

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01103

稳定沉默 CXCR4 表达的肾癌 A498 细胞株的构建

王林辉¹△, 黄霆²△, 杨庆¹, 陈伟¹, 吴震杰¹, 孙颖浩^{1*}

1. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433
2. 解放军 81 医院泌尿外科, 南京 210000

[摘要] **目的** 应用 RNA 干扰技术降低肾癌 A498 细胞株的 CXCR4 基因表达水平, 并建立稳定转染细胞株。**方法** 针对 CXCR4 基因设计合成 siRNA, 转染肾癌 A498 细胞株, 采用 RT-PCR 法检测 CXCR4 基因表达变化, 根据有效干扰片段结果合成重组 shRNA 质粒, 稳定转染至 A498 细胞系并进行 G418 抗性筛选细胞株。采用 RT-PCR 和 Western 印迹法检测 CXCR4 mRNA 及蛋白表达水平, 应用流式细胞技术检测 CXCR4 shRNA 诱导 A498 细胞凋亡的效应, Transwell 试验检测细胞侵袭能力的改变。**结果** 将 CXCR4 重组 shRNA 质粒成功转染 A498 细胞后, 肾癌细胞内可见绿色荧光, 通过 G418 筛选, 获得了 CXCR4 基因沉默的 A498 细胞系, RT-PCR 及 Western 印迹检测证实该细胞系的 CXCR4 水平明显低于对照组的表达水平 ($P < 0.05$)。CXCR4 shRNA 组细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率及总凋亡率均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。Transwell 体外侵袭实验显示 CXCR4 shRNA 能明显抑制 A498 细胞的体外侵袭力 ($P < 0.05$)。**结论** 成功构建稳定沉默 CXCR4 表达的肾癌 A498 细胞株, 转染后的细胞凋亡率升高, 体外侵袭能力降低, 为后续研究奠定了基础。

[关键词] 短发夹 RNA; CXCR4; 肾癌细胞; 转染

[中图分类号] R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)10-1103-05

Establishment of a renal carcinoma cell line A498 with CXCR4 stably silenced

WANG Lin-hui¹△, HUANG Ting²△, YANG Qing¹, CHEN Wei¹, WU Zhen-jie¹, SUN Ying-hao^{1*}

1. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Urology, No. 81 Hospital of PLA, Nanjing 210000, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To establish a renal carcinoma cell line A498 with CXCR4 stably silenced by using RNAi technique. **Methods** We designed three sequence-specific small interfering RNAs (siRNA) targeting CXCR4 gene and transfected siRNA into renal carcinoma cell line A498; the change of CXCR3 gene expression was observed by RT-PCR. The effective siRNA sequence was used to construct the recombinant plasmid, which was used to transfect A498 cells by liposome. Then the stably CXCR4 silenced cell lines were screened by using G418. RT-PCR and Western blotting analysis were used to determine CXCR4 mRNA and protein expression. Flow cytometry was employed for determination of apoptosis in A498 cells. The invasion ability of cells was detected by transwell assay. **Results** Green fluorescence was seen in A498 cells transfected with recombinant shRNA plasmid. G418 screening yielded stably CXCR4-silenced A498 cell lines; RT-PCR and Western blotting analysis revealed that CXCR4 expression in CXCR4-shRNA group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). The early apoptotic rate, late apoptotic rate, and total apoptotic rate in the CXCR4-shRNA group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$); transwell assay showed that the cell invasion ability in the CXCR4-shRNA group was significantly decreased compared with that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** We have successfully established an A498 cell line with CXCR4 stably silenced; the cell line has a higher apoptotic rate and lower invasion ability, which paves a way for future research.

[Key words] short hairpin RNA; CXCR4; renal carcinoma cells; transfection

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(10):1103-1107]

肾细胞癌发病率在男性中占恶性肿瘤第 7 位, 发病率每年上升 2%~4%。外科手术是处理局限性

[收稿日期] 2011-06-22 **[接受日期]** 2011-09-13

[基金项目] 国家自然科学基金(30873030). Supported by National Natural Science Foundation of China(30873040).

[作者简介] 王林辉, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师. E-mail: wlhui@medmail.com.cn; 黄霆, 硕士, 主治医师. E-mail: huangting12b@gmail.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81873409, E-mail: sunyh@medmail.com.cn

肾癌的一个较好手段^[1-2],但转移性肾癌对化学治疗、激素治疗及放射治疗均反应较低,此类患者预后较差,高危患者的中位生存时间仅为7~15个月,5年生存率低于5%^[3]。因此,探索制定新的肿瘤治疗方案显得十分必要。趋化因子受体 CXCR4 属于 G 蛋白偶联受体超家族,与特异性配体基质细胞衍生因子 1(stromal cell-derived factor-1,SDF-1)相互作用后,参与了体内细胞生成和免疫反应等多种生理和病理过程。研究表明肿瘤患者中 CXCR4 表达水平与肿瘤局部复发、淋巴结转移及 3 年存活率密切相关^[4]。

因此,本研究采用 RNA 干扰技术降低肾癌 A498 细胞株的 CXCR4 基因表达水平并建立 A498 稳定转染细胞株,为进一步研究 CXCR4 基因在肾癌中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 人肾透明细胞癌 A498 细胞株购自中国医学科学院基础研究所细胞中心;胎牛血清购自 Hyclone 公司;MEM 培养液购自 Gibco 公司;胰酶消化液购自碧云天生物技术研究所;RNA-Mate 转染剂购自上海吉玛化学技术有限公司;Lipofectamine 2000 及反转录 ABI 试剂盒购自 Invitrogen 公司;一抗兔抗人 CXCR4 mAb 购自 ABcam 公司;二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 购自晶美生物公司;超级 ECL 发光试剂盒购自 Pierce 公司;Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒购自 Mibchem 公司;Transwell 侵袭小室购自 Corning 公司;PBS 缓冲液为实验室自配。

1.2 引物设计及合成 3 条小干扰 RNA 序列和无义 shRNA 阴性对照质粒由上海吉玛化学技术有限公司合成、纯化,根据人 CXCR4 基因序列(Gene ID: 7852)合成 siRNA330:sense 为 5'-AGA UAU ACA CUU CAG AUA ATT-3',anti-sense 为 5'-UUA UCU GAA GUG UAU AUC UTT-3';siRNA525:sense 为 5'-GAA GCA UGA CGG ACA AGU ATT-3',anti-sense 为 5'-UAC UUG UCC GUC AUG CUU CTT-3';siRNA751:sense 为 5'-GAG GCA GAU GAC AGA UAU ATT-3',anti-sense 为 5'-UAU AUC UGU CAU CUG CCU CTT-3';GAPDH siRNA:sense 为 5'-GUA UGA CAA CAG CCU CAA GTT-3',anti-sense 为 5'-CUU GAG GCU GUU GUC AUA CTT-3';阴性对照 N-Control siRNA:sense 为 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3',anti-sense 为 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'。在 GenBank 中行

Blast 证实 CXCR4 siRNA 仅与 CXCR4 基因相应位点匹配,N-Control siRNA 及 shRNA 阴性对照质粒核苷酸序列与任何已知哺乳动物基因无匹配;shRNA 重组 pGPU6/GFP/Neo 质粒由上海吉玛化学技术有限公司根据最有效干扰 CXCR4 水平 siRNA 片段序列合成。

1.3 细胞培养及 siRNA 瞬时转染 人肾癌 A498 细胞使用含 10%胎牛血清的 MEM 培养基在 37℃、5%CO₂饱和湿度培养箱中培养。实验分组为阴性对照转染无义 siRNA 组(标记为 N 组)和 GAPDH siRNA 组(标记为 G 组),3 种不同的 CXCR4 干扰组:siRNA330、siRNA525、siRNA751(分别标记为 330 组、525 组、751 组)和仅加转染剂的空白对照组(标记为 B 组),转染前 1 d,4 × 10⁴ 个细胞使用 0.5 ml 含 FBS 和抗生素的细胞培养基接种在 24 孔板上,观察应能在 24 h 内使细胞汇合达到 40%~70%;在 100 μl 的无血清培养基中稀释 1 μl siRNA,加入 3 μg RNA-Mate 试剂充分混合,室温放置 30 min,以便形成 siRNA/RNAi-Mate 复合物;再将 siRNA/RNAi-Mate 复合物加入培养基中,轻轻混匀,在 37℃温浴 24 h。

1.4 RT-PCR 检测 CXCR4 基因表达 采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,各组取等量 RNA,用反转录 ABI 试剂盒按说明书进行反转录,得到总 cDNA,然后进行 RT-PCR。CXCR4 引物序列:上游引物 5'-GGA AAA GAG GGG AGG AGA G -3';下游引物 5'-CAC TTC CAA TTC AGC AAG CA -3'。内参照为人 GAPDH,GAPDH 上游引物 5'-ACC ACC ATG AGA AGG CTG G-3';下游引物 5'-CTC AGT GTA GCC CAG GAT GC-3'。RT-PCR 条件:95℃变性 10 s,60℃退火 20 s,72℃延伸 1 min,30 个循环。每组重复 6 次。重组 pGPU6/GFP/Neo 质粒稳定转染细胞株检测 CXCR4 表达过程与此法相同,实验分组为转染无义 shRNA 重组质粒的阴性对照组(标记为 1 组)、仅转染 pGPU6/GFP/Neo 质粒的空载体对照组(标记为 2 组)、仅用转染剂的空白对照组(标记为 3 组)和转染有干扰片段重组质粒的 CXCR4 干扰组(标记为 4 组)。

1.5 重组质粒稳定转染 A498 细胞培养至 80%~90%融合时,用 PBS 洗涤 2 次,加入含 10%胎牛血清的 MEM 培养液,吹打使细胞形成单细胞悬液。按 5 × 10⁴ 细胞/孔的密度接种 96 孔板,混匀后于 37℃、5% CO₂ 培养 24 h。按 Lipofectamine 2000 转染盒说明书转染重组 pGPU6/GFP/Neo 质粒,0.5 μg 质粒相对约 2.4 μl 脂质体,Lipofectamine 2000 每孔剂量分别为 0.1 μl、0.25 μl、0.5 μl,转染

细胞在培养箱中温育 6 h 后,吸弃转染液,换以 10% 胎牛血清的 MEM 培养基继续培养。

1.6 构建稳定转染的 A498 细胞株 根据分级浓度法测量出 A498 细胞最低完全死亡的 G418 浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。待重组质粒稳定转染细胞生长至 85% 满视野时,用含 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 的完全培养液培养,筛选 30 d。100 μl 无菌枪头挑选单克隆,维持 G418 抗性培养,扩大培养,并用荧光显微镜观察细胞形态。

1.7 Western 印迹检测 CXCR4 蛋白的表达 实验分组为:转染有干扰片段重组质粒的 CXCR4 干扰组(标记为 1 组)、转染无义 shRNA 重组质粒的阴性对照组(标记为 2 组)、仅转染 pGPU6/GFP/Neo 质粒的空载体对照组(标记为 3 组)、仅用转染剂的空白对照组(标记为 4 组)。采用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,每孔上样 20 μl 进行 10% SDS-PAGE 分离,半干电转 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。一抗(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,二抗室温温育 2 h,ECL 显色并对 X 线片曝光,经显影定影处理后,胶片用凝胶成像分析系统拍照。

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡 用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,离心收集细胞,用 400 μl Binding Buffer 悬浮细胞,密度为 1×10^6 cells/ml。在细胞悬浮液中加入 5 μl Annexin V-FITC,轻轻混匀后于 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育 15 min 后加入 10 μl PI 后轻轻混匀继续于 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育 5 min,在 1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.9 Transwell 小室侵袭实验检测细胞侵袭能力 在含 10% 胎牛血清的 MEM 中培养 A498 细胞至对数生长期,加入无血清 MEM 继续培养 48 h,在预先铺有基质胶的 Transwell 小室的上室内加入 500 μl 无血清培养的 A498 细胞(1×10^5 /ml),下室内加入含有 20% 胎牛血清的 MEM 培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h 后,取出 Transwell 小室,PBS 溶液冲洗 3 次,棉签轻轻拭去微孔膜上层的细胞,0.1% 结晶紫染色 30 min,加入 200 μl 的 33% 乙酸溶液 10 min 后用酶标仪读取 540 nm 光密度(D)值。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件分析系统进行分析,组间统计差异采用 one-way ANOVA 检验,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测瞬时转染 CXCR4 基因表达水平 结果(图 1)表明:与对照组相比,设计合成 330、525、751 的 siRNA 干扰序列均使 A498 细胞 CXCR4

mRNA 表达水平下降,但 siRNA525 转染 A498 细胞的干扰效果最为明显($P < 0.05$),干扰效率约为 78%~82%,以 siRNA525 序列合成 shRNA 重组质粒用于后续稳定转染实验。

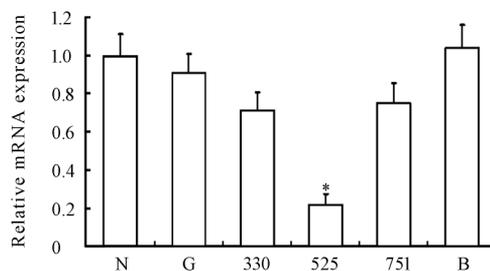


图 1 siRNA 对 CXCR4 mRNA 表达水平的干扰作用

Fig 1 Effect of siRNA interference on CXCR4 mRNA expression N: Negative control; G: GAPDH siRNA; 330: siRNA330; 525: siRNA525; 751: siRNA751; B: Blank-control group. * $P < 0.05$ vs control groups; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

2.2 稳定转染细胞的筛选 以 Lipofectamine 2000 为转染试剂稳定转染 shRNA 重组质粒,在一定范围内,转染效率随转染剂用量增加而略有提高(图 2),其转染最高效率在 90% 左右,在 0.5 μl /孔 Lipofectamine 2000 转染并用 G418 抗性培养后获得细胞株,荧光显微镜下观察 A498 细胞的状态及结构无特殊变化(图 3)。

2.3 RT-PCR 检测稳定转染细胞株 CXCR4 基因表达水平 RT-PCR 熔解曲线分析显示各组 PCR 产物的峰值比较集中(图 4A),说明所设计的引物有较强的特异性;CXCR4 干扰组较阴性对照组、转染空载体对照组、空白对照组的 CXCR4 mRNA 表达水平明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 4B)。

2.4 Western 印迹检测稳定转染细胞株 CXCR4 基因蛋白表达水平 Western 印迹条带经扫描后计算灰度值,结果显示 CXCR4 干扰组较阴性对照组、转染空载体对照组、空白对照组的 CXCR4 蛋白表达水平明显下降(图 5),证实稳定沉默 CXCR4 表达的肾癌 A498 细胞株构建成功。

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡水平 结果(表 1)显示: CXCR4 干扰组较阴性对照组、转染空载体对照组、空白对照组的细胞凋亡率升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 Transwell 小室侵袭实验 结果(图 6)显示: CXCR4 干扰组较阴性对照组、转染空载体对照组、空白对照组的细胞体外侵袭能力降低,各组测得 540 nm D 值分别为 0.52 ± 0.05 、 0.94 ± 0.04 、 0.88 ± 0.03 、 0.96 ± 0.08 ,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

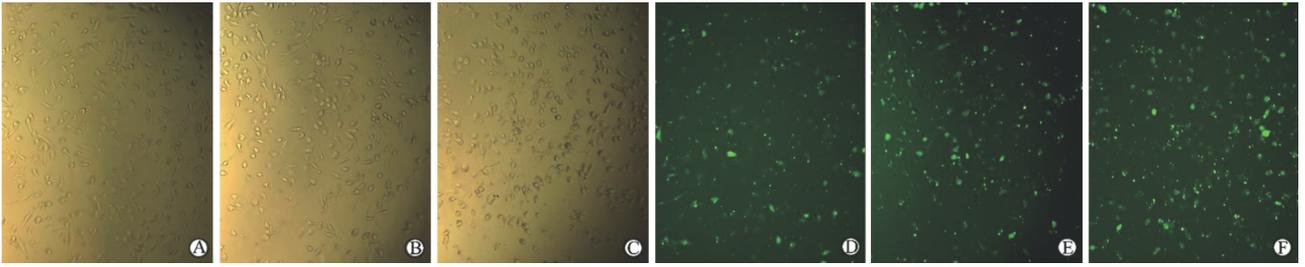


图2 不同浓度转染剂下稳定转染 A498 细胞效果

Fig 2 Effect of stable transfection with different concentrations of Lipofectamine

Lipofectamine 2000 reagent consumption. A,D: 0.1 μ l per pore; B,E: 0.25 μ l per pore; C,F: 0.5 μ l per pore. A-C: Light microscopy image; D-F: Fluorescent microscopy image. Original magnification: $\times 40$

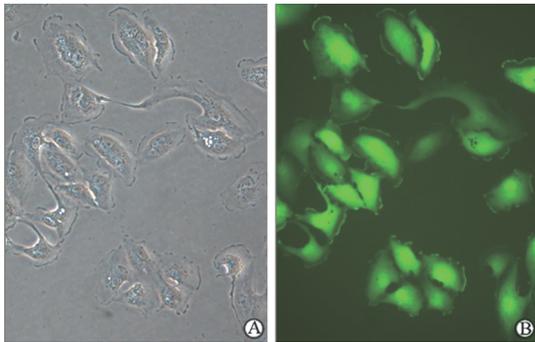


图3 稳定转染重组 shRNA 质粒的 A498 细胞株

Fig 3 A498 cell lines stably transfected with shRNA plasmid

Lipofectamine 2000 reagent consumption. A: Light microscopy; B: Fluorescent microscopy. Original magnification: $\times 200$

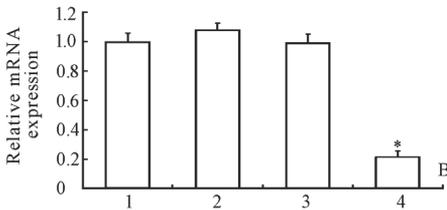
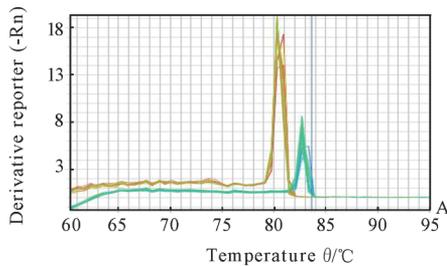


图4 RT-PCR 熔解曲线(A)及稳定转染重组质粒 A498 细胞 CXCR4 基因 mRNA 表达水平(B)

Fig 4 RT-PCR melt curve (A) and CXCR4 gene expression level in A498 cells stably transfected with recombinant plasmid (B)

1: Negative shRNA control group; 2: Empty pGPU6/GFP/Neo plasmid vector control group; 3: Blank-control group; 4: CXCR4 shRNA group. * $P < 0.05$ vs control groups; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

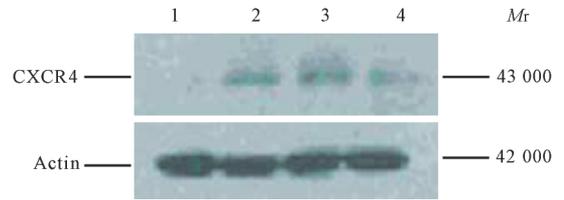


图5 稳定转染重组质粒 A498 细胞 CXCR4 蛋白表达水平

Fig 5 CXCR4 protein expression in A498 cells stably transfected with the recombinant plasmid

1: CXCR4-shRNA group; 2: Negative shRNA control group; 3: Empty pGPU6/GFP/Neo plasmid vector control group; 4: Blank control group

表1 CXCR4 基因表达降低对 A498 细胞凋亡的影响

Tab 1 Effect of CXCR4 gene depletion on A498 cell apoptosis

Groups	Apoptosis rate (%)		
	Early phase	Late phase	Total
Negative control	3.65 \pm 0.21	8.06 \pm 0.48	11.72 \pm 0.47
Vector-control	3.58 \pm 0.16	7.41 \pm 0.34	10.99 \pm 0.38
Blank-control	4.53 \pm 0.32	8.28 \pm 0.58	12.83 \pm 0.69
CXCR4 shRNA	17.74 \pm 0.31*	15.01 \pm 0.26*	32.76 \pm 0.38*

* $P < 0.05$ vs control groups; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

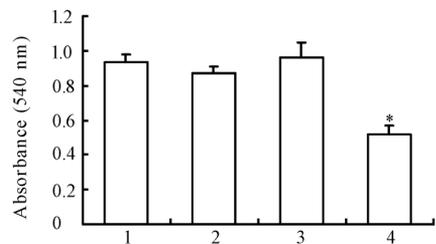


图6 各组细胞侵袭能力的比较

Fig 6 Comparison of cell invasion abilities among the four groups

1: Negative shRNA control group; 2: Empty pGPU6/GFP/Neo plasmid vector control group; 3: Blank-control group; 4: CXCR4 shRNA group. * $P < 0.05$ vs control groups; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

3 讨 论

CXCR4 是肿瘤细胞中常见的趋化因子受体之一, 编码 352 个氨基酸且特异性结合趋化因子 SDF-1, 在免疫组织化学研究中发现肾癌表达 CXCR4 的水平明显高于癌旁正常肾脏组织^[5], 还有学者报道癌灶组织的 CXCR4 表达水平与肾癌患者的淋巴结、肝、肺转移、病理分级及临床 TNM 分期等有一定的相关联系^[6], 提示高表达 CXCR4 的肾细胞癌与肿瘤的高侵袭性有密切关系。我们在前期实验中发现过表达 CXCR4 的 A498 细胞侵袭性明显强于正常的 A498 细胞, 更进一步证实了 CXCR4 的表达水平在肾癌肿瘤转移的过程中扮演重要的角色^[7]。国外学者报道 A498 细胞株的 CXCR4 表达水平高于 CAKI-1、786-0、KTC-26 等肾癌细胞株^[8], 因此本实验选择 A498 细胞为研究对象建立稳定下调 CXCR4 表达水平的细胞株。

由于 RNAi 具有高度的序列专一性和有效的干扰, 可以特异地将特定的基因沉默, 从而获得基因功能丧失或基因表达量降低, 已成为功能基因组学的一种强有力的研究工具^[9]。大量实验表明, 针对同一靶基因的不同 siRNA 序列具有不同的沉默效率^[10], 为了能够运用 RNAi 技术更有效地沉默靶基因, 本实验构建了 3 条针对 CXCR4 的 siRNA, 并证实均能不同程度地抑制肾癌 A498 细胞株 CXCR4 mRNA 表达水平, 其中编号为 525 的 siRNA 抑制效率最高, 可将其序列用于后续基因功能的研究。对于一个已知有效的 siRNA 序列, 需要维持较长时间的基因沉默时, 常使用基于质粒载体的 shRNA 系统^[11]。shRNA 通过质粒载体导入细胞后, 利用细胞内的酶切机制得到 siRNA 而最终发挥 RNA 干扰作用。shRNA 最大的优势是利用载体上的抗生素标记可以建立相对稳定的长期基因沉默细胞株, 或通过病毒插入基因组中从而得到稳定的基因沉默表达株^[12]。

本实验在体外证实了所设计合成的 RNA 干扰序列可有效地抑制肾癌 A498 细胞中 CXCR4 的转录及蛋白表达, 说明基于质粒载体的 shRNA 稳定转染的 A498 细胞株构建成功。实验中还发现转染 CXCR4 shRNA 重组质粒后的 A498 细胞凋亡率明显升高, 并且 CXCR4 shRNA 能明显抑制 A498 细胞的体外侵袭能力, 提示 CXCR4 正向调节肾癌 A498 细胞的增殖生长。我们前期研究发现 CXCR4 在进行细胞核转位后其核内表达水平与肾癌转移及侵袭能力密切相关^[7], 但目前尚不清楚 CXCR4 转移至细胞核具体激活了哪些蛋白或 DNA, 因此本实验

所成功构建的稳定转染细胞株将为进一步研究 CXCR4 细胞核内转移中信号转导的机制, 以及应用 RNAi 技术靶向治疗转移性肾癌等研究奠定了初步的工作基础。

[参 考 文 献]

- [1] Ljungberg B, Cowan N C, Hanbury D C, Hora M, Kuczyk M A, Merseburger A S, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update[J]. *Eur Urol*, 2010, 58:401-402.
- [2] 王林辉, 王 梁, 杨 庆, 杨 波, 吴震杰, 陈 伟, 等. 肾细胞癌治疗单中心临床分析(1995-2009 年)[J]. *第二军医大学学报*, 2011, 32:929-934.
Wang L H, Wang L, Yang Q, Yang B, Wu Z J, Chen W, et al. Treatment of renal cell carcinoma: a single center clinical analysis (1995-2009)[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2011, 32:929-934.
- [3] Cohen H T, McGovern F J. Renal cell carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353:2477-2490.
- [4] Haviv Y S, van Houdt W J, Lu B, Curiel D T, Zhu Z B. Transcriptional targeting in renal cancer cell lines *via* the human CXCR4 promoter[J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3:687-691.
- [5] Zagzag D, Krishnamachary B, Yee H, Okuyama H, Chiriboga L, Ali M A, et al. Stromal cell-derived factor-1alpha and CXCR4 expression in hemangioblastoma and clear cell-renal cell carcinoma: von Hippel-Lindau loss-of-function induces expression of a ligand and its receptor[J]. *Cancer Res*, 2005, 65:6178-6188.
- [6] Wehler T C, Graf C, Biesterfeld S, Brenner W, Schadt J, Gockel I, et al. Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by renal cell carcinoma correlates with advanced disease[J]. *J Oncol*, 2008, 2008:626340.
- [7] Wang L, Wang Z, Yang B, Yang Q, Wang L, Sun Y. CXCR4 nuclear localization follows binding of its ligand SDF-1 and occurs in metastatic but not primary renal cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2009, 22:1333-1339.
- [8] Jones J, Marian D, Weich E, Engl T, Wedel S, Relja B, et al. CXCR4 chemokine receptor engagement modifies integrin dependent adhesion of renal carcinoma cells[J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313:4051-4065.
- [9] Obbard D J, Jiggins F M, Halligan D L, Little T J. Natural selection drives extremely rapid evolution in antiviral RNAi genes[J]. *Curr Biol*, 2006, 16:580-585.
- [10] 李劲涛, 杨 军, 张秀丽, 谭 兴. RNAi 最新研究概况[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, 23:1077-1079.
- [11] Yu J Y, DeRuiter S L, Turner D L. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:6047-6052.
- [12] Michel U, Malik I, Ebert S, Bähr M, Kügler S. Long-term *in vivo* and *in vitro* AAV-2-mediated RNA interference in rat retinal ganglion cells and cultured primary neurons[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 326:307-312.