

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00354

· 论 著 ·

## TIEG 特异 siRNA 对糖基化终末产物介导的肾小管上皮细胞 Smad2 表达的影响

叶礼红<sup>1</sup>, 舒晓春<sup>1</sup>, 鲁红云<sup>1</sup>, 胡芳<sup>1</sup>, 孙辽<sup>1\*</sup>, 肖海鹏<sup>2\*</sup>

1. 中山大学附属第五医院内分泌科, 珠海 519000

2. 中山大学附属第一医院内分泌科, 广州 510600

**[摘要]** **目的** 以 RNA 干扰技术沉默 TGF- $\beta$  诱导早期基因(TIEG)的表达, 观察 TIEG 沉默对糖基化终末产物(AGEs)介导的肾小管上皮细胞 Smad2 表达的影响。**方法** 以 pshRNA-copGFP-lentivector 作为载体, 构建含 TIEG 特异 siRNA 的慢病毒载体 psiRNA-TIEG, 将其转染至大鼠近端肾小管上皮细胞(NRK52E), 然后给予糖基化修饰的牛血清白蛋白(AGE-BSA)刺激 24 h 和 48 h, 采用 PCR 方法测定其 TIEG mRNA、Smad2 mRNA 表达水平, 蛋白免疫印迹法测定 Smad2 蛋白表达水平。以转染空质粒载体组作为对照。**结果** TIEG 特异的 siRNA 可有效下调 AGEs 诱导的 TIEG mRNA、Smad2 mRNA 和蛋白表达, 与空质粒载体组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** TIEG 的沉默能有效抑制 AGEs 介导的 NRK52E 细胞 Smad2 mRNA 和蛋白的表达。

**[关键词]** TIEG; RNA 干扰; 肾小管上皮细胞; Smad2; 慢病毒载体**[中图分类号]** R 587.24 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)04-0354-05

## Effect of siRNA targeting TGF- $\beta$ inducible early gene on expression of advanced glycation end products-mediated Smad2 in renal tubular epithelial cells

YE Li-hong<sup>1</sup>, SHU Xiao-chun<sup>1</sup>, LU Hong-yun<sup>1</sup>, HU Fang<sup>1</sup>, SUN Liao<sup>1\*</sup>, XIAO Hai-peng<sup>2\*</sup>

1. Department of Endocrinology, The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Zhuhai 519000, Guangdong, China

2. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510600, Guangdong, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of siRNA targeting TGF- $\beta$  inducible early gene (TIEG) on expression of Smad2 in advanced glycation end products (AGEs)-mediated renal tubular epithelial cells. **Methods** The pshRNA-copGFP-lentivector containing target gene was used as a vector to construct siRNA-TIEG, which was then transfected into normal rat proximal tubular epithelial cells(NRK52E), which were then cultured in RPMI 1640 medium supplemented with AGE-BSA for 24 h and 48 h. The expression of Smad2 mRNA and protein was examined by PCR, Western blotting analysis, respectively. Blank vector group served as control. **Results** SiRNA-TIEG significantly reduced the expression of TIEG mRNA, Smad2 mRNA and Smad2 protein in normal rat proximal tubular epithelial cells in presence of AGE-BSA compared with those in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Silence of TIEG can effectively inhibit the expression of Smad2 mediated by AGEs in NRK52E cells.

**[Key words]** TIEG; RNA interference; tubular epithelial cells; Smad2; lentiviral vector

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(4):354-358]

高糖可以诱导肾小管上皮细胞和系膜细胞 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路活化<sup>[1]</sup>, 表明 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路在糖尿病肾病发病中具有重要作用。TGF- $\beta$  诱导早期基因(TGF- $\beta$  inducible early gene,

TIEG)产物属于 SP1 样蛋白家族的新成员, 是 TGF- $\beta$  诱导的早期转录因子蛋白, 参与调节 TGF- $\beta$  靶基因的表达。TIEG 通过促进正反馈 Smad 效应、抑制负反馈 Smad 效应增强 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路活

**[收稿日期]** 2009-08-20 **[接受日期]** 2009-12-18**[基金项目]** 国家自然科学基金(30470812), 珠海市科技计划项目(PC20071006). Supported by National Natural Science Foundation of China (30470812) and Science and Technology Project of Zhuhai City(PC20071006).**[作者简介]** 叶礼红, 硕士, 副主任医师。

\* 通讯作者(Corresponding authors). Tel: 0756-2528741, E-mail: ylh2298797@qq.com; Tel: 020-87331240, E-mail: xiaohp@mail.sysu.edu.cn

性<sup>[2-3]</sup>。阻抑 TIEG 的生物学效应为 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路异常活化相关的糖尿病肾病提供了一个新的治疗策略。近年来, RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术的出现, 为研究内源性基因功能和信号转导途径以及特异性的基因治疗提供了新的技术手段。我们在已经获取 TIEG 的 RNAi 有效靶序列的基础上, 设计并构建了 TIEG siRNA 的慢病毒载体, 采用糖基化终末产物 (AGEs) 模拟糖尿病体内环境, 初步观察该环境下 TIEG siRNA 对肾小管上皮细胞 Smad2 的影响, 为后期研究 TIEG 在糖尿病肾病中的作用机制和基因治疗提供实验依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 慢病毒载体系统、VEC (Rat vascular endothelial cell) 细胞、NRK52E 细胞购自上海倍尼菲生物科技有限公司, 大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ 、QIAGEN Plasmid Mini Kit、转染试剂 Opti-MEM 购自 Gibco 公司, 限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶购自大连宝生物工程技术有限公司, 大量质粒 DNA 提取试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司, Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司, 化学试剂购自 Sigma 公司。糖基化修饰的牛血清白蛋白 (AGE-BSA) 购自 Calbiochem, RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 MBI Fermentas 公司, LSA-B<sup>®</sup> + System (DAKO 公司), TRIzol Reagent (Invitrogen life technologies 公司), RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit、10 mmol/L dNTP Mix、Taq DNA 聚合酶购自 MBI Fermentas 公司, 兔抗大鼠 Smad2 抗体购自 Abcam 公司, 驴抗兔二抗购自 Santa Cruz 公司。

紫外分光光度计 (BioPhotometer, Eppendorf, 德国), 电泳仪 (EPS-300, TANON), Real-time PCR 仪 (TP800, TaKaRa 公司), 台式离心机 (5415D, Eppendorf 公司), 超净工作台 (CA-920-3, 上海净化设备厂), 凝胶成像和化学发光分析系统 (Alpha Fluorchem™ 8900, 美国), Axioplan 全自动显微镜 (Zeiss, 德国), Helser UP200S 超声细胞粉碎仪 (德国), 核酸-微量蛋白测定仪 (Biophotometer, Eppendorf, 德国)。

### 1.2 psiRNA 慢病毒载体的构建和鉴定

1.2.1 psiRNA 慢病毒载体的构建 根据 TIEG (GenBank NM\_031135) 基因信息由上海倍尼菲生物科技有限公司设计、合成 3 条针对 TIEG shRNA 的寡核苷酸序列。siRNA1: GCT TCT CTC CAG CAA GCT T (位于目的基因的第 331 位), siRNA2: CCG TCC CAG CAT TCT GTT (位于目的基因的

第 569 位), siRNA3: ACA ACT CTC TCG TTA CCA C (位于目的基因的第 1 158 位), Negative: CGT TTA ACT CTC CCA ACC A, 其 shRNA 的 DNA Oligo 5'-GAT CCG CCG TCC CAG CAT TCT GTT TCT TCC TGT CAG AAA ACA GAA TGC TGG GAC GGT TTT TG-3' (内含 BamH I 和 EcoR I 酶切位点)。根据每条 siRNA 序列, 设计两条互补的 DNA 模板单链, 经退火形成双链 DNA, 与经 BamH I 和 EcoR I 双酶切后的 pshRNA-copGFP-lentivector 慢病毒载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑取重组阳性克隆行 PCR 及测序鉴定 (上海英骏生物技术有限公司)。

1.2.2 psiRNA 沉默效应的鉴定 使用 QIAGEN Plasmid Mini Kit (Cat. No: 12123) 进行不含内毒素质粒的提取, 挑选生长状况良好的 VEC 细胞, 10 cm 培养皿生长密度达到 70% 时接种, 密度为  $1.5 \times 10^6$  个/孔, 接种 6 孔板; 24 h 后观察, 贴壁细胞密度为 80%; 吸去旧培养液, 分别添加 1 ml 新鲜的含 10% FBS 的 DMEM 培养液; 依据 Lipofectamine2000 说明书进行转染实验; 转染 24 h 观察, 细胞形态较好, 贴壁密度可达到 90%, 通过荧光显微镜观察实验组转染效率可达 80%, 换液; 48 h 后观察, 细胞形态较好, 贴壁密度可达到 90%, 通过荧光显微镜观察实验组转染效率可达 90%, 荧光表达略有增强; 提取总 RNA, 使用 Real-time PCR 的方法在目的细胞中进行有效 siRNA 序列的筛选。与对照组比较, 设计的 3 条 siRNA 构建的慢病毒载体转染 VEC 细胞后, 均能不同程度抑制目的基因 TIEG 的转录, 其中以 2 号基因沉默的作用最强, 其抑制效应约为 80%。

1.3 细胞培养及分组 (1) NRK52E 细胞分组: 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液培养 NRK52E 细胞 70% 贴壁后换无血清培养液, 24 h 后更换培养液并加用 AGE-BSA 或 BSA 刺激, 根据加用刺激物的不同分为 AGEs 组 (AGE-BSA 200  $\mu$ g/ml) 和 BSA 对照组 (BSA 200  $\mu$ g/ml); (2) 转染 NRK52E 细胞分组: 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液于 10 cm 培养皿常规培养细胞, 生长密度达到 70% 时接种, 以密度  $1.5 \times 10^6$  个/孔接种 6 孔板, 待贴壁细胞密度为 80%, 依据 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明, 用 siRNA2 或空载体质粒转染 NRK52E 细胞, 转染 24 h 后更换培养液并加入 AGE-BSA (200  $\mu$ g/ml) 刺激, 根据转染载体不同分为 siRNA 转染组和空载体组。

1.4 RT-PCR 检测细胞中 Smad2 和 TIEG mRNA 表达 根据 TRIzol 试剂盒说明提取细胞总 RNA, 反转录反应按 RevertAid™ First Strand cDNA Syn-

thesis Kit 试剂盒说明操作。PCR 引物用 Primer5 软件设计,由上海博亚生物技术有限公司合成。引物序列:GAPDH sense 5'-GGC AAG TTC AAT GGC ACA GT-3', antisense 5'-AAG GTG GAG GAA TGG GAG TT-3',目的基因长度 725 bp;Smad2 sense 5'-CTG CGA ATA CGC TTT CAG TCT G-3',antisense 5'-AAG CCG TCT ACA GTG AGT GAG-3',目的基因长度 462 bp;TIEG sense 5' - TCC GGA GAA GAA CCC ACA TAA AT-3',antisense 5'- GAG GAA GGC ACA GCA AAG TCA TAC-3',目的基因长度 154 bp。PCR 扩增产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳后,凝胶成像仪下观察、拍照。

1.5 蛋白免疫印迹法检测 Smad2 蛋白表达 加 TGF-β<sub>1</sub> 10 ng/ml 刺激细胞 0、48、72 h 后,弃去刺激后的各组细胞培养液,经裂解、粉碎、离心处理,得到细胞总蛋白,按样品:缓冲液=4:1 配制最低浓度样品,沸水浴 10 min,进行电泳,每孔上样 10 20 μl,电泳后经转膜仪转膜,以免抗大鼠 Smad2 抗体(1:500)为一抗进行杂交;二抗为辣根过氧化物酶

(HRP)标记的驴抗兔抗体(1:1 000)。经发光剂中 A、B 液作用,X 线片放射自显影。显影后自动洗片机洗片。

1.6 统计学处理 统计处理通过 SPSS 11.5 软件完成。所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TIEG siRNA 对 AGEs 诱导的 NRK52E 细胞 TIEG mRNA 表达的影响 PCR 结果表明,AGEs 以时间依赖性方式上调 NRK52E 细胞 TIEG mRNA 表达,TIEG mRNA 于 AGEs 刺激 24 h 明显增加,48 h 达到高峰,与刺激前和 BSA 对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,图 1)。TIEG siRNA 能有效沉默 AGEs 诱导的 NRK52E 细胞 TIEG 基因表达,尽管其沉默效应不能达到刺激前水平,但 TIEG mRNA 表达水平于 AGE 刺激 24 h 和 48 h 较空载体组明显下调( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,图 2)。

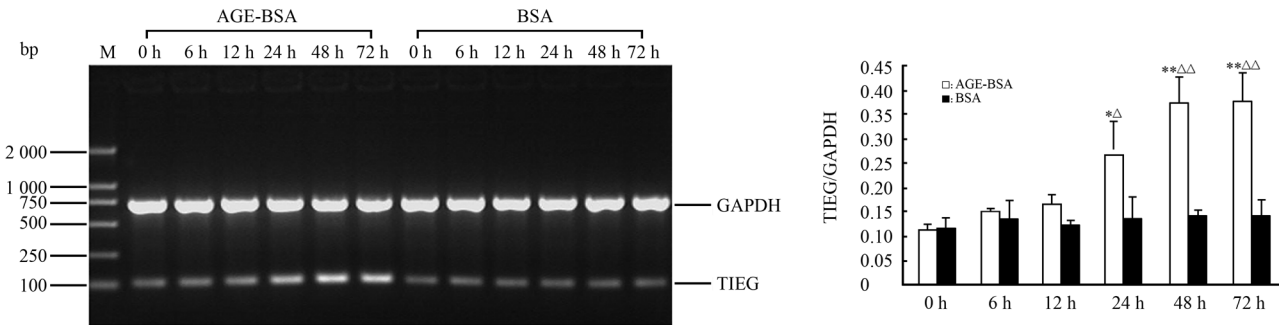


图 1 AGE-BSA 对 NRK52E 细胞 TIEG mRNA 表达的影响

Fig 1 Expression of TIEG mRNA in NRK52E cells induced by AGE-BSA

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0 h;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs BSA group

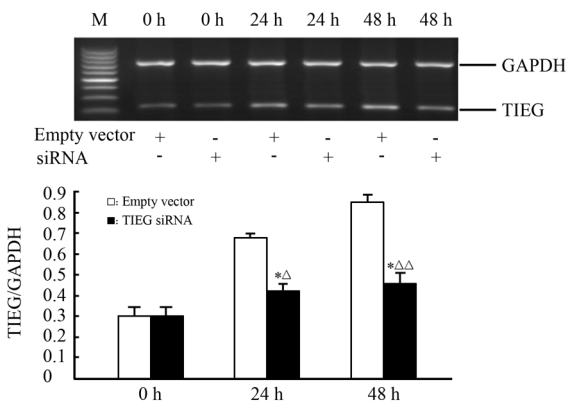


图 2 TIEG siRNA 对 AGE-BSA 介导

NRK52E 细胞 TIEG mRNA 表达的沉默效应

Fig 2 Silent function of TIEG siRNA on TIEG mRNA in AGEs-mediated NRK52E cells

\*  $P < 0.05$  vs 0 h;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs empty vector group

2.2 TIEG siRNA 对 AGEs 诱导的 NRK52E 细胞 Smad2 mRNA 和蛋白表达的影响 PCR 结果和蛋白免疫印迹结果显示,AGEs 以时间依赖方式上调 NRK52E 细胞 Smad2 mRNA 和蛋白表达,AGEs 刺激 NRK52E 细胞 24 h 和 48 h 后,Smad2 mRNA 和蛋白的表达均明显升高,与刺激前相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),刺激 48 h 时其表达水平与同时时间点的 BSA 对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,图 3、图 4)。

以 RNA 干扰技术使 TIGE 沉默后,AGEs 介导的 NRK52E 细胞 Smad2 mRNA 和蛋白表达均明显下调,AGEs 刺激 24 h 和 48 h,其 Smad2 mRNA 和蛋白表达水平与空载体组及刺激前比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ;图 5、图 6)。

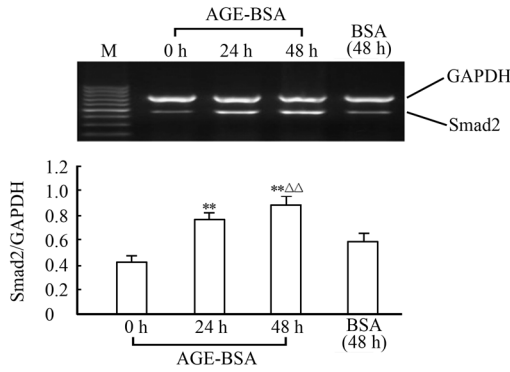


图 3 AGE-BSA 对 NRK52E 细胞 Smad2 mRNA 表达的影响

Fig 3 Expression of Smad2 mRNA in NRK52E cells induced by AGE-BSA

\*\*  $P < 0.01$  vs 0 h;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs BSA(48 h) group

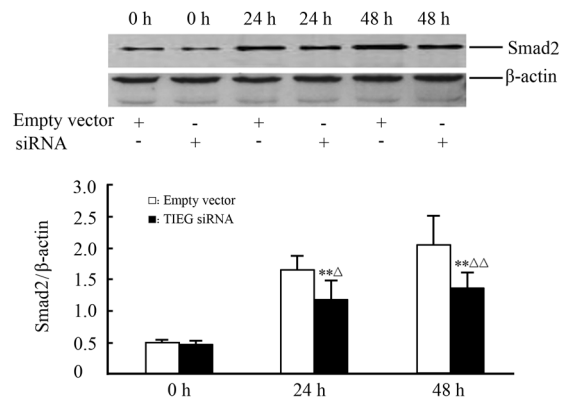


图 6 TIEG siRNA 对 AGE-BSA 介导 NRK52E 细胞 Smad2 蛋白表达的影响

Fig 6 Effect of TIEG siRNA on expression of Smad2 protein in AGEs-mediated NRK52E cells

\*\*  $P < 0.01$  vs 0 h;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs empty vector group

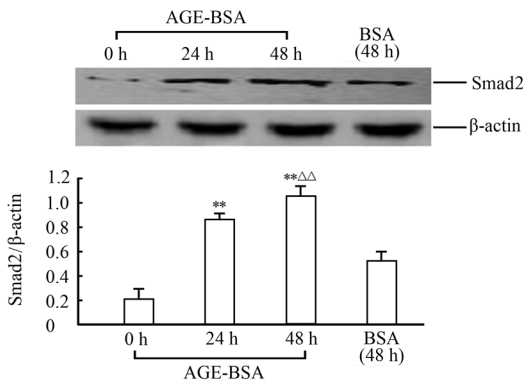


图 4 AGE-BSA 对 NRK52E 细胞 Smad2 蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of AGE-BSA on expression of Smad2 protein in NRK52E cells

\*\*  $P < 0.01$  vs 0 h;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs BSA(48 h) group

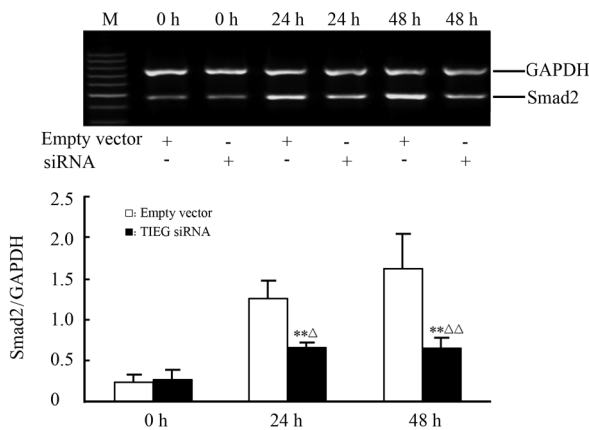


图 5 TIEG siRNA 对 AGE-BSA 介导 NRK52E 细胞 Smad2 mRNA 表达的影响

Fig 5 Effect of TIEG siRNA on expression of Smad2 mRNA in AGEs-mediated NRK52E cells

\*\*  $P < 0.01$  vs 0 h;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs empty vector group

### 3 讨论

高血糖糖毒性是糖尿病慢性并发症的重要原因之一,高糖可以促进肾小管上皮细胞内源性 TGF- $\beta$  合成,上调 Smad2/3 核表达水平。研究表明,高糖诱导肾小管上皮细胞 Smads 信号通路活化依赖于 TGF- $\beta$  效应<sup>[4]</sup>。AGEs 是糖与蛋白质、脂质及核酸中的氨基发生非酶糖基化的反应产物,研究表明体外修饰的 AGE-蛋白的结构性决定簇也存在于糖尿病患者血清,主要为葡萄糖修饰的 AGE (glu-AGE)<sup>[5]</sup>。因此,本研究应用 D-葡萄糖和牛血清白蛋白制备的 AGE-BSA 进行体外实验,能模拟糖尿病体内环境。

TGF- $\beta$ /Smads 信号通路活化在肾脏纤维化进程中发挥重要作用,主要是通过诱导 Smad2/Smad3 的活化从而促进细胞向肾小管上皮肌成纤维细胞转型,最终致肾脏纤维化<sup>[6]</sup>。本课题组以往的研究表明,AGE-BSA 以剂量依赖方式促进 Smad2/3 的磷酸化和核转位,明显增高 TGF- $\beta_1$  蛋白的水平,同时上调 Smad7 mRNA 的表达<sup>[7]</sup>。Smad7 可以通过与 Smad2 和 Smad3 竞争结合 TGF- $\beta$  I 型受体磷酸化结合位点,抑制 Smad2 和 Smad3 磷酸化和核转位,并通过与 Smurf2 结合后形成 E3 泛醌素连接酶参与 TGF- $\beta$  受体的降解,从而抑制 TGF- $\beta$ /Smads 信号通路的活化<sup>[8]</sup>。通过有效干预使 Smad2 水平下降,将有助于阻止肾脏纤维化。

TIEG 属于 TGF- $\beta$  诱导的早期基因表达的 Kruppel 样转录因子<sup>[9]</sup>,在一些 TIEG 转染的肿瘤细胞系的研究中表明,TIEG能够模拟 TGF- $\beta$ /Smads

信号通路的生物学效应,通过 Microarray 方法分析表明 TIEG 增强 Smads 信号通路的作用是通过上调 Smad2 基因转录、抑制 Smad7 启动子附近特殊的反应元件实现的<sup>[2-3]</sup>,提示 TIEG 可通过促进正反馈 Smad 效应、抑制负反馈 Smad 效应增强 TGF-β/Smads 信号通路活性。抑制或封闭 TIEG 的生物学效应,通过下调正调节 Smad 信号蛋白和上调负调节 Smad 信号蛋白的双重作用,可能会有效地抑制 Smad 信号通路的活化。本研究应用 RNA 干扰技术特异抑制 TIEG 的表达,旨在寻找抑制 TGF-β/Smads 信号通路活性的靶点。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是近年发展起来的一项新的分子生物学技术,可以简单、有效、特异地下调细胞中基因功能,为特异性基因治疗提供了新的技术手段<sup>[10]</sup>,目前已广泛应用于各种细胞生物中特定基因及蛋白功能研究<sup>[11-12]</sup>。慢病毒载体具有感染低分裂潜能细胞、转移基因片段容量较大、目的基因表达时间长、不易诱发宿主免疫反应、整合目的基因至靶细胞基因组并可以长期稳定表达等优点<sup>[13-16]</sup>,是目前应用最广泛的 RNA 干扰病毒载体。本研究针对大鼠 TIEG 基因设计了 3 条 siRNA 序列,通过鉴定并筛选出 TIEG 基因沉默效应最强的 2 号 siRNA 序列质粒,然后进行 NRK52E 细胞转染。结果表明 TIEG siRNA 能有效沉默 AGEs 诱导的 TIEG mRNA 表达, TIEG 沉默可有效下调 AGEs 诱导的 NRK52E 细胞 Smad2 mRNA 和蛋白的表达水平,说明 TIEG 沉默能有效抑制 AGEs 诱导的 Smad2 信号通路的活化。

肾小管上皮细胞转分化及其细胞外基质的过度合成是其在糖尿病肾病发病与进展中病理效应的体现。TIEG 基因沉默是否通过抑制 Smad2 和 Smad3 的磷酸化和向细胞核内转位,上调 AGEs 诱导的肾小管上皮细胞 Smad7 的表达,抑制 TGF-β 的作用,进而抑制肾小管上皮细胞转分化及细胞外基质的过度合成是本课题组后续研究的内容。

[参考文献]

[1] Li J H, Zhu H J, Huang X R, Lai K N, Johnson R J, Lan H Y. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-beta on renal tubular epithelial cells by blocking smad2 activation[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13: 1464-1472.  
 [2] Johnsen S A, Subramaniam M, Katagiri T, Janknecht R, Spelsberg T C. Transcriptional regulation of Smad2 is required for enhancement of TGFbeta/Smad signaling by TGFbeta inducible early gene[J]. Cell Biochem, 2002, 87: 233-241.

[3] Johnsen S A, Subramaniam M, Janknecht R, Spelsberg T C. TGFbeta inducible early gene enhances TGFbeta/Smad-dependent transcriptional responses [J]. Oncogene, 2002, 21: 5783-5790.  
 [4] 孙 辽. 高糖通过 TGF-β1/Smad 信号通路介导肾小管上皮细胞转分化[J]. 现代预防医学, 2009, 36: 709-716.  
 [5] Takeuchi M, Makita Z, Yanagisawa K, Kameda Y, Koike T. Detection of noncarboxymethyllysine and carboxymethyllysine advanced glycation end products (AGE) in serum of diabetic patients[J]. Mol Med, 1999, 5: 393-405.  
 [6] 史 伟, 何朝生, 刘双信, 梁馨苓, 叶智明, 梁永正, 等. 转化生长因子 β1 及 Smad 信号转导通路在肾小球硬化中的作用[J]. 中华肾脏病杂志, 2005, 21: 270-273.  
 [7] 孙 辽, 余学清, 祝胜郎, 陈文芳, 李晓艳, 贾占军, 等. AGEs 对肾小管上皮细胞转分化、I 型胶原合成及 Smad 信号通路的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22: 2429-2433.  
 [8] Kavsak P, Rasmussen R K, Causing C G, Bonni S, Zhu H, Thomsen G H, et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation[J]. Mol Cell, 2000, 6: 1365-1375.  
 [9] Chin D, Boyle G M, Parsons P G, Coman W B. What is transforming growth factor-beta (TGF-beta) [J]? Br J Plast Surg, 2004, 57: 215-221.  
 [10] 杨 媛, 王 蒙, 粟永萍. RNAi 作用机制研究进展及其应用[J]. 免疫学杂志, 2005, 21: 543.  
 [11] Shi W, Sun C, He B, Xiong W, Shi X, Yao D, et al. GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor [J]. J Cell Biol, 2004, 164: 291-300.  
 [12] Koinuma D, Shinozaki M, Komuro A, Goto K, Saitoh M, Hanyu A, et al. Arkadia amplifies TGF-beta superfamily signalling through degradation of Smad7 [J]. EMBO J, 2003, 22: 6458-6470.  
 [13] Jazag A, Ijichi H, Kanai F, Imamura T, Guleng B, Ohta M, et al. Smad4 silencing in pancreatic cancer cell lines using stable RNA interference and gene expression profiles induced by transforming growth factor-beta [J]. Oncogene, 2005, 24: 662-671.  
 [14] Ijichi H, Otsuka M, Tateishi K, Ikenoue T, Kawakami T, Kanai F, et al. Smad4-independent regulation of p21/WAF1 by transforming growth factor-beta [J]. Oncogene, 2004, 23: 1043-1051.  
 [15] Imamura T, Kanai F, Kawakami T, Amarsanaa J, Ijichi H, Hoshida Y, et al. Proteomic analysis of the TGF-beta signaling pathway in pancreatic carcinoma cells using stable RNA interference to silence Smad4 expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 318: 289-296.  
 [16] 唐红卫, 潘阳林, 聂勇战, 孟凡平, 谢华红, 王 均, 等. Osteopontin 特异性 siRNA 真核表达载体的构建及其在 GC9811 胃癌细胞中沉默效应的鉴定[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26: 202-205.

[本文编辑] 孙 岩