

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.07.0799

RNA 干扰 p38 基因对肾癌 786-O 细胞生物学特性的影响及对舒尼替尼的增敏作用

陈俊明^{1,2Δ}, 吴登爽^{1Δ}, 王志向^{1,3}, 吴震杰¹, 刘冰¹, 鲍一¹, 叶华茂⁴, 杨庆⁴, 曲乐^{1,5}, 王林辉^{1*}

1. 第二军医大学长征医院泌尿外科, 上海 200003

2. 武警河南总队医院泌尿外科, 郑州 450052

3. 解放军 458 医院泌尿外科, 广州 510602

4. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

5. 南京大学医学院附属金陵医院、南京军区南京总医院泌尿外科, 南京 210002

[摘要] **目的** 探讨 RNA 干扰 p38 基因对人肾癌细胞株 786-O 增殖、侵袭、细胞周期和细胞对舒尼替尼敏感性的影响。

方法 构建针对 p38 的 siRNA531 和 siRNA659 两条 siRNA, 分别将其转染至肾癌 786-O 细胞株, 即为 siRNA531 组和 siRNA659 组, 同时设置转染无义 siRNA 的阴性对照组和仅加转染试剂的空白对照组。应用 RT-PCR 技术检测 786-O 细胞 p38 mRNA 的表达, 蛋白质印迹法检测 p38 蛋白的表达。CCK-8 法检测细胞的增殖情况和对舒尼替尼的敏感性, 流式细胞术检测细胞的周期改变情况, Transwell 实验检测细胞的侵袭能力。**结果** RT-PCR 及蛋白质印迹法检测发现 siRNA 转染后 786-O 细胞 p38 mRNA 及蛋白的表达均降低。与空白对照组和阴性对照组相比, siRNA531 组和 siRNA659 组 786-O 细胞在转染后 3~5 d 时的增殖率均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 细胞对舒尼替尼的敏感性增加, 两组对舒尼替尼的 IC_{50} 值均低于阴性对照组 [(3.2 ± 0.3) 、 (1.4 ± 0.1) $\mu\text{mol/mL}$ vs (5.4 ± 0.2) $\mu\text{mol/mL}$, $P < 0.05$]。siRNA531 组、siRNA659 组 G_1 期细胞数量明显多于对照组, 且两组 786-O 细胞出现 G_0/G_1 阻滞。转染 24 h 后, 两组的穿膜细胞数分别为 56.43 ± 6.02 、 34.00 ± 8.12 , 与阴性对照组 (76.27 ± 5.08) 相比, 两组细胞的侵袭能力均下降 ($P < 0.01$)。**结论** 通过转染 p38 特异性 siRNA 可以成功沉默肾癌细胞株 786-O 的 p38 基因的表达, 抑制肾癌细胞株 786-O 的增殖、侵袭能力, 增加其对舒尼替尼的敏感性, 为后续研究肾癌治疗及靶向耐药奠定基础。

[关键词] 肾肿瘤; 肾细胞癌; p38; 靶向治疗; 增敏; siRNA 干扰

[中图分类号] R 737.11

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2016)07-0799-06

Effect of p38 siRNA on biological behavior and sensitivities to sunitinib of human renal carcinoma cell line 786-O

CHEN Jun-ming^{1, 2Δ}, WU Deng-shuang^{1Δ}, WANG Zhi-xiang^{1, 3}, WU Zhen-jie¹, LIU Bing¹, BAO Yi¹, YE Hua-mao⁴, YANG Qing⁴, QU Le^{1, 5}, WANG Lin-hui^{1*}

1. Department of Urology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of Urology, Hospital of Chinese People's Armed Police Forces Henan Headquarters, Zhengzhou 450052, Henan, China

3. Department of Urology, No. 458 Hospital of PLA, Guangzhou 510602, Guangdong, China

4. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

5. Department of Urology, Jinling Hospital, Nanjing University School of Clinical Medicine, General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Nanjing 210002, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of p38 gene silencing on the proliferation, invasion, cell cycle and sensitivity to sunitinib of human renal carcinoma cell line 786-O. **Methods** We designed two sequence-specific small interfering

[收稿日期] 2016-01-05 **[接受日期]** 2016-04-11

[基金项目] 国家自然科学基金(81272817, 81172447), 上海市自然科学基金(11ZR1447800). Supported by National Natural Science Foundation of China (81272817, 81172447) and Natural Science Foundation of Shanghai (11ZR1447800).

[作者简介] 陈俊明, 硕士, 主治医师. E-mail: cjm2008jy@163.com; 吴登爽, 硕士生. E-mail: wudeng221@126.com

Δ共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885732, E-mail: wlhui@medmail.com.cn

RNA(siRNA531 and siRNA659) targeting *p38* gene and transfected them into renal carcinoma cell line 786-O. 786-O cells transfected with nonsense siRNA served as negative control and those cultured with transfection medium served as blank control. The change of *p38* gene expression was observed by RT-PCR and the expression of p38 protein was detected by Western blotting analysis. The proliferation, sensitivities to sunitinib, invasion capabilities, and the cell cycle of 786-O cells were examined by CCK-8 assay, transwell chamber test and flow cytometry, respectively. **Results** RT-PCR and Western blotting analysis revealed that p38 expression in *p38* siRNA group was significantly decreased compared with the controls. The cell proliferation rates were also significantly decreased 3-5 days after siRNA531 or siRNA659 transfection compared with the controls ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and cells in the siRNA531 and siRNA659 groups become more sensitive to sunitinib compared with negative control group, with two IC_{50} values being significantly lower than that of the negative control group ($[3.2 \pm 0.3]$, $[1.4 \pm 0.1] \mu\text{mol/mL}$ vs $[5.4 \pm 0.2] \mu\text{mol/mL}$; $P < 0.05$). In addition, analysis of cell cycle demonstrated a marked G_0/G_1 arrest of the 786-O cells transfected with siRNA531 or siRNA659. We also noticed that 24 h after transfection, the cell invasion capabilities was significantly decreased in siRNA531 and siRNA659 compared with negative control (numbers of cells permeating septum; 56.43 ± 6.02 , 34.00 ± 8.12 vs 76.27 ± 5.08 ; $P < 0.01$). **Conclusion** We have successfully suppressed *p38* gene expression by specific siRNA, which can inhibit the proliferation and invasion of human renal carcinoma cell line 786-O and increase its sensitivity to sunitinib, paving a way for future treatment and targeted drug resistance of renal cell carcinoma.

[Key words] kidney neoplasms; renal cell carcinoma; p38; targeted therapy; enhanced sensitivity; siRNA interference

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(7): 799-804]

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是肾脏最常见的恶性疾病,在所有肾脏恶性疾病中约占90%^[1],近30%的患者在诊断时已发生转移^[2],而转移性肾癌对放化疗具有高度的抵抗性,5年生存率仅为5%~15%^[3]。近年来以苹果酸舒尼替尼(sunitinib)为代表的新型小分子靶向药物极大改善了晚期肾癌的治疗前景,其中位无进展生存期是接受细胞因子治疗患者的2倍,总缓解率也明显提高^[4-5]。但目前仍有相当比重的患者无法获得临床获益,且靶向药物并不能保持持久疗效,多数患者会在治疗开始的6~15个月出现耐药甚至进展^[6]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是一类丝/苏氨酸蛋白激酶,在细胞的增殖、分化及凋亡等进程中发挥重要作用^[7]。研究表明, p38MAPK 信号通路在肿瘤靶向耐药中发挥了重要作用^[8],但国内外对于 p38 在肾癌中的作用鲜见报道。本研究通过 RNA 干扰技术沉默肾癌 786-O 细胞株的 *p38* 基因,观察该过程是否对肾癌细胞生物学特性以及舒尼替尼的敏感性产生影响,为肾癌的治疗监测、预后以及靶向耐药方面提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂 人肾癌细胞株 786-O (ATCC 公司), RPMI 1640 培养基(Gibco 公司), p38 兔抗人单抗(货号 4511, Cell Signaling 公司),

Lipofectamine 2000、反转录 ABI 试剂盒(Invitrogen 公司), Transwell 侵袭小室(货号 3470, Corning 公司), C1052 细胞周期试剂盒(碧云天生物技术研究所)。生物分光光度计(SmartSpec plus, Bio-Rad 公司),离心机、蛋白电泳及流式细胞仪等常规仪器和试剂均由第二军医大学长海医院中心实验室提供。

1.2 引物设计及合成 阳性对照、阴性对照和 2 条小干扰 RNA(siRNA)序列均由上海吉玛化学技术有限公司合成、纯化, siRNA531:正义链为 5'-GAG CUG AAC AAG ACA AUC UTT-3',反义链为 5'-AGA UUG UCU UGU UCA GCU CTT-3'; siRNA659:正义链为 5'-GUC CAU CAU UCA UGC GAA ATT-3',反义链为 5'-UUU CGC AUG AAU GAU GGA CTT-3';阴性对照 siRNA:正义链为 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3',反义链为 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'。

1.3 786-O 细胞株培养及 siRNA 瞬时转染 人肾癌细胞株 786-O 置入含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI 1640 培养液中,于 37°C、5% CO₂ 饱和湿度孵箱中培养,倒置显微镜下观察细胞生长情况,按 1:3 传代。收集处于对数生长期的 786-O 细胞,胰酶消化,加入新鲜培养液重悬,显微镜下计数。实验分组为转染无义 siRNA 的阴性对照组、siRNA531 转染组(siRNA531 组)、siRNA659 转染组(siRNA659 组)和仅加转染试剂的空白对照组。转染前 24 h 786-O 细胞经胰酶消化配成密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的细

胞悬液,每孔用2 mL含FBS的新鲜培养液接种在6孔板上,待细胞汇合达到50%~70%,转染前半小时更换为无血清培养液。取9 μL siRNA和6 μL Lipofectamine 2000,加入250 μL 的Opti-MEM稀释并充分混合,室温静置20 min形成siRNA/Lipofectamine 2000复合物;各组分别加入不同siRNA/Lipofectamine 2000复合物,轻轻混匀,4~6 h后更换新鲜含FBS培养液。

1.4 RT-PCR检测 p38 mRNA 的表达 采用TRIzol法提取细胞总RNA,各组取等量RNA用反转录试剂盒按说明书行反转录得cDNA,RT-PCR检测各组细胞 p38 基因的表达水平。p38引物序列:上游5'-CTG GAT TTT GGA CTG GCTCG-3';下游5'-GGT GTT CCT GTC AGA CGC ATA-3'。RT-PCR条件:预变性95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,进行40个循环。实验重复4次。

1.5 蛋白质印迹法检测 p38 蛋白的表达 分别取阴性对照组、siRNA531组、siRNA659组和空白对照组细胞,采用RIPA裂解液提取细胞总蛋白,每孔上样20 μL 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(1:500)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,二抗室温温育2 h,ECL显色,X线片曝光,经显影定影处理后,使用凝胶成像系统检测各组条带灰度值并定量。

1.6 CCK-8法检测786-O细胞的增殖活性及对舒尼替尼的敏感性 分别取对数生长期的阴性对照组、siRNA531组、siRNA659组和空白对照组786-O细胞,经胰酶消化后调整细胞密度为 $1 \times 10^4/\text{mL}$,以每孔0.2 mL将细胞悬液加入96孔培养板中。各孔分别于转染后1、2、3、4、5 d时加入90 μL RPMI 1640培养液和10 μL CCK-8,培养箱中放置1 h后用酶标仪检测各孔在450 nm处的光密度(D)值。另取阴性对照组、siRNA531组和siRNA659组细胞,每组再分别设置实验孔、不加舒尼替尼的对照孔和只有培养液的空白孔;转染24 h后弃去原培养液,各孔分别加浓度为0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0和10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的舒尼替尼,每孔200 μL ,继续培养48 h后以上述方法检测各孔D值。细胞存活率计算公式:细胞存活率(%) = $[D_{\text{实验孔}} - D_{\text{空白孔}}] / [D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白孔}}] \times 100\%$,并根据细胞存活率计算其 IC_{50} 值。

1.7 流式细胞仪检测786-O细胞周期 分别取阴性对照组、siRNA531组、siRNA659组和空白对照组786-O细胞,细胞转染48 h后用不含EDTA的胰酶消化收集,冰冷PBS清洗2次,预冷70%乙醇固定,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。上机前离心去除乙醇,PBS清洗3次,100 mg/L RNase A 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化40 min;50 g/L PI 4 $^{\circ}\text{C}$ 染色1 h,流式细胞仪检测各组细胞DNA含量。

1.8 Transwell小室侵袭实验检测细胞的侵袭能力 分别取阴性对照组、siRNA531组、siRNA659组和空白对照组786-O细胞,在含10% FBS的RPMI 1640培养液中培养至对数生长期,加入无血清RPMI 1640培养液继续培养24 h。在预先铺有基质胶的Transwell小室上室加入100 μL 无血清培养的786-O细胞($1 \times 10^5/\text{mL}$),下室加入含10% FBS的RPMI 1640培养液。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育24 h后取出,PBS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,倒置显微镜下随机选取6个视野照相、计数细胞,取平均数。

1.9 统计学处理 采用SPSS 20.0统计软件进行分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 siRNA对各组细胞 p38 mRNA 表达的影响 结果(图1)表明,siRNA531组和siRNA659组细胞 p38 mRNA 的表达水平均下降,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),其中siRNA659组 p38 mRNA 表达下降更为明显。

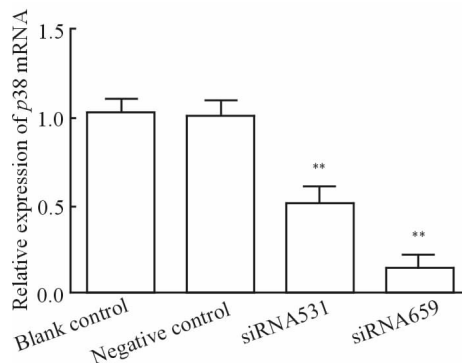


图1 转染 siRNA 后各组细胞 p38 mRNA 的表达

Fig 1 Effect of siRNA interference on p38 mRNA expression in each group

** $P < 0.01$ vs control groups. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

2.2 siRNA 对各组细胞 p38 蛋白表达的影响 与阴性对照组、空白对照组比较, siRNA531 组、siRNA659 组 p38 蛋白的表达水平明显下降, 其中 siRNA659 组 p38 蛋白表达下降更为明显(图 2), 表明合成的两条 siRNA 均可抑制 p38 蛋白的表达。

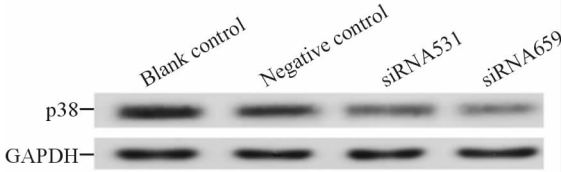


图 2 转染 siRNA 后各组细胞 p38 蛋白的表达水平
Fig 2 p38 protein expression in 786-O cells transfected with siRNA in each group

2.3 siRNA 对各组细胞增殖活性及舒尼替尼敏感性的影响 结果(图 3)显示, 第 3 天开始, siRNA531 组、siRNA659 组 786-O 细胞的增殖开始受到抑制, 3~5 d 内两组的增殖水平均低于空白对照组和阴性对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$); 其中 siRNA659 组受到的增殖抑制作用更为明显, 但两组比较差异无统计学意义。

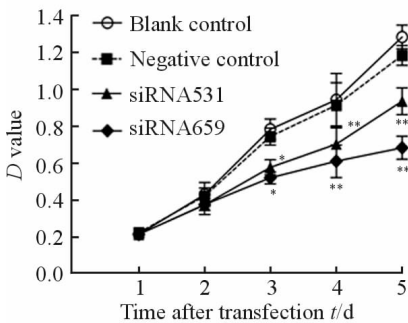


图 3 转染 siRNA 后各组细胞的增殖情况
Fig 3 786-O cell proliferation detected by CCK-8 after transfected with siRNA

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control groups. $n=5$, $\bar{x} \pm s$

同样使用 CCK-8 法检测各组细胞对舒尼替尼的药物敏感性, 结果(图 4)发现, 随着舒尼替尼作用浓度的增加, 786-O 细胞的生存率逐渐降低, siRNA659 组下降更为明显, 舒尼替尼浓度为 1.0~5.0 $\mu\text{mol/mL}$ 时与阴性对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。阴性对照组舒尼替尼的 IC_{50} 值为 $(5.4 \pm 0.2) \mu\text{mol/mL}$, siRNA531 组为 $(3.2 \pm 0.3) \mu\text{mol/mL}$, siRNA659 组 $(1.4 \pm 0.1) \mu\text{mol/mL}$, 组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

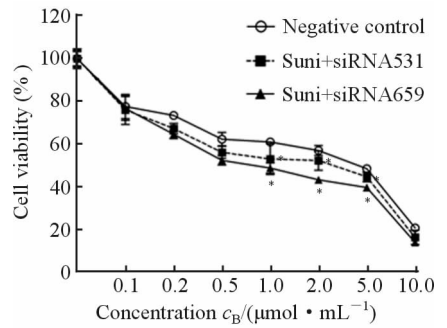


图 4 转染 siRNA 后各组细胞对舒尼替尼的药物敏感性比较

Fig 4 Comparison of drug sensitivities between experimental groups and control group

Suni: Sunitinib. * $P < 0.05$ vs negative control group. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

2.4 siRNA 对各组细胞周期的影响 流式细胞术检测转染 siRNA 后各组 786-O 细胞周期的变化, siRNA531 组、siRNA659 组 G_1 期细胞数量明显多于阴性对照组和空白对照组, 且两组 786-O 细胞出现 G_0/G_1 阻滞, 见图 5。

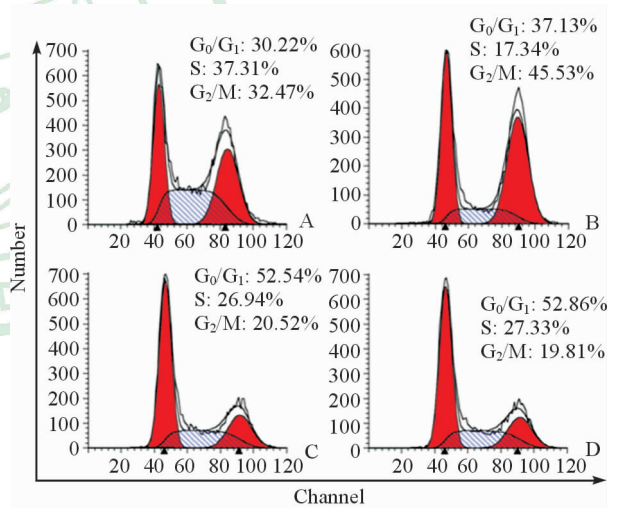


图 5 p38 基因沉默对 786-O 细胞周期的影响
Fig 5 Effect of p38 gene silencing on the 786-O cell cycle in each group

A: Blank control group; B: Negative control group; C: siRNA531 group; D: siRNA659 group

2.5 Transwell 小室侵袭实验结果 Transwell 小室侵袭实验结果(图 6)显示, siRNA531 组、siRNA659 组细胞的侵袭能力明显低于阴性对照组细胞, 其中 siRNA659 组细胞侵袭能力下降更为显著。各组细胞 24 h 穿过微孔膜的细胞数分别为空白对照组 85.62 ± 7.57 、阴性对照组 76.27 ± 5.08 、siRNA531 组 56.43 ± 6.02 、siRNA659 组

34.00±8.12, siRNA531 组、siRNA659 组与空白对照组和阴性对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

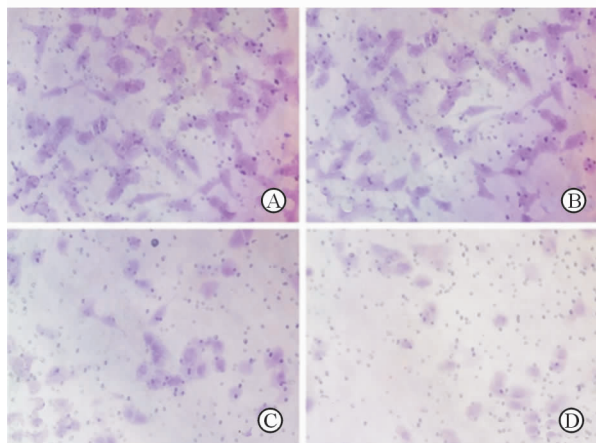


图6 转染 siRNA 后各组细胞的侵袭情况

Fig 6 Effect of p38 siRNA on 786-O cell invasion as determined by transwell assays

A: Blank control group; B: Negative control group; C: siRNA531 group; D: siRNA659 group. Original magnification: $\times 200$

3 讨论

p38MAPK 是丝氨酸/苏氨酸激酶高度相关的蛋白激酶超家族,共有 4 个成员,分别是 p38 α 、p38 β 、p38 γ 和 p38 δ ^[9],是细胞内重要的信号转导系统之一,存在于大多数细胞内。p38 活化环上的苏氨酸和酪氨酸两个位点几乎在所有不良刺激的作用下都会被 MAPK 激酶 (MAP kinase kinases, MKKs) 双磷酸化,从而被激活^[10]。活化的 p38 家族成员能通过磷酸化下游的蛋白激酶、转录因子及胞质蛋白等底物调控肿瘤细胞做出各种不同的响应。p38MAPK 信号通路与肿瘤细胞生长、增殖、运动及靶向耐药等相关。Kim 等^[11]研究发现,在 H-Ras 诱导的细胞侵袭和转移中,抑制 p38MAPK 的活性可以降低细胞的运动能力。Sossey-Alaoui 等^[12]通过采用 RNA 干扰技术抑制 WAVE3 基因的表达来降低磷酸化 p38 表达,结果降低了 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力。Rudalska 等^[8]研究发现通过短发夹 RNA 干扰沉默 p38/ATF2 信号通路后,耐药肝癌小鼠对索拉非尼的治疗敏感性增加,生存期延长;而质粒活化转染 p38 使其过表达后,人肝癌细胞对索拉非尼的敏感性降低。本研究发现,抑制 p38 的表达可抑制肾癌 786-O 细胞的增殖和侵袭能力,对靶向

药物舒尼替尼的敏感性增加,表明肾癌细胞中 p38 的表达在肾癌细胞增殖、转移以及对靶向药物耐药方面发挥着关键作用。

由于 RNA 干扰具有高度的序列专一性和有效的干扰,可以特异地将特定基因沉默,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^[13],但针对同一靶基因的不同 siRNA 序列的沉默效率不同^[14]。本研究构建了 2 条针对 p38 的 siRNA,并将其转染至肾癌 786-O 细胞株,通过 RT-PCR 及蛋白质印迹法检测技术,发现两条 siRNA 均不同程度地抑制了该细胞株中 p38 mRNA 及其蛋白的表达;其中 siRNA659 组 p38 mRNA 及蛋白表达水平下降更为明显,提示 siRNA 高效转染可下调 p38 基因表达。

肿瘤细胞增殖和侵袭能力是恶性肿瘤进展的重要生物学特征。本研究抑制 p38 基因表达后,采用 Transwell 小室法及 CCK-8 法分别检测细胞的侵袭能力、增殖能力及其对靶向药物的敏感性,研究发现,与阴性对照组和空白组比较,自 72 h 起 siRNA531 组、siRNA659 组细胞的增殖均发生降低,其中 siRNA659 组细胞的增殖降低更明显,表明 p38 基因沉默可抑制肾癌 786-O 细胞增殖,提示 p38 基因在肾癌细胞生长、分化方面具有重要作用。侵袭实验结果发现抑制 786-O 细胞 p38 基因表达后,细胞侵袭能力明显受到抑制,且干扰效率越高,细胞侵袭能力受抑制越明显。流式细胞术检测发现,p38 基因沉默可使 786-O 细胞阻滞于 G₀/G₁ 期。在舒尼替尼的药物敏感性实验中,siRNA531 组、siRNA659 组对舒尼替尼的敏感性增强,且 p38 基因的干扰效率越高,肾癌 786-O 细胞株对舒尼替尼的敏感性越强。研究表明虽然舒尼替尼对包括血管上皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 1、2、3,血小板源性生长因子受体 (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR) α 、 β 和干细胞因子等血管形成有关生长因子受体有抑制作用,但仍可能通过 p38MAPK 信号通路使肾癌细胞增殖转移;或活化的 p38 可激活下游 MEK/ERK 信号通路,导致肿瘤细胞的增殖、转移以及对舒尼替尼的耐药作用。

综上所述,本研究初步证实了 p38 与肾癌细胞的增殖、侵袭密切相关,干扰 p38 的表达可以增强肾

细胞靶向药物治疗的敏感性。p38MAPK 信号通路在肾细胞癌耐药中具有重要作用。本研究为下一步动物体内实验提供了理论及实验基础,为寻找晚期肾癌患者靶向耐药新机制和增敏的分子靶点提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] LOPEZ-BELTRAN A, SCARPELLI M, MONTIRONI R, KIRKALI Z. 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults[J]. *Eur Urol*, 2006, 49: 798-805.
- [2] SIEGEL R, MA J, ZOU Z, JEMAL A. Cancer statistics, 2014[J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64: 9-29.
- [3] JEMAL A, SIEGEL R, XU J, WARD E. Cancer statistics, 2010[J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60: 277-300.
- [4] SONPAVDE G, CHOUEIRI T K, ESCUDIER B, FICARRA V, HUTSON T E, MULDER P F, et al. Sequencing of agents for metastatic renal cell carcinoma: can we customize therapy? [J]. *Eur Urol*, 2012, 61: 307-316.
- [5] MOTZER R J, HUTSON T E, TOMCZAK P, MICHAELSON M D, BUKOWSKI R M, RIXE O, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2007, 356: 115-124.
- [6] RINI B I, ATKINS M B. Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10: 992-1000.
- [7] MALM S W, HANKE N T, GILL A, CARBAJAL L, BAKER A F. The anti-tumor efficacy of 2-deoxyglucose and D-allose are enhanced with p38 inhibition in pancreatic and ovarian cell lines[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34: 31.
- [8] RUDALSKA R, DAUCH D, LONGERICH T, MCJUNKIN K, WUESTEFELD T, KANG T W, et al. *In vivo* RNAi screening identifies a mechanism of sorafenib resistance in liver cancer [J]. *Nat Med*, 2014, 20: 1138-1146.
- [9] ONO K, HAN J. The p38 signal transduction pathway: activation and function [J]. *Cell Signal*, 2000, 12: 1-13.
- [10] RAINGEAUD J, GUPTA S, ROGERS J S, DICKENS M, HAN J, ULEVITCH R J, et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 7420-7426.
- [11] KIM M S, LEE E J, KIM H R, MOON A. p38 kinase is a key signaling molecule for H-Ras-induced cell motility and invasive phenotype in human breast epithelial cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 5454-5461.
- [12] SOSSEY-ALAOUI K, RANALLI T A, LI X, BAKIN A V, COWELL J K. WAVE3 promotes cell motility and invasion through the regulation of MMP-1, MMP-3, and MMP-9 expression[J]. *Exp Cell Res*, 2005, 308: 135-145.
- [13] 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.
- [14] 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;1077-1079.

[本文编辑] 曾奇峰