

· 论 著 ·

RNA 干扰抑制 ERCC1 对非小细胞肺癌化疗敏感性的影响*

宋志雨, 周 航[△]

(遵义医学院附属医院肿瘤二科, 贵州遵义 563000)

摘要:目的 探讨利用 RNA 干扰技术沉默切除修复交叉互补基因组 1(ERCC1)表达对非小细胞肺癌耐药细胞株顺铂化疗敏感性的影响。方法 设计并合成 3 段靶向人的 ERCC1 基因的小分子干扰 RNA(siRNA), 构建携带 ERCC1-shRNA 的重组质粒表达载体, 采用脂质体 Lipofectamine 2000 转染入人肺癌细胞株 A549/DDP, 荧光镜下观察并测定转染效率; 应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测转染前后 ERCC1 mRNA 的表达情况; 应用四甲基偶氮唑蓝比色法(MTT)检测干扰 ERCC1 后 A549/DDP 细胞对顺铂敏感性的变化。结果 转染针对 ERCC1 的 siRNA 后, 转染组 A549/DDP 细胞内 ERCC1 mRNA 表达均下降, 转染后肺癌 A549/DDP 细胞对顺铂敏感性增加。结论 利用 RNA 干扰技术能够筛选出高效的特异阻断 ERCC1 基因表达的 siRNA; ERCC1 基因表达下调能够增加肺癌 A549/DDP 细胞对顺铂的敏感性, 部分逆转耐药。

关键词: RNA 干扰; 癌, 非小细胞肺癌; 顺铂; 切除修复交叉互补基因组 1; A549/DDP 细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.32.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)32-3232-04

The effect of RNA interference-mediated ERCC1 gene on the chemo-treatment sensitivity of non-small-cell lung cancer*

Song Zhiyu, Zhou Hang[△]

(The Second Department of Oncology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

Abstract: **Objective** To investigate changes of platinum-based chemotherapy sensitivity of silencing excision repair cross complementation 1(ERCC1) gene expression by using RNA interference in non-small-cell lung cancer(NSCLC) drug resistance cell lines. **Methods** Three siRNA sequences targeting ERCC1 gene were designed and synthesized. Recombinant plasmid expression vector which carrying ERCC1-shRNA was constructed and transfected into A549/DDP cells with Lipofectamine 2000. Transfection efficiency was measured in the fluorescent microscope. The expression of ERCC1 mRNA was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). The change of cisplatin sensitivity after interference was test by MTT assay. **Results** After transfection of ERCC1-siRNA, the ERCC1 mRNA expressions in A549/DDP cells were all reduced. The sensitivity to cisplatin of A549/DDP cell line was increased after transfection. The sensitivity to cisplatin of A549/DDP cell line was increased after transfection. **Conclusion** Highly effective and specific siRNA targeting ERCC1 gene can be successfully screened by RNA interference technique. Selective silencing of ERCC1 gene promotes the sensitivity to cisplatin in A549/DDP cell and can partly reverse the cisplatin resistance in human cisplatin resistant lung adeno-carcinoma cell lines A549/DDP in vitro.

Key words: RNA interference; carcinoma, non-small-cell lung; cisplatin; excision repair cross complementation 1 gene; A549/DDP cells

肺癌是世界上发病率和病死率均居首位的恶性肿瘤, 非小细胞肺癌(non-small lung cancer, NSCLC) 占有肺癌病例的 80%~85%。而以铂类为基础的全身化疗是晚期肺癌的主要治疗手段之一, 但有效率仅为 14%~40%, 主要是由于肿瘤对顺铂的先天耐药及获得性耐药导致化疗失败^[1]。核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)是修复顺铂致 DNA 损伤的一种重要途径, 在顺铂耐药机制中起关键作用。其中切除修复交叉互补基因组 1(ERCC1)是核苷酸切除修复环路中重要成员之一。ERCC1 mRNA 蛋白表达与患者对铂类化疗耐药密切相关, 其高表达是 NSCLC 顺铂耐药的重要原因。本研究通过构建靶向 ERCC1 基因能转录产生大量短发卡结构 RNA(short hairpin RNA, shRNA)的质粒载体, 将其转染至肺癌 A549/DDP 细胞株中, 研究沉默 ERCC1 基因表达是否能增强对化疗药物的敏感性, 从体外实验证明 ERCC1 参与了 NSCLC 顺铂耐药的形成, 探讨逆转肺癌化疗耐药的新途径。

1 材料与与方法

1.1 细胞株与主要试剂 肺癌 A549/DDP 细胞株购自中国医学科学院肿瘤医院细胞库, 胎牛血清购自 Hyclon 公司, RM1640 购于 Gibico 公司, 小分子干扰 RNA(small interfer-

ence RNA, siRNA)质粒表达载体购自上海吉玛公司, 质粒抽提试剂盒购于 Promega 公司, 脂质体转染试剂盒 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司, TRIzol、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒及荧光定量试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司, 青霉素、链霉素、LB 培养基为 Invitrogen 公司产品, 大肠杆菌 DH-5 α 为本实验室保存, 四甲基偶氮唑盐(MTT)购于美国 Sigma 公司。

1.2 主要仪器 包括 PCR 仪、DYY 电泳仪、紫外分光光度计、倒置荧光显微镜、酶标仪、恒温水浴箱、高速冷冻离心机等。

1.3 引物 ERCC1 及内参 GAPDH 引物均由 TaKaRa 公司合成, 具体序列见表 1。

1.4 实验方法

1.4.1 siRNA 设计 根据美国国立生物技术信息中心(NCBI)和日本 DNA 数据库(DDBJ)的基因序列库检索到的 ERCC1 的 mRNA 序列, 按照确定序列原则选择 3 条靶序列: (1) CCG TGA AGT CAG TCA ACA A; (2) CAA GGC CTA TGA GCA GAA A; (3) GGC TGT TTG ATG TCC TGC A。

1.4.2 构建质粒真核表达载体 针对 3 条靶序列构建 RNA 干扰载体, 见表 2。内建绿色荧光蛋白(green fluorescent pro-

* 基金项目: 贵州省科技厅资助项目[黔科合 J 字(2007)2129]。

[△] 通讯作者, E-mail: zhouhang6618@sina.com。

表 1 引物序列

基因	上游(5'~3')	下游(5'~3')
ERCC1	GGA GAC CTA CAA GGC CTA TGA GCA	ACT TCA CGG TGG TCA GAC ATT CAG
GAPDH	CCC CTT CAT TGA CCT CAA CTA CAT	CAT GAG TCC TTC CAC GAT ACC AA

表 2 3 个 ERCC1-siRNA 质粒表达载体

基因	上游(5'~3')	环状序列	下游(5'~3')
ERCC1-siRNA1	CAC CGT GAA GTC AGT CAA CAA	TTC AAG AGA	TTG TTG ACT GAC TTC ACG GTG
ERCC1-siRNA2	TAC AAG GCC TAT GAG CAG AAA	TTC AAG AGA	TTT CTG CTC ATA GGC CTT GTA
ERCC1-siRNA3	GAG GCT GTT TGA TGT CCT GCA	TTC AAG AGA	TGC AGG ACA TCA AAC AGC CTC

tein, GFP) 绿色荧光标记, 内建氨苄西林(ampicillin) 抗性基因, 经测序证实 RNAi 打靶序列正确。酶切鉴定、DNA 序列分析由上海吉玛公司协助完成。

1.4.3 细胞培养 将 A549/DDP 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清、50 U/mL 青霉素、50 mg/mL 链霉素的 RPMI1640 培养液中, 置于细胞培养箱中进行培养, 加入顺铂至 1 mg/L, 以维持耐药性, 实验前 3 d 停药。

1.4.4 质粒抽提 将含有质粒的菌液接种在 LB 培养基中, 加入氨苄西林至 100 μg/mL, 摇菌过夜后, 用 Promega 公司抽提试剂盒抽取各组质粒 DNA, 经紫外分光光度仪检测纯度及浓度, 保存备用。

1.4.5 体外转染 将细胞分为空白对照组、转染组(ERCC1-siRNA1、ERCC1-siRNA2、ERCC1-siRNA3 组) 和阴性对照组(吉玛公司提供); 取对数生长期细胞, 调整细胞浓度为 2×10^5 个/微升, 接种于 24 孔板中(每孔 500 μL), 用 Lipofectamine 2000 转染, 转染试剂与质粒的比例在说明书建议范围内选择, 按照可获得最大转染效率的剂量比配制, 本实验选用比例为 2 μL : 1 μg; 转染时细胞融合率达 90% 左右, 分别用 50 μL 无血清和抗生素 RPMI1640 培养基稀释 1 μg 质粒和 2 μL Lipofectamine 2000 试剂, 室温下孵育 5 min 后, 轻轻混匀混合稀释后的质粒 DNA 和 Lipofectamine 2000 试剂, 室温下放置 20 min, 加上述 100 μL 培养液至每孔, 空白对照只加转染试剂, 在 37 °C、CO₂ 培养箱中培养, 5 h 后加血清, 48 h 后收集细胞, 行 RT-PCR 检测。

1.5 荧光显微镜下检测转染效率 使用带 GFP 的 siRNA 质粒表达载体转入 A549/DDP 细胞, 30 h 后在荧光显微镜下观察, 先在可见光下固定一个视野, 数出细胞总数, 转换荧光光源计数发绿色荧光的细胞数, 每孔随机选择 5 个观察视野。因部分细胞有微弱的自发荧光, 本实验按荧光强弱将阳性细胞分为 3 个等级, 即 +、++、+++ , 其中 + 为细胞的自发荧光, ++ 及 +++ 为 GFP 发出的荧光。荧光强度为 ++ 及 +++ 的细胞视为有效转染细胞。转染效率 = 有效转染细胞数 / 细胞总数 × 100%。

1.6 转染细胞的 ERCC1 mRNA 检测

1.6.1 RT-PCR 检测 ERCC1 基因水平 采用 SYBR Green I 染料法, TRIzol 提取各组细胞总 RNA, 紫外分光光度计进行核酸定量, 取 2 μg RNA 作为模板进行反转录, 合成 cDNA, 以 cDNA 为模板在 RT-PCR 仪上行实时定量扩增, 按照荧光定量试剂盒说明书建立反应体系及条件, 引物序列见表 1, 反应体系为 SYBR superMix 荧光混合物 10 μL, 模板混合液(上、下游引物) 1 μL, 焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC) 处理过并经高温高压灭菌的三蒸水 5 μL, cDNA 4 μL, 反应总

体积为 20 μL。反应条件为: 第 1 步: 预变性 95 °C 8 min 1 个循环; 第 2 步: 95 °C 15 s, 60 °C 1 min 40 个循环。同时扩增 GAPDH 作为内参照。

1.6.2 RT-PCR 结果分析 根据参考文献[2], 采用相对定量法检测转染组与对照组之间的差异化表达, 以 GAPDH 作为内参照。根据扩增曲线, 以 Ct 值为统计参数依次计算下列数据: (1) Ct average = (Ct1 + Ct2 + Ct3) / 3 (重复管); (2) ΔCt = Ct average - 中间值; (3) 基因的表达 = $2^{-\Delta Ct}$; (4) 相对定量 = 目的基因的表达 / 内参基因的表达, 计算得出转染组对于对照组的干扰效率。

1.7 MTT 法检测 RNA 干扰后细胞对顺铂的半数抑制量的变化 取对数生长期的 A549/DDP 细胞, 以每孔 2×10^4 个均匀种植于 96 孔板, 待细胞贴壁后换成无血清和抗生素的 RPMI1640 培养基, 继续培养 24 h, 加入不同的 ERCC1-siRNA 质粒表达载体与 lipofectamine 2000 试剂混合后的转染液, 在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中保温 6 h 后, 换成含血清和抗生素的 RPMI1640 培养基, 然后取顺铂最大浓度 1 mg/mL 进行等比稀释, 共 7 个浓度, 分别加入 96 孔板中, 终浓度分别为 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.562 5 μg/mL, 继续培养 72 h 后, 每孔中加入 5 mg/mL MTT 20 μL, 继续培养 4 h, 上述细胞为转染组; 空白对照组加入 lipofectamine 2000 后再加入顺铂, 未转染 ERCC1-siRNA。以 2 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 每孔中加入二甲基亚砜(DMSO) 100 μL, 震荡 10 min。用酶标仪 570 nm 测定光密度(OD) 值, 计算半数抑制浓度(IC₅₀) 值。每种条件做 6 个平行孔, 并重复 3 次。

1.8 统计学处理 采用 SPSS12.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析或 t 检验, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 荧光显微镜检测 siRNA 的转染效率 GFP 标记的 ERCC1-siRNA 转染 A549/DDP 细胞 30 h 后, 于荧光显微镜下观察各组细胞内 GFP 的表达。空白对照组未见细胞内有荧光表达, 余组均可见细胞内有荧光表达, 且多数细胞荧光等级达 ++ 以上, 提示转染成功, 见插图 1。通过细胞记数板记数并计算, 转染效率达 80% 以上。

2.2 转染 ERCC1-siRNA 后 ERCC1 mRNA 表达变化

2.2.1 扩增曲线及熔解曲线分析 扩增曲线示所有细胞可以扩增出 GAPDH 及 ERCC1 基因, 实验成功。熔解曲线分析只出现 ERCC1 及 GAPDH 双峰, 提示 RT-PCR 扩增的特异性较好, 结果可信, 见图 2。

2.2.2 转染 ERCC1-siRNA 后 ERCC1 mRNA 表达水平变化 ERCC-siRNA1、ERCC-siRNA2、ERCC-siRNA3 组 ERCC1

mRNA 相对表达量分别为 76.74 ± 5.31 、 71.72 ± 4.83 、 25.65 ± 2.64 ，与空白对照组比较，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。阴性对照组 NC-ERCC1 mRNA 表达量为 95.19 ± 6.45 ，与空白对照组比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见图 2。

2.3 A549/DDP 对顺铂敏感性变化 各转染组 A549/DDP 细胞对顺铂的敏感性增加。空白对照组对顺铂的 IC_{50} 值为 $19.72 \mu\text{g/mL}$ ，ERCC1-siRNA1、ERCC1-siRNA2、ERCC1-siRNA 3 组对顺铂的 IC_{50} 分别为 4.59 、 5.61 、 $0.88 \mu\text{g/mL}$ ，与空白对照组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

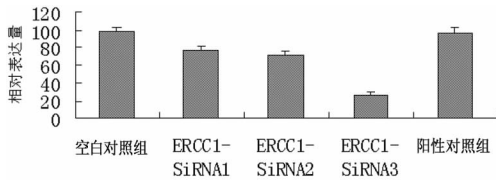


图 2 转染后各组细胞 ERCC1 mRNA 的表达情况

3 讨 论

近年来的研究表明，细胞信号转导中相关因子的表达异常、肿瘤细胞 DNA 修复的异常及其他相关基因的表达异常与肺癌耐药性的产生存在密切联系^[3]。随着肿瘤耐药机制研究的不断深入，目前认为耐药是多种基因参与机制共同作用的结果，因此针对相关耐药基因分子，制定出个体化治疗方案，增加癌细胞对化疗药物的敏感性，以提高临床疗效。

顺铂目前被认为是治疗 NSCLC 最有效的单药之一。其作用机制为形成铂-DNA 加合物，抑制 DNA 的复制和转录，导致细胞不能复制而凋亡^[4]。肿瘤细胞对顺铂耐药考虑有以下机制：(1)对铂类介导的 DNA 损伤修复能力增强；(2)谷胱甘肽和金属药物降解酶的表达增加；(3)细胞对顺铂的摄取下降；(4)凋亡通路的改变。其中 DNA 修复能力增强是顺铂耐药的重要原因^[5-7]。DNA 损伤修复主要有以下途径^[8]：同源重组修复 (homologous recombinational repair, HRR)、非同源末端联结 (nonhomologous end joining, NHEJ)、核苷酸切除修复 (nucleotide excision repair, NER)、碱基切除修复 (base excision repair, BER) 和错配修复 (mismatch repair, MMR)^[9-11]。NER 是哺乳动物细胞 DNA 修复的主要途径，ERCC1 基因属于 NER 途径，参与 DNA 损害的辨认及 DNA 片段切除，因此 NER 途径在顺铂耐药机制中起关键作用。

ERCC1 是一种高度保守的单链 DNA 核酸内切酶，全长 15×10^3 bp，含 10 个外显子，具识别功能，且具核酸内切酶活性，被认为在 NER 通路中起着速度限制性作用^[12]。ERCC1 和铂类药物耐药密切相关，ERCC1 过表达可使停滞在 G_2/M 期的损伤迅速修复，导致对顺铂耐药。ERCC1 表达降低则难以清除 Pt-DNA 加合物，则会对铂类药物的作用更加敏感。资料表明，体外培养的卵巢癌、宫颈癌、睾丸癌、膀胱癌以及 NSCLC 等的细胞系，在加入铂类药物后，出现的铂类药物抵抗与 ERCC1 mRNA 表达有关^[13]。同样，临床上一些回顾性研究也提示，ERCC1 mRNA 过度表达与进展期胃癌、卵巢癌、结肠直肠癌、食管癌、NSCLC 等的铂类药物化疗抵抗密切相关^[14-19]，由此，学者们开始应用药物干预或基因封闭技术的手段影响 ERCC1 基因及蛋白的表达，并寻求逆转耐药的途径。

RNA 干扰技术是近年出现的一种研究基因功能和进行基因治疗的一种新方法，是外源双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 分子在 mRNA 水平沉默靶基因，阻断基因的表达。它具有序列特异性和高效性及操作简单等特点，siRNA 是 RNA 干扰作用中不可缺少的重要环节，它更接近 mRNA

分子，沉默基因表达的机制和稳定性方面都比反义寡核苷酸技术有优势，Chang 等^[20]首先设计合成了针对 ERCC1 的 siRNA，导入 Hela-S3 肝癌细胞、MCF-7 乳腺癌细胞和 HCT116 大肠癌细胞后均检测到 ERCC1 的表达下降，且细胞对铂类药物的敏感性增加。

因此本研究设计合成了靶向 ERCC1 基因的 siRNA，构建携带 ERCC1-shRNA 的重组质粒表达载体，将其转染入 A549/DDP 后，随后采用 RT-PCR 检测 ERCC1 mRNA 的表达，其中作者选用 Lipofectamine 2000 作为转染的脂质体载体，质粒上携带有 GFP 绿色荧光标记，在转染入细胞后，载体同时表达 GFP 蛋白。便于实时检测表达载体的转染效率，可方便地对细胞的转染条件进行优化以提高载体的转染效率，增强 siRNA 的表达以及目的基因的基因沉默效果。转染后在荧光显微镜下观察，未加入 siRNA 组的细胞内没有荧光，而加入 NC-siRNA 和转染组中转染成功的细胞内发出绿色荧光，观测非常方便，且根据荧光强度及发光细胞比值可以判断转染效率。实验结果显示 ERCC1 基因表达水平平均降低，ERCC1-siRNA 能有效干扰 ERCC1 基因的表达，阻断信息转导，进而沉默目的基因的表达，且筛选出干扰目的基因效率最高的 ERCC1-siRNA3，MTT 检测显示转染后肺癌 A549/DDP 细胞对顺铂 IC_{50} 值明显降低，敏感性明显增加，部分逆转化疗耐药，由此可见，运用 RNA 干扰技术抑制 NSCLC 细胞株 ERCC1 基因的表达可以提高肺癌细胞对化疗药物的敏感性，为基因治疗逆转 NSCLC 顺铂化疗耐药提供了新的思路，并提供了可靠的实验依据，ERCC1 可作为新的治疗靶点，用于指导个体化治疗；然而，由于肿瘤细胞产生耐药机制相当复杂，还需要进行深入的药物实验及体内动物实验，来验证以 ERCC1 为靶基因的 RNA 干扰逆转 NSCLC 顺铂耐药的有效性。

参考文献：

- [1] Herbst RS, Dang NH, Skarin AT. Chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 1997, 11(3): 473-507.
- [2] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [3] Jansen B, Zangemeister-Wittke U. Antisense therapy for cancer: the time of truth[J]. Lancet Oncol, 2002, 3(11): 672.
- [4] Takano M, Kudo K, Goto T, et al. Analysis by comparative genomic hybridization of genes relating with cisplatin resistance in ovarian[J]. Hum Cell, 2001, 14(4): 267-271.
- [5] Reed E. Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy[J]. Cancer Treat Rev, 1998, 24(5): 331-344.
- [6] Furuta T, Ueda T, Aune G, et al. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells[J]. Cancer Res, 2002, 62(17): 4899-4902.
- [7] Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. Science, 2004, 304(5676): 1497-1505.
- [8] Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, et al. DNA repair/proapoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis[J].

Mutat Res, 2002, 511(2): 145-178.

- [9] Sakamoto M, Kondo A, Kawasaki K, et al. Analysis of gene expression profiles associated with cisplatin resistance in human ovarian cancer lines and tissues cDNA microarray[J]. Hum Cell, 2001, 14(4): 305-315.
- [10] Mansouri A, Zhang Q, Ridgway LD, et al. Cisplatin resistance in an ovarian carcinoma is associated with a defect in programmed cell death control through XIAP regulation [J]. Oneol Res, 2003, 13(6/10): 399-404.
- [11] Katano H, Kondo A, Safaei R, et al. Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper[J]. Cancer Res, 2002, 62(22): 6559-6565.
- [12] Rosell R, Taron M, Barnadas A, et al. Nucleotide excision repair pathways involved in cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer[J]. Cancer Control, 2003, 10(4): 297-305.
- [13] Altaha R, Liang X, Yu JJ, et al. Excision repair cross complementing group 1: gene expression and platinum resistance[J]. Int J Mol Med, 2004, 14(5): 959-970.
- [14] Joshi MB, Shirota Y, Danenberg KD, et al. High gene expression of TS1, GSTP1 and ERCC1 are risk factors for survival in patients treated with trimodality therapy for esophageal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(8): 2215-2221.
- [15] Langer R, Specht K, Becker K, et al. Association of pretherapeutic expression of chemotherapy-related genes with response to neoadjuvant chemotherapy in barrett carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(9): 7462-7469.
- [16] Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy[J]. J Clin Oncol, 1998, 16(3): 309-316.
- [17] Reed E, Dabholkar M, Thornton K, et al. Evidence for in the appearance of mRNAs of nucleotide excision repair genes, in human ovarian cancer tissues[J]. Oncol Rep, 2000, 7(11): 1123-1128.
- [18] Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J, et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy[J]. J Clin Oncol, 2001, 19(5): 4298-4304.
- [19] Warnecke-Eberz U, Metzger R, Miyazono F, et al. High specificity of quantitative excision repair cross-complementing 1 messenger RNA expression for prediction of minor histopathological response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(7): 3794-3799.
- [20] Chang IY, Kim MH, Kim HB, et al. Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 327(1): 225-233.

(收稿日期: 2011-07-28 修回日期: 2011-09-07)

(上接第 3231 页)

- 性栓塞存在的问题与对策[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(6): 786-787.
- [3] Jubb Am, Hurwitz HI, Bai W, et al. Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer [J]. Clin Oncol, 2006, 24(2): 217-227.
- [4] 王革芳, 程永德, 王咏梅, 等. 静脉滴注重组人血管内皮抑素联合动脉灌注化疗治疗晚期恶性肿瘤的临床观察[J]. 介入放射学杂志, 2009, 18(4): 270-273.
- [5] 王金万, 孙燕. 重组人血管内皮抑素 III 期临床研究[J]. 中国前沿医学, 2006, 3(8): 87-90.
- [6] Hansen S, Sorensen FB, Vach W, et al. Microvessel density compared with the Chalkley count in a prognostic study of angiogenesis in breast cancer patients[J]. Histo Pathology, 2004, 44(5): 428-436.
- [7] 宁厚法, 王滨, 曹贵文, 等. 经导管肝动脉化疗栓塞术 (TACE) 对肝细胞癌凋亡相关蛋白 fas, bax 和 bel-x1 表达影响的相关研究[J]. 实用放射学杂志, 2004, 20(3): 248-250.
- [8] 汤日杰, 李伟, 何丽珍, 等. 肝动脉化疗栓塞联合血管内皮抑素治疗肝癌的试验及临床应用[J]. 研究热带医学杂志, 2010, 10(7): 788-783.
- [9] 王滨, 徐辉, 曹贵文, 等. 肝动脉化疗栓塞对肝癌肿瘤新生血管生成及血管内皮细胞生长因子表达的影响[J]. 中华放射学杂志, 2005, 39(2): 204-206.
- [10] 吴穷, 秦叔逵, 王杰军. 血管内皮抑素的临床前研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2008, 13(3): 271-277.
- [11] Ling Y, Yang Y, Lu N, et al. Endostar, a novel recombinant human endostatin, exerts antiangiogenic effect via blocking VEGF induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1 of endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 361(1): 79-84.
- [12] 赵登玲, 邓钢, 李光超, 等. 经肝动脉灌注重组人血管内皮抑制素联合 TACE 治疗兔 VX2 肝癌及肿瘤血管生成的评估[J]. 肿瘤, 2008, 28(1): 211-215.
- [13] Kong SY, Park JW, Lee JA, et al. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and survival in hepatocellular carcinoma patients [J]. Hepatology, 2007, 46(2): 446-455.
- [14] 钱骏, Vossoughi D, Oppermann E, 等. 血管生成抑制剂烟曲霉素衍生物在介入治疗肝细胞癌实验中的应用[J]. 中华放射学杂志, 2006, 40(1): 13-16.

(收稿日期: 2011-05-09 修回日期: 2011-08-12)