

神经疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.2014.02.009

Clusterin 基因沉默对脑胶质瘤 U87 细胞放射敏感性的影响

张蕴蕴¹, 周 伟², 孙 卯³, 黄 铎², 陈晓品¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院肿瘤科, 重庆 400010; 2. 重庆市肿瘤研究所放疗科, 重庆 400030;

3. 重庆医科大学附属第二医院消化内科, 重庆 400010)

【摘要】目的:研究通过慢病毒介导的 RNA 干扰技术沉默簇集蛋白(clusterin, CLU)基因表达对人脑胶质瘤 U87 细胞放射敏感性的影响。**方法:**设计和合成靶向 CLU 的短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)序列(CLU shRNA1, CLU shRNA2), 并构建到慢病毒的载体 plentilox 3.7, 以不针对任何基因的 shRNA 序列作为对照(对照 shRNA)。包被能成功表达各种 shRNA 载体的慢病毒。将慢病毒感染人脑胶质瘤 U87 细胞, Real-time PCR 法和 Western blot 法测定 CLU mRNA 表达和蛋白质表达水平, 证实干扰效果。给予不同放射剂量(2, 4, 6 Gy)处理后, 通过四甲基偶氮唑盐(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)法及流式细胞仪 Annexin V/PI 法检测脑胶质瘤 U87 细胞的存活率及凋亡率。Western blot 方法筛选多个凋亡相关信号分子的变化。**结果:**靶向 CLU 基因的 shRNA 特异性地抑制了 CLU mRNA 和蛋白质的表达。MTT 实验结果显示实验干扰组细胞在不同放射剂量下的脑胶质瘤实验 U87 细胞的存活率与对照组比较明显下降, 差异具有统计学意义(4 Gy 时, 对照 shRNA vs. CLU shRNA1: $P=0.000$, 对照 shRNA vs. CLU shRNA2: $P=0.003$; 6 Gy 时, 对照 shRNA vs. CLU shRNA1: $P=0.000$, 对照 shRNA vs. CLU shRNA2: $P=0.000$)。流式细胞仪 Annexin V/PI 法检测结果表明: 4 Gy 放疗后 2 个实验组细胞凋亡率均明显增加, 最高达 $(35.54 \pm 0.95)\%$, 较对照组高 2 倍多, 差异具有明显统计学意义(对照 shRNA vs. CLU shRNA1: $P=0.000$; 对照 shRNA vs. CLU shRNA2: $P=0.000$)。Western blot 法发现 CLU 沉默可以显著上调促凋亡分子 Bax 蛋白水平。**结论:**CLU 基因沉默可能通过调控 Bax 蛋白的表达, 明显增强脑胶质瘤 U87 细胞对放射的敏感性, 有望成为增加脑胶质瘤放射敏感性的新靶点。

【关键词】簇集蛋白; 脑胶质瘤; 放射敏感性; RNA 干扰**【中图分类号】**R322.81; R739.41**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-02-26

Effects of gene silencing of Clusterin on radiosensitivity of human glioma U87 cell line

Zhang Yunyun¹, Zhou Wei², Sun Mao³, Huang Luo², Chen Xiaopin¹

(1. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Radiotherapy, Chongqing Cancer Hospital; 3. Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of gene silencing of Clusterin (CLU) by lentivirus-mediated RNA interference on radiosensitivity of human glioma U87 cell-line. **Methods:** shRNAs targeting CLU were cloned into lentiviral vector plentilox3.7 and scramble control shRNA was used as control. Lentiviruses expressing different shRNAs were packaged into 293T cells. Real-time PCR and Western blot were performed to examine mRNA and protein expression of CLU at 72 h after infection of lentivirus. After exposing to different doses of radiation (0, 2, 4, 6 Gy), MTT assay was used to determine cell survival ratio and apoptotic ratio was also detected by flow cytometry. Changes of apoptotic proteins were examined by Western blot. **Results:** shRNA targeting CLU specifically inhibited the mRNA and protein level of CLU. MTT results showed that survival ratios of CLU-silencing cells under different doses of ionizing irradiation (4, 6 Gy) were significantly lower compared with those of cells infected with virus expressing control shRNA (4 Gy: control shRNA vs. CLU shRNA1, $P=0.000$, control shRNA vs. CLU shRNA2, $P=0.003$; 6 Gy: control shRNA vs. CLU shRNA1, $P=0.000$, control shRNA vs. CLU shRNA2, $P=0.000$). Flow cytometry results showed that apoptotic ratios of CLU-silencing cells under 4 Gy treatment were increased to $(35.54 \pm 0.95)\%$, nearly 2 folds higher than those of control cells (control shRNA vs. CLU shRNA1: $P=0.000$; control shRNA vs. CLU shRNA2: $P=0.000$). Results of Western blot showed that gene silencing of CLU markedly upregulated apoptosis-related protein Bax expression. **Conclusions:** Gene silencing of CLU significantly enhances the radio-sensitivity of

作者介绍: 张蕴蕴, Email: myhappy0512@qq.com,

研究方向: 肿瘤的基因放疗。

通信作者: 陈晓品, Email: cxp640910@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81171628)。

glioma U87 cell-line in vitro partially through upregulating apoptotic protein Bax. CLU may be a promising target during glioma therapy.

【Key words】clusterin; glioma; radio-sensitivity; RNA interference

脑胶质瘤是较常见的中枢神经系统恶性肿瘤, 约占所有原发性神经系统肿瘤的 50%~55%^[1], 具有“三高一低”的特点, 即发病率、复发率、病死率高, 治愈率低。目前对脑胶质瘤主张采取手术联合术后放化疗的综合治疗手段, 其中放疗作为胶质瘤不可缺少的治疗手段之一, 其治疗作用早已得到肯定, 大量研究证明术后放疗能显著改善病人生存率。然而, 胶质瘤本身对放射治疗具有抵抗作用, 因此如何有效提高肿瘤的放射敏感性, 提高患者的术后生存率, 成为当前研究的新热点之一。

簇集蛋白(clusterin, CLU)是一个硫酸糖蛋白异构二聚体, 广泛存在于人类及动物的许多组织及几乎所有体液中。由于选择性拼接的结果, CLU 主要有 2 种亚型: 分泌型和核型。分泌型 CLU 受到各种伤害刺激(如电离辐射、化学刺激)时表达明显上调, 对细胞发挥保护作用; 核型 CLU 主要集中在细胞核, 可诱导细胞的凋亡^[2]。CLU 在多种恶性肿瘤中也具有较高表达水平, 且与肿瘤的病理类型及恶性生物学行为具有相关性^[3-6]。多项研究发现通过沉默 CLU 表达可增加了某些肿瘤对放、化疗的敏感性^[6-8], 例如乳腺癌, 卵巢癌, 前列腺癌等。目前关于 CLU 在胶质瘤中的作用尚缺乏相关报道。本研究拟探讨运用慢病毒介导的基因干扰技术沉默人脑胶质瘤 U87 细胞的 CLU 表达后, 观察其对细胞放射敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人脑胶质瘤 U87 细胞株购自重庆医科大学生命科学院。慢病毒包装质粒及包装细胞 293FT, Trizol 试剂均购自美国 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒购自美国的 Promega 公司, CLU 抗体来自美国的 Lake Placid 公司, β -actin 抗体购自美国的 Sigma-Aldrich, Bax 抗体购自英国的 abcam 公司, 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的驴抗兔 IgG 抗体购自美国的 GE healthcare 公司; Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒购自凯基公司。四甲基偶氮唑盐(thiazolyl blue tetrazolium bixomide, MTT)购自 Sigma。其他试剂为进口分装或国产分析纯化。

1.2 方法

1.2.1 CLU shRNA 质粒构建 根据 Genebank 数据库中提供的 clusterin 基因核苷酸序列(基因号 NM_001831), 针对 clusterin mRNA 全长按照设计原则^[9], 设计 CLU-shRNA1 序列 5'-CAGGGAAGTAAGTACGTCAATTTCAGAGAATTGACGACTTACTTCCTGTTTTT-3'; CLU shRNA2 序列 5'-GCTAAAGTCCTACCAGTGAATTCAAGAGATTCCACTGCTAGG-

ACTTTAGCTTTTT-3'; 对照 shRNA 序列 5'-GCAACAAGATGAAGAGCACCAATTCAAGAGATTGCTGCTCTTCATCTTGTTGTTTTT-3'。合成两条具有发夹结构的干扰序列退火形成 DNA 双链后, 与线性化含有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)质粒载体 pLentilox 3.7 连接。将连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 挑取单克隆菌落, 37 °C 恒温摇床(250 r/min)培养过夜。提取质粒后行测序鉴定, 并将构建的质粒命名为对照 shRNA, CLU shRNA1, CLU shRNA2。

1.2.2 慢病毒载体的包装与病毒滴度测定 将含有 GFP 的质粒对照 shRNA 或 CLU shRNA1 或 CLU shRNA2 各自与慢病毒包装质粒 pLP1, pLP2 和 pLP/VSVG 共转染 293FT 细胞。转染 24 h 后更换培养基, 培养 24 h 后收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液, 对其浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液。病毒浓缩液感染 293T 细胞, 荧光显微镜下观察 GFP 表达情况, 评价病毒感染效率。

1.2.3 细胞培养及感染 胶质瘤 U87 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C、饱和湿度、5%CO₂ 孵箱中无菌培养。感染将细胞接种到 6 孔板, 每孔接种 1×10^5 个细胞, 培养过夜后用包含 6 μ g/ml 聚凝胺和 10% 胎牛血清的细胞培养液稀释病毒到相应滴度进行感染, 感染 72 h 后进行 Real-time PCR 和 Western blot 检测。

1.2.4 Real-time PCR 法检测 CLU mRNA 水平 将表达对照 shRNA 或 CLU shRNA1 或 CLU shRNA2 的慢病毒感染 72 h 后收集细胞, 按照 TRIzol 法提取各组细胞总 RNA, 并检验其纯度和完整性。20 μ l 逆转录反应体系: RNA 1 μ g, Master mix 4 μ l, DEPC H₂O 补齐。混匀后按下述条件反应: 25 °C 5 min, 42 °C 30 min, 85 °C 5 min, 4 °C 5 min。取 1 μ l cDNA, 加入 SYBGreen 10 μ l, 上游引物(10 μ mol/L) 各 0.4 μ l, H₂O 7.2 μ l。混匀后按下述条件反应: 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 15 s, 共计 40 个循环。CLU 上游引物 5'-GGACATCCACTTCCATAGCC-3', 下游引物 5'-GCACTTGTCACACTGGTCTCT-3'; β -actin 上游引物 5'-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3', 下游引物 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'。所有实验管均采用 3 管重复, 重复 3 次, 取其平均值。

1.2.5 Western blot 检测转染前后 CLU 蛋白水平的变化 提取细胞总蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白质浓度。每孔取 50 μ g 蛋白上样, 经 10%SDS-PAGE 凝胶电泳后转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜, 以含 5% 脱脂奶粉的 Tris 盐吐温缓冲液(Tris buffered saline with 0.05% Tween-20, TBST)室温下封闭过夜, 后加入一抗(clusterin 抗体 1:1 000; Bax 抗体 1:1 000 或 β -actin 1:3 000)过夜孵育, 洗膜后二抗室温孵育 2 h(HRP 标记的驴抗兔 IgG 1:3 000 稀释), 最后加入化学发光试剂进行放射自显影, 成像, 拍照并记录。利用美国 UVP 凝胶图像处理系统 Labworks 4.6 软件分析目的条带灰度值并统计分析。

1.2.6 MTT 法检测放射敏感性 放疗条件: 采用医用直线加速器(Varian 2300 C/D), 6 MV-X 射线, 源皮距 100 cm。各组细胞转染后 6 h, 给予不同剂量放射处理(2, 4, 6 Gy), 继续

37 ℃、饱和湿度及 5%CO₂ 浓度孵箱中无菌孵育,每 24 h 换液。48 h 后终止培养,每孔加入 MTT(5 mg/ml)10 μl,继续培养 4 h 后吸尽孔内液体,加入 150 μl DMSO,振荡 10 min,最后在酶联免疫检测仪 570 nm 波长处比色,记录各孔吸光度(absorbance,A)值,根据 A 值计算出各组存活分数并绘制相应存活曲线图。存活分数(survival fraction,SF)=实验组平均 A 值/对照组平均 A 值 × 100%。

1.2.7 Annexin V/PI 法检测细胞凋亡率 各组细胞转染后 6 h,经 4 Gy 放射处理后,继续于 37 ℃、饱和湿度及 5%CO₂ 浓度孵箱中无菌培养,每 24 h 换液。48 h 后终止培养,收集细胞,PBS 洗涤后制成 500 μl 单细胞悬液,分别加入 Annexin V 5 μl、稀释的碘化丙啶(propidium iodide,PI)10 μl 混匀,然后冰浴、暗处静置 10 min,最后置流式细胞仪检测。凋亡率%=凋亡细胞数/总细胞数 × 100%。

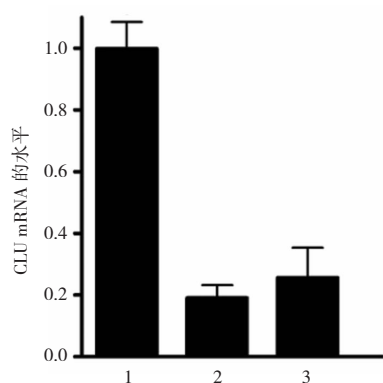
1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间差异比较采用方差分析,其两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Real-time PCR 验证靶向 CLU 的 shRNA 基因沉默效果

将 2 条针对 CLU 的 shRNA 序列及不针对细胞内任何基因的序列克隆到慢病毒载体 plentiLox 3.7 上,分别命名为 CLU shRNA1,CLU shRNA2 和对照 shRNA。将以上慢病毒感染胶质瘤 U87 细胞 72 h 后,提取细胞 RNA 进行 real-time PCR 检测。结果显示感染 CLU shRNA1 或 CLU shRNA2 细胞中 CLU mRNA 水平低于感染对照 shRNA 的细胞,见图 1(对照 shRNA vs. CLU shRNA1; $P=0.000$;对照 shRNA vs. CLU shRNA2; $P=0.000$)。



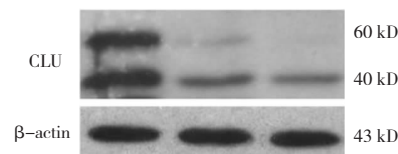
1. 对照 shRNA;2. CLU shRNA1;3. CLU shRNA2

图 1 Real-time PCR 检测细胞中 CLU mRNA 的水平
Fig.1 mRNA level of CLU detected by real-time PCR

2.2 Western blot 检测慢病毒介导的 shRNA 对 CLU 基因的抑制效应

将以上通过验证的 shRNA 包被成高效率的慢病毒。将分

别表达 CLU shRNA1,CLU shRNA2 或对照 shRNA 的慢病毒感染胶质瘤 U87 细胞 48 h 后,提取细胞总蛋白进行 Western blot 检测。Western blot 结果显示 CLU 蛋白的目的条带在 40 kD 和 60 kD 作用。与对照细胞相比,表达 CLU shRNA1 和 CLU shRNA2 的慢病毒具有显著抑制细胞 CLU 蛋白水平的作用,见图 2。



1. 对照 shRNA;2. CLU shRNA1;3. CLU shRNA2

图 2 Western blot 检测细胞中 CLU 的蛋白水平

Fig.2 Protein level of CLU detected by Western blot

2.3 MTT 检测 6 MV-X 射线对 CLU 基因沉默的细胞活力的影响

在以上显著的基因沉默效果的基础上,运用 MTT 方法检测 CLU 基因沉默的细胞对 6 MV-X 射线的敏感度。随着放射剂量的增加,各组细胞的存活率均有不同程度的下降,当 6 MV-X 射线放射剂量增加到 4 Gy 和 6 Gy 时,实验组细胞存活分数显著低于对照组,差异具有统计学意义,见图 3(4 Gy 时,对照 shRNA vs. CLU shRNA1; $P=0.000$,对照 shRNA vs. CLU shRNA2; $P=0.003$;6 Gy 时,对照 shRNA vs. CLU shRNA1; $P=0.000$,对照 shRNA vs. CLU shRNA2; $P=0.000$)。以上结果说明沉默 CLU 基因明显增加了脑胶质瘤 U87 细胞对放射的反应。

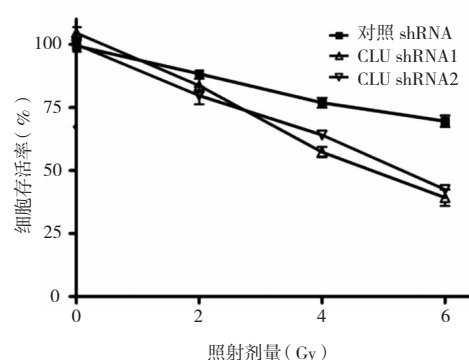


图 3 MTT 法检测 CLU 基因沉默对细胞放射敏感性的影响

Fig.3 Effect of CLU silencing on radiosensitivity examined by MTT assay

2.4 流式细胞术检测 4 Gy 放射处理后凋亡率

通过流式细胞仪检测接受 4 Gy 放疗后不同处理组细胞的凋亡率。结果显示感染对照 shRNA 的细胞中约有 (15.00 ± 3.53)% 处于凋亡;而感染 CLU shRNA1 的细胞约有 (35.54 ± 0.95)% 处于凋亡状态,感染 CLU shRNA2 的细胞中约有 (32.65 ± 3.02)% 处于凋亡状态,差异具有统计学意义,见图 4 (对照 shRNA vs. CLU shRNA1; $P=0.000$;对照 shRNA vs. CLU shRNA2; $P=0.000$)。说明沉默 CLU 提高神经胶质瘤 U87 细胞对 6 MV-X 射线的敏感度。

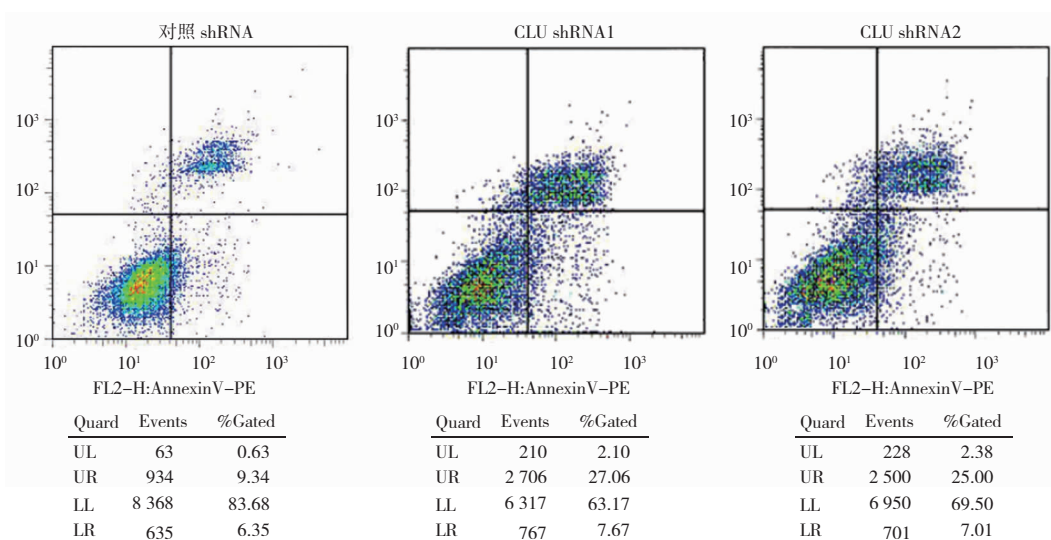
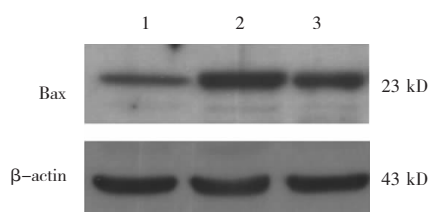


图 4 流式细胞仪检测 CLU 沉默对细胞凋亡的影响

Fig.4 Effect of CLU silencing on cell apoptosis detected by flow cytometry

2.5 CLU 沉默促进凋亡相关信号分子 Bax 的表达

为了进一步阐明 CLU 基因沉默增强脑胶质瘤 U87 细胞对放射敏感性的分子机制,对多个与细胞凋亡密切相关的信号分子进行筛选,包括 p53、p21、caspase-3、NF- κ B 和 Bax。Western blot 结果显示,CLU 基因沉默明显诱导了 Bax 蛋白的表达(图 5),但对其他凋亡相关蛋白没有显著影响。Bax 是一种 Bcl-2 家族的前凋亡蛋白,作为一种细胞损伤和刺激的传感器从而在线粒体凋亡途径中发挥着重要的作用。该结果提示 CLU 沉默可能通过调控线粒体凋亡途径从而促进了 Bax 诱导的细胞凋亡。



1. 对照 shRNA; 2. CLU shRNA1; 3. CLU shRNA2

图 5 Western blot 检测细胞中 Bax 蛋白水平

Fig.5 Protein level of Bax detected by Western blot

3 讨论

CLU 蛋白是一种异二聚体硫酸化糖蛋白,最早由 Blaschuk 等^[10]自山羊睾丸细胞中分离出来,为一种前列腺雄激素抑制物。此后的大量研究发现该蛋白广泛存在于人体体液及组织中,并参与机体多种调节重要的生理活动,如细胞周期、细胞的黏附、聚

集、分化、凋亡及 DNA 损伤修复等。目前研究发现 CLU 在多种肿瘤的发生发展中发挥着重要的作用。在病理条件下,CLU 在肺癌、肝癌、卵巢癌、食管癌、膀胱癌、乳腺癌、肾癌等多种恶性肿瘤中出现表达上调,并且与肿瘤的分级、转移、肿瘤细胞的放疗敏感性等密切相关。Miyake 等^[11]研究表明在膀胱移行上皮细胞癌中 CLU 的过度表达与疾病的进展和预后有关。在卵巢肿瘤中,CLU 蛋白表达程度与卵巢肿瘤恶性程度、转移及细胞凋亡间也存在密切相关性^[12]。周利群等^[13]发现前列腺癌组织中 CLU 的表达水平明显高于正常前列腺组织及前列腺增生组织,且其表达量随临床分期的增高而增高。更为重要的是,研究发现 CLU 的基因沉默可以诱导骨肉瘤细胞及前列腺癌细胞的凋亡,并促进肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[2]。同样,在前列腺癌^[8]、乳腺癌^[14]的研究中,针对 CLU 的反义寡核苷酸抑制 CLU 的表达可增强前列腺癌、乳腺癌对化疗药物的敏感性。大量研究发现 CLU 蛋白在细胞受到电离辐射时表达明显上调,从而对细胞发挥保护作用^[15]。Chi 等^[16]通过抑制 CLU 表达也在多种肿瘤中成功增加了其放疗敏感性。本研究首先运用慢病毒介导的基因沉默技术,成功而显著的抑制了神经胶质瘤细胞中 CLU 的表达。在此基础上,通过 MTT 及流式细胞术检测发现 CLU 基因沉默的胶质瘤细胞在 6 MV-X 射线处理后,细胞存活率较对照组明显下降,凋亡的细胞较对照细胞明显增多,说明 CLU 基因沉默增加了胶

质瘤细胞对放疗的敏感性。

目前研究发现多个信号通路参与 CLU 影响的放疗敏感性的过程。Criswell 等^[17]发现放射线处理后 p53 作为 CLU 的负性调节蛋白,显著下调了 CLU 的蛋白水平,从而促进细胞对放疗的敏感性。Ranney 等^[18]发现在乳腺癌细胞中,高表达的 CLU 蛋白可以定位于线粒体,通过抑制线粒体细胞色素 C 的释放,抑制了化疗诱导的细胞凋亡。也有研究报道^[19]CLU 蛋白主要通过抑制促凋亡分子 Bax 寡聚化,阻止其对线粒体的作用,从而抑制细胞凋亡发生,同时抑制 CLU 表达能够明显增加肿瘤细胞的凋亡率及放、化疗敏感性。本研究筛选了多个与凋亡密切相关的信号分子,发现在胶质瘤细胞中,CLU 沉默显著诱导促凋亡分子 Bax 蛋白的表达。大量研究数据证实细胞凋亡伴随着放射敏感性的增加,因此可以推测在神经胶质瘤中,CLU 沉默通过调控促凋亡分子 Bax 蛋白的表达,在促进了肿瘤细胞的凋亡的同时增加了其对放疗的敏感性。

本实验发现 CLU 基因沉默后,脑胶质瘤 U87 细胞对放射的敏感性有了显著的提高,并且这个过程可能与 Bax 蛋白相关。以上结果说明 CLU 基因与脑胶质瘤 U87 细胞的放射敏感性具有密切相关性,这为以 CLU 基因为靶点治疗脑胶质瘤提供了有效的理论依据,具有广泛的研究价值。

参 考 文 献

- [1] Goodenberger ML, Jenkins RB. Genetics of adult glioma[J]. Cancer genetics, 2012, 205(12): 613–621.
- [2] Trougakos IP, So A, Jansen B, et al. Silencing expression of the clusterin/apolipoprotein j gene in human cancer cells using small interfering RNA induces spontaneous apoptosis, reduced growth ability, and cell sensitization to genotoxic and oxidative stress[J]. Cancer Res, 2004, 64(5): 1834–1842.
- [3] Steinberg J, Oyasu R, Lang S, et al. Intracellular levels of SGP-2 (Clusterin) correlate with tumor grade in prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 1997, 3(10): 1707–1711.
- [4] Kang YK, Hong SW, Lee H, et al. Overexpression of clusterin in human hepatocellular carcinoma[J]. Hum Pathol, 2004, 35(11): 1340–1346.
- [5] Kruger S, Ola V, Fischer D, et al. Prognostic significance of clusterin immunoreactivity in breast cancer[J]. Neoplasma, 2007, 54(1): 46–50.
- [6] Wei L, Xue T, Wang J, et al. Roles of clusterin in progression, chemoresistance and metastasis of human ovarian cancer[J]. Int J Cancer, 2009, 125(4): 791–806.
- [7] Shannan B, Seifert M, Leskov K, et al. Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(1): 12–19.
- [8] Gleave M, Miyake H. Use of antisense oligonucleotides targeting the cytoprotective gene, clusterin, to enhance androgen and chemosensitivity in prostate cancer[J]. World J Urol, 2005, 23(1): 38–46.
- [9] Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(9): 6047–6052.
- [10] Blaschuk O, Burdzy K, Fritz IB. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ramn rete test is fluid[J]. J Biol Chem, 1983, 258(12): 7714–7720.
- [11] Miyake H, Gleave M, Kamidono S, et al. Overexpression of clusterin in transitional cell carcinoma of the bladder is related to disease progression and recurrence[J]. Urology, 2002, 59(1): 150–154.
- [12] Xie D, Lau SH, Sham JS, et al. Up-regulated expression of cytoplasmic clusterin in human ovarian carcinoma[J]. Cancer, 2005, 103(2): 227–283.
- [13] 周利群, 杨学贞, 曾 荔, 等. 聚集素在前列腺正常、增生、癌组织中的表达及意义[J]. 中华外科杂志, 2003, 41(2): 93–95.
- [14] So A, Sinnemann S, Huntsman D, et al. Knockdown of the cytoprotective chaperone, clusterin, chemosensitizes human breast cancer cells both in vitro and in vivo[J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(12): 1837–1849.
- [15] Klokova D, Criswell T, Leskova KS, et al. Boothmana, IR-inducible clusterin gene expression: a protein with potential roles in ionizing radiation-induced adaptive responses, genomic instability, and bystander effects[J]. Mutat Res, 2004, 568(1): 97–110.
- [16] Chi KN, Hotte SJ, Tu D, et al. Randomized phase II study of docetaxel and prednisone with or without OGX-011 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer[J]. J Clin Oncol, 2010, 26(27): 4247–4254.
- [17] Criswell T, Klovov D, Beman M, et al. Repression of IR-inducible clusterin expression by the p53 tumor suppressor protein[J]. Cancer Biol Ther, 2003, 2(4): 372–380.
- [18] Ranney MK, Ahmed IS, Potts KR, et al. Multiple pathways regulating the anti-apoptotic protein clusterin in breast cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1772(9): 1103–1111.
- [19] Zhang H, Kim JK, Edwards CA, et al. Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax[J]. Nat Cell Biol, 2005, 7(9): 909–915.

(责任编辑: 关蕴良)