

# 应用Cyclin D1和bcl-2为靶标的siRNA慢病毒载体构建和鉴定\*★

吴小三<sup>1</sup>, 张春林<sup>1</sup>, 赵曜<sup>1</sup>, 高田田<sup>2</sup>, 孙佼<sup>1</sup>, 曾炳芳<sup>1</sup>

## Construction and identification of lentiviral vector targeting human *bcl-2* and *cyclin D1* gene

Wu Xiao-san<sup>1</sup>, Zhang Chun-lin<sup>1</sup>, Zhao Yao<sup>1</sup>, Gao Tian-tian<sup>2</sup>, Sun Jiao<sup>1</sup>, Zeng Bing-fang<sup>1</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Studies concerning osteosarcoma drug resistance are limited for single gene or passway. However, dual-channel blocker of apoptosis and cell cycle regulation may reverse drug resistance in osteosarcoma.

**OBJECTIVE:** To construct an effective *bcl-2*, *cyclin D1* specific siRNA lentiviral vector and transfect it into drug-resistant osteosarcoma cell lines of osteosarcoma, and to discuss the reversal of drug resistance.

**METHODS:** The restriction endonuclease and T<sub>4</sub> DNA ligase were used to construct the vector plasmid. *Bcl-2* and *cyclin D1* genes were cloned into the site of pSIH1-H1-copGFP shRNA vector to construct the pSIH1-H1-copGFP-*bcl-2*-siRNA and pSIH1-H1-copGFP-*cyclin D1*-siRNA. The cloned lentiviral plasmids and the packaging plasmids system were transfected into 293T cells. The supernatant was collected and the titer and infection efficiency of the recombinant lentivirus were determined.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The ligation of four pairs of *bcl-2* and *cyclin D1* specific siRNAs to the double digested lentiviral pSIH1-H1-copGFP shRNA vector were successful. The titer of concentrated virus was  $1.14 \times 10^4$  ifu/ $\mu$ L in the supernatant of the infected cells. The highest interference efficiency of *bcl-2*, *cyclin D1* genes was respectively 88% and 87% detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The results demonstrated an effective *bcl-2*, *cyclin D1* specific siRNA lentiviral vector has been constructed by the application of siRNA technique.

Wu XS, Zhang CL, Zhao Y, Gao TT, Sun J, Zeng BF. Construction and identification of lentiviral vector targeting human *bcl-2* and *cyclin D1* gene. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(20): 3709-3713. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 近年来, 与骨肉瘤耐药相关的基因研究大多局限于单个基因或单个通路。而进行细胞凋亡和细胞周期调控双通道同时阻断有可能逆转药物耐受机制。

**目的:** 构建 *bcl-2* 和 *cyclin D1* 特异性 siRNA 慢病毒载体, 拟将其转入骨肉瘤耐药细胞株, 探讨对骨肉瘤耐药性的逆转作用。

**方法:** 采用限制性内切酶酶切、T<sub>4</sub>DNA 连接酶连接等方法, 将 *bcl-2* 和 *cyclin D1* 基因分别插入慢病毒载体 pSIH1-H1-copGFP shRNA Vector 中, 构建 *bcl-2* 和 *cyclin D1* 与 pSIH1-H1-copGFP 共表达的慢病毒载体(pSIH1-H1-copGFP-*bcl-2*-siRNA 和 pSIH1-H1-copGFP-*cyclin D1*-siRNA)。构建成功后的慢病毒质粒系统和 pPACK 包装质粒共转染 293T 细胞, 过滤, 浓缩病毒, 利用荧光蛋白作为报告基因, 对病毒滴度和感染效率进行检测。

**结果与结论:** 4 对 *bcl-2* 和 *cyclin D1* 特异性 siRNA 与双酶切慢病毒载体 pSIH1-H1-copGFP shRNA Vector 连接成功。共转染 293T 细胞包装病毒并浓缩后滴度达  $1.14 \times 10^4$  ifu/ $\mu$ L, 适合感染目的细胞。实时荧光定量 PCR 检测结果显示对 *bcl-2* 和 *cyclin D1* 基因的干扰效率最高分别达 88% 和 87%。证实将 siRNA 技术应用于 *bcl-2* 和 *cyclin D1*, 能够构建出有效的 *bcl-2* 和 *cyclin D1* 特异性 siRNA 慢病毒载体。

**关键词:** 骨肉瘤; *bcl-2* 基因; *cyclin D1* 基因; RNA 干扰; 慢病毒; 组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.20.023

吴小三, 张春林, 赵曜, 高田田, 孙佼, 曾炳芳. 应用 *Cyclin D1* 和 *bcl-2* 为靶标的 siRNA 慢病毒载体构建和鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(20):3709-3713. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

骨肉瘤约占恶性骨肿瘤的80%上, 目前采取的治疗手段主要是新辅助化疗及手术等联合治疗, 患者5年生存率已达70%左右<sup>[1]</sup>。虽然如此, 骨肉瘤的治疗结果依然不能令人满意<sup>[2]</sup>, 主要原因是骨肉瘤对化疗反应不满意, 导致肿瘤耐药而出现复发、转移而预后不良<sup>[3]</sup>。对骨肉瘤细胞的研究表明, 一系列基因功能的改变增强了肿瘤的增殖性与侵袭性。近年来, RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术因其具有高度特

异性, 高效性及低毒性等特点已经成为探索基因功能的新思路。作者设想设计以与骨肉瘤耐药密切相关的基因为靶标的siRNA, 利用由HIV病毒改造而来的慢病毒作为载体, 在转录后对相应靶基因进行调节, 联合及分别应用, 观察细胞耐药及凋亡的改变。

进行RNAi研究时, 目的基因靶序列的选择至关重要, 针对不同靶序列干扰效果可能相去甚远。*bcl-2*基因属于*bcl-2*基因家族, 是一种原癌基因, 具有抑制细胞凋亡的作用, 大量研究表明它在骨肉瘤细胞中高表达, 并积极参与肿瘤的发生和发展<sup>[4]</sup>。*cyclin D1*也是一种原癌基

<sup>1</sup>Department of Orthopaedics, Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China;  
<sup>2</sup>Department of Orthopaedics, Eighth People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200235, China

Wu Xiao-san★, Studying for master's degree, Physician, Department of Orthopaedics, Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China  
Xiaosan96@live.cn

Correspondence to: Zhang Chun-lin, Associate chief physician, Department of Orthopaedics, Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30700850\*

Received: 2010-01-04  
Accepted: 2010-02-11

<sup>1</sup>上海交通大学附属第六人民医院骨科, 上海市200233; <sup>2</sup>上海市第八人民医院骨科, 上海市200235

吴小三★, 男, 1984年生, 安徽省安庆市人, 苏州大学在读硕士, 医师, 主要从事骨肿瘤的基础与临床研究。  
Xiaosan96@live.cn

通讯作者: 张春林, 男, 副主任医师, 上海交通大学附属第六人民医院骨科, 上海市200233

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2010)20-03709-05

收稿日期: 2010-01-04  
修回日期: 2010-02-11 (20091017005/N:Z)

因, 在调节细胞从G<sub>1</sub>期进入S期中发挥重要的作用, 目前, 在许多肿瘤中都发现了cyclin D1基因表达的异常, cyclin D1在骨肉瘤中的表达上调亦有报道。实验设计并构建bcl-2和cyclin D1特异性siRNA慢病毒载体并鉴定是否构建成功, 为进行下一步的骨肉瘤耐药性研究打下基础。

## 1 材料和方法

**设计:** 基因水平的单一样本实验。

**时间及地点:** 实验于2008-11/2009-06在上海市第六人民医院中心实验室完成。

**材料:**

细胞株、试剂及仪器	来源
293T 细胞株、Lentivirus Package plasmid mix	System Biosciences
骨肉瘤阿霉素耐药株 MG63/R1000	本实验室培养
BamH I、EcoR I、限制性内切酶、T <sub>4</sub> Ligase、Taq 酶、dNTP Mix、M-MLV 反转录酶、dNTP、oligo dT、Rnase inhibitor、SYBR Master Mixture、PCR Buffer、PCR 仪、大肠杆菌 DH5α、MiniBEST Plasmid Purification Kit	Takara
Lipofectmaine 2000	Invitrogen
Trypsin 0.25%、Opti-MEM	GIBCO
Milllex-HV 0.45 μm PVDF filters	Millipore
UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒	上海生工
紫外分光光度计	Thermo
LB、SOC	OXOID
摇床	江苏培英
台式离心机、冷冻离心机、微量加样器	Eppendorf
电泳仪、水平电泳槽	TANON
其他试剂	进口或国产分析纯

**实验方法:**

**慢病毒载体的构建及鉴定:** 靶向bcl-2和cyclin D1 siRNA序列设计: 根据GenBank中bcl-2基因的已知mRNA序列(基因编码: NM\_000633)和cyclin D1基因的已知序列(基因编码: NM\_053056), 运用Ambion公司网上在线设计工具, 选择3段靶序列, 同时设计一段阴性(Negative)对照序列, 见表1, 2。

表 1 bcl-2 特异性的干扰序列  
Table 1 Target sequence of bcl-2 gene for siRNA

No.	Target sequence
Bcl2-siRNA1	5'GCT GCA CCT GAC GCC CTT C3'
Bcl2-siRNA2	5'GCT GGA TTA TAA CTC CTC T3'
Bcl2-siRNA3	5'GGA TGA CTG AGT ACC TGA A3'
siRNA-Negative	5'CGT TTA ACT CTC CCA ACC A3'

表 2 cyclin D1 特异性的干扰序列  
Table 2 Target sequence of cyclin D1 gene for siRNA

No.	Target sequence
CyclinD1-siRNA1	5'GGT AGA TGT GTA ACC TCT T 3'
CyclinD1-siRNA2	5'CCA TCC AGT GAC AAA CCA T 3'
CyclinD1-siRNA3	5'GCT GTG CAT CTA CAC CG AC 3'
siRNA-Negative	5'CGT TTA ACT CTC CCA ACC A3'

再根据每条siRNA序列, 设计两条互补的DNA模板单链, 模板链包括siRNA的正义链(sense chain)和反义链(antisense chain), 中间以9个脱氧核苷酸的Loop结构(5' - CTT CCT GTC AGA -3')相连, 后面接有RNA PolyII聚合酶转录中止位点(TTT TT), 同时模板链两端分别添加BamHI和EcoRI酶切位点, 合成相应的DNA单链。序列由上海Invitrogen公司合成。

**双链DNA oligo制备:** 将合成互补的两条寡核苷酸各取5 μL (1 g/L), 加入20 μL退火缓冲液, 加双蒸水70 μL至总体积为100 μL, 混匀, 95 °C加热10 min, 取出室温静置1 h, 12%PAGE非变性PAGE凝胶检测双链形成效率。

**vshRNA载体的构建:** 对siRNA质粒表达载体(pSIH1-H1-copGFP shRNA Vector)进行酶切线性化处理。酶切反应体系为: 纯化的DNA质粒2.0 μL (500 mg/L), BamH I 0.25 μL (10 U/μL), EcoR I 0.25 μL (10 U/μL), K Buffer 1.0 μL (1×), 加dH<sub>2</sub>O 6.5 μL至总反应体系为10.0 μL。置于37 °C, 4 h。0.5%琼脂糖凝胶电泳, 切胶后对目的片段进行切胶回收, 紫外分光光度计测定浓度, -20 °C保存待用。

**目的基因与载体片段的连接:** 将双链DNA oligo与酶切处理后的vsh RNA载体连接。22 °C连接2 h, 准备转化DH5α感受态细胞。

**转化:** 取-70 °C保存的DH5α感受态细胞, 冰浴放置5~10 min, 使之冰中融化; 5 μL连接产物加入感受态细胞, 移液枪缓慢混匀, 冰浴放置30 min; 混合物快速放入42 °C水浴中进行热击90 s, 取出后冰浴2 min; 将转化产物加入900 μL的SOC培养基中, 37 °C和150 r/min条件下摇床培养1 h; 收集菌液, 分100 μL和900 μL涂布LB(Amp抗性)平板, 37 °C培养过夜。

**PCR鉴定阳性克隆:** 37 °C培养过夜后, 每组样品挑取1个单菌落, 用载体多克隆位点两端引物行PCR扩增检测阳性菌落。PCR产物5 μL用1.5%琼脂糖凝胶电泳, 检测扩增条带大小。

**DNA测序鉴定:** 挑取PCR检验阳性菌落于3 mL LB液体培养基中, 37 °C和200 r/min条件

下摇床培养过夜。MiniBEST Plasmid Purification Kit提取质粒，使用载体多克隆位点的上游引物(Foward primer: 5'-TGC ATG TCG CTA TGT GTT CTG)将质粒DNA送测序。

**携带siRNA的慢病毒重组体的包装及病毒滴度测定：**

**病毒包装：**转染前1 d，在10 cm的培养皿中接种293T细胞，细胞数为 $5 \times 10^6$ ，使转染时细胞能铺满培养皿的50%~70%将2  $\mu$ g目的基因的慢病毒表达载体同20  $\mu$ L (10  $\mu$ g)pPACK包装质粒混合物混合，400  $\mu$ L DMEM培养基稀释。取30  $\mu$ L Lipofectamine 2000™试剂，用400  $\mu$ L DMEM培养基稀释。稀释后的DNA与稀释后的Lipofectamine 2000™混合，室温下孵育15 min，混合液转移至293T细胞的培养液中，37  $^{\circ}$ C、体积分数5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养。48 h后收集293T细胞上清液，3 000 r/min室温离心5 min去除细胞碎片，将上清液用Millex-HV 0.45  $\mu$ m的PVDF滤膜过滤。以10  $\mu$ L每管分装病毒液置于-70  $^{\circ}$ C冰箱中保存待用。

**病毒载体的滴度检测：**使用GFP表达量法测定病毒滴度。将待测定的病毒原液按 $10^{-1}$ ， $10^{-2}$ ， $10^{-3}$ ， $10^{-4}$ ， $10^{-5}$ ， $10^{-6}$ ， $10^{-7}$ ， $10^{-8}$ ， $10^{-9}$ ， $10^{-10}$ 梯度稀释。在96孔板中接种293T细胞100  $\mu$ L，细胞数为 $3.5 \times 10^7$  L<sup>-1</sup>，用含体积分数10%胎牛血清的DMEM在37  $^{\circ}$ C、体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。24 h后，使用新鲜培养基100  $\mu$ L (不含抗生素，添加体积分数2%的胎牛血清)，对感染后细胞进行换液处理，大约感染后第72小时荧光表达趋于稳定。在显微镜下计数细胞总数以及有荧光表达的细胞数目，将得到的数值除以相应的稀释倍数就得到了病毒原液的滴度值。

**实时荧光定量PCR检测RNA干扰效率：**将上述培养病毒原液干扰MG63/R细胞，TRIzol法常规提取细胞总RNA，按反转录(RT)试剂盒说明进行反转录合成cDNA。常规进行PCR反应。实验以 $\beta$ -actin为内参照。记录各组达到域值的循环数(Ct值)，根据Ct值比较基因的表达量，鉴定RNA干扰是否成功。

**设计、实施、评估者：**实验设计及评估为通讯作者，实验实施为第一、三作者，均经过正规科研培训。

**2 结果**

**2.1 构建的特异性pshRNA-GFP Lentivector质粒结构**  
目的基因shRNA核苷酸序列经退火形成双链DNA oligo，行12%PAGE非变性PAGE凝胶检测后，用BamH I和EcoR I双酶切pshRNA-GFP载体后线性化(图1)，将线性化载体与DNA oligo经行T<sub>4</sub>噬菌体连接，产物转化DH5 $\alpha$ 感受态细胞，挑选阳性重组克隆，PCR鉴定，重组克隆PCR片段为152 bp，未插入的空载体PCR片段为102 bp(图2)，鉴定结果与预期相符。

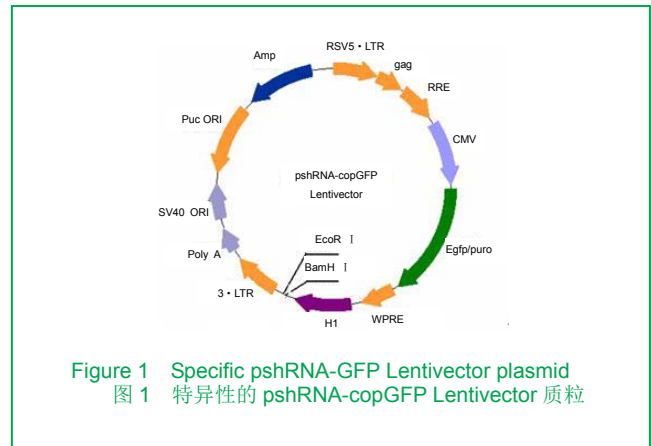
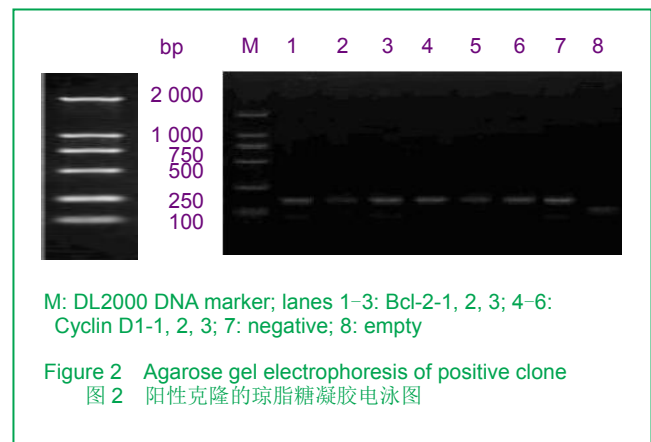


Figure 1 Specific pshRNA-GFP Lentivector plasmid  
图1 特异性的 pshRNA-copGFP Lentivector 质粒



M: DL2000 DNA marker; lanes 1-3: Bcl-2-1, 2, 3; 4-6: Cyclin D1-1, 2, 3; 7: negative; 8: empty

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of positive clone  
图2 阳性克隆的琼脂糖凝胶电泳图

**2.2 测序结果** 结果表明目的基因序列准确无误，重组质粒构建成功。

**2.3 携带目的基因慢病毒重组体的包装及鉴定** 使用慢病毒包装质粒混合物和构建好的慢病毒干扰质粒共转染293T细胞，48 h后荧光显微镜下观察荧光强度，细胞生长良好，病毒包装成功。

包装质粒混合物和 Lenti-Bcl-2 siRNA2 重组质粒共转染 293T 细胞 48 h 后荧光显微镜观察结果见图 3。

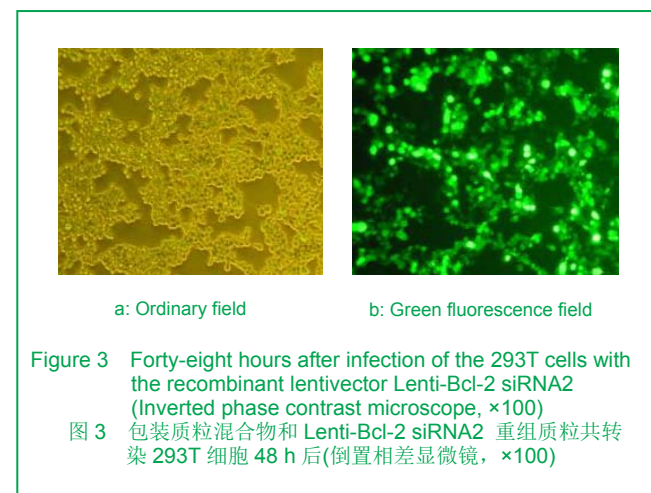
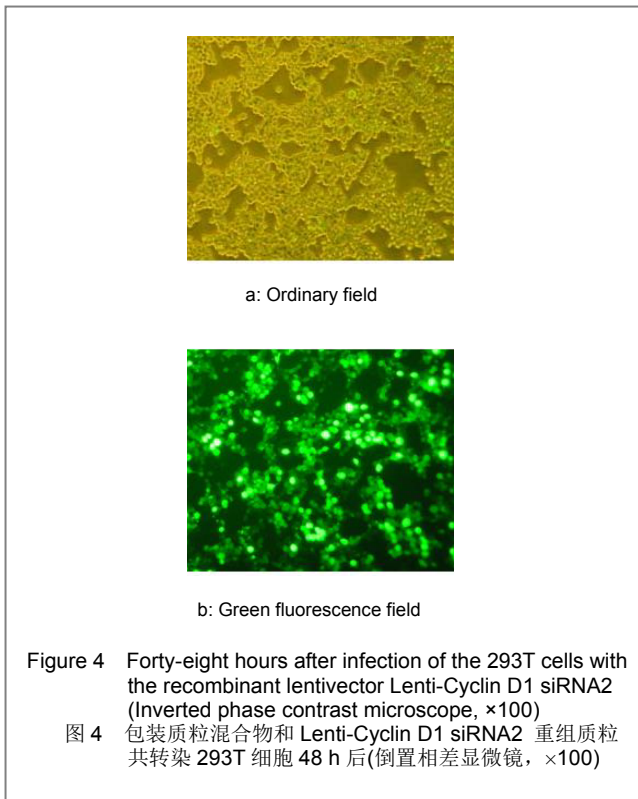


Figure 3 Forty-eight hours after infection of the 293T cells with the recombinant lentivector Lenti-Bcl-2 siRNA2 (Inverted phase contrast microscope,  $\times 100$ )

图3 包装质粒混合物和 Lenti-Bcl-2 siRNA2 重组质粒共转染 293T 细胞 48 h 后(倒置相差显微镜,  $\times 100$ )

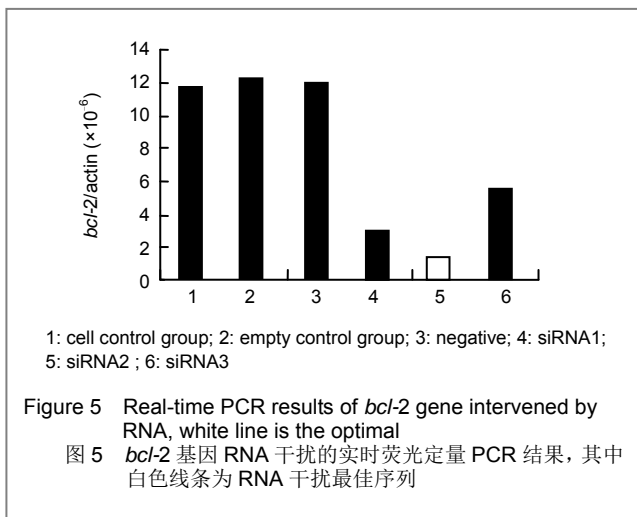
包装质粒混合物和Lenti-cyclin D1siRNA2 重组质粒共转染293T细胞48 h后荧光显微镜观察结果见图4。



转染后48~72 h收集合成的慢病毒液, 经浓缩后再感染293T细胞, 感染24 h后在荧光显微镜下进行滴度值测定, 经过计算, Lenti-bcl2 siRNA2病毒液滴度为  $1.14 \times 10^4$  ifu/ $\mu$ L。

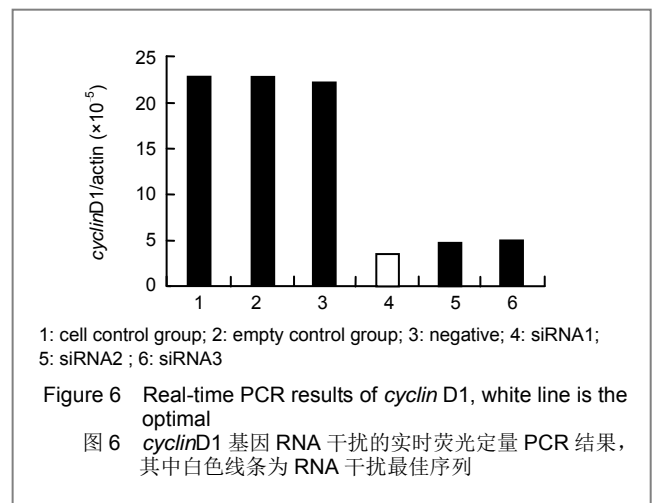
**2.4 实时荧光定量PCR结果** 对 *bcl-2* 基因的干扰效率分别为74%, 88%和53%, 对 *cyclin D1* 基因的干扰效率分别为87%, 79%和76%。证明 *bcl-2* 和 *cyclin D1* 特异性 siRNA 慢病毒载体构建成功, 能有效干扰 *bcl-2* 和 *cyclin D1* 的基因表达。

*bcl-2* 基因RNA干扰的实时荧光定量PCR结果见图5。



*cyclin D1* 基因RNA干扰的实时荧光定量PCR结果

见图6。



### 3 讨论

RNA干扰由Fire发现并命名, 可使目标mRNA特异性降解, 称为基因敲减, 由于转录后基因沉默故又被称为RNAi<sup>[5]</sup>。生成siRNA的方法有化学合成法、体外转录合成法、质粒载体介导的细胞内表达法和病毒载体介导的细胞内表达法等。相对于以往所用的载体如腺病毒、反转录病毒等, 慢病毒载体具有可感染非分裂期细胞, 容纳外源性目的基因的片段大, 目的基因表达时间长, 不易诱发宿主免疫反应和安全性较好等优点<sup>[6-7]</sup>。本实验将19nt的目的序列及其反向重复序列插入siRNA表达慢病毒载体转染细胞后, 能够转录出含有19个碱基对的小发夹RNA, 诱导RNAi的发生。

阿霉素是骨肉瘤化疗中的主要药物, 应用阿霉素诱导建立骨肉瘤耐药株具有代表性, 对骨肉瘤耐药机制的研究有重大的意义。有研究表明, 阿霉素能激活*bcl-2*通道, 上调*bcl-2*基因从而使肿瘤发生耐药<sup>[8]</sup>。课题组前期采用阿霉素冲击诱导及药物浓度逐渐递增的方式建立了耐药细胞模型MG63/R, 运用Western blot方法证实, MG63/R细胞组与MG63细胞组相比, Bcl-2蛋白表达在细胞诱导耐药后增加了1.36倍( $P < 0.05$ )。

本实验中, 将Bcl-2-siRNA和Cyclin D1-siRNA与siRNA质粒表达载体(pSIH1-H1-copGFP shRNA Vector)连接, 拟将构建好的载体转染入人骨肉瘤MG63/R1000细胞, 在mRNA水平上对*bcl-2*和*Cyclin D1*基因进行抑制, 但不干扰其他基因的表达。在构建的3条特异性siRNA序列中, 以重组载体pSIH1-H1-copGFP-bcl-2-siRNA和pSIH1-H1-copGFP-cyclinD1-siRNA转染后对特定基因表达的干扰效果最佳, 作为优先考虑的序列。

骨肉瘤的发生不仅与细胞的无限增殖有关, 而且与细胞的凋亡减少有关。细胞凋亡受多途径基因调控,

*bcl-2*基因是与细胞凋亡关系最为密切的凋亡抑制基因,具有干扰凋亡途径的级联放大作用从而导致对化疗药物的耐受<sup>[9-11]</sup>。对线粒体凋亡通路的影响是*bcl-2*实现凋亡调控的主要途径,当细胞受到死亡信号刺激时,与Bcl-2蛋白相结合的蛋白就会被置换出来,线粒体膜通透性增加,释放出一系列物质,导致细胞的死亡<sup>[12]</sup>。*bcl-2*基因作为原癌基因,大量研究表明它积极参与多种肿瘤的发生和发展<sup>[13]</sup>。在骨肉瘤细胞中的表达已有众多相关报道。Posl等<sup>[14]</sup>的研究结果表明,Bcl-2的高表达是骨肉瘤恶性程度高的指标。Ferrari等<sup>[15]</sup>发现原发骨肉瘤及骨肉瘤发生肺转移的病理组织切片中Bcl-2的表达率分别为53%、84%,提示Bcl-2的表达与肿瘤的恶性程度有关。在前期的实验中,作者利用RT-PCR及Western blot技术对耐药前后的骨肉瘤细胞中的*bcl-2*基因含量进行检测,结果发现*bcl-2*基因及其表达蛋白在耐药细胞株MG63/R中表达明显高于敏感细胞株MG63。研究表明,*bcl-2*基因表达的下降可能可以提高化疗药物对肿瘤细胞的敏感性,降低对药物的耐受性<sup>[16]</sup>。本实验以*bcl-2*基因为靶标建立siRNA慢病毒载体,拟将特异性的siRNA转染入*bcl-2*高表达的耐药的人骨肉瘤细胞株MG63/R1000,通过抑制靶基因*bcl-2*的表达,提高化疗药物敏感性,进一步研究Bcl-2与骨肉瘤耐药的相关性。

骨肉瘤的发生发展与细胞周期调控失衡有关,Cyclin D1是细胞周期调节点的性正调控因子,其过度表达能刺激细胞周期素依赖性激酶4介导的视网膜母细胞瘤易感基因磷酸化,而后者高度磷酸化能使其失去抑制生长的功能,从而促进细胞增殖和一些肿瘤的失控生长。研究表明,Cyclin D1基因在多种肿瘤细胞中存在高表达,因此它有望成为肿瘤基因治疗的一个新的有意义的靶点。Gysin等<sup>[17]</sup>研究表明,Cyclin D1过度表达与骨肉瘤发生发展高度相关。目前已有较多应用人工合成的Cyclin D1反义寡核苷酸,反义RNA和负显性突变体导入肿瘤细胞内,成功抑制Cyclin D1基因的表达和抑制肿瘤细胞增殖的研究。Cyclin D1基因在骨肉瘤细胞中存在高表达,为其作为基因治疗靶点提供了理论依据。

#### 4 参考文献

- [1] Longhi A, Errani C, De Paolis M, et al. Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art. *Cancer Treat Rev.* 2006;32(6):423-436.
- [2] Lee JA, Kim MS, Kim DH, et al. Relative tumor burden predicts metastasis-free survival in pediatric osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2008;50(2):195-200.
- [3] Bacci G, Longhi A, Versari M, et al. Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: 15-year experience in 789 patients treated at a single institution. *Cancer.* 2006;106(5):1154-1161.

- [4] Nedelcu T, Kubista B, Koller A, et al. Livin and Bcl-2 expression in high-grade osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134(2):237-244.
- [5] Shariat SF, Lotan Y, Saboorian H, et al. Survivin expression is associated with features of biologically aggressive prostate carcinoma. *Cancer.* 2004;100(4):751-757.
- [6] de Jonge J, Holtrop M, Wilschut J, et al. Reconstituted influenza virus envelopes as an efficient carrier system for cellular delivery of small-interfering RNAs. *Gene therapy.* 2006;13(5):400-411.
- [7] Raoul C, Abbas-Terki T, Bensadoun JC, et al. Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med.* 2005;11(4):423-428.
- [8] Tu Y, Xu FH, Liu J, et al. Upregulated expression of BCL-2 in multiple myeloma cells induced by exposure to doxorubicin, etoposide, and hydrogen peroxide. *Blood.* 1996;88(5):1805-1812.
- [9] Khodadadian M, Leroux ME, Auzenne E, et al. MRP- and BCL-2-mediated drug resistance in human SCLC: effects of apoptotic sphingolipids in vitro. *Lung Cancer.* 2009;66(1):48-57.
- [10] George J, Banik NL, Ray SK. Bcl-2 siRNA augments taxol mediated apoptotic death in human glioblastoma U138MG and U251MG cells. *Neurochem Res.* 2009;34(1):66-78.
- [11] Michaud WA, Nichols AC, Mroz EA, et al. Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis and predicts poor outcome following chemoradiation treatment in advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(5):1645-1654.
- [12] Panasiuk A, Dzieciol J, Panasiuk B, et al. Expression of p53, Bax and Bcl-2 proteins in hepatocytes in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2006;12(38):6198-6202.
- [13] Warmann SW, Frank H, Heitmann H, et al. Bcl-2 gene silencing in pediatric epithelial liver tumors. *The Journal of surgical research.* 2008;144(1):43-48.
- [14] Posl M, Amling M, Werner M, et al. Osteosarcoma--apoptosis and proliferation. Study of bcl-2 expression. *Der Pathologe.* 1994;15(6):337-344.
- [15] Ferrari S, Bertoni F, Zanella L, et al. Evaluation of P-glycoprotein, HER-2/ErbB-2, p53, and Bcl-2 in primary tumor and metachronous lung metastases in patients with high-grade osteosarcoma. *Cancer.* 2004;100(9):1936-1942.
- [16] Fleming AB, Saltzman WM. Pharmacokinetics of the carmustine implant. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(6):403-419.
- [17] Gysin R, Azzi A, Visarius T. Gamma-tocopherol inhibits human cancer cell cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclins. *Faseb J.* 2002;16(14):1952-1954.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 国家自然科学基金资助项目 (30700850), 课题名称“应用 RNA 干扰技术双通道下调 bcl-2 和 cyclin D1 基因增强耐药骨肉瘤化疗敏感性的研究”。

**利益冲突:** 无利益冲突。

**课题的创新点:** 近年来,许多学者对骨肉瘤耐药相关的基因做了大量研究,但大多局限于对单个基因或单个通路的研究。本实验选取细胞凋亡通路上的 *bcl-2* 基因和细胞周期调控相关的 *cyclin D1* 基因做为研究对象,将细胞凋亡通路和细胞周期调控机制联系起来,为探索肿瘤耐药机制开拓了新的思路。

**课题评估的“金标准”:** 公认的检测 RNA 干扰效率的方法是实时荧光定量 PCR, 本文已经采用。

**课题的偏倚与不足:** 由于骨肉瘤细胞化疗耐药的机制尚未完全阐明,可能是多通道多基因的综合作用。目前更多的研究认为,骨肉瘤耐药与 *mdr*、*mrp* 以及 *lpr* 等基因密切相关。本课题中未进一步研究 *bcl-2* 和 *cyclin D1* 与这些基因的相关性。