

miR-125b慢病毒表达载体的构建及其对卵巢癌SKOV3细胞增殖和迁移的影响

何小茜¹ 余秋波² 杨 戎^{1*}

(¹重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, ²重庆医科大学生命科学院, 重庆 400016)

摘要 构建并鉴定miR-125b慢病毒过表达载体, 研究miR-125b对卵巢癌细胞增殖和迁移的影响及其可能机制。将PCR扩增的miR-125b前体序列与经过酶切后的GP-Supersilencing Vector进行连接, 产生miR-125b重组慢病毒表达载体。将重组慢病毒载体质粒、pGag/Pol、pRev和pVSV-G共转染293T细胞, 包装产生慢病毒。使用收获的病毒颗粒感染卵巢癌SKOV3细胞, 嘌呤霉素筛选稳定感染细胞株; 实时荧光定量PCR(Real-time qPCR)检测miR-125b在SKOV3细胞中的表达; Western blot检测其潜在靶基因HER-2的表达; MTT实验和Transwell侵袭实验分别观察miR-125b过表达后SKOV3细胞增殖和迁移能力的改变。该研究成功构建miR-125b慢病毒过表达载体, 感染卵巢癌SKOV3细胞后, 能够过表达miR-125b, 并抑制SKOV3细胞的增殖及迁移, 降低潜在靶基因HER-2的表达。该研究证明, miR-125b能够抑制SKOV3细胞的增殖及迁移, 并可能通过降低潜在靶基因HER-2的表达而实现。

关键词 miR-125b; HER-2; 卵巢癌; 细胞增殖; 细胞迁移

Construction of Lentiviral Vector of miR-125b and the Effect of miR-125b on Cell Proliferation and Migration of Ovarian Cancer SKOV3 Cells

He Xiaoxi¹, Yu Qiubo², Yang Rong^{1*}

(¹Molecular Medicine and Cancer Research Centre, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²Institute of Life Science, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract We constructed the lentiviral vector expressing miR-125b and observed the effect of miR-125b on ovarian cancer cell proliferation and migration. The PCR amplification of miR-125b precursor sequence was linked with linearized GP-Supersilencing Vector to generate the recombinant lentiviral vector expressing miR-125b. The 293T cells were transfected with the plasmids of recombinant lentiviral vector, pGag/Pol, pRev and pVSV-G plasmids to package the lentivirus. SKOV3 cells were infected by obtained lentivirus and screened with puromycin. The expression of miR-125b in SKOV3 cells was detected by Real-time qPCR and the expression of potential target gene *HER-2* was tested by Western blot. Cell proliferation and cell migration were assessed using the MTT assay and transwell migration assay. The results showed that the lentiviral vector expressing miR-125b was successfully constructed and achieved the over-expression of miR-125b after infected ovarian cancer SKOV3 cells. The over-expression of miR-125b inhibited cell proliferation and migration of SKOV3 cells and decreased the expression of *HER-2* gene. We concluded that miR-125b could inhibit the proliferation and migration of SKOV3 cells through down-regulation of *HER-2* expression.

Key words miR-125b; *HER-2*; ovarian cancer; cell proliferation; cell migration

收稿日期: 2013-10-23 接受日期: 2013-12-25

重庆市渝中区科技计划项目(20120205)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485868, E-mail: 1364262572@qq.com

Received: October 23, 2013 Accepted: December 25, 2013

This work was supported by the Project of Science and Technology Plan of Chongqing Yuzhong District

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485868, E-mail: 1364262572@qq.com

网络出版时间: 2014-03-28 16:49

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.04.0339.html>

MicroRNAs(miRNAs)是一类长度为22 bp左右的非编码小分子RNA, 它们通过对靶基因mRNA的裂解或翻译抑制而在动物和植物中起着重要的调控作用。在哺乳动物中, miRNA主要通过与其靶基因3'-UTR区不完全配对, 抑制靶基因的翻译, 在转录后水平调控基因的表达, 从而参与调控胚胎形成、个体发育、细胞增殖、分化和凋亡等一系列生理进程, 并与多种人类疾病密切相关。现有研究表明, miRNA在多种人类肿瘤中异常上调或下调, 抑制或增强重要的肿瘤相关基因的表达, 发挥着类似于肿瘤抑制基因或癌基因的功能。

miR-125b是miRNA家族中的重要一员, 它在多种肿瘤发生发展过程中发挥重要作用。研究发现, 在卵巢癌组织和细胞株中miR-125b呈明显低表达, 它可能通过解除对一系列潜在靶基因如*HER-2*基因表达的抑制作用, 导致靶基因的表达上调, 从而影响卵巢癌细胞的增殖、凋亡、迁移等正常生物学功能, 但其具体调控机制尚不明确。在卵巢癌中, *HER-2*基因的过表达可促进卵巢癌细胞增殖及转移能力, 并影响肿瘤对化疗的敏感性。因此, 本研究拟通过在卵巢癌SKOV3细胞株中过表达miR-125b, 检测miR-125b对卵巢癌SKOV3细胞增殖和迁移的影响, 及其对潜在靶基因*HER-2*的调节作用, 以期明确miR-125b在卵巢癌发生发展过程中是否通过调控潜在靶基因*HER-2*的表达发挥作用。

1 材料与方法

1.1 材料

慢病毒载体系统(由GP-Supersilencing Vector、pGag/Pol、pRev和pVSV-G四种质粒组成)、Real-time qPCR试剂盒购自上海吉玛生物技术有限公司; 感受态大肠杆菌菌株DH5 α 购自中科院上海生命科学研究院细胞库; 人卵巢癌SKOV-3细胞、293T细胞由重庆医科大学病理生理教研室保存; 限制性内切酶、T₄ DNA连接酶、质粒抽提试剂盒(Qiagen公司); 转染试剂脂质体Lipofectamine 2000(Invitrogen公司); Trizol总RNA提取试剂、M-MLV(Tiagen公司); ladder DNA marker(AXYGEN公司); MTT(Sigma公司); RPMI-1640、DMEM培养基、胎牛血清、0.125%胰蛋白酶(Hyclone公司); Western及IP细胞裂解液、PMSF、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、蛋白marker、超敏ECL化学发光试

剂盒(Beyotime公司); Anti-HER-2、anti- β -actin、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(Bioworld公司); 嘌呤霉素(Amresco公司)。

1.2 方法

1.2.1 LV3-hsa-miR-125b慢病毒过表达载体的构建 根据miRBase中miR-125b前体序列, 由吉玛公司设计合成目的基因靶序列及空白对照序列(negative control NC)。miR-125b前体序列: 5'-TCC CTG AGA CCC TAA CTT GTG A-3'。miR-125b shRNA序列: 正义链: 5'-GAT CCG TCC CTG AGA CCC TAA CTT GTG ATT CAA GAG ATC ACA AGT TAG GGT CTC AGG GAC TTT TTT G-3'; 反义链: 5'-AAT TCA AAA AAG TCC CTG AGA CCC TAA CTT GTG ATC TCT TGA ATC ACA AGT TAG GGT CTC AGG GAC G-3'。经退火形成双链DNA, 与经*Xho* I和*Hap* I双酶切后的GP-Supersilencing Vector载体连接。连接产物转化感受态大肠杆菌DH5 α , 每个连接反应挑取5个菌落, LB培养, 使用碱裂解法抽提质粒, 所得质粒用*Xba* I和*Not* I双酶切鉴定及重组阳性克隆质粒测序鉴定。测序正确的菌株利用质粒抽提试剂盒抽提质粒LV3-hsa-miR-125b。

1.2.2 慢病毒包装、滴度测定 转染前24 h, 取细胞状态良好、处于对数生长期的293T细胞消化计数, 每10 cm培养皿铺 5×10^6 细胞, 使其细胞融合率达80%~90%。按照Lipofectamine 2000说明书步骤, 将重组慢病毒质粒LV3-hsa-miR-125b和空白对照质粒LV3-NC分别同pGag/Pol、pRev、pVSV-G共转染293T细胞。培养48 h后收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液, 对其进行浓缩, 得到高滴度慢病毒浓缩液。消化计数293T细胞, 按 3×10^4 /孔的浓度接种96孔板, 混匀后于37 °C、5% CO₂培养箱培养24 h; 病毒原液10倍稀释3~5个梯度; 吸去96孔板中的培养液, 每孔加入100 μ L稀释病毒液, 于37 °C、5% CO₂培养箱培养24 h; 吸去稀释病毒液, 每孔加入150 μ L 10% FBS的DMEM培养液, 继续培养48 h, 通过荧光显微镜计数荧光细胞, 结合稀释倍数计算病毒滴度。

1.2.3 SKOV3细胞感染与筛选 从液氮中取出SKOV-3细胞, 37 °C水浴迅速解冻, 放入10% FBS的RPMI-1640培养液中, 于37 °C、5% CO₂培养箱中培养, 密度生长至90%时传代。实验分3组: Lenti-125b组为感染重组过表达miR-125b慢病毒的SKOV3细胞; Lenti-nc组为感染空白阴性对照慢病毒的SKOV3

细胞; uninfected组为未做处理的SKOV3细胞。感染前24 h, 消化SKOV-3细胞并计数, 按 1×10^5 /孔的浓度接种于6孔板中, 37°C 、5% CO_2 培养箱培养, 待细胞融合率达30%~40%, 用重组慢病毒颗粒和空白对照病毒颗粒分别感染SKOV3细胞, 加入病毒的感染参数(MOI)为10。 37°C 、5% CO_2 培养箱培养24 h。吸去病毒液, 用完全培养基换液, 继续培养48, 72 h, 在荧光显微镜下观察绿色增强荧光蛋白(EGFP)表达情况。可见绿色荧光EGFP表达时, 根据嘌呤霉素对SKOV3细胞最小致死浓度实验, 加入含2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素的培养基进行筛选, 每2~3 d换液传代, 筛选14 d, 使感染率达95%以上, miR-125b过表达稳转细胞系形成。

1.2.4 实时荧光定量PCR检测miR-125b的表达 将筛选到的miR-125b过表达细胞系扩增培养后接种到6孔板中, 待细胞融合率达80%时, PBS洗3次, 0.125%胰酶消化细胞, Trizol裂解细胞提取总RNA。用Hairpin-itTM miRNAs qPCR Quantitation Kit进行逆转录和实时荧光定量PCR。20 μL 体系中加入4 μg RNA为模板, 逆转录生成cDNA(ddH₂O稀释10倍), 再以cDNA为模板, 对miR-125b和U6内参进行实时定量PCR检测。每个样品设3个复孔, 以U6作为内参, 重复3次, 计算Ct均值, 应用相对定量法进行定量分析。

1.2.5 MTT实验检测细胞增殖 将处于对数生长期的稳定感染的SKOV3细胞按 3×10^3 /孔接种于96孔板(100 μL /孔)中, 接种3板, 每板分3组, 每组细胞取6孔, 分别于24, 48, 72 h加入10 μL MTT(5 mg/mL), 37°C 、5% CO_2 孵育4 h后去上清, 每孔加入100 μL DMSO, 避光摇匀10 min, 酶标仪测定 D_{490} 值, 重复3次取平均值, 以时间为横轴、吸光度为纵轴绘制曲线。

1.2.6 Transwell迁移实验检测细胞迁移能力 于24孔版中放入Transwell小室(装有聚碳酸酯微孔膜, 孔径8 μm), 将处于对数生长期的3组细胞消化, 制成100 μL 细胞悬液(用不含血清培养基), 以 5×10^4 /孔接种于小室上层。下室加入500 μL 含10%胎牛血清的培养基, 置 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。孵育24 h后, PBS清洗2次, 甲醇室温固定30 min, 0.25%结晶紫溶液染色15 min, PBS再清洗3次, 用棉球轻轻擦去小室上层细胞, 置于显微镜下观察迁移的细胞, 随机计数5个视野, 重复3次取均值。

1.2.7 Western blot检测HER-2的表达 收取细胞,

利用Western及IP裂解液试剂盒提取总蛋白, 参照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书对蛋白进行定量, 每孔上样15 μL 蛋白样品进行SDS-PAGE电泳并转移至PVDF膜上, 室温震荡封闭2 h, 兔抗人—抗HER-2按1:500稀释, 4°C 孵育过夜。TBST洗涤3次, 每次8 min, 山羊抗兔二抗(1:2 000稀释)室温孵育2 h, TBST洗涤3次, 每次8 min, 发光, 暗室显影。

1.2.8 统计学分析 所有计量数据均以平均数 $\pm$ 标准差表示, 采用统计软件包SPSS 16.0进行数据处理, 运用配对 t 检验及方差分析。

2 结果

2.1 重组慢病毒载体LV3-hsa-miR-125b的构建和测序

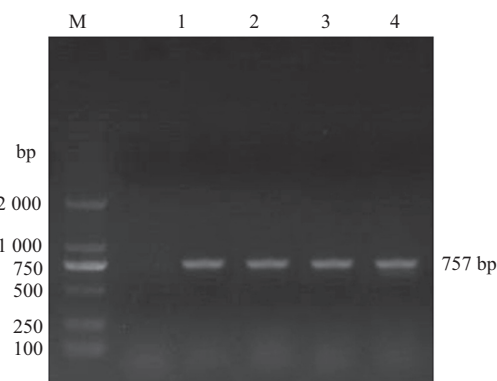
重组慢病毒载体LV3-hsa-miR-125b, 经Xba I和Not I双酶切鉴定, 所有质粒在757 bp大小的均为阳性重组载体(图1), 选择两个克隆(2、4)进行测序鉴定。测序结果表明, 合成的miR-125b shRNA寡核苷酸链序列插入正确(图2)。

2.2 重组慢病毒载体LV3-hsa-miR-125b的包装及滴度测定

采用脂质体转染技术将慢病毒表达质粒、pGag/Pol、pRev、pVSV-G 4种质粒共转染293T细胞, 在荧光倒置显微镜下观察各孔中绿色荧光的强度, 病毒滴度为带绿色荧光的细胞数乘以相应稀释倍数。测定滴度为 1×10^9 UT/mL, 说明有大量质粒转入293T细胞, 病毒包装成功(图3)。

2.3 慢病毒颗粒感染SKOV3细胞及筛选稳定表达细胞系

重组过表达miR-125b慢病毒颗粒(Lenti-125b)



M: marker; 1~4: LV3-hsa-miR-125b.

图1 重组慢病毒载体酶切鉴定

Fig.1 The recombinant lentiviral vector identified by PCR

和空白对照病毒颗粒(Lenti-nc)分别感染SKOV3细胞,经嘌呤霉素筛选后,在荧光倒置显微镜下观察EGFP的表达,可见95%以上细胞都带有绿色荧光标记(图4)。

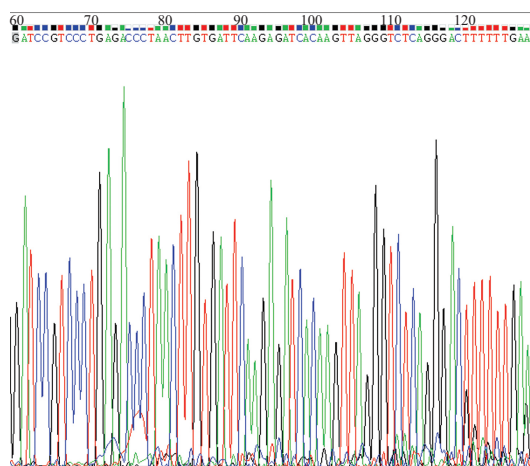


图2 质粒LV3-hsa-miR-125b测序结果

Fig.2 DNA sequence of LV3-hsa-miR-125b plasmid

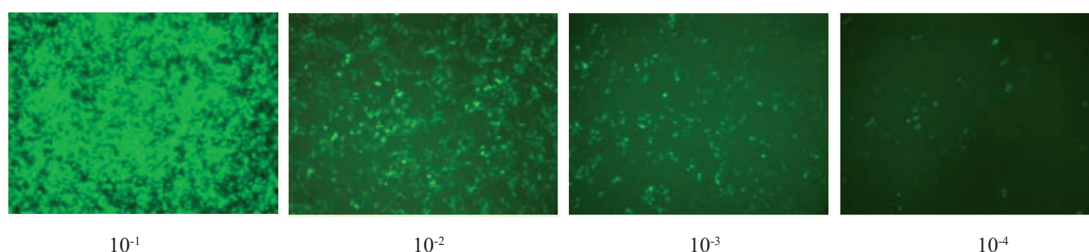
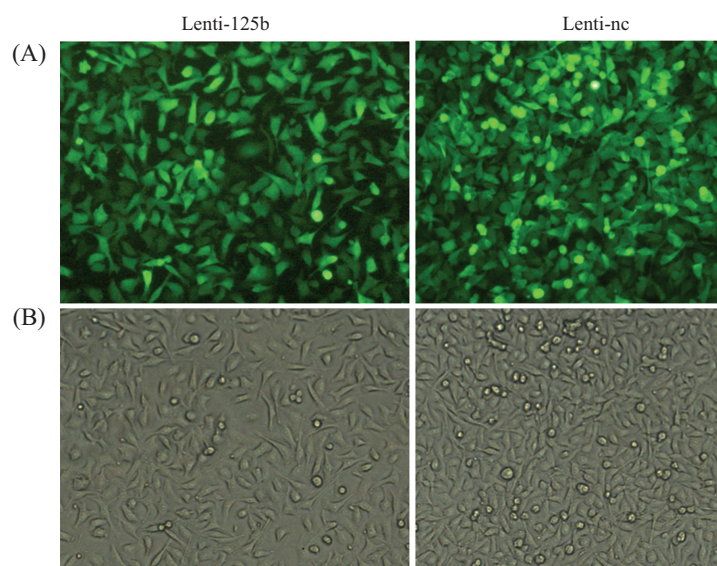


图3 不同稀释倍数慢病毒感染293T细胞后EGFP的表达(100×)

Fig.3 The expression of EGFP after 293T cells infected by different concentration of lentivirus (100×)



A: 在488 nm波长激发光下观察; B: 在白光下观察。

A: under the excitation light of 488 nm wavelength; B: under the white light.

图4 重组慢病毒感染和筛选(200×)

Fig.4 The infection efficiency in SKOV3 cells (200×)

2.4 实时荧光定量PCR检测miR-125b在SKOV3细胞中的表达

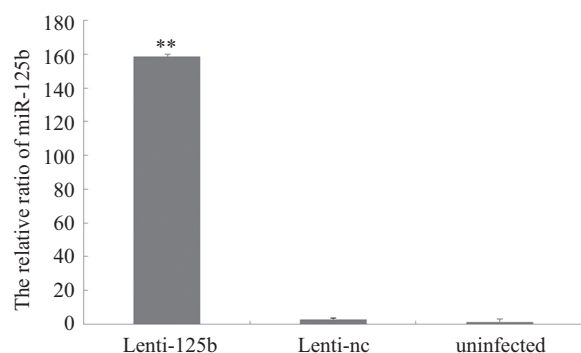
实时荧光定量PCR结果显示,与感染空白对照慢病毒组(Lenti-nc)和未感染组(uninfected)比较,感染过表达miR-125b慢病毒组(Lenti-125b)中miR-125b的表达明显增高(图5),高于uninfected组(98.40 ± 0.88)倍,高于Lenti-nc组(50.02 ± 0.35)倍,具有显著差异($P < 0.01$)。

2.5 过表达miR-125b抑制卵巢癌SKOV3的增殖

MTT实验检测过表达miR-125b的卵巢癌SKOV3细胞的增殖情况(图6)。Lenti-125b组与Lenti-nc组和uninfected组相比, Lenti-125b组在24, 48, 72 h三个时间点增殖能力均减弱,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 过表达miR-125b抑制卵巢癌SKOV3的迁移

Transwell迁移实验结果显示, Lenti-125b组24 h穿过小孔的细胞为(37.6 ± 4.5)个,而Lenti-nc组

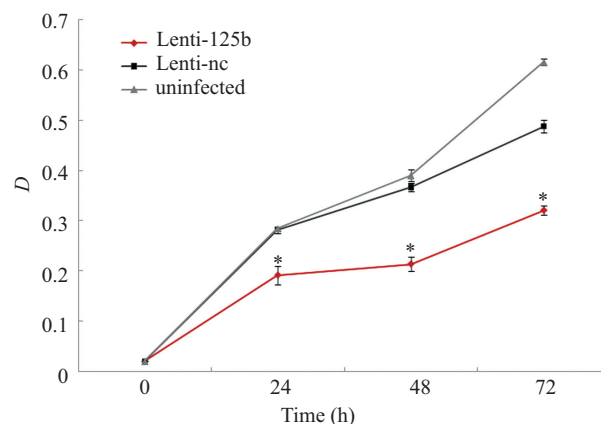


纵坐标为miR-125b的相对表达量, ** $P < 0.01$, 与未感染组和Lenti-nc组比较。

Y-axis means relative fold change, ** $P < 0.01$ compared with uninfected and Lenti-nc groups.

图5 Real-time qPCR检测miR-125b在各组细胞中的表达

Fig.5 The expression of miR-125b in each group of SKOV3 cells



* $P < 0.05$, 与未感染组和Lenti-nc组比较。

* $P < 0.05$ compared with uninfected and Lenti-nc groups.

图6 过表达miR-125b对SKOV3细胞增殖的影响

Fig.6 The influence of cell proliferation in SKOV3 cells with over-expression of miR-125b

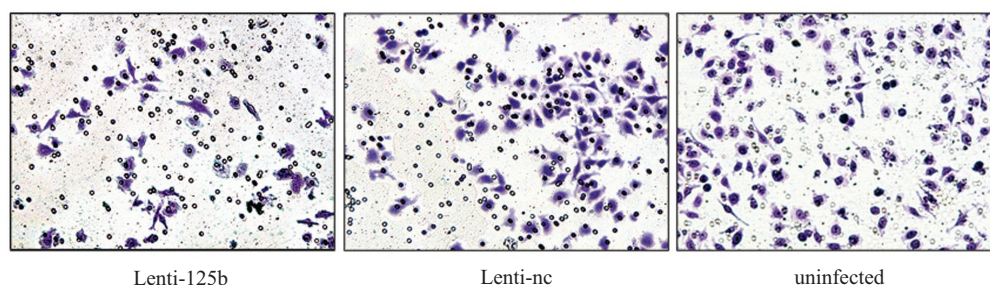


图7 Transwell小室迁移实验24 h迁移的细胞数(200×)

Fig.7 Transwell migration assay of the number of migratory cells of each group in 24 hours (200×)

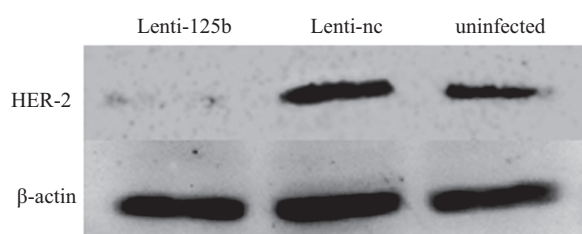


图8 过表达miR-125b对HER-2的影响

Fig.8 The influence of HER-2 expression with over-expression of miR-125b

穿过细胞为(111.0±9.0)个, uninfected组穿过细胞为(115.2±7.4)个, 与对照组和未处理组相比, Lenti-125b组穿过小孔的细胞数量减少(图7), 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.7 过表达miR-125b抑制HER-2的表达

收集稳定过表达miR-125b的SKOV3细胞, 提取总蛋白, 经Western blot检测, HER-2的表达量较Lenti-nc组和uninfected组明显下调(图8), 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

卵巢癌由于缺乏特异性症状和有效的早期诊断手段, 是妇科恶性肿瘤中死亡率最高的肿瘤, 严重威胁妇女的生命和健康。与其他肿瘤一样, 卵巢癌的发生是与细胞增殖分化相关的癌基因、抑癌基因多阶段相互作用的结果。MicroRNAs(miRNAs)是近年来新发现的一类内源性非编码的调节性小分子RNA, 它们与靶基因mRNA的3'-UTR配对结合, 通过抑制靶mRNA翻译或降解靶mRNA两种方式实现对基因表达的转录后调控。许多miRNAs以癌基因或抑癌基因作为靶点, 它们的表达失调可以导致靶基因的上调或下调, 而这些靶基因中很多与肿瘤的发生密切相关。

肿瘤无限增殖的因素包括抑癌基因的失活、癌基因的过度表达、细胞周期失控及细胞凋亡的耐受等。HER-2基因是表皮细胞生长因子受体(epidermal growth factor receptor)家族中的重要成员, 编码一个185 kDa具有酪氨酸激酶活性的跨膜糖蛋白(p185),

在调控细胞正常生长和发育的信号网络中起着关键作用,与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关,如在子宫内膜癌细胞中存在*HER-2*基因的扩增和过度表达,并伴随着癌变组织增殖能力和侵袭性增强。在卵巢癌中,*HER-2*基因的过度表达能够促进细胞增殖及转移能力,并影响肿瘤对化疗的敏感性。有研究显示,*HER-2*基因可能为miR-125b所调控的一个重要靶点。Scott等^[6]发现,向乳腺癌细胞中转染miR-125b能够显著下调*HER-2*和*HER-3*基因的表达,从而抑制乳腺癌细胞的生长及转移;然而Shi等^[16]研究却发现,miR-125b在高表达*HER-2*的前列腺细胞系cds中并不能抑制*HER-2*的表达,这说明在不同的组织器官中,同一个miRNA对下游基因表达的调控是不同的。研究发现,miR-125b在卵巢癌细胞及组织中呈明显下调趋势,因此我们推想在卵巢癌中,miR-125b是否也能通过对靶基因*HER-2*表达的调控,从而影响癌细胞的增殖、迁移和侵袭等能力。

本研究通过构建含有荧光报告基因(EGFP)的LV3-hsa-miR-125b重组慢病毒载体,感染人卵巢癌SKOV3细胞,获得miR-125b稳定过表达细胞系;经MTT检测发现,miR-125b的过表达使SKOV3细胞的增殖受到抑制;Transwell迁移实验发现,miR-125b过表达减弱了SKOV3细胞的迁移能力;Western blot检测发现,过表达miR-125b可以使*HER-2*基因的表达受到抑制。在卵巢癌细胞中miR-125b是低表达的,根据本研究结果推测,miR-125b对*HER-2*基因的表达抑制作用减弱,*HER-2*基因表达增强,从而导致卵巢癌细胞的增殖与侵袭能力增强;在本实验中,通过上调卵巢癌细胞中miR-125b的表达,增强miR-125b对*HER-2*基因的表达抑制作用,*HER-2*基因表达下调,从而导致卵巢癌细胞的增殖与侵袭能力减弱。本研究结果证明,miR-125b在卵巢癌细胞中,可以通过靶向调节*HER-2*的表达,从而抑制卵巢癌细胞的增殖和迁移。由于一个靶基因可以受到多个miRNA的调控,而miR-125b也可以调节下游多个靶基因,调控通路复杂,要明确miR-125b在卵巢癌发生发展中具体机制及靶向信号通路还需要进一步深入研究。上述研究结果为下一步深入研究miR-125b对卵巢癌发生发展的作用机制提供了重要途径,为探索卵巢癌的基因治疗、寻找新的分子治疗靶点提供了实验依据。

参考文献 (References)

- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431(7006): 350-5.
- Khraiwesh B, Arif MA, Seumel GI, Ossowski S, Weigel D, Reski R, *et al.* Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell* 2010; 140(1): 111-22.
- 刘宝瑞, 谢 丽. miRNA: 新一代肿瘤生物标志. *临床肿瘤学杂志* (Liu Baorui, Xie Li. microRNA: A new cancer biomarker. *Chinese Clinical Oncology*) 2010; 1(15): 1-5.
- Lorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, *et al.* MicrRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65(15): 7065-70.
- Yi Guan, Hailan Yao, Zhihong Zheng, Guangrong Qiu, Kailai Sun. MiR-125b targets BCL3 and suppresses ovarian cancer proliferation. *Int J Cancer* 2011; 128(10): 2274-83.
- Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, Benz CC. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem* 2007; 282 (2): 1479-8.
- 孟丽荣, 鲁艳明, 尚 超. 子宫内膜癌中microRNA-125b对HER2基因3'非翻译区的调控作用. *现代肿瘤医学* (Meng Lirong, Lu Yanming, Shang Chao. The role of microRNA-125b on HER2 gene 3' untranslated region in endometrial cancer. *Modern Oncology*) 2012; 20(1): 18-20.
- Engelsen IB, Stefansson IM, Beroukhi R, Sellers WR, Meyerson M, Akslen LA, *et al.* HER-2/neu expression is associated with high tumor cell proliferation and aggressive phenotype in a population based patient series of endometrial carcinomas. *Int J Oncol* 2008; 32(2): 307-16.
- Lorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, *et al.* MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2007; 67(18): 8699-707.
- Nam EJ, Yoon H, Kim SW, Kim H, Kim YT, Kim JH, *et al.* MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14(9): 2690-5.
- Cockrel AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Bio technol* 2007; 36(3): 184-204.
- Malamou-Mitsi V, Crikoni O, Timotheadou E, Aravantinos G, Vrettou E, Agnantis N, *et al.* Prognostic significance of HER-2, p53 and Bcl-2 in patients with epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res* 2007; 27(2): 1157-65.
- Gutierrez C, Schiff R. HER2: Biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135(1): 55-62.
- 周 颖, 凌 斌, 姚凤球, 沈国栋, 冯定庆, 陈峥峥, 等. 抑制Her-2基因的表达对NK-92细胞杀伤SKOV3细胞活性影响的研究. *现代妇产科进展* (Zhou Ying, Ling Bin, Yao Fengqiu, Shen Guodong, Feng Dingqing, Chen Zhengzheng, *et al.* Enhancement of cytotoxic of NK-92 cell against SKOV3 by inhibition of the expression of Her-2 gene. *Prog Obstet Gynecol*) 2006; 9(15): 675-7.
- 陈一喆, 赵志光, 朱雪琼, 吕杰强. 上皮性钙黏附素、 β -连环素与HER/neu蛋白在上卵巢上皮性肿瘤表达及意义. *肿瘤学杂志* (Chen Yizhe, Zhao Zhiguang, Zhu Xueqiong, Lü Jieqiang. Expression and significance of E-cadherin, Beta-catenin and HER/neu oncoprotein in epithelial ovarian tumor. *Journal of Oncology*) 2009; 15(5): 440-4.
- Shi XB, Xue L, Yang J, Ma AH, Zhao J, Xu M, *et al.* An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(50): 19983-8.