

靶向 SMPD1 基因的 RNA 干扰对人成纤维细胞 凋亡的保护作用

高 军¹, 周灿权¹, 张仁礼², 马 芸³(1. 中山大学附属第一医院生殖医学中心, 广东 广州 510080, 2. 广东省人民医院妇产科生殖中心,
3. 中山大学中山医学院)

摘 要: 【目的】以人包皮成纤维细胞(HFF)为模型,通过系统比较针对不同靶点的小干扰 RNA(siRNA)对酸性鞘磷脂酶 1 (SMPD1) 基因的沉默效果,筛选获得最有效的小干扰 RNA 序列,同时观察沉默 SMPD1 对细胞凋亡的保护作用。【方法】设计合成三对靶向 SMPD1 基因的小干扰 RNA 作为实验组,同时设立阴性对照组和脂质体组(lipofectamine 2000),瞬时转染原代培养的 HFF 细胞,采用荧光定量 RT-PCR 法及 Western blot 测定 SMPD1 表达抑制情况,并用化疗药物丝裂霉素诱导细胞凋亡,MTT 法检测 siRNA 转染对细胞的保护作用。【结果】小干扰 RNA1, 2, 3 对 SMPD1 基因 mRNA 的抑制效率分别为 96.3%, 39%, 63.2%, 以 siRNA1 最高,最佳浓度为 50 nmol/L,最佳作用时间为 48 h。SMPD1 蛋白在 48 h 出现沉默效果,96 h 开始恢复。50 nmol/L 的 siRNA1 可以有效抑制化疗药物丝裂霉素引起的细胞凋亡,细胞存活率为 73.8%,与对照组存活率 65.4%比较差异具有统计学意义。【结论】三对 siRNA 均具有一定的靶基因沉默效果,其中 siRNA1 效果最佳,沉默效率达到 96.3%;靶向 SMPD1 基因的 siRNA 能有效抑制人成纤维细胞的凋亡。

关键词: siRNA; SMPD1; 成纤维细胞; 凋亡

中图分类号: R361

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)02-0159-06

RNA Interference Targeted on SMPD1 Protect HFF Cells from Apoptosis

GAO Jun¹, ZHOU Can-quan¹, ZHANG Ren-li², MA Yun³(1. Reproductive Center, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China,
2. Reproductive Center, Department of Gynecology and Obstetrics, People's Hospital of Guangdong,
3. Zhongshan school of Medicine, SUN Yat-sen University)

Abstract: 【Objective】To detect silencing effect of different siRNAs targeted on SMPD1 gene to select the most efficient siRNA sequence using HFF cells as a model. To observe the anti-apoptosis effect after knockdown SMPD1. 【Methods】Three siRNA sequences targeted on special sequence of SMPD1 gene were designed. HFF cells were transfected with siRNAs, no target siRNA and lipofectamine 2000. SMPD1 expression was tested with real-time quantitative RT-PCR and Western blot analysis. The protective effect of siRNA was tested with MTT assay after using mitomycin to induce apoptosis in HFF. 【Results】The inhibitory rates of siRNA1, 2, and 3 were 96.3%, 39%, and 63.2%, respectively, among which of siRNA1 being the highest. The best active concentration was 50 nmol/L and the best active time was 48 h for siRNA1. The SMPD1 protein decreased from 48 h after transfection and recovered from 96 h. siRNA1 could inhibit apoptosis induced by mitomycin. 【Conclusion】The three siRNA sequence both have silencing effect on SMPD1, among which siRNA1 was the best one. siRNA1 inhibitory rate was 96.3%. siRNA targeted on SMPD1 can protect HFF cells from apoptosis.

Key words: siRNA; SMPD1; fibroblast; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(2):159-164]

收稿日期: 2007-01-16

基金项目: 广州市科委重大资助项目 (2004Z1-E0101); 广东省卫生厅基金资助项目 (B2004038); 国家自然科学基金资助项目 (30400474)

作者简介: 高军 (1977-), 女, 汉族, 黑龙江集贤人, 博士生; 周灿权, 教授, 博士生导师, 通讯作者。E-mail: zhucanquan@hotmail.com

神经酰胺是启动发育中和抗肿瘤治疗过程中卵母细胞凋亡信号的第二信使,启动凋亡信号神经酰胺主要由鞘磷脂酶水解鞘磷脂产生^[1]。因此,阻断鞘磷脂酶的表达有望能抑制卵母细胞在抗肿瘤治疗过程的凋亡,从而实现卵巢保护。有研究表明用 siRNA 干扰的方法可以敲减酸性鞘磷脂酶基因的表达从而降低神经酰胺水平,减少缺血/再灌注过程中肝脏的损伤^[2]。目前国内外尚无使用 RNA 干扰的方法阻断酸性鞘磷脂酶基因进行卵巢生殖力保护的研究报道。本研究利用 RNA 干扰的方法,通过设计合成,实验筛选,获得高效抑制 SMPD1 (Sphingomyelin phosphodiesterase 1)、具有明显保护作用的 siRNA 序列,通过 mRNA 水平、蛋白水平及生物学效应三个层次验证 siRNA 的有效性,为研发女性生殖细胞保护的 siRNA 类药物奠定理论和实验的基础。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

选取自身表达 SMPD1 基因的人包皮成纤维细胞(human foreskin fibroblast, HFF),作为本实验的实验材料。取 2005 年 7 月至 2006 年 7 月在中山大学附属第一医院门诊日间手术室进行包皮环切术的 6-8 岁正常男性儿童切除的包皮组织,进行成纤维细胞的原代培养。在超净台上操作,尽量去除皮下疏松结缔组织,将包皮放入含青霉素(100 U/mL, Sigma)和链霉素(100 μg/mL, Sigma)的 PBS 液中漂洗两次,加入 2.5 g/L 胰蛋白酶(Sigma),4 过夜冷消化。次日取出包皮,无菌条件下去除褐色的表皮层,留下白色的真皮层。将组织剪碎移入离心管中,加入 1 g/L 型胶原酶(Sigma),37 消化 1-2 h。用吸管反复吹打使细胞分散,100 目细胞筛网过滤后离心,1 000 r/min($r = 15$ cm),5 min。弃上清,加入含 100 mL/L 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的高糖 DMEM 培养液(Gibco)重悬细胞,接种至培养瓶中,置体积分数为 5%CO₂、37 培养箱培养,第 3 天换液,第 5 天细胞融合 90%,可进行传代。取第 3 至第 9 代细胞进行实验。

1.2 siRNA 设计合成

根据文献[3]报道的方法从 GENE BANK 中检索出人类 SMPD1 mRNA 全序列(GeneID: 6609),

通过同源性比对,找出 SMPD1 的保守区。利用保守区序列进一步与人类基因组进行比对,找出 SMPD1 的特异序列,针对这些特异序列设计一系列 siRNA 的序列,然后通过检证性比对筛选特异性高的 siRNA 序列进行合成。共合成 3 对 19 bp 的 siRNA,另设随机序列 no target siRNA (NT siRNA)作为阴性对照。siRNA 序列如下:siRNA1 正义链 5'-guc uau uca ccg cca uca a-3',反义链 5'-cag aua agu ggc ggu agu u-3';siRNA2 正义链 5'-cua ccu aca ucg gcc uua a-3',反义链 5'-gau gga ugu agc cgg aau u-3';siRNA3 正义链 5'-uua ccg ugu gua cca aau a-3',反义链 5'-aau gcc aca cau ggu uua u-3'。阴性对照正义链 5'-uuc ucc gaa cgu guc acg u-3',反义链 5'-acg uga cac guu cgg aga a-3'。由广州锐博生物公司合成。

1.3 优化转染条件

用 Invitrogen 公司的 Block it transfection kit 优化转染条件。按照说明书操作,转染前一天细胞消化接种 24 孔板,用不含抗生素的生长培养基,使转染时细胞 30%~50%融合。转染当天更换培养板中的培养基,每孔加 400 μL opti-MEM 低血清培养基。用 50 μL Opti-MED 低血清培养基(不加血清)稀释 Block-it Fluorescent oligo,轻柔混合。用 50 μL Opti-MED 低血清培养基稀释 lipofectamine 2000,轻柔混合,室温下孵育 5 min。将稀释后的 Block-it Fluorescent oligo 和 lipofectamine 2000 轻柔混合,室温下孵育 20 min。将此复合物加到培养板中,前后摇晃板以混合。置体积分数为 5%CO₂、37 培养箱培养,6 h 后换完全培养液,至多 24 h 用荧光显微镜观察荧光信号强弱。FITC filter($\lambda_{ex} = 494$ nm, $\lambda_{em} = 519$ green)检测荧光信号的表达。

1.4 siRNA 有效性筛选实验

按照优化的转染条件,转染方法同前,实验组为 siRNA1 至 siRNA3 共 3 组,设立 no target siRNA 对照,脂质体(Lipofectamine 2000)对照及空白对照。siRNA 浓度为 50 nmol/L,转染后 48 h 观察和检测 RNA 干扰效果。实验重复 3 次取平均值。筛选出沉默效率最高的一对 siRNA 进行时间梯度和浓度梯度的转染实验。

1.5 有效 siRNA 基因沉默的最佳转染浓度和时间的确定

按照优化的转染条件,转染方法同前,选择 0.5、5、50、100 nmol/L 4 种浓度进行细胞转染,转

染 24 h 收集细胞提取总 RNA, 进行荧光定量 PCR, 确定最佳转染浓度。使用最佳浓度转染细胞, 分别于转染 12、24、48、72 h 后收集细胞, 同样进行 RNA 提取, 逆转录及定量 PCR, 确定最佳转染时间。所有实验重复 3 次取平均值。

1.6 Q-RT-PCR

用 Trizol Reagent 提取法提取总 RNA。Trizol, 逆转录试剂盒 Super Strip 购自 Invitrogen 公司, 无水乙醇, 氯仿, 异丙醇均为国产分析纯。DEPC 为 Sigma 公司产品。由广州达安基因股份有限公司负责设计合成荧光定量 PCR 引物及 Taqman 探针。SMPD1 引物序列: 正义链 5'-TCA CGT GGT CCT GGA CCA T-3'; 反义链 5'-AGA AGC TGC CAG TGC GGT AT-3'; 探针序列 5'-CCT ACA TCC TGA ATC TGA CCC AGG CAA A-3', 探针 5'端加 FAM 标记, 3'端加 TAMRA 标记。同时设计出内参照 β -actin 的引物和探针, 在检测 SMPD1 基因 mRNA 的同时对每个样品中 β -actin 的表达进行检测, 以校正不同样品之间因 RNA 总量、质量及逆转录反应效率差异所导致的目的基因的表达差异。 β -actin 引物序列: 正义链 5'-GCG CGG CTA CAG CTT CA-3'; 反义链 5'-TCT CCT TAA TGT CAC GCA CGA T-3'; 探针序列 5'-CAC CAC GGC CGA GCG GGA-3', 同样在 5'端加 FAM 标记, 3'端加 TAMRA 标记。按照 Trizol 说明书进行细胞总 RNA 提取, 用 6 μ L 1 mL/L DEPC 水溶解, 取 1 μ L 检测 RNA 浓度和纯度, 5 μ L 行逆转录, 按照 Super Strip 试剂盒说明进行。取 5 μ L cDNA 行荧光定量 PCR, ABI Prism 7700 PCR 仪, 循环条件: 93 预变性 3 min, 93 变性 45 s, 55 退火 45 s, 共进行 40 个循环。实验结果用目的基因定量值/内参定量值表示, 抑制率 = (Lipofectamine 2000 定量值 - 实验组定量值) / Lipofectamine 2000 定量值。

1.7 Western Blot

细胞接种 12 孔板, 密度 8×10^4 /mL, 每孔 1 mL 24 h 后转染 siRNA, 转染后不同时间点 (24、48、72、96 h) 进行细胞总蛋白提取, BCA 法进行蛋白质定量 (上海申能博彩)。用蛋白印迹法进行 SMPD1 蛋白的检测, 各组样本各取总蛋白质 20 μ g 上样, 经 100 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳后转 PVDF 膜。与兔抗人 ASM (H-181) 多克隆一抗 (Santa Cruz 公司) 4 孵育过夜。与 HRP 标记的羊

抗兔 IgG 抗体 (武汉博士德) 室温孵育 1 h 后, ECL (Pierce 公司) 显色, 暗室中观察, 胶片曝光记录结果。同时用 β -actin 作为内参确证蛋白上样量一致。

1.8 siRNA 转染对细胞凋亡的抑制作用

MTT 法检测 siRNA 对细胞的保护效应。细胞接种 96 孔板, 密度 5×10^4 /mL, 每孔 200 μ L, 24 h 后转染 siRNA。转染后 48 h 加入化疗药物丝裂霉素 (日本协和株氏会社), 100 μ g/mL, 干预后 24 h 加入 MTT 液, 10 μ L /孔, 37 孵育 4 h, 弃原液, 加入 DMSO 150 μ L /孔, 振荡 10 min, 酶标仪测定 OD490 比值。设立 6 个平行孔, 实验重复三次取平均值。

1.9 统计学处理

用 SPSS 11.0 统计学软件进行分析, 计量资料统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析 (One way ANOVA) 进行多个样本均数间的显著性检验, 两样本比较采用配对资料 t 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 细胞形态学观察

成纤维细胞接种后 24 h 内贴壁, 细胞伸展呈梭形或多边形, 胞浆丰满, 核圆形或椭圆形。细胞密度低时交织成网状, 细胞密度高时排列成束状或漩涡状。

2.2 荧光 oligo-lipofectamine 2000 共转染条件优化实验

设立 lipofectamine 0.5、1、1.5 μ L, oligo 40、60、80、100 nmol/L。各组转染效率见表 1 图 1。

2.3 siRNA 有效性筛选实验

表 1 不同浓度 oligo 和 lipofectamine2000 共转染后阳性细胞率 (%)

Table 1 Positive cell rate after cotransfected different concentration of oligo and lipofectamine 2000 (%)

Lipofectamine	Oligo				
	2000	40 nmol/L	60 nmol/L	80 nmol/L	100 nmol/L
0.5 μ L	41	51	80	78	
1 μ L	88	71	62	63	
1.5 μ L	78	80	76	79	

QRT-PCR 结果 (图 2) 表明, 各条 siRNA 对 SMPD1 基因 mRNA 表达均有抑制作用, 抑制率分别为 96.3%, 39%, 63.2%, 其中以 siRNA1 最明显。各组与 NT siRNA 比较差异达到统计学意义 ($P < 0.05$)。

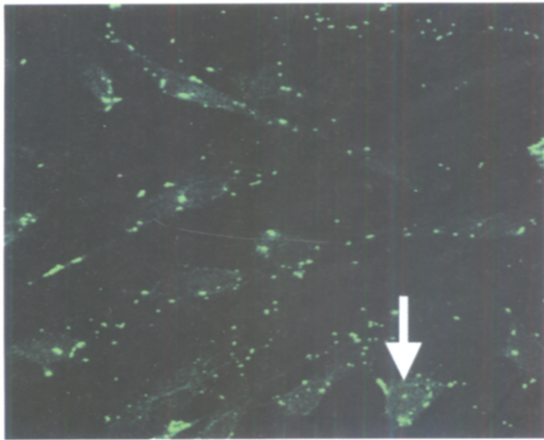


图 1 荧光 oligo-lipofectamine 2000 共转染人包皮成纤维细胞

Fig.1 Cotransfection fluorescent oligo and lipofectamine 2000 into HFF cells

The green fluorescence was located in cytoplasm and nucleus observed by confocus fluorescent microscope (x400)

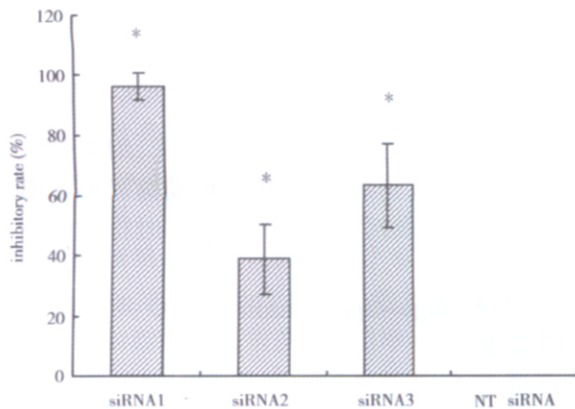


图 2 HFF 转染各条 siRNA 后对 SMPD1 的抑制率 (%)
Fig.2 The inhibitory rate after transfecting HFF cell with siRNAs

*F=56.139, P<0.05 compared with NT siRNA

2.4 有效 siRNA 基因沉默的最佳转染浓度和时间

2.4.1 有效 siRNA 浓度梯度检测 因 siRNA1 抑制效率最佳, 选用其进行最佳转染浓度和时间的实验。细胞转染 siRNA1, 选用 0.5、5、50、100 nmol/L 4 种浓度, 设立同样浓度的 no target siRNA 及 Lipofectamine 2000 对照,, 转染 24 h 后收集细胞检测 mRNA 水平。实验结果(图 3)显示各组抑制率分别为 64.57%, 71.85%, 75.11%, 39.52%。0.5、5、50、组与 NT siRNA 比较有统计学差异(P<0.05)。

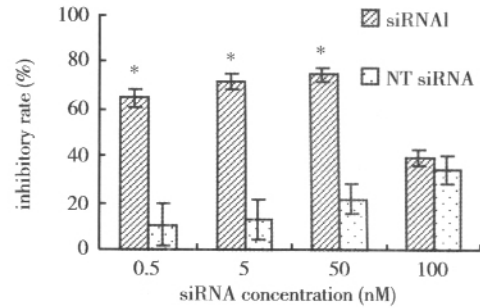


图 3 HFF 转染不同浓度 siRNA1 后对 SMPD1 的抑制率 (%)

Fig.3 The inhibitory rate of different concentration of siRNA1

*F=60.057, P<0.05, compared with NT siRNA

2.4.2 有效 siRNA 时间梯度检测 细胞转染 siRNA1, 浓度 50nmol/L, 设立同样浓度的 no target siRNA 及 Lipofectamine 2000 对照, 分别转染 12、24、48、72 h 后收集细胞, 检测 mRNA 水平。各组抑制率分别为 0, 59.68%, 77.71%, 74.71%(图 4)。24h, 48h, 72h 组与 NT siRNA 比较有统计学差异

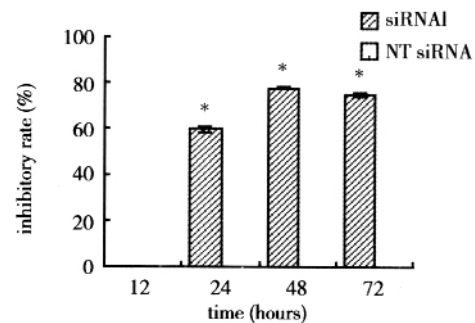


图 4 HFF 转染 siRNA1 不同时间对 SMPD1 的抑制率 (%)

Fig.4 The inhibitory rate of different effective time of siRNA1

*F=16049.70, P<0.05, compared with NT siRNA

(P<0.05)。

2.5 siRNA 转染后 SMPD1 基因蛋白的变化

细胞转染 siRNA1, 浓度 50nmol/L, 设立同样浓度的 no target siRNA 及 Lipofectamine 2000 对照,, 分别于转染 24 h, 48 h, 72 h, 96 h 收集细胞, 用 Western Blot 法检测 SMPD1 蛋白表达。转染后 48h SMPD1 蛋白表达明显减弱, 96 h 恢复正常。- actin 各组无差异(图 5)

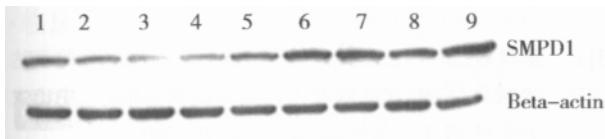


图 5 HFF 转染 siRNA1 不同时间对 SMPD1 蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of siRNA on SMPD1 protein level in HFF with different time

1: Lipofectamine 2000; 2: siRNA1- 24h; 3: siRNA1- 48h; 4: siRNA1- 72h; 5: siRNA1- 96h; 6: no target siRNA- 24h; 7: no target siRNA- 48h; 8: no target siRNA- 72h; 9: no target siRNA- 96h

2.6 siRNA 转染后丝裂霉素诱导凋亡检测细胞保护作用

HFF 细胞转染各 siRNA, 浓度 50 nmol/L, 设立同样浓度的 no target siRNA, Lipofectamine, MMC 对照及无凋亡空白对照, 转染后 48 h 加入化疗药物丝裂霉素干预, 24 h 后收集细胞进行 MTT 实验, 检测细胞活力, 结果见表 2。

表 2 转染 siRNA 并给予 MMC 后 MTT 法检测 HFF 活力
Table 2 HFF activity after siRNA transfection and mitomycin administration using MTT methods (n=15)

Group	A	Survival rate (%)
Control	1.224 ±0.016	100
MMC	0.800 ±0.013	65.4
Lipofectamine 2000	0.815 ±0.004	66.6
siRNA1	0.903 ±0.009 ¹⁾	73.8 ¹⁾
siRNA2	0.822 ±0.005	66.6
siRNA3	0.841 ±0.016	67.6
NT siRNA	0.821 ±0.006	67.1

Compared with lipofectamine 2000.1) t=18.653, P=0.003

3 讨 论

研究表明, 导致发育中和抗癌治疗过程中卵泡消失的机制是细胞凋亡^[4,9]。启动卵母细胞凋亡的共同信号途径是通过活化鞘磷脂酶, 水解鞘磷脂产生神经酰胺, 神经酰胺作为第二信使依次启动细胞凋亡下游信号^[1]。近几年, 一些学者对鞘磷脂酶与卵母细胞凋亡信号之间的关系进行了有益的探索, 并进行了鞘磷脂酶 (Sphingomyelinase, SMase) 基因敲除及神经酰胺拮抗剂 S1P 促进卵母细胞存活作用的研究^[1,6]。这些研究的结果表明, SMase 功能的缺如, 导致卵母细胞凋亡信号不能启

动, 使新生小鼠卵巢始基卵泡的贮备量大大增加。体内给予 S1P 的野生型小鼠卵泡同样可以完全耐受由抗肿瘤治疗引起的凋亡。这些研究给我们这样的提示, 鞘磷脂酶基因是调控卵母细胞凋亡的关键基因, 如果能够抑制其表达, 将对卵母细胞的保护起到重要作用。酸性鞘磷脂酶在一定的外源刺激下能快速活化释放到细胞表面, 水解细胞膜上的鞘磷脂导致神经酰胺水平在数秒到数分钟内迅速上升。在细胞凋亡、调节肿瘤细胞生长、参与 Fas 信号系统的传递等方面发挥着重要作用^[7]。本研究选用内源性表达 SMPD1 的人包皮成纤维细胞, 利用 siRNA 干扰技术, 沉默 SMPD1 的表达。结果表明 siRNA 可以有效抑制 SMPD1 mRNA 及蛋白的表达, 抑制率达到 96%。丝裂霉素(Mitomycin, MMC)是传统的化疗药物, 由轮生链霉菌培养液中提取的有效成分, 其分子为 C₁₅ H₁₈ N₄ O₅^[8]。其作用机制是抑制细胞有丝分裂及 DNA 合成。有研究表明丝裂霉素 100 μg/ml 作用 24 小时是引起细胞凋亡的最佳诱导条件^[9]。本实验采用文献报道的浓度和作用时间, 结果表明丝裂霉素组细胞抑制率达到 34.6%, 在给予 siRNA 沉默 SMPD1 后给予化疗药物丝裂霉素, 凋亡率为 26.2%, 细胞存活率显著增高, 差异达到显著性水平, 说明抑制 SMPD1 的表达可以抑制鞘磷脂的降解, 从而减少神经酰胺的生成, 阻断信号传导, 抑制细胞凋亡的发生。

基因敲除能取得很好的效果, 但在临床应用上是不可行的, 其方法太复杂, 即使能够实现, SMPD1 基因的缺失也会给个体带来很多其它方面的问题, 如尼曼匹克症的发生^[10]。利用 RNA 干扰技术沉默特定基因, 可实现快速、高效、个体化的基因治疗, 且在需要的时候可以解除这种抑制, 恢复 SMPD1 基因的表达, 就像使用药物一样, 这无疑提供了更为广阔的应用前景。目前 siRNA 的制备方法主要有化学合成法、DNA 质粒载体导入法和病毒载体导入法。后两者都需要整合进宿主的基因组, 易导致插入突变, 牵涉到生物安全性的问题, 为适应将来临床应用的需要, 本研究采用化学合成 siRNA 作为实验材料。化学合成的 siRNA 还具有转染效率高, 对细胞毒性小等优点。我们用化学合成的 siRNA 转染 HFF, 转染效率达到 80%~90%, SMPD1 的表达抑制率很高(96.3%)。siRNA 是强大的抑制目标基因表达的工具, 在细胞培养中转染 siRNA 沉默基因表达, 只需要浓度为 10-

50nmol/L 的 siRNA 就足够了。如果 siRNA 浓度过高,会引起非特异的干扰素反应,使细胞的基因表达普遍受到抑制^[11]。本实验观察到,siRNA 浓度在 0.5~50 nmol/L 之间目的基因的抑制率是逐渐上升的,当 siRNA 浓度达到 100 nmol/L 时,抑制率下降,而阴性对照 no target siRNA 的抑制率则上升,说明太高浓度的 siRNA 会引起“脱靶基因沉默”的不良反应,抑制了目标基因以外的基因表达。哺乳动物细胞中可能缺少产生持续性 RNA 干扰效应的能力,所以细胞进行 2~4 次分裂后 RNA 干扰效应一般会消失^[12]。此外 siRNA 容易被普遍存在的 RNA 酶降解,只能维持较短时间的基因沉默作用,在本研究中 siRNA 转染 HFF 后, SMPD1 基因 mRNA 水平在 48 h 达到最大抑制率,蛋白沉默的效应只能维持 96 h,其后由于细胞分裂,siRNA 降解等原因 SMPD1 表达恢复到转染前水平。研究表明,通过化学方法修饰功能性 siRNA 分子的某些基团,能进一步提高沉默效应和稳定性^[13],将更能适应临床应用的需要。

目前国内外尚无有关 SMPD1siRNA 作用于人包皮成纤维细胞的报道,本研究已经筛选出能有效抑制 SMPD1,具有抗凋亡效应的 siRNA,为进一步研究将 RNA 干扰应用于卵母细胞保护、抵抗抗肿瘤治疗过程中化疗药物引起的卵母细胞凋亡、保护女性生殖力打下基础。

参考文献:

- [1] HORINOUCHE, K, ERLICH S, PERL D P, et al. Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann- Pick disease[J]. *Nat Genet*, 1995, 10(3): 288-293.
- [2] LLACUNA L, MARI M, GARCIA-RUIZ C, et al. Critical Role of Acidic Sphingomyelinase in Murine Hepatic Ischemia- Reperfusion Injury [J]. *Hepatology*, 2006, 44(3):561- 572.
- [3] 郭海霞,薛红漫,夏焱,等. siRNA 对 VEGFR₂ 的表达抑制及对 HL60 细胞和人内皮细胞的影响[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006, 27(3):276- 280.
- [4] MORITA Y, TILLY J L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass[J]. *Dev Biol*, 1999, 213(1):1- 17.
- [5] TILLY J L, KOLESNICK R N. Sphingolipids, apoptosis, cancer treatments and the ovary: investigating a crime against female fertility[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1585(2- 3): 135- 358.
- [6] 彭萍,杨冬梓,莫亚勤,等. 1- 磷酸- 神经鞘氨醇预防化疗大鼠卵巢功能损害的实验研究[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2007, 28(1):15- 18.
- [7] 候丽莉,陈肖华. 酸性神经鞘磷脂酶的生物学特性及其功能[J]. *国外医学.放射医学核医学分册*, 2005, 29(1): 44- 47.
- [8] 倪韶青,寿洪初,赵正言,等. 谷胱甘肽硫转移酶与疾病和化疗[J]. *中国药理学杂志*, 2005, 40(20):1530- 1533.
- [9] 梁丽莉,张强,李钟,等. 丝裂霉素对膀胱癌 EJ 细胞作用机制的研究 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 2002, 23(6): 368- 369.
- [10] WASSERSTEIN M P, ARON A, BRODIE S E, et al. Acid sphingomyelinase deficiency: Prevalence and characterization of an intermediate phenotype of Niemann- Pick disease[J]. *J Pediatr*, 2006, 149(4): 554- 559.
- [11] 宋尔卫. RNA 干扰的生物学原理与应用[M]. 北京:高等教育出版社, 2005:184.
- [12] STEIN P, SVOBODA P, ANGER M, et al. RNAi: mammalian oocytes do it without RNA- dependent RNA polymerase[J]. *RNA*, 2003, 9(2): 187- 192.
- [13] CHOUNG S, KIM Y J, KIM S, et al. Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(3): 919- 927.

(编辑 张恩健)