

siRNA 沉默 Livin 基因 对胶质瘤 TJ905 干细胞多重耐药蛋白 1 和 3 表达的影响

桂 焱^{1,2▲} 李根华² 冯 嵩² 周广洲¹ 陈 俊¹ 靳 峰^{2△}

(¹济宁医学院, 济宁 272000; ²济宁医学院附属医院, 济宁 272029)

摘要 目的 探讨 siRNA 沉默 Livin 基因后,替莫唑胺干预胶质瘤 TJ905 干细胞对多重耐药蛋白(MRP1、MRP3)基因表达的影响,揭示 Livin 基因与化疗耐药之间的关系。**方法** 分离培养胶质瘤 TJ905 干细胞, RNA 干扰技术构建靶向 Livin-siRNA,通过慢病毒转染胶质瘤 TJ905 干细胞建立实验组,另设空病毒转染建立对照组,用不同浓度(0、25、50、100、200、400 μmol/L)的替莫唑胺干预胶质瘤 TJ905 干细胞 72h,细胞增殖实验检测细胞增殖变化趋势,流式细胞技术检测细胞周期变化,实时荧光定量 PCR 检测 Livin、MRP1、MRP3 基因表达情况。**结果** 成功构建靶向 Livin-siRNA 模型,实验组 TJ905 干细胞增殖受到明显抑制,存活率显著低于对照组($P < 0.05$);使用不同浓度的替莫唑胺干预 TJ905 干细胞,对照组和实验组的细胞周期均停滞于 G0/G1 期,且实验组更加明显($P < 0.05$);与对照组相比较,实验组 TJ905 干细胞 Livin 基因表达较对照组下降($P < 0.05$);MRP1 基因表达量下降($F = 195.975, P < 0.05$)以及 MRP3 基因表达量下降($F = 719.521, P < 0.05$)。**结论** TJ905 干细胞 MRP1、MRP3 高表达可能与 Livin 基因密切相关,靶向 siRNA 沉默 Livin 基因可有效降低 MRP1、MRP3 基因的表达从而逆转胶质瘤 TJ905 干细胞对化疗药物的耐药性,提示 Livin 基因可能在化疗耐药机制中发挥重要作用。

关键词 胶质瘤;胶质瘤干细胞;Livin;多重耐药蛋白;替莫唑胺

中图分类号: R739.41 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2017)04-199-06

Influence of Livin-siRNA on the expression of multidrug resistance-associated proteins 1 and 3 in TJ905 glioblastoma stem cells

GUI Yi^{1,2▲}, LI Genhua², FENG Song², ZHOU Guangzhou¹, CHEN Jun¹, JIN Feng^{2△}

(¹Jining Medical University, Jining 272067, China;

²The Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract: Objective To explore the effects of small interference RNA (siRNA) targeting Livin on genes of MRP1 and MRP3 in TJ905 stem cells, and reveal the relationship between Livin and chemotherapy resistance. **Methods** CD133⁺ stem-like cells were isolated by immunomagnetic beads from TJ905 cells. RNA interference technology was used to construct the siRNA targeting Livin (Livin-siRNA), and the experimental group was established by lentivirus transfected glioma TJ905 stem cells. The control group was established by empty virus transfection. Cell counting kit-8 assay, flow cytometry, realtime fluorescence quantitative PCR technology were used to detect and analyze the TJ905 stem cell proliferation and cell cycle and investigate the mRNA expression levels of Livin, MRP1 and MRP3. **Results** Targeting Livin-siRNA model was successfully constructed. The survival rate of TJ905 stem cells was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). The cell cycle of the control group and the experimental group were stopped by using different concentrations of temozolomide for glioma stem cells, and the experimented group was more obvious ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of Livin gene in TJ905 stem cells was significantly lower than

* [基金项目] 国家自然科学基金(81071779); 山东省自然科学基金(ZR2016HL34); 山东省优秀中青年科学家奖励基金(BS2010YY006); 山东省高等学校科技计划项目(J16LL05)

△ [通信作者] 靳峰, E-mail: jinfengsdjn@163.com

▲ 桂焱, 济宁医学院 2014 级研究生

that in the control group ($P < 0.05$), and the expression of multiple drug resistant MRP1 gene ($F = 195.975$, $P < 0.05$) and the expression of MRP3 gene was significantly decreased ($F = 719.521$, $P < 0.05$). **Conclusion** Livin gene may be closely related to the high expression of MRP1 and MRP3 genes. Livin-siRNA can effectively reduce the expression of MRP1 and MRP3 to reverse the drug resistance of glioma TJ905 stem cells to chemotherapeutic drugs. It is suggested that Livin may play an important role in the mechanism of chemotherapy resistance.

Keywords: Gliomas; Cancer stem cells; Livin; Multidrug resistance-associated proteins; Temozolomide; RNA interference

胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤。目前胶质瘤的治疗首选手术切除联合术后同步放疗和替莫唑胺(Temozolomide, TMZ)化疗的综合治疗^[1],但患者即使接受综合治疗,其预后仍较差^[2]。胶质瘤干细胞介导的化疗耐药途径在 TMZ 耐药机制中发挥重要作用,虽然胶质瘤干细胞数量少,但广泛存在于胶质瘤组织和胶质瘤细胞系中,被认为是胶质瘤发生、发展的种子细胞,是胶质瘤发生、发展与维持的基础,与胶质瘤的复发、转移和对药物治疗抵抗有关^[3]。目前大量的研究还证实,包括 TMZ 在内的传统化疗药物对胶质瘤干细胞的杀伤作用较弱^[4]。Livin 基因作为近年来新发现的抗凋亡家族成员,在肿瘤细胞增殖和细胞凋亡方面的作用日渐突出,而多重耐药蛋白(multidrug resistance protein, MRP)在肿瘤细胞化疗耐药发生机制方面则起着重要作用^[5]。本研究应用免疫磁珠法分离胶质瘤 TJ905 干细胞,利用 RNA 干扰技术构建 Livin-siRNA 慢病毒转染模型,通过 TMZ 干预转染后的胶质瘤 TJ905 干细胞,检测沉默 Livin 基因后 TJ905 干细胞增殖、细胞周期及 MRP1、MRP3 基因表达情况,探讨 Livin 基因与多重耐药基因之间的关系,为进一步研究胶质瘤干细胞化疗耐药机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

胎牛血清(FBS)购自杭州四季青公司;改良 Eagle 培养基(DMEM/F12)购自美国 HyClone 公司;胰蛋白酶、PBS 缓冲液、牛血清白蛋白(BSA)、乙二胺四乙酸(EDTA)购自美国 Gibco 公司;B27 (50×)、表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、白血病抑制因子(LIF)购自美国 Peprotech 公司;免疫磁珠细胞分选试剂盒购自德国 Miltenyi Biotec 公司;兔抗人 Nestin 抗体、兔抗人 GFAP 抗体和小鼠抗人 β -tubulin 抗体购自美国

Santa Cruz 公司;异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔 IgG、羊抗小鼠 IgG 均购自武汉博士德生物技术有限公司。

1.2 胶质瘤 TJ905 细胞培养及其干细胞的分选

选择生长状态良好的 TJ905 细胞,在含 10% FBS 的常规培养基中连续培养;利用免疫磁珠法分选、CD133⁺ 干细胞,将其置于含有 EGF (20ng/ml)、bFGF (20ng/ml)、LIF (10ng/ml) 和 B27 (1×) 的无血清干细胞培养基中培养。

1.3 免疫荧光染色法鉴定胶质瘤干细胞及其诱导分化细胞

将细胞球植入到 10% 多聚赖氨酸包被的玻片上,室温晾干后 4% 多聚甲醛固定 30min,加入 5% 山羊血清封闭液,室温孵育 30 min 后加入一抗 Nestin(1:200),湿盒内 4℃ 过夜;次日 PBS 漂洗 3 遍后加入 FITC 标记二抗(1:50)于湿盒内 37℃ 避光孵育 30min,同时用 PBS 代替荧光二抗作阴性对照,然后 PBS 冲洗后置于荧光显微镜下观察并拍照。取生长状态良好的细胞球植入预先经多聚赖氨酸包被好的 6 孔板中,用含 10% FBS 的 DMEM/F12(1:1)完全培养基培养 3~6d,待细胞周围伸出较长突起或散在细胞变为多角形、星形或梭形,用上述类似方法将诱导后的细胞行胶质酸性蛋白(GFAP)和 β -微管蛋白(β -Tubulin)免疫荧光检测。

1.4 慢病毒转染

取生长状态良好的 TJ905 干细胞接种于 96 孔板,分为干细胞实验组和对照组,每组 20 个孔,实验组转染携带 siRNA 的病毒 20h,对照组转染空病毒。然后更换培养基,转染完成后 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱连续培养 3d,倒置荧光显微镜下观察转染效果。预实验摸索 TJ905 干细胞感染复数 MOI 值为 10,根据慢病毒转染说明书进行操作。

1.5 CCK-8 法检测细胞增殖

按照实验设计分组,提前 24h 在 96 孔板接种

TJ905 干细胞,每孔各 10^5 个,24h 吸掉 96 孔板培养基后每孔添加 $100\mu\text{l}$ 不同浓度的 TMZ 培养基, TMZ 浓度分别为 0(空白对照组)、25、50、100、200、 $400\mu\text{mol/L}$ (空白对照为 DMSO 代替),每孔设 2 个副孔。TMZ 干预 72h 后弃掉培养基,每孔加 $100\mu\text{l}$ CCK-8 溶液(DME/F12: CCK-8 = 9: 1), 37°C 温箱孵育 2h, 上机检测(检测波长 450nm , 参照波长 630nm), 每组重复 2 次。

1.6 流式细胞术检测干细胞周期

按照上述实验设计分组 TJ905 干细胞制备成单细胞悬液, 70% 乙醇 4°C 固定过夜, 次日 PBS 漂洗, 添加 $500\mu\text{l}$ 配制好的 PI 染色液, 37°C 孵育 30min, 4°C 冰盒待检。采用流式细胞仪自带分析软件分析数据。

1.7 实时荧光定量 PCR(RT - qPCR) 检测

分别用上述浓度的 TMZ 干预 TJ905 干细胞, 并在干预 72h 后收集细胞, 用 TRIzol 一步法提取总 RNA, 采用 RT-PCR 技术对逆转录扩增产物进行定量分析。PRIMER5.0 设计 Livin、MRP1、MRP3 引物序列, 引物序列信息如表 1。使用 PrimeScript PLUS RTase 将 RNA 反转录成 cRNA。按照试剂盒说明书建立终体积为 $20\mu\text{l}$ 的 PCR 反应体系, $2\mu\text{l}$ 反转录产物、 $10\mu\text{l}$ SYBR Green I、上下游引物 ($10\mu\text{mol/L}$) 各 $0.5\mu\text{l}$ 。在反应过程中每次扩增的同时设无 cDNA 做阴性对照。获取各组标本的标准曲线结果分析采用荧光定量 PCR 仪器自带分析软件分析标本的 Ct 值。计算方法: 待测样品相对值 = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, $\Delta\Delta\text{Ct} = \text{Ct 阴性对照} - \text{Ct 待测样品}$ 。

表 1 PCR 引物检测序列

引物名称	引物序列(5'→3')
Livin-F	GCTGTCACCTCCTGCTCCGGTC
Livin-R	CAGGGGCTGCGTCTTCCGGTTC
MRP1-F	AATGAGGAGGTGGAGGCTTGAT
MRP1-R	TACTGGTGCAGCACGAGGGTCT
MRP3-F	GCTTCTATGCAGCCACATCACC
MRP3-R	GCA AAGAGCACCACGCACTTCC

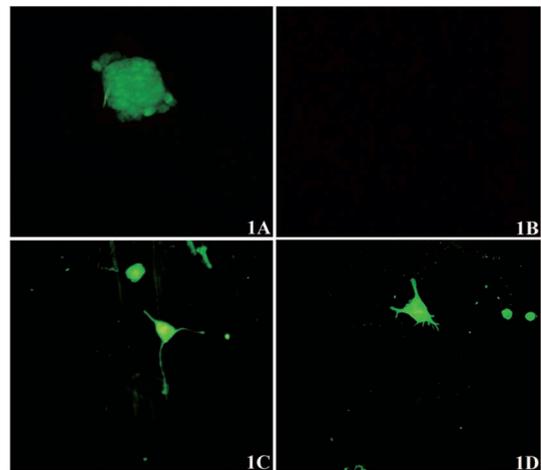
1.8 统计学方法

实验数据应用 IBM SPSS19.0 软件进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, RT - qPCR 结果比较采用析因分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质瘤 TJ905 干细胞的分选与鉴定

免疫磁珠法分选 CD133^+ 细胞, 接种于无血清干细胞培养基, 最初 24 ~ 48h 内细胞生长比较缓慢, 3d 后开始出现细胞球, 至第 6 ~ 8d 左右细胞球显著增大。细胞球悬浮生长, 大小不一, 呈圆形或不规则球形, 折光性较强。将胶质瘤 TJ905 干细胞球接种到经 10% 多聚赖氨酸包被的玻璃片上, 室温晾干后行 Nestin、GFAP、 β -Tubulin 免疫荧光染色, 在荧光显微镜观察显示, 干细胞球 Nestin 染色呈现为绿色荧光, 而 GFAP、 β -Tubulin 染色无绿色荧光; 用完全培养基诱导分化 3 ~ 5d 后行 Nestin、GFAP、 β -Tubulin 免疫荧光染色, 结果显示胶质瘤 TJ905 干细胞球分化细胞 Nestin 染色呈阴性。见图 1。



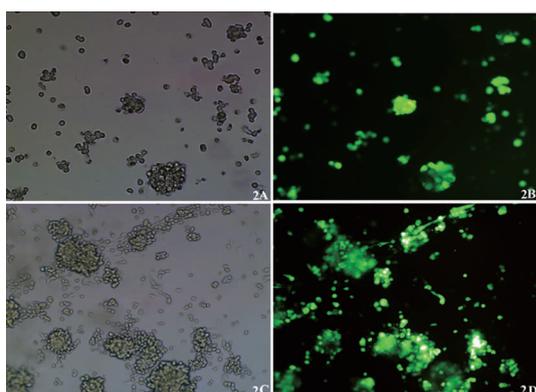
注: A. TJ905 干细胞 Nestin 染色阳性; B. Nestin 染色阴性对照; C. TJ905 干细胞经含血清培养基诱导分化后 GFAP 染色阳性; D. TJ905 干细胞经含血清培养基诱导分化后 β -Tubulin 染色阳性。
图 1 TJ905 干细胞分选与鉴定(免疫荧光染色, $\times 200$)

2.2 慢病毒转染结果

待转染完成, 培养 3d 后于倒置荧光显微镜下观察干细胞转染情况, 结果显示转染后的胶质瘤 TJ905 干细胞在镜下呈绿色荧光, 慢病毒转染效率为 80%。见图 2。

2.3 CCK-8 检测转染后胶质瘤 TJ905 干细胞增殖

CCK-8 检测结果显示: 实验组 TJ905 干细胞的存活率随 TMZ 浓度的增加而下降, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 且相同的药物浓度时, 实验组干细胞存活率低于对照组, 两者之间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。



注:A. 对照组 TJ905 干细胞慢病毒转染前;
B. 对照组 TJ905 干细胞慢病毒转染后;
C. 实验组 TJ905 干细胞慢病毒转染前;
D. 实验组 TJ905 干细胞慢病毒转染后。

图 2 慢病毒转染 TJ905 干细胞前后对比
(免疫荧光染色, ×100)

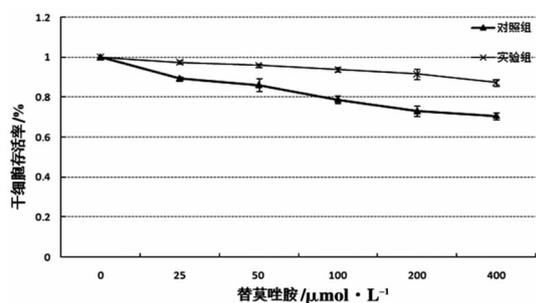
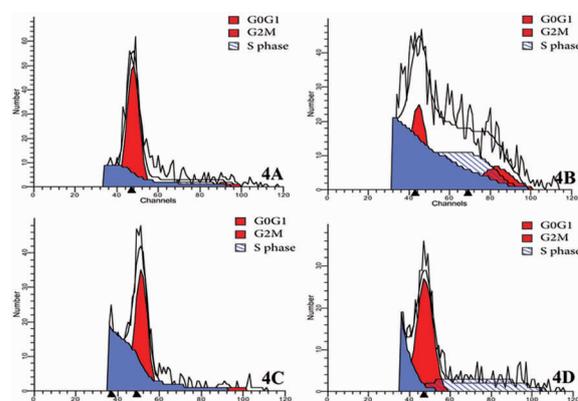


图 3 CCK-8 检测不同浓度 TMZ 干预实验组
和对照组 72h 后的存活率变化

2.4 流式细胞仪检测胶质瘤 TJ905 干细胞的细胞周期变化

采用流式细胞仪检测细胞周期变化,结果显示:使用不同浓度的 TMZ 干预,实验组(91.44 ± 1.29)和对照组(77.67 ± 1.49)的细胞周期均停滞于 G0/G1 期,且实验组更加明显,差异具有统计学意义($P < 0.05$);随着 TMZ 浓度的增加,实验组与对

照组干细胞 S 期所占比例逐渐增多,而 G0/G1 期逐渐减少, TMZ 在 0 μmol 时, S 期在实验组(3.66 ± 0.10)和对照组(17.37 ± 1.35),差异具有统计学意义($P < 0.05$), TMZ 在 400 μmol 时, S 期在实验组(34.49 ± 1.19)和对照组(53.65 ± 1.27),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。



注:A. 0 μmol/L TMZ 干预对照组 TJ905 干细胞
B. 400 μmol/L TMZ 干预对照组 TJ905 干细胞
C. 0 μmol/L TMZ 干预实验组 TJ905 干细胞
D. 400 μmol/L TMZ 干预实验组 TJ905 干细胞

图 4 TMZ 干预 TJ905 干细胞 72h 后细胞周期变化

2.5 RT-qPCR 技术检测 Livin、MRP1 和 MRP3 mRNA 的表达量

结果显示:TJ905 干细胞 Livin 基因 mRNA 表达量分别为:实验组为(0.177 ± 0.021) × 10⁻⁴,对照组为(1.259 ± 0.145) × 10⁻⁴,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在相同的药物浓度干预下,实验组 MRP1 和 MRP3 mRNA 表达量与对照组相比均下降,在各浓度时差异均有统计学意义($P < 0.05$);而在不同 TMZ 浓度干预下,各组中 MRP1 和 MRP3 mRNA 的表达也具有差异性($P < 0.05$)。见表 2、表 3。

表 2 不同浓度 TMZ 干预 72h 后实验组和对照组 MRP1 mRNA 表达量比较(μmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	0	25	50	100	200	400	$F_{\text{药物浓度}}$	P	
对照组	4.789 ± 0.720	5.746 ± 0.642	6.036 ± 0.587	7.470 ± 0.759	7.640 ± 0.646	7.789 ± 0.725	26.91	0.000	
实验组	2.522 ± 0.340	3.032 ± 0.306	3.584 ± 0.459	4.301 ± 0.346	4.456 ± 0.428	5.894 ± 0.506			
$F_{\text{区间}}$							195.975		
P							0.000		

表 3 不同浓度 TMZ 干预 72h 后实验组和对照组 MRP3 mRNA 表达量比较(μmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	0	25	50	100	200	400	$F_{\text{药物浓度}}$	P
对照组	17.635 ± 2.277	57.460 ± 1.827	39.600 ± 2.432	38.384 ± 1.641	35.311 ± 1.303	34.333 ± 1.338	58.586	0.000
实验组	8.290 ± 0.445	10.907 ± 1.004	12.624 ± 1.299	15.328 ± 1.575	20.385 ± 1.711	26.341 ± 2.462		
$F_{\text{区间}}$							719.521	
P							0.000	

3 讨论

胶质瘤是颅内最常见的原发性肿瘤,复发率高、预后差,患者在确诊后即使接受了积极的手术切除和放射、化学药物治疗后,胶质母细胞瘤患者的中位生存时间只有 12 ~ 18 个月^[6]。以往的化疗药物是以胶质瘤细胞为研究对象的,而对胶质瘤干细胞作用较弱,不能产生有效的杀灭作用,这被认为是产生胶质瘤化疗耐药与胶质瘤复发的根源^[7-9]。因此,以胶质瘤细胞为载体模型揭示化疗耐药作用机制有局限性,以胶质瘤干细胞为模型的研究才有可能最终揭示胶质瘤发生和化疗耐药的机制,才有可能研制出对胶质瘤干细胞敏感性高的治疗药物,从而实现对胶质瘤的治疗。

Livin 基因是细胞凋亡抑制蛋白(IAP)家族的新成员,其在细胞增殖、细胞凋亡和细胞周期控制中发挥着关键作用。据报道,Livin 基因的过表达和肿瘤细胞的细胞凋亡抗性表型密切相关,并且 Livin 基因也可以赋予对化疗药物的抗性^[10-11]。通过前期研究也发现^[12],Livin 基因在胶质瘤干细胞中的表达量更高,且在 TMZ 浓度增至 100 μmol/L 时,胶质瘤干细胞增殖率的抑制作用明显低于胶质瘤细胞,说明胶质瘤干细胞比胶质瘤细胞更具耐药性^[13]。我们课题组之前的研究结果显示,Livin 基因在胶质瘤细胞和胶质瘤干细胞中过表达^[14]。本文利用 RNA 干扰技术,沉默胶质瘤 TJ905 干细胞中 Livin 基因表达,应用胶质瘤一线化疗药物 TMZ 干预后发现实验组 TJ905 干细胞存活率明显低于对照组,细胞周期中 G0/G1 期所占比例增多而 S 期所占比例下降。提示沉默胶质瘤干细胞中 Livin 基因可以提高 TMZ 的杀伤效果,降低了干细胞对 TMZ 的化疗抵抗作用。结合前期研究内容^[15],Livin-siRNA 可能通过上调 TNF-α 基因的表达,促使化疗药物 TMZ 对胶质瘤 TJ905 干细胞 TNF-α 的表达产生诱导作用,降低了胶质瘤 TJ905

干细胞的化疗耐药,然而胶质瘤干细胞介导的化疗耐药途径还不甚清楚。

多重耐药是导致肿瘤患者化疗失败的主要原因,而导致多重耐药的重要机制之一是 MRP 的表达增加,MRP 属于 ABC 转运蛋白超家族成员,它可以降低肿瘤细胞对药物的敏感性,导致细胞耐药的产生。其中,对 MRP1 的作用进行的研究表明,抑制其活性已经成为在化疗中逆转多重耐药性的有效工具^[16]。MRP3 与 MRP1 具有相似的结构,相反的是,在正常脑组织中没有 MRP3 的表达。在 mRNA 和蛋白质水平,过表达 MRP3 具有评价患者预后的潜在价值和作为免疫治疗的靶向目标^[15]。另外,MRP1 和 MRP3 在胶质瘤干细胞中的表达量明显高于胶质瘤细胞,并且应用化疗药物干预后,MRP1 的表达量明显升高,说明 MRP1 可能在胶质瘤干细胞化疗耐药中发挥更大的作用^[16],目前只有少数有关特别是高级别脑肿瘤相关的 MRP1 或 MRP3 的活性与化学抗性的研究。

本文发现对照组随着 TMZ 浓度的增大,MRP1 表达水平上升,MRP3 表达水平却出现先上升后下降;而实验组中 MRP1、MRP3 的表达量均低于对照组,在 TMZ 高浓度时作用尤为突出。结果说明 MRP1 和 MRP3 的表达水平可能与 Livin 密切相关,通过靶向沉默 Livin 可有效降低 MRP1 和 MRP3 的表达。但是,对照组 MRP3 表达水平却出现先上升后下降,可能是因为胶质瘤 TJ905 干细胞中 MRP1 和 MRP3 的具有不同的表达特点,使胶质瘤干细胞在胶质瘤治疗的不同阶段发挥不完全相同的作用^[17]。

总之,Livin-siRNA 能有效降低胶质瘤 TJ905 干细胞中 MRP1、MRP3 基因的表达水平,并能显著抑制胶质瘤 TJ905 干细胞的增殖,表明 MRP1、MRP3 的高表达可能与 Livin 基因密切相关。因此,利用 Livin-siRNA 可以逆转胶质瘤 TJ905 干细胞对化疗药物的耐药性,可能会成为新的胶质瘤

治疗靶点,有待在今后研究中进一步证实。

参考文献:

[1] Sharma A, Shiras A. Cancer stem cell-vascular endothelial cell interactions in glioblastoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 473 (3): 688-692. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.12.022.

[2] Jin F, Zhang R, Feng S, et al. Pathological features of transplanted tumor established by CD133 positive TJ905 glioblastoma stem-like cells [J]. Cancer Cell International, 2015, 15 (1). DOI: 10.1186/s12935-015-0208-y.

[3] Liebelt BD, Shingu T, Zhou X, et al. Glioma Stem Cells; Signaling, Microenvironment, and Therapy [J]. Stem Cells Int, 2016, 2016: 7849890. DOI: 10.1155/2016/7849890.

[4] Srensen MD, Fosmark S, Hellwege S, et al. Chemoresistance and chemotherapy targeting stem-like cells in malignant glioma [J]. Adv Exp Med Biol, 2015, 853: 111-138. DOI: 10.1007/978-3-319-16537-0_7.

[5] Zhang YK, Wang YJ, Gupta P, et al. Multidrug Resistance Proteins (MRPs) and Cancer Therapy [J]. AAPS J, 2015, 17 (4): 802-812. DOI: 10.1208/s12248-015-9757-1.

[6] Paw I, Carpenter RC, Watabe K, et al. Mechanisms regulating glioma invasion [J]. Cancer Lett, 2015, 362 (1): 1-7. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.03.015.

[7] Garrido W, Rocha JD, Jaramillo C, et al. Chemoresistance in high-grade gliomas; relevance of adenosine signalling in stem-like cells of glioblastoma multiforme [J]. Curr Drug Targets, 2014, 15 (10): 931-942.

[8] 高谋, 徐如祥, 杨志军. 干细胞在胶质瘤治疗中的研究进展 [J]. 中华神经医学杂志, 2014, 13 (5): 531-533. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2014.05.022.

[9] 李根华, 冯嵩, 刘阳, 等. 替莫唑胺对胶质瘤干细胞抗凋亡与多重耐药基因及细胞周期的影响 [J]. 中华神经外科杂志, 2015, 31 (7): 727-731. DOI: 10.3760/

cma.j.issn.1001-2346.2015.07.020.

[10] Wang X, Xu J, Ju S, et al. Livin gene plays a role in drug resistance of colon cancer cells [J]. Clin Biochem, 2010, 43 (7-8): 655-660. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2010.02.004.

[11] Shao SL, Cui TT, Zhao W, et al. RNAi-based knockdown of multidrug resistance-associated protein 1 is sufficient to reverse multidrug resistance of human lung cells [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15 (24): 10597-10601. DOI: 10.7314/apjcp.2014.15.24.10597.

[12] Liu Y, Guo Q, Zhang H, et al. Effect of siRNA-Livin on drug resistance to chemotherapy in glioma U251 cells and CD133(+) stem cells [J]. Exp Ther Med, 2015, 10 (4): 1317-1323. DOI: 10.3892/etm.2015.2675.

[13] 李根华, 张浩, 刘阳, 等. 替莫唑胺对 U251 干细胞细胞周期及细胞增殖的影响 [J]. 济宁医学院学报, 2013, 36 (3): 166-170. DOI: 10.3969/j.issn.1000-9760.2013.03.004.

[14] Jin F, Zhao L, Guo YJ, et al. Influence of Etoposide on anti-apoptotic and multidrug resistance-associated protein genes in CD133 positive U251 glioblastoma stem-like cells [J]. Brain Res, 2010, 1336: 103-111. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.04.005.

[15] 刘洋, 郭强, 张浩, 等. Livin 靶向 siRNA 对胶质瘤 TJ905 干细胞及肿瘤坏死因子- α 的影响 [J]. 临床荟萃, 2015, 30 (3): 312-314.

[16] Peigan L, Garrido W, Segura R, et al. Combined use of anticancer drugs and an inhibitor of multiple drug resistance-associated protein-1 increases sensitivity and decreases survival of glioblastoma multiforme cells in vitro [J]. Neurochem Res, 2011, 36 (8): 1397-1406. DOI: 10.1007/s11064-011-0464-8.

[17] Kuan C T, Wakiya K, Herndon J E, et al. MRP3: a molecular target for human glioblastoma multiforme immunotherapy. [J]. BMC Cancer, 2010, 10 (1): 468. DOI: 10.1186/1471-2407-10-468.

(收稿日期 2017-03-30)

本文编辑:石俊强

(上接第 198 页)

[5] 王文华. 探索小儿手足口病的预防治疗措施 [J]. 中国卫生产业, 2015, 12 (9): 153-154.

[6] 李国峰. 探讨重症手足口病的早期识别与临床治疗

措施 [J]. 中国继续医学教育, 2016, 8 (14): 138-139. DOI: 10.3969/j.issn.1674-9308.2016.14.094.

(收稿日期 2017-12-09)

(本文编辑:甘慧敏)