

鸦胆子油乳联合 siRNA-ERCC1 对肺腺癌 A549/DDP 细胞的耐药逆转作用

丁雨钦¹, 曲杰¹, 张晶晶¹, 吕喜英^{2*}

(1. 承德医学院, 河北 承德 067000; 2. 承德医学院附属医院, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的:探讨靶向切除修复交叉互补基因1(ERCC1)的小干扰RNA片段(small interfering RNA, siRNA)和鸦胆子油乳联合应用逆转人肺腺癌耐药细胞 A549/DDP 的效果。方法:设计并合成针对 ERCC1 基因对应序列的 siRNA,采用转染试剂 Lipofectamine 2000 转染人肺腺癌耐药细胞 A549/DDP;将实验组细胞分为:空白对照组、鸦胆子油处理组、siRNA 处理组及鸦胆子油联合 siRNA 处理组,利用 RT-PCR 检测 ERCC1 mRNA 和 Western blot 检测 ERCC1 蛋白质的表达;MTT 法检测 A549/DDP 细胞对顺铂的耐药逆转效果。结果:siRNA、鸦胆子油、鸦胆子油和 siRNA 联合应用均能降低 ERCC1 mRNA 和蛋白质的表达,对顺铂的敏感性明显恢复,耐药倍数分别降至 9.72, 8.89, 7.59, 6.83, 鸦胆子油和 siRNA 联合应用效果明显提高($P < 0.05$)。结论:siRNA、鸦胆子油能有效地逆转人肺腺癌耐药细胞 A549/DDP 的多药耐药,鸦胆子油和 siRNA 联合应用效果明显加强。

[关键词] 鸦胆子油乳; A549/DDP 细胞; ERCC1; 耐药逆转

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0235-05

Reversal Effect of *Brucea javanica* Oil Emulsion Combined siRNA-ERCC1 on Human Lung Adenocarcinoma A549/DDP Cells

DING Yu-qin¹, QU Jie¹, ZHANG Jing-jing¹, LV Xi-ying^{2*}

(1. Chengde Medical University, Chengde 067000, China;

2. The Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of small interfering RNAs (siRNAs) combined with *Brucea*

[收稿日期] 20120514(018)

[第一作者] 丁雨钦, 硕士, 从事肿瘤临床治疗研究, Tel:15233401358, E-mail:ansontingel@163.com

[通讯作者] * 吕喜英, 教授, 硕士生导师, 从事肿瘤临床治疗和肿瘤细胞耐药研究, Tel:15633142660, E-mail:xiyinglv@sina.com

[2] 张亚强, 刘猷枋, 于灵惠, 等. 中药前列腺汤对实验性前列腺炎病理模型的影响[J]. 中西医结合杂志, 1991, 11(8):480.

[3] 潘俊杰, 李结实, 金星, 等. 慢性前列腺炎的辨证分型与治疗观察[J]. 四川中医, 2011, 29(11):59.

[4] 刘宾. 慢性前列腺炎中医研究现状[J]. 世界中西医结合杂志, 2009, 4(9):672.

[5] 左仲许. 中药治疗慢性前列腺炎 21 例报告[J]. 实用中西医结合杂志, 1996, 9(8):494.

[6] 张亚强, 刘猷枋. 前列腺方治疗慢性前列腺炎血瘀证的临床与实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(9):534.

[7] 王图超. 中西医结合治疗性病后前列腺炎 57 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):237.

[8] 顾勇刚, 顾文忠. 加味四妙抵当汤治疗慢性前列腺炎 40 例观察[J]. 实用中医药杂志, 2011, 27(4):226.

[9] 洪振丰, 戴春福, 元兴亮, 等. 前列宁合剂对菌性前列腺炎大鼠 ET-1, TXB₂, 6-keto-PGF1 α 研究影响[J]. 中医药学刊, 2004, 22(5):213.

[10] 吴孝政. 中医药治疗慢性前列腺炎的现状与展望[J]. 实用中医内科杂志, 2011, 25(11):25.

[11] 刘宾, 王付, 黄明宜, 等. 抵当汤临床及实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):283.

[责任编辑 聂淑琴]

javanica oil emulsion targeted ERCC1 Gene on reverting platinum resistance of human lung adenocarcinoma cell line A549/DDP. **Method:** The siRNAs which targeted the same sequences of ERCC1 gene were designed and synthesized. Human lung adenocarcinoma cell line A549/DDP was cultured and transfected with siRNAs by Lipofectin2000. Experimental cell grouping: A549/DDP (Control), Brucea-treated group, siRNA-treated group, Brucea and siRNA treated group. ERCC1 mRNA was assayed by RT-PCT, and the protein expression was detected by Western blotting. The efficiency of A549/DDP to cisplatin was determined by MTT method. **Result:** The expression of ERCC1 mRNA and protein decreased significantly after transfection of siRNAs, *B. javanica* oil and *B. javanica* oil + siRNAs. The efficiency of A549/DDP to cisplatin reversed significantly. The drug-resistant multiple dropped back to 9.72, 8.89, 7.59, 6.83. The reversing effect increased significantly by siRNAs combined with *B. javanica* oil. **Conclusion:** Both siRNAs and *B. javanica* oil can reverse platinum resistance of human lung adenocarcinoma cell line A549/DDP. The inhibition effect increases significantly by siRNAs combined with *B. javanica* oil emulsion.

[Key words] *Brucea javanica* oil emulsion; A549/DDP cells; ERCC1; reversal

鸦胆子 *Brucea javanica* (L) merr 系苦木科植物的果实,1973 年首次从中分离得到对各种动物瘤株有生长抑制作用的成分鸦胆亭 (brucantin),以后相继分离出一系列具有抗癌活性的成分,鸦胆子油乳作为其中一种成熟剂型已用于多种肿瘤的临床治疗^[1-2]。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术是近年来较为热门的一种基因治疗的新方法^[3-4]。siRNA 是一种小 RNA 分子,由 Dicer 酶加工而成,激发与之互补的目标 mRNA 沉默。鸦胆子油乳通过促进肺腺癌 A549 细胞的凋亡来抑制肿瘤细胞的增殖。为了进一步阐明鸦胆子油乳抗肿瘤的作用机制,本实验观察鸦胆子油乳联合 RNAi 在体外对人肺癌耐药细胞株 A549/DDP 的耐药逆转作用和对切除修复交叉互补基因 1 (ERCC1) mRNA 和蛋白表达水平的影响,而从进一步逆转 A549/DDP 的铂类耐药。

1 材料

1.1 细胞株 人肺腺癌 A549 细胞 (批号 0018) 和人肺腺癌耐顺铂 A549/DDP 细胞 (批号 0019) 均购自中国科学院肿瘤医院中心细胞库。

1.2 药物 鸦胆子油乳注射液 (批号 12031011) 购于沈阳药大药业有限责任公司,顺铂冻干粉剂 (DDP,批号 110602) 为德州德药制药有限公司产品。两者 4℃ 保存,使用前用 RPMI 1640 培养基稀释至所需浓度。

1.3 试剂 四甲基氮唑蓝 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO)、胰酶均为美国 Sigma 公司产品; RPMI 1640 培养基为 Gibco 公司产品;胎牛血清为武汉三利生物技术有限公司产品 (批号 20090901);兔抗人 ERCC1 及 β -actin 单抗购自美国 BIOWORLD 公司;

siRNA 由 Ambion 公司设计合成;阳离子脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 Trizol 购于 Invitrogen 公司;反转录试剂购于 Promega 公司,荧光 PCR 试剂购于 Bioer 公司。

1.4 仪器 CO₂ 电热恒温培养箱 (日本 Sanyo 公司),光学显微镜 (日本 Olympus), LD5-IA 型低速离心机 (北京雷勃尔离心机有限公司), BIO-RAD680 型全自动酶标仪 (美国伯乐公司), BP211D 型电子天平 (德国 Sartorius 公司), DYY-III2 型稳压稳流电泳仪 (北京六一仪器厂)。

1.5 软件 ImageJ 软件是一个基于 java 的公共图像处理软件,由 National Institutes of Health 开发。本实验中用于蛋白免疫印迹试验和反转录 PCR 图像吸光度的测定。

2 方法

2.1 细胞培养 肺腺癌细胞 A549 及肺腺癌耐药细胞 A549/DDP 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基,在含 5% CO₂, 37℃ 饱和湿度的培养箱中培养,0.25% 胰蛋白酶消化传代。为保持 A549/DDP 的耐药性,该细胞培养液含 2 mg·L⁻¹ 的 DDP,实验前 2 d 更换为无 DDP 的 RPMI 1640 培养液。A549/DDP 鸦胆子油组在 A549/DDP 细胞生长融合至 40% ~ 60% 时更换含 125 mg·L⁻¹ 鸦胆子油乳注射液的完全培养基,继续培养 24 h 后用于后续实验。实验用细胞均处于对数生长期。

2.2 噻唑蓝比色法 (MTT) A549 和 A549/DDP 两株细胞经胰酶消化后计数,调整细胞密度为 1 × 10⁵ 个/mL,分别接种于 2 块 96 孔板,每孔 200 μ L。分设 A549 实验组 (5 种 DDP 质量浓度取 5, 10, 15, 20, 40 mg·L⁻¹); 设 A549/DDP 实验组 (5 种 DDP 质量

浓度取 25, 50, 100, 200, 400 mg·L⁻¹); 设 DDP 质量浓度为 0 mg·L⁻¹ 的空白对照组。细胞经含 10% 小牛血清的 1640 培养基培养 24 h 后, 各实验组细胞加入含对应浓度 DDP 的条件培养基, 终体积为 200 μL, 每个质量浓度设 6 复孔, A549 空白组和 A549/DDP 空白组则加入等体积的 RPMI 1640, 继续培养 36 h 后, 每孔加入无血清 RPMI 1640 180 μL + 5 g·L⁻¹ MTT 20 μL, 继续孵育 4 h, 每孔加入 200 μL 二甲基亚砜(DMSO)终止, 振荡 15 min, 酶标仪 570 nm 波长检测吸光度。以空白对照组细胞活力为 100%, 按公式计算不同浓度 DDP 对 A549, A549/DDP 细胞增殖的抑制率。细胞抑制率 = (1 - A_{实验} - A_{空白}) × 100%。采用直线回归法计算 DDP 的半数抑制浓度(IC₅₀值)。耐药倍数 = IC_{50 耐药株}/IC_{50 敏感株}。每组实验至少重复 3 遍。

2.3 RNA 干扰(RNAi) siRNA-ERCC1 的设计和合成: 按参考文献[5], 在 ERCC1 mRNA (AB069681) 的 111-129 位点设计 siRNA-ERCC1 序列: 有义链 5'-GCC CUU AUU CCG AUC UAC A-3'; 反义链 5'-UGU AGA UCG GAA UAA GGG C-3'。应用 Blast 在 EST 数据库查询 siRNA-ERCC1 序列, 证实除与 ERCC1 基因外, 未发现与另外任何基因同源。采用 Lipofectamine 2000 脂质体转染法, 当 A549/DDP 细胞融合 40% ~ 60% (此时细胞处于对数生长期, 状态最佳), 在 6 孔板中进行转染实验, 实验分组: 空白对照组: siRNA-ERCC1 组: siRNA-ERCC1 + 鸦胆子油乳组。每组 3 个复孔, 每个实验均重复 3 次。转染后细胞用于后续 Western blot, RT-PCR, MTT 等实验。

2.4 反转录 PCR (RT-PCR) TRizol 裂解培养的 A549/DDP 空白对照组、鸦胆子油处理组、siRNA-ERCC1 组和鸦胆子油 + siRNA-ERCC1 组细胞, 氯仿抽提, 异戊醇沉淀, 乙醇洗涤干燥获取总 RNA, 逆转录成 cDNA, PCR 扩增出 ERCC1、内参 GAPDH 基因片段。ERCC1 引物序列(华大基因合成): 上游 5'-CCC TGG GAA TTT GGC GAC GTA A-3', 下游 5'-CTC CAG GTA CCG CCC AGC TTC C-3', 扩增片段长度 273 bp。反应条件: 预变性 94 °C 5 min 进入循环, 94 °C 变性 40 s, 61 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 65 s, 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。内参照 GAPDH 的基因引物序列采用国际标准序列(华大基因合成): 上游 5'-CGA AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3', 下游 5'-AGC CTT CTC GGT GGT GAA GAC-3', 扩增片段长度 306 bp。反应条件: 预变性

94 °C 2 min 进入循环, 94 °C 变性 30 s, 54.1 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。反应完成后取 5 μL ERCC1 PCR 产物, 3 μL GAPDH PCR 产物及 2 μL 5 × 上样缓冲液, 加少量溴乙锭(EB)染色, 行 2% 琼脂糖凝胶电泳。于紫外透射仪上观察电泳结果。ERCC1 基因的表达强度用 ERCC1 基因 RT-PCR 反应产物的吸光度与内参照 GAPDH RT-PCR 反应产物吸光度的比值表示。按以下公式计算 ERCC1 基因表达强度:

$$\text{ERCC1 基因表达强度} = \frac{\text{观察组 ERCC1 表达强度}}{\text{对照组 ERCC1 表达强度}} \times 100\%$$

2.5 蛋白免疫印迹试验(Western blot) 收集培养的 A549/DDP 空白对照组、鸦胆子油处理组、siRNA-ERCC1 组和鸦胆子油 + siRNA-ERCC1 组细胞, 加入细胞裂解液, 冰上放置 15 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清, 以 Bradford 法作蛋白质定量后置 -80 °C 贮存备用。灌制 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 常规电泳, 转膜, 封闭, 一抗(1:1 000), 4 °C 孵育过夜, 二抗(1:2 000), 室温孵育 2 h, ECL 显色。图像经 ImageJ 软件测定各条带的吸光度, 以各条带的吸光度值与 β-actin 吸光度值的比值进行细胞间蛋白表达强度的比较。

2.6 噻唑蓝比色法(MTT) A549/DDP 细胞经胰酶消化后计数, 调整细胞密度为 1 × 10⁵ 个/mL, 分别接种于 4 块 96 孔板, 每孔 200 μL。分设 A549/DDP 实验组、鸦胆子油实验组、siRNA-ERCC1 实验组和鸦胆子油联合 siRNA-ERCC1 实验组, 各组均取 5 种 DDP 质量浓度: 25, 50, 100, 200, 400 mg·L⁻¹。实验操作方法和数据处理同 2.2。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 12.0 统计软件, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用方差分析, 两两比较用 *q* 检验。定义 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 A549/DDP 细胞耐药性 MMT 结果 DDP 对 A549 和 A549/DDP 细胞的抑制作用呈浓度依赖性。DDP 对 A549 细胞的 IC₅₀ 为 (20.98 ± 3.785) μmol·L⁻¹, 对 A549/DDP 细胞的 IC₅₀ 为 (203.85 ± 9.745) μmol·L⁻¹, A549/DDP 的耐药倍数约为 9.72。

3.2 RT-PCR 鸦胆子油乳作用 A549/DDP 细胞后能够降低其 ERCC1 mRNA 的表达强度至 (75.56 ± 2.34)% (*P* < 0.01); siRNA-ERCC1 作用后 mRNA 表达强度降至 (68.18 ± 2.88)% (*P* < 0.01), 鸦胆子

油乳在联合 siRNA-ERCC1 作用后, 细胞 ERCC1 mRNA 表达强度减少最为明显 (50.41 ± 3.70)% ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 4 组细胞 ERCC1 mRNA 平均吸光度 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分组	A					表达强度 /%	P
	1	2	3	4	5		
A549/DDP(对照)	35.12	36.36	35.98	38.55	34.45	100.00	-
鸦胆子处理	27.69	26.55	26.58	28.05	27.32	75.56 ± 2.34	<0.01
siRNA 处理	24.26	25.09	26.85	22.95	23.65	68.18 ± 2.88	<0.01
鸦胆子 + siRNA 处理	20.10	19.06	18.95	15.87	16.72	50.41 ± 3.70	<0.01

注:以上数据采用多样本均数之间的方差分析。统计结果显示 4 个实验组之间结果有显著性差异 ($P < 0.01$), 两两比较时差异亦有统计学意义 ($P < 0.01$) (表 2, 3 同)。

3.3 Western Blot 鸦胆子油乳作用 A549/DDP 细胞后能够降低其 ERCC1 蛋白的表达强度至 (80.67 ± 1.48)% ($P < 0.01$); siRNA-ERCC1 作用后 ERCC1 蛋白表达强度至 (70.66 ± 2.84)% ($P < 0.01$), 鸦胆子油乳在联合 siRNA-ERCC1 作用后, 细胞 ERCC1 蛋白表达强度减少最为明显 (15.18 ± 1.53)% ($P < 0.01$)。结果见表 2。

3.4 对 A549/DDP 细胞的耐药逆转作用 MTT 结果: 预实验中作者选择 5 种不同质量浓度鸦胆子油

乳作用 A549/DDP 细胞, 结果发现 $0.125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 鸦胆子油乳作用相对明显, 该浓度组作用后的 A549/DDP 细胞 DDP 的 IC_{50} 为 $186.10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 耐药倍数为 8.87; 经 siRNA-ERCC1 作用后的 A549/DDP 细胞 DDP 的 IC_{50} 为 $159.15 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 耐药倍数为 7.59; 鸦胆子油乳 + siRNA 联合作用之后的 A549/DDP 细胞 DDP 的 IC_{50} 为 $143.327 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 耐药倍数为 6.83, 明显低于其余组 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 2 4 组细胞 ERCC1 蛋白平均吸光度 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分组	A					表达强度 /%	P
	1	2	3	4	5		
A549/DDP(对照)	76.02	78.54	74.37	72.65	77.11	100.00	-
鸦胆子处理	60.08	63.52	58.45	61.01	62.34	80.67 ± 1.48	<0.01
siRNA 处理	53.43	50.22	54.17	53.70	55.77	70.66 ± 2.84	<0.01
鸦胆子 + siRNA 处理	9.70	10.83	12.53	11.37	13.00	15.18 ± 1.53	<0.01

表 3 5 个浓度组顺铂对各组细胞作用后抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

细胞组	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$						IC_{50}
	0	25	50	100	200	400	
A549/DDP	0	5.28	14.50	23.47	52.57	95.28	203.85
鸦胆子油乳	0	8.17	20.83	28.74	59.80	96.13	186.10 a
siRNA-ERCC1	0	5.13	14.05	22.27	50.34	95.83	159.15 b
鸦胆子 + siRNA	0	10.76	29.30	43.72	81.21	98.13	143.33 c

注:表中数据代表 0, 25, 50, 100, 200, 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 5 个浓度组顺铂作用各组细胞后细胞生长抑制率。

4 讨论

肺癌是世界上发病率和死亡率均居首位的恶性肿瘤, 而晚期患者手术切除率低, 以顺铂为基础的化疗方案成为治疗晚期 NSCLC 的标准化疗方案, 但其有效率低, 究其原因与肿瘤细胞对铂类化疗耐药有关^[6]。ERCC1 是一类 DNA 损伤修复基因, 其表达产

物是一种单链 DNA 核酸内切酶^[7], 是 NER 修复过程限速步骤中的重要基因^[8]。近年来的研究证实 ERCC1 的过表达与肿瘤的化疗敏感性密切相关^[9]。

现代药理研究表明, 鸦胆子油中主要含多种饱和或不饱和脂肪酸^[10], 与肿瘤细胞膜有特异的亲和力, 具有很强的抗癌活性。鸦胆子油是细胞周期非特异性抗癌药, 对癌细胞各周期均有一定的杀伤和

抑制作用。在临床应用于多种中晚期恶性肿瘤,并可改善患者免疫功能,提高患者生存质量^[11-13]。

RNAi 是一种由 dsRNA 介导的基因沉默过程,由外源性的 dsRNA 进入细胞后,被 Dicer 酶识别并切割而来,进而降解同源的 mRNA,特异性地抑制目的基因的表达,现已广泛应用于基因功能、肿瘤和病毒性疾病治疗等的研究^[14]。

本研究结果显示,A549/DDP 细胞对 A549 耐药倍数为 9.72,经过鸦胆子油乳作用后能有效降低细胞耐药相关基因 ERCC1 mRNA 和蛋白的表达,降低细胞对顺铂的耐药性至 8.87 倍。转染 siRNA-ERCC1 后,可有效阻断基因的表达。在同时联合鸦胆子油乳和 siRNA-ERCC1 后,能进一步抑制基因表达,降低细胞对顺铂的耐药性至 6.83 倍,提高其对顺铂的化疗敏感性,进而发挥对肺腺癌 A549/DDP 细胞的耐药逆转作用。提示两种因素存在交互作用,并且表现为协同作用。

综上所述,鸦胆子油乳对肺腺癌 A549/DDP 细胞株具有耐药逆转作用,其逆转作用可能通过减低膜表面转运蛋白 ERCC1 的表达来实现,其具体机制有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 陈世希,陆保成,张仁希.表阿霉素、鸦胆子的碘油超液化乳剂介入性治疗 286 例肝癌[J].中国癌症杂志,1999,9(5):389.
- [2] 林宏英,吴建梅,张文生.鸦胆子油的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(4):65.
- [3] 胡卫,方肇勤,梁超,等. RNA 干扰研究波形蛋白在肝癌细胞增殖中的作用及不同中医治法的调节[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(20):149.
- [4] Kaelin W G Jr, Molecular biology. Use and abuse of RNAi to study mammalian gene function[J]. Science,

2012,337(6093):421.

- [5] Lan L, Hayashi T, Rabeya R M, et al. Functional and physical interactions between ERCCI and MSH2 complexes for resistance to cisdiaminedichloroplatinum (II) in mammalian cells [J]. DNA Repair, 2003,3(2):135.
- [6] Rosell R, Lord R V, Taron M, et al. DNA repair and cisplatin resistance in non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer,2002,38(3):217.
- [7] Marcel van Duin, Jan de Wit, Hanny Odijk, et al. Molecular characterization of the human excision repair gene ERCC-1: cDNA cloning and amino acid homology with the yeast DNA repair gene RAD10 [J]. Cell,1986,44(6):913.
- [8] Lehmann A R. Workshop on ukaryotic DNA repair genes and gene products [J]. Cancer Res,1995,55(4):968.
- [9] Reed E. ERCCI and clinical resistance to platinum based therapy [J]. Clin Cancer Res,2005,11(17):6100.
- [10] 丘明明,王受武,韦荣芳,等.鸦胆子治疗尖锐湿疣活性成分的提取分离[J].广西中医学院学报,1999,16(4):82.
- [11] 张宇,于力克,夏宁.鸦胆子油乳联合 GP 方案化疗对晚期 NSCLC 患者免疫功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):254.
- [12] 杨明镇,王慧,蒋国军,等.鸦胆子油乳介入治疗老年中晚期原发性肝癌[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(2):235.
- [13] 邢海燕,薛惠宁,蒋可.鸦胆子油乳联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌 39 例——附单纯化疗对照组 30 例[J].辽宁中医杂志,2004,31(2):129.
- [14] Cheng J C, Moore T B, Sakamoto K M. RNA interference and human disease [J]. Mol Genet Metab, 2003, 80(1/2):121.

[责任编辑 邹晓翠]