

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.08.004

文章编号: 1005-8982(2016)08-0017-05

论著

## 长链非编码 *GATS* 表达干扰质粒构建 抑制乳腺癌细胞增殖和侵袭的研究

易剪梅, 钱立元, 陈学东

(中南大学湘雅三医院 乳腺外科, 湖南 长沙 410018)

**摘要:目的** 探讨长链非编码 *GATS* 对乳腺癌细胞增殖和侵袭的影响。**方法** 构建的人 *LncRNA-GATS-shRNA1~4* 慢病毒载体转染乳腺癌 MDA-MB-231 细胞后, qPCR 筛选出干扰效率为 50.0% 和 54.0% 的 sh1 组和 sh3 组, MTT 法和 Transwell 实验分别检测转染后细胞增殖和侵袭能力; 流式细胞术检测转染 sh1 组慢病毒后细胞周期分布及凋亡变化。**结果** 测序证实, *LncRNA-GATS* 的 shRNA 寡聚核苷酸序列已被克隆到 pLV-*GATS* 载体; 转染 MDA-MB-231 细胞后, 与阴性对照组比较, sh1 组和 sh3 组的乳腺癌细胞增殖和侵袭能力均降低 ( $P < 0.01$ ), 以 sh1 组更显著; sh1 组细胞周期被阻滞于 S 期 ( $P < 0.01$ ); 细胞凋亡率无明显变化 ( $P > 0.05$ )。**结论** *LncRNA-GATS* 可能下调乳腺癌细胞侵袭力, 并通过抑制细胞周期进展降低细胞增殖能力。

**关键词:** 人 *LncRNA-GATS*; shRNA 干扰载体; MDA-MB-231 细胞; 增殖; 侵袭

**中图分类号:** R655.8

**文献标识码:** A

## Inhibitory regulation of human long non-coding RNA *GATS* on proliferation and invasion of breast cancer cells

Jian-mei Yi, Li-yuan Qian, Xue-dong Chen

(Department of Breast, Thyroid and Hernia Surgery, the 3rd Affiliated Hospital of Xiangya, Central South University, Changsha, Hunan 410018, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of human long non-coding RNA *GATS* on proliferation and invasion of breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods** Four human *GATS*-*LncRNA*-specific oligonucleotide sequences were designed and synthesized previously, then were inserted into the pLV-*GATS* vector. After infecting the MDA-MB-231 cells, transfection efficiencies of *GATS*-*LncRNA*-shRNA1 and *GATS*-*LncRNA*-shRNA3 were analyzed and screened by qPCR, which were 50.0% and 54.0% respectively. MTT and Transwell assays were used to detect the proliferation and invasion ability of the transfected cells, respectively. Flow cytometry was used to search the changes of cell cycle distribution and apoptosis of the MDA-MB-231 cells transfected *GATS*-*LncRNA*-shRNA1 lentiviral vector. **Results** Compared with the cells transfected with scrambled shRNA, the proliferation and invasion ability of cells the sh1 group and sh3 group was inhibited, especially the sh1 group. Flow cytometry showed the sh1 group cell cycle was arrested in S phase, and the cell apoptosis rate had no significant change ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** *LncRNA GATS* inhibits the invasion of breast cancer cells, and down regulates the proliferation of tumor cells through arresting cell cycle in S phase.

**Keywords:** Human *LncRNA GATS*; short hairpin RNA interference vector; MDA-MB-231 cells; proliferation; invasion

乳腺癌是妇女发病率最高的恶性肿瘤, 其发病率占全身各种恶性肿瘤的 7%~10%, 近年来发病率

不断上升<sup>[1-3]</sup>, 其中三阴乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)占 20%<sup>[4]</sup>。三阴乳腺癌作为一种特殊

收稿日期: 2016-01-27

的高危乳腺癌亚型,其侵袭性强、预后差、青年女性好发,寻找其有效治疗靶点迫在眉睫。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度 > 200 nt 的基因转录产物,占 ncRNA 的 80%,既参与表观遗传、可变剪接、入核转运等过程,也能以细胞微结构原件、小 RNA 前体等发挥功能<sup>[9]</sup>。近年,大量研究证实 lncRNA 在白血病、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、神经胶质瘤、肺癌等多种肿瘤中异常表达<sup>[6-10]</sup>。课题组前期基因芯片筛选乳腺浸润性导管癌中 18 条差异表达人 lncRNA ( $P < 0.01$ ),其中 *GATS* 较正常组织明显下调<sup>[11]</sup>。本试验构建 *GATS*-lncRNA-shRNA 慢病毒载体,转染人乳腺癌细胞 MDA-MB-231,检测其对乳腺癌细胞增殖、侵袭的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞、菌株与质粒** 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、HEK-293FT 脂质体转染细胞、pLV-*GATS*-shRNA 慢病毒载体及慢病毒包装系统、慢病毒对照 LV-shNC 等均由长沙赢润生物技术有限公司提供。

**1.1.2 主要仪器及试剂** 荧光定量 PCR 仪 (BioRad 公司)、总 RNA 提取试剂 Trizol (美国 Invitrogen 公司)、Transwell 小室 (美国 Corning costar 公司)、流式细胞仪 (美国 BD 公司)、Annexin V-APC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物公司)、DMEM 培养基 (Gibco 公司)、胎牛血清 (杭州四季青公司)、THUNDERBIRD SYBR<sup>®</sup> qPCR Mix (日本 TOYOBO 公司)、dNTP、RevertAid<sup>™</sup> Reverse Transcriptase、RiboLock<sup>™</sup> RNase Inhibitor、Taq DNA Polymerase (MBI 公司)、培养基: RPMI 1640 (美国 Invitrogen 公司)+10% FBS (美国 Gibco 公司)+1% p/s (双抗诱液,碧云天公司)、胰酶液 (美国 Gibco 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** MDA-MB-231 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37℃ 饱和湿度、含 5%

二氧化碳 CO<sub>2</sub> 的孵箱中培养。

**1.2.2 构建慢病毒载体及细胞感染** 针对人 *GATS*-lncRNA 序列 (NCBI Gen Bank, 基因编号: NR028038), 利用 YRgene shRNA 库设计干扰序列 (见表 1), 构建慢病毒重组载体 pLV-*GATS*-lncRNA-shRNA1~4。取重组载体转化至感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 同时设计空载体作为对照, 挑选阳性克隆测序。将重组载体和包装质粒共转染 HEK293FT 细胞, 包装慢病毒, 4 d 后用荧光显微镜技术观察荧光表达, 计数病毒滴度。包装好的 *GATS*-lncRNA-shRNA 1~4 慢病毒和阴性对照组 (NC-shRNA), 以 MOI 值 50 转染 MDA-MB-231 细胞。

**1.2.3 逆转录 (RT-PCR) 检测 lncRNA *GATS* 表达** 按 Trizol 裂解液说明书进行细胞总 RNA 的抽提; 按逆转录试剂盒说明进行逆转录。*GAPDH* 为内参基因, *GATS* lncRNA 的正向引物为 5'-TAAGCA-GAGGGCTACAGAA-3', 反向引物 5'-CAGGGAGATCAGGAGGAC-3'; *GAPDH* 的正向引物为 5'-TGCAC-CACCAACTGCTTAGC-3', 反向引物 5'-GGCATGGAC TGTGGTCATGAG-3', 按荧光定量 PCR 试剂盒说明配置反应体系, 荧光信号实时检测, 数据分析采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> (CT 代表循环阈值) 分析法。

**1.2.4 MTT 法检测转染后 MDA-MB-231 细胞增殖** 筛选出干扰效率分别为 50.0% 和 54.0% 的 sh1 和 sh3 组, 取 sh1、sh3 及阴性对照组 (NC 组) 3 组 MDA-MB-231 细胞接种到 96 孔板, 每孔接种 8 000 个细胞 (100  $\mu$ l), 每组设 3 个复孔。于慢病毒感染后 48、72 和 96 h 加入 MTT 溶液 (20  $\mu$ l, 5 mg/ml)。酶联免疫检测仪测定 A490 值。

**1.2.5 Transwell 法检测转染后 MDA-MB-231 细胞侵袭** 转染 24 h 后将 60  $\mu$ l 基质胶稀释于 300  $\mu$ l 无血清培养基中, 取上述稀释液 100  $\mu$ l 加入 Transwell 上室中, 37℃ 培养箱中, 孵育 4~5 h。下室中加入 600  $\mu$ l 含有 20% FBS 的培养基。37℃ 培养箱孵育 20~24 h, Transwell PBS 洗 2 次, 显微镜下计数

表 1 *GATS* 的 lncRNA 序列及人工合成的 shRNA oligo 序列

编号	Target 序列信息	shRNA 序列信息
<i>GATS</i> -lncR-shNC	GACTTCATAAGGCGCATGC	GACTTCATAAGGCGCATGCCTCGAGGCATGCGCCTTATGAAGCTTTTT
<i>GATS</i> -lncR-sh1	GCGCTCAGCCTATGGGTTTAA	GCGCTCAGCCTATGGGTTTAACTCGAGTTAAACCCATAGGCTGAGCGCTTTTT
<i>GATS</i> -lncR-sh2	GCTTCCTTTGGTATGCTATTC	GCTTCCTTTGGTATGCTATTCCTCGAGGAATAGCATACCAAAGGAAGCTTTTT
<i>GATS</i> -lncR-sh3	GCAGGAACTTCAGCTTAACC	GCAGGAACTTCAGCTTAACCCCTCGAGGGTTAAGCTGAAGTTTCTGC TTTTT
<i>GATS</i> -lncR-sh4	GGGAGGCCAATAGGCTGAAAT	GGGAGGCCAATAGGCTGAAATCTCGAGATTTTCAGCCTATTGGCCTCCCTTTTT

5个高倍镜视野细胞,计算平均数。每组设 2 个复孔,实验重复 3 次。

**1.2.6 流式细胞仪检测细胞周期分布** 各组细胞慢病毒感染 72 h 后,经 0.2%胰酶处理,离心收集细胞,用 4℃预冷 PBS 洗涤 2 次,在离心管中留约 0.5 ml PBS,加入预冷的 70%乙醇 1 ml 混匀固定,4℃放置过夜;离心除去乙醇,PBS 清洗 1 次,在离心管中留 1 ml PBS,打散细胞团,加入 Rnase 5  $\mu$ l (10 mg/ml),37℃放置 1 h,400 目筛网过滤,加入 PI (100  $\mu$ g/ml)染液,室温避光染色 30 min,流式细胞仪(FACS)检测细胞周期。实验重复 3 次。

**1.2.7 流式细胞仪检测细胞凋亡** 各组细胞慢病毒感染 72 h 后,经 0.25%胰酶处理,离心收集细胞,用 4℃预冷 PBS 洗涤 2 次,然后用 500  $\mu$ l 结合缓冲液重悬细胞,调节其浓度为  $10^6$ /ml,然后取 100  $\mu$ l 细胞悬浮于 5 ml 流式管中,加入 5  $\mu$ l Annexin V-APC 混匀后,加入 5  $\mu$ l PI 混匀,于室温避光孵育 15 min,重悬于 400  $\mu$ l PBS,400 目筛网过滤,加样于流式细胞仪(FACS)检测细胞凋亡。激发波长 Ex=488 nm,发射波长 Em=530 nm。获得细胞凋亡数据后用 Mod Fit LT 软件进行细胞凋亡相对定量分析。实验重复 3 次。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组间比较用单因素方差分析,两两比较用 Dunnett 法。方差不齐用非参数检验的 Kruskal-Wallis *H* 检验,两两比较用 Dunnett's 法, $P < 0.05$  为差异有统计意义。

## 2 结果

### 2.1 重组人 GATS-lncRNA-shRNA 慢病毒载体测序和鉴定

经测序分析,比对 4 种重组载体中插入的片段序列与设计的 pLV-GATS-lncRNA-shRNA 寡核苷酸序列完全一致。荧光显微镜下一视野的荧光和

可见光照片比较,可见大部分细胞发出荧光,病毒滴度分别为  $2 \times 10^9$  TU/ml、 $6 \times 10^8$  TU/ml、 $2 \times 10^9$  TU/ml 和  $4 \times 10^8$  TU/ml。

### 2.2 RT-qPCR 检测 GATS lncRNA 表达

GATS-lncRNA-shRNA 慢病毒转染人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞,荧光显微镜证实转染成功(见图 1)。RT-qPCR 结果显示,pLV-GATS-lncRNA-shRNA1~4 慢病毒对 GATS lncRNA 干扰效率分别为 50.0%、40.9%、54.0%和 8.0%。

### 2.3 MTT 检测转染后 MDA-MB-231 细胞增殖能力变化

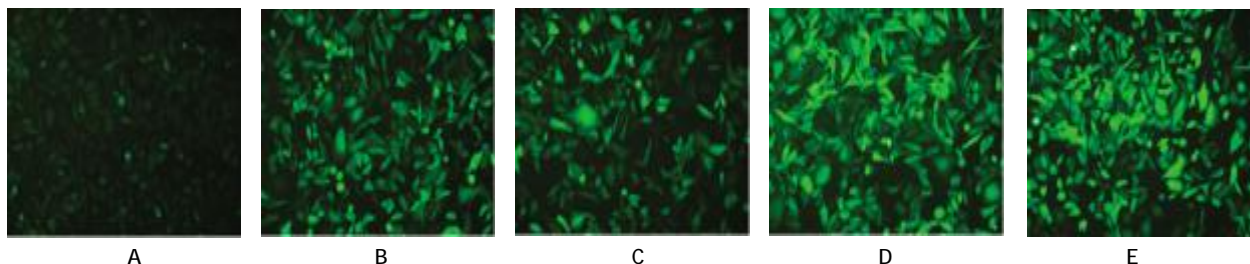
各组不同时相吸光度见表 2,吸光度变化曲线见图 2。MTT 检测结果显示,转染后 3 组 MDA-MB-231 细胞的增殖水平在 48、72 和 96 h 差异有统计学意义( $P < 0.001$ );与对照组比较,sh1 组的细胞增殖水平在 48、72 和 96 h 差异有统计学意义( $P = 0.000$ ),sh3 组的细胞增殖水平除在 72 h 差异有统计学意义( $P = 0.000$ ),48 和 96 h 差异无统计学意义( $P = 0.182$  和 0.110)。

### 2.4 Transwell 法检测转染后 MDA-MB-231 细胞侵袭能力变化

非参数检验的 Kruskal-Wallis *H* 检验结果显示,慢病毒转染 72 h 后,3 组的细胞侵袭力差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),两两比较结果显示与 NC 组比较,sh1 组和 sh3 组的细胞侵袭能力有所下降( $P < 0.01$ ),但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 3 和表 3。

### 2.5 流式细胞仪分析细胞周期分布及凋亡

NC 组细胞 G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub> 期分别占(51.57  $\pm$  1.08)%、(28.04  $\pm$  1.23)%、(20.39  $\pm$  0.25)%,sh1 组细胞 G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub> 期分别占(37.60  $\pm$  1.00)%、(43.20  $\pm$  1.65)%、(19.20  $\pm$  0.66)%。与 NC 组比较,sh1 组 S 期细胞比例明显增高( $P < 0.01$ ),说明转染 GATS-lncRNA-shRNA1 后,MDA-MB-231 细胞周期发生 S 期阻滞,见图 4。慢病毒转染 72 h 后,3 组的细胞凋亡率差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),不能认为转染 GATS-lncRNA-shRNA 会影响 MDA-MB-231 细胞的凋亡率。见表 4。



A: GATS-lncRNA-shRNA NC; B: GATS-lncRNA-shRNA1; C: GATS-lncRNA-shRNA2; D: GATS-lncRNA-shRNA3; E: GATS-lncRNA-shRNA4

图 1 GATS-lncRNA-shRNA 慢病毒感染 MDA-MB-231 细胞 ( $\times 200$ )

表 2 各组不同感染时相细胞吸光值比较 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	细胞增殖		
	48 h	72 h	96 h
NC 组	0.430 ± 0.006	0.533 ± 0.008	0.617 ± 0.008
sh1 组	0.349 ± 0.010 <sup>†</sup>	0.422 ± 0.012 <sup>†</sup>	0.504 ± 0.007 <sup>†</sup>
sh3 组	0.416 ± 0.012	0.464 ± 0.009 <sup>†</sup>	0.602 ± 0.009
F 值	61.408	97.783	178.359
P 值	0.000	0.000	0.000

注:† 与 NC 组比较,  $P=0.000$

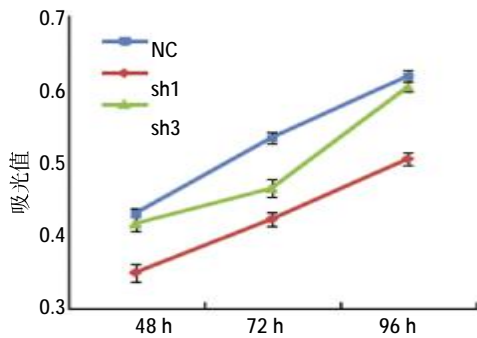
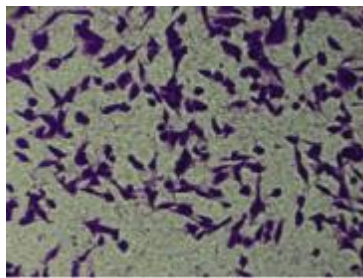
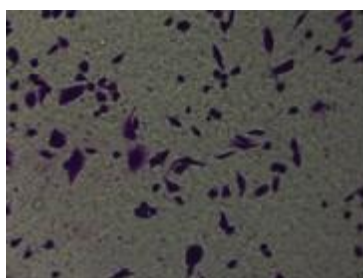


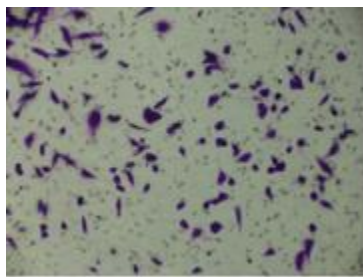
图 2 MTT 检测转染 GATS-lncRNA-shRNA 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响



A



B



C

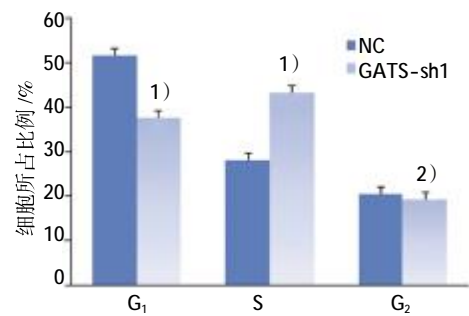
A: NC-shRNA; B: GATS-lncRNA-shRNA1; C: GATS-lncRNA-shRNA3

图 3 转染 GATS-lncRNA-shRNA 对 MDA-MB-231 细胞侵袭力的影响

表 3 各组穿膜细胞数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	细胞数	相对比率
NC 组	6	156.30 ± 12.58	1.00 ± 0.00
sh1 组	6	91.20 ± 28.61 <sup>†</sup>	0.58 ± 0.15
sh3 组	6	112.2 ± 38.59 <sup>†</sup>	0.71 ± 0.21
H 值		15.348	
P 值		0.000	

注:† 与 NC 组比较,  $P<0.01$



1) 与 NC 组比较,  $P<0.05$ ; 2) 与 NC 组比较,  $P<0.01$

图 4 转染 GATS-lncRNA-shRNA1 对 MDA-MB-231 细胞周期的影响

表 4 各组细胞凋亡率的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	凋亡率/%	F 值	P 值
NC 组	3	1.94 ± 0.32		
sh1 组	3	1.37 ± 0.27	4.178	0.073
sh3 组	3	1.93 ± 0.24		

### 3 讨论

国内外学者认为, 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系能较好反应 TNBC 特性<sup>[12-13]</sup>, 故本研究选择该细胞作为细胞模型。Jin 等<sup>[14]</sup>研究发现, MALAT1 在 TNBC 组织中上调, 体外下调 MALAT1 可以抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和增加癌细胞凋亡; 在活体下调 MALAT1 抑制肿瘤生长和转移, 其很可能通过 miR-1/SLUG 轴而产生作用。同源异型框基因反义基因间 RNAs (HOX antisense intergenic RNAs, HOTAIR), 通过 ERS 和 ER 共调节因子, HOTAIR 反转录的雌二醇诱导下的转录失衡, 导致乳腺癌变, 并发现 HOTAIR 在转录水平被 E2 调节, 对于乳腺癌细胞的生存发育是必需的<sup>[15-16]</sup>。

人 lncRNA-GATS 为基质抗原 3 (stromal antigen 3, STAG3) 基因的反向链 (opposite strand), 又名 STAG3OS, 定位于 7q22.1, 外显子计数为 8, 长度 71 580 bp。STAG3 含有 C-末端结构域, 一个 28 个氨基酸的保守的结构域和一个 86 个氨基酸的结构

域。STAG3 作为多亚基蛋白复合物的内聚蛋白,在同源染色体分离的关键步骤中装配 / 拆卸染色质,目前,确认其在偶线期复合物或着丝粒着丝点中的功能尚不明确,其在肿瘤中异常激活的相关机制待阐明<sup>[17-18]</sup>。

本实验成功构建人 GATS-lncRNA-shRNA 慢病毒载体<sup>[19-20]</sup>,转染乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,MTT 实验和 Transwell 实验发现,GATS-lncRNA-shRNA1 和 GATS-lncRNA-shRNA3 组增殖和侵袭能力较均降低,以 sh1 组更为显著;流式分析发现转染 GATS-lncRNA-shRNA1 后细胞周期进展被阻滞于 S 期,细胞凋亡率无明显变化。该结果提示,GATS-lncRNA 干扰后,细胞增殖受限可能并不是通过诱导凋亡来实现,而是影响细胞周期来实现。

综上所述,本研究首次探讨 lncRNA GATS 在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖和侵袭过程中发挥的作用,提示 GATS-lncRNA 可能为乳腺癌治疗的新的有效靶点。为进一步研究 GATS-lncRNA 与 STAG3 在乳腺癌发生、发展和转移的过程中的相互关系奠定基础。

#### 参 考 文 献:

- [1] Chao YL, Shepard CR, Wells A. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition[J]. Mol Cancer, 2010, 9(7): 179.
- [2] Hou G, Zhang S, Zhang X, et al. Clinical pathological characteristics and prognostic analysis of 1013 breast cancer patients with diabetes[J]. Breast Cancer Res Treat, 2013, 137(3): 807-816.
- [3] Hassan MS, Ansari J, Spooner D, et al. Chemotherapy for breast cancer (Review). Oncol Rep, 2010, 24(5): 1121-1131.
- [4] Beg S, Siraj AK, Prabhakaran S, et al. Loss of PTEN expression is associated with aggressive behavior and poor prognosis in Middle Eastern triple-negative breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2015, 151(3): 541-553.
- [5] Di GF, Capaccioli S, Lulli M. A pathophysiological view of the long non-coding RNA world[J]. Oncotarget, 2014, 305(22): 10976-10996.
- [6] Liu Y, Zhao J, Zhang W, et al. LncRNA GAS5 enhances G<sub>1</sub> cell cycle arrest via binding to YBX1 to regulate p21 expression in stomach cancer[J]. Sci Rep, 2015, 5(11): 10159.
- [7] Kiren YU, Mark RP, Gwyn T. Williams. Reciprocal regulation of GAS5 lncRNA levels and mTOR inhibitor action in prostate cancer cells[J]. The Prostate, 2015, 75(7): 693-705.
- [8] Dong S, Ou X, Li W, et al. The long non-coding RNA, GAS5, enhances gefitinib-induced cell death in innate EGFR tyrosine kinase inhibitor-resistant lung adenocarcinoma cells with wide-type EGFR via downregulation of the IGF-1R expression[J]. Hematol Oncol, 2015, 8: 43.
- [9] Sun M, Liu XH, Wang KM, et al. Downregulation of BRAF activated non-coding RNA is associated with poor prognosis for non-small cell lung cancer and promotes metastasis by affecting epithelial-mesenchymal transition[J]. Mol Cancer, 2014, 13(1): 68.
- [10] Sun T, Ye HH, Wu CL, et al. Emerging players in prostate cancer: long non-coding RNAs[J]. Am J Clin Exp Urol, 2014, 2(4): 294-299.
- [11] Chen XD, Yang JY, Qian LY, et al. Aberrantly expressed mRNAs and long non-coding RNAs in patients with invasive ductal breast carcinoma: a pilot study[J]. Molecular medicine reports, 2015, 11(3): 2185-2190.
- [12] Cailleau R, Olivé M, Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization[J]. In Vitro, 1978, 14(11): 911-915.
- [13] Marc L, Guy L. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2004, 83(3): 249-289.
- [14] Jin C, Yan BC, Qin L, et al. Reciprocal regulation of Hsa-miR-1 and long noncoding RNA MALAT1 promotes triple-negative breast cancer development[J]. Tumour Biol, 2015, (12): 1-12.
- [15] Bhan A, Hussain I, Ansari K, et al. Antisense transcript long noncoding RNA (lncRNA) HOTAIR is transcriptionally induced by estradiol[J]. J Mol Biol, 2013, 425(19): 3707-3722.
- [16] Bhan A, Mandal SS. Estradiol-Induced Transcriptional Regulation of Long Non-Coding RNA, HOTAIR [M]. 1st ed. Humanna Press, 2016: 395-412.
- [17] Prieto I, Suja JA, Pezzi N, et al. Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(8): 761-766.
- [18] Strunnikov A. Cohesin complexes with a potential to link mammalian meiosis to cancer[J]. Cell Regen (Lond), 2013, 2(1): 4.
- [19] Heilbronn R, Weger S. Viral vectors for gene transfer: current status of gene therapeutics[J]. Handb Exp Pharmacol, 2010(197): 143-170.
- [20] 丁治国,何蓓,陈晓珩,等.人 VEGF 基因慢病毒介导 RNA 干扰有效靶点的设计及筛选[J].中国现代普通外科进展,2013,16(2): 85-88.

(张蕾 编辑)