

小干扰 RNA 沉默 HIF-1 α 对缺氧状态下脉络膜黑色素瘤细胞中 MMP-2 表达的影响

苑伏香¹, 张 霆¹, 周占宇¹, 王良雨¹, 赵 娟², 王 爽³, 卢发艳⁴

作者单位:¹(266011) 中国山东省青岛市市立医院;²(215000) 中国江苏省苏州市, 苏州大学附属理想眼科医院;³(266011) 中国山东省青岛市, 青岛眼科研究所;⁴(266071) 中国山东省青岛市, 青岛大学

作者简介: 苑伏香, 女, 硕士, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病。
通讯作者: 周占宇, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病。zhouzhanyu1125@163.com

收稿日期: 2015-03-10 修回日期: 2015-06-19

Effect of silencing HIF-1 α by siRNA on the expression of erythropoietin in malignant melanoma of the choroid cell under hypoxia

Fu-Xiang Yuan¹, Ting Zhang¹, Zhan-Yu Zhou¹, Liang-Yu Wang¹, Juan Zhao², Shuang Wang³, Fa-Yan Lu⁴

¹Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, Shandong Province, China; ²Lixiang Eye Hospital Affiliated to Jiangsu University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China; ³Shandong Eye Institute, Qingdao 266011, Shandong Province, China; ⁴Qingdao University, Qingdao 266071 Shandong Province, China

Correspondence to: Zhan-Yu Zhou. Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, Shandong Province, China. zhouzhanyu1125@163.com

Received: 2015-03-10 Accepted: 2015-06-19

Abstract

• AIM: To silent hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) gene in malignant melanoma of the choroid cell by small interference RNA (siRNA) and investigate its effect on the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the choroid cell line human uveal melanoma cell (OCM-1) in hypoxia environment.

• METHODS: OCM-1 cells cultured on culture flask were divided into normal group and hypoxia group. Hypoxia group were divided into five groups: simple hypoxic group, and interference group, and negative control group, and positive control group, and liposome group. Normal group cells were cultured on DMEM culture flask with 10% FBS, 100U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin as well as high concentration of glucose. The cells were maintained at 37 $^{\circ}$ C in a humidified 5% CO₂ incubator. Cells in good condition were selected for experiment. For hypoxia group, chemical hypoxia inducer CoCl₂ was added into nutrient medium at the concentration of

100 μ mol/L to simulate hypoxia microenvironment. We designed and synthesised siRNA (siRNA + negative control + positive control), the target sequences of the HIF-1 α to transfect hypoxic malignant melanoma of the choroid cell. SiRNA including HIF-1 α siRNA, β -actin siRNA and negative control group synthesized *in vitro* transfected hypoxic OCM-1 cell through Lipofectamine2000. The expression of HIF-1 α , MMP-2 gene and the protein were detected by RT-PCR and Western blot.

• RESULTS: Compared with the normal group, the expression of HIF-1 α mRNA was not obviously changed ($P > 0.05$), but the expression of HIF-1 α protein and MMP-2 mRNA protein was significantly higher ($P < 0.05$). Compared with the other hypoxia groups, β -actin mRNA expression of positive control group decreased ($P < 0.05$), which proved successful transfection. The expression of HIF-1 α mRNA and the expression of its protein and both MMP-2 mRNA and its protein was significantly lower ($P < 0.05$). The negative control group, liposome control group had no significant difference in the detection of factors ($P > 0.05$).

• CONCLUSION: Hypoxia status may upregulate the HIF-1 α in OCM-1 cells by increasing the expression of protein. Hypoxia can also inactivate MMP-2, resulting in upregulation of MMP-2 RNA and the expression of its protein. The expression of HIF-1 α and MMP-2 mRNA can be down-upregulated by transfecting OCM-1 with HIF-1 α siRNA.

• KEYWORDS: uveal melanoma cell; hypoxia; hypoxia-inducible factor-1 alpha; matrix metalloproteinases-2; small interference RNA

Citation: Yuan FX, Zhang T, Zhou ZY, *et al.* Effect of silencing HIF-1 α by siRNA on the expression of erythropoietin in malignant melanoma of the choroid cell under hypoxia. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(7):1139-1142

摘要

目的: 以小干扰 RNA 沉默人眼脉络膜黑色素瘤细胞中的低氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 基因, 在缺氧状态下观察其对人眼脉络膜黑色素瘤 (human uveal melanoma cell, OCM-1) 细胞中基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 基因表达的影响。
方法: 将脉络膜黑色素瘤细胞分为正常组与缺氧组, 其中将缺氧组再分成单纯缺氧组、干扰组、脂质体对照组、阳性对照组和阴性对照组; 对正常组细胞用含有浓度为 10% 的胎牛血清和 1% 的双抗 (青-链霉素混合液) 的

DMEM 高糖培养基进行培养。在缺氧组人眼 OCM-1 细胞的培养瓶中加入 100 μ mol/L CoCl₂ 以构建肿瘤细胞内部的缺氧微环境。干扰组转染 HIF-1 α siRNA, 阴性对照组转染无义 siRNA, 阳性对照组转染 β -actin siRNA, 脂质体对照组转染空脂质体。RT-PCR 检测细胞中 HIF-1 α 和 MMP-2 mRNA 的表达, 行 Western-blot 检测 HIF-1 α 和 MMP-2 蛋白的表达。

结果:与正常组相比,单纯缺氧组 HIF-1 α 蛋白的表达增高($P < 0.05$),而其 mRNA 表达量无明显变化($P > 0.05$);MMP-2 mRNA 及蛋白的表达升高($P < 0.05$)。缺氧培养的各组之间相比,阳性对照组 β -actin mRNA 表达下降($P < 0.05$),证实转染成功;干扰组 HIF-1 α mRNA 和 MMP-2 mRNA 和蛋白表达均下降($P < 0.05$),阴性对照组、脂质体对照组各检测因素均无明显差别($P > 0.05$)。

结论:缺氧条件下可以提高人眼脉络膜黑色素瘤细胞中 HIF-1 α 蛋白的表达,而且 HIF-1 α 蛋白的表达水平可以影响 MMP-2 的转录与翻译,从而可能进一步影响人眼脉络膜瘤细胞的外周浸润和远处转移能力。

关键词:脉络膜黑色素瘤;缺氧;HIF-1 α ;MMP-2;小干扰 RNA

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.7.05

引用:苑伏香,张霆,周占宇,等.小干扰 RNA 沉默 HIF-1 α 对缺氧状态下脉络膜黑色素瘤细胞中 MMP-2 表达的影响.国际眼科杂志 2015;15(7):1139-1142

0 引言

脉络膜黑色素瘤是在成年人眼最多见的一类原发性恶性肿瘤,迄今为止并没有发现有效的治疗途径^[1]。研究表明,当瘤体直径超过 2mm 后,瘤体内需有新生血管形成肿瘤才可以继续生长^[2]。低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是组织在缺血和缺氧现象中产生的一类转录因子,它参与多种肿瘤细胞的生长、浸润及转移^[3]。研究发现 HIF-1 下游含有一百多类靶基因, HIF-1 的靶基因产物对红细胞的产生、血管新生和细胞增殖分化和凋亡、肿瘤细胞的浸润转移等方面发挥重要作用^[4]。基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)作为 HIF-1 下游的靶基因,不仅可以特异性地降解基底膜内的 IV 型胶原,还能降解其中的 V 型胶原以及层黏连蛋白等大分子物质,在很大程度上增加了基底膜对肿瘤细胞的通透性,所以 MMP-2 与肿瘤的侵袭转移有密切关系^[5,6]。RNA 干扰技术是双链 RNA 引起的动物或者植物中的有序列特异性转录后基因沉默过程,其基本过程包括启动和效应两种程序^[7]。主要原理为特异性的核酸酶将双链 RNA 切割,产生小干扰 RNA,后者与 RNA 酶结合形成 RNA 诱导沉默复合体(RISC),RISC 为一种内源性核酸酶,它将与小干扰 RNA 结合的靶信使 RNA 内部的碱基切割,使之所携带的转录信息丧失,从而使目的基因的表达被特异性的抑制和下调^[8]。本研究模拟采用 RNA 干扰技术来抑制人眼脉络膜黑色素瘤细胞中 HIF-1 α 基因的表达,初步探讨 HIF-1 α 及其下游靶基因 MMP-2 在脉络膜黑色素瘤生物学行为中所发挥的作用,为通过下调 HIF-1 α 及其下游靶基因 MMP-2 的表达,从而间接抑制肿瘤组织内部新生血管形成、肿瘤细胞的生长及转移,为使用 RNAi 技术特异性抑制 HIF-1 α 基因的表达临床治疗脉络膜黑色素瘤提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料 siRNA 及实验引物的合成:在美国国立生物技术信息中心数据库中检索 HIF-1 α 的序列全长,运用网上设计工具筛选目标序列,设计合成 HIF-1 α siRNA 干扰靶序列:5'-CGTTGTGAGTGGTATTATT-3',HIF-1 α siRNA 干扰序列:正义链为:5'-CGUUGUGAGUGGUAUUAU dTdT-3',反义链为:5'-dTdTGCAACACUCACCAUAAUAA-3';本实验用到的干扰序列来自于广州锐博生物公司。OCM-1 细胞株来源为上海拜力生物科技有限公司。实验所用到的引物序列的设计均是参考文献所得,实验引物序列生成来自上海申能博彩生物科技有限公司(表 1)。

1.2 方法

1.2.1 脉络膜黑色素瘤细胞培养 OCM-1 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基,于 37 $^{\circ}$ C,体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中进行培养,隔天进行传代。

1.2.2 脉络膜黑色素瘤细胞的缺氧培养 将氯化钴浓度为 100 μ mol/L DMEM 完全培养基 5mL 加入到黑色素瘤细胞的培养瓶中,缺氧条件下在培养箱中对人眼脉络膜黑色素瘤细胞实行培养。

1.2.3 脉络膜黑色素瘤细胞的实验分组 将培养瓶中的 OCM-1 细胞分为六组,分别为 A 组:正常对照组,B 组:单纯缺氧组,C 组:干扰组,D 组:阴性对照组,E 组:阳性对照组,F 组:脂质体对照组。其中 A 组细胞为在含有正常氧分压情况下培养的细胞。B 组细胞只对其在缺氧条件下进行培养。C 组人眼脉络膜黑色素瘤细胞设为干扰组细胞,即在缺氧条件下对细胞进行培养后,用 HIF-1 α 小干扰 RNA 对其进行转染。在缺氧条件下培养的 D 组人眼脉络膜黑色素瘤细胞设置为阴性对照,对其用无意义的小干扰 RNA 进行细胞转染。在缺氧条件下培养的 E 组人眼脉络膜黑色素瘤细胞设置为阳性对照,对其用 β -actin 的小干扰 RNA 进行细胞转染,若此组 β -actin 的表达下调,证实转染成功。在缺氧条件下培养的 F 组人眼脉络膜黑色素瘤细胞设置为脂质体对照,对其用空白脂质体进行细胞转染。

1.2.4 小干扰 RNA 转染人眼脉络膜黑色素瘤细胞 观察六孔板中的各组人眼脉络膜黑色素瘤细胞,等到其融合已达 85% 左右,弃去每孔中的培养基,用 PBS 无菌溶液对每孔细胞冲洗 2 遍后培养基更换为 2mL 不含血清、双抗及氯化钴的 DMEM。取 12 个小的 Ep 管,分别对其进行标记为 A~F 组和 A1~F1 组。在 A~F 组 EP 管中均加入 100 μ L 不含双抗、不含血清的 DMEM 溶液,其中 C~E 组分别加入 75pmol HIF-1 α siRNA、无义 siRNA、 β -actin siRNA,混匀。A₁~F₁ 组 Ep 管中分别加入 100 μ L 不含双抗、不含血清的 H-DMEM 培养基,其中 C₁~F₁ 组中加入 7.5 μ L 阳离子脂质体 Lipofectamine 2000,轻轻混匀,室温孵育 5min。在 5min 之内将 A~F 分别与对应的 A₁~F₁ 混合后轻轻混匀,在常温下孵育 20min。将上述混合物相对应加入 6 孔板的内的 A~F 孔内,置于培养箱中培养 24h 后,继续更换含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基细胞培养 24h。

1.2.5 RT-PCR 测定人眼脉络膜黑色素瘤细胞内 HIF-1 α 和 MMP-2 mRNA 的表达 提取各组 OCM-1 细胞总 RNA,参照两步法 RT-PCR 试剂盒(TaKaRa PrimeScript RT-PCR kit)说明书建立逆转录反应体系。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性,时间 30s;95 $^{\circ}$ C 变性 时间 15s;60 $^{\circ}$ C 退火

表 1 HIF-1 α 和 MMP-2 及内参的引物序列和扩增产物长度

| 基因 | 引物序列 | 扩增产物长度 |
|----------------|---------------------------------|--------|
| HIF-1 α | 上游引物:5'-TGCTGATTGTGAACCCATT-3' | 142bp |
| | 下游引物:5'-TCTGGCTCATATCCCATCAA-3' | |
| MMP-2 | 上游引物:5'-CCAAGTCTGGAGCGATGTG-3' | 74bp |
| | 下游引物:5'-GAGTCCGTCCTTACCGTCAA-3' | |
| β -actin | 上游引物:5'-TCCATCATGAAGTGTGACGT-3' | 245bp |
| | 下游引物:5'-TACTCTGCTTGCTGATCCAC-3' | |

时间 30s;72 $^{\circ}$ C 延伸 时间 45s;重复 40 个循环。产物与内参比较,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量的方式对结果进行计算。

1.2.6 Western-blot 法检测脉络膜黑色素瘤细胞中 HIF-1 α 和 MMP-2 蛋白的表达 细胞进行转染 24h 之后,每孔加入 150 μ L 细胞裂解液,收集细胞,冰上裂解 60~90min,4 $^{\circ}$ C,12000r/min 离心 15min,取上清,用 BCA 法测量蛋白浓度。加上样缓冲液进行 SDS-PAGE 电泳,转至 PVDF 膜。室温下在水平摇床上封闭 2h,一抗(兔抗人 β -actin 多克隆抗体为 1:2000;兔抗人 HIF-1 α 、MMP-2 多克隆抗体为 1:200)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗(HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 1:4000)水平摇床上室温孵育 2h。Quantity one 软件进行灰度分析,目的蛋白条带灰度值与 β -actin 条带灰度值的比值即目的蛋白相对表达量。

统计学分析:本实验获得的数据用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,两独立样本定量资料比较采用 t 检验,多组独立样本定量资料比较采取单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脉络膜黑色素瘤细胞的形态学变化 人眼脉络膜黑色素瘤细胞在含有正常氧分压的培养基中培养时,可以观察到肿瘤细胞的生长方式为附壁式生长,多数人眼脉络膜黑色素瘤细胞的形状是多边形和梭形;细胞质中胞浆含量比较丰富,多数瘤细胞的细胞核为圆形和椭圆形。缺氧培养的人眼脉络膜黑色素瘤细胞增殖速度加快,细胞排列杂乱,在转染后的人眼脉络膜黑色素瘤细胞与单纯缺氧组相比在形态上无明显差异。

2.2 人眼脉络膜黑色素瘤细胞中 HIF-1 α 和 MMP-2 mRNA 表达的结果及分析 应用实时荧光定量 RT-PCR 方法测定各组细胞中 β -actin Ct 值,各组间比较有统计学差异($F=4.886, P=0.019$)。阳性对照组中 β -actin 所得 Ct 值与其他各组相比,均明显升高,表明 β -actin 的表达下调,有显著统计学差异($P<0.01$),说明本实验对人眼脉络膜黑色素瘤细胞实行转染以及进行 siRNA 干扰的操作是成功的。

2.2.1 人眼脉络膜黑色素瘤细胞 HIF-1 α mRNA 的表达及分析 以 β -actin 为内参,比较各组间 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量的结果大小,见图 1。与正常对照组相比,单纯缺氧组中 HIF-1 α mRNA 差异无统计学意义($P>0.05$);与单纯缺氧组相比,转染 HIF-1 α siRNA 后,HIF-1 α mRNA 的表达显著下降($P<0.05$);干扰组与阴性对照组、脂质体对照组相比,HIF-1 α mRNA 的表达均有统计学差异($P<0.05$)。

2.2.2 人眼脉络膜黑色素瘤细胞 MMP-2 mRNA 的表达及分析 由图 2 可以得出,与正常对照组相比,单纯缺氧组中 MMP-2 mRNA 表达升高,具有统计学差异($P<0.05$);与单纯缺氧组相比,转染 HIF-1 α siRNA 后,MMP-2

表 2 各组细胞 MMP-2 和 HIF-1 α 蛋白相对表达量

| 组别 | (x \pm s, n=5) | |
|----------|----------------------|----------------------|
| | MMP-2 | HIF-1 α |
| 常氧组 | 0.4071 \pm 0.00739 | 0.4809 \pm 0.00440 |
| 单纯缺氧组 | 0.5821 \pm 0.00601 | 0.6299 \pm 0.00571 |
| 干扰组 | 0.3682 \pm 0.00451 | 0.3389 \pm 0.00341 |
| 阴性对照组 | 0.5809 \pm 0.00328 | 0.6320 \pm 0.00831 |
| 阳性对照组 | 0.5831 \pm 0.00467 | 0.6281 \pm 0.00940 |
| 脂质体对照组 | 0.5799 \pm 0.00582 | 0.6370 \pm 0.00370 |
| <i>F</i> | 4.480 | 10.215 |
| <i>P</i> | 0.025 | 0.001 |

mRNA 的表达明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);干扰组与阴性对照组、脂质体对照组相比,MMP-2 mRNA 的表达降低均有统计学差异($P<0.05$)。

2.3 人眼脉络膜黑色素瘤细胞中 HIF-1 α 和 MMP-2 蛋白表达结果 对不同分组的人眼脉络膜黑色素瘤细胞中 HIF-1 α 和 MMP-2 蛋白的表达进行测量,结果见表 2。

2.3.1 人眼脉络膜黑色素瘤细胞中 HIF-1 α 蛋白表达结果分析 在单纯缺氧组和正常对照组之间的比较发现,经过缺氧培养的人眼脉络膜黑色素瘤细胞中 HIF-1 α 蛋白表达明显升高,两组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。干扰组和其他各组结果相比 HIF-1 α 蛋白表达显著降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$,图 3)。

2.3.2 脉络膜黑色素瘤细胞中 MMP-2 蛋白表达结果分析 和正常对照组相比,经过缺氧培养的人眼脉络膜黑色素瘤细胞中 MMP-2 的蛋白表达含量升高,两者差异具有统计学意义($P<0.05$)。干扰组和其它各组结果相比 MMP-2 蛋白表达出现显著降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$,图 4)。

3 讨论

脉络膜黑色素瘤为青年人眼内常见的恶性肿瘤,发病率较视网膜母细胞瘤稍低^[9]。其发病率为体内原发性黑色素瘤的 5%~6%^[10],尽管其为眼科的常见病,脉络膜黑色素瘤的发病原因以及它的发病机制仍不清楚。近几十年来,众多研究者们对脉络膜黑色素瘤细胞从多方面进行了深入的研究^[11]。

生物体内恶性肿瘤组织的发生发展和肿瘤细胞的外周浸润以及远处转移的过程是由众多因素参与形成的^[12,13]。肿瘤组织的失控性增长可以导致细胞与血液之间供需失衡,当实体肿瘤组织生长达到一定范围,其内部可以形成缺氧环境。在缺氧环境下,恶性肿瘤组织内部会产生一系列生理、生化改变以适应缺氧微环境。参与这些生理生化的反应过程大部分都是由 HIF-1 介导的。在氧

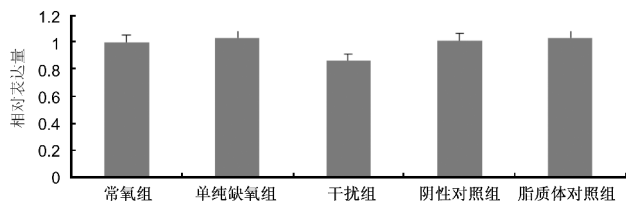


图1 不同组别 HIF-1α mRNA 的相对表达量。

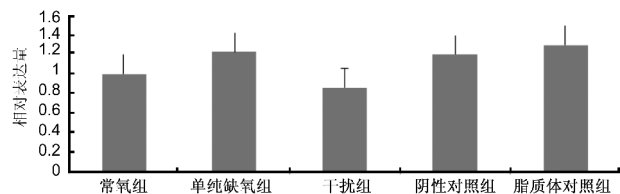


图2 不同组别 MMP-2 mRNA 的相对表达量。

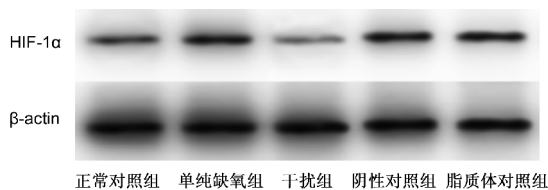


图3 Western-blot 结果显示各组细胞 HIF-1α 蛋白的表达。

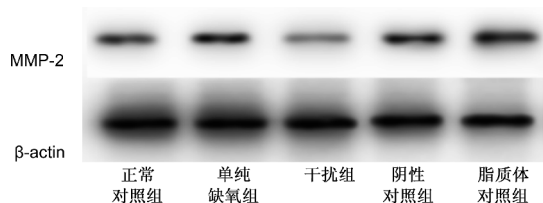


图4 Western-blot 结果显示各组细胞 MMP-2 蛋白的表达。

浓度正常条件下, HIF-1α 可以依赖氧的存在发生降解^[14], 在低氧环境中可以影响 HIF-1α 的酶解, 即可引起其在细胞内过度表达。目前世界上已经发现 60 余种与 HIF-1 有关的目的基因。这些目的基因上含有可以与 HIF-1α 结合的缺氧反应元件, 两者结合后可以提高下游目的基因的转录与翻译, 而这些基因的表达产物和肿瘤细胞的生物学行为密切相关。MMP-2 基因作为 HIF-1 的重要靶基因之一, 主要参与肿瘤细胞外基质的酶解。本实验研究所得结果显示: 与含有正常氧分压和氧浓度中培养的人眼脉络膜黑色素瘤细胞相比, 用氯化钴诱导的缺氧条件下培养的人眼脉络膜黑色素瘤细胞中所测定的 HIF-1α 基因在 mRNA 水平中表达含量未见有明显变化, 在经过缺乏正常氧分压条件下培养的瘤细胞中 HIF-1α 的蛋白含量增加。对于在正常氧浓度下培养的人眼脉络膜黑色素瘤细胞, MMP-2 转录后的产物信使 RNA 与其翻译后的蛋白含量远较缺氧条件下培养的瘤细胞含量低。根据以上研

究结果推测, 在缺氧的条件下可以提高 HIF-1 的翻译以及 MMP-2 的转录与翻译。将小干扰 RNA 转染低氧状态下培养的人脉络膜黑色素瘤细胞后, 可以沉默 HIF-1α, 在这种条件下研究结果显示沉默 HIF-1α 后, MMP-2 的表达无论是在转录水平还是在翻译水平都明显降低。可以推测 HIF-1α 的表达水平可以影响 MMP-2 的表达, 从而进一步影响人眼脉络膜瘤细胞的外周浸润和远处转移能力。

肿瘤细胞在缺氧环境中由于多种基因的表达能力发生变化, 导致肿瘤组织内基因表达产物的含量发生不同程度的改变, 这些变化不仅可以抑制肿瘤细胞的凋亡, 还可以影响肿瘤的生物行为以及对治疗的敏感性。通过本研究表明 HIF-1α 在肿瘤组织中可以发挥重要作用, 它可能作为一种新的治疗手段来为人眼脉络膜黑色素瘤的治疗开辟新思路。

参考文献

- Egan KM, Seddon JM, Glynn RJ, *et al.* Epidemiologic aspects of uveal melanoma. *Surv Ophthalmol* 1988;32(4):239-251
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, *et al.* Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994;79(2):315-328
- Swinson DE, Jones JL, Cox G, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 alpha in non small cell lung cancer: relation to growth factor, protease and apoptosis pathways. *Int J Cancer* 2004;111(1):43-50
- 邹多宏, 黄远亮. 低氧诱导因子-1α 的研究进展. *国际口腔医学杂志* 2010;37(3):320-323
- Schwartz GK. Invasion and metastasis in gastric cancer; *in vitro* and *in vivo* models with clinical correlation. *Semin Oncol* 1996;23(3):316
- Sugimoto C, Fujieda S, Sunaga H, *et al.* Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) mediated signaling regulates type IV collagenase activity in head and neck cancer cells. *Int J Cancer* 2001;93(1):42
- Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;418(6894):244-251
- 曾义, 游潮. RNAi 技术及其在胶质瘤治疗中的研究进展. *中华肿瘤防治杂志* 2008;15(8):4
- Servodidio CA, Abramson DH. Choroidal melanoma. *Nurs Clin North Am* 1992;27(3):777-791
- Bedikian AY. Metastatic uveal melanoma: current options. *Int Ophthalmol Clin* 2006;46(1):151-166
- 葛坚, 郭希让. 眼科学. 北京: 人民卫生出版社 2010:282-284
- Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, *et al.* Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998;394(6692):485-490
- 俞梅. 子宫颈病变中促红细胞生成素受体的表达及其与微血管密度的相关性研究. *现代妇产科进展* 2005;14(6):459-461, 534
- Guarente L. Cell biology Hypoxic hookup. *Science* 2009;324(23):1281-1282