

靶向 E2F1 的 shRNA 抑制眼内 视网膜母细胞瘤生长*

王丰 马家烈 李惠明 陈霞芳 王煜非 黄倩**

(上海交通大学附属第一人民医院中心实验室, 上海 200080)

摘要 视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)中由于 Rb 基因缺失或失活, 转录调控因子 E2F1 始终处于活化状态, 细胞不断增殖, E2F1 活性增加是恶性肿瘤的普遍现象. 根据人 E2F1 基因设计了 3 段 shRNA, 构建 RNA 干扰表达载体 pSilencer-shE2F1, 瞬时转染人视网膜母细胞瘤细胞株 HXO-Rb-44 和人肝癌细胞株 SMMC-7721, 通过荧光定量 PCR 检测 E2F1 表达水平的变化, PI (碘化丙啶)染色检测细胞周期各时相细胞数量以检测其对细胞周期的影响. 根据筛选出的有效 shRNA 序列构建腺病毒载体并包装出腺病毒 Ad-shE2F1, 在裸鼠前房模型中, 体外按 50 moi 的感染系数感染稳定表达绿色荧光蛋白(GFP)的人视网膜母细胞瘤细胞株 48 h 后, 收集细胞, 将 2×10^5 细胞注射到裸鼠眼前房内, 连续观察眼内肿瘤细胞生长情况并拍照记录. 通过转染肿瘤细胞株检测 E2F1 转录水平, 筛选到 1 个能明显抑制肿瘤细胞内 E2F1 表达的 shRNA 序列, 并使细胞周期中 S 期细胞数减少. 经 Ad-shE2F1 感染的 RB 肿瘤细胞与对照相比较, 其在裸鼠眼前房内肿瘤生长减缓. 结果说明, 有效抑制 hE2F1 表达的 shRNA 具有抑制体内外人视网膜母细胞瘤生长的作用.

关键词 E2F1, shRNA, 视网膜母细胞瘤

学科分类号 R739.7, R730.54

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00646

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)是婴幼儿最常见的眼内恶性肿瘤^[1], 其发生主要是由于 Rb 基因的缺失或失活导致细胞周期调控异常所致^[2]. Rb 基因是第一个被发现的人类抑癌基因, 当 Rb 基因所编码的 RB1 蛋白处于非磷酸化状态时, 能与转录调控因子 E2F1 结合, 与 RB1 蛋白结合的 E2F1 处于失活状态, 细胞也因此保持在静止期. 受刺激后或发生恶性转化后, RB1 蛋白或被磷酸化或缺如, E2F1 游离并进而活化, 引起与细胞增殖有关的基因表达, 细胞进入 S 期并进一步分裂、增殖^[3,4]. 因此, Rb 基因通过转录因子 E2F1 在调控细胞周期的进展和细胞增生中起关键作用^[5]. RB 肿瘤中由于 Rb 基因缺失或失活, E2F1 始终处于活化状态, 细胞不断增殖. 有研究表明, 其他类型的肿瘤也存在 Rb 基因缺失或失活, 此外, 在 Rb 基因正常的肿瘤细胞中 E2F1 的活性也明显增加. 鉴于 E2F1 活性增加是恶性肿瘤的普遍现象, 我们在此探索利用 RNA 干扰技术抑制 E2F1 活性, 从而抑制肿瘤生长和转移的新方法^[6].

1 材料与方法

1.1 细胞株及细胞培养

人类 RB 细胞株 HXO-RB-44(中南大学肿瘤研究所建株)经脂质体介导绿色荧光蛋白(GFP)表达质粒转移, G418 筛选后选出持续、稳定表达 GFP 的克隆 HXO-RB-44-GFP. 在含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中培养扩增, 待生长至对数生长期时离心、收集细胞, 用 PBS 缓冲液洗 2 次, 常规计数, 调整细胞悬液浓度至 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ 个/ml 作为移植用. 人肝癌细胞 SMMC-7721, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液培养.

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2004CB518804), 国家自然科学基金杰出青年项目(30325043), 上海市视觉复明临床医学中心课题(FM040102-10), 上海交通大学附属第一人民医院科学研究基金资助项目(03B02).

** 通讯联系人.

Tel: 021-63240090-4601, E-mail: qhuang@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2008-09-18, 接受日期: 2008-11-17

1.2 携带 hE2F1 基因 shRNA 质粒的构建

根据 GenBank 中人 E2F1 基因的 cDNA 序列, 通过 Ambion 公司和 MIT 的 siRNA 专业设计软件设计并从中挑选出 3 个最佳的 siRNA 序列. 按 siRNA 表达载体 pSilencer3.1-H1 puro (Ambion 公司) 的要求, 人工合成含正反 2 条颈环结构的单链 DNA, 复性成双链后连接入载体中, 构建针对 E2F1 基因 siRNA 的表达质粒 pSilencer3.1-H1 puro-shE2F1-1, pSilencer3.1-H1 puro-shE2F1-2, pSilencer3.1-H1 puro-shE2F1-3. 通过双向测序 (Takara 公司) 确认插入片段的碱基完全正确.

1.3 荧光定量 RT-PCR 检测 shE2F1 载体对肿瘤细胞内 E2F1 基因 mRNA 表达水平的影响

于转染的前一天按 8×10^4 个 / 孔将 7721 细胞接种于 24 孔培养板中, 转染当天细胞生长至 70% ~ 80% 汇合, 更换为 1 ml 新鲜培养基. 悬浮的 Rb 细胞则于转染当天记数, 按每孔 200 μ l 含 5×10^5 细胞接种至 24 孔培养板中. 将含 1 μ l 脂质体 (Lipofectamine2000, Invitrogen 公司) 的 50 μ l Opti-MEM 无血清培养基 (Invitrogen 公司) 和含 2 μ g 质粒 DNA 的 50 μ l Opti-MEM 混合, 室温放置 20 min 后加入 24 孔板的细胞中, 每组实验 2 个复孔. 48 h 后收集细胞, 用 Trizol (Invitrogen 公司) 提取细胞总 RNA, 取 1 μ g 总 RNA 经逆转录系统 (Promega 公司) 合成 cDNA 第一链, 设计 E2F1 的特异引物, 以 GAPDH 基因为内参, 通过 SybrGreen 掺入的方法在 MJ Opticon 2 (BIORAD 公司) 系统上进行荧光定量 PCR 反应, 获得 C_t 值, 利用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算肿瘤细胞中 E2F1 的 RNA 水平的变化. 每个 PCR 反应有 3 个复孔.

1.4 shE2F1 改变肿瘤细胞的细胞周期

根据荧光定量 RT-PCR 的结果, 选出其中具有明显抑制靶基因 RNA 水平的序列, 检测其对肿瘤细胞细胞周期的影响. 按上述方法转染肿瘤细胞, 48 h 后收集细胞, 碘化丙锭 (PI) 染色后, 利用流式细胞仪检测细胞周期各时相细胞数量及 DNA 含量.

1.5 构建 shE2F1 腺病毒载体

根据筛选出的 shE2F1 的有效序列以及 pENTR™/U6 (Invitrogen 公司) 载体的要求, 合成正反 2 条 shE2F1 的 DNA 单链, 退火形成双链后插入 pENTR™/U6 载体, 筛选阳性转化子, 通过双向 DNA 序列测定, 确定插入片段序列正确无误, 然后大量扩增, 纯化的质粒 DNA 与 pAd/BLOCK-iT™-DEST (Invitrogen 公司) 在体外重组后转染

AD293 细胞, 包装腺病毒 Ad-shE2F1. 同时合成与靶序列有一个碱基差异的 DNA 序列作为阴性对照, 包装腺病毒 Ad-shNegative.

1.6 RB 肿瘤眼内动物模型的建立

RB 肿瘤眼内动物模型采用 BALB/c(nu/nu) 裸小鼠 (上海斯莱克实验动物有限责任公司), 雄性, 6~8 周龄, 体重 20~30 g. 按 45 mg/kg 体重腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉小鼠, 2.5% 托吡卡胺散瞳, Topcon OMS.110 双目手术显微镜下, 用 OT 针自角巩膜缘部位刺入前房, 做一隧道, 待少量房水流出来后, 用钝头直径为 300 μ m 的微量注射器 (上海医用激光仪器厂产) 吸取 2 μ l 细胞悬液, 沿所做隧道进入前房并注射. 术后双眼涂金霉素眼膏.

1.7 裸鼠眼内 RB 肿瘤生长的动态观察

术后 RB 肿瘤生长以波长为 450~490 nm 的蓝光作为激发光, 在 Zeiss StemiSV11 体视镜下观察, 每周 3 次, 同时拍照记录.

1.8 眼内肿瘤及脑部转移的观察

肿瘤生长至眼外时处死动物. 摘取眼球后, 小心剥离颅骨, 完整取出整个脑组织. 用冰醋酸固定液固定 24 h 后, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋. 切片 (4 μ m 厚) 用苏木素-伊红 (Hematoxylin-Eosin, H&E) 染色. 光学显微镜下观察组织形态学改变及肿瘤转移情况.

1.9 Ad-shE2F1 在 RB 肿瘤裸鼠前房模型中的治疗作用

实验方法同 RB 肿瘤裸鼠前房模型, 对照组左眼前房内注入 2 μ l 经 50 moi 的 Ad-shNegative 感染 48 h 的 HXO-Rb44-GFP, 治疗组左眼前房注入 2 μ l 经 50 moi 的 Ad-shE2F1 感染 48 h 的 HXO-Rb44-GFP, 每组 10 只眼睛. 术后于荧光体视显微镜下连续观察前房内肿瘤生长的情况并拍照, 连续观察两周左右. 待对照组绿色荧光区域面积充满整个前房时, 引颈法处死裸鼠, 取出眼球及脑组织用于病理分析.

2 结 果

2.1 荧光定量 RT-PCR 检测 shE2F1 对肿瘤细胞 E2F1 mRNA 表达水平的抑制

pSilencer3.1-H1 puro-shE2F1 经脂质体转染 SMMC-7721 和 HXO-Rb44 肿瘤细胞 48 h 后, 以相同量的总 RNA 逆转录, 荧光定量 PCR 检测 E2F1 表达水平的变化, 以复孔的平均数值作图, 结果见图 1, 其中一个 shE2F1 顺序在 2 种不同的肿瘤细胞中均能明显抑制靶基因 E2F1 mRNA 的表达.

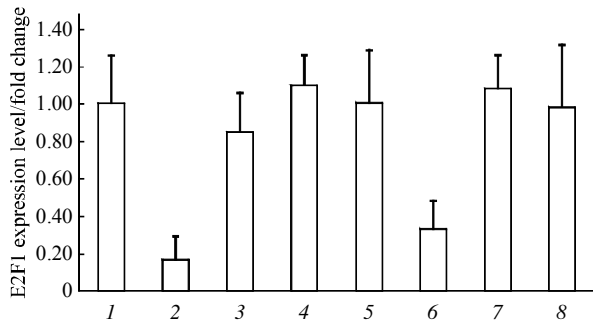


Fig. 1 E2F1 expression levels changed after transfected with shE2F1 tested by realtime RT-PCR

1: HXO-Rb44/negtive control; 2: HXO-Rb44/shE2F1-1; 3: HXO-Rb44/shE2F1-2; 4: HXO-Rb44/shE2F1-3; 5: SMMC-7721/negtive control; 6: SMMC-7721/shE2F1-1; 7: SMMC-7721/shE2F1-2; 8: SMMC-7721/shE2F1-3.

2.2 shE2F1 明显减少处于分裂期的 RB 肿瘤细胞

瞬时转染 pSilencer3.1-H1 puro-shE2F1 48 h 后, 细胞经 PI 染色, 流式细胞仪分析细胞周期各时相细胞数量, 结果见表 1, shE2F1 能够明显减少处于分裂期(S 期)的 RB 肿瘤细胞数.

Table 1 PI test for the quantity of cells during different time in cell cycle

HXO-Rb44-GFP	G1(%)	G2(%)	S(%)
pSilencer3.1 H1 puro-negative	22.8	34.4	42.8
pSilencer3.1 H1 puro-shE2F1	70.8	24.5	4.7

2.3 RB 眼内模型及肿瘤生长的动态观察

前房注射 HXO-Rb44-GFP 细胞后连续观察 14~15 天. 接种的 12 只眼中, 9 只眼观察到有肿瘤生长, HXO-Rb44-GFP 细胞眼内前房移植致瘤率约为 75%. 术后 1 天起就可见前房内绿色荧光团, 随着时间的延长区域逐渐增大. 到 11~14 天绿色

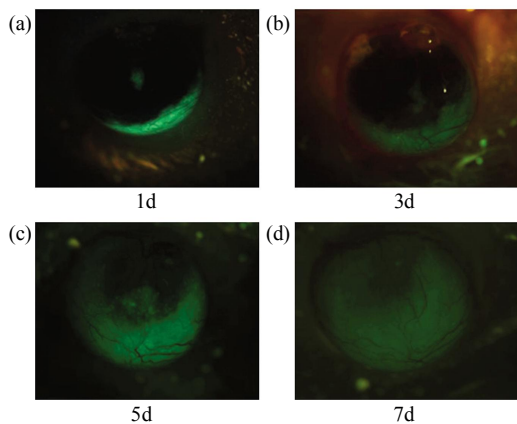


Fig. 2 Inspection of RB tumor planted in anterior chamber by the fluorescent scope

荧光的范围继续增大充满整个前房并且可观察到眼球突出, 眼内肿瘤组织侵及眼外(图 2).

2.4 HXO-Rb44-GFP 裸鼠前房模型的病理观察

在前房内可见排列较疏松、细胞质丰富、多个核分裂相、核浆比增大的肿瘤细胞, 肿瘤内可见散在新生血管(图 3a, b). 在脑组织观察到转移的肿瘤细胞(图 3c, d).

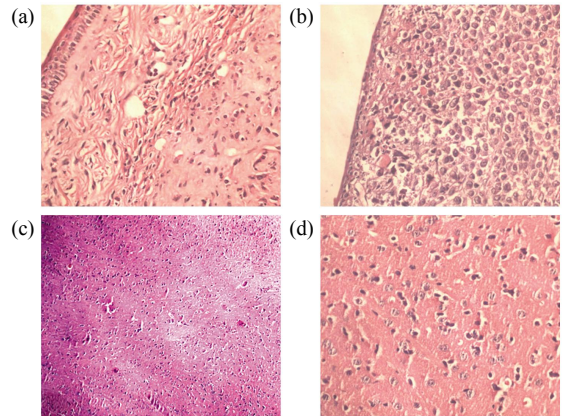


Fig. 3 Pathological tests for RB tumor

Tumor cells could be observed filling the anterior chamber of nude mice eyes, (a) $\times 100$, (b) $\times 400$. Tumor cells metastated to the brain, (c) $\times 100$, (d) $\times 400$.

2.5 经 Ad-shE2F1 感染的 HXO-Rb44-GFP 肿瘤细胞在眼内的生长速率较对照明显减慢

裸鼠前房内注射经 Ad-shE2F1 感染的 HXO-Rb44-GFP 肿瘤细胞后, 荧光体视镜连续观察裸鼠眼内肿瘤生长情况并连续拍照. 实验组(Ad-shE2F1)与对照组(Ad-shNegative)比较, 绿色荧光区域面积差别明显, 对照组较实验组 RB 肿瘤生长趋势快(图 4).

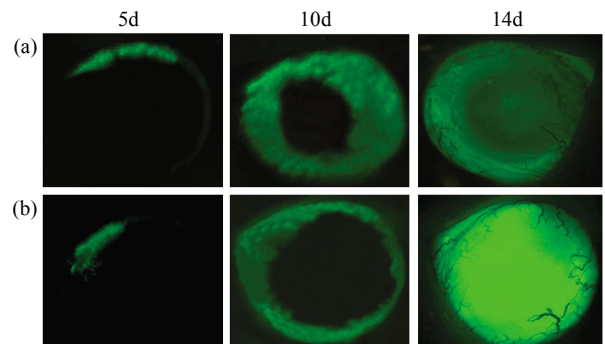


Fig. 4 The difference between the two groups for RB tumor development
(a) Ad-shE2F1. (b) Ad-shNegative.

3 讨 论

传统的动物肿瘤模型只能在处死动物后借助于病理形态学检查判断肿瘤的恶性程度和转移情况, 不仅步骤繁杂, 耗时长, 且观察范围十分局限, 很难做出全面准确的结论. 1992年发现的 GFP 是迄今为止最佳的活体分子标记物^[7]. 具有分子质量小、对细胞无毒、使用方便及容易检测等优点, 并且不需要任何外源底物或协同因子, 在蓝光激发下发出性质稳定的绿色荧光, 使 GFP 在细胞水平和亚细胞水平的研究中得以广泛应用, 尤其是在判断肿瘤体积及浸润范围等方面更具优势. 本研究利用 GFP 基因标记的 HXO-Rb44 细胞株建立的 RB 肿瘤前房移植瘤模型, 利用荧光体视显微镜, 不仅能直接实时无创地观察肿瘤在裸鼠前房内的生长情况, 并可准确评价肿瘤的生长部位和大小, 还可对完整的器官或活组织切片进行观察, 全面了解肿瘤的生长和转移情况.

我们观察到, 在眼外蔓延期肿瘤细胞可侵入颅内脑组织, 在颅内与视神经孔紧邻的脑组织常表现为密集的灶性肿瘤细胞浸润, 而在脑组织的其他部位, 肿瘤细胞大多散在分布在血管尤其是静脉周围. 本实验所用动物模型作为一种简便的活体动物模型, 可用于连续动态观测, 从而加深对 RB 肿瘤生物学行为的理解, 并将在评价肿瘤治疗效果特别是在肿瘤基因治疗研究领域发挥重要作用.

细胞生长和增殖受多种癌基因和抑癌基因的调控, 癌基因的激活或抑癌基因的失活都将导致细胞增殖异常, 诱发肿瘤的发生. E2F 是 1986 年 Kovesdi 等在研究腺病毒时首先发现的, 目前已发现 6 个家族成员, 分别为 E2F1~E2F6, 相应基因定位于不同的染色体, 所有 E2F 蛋白都包含高度保守的 DNA 结合区, 与 E2F 二聚体伴侣蛋白(DP 蛋白)结合的二聚体区及与 RB 蛋白家族结合的活化区^[8]. 目前发现的 DP 蛋白有 DP21、DP22 两种, 与 E2F 蛋白结合形成异二聚体增强 E2F 的转录活性, E2F1、E2F2、E2F3 蛋白只与 RB 蛋白家族中的 RB1 蛋白结合, E2F4、E2F5 蛋白只与同属 RB 蛋白家族的 p107、p130 结合^[9], 目前认为, E2F1、E2F2、E2F3 在促进细胞通过 G1/S 监视点起重要作用, 而 E2F4、E2F5 则起相反的抑制作用^[10].

位于细胞核内的 RB 蛋白, 有磷酸化和低(或去)磷酸化两种形式, 低(或去)磷酸化的 RB 蛋白是生理活化形式, 显示出细胞生长抑制功能. RB 蛋

白磷酸化或与病毒癌蛋白 E1A 的结合可使 E2F1 游离出来, 游离的 E2F1 蛋白由胞浆进入核内, 直接活化 c-myc、c-myb、DNA 聚合酶等基因, 启动 DNA 合成^[11]. 研究显示, E2F1 过表达加快了细胞从 G1 期进入 S 期, 使机体失去对细胞周期的有序调控, 常引起过度增殖并向恶性转化, 导致肿瘤的形成. E2F1 能在体外诱导大鼠胚胎成纤维细胞的肿瘤性转化^[12], 在体内高活性的 E2F1 可诱发 p53 缺失小鼠皮肤肿瘤的形成^[13]. Yamasaki 等^[14]研究发现, E2F1 的缺失可以降低 Rb1(+/-)小鼠肿瘤的发生, 并延长其平均寿命. 胃肠道肿瘤的研究也发现, 40% 的胃肠道肿瘤与其相应的未发现肿瘤的正常黏膜相比较, 具有较高水平的 E2F1 mRNA 的表达^[15].

利用 RNA 干扰以抑制目的基因表达的技术目前日趋成熟^[16~18]. 本研究以 E2F1 为靶基因, 通过 shE2F1 下调 E2F1 的转录水平, 观察对 RB 肿瘤体内外生长的影响. 我们合成了 3 对针对 E2F1 特定序列的 shRNA, 体外转染 HXO-RB-44 细胞株和人肝癌细胞株 SMMC-7721 后, 荧光定量 PCR 检测 E2F1 转录水平的变化, 通过 PI 染色的方法, 流式细胞仪检测细胞周期各时相细胞比例的改变, 筛选到有效的序列. 在体内实验中, 通过构建携带 shE2F1 的腺病毒载体, 研究重组腺病毒感染的 HXO-Rb44-GFP 细胞在前房模型中对视网膜母细胞瘤生长的作用. 荧光体视镜下观察动物眼内前房内绿色荧光区域面积的变化, 比较治疗组(Ad-shE2F1)与对照组(Ad-shNegative)肿瘤细胞的生长情况, 可见对照组较治疗组肿瘤细胞生长趋势快. 本研究结果显示, Ad-shE2F1 对前房内视网膜母细胞瘤的生长有一定抑制作用. 结果将为 RB 肿瘤的基因治疗提供实验依据, 为其他 E2F1 高表达的肿瘤治疗提供线索.

参 考 文 献

- 1 李凤鸣, 主编. 眼科全书. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 1202
Li F M. System of Ophthalmology. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996. 1202
- 2 Sellers W R, Kaelin W G Jr. Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol*, 1997, **15** (11): 3301~3312
- 3 Johnson D G, Schwarz J K, Cress W D, *et al.* Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature*, 1993, **365**(6444): 349~352
- 4 Stanelle J, Stiewe T, Theseling C C, *et al.* Gene expression changes in response to E2F1 activation. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30** (8): 1859~1867
- 5 Suzuki T, Yasui W, Yokozaki H, *et al.* Expression of the E2F family in human gastrointestinal carcinomas. *Int J Cancer*, 1999, **81** (4):

- 535~538
- 6 Han S, Park K, Bae B N, *et al.* E2F1 expression is related with the poor survival of lymph node-positive breast cancer patients treated with fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide. *Breast Cancer Res Treat*, 2003, **82**(1): 11~16
 - 7 Misteli T, Spector D L. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**(10): 961~964
 - 8 Kovcsdi I, Reichel R, Nevins J R. Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell*, 1986, **45**(2): 219~228
 - 9 Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*, 1998, **12**(15): 2245~2262
 - 10 Sears R C, Nevins J R. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *J Biol Chem*, 2002, **277**(14): 11617~11620
 - 11 Krek W, Ewen M E, Shirodkar S, *et al.* Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell*, 1994, **78**(1): 161~172
 - 12 Shu H K, Julin C M, Furman F, *et al.* Overexpression of E2F1 in glioma-derived cell lines induces a p53-independent apoptosis that is further enhanced by ionizing radiation. *Neuro Oncol*, 2000, **2**(1): 16~21
 - 13 Pierce A M, Gimenez-Conti I B, Schneider-Broussard R, *et al.* Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(15): 8858~8863
 - 14 Yamasaki L, Bronson R, Williams B O, *et al.* Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-)mice. *Nat Genet*, 1998, **18**(4): 360~364
 - 15 Suzuki T, Yasui W, Yokozaki H, *et al.* Expression of the E2F family in human gastrointestinal carcinomas. *Int J Cancer*, 1999, **81**(4): 535~538
 - 16 Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, **391**(6669): 806~811
 - 17 Devi G R. siRNA-based approaches in cancer therapy. *Cancer Gene Ther*, 2006, **13**(9): 819~829
 - 18 Karagiannis T C, El-Osta A. RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs. *Cancer Gene Ther*, 2005, **12**(10): 787~795

RNA Interference Gene Therapy Targeting Human Transcription Factor E2F1 Inhibits Human Retinoblastoma Cells Proliferation*

WANG Feng, MA Jia-Lie, LI Hui-Ming, CHEN Xia-Fang, WANG Yu-Fei, HUANG Qian**

(Experimental Center, The First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

Abstract The transcription factor E2F1 may form a complex with RB and which may play a major role in promoting growth control. Small interfering RNAs are short, double-stranded RNA molecules that can target mRNAs with complementary sequence for degradation *via* a cellular process to induce gene silence through degradation of homologous transcripts. The experiments were designed to inhibit proliferation of human retinoblastoma cells by knockdown human transcription factor E2F1 expression level using RNA interference technology. Three different hairpin shRNA inserts were designed targeting human transcription factor E2F1. The three inserts were synthesized and subcloned into a shRNA expression vector pSilencer H1puro which contains the H1 RNA polymerase III promoter. The three plasmids encoding E2F1 short hairpin were transfected into human retinoblastoma cells line HXO-Rb-44 and human liver cancer cell line SMMC-7721 *in vitro*. Real-time RT-PCR was used to measure E2F1 mRNA level. For function analysis, propidium iodide (PI)-stained DNA content method was used to identify cell cycle by flow cytometer. The selected shE2F1 were cloned into an adenovirus system and packaged to adenovirus. Retinoblastoma HXO-Rb-44-gfp cell line which has been marked with green fluorescent protein (GFP) were infected by Ad-shE2F1 for 48h, and Ad-shNegative was used as control. The infected cells were injected into anterior chamber of nude mice eyes. The eyes were investigated and the consecutive and dynamic photos of the condition of RB tumor's growth were taken by the special fluorescent microscope. One in three RNAi expression plasmids delivery resulted in 83.5% suppression of E2F1 mRNA transcription level. The same shRNA showed 89% inhibition in entering S phase. In nude mice eye anterior chamber, Ad-shE2F1 infected tumor cells grew more slowly than the negative control. The results showed that efficacy of Ad-shE2F1 were helpful in the process of limiting the growth of retinoblastoma. RNAi gene therapy directed against the human transcription factor E2F1 is a new therapeutic approach to suppress retinoblastoma cells proliferation.

Key words E2F1, shRNA, retinoblastoma

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00646

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2004CB518804), The National Natural Science Foundation of China (30325043), Shanghai Clinical Medicine Center for Vision Rehabilitation (FM040102-10) and Foudation of First People's Hospital Affiliated Shanghai Jiaotong University(03B02).

**Corresponding author. Tel: 86-21-63240090, E-mail: qhuang@sjtu.edu.cn

Received: September 18, 2008 Accepted: November 17, 2008