

利用 RNAi 逆转录病毒载体系统对人朊病毒蛋白表达的 稳定抑制

徐文婧^{1,2}, 王娣³, 王娟^{1,2}, 杨怀义¹

1 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

2 中国科学院研究生院, 北京 100039

3 北京中医药大学, 北京 100029

摘要: 朊病毒是引起可传染的致死性海绵状脑病的致病因子, 细胞中正常的朊病毒蛋白(PrP^C)在该疾病病程发展中起着必不可少的作用。同时, PrP^C 已被证明在胃癌、乳腺癌等癌症中发挥着保护癌细胞的作用。根据人源 PrP^C(HuPrP^C) cDNA 序列, 本研究设计了 4 种 19 nt 的 siRNA, 将其构建成 RNAi 逆转录病毒载体系统, 进行了其对 HuPrP^C 表达的抑制效应的分析, 从中获得了能高效稳定抑制 HuPrP^C 表达的 3 种靶向序列, 其中 si626(5'-GGTTGAGCAGATGTGTATC-3') 的抑制效果最为明显, 其抑制效率可达 85% 以上。随后, 利用筛选出的 si292 和 si626 的稳定干扰细胞系进行了细胞浸润性实验, 结果发现, PrP^C 干扰细胞系细胞浸润能力显著下降。这为进一步研究朊病毒疾病的基因治疗、以 PrP^C 为靶标进行 PrP^C 相关癌症的辅助治疗研究奠定了一定的基础。

关键词: 朊病毒, RNAi, 逆转录病毒载体, 细胞浸润

Stable inhibition of human prion protein through a retrovirus-based RNAi system

Wenjing Xu^{1,2}, Di Wang³, Juan Wang^{1,2}, and Huaiyi Yang¹

1 *Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*

2 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*

3 *Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China*

Abstract: Prion leads to fatal transmissible spongiform encephalopathies. Cellular prion protein (PrP^C) is necessary in prion disease. At present, it is demonstrated that PrP^C plays a protective role in several carcinomas, such as gastric and breast cancer. We designed four 19-nt siRNAs according to cDNA sequence of human PrP^C and constructed retrovirus-based RNAi vectors. We evaluated the inhibitive effect of these sequences on HuPrP^C (human PrP^C) and selected out three sequences with stable and efficient inhibition. And the efficiency of si626 reached more than 85%, which effect was significant. Next, we performed cell invasion assays of PC3M-si292 and PC3M-si626 in which PrP^C was inhibited. And it showed that the cell invasive ability decreased in PrP^C knock-down cell lines. This will make preparations for the further research on gene therapy of prion diseases and PrP^C related carcinoma treatment and PrP^C could be considered as a potential therapeutic target molecule in prostate cancer treatment.

Received: May 4, 2009; **Accepted:** May 19, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30770086).

Corresponding author: Huaiyi Yang. Tel: +86-10-64807372; Fax: +86-10-64807381; E-mail: yanghy@sun.im.ac.cn

国家自然科学基金(No. 30770086)资助。

Keywords: prion, RNAi, retroviral vector, cell invasion

朊病毒(Prion)是一种蛋白质感染因子,其感染可引起人和动物的致死性神经退行性疾病,即可传染性海绵状脑病(Transmissible spongiform encephalopathies, TSEs),如人克雅氏症(Creutzfeldt-Jakob disease, CJD)、变异型克雅病(Variant CJD)、Kuru 病、牛海绵状脑病(Bovine spongiform encephalopathy, BSE, 也称为疯牛病)、羊瘙痒病(Scrapie)、鹿慢性消耗性疾病(Chronic wasting disease, CWD)等^[1]。引起 TSEs 的致病性因子(PrP^{Sc})与朊病毒的细胞型蛋白(Cellular prion protein, PrP^C)为同分异构体,PrP^{Sc}由 PrP^C构象异常所致,PrP^{Sc}的形成需 PrP^C的参与^[2,3]。PrP^C为一种在哺乳动物体内正常表达的糖蛋白,除其主要在脑部表达,构象改变与 TSEs 相关外,其也能在其他组织中表达,最近有研究发现其在胃癌^[4]、乳腺癌^[5]等癌症中有丰富表达,并且参与着癌细胞的抗凋亡作用^[4-6]及其迁移和浸润^[7],起到保护癌细胞促进癌症发生的作用。若能干扰 TSEs 发生过程中脑部 PrP^C的表达,干扰胃癌、乳腺癌中 PrP^C的表达,将有利于延缓 PrP^C相关疾病的发生。

RNAi 技术是近年来发展起来的抑制基因表达的一种有效方法。通过 siRNA 靶向特异的 mRNA 序列,经与 RNA 诱导沉默复合体(RISC)共同作用,剪切 mRNA,以抑制目的基因的表达^[8,9]。利用 RNAi 技术进行神经退行性疾病治疗的研究目前主要集中在阿尔茨海默病^[10]、脊髓小脑性共济失调^[11]、亨廷顿疾病^[12],而对朊病毒疾病治疗的研究还有待深入展开。目前虽有报道了利用 RNAi 技术抑制小鼠 PrP^C(mPrP^C)和牛 PrP^C(bPrP^C)表达的 siRNA 序列^[13,14],但针对人 PrP(HuPrP)基因 *PRNP* 的 siRNA 序列还少有报道。为此,本实验设计了 4 种靶向 HuPrP 的 siRNA,从中筛选出了抑制 HuPrP^C 表达效率可达 85% 以上的 siRNA 序列,这为有效治疗 CJD、vCJD 及一些癌症的发生奠定了良好基础。同时,实验中利用逆转录病毒为载体进行了 HuPrP^C 表达的稳定抑制,并利用 PrP^C 敲降的稳定细胞系进行了 PrP^C 对细胞浸润性影响的研究,为治疗 PrP^C 相关癌症提供了一种有效的辅助治疗手段。结果显示,PrP^C 表达被抑制后细胞的浸润能力显著下降,这为以 PrP^C 作为靶标的基因治疗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、细胞

RNAi Ready pSIREN-RetroQ 逆转录病毒载体及 Helper 质粒、PhoenixTM 细胞由中国科学院微生物研究所叶昕老师惠赠;JM109 为本实验室保存菌株;PC3M 细胞系从武汉大学购买。

1.2 试剂

*Bam*H I、*Eco*R I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶混合物 Solution I、PrimeScriptTM RT reagent Kit、SYBR Premix Ex *Taq*TM、DNase I 购自 TaKaRa 公司;Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;MEM 及 DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;8H4 抗体由美国 Case Western Reserve University 施民新教授惠赠; β -actin 抗体购自北京中山金桥公司;Omega E.Z.N.A. Plasmid Minipreps Kit 质粒小提试剂盒、Omega Gel Extraction 凝胶回收试剂盒购自美国 Omega 公司;DNA 分子量 Marker 及预染蛋白 Marker 为 Fermentas 公司产品;Fugene 转染试剂购自 Roche 公司,细胞浸润试剂 CytoSelectTM Cell Invasion Assay 试剂盒为 Cell BioLabs 公司产品。

1.3 RNAi 逆转录病毒的载体的构建

1.3.1 DNA 寡核苷酸序列的设计与合成

根据人源 PrP^C(HuPrP^C)cDNA 序列,按照 BD 公司 BDTM Knockout RNAi Systems User Manual 设计 shRNA 的原则,即起始的碱基为 G 或 A、靶序列中没有连续 3 个及以上的 T、Loop 序列选用文献中报道的 5'-TTCAAGAGA-3'序列^[15-17],选择了 1 个针对于 HuPrP^C N 端,3 个针对于 C 端的 *PRNP* 基因 cDNA 的 292~310、515~533、599~617、626~644 的序列(分别命名为 si292、si515、si599、si626)作为靶位点,设计合成相应的 shRNA cDNA 模板。并在两端合成相应的 *Bam*H I 与 *Eco*R I 的酶切位点。所有寡核苷酸均在 TaKaRa 公司合成。

1.3.2 载体的构建

将合成的 DNA 寡核苷酸用 TE 溶解至终浓度为 100 μ mol/L,按照 1:1 混合,产生终浓度为 50 μ mol/L 双链寡核苷酸。按照 95 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 37 $^{\circ}$ C 2 min, 25 $^{\circ}$ C 2 min 的退火反应进行退火。

pSIREN-RetroQ 载体用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行酶切后与退火后的寡核苷酸于 16°C 用 Solution I 连接, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞。TaKaRa 公司测序后, 获得阳性克隆。本试验共构建 5 种重组逆转录病毒载体, 其中 pSIREN-RetroQ-shluc 为表达干扰 luciferase 的无关 shRNA 的对照载体, 另外 pSIREN-RetroQ-sh292、pSIREN-RetroQ-sh515、pSIREN-RetroQ-sh599、pSIREN-RetroQ-sh626 四种载体均为表达靶向 *PRNP* mRNA siRNA 序列的逆转录病毒载体。

1.4 细胞培养

PhoenixTM 逆转录病毒包装细胞系, 于 10%胎牛血清和 100 mg/mL 链霉素及 100 U/mL 的青霉素的 DMEM 细胞培养基中培养。PC3M 靶细胞, 于含有 10%胎牛血清和 100 mg/mL 链霉素及 100 U/mL 的青霉素的 MEM 细胞培养基中培养。其培养均在 37°C、5% CO₂ 条件下进行。

1.5 逆转录病毒包装及靶细胞感染

60 mm 的细胞培养皿中接种 5×10⁵ 个 PhoenixTM 细胞培养 1 d 后, 次日利用 1:1 的重组逆转录病毒载体与 Helper 质粒按照 FuGene 转染试剂说明进行共转染。转染 48 h 后, 收集含有病毒的细胞上清, 经过 0.45 μm 的滤膜过滤, 保存于 -70°C。

在感染前 1 d, 于 6 孔板中接种 4×10⁵ 个 PC3M 细胞, 次日每孔加入 1 mL 病毒液与终浓度为 8 μg/mL 的 polybrene。24 h 后, 细胞重新铺到 100 mm 培养皿中同时加入嘌呤霉素使其终浓度为 5 μg/mL。经过 3~4 周抗生素的筛选, 收集嘌呤霉素抗性 PC3M 细胞混合克隆。

1.6 RNA 提取及 real-time PCR 检测

按照 Trizol 说明书提取细胞总 RNA, 并用 DNase I 去除其中的 DNA。取 500 ng RNA 进行逆转录合成 cDNA。按照 SYBR Premix Ex TaqTM 说明书进行 real-time PCR 检测, 其用于扩增 *PRNP* cDNA 寡核苷酸的引物为: 5'-TACATTTTCGGCAGTGACT ATG-3' 和 5'-TGTTCTGGTTGCTGTACTCAT-3'; 用于扩增内参 *beta-actin* 基因的引物为: 5'-ACCCACA CTGTGCCCATCTACGA-3' 和 5'-GCCGTGGTGGTG AAGCTGTAGCC-3'; 其扩增条件为预变性 95°C 10 min, 95°C 5 s, 58°C 20 s, 72°C 15 s, 40 个循环。

PCR 扩增后按照 2^{-ΔΔCt}, 分析试验组与对照组的差异。

1.7 Western blotting 检测

用细胞裂解液冰上裂解细胞 20 min, 12 000 r/min 离心 10 min 收集上清, 12%分离胶进行 SDS-PAGE 电泳后, 用半干转法将蛋白转移至 PVDF 膜 (0.65 mA/cm²)。5%的脱脂牛奶(TBST 配)封闭过夜。孵育特异性抗体, anti-PrP (8H4) 浓度为 1:1000, anti-Beta-actin 为 1:2000, 二抗分别为辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG 浓度均为 1:2000 或抗兔 IgG 浓度为 1:3000, 加 ECL 发光液, 显影。

1.8 流式细胞检测

细胞用 2.5%的胰酶消化, 用冰冷的 PBS 洗 2 次之后, 5%的 BSA 封闭。1:100 的 anti-PrP 一抗孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 1:200 的 FITC 标记小鼠 IgG, 孵育 45 min。PBS 洗 3 次后, 用 500 μL 将细胞重悬, 进行流式细胞检测。

1.9 细胞浸润性测定

根据 CytoSelectTM Cell Invasion Assay 试剂盒说明书对 PC3M、PC3M-siluc、PC3M-si292、PC3M-si626 四种细胞的细胞浸润能力进行测定。

2 结果

2.1 RNAi 稳定细胞系的构建

本实验使用了自失活型载体 RNAi-Ready pSIREN-RetroQ 为 RNAi 逆转录病毒载体(图 1A), 根据 si292、si515、si599、si626 的序列设计出互补的正义和反义寡核苷酸, 退火成双链 DNA, 结构如图 1B 所示。为能使转录有效终止, 在其 3'端添加了终止信号 dT(6)。其目的片段由位于其上的 U6 启动子转录成 shRNA(图 1C)。以重组逆转录病毒载体转染 PhoenixTM 细胞, 收集病毒后感染 PrP^C 高表达的人前列腺癌细胞系 PC3M, 进行 siRNA 序列的有效性筛选。感染细胞经过 2~3 周的抗生素筛选后, 混合收集抗性克隆, 获得稳定表达 PrP^C siRNA 序列的细胞系 PC3M-si292、PC3M-si515、PC3M-si599 和 PC3M-si626。由于实验中获得 siRNA 稳定细胞系为混合克隆细胞系, 这就排除了目的基因整合的位置效应, 其反映出的 RNAi 效应将直接表示了 siRNA 序列的有效性。

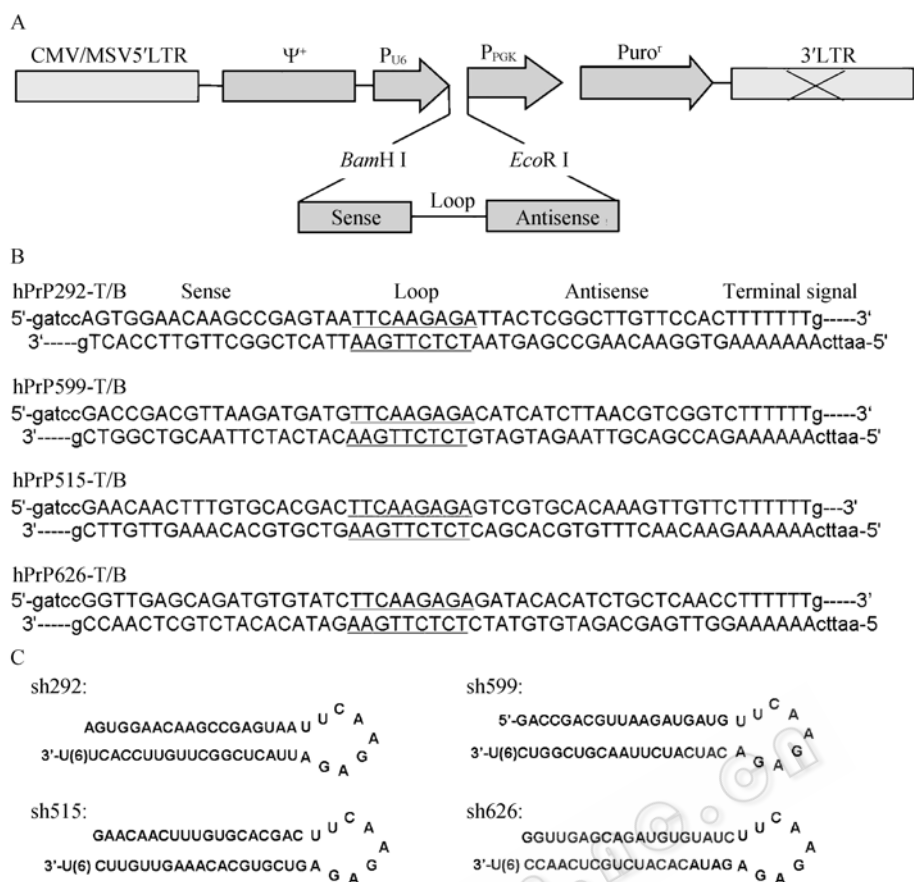


图 1 RNAi 逆转录病毒载体系统

Fig. 1 Retrovirus-based RNAi system. (A) Schematic representation of the retroviral vector RNAi-Ready pSIREN-RetroQ. (B) The sequences of four shRNA template oligonucleotides encoding shRNAs for *PRNP* gene silence. (C) The predicted shRNAs for *PRNP* gene silence.

2.2 靶向 PrP^C 的 siRNA 能有效干扰 *PRNP* mRNA 的合成

由于通过 siRNA 引起基因沉默的靶向分子为目的基因的 mRNA, 故为评价不同靶序列 siRNA 序列的有效性, 本实验首先利用 real-time PCR 对转染细胞中 *PRNP* mRNA 的水平进行了检测。其结果表明, 基于逆转录病毒载体系统释放的 shRNA 能有效干扰 *PRNP* mRNA 的合成, 尤其 si626 序列的效果最为明显, 与对照序列 siluc 相比其 *PRNP* mRNA 的合成减少了 $86.3\% \pm 2.5\%$, 其他 siRNA 序列也都对 *PRNP* mRNA 的合成表现出了明显的干扰效果, 与对照细胞系 PC3M-siluc 相比, PC3M-si292、PC3M-si515、PC3M-si599 中 *PRNP* mRNA 的合成分别下降了 $66\% \pm 1.33\%$ 、 $55\% \pm 12.9\%$ 、 $74.3\% \pm 2.6\%$, 其结果在统计学意义上都表现出了显著或极显著的差异(图 2)。

2.3 靶向 PrP^C 的 siRNA 能有效抑制稳定细胞系中 PrP^C 的表达

为进一步评价 siRNA 序列的有效性, 进一步通过 Western blotting 对获得的 siRNA 逆转录病毒稳定细胞系中 PrP^C 的表达进行了检测。结果表明, PC3M-si515、PC3M-si599 和 PC3M-si626 细胞系中

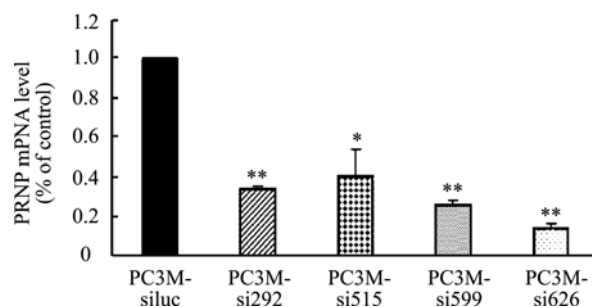


图 2 利用 Real-time PCR 进行 siRNA 干扰效果的检测
 Fig. 2 Quantitative realtime-PCR analysis of the effects of various siRNAs.

PrP^C 的表达, 受到了显著的抑制, 其在 PC3M-si626 细胞系中的表现尤为明显(图 3), 这与在 mRNA 水平上的检测相一致。而在 PC3M-si292 细胞系中 si292 对 PrP^C 表达的抑制效果并不明显。

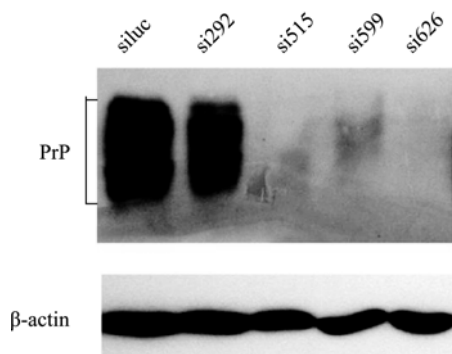


图 3 siRNA 干扰效果的 Western blotting 检测
Fig. 3 Western blotting analysis of the effects of various shRNAs for PrP^C gene silencing, protein electrophoretically separated on a 12% SDS-PAGE.

由于在 PC3M 细胞系中 PrP^C 主要通过 GPI 锚定于细胞膜表面。因此本研究进一步利用细胞流式对其在细胞膜上的表达进行了检测。其结果表明, siRNA 逆转录病毒稳定细胞系细胞表面 PrP^C 的表达与 Western blotting 检测的结果趋势相一致, PC3M-si292、PC3M-si515、PC3M-si599 和 PC3M-si626 四种细胞系细胞膜上 PrP^C 表达分别下降了 49.6%±7.0%、84%±7.5%、72.8%±12.8%、87.1%±6.1%(图 4), 均表现出与对照细胞系有极显著差异。si626 序列的干扰效果最为明显, 其效果可达到 85%以上。

2.4 PrP^C 被干扰后对细胞浸润性的影响

在胃癌细胞中, 高表达的 PrP^C 能够促进癌细胞的浸润和转移^[7]。为阐明前列腺癌细胞 PC3M 中高表达 PrP^C 对前列腺癌发生的影响, 本研究利用筛选出的 PrP^C 被抑制的 PC3M 细胞系分析了其对前列腺癌细胞浸润的影响。本试验选用了设计的 4 个序列中的 2 个具有代表性的序列 si292 和 si626, 即分别是对 PrP^C 干扰效果不是特别明显和对其干扰效果非常明显的序列。结果显示, PC3M-si626 细胞的浸润能力较对照细胞 PC3M-siluc 明显下降, 而 PC3M-si292 细胞的浸润能力与对照细胞相比虽然有所下降但效果不十分明显, 这表明 PrP^C 对于细胞的浸润能力的影响存在剂量依赖性, 即随着 PrP^C 的增

多, 癌细胞浸润能力会增强(图 5)。

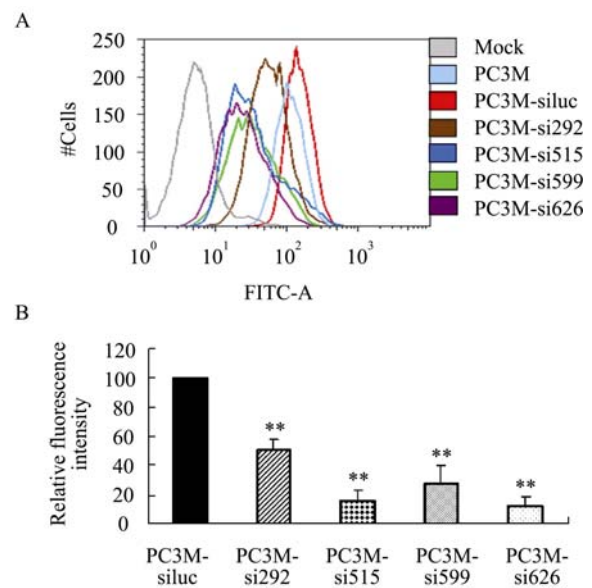


图 4 细胞膜表面 PrP^C 的流式检测
Fig. 4 Flowcytometry analysis of PrP^C expression on cell surface. (A) The image of flowcytometry analysis. (B) Quantification of three independent flowcytometry analysis assays.

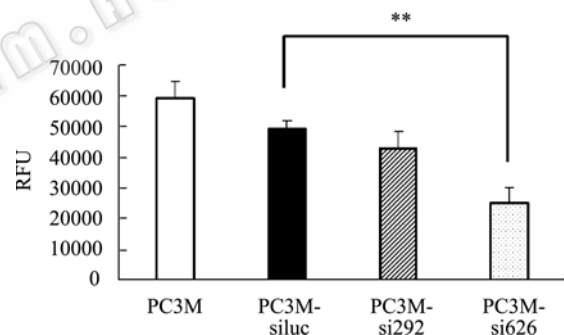


图 5 PrP^C 对前列腺癌细胞浸润能力的影响
Fig. 5 Influence of PrP^C on prostate cancer cell invasive ability. RFU represents relative fluorescence unit.

3 讨论

朊病毒是致死性可传染海绵状脑病的致病因子, 对该类疾病的治疗目前还没有有效的治愈方法。疯牛病即为该疾病中的一种, 目前认为可通过食物链进行跨种间传播, 在人群中造成 vCJD 的发生, 严重影响着人类的健康。朊病毒感染因子(PrP^{Sc})的同分异构体 PrP^C 为正常的糖蛋白, 这种蛋白表达于哺乳动物中, 并在脑部具有高的表达丰度。虽然该蛋白在脑中大量表达的作用不十分清楚, 但是已有研究表明其是朊病毒疾病的产生不可缺少的成分, 因此

细胞型朊病毒蛋白在一定程度上促进了朊病毒疾病病程的发展。并且, 在家畜的朊病毒疾病的研究中, 已证明通过 RNA 干扰技术可以有效延缓朊病毒疾病的进程, 延长患病动物的寿命^[13,14,18]。

近年来, 对朊病毒蛋白的研究已从朊病毒疾病的研究逐渐扩展到了对其在细胞中正常生理功能。一些研究发现 PrP^C 在胃癌与其他一些癌症细胞中具有高的表达丰度^[6,19,20], 并且 PrP^C 参与了胃癌细胞系的浸润和转移以及多药物抗性^[7,19], PrP^C 可以抑制乳腺癌及胃癌细胞系的细胞凋亡^[4,19], 在对乳腺癌的研究中发现干扰 PrP^C 在乳腺癌细胞系中的正常表达使这些细胞对于 TRAIL 介导的细胞凋亡更加敏感^[5]。

利用 RNAi 技术进行 PrP^C 表达的抑制, 将会对朊病毒疾病及 PrP^C 表达相关的癌症治疗起到一定的辅助作用。在此研究中, 选择了针对 HuPrP^C 基因 PRNP cDNA 的 4 种 siRNA 靶向序列, 并从中筛选出了 3 种能被相应 siRNA 高效抑制的 HuPrP^C 靶向序列, si515(5'-GAACTTTGTGCACGAC-3')、si599(5'-GACCGACGTTAAGATGATG-3')和 si626(5'-GGTTGAGCAGATGTGTATC-3'), 尤以 si626 抑制效果最为明显, 其对 HuPrP^C 表达的抑制可达 85% 以上。进而, 本研究利用构建的 PrP^C 稳定干扰细胞系对前列腺癌细胞浸润能力进行了研究, 结果发现 PrP^C 被抑制后能够显著降低前列腺癌细胞的浸润性。同时试验发现, 利用逆转录病毒载体系统可高效稳定地将 siRNA 递送给靶序列, 对目的基因表达进行持续稳定地抑制, 故利用该载体系统进行 siRNA 的递送将能为 PrP^C 相关癌症的治疗提供新的辅助治疗手段。

REFERENCES

- [1] Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(23): 13363–13383.
- [2] Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, *et al.* Prion protein biology. *Cell*, 1998, **93**(3): 337–348.
- [3] Bueler H, Fischer M, Lang Y, *et al.* Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, 1992, **356**(6370): 577–582.
- [4] Liang J, Pan YL, Ning XX, *et al.* Overexpression of PrP^C and its antiapoptosis function in gastric cancer. *Tumour Biol*, 2006, **27**(2): 84–91.
- [5] Meslin F, Hamai A, Gao P, *et al.* Silencing of prion protein sensitizes breast adriamycin-resistant carcinoma cells to TRAIL-mediated cell death. *Cancer Res*, 2007, **67**(22): 10910–10919.
- [6] Diarra-Mehrpour M, Arrabal S, Jalil A, *et al.* Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Cancer Res*, 2004, **64**(2): 719–727.
- [7] Pan, YL, Zhao LN, Liang J, *et al.* Cellular prion protein promotes invasion and metastasis of gastric cancer. *FASEB J*, 2006, **20**(11): 1886–1888.
- [8] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, **411**(6836): 494–498.
- [9] Fire A. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet*, 1999, **15**(9): 358–363.
- [10] Singer O, Marr RA, Rockenstein, *et al.* Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci*, 2005, **8**(10): 343–349.
- [11] Xia HB, Mao QW, Eliason SL, *et al.* RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med*, 2004, **10**(8): 816–820.
- [12] Harper SQ, Staber PD, He XH, *et al.* RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(16): 5820–5825.
- [13] Sutou S, Kunishi M, Kudo T, *et al.* Knockdown of the bovine prion gene PRNP by RNA interference (RNAi) technology. *BMC Biotechnol*, 2007, **7**: 44.
- [14] Golding MC, Long CR, Carmell MA, *et al.* Suppression of prion protein in livestock by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(14): 5285–5290.
- [15] Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, *et al.* Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, 2002, **16**(8): 948–958.
- [16] Lee NS, Dohjima T, Bauer G, *et al.* Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(5): 500–505.
- [17] Sui G, Soohoo C, Affarel B, *et al.* A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(8): 5515–5520.
- [18] Pfeifer A, Eigenbrod S, Al-Khadra S, *et al.* Lentivector-mediated RNAi efficiently suppresses prion protein and prolongs survival of scrapie-infected mice. *J Clin Invest*, 2006, **116**(12): 3204–3210.
- [19] Du JP, Pan YL, Shi YQ, *et al.* Overexpression and significance of prion protein in gastric cancer and multidrug-resistant gastric carcinoma cell line SGC7901/ADR. *Int J Canc*, 2005, **113**(2): 213–220.
- [20] Sauer H, Dagdanova A, Hescheler J, *et al.* Redox-regulation of intrinsic prion expression in multicellular prostate tumor spheroids. *Free Radic Biol Med*, 1999, **27**(11-12): 1276–1283.