

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.002

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.002

## O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶 siRNA 联合替莫唑胺对黑素瘤细胞增殖的影响

孙金中<sup>1</sup>, 黄倩<sup>2</sup>, 辛勇<sup>2</sup>, 蒋冠<sup>3</sup>, 孙圣荣<sup>1</sup>

(1. 武汉大学人民医院乳腺甲状腺外科, 武汉 430060; 2. 徐州医科大学附属医院放疗科, 江苏 徐州 221002;  
3. 徐州医科大学附属医院皮肤科, 江苏 徐州 221002)

**[摘要]** 目的: 研究O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)对人黑素瘤细胞耐替莫唑胺(temozolomide, TMZ)的影响及机制。方法: 体外培养人黑素瘤A375细胞、M14细胞、MV3细胞, 采用RT-qPCR及蛋白质印迹法检测细胞MGMT的表达量; CCK-8法检测细胞的增殖抑制率; 蛋白质印迹法检测不同干扰序列对黑素瘤细胞MGMT的干扰效果; 蛋白质印迹法检测细胞内PARP, DNA-PKcs和NF-κB蛋白表达。结果: RT-PCR及蛋白质印迹法结果显示不同黑素瘤细胞MGMT表达量不同, 其中A375细胞MGMT表达量最高, MV3细胞的表达量最少; 蛋白质印迹法结果显示转染MGMT siRNA后黑素瘤细胞MGMT表达量明显下降(P<0.05); CCK-8结果显示TMZ对A375细胞及M14细胞的生长增殖有抑制作用, 并且这种作用呈时间和剂量依赖性(P<0.05); 蛋白质印迹法结果可见MGMT siRNA联合TMZ处理组PARP, DNA-PKcs, NF-κB蛋白表达减弱(P<0.05)。结论: MGMT siRNA联合TMZ显著抑制黑素瘤A375和M14细胞增殖。

**[关键词]** 替莫唑胺; 黑素瘤; 细胞耐药; O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶

## Effect of MGMT siRNA combined with temozolomide on the proliferation of melanoma cells

SUN Jinzhong<sup>1</sup>, HUANG Qian<sup>2</sup>, XIN Yong<sup>2</sup>, JIANG Guan<sup>3</sup>, SUN Shengrong<sup>1</sup>

(1. Department of Breast and Thyroid Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060;  
2. Department of Radiation Oncology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou Jiangsu 221002;  
3. Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou Jiangsu 221002, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the effect of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) on the melanoma cells to resist to temozolomide (TMZ). **Methods:** Human melanoma A375 cells, M14 cells, MV3 cells were cultured in vitro. The expression of MGMT in cells was detected by RT-qPCR and Western blotting. Temozolomide on cell proliferation was analyzed by the CCK-8 method. The interference effect of different interference sequences of MGMT on melanoma cell line was detected by Western blot. The expression of PARP, DNA-Pkcs and NF-κB was detected by Western blotting. **Results:** The results of RT-PCR and Western Blot showed that the expression

收稿日期 (Date of reception): 2019-05-26

通信作者 (Corresponding author): 辛勇, Email: 5721268@163.com

of MGMT was different in different melanoma cells. Western blot results showed that the expression of MGMT in melanoma cells decreased after transfecting with MGMT siRNA ( $P<0.05$ ); temozolomide inhibited the growth and proliferation of A375 cells and M14 cells significantly through CCK-8 assays, and this effect was time and dose-dependent ( $P<0.05$ ). Western blot showed that the expression of PARP, NF- $\kappa$ B and DNA-PKcs protein was decreased ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Temozolomide inhibits the proliferation of A375 cells and M14 cells, and MGMT siRNA combined with temozolomide significantly inhibits the proliferation of melanoma A375 cells and M14 cells.

**Keywords** temozolomide; melanoma; drug resistance; O<sup>6</sup>-methylguananine-DNA methyltransferase

恶性黑色素瘤(malignant melanoma)起源于黑色素细胞,侵袭性较强<sup>[1]</sup>,生存率极低<sup>[2-3]</sup>。近年来恶性黑色素瘤发病率、病死率增长迅速,且有年轻化的趋势<sup>[4]</sup>,成为现阶段国内外皮肤肿瘤研究的热点<sup>[5]</sup>。

黑色素瘤的治疗手段主要包括手术治疗、放疗、化疗和靶向治疗。手术治疗仅限于早期局限性黑色素瘤<sup>[6-7]</sup>。近年来,靶向治疗在黑色素瘤的治疗上取得了重大进展。2011年美国FDA批准了ipilimumab(Ipi,抗CTLA4单抗)上市,初步奠定了靶向治疗在晚期黑色素瘤中的地位<sup>[8]</sup>。但是,靶向新药在中国未上市,且费用不菲。因此,现阶段化疗仍是中国黑色素瘤患者重要的治疗手段,常用化疗药物有达卡巴嗪(dacarbazine, DTIC)、替莫唑胺(temozolomide, TMZ)、铂类、长春花碱、紫杉醇、福莫司汀等。TMZ作为一种新型烷化剂被很多国家推荐用于恶性黑色素瘤一线治疗<sup>[9-10]</sup>,原因是其能透过血脑屏障,有较高的生物利用度,对脑转移有治疗和预防作用。

TMZ导致肿瘤细胞死亡主要是通过DNA链甲基化,引起DNA单链或双链断裂,阻断DNA复制<sup>[11]</sup>。甲基化主要发生在鸟嘌呤的N<sup>7</sup>位、O<sup>6</sup>位以及腺嘌呤的N<sup>3</sup>位,其中鸟嘌呤O<sup>6</sup>甲基化是导致细胞损伤的重要原因。已有研究<sup>[12]</sup>证实O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O<sup>6</sup>-methylguananine-DNA methyltransferase, MGMT)是一种重要的DNA损伤修复蛋白,与肿瘤细胞对烷化剂耐药密切相关。RNA干扰(RNA interference)是一种高效、特异性的基因沉默机制<sup>[13]</sup>,阻断体内特定基因的表达,促使mRNA降解,诱使细胞表现出特定基因缺失的表型的过程,导致靶基因功能缺失从而达到

疾病治疗或预防的目的<sup>[14-15]</sup>,而对细胞本身的调控系统无影响。RNA干扰已经被广泛应用于治疗各类疾病<sup>[16-17]</sup>。

本研究拟通过RNA干扰技术使靶基因MGMT功能缺失,将通过检测凋亡相关蛋白PARP、NF- $\kappa$ B及DNA-PKcs观察TMZ对正常黑色素瘤和干扰MGMT后黑色素瘤的增殖和凋亡的影响,为其在黑色素瘤的治疗提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

黑色素瘤细胞株A375, MV3, M14由本实验室保存,BCA蛋白定量试剂盒购于美国Novagen公司,CCK-8检测试剂盒、DAPI和NF- $\kappa$ B一抗、核蛋白提取试剂盒购于南京凯基公司,DNA-PKcs一抗,PARP一抗购于南京Bioworld公司,替莫唑胺购于上海梯希爱公司,Glycine、丙烯酰胺单体、丙烯酰胺双体购于加拿大BIO BASIC公司,RNA提取试剂(TRIzol)购于美国Invitrogen公司。

### 1.2 MGMT siRNA 分子的设计与合成

在GenBank中获得MGMT基因全长mRNA序列,用Sirna mode of Sfold软件(<http://sfold.wadsworth.org/sirna.pl>)及Ambion公司网站的siRNA target finder进行siRNA的设计及RNA二级结构的预测。通过Blast挑选长为21个碱基的特异性寡核苷酸序列(5'-CAAGGAUUGUGAAAUGAAATT-UUUCAUUUCACAAUCCUUGTT-3'为3对中有效的1对),表1为设计的3个序列。

表1 MGMT siRNA干扰序列

Table 1 Interference sequences of MGMT siRNA

序列名称	正向引物	反向引物
MGMT siRNA1(22856)	GGAGAAGUGAUUUCUACCTT	GGUAAGAAAUCACUUCUCCTT
MGMT siRNA2(60890)	AUGGCUUCUGGCCAUGAATT	UUCAUGGGCCAGAAGCCAUTT
MGMT siRNA3(23084)	CAAGGAUUGUGAAAUGAAATT	UUUCAUUUCACAAUCCUUGIT

### 1.3 细胞培养及 siRNA 转染

将A375, M14, MV3黑素瘤细胞株用含10%胎牛血清的DMEM培养液于37℃和5%CO<sub>2</sub>条件下培养。转染前1 d, 将对数生长期的细胞以1×10<sup>5</sup>个/孔接种于24孔板上, 待细胞处于50%~70%融合时进行转染。根据lipofectamine™ 2000转染试剂手册进行操作, 每空加入用无双抗及血清的培养基稀释的1.5μg siRNA分子和2 μL lipofectamine™ 2000转染试剂。

### 1.4 RT-PCR 法检测 MGMT mRNA 表达的情况

将A375, M14, MV3细胞低密度铺于6孔板, 48 h后提取总RNA, MGMT引物序列为: 正向5'-GGCTGAATGCCTATTTCCACCA-3', 反向5'-TGTCGCTCAAACATCCATCCTACT-3'; β-actin作为内参对照, β-actin引物序列为: 正向5'-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3', 反向5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'。每组均设3个复孔。反应条件: 95℃ 5 min; 95℃ 10 s, 60℃ 34 s 40个循环, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。

### 1.5 CCK-8 法测定细胞增殖率

将A375, M14细胞计数后, 调整细胞密度为3×10<sup>4</sup>个/mL, 每孔接种100 μL于96孔板。24 h后, 加入浓度梯度为50, 100, 200, 400, 800 μmol/L的TMZ, 每组每一浓度平行设6个复孔, 总体积为100 μL/孔。另设不含细胞的空白对照组和含细胞不加药的阴性对照组。培养12, 24, 48, 72 h后, 每孔加入10 μL CCK-8, 继续培养2 h, 震荡5 min后, 450 nm波长下测定A值, 计算抑制率[抑制率=1 - 实验组A值/对照组A值×100%]。

### 1.6 蛋白质印迹法

利用蛋白质印迹法技术检测A375细胞、M14细胞、MV3细胞中MGMT的表达。利用蛋白质印迹法技术检测MGMT siRNA组、TMZ组和MGMT siRNA+TMZ组中PARP, DNA-PKcs和NF-κB蛋白表达。快速制备法提取总蛋白, 经电泳、转膜后杂交, 一抗为兔抗人单抗, 二抗为碱性磷酸酶偶联羊抗兔多抗, 以NBT/BCIP显色, 结果拍照。

### 1.7 统计学处理

采用SPSS 16.0统计软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差( $\bar{x}±s$ )表示。两组间比较采用 $t$

检验, 多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞 MGMT 表达量分析

RT-PCR结果示A375细胞中MGMT的相对表达量最高, MV3细胞中MGMT的相对表达量最低(图1); 蛋白质印迹法结果与RT-PCR检测结果一致(图2)。为使实验后期干扰效果更显著, 选择MGMT的相对表达量较高的两株细胞A375和M14作为后面实验的研究对象。

### 2.2 蛋白质印迹法筛选有效干扰序列

将MGMT siRNA1, MGMT siRNA2, MGMT siRNA3干扰序列瞬时转染到生长活跃的A375细胞和M14细胞内48 h后提取蛋白, 用蛋白质印迹法检测示MGMT siRNA3干扰效果最好, 与对照组之间的差异有统计学意义( $P<0.01$ , 图3), 选定MGMT siRNA3为有效的干扰序列。

### 2.3 CCK-8 检测结果

对照组细胞体外生长活跃, 经50, 100, 200, 400, 800 μmol/L的TMZ处理12, 24, 48, 72 h, 细胞生长均不同程度地减慢, 随浓度的升高, 细胞抑制率呈不同程度的增加; 随TMZ作用时间延长, 细胞抑制率亦在增加, 48 h达高峰, 72 h渐平缓, 与对照组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ,  $n=3$ , 表2, 表3)。

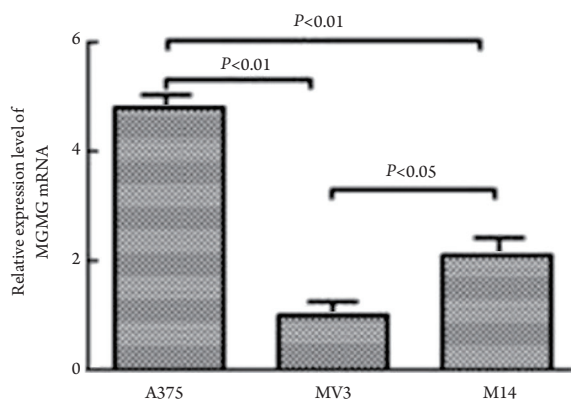


图1 RT-PCR检测A375, MV3, M14细胞株MGMT的相对表达量

Figure 1 Relative expression of MGMT (A375, MV3, M14) detected by RT-PCR

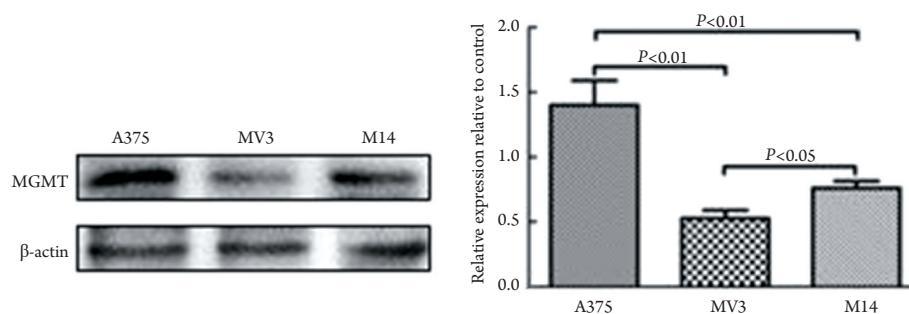


图2 蛋白质印迹法检测A375, MV3, M14细胞株MGMT的相对表达量

Figure 2 Relative expression of MGMT (A375, MV3, M14) detected by Western blotting

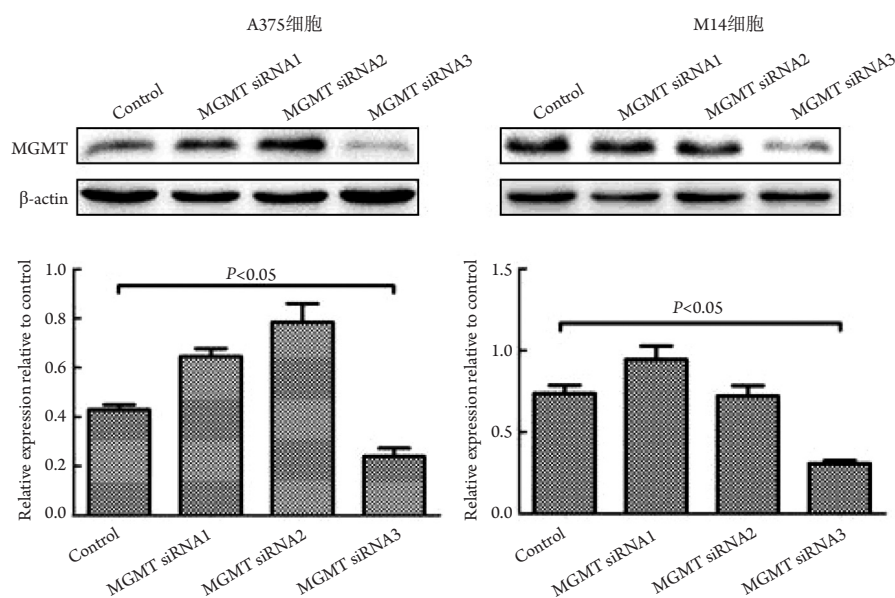


图3 蛋白质印迹法实验检测干扰序列结果

Figure 3 Relative expression of different interference sequences of MGMT (A375, M14) detected by Western blotting

127

131

128 表2 CCK-8检测不同时间点和不同浓度TMZ对A375细胞增殖影响( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

132

129 Table 2 Effect of different time points and different concentrations of TMZ on proliferation of A375 cell line by CCK-8 assay ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

133

130

134

组别	抑制率/%			
	12 h	24 h	48 h	72 h
Control组	0	0	0	0
50 $\mu\text{mol/L}$ 组	4.99 $\pm$ 2.89	14.17 $\pm$ 3.17	22.16 $\pm$ 2.79	31.48 $\pm$ 5.03
100 $\mu\text{mol/L}$ 组	11.37 $\pm$ 3.57	20.33 $\pm$ 4.92	32.55 $\pm$ 4.74	43.94 $\pm$ 4.48
200 $\mu\text{mol/L}$ 组	21.33 $\pm$ 3.89	34.80 $\pm$ 4.72	54.03 $\pm$ 3.69	61.97 $\pm$ 4.56
400 $\mu\text{mol/L}$ 组	33.73 $\pm$ 3.32	47.61 $\pm$ 4.14	60.91 $\pm$ 4.99	77.59 $\pm$ 5.09
800 $\mu\text{mol/L}$ 组	45.12 $\pm$ 4.60	65.33 $\pm$ 4.72	89.26 $\pm$ 2.30*	93.39 $\pm$ 2.99*

与对照组比较, \* $P<0.05$ 。

Compared with the control group, \* $P<0.05$ .



表3 CCK-8检测不同时间点和不同浓度TMZ对M14细胞增殖影响( $n=3, \bar{x} \pm s$ )Table 3 Effect of different time points and different concentrations of TMZ on proliferation of M14 cell line by CCK-8 assay ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	抑制率/%			
	12 h	24 h	48 h	72 h
Control组	0	0	0	0
50 $\mu\text{mol/L}$ 组	8.45 $\pm$ 2.34	18.82 $\pm$ 3.84	24.42 $\pm$ 4.47	33.93 $\pm$ 3.60
100 $\mu\text{mol/L}$ 组	13.53 $\pm$ 2.87	26.81 $\pm$ 2.38	35.01 $\pm$ 4.34	41.79 $\pm$ 2.92
200 $\mu\text{mol/L}$ 组	30.44 $\pm$ 2.60	40.88 $\pm$ 4.03	60.77 $\pm$ 3.57	71.34 $\pm$ 5.48
400 $\mu\text{mol/L}$ 组	44.77 $\pm$ 4.72	56.66 $\pm$ 6.48	75.51 $\pm$ 4.87	87.23 $\pm$ 5.37
800 $\mu\text{mol/L}$ 组	60.75 $\pm$ 3.69	85.22 $\pm$ 4.46	93.64 $\pm$ 2.43*	93.44 $\pm$ 3.08*

与对照组比较, \* $P<0.05$ 。

Compared with the control group, \* $P<0.05$ .

#### 2.4 PARP, NF- $\kappa$ B, DNA-PKcs 蛋白表达比较

综合干扰处理时间及CCK-8实验结果, 在MGMT siRNA瞬时转染黑色素瘤细胞24 h后, 予400  $\mu\text{mol/L}$  TMZ处理细胞24 h后提取蛋白, 蛋白质印

迹法方法检测与凋亡相关蛋白的表达, 发现MGMT siRNA联合TMZ处理组PARP, NF- $\kappa$ B蛋白表达较单纯TMZ组减弱, DNA-PKcs蛋白表达较单纯TMZ组增强(图4为A375细胞株、图5为M14细胞株,  $P<0.05$ )。

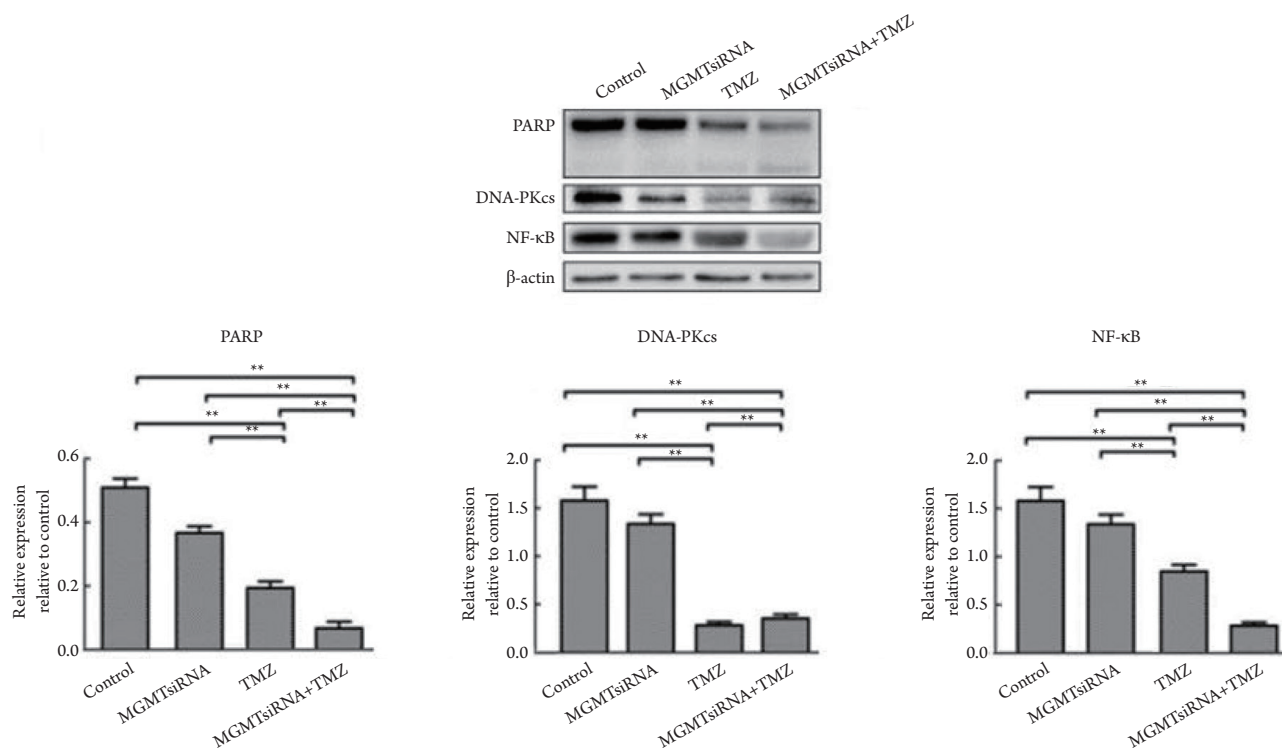


图4 蛋白质印迹法检测control组、MGMT siRNA组、TMZ组和MGMT siRNA+TMZ组处理A375细胞株48 h后, PARP, DNA-PKcs和NF- $\kappa$ B(\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ,  $n=3$ )

Figure 4 Relative expression of PARP, DNA-PKcs and NF- $\kappa$ B after treatment of A375 cell line for 48h in control group, MGMT siRNA group, TMZ group and MGMT siRNA + TMZ group detected by Western blotting (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ,  $n=3$ )

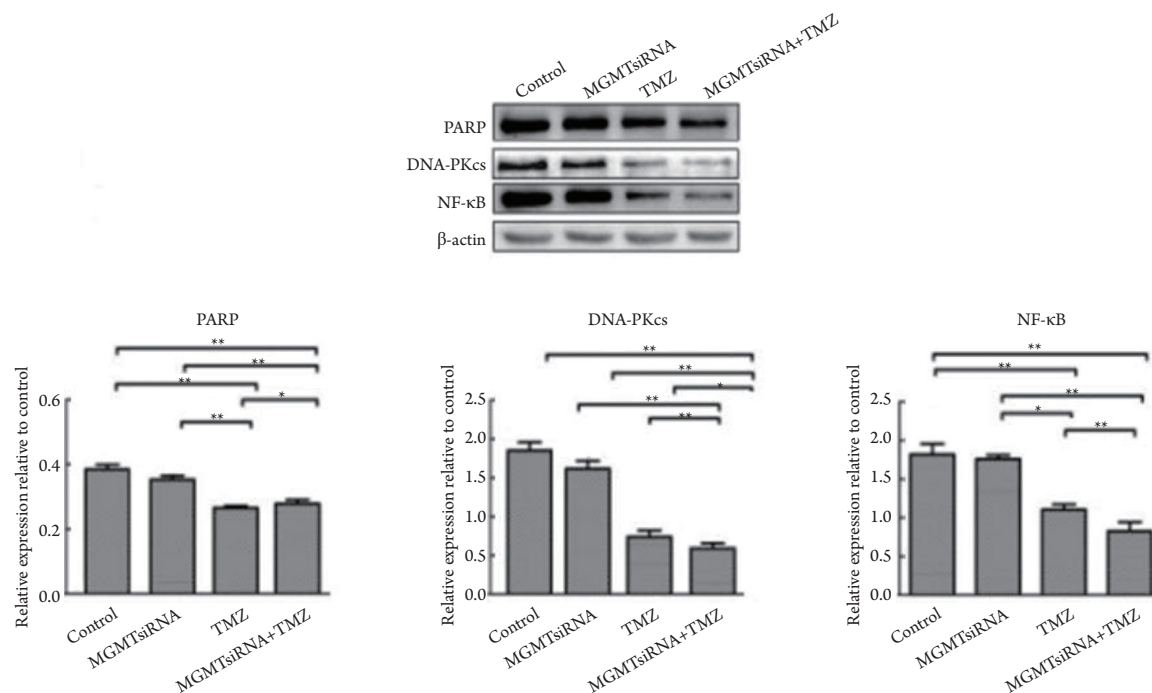


图5 蛋白质印迹法检测control组、MGMTsiRNA组、TMZ组和MGMT siRNA + TMZ组处理M14细胞株48 h后, PARP, DNA-PKcs和NF-κB(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 3$ )

Figure 5 Relative expression of PARP, DNA-PKcs and NF-κB after treatment of M14 cell line for 48 h in control group, MGMT siRNA group, TMZ group and MGMT siRNA + TMZ group detected by Western blotting (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 3$ )

### 3 讨论

烷化剂TMZ是黑色素瘤化疗常用的一种药物, O<sup>6</sup>MeG是其主要的加合物, 它能造成碱基的错误配对, 导致细胞分裂、增殖停止或死亡<sup>[18]</sup>。然而, TMZ会通过上调MGMT表达来启动细胞内修复。MGMT通过自身活性中心的半胱氨酸残基与O<sup>6</sup>MeG上的烷基基团共价结合并将其移除, 这是TMZ产生耐药的主要原因<sup>[19]</sup>。因此, 抑制MGMT可以有效避免其对TMZ等烷化剂诱导的肿瘤细胞损伤的修复, 这将为解决黑色素瘤的耐药提供新思路。

利用RNA干扰特异性剔除或关闭特定基因表达来研究其在肿瘤治疗中的应用是目前的研究热点。倪洪早等<sup>[20]</sup>成功构建LASP-1-siRNA, 发现干扰LASP-1基因通过p-FAK-Src信号通路, 抑制MMP-2和MMP-9蛋白表达, 从而抑制胶质瘤细胞的黏附、迁移和侵袭能力。Fang等<sup>[21]</sup>研究发现携带Ki67 shRNA和hTERT shRNA干扰的腺病毒, 显著抑制hTERT和Ki67表达, 对肾癌细胞的杀伤作用较强。鉴于此, 提出利用RNA干扰抑制MGMT的表达可以提高TMZ对黑色素瘤的疗效。

本实验研究MGMT siRNA对MGMT基因表达的抑制作用, 利用lipofectamine<sup>TM</sup>2000转染黑色素

瘤细胞, 将siRNA转入黑色素瘤细胞内, 利用蛋白质印迹法检测siRNA对MGMT表达的抑制作用。结果表明: 将针对MGMT的siRNA分子导入黑色素瘤细胞后, 其有效干扰MGMT蛋白表达, 而细胞转染MGMT siRNA后对TMZ的敏感性也有提高。

体内外研究<sup>[22]</sup>表明抑制PARP-1可降低DNA修复功能, 增强放疗和化疗对肿瘤的治疗效果。PARP-1可能通过紧密结合到双链断裂与DNA依赖蛋白激酶(DNA-PKcs)相互作用。DNA-PKcs是DNA损伤修复的关键酶, 可以高效修复DNA损伤, 从而抑制肿瘤细胞凋亡<sup>[23]</sup>。研究<sup>[24]</sup>发现NF-κB相关信号转导通路在黑色素瘤的演变进程及其在黑色素瘤化疗耐受中也发挥重要作用。本研究中蛋白质印迹法证实: MGMT siRNA联合TMZ组相比单独MGMT siRNA组和单独TMZ组, PARP, NF-κB蛋白表达较单纯TMZ组减弱, DNA-PKcs蛋白表达较单独MGMT siRNA组和单独TMZ组减弱。

本研究发现MGMT siRNA可以通过抑制MGMT和PARP两条DNA修复信号通路, 下调NF-κB, DNA-PKcs蛋白表达, 从而提高TMZ对黑色素瘤细胞的抗增殖和促凋亡效应。如何解决恶性黑色素瘤疗效欠佳、易于产生化疗耐受这一问题一直是其治疗研究热点, 本研究为临床上逆转黑色素

患者对TMZ药物的耐药、提高TMZ药物的抗癌效果提供了一条新的思路。

## 参考文献

- Pautu V, Leonetti D, Lepeltier E, et al. Nanomedicine as a potent strategy in melanoma tumor microenvironment[J]. *Pharmacol Res*, 2017, 126: 31-53.
- Das Thakur M, Salangsang F, Landman AS, et al. Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance[J]. *Nature*, 2013, 494(7436): 251-255.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2007[J]. *CA Cancer J Clin*, 2007, 57(1): 43-66.
- Rigon RB, Oyafuso MH, Fujimura AT, et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for melanoma antitumoral therapy: a review[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 841-817.
- Swick JM, Maize JC Sr. Molecular biology of melanoma[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2012, 67(5): 1049-1054.
- Foote M, Read T, Thomas J, et al. Results of a phase II, open-label, non-comparative study of intralesional PV-10 followed by radiotherapy for the treatment of in-transit or metastatic melanoma[J]. *J Surg Oncol*, 2017, 115(7): 891-897.
- Das Thakur M, Salangsang F, Landman AS, et al. Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance[J]. *Nature*, 2013, 494(7436): 251-255.
- Luke JJ, Schwartz GK. Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma[J]. *Clin Dermatol*, 2013, 31(3): 290-297.
- Gogas HJ, Kirkwood JM, Sondak VK. Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change?[J]. *Cancer*, 2007, 109(3): 455-464.
- Biasco G, Pantaleo MA, Casadei S. Treatment of brain metastases of malignant melanoma with temozolomide[J]. *N Engl J Med*, 2001, 345(8): 621-622.
- Johannessen TC, Bjerkvig R. Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2012, 12(5): 635-642.
- Kitange GJ, Carlson BL, Schroeder MA, et al. Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts[J]. *Neuro Oncol*, 2009, 11(3): 281-291.
- Hannon GJ. RNA interference[J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 244-251.
- 曾涛, 温剑虎, 王继相. RNA干扰技术靶向c-Myc基因抑制胃癌SGC7901细胞的体内外影响[J]. *中华实验外科*, 2019, 36(3): 424-426.
- ZENG Tao, WEN Jianhu, WANG Jixiang. In vitro and in vivo effects of RNA interference targeting c-Myc gene on gastric cancer SGC7901 cells[J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2019, 36(3): 424-426.
- 蒋帅, 胡少勃, 程翔, 等. 沉默p21活化激酶1对肝癌细胞的影响及其机制[J]. *中华实验外科*, 2018, 35(12): 2250-2252.
- JIANG Shuai, HU Shaobo, CHENG Xiang, et al. The effect and mechanism of silencing p21-activated kinases 1 by small interference RNA on hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2018, 35(12): 2250-2252.
- Ghafouri-Fard S, Ghafouri-Fard S. siRNA and cancer immunotherapy[J]. *Immunotherapy*, 2012, 4(9): 907-917.
- Gavrilov K, Saltzman WM. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies[J]. *Yale J Biol Med*, 2012, 85(2): 187-200.
- Jiang G, Li R, Tang J, et al. Formulation of temozolomide-loaded nanoparticles and their targeting potential to melanoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(2): 995-1001.
- Happold C, Stojcheva N, Silginer M, et al. Transcriptional control of O6-methylguanine DNA methyltransferase expression and temozolomide resistance in glioblastoma[J]. *J Neurochem*, 2018, 144(6): 780-790.
- 倪洪早, 张芸, 崔晨晨, 等. 沉默LASP-1对人胶质瘤细胞的黏附、迁移和侵袭能力的影响及其机制要点[J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33(4): 986-988.
- NI Hongzao, ZHANG Yun, CUI Chenchen, et al. Effect and mechanism of LIM and SH3 protein 1 on adhesion, migration and invasion of human glioma cells[J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2016, 33(4): 986-988.
- Fang L, Cheng Q, Li W, et al. Antitumor activities of an oncolytic adenovirus equipped with a double siRNA targeting Ki67 and hTERT in renal cancer cells[J]. *Virus Res*, 2014, 181: 61-71.
- Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, et al. PARP inhibition: PARP1 and beyond[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(4): 293-301.
- Wang Y, Sun H, Wang J, et al. DNA-PK-mediated phosphorylation of EZH2 regulates the DNA damage-induced apoptosis to maintain T-cell genomic integrity[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(7): e2316.
- Godwin P, Baird AM, Heavey S, et al. Targeting nuclear factor-kappa B to overcome resistance to chemotherapy[J]. *Front Oncol*, 2013, 3: 120.

本文引用: 孙金中, 黄倩, 辛勇, 蒋冠, 孙圣荣. O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶siRNA联合替莫唑胺对黑素瘤细胞增殖的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(7): 1632-1638. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.002

Cite this article as: SUN Jinzhong, HUANG Qian, XIN Yong, JIANG Guan, SUN Shengrong. Effect of MGMT siRNA combined with temozolomide on the proliferation of melanoma cells[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(7): 1632-1638. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.07.002