

磷硫代 siRNA 的 YAP 基因沉默活性研究

唐 硕, 黄 震

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

摘 要: 为了探究 RNA 聚合酶酶促合成非对映体纯 PS-siRNA (pPS-siRNA) 的基因沉默活性, 本研究针对潜在的癌症治疗靶点 Yes 相关蛋白 (YAP), 通过 qPCR、Western blot 等方法研究了其对 YAP 基因的沉默效果和对 HeLa 细胞的细胞毒性. 结果表明, 与未修饰的 siRNA (PO-siRNA) 相比, pPS-siRNA 可以更好地下调 YAP 基因表达 (效率提高约 30%), 而没有明显的细胞毒性. 此外, MTT 细胞增殖实验与流式细胞术的结果表明, 经 pPS-siRNA 敲降 YAP 后, HeLa 细胞的增殖受到了抑制. 说明 pPS-siRNA 在基因治疗方面具有优越性以及 YAP 作为肿瘤治疗靶点的潜力.

关键词: 核酸硫代磷酸酯修饰; 酶促合成 PS-siRNA; T7 RNA 聚合酶体外转录; 非对映体纯; YAP 基因表达; RNA 干扰功效

中图分类号: Q52 文献标识码: A DOI: 10.19907/j.0490-6756.2021.056004

Study on YAP gene silencing activity of phosphorothioate siRNAs

TANG Shuo, HUANG Zhen

(Key Laboratory Bio-resources and Eco-environment of Ministry Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: In order to explore the gene silencing activity of diastereomeric pure PS-siRNA (pPS-siRNA) synthesized enzymatically by RNA polymerase, its silencing activity on Yes-associated protein (YAP), a potential cancer treatment target, and cytotoxicity to HeLa cells were studied by qPCR and Western blot in this study. The data showed that compared with unmodified siRNAs (PO-siRNAs), pPS-siRNAs can better reduce YAP gene expression without significant cytotoxicity (approximately 30% more efficient). In addition, MTT cell proliferation assay and flow cytometry showed that the proliferation of HeLa cells was inhibited after YAP down-regulated by the pPS-siRNAs. This research proved the superiority of pPS-siRNAs in gene therapy and the potential of YAP as a tumor therapeutic target.

Keywords: Nucleic acid phosphorothioate modification; Enzymatically synthesized PS-siRNA; T7 RNA polymerase transcription; Diastereomer purity; YAP gene expression; RNA interference efficacy

1 引 言

Yes 相关蛋白 (YAP) 位于基因座 11q22, 是 Hippo 途径的主要效应子, 通过与靶基因相互作用

来调节细胞增殖和凋亡^[1-2]. 作为转录共激活因子, YAP 在信号传导中起着复杂的作用. 通常, YAP 被认为是一种原癌基因, YAP 的上调会导致未转化的乳腺上皮细胞从上皮向间充质过渡, 异常增殖

收稿日期: 2020-11-21

基金项目: 国家自然科学基金(21761132029); 中央大学基础研究基金(2016—2020)

作者简介: 唐硕(1992—), 男, 山西太原人, 硕士研究生, 研究方向为核酸分子生物学. E-mail: shuotang2710@163.com

通讯作者: 黄震. E-mail: huang@senaresearch.org

并抑制细胞凋亡^[3]. 此外,在大多数肿瘤细胞中,尤其是在卵巢癌,胃癌和肝细胞癌中,都观察到了 YAP 过表达^[4-7]. 但是,YAP 还可以在散发性乳腺癌中起抑癌作用,其中已证明 YAP 可以正向调节 p53 家族成员^[8]. 这些使 YAP 在肿瘤治疗领域具有一定的研究价值.

RNA 干扰(RNAi)技术在临床治疗中具有巨大的潜力,其中小干扰 RNA(siRNA)是进行基因功能研究的有效工具^[9-11]. 但是,未修饰的 siRNA 仍有一些缺陷,例如低效率、在循环系统中的快速清除等^[12]. 为了改善 siRNA 的药代动力学特性,人们采用了各种化学修饰方法,如 2'-OMe,2'-F 和通过硫代磷酸酯(PS)取代的磷酸二酯键修饰等^[13-17]. PS 修饰是较成熟的方法,作为一种硫原子的单原子取代,其对 siRNA 结构的影响较小. 然而,PS-siRNA 的应用还面临一些问题,在一些报道中,化学合成的 PS-siRNA 表现出严重的细胞毒性以及较差的沉默活性^[11,18-20]. 这可能是由于 PS 中心具有手性(Rp 或 Sp)^[21],导致使用常规方法合成的 PS-siRNA 产物是一种非对映异构体混合物,其对 RNA 诱导沉默复合物(RISC)的加载效率较低^[22]. 不幸的是,固相化学合成尚无法获得纯非对映体 PS-siRNA(pPS-siRNA),相比之下,人们已开发出了 T7 RNA 聚合酶转录策略来合成 pPS-siRNA,此种方法得到的产物具备单一的 R 构型^[17,23-25]. 因此,尽管产量相对较低,酶促合成法制备的 pPS-siRNA 仍存在一定的研究价值^[26].

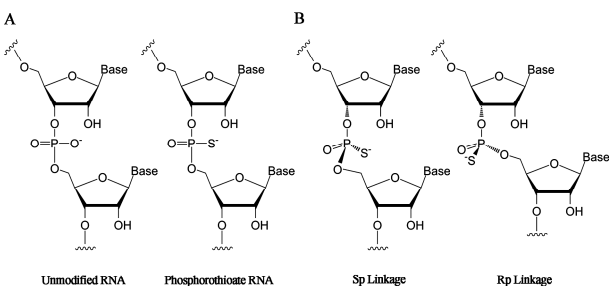


图 1 化学结构

(A)未修饰的 RNA 和硫代磷酸 RNA 的化学结构;(B)P-手性链接

Fig. 1 Chemical structures

(A) unmodified RNA and phosphorothioate RNA; (B) P-chiral Linkages

为了探索 YAP 基因对癌细胞生长的影响及磷硫代 siRNA 的应用潜力,本文比较了 pPS-siRNA 和未修饰的 siRNA(PO-siRNA)的基因沉默活性,研究了 YAP 在 HeLa 细胞系细胞周期和增殖中发挥的作用. 研究中使用的所有 siRNA 均来

自 T7 RNA 聚合酶体外酶促合成. 结果表明 pPS-siRNA 在抑制 YAP 基因表达时比 PO-siRNA 更有效,并且没有明显的细胞毒性. 此外,YAP 基因的下调一定程度上抑制了 HeLa 细胞的增殖,这提示了一种潜在的癌症治疗策略.

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 细胞株 宫颈癌细胞株 HeLa 购自于 ATCC 细胞库.

2.1.2 主要试剂 胎牛血清(FBS)购自于 Gibco 生物公司;高糖培养基 DMEM 和胰蛋白酶购自于 Hyclone 生物公司;cDNA 合成试剂盒和显影液(EasySee Western Blot Kit)购自全式金公司;RNA 提取试剂盒 Eastep® Super Total RNA Extraction Kit 购自于 promega 公司;Exfect® 2000 转染试剂购自于诺唯赞生物科技股份有限公司;qPCR 试剂购自于 Takara 生物公司;苯甲磺酰氟化物(PMSF)和 RIPA 裂解液均购自于索莱宝生物公司;脱脂奶粉,BSA,溴化麝香草酚蓝四氮唑(MTT)等均购自上海生工生物;兔单克隆 YAP 抗体和鼠单克隆 GAPDH 抗体分别购自于 Cell Signaling Technology 及 Proteintech 公司;二抗 HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)及 HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG(H+L)购自于 Proteintech 公司;细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒,Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天.

2.2 方法

2.2.1 细胞培养与转染 HeLa 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中. 该细胞培养在含 5% CO₂, 37 °C 的细胞孵箱中,每 2~3 d 传一次代,传代比例为 1 : 6. 使用 Exfect® 2000 转染试剂进行 siRNA 的转染,操作步骤依照相应说明书进行.

2.2.2 寡核苷酸的制备 靶向 YAP 的 siRNA 的序列已经在之前的文献中有过报道^[27],为 5'-GGTGATACTATCAACCAAA-TT-3'. 乱序 siRNA 的序列由本实验室自行设计,为 5'-TACAAATATCACGTAAGCTT-3'. 本研究中的所有 siRNA 均由 T7 RNA 聚合酶体外转录得到. 对于 PO-siRNA 的合成,于 EP 管中加入 2 μmol/L DNA 模板,15 U/μL T7 RNA 聚合酶,0.1 U/μL RNA 酶抑制剂,10 mmol/L NTPs 以及

转录缓冲液[1x 浓度: Hepes-KOH(12 mmol/L, pH 8. 5, MgCl₂(4. 6 mmol/L), 亚精胺(0. 2 mmol/L), BSA(0. 01 mg/mL)], 于 37 °C 水浴中孵育 6 h. 对于 pPS-siRNA 的合成, 使用的 NTPs 为 ATP_αS、UTP_αS、CTP_αS 及未修饰的 GTP, 其余与 PO-siRNA 相同. 最后, 酶促合成产物经凝胶纯化并由酶标仪定量.

2. 2. 3 血清稳定性实验 进行血清稳定性测定以确定酶促合成的 PO-和 pPS-siRNA 的稳定性. siRNA 溶液(双链 siRNA)均在 10% FBS 存在下于 37 °C 孵育, 随后在不同时间间隔(0、2、4、6 和 8 h)取样. 样品在液氮中急冻, 并储存在-80 °C 下. 最后, 通过 12. 5% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶分析实验结果.

2. 2. 4 qPCR 实验 转染 48 h 之后收取 HeLa 细胞, 并通过 Eastep[®] Super Total RNA Extraction Kit 提取总 RNA. 通过 TransScript[®] All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR kit 得到 cDNA. qPCR 引物如下: YAP 正向引物 5'-CCTGATGGATGGGAACAAGC-3', 反向引物 5'-GCACTCTGACTGATTCTCTGG-3'^[28]; GAPDH 正向引物 5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3', 反向引物 5'-GAAGGCTGGGGCT-CATTT-3'.

2. 2. 5 Western blot 实验 转染 48 h 后收取细胞, 并使用 RIPA 裂解缓冲液于冰上裂解. 蛋白定量后, 进行 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 每孔上样量 20 μg. 之后, 在恒流 260 mA 的条件下转膜 90 min, 将蛋白转至 PVDF 膜上. 将 PVDF 膜在 5% 脱脂奶粉中室温封闭 2 h. 洗膜后, 将含 YAP 的 PVDF 膜与兔单克隆 YAP 抗体(Cell Signaling Technology, #14074), 含 NADPH 的 PVDF 膜与鼠单克隆 GAPDH 抗体(Proteintech, #60004)分别在 4 °C 过夜孵育. 第二天再次洗膜, 并与相应的二抗 HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) 及 HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG(H+L)室温孵育 2 h. 最后, 洗膜并使用 EasySee Western Blot Kit 化学发光检测目的蛋白. 分析及定量统计由 ImageJ 软件完成.

2. 2. 6 MTT 实验 将 HeLa 细胞以每孔 3×10³ 个的数量铺至 96 孔板中, 每孔设置 5 个重复孔, 共铺 4 块板. 4 块板同时进行一次给药, 给药前将 96 孔板中的培养基换成新的含 10% 血清的 DMEM 培养基. 给药之后, 分别于第 0 h、24 h、48 h、72 h

用 MTT 染料处理细胞, 每孔加入 10 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 混匀后于细胞孵箱中培养 4 h. 4 h 后吸去培养液, 每孔加入 100 μL DMSO, 使用酶标仪在 560 nm 处测量显色反应. 最后, 使用 Graph-Pad Prism 7 软件进行数据处理.

2. 2. 7 流式细胞术分析 转染 48 h 后收取细胞, 使用冰浴的 PBS 缓冲液清洗 3 次. 之后, 使用 70% 冰浴的乙醇于 4 °C 过夜固定. 随后, 再次清洗细胞并使用 Cell Cycle and Apoptosis Analysis Kit 根据其说明书为细胞染色. 最终, 样品经 BD FACScalibur 流式细胞仪检测, 并通过 ModFit 软件进行分析.

2. 2. 8 统计分析 使用 GraphPad Prism 7 软件进行数据分析. 两组之间的差异通过 t 检验分析, P<0. 05 时认为具有统计学意义.

3 结果和讨论

3. 1 血清稳定性实验

为了研究酶促合成的 pPS-siRNA 的血清稳定性, 本文使用胎牛血清(FBS)进行了血清稳定性测定. 将酶促合成的 pPS-和 PO-siRNA(均为双链)与 10% FBS 溶液在 37 °C 下孵育, 在 0、2、4、6 和 8 h 取样, 并通过 12. 5% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶分析 siRNA 的稳定性. 研究发现 PO-siRNA 在孵育 2 h 后几乎全部降解, 而 pPS-siRNA 在同一时间还剩余约 50%(图 2). 这表明 pPS-siRNA 比 PO-siRNA 具有更好的稳定性.

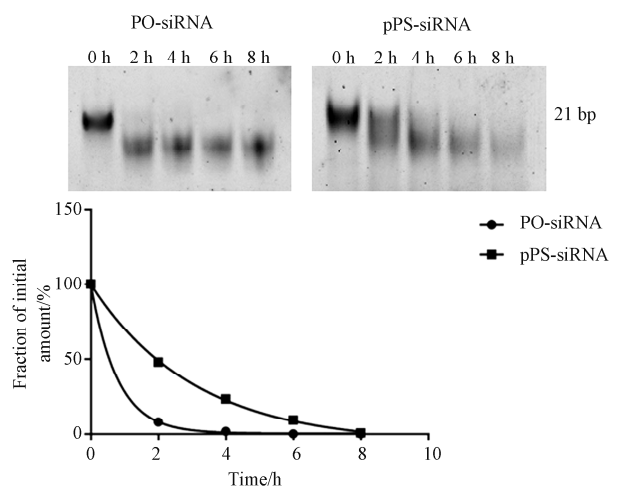


图 2 pPS-siRNA 与未修饰的对应物 PO-siRNA 的核酸酶抗性对比
Fig. 2 Nuclease-resistance of pPS-siRNAs over PO-siRNAs, the canonical counterparts

3. 2 沉默活性研究

本文通过 qPCR 和 Western blot 测定了 HeLa

细胞中 PO-和 pPS-siRNA 的 YAP 基因沉默活性(图 3). 转染并孵育 48 h 后,收取 HeLa 细胞,通过 qPCR 和 Western blot 分析样品. 研究发现空白对照和乱序的 PO-、pPS-siRNA 组(PO-siScr 和 pPS-siScr)均未显示出对 YAP 基因的抑制作用,而靶向 YAP 的 PO-和 pPS-siRNA(PO-siYAP 和 pPS-siYAP)显著抑制 YAP 的内源性表达. 此外, pPS-siYAP 的 YAP 敲除效率比 PO-siYAP 更高(约高 30%),推测可能归因于 pPS-siRNA 较高的细胞内稳定性,硫代磷酸酯修饰延长了 siRNA 的半衰期^[19]. 相反,在 J Winkler *et al.* 的研究中,与未修饰的 PO-siRNA 相比,非对映体混合物 PS-siRNA 的基因沉默效果降低了^[11,18],这可能是由于非对映体混合物在 RISC 复合物中的负载较低所致^[22].

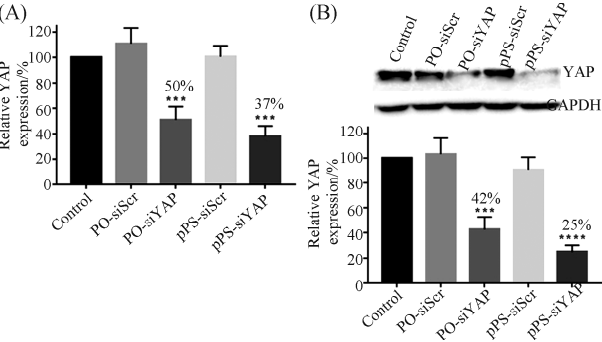


图 3 转染和孵育 48 h 后 YAP 基因的表达
(A)qPCR 检测 YAP mRNA 水平,并将 GAPDH 用作内参;
(B)Western blot 进行分析,使用 GAPDH 作为内参. 对照组用 PBS 缓冲液转染
Fig. 3 YAP gene expression after transfection and incubation for 48 h
(A) Detected by qPCR, and GAPDH was used as an endogenous control; (B) analyzed by Western blot using antibodies against YAP, and GAPDH was used as an endogenous control. The control group was transfected with PBS buffer

3.3 细胞增殖试验

为了研究 pPS-siRNA 的细胞毒性及其下调 YAP 表达后对 HeLa 细胞增殖的影响(图 4 和 5),进行了 MTT 分析. 在下调 YAP 表达后,进行 MTT 细胞增殖实验以研究酶促合成的 pPS-siRNA 的细胞毒性及其对 HeLa 细胞增殖的影响. 用 MTT 处理后,以 0、24、48 和 72 h 的时间间隔分析细胞,并绘制 HeLa 细胞的生长曲线. 对照组用 PBS 缓冲液转染(图 4). 数据显示 PO-siScr 和 pPS-siScr 组的增殖曲线与空白对照组相同,表明 pPS-siRNA 无明显细胞毒性. 另外,PO-siYAP、pPS-siYAP 组 HeLa 细胞的生长显示出受到抑制的趋势,相比 PO-siYAP 组, pPS-siYAP 组的抑制

效果更好. 结果表明, YAP 的下调可以在一定程度上抑制 HeLa 细胞的生长,这与文献报道是一致的^[29-31],其中 pPS-siRNA 抑制效果较好,并且没有明显的细胞毒性. 相反,在 Z Y Li *et al.* 的报道中,非对映体混合物 PS-siRNA 表现出更高的细胞毒性^[32].

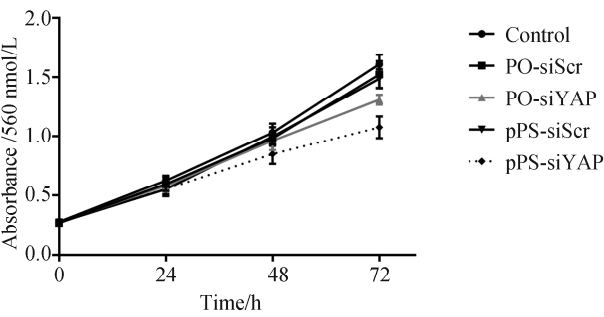


图 4 YAP 基因表达的下调抑制 HeLa 细胞的增殖
Fig. 4 Down-regulation of YAP gene expression can decrease cell proliferation in HeLa cells

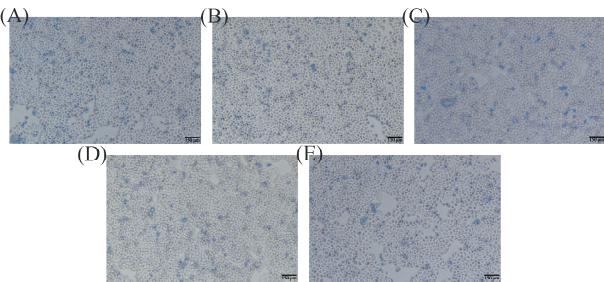


图 5 转染和孵育 48 h 后酶促合成的 siRNA 对 HeLa 细胞形态的影响
(A)用 PBS 缓冲液转染的 HeLa 对照细胞; (B)HeLa-PO-siScr 细胞; (C) HeLa-PO-siYAP 细胞; (D) HeLa-pPS-siScr 细胞; (E)HeLa-pPS-siYAP 细胞. 实验组细胞状态良好,未观察到对细胞形态的影响
Fig. 5 Effect of the transcribed siRNAs on the morphology of HeLa cells after transfection and incubation for 48 h
(A) HeLa-control cells transfected with PBS buffer; (B) HeLa-PO-siScr cells; (C) HeLa-PO-siYAP cells; (D) HeLa-pPS-siScr cells; (E) HeLa-pPS-siYAP cells. The cells transfected with pPS-siRNA were in good condition and no effect on cell morphology was observed

3.4 细胞周期分析

为了研究 YAP 基因沉默对 HeLa 细胞周期的影响,进行了 PI 染色的流式细胞术检测(图 6). 转染并孵育 48 h 后,收获 HeLa 细胞并用 PI 染色,随后用流式细胞仪进行分析. 对照组用 PBS 缓冲液转染. 研究发现,在 YAP 表达下调后,G0 / G1 期的细胞蓄积增加,从 57. 6%(使用 PBS 对照)到 62. 7%(PO-siYAP)和 65. 4%(pPS-siYAP),而 G2 / M 期的细胞蓄积减少,从 13. 0%(对照)降至 11. 4%(PO-siYAP)和 9. 90%(pPS-siYAP). 这些

结果表明, YAP 的下调可能导致 HeLa 细胞的增殖在 G₀ / G₁ 期停滞, 这与 MTT 实验结果以及 YAP 在促进细胞增殖和存活中的作用一致, 并与多种肿瘤细胞的凋亡有关^[28,33-34]. 然而, 尽管呈现出一定趋势, 这种抑制在 HeLa 细胞中并不显著, 可能 YAP 对不同细胞生长的影响存在差异^[33].

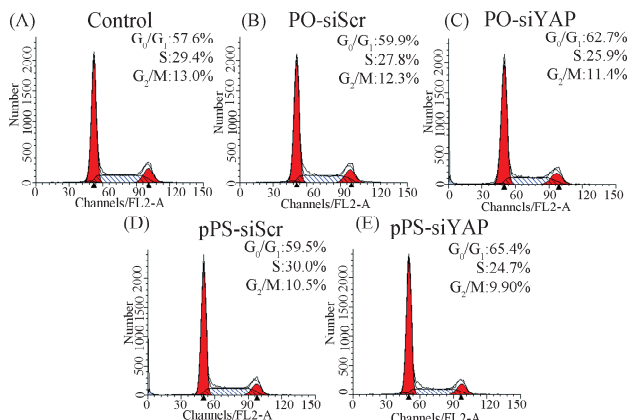


图 6 YAP 基因下调表达后 HeLa 细胞的生长状况

Fig. 6 Cell cycle of HeLa cells after down-regulation of YAP gene expression

4 结 论

研究表明, pPS-siRNA 具有较高的核酸酶稳定性, 无明显的细胞毒性, 并且在 YAP 基因沉默中比其 PO-siRNA 对应物更具活性. 酶法合成的 pPS-siRNA 克服了化学合成 mPS-siRNA (非对映异构体混合物) 的缺陷, 该方法在基因功能研究和 siRNA 治疗领域将具有重要价值. 此外, 本文已经证实, YAP 表达的下调可以抑制细胞增殖, 表明其在肿瘤发生和发展中的重要作用, 具有一定的研究价值.

参考文献:

- [1] Zhao B, Li L, Guan K L. Hippo signaling at a glance [J]. J Cell Sci, 2010, 123: 4001.
- [2] Zhang S H, Zhou D W. Role of the transcriptional coactivators YAP/TAZ in liver cancer [J]. Curr Opin Cell Biol, 2019, 61: 64.
- [3] Overholtzer M, Zhang J M, Smolen G A, *et al.* Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. (CELL BIOLOGY)(Author abstract) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 12405.
- [4] Perra A, Kowalik M A, Ghiso E, *et al.* YAP activation is an early event and a potential therapeutic target in liver cancer development [J]. J Hepatol,

2014, 61: 1088.

- [5] Wang S, Li H, Wang G, *et al.* Yes-associated protein (YAP) expression is involved in epithelial - mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma [J]. Clin Transl Oncol, 2016, 18: 172.
- [6] Kang W, Tong J H M, Chan A W H, *et al.* Yes-associated protein 1 exhibits oncogenic property in gastric cancer and its nuclear accumulation associates with poor prognosis [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17: 2130.
- [7] Zhang X, George J, Deb S, *et al.* The hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, is an ovarian cancer oncogene [J]. Oncogene, 2011, 30: 2810.
- [8] Yuan M, Tomlinson V, Lara R, *et al.* Yes-associated protein (YAP) functions as a tumor suppressor in breast [J]. Cell Death Differ, 2008, 15: 1752.
- [9] Yair D, Thomas T. siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics [J]. Nat Rev Drug Discov, 2004, 3: 318.
- [10] Haussecker D. Current issues of RNAi therapeutics delivery and development [J]. J Control Release, 2014, 195: 49.
- [11] Mark A B. Progress towards *in vivo* use of siRNAs [J]. Mol Ther, 2006, 13: 644.
- [12] Sarret P, Doré-Savard L, Beaudet N. Direct application of siRNA for *in vivo* pain research [J]. Methods Mol Biol, 2010, 623: 383.
- [13] Choung S, Kim Y J, Kim S, *et al.* Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342: 919.
- [14] Nawrot B, Sipa K. Chemical and structural diversity of siRNA molecules [J]. Curr Top Med Chem, 2006, 6: 913.
- [15] Bramsen J B, Kjems J. Chemical modification of small interfering RNA [J]. Methods Mol Biol, 2011, 721: 77.
- [16] Selvam C, Mutisya D, Prakash S, *et al.* Therapeutic potential of chemically modified siRNA: recent trends [J]. Chem Biol Drug Des, 2017, 90: 665.
- [17] Caton W J, Fiaz B, Hoxhaj R, *et al.* Convenient synthesis of nucleoside 5'-(α P-thio) triphosphates and phosphorothioate nucleic acids (DNA and RNA) [J]. Sci China Chem, 2012, 55: 80.
- [18] Winkler J, Stessl M, Amartei J, *et al.* Off-target effects related to the phosphorothioate modification of nucleic acids [J]. Chem Med Chem, 2010, 5: 1344.

- [19] Amarzguioui M, Hølen T, Babaie E, *et al.* Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 589.
- [20] Harborth J, Elbashir S, Vandenburgh K, *et al.* Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing [J]. *Antisense Nucleic A*, 2003, 13: 83.
- [21] Sakamuri S, Eltepu L, Liu D, *et al.* Impact of phosphorothioate chirality on double-Stranded siRNAs: A systematic evaluation of stereopure siRNA designs [J]. *Chem Bio Chem*, 2020, 21: 1304.
- [22] Jahns H, Roos M, Imig J, *et al.* Stereochemical bias introduced during RNA synthesis modulates the activity of phosphorothioate siRNAs [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6317.
- [23] Griffiths A D, Potter B, Eperon I. Stereospecificity of nuclease towards phosphorothioate-substituted RNA; stereochemistry of transcription by T7 RNA polymerase [J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15: 4145.
- [24] Vörtler L C, Eckstein F. Phosphorothioate modification of RNA for stereochemical and interference analyses [J]. *Methods Enzymol*, 2000, 317: 74.
- [25] Eckstein F. Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides [J]. *Nucleic Acid Ther*, 2014, 24: 374.
- [26] Amarzguioui M, Rossi J J, Kim D. Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579: 5974.
- [27] Zhi X, Zhao D, Zhou Z, *et al.* YAP promotes breast cell proliferation and survival partially through stabilizing the KLF5 transcription factor [J]. *Am J Pathol*, 2012, 180: 2452.
- [28] Zhou Z, Zhu J S, Xu Z P, *et al.* Lentiviral vector-mediated siRNA knockdown of the YAP gene inhibits growth and induces apoptosis in the SGC7901 gastric cancer cell line [J]. *Mol Med Report*, 2011, 4: 1075.
- [29] Muramatsu T, Imoto I, Matsui T, *et al.* YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32: 389.
- [30] Pei T M, Li Y J, Wang J B, *et al.* YAP is a critical oncogene in human cholangiocarcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 17206.
- [31] Li K, Guo J W, Wu Y, *et al.* Suppression of YAP by DDP disrupts colon tumor progression [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39: 2114.
- [32] Li Z Y, Mao H B, Kallick D A, *et al.* The Effects of thiophosphate substitutions on native siRNA gene silencing [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329: 1026.
- [33] Shen Z W, Ben Z S. YAP regulates S-phase entry in endothelial cells [J]. *Plos One*, 2015, 10: e0117522.
- [34] Zhou X X, Su J N, Feng S Y, *et al.* Antitumor activity of curcumin is involved in down-regulation of YAP/TAZ expression in pancreatic cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 79076.

引用本文格式:

中文: 唐硕, 黄震. 磷硫代 siRNA 的 YAP 基因沉默活性研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2021, 58: 056004.
英文: Tang S, Huang Z. Study on YAP gene silencing activity of phosphorothioate siRNAs [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2021, 58: 056004.