

RNA 干扰 *c-Met* 基因表达对非小细胞肺癌侵袭和迁移及顺铂敏感性的影响

沈 青^{1,2}, 徐立群², 陈清勇², 焦德敏²

(1. 浙江中医药大学第二临床医学院, 浙江 杭州 310053;

2. 解放军第一一七医院, 浙江 杭州 310004)

摘 要: [目的] 研究 *c-Met* 基因干扰后对肺癌细胞株 95D 侵袭、迁移能力和化疗药物敏感性的影响。[方法] 分别采用免疫组化 SP 法和 Western Blot 技术检测肺癌组织及不同肺癌细胞株中 Met 蛋白的表达情况。将 *c-Met* shRNA 质粒转染人肺癌细胞株 95D, 通过 Western Blot 检测转染效率; Transwell 小室和划痕愈合实验测定细胞体外侵袭和迁移能力; 四甲基偶氮唑法 (MTT 法) 检测细胞的增殖情况及顺铂敏感性。[结果] Met 蛋白在 NSCLC 组织中的表达明显高于癌旁正常组织, 同时高侵袭性的肺癌细胞株 (95D、801D) 中 Met 蛋白的表达也较高。*c-Met* 基因干扰能明显降低 95D 细胞的侵袭和迁移能力, 并显著提高其对顺铂的敏感性。[结论] *c-Met* 基因可作为一个重要的靶点应用于非小细胞肺癌治疗。

关键词: *c-Met*; 癌; 非小细胞肺; RNA 干扰; 顺铂

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X (2014) 06-0441-07

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.06.B001

The Effects of RNA Interference to *c-Met* Gene on Invasion and Migration of Human Non-small Cell Lung Cancer and the Sensitivity to Cisplatin

SHEN Qing^{1,2}, XU Li-qun², CHEN Qing-yong², et al.

(1. The 2nd Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. The 117th Hospital of PLA, Hangzhou 310004, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effects of *c-Met* gene interference on invasion and migration ability and chemotherapeutic drugs sensitivity in lung cancer 95D cell line. [Methods] *c-MET* protein expression was detected in lung cancer tissues and different lung cancer cell lines using immunohistochemistry and Western Blot technology. *c-Met* shRNA plasmid was transfected into lung cancer 95D cells, then the ability of cell invasion and migration was detected by transwell chambers in vitro invasion assay and wound-healing assay. Cell proliferation and the sensitivity of lung cancer cell to cisplatin were determined by MTT assay. [Results] Met protein expression in NSCLC tissues was significantly higher than that in cancer adjacent tissues. Meanwhile, Met protein expression in invasive lung cancer cell line (95D, 801D) was higher than that in low invasive lung cancer cell line (95C) and in BEAS-2B cell. In addition, *c-Met* gene silence significantly inhibited the migration and invasion ability of 95D cells and improved its sensitivity to cisplatin. [Conclusion] *c-Met* gene may have the potential as a therapeutic target using in the treatment for human non-small cell lung cancer.

Subject words: *c-Met*; NSCLC; RNA interference; cisplatin

肺癌目前是最常见的恶性肿瘤, 每年新发病例和死亡病例均位居各种恶性肿瘤前列, 已成为男、女性肿瘤患者的主要死因之一^[1]。非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 约占肺癌总数

的 80%~85%。随着分子生物学的发展, 以及多学科综合治疗模式的发展, NSCLC 的治疗效果有所提高。但由于非小细胞肺癌易发生浸润和转移, 患者总体预后仍然较差。目前有关非小细胞肺癌浸润转移机制尚不完全清楚, 因此探索 NSCLC 浸润转移显得尤为重要。

c-Met 原癌基因, 位于人类第 7 号染色体 7q21-

基金项目: 浙江省科技计划项目 (2013C33209)

通讯作者: 徐立群, 主任医师, 硕士; 解放军第一一七医院, 浙江省杭州市灵隐路 14 号 (310004); E-mail: xuliquan117@hotmail.com

收稿日期: 2014-03-04; **修回日期:** 2014-04-03

q31, 其编码的 c-Met 蛋白属于受体酪氨酸蛋白激酶家族成员, 是 HGF 的上皮特异性受体。c-Met 在多种肿瘤中高表达, 并与肿瘤细胞增殖失控以及肿瘤细胞的恶性生物学行为(如无限生长、侵袭和转移等)密切相关^[2]。本研究中, 通过免疫组化、Western Blot 法验证 c-Met 基因表达与非小细胞肺癌的关系。构建 c-Met 基因干扰质粒, 并将其转染肺癌细胞株 95D, 进一步探索 c-Met 基因沉默对 95D 细胞增殖、侵袭方面的作用及顺铂敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

RPMI 1640 购自 GIBCO, 4℃ 保存。Western-blotting luminol 试剂盒(ECL): Biological Industries, 2℃~8℃ 保存。PVDF 膜: MILLIPORE 公司产品。Transwell Chamber 8μm 孔径购自美国 Costar 公司。c-Met 干扰质粒购自上海吉玛公司。二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)、MTT 购自 Sigma 公司, 兔抗人 β-actin 单抗和兔抗人 c-Met 单克隆抗体购自 Abcam 公司, 顺铂购自齐鲁制药有限公司。

1.2 细胞培养及转染

肺癌细胞株(95D、95C、A549、801D)和人正常肺支气管上皮细胞株(BEAS-2B)购自上海生科院研究所, 所有细胞均培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 恒温 37℃ 置于 5% CO₂ 培养箱中, 细胞单层贴壁生长, 取生长状态良好的对数生长期细胞进行实验。

细胞转染采用 Lipofectamine 2000 将 c-Met shRNA 质粒转染至 95D 细胞, 脂质体: shRNA c-Met 以 0.8μl: 0.8μg 比例转染。c-Met 干扰序列 3081: S: CACCGCAGTGAATTAGTTCGCTACGTTCAAGAG-ACGTAGCGAACTAATTCACCTGCTT TTTTG A: GATCCAAAAAAGCAGTGAATTAGTTCGCTACG-TCTCTTGAACGTAGCGAACTAATTC ACTGC

1.3 组织标本选取及免疫组化

选取肿瘤组织石蜡标本 20 例(其中腺癌 15 例, 鳞癌 5 例)和癌旁正常组织 5 例, 术前所有患者均未化疗或放疗, 有完整的临床资料和明确的术后病理诊断。手术标本经 10% 甲醛固定后, 常规石蜡包埋、切片, 厚度 4μm, 采用免疫组化 SP 法(兔抗人 c-Met

单克隆抗体, 免疫组化二抗 SP 试剂盒)。按照试剂说明书进行操作。结果评定: 将着色强度高于背景的细胞定为阳性细胞。细胞质和细胞核内的棕黄色颗粒都分别根据阳性细胞的染色强度(未着色: 0 分; 淡黄色: 1 分; 棕黄色: 2 分; 棕褐色: 3 分)和阳性细胞所占的构成比评分(全阴: 0 分; ≤10%: 1 分; 11%~50%: 2 分; 51%~75%: 3 分; >75%: 4 分); 将每例获得的两组分数相乘: 0~3 分为(-); 4~7 分为(+); 8~12 分为(++)^[3]。

1.4 Western Blot 法

细胞经 RIPA 裂解液(购自碧云天 Western 及 IP 的 RIPA, 取 1ml RIPA+10μl PMSF+10μl Aprotinin)裂解 30min, 冰上进行操作。收集到 EP 管, BCA 蛋白定量法定量。取 30μg 样品和上样缓冲液混合, 煮沸后离心, 上样电泳, 行 SDS-PAGE, 采用湿转法转膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 再分别加入 c-Met(1:2 000)一抗孵育 4℃ 过夜, TBST 洗膜 3 次后兔二抗(1:10 000)室温摇床孵育 2h, TBST 洗膜 3 次, ECL 发光试剂盒发光显影, 定影后进行分析。

1.5 Transwell 小室检测细胞侵袭能力

将 95D 细胞接种至 24 孔板, 铺板使待测细胞密度调至 5×10⁴ cells/孔, 分为 95D 组、95Dsh c-Met 组(RNA 干扰后 95D 细胞中 c-Met 蛋白的表达组)、95D c-Met NC 组(95D c-Met Negative Control), 5% CO₂、37℃ 孵育培养, 转染 24h 后, 将细胞消化, 使用无血清培养基制备细胞悬液, 取 200μl, 密度为 3×10⁴ cells/ml 加入至上室, 600μl 10% 小牛血清培养基加入下室。常规培养 24h 后, ≥95.5% 冷却的甲醇固定 20min, 1% 结晶紫染色 45min。用棉签擦去小室上表面的细胞, 镜下计数滤膜下表面细胞数, 随机计数 5 个视野中的细胞数目, 每个标本重复 3 次, 以侵袭细胞的相对数目来表示肿瘤细胞的侵袭能力。

1.6 划痕试验检测细胞迁移能力

用 marker 笔在孔板背后, 用直尺比着, 均匀划横线, 划 2 条线, 互相垂直, 48h 后铺 24 孔板, 每孔 5×10⁴ 个细胞, 分 3 组: 95D 组、95D c-Met NC 组和 95Dsh c-Met 组, 5% CO₂、37℃ 孵育培养, 经 shRNA c-Met 转染 24h 后用枪头比着直尺, 尽量垂至于背后的横线划痕, 在划痕与记号笔划线相交点处进行定点监测, 用 PBS 洗细胞 2 次, 去除划下的细胞, 加入 2.5% 小牛血清培养基, 并按 0h 拍照取样。再放入

37℃、5%CO₂ 培养箱,培养 24h 后再取样,拍照。使用 Image-pro Plus 软件测量划痕宽度,每个监测点随机测量 5 处。平均迁移距离=(0h 划痕宽度-24h 划痕宽度)/0h 划痕宽度。

1.7 MTT 法检测细胞增殖

取对数期细胞,调整细胞悬液浓度,24 孔板每孔加入 500μl,铺板使待测细胞密度调至 5×10⁴cells/孔,分为 95D 组、95Dsh c-Met 组、95D c-Met NC 组;5% CO₂、37℃孵育培养,shRNA c-Met 转染 24h,消化细胞接入 96 孔板,细胞贴壁生长后,取不同时间段(0、24、48、72h),每孔加入 20μl MTT 溶液,继续培养 4h 后终止培养,弃去上清液,加入 200μl DMSO 液体,充分混匀 10min,在酶联免疫检测仪 490nm 处测量各孔的吸光值。不同 c-Met 组经转染 24h 同样消化细胞接至 96 孔板,加入顺铂浓度为空白组、10μmol 组、20μmol 组、40μmol 组、60μmol 组、80μmol 组、120μmol 组,再经过细胞培养 24h,通过 MTT 检测细胞增殖情况。最后按下列公式计算细胞存活率:细胞存活率(%)=(实验组 A 值-空白对照组 A 值)/(阴性对照组 A 值-空白对照组 A 值)×100%。

1.8 统计学处理

所有实验均重复 3 次,实验数据用均数±标准差表示,应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。组间比较采用 *F* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Met 蛋白的表达检测

20 例非小细胞肺癌组织中,Met 蛋白均呈阳性表达(100%),有 15 例呈强阳性(75%),5 例呈弱阳性(25%)。5 例癌旁组织中 Met 蛋白呈阴性或弱阳性(Figure 1)。不同转移潜能肺癌细胞株和正常人肺支气管上皮细胞 Met 蛋白表达有差异,4 种肺癌细胞系均较肺支气管上皮细胞明显增高 (*P*<

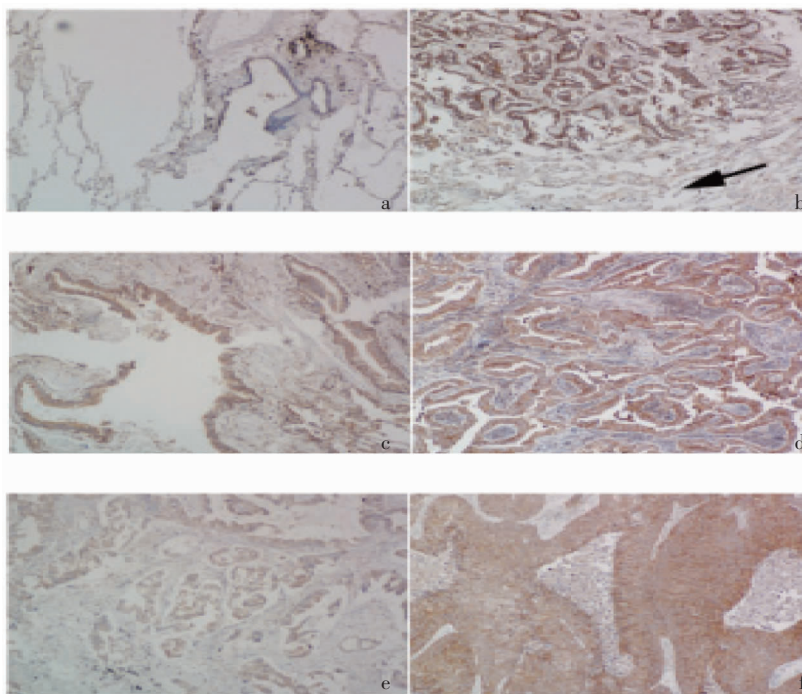
0.05)(Figure 2)。在高转移性肺癌细胞系(95D、801D)Met 的表达高于低转移性肺癌细胞系(95C)(*P*<0.05)。这种差异性表达提示 c-Met 与肺腺癌发生及肺癌转移相关,在肺癌组织及高转移性肺癌细胞中的 c-Met 表达较高。

2.2 c-Met 干扰效果检测

c-Met shRNA 质粒转染 95D 细胞后,Western Blot 检测 Met 蛋白表达变化(Figure 3)。结果显示,c-Met 干扰序列干扰效果好,Met 蛋白较阴性对照组(Negative-control)和空白组表达量分别下降约 59.08%和 60.8% (*F*=126.021,*P*=0.000),而空白组和阴性对照组细胞之间 Met 蛋白的表达水平差异无统计学意义(*P*=0.333)。这一结果表明 c-Met shRNA 重组质粒特异性地抑制 95D 细胞中 Met 蛋白的表达。我们进一步对 c-Met shRNA 重组质粒进行体外细胞功能实验。

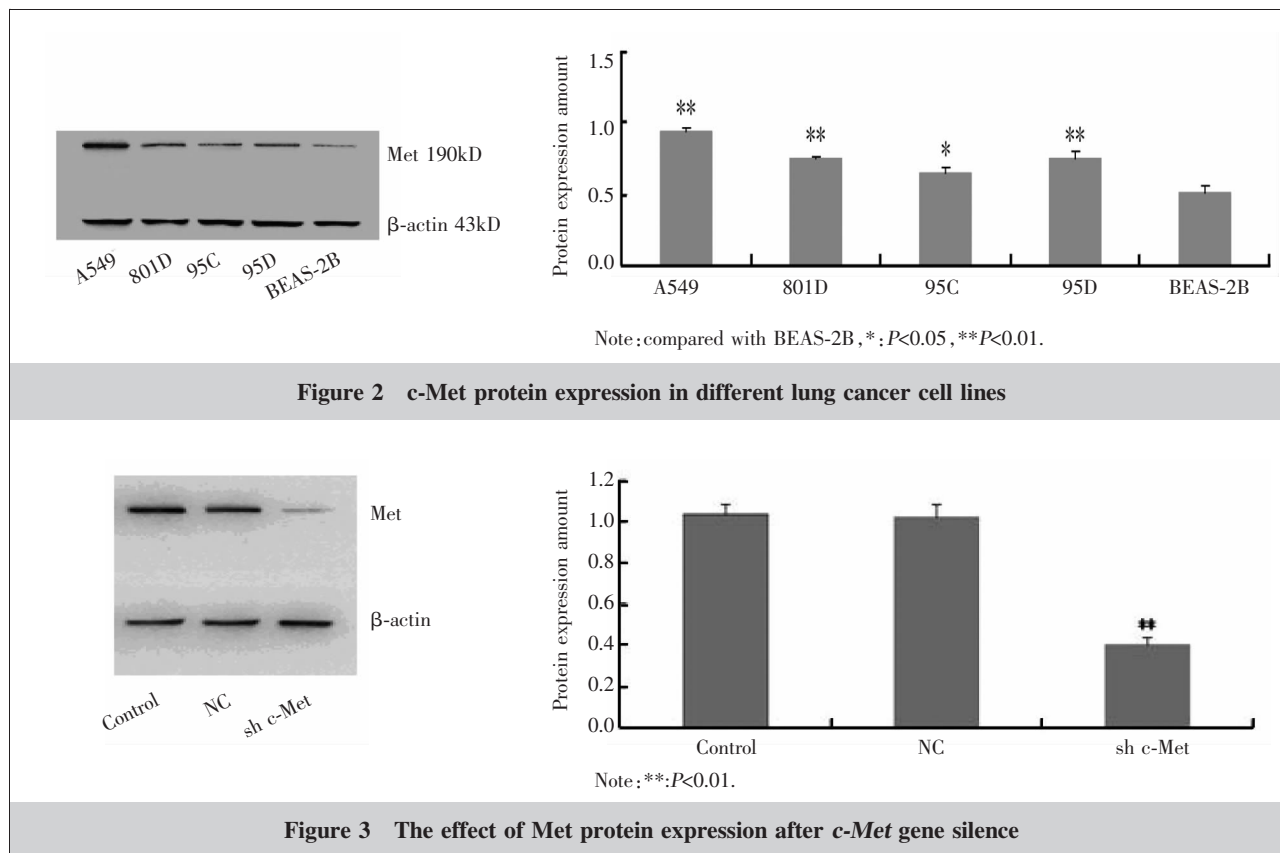
2.3 c-Met 基因干扰对 95D 细胞生长的影响

MTT 实验检测细胞活力结果显示,转染 24h,3 组细胞之间增殖能力差异无统计学意义 (*F*=2.480,



Note:a,b;cancer adjacent tissues;c:weak positive in lung adenocarcinoma tissues;d:strong positive in lung adenocarcinoma tissues;e:weak positive in squamous cancer tissues;f:strong positive in squamous cancer tissues.

Figure 1 The expression of c-Met in lung adenocarcinoma tissues,squamous cancer tissues and cancer adjacent tissues by immunohistochemistry (SP ×100)

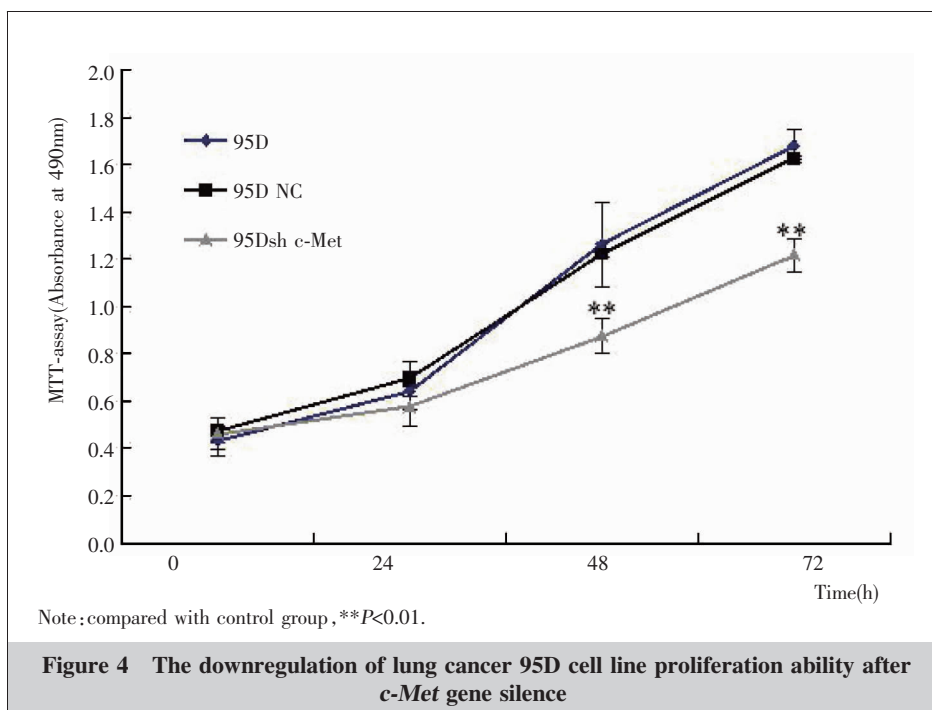


$P=0.133$)。48h后,c-Met shRNA组细胞的增殖能力明显下降,与NC组和空白组相比,差异有统计学意义($P=0.000$)。但NC组和空白组之间的增殖能力无统计学意义($P>0.05$)(Figure 4)。

2.4 体外侵袭、迁移能力测定

c-Met 基因干扰后,细胞侵袭迁移能力受到抑制。Transwell 实验结果显示 c-Met shRNA 重组质粒转染使 95D 细胞侵袭能力受到显著的抑制,侵袭至 Transwell 小室滤膜下表面的细胞数 $[(279 \pm 32.53) \text{ 个}]$ 明显低于空白组 $[(490 \pm 45.25) \text{ 个}]$ 和对照组 $[(517 \pm 12.72) \text{ 个}]$ 。c-Met 干扰组较 NC 组和空白组的迁移细胞数分别减少 46.03% 和 43.06%,sh c-Met 组与 NC

组、sh c-Met 组与空白组两两比较,差异有统计学意义($F=31.179, P=0.010$),但 NC 组和空白组之间无统计学意义($P=0.473$)。分别测量 0h 和 24h 划痕宽度,



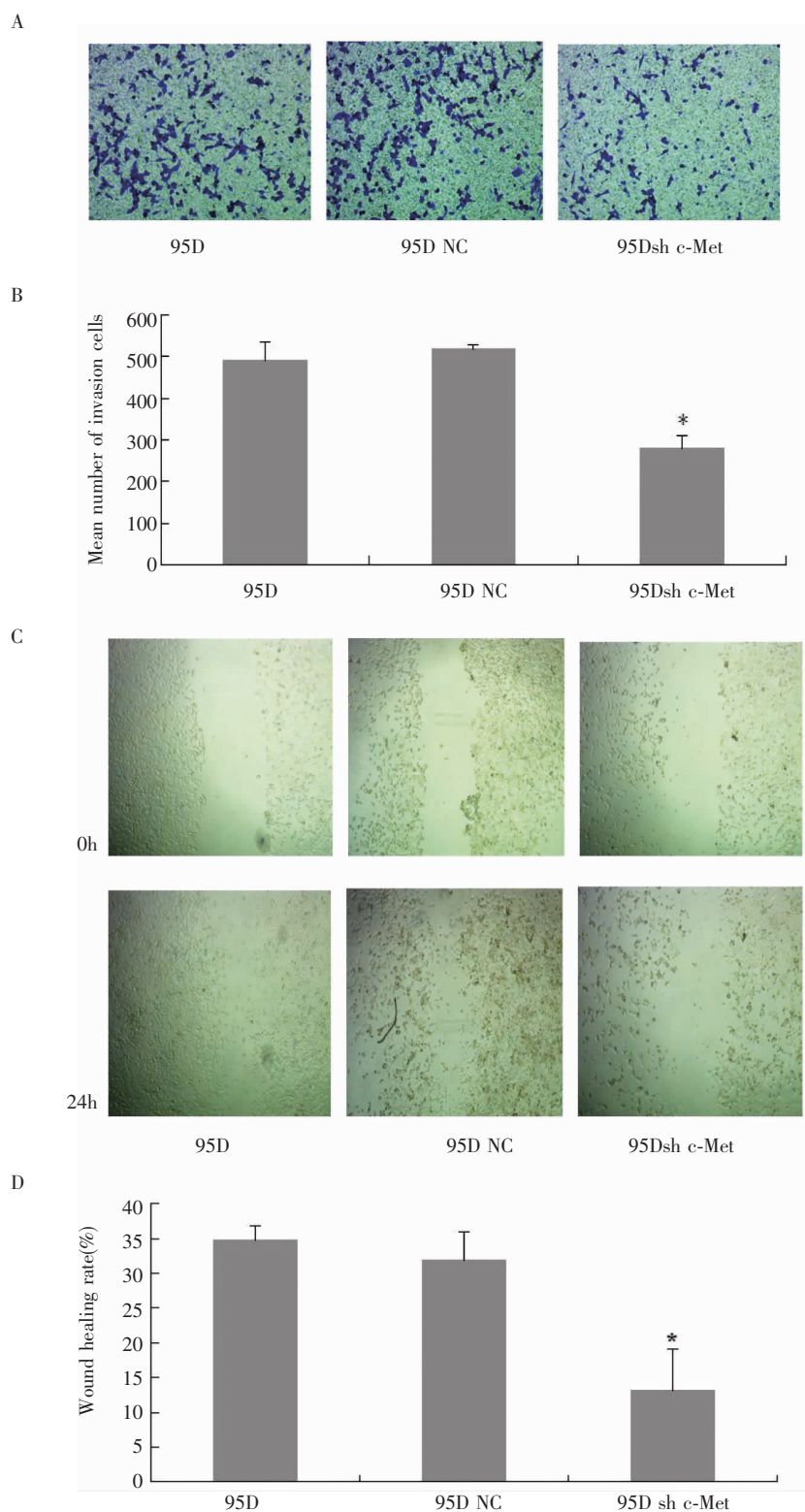
结果显示 *c-Met* 干扰组平均迁移距离小于 NC 组和空白组, *sh c-Met* 组较 NC 组和空白组的平均距离分别减少 50.2% 和 62.05%, *sh c-Met* 组与 NC 组、*sh c-Met* 组与空白组两两比较, 差异有统计学意义 ($F=14.803, P=0.028$)。但 NC 组和空白组之间无统计学差异 ($P=0.552$) (Figure 5)。

2.5 *c-Met* 基因干扰后增加 95D 细胞对顺铂敏感性

MTT 结果显示 (Figure 6), 不同浓度顺铂 (10~120 μmol) 作用于 *c-Met* shRNA 重组质粒转染的 95D 细胞, 药物浓度—细胞存活率曲线与对照组 NC 和空白组相比明显往右侧移位。随着药物浓度的增加, 细胞的存活率也有下降的趋势。与 NC 组相比, *sh c-Met* 对 95D 细胞在不同顺铂浓度作用下, 细胞存活率在 10、20、40、60、80、120 $\mu\text{mol/L}$ 分别为 79.4%、81.8%、78.1%、73.2%、69.2%、70.0%。*sh c-Met* 组与 NC 组、*sh c-Met* 组与空白组两两比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 但 NC 组和空白组之间无统计学意义 ($P>0.05$)。结果表明沉默 *c-Met* 基因, 可明显提高 95D 细胞对化疗药物顺铂的敏感性。

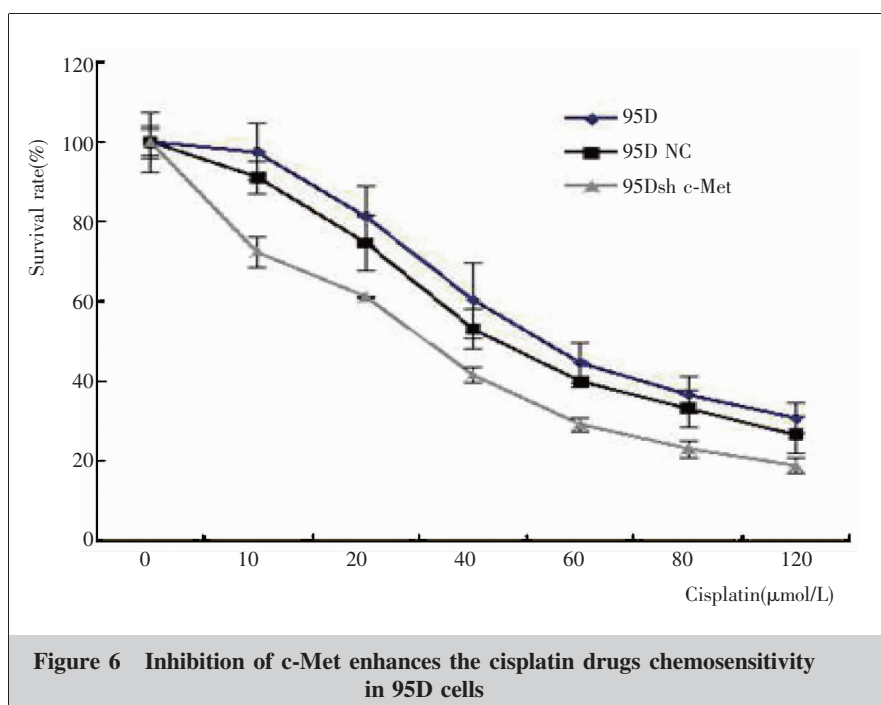
3 讨论

肿瘤的侵袭和转移是一个十分复杂的生物学现象, 经过肿瘤细胞从原发肿瘤组织脱离、侵犯周围组织、进入循环系统、逃避免疫监视、血管生成以及在远离肿瘤组织处形成转移灶。在这一过程中, 许多肿瘤转移基因和转移抑制基因参与了调控。 *c-*



Note: A, B: The Transwell chambers in vitro invasion after *c-Met* gene silence ($\times 40$); C, D: The wound healing test after *c-Met* gene silence ($\times 40$); *, $P<0.05$; **, $P<0.01$.

Figure 5 In vitro invasion and migration experimental test



Met 是原癌基因家族中重要成员之一, 编码的蛋白质属于酪氨酸激酶活性的生长因子受体类。研究表明, *c-Met* 在多种肿瘤组织中过表达, 比如结直肠癌、胃癌、肺癌、转移性恶性黑色素瘤、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、肾癌以及肝癌等^[4], 并且与浸润、转移密切相关, 是预后不良的标志^[5]。

本研究中, 我们采用免疫组化法检测了 NSCLC 组织中 *c-Met* 蛋白的表达情况, 结果表明, *c-Met* 蛋白在 20 例 NSCLC 组织中的阳性表达率为 75.0%, 5 例癌旁组织中均未见 *c-Met* 蛋白的强阳性表达。表明 *c-Met* 蛋白的异常表达可能是肺癌细胞恶性表型的特征之一。另外, 在不同转移潜能肺癌细胞系中的检测结果显示, *c-Met* 蛋白在高转移性肺癌细胞系中的表达明显高于低转移性肺癌细胞系, 这种差异性表达与 *c-Met* 蛋白在肺癌组织中的表达一致。以上研究结果提示, *c-Met* 蛋白的异常表达在 NSCLC 的发生、发展和转移过程中发挥着调控作用, 可作为判断 NSCLC 转移和预后的重要生物学指标。因此, 控制肿瘤细胞中 *c-Met* 蛋白的异常表达对临床进行抗肿瘤转移的治疗研究将具有重要的意义。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术在多种肿瘤的基因治疗中被证实具有强大的基因沉默作用^[6,7]。肿瘤细胞的迁移能力和其侵袭能力密切相关^[8,9]。Ma 等^[10]研究肺腺癌不同细胞株中 *c-Met* 蛋白表达及干

扰 *c-Met* 基因表达后观察肺癌细胞增殖能力变化; 谢治年等^[11]下调 *c-Met* 后, 喉癌 Hep-2 细胞的迁移侵袭能力降低; Wang 等^[12]下调肺小细胞癌细胞的 *c-Met* 后, 细胞迁移侵袭能力减低; Li 等^[13]采用 RNA 干扰 *c-Met* 基因, 观察到鼻咽癌细胞增殖、侵袭受到抑制, 促进细胞凋亡; Chu 等^[14]下调神经胶质瘤 U251 细胞的 *c-Met* 后, 细胞侵袭能力也减低。由此我们推测非小细胞肺癌干扰 *c-Met* 后细胞的迁移、侵袭能力也将会有所减低。在本实验中, 我们通过构建 *c-Met* shRNA 重组质粒载体, 转染肺癌 95D 细胞, 经 Western Blot 证

实, *c-Met* 基因表达下降 60.8% 以上, 通过 MTT、Transwell 和划痕愈合实验, 我们发现 *c-Met* 基因干扰后, 细胞的增殖、侵袭等能力有了明显的下降。

最近, 一些研究显示 *c-Met* 基因的表达程度与化疗药物的耐药性有关。顺铂作为重要的抗癌药物, 广泛用于 NSCLC、乳腺癌、小细胞肺癌等, 肿瘤细胞对铂类药物产生耐药是临床治疗失败的主要原因, 克服耐药性是提高临床治疗效果的迫切需要。Yoon 等^[15]发现, 在耐顺铂人肺腺癌细胞 H460/CIS 中, Bcl-2 表达水平显著增高, 提示 Bcl-2 可能与顺铂耐药有关。Wang 等^[16]发现在骨肉瘤细胞中抑制 *c-Met* 表达及下游信号通道 PI3K/Akt, 提高细胞对化疗药物顺铂的敏感性。为了进一步研究在肺癌细胞中 *c-Met* 基因干扰后顺铂药物敏感性是否有影响, 本研究采用 MTT 检测肺癌细胞药物作用后增殖率。结果显示, *c-Met* 干扰肺癌细胞 95D 后, 增加肺癌细胞对顺铂的敏感性, 根据 *c-Met* 干扰后在 NSCLC 中的作用, 我们推测 *c-Met* 的扩增可能是顺铂耐药的机制之一。

目前有关 *c-Met* 基因表达在非小细胞肺癌增殖、侵袭转移的具体作用机制仍尚未明确。一般认为, HGF 与 *c-Met* 结合后 *c-Met* 发生自身磷酸化, 激活细胞内各种重要信号通路, 最后调控细胞的一系列生命活动。Met 下游通路主要包括 MAPK、PI3K/

Akt 和 c-Src/FAK、STAT 等通路^[17,18]。但 Stein 等^[19]报道在结肠癌中 *c-Met* 通过扩增和(或)变异,不依赖于 HGF 的结合来激活、促进肿瘤的发生发展。也有研究发现 *c-Met* 信号通路与 EGFR 和 HER3 部分下游信号通路相通,存在“cross-talk”现象^[20]。本研究 *c-Met* 是否可能通过阻断 HGF/*c-Met* 下游 Ras/MAPK 和 PI3K/Akt 等信号转导通路,从而引起肿瘤细胞的抑制效应,这具体作用机制有待我们进一步研究。

综上所述,我们研究表明下调 *c-Met* 基因可明显抑制肺癌细胞 95D 的侵袭和迁移,也发现敲除 *c-Met* 基因可使肿瘤细胞对抗肿瘤的药物更敏感。这为原癌基因 *c-Met* 可能成为治疗 NSCLC 基因治疗的一个潜在的有效作用靶点,和将为临床治疗 NSCLC 提供一个新思路 and 实验依据。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer Clin, 2011, 61(2): 69–90.
- [2] Park S, Choi YL, Sung CO, et al. High MET copy number and MET overexpression: poor outcome in non-small cell lung cancer patients [J]. Histol Histopathol, 2012, 27(2): 197.
- [3] Xu LZ, Yang WT. The judgment standard of immunohistochemical reaction results [J]. Chinese Journal of Cancer, 1996, 6 (4): 229–231. [许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准 [J]. 中国癌症杂志, 1996, 6(4): 229–231.]
- [4] Chen DG, Wang YF. Progress of anticancer therapy of HGF/*c-MET* signaling pathway [J]. Sichuan Journal of Physiological Science, 2013, 35(3): 108–111. [陈德高, 王玉芳. HGF/*c-Met* 信号通路的抗肿瘤治疗进展 [J]. 四川生理科学杂志, 2013, 35(3): 108–111.]
- [5] Wu YL, Zhong WZ, Li LY, et al. Epidermal growth factor receptor mutations and their correlation with gefitinib therapy in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis based on updated individual patient data from six medical center in mainland China [J]. J Thorac Oncol, 2007, 2 (5): 430–439.
- [6] Uchino K, Ochiya T, Takeshita F. RNAi therapeutics and applications of microRNAs in cancer treatment [J]. Jpn J Clin Oncol, 2013, 43(6): 596–607.
- [7] Kubowicz P, Żelazczyk D, Pękala E. RNAi in clinical studies [J]. Curr Med Chem, 2013, 20(14): 1801–1816.
- [8] Hendrix A, Gespach C, Bracke M, et al. The tumor ecosystem regulates the roads for invasion and metastasis [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2011, 35(11): 714–719.
- [9] Cattaruzza S, Perris R. Proteoglycan control of cell movement during wound healing and cancer spreading [J]. Matrix Biol, 2005, 24(6): 400–417.
- [10] Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, et al. Functional expression and mutations of *c-Met* and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer [J]. Cancer Res, 2005, 65(4): 1479–1488.
- [11] Xie ZN, Ji CY, Chen JC, et al. Effects of *c-Met*-siRNA on the biological behaviour of laryngeal carcinoma Hep-2 cells [J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2009, 23(12): 553–557. [谢治年, 姬长友, 陈继川, 等. *c-Met*-siRNA 对喉癌 Hep-2 细胞株生物学行为的作用 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2009, 23(12): 553–557.]
- [12] Wang ZX, Lu BB, Yang JS, et al. Adenovirus-mediated siRNA targeting *c-Met* inhibits proliferation and invasion of small-cell lung cancer (SCLC) cells [J]. J Surg Res, 2011, 171(1): 127–135.
- [13] Li Y, Zhang S, Tang Z, et al. Silencing of *c-Met* by RNA interference inhibits the survival, proliferation, and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Tumour Biol, 2011, 32(6): 1217–1224.
- [14] Chu SH, Feng DF, Zhang H, et al. *c-Met*-targeted RNA interference inhibits growth and metastasis of glioma U251 cells in vitro [J]. J Neurooncol, 2009, 93(2): 183–189.
- [15] Yoon SS, Ahn KS, Kim SH, et al. In vitro establishment of cisdiammine-dichloroplatinum (II) resistant lung cancer cell line and modulation of apoptotic gene expression as a mechanism of resistant phenotype [J]. Lung Cancer, 2001, 33 (2–3): 221–228.
- [16] Wang K, Zhuang Y, Liu C, et al. Inhibition of *c-Met* activation sensitizes osteosarcoma cells to cisplatin via suppression of the PI3K-Akt signaling [J]. Arch Biochem Biophys, 2012, 526(1): 38–43.
- [17] Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, et al. *Met*, metastasis, motility and more [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(12): 915–925.
- [18] Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience [J]. Nat Rev Drug Discov, 2008, 7(6): 504–516.
- [19] Stein U, Walther W, Arlt F, et al. MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis [J]. Nat Med, 2009, 15(1): 59–67.
- [20] Belalcázar A, Azaña D, Pérez CA, et al. Targeting the *Met* pathway in lung cancer [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2012, 12(4): 519–528.