

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.10.011

PEI-CS/siRNA 复合颗粒对肝癌耐药细胞 BEL7402/5-FU 中 MRE11 表达的影响 *

潘 杰¹ 朱欣婷^{1,2} 刘 云^{2,3} 谢星星³ 侯玉群^{1,2} 李长福^{1,2} 范 芳^{1,2,Δ}

(1 遵义医学院基础医学院 贵州 遵义 563099; 2 贵州省普通高等学校特色药物肿瘤防治特色重点实验室 贵州 遵义 563099; 3 遵义医学院医学与生物学研究中心 贵州 遵义 563099)

摘要 目的:探讨聚乙烯亚胺-壳聚糖(PEI-CS)/siRNA 复合颗粒对肝癌耐药细胞 BEL7402/5-FU 中 MRE11 表达的影响。**方法:**采用复凝聚法将 PEI-CS(100 μg/mL)与不同浓度的 MRE11 siRNA-FAM 形成 PEI-CS/siRNA 复合颗粒,并转染 BEL7402/5-FU 细胞,用荧光显微镜和 Real-time PCR 检测转染效率和沉默效率。**结果:**荧光显微镜观察结果显示:转染细胞 48 h 后,3.125、6.25、12.5、25、50 μg/mL 的 siRNA 与 PEI-CS 形成的复合颗粒的转染率分别为 62.31%、76.09%、79.99%、86.49%、96.59%。转染细胞 48、72、96 h 后,12.5 μg/mL 的 siRNA 与 PEI-CS 形成的复合颗粒的转染率分别为 78.22%、55.76%、42.85%,25 μg/mL 的 siRNA 与 PEI-CS 形成的复合颗粒的转染率分别为 83.67%、74.23%、67.45%。Real-time PCR 检测结果显示:25 μg/mL 的 siRNA 与 PEI-CS 形成的复合颗粒转染 48 小时后,对 BEL7402/5-FU 细胞中 MRE11 基因的沉默效率为 35.4%。**结论:**聚乙烯亚胺-壳聚糖/siRNA 复合颗粒能有效转染肝癌耐药细胞 Bel7402/5-FU,并对 BEL7402/5-FU 细胞中 MRE11 基因表达有一定抑制作用。

关键词:聚乙烯亚胺-壳聚糖;复合颗粒;减数分裂重组蛋白 11;RNA 干扰;Bel7402/5-FU

中图分类号:R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)10-1844-04

Effect of PEI-CS/siRNA Composite Particles on Multidrug-resistant Hepatocellular Carcinoma Cell Line BEL7402/5-FU in MRE11 Gene Expression*

PAN Jie¹, ZHU Xin-ting^{1,2}, LIU Yun^{2,3}, XIE Xing-xing³, HOU Yu-qun^{1,2}, LI Chang-fu^{1,2}, FAN Fang^{1,2,Δ}

(1 Basic Medical College, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou, 563099, China; 2 Guizhou Provincial College-based Key Lab for Tumor Prevention and Treatment with Distinctive Medicines, Zunyi, Guizhou, 563099, China; 3 Medical and Biological Research Center, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou, 563099, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of PEI-CS/siRNA nanoparticles on gene expression of multidrug-resistant hepatocellular carcinoma cell line BEL7402/5-FU in MRE11. **Methods:** BEL7402/5-FU was transfected with PEI-CS/siRNA nanoparticles, which were prepared with PEI-CS (100 μg/mL) and different concentration of MRE11 siRNA-FAM by condensation method. Then, the rate of transfection was observed by fluorescence microscopy, the silencing efficiency was assessed by Real-time PCR. **Results:** As shown by fluorescence microscopy, when the cell was transfected after 48 hours using nanoparticles which were prepared with PEI-CS at different concentration of siRNA (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 μg/mL), the transfection efficiency showed 62.31%, 76.09%, 79.99%, 86.49%, and 96.59%, respectively. When the cell was transfected with nanoparticles at the concentration of 12.5 μg/mL for different times (48, 72, 96 h), the transfection efficiency was 78.22%, 55.76% and 42.85%, respectively. However, under the test conditions above, the transfection efficiency were respectively turned into 83.67%, 74.23% and 67.45%, when the concentration of nanoparticles was 25 μg/mL. Real-time PCR results showed that the efficiency of RNA interference for MRE11 was 35.4% by PEI-CS/siRNA nanoparticles at the concentration of 25 μg/mL. **Conclusions:** PEI-CS/siRNA nanoparticles can not only effectively transfect multidrug-resistant hepatocellular carcinoma cell line BEL7402/5-FU, but also down-regulate expression levels of gene MRE11.

Key words: Polyethyleneimine-chitosan; Composite particles; MRE11; RNA interference; BEL7402/5-FU

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)10-1844-04

前言

近年来, RNAi 技术在肿瘤基因治疗方面取得巨大进展。由

于 RNA 的强阴离子磷酸二酯骨架, 裸 siRNA 不能自由穿越细胞膜, 所以需要一种可靠、高效的递送载体使其进入细胞, 发挥作用^[1]。目前常用递送载体包括病毒载体和非病毒载体两大类

* 基金项目: 贵州省科技厅社会发展攻关项目(黔科合 SY[2013]3008); 遵义医学院招标项目(F-614);

遵义市红花岗区科技基金(遵红科合社字[2009]18); 贵州省教育厅特色重点实验室建设项目(黔教合 KY 字[2014]212)

作者简介: 潘杰(1986-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 肿瘤分子生物学, E-mail: 121125307@qq.com

Δ 通讯作者: 范芳, E-mail: fanf1970@126.com

(收稿日期: 2014-10-25 接受日期: 2014-11-22)

[2]。病毒载体虽能达到高效转染,但由于其存在潜在的安全隐患,一定程度上限制了其医学应用[3,4]。而非病毒载体因低免疫原性、无插入基因大小限制、易于生产等优点,受到广泛青睐。在众多非病毒载体中,壳聚糖是被人们关注得比较多的一种非病毒基因递送载体,因其具有低毒性、生物相容性、降解能力良好,而被修饰后广泛应用[5,6]。Zhao 等已利用聚乙烯亚胺-壳聚糖(Polyethylenimine-chitosan, PEI-CS)用于质粒 DNA 的递送,并取得了良好的转染效果[7]。

减数分裂重组蛋白 11 (Meiotic recombination 11, MRE11) 是 MRN 复合物(MRE11/RAD50/NBS1)重要组分之一。有报道指出,它的表达量与肿瘤的恶性程度相关,且在肿瘤的发生中有相当大的作用[8]。本课题组前期研究发现,以阳离子脂质体转染法,将 shMRE11 质粒载体转染人肝癌耐药细胞 BEL7402/5-FU,能有效抑制 MRE11 的表达[9]。由于 shRNA 质粒表达 siRNA 的效率易受细胞状态的影响,在研究化疗药物与 siRNA 联用抑制肿瘤的过程中,难以获得好的效果。因此本研究以 PEI-CS 为载体,将 PEI-CS 与 MRE11 siRNA-FAM 形成 PEI-CS/siRNA-FAM 复合颗粒,通过体外转染肝癌耐药细胞 BEL7402/5-FU,观察 PEI-CS/siRNA-FAM 复合颗粒的转染率及对 MRE11 的沉默率,以期开展化疗药物与 siRNA 联用,克服肝癌细胞的多药耐药性打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

BEL7402/5-FU 细胞株(南京凯基生物科技发展有限公司); CDI (N,N'-羰基二咪唑,上海生工生物工程公司);聚乙烯亚胺(MW1800, 99%,上海晶纯实业有限公司);壳聚糖(浙江金壳药业有限公司);MRE11 siRNA 序列为 5'-AAGAACCUGGUC-CCAGAGGAG-3',参考文献[10]合成,并标记 FAM 荧光基团(上海吉玛制药技术有限公司);1640 培养基(Hyclone 公司)。

1.2 方法

1.2.1 聚乙烯亚胺-壳聚糖(PEI-CS)的制备 取 0.5 g 壳聚糖(CS)溶于 20 mL 0.5%醋酸,待完全溶解后加入 0.223 g CDI,反应 1 h 后加入 0.0295 g PEI,室温反应过夜,再透析 48 h 后,取出透析液冷冻干燥,即得[11]。

1.2.2 BEL7402/5-FU 细胞培养 将 BEL7402/5-FU 细胞于含 10%胎牛血清、20 μ g/mL 5-FU 的 DMEM 培养液,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。细胞贴壁生长,每天换液 1 次,2-3d 传代一次,取对数期细胞用于实验[12]。

1.2.3 复凝聚法 PEI-CS/siRNA-FAM 复合颗粒的制备 将 4 mg PEI-CS 溶于 40 mL 10 mM 醋酸,用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,配成 100 μ g/mL PEI-CS,55 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。用 50 mM 的硫酸钠将 siRNA-FAM 分别稀释成 3.125、6.25、12.5、25、50 μ g/mL 的浓度,稀释后分别与 PEI-CS 等体积混合,涡旋 25 sec 后,在室温下静置 30 min,制备出不同 siRNA 浓度的复合颗粒(PEI-CS/siRNA-FAM),即质量比(m_0/m_i)分别为 32、16、8、4、2 的五个样本(m_0 为 PEI-CS, m_i 为 siRNA)。

1.2.4 BEL7402/5-FU 细胞转染 将 BEL7402/5-FU 细胞以 4×10^5 个/孔的密度接种于 24 孔培养板,当融合度达到 80% 左右时,吸去各孔的培养液,将五个 PEI-CS/siRNA-FAM 复合

颗粒样本,加至相应培养孔中,每孔加 100 μ L,用培养基补足到 500 μ L,8 h 后换液。转染 48 h 后,荧光显微镜下计数。转染效率 = 每个视野下的荧光细胞个数 / 相同视野下的细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.2.5 Real-time PCR 检测 MRE11 mRNA 水平的表达 实验共分为 4 组:空白对照组、PEI-CS 组、siRNA-FAM 组、PEI-CS/siRNA-FAM 实验组。用 $m_0/m_i=4$ 的 PEI-CS/siRNA-FAM 转染 BEL7402/5-FU 48 h 后,按 RNAiso Plus 试剂盒说明书,提取各组细胞总 RNA。Real-time PCR 引物:MRE11 上游 5'-GTGGACAAGGAGAGAAAGATG-3';下游 3'-TACTT-CAGGCACTCCGATACTG-5',扩增片段长度为 188 bp。 β -actin 上游 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3';下游 3'-CTAAGT-CATAGTCCGCTAGAAGCA-5',扩增片段长度为 232 bp。用 Real-time PCR 仪检测各组样品 MRE11 mRNA 表达量,根据 Ct 值通过公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行相对定量分析计算可得 MRE11 mRNA 相对表达量。

1.3 统计学处理

以上实验均重复 3 次,实验结果均用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,资料经正态性及方差齐性检验后,行单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PEI-CS/siRNA-FAM 转染效率的检测

2.1.1 不同浓度 PEI-CS/siRNA 对 BEL7402/5-FU 的转染率 PEI-CS/siRNA 转染 BEL7402/5-FU 细胞 48 h 后,质量比(m_0/m_i)分别为 32、16、8、4、2 的转染效率分别为 62.31%、76.09%、79.99%、86.49%、96.59%,呈现明显的剂量依赖性(图 1)。另外,转染后荧光显微镜成像情况(图 2)也表明,携有 FAM 的复合颗粒能够很容易进入胞内,且用 25 μ g/mL siRNA 制备的复合颗粒,转染效率明显强于 12.5 μ g/mL。

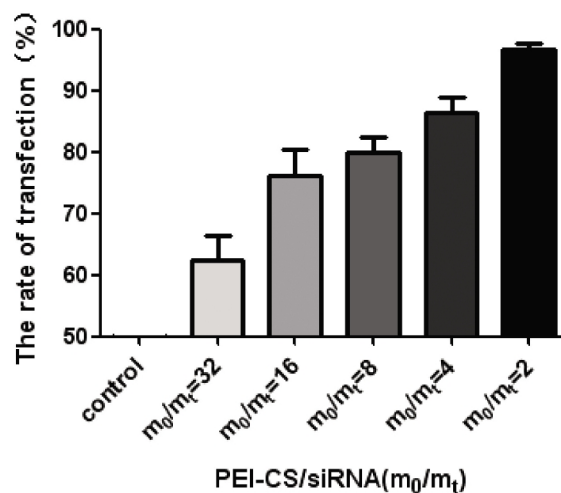


图 1 PEI-CS/siRNA-FAM 转染 BEL7402/5-FU 48h 的转染率, control:

siRNA=50 μ g/mL; m_0 :PEI-CS 浓度, m_i : siRNA 浓度

Fig. 1 The transfection efficiency of PEI-CS/siRNA-FAM in BEL7402/5-FU after transfected 48 h, control: siRNA=50 μ g/mL; m_0 : PEI-CS concentration, m_i : siRNA concentration

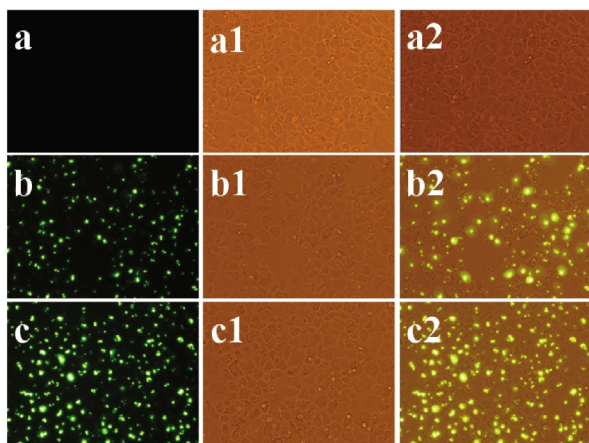


图2 PEI-CS/siRNA-FAM 转染后荧光显微镜成像情况(200×),
a: $m_0/m_1=0$, b: $m_0/m_1=8$, c: $m_0/m_1=4$; 荧光光源(a, b, c), 明场(a1, b1, c1),
明场 + 荧光光源(a2, b2, c2)

Fig. 2 The microscope image of PEI-CS/siRNA-FAM after transfection at
different test conditions after transfection conditions(200×),
a: $m_0/m_1=0$, b: $m_0/m_1=8$, c: $m_0/m_1=4$, Fluorescence(a, b, c), Bright field
(a1, b1, c1), Merged images from bright field and fluorescence (a2, b2, c2)

2.1.2 转染时间对转染效率的影响 分别用 $m_0/m_1=8, 4$ 的 PEI-CS/siRNA 复合颗粒考察不同转染时间对转染效率的影响。如图3显示, $m_0/m_1=4$ 的 PEI-CS/siRNA 转染 96 h 后, 与 48

和 72 h 比较, 仍保持较高的水平; 而 $m_0/m_1=8$ 的 PEI-CS/siRNA 转染 72 和 96 h 后, 转染效率下降明显。

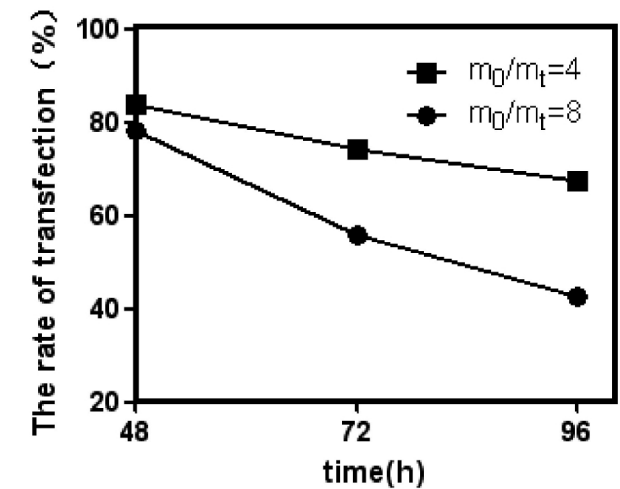


图3 转染时间对 PEI-CS/siRNA 的转染效率的影响
Fig. 3 The effect of transfection time on the Transfection rate
of PEI-CS / siRNA

2.2 Real-time PCR 检测 Mre11 mRNA 水平的沉默效率
转染 48h 后, 由表 1 和图 4 可见: PEI-CS/ siRNA 转染组中 MRE11 mRNA 的表达比空白对照组低 ($P<0.05$), 且 MRE11 mRNA 水平的沉默效率为 35.4%。

表 1 各组细胞 MRE11 mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 The Relative expression levels of MRE11 mRNA for different groups($\bar{x} \pm s, n=3$)

Groups	MRE11 mRNA level (Ct Value)	β -actin mRNA level (Ct Value)	MRE11 Fold Change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Control group	27.392 $\pm$ 0.337	15.283 $\pm$ 1.071	1.000 $\pm$ 0.000
PEI-CS group	27.202 $\pm$ 0.241	15.417 $\pm$ 1.271	0.917 $\pm$ 0.054
siRNA group	27.282 $\pm$ 0.474	15.216 $\pm$ 1.296	0.948 $\pm$ 0.162
PEI-CS/ siRNA group	27.915 $\pm$ 0.235**	15.583 $\pm$ 1.508	0.646 $\pm$ 0.059**

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

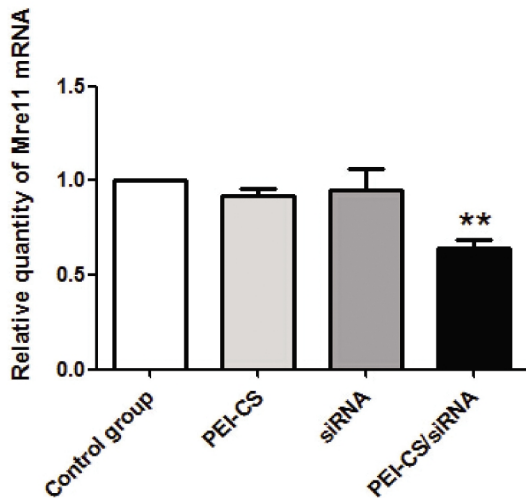


图4 各组细胞 Mre11 mRNA 相对表达量($n=3$), 与对照组相比, ** $P<0.05$
Fig. 4 The rate of DNA synthesis for different groups (%), $\bar{x} \pm s, n=3$),
compared with the control group, ** $P<0.05$

3 讨论

既往研究表明, 聚乙烯亚胺(Polyethylenimine, PEI)和壳聚糖(Chitosan, CS)作为非病毒载体被广泛地用于基因递送。PEI 由于其阳离子特性和质子缓冲能力, 被认为是用于基因递送的最有效的阳离子聚合物之一^[13,14]。然而, PEI 的高细胞毒性阻碍了其应用^[15]。另一方面, 众所周知, CS 有高阳离子电势和较低细胞毒性的, 是一种具有生物相容性和生物降解性的材料^[16]。但是, CS 的低转染效率显著地限制了其在基因递送中的应用^[17]。PEI-CS 作为载体进行质粒 DNA 转染时, 易于其形成纳米粒, 与其有良好的链接力, 并能够使其免受核酸酶的降解, 便于细胞摄取和内体逃逸^[18]。与 PEI 25KDa 相比, PEI-CS 的毒性更低, 且在 HepG2, A549 和 HeLa 细胞系中都表现出高的转染效率^[19]。

本实验考察了不同质量比的 PEI-CS/siRNA 复合颗粒对 BEL7402-5FU 细胞进行 siRNA 转染后, 对转染效率和持续性的影响。结果表明 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ siRNA 与相

同浓度的 PEI (100 $\mu\text{g/mL}$) 形成质量比为 32,16,8,4,2 的 PEI-CS/siRNA 复合颗粒,转染细胞 48h 后,转染效率随着 siRNA 浓度的增加而增加,与对照组比较差异有统计学意义,且在 50 $\mu\text{g/mL}$ 范围内呈现剂量依赖性。用质量比为 8,4 的 PEI-CS/siRNA 复合颗粒转染细胞 48,72,96 h 后,质量比为 4 的 PEI-CS/siRNA 复合颗粒转染效率的下降幅度与质量比为 8 的相比较差异较小,说明质量比为 4 的 PEI-CS/siRNA 复合颗粒转染的持续性更好。为了了解 PEI-CS/siRNA 复合颗粒转染 BEL7402-5FU 细胞后,对 MRE11 基因的沉默效果。我们以有较高转染效率且转染持续性良好的质量比为 4 的 PEI-CS/siRNA 复合颗粒转染 BEL7402-5FU 细胞,Real-time PCR 检测 MRE11 mRNA 水平的表达量,与对照组相比较,有较大差异,进一步说明了 PEI-CS/siRNA 复合颗粒能够进入 BEL7402-5FU 细胞,且对 MRE11 基因的表达有抑制作用。

肿瘤化学疗法是当今治疗肿瘤的重要方法之一,然而由于多药耐药(multidrug resistance, MDR)^[20]的存在,不能得到良好的化疗效果。RNAi 技术因其能特异地沉默肿瘤靶基因,抑制肿瘤生长,现在更多用于一些抗肿瘤耐药的研究^[21,22]。而临床常用的肿瘤治疗方法中,绝大多数是通过破坏 DNA 而实现的。MRE11 在 DNA 双链断裂(double stranded breaks, DSBs)修复中发挥重要作用^[23],不但是 DNA 损伤的感受器,而且是 DNA 修复的启动因子,还能修饰受损的 DNA 分子^[24,25]。本研究利用 PEI-CS 与 MRE11 siRNA-FAM 形成 PEI-CS/siRNA-FAM 复合颗粒,并成功实现了持续转染和对 MRE11 表达抑制,为课题组今后开展化疗药物与 siRNA 联用,克服肝癌细胞多药耐药的研究打下了坚实基础。

参考文献(References)

- [1] Kim WJ, Kim SW. Efficient siRNA delivery with non-viral polymeric vehicles[J]. *Pharm Res*, 2009, 26(3): 657-666
- [2] Liu Jue-zhao, Xin Mei-hua, Li Ming-chun. Research progress in chitosan derivatives for non-viral gene deliveries [J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2010, 29(8): 1485-1491
- [3] Huang PI, Lo WL, Cherng JY, et al. Nonviral delivery of RNA interference targeting cancer cells in cancer gene therapy [J]. *Curr Gene Ther*, 2012, 12(4): 275-284
- [4] Rekha MR, Sharma CP. Polymers for gene delivery: current status and future perspectives[J]. *Recent Pat DNA Gene Seq*, 2012, 6(2): 98-107
- [5] Wong K, Sun G, Zhang X, et al. PEI-g-chitosan, a novel gene delivery system with transfection efficiency comparable to polyethylenimine in vitro and after liver administration in vivo [J]. *Bioconj Chem*, 2006, 17(1): 152-158
- [6] Carrillo C, Suñé JM, Pérez-Lozano P, et al. Chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery systems: determination of loading efficiency[J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68(6): 775-783
- [7] Zhao QQ, Chen JL, Han M, et al. Combination of poly(ethylenimine) and chitosan induces high gene transfection efficiency and low cytotoxicity[J]. *Biosci Bioeng*, 2008, 105(1): 65-68
- [8] Shyng-Shiou F, Yuan, Ming-Feng Hou, et al. Role of Mre11 in cell Proliferation, tumor invasion, and DNA repair in Breast cancer[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2012, 104(19): 1485-1502
- [9] Fan Fang, Geng Lei, Li Da-yu, et al. ShRNA-mediated MRE11 gene silencing inhibits DNA repair in multidrug-resistant hepatocellular carcinoma cell line BEL7402/5-FU [J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2013, 21(29): 3053-3058
- [10] Xu M, Myerson RJ, Hunt C, et al. Transfection of human tumour cells with Mre11 siRNA and the increase in radiation sensitivity and the reduction in heat-induced radiosensitization [J]. *International Journal of Hyperthermia*, 2004, 20(2): 157-162
- [11] Jiang HL, Kwon JT, Kim EM, et al. Galactosylatedpoly(ethyleneglycol)-chitosan-graft-polyethylenimine as a gene carrier for hepatocyte-targeting [J]. *Journal of Controlled Release*, 2008, 131(2): 150-157
- [12] Liang Dami, Shu Bo, Yang Jiawei, et al. Effects of DNA-PKcs gene silence on drug resistance of multidrug-resistant hepatocellular carcinoma cell line BEL7402/5-FU [J]. *Journal of Zunyi Medical University*, 2014, 37(3): 304-307
- [13] Ziebarth JD, Wang Y. Understanding the protonation behavior of linear polyethylenimine in solutions through Monte Carlo simulations [J]. *Biomacromolecules*, 2010, 11(1): 29-38
- [14] Zhu Qing, Liu Ke-hai, Wang Xiao-yu, et al. Application of polyethyleneimine and chitosan as gene carriers [J]. *Pharm Care Res*, 2013, 13(6): 445-448
- [15] Zhao QQ, Chen JL, LÜT F, et al. N/Pratiosignificantly influences the transfection efficiency and cytotoxicity of apolyethylenimine/chitosan/DNA complex[J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(4): 706-710
- [16] Miao Pei-hong, He Cai-xia, Gao Jian-qing, et al. Progress of PEI-based Cationic Polymers as Non-viral Gene Vectors [J]. *Chin JMAP*, 2011, 28(6): 505-510
- [17] Gaymes TJ, Mohamedali AM, Patterson M, et al. Microsatellite instability induced mutations in DNA repair genes CtIP and MRE11 confer hypersensitivity to poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in myeloid malignancies[J]. *Haematologica*, 2013, 98(9): 1397-1406
- [18] Lu H, Dai Y, Lv L, et al. Chitosan-graft-polyethylenimine/DNA nanoparticles as novel non-viral gene delivery vectors targeting osteoarthritis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84703
- [19] Gao JQ, Zhao QQ, Lv TF, et al. Gene-carried chitosan-linked-PEI induced high gene transfection efficiency with low toxicity and significant tumor-suppressive activity[J]. *Int J Pharm*, 2010, 387(1-2): 286-294
- [20] Wang Xiu-mei, Peng Wen-xing, Wen Xiao-ke. Progress in Signal Transduction Mechanisms for Transcriptional Regulation of the MDR1 Gene[J]. *Guide of China Medicine*, 2012, 10(30): 436-440
- [21] Chen Guiyuan, Tan Deyong. The Research Status and Application Prospect of RNA Interference[J]. *Journal of Dali University*, 2012, 11(10): 52-55
- [22] Cai B, Miao Y, Liu Y, et al. Nuclear multidrug-resistance related protein 1 contributes to multidrug-resistance of mucoepidermoid carcinoma mainly via regulating multidrug-resistance protein 1: a human mucoepidermoid carcinoma cells model and Spearman's rank correlation analysis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e69611
- [23] Yamaguchi-Iwai Y, Sonoda E, Sasaki MS, et al. Mre11 is essential for the maintenance of chromosomal DNA in vertebrate cells [J]. *EMBO J*, 1999, 18(23): 6619-6629
- [24] Liao S, Guay C, Toczylowski T, et al. Analysis of MRE11's function in the 5'-->3' processing of DNA double-strand breaks [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(10): 4496-4506
- [25] Foster SS, Balestrini A, Petrini JH. Functional interplay of the Mre11 nuclease and Ku in the response to replication-associated DNA damage[J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(21): 4379-4389