

survivin反义寡核苷酸对肝癌细胞生长抑制作用的研究

陈 涛, 贾玉容, 赵铁军, 尹致良

陈涛, 贾玉容, 赵铁军, 尹致良, 中国人民解放军成都军区总医院全军普通外科中心 四川省成都市 610083
陈涛, 男, 1970-11-05 生, 四川省成都市人, 汉族. 2002 年获第三军医大学普通外科博士学位, 主治医师. 主要从事肝脏、胆道外科研究.
项目负责人: 陈涛, 610083, 四川省成都市, 中国人民解放军成都军区总医院全军普通外科中心.
电话: 028-86570353
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-02-24

Inhibitory effect of antisense oligonucleotide on the expression of survivin gene and proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721

Tao Chen, Yu-Rong Jia, Tie-Jun Zhao, Zhi-Liang Yin

Tao Chen, Yu-Rong Jia, Tie-Jun Zhao, Zhi-Liang Yin, Center of General Surgery, General Hospital of Chengdu Command Area, Chengdu 610083, Sichuan Province, China
Correspondence to: Tao Chen, Center of General Surgery, General Hospital of Chengdu Command Area, Chengdu 610083, Sichuan Province, China.
Received: 2004-01-15 Accepted: 2004-02-24

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effect of survivin antisense oligonucleotide (ASODN) on the expression of survivin gene and proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721.

METHODS: The 20mer antisense oligonucleotide (ASODN) targeted to the promotor region of survivin mRNA was designed and synthesized. The expression of survivin gene in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 was blocked by means of ASODN transfection mediated by DOTAP liposomal reagent. The changes of survivin protein and mRNA expression after transfection were assessed by Western blot and in situ hybridization, respectively. The apoptotic rate was detected by flow cytometer. The changes of cell adherent rate, cell growth activity, and the inhibitory rate of cell growth were also studied.

RESULTS: The expression of survivin protein and mRNA was decreased markedly after survivin ASODN transfection (69.59 vs 10.71, and 75.61 vs 22.94, $P < 0.01$). Meanwhile, the cell adherent rate also decreased markedly (90.68% vs 33.16%, $P < 0.01$) while the apoptotic rate increased markedly (0.7% vs 31.35%, $P < 0.01$). The inhibitory effect on the cell growth could maintain about a week after transfection, and the highest inhibitory rate could be 71.8% three days after transfection.

CONCLUSION: Transfection of ASODN targeted to the promotor region of survivin mRNA by DOTAP liposomal transfection reagent can down-regulate the expression of survivin protein and mRNA significantly in 7721 cell line and

inhibit the proliferation of cancer cells. survivin may be an important target in the therapy of hepatocellular carcinoma.

Chen T, Jia YR, Zhao TJ, Yin ZL. Inhibitory effect of antisense oligonucleotide on the expression of survivin gene and proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1546-1549

摘要

目的: 采用反义寡核苷酸封闭肝癌细胞中survivin基因的表达, 研究其对肝癌细胞生长的抑制作用.

方法: 针对survivin mRNA翻译起始位点设计并合成反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASODN); 采用脂质体介导 survivin ASODN 转染人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞, western-blot 及原位杂交方法检测 survivin 蛋白及 mRNA 表达, 流式细胞仪检测细胞凋亡率的变化, 检测转染前后细胞贴壁率及细胞生长抑制率变化, 绘制细胞生长曲线.

结果: 脂质体介导 survivin 反义寡核苷酸转染肝癌细胞后 survivin 蛋白及 mRNA 表达分别从 69.59 及 75.61 降低至 10.71 及 22.94, 细胞贴壁率从 90.68% 降低至 33.16%, 细胞凋亡率从 0.7% 增加至 31.35%, 均有显著差异. 转染后对细胞生长的抑制作用可以维持大约 1 wk, 在转染后第 3 d 抑制率最高可达 71.8%.

结论: 脂质体介导转染 survivin 反义寡核苷酸可以有效降低细胞内 survivin 基因的表达, 诱导细胞发生凋亡, 抑制肝癌细胞生长.

陈涛, 贾玉容, 赵铁军, 尹致良. survivin 反义寡核苷酸对肝癌细胞生长抑制作用的研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1546-1549

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1546.asp>

0 引言

目前肝癌的治疗方法主要集中在抑制肝癌细胞增生和促进肝癌细胞凋亡两个方面^[1-14], 由于抑制细胞增生的方法对正常肝组织也可能造成较大损伤, 因此诱导肝癌细胞凋亡的方法可能更为合理. survivin 是新近发现的一种抑制细胞凋亡蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)家族成员, 仅特异性地表达于肿瘤组织, 在正常成人组织几乎不表达, 通过阻断细胞凋亡的发生过程, 在促进肿瘤的发生发展过程中发挥重要的作用^[15-25]. 本研究采用针对 survivin mRNA 设计的 ASODN, 通过脂质体介导转染人肝癌细胞 SMMC-7721 抑制其 survivin 的

表达, 并对其对 SMMC-7721 细胞的生长抑制作用进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株 SMMC-7721 为本中心自存, 水浴复苏后调节至 $1 \times 10^6/L$, 接种于 30 mL 培养瓶及铺有无菌盖玻片的 6 孔培养板, 以含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养液, 置于 37℃, 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养, 隔日换液, 常规培养至 80% 汇片后进行转染。硫代磷酸型寡核苷酸由上海生工生物工程公司合成, 序列如下: 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASODN)序列 5' GGGGCACCCATGCCGCCGCC3'; 正义寡核苷酸(sense oligonucleotide, SODN) 序列: 5' GGCGGCGGCATGGGTGCCCC3'。两条序列均采用硫代磷酸型, 即在合成时用巯基取代寡核苷酸片段磷上的羟基。按照 DOTAP 脂质体转染试剂盒(Roche, USA)说明进行转染。

1.2 方法 根据转染复合物浓度分为 6 组, 1 组: 以无血清 RPMI1640 培养液代替转染复合物作为空白对照组; 2 组: 1 000 μg/L SODN 转染组; 3 组: 400, 600, 800, 1 000 μg/L ASODN 转染组; 每组设 5 组平行分组, 转染进行 24 h 后结束转染用 Western-blot 检测 survivin 蛋白的表达。收集 5×10^6 个细胞, 含 1 mmol/L PMSF(Merk, USA)的细胞裂解液裂解细胞, 提取总蛋白质, 紫外分光光度法蛋白定量。40 μg 蛋白进行 120 g/L 十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳(Bio-Rad, USA), 以蛋白电泳转引仪(Bio-Rad, USA)将产物转至 PVDF 膜; 将膜 4 封闭过夜, TBST 洗膜, 加入 1: 1000 羊抗人 survivin (Santa-Cruz, USA), 4℃ 摇床孵育过夜, TBST 洗膜, 加入 1: 4 000 兔抗羊 IgG/HRP(Santa-Cruz, USA)室温孵育 90 min, TBST 洗膜, Lumiglo 化学发光试剂反应 1 min, X 片暗室曝光, 常规显影定影。图像以 Bio-Rad 图像分析系统分析, 以相应蛋白条带的平均光强度值表示 p38MAPK 表达的相对强度。

1.2.1 原位杂交检测 survivin mRNA 的表达 survivin cDNA 载体质粒为 pcDNA3.1(Invitrogen, USA), 按照质粒抽提纯化试剂盒(上海华舜, 中国)说明书将质粒转化、扩增、抽提、纯化, 以内切酶 EcoRI(Gibco, USA)将质粒线性化, 按 Dig-RNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim, German)说明以地高辛标记探针; 细胞铺片转染结束后, 以地高辛标记探针进行杂交, NBT-BCIP 显色液 40 μL 显色, 镜下观察, 适时终止显色。随机选择 5 个 200 倍视野, 计数细胞总数及染色阳性细胞数, 计算杂交阳性率=(杂交阳性细胞数/总细胞数)×100%。杂交前用 RNase 100 mg/L, 37℃ 1 h 预处理细胞片作阴性对照。用不含 survivin 反义 cRNA 探针的杂交缓冲液检测作空白对照。

1.2.2 细胞增殖活性测定 在 6 孔培养板内进行转染,

转染结束后换新鲜培养液继续培养 24 h 后终止培养, 倒置显微镜下观察细胞生长情况, 每孔分别随机计数 5 个 20×10 倍视野下贴壁细胞数及全部细胞数, 根据公式计算细胞贴壁率(%)=(贴壁细胞数/全部细胞数)×100%。收集 ASODN 转染后的各组细胞, 调整至 $1.5 \times 10^7/L$, 接种于 96 孔板, 每孔 200 μL, 每组细胞接种 5 复孔, 共接种 7 板, 继续常规培养。每日取出一板, 弃去培养液, 生理盐水漂洗两遍, 5 g/L 结晶紫溶液染色, PBS 冲洗, 50℃ 烘干, 加入 10 g/L SDS 溶液振荡溶解, 酶联免疫仪于 540 nm 读取 A 值。以 A 值为纵坐标, 以时间(d)为横坐标绘制生长曲线。计算细胞生长抑制率(%)=[1-(试验组 A 值/空白对照组 A 值)]×100%。收集 2×10^6 个细胞, 预冷的 700 mL/L 乙醇 4℃ 固定 24 h, PBS 洗涤 3 次, 细胞重悬于 PBS 0.4 mL 中, 加入 5 g/L 的 RNase A 10 μL 37℃ 孵育 1 h, 1 g/L PI 4℃ 染色过夜, 流式细胞仪检测凋亡细胞的比率。Multicycle 软件进行数据处理。

统计学处理 结果以均数±标准差(mean±SD)表示, 采用 SPSS10.0 软件进行 χ^2 检验、方差分析和 q 检验分析。

2 结果

2.1 survivin 蛋白和 survivin mRNA 的表达 survivin 蛋白在人肝癌细胞 SMMC-7721 中高度表达, western blot 检测表明, SODN 转染组较正常对照组无明显变化; 600, 800 及 1 000 μg/L ASODN 组转染后 survivin 蛋白表达较正常对照及 SODN 转染组显著降低, 其中 1 000 μg/L 组转染结束后 survivin 蛋白表达仅为空白对照组的 15.4% (图 1, 表 1)。survivin mRNA 原位杂交产物呈蓝紫色,

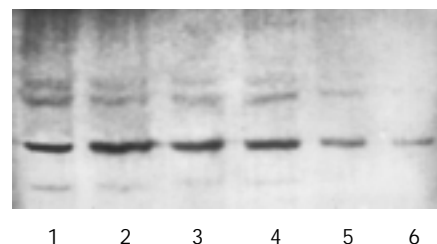


图 1 SMMC-7721 人肝癌细胞株 survivin 蛋白的表达 Western-blot 1: 空白对照组; 2: 正义对照组; 3: 400 μg/L ASODN 组; 4: 600 μg/L ASODN 组; 5: 800 μg/L ASODN 组; 6: 1 000 μg/L ASODN 组。

表 1 survivin ASODN 转染后细胞内 survivin 蛋白及 mRNA 表达的变化(mean±SD)

分组	蛋白表达	mRNA 表达(%)
空白对照	69.59	75.61 ± 4.05
SODN	70.81	75.46 ± 4.48
400 μg/LASODN 转染	52.72	61.83 ± 3.26
600 μg/LASODN 转染	43.13	53.99 ± 2.82
800 μg/LASODN 转染	25.82	28.21 ± 3.11 ^b
1 000 μg/LASODN 转染	10.71	22.94 ± 2.46 ^b

^bP < 0.01 vs control.

主要分布于细胞质内. 经survivin ASODN作用后survivin mRNA 表达呈逐渐降低的趋势. 统计分析表明, 800 及 1 000 $\mu\text{g/L}$ ASODN组 survivin mRNA 杂交阳性率分别为 $28.2 \pm 3.1\%$ 和 $22.9 \pm 2.5\%$, 较正常对照及 SODN 转染组显著降低(图 2AB, 表 1).

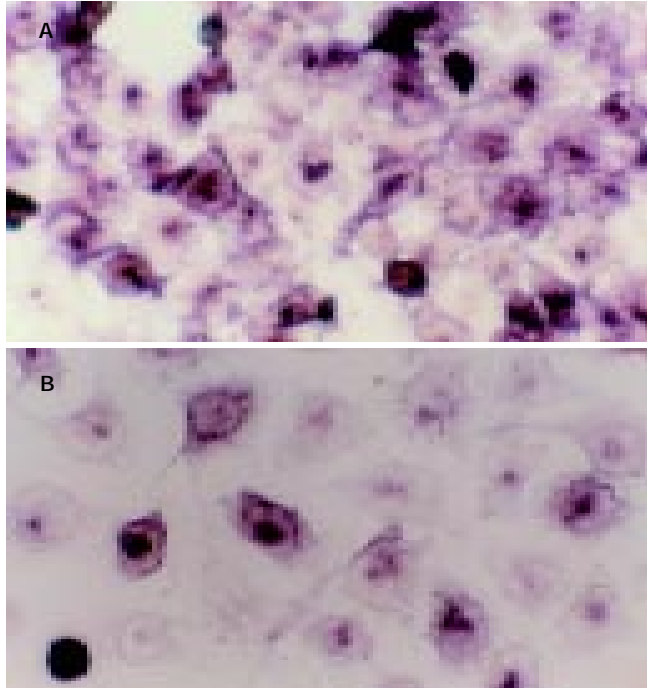


图2 SMMC-7721 人肝癌细胞株 原位杂交 $\times 400$. A: survivin mRNA 强阳性. B: 转染 survivin ASODN 后 survivin mRNA 明显减弱.

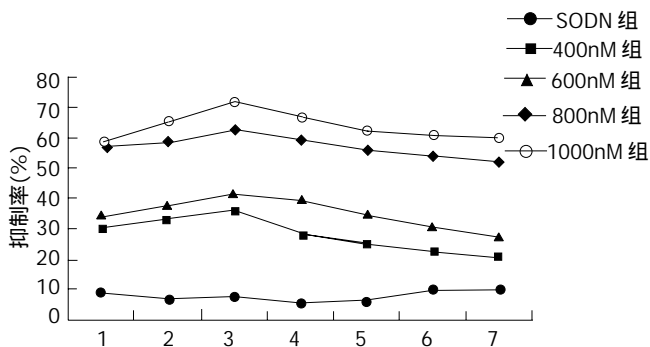


图3 细胞生长抑制率变化.

2.2 SMMC-7721细胞的增生活性 倒置显微镜下观察, 空白对照以及正义对照组细胞生长良好, 接种 4 h 后大多数细胞已贴壁生长, 形状舒展. survivin ASODN 转染后的细胞贴壁较晚, 随时间推移, 贴壁细胞减少, 24 h 后多数细胞呈悬浮状态. 经 survivin ASODN 作用后细胞贴壁率呈逐渐降低的趋势, 正义对照组及 400 $\mu\text{g/L}$ 组细胞贴壁率较空白对照组差异无显著性, 但 600, 800 及 1 000 $\mu\text{g/L}$ 组细胞贴壁率分别为 $74.9 \pm 2.1\%$ 、 $51.5 \pm 1.5\%$ 及 $33.2 \pm 2.0\%$, 较正常对照($90.7 \pm 1.9\%$)及 SODN 转染组($90.0 \pm 1.2\%$)显著降低($P < 0.05$, 0.01 和 0.01). 细胞增生活性空白对照以及正义对照组较高, survivin ASODN 处理后各组细胞增生活性均有不同程度降低,

在转染后 3 d 细胞生长抑制率最高, 其中 1 000 $\mu\text{g/L}$ 组在转染结束后第 3 d 对肝癌生长抑制率最高可达 71.8%, 其后逐渐缓慢下降, 至 7 d 仍可保持一定的生长抑制作用(图 3). 流式细胞仪定量检测凋亡细胞, 可见转染后 2 倍体峰(G1 期细胞)减少, G1 峰左侧出现明显的凋亡峰(亚二倍体峰). 各组细胞凋亡分别为 0.7%, 0.8%, 2.4%, 7.8%, 23.1% 及 31.4%, 实验组细胞凋亡均较对照组有显著增加.

3 讨论

研究发现 ASODN 可以在转录水平和翻译水平调节相关基因的表达^[26]. 随着 DNA 自动化合成技术的发展, 采用反义技术抑制和封闭特定基因的表达, 已经成为研究基因功能的重要方法以及基因治疗的重要组成部分. 我们设计了一种针对 survivin mRNA 翻译起始位点的 ASODN, 采用脂质体介导转染肝癌细胞 SMMC-7721, 以封闭 survivin 基因的表达, 并研究了其对肝癌细胞的生长抑制效应. 由实验结果可见, 我们针对 survivin mRNA 翻译起始位点设计的 ASODN 能够确实有效地封闭体外培养的肝癌 SMMC-7721 细胞 survivin 基因的表达, 并对抑制其生长活性具有明显的效果, 在转染后 3 d 抑制活性最高, 其后逐渐缓慢下降, 至转染后 7 d 仍能保持一定的抑制活性, 表明其药物作用效果具有一定的可持续性. ASODN 通过多种机制产生生物活性, 主要与 RNaseH 介导的靶 mRNA 水解, 以及由于 mRNA-DNA 异源双核酸分子所产生的空间位阻导致翻译停止有关^[27]. 我们发现, 经过 survivin ASODN 转染后, 细胞内 survivin 蛋白和 mRNA 的表达都降低, 但较小剂量(600 $\mu\text{g/L}$)的 ASODN 即可引起 survivin 蛋白表达的显著降低, 而同样剂量的 ASODN 还不足以引起 survivin mRNA 表达的显著变化, 当采用较大剂量(800 $\mu\text{g/L}$ 以上)的 ASODN 时才会引起 survivin mRNA 表达的显著降低, 说明 survivin ASODN 至少在蛋白翻译及 mRNA 转录两个水平发挥了作用, 其作用的差异可能与 ASODN 的设计有关. 本实验结果表明, 针对 survivin mRNA 翻译起始位点设计的 ASODN, 能够确实有效地封闭 survivin 的表达, 在 1 000 $\mu\text{g/L}$ 组, 可将 survivin 蛋白的表达下调 84.6%, 将其 mRNA 的表达下调 69.7%, 可用于特异性地阻断 survivin 表达以研究其功能并进行反义治疗.

ASODN 是目前最有可能应用于临床的基因疗法^[28]. 由于 survivin 仅特异性地表达于肿瘤组织, 在正常成人组织几乎不表达, 使得应用 survivin 特异性抗体免疫治疗以及反义 survivin 基因治疗具有良好的靶向性、特异性及安全性, 这是其特有的优点^[29-30]. 我们在前期研究中发现, survivin 在人肝癌组织中的表达与肝癌细胞的增生凋亡比及分化程度有关, 并可作为预后不良的重要指标^[31]. 因此我们进一步研究了封闭 survivin 的表达对肝癌细胞的生长抑制作用, 结果发现, 采用针对 survivin mRNA 翻译起始位点设计的 20 聚 ASODN, 在

其有效地下调survivin mRNA及蛋白的表达的同时细胞增生活性受到了明显的抑制,经survivin ASODN作用后细胞贴壁率呈逐渐降低的趋势,600、800及1 000 $\mu\text{g/L}$ ASODN组细胞贴壁率较正常对照及SODN转染组显著降低。此外,反义药物作用的持续性对于评价药物作用,特别是对于给药方案具有重要的参考价值。实验结果表明survivin ASODN转染后的作用具有一定的持续性,转染结束后各组细胞增生活性均有不同程度降低,说明采用ASODN封闭survivin的表达能够确实地抑制肝癌细胞的增生活性。

在调控凋亡的基因中,survivin的抑凋亡作用在肿瘤发生发展中的作用是十分重要的。我们观察到survivin ASODN转染能够抑制肝癌细胞的生长,由于survivin主要作为抑凋亡基因在细胞中发挥作用,因此我们进一步研究了survivin ASODN转染对肝癌细胞的生长抑制效应是否与诱导细胞凋亡有关。采用流式细胞仪检测凋亡细胞比率,结果发现随着survivin ASODN剂量的增加,转染后凋亡细胞的比率逐渐增加,较对照组有显著差异,这也为survivin基因在肝癌细胞中发挥抑凋亡作用提供了新的证据。

4 参考文献

- Shi M, Zhang B, Tang ZR, Lei ZY, Wang HF, Feng YY, Fan ZP, Xu DP, Wang FS. Autologous cytokine-induced killer cell therapy in clinical trial phase I is safe in patients with primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:1146-1151
- Ruzzenente A, Manzoni GD, Molfetta M, Pachera S, Genco B, Donataccio M, Guglielmi A. Rapid progression of hepatocellular carcinoma after Radiofrequency Ablation. *World J Gastroenterol* 2004;10:1137-1140
- Ouyang GL, Cai QF, Liu M, Chen RC, Huang Z, Jiang RS, Chen F, Hong SG, Bao SD. Growth arrest and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells induced by hexamethylene bisacetamide. *World J Gastroenterol* 2004;10:954-958
- Wang TE, Kao CR, Lin SC, Chang WH, Chu CH, Lin J, Hsieh RK. Salvage therapy for hepatocellular carcinoma with thalidomide. *World J Gastroenterol* 2004;10:649-653
- He C, Lao WF, Hu XT, Xu XM, Xu J, Fang BL. Anti-liver cancer activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand gene and its bystander effects. *World J Gastroenterol* 2004;10:654-659
- Gu S, Liu CJ, Qiao T, Sun XM, Chen LL, Zhang L. Inhibitory effect of antisense vascular endothelial growth factor 165 eukaryotic expression vector on proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:535-539
- Li ZM, Liu ZC, Guan ZZ, Zhu XF, Zhou JM, Xie BF, Feng GK, Zhu ZY, Jiang WQ. Inhibition of DNA primase and induction of apoptosis by 3', 3'-diethyl-9-methylthia-carbocyanine iodide in hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:514-520
- Xiao EH, Li JQ, Huang JF. Effects of p53 on apoptosis and proliferation of hepatocellular carcinoma cells treated with transcatheter arterial chemoembolization. *World J Gastroenterol* 2004;10:190-194
- 凌昌全, 李琦, 刘晓华, 陈庆华, 彭永海, 罗若茵, 黄雪强. 经动脉灌注蜂毒素-聚乳酸/羟乙酸微球治疗大鼠肝肿瘤。世界华人消化杂志 2003;11:900-903
- 马力, 张月宁. 鸦胆子油乳诱导肝癌细胞凋亡及对相关基因表达的影响。世界华人消化杂志 2004;12:559-562
- Chao JC, Chu CC. Effects of Ginkgo biloba extract on cell proliferation and cytotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:37-41
- Chen XP, He SQ, Wang HP, Zhao YZ, Zhang WG. Expression of TNF-related apoptosis-inducing Ligand receptors and anti-tumor effects of TNF-related apoptosis-inducing Ligand in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2433-2440
- Li Y, Shang P, Qian AR, Wang L, Yang Y, Chen ZN. Inhibitory effects of antisense RNA of HAb18G/CD147 on invasion of hepatocellular carcinoma cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2003;9:2174-2177
- Liu ZS, Tang SL, Ai ZL. Effects of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of human hepatoma BEL-7402 cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:1968-1971
- Altieri DC. Survivin and apoptosis control. *Adv Cancer Res* 2003;88:31-52
- Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, Gandini O, Silvestri I, Nofroni I, Sacconi G, Frati L, Agliano AM. Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer. *Ann Oncol* 2003;14:85-90
- Tomizawa M, Saisho H, Tagawa M. Regulatory regions of growth-related genes can activate an exogenous gene of the alpha-fetoprotein promoter to a comparable degree in human hepatocellular carcinoma cells. *Anticancer Res* 2003;23:3273-3277
- Schultz II, Kiemeny LA, Witjes JA, Schalken JA, Willems JL, Swinkels DW, de Kok JB. survivin mRNA expression is elevated in malignant urothelial cell carcinomas and predicts time to recurrence. *Anticancer Res* 2003;23:3327-3331
- Pennati M, Binda M, Colella G, Zoppe' M, Folini M, Vignati S, Valentini A, Citti L, De Cesare M, Pratesi G, Giacca M, Daidone MG, Zaffaroni N. Ribozyme-mediated inhibition of survivin expression increases spontaneous and drug-induced apoptosis and decreases the tumorigenic potential of human prostate cancer cells. *Oncogene* 2004;23:386-394
- Altieri DC. survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003;22:8581-8589
- Altieri DC. survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer. *Prog Cell Cycle Res* 2003;5:447-452
- Yang JH, Zhang YC, Qian HQ. survivin antisense oligodeoxynucleotide inhibits growth of gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:1121-1124
- Chang Q, Liu ZR, Wang DY, Kumar M, Chen YB, Qin RY. survivin expression induced by doxorubicin in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:415-418
- Zhu XD, Lin GJ, Qian LP, Chen ZQ. Expression of survivin in human gastric carcinoma and gastric carcinoma model of rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:1435-1438
- Lin LJ, Zheng CQ, Jin Y, Ma Y, Jiang WG, Ma T. Expression of survivin protein in human colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2003;9:974-977
- Opalinska JB, Gewirtz AM. Therapeutic potential of antisense nucleic acid molecules. *Sci STKE* 2003;2003:pe47
- Holmlund JT. Applying antisense technology: Affinitak and other antisense oligonucleotides in clinical development. *Ann NY Acad Sci* 2003;1002:244-251
- Alama A, Barbieri F, Cagnoli M, Schettini G. Antisense oligonucleotides as therapeutics agents. *Pharmacol Res* 1997;36:171-178
- Olie RA, Simoes-Wüst AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister Wittke U. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res* 2000;60:2805-2809
- Chen J, Wu W, Tahir SK, Kroeger PE, Rosenberg SH, Cowser LM, Bennett F, Krajewski S, Krajewska M, Welsh K, Reed JC, Ng SC. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. *Neoplasia* 2000;2:235-241
- 陈涛, 贾玉容, 田伏洲, 蔡忠红, 李广阔. 肝癌组织中survivin蛋白表达的意义。世界华人消化杂志 2003;11:411-414