

基础研究

DOI:10.11699/cyxh20130911

Survivin 与 VEGF 基因反义寡核苷酸联合应用 人肺腺癌 A549 细胞作用研究

隋雪梅, 徐 玲, 梁 超

(重庆医科大学附属第一医院呼吸内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨脂质体介导的血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)与生存素(Survivin)基因反义寡核苷酸联合应用对人肺腺癌细胞系 A549 生长的影响。**方法:**构建 VEGF 与 Survivin 基因反义寡核苷酸,以脂质体转染人肺腺癌 A549 细胞。实验分为对照组、脂质体对照组、VEGF 反义转染组(VEGF ASODN 组)、Survivin 反义转染组(Survivin ASODN 组)、联合转染组(VEGF ASODN+Survivin ASODN 组)。采用 RT-PCR 检测 VEGF 与 Survivin 基因表达;流式细胞仪分析细胞周期和凋亡、检测 VEGF 与 Survivin 蛋白表达;MTT 观测细胞生长;平板集落实验分析细胞增殖克隆能力。**结果:**脂质体介导的 VEGF 与 Survivin 基因反义寡核苷酸联合转染组 A549 细胞存活率和增殖克隆能力明显低于其余组,差异有统计学意义($P=0.043$, $P=0.049$, $P=0.038$, $P=0.023$)。流式细胞仪分析显示联合转染组细胞周期被阻滞, Survivin 蛋白表达低于其余组,与对照组差异有统计学意义($P=0.017$, $P=0.002$), VEGF 蛋白表达低于其余组,与对照组差异有统计学意义($P=0.013$, $P=0.003$)。RT-PCR 检测结果显示联合转染组 VEGF 与 Survivin 基因表达低于其余组。**结论:**VEGF 与 Survivin 基因反义寡核苷酸联合应用抑制人肺腺癌 A549 细胞的增殖,延长细胞周期,抑制 VEGF 与 Survivin 基因表达。为后续的动物实验打下了理论依据。

【关键词】肺癌;血管内皮细胞生长因子;生存素;细胞增殖;集落形成;细胞周期

【中国图书分类法分类号】R734

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-06-03

Effects of antisense VEGF and Survivin oligodeoxynucleotides on human lung adenocarcinoma cell line A549

SUI Xuemei, XU Ling, LIANG Chao

(Department of Respiratory, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of liposome-mediated vascular endothelial growth factor(VEGF) and Survivin antisense oligonucleotide on the growth of human lung adenocarcinoma cell line A549. **Methods:** VEGF and Survivin antisense oligonucleotides were constructed and human lung adenocarcinoma A549 cells were transfected with Lipofectamine™2000. The experiment was divided into control group, liposome control group, VEGF antisense transfection group(VEGF ASODN group), Survivin antisense transfection group(Survivin ASODN group), joint transfection group(VEGF ASODN+Survivin ASODN group). VEGF and Survivin were detected by RT-PCR. Flow cytometry(FCM) was applied to measure cell cycle, cell apoptosis and VEGF and Survivin protein. MTT method was applied to measure cell growth. Colony forming test was applied to measure the cell proliferation and clonogenic abilities. **Results:** A549 cell viability and proliferation and clonogenic abilities were significantly lower in VEGF ASODN+Survivin ASODN group than in the other groups, with significantly statistical differences($P=0.043$, $P=0.049$, $P=0.038$, $P=0.023$). FCM analysis showed that co-transfection of transfected cell cycle was arrested and Survivin protein expression was lower in VEGF ASODN+Survivin ASODN group than in the other groups, with significantly statistical differences($P=0.017$, $P=0.002$). VEGF protein expression was lower in VEGF ASODN+Survivin ASODN group than in the other groups, with significantly statistical differences($P=0.013$, $P=0.003$). RT-PCR results showed that VEGF and Survivin gene expressions were lower in VEGF ASODN+Survivin ASODN group than in the other groups. **Conclusions:** Combination of VEGF and Survivin antisense oligonucleotides can inhibit the proliferation of human lung adenocarcinoma cell line A549, extend cell cycle and inhibit VEGF and Survivin gene expression, which will lay theoretical basis for the subsequent animal experiments.

【Key words】lung cancer; vascular endothelial growth factor; Survivin; cell proliferation; colony forming; cell cycle

作者介绍:隋雪梅, Email: taishanxingkong@163.com,

研究方向:肺癌的诊断与治疗研究。

通信作者:徐 玲, Email: xl2197@163.com。

基金项目:重庆市科委资助项目(编号:2011AC5202)。

根据卫生部全国肿瘤防治办公室对部分城乡统计的资料显示,肺癌已成为我国首位恶性肿瘤死亡原因,占全部恶性肿瘤死亡的 22.7%,肺癌发病率每年增长 26.9%,已成为严重威胁健康的疾病^[1]。由于肺癌缺乏特异性的临床表现和标志物,早期诊断准确率较低,临床上多数患者就诊时已属于晚期,治疗效果差,综合治疗晚期非小细胞肺癌的 5 年生存率不到 5%^[2]。这就要求不断探索新的治疗模式—基因靶向治疗。

生存素(Survivin)在多数恶性肿瘤组织中表达丰富且与预后不良相关,正常成人组织不表达,这种选择性表达的特性受到瞩目^[3]。几乎人类所有肿瘤都有 Survivin 表达,可拮抗有 Fas、Bax、caspase-3、caspase-7 和抗癌药物诱导的细胞凋亡^[4-5],从而促进细胞增生或影响抗癌药物的治疗效果。同时,血管生成依赖于瘤细胞产生的血管生成因子[如碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)和血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)]的促进作用。血管的生成受激活和抑制因子之间的平衡来调节,因此,通过基因治疗抑制促进血管生成的因子表达,可能会拮抗肿瘤诱导的血管生成。有研究证明 VEGF 与肿瘤的生长密切相关,甚至可以作为肺癌预后的独立预测因子。Fontanini 等^[6]研究证明 VEGF 是非小细胞肺癌新生血管增生的关键细胞因子。这提示将抗血管生成策略同抑制癌细胞的恶性表型或促进癌细胞的凋亡结合起来,共同抑制肿瘤的生长、侵袭和转移。本研究将探讨 VEGF 与 Survivin 基因反义寡核苷酸联合治疗对非小细胞肺癌的影响,目前还没有相关研究报道。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌 A549 细胞株由重庆医科大学附属第一医院神经病学重点实验室保存,传代细胞,贴壁生长。RPMI1640 培养基购自 Hyclone 公司。胎牛血清由天津康源生物生产。脂质体(Lipofectamine™2000)购自美国 invitrogen 公司。逆转录试剂盒、Trizol Reagent、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶均为 Takara 公司产品。PCR 引物、全硫代磷酸化修饰的寡核苷酸均由 invitrogen 公司合成,VEGF 反义寡核苷酸序列为 5'-TGGCTTGAAGATGTACTCGAT-3',Survivin 反义寡核苷酸序列为 5'-CCACGGCCTCCCAAAGTGCTG-3'。Survivin 一抗兔抗人单克隆抗体为 Cell Singaling,VEGF 一抗兔抗人单克隆抗体为 EPITOMICS,二抗为羊抗兔 fitc 标记,为 JACK-SON IMMUNO RESEARCH。Marker 为东盛生物 50BP LAD-DER PLUS。

1.2 实验分组

实验分为 5 组。分别是对照组,仅予以 RPMI1640 培养基处理;脂质体对照组,阳离子脂质体 Lipofectin+RPMI1640 转染液;VEGF 反义转染组,VEGF ASODN+Lipofectin+RPMI1640 转染液;Survivin 反义转染组,Survivin ASODN+Lipofectin+RPMI1640 转染液;联合转染组,VEGF ASODN+Survivin ASODN+Lipofectin+RPMI1640 转染液。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养与转染 用含 10%灭活血清的 RPMI1640,37℃、5%CO₂ 常规培养 A549 细胞。常规加入青霉素 50 U/ml,链霉素 50 g/L。取处于对数生长期的贴壁细胞进行转染,按照 Lipofectamine™2000 说明书进行操作。寡核苷酸液均按 80 μg/ml 配制,与脂质体液 1:1 混合转染,转染 24 h 后换液。按照各种实验要求,进行各项检查。

1.3.2 RT-PCR 检测基因的表达 收集各组细胞,Trizol 提取各组 RNA。Takara 试剂盒进行逆转录,以逆转录产物为模板,按 Premix Ex Taq Version2.0 说明书进行扩增。VEGF PCR 扩增所用上游引物为 5'-GTCCAACCTCTGGGCTGTTCT-3',下游引物为 5'-CCCTCTCCTCTTCCTTCTCTTC-3'。Survivin PCR 扩增所用上游引物为 5'-CACC GCATCTCTACATTCAA-GA-3',下游引物为 5'-CAAGTCTGGCTCGTTCTCACT-3'。扩增反应条件:98℃ 10 s 变性,60℃ 30 s 退火,72℃ 1 min 延伸,30 个循环。PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。VEGF PCR 扩增目的片段的大小为 151 bp,Survivin PCR 扩增目的片段的大小为 114 bp。

1.3.3 流式细胞仪(flow cytometry,FCM)分析蛋白的表达 收集转染 24 h 后的各组细胞,冷 PBS 缓冲液冲洗,4%多聚甲醛室温固定。1 ml 含 0.2%Triton 打孔,VEGF 一抗冰上孵育 40 min。加入荧光标记 FITC 标记二抗,冰上孵育 40 min。PBS 缓冲液冲洗,1%多聚甲醛重悬,送检。Survivin 蛋白检测方法与 VEGF 相同。

1.3.4 FCM 检测细胞周期 对数生长期的 A549 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板,培养 24 h 后转染。每组 3 个对照孔。收集每组细胞,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清。4℃PBS 洗涤细胞后,4℃冰乙醇固定单细胞悬液。送检。实验重复 3 次。

1.3.5 FCM 分析细胞凋亡 收集对数生长期细胞,制成单细胞悬液,以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板,培养 24 h 后转染。每组设 3 个对照孔。转染 24 h 后,收集细胞,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清。PBS 洗涤、重悬。送检。

1.3.6 MTT 法检测细胞存活率 收集对数生长期细胞,制成单细胞悬液。取 96 孔板 3 个,以 10^4 个/孔接种细胞。培养细胞 24 h 后,进行转染。每组 6 个对照孔。转染 24、48、72、96 h 后,分别每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 试剂 10 μl,继续培养 4 h,吸干每孔的培养基,终止培养。加入二甲基亚砜 150 μl,摇床震荡 10 min。在 570 nm 波长下,酶标仪测量各孔的吸光度(absorbance,A)值。实验重复 3 次,绘制细胞生长曲线。

1.3.7 平板集落实验检测细胞增殖克隆能力 在 6 孔板中转染细胞,分组。24 h 后收集各组细胞,制成单细胞悬液。取 24 孔板 1 个,每孔接种细胞细胞数为 150 个。培养 14 d 后计数细胞数>50 个、直径>0.5 mm 的集落。每组设立 3 个对照孔,实验重复 3 次。集落形成率(%)=集落数/接种细胞数 ×

100%。

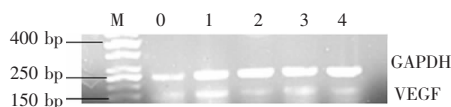
1.4 统计学分析

采用 SPSS 18.0 进行。数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK- q 检验; 不同时间点测量值进行重复测量方差分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 反义寡核苷酸降低基因表达

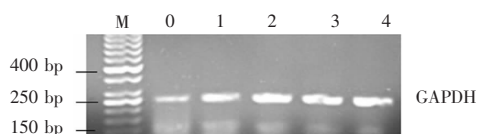
RT-PCR 法检测转染反义寡核苷酸后各组细胞 VEGF 和 Survivin 的表达, 图 1 结果显示转染后 VEGF 反义转染组和联合转染组 VEGF 的表达明显低于其余各组。图 2 结果显示转染后 Survivin 反义转染组和联合转染组 Survivin 的表达明显低于其余各组。提示转染反义寡核苷酸能够降低基因的表达。



M. 50 bp DNA marker; 0. 对照组; 1. 脂质体对照组; 2. VEGF 反义转染组; 3. Survivin 反义转染组; 4. 联合转染组

图 1 RT-PCR 检测各组 A549 细胞 VEGF mRNA 表达

Fig.1 Expressions of VEGF mRNA in A549 cells measured by RT-PCR



M. 50 bp DNA marker; 0. 对照组; 1. 脂质体对照组; 2. VEGF 反义转染组; 3. Survivin 反义转染组; 4. 联合转染组

图 2 RT-PCR 检测各组 A549 细胞 Survivin mRNA 表达

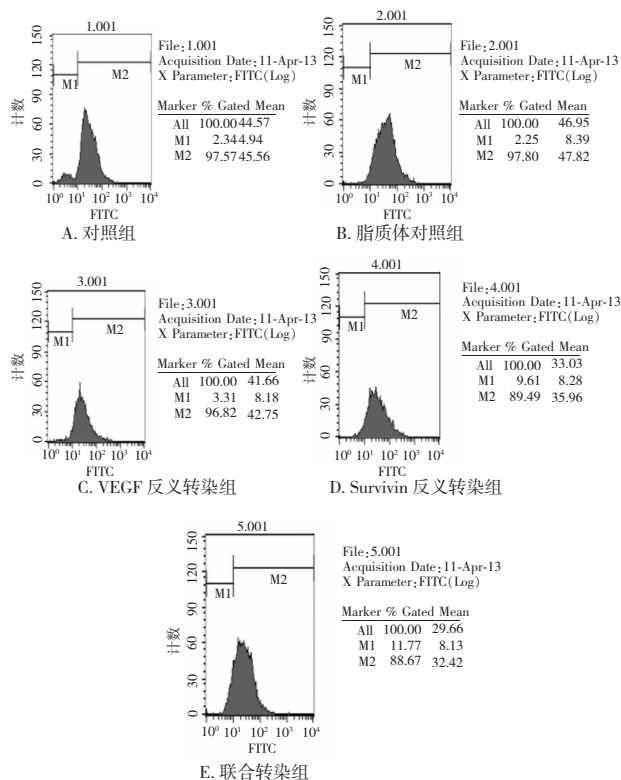
Fig.2 Expressions of Survivin mRNA in A549 cells measured by RT-PCR

2.2 反义寡核苷酸降低目的基因蛋白的表达

FCM 检测结果显示 Survivin 反义转染组和联合转染组 Survivin 蛋白表达量低于其余 3 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1), 提示 Survivin 反义寡核苷酸经脂质体转染入细胞能够抑制 Survivin 的蛋白表达。VEGF 反义转染组和联合转染组 VEGF 蛋白表达量低于其余 3 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。提示 VEGF 反义寡核苷酸经脂质体转染入细胞能够抑制 VEGF 的蛋白表达。见图 3、4。

2.3 细胞周期被阻滞在 S 期

FCM 分析细胞周期结果显示各转染组 S 期细胞百分比比较对照组高, G2 期细胞百分比比较对照组低。联合转染组 S 期细胞百分比最高, G2 期细胞百分比最低 (图 5)。表明反义寡核苷酸转染主要将 A549 细胞阻滞在 S 期, 联合转染对细胞周期 S 期阻滞作用较单寡核苷酸转染强。

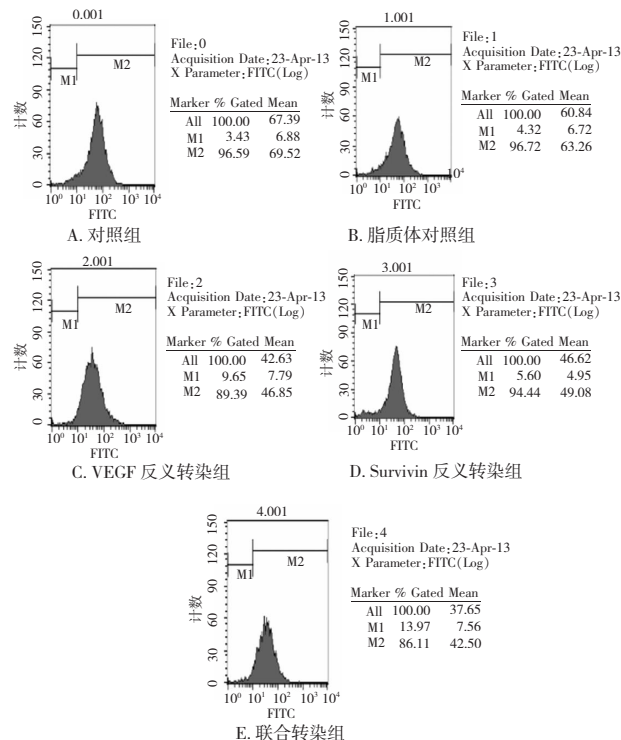


M1. A549 细胞中 Survivin 蛋白无表达的百分比;

M2. A549 细胞中 Survivin 蛋白的表达百分比

图 3 A549 细胞中 Survivin 蛋白的表达

Fig.3 Protein expressions of Survivin in A549 cells



M1. A549 细胞中 VEGF 蛋白无表达的百分比;

M2. A549 细胞中 VEGF 蛋白的表达百分比

图 4 A549 细胞中 VEGF 蛋白的表达

Fig.4 Protein expressions of VEGF in A549 cells

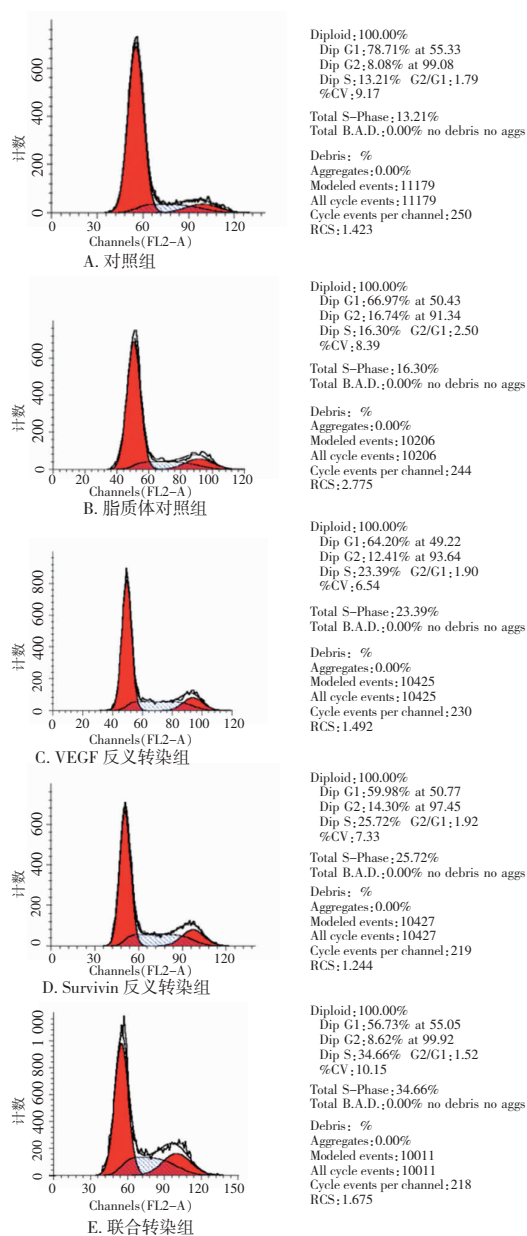
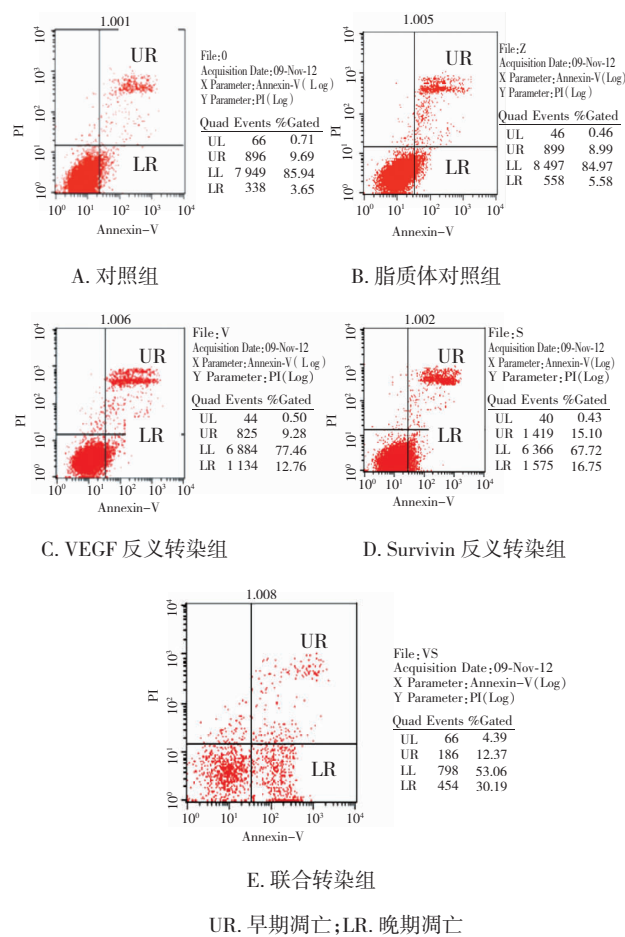


图 5 FCM 检测细胞周期分布

Fig.5 Cell cycle distribution determined by FCM

2.4 FCM 分析凋亡结果

凋亡结果显示联合转染组的凋亡率明显高于其余各组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。联合转染组与对照组相比 $P = 0.00$, 与脂质体对照组相比 $P = 0.00$, 与 VEGF 反义转染组相比 $P = 0.043$, 与 Survivin 反义转染组相比 $P = 0.046$, 差异均有统计学意义 (表 1)。结果说明联合转染能够促进细胞的凋亡。见图 6。



UR. 早期凋亡; LR. 晚期凋亡

图 6 FCM 检测细胞凋亡情况

Fig.6 Cell apoptosis determined by FCM

表 1 MTT 检测细胞增殖 ($\bar{x} \pm s$)Tab.1 Cell proliferation measured by MTT assay ($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	0.522 ± 0.664	0.538 ± 0.110	0.632 ± 0.211	0.813 ± 0.121
脂质体对照组	0.422 ± 0.588	0.487 ± 0.091	0.570 ± 0.007	0.678 ± 0.100
VEGF反义转染组	0.301 ± 0.141	0.386 ± 0.095	0.401 ± 0.353	0.421 ± 0.124
Survivin反义转染组	0.271 ± 0.121	0.312 ± 0.025	0.322 ± 0.010	0.334 ± 0.133
联合转染组	0.198 ± 0.113	0.227 ± 0.028	0.235 ± 0.012	0.242 ± 0.324
F 值	15.956			
P 值	0.000			

注: 1. 联合转染组与对照组相比 $q = 5.936$, $P = 0.043$; 与脂质体对照组相比 $q = 4.641$, $P = 0.049$; 与 VEGF 反义转染组相比 $q = 3.466$, $P = 0.038$; 与 Survivin 反义转染组相比 $q = 5.031$, $P = 0.023$; 2. VEGF 反义转染组、Survivin 反义转染组与对照组相比, q 值分别为 -5.396 , -5.591 , P 值分别为 0.007 与 0.010

2.5 MTT 法检测细胞

MTT 结果示 VEGF 反义转染组、Survivin 反义转染组 A 值均低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1), 提示单独应用 VEGF 或 Survivin 反义寡核苷酸对细胞生长有抑制作用, 与文献报道相符^[7-8]。联合转染组细胞的 A 值明显低于其余 4 组, 细胞生长较其余 4 组缓慢 (图 7), 对细胞生长的抑制作用较单独应用强 ($P < 0.05$), 见表 1。

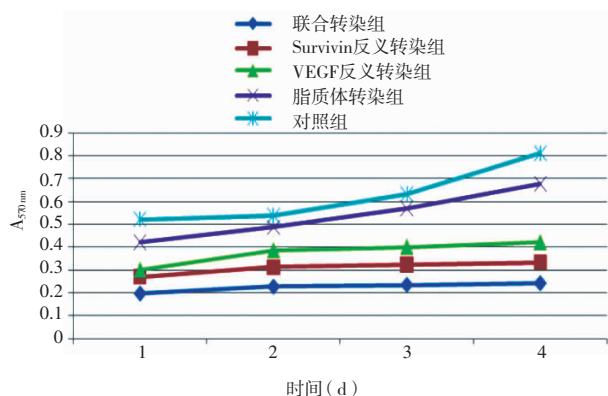


图 7 MTT 检测细胞增殖

Fig.7 Cell proliferation measured by MTT assay

2.6 平板集落实验

A549 细胞株平板集落实验结果 (表 2) 示, 对照组、脂质体对照组、VEGF 反义转染组、Survivin 反义转染组、联合转染组集落形成率分别为 77%、75%、57%、50%、27%。对照组与脂质体对照组差异不明显 ($P > 0.05$)。VEGF 反义转染组、Survivin 反义转染组与对照组、脂质体对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 联合转染组与其余各组有明显差异 P 分别为 0.000、0.000、0.000、0.002。联合转染组集落形成能力最弱, 相对实验对照组而言联合转染组的集落抑制率达 65% 提示联合转染对集落形成有抑制作用 ($P < 0.05$)。

3 讨论

反义寡核苷酸 (antisense oligodeoxynucleotides, ASODN) 作为一种新型药物, 通过多种途径介导靶 mRNA 的降解、抑制 DNA 的复制、转录和转录后的加工和翻译^[9]。最先采用反义核酸干扰基因功能的是 Zamecnik 和 Stephenson^[10], 他们于 1978 年报道了 ASODN 可抑制肉瘤病毒的复制。1984 年, Izant 和 Weintraub^[11]首次提出了“反义核酸技术”的概念, 即根据碱基互补原理, 利用人工或生物合成特异互补的 DNA 或 RNA 片段, 抑制或封闭基因表达的技术。

VEGF 是 1989 年 Ferrara 与 Henzel^[12]首次从垂体滤泡细胞中分离到的一种具有高度特异性的血管内皮分裂原, 它的主要功能是增强血管通透性和促进血管生成, 进而促进肿瘤细胞的生长与扩散。有研究表明^[13]通过肿瘤原位注射反义 VEGF 硫代寡核苷酸能够降低肿瘤 VEGF 的表达, 进而抑制肿瘤的生长。

Survivin 作为一种凋亡抑制蛋白, 通过抑制 caspase-3 和 caspase-7 的活性阻断凋亡过程^[14], 高表达于多种恶性肿瘤^[15-16]。Chen 等^[5]研究结果揭示, Survivin ASODN 能够明显下调 Survivin 基因和蛋白表达, 诱导肺癌细胞凋亡。

综合以上的研究成果, 本实验创新性的联合应用 VEGF 和 Survivin 反义寡核苷酸, 采用脂质体介导转染肺癌细胞 A549, 以同时封闭 Survivin 和 VEGF 基因表达, 并观察其对细胞增殖的影响及诱导肺癌细胞凋亡的作用。

表 2 不同组中 Survivin 和 VEGF 蛋白的表达、细胞凋亡情况和集落形成能力

Tab.2 Protein expressions of Survivin and VEGF in different groups and lung adenocarcinoma cell apoptosis and colony forming ability

组别	Survivin	VEGF	总凋亡率 (%)	集落形成数 (个)
对照组	45.620 ± 2.664	65.957 ± 3.110	13.843 ± 0.582	115.200 ± 9.418
脂质体对照组	45.987 ± 1.588	65.537 ± 2.091	13.943 ± 0.663	112.000 ± 6.205
VEGF反义转染组	45.473 ± 3.141	44.660 ± 1.950	26.083 ± 3.507	85.000 ± 6.442
Survivin反义转染组	37.340 ± 2.557	50.053 ± 0.905	28.560 ± 3.168	74.600 ± 9.127
联合转染组	30.850 ± 1.360	41.493 ± 0.932	42.710 ± 0.954	40.600 ± 7.765
F 值	24.566	102.556	89.649	74.436
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1. 联合转染组与对照组、脂质体对照组、VEGF 反义转染组、Survivin 反义转染组 Survivin 蛋白表达比较 q 值分别为 8.553、12.600、7.400、3.881, P 分别为 0.017、0.002、0.033、0.140; 2. 联合转染组与对照组、脂质体对照组、VEGF 反义转染组、Survivin 反义转染组 VEGF 蛋白表达比较 q 值分别为 13.051、18.193、2.537、11.410, P 分别为 0.013、0.003、0.364、0.002; 3. 凋亡率联合转染组与对照组相比 $q=44.753$, $P=0.00$; 与脂质体对照组相比 $q=42.901$, $P=0.000$; 与 VEGF 反义转染组相比 $q=7.925$, $P=0.043$; 与 Survivin 反义转染组相比 $q=7.408$, $P=0.046$; 4. 集落形成能力联合转染组与其余各组比较 q 分别为 13.666、16.062、9.840、6.344, P 分别为 0.000、0.000、0.000、0.002

本研究采用 VEGF 与 Survivin 基因反义寡核苷酸联合转染的方法,通过一系列实验,分别从细胞、蛋白、基因水平观察它们对人非小细胞肺癌 A549 细胞株的作用。实验采用了相比 Western blot 更为精确的 FCM 检测 VEGF 和 Survivin 蛋白的表达,同时可以对蛋白表达进行定量,实验结果更加精确。实验发现反义寡核苷酸转染后,对应 VEGF 和 Survivin 基因和蛋白的表达相对对照组均降低,表明反义寡核苷酸转染效果是抑制基因的表达。通过 MTT、FCM 所测结果达到基本一致,均证明 VEGF 与 Survivin 基因反义寡核苷酸联合应用在离体体外会阻碍肿瘤的发展,VEGF 与 Survivin 基因反义寡核苷酸联合应用能抑制 VEGF 和 Survivin 基因蛋白的表达,促进 A549 的凋亡,抑制 A549 生长,延长细胞周期。因此推断 VEGF 与 Survivin 基因反义寡核苷酸联合应用对肺癌 A549 有一定的治疗作用。

肺癌已经成为严重威胁人类健康的疾病,本实验提供了新的治疗方向,为以后的动物体内研究以及非小细胞肺癌的多基因联合治疗从基础研究向临床应用过渡提供可靠的理论基础。

参 考 文 献

- [1] 支修益.我国肺癌流行病学现状分析[J].中国处方药,2009(2):56-57.
- [2] Zhi X Y.Epidemiological analysis of lung cancer in current China[J].China Prescription Drug,2009(2):56-57.
- [3] Isobe T,Herbst R S,Onn A. Current management of advanced non-small cell lung cancer;targeted therapy[J].Semin Oncol,2005,32(3):315-328.
- [4] Li F,Brattain MG. Role of the Survivin gene in pathophysiology[J].Am J Pathol,2006,169(1):1-11.
- [5] Blanc-Brude O P,Mesri M,Wall N R,et al.Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer;initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis[J].Clin Cancer Res,2003,9(7):2683-2692.
- [6] 陈余清,李 伟,周继红,等.survivin 抗肺癌细胞凋亡的分子机制[J].中华肿瘤杂志,2006,28(6):413-417.
- [7] Chen Y Q,Li W,Zhou J H,et al.Molecular mechanism of anti-apoptotic action of survivin in NCI-H446 lung cancer cells[J].Chin J Oncol,2006,28(6):413-417.
- [8] Seto T,Higashiyama M,Funai H,et al.Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor and its fit-1 and KDR receptors in stage I non-small-cell lung cancer[J].Lung Cancer,2006,53(1):91-96.
- [9] 郭旭峰,徐中华,陈勇兵,等.脂质体介导的 VEGF-C 反义寡核苷酸对肺腺癌细胞系 A549 生长、凋亡的影响[J].中国老年学杂志,2010,30(13):1830-1831.
- [10] Guo X F,Xu Z H,Chen Y B,et al.Liposome-mediated VEGF-C anti-sense oligonucleotide on the growth of lung adenocarcinoma cell line A549,apoptosis[J].Chinese Journal of Gerontology,2010,30(13):1830-1831.
- [11] 陈 刚,王小玲,刘月平,等.FEZ1 Survivin 在肺小细胞癌及低分化鳞状细胞癌蛋白表达及其在凋亡中的作用[J].中国肿瘤临床,2007,34(21):1209-1211.
- [12] Chen G,Wang X L,Liu Y P,et al.Expression of FEZ1 and Survivin and its significance in small cell lung cancer and poorly differentiated squamous cell lung cancer[J].Chinese Journal of Clinical Oncology,2007,34(21):1209-1211.
- [13] Crooke S T.Oligonucleotide analogs might be designed to bind to Mrna[J].Anticancer Drug Res,1997,12(5):311-313.
- [14] Zamecnik P C,Stephenson M L.Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide[J].Proc Natl Acad Sci USA,1978,75(1):280-284.
- [15] Izant J G,Weintraub H.Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA;a molecular approach to genetic analysis[J].Cell,1984,36(4):1007-1015.
- [16] Ferrara N,Henzel W J.Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells[J].Biochem Biophys Res Commun,2012,425(3):540-547.
- [17] 李春艳,成小松,李 曦.脂质体介导的 VEGF 反义寡核苷酸对肺癌微血管密度及 VEGF 表达的抑制作用[J].中国肺癌杂志,2006,9(3):215-220.
- [18] Li C Y,Cheng X S,Li X.Influence of antisense VEGF oligodeoxynucleotides formulated in cationic liposome on microvessel density and VEGF expression of lung cancer[J].Chinese Journal of Lung Cancer,2006,9(3):215-220.
- [19] Shin S,sung B J,Cho Y S,et al.An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and-7[J].Biochemistry,2001,40(4):1117-1123.
- [20] Tanaka K,Iwamoto S,Gon G,et al.Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas[J].Clin Cancer Res,2000,6(1):127-134.
- [21] Sarela A I,Macadam R C,Farmery S M,et al.Expression of the antiapoptosis gene,survivin,predicts death from recurrent colorectal carcinoma[J].Gut,2000,46(5):645-650.

(责任编辑:冉明会)