

Survivin 反义寡核苷酸经线粒体途径诱导肺癌细胞凋亡研究

李伟¹, 陈余清¹, 周继红², 李殿明¹, 徐凤珍¹, 夏雪梅¹

[摘要] 目的: 探讨 survivin 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASODN) 诱导肺癌细胞凋亡的作用及 survivin 抗凋亡的分子机制。方法: 脂质体介导下, 分别以 100 nmol/L, 300 nmol/L, 500 nmol/L survivin ASODN 作用于肺癌细胞株 NCF-H446 后, 在不同时间用流式细胞仪(flow cytometry, FCM) 检测凋亡; Rh123 染色法检测细胞线粒体膜电位(mitochondrial potential membrane, $\Delta\Psi_m$) 变化, ELISA 法检测胞质细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C) 浓度, 比色法检测胞质内天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-9(cysteinyl aspartate specific proteinase-9, caspase-9) 活性变化; 加入 caspase-9 抑制剂 Z-LEHD-FMK 后 FCM 检测细胞凋亡。结果: Survivin ASODN 500 nmol/L 作用 72 h 效果最佳, 细胞凋亡指数(AI) 达 48.35%, 增殖指数(PI) 为 24.38%; Survivin ASODN 导致细胞 $\Delta\Psi_m$ 逐渐下降, 并相继引起 Cyt C 的释放和 caspase-9 的激活。三者变化具有时间依赖性和差异性; Z-LEHD-FMK 显著抑制了 survivin ASODN 诱导的细胞凋亡。结论: Survivin 主要通过调控线粒体凋亡途径发挥抗肺癌细胞凋亡作用; Survivin ASODN 能够显著诱导肺癌细胞凋亡, 抑制细胞增殖。

[关键词] 肺肿瘤; survivin; 反义寡核苷酸; 凋亡; 线粒体途径

[中国图书资料分类法分类号] R 734.2 [文献标识码] A

Survivin antisense oligonucleotides induces apoptosis of lung cancer cells through mitochondrial-dependent pathway

LI Wei¹, CHEN Yu-qing¹, ZHOU Ji-hong², LI Dian-ming¹, XU Feng-zhen¹, XIA Xue-mei

1. Department of Respiratory Diseases, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bengbu Medical College, Bengbu 233003, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of survivin antisense oligonucleotides(ASODN) in inducing the apoptosis of lung cancer cells and its mechanism. **Methods:** The lung cancer cell lines NCF-H446 were transferred with 100 nmol/L, 300 nmol/L and 500 nmol/L survivin ASODN. The apoptosis index(AI) and the proliferation index(PI) were measured by flow cytometry(FCM). The cells were stained with Rh123 to detect the changes in the mitochondrial membrane potential($\Delta\Psi_m$) by FCM. While the concentration of cytoplasmic cytochrome c (Cyt C) was determined by ELISA, the relative activities of caspase-9 were detected by colorimetric assay. The apoptotic rates of lung cancer cells induced by survivin ASODN with or without caspase-9 inhibitor were measured by FCM. **Results:** When the NCF-H446 cells were treated with concentration of ASODN 500 nmol/L for 72 h, the AI was 48.35%, and the PI 24.38%. Survivin ASODN decreased $\Delta\Psi_m$ gradually, released Cyt C and activated caspase-9 significantly. The changes of the above indicators had time-dependent and time diversity relationship. In the presence of caspase-9 inhibitor, the apoptotic rates of lung cancer cells induced by survivin ASODN decreased significantly. **Conclusions:** Survivin inhibits apoptosis primarily via regulation of mitochondrial-dependent pathway. Survivin ASODN can not only induce apoptosis but also inhibit cell proliferation.

[Key words] lung neoplasms; survivin; antisense oligodeoxynucleotides; apoptosis; mitochondrial-dependent pathway

[收稿日期] 2005-08-10

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金资助项目(2004kj283)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院附属医院 呼吸病科, 安徽 蚌埠 233004 2. 蚌埠医学院 生物化学与分子生物学教研室, 安徽 蚌埠 233003

[作者简介] 李伟(1975-), 男, 安徽蚌埠人, 硕士, 住院医师, 主要研究方向: 肺癌的分子生物学。

Survivin 是近年发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP) 基因家族中的新成员, 在大多数肿瘤组织中高表达, 但不表达于终末分化的成人组织^[1]。我们既往的研究^[2]也显示肺癌组织 survivin 基因表达的阳性率达 70%, 提示 survivin

[参 考 文 献]

- [1] Dumort CE, Hente VR. Enhancement of axon growth by detergent-extracted nerve grafts[J]. *Transplantation*, 1997, 63(9): 1 210 ~ 1 215.
- [2] Sondell M, Lundborg G, Kanjie M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction [J]. *Brain Res*, 1998, 795(1-2): 44 ~ 54.
- [3] Gulati AK. Immunological fate of Schwann cell-populated acellular basal lamina nerve allografts[J]. *Transplantation*, 1995, 59(11): 1 618 ~ 1 622.
- [4] Williams LR, Longo FM, Powell HC, et al. Spatial-temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber; Parameter for a bioassay[J]. *J Comp Neurol*, 1983, 218(4): 460 ~ 470.
- [5] Podhajsky RJ, Myers RR. The vascular response to nerve transection: Neovascularization in the silicone nerve regeneration chamber[J]. *Brain Res*, 1994, 662(1-2): 88 ~ 94.

在肺癌的发生发展中起重要作用,但 survivin 调控肺癌细胞凋亡的确切分子机制不明。有研究表明³⁾, survivin 直接通过与天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 (cystenyl aspartate specific proteinase-3, caspase-3) 或 caspase-7 形成稳定的同源二聚体发挥抗凋亡作用。但梅柱中⁴⁾ 在实验中抑制 survivin 表达后并未发现 caspase-3 活性变化。上述研究多着眼于凋亡的下游事件,而现代研究证实线粒体才是凋亡始动的核心⁵⁾, 故本实验通过研究 survivin ASODN 对线粒体凋亡途径激活的影响,深入探讨 survivin 调控肺癌细胞凋亡的确切分子机制,并为肺癌的靶向治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 Lipofectin 为 Invitrogen 公司; caspase-9 活性检测试剂盒购自 BioVision 公司; 细胞色素 C、ELISA 试剂盒为 Bender Med Systems 公司产品; 线粒体分离试剂盒为 Active Motif 公司产品; Rhodamine123 (Rh123)、碘化丙锭(PI)、Annexin-V-FITC/PI 凋亡试剂盒均为 Sigma 公司。caspase-9 抑制剂 Z-LEHD-FMK 为 R &D 公司。

1.2 细胞株 肺癌细胞株 NCI-H446, 购自中国科学院上海细胞生物研究所。

1.3 实验方法

1.3.1 脂质体介导 survivin ASODN 转染 针对 survivin mRNA 的编码子序列, 序列为 5'-CCC AGC CTT CCA GCT CCT TG-3' (第 232 ~ 251 bp)⁶⁾。无义寡核苷酸(NSODN) 序列为 5'-GCA CCT AGT CTC CCT CC -3', 经基因库检索, 未发现同源序列。以上 survivin SAODN 均采用逐步硫代修饰, 委托上海生工生物工程技术有限公司代为合成。转染步骤按照脂质体转染试剂盒说明书进行。

1.3.2 FCM 检测细胞凋亡率(PI 法) 取对数生长期细胞计数, 并调整细胞浓度为 3×10^5 /ml, 接种于 6 孔培养板中, 24 h 后在脂质体介导下转染 survivin ASODN, 实验分空白对照组(control)、加 PBS 稀释、空脂质体组[Lipofectin 10(μ g/ml)]、NSODN 500 nmol/L 和 survivin ASODN 100 nmol/L、300 nmol/L、500 nmol/L 组, 分别于转染后 72 h 消化收集细胞, 常规固定, PI 染色, 流式细胞仪检测细胞凋亡。计数 5 000 个细胞, Multicycle 软件进行数据处理。其中凋亡指数(AI) = 亚 G₁ 期细胞占整个细胞周期的百分比; 增殖指数(PI) = (S 期 + G₂/M 期) 细胞占整个细胞周期的百分比。

1.3.3 流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位

($\Delta\Psi_m$) Rh123 是一种能选择性为线粒体所吸收的荧光染料, 其荧光强度反映细胞线粒体 $\Delta\Psi_m$ 。实验分 3 组: 空白对照组、NSODN 500 nmol/L 和 survivin ASODN 500 nmol/L (因 500 nmol/L 诱导凋亡最显著, 故取该浓度为工作浓度)。每组设三个复孔, 分别于转染后 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 消化收取 1×10^6 细胞, PBS 洗 2 次。取 1 g/L Rh123 10 ml, 用 PBS 稀释至 100 mg/L, 重悬上述细胞, 避光于 37 °C 孵育 45 min 后进行流式细胞仪测定(激发波长 488 nmol/L; 发射波长 525 nmol/L)。计数 10 000 个活细胞, 以 Rh123 为荧光指示剂检测细胞线粒体 $\Delta\Psi_m$ 的改变。

1.3.4 ELISA 法检测胞质内 Cyt C 的浓度 实验分组同上, 分别于转染后 3 h、6 h、12 h、18 h、24 h、36 h、48 h、72 h 消化收取细胞。按线粒体分离试剂盒说明分离线粒体和胞质: 收集细胞, 冰 PBS 洗, 低温离心两次; 沉淀物在冰胞质缓冲液中悬浮 15 min, 转至预冷的匀浆器, 用研杵研磨约 40 下, 使其匀浆化; 上清液反复差速离心以除去线粒体和残余的细胞核; Bradford 法作蛋白定量。ELISA 法检测胞质的 Cyt C 浓度: 先后加入生物素共轭物及链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶, 室温下孵育 1 h, 分光光度计测量 450 nmol/L 处的吸光度, 并在标准曲线上换算成浓度值。

1.3.5 比色法检测 caspase-9 活性 分别于转染后 6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 消化收取细胞。细胞数为 4×10^6 , 加入 50 μ l 冰冻细胞裂解缓冲液再次悬浮细胞冰育 10 min, 5 000 r/min 离心 1 min, 上清液转至试管里冰育, 取上清 5 μ l, 用 Bradford 法作蛋白定量, 提取 70 μ g 蛋白到 50 μ l 细胞裂解缓冲液, 再加 50 μ l 2 \times 反应缓冲液(包含 10 mmol/L DTT)、5 μ l LEHD-pNA 底物, 37 °C 下孵育 1~2 h, 转移至 96 孔板中, 酶标免疫测定仪测定波长 405 nm 的吸光度(A) 值, 即为其 caspase-9 的相对活性值。

1.3.6 FCM 检测细胞凋亡(annexin-V-FITC/PI 双染法) 实验分 4 组: 空白对照组、NSODN 500 nmol/L、survivin ASODN 500 nmol/L 和 survivin ASODN + Ac-DEVD-CHO。后者预先用 100 μ mol/L Z-LEHD-FMK 处理, 各组均于转染 72 h 收取细胞, FCM 检测细胞凋亡。右上象限(UR) 代表晚期凋亡, 左上象限(UL) 代表坏死或晚期死亡, 右下象限(LR) 代表早期凋亡, 左下象限(LL) 是正常活细胞。

1.4 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 Survivin ASODN 对 NCI-H446 细胞形态、细胞凋亡和增殖的影响 光学显微镜下,经 survivin ASODN 处理后的肺癌细胞出现皱缩、变圆、脱落;部分细胞体积缩小,细胞解离成彼此黏附成簇的圆形小体-凋亡小体(图 1A~1C)。FCM 分析发现:Survivin ASODN 500 nmol/L 组 NCI-H446 细胞的 AI 值显著高于空白对照组($P < 0.01$),PI 值显著低于空白对照组($P < 0.01$);而空白对照组与 NSODN 组 AI 值、PI 值比较,差异均无显著性($P > 0.05$)(见表 1)。

表 1 不同浓度 survivin ASODN 对肺癌细胞 AI 及 PI 的影响(%) ($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组	AI	PI
空白对照组	3.75 ± 1.13	75.54 ± 3.43
Lipofectin	3.41 ± 2.42	73.12 ± 2.76
NSODN	4.69 ± 2.55	71.76 ± 1.68
ASODN		
100 nmol/L	19.85 ± 2.09 **	51.03 ± 4.53 **
300 nmol/L	34.39 ± 3.04 **	38.94 ± 3.67 **
500 nmol/L	48.35 ± 2.31 $\Delta\Delta$	24.38 ± 3.10 $\Delta\Delta$
F	196.60	122.47
P	< 0.01	< 0.01
MS 组内	5.430	10.968

q 检验:与空白对照组比较 ** $P < 0.01$;与 ASODN 100、300 nmol/L 比较 $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 $\Delta\Psi_m$ 、胞质 Cyt C 浓度、caspase-9 活性变化

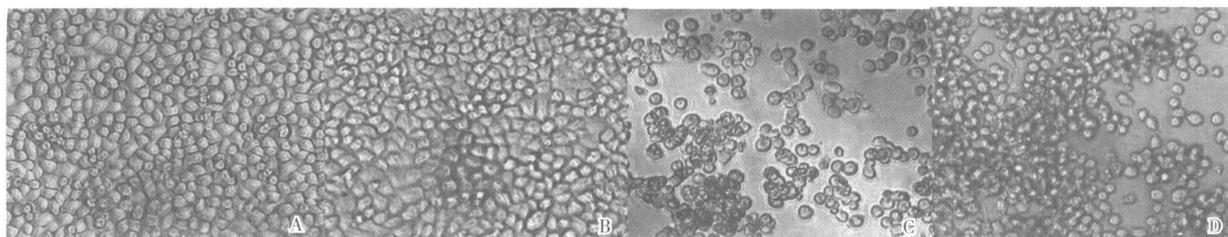


图 1 不同处理对肺癌细胞形态的影响(A: 空白对照组 $\times 200$ 倍; B: NSODN $\times 200$ 倍; C: survivin ASODN 500nmol/L $\times 200$ 倍; D: survivin ASODN + Z-LEHD-FMK)

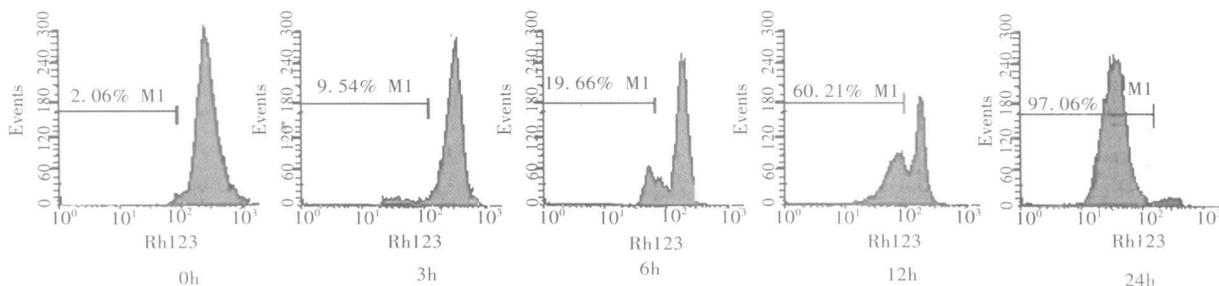


图 2 survivin ASODN 引起肺癌细胞线粒体膜电位变化

Survivin ASODN 诱导肺癌细胞凋亡过程中, $\Delta\Psi_m$ 下降、Cyt C 浓度和 caspase-9 活性升高具有时间依赖性和差异性。图 2 所示,与空白对照组相比, survivin ASODN 诱导肺癌细胞凋亡的过程中,随时间延长弱荧光部分细胞含量逐渐增高,24 h 达到 97.06% ($P < 0.01$)(见图 2、表 2),而空白对照组与 NSODN 组弱荧光部分细胞含量比较差异无显著性($P > 0.05$)。可见,ASODN 作用后 NCI-H446 细胞的线粒体膜电位强度受到影响而下降,使得进入细胞内的荧光染料减少,检测到的荧光变弱。Survivin ASODN 作用后胞质 Cyt C 浓度的增高稍晚于 $\Delta\Psi_m$ 的下降,与空白对照组相比,ASODN 作用 6 h 开始出现 Cyt C 向胞质的释放,24 h 达高峰 ($P < 0.01$)。而空白对照组与 NSODN 组胞质 Cyt C 浓度比较,差异均无显著性($P > 0.05$)(见表 3)。胞质 caspase-9 活性升高晚于前两者,与空白对照组相比,ASODN 作用 12 h caspase-9 活性开始升高,36 h 达高峰,后缓慢下降,48 h 其活性仍较高 ($P < 0.01$)。NSODN 组与空白对照组 caspase-9 活性比较,差异均无显著性($P > 0.05$)(见表 4)。

2.3 Caspase-9 抑制剂阻断凋亡的效果 FCM 检测发现 survivin ASODN 组凋亡率均显著高于空白对照组和 NSODN 组 ($P < 0.01$)。使用 caspase-9 活性抑制剂 Z-LEHD-FMK 后,Survivin ASODN 诱导肺癌细胞凋亡的效果被显著削弱,抑制剂组与 survivin ASODN 组凋亡率比较,差异有显著性 ($P < 0.01$),但抑制剂组与空白对照组比较,差异也有显著性 ($P < 0.01$)(见图 1D、图 3 及表 5)。

表 2 不同处理组不同时间弱荧光细胞(Rh123-)率比较(%) ($n_i=3; \bar{x} \pm s$)

分组	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h
空白对照组	1.76±0.27	1.82±0.31	2.05±0.34	1.87±0.29	1.97±0.37
NSODN	1.78±0.24	1.76±0.28	1.91±0.31	1.99±0.32	1.84±0.35
ASODN	1.80±0.26	10.76±1.63**	18.33±2.84**	63.56±7.19**	95.81±10.27**
F	0.02	85.25	96.89	219.63	250.20
P	> 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
MS 组内	0.066	0.944	2.759	17.294	35.244

q 检验: 与空白对照组比较 ** $P < 0.01$

表 3 不同处理组不同时间胞质内 Cyt C 浓度比较(ng/ml) ($n_i=3; \bar{x} \pm s$)

分组	3 h	6 h	12 h	18 h	24 h	36 h	48 h	72 h
空白对照组	0.079±0.002	0.082±0.003	0.083±0.002	0.081±0.004	0.085±0.010	0.084±0.006	0.083±0.006	0.076±0.009
NSODN	0.080±0.003	0.081±0.002	0.086±0.007	0.085±0.006	0.084±0.005	0.082±0.009	0.083±0.010	0.081±0.006
ASODN	0.083±0.011	0.192±0.121	0.270±0.143	1.086±0.137**	2.422±0.111**	1.031±0.101**	0.108±0.099	0.084±0.010
F	0.29	2.50	5.04	160.36	1317.03	261.30	0.19	0.68
P	> 0.05	> 0.05	> 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.01	> 0.05	> 0.05
MS 组内	0.000	0.005	0.007	0.006	0.004	0.003	0.003	0.000

q 检验: 与空白对照组比较 ** $P < 0.01$

表 4 不同处理组不同时间 caspase-9 活性比较($n_i=3; \bar{x} \pm s$)

分组	6 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
空白对照组	0.024±0.014	0.023±0.009	0.027±0.012	0.028±0.013	0.027±0.012	0.024±0.007
NSODN	0.025±0.013	0.026±0.006	0.028±0.002	0.026±0.008	0.027±0.009	0.025±0.005
ASODN	0.027±0.007	0.043±0.011**	0.091±0.008**	0.340±0.010**	0.130±0.011**	0.031±0.005
F	0.05	4.40	57.07	882.63	91.99	1.30
P	> 0.05	> 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.01	> 0.05
MS 组内	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

q 检验: 与空白对照组比较 ** $P < 0.01$

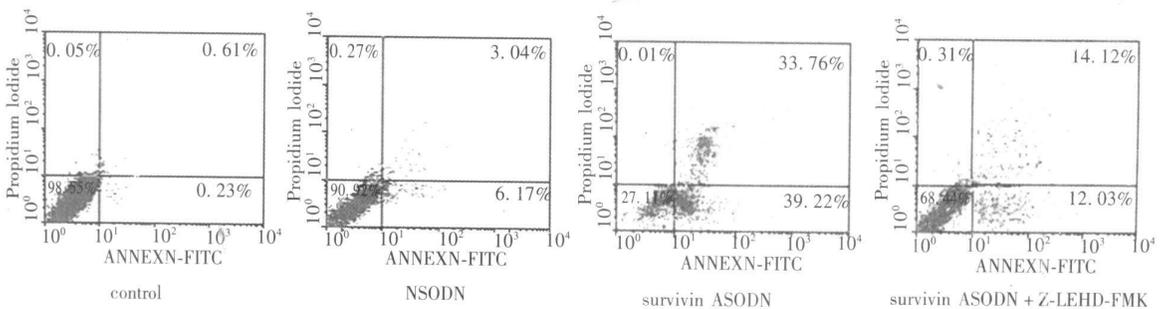


图 3 caspase-9 抑制剂对 survivin ASODN 诱导肺癌细胞凋亡的影响

3 讨论

细胞凋亡是机体重要的生理过程,起着维持内环境稳定的关键作用,凋亡受抑有助于细胞的恶性转化和肿瘤的进展。因此,研究肿瘤细胞凋亡的调节机制对于阐明肿瘤的发生机制和探索新的肿瘤治疗措施具有重要意义。

Survivin 基因由于其强大的抑制凋亡,促进增殖作用以及在肿瘤组织内表达的特异性,使其可能成为靶向治疗的较好靶点^[7]。本实验所用反义序列经我科以往研究证实^[8]能够显著下调肺癌细胞株 survivin 基因和蛋白表达。研究表明:Survivin ASODN 500 nmol/L 作用 72 h 后 NCI-H446 细胞的 AI 值达 48.35%,明显高于空白对照组、lipofectin

组和 NSODN 组; PI 值为 24.38%, 明显低于上述各组。而 NSODN、lipofectin 组 AI 值和 PI 值与空白对照组无差异。提示该靶向序列有确切的抗肿瘤效果。

表 5 不同处理组对肺癌细胞凋亡的影响(%) ($n_r=3; \bar{x} \pm s$)

分组	UR+LR	F	P	MS _{组内}
空白对照组	3.35±0.99			
NSODN	7.52±1.14	478.63	< 0.01	5.923
ASODN	70.27±3.63**			
ASODN+Z-LEHD-FMK	32.71±2.87 $\Delta\Delta$			

q 检验: 与空白对照组比较 ** $P < 0.01$; 与 ASODN 组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$

$\Delta\Psi_m$ 的下降被认为是细胞凋亡发生和线粒体参与调控凋亡过程的一个重要的早期事件^[9]。本研究采用一种能选择性为线粒体所吸收的荧光染料 Rh123 作指示剂, 检测到 survivin ASODN 作用肺癌细胞 3 h 即可引起 $\Delta\Psi_m$ 下降, 线粒体跨膜电位随着 survivin ASODN 作用时间延长而降低直至消失, 作用 12 h $\Delta\Psi_m$ 已大幅度降低, 24 h 基本降至最低值, 即完全去极化。 $\Delta\Psi_m$ 变化呈现出明显的时间—效应关系, 反映出线粒体在 survivin ASODN 诱导肺癌细胞凋亡的早期即开始快速反应, 并且其调控反应一直持续进行。这种变化会进一步引起线粒体释放出致凋亡活性物质, Cyt C 是其中最关键的因子, Cyt C 可与 procaspase-9、Apaf-1 形成凋亡复合物, 进而产生有催化活性的异源四聚体 caspase-9, 后者催化其它的效应蛋白酶, 不可逆地启动细胞凋亡^[5]。本研究发现, 当 survivin ASODN 作用肺癌细胞 6h 后胞质 Cyt C 开始增高, 证实 Cyt C 在此过程中由线粒体膜间隙释放入细胞质中, 这是线粒体发挥促凋亡作用的重要途径。而胞质 caspase-9 活性在 survivin ASODN 作用 12 h 才开始升高, 晚于 Cyt C 的释放。这与 Liu 等^[10]的研究结果相似, 他们用 survivin 突变体 T34A 作用黑素瘤细胞后, 发现线粒体跨膜电位的消失、Cyt C 的释放均早于 caspase 的激活, 这体现了凋亡级联反应的时间连续性。我们进一步使用 caspase-9 抑制剂再检测凋亡, FCM 结果显示: Survivin ASODN 诱导的肺癌细胞凋亡被明显抑制, 再次表明 survivin 主要通过线粒体途径调控凋亡。但值得注意的是, 抑制剂组凋亡率仍高于空白对照组, 说明 Z-LEHD-FMK 不能完全抑制 survivin ASODN 诱导的细胞凋亡, 而我们既往研究已证实 survivin 调控凋亡的过程并无死亡受体途径

的参与。因此, 我们推测, 依赖线粒体的非 caspase 途径可能部分参与 survivin 的凋亡调控, 因为受到凋亡信号刺激后, 线粒体膜间隙可以释放出近 200 余种凋亡相关的活性物质, 其中很多可通过非 caspase 途径调控凋亡, 如 AIF (apoptosis inducing factor) 等^[11]。它们是否参与、如何参与 survivin 对凋亡的调控, 尚待进一步研究。

survivin ASODN 能够显著诱导肺癌细胞凋亡, 抑制其增殖。survivin 主要通过调控线粒体途径抑制凋亡。本研究完整揭示了 survivin ASODN 对线粒体凋亡途径激活的影响, 该结果有助于深入理解 survivin 调控抗肺癌细胞凋亡的分子机制, 并为肺癌的靶向治疗提供理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. *Nat Med*, 1997, 3(8): 917~921.
- [2] 陈余清, 李殿明, 蔡映云, 等. 纤支镜气管镜活检病变组织标本和痰标本 survivin 基因的检测对肺癌的诊断价值[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2005, 28(4): 225~229.
- [3] Shin S, Sung BJ, Cho YS, *et al*. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase 3 and -7 [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(4): 1117~1123.
- [4] 梅柱中, 董燕, 孙志贤. 反义 RNA 抑制存活素基因的表达对 HeLa 细胞的影响[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2001, 33(5): 547~551.
- [5] Joza N, Susin SA, Daugas E, *et al*. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death [J]. *Nature*, 2001, 410(6828): 549~554.
- [6] Olie RA, Simoes-Wust AP, Baumann B, *et al*. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(11): 2805~2809.
- [7] Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(1): 46~54.
- [8] 夏雪梅, 陈余清, 蔡映云, 等. Survivin 反义寡核苷酸诱导肺癌细胞株凋亡的研究[J]. *蚌埠医学院学报*, 2005, 30(1): 4~8.
- [9] Shilo S, Aronis A, Komamitsky R, *et al*. Selenite sensitizes mitochondrial permeability transition pore opening *in vitro* and *in vivo*: A possible mechanism for chemo-protection [J]. *Biochem J*, 2003, 370(Pt 1): 283~290.
- [10] Liu T, Brouha B, Grossman D, *et al*. Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in survivin-targeted melanoma cells[J]. *Oncogene*, 2004, 23(1): 39~48.
- [11] Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, *et al*. Apoptosis inducing factor (AIF): A ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis[J]. *FEBS Lett*, 2000, 476(3): 118~123.