

靶向 survivin 的 siRNA 诱导胰腺癌细胞凋亡的实验研究

管海涛¹, 薛兴欢¹, 王西京¹, 李昂², 秦兆寅³ (西安交通大学第二医院¹肿瘤外科,³普通外科, 陕西 西安 710004;²西安交通大学口腔医院医学研究中心, 陕西 西安 710004)

摘要:目的 采用 RNA 干扰技术 (siRNA) 阻断 survivin 基因的表达, 观察其抑制胰腺癌细胞增殖及诱导胰腺癌细胞凋亡的作用。方法 构建靶向 survivin 的 siRNA 质粒表达载体, 采用 Lipofectamine™2000 转染胰腺癌细胞 PC-2, 采用半定量 RT-PCR、免疫组化技术检测转染前后 PC-2 细胞 survivin 基因表达的变化; 采用 MTT 法检测对 PC-2 细胞增殖的抑制作用; 采用流式细胞术检测其诱导 PC-2 细胞凋亡的作用。结果 靶向 survivin 的序列特异性的 siRNA 可以高效地抑制 PC-2 细胞 survivin 基因表达, 在 mRNA 水平其表达抑制率为 81.25%, 在蛋白质水平其表达抑制率为 74.24%。转染靶向 survivin 的 siRNA 质粒表达载体可以显著抑制 PC-2 细胞的增殖, 细胞接种 24、48 h 后其增殖抑制率分别为 28.00% 和 33.38%; 转染后 24、48 h 可以诱导 8.46%、7.53% 的细胞凋亡。结论 所构建的靶向 survivin 的 siRNA 质粒表达载体可以有效地阻断 PC-2 细胞 survivin 基因表达, 阻断 survivin 基因表达可以显著地抑制 PC-2 细胞的增殖并在一定程度上诱导其凋亡, 靶向 survivin 的 siRNA 在胰腺癌的基因治疗中具有一定的价值。

关键词: RNA 干扰; survivin; 胰腺癌; 凋亡

中图分类号: R735.9 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)02-0169-05

siRNA targeted against survivin induces apoptosis of pancreatic cancer cells

GUAN Hai-tao¹, XUE Xing-huan¹, WANG Xi-jing¹, LI Ang², QIN Zhao-yin³

Department of Oncologic Surgery¹, Department of General Surgery³, Second Hospital of Xi'an Jiaotong University; ²Medical Research Center, Stomatological Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

Abstract: Objective To investigate the effect of a sequence-specific small interfering RNA (siRNA) in suppressing survivin expression and cell proliferation and inducing apoptosis of PC-2 cells. **Methods** The plasmid expression vector of siRNA targeted against survivin was constructed and transfected into PC-2 cells with Lipofectamine™2000. The changes of survivin expression were detected by semi-quantitative RT-PCR and immunohistochemical SP methods. The effect of siRNA in suppressing the proliferation of PC-2 cells was detected by MTT assay, and its role in inducing PC-2 cell apoptosis evaluated by flow cytometry. **Results** The sequence-specific siRNA effectively suppressed survivin expression at both mRNA and protein levels with inhibition rate of 81.25% at mRNA level and 74.24% at protein level. Survivin expression suppression significantly inhibited the proliferation of PC-2 cells, and at 24 and 48 h after cell seeding, the proliferation inhibition rate was 28.00% and 33.38% respectively; 24, 48 h after the transfection, apoptosis occurred in 8.46% and 7.53% of the cells, respectively. **Conclusions** The plasmid expression vector for the siRNA against survivin constructed in the study can effectively and specifically suppress survivin expression in PC-2 cells, and blocking survivin expression suppresses PC-2 cell proliferation and induces cell apoptosis. siRNA targeted against survivin has a potential value in gene therapy for pancreatic cancer.

Key words: RNA interference; survivin; pancreatic cancer; apoptosis

Survivin 基因是于 1997 年发现的凋亡抑制蛋白家族成员之一, 具有抗凋亡和调节细胞周期的双重功能。survivin 的表达具有高度的特异性, 在多数肿瘤组织中存在过表达, 而在大多数正常组织中不表达, 是肿瘤基因治疗的理想靶点。RNA 干扰 (RNAi) 是双链 RNA 介导的转录后基因沉默, 具有高度的特异性和有效性, 正成为基因功能研究的有力工具。因此我们构建了靶向 survivin 的小干扰 RNA (siRNA) 质粒

表达载体并转染胰腺癌 PC-2 细胞, 观察其抑制 PC-2 细胞增殖及诱导其凋亡的作用。

1 材料和方法

1.1 胰腺癌细胞株和培养

胰腺癌细胞株 PC-2 购自第四军医大学动物实验中心, 为贴壁细胞。采用含 100 ml/L 小牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素、0.1 g/L 链霉素的 RPMI 1640 培养基在 37 °C、50 ml/L CO₂、饱和湿度的条件下传代培养。

1.2 靶向 survivin 的 siRNA 质粒表达载体的构建

质粒 Pgenesil-1 购自武汉晶赛生物工程技术有限公司。用 BamHI、HindIII 双酶切使其线性化, 1% 低熔点琼脂糖凝胶回收大片段。针对目的基因 survivin

收稿日期: 2005-08-22

基金项目: 陕西省科技攻关项目 [2004K13-G11(1)]

Supported by the Key Science and Technology Research Project of Shaanxi Province [2004K13-G11(1)]

作者简介: 管海涛 (1971-), 男, 在读博士研究生, 主治医师

的序列 5'-GGA CCA CCG CAT CTC TAC A-3'^[1]设计两条 DNA 链, 一条为: 5'-GATCC GGA CCA CCG CAT CTC TAC A TTCAAGACG TGT AGA GAT GCG GTG GTC C TTTTTT GAATTC A-3'; 另一条为 3'-GCCT GGT GGC GTA GAG ATG T AAGTTCTGC ACA TCT CTA CGC CAC CAG G AAAAAA CTTAAG TTCTGA-5', DNA 链的结构为 BamHI+ 正义链 + 环状结构 + 反义链 + 中止信号 + EcoRI + HindIII。上述两条 DNA 链退火并磷酸化后与线性化质粒载体 Pgenesil-1 连接。取连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 涂布于含 0.05 g/L 卡那霉素的固体 LB 平板上, 37 °C 恒温培养过夜。从每个培养皿上各挑取 3 个单克隆菌落接种于 3 ml 含 0.05 g/L 卡那霉素的 LB 液体培养液中, 37 °C 恒温摇床培养过夜。提取质粒并酶切鉴定、测序。所得质粒命名为 Pgenesil-sur(+)。同法构建阴性对照质粒命名为 Pgenesil-sur(-), 其靶序列为: 5'-GAC TTC ATA AGG CGC ATG C-3', 该序列与人、鼠无同源性。两条 DNA 链的序列为: 5'-GATCC GAC TTC ATA AGG CGC ATG C TTCAAGACG GCA TGC GCC TTA TGA AGT C TTTTTT GTCGAC A-3' 和 3'-G CTG AAG TAT TCC GCG TAC G AAG TTCTGC CGT ACG CGG AAT ACT TCA G AAAAAA CAGCTG TTCTGA-5', 其结构为 BamHI+ 正义链 + 环状结构 + 反义链 + 中止信号 + SalI + HindIII。

1.3 质粒的提取

中量无内毒素质粒提取试剂盒购自北京天为时代公司, 按试剂盒操作说明提取质粒, 紫外分光光度计测定其浓度和纯度, -20 °C 保存备用。

1.4 PC-2 细胞的转染

以 24 孔细胞培养板为例。转染试剂 lipofectamineTM2000 购自 Invitrogen 公司。常规消化收集细胞后, 将细胞接种于 24 孔培养板。转染前 1 d 换用不含抗生素、含有血清的培养基。待细胞生长至密度为 70%~80% 时, 进行转染。用不含抗生素和血清的培养基将质粒 0.8 μ g, lipofectamineTM2000 2.4 μ l 分别稀释至 50 μ l, 混匀后室温放置 5 min, 然后将二者混合均匀, 室温放置 20 min 后加入培养孔中。多孔转染, 按上述比例批量制作转染混合物后进行转染。转染后 6 h, 换用普通完全培养基, 12 h 后于倒置荧光显微镜下观察细胞表达增强绿色荧光蛋白的情况。

1.5 半定量 RT-PCR 检测 survivin 基因 mRNA 表达的变化

细胞接种于 6 cm 培养皿, 分为 3 组: (1) 空白对照组; (2) 阴性对照组; (3) 阳性实验组。每组 3 个培养皿。空白对照组转染时仅加入 lipofectamineTM2000; 阴性对照组转染时使用 Pgenesil-sur(-) 质粒; 阳性实验

组转染时使用 Pgenesil-sur(+) 质粒。转染后 24 h 消化收集 1×10^6 个细胞, 按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA。紫外分光光度计测定其浓度和纯度。RT-PCR 反应采用两步法。(1) cDNA 的合成: 采用 RevertAidTM 第一链 cDNA 合成试剂盒, 取 1 μ g 总 RNA, 按操作说明书合成 cDNA; (2) PCR 反应: 采用北京天为时代公司的一管便捷式 PCR 反应试剂盒。内参照 GAPDH 的引物序列采用国际标准序列: 5'-CGA AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3' (上游引物); 5'-AGC CTT CTC GGT GGT GAA GAC-3' (下游引物), 扩增产物大小为 306 bp。survivin 的引物序列为: 5'-GCA TGG GTG CCC CGA CGT TG-3' (上游引物); 5'-GCT CCG GCC AGA GGC CTC AA-3' (下游引物), 扩增产物大小为 447 bp。用凝胶成像分析仪进行摄像, 用 Dolphin 1D 软件进行半定量分析。survivin 基因的表达强度用 survivin 基因 RT-PCR 反应产物的光密度与内参照 GAPDH RT-PCR 反应产物光密度的比值表示。按以下公式计算 survivin 基因表达的抑制率: survivin 基因表达的抑制率 = (1 - 观察组 survivin 表达强度 / 对照组 survivin 表达强度) \times 100%。

1.6 免疫组化法检测 survivin 基因蛋白表达的变化

将细胞接种于置入了细胞爬片的 24 孔培养板中进行转染。分组及转染同 1.5, 每组 8 孔。转染后 24 h 用 65% 丙酮固定细胞, 免疫组化 SP 法检测 survivin 蛋白的表达。一抗为兔抗人单克隆抗体, 购自北京中山公司, 工作浓度为 1:50。阳性对照为已知 survivin 表达阳性的乳腺癌石蜡切片; 用 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。阳性表达为胞质或胞核出现棕黄色颗粒。根据细胞着色的深浅将 survivin 基因的表达强度分为: (1) 阴性, 细胞不着色, 记 0 分; (2) 弱阳性, 细胞呈淡黄色, 记 1 分; (3) 阳性, 细胞呈棕黄色, 记 2 分; (4) 强阳性, 细胞呈深棕黄色, 记 3 分。每张爬片于高倍镜下随机观察 5 个视野, 计数细胞并对每个细胞进行评分, 最后将评分之和除以细胞总数, 所得数值作为该张细胞爬片 survivin 的表达强度。按 1.5 中的公式计算 survivin 基因表达的抑制率。

1.7 MTT 法检测对胰腺癌细胞增殖的抑制作用

将细胞接种于 6 孔培养板中并进行转染, 分组及转染同 1.5。12 h 后消化、收集细胞, 调整细胞浓度为 1×10^7 个/L, 分别将各组细胞接种于 96 孔培养板, 每组 8 孔, 每孔 200 μ l。另设对照孔调零, 每个检测时间点接种 1 板, 共 3 板。于细胞接种后 0、24、48 h 采用 MTT 法检测对 PC-2 细胞增殖的抑制率: 增殖的抑制率 = (1 - 观察组 A₄₉₀ 值 / 对照组 A₄₉₀ 值) \times 100%。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡

采用 PI 单染法检测 PC-2 细胞凋亡。细胞接种于

6孔培养板, 分组及转染同 1.5, 每组 6 孔。分别于转染后 24、48 h 消化收集细胞, 每次每组各取 3 孔细胞。PBS 缓冲液洗两遍, 用预冷的 75%乙醇固定过夜。1000 r/min、5 min 离心, 倾去上清液, PBS 缓冲液洗两遍, 加入 0.05 g/L 的 RNase, 室温避光 30 min, 去除细胞内 RNA。加入 0.06 g/L 的 PI, 室温避光 30 min 后上机检测。

1.9 统计学处理

应用统计学软件 SPSS10.0 进行统计分析, 多组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

2 结果

2.1 质粒的酶切鉴定和测序结果

质粒 Pgenesil-1 的多克隆酶切位点如下: *Hind*II *I-Xba*I-*Sal*I-*Pst*I-*Bam*HI-U6 Promotor-*Eco*RI-*Sal*I-*Xba*I-*Dra*III。在插入的目的基因片段里, 我们设计了一个 *Eco*RI 的酶切位点[Pgenesil-sur(+)]或 *Sal*I 的酶切位点[Pgenesil-sur(-)]质粒, 插入在质粒 Pgenesil-1 的 *Bam*HI 和 *Hind*III 之间。若插入正确, 就能被 *Eco*RI 或 *Sal*I 酶切出一条约 400 bp 的小带。经酶切分析 Pgenesil-sur(+)、Pgenesil-sur(-)均符合设计要求。送转化菌液去上海博亚生物公司测序, 测序结果(图 1)符合设计要求。

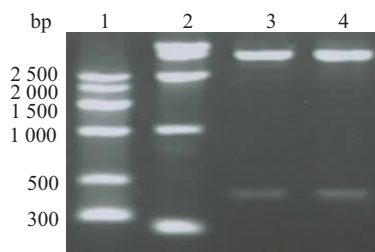


图 1 质粒酶切鉴定凝胶电泳图

Fig.1 Verification of the plasmids digested with restriction endonuclease

Lane 1: Marker VII; Lane 2: Marker VI; Lane 3: Pgenesil-sur(+); Lane 4: Pgenesil-sur(-)

2.2 PC-2 细胞的转染结果

PC-2 细胞转染 Pgenesil-sur(+)]质粒或 Pgenesil-sur(-)]质粒 12 h 后, 于倒置荧光显微镜下观察可见到有增强绿色荧光蛋白的表达, 24 h 左右表达最强(图 2、3), 72 h 后增强绿色荧光蛋白的表达逐渐减弱。

2.3 半定量 RT-PCR 检测 survivin 基因 mRNA 表达的变化

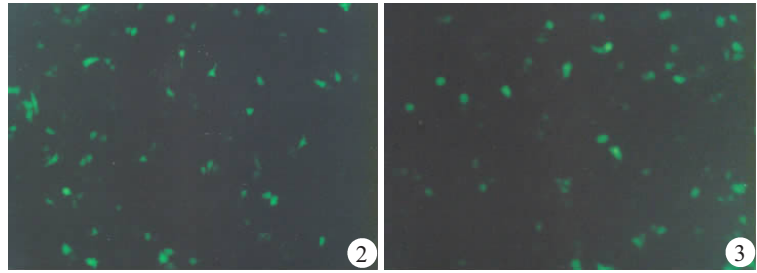


图 2 PC-2 细胞转染 Pgenesil-sur(+)]质粒 24 h 后增强绿色荧光蛋白表达情况

Fig.2 Expression of EGFP in PC-2 cells 24 h after transfection with plasmid Pgenesil-sur(+)] (Original magnification: $\times 200$)

图 3 PC-2 细胞转染 Pgenesil-sur(-)]质粒 24 h 后增强绿色荧光蛋白表达情况

Fig.3 Expression of EGFP in PC-2 cells 24 h after transfection with plasmid Pgenesil-sur(-)] (Original magnification: $\times 200$)

EGFP: Enhanced green fluorescent protein

转染后 24 h, 空白对照组、阴性对照组、阳性实验组 survivin mRNA 的表达强度(图 4)分别为 0.96 ± 0.02 、 0.98 ± 0.03 和 0.18 ± 0.03 , 统计分析表明 PC-2 细胞转染 Pgenesil-sur(+)]质粒后, survivin 的表达被显著抑制($P < 0.05$), 其抑制率达到 81.25%; 转染 Pgenesil-sur(-)]质粒对 PC-2 细胞 survivin 表达则无抑制作用($P > 0.05$)。

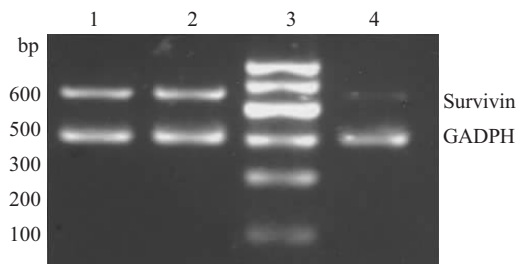


图 4 半定量 RT-PCR 检测 survivin 基因 mRNA 表达变化的凝胶电泳图

Fig.4 Expression of survivin mRNA detected by semi-quantitative RT-PCR

Lane 1: Blank control group; Lane 2: Negative control group; Lane 3: Marker I; Lane 4: Positive experiment group

2.4 免疫组化法检测 survivin 基因蛋白表达的变化

转染后 24 h, 空白对照组、阴性对照组、阳性实验组 survivin 蛋白的表达强度(图 5)分别为 2.29 ± 0.23 、 2.34 ± 0.15 和 0.59 ± 0.16 , 统计分析表明 PC-2 细胞转染 Pgenesil-sur(+)]质粒后, survivin 蛋白的表达被显著抑制($P < 0.05$), 其抑制率达到 74.24%; 转染 Pgenesil-sur(-)]质粒对 PC-2 细胞 survivin 蛋白的表达则无抑制作用($P > 0.05$)。

2.5 MTT 法检测对胰腺癌细胞增殖的抑制作用

MTT 法检测结果表明转染 Pgenesil-sur(+)]质粒后可显著抑制 PC-2 细胞的增殖, 细胞接种后 24、48

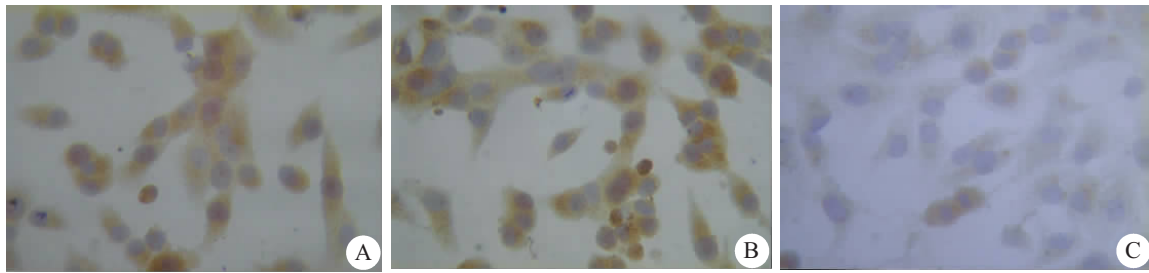


图 5 不同组 survivin 表达情况

Fig.5 Immunohistochemistry for survivin expression in different groups (SP methods, original magnification: $\times 400$)

A: Blank control group; B: Negative control group; C: Positive experiment group

h的增殖抑制率分别为 28.00%和 33.38% ($P < 0.05$)。转染 Pgenesil-sur (-) 质粒对 PC-2 细胞的增殖无影响 ($P > 0.05$)。

2.6 流式细胞术检测 PC-2 细胞的凋亡

转染后 24、48 h,空白对照组、阴性对照组均未检测到细胞凋亡,阳性实验组细胞 24、48 h 的凋亡率分别为 $(8.46 \pm 1.07)\%$ 和 $(7.53 \pm 0.93)\%$ 。统计结果表明转染 Pgenesil-sur(+)质粒后 PC-2 细胞的凋亡率显著升高 ($P < 0.05$),但阳性实验组细胞 24、48 h 的细胞凋亡率差异无显著性 ($P > 0.05$)。

3 讨论

胰腺癌是预后最差的恶性肿瘤之一,手术或化疗后的 5 年生存率仅为 1%~2%。胰腺癌细胞对凋亡的抵抗导致胰腺癌对大多数的抗肿瘤治疗如放疗、化疗、免疫治疗不敏感,这是胰腺癌预后极差的重要原因之一^[2]。近年来的研究证实 survivin 与恶性肿瘤的关系密切,survivin 在大多数肿瘤组织中存在着高表达,且与肿瘤的发生、发展,与血管形成,与肿瘤的化疗敏感性、放射敏感性以及复发、预后等密切相关,阻断 survivin 基因的表达,可以诱导肿瘤细胞的凋亡,提高肿瘤细胞对化疗药物和放疗的敏感性,抑制肿瘤血管形成^[3-4]。对 survivin 与胰腺癌关系的研究表明,survivin 在胰腺癌中也存在着过表达,并通过抑制细胞凋亡参与胰腺癌的发生、发展;survivin 与胰腺癌放疗、化疗敏感性相关,是胰腺癌预后的指标^[5-8]。这些研究提示 survivin 在胰腺癌的基因治疗中具有潜在的重要价值。

目前认为 survivin 抑制细胞凋亡的机制可能为:(1)直接或间接抑制 caspases (caspase-3、caspase-7、caspase-6、caspase-8、caspase-9、caspase-10) 的活性;(2)与 cdk4/P21 复合物相互作用,释放出 P21,P21 再与 caspase-3 结合;(3)与 Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low Pi) 结合并将其隔离,防止 Smac/DIABLO 与其他的凋亡抑制蛋白结合。对 sur-

vivin 在细胞分裂过程中定位的研究表明,survivin 与 INCENP (inner centromere protein)、Aurora-B 等共同在调节细胞周期、细胞分裂的过程中扮演了重要角色。阻断 survivin 的表达,可以破坏微管的形成,导致多倍体的形成和细胞分裂失败^[9]。

RNAi 是自然界生物体的一种遗传现象,是一种由双链 RNA 介导的序列特异性的转录后的基因沉默过程。当外源性的双链 RNA 进入细胞后,被 RNaseIII 蛋白家族成员之一的 Dicer 酶所识别并被切割为 21~23 个核苷酸的短的双链 RNA,即小干扰 RNA (siRNA)。siRNA 与 RNA 介导的沉默复合体结合后,识别并降解同源的 mRNA,从而特异性地抑制目的基因的表达^[10],具有高效、特异、低毒的特点。自发现以来,siRNA 已广泛应用于基因功能、肿瘤和病毒性治疗等的研究。本实验中,我们参考 Kappler 等^[1]的序列,设计构建了靶向 survivin 的 siRNA 质粒表达载体,其转录产物可在体内形成由 1 个茎环所分离的具有反向重复序列的发卡样 RNA,此 RNA 随后被加工成 siRNA 而降解靶基因 mRNA,达到阻断靶基因表达的目的。本实验中所构建的 siRNA 质粒表达载体中含有增强的绿色荧光蛋白,可以方便地观察到转染的效果。进行 RNAi 研究时,目的基因靶序列的选择至关重要,针对不同的靶序列干扰的效果可能相差甚远^[11]。本实验所参考 Kappler 等^[1]的序列已证实对多种肿瘤细胞有效^[12]。我们的实验亦证实该序列对胰腺癌、乳腺癌有效(另文发表),提示该序列可能具有通用性,可以作为研究靶向 survivin 的 RNAi 时的优先考虑的序列。我们采用免疫组化技术来检测 survivin 在蛋白质水平的表达变化有一个显著的优点,即在同一张细胞爬片上本身就存在着自身对照(转染成功的细胞和未转染的细胞),可以直观地看到 RNAi 的效果。

RT-PCR 和免疫组化检测结果表明,本实验中所构建的靶向 survivin 的 siRNA 质粒表达载体具有高度特异性,可以有效地抑制 PC-2 细胞 survivin 的表达。抑制 PC-2 细胞 survivin 基因的表达可以显著抑

制 PC-2 细胞的增殖并诱发一定程度的自发凋亡,提示靶向 survivin 的 siRNA 在胰腺癌的治疗中具有一定的价值,为今后进一步研究提供了必要的实验基础。

参考文献:

- [1] Kappler M, Bache M, Bateerl F, et al. Knockdown of survivin expression by small interfering RNA reduce the clonogenic survival of human sarcoma cell lines independently of P53[J]. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11(3): 186-93.
- [2] Westphal S, Kalthoff H. Apoptosis: targets in pancreatic cancer[J]. *Mol Cancer*, 2003, 2(1): 6.
- [3] Yamamoto T, Tanigawa N. The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer[J]. *Med Electron Microsc*, 2001, 34(4): 207-12.
- [4] Coma S, Noe V, Lavarino C, et al. Use of siRNAs and antisense oligonucleotides against survivin RNA to inhibit steps leading to tumorigenesis[J]. *Oligonucleotides*, 2004, 14(2): 100-13.
- [5] Satoh K, Kaneko K, Hirota M, et al. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors[J]. *Cancer*, 2001, 92(2): 271-8.
- [6] Asanuma K, Kobayashi D, Furuya D, et al. A role for survivin in radioresistance of pancreatic cancer cells[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2002, 93(9): 1057-62.
- [7] Kami K, Doi R, Koizumi M, et al. Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients[J]. *Surgery*, 2004, 136(2): 443-8.
- [8] 刘江伟, 李开宗, 窦科峰, 等. Survivin 反义寡核苷酸诱导胰腺癌细胞凋亡并增加吉西他滨的化疗敏感性[J]. *中华普通外科杂志*, 2004, 19(7): 401-3.
- [9] Liu JW, Li KZ, Dou KF, et al. Survivin antisense oligonucleotide induces apoptosis and sensitizes pancreatic cancer cells to Gemcitabine[J]. *Chin J Gen Surg*, 2004, 19(7): 401-3.
- [10] Chiou SK, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin—an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond[J]. *Med Sci Monit*, 2003, 9(4): 143-7.
- [11] Cheng JC, Moore TB, Sakamoto KM. RNA interference and human disease[J]. *Mol Genet Metab*, 2003, 80(1-2): 121-8.
- [12] Luo KQ, Chang DC. The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the targeted region[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318(1): 303-10.
- [13] 卢昕, 郑启昌, 熊俊, 等. siRNA 抑制肝癌细胞株 HepG2 survivin 基因表达的研究[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2004, 33(6): 696-9.
- [14] Lu X, Zheng QC, Xiong J, et al. Inhibitory effect of siRNA on Survivin expression in HepG2 cells [J]. *J Huazhong Univ Sci Tech (Health Sci)*, 2004, 33(6): 696-9.

(上接 168 页)

- [2] 刘宇虎, 张振书, 肖冰, 等. 人源性大肠癌 cDNA 噬菌体表达文库的构建及鉴定[J]. *中华消化杂志*, 2003, 23(10): 599-602.
- [3] Liu YH, Zhang ZS, Xiao B, et al. Construction and identification of human colorectal carcinoma cDNA phage expression library [J]. *Chin J Dig*, 2003, 23(10): 599-602.
- [4] 刘宇虎, 张振书. 应用 SEREX 技术筛选肿瘤抗原的研究进展[J]. *实用癌症杂志*, 2003, 18(3): 320-2.
- [5] 刘宇虎, 张振书, 钟东, 等. 人源性大肠癌抗原基因的 SEREX 筛选[J]. *世界华人消化杂志*, 2003, 11(9): 1378-81.
- [6] Liu YH, Zhang ZS, Zhong D, et al. Screening of human colorectal carcinoma associated antigen genes by SEREX [J]. *World Chin J Digestol*, 2003, 11(9): 1378-81.
- [7] Scanlan MJ, Chen YT, Williamson B, et al. Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies[J]. *Int J Cancer*, 1998, 76(5): 652-8.
- [8] Hampton TA, Conry RM, Khazaeli MB, et al. SEREX analysis for tumor antigen identification in a mouse model of adenocarcinoma [J]. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7(3): 446-55.
- [9] Line A, Slucka Z, Stengrevics A, et al. Characterization of tumour-associated antigens in colon cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2002, 51(10): 574-82.
- [10] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(17): 3389-402.
- [11] Deblandre GA, Marinx OP, Evans SS, et al. Expression cloning of an interferon-inducible 17-kDa membrane protein implicated in the control of cell growth[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(40): 23860-6.
- [12] Sulston JE, Waterston R. Toward a complete human genome sequence [J]. *Genome Res*, 1998, 8(11): 1097-108.
- [13] Ridanpaa M, van Eenennaam H, Pelin K, et al. Mutations in the RNA component of RNase MRP cause a pleiotropic human disease, cartilage-hair hypoplasia[J]. *Cell*, 2001, 104(2): 195-203.
- [14] Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, et al. Generation and initial analysis of more than 15 000 full-length human and mouse cDNA sequences[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(26): 16899-903.
- [15] Shuford W, Raff HV, Finley JW, et al. Effect of light chain V region duplication on IgG oligomerization and *in vivo* efficacy[J]. *Science*, 1991, 252(5006): 724-7.
- [16] Paterson T, Innes J, McMillan L, et al. Variation in IgG1 heavy chain allotype does not contribute to differences in biological activity of two human anti-rhesus (D) monoclonal antibodies [J]. *Immunotechnology*, 1998, 4(1): 37-47.