

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)03-0269-06

***c-myc* 反义寡核苷酸对卵巢癌细胞 COC1/DDP 顺铂耐药的逆转作用**

孙迎春, 张晓慧, 张爱荣*, 陈官萍, 付建武(山东大学第二附属医院 妇产科, 济南 250033)

[摘要] 目的: 探讨 *c-myc* 反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)逆转人卵巢癌细胞顺铂(cisplatin, 又称 DDP)耐药的可行性。**方法:** 以卵巢癌 DDP 耐药细胞株 COC1/DDP 为研究对象, 实验组以脂质体为载体分别将 *c-myc* ASODN、*c-myc* 正义寡核苷酸(sense oligodeoxynucleotide, SODN)转染到 COC1/DDP 细胞内, 阴性对照组细胞以同体积的培养液转染。采用计数法检测转染细胞增殖变化, MTT 法检测 DDP 对细胞增殖的抑制率, RT-PCR、免疫组织化学技术分别检测转染细胞及 *c-myc* ASODN 治疗后裸鼠移植瘤 *c-myc* mRNA 及蛋白的表达, 研究 *c-myc* ASODN 逆转癌细胞耐药及降低肿瘤恶性表型和成瘤能力的作用。**结果:** 实验组转染 ASODN 后 COC1/DDP 细胞增殖被抑制; 对 DDP 的敏感性提高, 细胞生长抑制率增高, 与 SODN 组及阴性对照组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。ASODN 转染后 COC1/DDP 细胞的 *c-myc* mRNA 和蛋白表达均明显降低, 与相同浓度 SODN 转染组、阴性对照组的 COC1/DDP 细胞比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。裸鼠腹水瘤模型中 ASODN + DDP 治疗组与单纯 DDP 治疗组及 SODN + DDP 治疗组相比较, 腹水少、腹腔内瘤块少且体积小、移植瘤中 *c-myc* mRNA 和蛋白的表达均明显降低。**结论:** 体外、体内实验中 *c-myc* ASODN 均能有效地逆转卵巢癌细胞 DDP 耐药性, *c-myc* 反义寡核苷酸可望成为一种有效的卵巢癌治疗方法。

[关键词] 卵巢癌; *c-myc*; 反义寡核苷酸; 顺铂; 耐药性**[中图分类号]** R737.31 **[文献标志码]** A***c-myc* antisense oligodeoxynucleotides in reversion of cisplatin resistance in ovarian cancer cell line COC1/DDP**

SUN Ying-chun, ZHANG Xiao-hui, ZHANG Ai-rong*, CHEN Guan-ping, FU Jian-wu (Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, Shandong University, Jinan 250033, China)

[Abstract] Objective: To evaluate the feasibility of *c-myc* antisense oligodeoxynucleotides (ASODN) in reversing cisplatin (DDP) resistance in ovarian cancer cell line COC1/DDP. **Methods:** COC1/DDP cells were transfected with *c-myc* ASODN, *c-myc* sense oligodeoxynucleotides(SODN), and same volume of culture medium(negative control) separately by lipofectamine. Cell proliferation was determined by cells counting for 6 days. Then cells were treated with cisplatin and the inhibitory rates of cells were determined by MTT. RT-PCR and immunohistochemistry technique were used to determine the *c-myc* mRNA and protein *in vitro* and *in vivo*. The effectiveness of *c-myc* ASODN in reversing drug resistance and reduce malignancy/tumorigenesis of COC1/DDP cells was analyzed. **Results:** Compared with cells in *c-myc* SODN and negative control groups, those in *c-myc* ASODN transfected group became sensitive to DDP and their proliferation was significantly inhibited (both $P < 0.05$). Expression *c-myc* mRNA and protein in COC1/DDP cells was significantly decreased in *c-myc* ASODN group in comparison with that in the other 2 groups (both $P < 0.05$). Nude mice intraperitoneally transplanted with ovarian cancer ascites had less ascites, less and small tumors, and decreased expression of *c-myc* mRNA and protein after they were treated with ASODN + DDP than they were treated with DDP alone or with SODN + DDP. **Conclusion:** *c-myc* ASODN can reverse the resistance of ovarian cancer cells to cisplatin *in vitro* and *in vivo* and it may be a new treatment method for ovarian cancer.

[Key words] ovarian cancer; *c-myc*; antisense oligodeoxynucleotides; cisplatin; drug resistance

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(3): 269-274]

[基金项目] 山东大学特色专业基金(No. 39740736). Supported by Special Subject Foundation of Shandong University(No. 39740736)**[作者简介]** 孙迎春(1958-), 女, 山东省昌邑市人, 硕士研究生, 主要从事妇科肿瘤基础临床研究, 现在昌邑市第一人民医院工作

* Corresponding author. E-mail: zhangairong2001@yahoo.com.cn

目前卵巢癌的一线化疗是以铂类药物为主的联合化疗方案^[1-2]。对化疗药物的耐药,是卵巢癌复发和转移的主要原因^[3]。近年来经细胞凋亡机制的研究证实,抗细胞凋亡因子在肿瘤细胞的生长及耐药性产生中起着重要作用^[4]。*c-myc* 是细胞凋亡的重要调控基因^[5],与肿瘤耐药的形成为密切关系^[6]。本实验以卵巢癌顺铂(cisplatin, 又称 DDP)耐药细胞株 COC1/DDP 为模型,将 *c-myc* 反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)转染到 COC1/DDP 细胞内,通过体外培养及动物实验,观察其对卵巢癌 DDP 耐药的逆转作用,为卵巢癌的临床治疗寻找新的途径。

1 材料与方法

1.1 研究对象

人卵巢癌耐药细胞株 COC1/DDP 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心,以含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 细胞培养液在 37 ℃、5% CO₂、相对湿度为 90% 的培养箱中培养,贴壁生长,取对数生长期细胞供实验使用。4 ~ 6 周龄雌性 BALB/c 裸鼠 20 只,购自上海斯莱克实验动物有限公司[实验动物合格证号为 SCXK(沪)2003-0003]。

1.2 主要试剂

c-myc 反义链由上海博亚生物技术有限公司合成,序列为 5'-CCTCTCGAGGCAGGAGGG-3',其碱基由硫代磷酸修饰。正义寡核苷酸(sense oligodeoxynucleotide, SODN)序列: 5'-ATGCCCTCAACGTT-3',序列设计参考文献[6]的方法。RPMI 1640 培养液、RNA 提取试剂 TRIzol 和转染剂脂质体 lipofectamine 2000,均为美国 GIBCOL 公司产品。DDP 购自山东齐鲁制药厂。RT-PCR 试剂盒由大连宝生物有限公司提供。甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砷及锥虫蓝均购自美国 Sigma 公司。兔抗人多克隆抗体 *c-myc* 及免疫组织化学试剂盒均为北京中山生物技术公司产品。

1.3 细胞计数法观察 *c-myc* ASODN 转染对卵巢癌细胞生长的影响

对数生长期 COC1/DDP 细胞,以 1×10^5 /孔接种至 6 孔板,待其生长至 90% 融合时,实验组用 lipofectamine 2000 脂质体介导,将 ASODN、SODN 转染到 COC1/DDP 细胞内,即分别为 COC1/DDP/ASODN、COC1/DDP/SODN。设计 3 种质量浓度: 4、8、16 $\mu\text{g/ml}$,分别于转染 24、48、72 h 后终止。以等体积 RPMI 1640 培养液代替寡核苷酸转染作为阴性对照组。3 组细胞按 $1 \times$

10^4 /孔接种于 24 孔培养板中,每天取 3 孔细胞用胰酶消化制成单个细胞后,用锥虫蓝染色、计数、取均值、绘制细胞生长曲线^[7]。

1.4 MTT 法检测 DDP 作用后对转染卵巢癌细胞增殖的影响

实验组和阴性对照组细胞按 1×10^3 /孔分别接种于 96 孔培养板中,以不加细胞只加培养液的孔作为调零孔。每孔细胞经 30 $\mu\text{g/ml}$ DDP 作用 24 h 后,以 MTT 法检测各孔的光密度(*D*)值,计算细胞的抑制率^[8]。

1.5 RT-PCR 法检测转染卵巢癌细胞 *c-myc* mRNA 的表达水平

收集 3 组细胞各 5×10^6 个,用 TRIzol 试剂提取总 RNA,反转录(RT)、PCR 扩增。*c-myc* 引物序列: 上游 5'-AGGTCGCTCTGCTGCTGCT-3',下游 5'-ATGCCCTCAACGTTAGCT-3',扩增片段长度为 119 bp。 *β -actin* 基因作为内参照,上游引物序列 5'-ATGCCCACAGGATGCAGA-3',下游引物序列 5'-GAGTACTTGCCTCAGGAGGA-3',扩增片段长度为 156 bp。产物 2% 琼脂凝胶电泳,Smart View 凝胶成像分析系统分析结果。应用计算机对电泳条带灰度值进行分析,以 *c-myc* 条带灰度值/ *β -actin* 条带灰度值的比值表示 mRNA 水平。

1.6 免疫细胞化学法检测转染 ASODN 的卵巢癌细胞 *c-myc* 蛋白的表达

应用免疫细胞化学技术检测各组细胞 *c-myc* 蛋白的表达^[9]。一抗为抗人 *c-myc* 小鼠单抗(1:100),二抗为生物素化山羊抗鼠 IgG。DAB 显色试剂盒内含 DAB、H₂O₂、Tris 各 3 ml,临用前配置成 DAB 显色液。结果判定:排除爬片边缘细胞,10 \times 20 中倍镜下每个视野随机选 30 个细胞。*c-myc* 蛋白染色阳性为细胞质呈清晰棕褐色颗粒。按着色强弱分为 4 个等级:无着色为“-”,淡棕黄色为“+”,棕黄色为“++”,棕褐色为“+++”。

1.7 裸鼠腹腔移植瘤实验

1.7.1 裸鼠卵巢癌腹水瘤模型的建立 取对数期生长卵巢癌 DDP 耐药细胞 COC1/DDP,用无血清的 RPMI 1640 培养液调整细胞密度至 2.5×10^7 个/ml。取 0.2 ml COC1/DDP 细胞悬液,于 30 min 内分别注射于裸鼠腹腔。

1.7.2 实验干预 卵巢癌腹水瘤模型平均成瘤时间为 3 周左右,可见裸鼠腹围明显增加。共成功建立腹水瘤模型裸鼠 15 只,将其随机分成 3 组:DDP 治疗组,DDP 腹腔注射;ASODN + DDP 治疗组,ASODN + DDP 腹腔注射;SODN + DDP 治疗组,

SODN + DDP 腹腔注射。寡核苷酸用量为每只模型鼠每天 $10 \mu\text{g}$ (0.2 ml) 无血清 RPMI 1640 培养液 10 倍稀释的 lipofectamine 2 000 包裹的 ASODN 及 SODN, 分别于 DDP 治疗前 3 天腹腔注射; DDP 用量每只 $2 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 连用 3 d。1 周后重复用药 1 次, 治疗 2 周。

1.7.3 干预效果观察 每天观察裸鼠一般情况, 每隔 5 d 测量 1 次腹围。裸鼠死亡后立即取部分肿瘤组织以 10% 中性甲醛溶液固定, 另取部分肿瘤组织保存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中。至用药后第 40 天, 处死全部存活裸鼠, 分离出肿瘤组织, 采用 RT-PCR 和免疫组化检测 *c-myc* mRNA 及蛋白的表达, 具体试剂及步骤同 1.5 和 1.6。

1.8 统计学处理

应用 SPSS13.0 软件包进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 寡核苷酸转染对 COC1/DDP 细胞生长的抑制

实验组经 ASODN 转染后, 细胞生长受到明显抑制, 部分细胞出现形态不规则、大小不一致、细胞膜不光滑及折光性差等变化。SODN 和阴性对照组细胞贴壁生长良好。至第 5 天计数细胞发现, 4、8、16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ASODN 转染后, 细胞数分别为 $(3.92 \pm 0.33) \times 10^4$ 个、 $(3.67 \pm 0.41) \times 10^4$ 个、 $(3.07 \pm 0.18) \times 10^4$ 个; SODN 组、阴性对照组分别为 $(7.90 \pm 0.30) \times 10^4$ 个、 $(8.40 \pm 0.46) \times 10^4$ 个。ASODN 组与 SODN 组、阴性对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 以 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ASODN 抑制效应最明显; SODN 组与阴性对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1)。

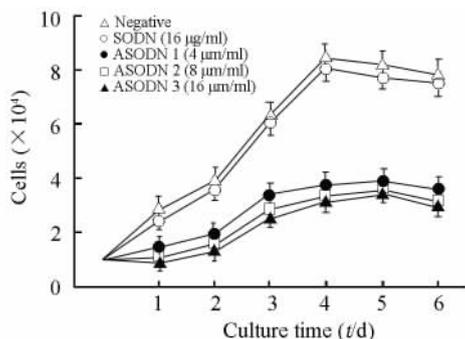


图 1 寡核苷酸转染对 COC1/DDP 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of oligonucleotide on COC1/DDP cell proliferation after transfection

2.2 DDP 对寡核苷酸转染后细胞增殖的抑制

两组 COC1/DDP 细胞经 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP 作用 24、48、72 h, 结果显示, ASODN 组与 SODN 组、阴性对照组比较, COC1/DDP 细胞增殖的差异有显著的统计学意义 ($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 DDP 作用不同时间对 COC1/DDP 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, %)

Tab. 1 Inhibitory effect of different time of DDP on COC1/DDP cells proliferation

Groups	24 h	48 h	72 h
ASODN + DDP	$71.62 \pm 0.71^{**}$	$83.84 \pm 0.65^{**}$	$95.37 \pm 0.41^{**}$
SODN + DDP	1.05 ± 0.18	2.31 ± 0.34	3.33 ± 0.17
Negative	1.17 ± 0.35	3.26 ± 0.65	3.92 ± 0.21

** $P < 0.01$ vs SODN + DDP group or negative control group

2.3 寡核苷酸转染后各组细胞 *c-myc* mRNA 表达水平的变化

经 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ASODN 转染后, *c-myc* mRNA 表达减弱。转染 24、48、72 h 后, *c-myc* mRNA 表达量分别为 (0.98 ± 0.05) 、 (0.89 ± 0.04) 及 (0.76 ± 0.01) , 分别与 SODN 组的 (1.57 ± 0.03) 、阴性对照组的 (1.63 ± 0.02) 比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2)。

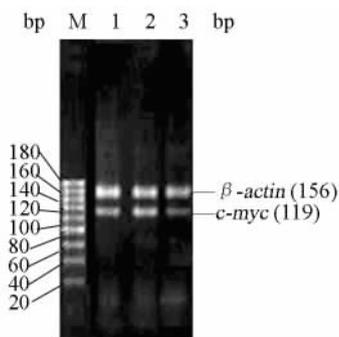


图 2 ASODN 转染 72 h 对 COC1/DDP *c-myc* mRNA 表达水平的影响

Fig. 2 Effect of *c-myc* ASODN on COC1/DDP *c-myc* mRNA expression 72 h after transfection

M: Marker; 1: SODN; 2: Negative; 3: ASODN

2.4 寡核苷酸转染后各组细胞 *c-myc* 蛋白表达水平的变化

SODN 组、阴性对照组 COC1/DDP 细胞中可见到较强的 *c-myc* 蛋白表达, 细胞质呈棕色颗粒; ASODN 组细胞只见少量 *c-myc* 蛋白表达, 染色较浅 (图 3)。

2.5 *c-myc* ASODN 对裸鼠腹腔转移瘤治疗的影响

裸鼠接种 COC1/DDP 细胞后,平均成瘤时间为 3 周左右。治疗实验结果显示, SODN 组、DDP 组裸鼠的平均腹围随时间推移呈不同程度增大,而

ASODN 组裸鼠平均腹围明显缩小。治疗至 20 d 时,ASODN 组裸鼠平均腹围和其他组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$,表 2)。

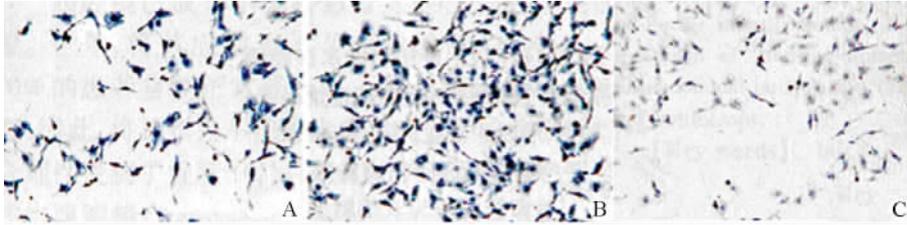


图 3 寡核苷酸转染后 COC1/DDP 细胞中 *c-myc* 蛋白的表达(S-P, ×200)

Fig.3 Expression of *c-myc* protein in COC1/DDP cell after oligonucleotide transfection(S-P, ×200)

A:Expression of *c-myc* protein in SODN group(+++); B: Expression of *c-myc* protein in negative control (+++); C:Expression of *c-myc* protein in ASODN group (+)

表 2 ASODN 对各组腹水移植瘤裸鼠腹围的影响($\bar{x} \pm s, l/cm$)

Tab.2 Effect of ASODN on abdominal circumference in different groups of graft-tumor in nude mice ($\bar{x} \pm s, l/cm$)

Groups	0 d	5 d	10 d	15 d	20 d
ASODN + DDP	6.87 ± 0.23	7.07 ± 0.30	6.93 ± 0.12	6.26 ± 0.11	6.10 ± 0.17*
SODN + DDP	6.77 ± 0.22	7.15 ± 0.23	7.45 ± 0.14	7.89 ± 0.09	8.05 ± 0.22
Negative control	7.15 ± 0.15	7.25 ± 0.17	7.78 ± 0.16	8.12 ± 0.14	8.67 ± 0.15

* $P < 0.05$ vs SODN + DDP or negative control

处死裸鼠后可见 DDP 治疗组裸鼠腹腔内有明显腹水形成,呈乳白色、黏稠;瘤块大,分布于网膜、肠系膜、盆腔腹膜表面,肝、脾表面可见明显的肿瘤组织;单侧或双侧卵巢明显增大,附件区粘连。ASODN + DDP 治疗组裸鼠腹水少,瘤块少且体积较 DDP 组小,未累及肝、脾表面,粘连较轻。SODN + DDP 治疗组裸鼠的大体观察与 DDP 组相似。

RT-PCR 结果显示,ASODN 组瘤体 *c-myc* mRNA 为 0.095 ± 0.047 ,SODN 组为 0.653 ± 0.031 ,DDP 组为 0.784 ± 0.019 。ASODN 组瘤组织 *c-myc* mRNA 表达出现下调,和其他组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$,图 4)。免疫组织化学染色显示,DDP 治疗组及 SODN + DDP 治疗组 *c-myc* 主要位于肿瘤细胞质,呈棕红色颗粒,表达较强;而 ASODN + DDP 治疗组则可见 *c-myc* 表达明显降低,染色较浅(图 5)。

3 讨论

化疗药物作用肿瘤后,相关基因靶点突变是肿瘤耐药性形成的重要原因^[10],进而导致了临床肿瘤化疗效果不佳或失败。通过对异常表达基因进行修

饰、干扰或封闭,从而逆转肿瘤耐药,正逐渐成为肿瘤有效化疗的重要途径之一^[6,11]。

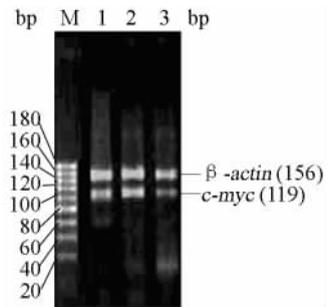


图 4 各组裸鼠移植瘤 *c-myc* mRNA 表达

Fig.4 Expression of *c-myc* mRNA in different groups of graft-tumor in nude mice

M:Marker; 1: Expression of *c-myc* mRNA in SODN group; 2: Expression of *c-myc* mRNA in negative control; 3: Expression of *c-myc* mRNA in ASODN group

耐药细胞系中凋亡抑制基因 *c-myc* mRNA 高表达已经得到认可^[12]。ASODN 俗称为“基因封条”,其与相应的异常激活或有害基因的 mRNA 编码序

列结合后可使 mRNA 表达减少并失去编码蛋白的功能^[13]。反义寡核苷酸技术,是应用反义寡核苷酸类

药物在转录和翻译水平抑制特定基因表达的基因治疗技术,是一种新的药物开发方法^[14]。

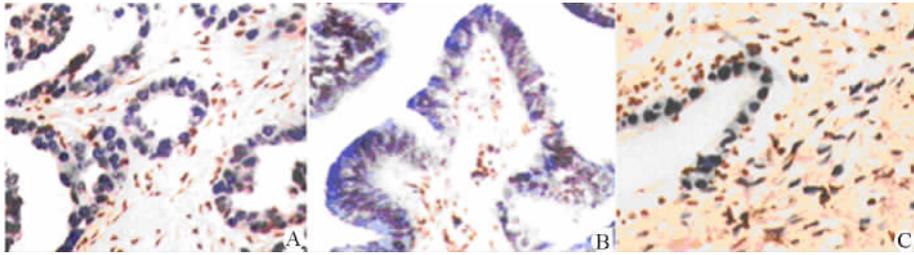


图5 各组裸鼠移植瘤中 *c-myc* 蛋白的表达(S-P, ×200)

Fig.5 Expression of *c-myc* protein in different groups of graft-tumor in nude mice (S-P, ×200)

A: Expression of *c-myc* protein in SODN group(+++); B:Expression of *c-myc* protein in negative control(+++);

C: Expression of *c-myc* protein in ASODN group(+)

本实验用 *c-myc* ASODN 转染卵巢癌耐药细胞 COC1/DDP,结果显示 ASODN 转染后,显微镜下观察 COC1/DDP 细胞生长明显受到抑制,出现凋亡细胞形态学变化,而阴性对照组细胞贴壁生长良好。细胞计数亦显示 ASODN 组、SODN 组、阴性对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示 *c-myc* ASODN 通过有效地下调 *c-myc* 表达,促进了肿瘤细胞的凋亡。MTT 法检测结果显示,DDP 作用后 ASODN 组细胞生长抑制率明显高于 SODN 组、阴性对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示 *c-myc* ASODN 可实现 COC1/DDP 细胞对 DDP 耐药性的逆转,明显提高 COC1/DDP 细胞对 DDP 的敏感性。RT-PCR 和免疫组化检测结果显示,ASODN 转染组 COC1/DDP 细胞的 *c-myc* mRNA 及蛋白表达均明显降低,与相同浓度 SODN 转染组、阴性对照组 COC1/DDP 细胞分别比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。本研究分别从 mRNA 和蛋白质水平证明了 *c-myc* ASODN 对卵巢癌细胞 *c-myc* 表达具有明显的抑制作用。考虑其作用机制有:(1)合成的 *c-myc* ASODN 在一定的条件下与 *c-myc* 双螺旋 DNA 结合形成局部的分子间三链 DNA^[15]。三链结构形成后所引起的结合部位 DNA 结构的改变以及 ASODN 本身所引起的位阻效应,可干扰核蛋白因子和聚合酶与 DNA 的这一位点结合^[16],因此能在转录水平抑制基因转录的起始或延伸。(2)ASODN 也可以与 *c-myc* mRNA 直接结合,抑制其转运到核糖体^[17-18]。(3)ASODN 能与翻译的起始位点结合阻抑翻译过程^[15]。(4)带有负电荷的 ASODN 与互补 *c-myc* mRNA 结合后可以激活核糖核酸酶,或者能特异地切割 RNA /DNA 杂交双链中的 RNA^[19]。

本实验还通过裸鼠腹腔移植瘤实验对体内 *c-myc* ASODN 逆转卵巢癌 DDP 耐药的可行性进行了探讨。结果显示,治疗 3 周后 ASODN 组裸鼠腹围与 SODN 组、阴性对照组相比明显缩小,提示 *c-myc* ASODN 在活体内亦可通过下调卵巢癌细胞 *c-myc* 的表达而抑制瘤体的生长。RT-PCR 和免疫组化结果亦显示 ASODN 组移植瘤 *c-myc* mRNA 及蛋白表达较对照组均明显降低,差异有统计学意义,进一步从体内实验分析了 *c-myc* ASODN 的抑瘤作用。提示 *c-myc* ASODN 可作为一种有效的基因制剂应用于卵巢癌临床治疗,特别是针对于卵巢癌 DDP 耐药的治疗。

然而细胞对天然 ASODN 的摄取率很低,应用脂质体介导 ASODN 向细胞核转运可以提高转染效率^[20]。本试验使用 lipofectamine 2 000 脂质体,其由磷脂双脂层包裹液体成分构成,在结构上与细胞膜相似,ASODN 包裹在脂质双层中形成的阳离子脂质体复合物与带电荷的细胞膜亲和结合,然后通过胞饮作用进入细胞内,可以增加 ASODN 的吸收。同时,对寡核苷酸均采用全程硫代修饰其磷酸骨架形成硫化嵌合型反义寡核苷酸,修饰后得磷酸二酯键与天然的磷酸二酯键非常相似,有较强的抗核酸酶能力^[21]。并且,本实验中 ASODN 剂量为体外试验验证有效剂量的 125%。这些都保证了 *c-myc* ASODN 的有效性。

综上所述,本研究通过体内、体外实验初步证明了 *c-myc* ASODN 可通过下调卵巢癌 *c-myc* 的表达,逆转卵巢癌 DDP 耐药,提高其对 DDP 的敏感性,表明 *c-myc* 反义寡核苷酸可望成为一种有效的卵巢癌治疗方法。

[参 考 文 献]

[1] 丰有吉,沈 铿 主编. 妇产科学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2005: 338.

[2] Kikuchi Y. The mechanism of cisplatin-resistance in ovarian cancer [J]. Hum Cell, 2001, 14(2): 115-133.

[3] Armstrong DK. Relapsed ovarian cancer: challenges and management strategies for a chronic disease [J]. Oncologist, 2002, 7 (suppl5): 20-28.

[4] Notarbartolo M, Cervello M, Dusonchet L, et al. Resistance to diverse apoptotic triggers in multidrug resistant HL60 cells and its possible relationship to the expression of P-glycoprotein, Fas and of the novel anti-apoptosis factors IAP (inhibitory of apoptosis proteins) [J]. Cancer Lett, 2002, 180(1):91-101.

[5] Nieminen AI, Partanen JI, Hau A, et al. c-myc primed mitochondria determine cellular sensitivity to TRAIL-induced apoptosis [J]. EMBO J, 2007, 26(4): 1055-1067.

[6] Sinha BK, Yamazaki H, Eliot HM , et al . Relationships between proto-oncogene expression and apoptosis induced by anti-cancer drugs in human prostate tumor cells [J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1270(1): 12-18.

[7] 刘庭波,吕联煌. c-myc 反义寡脱氧核苷酸诱导人髓系白血病细胞系 HL-60 细胞凋亡 [J]. 中国实验血液学杂志, 2001, 9 (1): 34-38.

[8] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养 [M]. 西安:世界图书出版公司, 2004: 239-243.

[9] 沈关心,周汝麟. 现代免疫学实验技术 [M]. 2 版. 武汉:湖北科学技术出版社, 2002, 209-216.

[10] Saeki T, Tsuruo T, Sato W , et al . Drug resistance in chemotherapy for breast cancer [J]. Cancer Chemath Pharmacol, 2005, 56 (Suppl 1):84-89.

[11] 彭 智,肖志坚,王 一,等. SiRNA 逆转 K562/A02 多药耐药的研究 [J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(1): 5-7.

[12] He Y, Zhang J, Zhang J, et al . The role of c-myc in regulating mdrl gene expression in tumor cell line KB [J]. Chin Med J (Engl), 2000, 113(9): 848-851.

[13] Wang JY, Dflica K. Computational identification of antisense oligonucleotides that rapidly hybridize to RNA [J]. Oligonucleotides, 2004, 14(3): 167-175.

[14] 王 颖,李春艳,林春艳. VEGF 反义寡核苷酸对 Lewis 肺癌细胞的抑制作用 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006, 13(4): 281-285.

[15] Hunter AJ, Leslie RA, Gloger IS, et al . Probing the function of novel genes in the nervous system: is antisense the answer [J]? Trends Neurosci, 1995, 18(8):329-331.

[16] Helene C. The anti-gene strategy: control of gene expression by triplex-forming-oligonucleotides [J]. Anticancer Drug Des, 1991, 6 (6):569-584.

[17] 许凤娣,金志军. 肿瘤的反义核酸治疗 [J]. 国外医学: 生理病理科学与临床分册, 1995, 15(3):149-151.

[18] Okamoto K, Freundlich M. Mechanism for the autogenous control the crp operon; transcriptional inhibition by a divergent RNA transcript [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(4): 5000-5004.

[19] Wahlestedt C, Golanov E, Yamamoto S, et al. Antisense oligodeoxynucleotides to NMDA-R1 receptor channel protect cortical neurons from excito-toxicity and reduce focal ischaemic infarctions [J]. Nature, 1993, 363(6426): 260-263.

[20] Zhang C, Pei J, Kumar D, et al . Antisense oligonucleotides: target validation and development of systemically delivered therapeutic nanoparticles [J]. Methods Mol Biol, 2006, 361(2): 163-185.

[21] Wang Z, Song Q, Sanghvi YS. Dimethylthiarum disulfide: new sulfur transfer reagent in phosphorothioates oligonucleotide synthesis [J]. Methods Mol Biol, 2005, 288(9): 51-64.

[收稿日期] 2006 - 12 - 27 [修回日期] 2007 - 03 - 01

[本文编辑] 郁晓路

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

参考文献题名后须标注文献类型和文献载体标志代码

本刊参考文献按照国家标准 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》的要求进行著录。该国家标准要求,每条文献的题名后都须标上[文献类型标志]或[文献类型标志/文献载体标志]。对纸质文献,如为期刊中析出文献,题名后应标上[J];如为专著中析出文献,题名后应标上[M]。对电子文献,如为网络期刊析出文献,题名后须标上[J/OL];如为网络专著中析出文献,题名后须标上[M/OL]。

现把常用的文献类型标志代码和电子文献载体标志代码介绍如下:

表 1 文献类型和文献载体标志代码

文献类型	标志代码	文献类型	标志代码	载体类型	标志代码
期 刊	J	报 纸	N	磁 带	MT
专 著	M	专 利	P	磁 盘	DK
汇 编	G	标 准	S	光 盘	CD
会 议 录	C	数 据 库	DB	联机网络	OL
学 位 论 文	D	计 算 机 程 序	CP		
报 告	R	电 子 公 告	EB		