

· 论 著 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2007 )05-0461-05

**bFGF 反义硫代寡核苷酸增强人喉鳞癌 Hep2 细胞的化疗敏感性**

黄红亮, 王 宏, 向军俭\*, 唐 勇, 邓 宁, 杨红宇 (暨南大学 分子免疫学与抗体工程中心, 广州 510632)

**[ 摘 要 ]** 目的: 研究 bFGF 反义硫代寡核苷酸增强人喉鳞癌 Hep2 细胞对多柔比星、氟脲嘧啶及顺铂的敏感性。方法: 设计、合成 bFGF 反义脱氧寡核苷酸( AS ), 用聚乙烯亚胺( jetPEI )介导 bFGF 反义脱氧寡核苷酸转染入 Hep2 细胞; 半定量 RT-PCR 测定 bFGF 反义硫代寡核苷酸转染后细胞中 bFGF mRNA 水平; 免疫细胞化学法检测 Hep2 细胞转染前后 bEGF 的表达水平; FACS 分析 bFGF 反义硫代寡核苷酸诱导细胞的凋亡; MTT 法检测 bEGF 反义硫代寡核苷酸及其与化疗药物联合处理后的细胞增殖。结果: bFGF 反义硫代寡核苷酸呈剂量与时间依赖抑制 Hep2 细胞增殖, 最高抑制率为 25.5%; 被转染细胞 bFGF mRNA 和蛋白的表达分别降低 52.0% 和 41.1%, 细胞凋亡率为 20.5%; bFGF 反义硫代寡核苷酸协同多柔比星、氟脲嘧啶及顺铂作用 Hep2, 使 3 种药物的 IC<sub>50</sub> 分别降低 75.5%、83.5% 及 65.4%。结论: bFGF 反义硫代寡核苷酸协同化疗药物增强 Hep2 细胞对化疗药物敏感性, 将为人喉鳞癌的生物和化学药物治疗增添新途径。

**[ 关键词 ]** 碱性成纤维细胞生长因子; 喉鳞癌; 反义硫代寡核苷酸; 化疗药物; 化疗敏感性

**[ 中图分类号 ]** R730.5; R739.6

**[ 文献标志码 ]** A

**Antisense phosphorothioate oligonucleotide targeting bFGF enhances chemosensitivity of human laryngeal squamous carcinoma cells**

HUANG Hong-liang, WANG Hong, XIANG Jun-jian\*, TANG Yong, DENG Ning, YANG Hong-yu ( Molecular Immunology and Antibody Engineering Center, Jinan University, Guangzhou 510632, China )

**[ Abstract ] Objective:** To study the enhancing effect of bFGF-targeted antisense phosphorothioate oligonucleotide ( APO ) on the chemosensitivity of human laryngeal squamous carcinoma cell line Hep2 to Doxorubicin, 5-Fluorouracil, and Cisplatin. **Methods:** bFGF-specific APO was designed, constructed and transfected into Hep2 cells with jetPEI ( polyethyleneimine ). Expression of bFGF mRNA was evaluated by semi-quantitative RT-PCR after transfection; immunocytochemical method was used to examine the expression of bEGF expression before and after transfection of Hep2; the induction of cell apoptosis was analyzed by flow cytometry; cell proliferation was then analyzed by MTT assay after treatment with bFGF-specific APO or chemotherapeutic drugs, or a combination of both. **Results:** bFGF-specific APO inhibited the growth of Hep2 cells in a dose- and time-dependent manner, with the peak inhibitory rate being 25.5%. The expression of bFGF mRNA and protein decreased by 52.0% and 41.1%, respectively. The apoptosis rate of Hep2 cells was 20.5% after transfection. bFGF-specific APO reduced the 50% inhibitory concentration of Doxorubicin, 5-Fluorouracil, and Cisplatin in Hep2 cells by 75.5%, 83.5% and 65.4%, respectively. **Conclusion:** bFGF-specific APO can enhance the chemosensitivity of Hep2 cells, which paves a new way for potential biologic chemotherapy of laryngeal squamous carcinoma.

**[ Key words ]** basic fibroblast growth factor; laryngeal squamous cell carcinoma; antisense phosphorothioate oligonucleotides; chemotherapeutic drugs; chemo sensitivity

[ Chin J Cancer Biother, 2007, 14( 5 ): 461-465 ]

喉癌( laryngeal carcinoma )发病率在耳鼻喉科领域中仅次于鼻咽癌和鼻腔、鼻窦癌,居第 3 位,为全部恶性肿瘤的第 19 位。近年来,随着化疗药物和联合用药的研究进展,综合治疗已经成为晚期喉咽癌治疗的发展趋势<sup>[1]</sup>。而化疗耐药是肿瘤化疗面临的重要难题。碱性成纤维细胞生长因子( basic fibroblast growth factor, bFGF )是一种广泛存在于人

**[ 基金项目 ]** 中国博士后科学基金资助项目( No. 20060390735 );广东省生物工程药物重点实验室基金( No. 51206001 )。Supported by the Postdoctoral Science Foundation of China ( No. 20060390735 ), Foundation for key Laboratory of Bioengineering Drug of Guangdong Province ( No. 51206001 )

**[ 作者简介 ]** 黄红亮( 1976 - ),女,湖南省涟源市人,在站博士后,主要从事分子生物学方面的研究;E-mail: hhliang@126.com

\* Corresponding author. E-mail: txjj@jnu.edu.cn

和动物体内具有多种生物学活性的多肽。同时发现, bFGF 与肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[2]</sup>。喉鳞状细胞癌中高表达 bFGF, 且 bFGF 过度表达与喉癌的生长、转移及恶性程度相关<sup>[3,4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>还表明, bFGF 还与肿瘤的抗药性相关, 是一种广谱耐药因子, 与膀胱癌、乳腺癌、颈部癌、卵巢癌及前列腺癌等多种肿瘤的抗药性相关<sup>[6]</sup>。因此, 本研究利用 bFGF 反义硫代寡核苷酸转染人喉鳞状癌 Hep2 细胞, 通过降低 bFGF mRNA 以抑制 bFGF 的表达, 并联合化学药物以增强化疗在喉鳞癌治疗中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

RPMI 1640 ( Gibco ); 超级新生牛血清( 杭州四季青生物工程公司 ); 胰蛋白酶、噻唑蓝 ( MTT ) 和氟脲嘧啶 ( 5-FU ) ( Sigma ); SP 免疫组化试剂盒和 PI 染色试剂盒 ( 南京凯基生物科技发展有限公司 ); DAB 显色试剂盒 ( 北京天根生化科技有限公司 ); 聚乙烯亚胺 ( JetPEI™ ) 转染试剂 ( 法国, Polyplus Transfection ); 一步法 RT-PCR 试剂盒 ( TaKaRa ); Trizol ( Invitrogen ); 多柔比星 ( Doxorubicin, 又称 ADM, 浙江海正药业股份有限公司 ); 顺铂 ( Cisplatin, 又称 DDP, 为云南生物谷灯盏花药业有限公司 ); bFGF 单克隆抗体由本室制备。

### 1.2 细胞培养

人喉癌细胞 Hep2 由本校基因组研究中心张美英老师惠赠, 本室保存。Hep2 培养于含 10% 牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养液中, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱 ( 美国 Shel-Lab ) 培养。

### 1.3 反义脱氧核糖寡核苷酸的合成

全硫代修饰脱氧核糖寡核苷酸参照文献<sup>[7-8]</sup>设计, 均由上海英俊生物技术公司合成。bFGF 反义硫代寡核苷酸 ( AS ): 5'-tagcttgatgtgaggg-3', 互补于 bFGF mRNA 成环区的 638 ~ 653 bp; ASm1 为 AS 的单核苷酸突变体: 5'-tagcttgaggtgaggg-3'; ODN-GT: 5'-gggtgggtgggg-3', 为随机硫代寡核苷酸链。

### 1.4 聚乙烯亚胺介导脱氧核糖寡核苷酸的转染和 MTT 法检测转染细胞的增殖活性

将对数生长期 Hep2 细胞以  $3 \times 10^4$  /孔接种于 24 孔细胞培养板, 培养 24 h 后加入相应剂量的 jetPEI/oligonucleotide 复合物 ( N/P = 3 ), jetPEI/oligonucleotide 复合物的制备按 jetPEI 试剂盒说明书进行。细胞与 jetPEI/oligonucleotide 复合物作用 2 ~ 4 h 后, 吸去培养液, 加入一定量新鲜培养液, 同时设

空白对照。继续培养 72 h, 用 MTT 法检测活细胞, MTT 反应后用酶标仪 ( 芬兰 Multiskan ) 读取  $D_{570}$  值。相对细胞增殖率 ( % ) = [ 处理组  $D$  值 / 空白对照组  $D$  值 ]  $\times 100\%$ , 细胞生长抑制率 ( % ) =  $100\% -$  相对细胞增殖率。

### 1.5 半定量 RT-PCR 检测转染细胞 bFGF mRNA 的表达

以  $2 \times 10^5$  /孔接种 Hep2 细胞于 6 孔培养板, 培养 24 h 后, 按 1.4 中方法以 8.0  $\mu\text{g}$  /孔 AS、ASm1 和 GT-PS 转染一定时间后收集细胞。采用 Trizol 提取 Hep2 细胞总 RNA。取 1  $\mu\text{g}$  总 RNA 按一步法 RT-PCR 试剂盒说明书扩增 bFGF mRNA, 上游引物: 5'-aagcggtctactgcaaa-3', 下游引物: 5'-caggtctgttttgatcca-3', 大小为 337 bp。反应条件: 50 °C, 15 min ( RT 反应 ); 94 °C, 2 min ( RNase 失活 ); 94 °C, 30 s; 56 °C, 30 s; 72 °C, 1.5 min ( PCR 反应 ); 30 个循环。内参照为磷酸甘油醛脱氢酶 ( GAPDH ) mRNA, 大小为 450 bp。PCR 产物于 1.0% 琼脂糖电泳, IPP 软件分析 PCR 产物灰度值。

### 1.6 免疫细胞化学检测 Hep2 细胞中 bFGF 的表达

按 1.4 方法以 1.5  $\mu\text{g}$  /孔寡核苷酸转染 Hep2 细胞 72 h 后, 以免疫细胞化学检测细胞中 bFGF 的表达。操作按 SP 免疫组化试剂盒说明书进行, 即甲醇固定细胞, 5% 脱脂牛奶 37 °C 封闭 30 min, 洗涤后加 bFGF 单克隆抗体 4 °C 过夜, 洗涤, 依次加生物素标记二抗及辣根过氧化物酶标记链亲和素 37 °C 孵育 20 min, 洗涤后加 DAB 显色, 显微镜 ( Olympus ) 观察、照相, 采用 Image-pro Plus 4.5 分析积分光密度。

### 1.7 流式细胞术检测 Hep2 细胞的凋亡

Hep2 细胞以  $2 \times 10^5$  /孔接种于 6 孔细胞培养板, 培养 24 h 后, 按 1.4 中方法将 8.0  $\mu\text{g}$  /孔 AS、ASm1 和 GT-PS 转染细胞。转染后 72 h 收集细胞, 按 PI 染色试剂盒说明书处理细胞, 用 FACS Aria 流式细胞仪 ( 美国 BD 公司 ) 检测细胞凋亡。

### 1.8 MTT 法检测 bFGF 反义硫代寡核苷酸与化疗药物联合处理对 Hep2 细胞增殖的抑制作用

取 Hep2 细胞以  $3 \times 10^4$  /孔接种于 24 孔细胞培养板, 培养 24 h, 将 AS、GT-PS 均以 1.2  $\mu\text{g}$  /孔转染 Hep2 细胞 24 h 后, 以不同质量浓度多柔比星 ( 0.01、0.05、0.1、0.4、0.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  )、氟脲嘧啶 ( 0.5、1.0、5.0、10.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ) 或顺铂 ( 0.1、0.5、1.0、2.0、4.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ) 处理, 同时设空白对照、寡核苷酸处理对照, 继续培养 72 h 后, 用 MTT 法检测活细胞。MTT 反应后用酶标仪读取

$D_{570}$  值。各组细胞相对增殖率(%) = [处理  $D$  值/对照  $D$  值]  $\times$  100%, 寡核苷酸与药物联合处理组以相应寡核苷酸处理为对照, 药物单独处理组以空白为对照。

### 1.9 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS11.0 软件进行  $t$  检验, 分析组间差异的统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 bFGF 硫代反义寡核苷酸抑制喉鳞癌 Hep2 细胞的增殖

相应剂量的 jetPEI/oligonucleotide 复合物 (N/P = 3) 转染 Hep2 细胞 24 ~ 72 h 后, 用 MTT 法测定处理细胞的相对增殖率。MTT 分析结果(图 1)显示, 反义硫代寡核苷酸 (AS) 对 Hep2 细胞增殖的抑制呈剂量累积效应, 转染 48 h 后细胞增殖抑制率趋于稳定, 2.5  $\mu\text{g}/\text{孔}$  转染 72 h 后的细胞增殖抑制率为 25.5% ( $P < 0.05$ )。

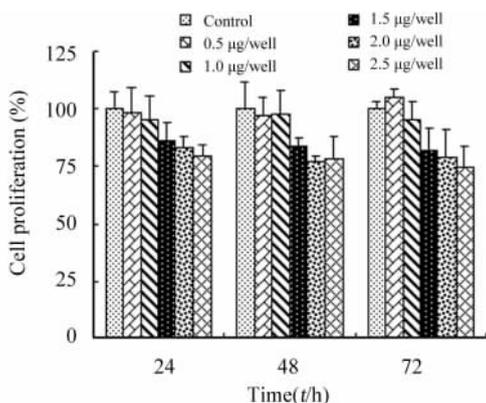


图 1 bFGF 反义硫代寡核苷酸抑制 Hep2 细胞的增殖

Fig. 1 Inhibition of Hep2 cell growth by bFGF antisense phosphorothioate oligonucleotides

### 2.2 bFGF 反义硫代寡核苷酸对 Hep2 细胞作用的特异性

将 bFGF 反义硫代寡核苷酸 (AS) 及其单核苷酸突变体 (ASm1)、非特异性硫代寡核苷酸 (GT-PS) (2.0  $\mu\text{g}/\text{孔}$ ) 转染 Hep2 细胞, 72 h 后 MTT 检测结果显示(图 2), GT-PS 和 ASm1 对 Hep2 细胞的抑制率分别为 2.8% 和 10.4%, 明显低于 AS 的抑制率 28.5% ( $P < 0.01$ )。

### 2.3 bFGF 反义硫代寡核苷酸影响 Hep2 细胞 bFGF mRNA 表达

图 3A 中结果表明, bFGF 反义硫代寡核苷酸 (AS) 能呈时间依赖地降低 Hep2 细胞中 bFGF mRNA

水平, 转染后 72 h 时, bFGF mRNA 的表达量与对照相比降低了 52% (图 3B,  $P < 0.01$ )。而其单核苷酸突变体 (ASm1) 及非特异性硫代寡核苷酸 (GT-PS) 转染 72 h 后并不影响细胞中 bFGF mRNA 水平 (图 3B)。

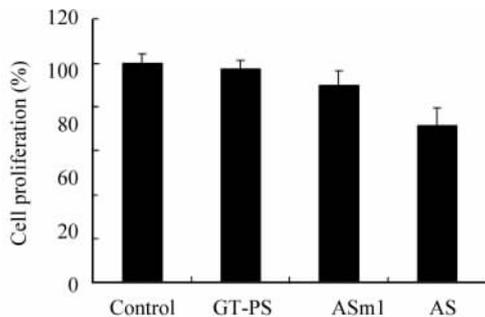


图 2 bFGF 硫代寡核苷酸对 Hep2 细胞作用的特异性

Fig. 2 Specificity of bFGF phosphorothioate oligonucleotides on Hep2 cells

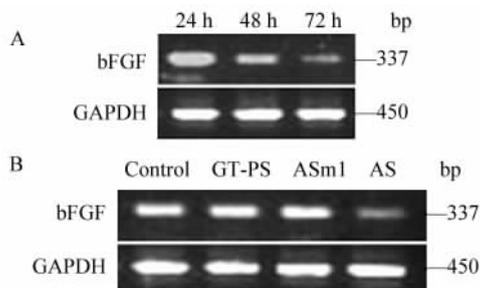


图 3 硫代寡核苷酸对 Hep2 细胞 bFGF mRNA 表达的影响

Fig. 3 Effect of oligonucleotides on bFGF mRNA level in Hep2 cells

A: Treated by AS; B: Treated by AS, GT-PS and ASm1

### 2.4 bFGF 反义硫代寡核苷酸影响 Hep2 细胞 bFGF 表达

图 4 中结果表明, Hep2 细胞高效表达 bFGF, 主要定位于细胞核; AS 转染后 72 h, bFGF 表达较对照降低 41.1% ( $P < 0.01$ ), GT-PS 及 ASm1 并未显著影响 bFGF 表达。

### 2.5 bFGF 反义硫代寡核苷酸诱导 Hep2 细胞凋亡

流式细胞仪检测结果表明, bFGF 反义硫代寡核苷酸转染后能诱导 Hep2 细胞凋亡, 细胞凋亡率为 (12.5  $\pm$  2.13)% ( $P < 0.01$ )。其单核苷酸突变体 (ASm1) 和非特异性硫代寡核苷酸 (GT-PS) 诱导 Hep2 细胞凋亡率分别为 (3.2  $\pm$  0.58)% 和 (4.7  $\pm$  1.31)%, 与对照 (1.1  $\pm$  0.28)% 相比无统计学差异。

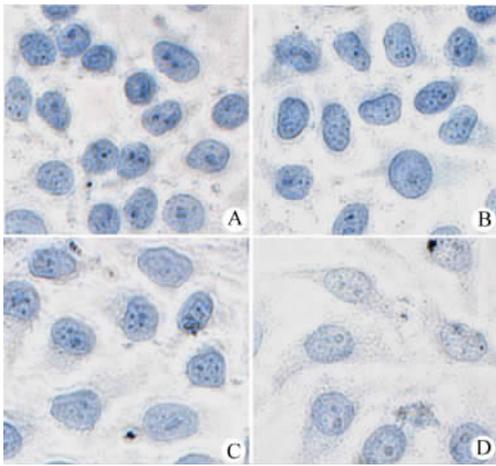


图4 免疫细胞化学检测 Hep2 细胞中 bFGF 的表达 (×400)

Fig. 4 bFGF expression in Hep2 cells by immunocytochemistry assays (×400)

A: Untreated; B: GT-PS treated; C: ASm1 treated; D: AS treated

2.6 bFGF 反义硫代寡核苷酸联合化疗药物对 Hep2 细胞的抑制效应

图5中结果显示,多柔比星、氟脲嘧啶及顺铂均

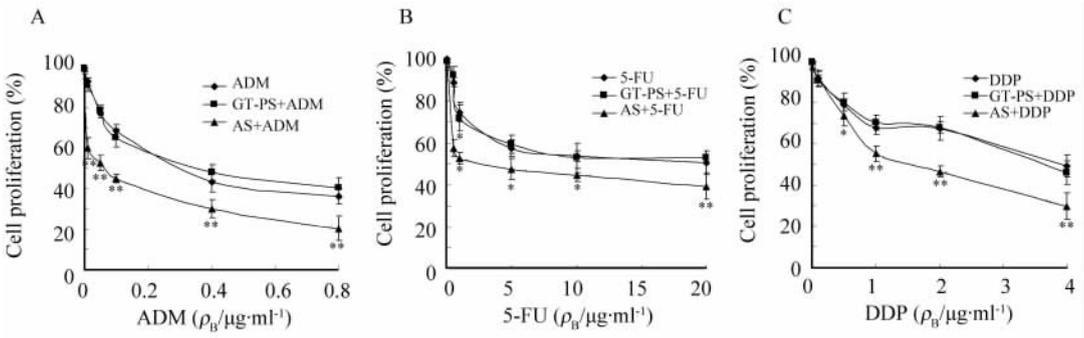


图5 bFGF 反义硫代寡核苷酸与化疗药物联合作用抑制 Hep2 细胞增殖

Fig. 5 Combined treatment with bFGF antisense phosphorothioate oligonucleotide and chemotherapy on Hep2 cell growth

A: ADM (Doxorubicin); B: 5-FU; C: DDP( Cisplatin); \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs other groups

反义寡核苷酸被公认是一个特异靶向基因表达的有效工具及临床前试验用药在肿瘤基因治疗中具有潜在的价值。本研究中 bFGF 反义寡核苷酸被转入 Hep2 细胞内后特异地结合 bFGF mRNA 使其被 RNase 降解,从而沉寂 bFGF 基因的表达,抑制肿瘤细胞增殖,诱导细胞凋亡,说明 bFGF 是肿瘤基因治疗的一个有效的分子靶标。由于 bFGF 与肿瘤耐药性密切相关,且反义寡核苷酸可有效封闭其表达。因此,反义 bFGF 的表达有可能增加肝癌细胞对化疗药物的敏感性,甚至使耐药喉鳞癌细胞恢复对原耐受药物的敏感性,达到真正意义上的逆转,这对于预防喉鳞癌的发生、发展及手术后抗复发治疗有潜

能显著抑制 Hep2 细胞增殖,且呈剂量依赖效应。bFGF 反义硫代寡核苷酸转染降低多柔比星、氟脲嘧啶及顺铂对 Hep2 细胞的 IC<sub>50</sub>,分别降低了 75.5%、83.5% 及 65.4%,即显著增强 Hep2 细胞对 3 种化疗药物的敏感性;非特异性硫代寡核苷酸则未影响多柔比星、氟脲嘧啶及顺铂抑制 Hep2 细胞增殖。

3 讨论

bFGF 是一种多功能因子,可促进多种细胞的增殖与分化。大量研究证明,bFGF 在多种肿瘤组织中被高度表达,自分泌或旁分泌 bFGF 与细胞表面受体结合并使其活化,继而激活细胞内的系列信号分子,如 PKC $\gamma$ 、MEK、ERK、MAPK 及 Ca<sup>2+</sup> 等,促进肿瘤细胞增殖及肿瘤血管新生<sup>[9-10]</sup>。bFGF 还可以不同途径诱导肿瘤细胞的抗药性,如上调 PKC、B-Raf 与 S6K2 而诱导抗凋亡蛋白 XIAP 与 Bcl-xL 的表达<sup>[11]</sup>,或调节 Raf-1 与 ASK1 形成复合体以阻止化学药物经 ASK1 诱导细胞凋亡<sup>[12]</sup>,以提高肿瘤细胞的抗药性。因而,bFGF 已成为肿瘤基因治疗研究理想的靶目标。

在的价值。本研究证明 bFGF 反义寡核苷酸处理后,有效降低了化疗药物对 Hep2 细胞的 IC<sub>50</sub>,两者联合后的抗肿瘤效应明显优于单独 bFGF 反义寡核苷酸治疗或化疗,起到了协同作用,结果表明 bFGF 反义寡核苷酸封闭 bFGF 表达,能一定程度地逆转 Hep2 细胞的耐药性,提高了其化疗敏感性,为喉鳞癌的生物与化学治疗探索了新途径。

肿瘤细胞可通过上调 bcl-2<sup>[16]</sup>、bcl-XI<sup>[17]</sup> 和 survivin<sup>[18]</sup> 等抗凋亡基因而逃避化疗药物诱导的细胞凋亡,从而提高细胞生存能力。bFGF 诱导的肿瘤抗药性同样与上调 bcl-xL、XIAP 及 ASK1 等抗凋亡基因相关<sup>[11-12]</sup>。本研究中 bFGF 反义硫代寡核苷酸抑

制 bFGF 表达可诱导 Hep2 细胞凋亡,表明 bFGF 表达抑制可能下调了 bcl-2 等抗凋亡基因的表达,从而降低了肿瘤细胞逃避化疗药物诱导的细胞凋亡的概率,以致能一定程度地增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,具体作用途径有待进一步证明。

bFGF 不仅是肿瘤耐药因子,且与肿瘤抗放疗相关。24 000 bFGF 通过上调 RhoB 及 DNA-PKCS 等而诱导 HeLa 细胞的放疗抗性<sup>[13-14]</sup>;且放疗后,肿瘤细胞可通过上调 bFGF 和 VEGF 而提高其存活率<sup>[15]</sup>。本研究并未探讨 bFGF 反义硫代寡核苷酸能否增强 Hep2 细胞的放疗敏感性,但 bFGF 反义硫代寡核苷酸能整体地抑制肿瘤细胞中 bFGF 表达,包括 24 000 bFGF 在内的高分子量 bFGF,因此,bFGF 反义硫代寡核苷酸能潜在地增强肿瘤细胞的放疗敏感性。

由于肿瘤的发生、发展及耐药性的表现是一个复杂的过程,其中涉及增殖、凋亡及血管新生等相关基因的表达与调控。因此,靶向多种因子或不同信号途径的反义寡核苷酸,甚至联合化疗药物或信号抑制因子,是更具潜力的肿瘤治疗方法。如 Bcl-2/Bcl-xL 双特异性反义寡核苷酸较各自的单特异性反义寡核苷酸能更有效地诱导肿瘤细胞凋亡及增强肿瘤细胞的化疗敏感性<sup>[19-20]</sup>。本研究中 bFGF 反义寡核苷酸能有效地增强 Hep2 细胞的化疗敏感性,表明其是一种潜在意义的肿瘤治疗方法,若联合其他促凋亡治疗方法,则能更有效地发挥其抗肿瘤作用。

## 【参考文献】

[1] 吴跃煌,唐平章. 晚期喉癌近代治疗观念[J]. 中国医学科学院学报, 2006, 28(3): 431-434.

[2] Pallares J, Rojo F, Iriarte J, *et al.* Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues [J]. *Histol Histopathol*, 2006, 21(8): 857-865.

[3] 杨春平,罗英. 喉鳞状细胞癌组织中血管内皮生长因子和碱性成纤维生长因子及微血管密度的检测及临床意义[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2005, 19(7): 323-325.

[4] Riedel F, Götte K, Bergler W, *et al.* Expression of basic fibroblast growth factor protein and its down-regulation by interferons in head and neck cancer [J]. *Head Neck*, 2000, 22(2): 183-189.

[5] Song S, Wientjes MG, Gan Y, *et al.* Fibroblast growth factors: an epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(15): 8658-8663.

[6] Gan YB, Wientjes MG, Au JL. Expression of basic fibroblast growth factor correlates with resistance to paclitaxel in human patient tumors [J]. *Pharm Res*, 2006 23(6): 1324-1331.

[7] Kuhn H, Kopff C, Konrad J, *et al.* Influence of basic fibroblast growth factor on the proliferation of non-small cell lung cancer cell

lines [J]. *Lung Cancer*, 2004, 44(2): 167-174.

- [8] 向军俭,秦艳芳,邓宁,等. bFGF mRNA、bFGF 及 FGFR1 与神经胶质瘤细胞恶性行为的相关性 [J]. *中国免疫学杂志*, 2006, 22(5): 440-444.
- [9] Khan MM, Dhandapani KM, Wad FM, *et al.* Induction of transforming growth factor- $\beta$ 1 by basic fibroblast growth factor in rat C6 glioma cells and astrocytes is mediated by MEK/ERK signaling and AP-1 activation [J]. *J Neurosci Res*, 2007, 85(5): 1033-1045.
- [10] Skaletz-Rorowski A, Eschert H, Leng J, *et al.* PKC delta induced activation of MAPK pathway is required for bFGF-stimulated proliferation of coronary smooth muscle cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 67(1): 142-150.
- [11] Pardo OE, Wellbrock C, K. hanzada UK, *et al.* FGF-2 protects small cell lung cancer cells from apoptosis through a complex involving PKC epsilon, B-Raf and S6K2 [J]. *EMBO J*, 2006, 25(13): 3078-3088.
- [12] Alavi AS, Acevedo L, Min W, *et al.* Chemoresistance of endothelial cells induced by basic fibroblast growth factor depends on Raf-1-mediated inhibition of the proapoptotic kinase, ASK1 [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(6): 2766-2772.
- [13] Ader I, Toulas C, Dalenc F, *et al.* RhoB controls the 24 kDa FGF-2-induced radioresistance in HeLa cells by preventing post-mitotic cell death [J]. *Oncogene*, 2002, 21(39): 5998-6006.
- [14] Ader I, Muller C, Bonnet J, *et al.* The radioprotective effect of the 24kDa FGF-2 isoform in HeLa cells is related to an increased expression and activity of the DNA dependent protein kinase (DNA-PK) catalytic subunit [J]. *Oncogene*, 2002, 21(42): 6471-6479.
- [15] Semenza GL. Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1 [J]. *Cancer Cell*, 2004, 5(5): 405-406.
- [16] Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, *et al.* Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion *in vivo* [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(19): 4438-4445.
- [17] Han Z, Chatterjee D, Early J, *et al.* Isolation and characterization of an apoptosis-resistant variant of human leukemia HL-60 cells that has switches expression from Bcl-2 to Bcl-XL [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(7): 1621-1628.
- [18] Kannangai R, Wang J, Liu QZ, *et al.* Survivin overexpression in hepatocellular carcinoma is associated with p53 dysregulation [J]. *Int J Gastrointest Cancer*, 2005, 35(1): 53-60.
- [19] Yamanaka K, Rocchi P, Miyake H, *et al.* Induction of apoptosis and enhancement of chemosensitivity in human prostate cancer LN-CaP cells using bispecific antisense oligonucleotide targeting Bcl-2 and Bcl-xL genes [J]. *BJU Int*, 2006, 97(6): 1300-1308.
- [20] Yamanaka K, Rocchi P, Miyake H, *et al.* A novel antisense oligonucleotide inhibiting several antiapoptotic Bcl-2 family members induces apoptosis and enhances chemosensitivity in androgen-independent human prostate cancer PC3 cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(11): 1689-1698.

【收稿日期】 2007-07-24

【修回日期】 2007-08-16

【本文编辑】 王莹