文章编号:1000-5404(2013)24-2643-05

论著

联合运用 Survivin 和 VEGF 反义寡核苷酸对裸鼠人肺腺癌 A549 移植瘤的生长抑制作用

梁 超,徐 玲,隋雪梅 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院呼吸内科)

[摘要] **目的** 探讨 Survivin 反义寡核苷酸联合血管内皮生长因子(VEGF)反义寡核苷酸在裸鼠体内对人肺腺癌细胞 A549 的生长抑制作用。**方法** 将脂质体包裹的 ASODN 混悬液瘤旁注射移植有 A549 肿瘤细胞的裸鼠,并相应地把裸鼠分为 5 组:空白对照组、脂质体对照组、VEGF 处理组、Survivin 处理组,Survivin-VEGF 联合处理组。观察各组肿瘤的生长情况,并分别以 Western blot、real-time PCR 检测肿瘤组织 Survivin 及 VEGF 各自的表达情况,用免疫组化法检测 Cyclin B1 的蛋白表达和微血管密度计数(CD34 染色)。**结果** Survivin-VEGF ASODN 联合处理组较各组的生长情况明显减慢($P<0.05$);Western blot 和 real-time PCR 结果显示 Survivin-VEGF 联合处理组中 Survivin 和 VEGF 蛋白及 RNA 的表达较各组均受到明显抑制($P<0.05$);Survivin-VEGF 联合处理组显著降低了肿瘤组织微血管密度计数(MVD)(10.27±1.75),与各单反义寡核苷酸处理组[Survivin 处理组(13.27±2.19),VEGF 处理组(11.40±1.18)]之间的差异具有统计学意义($P<0.05$);Survivin-VEGF 联合处理组停滞于 G_2/M 期的细胞(23.17±5.45)也较 Survivin 处理组(12.54±6.67)和 VEGF 处理组(18.39±6.87)明显增多($P<0.05$)。**结论** 联合使用 VEGF 反义寡核苷酸和 Survivin 寡核苷酸对肿瘤的抑制作用优于单用 VEGF 反义寡核苷酸或 Survivin 反义寡核苷酸。

[关键词] Survivin;血管内皮生长因子;反义寡核苷酸;联合;A549
[中图法分类号] R394-33;R73-262;R734.2 [文献标志码] A

Survivin antisense oligonucleotide combined with VEGF antisense oligonucleotide inhibits growth of human pulmonary adenocarcinoma A549 xenografts in nude mice

Liang Chao, Xu Ling, Sui Xuemei (Department of Respiratory Medicine, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the inhibitory effect of survivin antisense oligonucleotide (ASODN) combined with VEGF ASODN on the growth of human pulmonary adenocarcinoma A549 xenografts in nude mice. **Methods** The nude mice transplanted with A549 tumor cells were divided into 5 groups: control group, liposome control group, VEGF ASODN treatment group, survivin ASODN treatment group, and survivin-VEGF combined ASODN treatment group. Liposome-ASODN mixed suspension was peritumorally injected to the nude mice. The tumor growth in all groups were observed, and the expressions of survivin and VEGF in tumor tissues were detected by Western blotting and real-time PCR. Immunohistochemical method was used to detect the expression of cyclin B1 and microvascular density (MVD) count (CD34 staining). **Results** Survivin-VEGF combined ASODN treatment inhibited the tumor growth with more significant effects than other groups ($P<0.05$). The result of Western blotting and real-time PCR showed that the protein and mRNA expression of survivin and VEGF in the survivin-VEGF combined ASODN treatment group was obviously lower than other groups ($P<0.05$). Survivin-VEGF combined ASODN treatment group reduced the MVD count in tumor tissues (10.27±1.75) significantly, with stronger effects than the single ASODN treatment groups (survivin ASODN treatment group 13.27±2.19 and VEGF ASODN treatment group 11.40±1.18) ($P<0.05$). Survivin-VEGF combined ASODN treatment group group had more cells arrested in in G_2/M phase (23.17±5.45) than the survivin ASODN treatment group (12.54±6.67) and VEGF ASODN group

[基金项目] 国家临床重点专科专项(卫办医政函[2012]949 号);重庆市科技攻关计划(CSTC2011AC5202)
[通信作者] 徐 玲,E-mail:122762457@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131014.0941.001.html(2013-10-14)

(18.39 ± 6.87) ($P < 0.05$). **Conclusion** The combination of VEGF ASODN and survivin ASODN inhibits the tumor growth of human pulmonary adenocarcinoma A549 xenografts in nude mice, with better effects than VEGF ASODN or survivin ASODN alone.

[**Key words**] survivin; vascular endothelial growth factor; antisense oligonucleotide; combined; A549

Supported by the Project of National Clinical Key-discipline Construction ([2012]949) and the Tackling Project of Sci & Tech Research of Chongqing (CSTC2011AC5202). Corresponding author: Xu Ling, E-mail:122762457@qq.com

肺癌是目前全球发病率和致死率均为第一的肿瘤。由于肿瘤其发病过程中的多因子参与性,多通路、多途径的协同性,使得迄今为止也没有一个令人十分满意的单靶点治疗方案[1]。于是我们构思,能否在治疗的时候选取多个基因靶点同时进行干预,以期获得一个令人满意的治疗效果。Survivin是目前发现的最强的凋亡抑制蛋白[2],在多种恶性肿瘤组织中表达丰富且与预后密切相关。它是Caspase-3和Caspase-7(Caspase 3、7是由fas基因介导细胞死亡的基本死亡因子)的直接抑制剂[3]。同时,Survivin也可对抗G_2/M期对细胞凋亡的诱导,使肿瘤细胞可通过凋亡的关卡,促进转化细胞的异常增殖[4]。Wang[5]、Carrasco等[6]通过反义寡核苷酸技术,证明了单Survivin反义寡核苷酸,对肿瘤细胞生长抑制的有效性。另一方面,肿瘤组织的生长高度依赖于其对自身血管的诱导能力,因此抗肿瘤血管生成策略也是目前抗肿瘤研究中的热点[7]。而VEGF是抗肿瘤血管生成策略中一个经典的治疗靶点。其在肿瘤组织中的分布特异性以及促血管生成作用决定了其作为抗肿瘤治疗靶点的有效性[8]。已有实验研究证实了单VEGF反义寡核苷酸对肿瘤细胞的生长有明显的抑制作用[9]。我们选用了目前已较为成熟的反义寡核苷酸技术[10],同时针对以上两靶点对裸鼠移植瘤进行干预,观察该方法对肿瘤生长的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 Survivin兔单克隆抗体为Cell Singaling,VEGF、Cyclin B1、Caspase-3、CD34兔单克隆抗体均为EPITOMICS产品。二抗为博士德生物公司羊抗兔IgG。脂质体2000购自Invitrogen。蛋白提取试剂盒和蛋白电泳试剂盒均为碧云天产品,蛋白浓度测定试剂盒为Pierce BCA Protein Assay Kit。TUNENL试剂盒购自Roche。免疫组化试剂盒为中杉金桥。Trizol、PCR逆转录试剂盒以及*Taq* mix为TaKaRa产品。SYBR荧光染料购自东盛。PCR引物,反义寡核苷酸序列:Survivin ASODN[5]:5′-CCACGGCCTCCCAAAGTGCTG-3′, VEGF ASODN[9]:5′-GCAGTAGCTACGCTGATAGTGC-3′(以上序列首尾各3个碱基均行硫代修饰,分别为21个碱基和22个碱基)均由上海Invitrogen合成。

1.1.2 实验动物 4周龄,16~20 g的BALB/c-NU全雌裸鼠25只。从重庆医科大学实验动物中心购买。

1.1.3 细胞株 A549细胞为人肺腺癌细胞株,由重庆医科大学附属第一医院呼吸科实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 裸鼠植瘤 常规培养A549细胞后,以1×10^7浓度于腋下皮下注射,每只注入0.2 mL,即每只裸鼠注入2×10^6个细胞。以肉眼可见肿块形成为植瘤成功[11]。

1.2.2 裸鼠分组及治疗 将25只植瘤成功的裸鼠按随机数字表法分为5组(空白对照组、脂质体对照组、VEGF处理组、Survivin处理组,Survivin-VEGF联合处理组),每组各5只。于肿瘤直径约5 mm时,开始给予相应处理。VEGF处理组给予VEGF-ASODN (62.4 μg),Survivin处理组给予Survivin-ASODN (58.8 μg),Survivin-VEGF联合处理组(62.4 μg)分别给予VEGF-ASODN(58.8 μg)和Survivin-ASODN (62.4 μg)。隔2 d注射1次,注射7次。自注射之日起,每3天测量1次裸鼠肿瘤体积。肿瘤体积按公式:$V = 0.5 \times a \times b^2$(a:肿瘤长径;b:短径)。肿瘤取出后,予以称质量[12]。

1.2.3 Western blot检测VEGF和Survivin蛋白的表达 取100 mg组织剪碎后于液氮中研磨,按碧云天蛋白提取试剂盒说明书提取总蛋白后于-20 ℃保存。按Pierce BCA Protein Assay Kit试剂盒说明书,进行BCA法测蛋白浓度。SDS-PAGE电泳后,用电转法将蛋白转至硝酸纤维素膜。封闭抗体后加入一抗(Survivin Rabbit mAb和VEGF Rabbit mAb),4 ℃过夜后,加入二抗(HRP标记的GOAT Anti-Rabbit IgG),用BIO-RAD凝胶/发光图像分析系统观测各组结果[6]。

1.2.4 荧光定量PCR 取50 mg瘤组织,于液氮中研磨后,按照TaKaRa提取试剂盒说明书、TaKaRa逆转录试剂盒说明书抽提总miRNA和逆转录qRT-PCR,引物序列为VEGF(96 bp):上游:5′-ATCATGCGGATCAAACCTCAC-3′,下游:5′-TGTTCT-GTCTTTCTTTGGTCTGC-3′;Survivin (123 bp):上游:5′-TCATC-CACTGCCCTACCGA-3′,下游:5′-AGCCAGGGGAGTGCTTTCT-3′;β-actin(263 bp):上游:5′-GAGACCTTCAACACCCCAGC-3′,下游:5′-ATGTCACGCACGATTTCCC-3′。采用Opticon2-Real-time-PCR仪(美国Bio-Rad公司)检测CT值,计算miRNA相对表达量($2^{-\triangle\triangle CT}$)。

1.2.5 微血管密度 按Weidner[13]的CD34免疫组化计量微血管密度。石蜡切片常规脱蜡水化后,按中杉金桥免疫组化试剂盒说明书进行操作。每个标本先于低倍镜下选取血管丰富

表1 各组裸鼠肿瘤体积生长数据分析 (mm^3)

测量时间	空白对照组	脂质体对照组	VEGF处理组	Survivin处理组	Survivin-VEGF联合处理组
第14天	25.80±11.09	25.00±8.08	24.40±5.31	26.80±6.28	23.75±6.95
第17天	166.31±27.29	169.65±26.83	148.51±27.47	137.38±39.60	158.00±35.91
第20天	275.67±23.16	277.17±27.08	217.65±18.76	203.95±33.12	192.61±32.10
第23天	373.39±17.08	375.83±26.53	304.62±28.40	276.55±35.97	252.04±34.69
第26天	479.49±26.61	476.28±35.19	369.88±27.32	349.99±39.94	296.73±63.64
第29天	568.19±19.25	562.36±14.21	419.98±24.91	408.29±45.53	356.40±31.63
第32天	686.84±20.40	687.38±19.20	444.90±16.19	448.95±33.15	375.20±22.70
第35天	761.90±22.84	763.53±9.74	453.49±10.17	469.68±35.13	383.97±16.98

的区域(注意避开坏死区域),再于高倍显微镜下(×400)随机观察5个视野,以染色为棕色却不与其他棕色的组织或细胞相连者为准(有平滑肌包裹的大血管除外),计算每个视野的平均数,即为微血管密度。

1.2.6 免疫组织化学检测Cyclin B1蛋白的表达 石蜡切片常规脱蜡水化后,按中杉金桥免疫组化试剂盒说明书进行操作。于高倍显微镜随机观察5个视野,观察Cyclin B1蛋白的表达情况[14]。

1.3 统计学处理

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据用SPSS 17.0软件进行处理。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,$P<0.05$为差异有统计学意义。

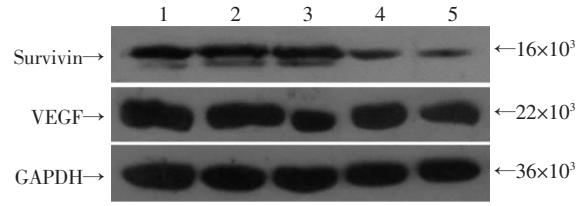
2 结果

2.1 肿瘤生长情况

由表1可见空白对照组、脂质体对照组肿瘤的生长明显快于其他3组。Survivin-VEGF联合处理组又明显较Survivin处理组和VEGF处理组生长慢。各处理组与空白对照组和脂质体对照组在第17~20天时开始出现差异,其后差异逐渐增大($P<0.05$)。单ASODN组(Survivin处理组或VEGF处理组)与Survivin-VEGF联合处理组之间在第20~23天开始出现差异($P<0.05$)。各组裸鼠于植瘤第37天(即第8次干预后的第2天)处死裸鼠,并将裸鼠肿瘤完整剥离下来后称质量,所得结果与肿瘤体积情况一致。空白对照组和脂质体对照组肿瘤质量最重[(0.944±0.033)g,(0.956±0.018)g],其次为单ASODN组[Survivin处理组(0.479±0.046)g和VEGF处理组(0.476±0.079)g],质量最轻者为Survivin-VEGF联合处理组(0.265±0.010)g。

2.2 肿瘤组织内VEGF和Survivin蛋白的表达

由图1可看出,Survivin处理组、VEGF处理组都能分别有效的降低其靶蛋白的表达,较空白对照组差异有统计学意义($P<0.05$)。同时,在Survivin-VEGF联合处理组,Survivin和VEGF两者的表达均能被有效抑制,较空白对照组差异有统计学意义($P<0.05$)。VEGF在VEGF处理组、Survivin处理组和Survivin-VEGF联合处理组中的表达明显降低。Survivin在Survivin处理组和Survivin-VEGF联合处理组中的表达也明显降低,且在VEGF处理组其表达也有一定的减少。



1:空白对照组;2:脂质体对照组;3:VEGF处理组;4:Survivin处理组;5:Survivin-VEGF联合处理组

图1 Western blot检测组织内VEGF和Survivin蛋白的表达

2.3 肿瘤组织内VEGF和Survivin mRNA的表达

用荧光定量PCR法测定VEGF和Survivin mRNA,见表2。可以看出,Survivin-VEGF联合处理组同Survivin处理组和VEGF处理组一样,均能有效的降低其相应靶基因的表达。

表2 荧光定量PCR法测定VEGF和Survivin mRNA的表达

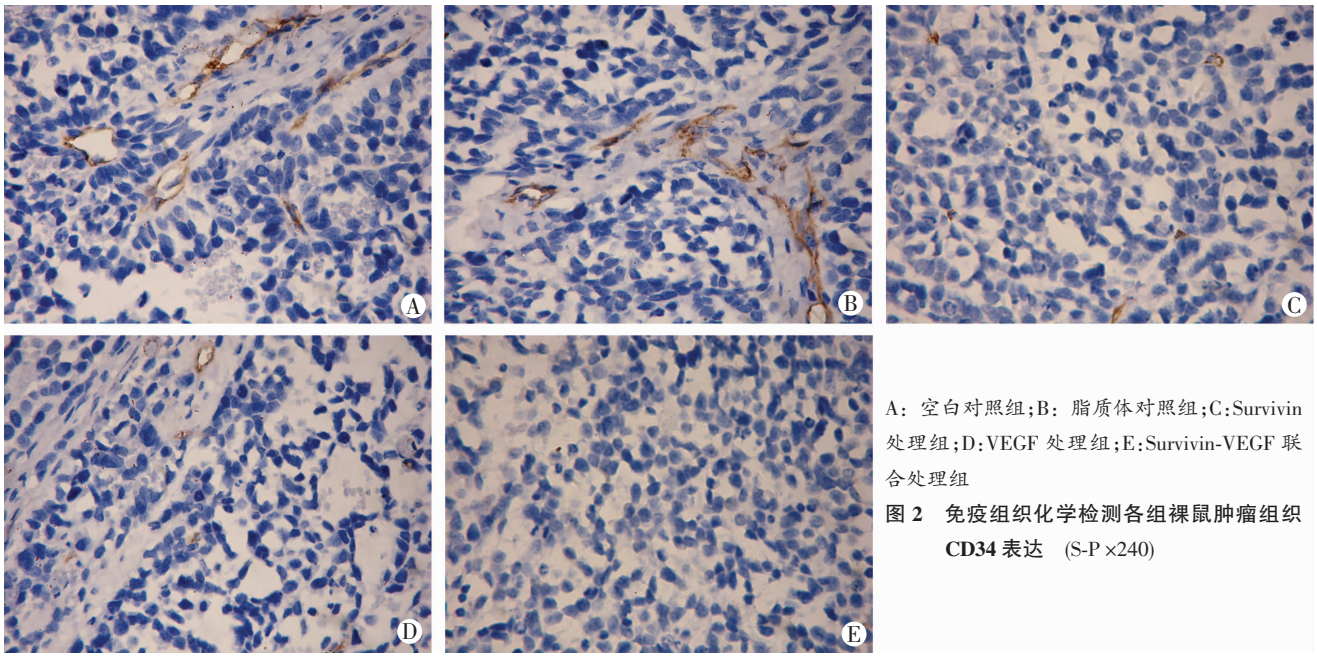
组别	VEGF		Survivin	
	$2^{-\triangle\triangle CT}$	相对比值	$2^{-\triangle\triangle CT}$	相对比值
空白对照组	0.234	0.244	0.501	0.510
脂质体对照组	0.207	0.216	0.526	0.536
Survivin处理组	0.052	0.056	0.404	0.415
VEGF处理组	0.105	0.112	0.142	0.150
Survivin-VEGF联合处理组	0.048	0.052	0.123	0.130

2.4 肿瘤组织内微血管密度计数

以免疫组化法对CD34染色后,被染为棕色的细胞即为肿瘤微血管内皮细胞(图2),计量各组肿瘤组织内微血管密度(MVD),各组分别为:空白对照组(16.67±2.47),脂质体对照组(16.53±4.00),Survivin处理组(13.27±2.19),VEGF处理组(11.40±1.18),Survivin-VEGF联合处理组(10.27±1.75),Survivin处理组、VEGF处理组、Survivin-VEGF联合处理组与空白对照组和脂质体对照组之间MVD的差异均有统计学意义($P<0.05$)。

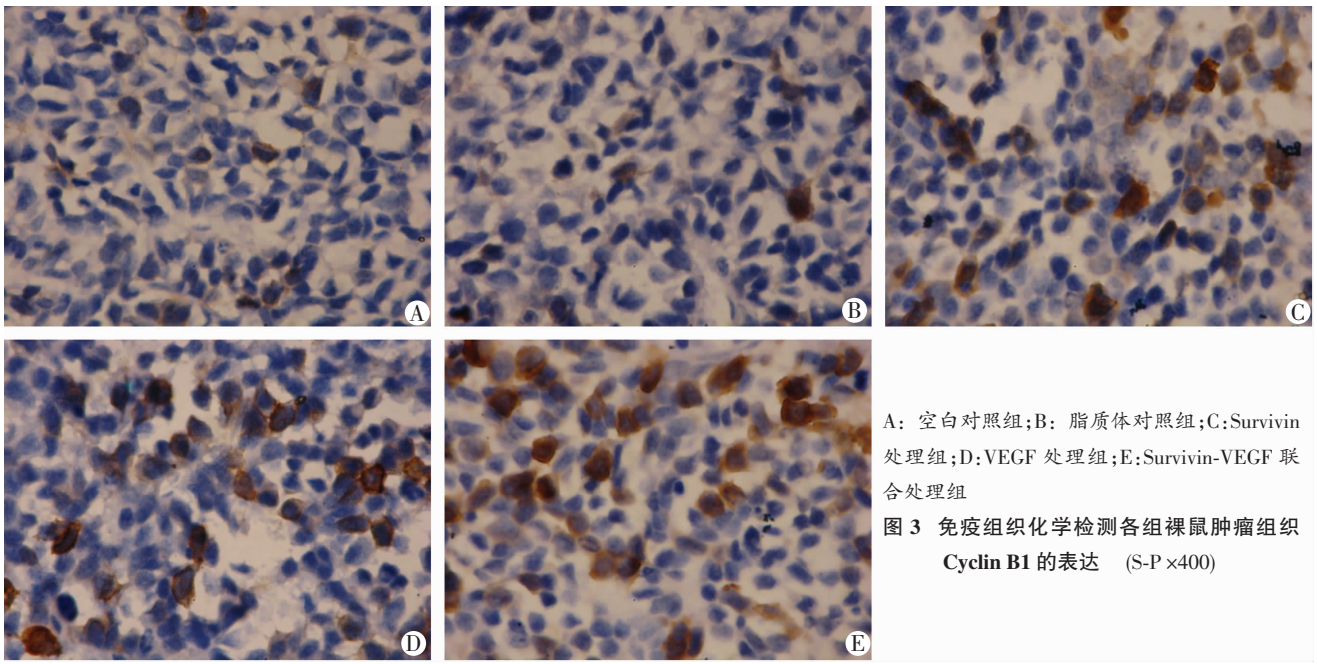
2.5 肿瘤组织Cyclin B1蛋白的表达

VEGF处理组Cyclin B1的表达(12.54±6.67)较空白对照组(7.11±3.49)和脂质体对照组(8.52±2.73)略有增强,但其差异无统计学意义。Survivin处理组Cyclin B1的表达(18.39±6.87)和Survivin-VEGF联合处理组Cyclin B1的表达则较空白对照组和脂质体对照组明显增强($P<0.05$)。且Survivin-VEGF联合处理组Cyclin B1的表达较Survivin处理组也有一定的提高($P<0.05$)。见图3。



A：空白对照组；B：脂质体对照组；C：Survivin处理组；D：VEGF处理组；E：Survivin-VEGF联合处理组

图2 免疫组织化学检测各组裸鼠肿瘤组织CD34表达 (S-P ×240)



A：空白对照组；B：脂质体对照组；C：Survivin处理组；D：VEGF处理组；E：Survivin-VEGF联合处理组

图3 免疫组织化学检测各组裸鼠肿瘤组织Cyclin B1的表达 (S-P ×400)

3 讨论

Survivin是目前为止发现的最强的凋亡抑制蛋白，在既往的实验中已证实抑制其表达可达到促使肿瘤细胞凋亡的作用。VEGF则是肿瘤血管生长过程不可或缺的重要因子，对其表达的干预最主要的效果是影响肿瘤内血管的生成，以此减少肿瘤细胞的营养供给，进而达到延迟肿瘤生长的作用[15]。既往的实验往往只选取其中一个基因靶点进行干预，而此次我们则通过反义寡核苷酸技术，同时对两者进行干预，一方面增加肿瘤细胞凋亡，另外一方面减少肿瘤的增长，以期获得更好的效果。

我们的结果证实了以上两者联合干预的可行性。单独使用Survivin ASODN或VEGF ASODN均能有效抑制肿瘤的生长。但与单独应用相比，Survivin-VEGF联合处理组表现出了比单反义寡核苷酸更强的抑制肿瘤生长的作用效果，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。两者合用所表现出来的作用可能与两者之间本身的表达相关性和两者对肿瘤发生、发展共同作用途径相关[16-19]。一方面，我们的实验研究发现，单独转染Survivin ASODN或VEGF ASODN，除本身相对应的靶基因表达降低外，另一基因的表达也受到了相应的抑

制($P<0.05$)。而Survivin-VEGF联合处理组结合了两者对本身靶基因及对应基因的抑制作用,使得Survivin和VEGF两者的表达较单反义组更低($P<0.05$)。这暗示着此两者在表达的信号通路上可能有相互促进的作用,但具体的分子机制尚有待进一步研究发现。另一方面,由MVD值和Cyclin B1的表达情况可以看出,联合处理组较单独作用组具有更强的微血管生长抑制作用及细胞周期阻滞作用。而这两个指标均为判断肿瘤生长抑制效果的指标。前者主要反映肿瘤组织的营养供给情况,与肿瘤的生长情况以及恶性程度密切相关[9],而VEGF ASODN抑制肿瘤生长主要的作用途径即为抑制肿瘤微血管生长,降低了MVD值[20-21]。后者是细胞有丝分裂的G_2/M期特异性表达的细胞周期调控蛋白[22]。G_2/M期是细胞周期在调控肿瘤的生长过程中一个重要的调控检验点。在G_2/M期,细胞本身可通过诱导凋亡来清除包括肿瘤细胞在内的异常细胞[23]。因此,Cyclin B1的表达情况也是间接判断肿瘤细胞凋亡情况的指标。而Survivin ASODN抑制肿瘤生长的关键作用环节即为阻滞了大量肿瘤细胞于G_2/M期,进而诱导细胞凋亡[6,14]。联合使用Survivin ASODN和VEGF ASODN使得二者对以上两肿瘤生长抑制途径作用得到了有效的叠加。这可能是两者合用取得更好抑制肿瘤生长的原因,但具体的原因还不清楚,需要更多的实验予以证实。

肿瘤的发生、发展是一个多通路、多途径、多因子参与的过程。因此单独抑制某一促肿瘤基因的表达往往难以取得令人满意的效果,而联合抑制多个促肿瘤基因这种鸡尾酒疗法的思路很可能会得到一个相对较好的肿瘤抑制效果。我们的实验证实了Survivin ASODN和VEGF ASODN两者联合使用,对肿瘤生长抑制的有效性。这可以给今后临床上联合使用Survivin ASODN和VEGF ASODN,甚至是以Survivin和VEGF为双靶点的其他干预方式的联合,奠定一定的理论基础。但我们对其联合作用的机制尚不清楚,将进行深入研究。

参考文献:

[1] Pakkala S, Ramalingam S S. Combined inhibition of vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor signaling in non-small-cell lung cancer therapy[J]. Clin Lung Cancer, 2009, 10(Suppl 1): S17-S23.

[2] Altier D C, Marchisio P C. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer[J]. Lab Invest, 1999, 79(11): 1327-1333.

[3] 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.

[4] Shin S, Sung B J, Cho Y S, *et al*. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of capase-3 and -7[J]. Biochemistry, 2001, 40(4): 1117-1123.

[5] Wang W, Li G, Hong Z, *et al*. The effect of Survivin antioligonucleotide on the apoptosis of Xuanwei lung adenocarcinoma cell[J]. Chin Ger J Clin Oncol, 2011, 10(5): 252-255.

[6] Carrasco R A, Stamm N B, Marcusson E, *et al*. Antisense inhibition of survivin expression as a cancer therapeutic[J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(2): 221-232.

[7] Cai J, Ahmad S, Jiang W G, *et al*. Activation of vascular endothelial growth factor receptor-1 sustains angiogenesis and Bcl-2 expression *via* the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in endothelial cells[J]. Diabetes, 2003, 52(12): 2959-2968.

[8] Hicklin D J, Ellis L M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(5): 1011-1027.

[9] 李春艳, 成小松, 李曦. 脂质体介导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.

[10] Phillips M I, Zhang Y C. Basic principles of using antisense oligonucleotides *in vivo*[J]. Methods Enzymol, 2000, 313: 46-56.

[11] 陶黎阳, 龙捷. 肺癌A549裸鼠移植瘤模型高效建立方法的应用[J]. 现代医药卫生, 2011, 27(9): 1281-1283.

[12] Liu C, Wu X, Luo C, *et al*. Antisense oligonucleotide targeting Livin induces apoptosis of human bladder cancer cell *via* a mechanism involving caspase 3[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29: 63.

[13] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. Breast Cancer Res Treatment, 1995, 36(2): 169-180.

[14] Tamura D, Arao T, Tanaka K, *et al*. Bortezomib potentially inhibits cellular growth of vascular endothelial cells through suppression of G_2/M transition[J]. Cancer Sci, 2010, 101(6): 1403-1408.

[15] Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer[J]. J Clin Oncol, 2008, 21(14): 2787-2799.

[16] 邹亚峰, 刘桂舫. Survivin和血管内皮生长因子在非小细胞肺癌中表达的相关性研究[J]. 河北医药, 2011, 33(1): 54-56.

[17] Zhu H, Chen X P, Zhang W G, *et al*. Expression and significance of new inhibitor of apoptosis protein survivin in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(25): 3855-3859.

[18] Beierle E A, Nagaram A, Dai W, *et al*. VEGF-mediated survivin expression in neuroblastoma cells[J]. J Surg Res, 2005, 127(1): 21-28.

[19] Mesri M, Wall N R, Li J, *et al*. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus[J]. J Clin Iverst, 2011, 108(7): 981-991.

[20] Coma S, Noe V, Lavarino C, *et al*. Use of siRNAs and antisense oligonucleotides against survivin RNA to inhibit steps leading to tumor angiogenesis[J]. Oligonucleotides, 2004, 14(2): 100-113.

[21] Wu Y, Wang G, Wei J, *et al*. Survivin protein expression positively correlated with proliferative activity of cancer cells in bladder cancer[J]. Indian J Med Sci, 2005, 59(6): 235-242.

[22] Chiarugi V, Magnelli L, Cinelli M, *et al*. Apoptosis and the cell cycle[J]. Cell Mol Biol Res, 1994, 40(7/8): 603-612.

[23] Hartwell L H, Kastan M B. Cell cycle control and cancer[J]. Science, 1994, 266(5192): 1821-1828.

(**收稿**:2013-06-28;**修回**:2013-09-12)

(编辑 王 红)