

PEI 介导 PKC- α 反义核酸对肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用

张小鹰^{1,2}, 蒋建伟¹, 陈涛^{1,3}, 严玉霞¹, 黎泳欣¹, 何金花¹

(1. 暨南大学医学院生化教研室, 广东广州 510632; 2. 佛山市南海区妇幼保健院, 广东佛山 528200;

3. 广东省结核病防治研究所, 广东广州 510620)

[摘要] 目的: 研究聚乙烯亚胺(PEI)-PKC- α 反义脱氧核寡核苷酸(ASODN)对人肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用。方法: RT-PCR 检测肝癌 SMMC-7721 细胞、HepG2 细胞 PKC- α mRNA 表达的差异, 细胞增殖抑制实验检测 PEI 和 ASODN 混合的最佳质量比, WST 法和克隆形成抑制实验检测细胞增殖抑制作用, 免疫荧光检测 PKC- α 的表达水平。结果: SMMC-7721 细胞 PKC- α mRNA 表达相对较高, PEI 和 ASODN 的质量比为 0.75/1 时是 PEI 转染反义核酸的合适比例, 对 SMMC-7721 细胞具有明显的增殖克隆抑制作用, 且呈剂量-效应关系; ASODN 和 PEI-ASODN 对 SMMC-7721 的 IC_{50} 分别为 16.6 μ mol/L 和 0.58 μ mol/L; PEI-ASODN 能够有效抑制 PKC- α 蛋白的生物合成。结论: PEI-ASODN 能显著抑制 SMMC-7721 细胞增殖和克隆形成, 下调 PKC- α 蛋白的表达。

[关键词] 蛋白激酶 C- α ; 聚乙烯亚胺; 反义核酸; 肝癌; SMMC-7721 细胞

[中图分类号] R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)04-0355-06

Proliferative inhibition effects of PKC- α antisense oligodeoxynucleotides mediated by polyethylenimine on SMMC-7721 cell lines

ZHANG Xiao-ying^{1,2}, JIANG Jian-wei¹, CHEN Tao^{1,3}, YAN Yu-xia¹, WU Feng-yun¹, HE Jing-hua¹

(1. Department of Biochemistry, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Foshan City Nanhai District Maternal and Child Health Hospital, Foshan 528200, China;

3. The Prevention and Treatment of Tuberculosis of Guangdong Province, Guangzhou 510620, China)

[Abstract] **Aim:** To investigate the proliferative inhibition effect of antisense oligonucleotides (ASODN) targeting for protein kinase C alpha (PKC- α) mediated by polyethyleneimine (PEI) on hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. **Methods:** The difference of PKC- α mRNA expression on hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells and HepG2 cells was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The best qualitative ratio of PEI/ASODN was determined by proliferative inhibition on SMMC-7721 cells. PKC- α ASODN were transfected with PEI, the proliferation and the clone formation of SMMC-7721 cells were detected by WST method and clone formation assay, respectively, and the expression of PKC- α was analyzed by immunofluorescence test. **Results:** The expression of PKC- α mRNA was higher in SMMC-7721 cells than that in HepG2 cells, the best qualitative ratio of PEI / ASODN on SMMC-7721 cells was at 0.75/1. Compare with the control group, PEI group, the prolifera-

[收稿日期] 2009-01-05

[基金项目] 广东省医学科研基金(A2007322)

[作者简介] 张小鹰(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤基因靶向治疗

通讯作者: 蒋建伟, 男, 副教授, 硕士生导师, Tel: 020-85220256; E-mail: jjw703@163.com

tion and clone formation rates of SMMC-7721 cells treated with PEI-ASODN were significantly inhibited ($P < 0.05$), and the inhibitive effect was much more significant when the dose of PEI-ASODN increased. The IC_{50} of ASODN on SMMC-7721 cells' proliferation was $16.6 \mu\text{mol/L}$ and the IC_{50} of PEI-ASODN on SMMC-7721 cells was $0.58 \mu\text{mol/L}$. And the expression of PKC- α protein in SMMC-7721 cells treated with PEI-ASODN was significantly lower than those in the control group detected by immunofluorescence test. **Conclusion:** The PKC- α ASODN mediated by PEI can inhibit the proliferation and clone formation in SMMC-7721 cells significantly and can down-regulate the expression of PKC- α protein.

[Key words] protein kinase C- α (PKC- α); polyethyleneimine (PEI); antisense oligodeoxynucleotides (ASODN); hepatocellular carcinoma; SMMC-7721 cells

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是细胞信号转导途径中的关键分子, 在细胞生长、分化与恶性转移过程中起重要的调控作用^[1-2]。研究发现, PKC- α 磷酸化后活化多种蛋白分子, 引起分化、增殖、胞膜转运、基因表达等一系列细胞反应。PKC- α 反义寡核苷酸 (antisense oligodeoxynucleotides, ASODN) 可通过下调 PKC- α 表达水平而显著抑制多种恶性肿瘤细胞的增殖, 并在一定程度上逆转其恶性表型^[3-4], PKC- α 在肝癌组织中呈高表达, 与肝癌的发生发展密切相关^[5], 本研究通过观察 PKC- α ASODN 抑制 PKC- α 蛋白的表达, 及对肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的影响, 为肝癌基因治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

PKC- α 反义核酸^[4]由赛百盛生物工程技术服务有限公司合成, 序列为: 5'-GTTCTCGCTGCT-GAGTTTCA-3', 随机序列 (random oligodeoxynucleotides, rODN): 5'-GAGTCGGGAGTCCGATGG-3', 全硫代修饰, PAGE 纯化, 冻存于 -20°C , 使用前用 RPMI 1640 培养液配制成浓度为 $150 \mu\text{mol/L}$ 备用。Trizol 购自 Invitrogen 公司; M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司; 聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI) 试剂购自 Sigma 公司; CCK-8 (Cell Count Kit-8) 试剂购自日本同仁化学研究所; 兔抗人 PKC- α 单克隆抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; FITC 标记的羊抗兔 IgG 购自深圳达科为公司。

1.2 方法

(1) 细胞: SMMC-7721 细胞由中山大学北校区生物化学教研室惠赠, 正常肝 L02 细胞由暨南大学药学院惠赠, HepG₂ 细胞为本室保存。实验时采用 RPMI 1640 培养液含体积分数为 10% 新生牛血清,

置 37°C 、体积分数为 5% CO_2 培养箱培养, 每 2-3 天用质量分数为 0.25% 胰蛋白酶消化传代。实验选用对数生长期、台盼蓝拒染率 $>95\%$ SMMC-7721 细胞。

(2) RT-PCR 检测: 取对数生长期的肝 L02 细胞、肝癌 SMMC-7721 细胞、HepG₂ 细胞, 按 TRIgene 说明书提取细胞总 RNA, 然后进行 RT-PCR, 以 GAPDH 作为内参照。反转录条件: 37°C 持续 1 h、 95°C 持续 5 min、 4°C 持续 5 min。PCR 条件: 94°C 预变性 5 min 后 94°C 持续 30 s、 56°C 持续 45 s、 72°C 持续 1 min, 共 30 个循环, 72°C 延伸 10 min。PCR 所用引物自行设计, 由北京赛百盛基因技术有限公司合成, PKC- α 上游引物: 5'-CCTATGGCG-GTCCTGTTGTAT-3'; 下游引物: 5'-GTTTGT-TCTCCCTTGTGACT-3', 扩增片段长度 473 bp。内参照磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 的上游引物: 5'-GGTCCGAGTCAACCGAATTT-3'; 下游引物: 5'-CCT-TCCACGATACCAAAGTT-3', 扩增片段长度 503 bp。扩增产物经质量分数为 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电压 60 V, 40 min 后结束电泳, UV Transilluminator 拍照, Gel-Doc1000 型紫外凝胶图像分析仪自带软件分析 PKC- α 和 GAPDH 扩增带的比值, 计算 PKC- α mRNA 的相对表达率。

(3) PEI/ASODN 复合物浓度比的确定^[6]: 取对数生长期肝癌 SMMC-7721 细胞, 将 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 细胞接种到 96 孔板, 每孔 100 μL 。实验分为 5 组, 每组设 3 复孔。每组固定 ASODN 终浓度均为 $1.0 \mu\text{mol/L}$, 并按 PEI/ASODN 质量比 0:1、0.25:1、0.50:1、0.75:1、1.0:1 制备 PEI-ASODN 复合物, 另设空白对照组。置 37°C 、体积分数为 5% CO_2 培养箱培养 48 h; 取出孔板, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 振荡混匀, 继续培养 1 h, 用酶标仪检测各孔的吸光值。绘制细胞生长曲线, 并计算 PEI-ASODN 对

SMMC-7721 细胞增殖抑制率和半数抑制浓度 (IC_{50})。细胞增殖抑制率 = $[A_{(对照组)} - A_{(实验组)}] / A_{(对照组)} \times 100\%$

(4) WST-8 法检测^[7]: 取对数生长期 SMMC-7721 细胞,将 5×10^4 /mL 细胞接种到 96 孔板,每孔 100 μ L。设空白对照组 (Control); PEI-ASODN 组: ASODN 终浓度为 0.125、0.250、0.375、0.500、0.75 μ mol/L; ASODN 对照组: 终浓度为 0.125、0.250、0.375、0.500、0.75、2、4、8、16 μ mol/L 和 PEI 对照组: 终浓度为 0.6、1.2、1.9、2.5、3.75 μ g/mL, 每组设 3 复孔,待细胞贴壁率达 40% ~ 50% 时加入药物,每孔最终体积为 150 μ L。置 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO_2 培养箱培养 48 h。取出孔板,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,同上方法检测各孔的吸光值。绘制细胞生长曲线,并计算 PEI-ASODN 对 SMMC-7721 细胞增殖抑制率和半数抑制浓度 (IC_{50})。细胞增殖抑制率 = $[A_{(对照组)} - A_{(实验组)}] / A_{(对照组)} \times 100\%$

(5) 克隆形成抑制实验: 取对数生长期 SMMC-7721 细胞,用含体积分数为 15% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液稀释细胞悬液,接种于 12 孔板,每孔接种 800 个细胞,终体积为 1 000 μ L。待细胞贴壁率达 40% ~ 50% 时加入药物,设空白对照组 (Control); PEI-ASODN 组: ASODN 终浓度 0.005、0.01、0.02、0.04、0.08、0.10、0.20 μ mol/L; ASODN 对照组: 终浓度 0.5 μ mol/L 和 PEI 对照组: 终浓度 0.96 μ g/mL, 每组设 2 复孔。置 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO_2 培养箱中培养 7 d。取出孔板, PBS 洗涤, 甲醇、冰醋酸固定, Giemsa 染色, 倒置显微镜计数细胞克隆数 (大于 20 个细胞的细胞群为一个克隆), 计算克隆形成抑制率。克隆形成抑制率 = $(1 - \text{实验组克隆数} / \text{细胞对照组克隆数}) \times 100\%$ 。

(6) 免疫荧光检测: 取对数生长期 SMMC-7721 细胞,将 5×10^4 /mL 细胞接种于 6 孔板中的盖玻片上,800 μ L/孔。待细胞贴壁率达 40% ~ 50% 时加入药物,设 3 组: 1) 对照组; 2) 随机序列对照组 (rODN 组); 3) PEI-ASODN 组: 含 ASODN 浓度为 0.125、0.250、0.500、0.750 μ mol/L。细胞爬片,培养 48 h, 甲醇、冰醋酸固定, 含体积分数为 0.01% Triton X-100 的 PBS 洗涤, 体积分数为 1% 正常山羊血清封闭, 1:100 兔抗人 PKC- α 单克隆抗体 (一抗) 孵育, 置于湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜后, 加 1:200 FITC 标记的羊抗兔 IgG (二抗), 置湿盒内室温避光孵育 1 h, 甘油封片, 激光共聚焦显微镜拍照。

1.3 统计学分析

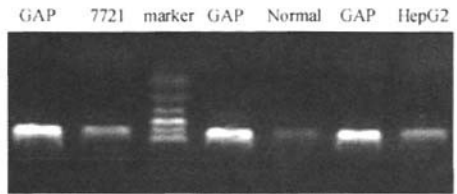
应用 SPSS11.5 统计软件处理数据, 结果以 (均

数 \pm 标准差) ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 分析各组间差异的显著性。

2 结果

2.1 SMMC-7721 细胞和 HepG2 细胞 pkc-α mRNA 表达的差异

RT-PCR 半定量结果证实, L02 细胞的 PKC- α /GAPDH mRNA 的灰度比值是 0.347, 肝癌 HepG₂ 细胞的比值是 0.406, SMMC-7721 细胞的比值是 0.433。与 L02 细胞相比, 肝癌 HepG₂ 细胞的 PKC- α 表达量增高 17.2%, 肝癌 SMMC-7721 细胞的 PKC- α 表达量增高 25%, 因此选择 SMMC-7721 细胞作为实验细胞。



GAP: (GAPDH); Normal: hepatocellular L02 细胞; 7721: SMMC-7721 细胞

图1 SMMC-7721 细胞和 HepG₂ 细胞 PKC- α mRNA 表达的差异

2.2 PEI/ASODN 不同混合比的确定

固定 ASODN 终浓度均为 1.0 μ mol/L, 按 PEI/ASODN 质量比 (0:1、0.25:1、0.5:1、0.75:1、1:1) 分 5 组加入 PEI-ASODN 复合物, 筛选结果 (表 1)。结果显示 PEI/ASODN 质量比为 0.75:1 时, 对 SMMC-7721 细胞的增殖抑制最显著, 以下实验均按 PEI/ASODN 质量比为 0.75:1。

表1 不同混合比率的 PEI 和 ASODN 对肝癌细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

PEI/ASODN	n	抑制率/%
0/1	3	22.4 \pm 10.1
0.25/1	3	26.8 \pm 7.6
0.5/1	3	29.1 \pm 3.8
0.75/1	3	55.2 \pm 2.6 ¹⁾
1/1	3	54.2 \pm 2.1 ¹⁾

1) 与 0/1 组比较, $P < 0.01$

2.3 PEI-ASODN 对 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用

ASODN 浓度为 0.125 ~ 0.75 μ mol/L 作用于 SMMC-7721 细胞 48 h 后, 细胞增殖未见抑制, PEI-ASODN 浓度 0.375 ~ 0.75 μ mol/L 作用于 SMMC-7721 细胞 48 h 后, 细胞增殖出现明显的抑制作用, 并随着浓度的增加其抑制作用逐渐增强 (表 2)。

表2 不同浓度 ASODN 对肝癌细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

c (ASODN) ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	ρ (PEI)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	n	抑制率/%	
			ASODN	PEI-ASODN
0	0	3	0	0
0.125	0.62	3	-1.7 ± 3.7	14.5 ± 4.0
0.25	1.24	3	0.2 ± 5.0	19.1 ± 6.5
0.375	1.86	3	-1.9 ± 5.7	$34.6 \pm 7.4^{1)}$
0.50	2.50	3	10.3 ± 15.5	$47.3 \pm 6.7^{1)}$
0.75	3.75	3	11.6 ± 5.6	$60.0 \pm 5.8^{1)}$
rODN _{0.75}		3	8.0 ± 3.1	15.4 ± 2.3

1) 与单纯 ASODN 组比较, $P < 0.01$; 表中 rODN_{0.75} 浓度为 0.75 $\mu\text{mol/L}$

2.4 PEI-ASODN 对 SMMC-7721 细胞的克隆形成抑制作用

各组的克隆形成情况(图2、表3)。细胞对照组细胞克隆数与 ASODN 组(0.75 $\mu\text{mol/L}$)和 PEI 组(3.75 $\mu\text{g/mL}$)相比未见差异;而 PEI-ASODN 组浓度从 0.005 $\mu\text{mol/L}$ 到 0.08 $\mu\text{mol/L}$ 作用于细胞 48 h 后,随着浓度增加,细胞克隆逐渐减小,克隆数量逐渐减少,当 PEI-ASODN 浓度达 0.08 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞克隆数为平均 4 个,当 PEI-ASODN 浓度达 0.10 $\mu\text{mol/L}$ 或 0.20 $\mu\text{mol/L}$ 时,孔内未见克隆形成。

con: 空白对照组; PEI: PEI 3.75 $\mu\text{g/mL}$; AS: ASODN 0.75 $\mu\text{mol/L}$
P-A0.005: PEI-ASODN 0.005 $\mu\text{mol/L}$; P-A0.01: PEI-ASODN 0.01 $\mu\text{mol/L}$;
P-A0.02: PEI-ASODN 0.02 $\mu\text{mol/L}$; P-A0.03: PEI-ASODN 0.03 $\mu\text{mol/L}$;
P-A0.04: PEI-ASODN 0.04 $\mu\text{mol/L}$; P-A0.08: PEI-ASODN 0.08 $\mu\text{mol/L}$;
P-A0.1: PEI-ASODN 0.10 $\mu\text{mol/L}$; P-A0.2: PEI-ASODN 0.20 $\mu\text{mol/L}$

图2 PEI-ASODN 抑制 SMMC-7721 细胞克隆形成

表3 不同浓度 PEI-ASODN 对 SMMC-7721 细胞克隆形成抑制率($\bar{x} \pm s$)的比较

组别/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	n	细胞克隆数	克隆形成抑制率/%
空白对照组	2	812 ± 27.58	-
PEI/3.75/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	2	$607 \pm 8.49^{1)}$	$25.3 \pm 1.7^{1)}$
ASODN/0.75	2	726 ± 24.04	10.7 ± 2.9
PEI-ASODN/0.005	2	$712.5 \pm 14.85^{1)}$	$12.3 \pm 1.8^{1)}$
PEI-ASODN/0.01	2	$614.5 \pm 12.02^{1)}$	$24.4 \pm 1.5^{1)}$
PEI-ASODN/0.02	2	$371 \pm 14.14^{1)}$	$54.4 \pm 1.8^{1)}$
PEI-ASODN/0.03	2	$152.5 \pm 14.85^{1)}$	$81.2 \pm 1.8^{1)}$
PEI-ASODN/0.04	2	$18.5 \pm 4.95^{1)}$	$97.8 \pm 0.6^{1)}$
PEI-ASODN/0.08	2	$4 \pm 4.24^{1)}$	$99.5 \pm 0.6^{1)}$
PEI-ASODN/0.10	2	0 ¹⁾	100 ¹⁾
PEI-ASODN/0.20	2	0 ¹⁾	100 ¹⁾

1) 与空白对照组比较, $P < 0.01$

2.5 免疫荧光检测 PKC- α 蛋白

经过一抗孵育过夜,二抗孵育1 h,PKC- α 蛋白在细胞核和细胞浆都有表达,且多分布在细胞浆,空白对照组和 rODN 对照组的 PKC- α 蛋白表达均较强。ASODN 浓度为 0.125 $\mu\text{mol/L}$ 的 PEI-ASODN 组 PKC- α 蛋白量未见减弱现象。当 PEI-ASODN 浓度增加到

0.250 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞核内蛋白表达开始减弱,但胞浆内仍有大量蛋白。随着反义核酸浓度的增高,细胞分裂增殖明显受到抑制,细胞核和细胞浆内 PKC- α 表达均减弱,其中以浓度为 0.750 $\mu\text{mol/L}$ PEI-ASODN 组最明显。

图3 不同浓度 PEI-ASODN 对 SMMC-7721 细胞 PKC- α 蛋白表达的影响

3 讨论

PKC- α 蛋白是细胞内信号传递中的关键分子之一,人体肿瘤组织中 PKC- α 表达水平出现异常,PKC- α 磷酸化后转位到胞浆或核膜,通过活化多种蛋白分子激发胞膜转运、基因表达、细胞分化、增殖等一系列反应。PKC- α 在膀胱上皮细胞癌、肝癌、恶性胶质瘤、肺癌等多数肿瘤组织中高表达,PKC- α 能促进这些肿瘤细胞增殖,抑制细胞凋亡和分化。Bosch 等^[8]报道 PKC 的激活可促使细胞内一系列与增殖有关的转录因子或蛋白质磷酸化,促进一些原癌基因的表达,调节细胞增殖;祝葆华等^[9]报道 PKC- α ASODN 对 CNE-2Z 细胞增殖的抑制作用,可能与下调 *C-MYC*, *C-FOS* 的表达有关。

RT-PCR 半定量结果证实,L02 细胞的 PKC- α /

GAPDH mRNA 的灰度比值是 0.347,肝癌 HepG₂ 细胞的比值是 0.406,SMMC-7721 细胞的比值是 0.433。与 L02 细胞相比,肝癌 HepG₂ 细胞的 PKC- α 表达量增高 17.2%,肝癌 SMMC-7721 细胞的 PKC- α 表达量增高 25%,因此选择 SMMC-7721 细胞作为实验细胞。

PEI 作为转染试剂,在质量浓度低于 3.75 $\mu\text{g/mL}$ 时,对细胞的毒性较小。PEI 与 ASODN 的质量比为 0.75/1 时,转染效率较高,与本研究组前期实验结果一致^[6];PEI 是带正电的大分子化合物,对细胞生长有一定的毒性,为减少 PEI 的细胞毒性,选择既能对细胞增殖产生显著抑制作用、PEI 用量又尽可能低的混合比例,故选择 PEI/ASODN 质量比为 0.75:1。

ASODN 在没有 PEI 转染下,对 SMMC-7721 细胞

细胞的增殖抑制作用很小, ASODN 对肝癌 SMMC-7721 细胞的 IC_{50} 为 $16.6 \mu\text{mol/L}$, 而 PEI-ASODN 的 IC_{50} 为 $0.58 \mu\text{mol/L}$, 在 PEI 的介导下, ASODN 的抑制作用提高了 28.6 倍。同样克隆形成抑制实验可以看到, ASODN 组与空白对照组相比细胞克隆数目未见明显差异, 而 PEI-ASODN 组随着浓度增加, 细胞克隆逐渐减小, 克隆数目逐渐减少。实验表明 PEI 能够明显提高 PKC- α ASODN 的抑制作用。

免疫荧光实验证实: PKC- α 蛋白在细胞核和细胞浆均有表达, 且多分布在细胞浆。浓度为 $0.125 \mu\text{mol/L}$ 的 PEI-ASODN 组 PKC- α 蛋白量未见减弱现象。当 PEI-ASODN 浓度增加到 $0.250 \mu\text{mol/L}$ 时, 细胞核内蛋白表达量开始减弱, 但胞浆内仍有大量蛋白。随着反义核酸浓度的增高, 细胞核和细胞浆内 PKC- α 表达均减弱, 其中以浓度为 $0.750 \mu\text{mol/L}$ PEI-ASODN 组最明显。Denham 等^[10] 在研究前列腺癌的时, 发现 PKC- α 主要表达在细胞浆, 反义核酸作用后, 胞浆内 PKC- α 蛋白降低明显, 且有重新分布趋势, 与本实验结果一致。

综上所述, PEI 介导的 PKC- α ASODN 能显著抑制 SMMC-7721 细胞生长增殖和克隆形成, 下调细胞中 PKC- α 蛋白的表达, 且呈浓度依赖关系。PKC- α ASODN 抑制 SMMC-7721 细胞增殖的机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] NAKASHIMA S. Protein kinase C alpha (PKC alpha): regulation and biological function[J]. J Biochem, 2002, 132(5): 669-675.
- [2] LAHN M, PATERSON B M, SUNDELL K. The role of protein kinase C-alpha (PKC- α) in malignancies of the gastrointestinal tract[J]. Eur J Cancer, 2004, 40(1): 10-20.
- [3] ZHU B H, YAO Z X, LUO S J, et al. Effects of anti-sense oligonucleotides of PKC-alpha on proliferation and apoptosis of HepG2 in vitro[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2005, 4(1): 75-79.
- [4] JIANG X H, TU S P, CUI J T, et al. Antisense targeting protein kinase C-alpha and beta1 Inhibits gastric carcinogenesis[J]. Cancer Res, 2004, 64(15): 5787-5794.
- [5] TSAI J H, TSAI M T, SU W W, et al. Expression of protein kinase C alpha in biopsies and surgical specimens of human hepatocellular carcinoma[J]. Chin J Physiol, 2005, 48(2): 139-143.
- [6] 王芳, 蒋建伟, 陈涛, 等. 聚乙炔亚胺介导生存素反义核酸体外投递肝癌 SMMC-7721 细胞的条件优化[J]. 暨南大学学报: 医学版, 2006, 27(4): 551-556.
- [7] 蒋建伟, 史金桃, 吴智慧, 等. 增殖细胞核抗原 siRNA 序列的设计、合成与筛选[J]. 中国病理生理学报, 2008, 24(3): 484-489.
- [8] BOSCH M, LOPEZ GIRONA A, BACHS O, et al. Protein kinase C regulates calmodulin expression in NRK cells activated to proliferate from quiescence[J]. Cell Calcium, 1994, 16(6): 446-454.
- [9] 祝葆华, 黄培春, 鲍波, 等. PKC- α 反义核酸对鼻咽癌 CNE-2Z 细胞增殖及 c-myc 和 c-fos 表达的影响[J]. 基础医学与临床, 2003, 23(1): 68-71.
- [10] DENHAM D W, FRANZ M G, DENHAM W. Directed antisense therapy on the role of protein kinase C-alpha in the tumorigenicity of pancreatic cancer[J]. Surgery, 1998, 124(2): 218-224.

[责任编辑: 朱颖嫒]