

针对 *Oct-4* 和 *Survivin* 基因的双靶向 shRNA 腺病毒载体的构建及其对肝癌细胞的抑制作用

王端明¹, 王敬晗², 李林芳², 陈静波³, 苏长青²

1 石河子大学医学院 新疆地方与民族高发病实验室, 新疆 石河子 832000

2 第二军医大学东方肝胆外科医院 分子肿瘤研究室, 上海 200438

3 新疆畜牧科学院, 新疆 乌鲁木齐 830000

王端明, 王敬晗, 李林芳, 等. 针对 *Oct-4* 和 *Survivin* 基因的双靶向 shRNA 腺病毒载体的构建及其对肝癌细胞的抑制作用. 生物工程学报, 2012, 28(5): 623-631.

Wang DM, Wang JH, Li LF, et al. Construction of adenovirus carrying dual-target shRNA for *Oct-4* and *Survivin* and its inhibitory effect on human hepatocellular carcinoma cells. Chin J Biotech, 2012, 28(5): 623-631.

摘要: 转录因子 *Oct-4* 和 *Survivin* 是细胞增殖的关键调控因子, 构建针对 *Oct-4* 和 *Survivin* 基因的双靶向 shRNA 腺病毒载体 Ad5-Dual-shRNA, 并研究其对肝癌细胞及移植瘤的生长抑制作用。合成 *Oct-4* 和 *Survivin* 基因的 shRNA 序列, 插入腺病毒穿梭载体 pDC312, 含有 shRNA 的穿梭载体与腺病毒骨架载体 pBHGloxdeltaE13Cre 共转染 HEK293 细胞, 经 Cre/LoxP 位点特异性重组获得重组腺病毒 Ad5-Dual-shRNA; 腺病毒 Ad5-Dual-shRNA 感染肝癌细胞系 EHBH-H1, 经 Western blotting 检测 *Oct-4* 和 *Survivin* 基因的表达情况, 用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐染色法 (MTT 实验) 和裸鼠荷瘤实验检测对肿瘤细胞生长的影响。研究结果显示, 双靶向重组腺病毒 Ad5-Dual-shRNA 感染肝癌细胞系 EHBH-H1 能够有效沉默 *Oct-4* 与 *Survivin* 基因的表达, 并且在 MTT 实验和裸鼠荷瘤试验中都显示出较单一靶向的 shRNA 腺病毒载体 Ad5-Surv-shRNA、Ad5-Oct4-shRNA 具有更为明显的肿瘤细胞生长抑制作用。实验结果表明, 特异性双靶向 shRNA 腺病毒载体 Ad5-Dual-shRNA 是一种更为高效的靶向肿瘤基因治疗载体。

关键词: *Oct-4*, *Survivin*, shRNA, 肝癌, 腺病毒

Received: October 25, 2011; **Accepted:** December 30, 2011

Supported by: National Significant Science and Technology Special Projects of New Drugs Creation (No. 2009ZX09102-235), National Natural Scientific Foundation of China (No. 81071866).

***Corresponding author:** Changqing Su. Tel: +86-21-81875351; E-mail: suchangqing@gmail.com

国家科技重大计划新药创制项目 (No. 2009ZX09102-235), 国家自然科学基金 (No. 81071866)资助。

Construction of adenovirus carrying dual-target shRNA for *Oct-4* and *Survivin* and its inhibitory effect on human hepatocellular carcinoma cells

Duanming Wang¹, Jinghan Wang², Linfang Li², Jingbo Chen³, and Changqing Su²

1 Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang, China

2 Department of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

3 Animal Science Academy of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, Xinjiang, China

Abstract: The transcriptional factor *Oct-4* and *Survivin* are the key regulatory factors in cancer cell proliferation and mitosis. A dual cancer-specific shRNA adenovirus vector, Ad5-Dual-shRNA, targeting *Oct-4* and *Survivin* genes was constructed by molecular cloning and recombination. After cells were infected with virus, hepatocellular carcinoma cell line EHBH-H1 was used for detecting the expression of *Oct-4* and *Survivin* proteins by Western blotting. The viral cytotoxic effect on cancer cells was detected by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay *in vitro*, and the inhibition effect on tumor xenografts was observed in nude mice. The results showed that the expression of *Oct-4* and *Survivin* in cancer cell line EHBH-H1 could be silenced markedly by Ad5-Dual-shRNA. In MTT and animal experiments, Ad5-Dual-shRNA also represented much stronger anti-tumor effect on tumor growth than Ad5-Surv-shRNA and Ad5-Oct4-shRNA. From this research we can draw a conclusion that the cancer-specific adenovirus vector expressing dual-shRNA targeting *Oct-4* and *Survivin* genes may provide us a more effective, specific and convenient gene therapy method.

Keywords: *Oct-4*, *Survivin*, shRNA, liver cancer, adenovirus

原发性肝癌是最常见的致死性恶性肿瘤，预后差，多数患者在首次手术后一年内复发或转移，一年生存率极低^[1]。而我国又是乙型肝炎感染人群最多的国家，肝癌的发病率明显较其他国家偏高^[2-3]。因此，深入了解肝癌发病的分子机制并积极探索新的治疗手段是提高肝癌整体治疗效果的关键。肿瘤细胞具有较强的凋亡抗性，并在一定程度上具有干细胞特性，是肿瘤复发、转移的重要原因之一。*Survivin* 是近年来克隆出的凋亡抑制蛋白家族 (IAPs) 新成员之一，也是迄今为止发现的抑制凋亡作用最强的凋亡抑制因子^[4]。正常情况下仅表达于胚胎组织，在胚胎

发育和细胞分化中起着调控细胞有丝分裂、抑制细胞凋亡的重要作用^[5]。目前研究发现 *Survivin* 在绝大多数肿瘤组织中高表达，提示 *Survivin* 与肿瘤的发生发展存在极为密切的关系^[6-7]。*Survivin* 抑制肿瘤细胞凋亡的分子机制还有许多尚待解决的疑难问题^[8-9]。其中，*Survivin* 与其他调控因子的相互作用尤为值得注意。*Oct-4* 属于 POU 转录因子家族，是一类 DNA 结合蛋白，能够激活在启动子或增强子区域内带有顺式作用元件的基因转录，对维持和调节干细胞状态起着关键作用。已有研究表明，很多类型的肿瘤细胞也有高水平的 *Oct-4* 表达，可能是参与了肿瘤细

胞的自我更新^[10]。鉴于此,本研究将应用分子克隆和同源重组技术构建特异性针对 *Oct-4* 和 *Survivin* 基因的双靶向 shRNA 腺病毒载体,并观察其对肿瘤细胞增殖的抑制作用,通过裸鼠荷瘤实验检验其抗肿瘤能力,旨在优化肿瘤基因治疗的方法,寻求更为有效的治疗策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

胎牛血清购自 PAA 公司, DMEM 粉剂购自 Gibco 公司, 各种限制性内切酶均购自 NEB 公司, 质粒提取试剂盒、病毒基因组提取试剂盒 QIAGEN DNA Blood Mini Kit 购自 QIAGEN 公司, 胶回收试剂盒购自 MN 公司, 鼠抗人 *Oct-4* 单抗购自美国 Santa Cruz 公司, 兔抗人 *Survivin* 多抗购自美国 R&D 生物公司, 山羊抗鼠 IgG、山羊抗兔 IgG、双染 SP 试剂盒购自福州迈心生物技术公司, 细胞裂解蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自 Pierce 公司, 预染蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司, 转染试剂 LipoFectamine2000 试剂盒购自 Invitrogen 公司, 其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.2 菌株、质粒和细胞株

大肠杆菌菌株 DH5 α 、重组腺病毒质粒 pAd-EGFP、肝癌细胞系 EHBH-H1 由第二军医大学东方肝胆外科医院实验室保存, 腺病毒包装用 HEK293 细胞株购自美国 ATCC。

1.1.3 实验动物

清洁级 BALB/c 裸鼠 30 只, 4 周龄, 体重 16~18 g, 由中国科学院上海实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (沪) 2009-0003。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人肝癌细胞系 EHBH-H1 用含 10% 胎牛血清、100 IU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养液, 置于 37 °C 饱和湿度及 5% CO₂ 的培养箱内培养, 待生长细胞达到 80% 以上的汇合度时进行传代培养。

1.2.2 *Oct-4* 和 *Survivin* 基因 shRNA 的设计与合成

根据 GenBank 的 *Survivin* 基因序列 (Accession No. NM001168) 和 *Oct-4* 基因序列 (Accession No. DQ486513.1) 设计相应的 shRNA。设计条件为: 1) 排除含有连续 4 个 G/C 或 A/T 的序列; 2) 排除两端存在 AA 的序列; 3) 排除定位在碱基易突变点的序列; 4) 排除其他人类基因的同源性序列。Surv-shRNA 序列为 5'-gaa agt gcg ccg tgc cat c-3', 位于全长 *Survivin* 编码序列的第 387~405 bp。*Oct4*-shRNA 序列为 5'-ccc tea ctt cac tgc act gta-3', 位于全长 *Oct-4* 编码序列的第 1233~1253 bp。同时设计阴性对照 (Ctrl-shRNA) 序列 5'-gac ttc ata agg cgc atg c-3'。由武汉市晶赛生物工程技术有限公司合成, 合成的编码 shRNA 的 DNA 结构为: *Xho* I + *Bam* H I + U6 + Sense DNA + Loop (ttc aag acg) + Antisense DNA + TTTTTT + *Bgl* II, 克隆入 pGenesil-1.1。

1.2.3 腺病毒载体的构建与病毒包装

将上述构建的 *Survivin*、*Oct-4* 和阴性对照 3 个 shRNA 质粒酶切回收, 目的基因片段插入到腺病毒穿梭载体 pDC312 的多克隆位点, 经酶切鉴定正确后, 分别命名为 pDC312-Surv-shRNA、pDC312-Oct4-shRNA 和 pDC312-Ctrl-shRNA。同时将 Surv-shRNA (正向插入 *Sal* I + *Bgl* II) 和

Oct4-shRNA (反向插入 *Bam*H I + *Bgl* II) 克隆入 pDC312 中, 构建含双靶向 shRNA 的载体 pDC312-Dual-shRNA。

用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养 HEK293 细胞, 对数生长期时用 0.25% 胰酶消化传代, 转种于 6 孔培养板, 置于 37 °C 饱和湿度及 5% CO₂ 的培养箱内生长 48 h, 待细胞汇合度为 60% 时, 同时转染 pBHGloxdeltaE13Cre 和上述含 shRNA 的腺病毒穿梭载体质粒 pDC312-Dual-shRN、pDC312-Surv-shRNA、pDC312-Oct4-shRNA 和 pDC312-Ctrl-shRNA, 转染方法参考 Invitrogen 公司 LipoFectamine2000 试剂盒说明书。共转染 12 d 后出现病毒空斑, 经过空斑纯化, 得到重组腺病毒, 分别命名为 Ad5-Dual-shRNA、Ad5-Surv-shRNA、Ad5-Oct4-shRNA 和 Ad5-Ctrl-shRNA。用病毒基因组提取试剂盒 QIAGEN DNA Blood Mini Kit 提取病毒基因组 DNA, 进行 PCR 鉴定。鉴定正确后, 采用 HEK293 细胞内扩增及常规氯化铯梯度离心纯化方法, 扩增及纯化腺病毒。

1.2.4 shRNA 腺病毒载体对基因表达的沉默作用

取对数生长期的肝癌细胞系 EHBH-H1 铺于 6 孔板, 24 h 后按 MOI=50 分别感染腺病毒 Ad5-Dual-shRNA、Ad5-Surv-shRNA、Ad5-Oct4-shRNA 和 Ad5-Ctrl-shRNA, 并设不加病毒的对照组, 在 37 °C 饱和湿度及 5% CO₂ 的培养箱内培养 48 h 后移去培养液, PBS 洗 3 次后, 加细胞裂解蛋白提取液, 室温下处理 30 min, 12 000 r/min 离心收集上清, 定量后分装于 EP 管-80 °C 保存。

Western blotting 操作方法检测培养细胞中

Oct-4 与 Survivin 蛋白的表达情况。将蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 每孔上样 20 μL, 电泳结束后用半干转印仪将电泳产物转移到 NC 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加一抗 (1 : 1 000 稀释), 室温孵育 3~4 h 或 4 °C 过夜, TBST 洗膜 5 min, 重复 5 次, 加辣根过氧化物酶标记的二抗 (1 : 10 000 稀释), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 5 min, 重复 5 次后进行化学发光反应, 暗室曝光, 胶片扫描后分析目标条带的分子量和光密度值。

1.2.5 MTT 实验

收集对数生长期的 EHBH-H1 细胞计数, 用 10% 胎牛血清 DMEM 培养液制成单细胞悬液, 按 1×10^4 个细胞/孔铺 96 孔板, 每孔 100 μL。置于 37 °C 饱和湿度及 5% CO₂ 的培养箱中培养过夜。用无血清培养液稀释病毒, 按 MOI = 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 加入 100 μL 稀释好的病毒液分别感染腺病毒, 对应于每个 MOI 值设置 4 个复孔, 置于 37 °C 饱和湿度及 5% CO₂ 的培养箱中, 7 d 后弃去培养液, 加入无血清的 DMEM 培养液 100 μL/孔和 5 g/L 的 MTT 10 μL/孔, 继续培养 4~6 h, 之后每孔加入 100 μL 10% SDS 培养过夜, 用酶联免疫检测仪 570 nm 波长测定光吸收值, 计算细胞存活率。

1.2.6 动物实验

取对数生长期的 EHBH-H1 细胞悬液, 计数后按 5×10^6 个细胞/100 μL 注射于裸鼠前肢右侧皮下, 恒温、通风、无菌条件下饲养。注射约 1 周后, 在接种区皮下出现米粒大小移植瘤。剔除瘤体过大和过小的裸鼠, 剩余 25 只, 随机分为 5 组: Ad5-Dual-shRNA、Ad5-Surv-shRNA、Ad5-

Oct4-shRNA、Ad5-Ctrl-shRNA、空白对照组, 每组 5 只。每组释以 2×10^8 PFU/100 μ L 的重组病毒瘤内多点注射, 隔日 1 次, 共 5 次; 空白对照组以生理盐水替代重组病毒注射, 100 μ L \times 5 次。开始治疗后, 定时测量瘤体大小, 以“最大径 \times 最小径 $^2 \times 0.5$ ”公式计算瘤体体积。

观察周期结束, 断颈处死小鼠, 取瘤体标本, 以 10% 中性缓冲福尔马林固定, 石蜡包埋切片。采用 SP 双染色法免疫组化定位肿瘤组织中 *Survivin*、*Oct-4* 的表达。在 5 个高倍视野下计数每张切片中阳性细胞的比例。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据两两比较采用配对资料 *t* 检验, 多组之间比较用 ANOVA 进行, 采用 SPSS13.0 软件包。

2 结果与分析

2.1 腺病毒介导特异性 shRNA 对基因表达的沉默作用

EHBH-H1 细胞系按 MOI=50 感染特异性腺病毒载体 48 h 后, Ad5-Dual-shRNA 组 *Oct-4* 与 *Survivin* 蛋白的表达均转阴, Ad5-Surv-shRNA 和 Ad5-Oct4-shRNA 能够各自下调相应的基因表达水平, 但 Ad5-Oct4-shRNA 对 *Survivin* 蛋白的表达也有一定的下调作用 (图 1)。结果显示双靶向载体 Ad5-Dual-shRNA 能够有效地沉默 *Oct-4* 与 *Survivin* 基因的表达。

2.2 双靶向 shRNA 腺病毒对肝癌细胞增殖的抑制作用

EHBH-H1 细胞按不同的感染强度感染 shRNA 腺病毒, 随着病毒滴度的增加, 细胞的存活率都有明显的下降 (图 2)。在 MOI=0.1 和 1

时, Ad5-Dual-shRNA 组细胞的平均存活率已下降到 43.7% 和 22.4%, 显著低于其他各组 ($P < 0.01$)。Ad5-Surv-shRNA 组与 Ad5-Oct4-shRNA 组的细胞存活率也低于空白对照和 Ad5-Ctrl-shRNA 组。结果说明特异性双靶向载体 Ad5-Dual-shRNA 能够显著地抑制肝癌细胞系 EHBH-H1 的增殖。

2.3 双靶向 shRNA 腺病毒抑制肝癌裸鼠移植瘤的生长

EHBH-H1 细胞裸鼠移植瘤经病毒治疗后, 第 10 天 Ad5-Dual-shRNA 组瘤体体积已出现明显差异 (图 3)。至 20 d, Ad5-Dual-shRNA、Ad5-Surv-shRNA、Ad5-Oct4-shRNA、Ad5-Ctrl-shRNA、空白对照组肿瘤体积分别为 (250.87 ± 17.37)、(671.27 ± 212.03)、(566.16 ± 123.71)、(980.66 ± 95.84)、($1\ 101.13 \pm 273.14$) mm^3 。统计发现, Ad5-Dual-shRNA、Ad5-Surv-shRNA、Ad5-Oct4-shRNA 组与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$), 以 Ad5-Dual-shRNA 组疗效最好。Ad5-Ctrl-shRNA 组与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。

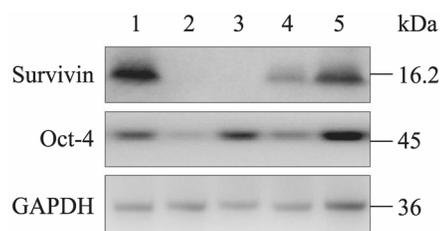


图 1 *Survivin* 和 *Oct-4* 特异性 shRNA 对目的基因表达的沉默作用

Fig. 1 The silencing effect of specific shRNA on the expression of *Survivin* and *Oct-4* proteins. 1: control group; 2: Ad5-Dual-shRNA group; 3: Ad5-Surv-shRNA group; 4: Ad5-Oct4-shRNA group; 5: Ad5-Ctrl-shRNA group.

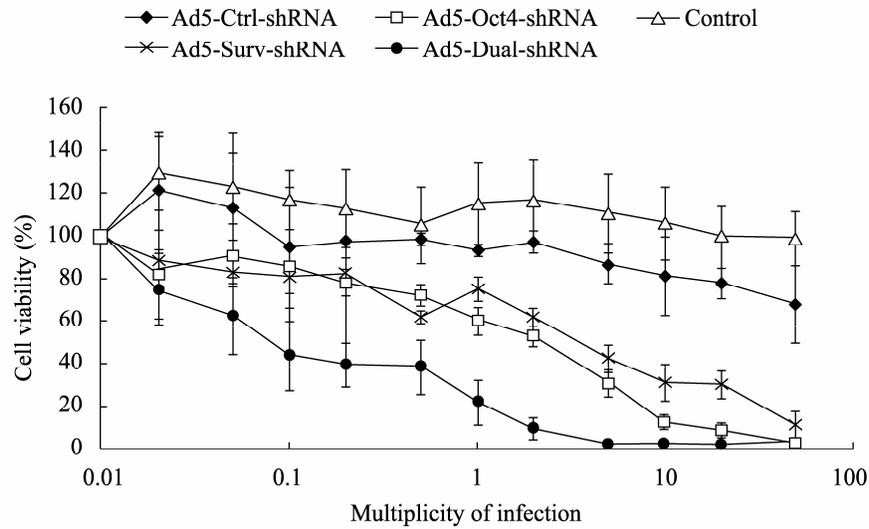


图2 MTT法检测癌细胞存活率

Fig. 2 Cell viability was assayed by MTT test.

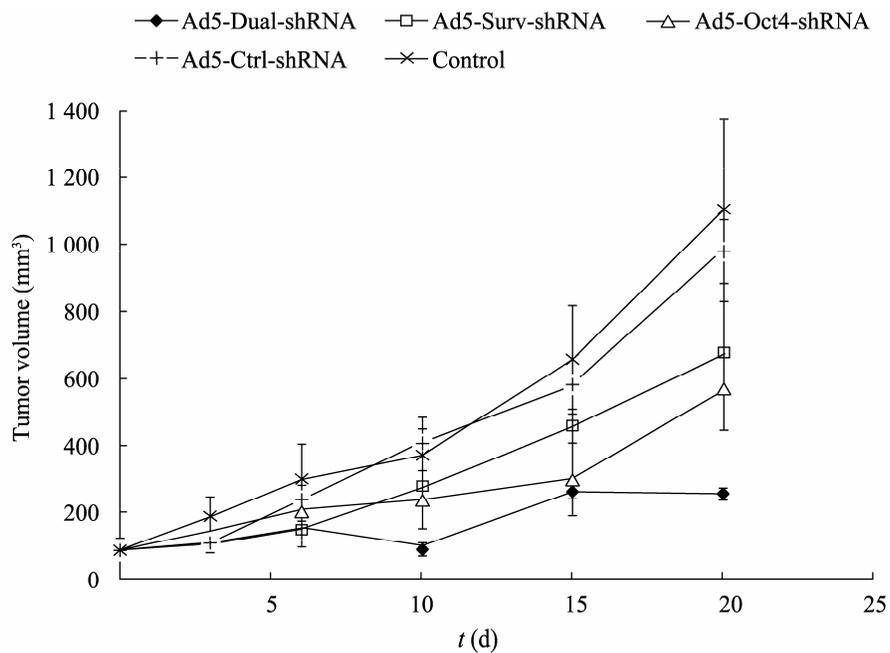


图3 肝癌裸鼠移植瘤 shRNA 病毒治疗的疗效对比

Fig. 3 HCC xenograft models were established by subcutaneous injection of 5×10^6 EHBH-H1 cells per mouse in five groups of nude mice ($n=5$ /group).

2.4 病理检查

移植瘤治疗后,取瘤体标本,石蜡包埋切片,做 *Oct-4* 和 *Survivin* 表达的双染免疫组化,*Survivin* 标记为深蓝色 (NBT/BCIP 显色),*Oct-4* 标记为红色 (AEC 显色)。可以看出,空白对照组 *Oct-4* 与 *Survivin* 的表达呈

双阳性;Ad5-Surv-hRNA 组 *Survivin* 阴性而 *Oct-4* 阳性,阳性反应主要集中在细胞核和细胞浆;Ad5-Oct4-shRNA 组 *Oct-4* 阴性,同时 *Survivin* 阳性表达率下降;Ad5-Dual-hRNA 组 *Oct-4* 和 *Survivin* 表达均明显下降(图 4)。

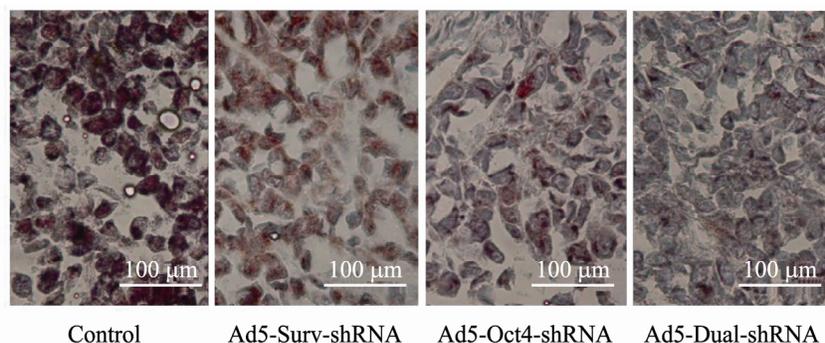


图 4 肝癌裸鼠移植瘤免疫组化检测 *Survivin* (NBT/BCIP 蓝色标记) 和 *Oct-4* (AEC 红色标记) 的表达

Fig. 4 The results of immunocytochemistry for *Survivin* (prussian blue stained with NBT/BCIP) and *Oct-4* (red stained with AEC).

3 讨论

Survivin 基因已成为肿瘤药物和基因治疗的一个理想靶点,其抑制肿瘤细胞凋亡的作用已有较多文献报道,主要是通过抑制 caspase 级联反应下游的 caspase-3、caspase-7 等发挥其抗凋亡作用^[11],而其体内调节机制以及与其他关键基因之间的相互作用还存在诸多问题有待解决。有实验证实,小鼠胚胎细胞 *Survivin* 的功能活性受 *Oct-4* 转录因子的调节,降低细胞 *Oct-4* 表达会明显抑制 *Survivin* 基因启动子的活性,从而抑制 *Survivin* 的表达^[12]。近来的研究也证实,人体很多类型的肿瘤细胞都有较高水平的 *Oct-4* 表达,可能参与维持肿瘤细胞特别是肿瘤干细胞的自

我更新、阻止肿瘤细胞分化等功能^[13]。那么,在恶性转化的肿瘤细胞中,*Survivin* 和 *Oct-4* 之间是否存在相互调节或影响的关系,目前国内外尚未见文献报道。我们已有的研究发现,在肝胆肿瘤中转录因子 *Oct-4* 对 *Survivin* 的表达有正向调节作用,*Oct-4* 是 *Survivin* 表达的上游调控基因。*Oct-4* 引起的 *Survivin* 增强表达,直接促进了肿瘤细胞周期的进展和细胞凋亡的抑制,而沉默 *Survivin* 表达则引起细胞周期阻滞,诱导细胞凋亡^[14]。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指在进化过程中高度保守的、由双链 RNA 诱发的、同源 mRNA 高效特异性降解的现象。其作用机制是双链 RNA 被特异的核酸酶降解,产生干扰

小 RNA (siRNA), 这些 siRNA 与同源的靶 RNA 互补结合, 特异性酶降解靶 RNA, 从而抑制、下调基因表达。由于使用 RNAi 技术可以特异性剔除或关闭特定基因的表达, 所以该技术已经发展成为基因治疗、基因结构功能研究的快速而有效的方法^[15]。针对肿瘤细胞 *Survivin* 高表达而设计的 siRNA 在脑胶质瘤^[16]、胰腺癌^[17]、膀胱癌^[18] 的实验中, 均能够显著抑制肿瘤细胞的生长, 产生抗癌作用。结果显示 RNAi 技术用于肿瘤的基因治疗具有可靠的疗效和良好的发展前景。

根据上述 *Oct-4* 增强 *Survivin* 表达的调节机制, 本研究构建 *Oct-4* 和 *Survivin* 双特异性 shRNA 的腺病毒表达载体, 研究其对肝癌细胞 EHBH-H1 的抑制作用。体外细胞学研究发现, 双靶向 shRNA 载体能够同时有效地沉默 *Oct-4* 与 *Survivin* 基因的表达, 从而抑制肝癌细胞系 EHBH-H1 的增殖活性, 其效果与病毒感染强度密切相关。双靶向 shRNA 载体对肝癌细胞生长的抑制作用, 明显强于单一靶向的 shRNA 载体。研究中发现, *Oct4*-shRNA 可引起 *Survivin* 表达抑制, 这与我们先前的实验相一致, 证实 *Oct-4* 是 *Survivin* 的上游调控因子^[14]。在 EHBH-H1 裸鼠移植瘤的实验中, 我们进一步证实了针对 *Oct-4* 和 *Survivin* 的双特异性 shRNA 载体能够沉默 *Oct-4* 与 *Survivin* 的表达, 明显抑制移植瘤的生长。而单一抑制 *Survivin* 的表达, 对移植瘤的抑制效果和维持时间均十分有限, 停止治疗后移植瘤出现恢复性生长的现象。单一抑制 *Oct-4* 的表达, 疗效好于 *Survivin* 特异性 shRNA 载体。

综上所述, 我们构建的针对 *Oct-4* 和 *Survivin* 的双靶向特异性腺病毒载体, 不仅能够有效抑制

目的基因的表达, 而且能在体内、体外抑制肝癌细胞的增殖活性和裸鼠移植瘤的生长, 发挥出良好的抗肿瘤效果。实验证明, 双靶向 shRNA 表达载体在肿瘤基因治疗中具有更好的优势。而且, 在抑制癌细胞 *Survivin* 表达控制细胞生长的同时, 敲除 *Oct-4* 的表达有可能进一步抑制具有肿瘤干细胞特性的细胞的增殖。

REFERENCES

- [1] Qin LX, Sun HC, Tang ZY. Progress in research of primary hepatic carcinoma, The Summary of Shanghai-Hong Kong International Liver Congress. Chin J Surg, 2006, 44(15): 1070-1074. 钦伦秀, 孙惠川, 汤钊猷. 原发性肝癌研究进展-2006 沪港国际肝病大会纪要. 中华外科杂志, 2006, 44(15): 1070-1074.
- [2] Shariff MI, Cox IJ, Goma AI, et al. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis and therapeutics. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2009, 3(4): 353-367.
- [3] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [4] LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, et al. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. Oncogene, 1998, 17(25): 3247-3259.
- [5] Ryan BM, O'Donovan N, Duffy MJ. Survivin: a new target for anti-cancer therapy. Cancer Treat Rev, 2009, 35(7): 553-562.
- [6] Tan GC, Norlatiffah S, Sharifah NA, et al. Immunohistochemical study of p16^{INK4A} and survivin expressions in cervical squamous neoplasm. Indian J Pathol Microbiol, 2010, 53(1): 1-6.
- [7] Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions. J Cell Mol Med, 2005, 9(2): 360-372.
- [8] Pennati M, Folini M, Zaffaroni N. Targeting

- survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions. *Carcinogenesis*, 2007, 28(6): 1133–1139.
- [9] Qiao L, Wong BCY. Targeting apoptosis as an approach for gastrointestinal cancer therapy. *Drug Resist Updat*, 2009, 12(3): 55–64.
- [10] Hansis C, Grifo JA, Krey LC. Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. *Mol Hum Reprod*, 2000, 6(11): 999–1004.
- [11] Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*, 2003, 22(53): 8581–8589.
- [12] Guo Y, Mantel C, Hromas RA, et al. Oct-4 is critical for survival/antiapoptosis of murine embryonic stem cells subjected to stress: effects associated with Stat3/survivin. *Stem Cells*, 2008, 26(1): 30–34.
- [13] Lau SK, Chang KL. OCT4: a sensitive and specific immunohistochemical marker for metastatic germ cell tumors. *Adv Anat Pathol*, 2006, 13(2): 76–79.
- [14] Wang DM, Liu C, Jiang XQ, et al. Expression of Oct-4 transcriptional factor regulates the anti-apoptosis effect of Survivin in hepatobiliary cancer cells. *Chin J Cell Biol*, 2010, 32(5): 709–713. 王端明, 刘辰, 姜小清, 等. 肝胆肿瘤细胞转录因子 Oct-4 的表达对 Survivin 抗凋亡作用的调控. *中国细胞生物学学报*, 2010, 32(5): 709–713.
- [15] Rissland OS, Lai EC. RNA silencing in Monterey. *Development*, 2011, 138(15): 3093–3102.
- [16] Hendruschk S, Wiedemuth R, Aigner A, et al. RNA interference targeting survivin exerts antitumoral effects *in vitro* and in established glioma xenografts *in vivo*. *Neuro Oncol*, 2011, 13(10): 1074–1089.
- [17] Jiang C, Tan T, Yi XP, et al. Lentivirus-mediated shRNA targeting XIAP and survivin inhibit SW1990 pancreatic cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Mol Med Report*, 2011, 4(4): 667–674.
- [18] Seth S, Matsui Y, Fosnaugh K, et al. RNAi-based therapeutics targeting survivin and PLK1 for treatment of bladder cancer. *Mol Ther*, 2011, 19(5): 928–935.