



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.01.011
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.01.011
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(1):57-62.

· 基础研究 ·

KDR 启动子驱动的 CD/TK 双自杀基因联合 survivin 基因干扰抑制肝癌细胞生长的体内研究

杨六成, 吴凯, 黄宗海, 徐帅, 王健俊, 赵海军

(南方医科大学珠江医院 普通外科, 广东 广州 510282)

摘要

目的: 探讨腺病毒介导的 KDR 启动子驱动的 CD/TK 双自杀基因系统 (Ad-KDRP-CD/TK) 联合 survivin 基因干扰对肝癌细胞在裸鼠体内生长的抑制作用。

方法: 将 20 只裸鼠随机分为模型组 (皮下植入 BEL-7402 肝癌细胞成瘤, 不加任何处理)、双自杀基因转染组 (皮下植入转染 Ad-KDRP-CD/TK 的 BEL-7402 细胞, 成瘤后瘤内注射前药更昔洛韦与 5-氟胞嘧啶)、survivin siRNA 转染组 (皮下注射 BEL-7402 肝癌细胞, 成瘤后瘤内注射 survivin siRNA/Lip-DMEM 转染混合物)、联合转染组 (双自杀基因转染 +survivin siRNA 转染处理)。治疗 2 周后处死各组小鼠, 称取肿瘤质量, 计算肿瘤抑制率, 检测瘤组织微血管密度 (MVD) 及 survivin mRNA 与蛋白表达。

结果: 各治疗组的肿瘤质量明显小于模型组 (均 $P < 0.05$), 且联合转染组的抑瘤率最大 (均 $P < 0.05$); 肿瘤组织 MVD、survivin mRNA 与蛋白水平均明显降低, 且联合转染组的降低程度最为明显 (均 $P < 0.05$)。

结论: 双自杀基因联合 survivin 干扰是抑制鼠肝癌细胞在体内生长的有效途径。

关键词

癌, 肝细胞; 基因, 转基因, 自杀; RNA 干扰; 小鼠, 裸
中图分类号: R735.7

Double suicide gene system driven by KDR promoter combined with survivin gene interference on inhibiting the growth of hepatocellular carcinoma cells in vivo

YANG Liucheng, WU Kai, HUANG Zonghai, XU Shuai, WANG Jianjun, ZHAO Haijun

(Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China)

Abstract

Objective: The investigate the inhibitory effect of the adenovirus-mediated CD/TK double suicide gene system driven by KDR promoter (Ad-KDRP-CD/TK) combined with survivin gene interference on the growth of hepatocellular carcinoma (HCC) cells in nude mice.

Methods: Twenty nude mice were equally randomized into model group (subcutaneous implantation of HCC BEL-7402 cells to establish xenograft tumor without other additional treatment), double suicide gene transfection group (subcutaneous implantation of BEL-7402 cells transfected with Ad-KDRP-CD/TK, followed by intratumor injection with the prodrug ganciclovir and 5-fluorocytosine after tumor formation), survivin siRNA transfection

收稿日期: 2014-11-03; 修订日期: 2014-12-20。

作者简介: 杨六成, 南方医科大学珠江医院主任医师, 主要从事消化道肿瘤基础与临床方面的研究。

通信作者: 吴凯, Email: aibeike@126.com

group (subcutaneous implantation of BEL-7402 cells, followed by intratumor injection with survivin siRNA/Lip-DMEM transfection complex after tumor formation), and combination transfection group (double suicide gene transfection plus survivin siRNA transfection). Two weeks after transfection treatment, mice in each group were sacrificed, tumor weight and tumor inhibition rate were measured, the microvessel density (MVD), and survivin mRNA and protein expressions in the tumor tissues were determined.

Results: In each treatment group compared with model group, the tumor weight was significantly reduced, with the maximum tumor inhibition in combination transfection group (all $P < 0.05$); the MVD, and the expression levels of survivin mRNA and protein were significantly decreased, with the maximum decreasing amplitude in combination transfection group (all $P < 0.05$).

Conclusion: Double suicide gene combined with survivin gene interference is an effective method to inhibit the growth of HCC cells in vivo.

Key words Carcinoma, Hepatocellular; Genes, Transgenic, Suicide; RNA Interference; Mice, Nude

CLC number: R735.7

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一，尽管近年来疗效有所提高，但总体预后欠佳。基因治疗带来了新的曙光^[1]。联合使用多种基因治疗较单一基因治疗可起到更好的疗效。血管内皮细胞生长因子受体又称激酶功能区受体 (kinase domain insert containing receptor, KDR) 高表达于肿瘤血管内皮细胞及多数肿瘤细胞内而在正常细胞中不表达。双自杀基因通过将毒性较低的前药在体内转化为化疗药可以最大限度降低药物的毒副作用，目前以大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因 (cytosine deaminase, CD) /5-氟胞嘧啶 (5-fluorocytosine, 5-FC) 和 I 型单纯疱疹病毒胸苷激酶 (type I herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK) /更昔洛韦 (ganciclovir, GCV) 治疗系统最为常用。以 KDR 启动子驱动双自杀基因，可使自杀基因在肿瘤血管内皮细胞及肿瘤细胞中特异性表达，起到靶向杀伤肿瘤细胞的作用，体外实验证实其可以明显的抑制肝癌细胞的生长^[2-3]。survivin 基因在肝癌中明显高表达^[4]，而抗 survivin 是一种有效的抑制肿瘤的策略^[5-6]。本研究联合应用双自杀基因腺病毒联合 RNA 干扰技术，观察其对肝癌裸鼠肿瘤生长及血管形成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

重组腺病毒质粒 Ad-KDRP-CD/TK 为珠江医院普外科构建，survivin siRNA 由广州锐博生物技术有限公司合成 (正义链为 5'-CAA AGG AAA

CCA ACA AUA AdTdT-3'; 反义链为 3'-dTdT GUU UCC UUU GGU UGU UAU U-5')，BEL-7402 肝癌细胞株及 BALB/C-nu 裸鼠 (4~6 周龄，体质量 14~18 g) 购自中山大学动物实验中心。TRIzol 及 Lipofectmain™2000 为美国 Invitrogen 公司产品，SP 免疫组化超敏试剂盒购自迈新生物技术公司，DAB 显色试剂盒为北京中杉金桥公司产品，RT-PCR 试剂盒为美国 Fermentas 公司产品，PCR 引物由深圳华大基因有限公司合成，BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究，兔抗 survivin 一抗购自武汉博士德生物工程有限公司，羊抗兔 IgG/HRP 二抗购自北京中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 BEL-7402 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中，于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养，每 2~3 天传代 1 次，实验取对数生长期细胞。

1.2.2 重组腺病毒的包装、扩增与纯化、滴度测定及鉴定 重组腺病毒质粒 Ad-KDRP-CDglyTK 在 293 细胞中包装成病毒，并在 293 细胞内扩增，当 293 细胞 70%~90% 融合时，加入病毒，当细胞 90% 以上形成细胞病变效应时收集细胞，应用氯化铯梯度离心法纯化病毒。通过荧光显微镜下 293 细胞中绿色荧光蛋白 (GFP) 的表达观察重组病毒的包装与复制，并以 PCR 方法鉴定重组腺病毒，详见参考文献^[7]。

1.2.3 裸鼠移植瘤模型的建立与治疗 选择 20 只 BALB/C-nu 裸鼠，随机均分为 4 组：(1) 模型组，注射 BEL-7402 细胞，不施加任何其他处理；(2) 双自

杀基因转染组,注射 Ad-KDRP-CD/TK 转染后 BEL-7402 细胞,成瘤后给予前药 5-FC 500 mg/(kg·d)、GCV 50 mg/(kg·d) 作用 2 周,每周 2 次;(3) survivin siRNA 转染组,注射未经病毒转染的 BEL-7402 细胞,成瘤后给予 50 nM survivin siRNA/Lip-DMEM 转染混合物 600 μ L,每周 2 次,共 2 周;(4) 联合转染组,双自杀基因转染,同时给予 survivin siRNA 转染。成瘤及给药方法:取 1.0×10^7 个/mL 的对数生长期的 BEL-7402 细胞悬液 0.5 mL,注射于裸鼠背部,第 3 天复种 1 次。肿瘤直径达到 0.5 cm 定为成瘤标准。药物采用瘤体内多点注射。

1.2.4 肿瘤生长情况观察 自瘤体内注射之日起,每 3 天以游标卡尺测量各组瘤体大小,按公式计算瘤体体积:瘤体体积 $V(\text{mm}^3) = \pi \times a \times b^2/6$ (a : 长径, b : 短径)。注射结束后 5 d 处死裸鼠,再次测量各组瘤体大小并计算瘤体体积。剥离瘤体测瘤重,计算肿瘤生长抑制率:肿瘤生长抑制率 = $(1 - \text{处理组瘤重} / \text{空白模型组瘤重}) \times 100\%$ 。

1.2.5 微血管密度的免疫组化检测 肿瘤标本常规 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋后切片,免疫组化染色检测 CD34 的表达,观察计数肿瘤组织微血管密度 (microvessel density, MVD),用已知阳性切片作阳性对照, PBS 代替一抗作阴性对照。采用 Weidner^[8] 报道的方法进行 MVD 计数,40 倍显微镜下选择微血管最密集的 5 个区域,200 倍镜下计数血管数,取平均值。

1.2.6 RT-PCR 法检测各组瘤细胞 survivin mRNA 表达 TRIzol Reagent 试剂盒提取肿瘤组织中总 RNA,按逆转录试剂盒说明合成逆转录 cDNA,应用 survivin 基因的上下游引物进行 PCR。扩增条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,1 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min,30 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下摄影、拍照。

1.2.7 Western blot 法检测瘤细胞 survivin 蛋白表达 取 4 组肿瘤组织 100 mg,剪成碎块,加入细胞裂解液 500 μ L 在冰浴中匀浆多次,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 25 min 后取上清与电泳上样缓冲液按 1:1 的比例混合在 EP 管中。BCA 试剂盒计算蛋白浓度,取 40 μ g 蛋白经 12%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,常规湿法转膜后,封闭液封闭过夜,1:400 兔抗人 survivin 抗体摇床孵育过夜,1:2 500 羊抗兔 IgG/HRP 二抗室温孵育 1.5 h,加入 ECL 工作液,常规显影和定影,

凝胶成像系统对蛋白条带进行处理。

1.3 统计学处理

数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件进行处理,采用单因素方差分析 (组间多重比较应用 LSD 法)。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 荷瘤鼠肿瘤生长情况

在治疗过程中,各组裸鼠食欲、精神状态及皮肤色泽均无改变。治疗开始前,4 组间初始瘤体积差异无统计学意义 ($F = 0.257, P = 0.855$);治疗结束后,各治疗组肿瘤质量明显小于模型组 (均 $P < 0.05$);其中联合转染组的抑瘤率明显大于双自杀基因转染组与 survivin siRNA 转染组 (均 $P < 0.05$);但后两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 肿瘤质量和抑瘤率比较

Table 1 Comparison of the tumor weight and tumor inhibition rate

组别	肿瘤重量 (mg)	抑瘤率 (%)
模型组	749.56 \pm 60.18	—
双自杀基因转染组	262.27 \pm 32.51 ¹⁾	65.95 \pm 5.67
surviving siRNA 转染组	246.61 \pm 30.66 ¹⁾	68.23 \pm 6.82
联合转染组	90.92 \pm 25.28 ^{1),2),3)}	88.09 \pm 1.34 ^{2),3)}
<i>F</i>	260.542	27.648
<i>P</i>	0.000	0.000

注: 1) 与模型组比较, $P < 0.05$; 2) 双自杀基因转染组比较, $P < 0.05$; 3) 与 survivin siRNA 转染组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. model group; 2) $P < 0.05$ vs. double suicide gene transfection group; 3) $P < 0.05$ vs. surviving siRNA transfection group

2.2 MVD 检测

抗 CD34 抗体免疫组化染色显示,各组肿瘤组织内均可见到血管内皮细胞内的胞浆呈棕黄色或黄色的阳性表达 (图 1)。模型组、双自杀基因转染组、surviving siRNA 转染组、联合转染组的 MVD 值分别为: 26.19 ± 3.55 、 12.94 ± 2.62 、 10.62 ± 2.55 、 7.12 ± 1.91 ,经单因素方差分析,各组间 MVD 表达存在统计学差异 ($F = 46.928, P = 0.000$);联合转染组 MVD 最小,与双自杀基因转染组、surviving siRNA 转染组比较,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$);但后两组间差异无统

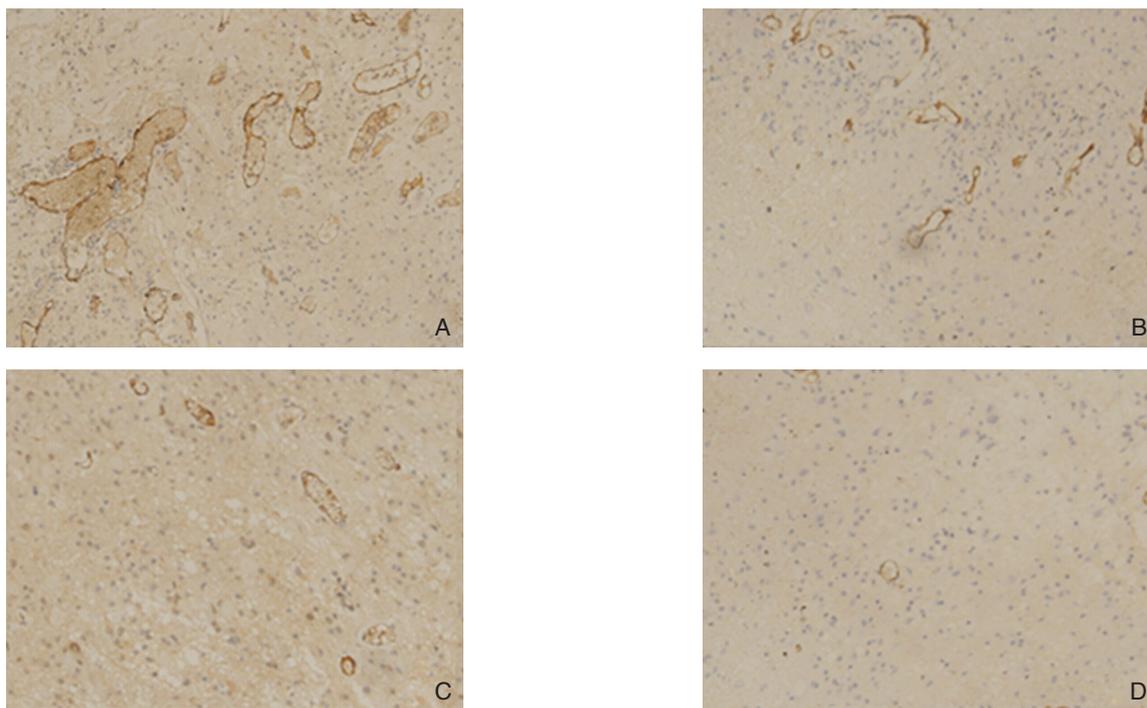


图 1 免疫组化检测 CD34 表达 (×200) A: 模型组; B: 双自杀基因转染组; C: survivin siRNA 转染组; D 联合转染组
Figure 1 Immunohistochemical staining for CD34 expression (×200) A: Model group; B: Double suicide gene transfection group;
 C: Survivin siRNA transfection group; D: Combination transfection group

计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 移植瘤组织 survivin mRNA 的表达

RT-PCR 检测结果显示, survivin mRNA 在模型组移植瘤中高度表达 (65.18 ± 5.19), 各处理组的 survivin mRNA 的表达量较模型组明显减少, 差异具有统计学意义 ($F=121.825, P=0.000$); 联合转染组表达量最低 (21.07 ± 3.58), 与双自杀基因转染组 (57.24 ± 4.90) 及 survivin siRNA 转染组 (25.13 ± 3.75) 比较, 差异有统计学意义 (均 $P<0.05$) (图 2)。

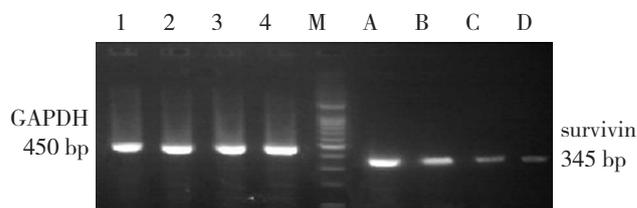


图 2 植瘤组织 survivin mRNA 的表达 1-4: GAPDH; M: 分子量标记; A: 模型组; B: 双自杀基因转染组; C: survivin siRNA 转染组; D: 联合转染组

Figure 2 Survivin mRNA expression in tumor tissues 1-4: GAPDH; M: Marker; A: Model group; B: Double suicide gene transfection group; C: Survivin siRNA transfection group; D: Combination transfection group

2.4 移植瘤组织 survivin 蛋白表达

Western blot结果显示, survivin蛋白在模型组移植瘤中高度表达 (77.60 ± 8.69), 各处理组的survivin蛋白的表达量较模型组明显减少, 差异具有统计学意义 ($F=80.964, P=0.000$); 联合转染组表达量最低 (23.24 ± 4.60), 与双自杀基因转染组 (67.05 ± 7.57) 及survivin siRNA转染组 (29.41 ± 5.13) 比较, 差异有统计学意义 (均 $P<0.05$)。

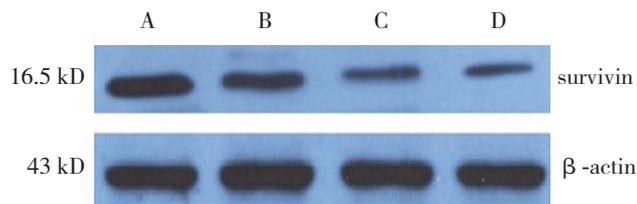


图3 移植瘤组织 survivin 蛋白的表达 A: 模型组; B: 双自杀基因转染组; C: survivin siRNA 转染组; D: 联合转染组

Figure 3 Survivin protein expression o in tumor tissues A: Model group; B: Double suicide gene transfection group; C: Survivin siRNA transfection group; D: Combination transfection group

3 讨论

肝癌是一种高度恶性肿瘤, 基因治疗是一种有效的肿瘤治疗方式^[9-10]。尽管单一治疗可以取得一定的疗效, 联合基因治疗可以取得更好的治疗效果, 常见的有: (1) 同类基因联合应用: 如双自杀基因联合应用, 其中最为常用的是CD/5-FC和TK/GCV两个自杀基因体系^[11], 由于TK局部杀伤作用强, 而CD旁观者效应好, 两者联合应用能优势互补, 提高疗效, 在对乳腺癌、胃癌、肝癌等治疗中取得了显著的疗效^[12-13]。笔者过往的研究^[14]亦证明两者联合可抑制体外肝癌细胞及血管内皮细胞的生长, 本研究进一步验证了联合治疗对肝癌动物模型的作用。(2) 不同类型的基因联合应用: 如Kim等^[15]联合应用自杀基因CD/5-FC和免疫基因IL-18在肝肿瘤取得了良好治疗效果。而采用单核细胞趋化蛋白1与HSV-TK系统相结合可提高对荷肝癌小鼠治疗的免疫杀伤作用^[16]。

自杀基因可直接或通过旁观效应发挥杀伤肿瘤的作用, 是肿瘤治疗的一种重要策略^[17]。然而其存在转导效率低等缺点, 寻找靶点以提高转染

效率显得尤为重要。血管内皮生长因子在肿瘤细胞及血管内皮细胞的增殖过程中起着重要作用, 而其必须与KDR结合方能发挥作用, KDR高表达于肿瘤血管内皮细胞及多数肿瘤细胞而在正常细胞中不表达^[18]。以KDR启动子驱动双自杀基因, 可使自杀基因具有更好的靶向性^[2]。

survivin基因是最小的凋亡抑制蛋白和最强的凋亡抑制因子, 其表达于大多数的肿瘤组织中, 而在正常的组织并不表达^[19]。肝癌细胞及血管内皮细胞中survivin基因亦呈高表达状态, 并且与肝癌转移和预后有密切关系^[20]。而抑制survivin基因的表达能够促进肿瘤细胞凋亡^[21]。笔者^[22]在前期体外研究中发现针对survivin siRNA对肝癌BEL-7402细胞具有明显抑制作用。本实验联合应用survivin siRNA及双自杀基因两种治疗方式观察其对裸鼠肝癌模型的作用。结果表明各组荷瘤裸鼠接受治疗后, 均能耐受药物, 而两种治疗方式均明显抑制肿瘤的生长, 联合用药发挥了更强的治疗效果。

抗血管生成被认为是一种重要的肿瘤治疗措施。而KDR及survivin基因均在肿瘤血管内皮细胞中明显高表达, 理论上降低两种基因表达可以抑制肿瘤新生血管的形成。本实验证实了survivin siRNA及双自杀基因可抑制肿瘤血管生成, 两者联合作用效果更明显。

双自杀基因可以通过多个途径发挥抑瘤作用, 本实验主要探讨了两种治疗对survivin基因表达及蛋白的影响。结果表明survivin siRNA可以明显的降低survivin基因表达及蛋白含量。而双自杀基因作用后survivin基因表达及蛋白含量亦有下降, 其可能与p53积聚及调节免疫机制、细胞信号传导、Bcl-2以及其它基因等有关^[23-24], 但其抑制的具体机制仍有待进一步实验证实。

综上所述, 本实验研究结果表明双自杀基因及survivin siRNA均可明显的抑制裸鼠肝癌细胞生长, 而联合用药发挥着更强的抑瘤作用。本实验从体内实验进一步验证了肝癌联合基因治疗的可行性, 为联合基因治疗进一步应用于临床提供了良好的实验基础。

参考文献

- [1] Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J, Edelstein RM. Gene therapy

- clinical trials worldwide 1989-2004-an overview[J]. *J Gene Med*, 2004, 6(6):597-602.
- [2] Jia W, Mei L, Wang Y, et al. Double suicide genes selectively kill human umbilical vein endothelial cells[J]. *Virology Journal*, 2011, 8:74.
- [3] Ma J, Li M, Mei L, et al. Double suicide genes driven by kinase domain insert containing receptor promoter selectively kill human lung cancer cells [J]. *Genet Vaccines Ther*, 2011, 9:6. doi: 10.1186/1479-0556-9-6.
- [4] Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer[J]. *Oncogene*, 2003, 22(53):8581-8589.
- [5] Uchida H, Tanaka T, Sasaki K, et al. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin induced apoptosis and attenuated tumor cell growth in vitro and in vivo[J]. *Mol Ther*, 2004, 10(1):162-171.
- [6] Kawamura K, Yu L, Tomizawa M, et al. Transcriptional regulatory regions of the survivin gene activate an exogenous suicide gene in human tumors and enhance the sensitivity to a prodrug[J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(1A):89-94.
- [7] 汤福祥, 郑权, 黄宗海, 等. 应用改进的AdEasy系统制备重组腺病毒[J]. *第一军医大学学报*, 2003, 23(5):501-503.
- [8] Weidner N. Chapter 14. Measuring intratumoral microvessel density[J]. *Methods Enzymol*, 2008, 444:305-323.
- [9] Taieb J, Barbare JC, Boussaha T, et al. Management of hepatocellular carcinoma. Where are we now? What's next?[J]. *Bull Cancer*, 2009, 96(1):19-34.
- [10] Kim HA, Nam K, Lee M, et al. Hypoxia/hepatoma dual specific suicide gene expression plasmid delivery using bio-reducible polymer for hepatocellular carcinoma therapy[J]. *J Control Release*, 2013, 171(1):1-10.
- [11] Fogar P, Greco E, Basso D, et al. Killer genes in pancreatic cancer therapy [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2005, 51(1): 61-76.
- [12] Su GQ, Su G, Huang ZH. Adenovirus-mediated tissue-targeted expression of the CDglyTk gene for the treatment of breast cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(2): 321-329.
- [13] Qiu Y, Peng GL, Liu QC, Li FL, Zou XS, He JX. Selective killing of lung cancer cells using carcinoembryonic antigen promoter and double suicide genes, thymidine kinase and cytosine deaminase (pCEA-TK/CD)[J]. *Cancer Lett*, 2012, 316(1): 31-38.
- [14] 杨六成, 黄宗海, 孔恒, 等. KDR启动子驱动的双自杀基因对人肝癌细胞及脐静脉内皮细胞的特异性杀伤作用[J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29(1):1-4.
- [15] Kim D, Rossi J. RNA mechanisms and applications[J]. *Biotechniques*, 2008, 44(5): 613-616.
- [16] Marukawa Y, Nakamoto Y, Kakinoki K, et al. Membrane-bound form of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy in a model of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Gene Ther*, 2012, 19(5):312-319.
- [17] Qiang L, Yanping L, Zonghai H, et al. Study of the mechanism of bystander effect of KDR-CDglyTK system mediated by adenovirus for the treatment of gastric cancer[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 67(3):1021-1027.
- [18] 常实, 汤恢煥, 龚学军, 等. 原发性肝癌组织VEGF与外周血AFP mRNA检测的临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(3):205-208.
- [19] Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(5):1087-1098.
- [20] Yamamoto H, Ngan CY, Monden M. Cancer cells survive with surviving[J]. *Cancer Sci*, 2008, 99:1709-1714.
- [21] Pennati M, Folini M, Zaffaroni N. Targeting survivin in cancer therapy [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2008, 12(4):463-476.
- [22] 杨六成, 黄宗海, 孔恒, 等. Survivin siRNA 对肝癌细胞BEL-7402的增殖及对Survivin 基因及蛋白表达的作用[J]. *陕西医学杂志*, 2009, 38(5):546-549.
- [23] Tomicic MT, Friedrichs C, Christmann M, et al. Apoptosis induced by (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine in varicella zoster virus thymidine kinase-expressing cells is driven by activation of c-Jun/activator protein-1 and Fas ligand/caspase-8[J]. *Mol Pharmacol*, 2003, 63(2):439-449.
- [24] Bertin S, Neves S, Gavelli A, et al. Cellular and molecular events associated with the antitumor response induced by the cytosine deaminase/ 5-fluorocytosine suicide gene therapy system in a rat liver metastasis model[J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(10):858-866.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 杨六成, 吴凯, 黄宗海, 等. KDR启动子驱动的CD/TK双自杀基因联合survivin基因干扰抑制肝癌细胞生长的体内研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(1):57-62. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.01.011

Cite this article as: YANG LC, WU K, HUANG ZH, et al. Double suicide gene system driven by KDR promoter combined with survivin gene interference on inhibiting the growth of hepatocellular carcinoma cells in vivo[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(1):57-62. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.01.011