

· 基础研究 ·

MDM2 反义寡核苷酸联合紫杉醇对乳腺癌 MCF-7 细胞株的作用 *

田国梅 赵长久[△] 付 鹏 栾 厦 张月红 吴 琼

(哈尔滨医科大学附属第四医院核医学科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的 探讨靶向 MDM2 反义寡核苷酸(ASON)联合紫杉醇对乳腺癌 MCF-7 细胞株的影响。方法 合成一段与 MDM2 mRNA 特异性结合的反义寡核苷酸和与反义寡核苷酸有 4 个碱基不同的错义寡核苷酸(MON),脂质体 2000 介导不同浓度的 MDM2 ASON 转染 MCF-7 乳腺癌细胞系,转染的乳腺癌细胞通过 1 $\mu\text{mol/L}$ 紫杉醇药物处理后,采用 RT-PCR 和 Western Blot 方法检测 MDM2 ASON 联合紫杉醇的协同作用及对乳腺癌 MCF-7 细胞株的抑制效率,MTT 观察给药后 MCF-7 细胞的增殖能力和药物敏感性。结果 MDM2 反义寡核苷酸联合紫杉醇明显下调 MDM2 mRNA 及 MDM2 蛋白表达水平,抑制 MCF-7 细胞的生长,随着 MDM2 ASON 浓度的增加,MDM2 表达越来越低,协同作用越来越强,呈剂量依赖关系,A500 联合紫杉醇的协同作用最明显,MTT 显示紫杉醇处理的转染 MCF-7 细胞增殖抑制率明显增高,A500 抑制增殖作用最明显,抑制率达(13.0 $\pm$ 0.84)%。结论 不同浓度 MDM2 ASON 转染后的乳腺癌 MCF-7 细胞,等浓度紫杉醇处理后,乳腺癌 MCF-7 细胞 MDM2 表达明显降低,细胞凋亡增加,MDM2 ASON 联合紫杉醇对 MCF-7 细胞有协同作用,提高了乳腺癌 MCF-7 细胞对紫杉醇的药物敏感性。

关键词 MDM2 基因;反义寡核苷酸;紫杉醇;乳腺癌 MCF-7 细胞

中图分类号 R737.9 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)25-4801-04

Effects of MDM2 Antisense Oligonucleotide Combined with Paclitaxel on Human Breast Cancer Cells MCF-7*

TIAN Guo-mei, ZHAO Chang-jiu[△], FU Peng, LUAN Xia, ZHANG Yue-hong, WU Qiong

(Department of Nuclear Medicine, Harbin Medical University Affiliated to the Fourth Hospital, Harbin, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of the MDM2 antisense oligonucleotide (ASON) combined with Paclitaxel on human breast cancer cells MCF-7. **Methods:** The synthesis of antisense oligonucleotides specific binding of MDM2 mRNA and missense oligonucleotides(MON) different from four bases, different concentrations of MDM2 ASON mediated by Lipofectamine 2000 transfected MCF-7 breast cancer cell lines, breast cancer cells transfected by 1 $\mu\text{mol/L}$ paclitaxel treatment. The expression of MDM2 mRNA and protein was determined by RT-PCR and Western blotting, To detect synergies of MDM2 ASON combined with paclitaxel and the inhibition efficiency of breast cancer cells MCF-7, the proliferation of MCF-7 cell to paclitaxel and chemosensitivity were observed by MTT assay. **Results:** The antisense oligonucleotide combined with Paclitaxel efficiently down-regulated MDM2 mRNA and protein expression, inhibit the growth of MCF-7 cells. MDM2 expression was getting lower and lower with the increase of the concentration of MDM2 ASON growing in a dose dependent relationship, the synergy of the A500 combined with paclitaxel was the most obvious. MTT showed that proliferation inhibition rate of MCF-7 cell transfected to paclitaxel increased significantly, A500 was the most significant effect, inhibition rate was (13.0 $\pm$ 0.84)%. **Conclusion:** Human breast cancer cell MCF-7 transfected was treated by a concentration of paclitaxel, MDM2 expression was significantly decreased, increased apoptosis, MDM2 ASON combined with paclitaxel on MCF-7 cells had a synergistic effect, improved the sensitivity of breast cancer MCF-7 cells to paclitaxel.

Key words: MDM2 Gene; Antisense Oligonucleotide; Paclitaxel; Breast Cancer Cell Line MCF-7

Chinese Library Classification: R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)25-4801-04

前言

乳腺癌占女性所有肿瘤的 18%,治疗后复发转移的患者约占 50%。随着发病率逐年不断地升高,已成为危害女性健康的主要恶性肿瘤。目前,乳腺癌的治疗趋向于多种手段的联合使用,其中基因治疗是近年来研究的热点,乳腺癌耐药是导致

化疗失败的主要原因,如何提高药物的敏感性已成为迫切需要解决的问题。癌基因 MDM2(小鼠双微体扩增基因)是 Cahilly 等在 1987 年从转化小鼠细胞系的双微染色体上基因扩增中发现的一个基因,在鼠和人的很多组织中都有表达^[1]。近年来研究认为 MDM2 高度表达与形成肿瘤有关^[2,3],已证实 MDM2 基因是一种癌基因,与多种肿瘤的发生、增殖及侵袭有关^[4-6]。本实验

* 基金项目 国家自然科学基金(81171362)

作者简介:田国梅(1982-),女,硕士,住院医师,主要研究方向:反义寡核苷酸

基因显像研究 电话:13895754241 E-mail:guomeitian@yahoo.cn

[△]通讯作者 赵长久 E-mail:changjiu-zhao@163.com

(收稿日期 2012-03-14 接受日期 2012-04-07)

依据乳腺癌高表达 MDM2 基因和反义寡核苷酸(ASON)与目的基因特异性结合并抑制其表达的特点,针对 MDM2 基因合成一段 ASON 和 MON,转染乳腺癌细胞后,给予紫杉醇处理,以研究 ASON 及紫杉醇对乳腺癌细胞株的作用,探讨乳腺癌治疗的新途径。

1 材料与方法

1.1 实验仪器及试剂

1.1.1 实验仪器 二氧化碳培养箱(HF240)由上海力申科技仪器有限公司提供;PCR 仪(MyCycler™ Thermal Cycler)由美国 Authorized Thermal Cycler 公司提供;水平摇床由太仓市实验设备厂提供;超速低温离心机(TGL-16M)由长沙湘仪公司提供;聚丙烯酰胺凝胶电泳转膜装置由上海天能生物公司提供。

1.1.2 实验试剂 乳腺癌细胞株 MCF-7;哈尔滨医科大学肿瘤研究所提供。反义寡核苷酸、错义寡核苷酸及引物由上海生工合成;小牛血清由 Sigma 公司提供;脂质体 2000 由美国 Invitrogen 公司提供;抗 MDM2 单克隆抗体(鼠抗人)美国 SANTA 公司提供;Trizol 试剂、dNTPs、DNA Marker (DL2000) 由大连 TaKaRa 公司提供。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 MCF-7 细胞培养 加入 10%胎牛血清的 RPMI-1640(青霉素 100 U/mL 链霉素 100 μg/mL) 吸管轻轻吹打成细胞悬液后,放入细胞培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 的饱和湿度条件下培养,隔天换液,2~3 d 传代,实验采用对数生长期细胞。

1.2.2 反义、错义寡核苷酸转染 反义、错义寡核苷酸行全硫代修饰,5'端氨基与骨架之间以直链的己基(CH₂)₆ 连接。反义序列 ASON 5'-GATCACTCCACCTTCAAGG3', 错义序列 MON 5'-GATGACTCACACCATCATGG3',实验取对数生长期细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化,吹打成细胞悬液,每孔 4×10⁶ 个细胞接种于 6 孔板内,加 2000 μL 培养液,置于 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,密度达到 80%用于实验。取 10 μL 脂质体 2000 与 490 μL 无血清 RPMI-1640 培养液混合 5 分钟;16.4 μL (10 μg)反义、错义 MDM2 与 483.6 μL 无血清 RPMI-1640 培养液混合 5 分钟,然后两者混合二十分钟后备用,把脂质体 2000 包裹的反义探针及错义探针加入到铺好的乳腺癌细胞的 6 孔板中,反义探针分别设 100、200、500 nmol/L 组,错义探针设 500 nmol/L 组,正常对照组及脂质体组 6 组,每个浓度级设 5 个孔。培养 6 h 后,换 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,培养 24 h 收集细胞用于实验。

1.2.3 紫杉醇对转染细胞 MDM2 mRNA 表达的影响 将转染各组、正常细胞组及脂质体组 24 h 后存活的细胞分别吹打成单细胞悬液,接种密度为 4×10⁵/孔分别接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后,给予 1 μmol/L 浓度的紫杉醇培养 24 h,不加药组为对照组,收集细胞,通过 RT-PCR 检测各组 MDM2 mRNA 的表达水平,实验重复 5 次。MDM2 上游引物序列 5'-AAGAC-TATTCTCAGCCATCA3' 下游引物序列 5'-CAT-ACTGGGACAGGCATT3' GAPDH 上游引物序列 5'-GGT-GAAGGTCGGAGTCAACGG3' 下游引物序列 5'-CCTGGAA-GATGGTGATGGGATT3' MDM2 扩增片段 259 bp, GAPDH 扩增片段 186 bp。用 Trizol 提取细胞总 RNA,PCR 反应条件:95

℃ 5 min→94℃ 30 s→51℃ 30 s→72℃ 30 s→72℃ 7 min。PCR 产物用含溴化乙锭(EB)的 2%琼脂糖凝胶电泳观察结果并拍照。

1.2.4 紫杉醇对转染细胞 MDM2 蛋白表达的影响 依次加入 200 μL 细胞裂解液,5 μL 蛋白酶,5 μL RNA 酶,1.5 μL DNA 酶提取细胞总蛋白,配制 10%的分离胶,30%聚丙烯酰胺凝胶电泳后,半干转将蛋白转移到 PVDF 膜,0.5 g 脱脂牛奶溶液中过夜,依次加入一抗 1:800(鼠抗人)和二抗 1:1000(羊抗鼠),加入显色剂后观察结果,用凝胶成像分析系统进行灰度分析。

1.2.5 MTT 法检测细胞的增殖能力 转染 24 h 后的 6 组细胞,按 4×10⁴ 个/孔细胞接种于 96 孔板上,每组设 10 个复孔,周边加 PBS。细胞贴壁后,每组的 5 个复孔加入 1 μmol/L 浓度的紫杉醇,其余不加药作为对照组,培养 20 h 后,每孔加入浓度为 5 g/L 新鲜配制的 MTT 溶液 20 μL,4 h 后弃去上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,溶解震荡 10 min,酶标仪测定 490 nm 波长处的 OD 值。细胞生长抑制率(%)=(1-加药组平均 OD 值/空白对照组平均 OD 值)×100%,实验重复 5 次。

1.3 统计学处理

采用数值($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS13.0 统计软件处理,两组间计量资料比较采用两样本 t 检验,多组间计量资料比较采用方差分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ASON 联合紫杉醇对 MCF-7 细胞 MDM2 mRNA 表达的影响

紫杉醇处理后,空白对照组,脂质体组,错义组细胞 MDM2 mRNA 表达较强,组间无明显差异,A100 细胞 MDM2 mRNA 表达较弱,A200、A500 组细胞 MDM2 mRNA 表达明显下调,随着 ASON 浓度的增高 MDM2 mRNA 表达减弱,呈剂量依赖关系(图 1)。因此,MDM2 ASON 与紫杉醇联合有协同作用。

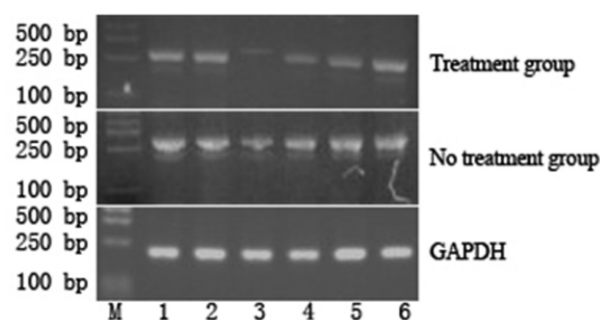


图 1 ASON 联合紫杉醇对 MCF-7 细胞 MDM2 mRNA 表达的影响

Fig.1 Expression of MDM2 mRNA treated by antisense oligonucleotide combined with Paclitaxel

1 空白组 2 脂质体组 3 反义组(500nmol/L) 4 反义组(200nmol/L); 5 反义组(100nmol/L) 6 错义组(500nmol/L)

LaneM:Marker;Lane1:Control;Lane2:Liposome;Lane3:A500;Lane4:A200; Lane5:A100;Lane6:M500

2.2 ASON 联合紫杉醇对 MCF-7 细胞 MDM2 蛋白表达的影响

空白组,脂质体组和错义组之间相比较无明显差别。与空

白组相比较 A100 A200 A500 不加药组细胞 MDM2 蛋白表达明显下调,差异有统计学意义($P < 0.01$);自身加药与不加药组比较,加药组 MDM2 蛋白表达显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),其中,随着 ASON 浓度的增加,MDM2 蛋白量表达减少越明显,给药组的反义组跟空白组差异有统计学意义($P < 0.01$)见图 2,可见 ASON 能够提高紫杉醇的药物疗效。

2.3 MTT 法检测细胞抑制率

ASON 转染细胞的生长抑制率 随着 ASON 浓度的增加抑制作用显著增高,A500 抑制率达 $(13.0 \pm 0.84)\%$,与空白对照组 $(1.11 \pm 0.19)\%$ 相比,差异有统计学意义($t = 30.80, P < 0.01$)。错义组 $(1.62 \pm 0.26)\%$ 和脂质体组 $(1.58 \pm 0.24)\%$ 与空白对照比,无明显差异,见表 1。

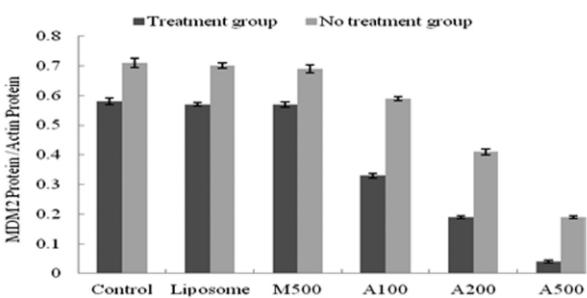


图 2 ASON 联合紫杉醇对 MCF-7 细胞 MDM2 蛋白表达的影响
Fig.2 Expression of MDM2 protein treated by antisense oligonucleotide combined with Paclitaxel

表 1 MTT 分析法检测 MCF-7 细胞的生长抑制率
Table 1 Growth inhibition rate of MCF-7 cell determined by MTT analytical method

Group	Repeat count	OD value	Growth inhibition rate of MCF-7 cell(%)
Control	5	1.26± 0.150	1.11± 0.19
Liposome cells	5	1.23± 0.130	1.58± 0.24
M500 cells	5	1.19± 0.120	1.62± 0.26
A100 cells	5	1.09± 0.108	4.27± 0.53
A200 cells	5	1.01± 0.101	7.50± 0.68
A500 cells	5	0.08± 0.092	13.0± 0.84

3 讨论

目前研究表明 MDM2 在体内最重要的功能被认为与多种肿瘤的发生、发展有关。MDM2 在许多肿瘤中过度表达,在 23% 的乳腺癌中有扩增,MDM2 联合 P53 可能有助于评估女性乳腺癌的危险性^[7]。化疗是乳腺癌治疗的重要方法,术前及术后化疗在治疗浸润性癌过程中尤为重要,术前化疗能使控制原发灶转移,缩小病灶及降低术后复发率,术后化疗能改善患者生活质量,提高生存率,因此如何提高药物化疗的疗效及降低副作用成为医学界备受关注的热点。

本实验我们所选择的 MDM2 反义寡核苷酸与 MDM2 基因能否特异性结合是成败的关键,在国内外研究中,利用 MDM2 mRNA 的反义寡核苷酸进行基因治疗已取得了显著效果,赵长久^[8]等对乳腺癌的反义核酸显像治疗进行研究,发现 ASON 能抑制 MDM2 mRNA 和蛋白表达,观察到了显著的肿瘤抑制效应。Wang 等^[9,10]对胶质细胞瘤和结肠癌的反义核酸治疗进行研究,发现 ASON 能抑制 MDM2 mRNA 表达,抑制肿瘤生长,与化疗药物的协同作用。彭志平等^[11]发现了 c-erbB2 反义寡核苷酸提高紫杉醇对乳腺癌 SK-Br-3 化疗敏感性,本研究选取的反义寡核苷酸已经证明能够与 MDM2 mRNA 特异性结合^[12],能够特异性抑制 MDM2 mRNA 的表达,本研究结果也证实了上述结果。

紫杉醇是红豆杉属植物中的一种复杂的次生代谢产物,是一种天然抗癌药物。1971 年 Wain 等^[13]通过射线分析确定了活

性成分的结构为复杂的二萜类化合物,一种四环二萜化合物,并证实了它为抗肿瘤作用的有效成份。本实验选紫杉醇有如下理由:(1)90 年代,紫杉类药物的问世是肿瘤化疗中一重要突破,研究表明紫杉类治疗乳腺癌效果较好^[14],代表药为紫杉醇、多西紫杉醇,开始用于乳腺癌术后辅助化疗。(2)2000 年,确定了紫杉醇在早期乳腺癌辅助治疗中的地位^[15],成为治疗复发转移乳腺癌的一线用药。(3)国外研究表明紫杉醇是治疗复发转移乳腺癌有效率的药物之一,紫杉醇加蒽环类药物是目前最有效的化疗方案。(4)单药和联合用药在晚期乳腺癌解救治疗中均显示很好的疗效,是最有效的药物之一。

乳腺癌化疗中紫杉醇虽有显著作用,但常造成呈剂量相关的毒副作用,如骨髓抑制,常见中性白细胞减少,贫血等,使其应用受到了局限。ASON 联合化疗药物能够产生协同作用^[16],减少化疗药物用量从而避免药物的毒副作用,是抗肿瘤治疗的新方向。但 ASON 与紫杉醇联合作用于乳腺癌是否有协同作用及能否通过减少紫杉醇药量而减少毒副作用的报道还少见。实验采用脂质体介导 MDM2 ASON 转染 MCF-7 乳腺癌细胞系,RT-PCR 和 Western Blot 方法检测其抑制效率,MTT 观察细胞的增殖能力,研究反义寡核苷酸对紫杉醇药物的协同作用及化疗敏感性,更进一步了解紫杉醇对乳腺癌治疗的重大意义,有望使它在治疗中发挥更大的作用。

本实验结果显示,MDM2 ASON 转染乳腺癌 MCF-7 细胞后,与空白、脂质体、错义对照组相比,不同浓度的寡核苷酸都能抑制体内 MDM2 基因的表达并且呈浓度依赖关系,在紫杉

醇药物处理后,MDM2 mRNA 和 MDM2 蛋白的表达下降要比未加药组更加明显,这表明 ASON 与紫杉醇联合具有协同效应,提高了紫杉醇对 MCF-7 细胞的化疗敏感性,细胞增殖抑制率明显提高,随着反义寡核苷酸浓度的增加,紫杉醇的抗肿瘤作用增加。目前,乳腺癌的综合治疗有多种手段,如:手术、放疗、化疗等,但肿瘤的本质是细胞无法控制的生长和过度的细胞异型性,有研究报道,ASON 可以干扰原癌基因表达,减缓了乳腺癌细胞的增殖、浸润和迁移^[17];抑癌基因导入乳腺癌细胞能促进凋亡,抑制增殖^[18,19];反义 RNA 技术与化疗相结合,能增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[20],因此,与单一手段相比较,基因治疗与化疗等传统手段相联合可能取得更好的疗效。本实验结果提示,MDM2 基因是一个肿瘤基因治疗可利用的靶点,通过 ASON 与 MDM2 基因特异性的结合,促进细胞凋亡,抑制细胞增殖,下调 MDM2 mRNA 和蛋白的表达,提高乳腺癌细胞对紫杉醇药物的敏感性,紫杉醇有望在乳腺癌治疗中发挥更大作用,地位更加突出,ASON 联合紫杉醇作用于乳腺癌 MCF-7 细胞,与单独紫杉醇作用相比较,起到了增敏作用,疗效明显增强,两者联合使用有望减少紫杉醇用药量,从而减轻毒副作用,使其治疗效果更加显著,但其联合用药在体内的疗效及毒副作用的评价还需进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Cahilly-Snyder L, Yang-Feng T, George DL. Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line [J]. *Somat Cell Mol Genet*, 1987, 13(3): 235-244
- [2] Bougeret C, Virone-Oddos A, Adeline E, et al. Cancer gene therapy mediated by CTS1, a p53 derivative: Advantage over wild-type p53 in growth inhibition of human tumors over expressing mdm2 [J]. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7(5):789-798
- [3] Lin J, Jin X, Page C, et al. A modified p53 overcomes mdm2-mediated oncogenic transformation: A potential cancer therapeutic agent [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(20):5895-5901
- [4] Horikawa Y, Nadaoka J, Saito M, et al. Clinical implications of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphisms in transitional cell carcinoma of the bladder [J]. *Oncology Reports*, 2008, 20:49-55
- [5] Cho YG, Choi BJ, Song JH, et al. No association of MDM2 T309G polymorphism with susceptibility to Korean gastric cancer patient [J]. *Neoplasma*, 2008, 55(3):256-260
- [6] Hernandez L, Bea S, Pinyol M, et al. CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(6):2199-2206
- [7] Singh V, Rastogi N, Mathur N, et al. Association of polymorphism in MDM2 and p53 Genes with breast cancer risk in Indian women [J]. *AEP*, 2008, 18(1):48-57
- [8] Peng Fu, Baozhong Shen, Changjiu Zhao, et al. Molecular Imaging of MDM2 Messenger RNA with 99mTc-Labeled Antisense Oligonucleotides in Experimental Human Breast Cancer Xenografts [J]. *J Nucl Med*, 2010, 51:1805-1812
- [9] Wang H, Nan L, Yu D, et al. Anti-tumor efficacy of a novel antisense anti-MDM2 mixed-backbone oligo nucleotide in human colon cancer models: p53-dependent and p53-independent mechanisms [J]. *Mol Med*, 2002, 8(4): 185-199
- [10] Prasad G, Wang H, Agrawal S, et al. Antisense anti-MDM2 oligonucleotides as a novel approach to the treatment of glioblastoma multiforme [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(1A):107-116
- [11] 彭志平, 蒋明东, 王树斌, 等. C-erbB2 反义寡脱氧核苷酸联合紫杉醇对乳腺癌细胞 SK-Br-3 的抑制作用 [J]. *第四军医大学学报*, 2009, 05:401-404
Peng Zhi-ping, Jiang Ming-dong, Wang Shu-bin, et al. Inhibitory effect of cerbB2 antisense oligodeoxynucleotide combined with taxol on proliferation of SK-Br-3 cells [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2009, 05:401-404
- [12] Lihong C, Sudhir A, Wenqiang Z, et al. Synergistic activation of p53 by inhibition of MDM2 expression and DNA damage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(1):195-200
- [13] 郭仁宏, 王金万. 紫杉醇脂质体的研究进展 [J]. *中国肿瘤*, 2008, 17(8):698-703
Guo Ren-hong, Wang Jin-wan. Research progress on paclitaxel liposome [J]. *China Cancer*, 2008, 17(8): 698-703
- [14] Seidmen AD, tiersten A, Hudis C, et al. Phase trial of paclitaxel by 3-hour infusion as initial and salvage chemotherapy for metastatic breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 1995, 13(10):2575-2581
- [15] Henderson C, Berry DA, Demetri GD, et al. Improved outcomes form adding sequential paclitaxel but not from escalating doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patient with node-positive primary breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(6):976-983
- [16] Eimasri HA. Experimental and mathematical modeling methods for the investigation of toxicological interactions [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 223 (2):148-154
- [17] Ostaw A, Chen Y, Mikhitarian K, et al. EpCAM is over expressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy [J]. *Cancer Res*, 2004, 64:5818-5824
- [18] Obermiller PS, Tait DL, Holt JT. Gene therapy for carcinoma of the breast: Therapeutic genetic correction strategies [J]. *Breast Cancer Res*, 2000, 2:28-31
- [19] Prabha S, Labhasetear V. Nanoparticle-mediated wild-type p53 gene delivery results in sustained antiproliferation activity in breast cancer cells [J]. *Mol Pharm*, 2004 1(3):211-219
- [20] Fan Z, Chakravarty P, Alferi A, et al. Adenovirus-mediated antisense ATM gene transfer sensitizes prostate cancer cell to radiation [J]. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7(10):1307-1314