

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0114-05

特异性增殖型腺病毒 CNHK200-mIFN- γ 表达 mIFN- γ 及体外肿瘤杀伤实验

陈洁^{1,4}, 钱其军², 达万明³, 欧英贤¹, 薛惠斌², 崔贞福², 苏长青², 李林芳², 姜梨华², 吴红平²(1. 第四军医大学西京医院血液科, 西安 710032; 2. 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438; 3. 解放军总医院血液科, 北京 100853; 4. 兰州军区兰州总医院血液科, 兰州 730050)

[摘要] 目的: 构建增殖型腺病毒 CNHK200-mIFN- γ 和增殖缺陷型腺病毒 AdEasy-mIFN- γ , 比较两者在肿瘤细胞中表达 mIFN- γ 蛋白的能力以及 CNHK200-mIFN- γ , ONYX-015 及野生型腺病毒 Ad5 在正常及肿瘤细胞中的增殖力, 进一步观察其抗肿瘤效果。方法: 以病毒增殖试验检测病毒在细胞中的增殖能力; 透射电镜观察 CNHK200-mIFN- γ 在 Hep3B 细胞中的增殖复制; 检测病毒感染肿瘤细胞后 mIFN- γ 的表达; CPE 实验观察增殖病毒对细胞的杀伤效应。结果: CNHK200-mIFN- γ 和 ONYX-015 仅在肿瘤细胞中增殖, 且前者增殖力较强。CNHK200-mIFN- γ 在肿瘤细胞中表达 mIFN- γ , 且表达量与病毒增殖密切相关, 而 AdEasy-mIFN- γ 在肿瘤细胞中的 mIFN- γ 表达几乎不能测到。ONYX-015 与 CNHK200-mIFN- γ 对正常的细胞无杀伤性, 但能有效地杀伤癌细胞。结论: 外源基因 mIFN- γ 的插入没有改变增殖病毒在肿瘤细胞中选择性增殖的特性。增殖型腺病毒 CNHK200-mIFN- γ 具有良好的肿瘤选择性及增殖性, 且可以有效表达 mIFN- γ , 并且有效杀伤癌细胞, 显示其良好的临床应用前景。

[关键词] 肿瘤特异性增殖病毒; 腺病毒; 基因; 干扰素; 病毒基因治疗

[中图分类号] R730.51 [文献标识码] A

Selective Replication *in vitro* and mIFN- γ Expression of a Tumor-Specific Replicative Virus CNHK200-mIFN- γ

CHEN Jie^{1,4}, QIAN Qi-jun², DA Wan-ming³, OU Ying-xian⁴, XUE Hui-bin², CUI Zhen-fu², SU Chang-qing², LI Lin-fang², JIANG Li-hua², WU Hong-ping²(1. Department of Hematology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 3. Department of Hematology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 4. Department of Hematology, General Hospital of Lanzhou Military Area, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] Objectives: To construct the replication-competent adenovirus CNHK200-mIFN- γ and the replication-deficient adenovirus AdEasy-mIFN- γ , and to compare their expression of mIFN- γ and the replicative activities of CNHK200-mIFN- γ , ONYX-015 and wide-type adenovirus (Ad5) in normal and cancer cells. Their antitumor activities were also observed. Methods: The replicative activities of viruses in cells were measured by viral replication assay; The replication of CNHK200-mIFN- γ in Hep3B cells was observed under the electron microscopy; The expression of mIFN- γ in cancer cells was detected by ELISA. CPE assay was used to detect viral antitumor activity. Results: Both CNHK200-mIFN- γ and ONYX-015 replicated only in cancer cells, and CNHK200-mIFN- γ replicated more potential than ONYX-015; The infection of CNHK200-mIFN- γ led to an obvious expression of mIFN- γ , whereas the expression of mIFN- γ mediated by AdEasy-mIFN- γ could not be detected at all. CNHK200-mIFN- γ and ONYX-015 could kill cancer cells but spare normal cells. Conclusions: The insertion of mIFN- γ causes no alterations on the tumor-specific replication of the original virus. CNHK200-mIFN- γ can selectively replicate and effectively express mIFN- γ in tumor cells, and specifically kill cancer cells, suggesting a splendid future as a new anticancer agent.

[Key words] replication-selective viruses; adenovirus; gene; interferon; gene-virus therapy

* 特异性增殖型病毒是肿瘤治疗的突破性进展, 其治疗机制完全不同于传统的治疗方法。这种病毒仅在肿瘤细胞中增殖, 对正常细胞损伤极小, 具有传统治疗无可比拟的优势^[1]。其中 ONYX-015(d1520) 是增殖型病毒中首先应用于临床肿瘤患者且是目前应用最为

[基金项目] 国家自然科学基金国际合作重大项目(30120160823)
[作者简介] 陈洁(1973-), 女, 湖北人, 主要从事肿瘤病毒基因治疗研究, 现在第四军医大学攻读博士学位
[通讯作者] 钱其军, E-mail: qiangj@sino-gene.cn

成功的一种病毒^[24],它与化疗药物顺铂和 5-FU 联合应用治疗 30 例难治型头颈部癌患者,其中 8 例完全缓解,11 例肿瘤缩小一半以上,总有效率为 63%^[5]。但是 ONYX-015 单独应用的有效率低于 10%^[6]。为了提高增殖病毒的抗肿瘤疗效,我们实验室构建了 ONYX-015 的类似病毒 CNHK200,它具有携带外源基因的能力,可以将各种抗肿瘤基因插入其病毒基因组中^[7],增强病毒的抗肿瘤疗效。本研究将具抗肿瘤作用的小鼠 γ 干扰素基因(mIFN- γ)插入 CNHK200 中,并从病毒的增殖能力、介导外源基因表达和肿瘤杀伤效应等方面研究 CNHK200-mIFN- γ 的特性,为最终将该病毒应用于临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

pShuttle 质粒、pAdEasyTM-1 质粒、大肠杆菌 BJ5183 购自 COLON CANCER 公司。pBlue-mIFN- γ 质粒由上海第二医科大学生化教研室惠赠。腺病毒载体 pCA13 和人胚胎肾 293 细胞株购自加拿大 Microbix Biosystems 公司。限制性内切酶 EcoR I, BamH I, Bgl II, Hind III, Pme I, Pac I 和 Lipofect Amine 试剂盒购自 GIBCO BRL 公司。人正常肝细胞株 L02、人正常成纤维细胞株 MRC-5、人肝癌细胞株 Hep3B、人胰腺癌细胞株 PANC-1、人黑色素瘤细胞株 A375、人肺癌细胞株 A549、人乳腺癌细胞株 MBD-231 购自美国 ATCC 公司。人胃癌细胞株 SGC-7901 来源于中科院上海细胞所。DMEM、RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自 GIBCO BRL 公司。ONYX-015 由美国加州大学 Berk AJ 教授惠赠。

1.2 引物合成

依据 mIFN- γ 的有效序列和引物设计原则,采用 PCGENE 软件中的 PCRPLAN 程序,分别设计针对 mIFN- γ 序列的引物(M1, P1)和野生型腺病毒特有而 CNHK200 选择部分缺失的 E1 区域的 PCR 引物(VT001, VT002):

mIFN- γ 的引物:上游引物(M1): 5'-ATGGCT-GTTTCTGGCTGTACTGCC-3', 下游引物(P1): 5'-TTTCCGCTTCCTGAGGCTGGATTCC-3'。

腺病毒 E1 区引物:上游引物(VT001): 5'-CTGGC-CAATACCAACCTTA-3', 下游引物(VT002): 5'-ATAT-GAGCTCACAAATGCTTC-3'。

1.3 增殖腺病毒 CNHK200-mIFN- γ 和增殖缺陷型腺病毒 AdEasy-mIFN- γ 的构建及制备

应用内切酶 BamH I 和 EcoR I 将 E1B 55 kD 缺失的腺病毒载体 pCA13 在 764 bp 和 1 241 bp 中切开,然后回收 6 460 bp DNA 片段。将上述片段与来源于

pBlue-mIFN- γ 质粒 BamH I /EcoR I 酶切回收的 466 bp mIFN- γ 基因连接,命名为 pCA13-mIFN- γ 。将含有 mIFN- γ 基因的 pCA13-mIFN- γ 用 Bgl II 进行酶切,回收 1 046 bp 片段,该片段含有 CMV 启动子 + mIFN- γ 基因 + SV40 polyA 加尾信号。将该片段插入 pXC-deE1b 载体中 Bgl II 位点,应用 PCR 鉴定 mIFN- γ 的存在(PCR 扩增方案为 94℃ 5 min 变性,94℃ 40 s,50℃ 30 s,72℃ 90 s 共 30 循环,72℃ 10 min)。利用 LipofectAmine 试剂盒,将质粒 pXC-deE1b-mIFN- γ 与 5 型腺病毒右臂质粒 pBGHE3 共转染至 293 细胞株,经过 3 次病毒空斑纯化,PCR 鉴定,证明该病毒中正确插入了 mIFN- γ 基因片断,且没有野生型病毒存在,将该腺病毒命名为 CNHK200-mIFN- γ 。

上述 pCA13-mIFN- γ 用 Bgl II 酶切回收含有 CMV 启动子 + mIFN- γ 基因 + SV40 polyA 加尾信号的 1 046 bp 片段,与 Bgl II 酶切后的 pShuttle 载体进行连接,Hind III 酶切及 PCR 鉴定连接正确后命名为 pShuttle-mIFN- γ 。将该重组子用 Pme I 线性化,与 50 ng 的 pAdEasyTM-1 DNA 共转化大肠杆菌 BJ5183(40 μ l),转化物铺 LB/Kan(50 μ g/ml)培养板,37℃ 培养 24 h,挑克隆,将正确的 BJAdeasyTM-1 菌液 10 μ l 制备成感受态细胞。将线性化的 pShuttle-mIFN- γ 与 BJAdeasyTM-1 共转化,挑取克隆,BamH I 酶切及 PCR 鉴定正确后命名为 AdEasy-mIFN- γ ,即携带 mIFN- γ 基因产物的肿瘤增殖缺陷型腺病毒。将 Pme I 线性化的 AdEasy-mIFN- γ 质粒通过 LipofectAmine 转染至 293 细胞株,共转染后 9~14 d 出现病毒空斑,经过 3 次病毒空斑纯化,提取腺病毒 DNA。用 2 组不同引物对病毒重组体进行 PCR 鉴定,一组引物(M1, P1)用来检测 mIFN- γ 基因的存在,另一组(VT001, VT002)用来排除野生型腺病毒的存在。

1.4 细胞培养

采用贴壁培养法,A549 肺癌细胞株在 HAMF-12 培养液中培养,其余细胞株在 DMEM 培养液中培养。培养液中加入 10% NBS、青霉素、链霉素各 100 μ g/ml,37℃,5% CO₂ 条件下培养。

1.5 病毒增殖试验

5 \times 10⁹/L 实体瘤细胞接种至六孔板中,每孔 100 μ l,5% CO₂ 孵箱内孵育 24 h,换用无血清培养液,分别用 MOI = 5 的 ONYX-015, CNHK200-mIFN- γ 和 Ad5 感染 2 h,在 0,6,12,24,48,96 h 收集病毒感染的细胞(包括贴壁和非贴壁细胞)及上清液,反复冻融 3 次,离心去细胞碎片,用空斑形成试验(TCID50 法)检测病毒滴度。

1.6 透射电镜检查

Hep3B 细胞培养 24 h,按照 MOI = 1 加入 CNHK

200- mIFN- γ 病毒感染,至细胞死亡约 90% 时收集细胞,4% 戊二醛 4 $\text{ }^\circ\text{C}$ 固定 4 h。1% 锇酸固定 2 h,干燥脱水,Epon812 环氧树脂包埋,超薄切片厚 50 nm,醋酸铀和柠檬酸铅染色,Hitachi-600 透射电镜检查。

1.7 mIFN- γ 表达的酶联免疫检测

CNHK200-mIFN- γ 和 AdEasy-mIFN- γ 作用于 Hep3B 和 PANC-1 细胞,检测上清液中 mIFN- γ 表达的情况。接种 5×10^8 /L 细胞至 24 孔板,每孔 100 μl , 24 h 后按 $\text{MOI} = 0.1$ 分别加入病毒 CNHK200-mIFN- γ 和 AdEasy-mIFN- γ ;2 h 后换用 2% 血清培养液,分别在 1, 3, 7 d 收集病毒感染的细胞培养上清液, -80°C 冻融 3 次,ELISA 方法检测不同时间的上清液 mIFN- γ 浓度。应用直线回归方法建立 ELISA 检测 mIFN- γ 蛋白标准曲线的直线回归方程,通过回归方程计算各样品 mIFN- γ 蛋白的浓度。

1.8 CPE (cytopathic effect) 实验

接种对数生长期的 L02, Hep3B, PANC-1 细胞 5×10^9 /L 至六孔细胞培养板,每孔 100 μl ,感染不同 MOI 的病毒 ONYX-015 和 CNHK200-mIFN- γ , 2 h 后换 5% 血清培养液,继续孵育 7 d,每天用显微镜观察细胞病变。7 d 后,PBS 轻轻清洗非贴壁细胞和细胞残渣,加 1% 戊二醛固定 10 min,用结晶紫染色,观察、拍照。

2 结果

2.1 CNHK200-mIFN- γ 和 AdEasy-mIFN- γ 的构建及鉴定

利用限制性内切酶技术和 PCR 检测,结果均证明增殖腺病毒 CNHK200-mIFN- γ 和增殖缺陷型腺病毒 AdEasy-mIFN- γ 构建成功(图 1)。两者在 293 细胞中反复扩增到需要量,并进行滴度测定,CNHK200-mIFN-

γ 滴度为 1.0×10^8 pfu/ml, AdEasy-mIFN- γ 滴度为 1.6×10^8 pfu/ml。

2.2 病毒增殖试验

在正常细胞株 L02 和 MRC-5 中, ONYX-015 和 CNHK200-mIFN- γ 均不增殖,而野生型病毒 Ad5 在 96 h 时增殖了上千倍(图 2A)。在人癌细胞中,包括 Hep3B, PANC-1, A375, A549, MBD-231, SGC-7901, ONYX-015 和 CNHK200-mIFN- γ 中均有明显增殖,且 CNHK200-mIFN- γ 的增殖能力比 ONYX-015 强(图 2B, 2C)。ONYX-015 与野生型腺病毒 Ad5 相比,在各种细胞中增殖力均有不同水平的下降,而 CNHK200-mIFN- γ 的增殖能力下降不明显,在 Hep3B 细胞株中甚至有所上升。病毒感染细胞 96 h 的病毒滴度结果显示, mIFN- γ 的插入没有减弱反而增强了病毒的增殖能力(图 2D)。

2.3 透射电镜检查

以 $\text{MOI} = 1$ 感染 CNHK200-mIFN- γ 病毒的 Hep3B 细胞,透射电镜检查发现胞浆内出现大量的病毒颗粒,证实 CNHK200-mIFN- γ 病毒可以在 Hep3B 细胞内有效复制(图 3)。

2.4 mIFN- γ 的表达

Hep3B 和 PANC-1 细胞在 CNHK200-mIFN- γ 病毒的作用下均能产生 mIFN- γ , 且 mIFN- γ 的表达量与病毒增殖密切相关(图 5)。在感染早期病毒增殖比较快速,后期则明显减弱, mIFN- γ 的表达量也呈现早期大量产生,后期增加缓慢的特征。而 Hep3B 和 PANC-1 在 AdEasy-mIFN- γ 病毒作用下产生的 mIFN- γ 几乎不能测到。结果说明 CNHK200-mIFN- γ 在肿瘤细胞中的增殖可以显著提高 mIFN- γ 的表达。

图 1 AdEasy-mIFN- γ 载体及病毒的鉴定

Fig.1 Identification of the virus AdEasy-mIFN- γ

A: Digestion identification of AdEasy-mIFN- γ vector. 1: λ DNA/EcoR I + Hind III Marker; 2: AdEasy-mIFN- γ /BamH I .
B: PCR identification with M1/P1 primers. 1: AdEasy-mIFN- γ ; 2: Negative control; 3: pCA13-mIFN- γ as positive control;
4: λ DNA/EcoR I + Hind III Marker. C: PCR identification with VT001/VT002 primers. 1: AdEasy-mIFN- γ ;
2: Negative control; 3: Ad5 as positive control; 4: λ DNA/EcoR I + Hind III Marker

图2 病毒在不同细胞中的增殖情况

Fig. 2 Replication of viruses in various cells

A: L02 cells; B: Hep3B cells; C: PANC-1 cells; D: Replication of viruses at 96 h in various cells

径发挥抗肿瘤作用,具有较为肯定的疗效^[11-13],因此在实验中我们构建了携带 mIFN- γ 基因的增殖性腺病毒

图3 电镜检测 CNHK200-mIFN- γ 病毒在人肝癌细胞 Hep3B 中的增殖

Fig. 3 CNHK200-mIFN- γ replication in Hep3B cells observed under electron microscopy

2.5 CPE 实验

CPE 即细胞病理效应,结果显示 ONYX-015 与 CNHK200-mIFN- γ 两种病毒对正常细胞无杀伤性,但是能有效地杀伤肝癌细胞 Hep3B 和胰腺癌细胞 PANC-1。在各种 MOI 值时,Hep3B 全部死亡。与 ONYX-015 相比,CNHK200-mIFN- γ 对 PANC-1 的杀伤力较强(表 1)。

3 讨论

肿瘤特异性增殖病毒的肿瘤杀伤性,主要依靠它在肿瘤细胞中的增殖力。这种病毒的最大优越性在于病毒在正常细胞内不增殖,对正常细胞损害不大。但目前所研制的各种增殖型病毒,单独应用抗癌性较低。让增殖病毒携带抗癌基因,通过病毒的增殖大量扩增抗癌基因,并表达具有抗癌作用的蛋白因子,可以提高增殖病毒的抗癌疗效。目前这一领域已经成为国际抗癌研究的热点之一^[8-10]。由于 IFN- γ 可以通过多种途

图4 CNHK200-mIFN- γ 介导的 mIFN- γ 基因在 Hep3B 和 PANC-1 中的表达

Fig. 4 mIFN- γ expression in Hep3B and PANC-1 cells mediated by CNHK200-mIFN- γ

CNHK200-mIFN- γ ,并比较了其在国外同类产品 ONYX-015 以及野生型腺病毒 Ad5 在各种实体瘤细胞中的增殖力。结果发现 ONYX-015 和 CNHK200-mIFN- γ 在多种实体瘤细胞中均可增殖,但在正常人肝细胞中不增殖,而野生型腺病毒 Ad5 感染人正常细胞 96 h 后增殖了上千倍,显示 mIFN- γ 的插入没有改变 CNHK200 在肿瘤细胞中特异性增殖的特点。实验结果还表明,CNHK200-mIFN- γ 的增殖能力明显优于 ONYX-015。以往研究表明 E1B 55 kD 基因的去除可导致病毒增殖力的下降,本实验发现与野生型腺病毒 Ad5 相比,ONYX-015 在各种细胞中增殖力确有不同水平的下降。但 CNHK200-mIFN- γ 的增殖能力下降却比较小,在 Hep3B 细胞株中甚至略有上升。虽然 CNHK200-mIFN-

γ 的增殖作用强于 ONYX-015 的机制尚需进一步研究，
但很显然 mIFN- γ 的插入没有削弱病毒在肿瘤细胞中
的增殖能力。

表 1 两种病毒对不同细胞的细胞病理效应
Tab.1 Cytopathic effect on various cells of viruses

		MOI					
		100	10	1	0.1	0.01	0
ONYX-015	L02	-	-	-	-	-	-
	Hep3B	+++	+++	+++	+++	+++	-
	PANC-1	+++	++	+	+	-	-
CNHK200-mIFN- γ	L02	-	-	-	-	-	-
	Hep3B	+++	+++	+++	+++	+++	-
	PANC-1	+++	+++	+++	+	-	-

+++ : Cell death completely; ++ : Cell death mostly; + : Cell death partially; - : No cell death

为了证实 CNHK200-mIFN- γ 在肿瘤细胞的增殖是
否能够促进 mIFN- γ 基因的表达,我们检测了增殖缺陷
型病毒 AdEasy-mIFN- γ 与增殖型病毒 CNHK200-mIFN-
 γ 分别感染肿瘤细胞后 mIFN- γ 的表达。结果显示
AdEasy-mIFN- γ 的感染几乎不引起 mIFN- γ 的表达,而
CNHK200-mIFN- γ 病毒明显促进了 mIFN- γ 的表达,且
mIFN- γ 的表达量与 CNHK200-mIFN- γ 病毒增殖能力
密切相关。表明 CNHK200-mIFN- γ 病毒的增殖可以显
著提高 mIFN- γ 在癌细胞中的表达。总之,将 mIFN- γ
插入肿瘤特异性增殖病毒 CNHK200 中,不仅没有改变
病毒的肿瘤增殖特性和增殖能力,而且可以较高水平
地表达 mIFN- γ 。

ONYX-015 的类似物 CNHK200 携带 mIFN- γ 基因
后,抗肿瘤疗效得到极大提高,同时与 ONYX-015 一
样,改造后的病毒不杀伤正常细胞,充分证明将 mIFN-
 γ 基因插入 ONYX-015 类似物的改造不仅没有破坏其
肿瘤特异性增殖的特征,而且大大提高了其抗癌力,这
种提高很可能是 CNHK200-mIFN- γ 中 mIFN- γ 表达的
结果。这为 CNHK200-mIFN- γ 病毒最终用于临床治疗
提供了坚实的基础,也为肿瘤的基因-病毒治疗提供了
有力的证据。

[参 考 文 献]

[1] 钱其军. 增殖病毒对肿瘤的治疗作用[J]. 中国肿瘤生物治疗
杂志, 2000, 7(1): 1-2.
[2] Biederer C, Ries S, Brandts CH, *et al.* Replication-selective viru-
ses for cancer therapy[J]. J Mol Med, 2002, 80(3): 163-175.
[3] Cohen EE, Rudin CM. ONYX-015: Onyx Pharmaceuticals[J].
Curr Opin Investig Drugs, 2001, 2(12): 1770-1775.
[4] Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, *et al.* ONYX-015,

an E1B gene-attenuated adenovirus, cause tumor-specific cytolysis
and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemo-
therapeutic agents[J]. Nat Med, 1997, 3(6): 639-645.
[5] Khuri FR, Nemunaitis J. A controlled trial of intratumoral ONYX-
015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cis-
platin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck
cancer[J]. Nat Med, 2000, 6(8): 879-885.
[6] Kim D. Replication-selective oncolytic adenoviruses: Virotherapy
aimed at genetic targets in cancer [J]. Oncogene, 2000, 19
(56): 6660-6669.
[7] Qian Q, Sham J, Che X, *et al.* Gene-viral vectors: A promising
way to target tumor cells and express anticancer genes simultane-
ously[J]. Chin Med J, 2002, 115(8): 1213-1217.
[8] Zeh HJ, Bartlett DL. Development of a replication-selective, on-
colytic poxvirus for the treatment of human cancers[J]. Cancer
Gene Ther, 2002, 9(12): 1001-1012.
[9] Varghese S, Rabkin SD. Oncolytic herpes simplex virus vectors for
cancer virotherapy[J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9(12): 967-
978.
[10] Freytag SO, Khil M, Stricker H, *et al.* Phase I study of replica-
tion-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy
for the treatment of locally recurrent prostate cancer[J]. Cancer
Res, 2002, 62(17): 4968-4976.
[11] Yang Y, Xiang Z, Ertl HC, *et al.* Upregulation of class I major
histocompatibility complex antigens by interferon-gamma is neces-
sary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-in-
fected hepatocytes *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995,
92(16): 7257-7261.
[12] Zhang JF, Hu C, Geng Y, *et al.* Treatment of a human breast
cancer xenograft with an adenovirus vector containing an interferon
gene results in rapid regression due to viral oncolysis and gene
therapy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(9): 4513-
4518.
[13] Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, *et al.* IFN-gamma-mediated
inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, al-
pha-galactosylceramide[J]. Blood, 2002, 100(5): 1728-1733.

[收稿日期] 2003 - 09 - 02

[修回日期] 2003 - 11 - 15