

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0119-05

TRAIL 基因修饰联合阿霉素对大肠癌细胞株 RKO 作用的研究

何超¹, 梁建华², 胡晓彤¹, 劳伟峰¹, 陈萍¹(1. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院临床医学研究所, 杭州 310016; 2. 浙江大学医学院硕士研究生院, 杭州 310006)

[摘要] **目的:** 探讨肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)基因联合阿霉素后,应用于人大肠癌细胞株 RKO 基因治疗的实验研究。**方法:** 将重组腺病毒载体(Ad)介导的 TRAIL 基因作用于大肠癌细胞株 RKO,并联合低剂量的阿霉素协同作用。通过 MTT 比色法与流式细胞仪研究分析其对 RKO 细胞的作用效果,并以 RT-PCR 检测联合应用阿霉素前后 TRAIL 基因的表达水平。**结果:** 病毒载体对 RKO 细胞的生长有轻微的抑制作用,作用 4 d 抑制率为 11.9%,但不增加 RKO 细胞的凋亡率。TRAIL 对 RKO 细胞的生长抑制率及凋亡诱导率分别为 50.1% 和 19.8%。联合阿霉素后,TRAIL 对 RKO 细胞株的生长抑制率及凋亡率均有显著的增强作用,分别达 60.3% 及 49.0%。RT-PCR 结果提示联合应用阿霉素后,TRAIL 基因的表达并未增强。**结论:** TRAIL 能有效抑制 RKO 的生长,联合阿霉素后,其对 RKO 的生长抑制作用及凋亡诱导作用均明显增强。阿霉素不是通过增加 TRAIL 基因的表达来实现上述作用的。

[关键词] TRAIL; 结直肠肿瘤; 基因治疗; 阿霉素

[中图分类号] R73-3; R735.34 [文献标识码] A

Activity of TRAIL Gene Modification Combined with DOX on Human Colon Cancer Cell Line RKO

HE Chao¹, LIANG Jian-hua², HU Xiao-tong¹, Lao Wei-feng¹, Chen Ping¹(1. Clinical Research Institute of Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China; 2. Graduate Student of Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the gene therapeutic efficiency of TRAIL combined with DOX on human colon cancer cell line RKO. **Methods:** Human colon cancer cell line RKO was transfected with adenovirus-mediated TRAIL gene Ad/GT-TRAIL and TRAIL/DOX combination. Cell growth and apoptosis were measured by MTT method and flow cytometry. TRAIL gene expression before and after combination with DOX was measured by RT-PCR. **Results:** The cell line RKO was slightly suppressed by mediate adenovirus and significantly suppressed by TRAIL gene. The suppression percentages were 11.9% and 50.1% respectively. Combined with DOX, the suppression and the apoptosis of cell line RKO could be significantly enhanced by TRAIL gene. The suppression and the apoptic percentage reached 60.3% and 49.0% respectively. RT-PCR showed the expression of TRAIL gene was not enhanced in the RKO cells exposed to the DOX/TRAIL combination. **Conclusion:** TRAIL gene was able to induce apoptosis and suppress the growth of human colon cancer cell line RKO. Combined with DOX, the suppression and apoptosis could be significantly enhanced. But this result came out not by increasing the expression of TRAIL gene.

[Key words] TRAIL; colorectal neoplasms; gene therapy; Doxorubicin

* 肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是新近发现的一种能介导细胞凋亡的信号分子,亦称凋亡素-2 配体(Apo-2L)。TRAIL 与 TNF 和 Fas/Apo-1 配体类似,为典型的 II 型跨膜蛋白^[1]。TRAIL 及其受体广泛地表达于人体的多种正常组织。

TRAIL 通过与其特异性受体的相互作用来发挥促进凋亡作用。但与 Fas 不同,TRAIL 对机体正常组织不具

[基金项目] 浙江省自然科学基金资助项目(基金编号:302678)

[作者简介] 何超(1959-),男,浙江萧山人,博士生导师,主要从事大肠肿瘤的临床与基础研究工作

有明显的毒性作用,只选择性地诱导肿瘤源性细胞和转化细胞发生凋亡,故被认为是一种安全的抗肿瘤制剂。近年来的许多研究也证实了这点^[24]。但也有一些研究认为有部分肿瘤细胞对 TRAIL 诱导的凋亡作用并不敏感,但联合部分化疗药物后能增加其对 TRAIL 的敏感性^[46]。为此,我们观察了 TRAIL 基因转染大肠癌细胞株 RKO 后其对细胞株生长率及凋亡率的影响,并联合化疗药物阿霉素(DOX),观察联合应用阿霉素后上述作用是否有所增强。并对腺病毒介导 TRAIL 基因联合化疗药物阿霉素治疗大肠癌的临床价值进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 重组腺病毒载体及药物

腺病毒载体 Ad/GT-TRAIL, Ad/GT-LacZ(阴性对照基因,其产物为半乳糖苷酶), Ad/GT-Bax 及 Ad/PGK-GV₁₆由美国 M. D. Anderson 癌症中心方炳良教授惠赠。分别携带人 TRAIL, Bax 和细菌 LacZ 基因。阿霉素(浙江海正药业股份有限公司,批号:020701)。

1.2 细胞株

人胚肾细胞株 293 为本室保存,人大肠癌细胞株 RKO 为浙大医学院肿瘤所提供。

1.3 仪器设备

细胞培养箱(Heraeus, HERA cell);倒置显微镜(Leica, MPS 30);低温高速离心机(Heraeus, Biofuge stratos);流式细胞仪(Beckman-Coulter, EPICS XL);自动酶联检测仪(Bio-Rad, Model 550);紫外可见分光光度仪(HP, 8653);PCR 仪(Perkin Elmer, PE4800);凝胶成像仪(BIO-RAD)。

1.4 主要试剂

X-gal, TRIZOL(上海生工), TRAIL 上、下游引物(上海生工定制), ANNEXIN V-PI 凋亡试剂盒(CALTAG), MTT(Amresco), Taq 酶, 琼脂糖, 逆转录酶, RNA 酶抑制剂, DMSO, 25 mmol/L Mg²⁺, 胰蛋白酶, 胎牛血清, pUC Mix Marker(Promega), 溴乙锭(Sangon), RPMI-1640 培养基(Gibcol)。

1.5 病毒扩增和滴度的测定

人胚肾细胞株 293 是缺陷型腺病毒载体包装细胞,以 PRMI-1640 完全培养基培养,细胞长至 60%~70% 时更换新鲜的培养基,按 MOI(multiplicity of infection)值 100 分别加入各重组腺病毒 Ad/GT-TRAIL, Ad/GT-LacZ, Ad/GT-Bax 及 Ad/PGK-GV₁₆, 继续培养观察数天,当 293 细胞大部分脱落时,分别收集细胞,反复冻融 3~5 次,镜下观察细胞完全碎解,4℃, 5 000 r/min 离心 20 min,收集上清,再用 0.22 μm 滤膜过滤

除菌,分光光度仪在 260 nm 处测 OD 值, A₂₆₀ = 1 × 10¹² 个病毒颗粒/ml 换算计算病毒滴度, -70℃ 保存备用。

1.6 病毒转染效率的测定

RKO 细胞 1 × 10⁵ 个接种于 24 孔板,24 h 后分别以 MOI = 200, 500, 1 000, 2 000, 5 000, 10 000 加入 Ad/GT-LacZ 及 Ad/PGK-GV₁₆, 各组设 3 个平行孔,作用 24 h 后, X-gal 染色 24 h 观察结果。

1.7 阿霉素浓度的筛选

于 96 孔板中种入 5 × 10³ 个/孔的 RKO 细胞,24 h 后分别加入 0.01, 0.05, 0.3, 1.5 μg/ml 不同浓度的阿霉素,各设 4 个平行孔。分别于不同时间点(1, 2, 3, 4 d)以 MTT 法测各组细胞的生长率。

1.8 各组重组腺病毒及阿霉素对 RKO 细胞生长率影响的测定

采用 96 孔板,每孔加入 5 × 10³ 个 RKO 细胞,每组设 4 个平行孔,24 h 后按 MOI = 2 000 感染各组腺病毒,或加入阿霉素使其浓度为 0.01 μg/ml,分别于不同时间点(1, 2, 3, 4 d)以 MTT 法测各组细胞的生长率。重复 3 次。

1.9 RKO 细胞凋亡率的检测

采用 6 孔板,每孔接种 5 × 10⁴ 个 RKO 细胞,24 h 后加入 MOI = 2 000 的各组腺病毒及 0.01 μg/ml 的阿霉素,每组设 6 个平行孔。作用 5 d 后, PI 联合 Annexin V 染色,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.10 RT-PCR 检测 TRAIL 基因的表达

50 ml 细胞培养瓶,当细胞长至约占瓶底 80% 时,分别感染 Ad/GT-TRAIL + Ad/PGK-GV₁₆, 阿霉素 + Ad/GT-TRAIL + Ad/PGK-GV₁₆, Ad/GT-LacZ + Ad/PGK-GV₁₆, 继续培养 24 h。用 0.25% 胰酶消化细胞, PBS 冲洗, 2 000 转离心 5 min 2 次,收集细胞。常规 RT-PCR, 1% 凝胶中电泳(100V),用凝胶显像仪观察电泳结果。

1.11 统计分析

采用 SPSS10.0 统计软件包,两独立样本的 *t* 检验。

2 结果

2.1 腺病毒的滴度

各种腺病毒的滴度均约为 5 × 10¹⁰ 病毒颗粒/ml。

2.2 阿霉素应用浓度筛选结果

MTT 法示 RKO 在各种不同的阿霉素浓度下的生长曲线如(图 1)。当阿霉素浓度为 0.01 μg/ml 时, RKO 细胞的生长抑制率小于 25%。

2.3 腺病毒的转染效率

X-gal 染色显示当 MOI = 2 000 时, 100% 的 RKO 细胞均被染成蓝色。

2.4 RKO 细胞在各组干预因素作用下形态的变化

Ad/GT-TRAIL、Ad/GT-Bax 联合 Ad/PGK-GV₁₆ 感染 RKO 后,均于第 2 天后逐渐出现细胞变圆,突起减少,胞浆中空泡产生,部分悬浮。联合阿霉素后,上述变化更加明显。而 Ad/GT-LacZ 联合 Ad/PGK-GV₁₆ 或阿霉素单独应用时,并不出现上述变化,如(图 2)。

2.5 RKO 细胞在各组干预因素作用下细胞生长率

MTT 法检测细胞生长率以 PBS 组为空白对照,各组生长率值如(表 1)。其中阿霉素、LacZ 组与 PBS 组比较有统计差异($P < 0.01$),说明阿霉素及携带 LacZ 基因的腺病毒对 RKO 细胞的生长均有抑制作用,但作用较弱。分别比较 TRAIL 组与 LacZ 组,Bax 组与 LacZ 组及 TRAIL 组与 Bax 组,前两组 RKO 细胞的生长率均有统计差异($P < 0.01$),而后一组无统计差别($P > 0.05$),说明表达 TRAIL 及 Bax 基因后,RKO 细胞生长受到较为明显的抑制。再比较阿霉素与阿霉素加 LacZ 组,TRAIL 组与阿霉素加 TRAIL 组,Bax 组与阿霉素加 Bax 组及阿霉素加 TRAIL 与阿霉素加 Bax 组,其中 TRAIL 与阿霉素加 TRAIL 组有统计学差别($0.01 <$

$P < 0.05$),其余各组间差别均无统计学意义($P > 0.05$)。提示加用阿霉素后,能提高 TRAIL 基因对 RKO 细胞株的生长抑制作用,而不能增强 Bax 基因对 RKO 细胞株的生长抑制作用。

图 1 RKO 在各种不同的阿霉素浓度下的生长曲线

Fig. 1 The growth curve of RKO cell line after treated by different concentration of DOX

图 2 RKO 细胞在 TRAIL 及 TRAIL + DOX 作用下的形态 ×100

Fig. 2 The appearance of RKO cell line after treated by TRAIL and TRAIL + DOX ×100

A: Normal RKO cell; B: RKO cell transfected with adenovirus-mediated TRAIL gene;

C: RKO cell transfected with adenovirus-mediated TRAIL gene added with DOX

2.6 TRAIL 基因在阿霉素作用下诱导 RKO 细胞的凋亡作用

各组细胞经 PBS、阿霉素、LacZ、TRAIL、Bax、阿霉素 + LacZ、阿霉素 + TRAIL、阿霉素 + Bax,作用 4 d 后,流式细胞仪测各组细胞的凋亡率如(表 2)所示。其中 PBS 与阿霉素组,PBS 与 LacZ + GV₁₆ 组相比,凋亡率无统计差别($P > 0.05$),说明在此浓度下的阿霉素及携带 LacZ 基因的病毒无明显的诱导 RKO 细胞凋亡作用。分别比较 LacZ 组与 TRAIL 组,LacZ 与 Bax 组及 TRAIL 与 Bax 组,均有统计学差别($P < 0.01$)。提示 TRAIL 和 Bax 基因对 RKO 细胞均有明显的诱导凋亡作用。且 Bax 的作用要强于 TRAIL。比较阿霉素与阿霉素 + LacZ 组,TRAIL 与阿霉素 + TRAIL 组,均提示有统计学

差别($0.01 < P < 0.05, P < 0.01$)。提示加用低浓度的阿霉素后,能促进 LacZ 及 TRAIL 基因对 RKO 细胞的凋亡作用。但比较 Bax 组与阿霉素 + Bax 组,发现两者并无统计差异($P > 0.05$),说明阿霉素并不能提高 Bax 基因诱导 RKO 细胞的凋亡作用。阿霉素 + TRAIL 组与阿霉素 + Bax 组亦有统计差别($0.01 < P < 0.05$)。说明在阿霉素的协同下,TRAIL 诱导 RKO 细胞的凋亡作用要明显强于 Bax。

2.7 TRAIL 基因表达结果的测定

如(图 3)。RT-PCR 产物凝胶电泳显示:Ad/GT-TRAIL + Ad/PGK-GV₁₆ 及其联合阿霉素感染后均可在 413 bp 看到特异性的条带。但联合阿霉素后的条带并不比前者更宽。

表 1 RKO 细胞株在各组干预因素作用 4 d 后的长生抑制率
Tab.1 The growth suppression rate of RKO cell line after treated by DOX and mediating adenoviruses for 4 days

Groups	Suppression rate($\bar{x} \pm s$)
PBS	0%
DOX	20.8% \pm 3.0% Δ
LacZ	11.9% \pm 5.8% Δ
TRAIL	50.1% \pm 8.3% $\square\blacktriangle$
Bax	51.7% \pm 9.6% $\square\blacksquare$
DOX + LacZ	28.5% \pm 10.8% \diamond
DOX + TRAIL	60.3% \pm 7.4%
DOX + Bax	59.1% \pm 7.6% \bullet

Δ Compared with PBS group $P < 0.01$; \square Compared with LacZ group $P < 0.01$; \blacktriangle Compared with DOX + TRAIL group $P < 0.05$; \blacksquare Compared with TRAIL group $P > 0.05$; \diamond Compared with DOX group $P > 0.05$; \bullet Compared with Bax group $P > 0.05$

表 2 RKO 细胞株在各组干预因素作用下 4 d 后的凋亡率
Tab.2 The apoptosis rate of RKO cell line after treated by DOX and mediating adenoviruses for 4 days

Groups	Suppression rate($\bar{x} \pm s$)
PBS	7.5% \pm 5.0%
DOX	9.8% \pm 3.5% Δ
LacZ	9.1% \pm 5.6% Δ
TRAIL	19.8% \pm 2.0% \diamond
Bax	31.9% \pm 8.2% $\diamond\square$
DOX + LacZ	15.2% \pm 3.3% \blacktriangle
DOX + TRAIL	49.0% \pm 6.4% \blacksquare
DOX + Bax	38.5% \pm 5.2% \circ

Δ Compared with PBS $P > 0.05$; \diamond Compared with LacZ $P < 0.01$; \square Compared with TRAIL $P < 0.01$; \blacktriangle Compared with LacZ $P < 0.05$; \blacksquare Compared with DOX + Bax $P < 0.05$; \circ Compared with Bax $P > 0.05$

3 讨论

通过基因手段来治疗肿瘤是广大学者一直来追求的目标。前期研究较多的 Bax 基因,因其对肿瘤细胞和机体正常细胞都有凋亡作用使其应用前景不被看好。而近年发现的 TNF 超家族成员 TRAIL 能选择性地诱导多种肿瘤细胞凋亡而对正常细胞无明显的毒性作用,故引起了广泛的关注,国内学者刘书逊^[7]对 TRAIL 及其受体系统曾有过较为详细的介绍。TRAIL 主要是通过与其受体结合而作用的。目前的研究认为 TRAIL 主要有两类受体。一类为功能型受体,亦称死亡受体(death receptor)。TRAIL 与之结合后可激发细胞的凋亡,此类有 DR4, DR5, 主要分布于转化细胞及肿瘤细胞的表面^[8,9];另一类为无功能型的受体,也称诱骗受体(decoy receptor, DcR)。TRAIL 与之结合后不

能诱导细胞发生凋亡,其主要分布于正常细胞表面^[9-10]。此可能是 TRAIL 选择性致凋亡作用的机理之

图 3 RT-PCR 产物凝胶电泳结果

Fig. 3 Transcription of TRAIL gene tested by RT-PCR
 M: Marker; 1: TRAIL group; 2: DOX + TRAIL group;
 3: LacZ group; 4: PBS group

一。细胞凋亡发生机制极为复杂,目前尚未十分清楚。TRAIL 与其受体接合后可能激发了细胞凋亡通路上多种凋亡促进因子或凋亡抑制因子,而起其选择性凋亡作用的。目前也有许多研究发现不是所有的细胞均对 TRAIL 激发的凋亡作用敏感。肿瘤细胞通过多种途径逃避 TRAIL 诱导凋亡作用。如 Ozoren^[11]等的研究表明,热休克蛋白可以使部分肿瘤细胞对 TRAIL 的凋亡作用不敏感。Tang^[12]等的研究也显示,环氧化酶(COX-2)能够抑制 DR5 的表达,上调 Bcl-2 的水平,而使大肠癌细胞抵制 TRAIL 的凋亡作用。当联合部分化疗药物后,可以增强这种敏感性,且可以克服肿瘤细胞对此种化疗药物的耐药性,故认为此种方法为肿瘤治疗的又一方面^[4,6]。如 Ali^[13], Gliniak^[14], Mizutani^[15]等应用可溶性的 TRAIL 蛋白,对不同的细胞株做了大量的实验,结果较为理想,认为阿霉素,5-Fu, CPT-11 等化疗药物与 TRAIL 在激发肿瘤细胞凋亡中起协同作用。他们的研究认为,上述药物是通过作用于凋亡通路上的一个或多个环节起作用的,如改变 TRAIL 受体的分布与表达,增强 caspase 的活性,抑制 NF- κ B 的活性等来起协同作用的。Naka^[16]的动物实验也表明了化疗药物与 TRAIL 的协同作用。他取新鲜人大肠癌标本建立鼠动物模型后,注射 TRAIL 及 5-Fu, CPT-11;结果显示 5-Fu, CPT-11 均与 TRAIL 有协同作用,且以 CPT-11 明显,有 50% 的鼠的肿瘤在联合应用 TRAIL 与 CPT-11 后完全消除。

基因治疗的优势在于通过改变肿瘤细胞的分子基础而达到从根本上抑制肿瘤的发生和发展。并且 Kagawa^[3]等的研究观察到应用 TRAIL 基因转染肿瘤细胞后,肿瘤细胞的凋亡出现旁观者效应,即在转入

TRAIL 基因的肿瘤细胞周围,未被转入 TRAIL 基因的肿瘤细胞也出现凋亡现象。这就提高了 TRAIL 基因诱导肿瘤细胞凋亡的效率。应用 TRAIL 基因治疗肿瘤的困难之一是构建带有组分启动子的凋亡诱导基因的腺病毒载体,因为其强大的凋亡诱导作用将使病毒包装细胞发生凋亡。在本实验构建的系统中,腺病毒带入 TRAIL cDNA 和 Bax cDNA 以及一个合成启动子(由 5 个 GAL4 结合位点和一个 TATA 盒构成,简称 GT),它们维持了较低水平的基因表达,从而避免了病毒包装细胞的凋亡。当联合感染融合蛋白 GAL4/VP16 的腺病毒后,目的基因就可以在靶细胞中高水平表达,从而引起靶细胞凋亡。以往对 Bax 基因的系统研究已证实这是一个十分有效的腺病毒介导的基因表达系统^[17]。

阿霉素属蒽环类抗生素,能嵌入 DNA 碱基对之间,阻止转录过程,抑制 RNA 合成,也可阻止 DNA 复制,是一种高效广谱的抗肿瘤抗生素。但高剂量的阿霉素有着许多较为严重的毒副作用,心脏毒性是阿霉素主要的临床毒副作用之一。因大量应用后出现严重的心力衰竭而限制了其使用。在本实验中所应用的阿霉素浓度不到临床常规用量血药浓度的二十分之一。且有研究显示,当阿霉素联合 TRAIL 时,也可以引起对阿霉素耐药的细胞株的死亡^[13]。所以两者联合应用,对克服肿瘤细胞的耐药性及用药安全性方面有着重要的临床意义。

本实验应用上述双腺病毒载体携带目的基因 TRAIL,阴性对照基因 LacZ,阳性对照基因 Bax,联合化疗药物阿霉素对大肠癌细胞株 RKO 的生长活性及凋亡率的影响进行的研究显示,载体病毒对 RKO 细胞的生长率有轻度的影响,但不增加 RKO 细胞的凋亡率。阿霉素并不能增加载体病毒的这种生长抑制作用,但却能轻微地增加其对 RKO 细胞的凋亡作用。TRAIL、Bax 基因均对 RKO 细胞有明显的生长抑制及凋亡作用,Bax 比 TRAIL 的致凋亡作用强,但阿霉素能显著增强 TRAIL 的生长抑制及诱导凋亡作用,而对 Bax 无此作用。联合阿霉素后,TRAIL 的凋亡作用要比 Bax 要强。RT-PCR 的结果表明,阿霉素的介入并不能增加 TRAIL 基因的表达。表明阿霉素可能是通过细胞凋亡通路上的其它途径来起作用的,如增加细胞 TRAIL 死亡受体 DR4、DR5 的表达,增强 caspase 的活性等,具体机制有待于进一步的研究。为此我们将作进一步的研究,以探索 TRAIL 基因联合不同药物治疗大肠癌的机理,为临床应用打下基础。

[参考文献]

[1] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, *et al.* Identification and char-

acterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis[J]. *Immunity*, 1995, 3: 673-682.

- [2] Yamashita Y, Shimada M, Tanaka S, *et al.* Electroporation-mediated tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L gene therapy for hepatocellular carcinoma[J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13: 275-286.
- [3] Kagawa S, He C, Gu J, *et al.* Antitumor activity and bystander effects of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 3330-3338.
- [4] Evdokiou A, Bouralexis S, Atkins GJ, *et al.* Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis[J]. *Int J Cancer*, 2002, 99: 491-504.
- [5] Mitsiades CS, Treon SP, Mitsiades N, *et al.* TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: Therapeutic applications[J]. *Blood*, 2001, 98: 795-804.
- [6] Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, *et al.* Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines[J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 734-741.
- [7] 刘书逊. TRAIL/TRAIL 系统与凋亡[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2001, 8(3): 227-230.
- [8] Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, *et al.* The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL[J]. *Science*, 1997, 276: 111-113.
- [9] Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, *et al.* Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors[J]. *Science*, 1997, 277: 818-821.
- [10] Pan G, Ni J, Yu G, *et al.* TRUND, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signaling[J]. *FEBS Lett*, 1998, 424: 41-45.
- [11] Ozoren N, El-Deiry W. Heat shock protects HCT116 and H460 cells from TRAIL-induced apoptosis[J]. *Exp Cell Res*, 2002, 281: 175-181.
- [12] Tang X, Sun YJ, Half E, *et al.* Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits death receptor 5 expression and confers resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human colon cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 4903-4908.
- [13] Jazirehi AR, Ng CP, Gan XH, *et al.* Adriamycin sensitizes the adriamycin-resistant 8226/Dox40 human multiple myeloma cells to Apo2L/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated (TRAIL) apoptosis[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7: 3874-3883.
- [14] Gliniak B, Le T. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand's antitumor activity in vivo is enhanced by the chemotherapeutic agent CPT-11[J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 6153-6158.
- [15] Mizutani Y, Nakao M, Ogawa O, *et al.* Enhanced sensitivity of bladder cancer cells to tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand mediated apoptosis by cisplatin and carboplatin[J]. *J Urol*, 2001, 165: 263-270.
- [16] Naka T, Sugamura K, Hylander BL, *et al.* Effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand alone and in combination with chemotherapeutic agents on patients' colon tumors grown in SCID mice[J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 5800-5806.
- [17] Kagawa S, Pearson SA, Ji L, *et al.* A binary adenoviral vector system for expressing high levels of the proapoptotic gene bax[J]. *Gene Ther*, 2000, 7: 75-79.

[收稿日期] 2003-11-04

[修回日期] 2004-01-20