

· 论 著 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2007 )05-0405-06

**腺病毒提高腺相关病毒在耐药与非耐药肿瘤细胞中的基因表达及其机制**

张圣海<sup>1</sup>▲, 吴继红<sup>1</sup>▲, 董小岩<sup>2</sup>, 吴小兵<sup>2</sup>, 田毓华<sup>1</sup>, 刘新建<sup>1</sup>, 黄倩<sup>1\*</sup>( 1. 上海交通大学附属第一人民医院 中心实验室, 上海 200080; 2. 中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所 分子病毒和基因工程国家重点实验室, 北京 100052 )

**[ 摘要 ]** 目的: 研究利用低剂量腺病毒提高重组腺相关病毒 2 型( recombinant adeno-associated virus, rAAV2 )在耐药与非耐药肿瘤细胞中基因表达水平的新方法, 并初步探讨其可能的作用机制。方法: rAAV2-GFP 单独或联合复制缺陷型腺病毒( Ad5-RFP )或条件复制型腺病毒( Ad5-TERT-RFP )感染人非小细胞肺癌细胞系( NCI-H446 )、人肺腺癌细胞系( A549 )、人胃癌细胞系( SGC7901 )、人口腔黏膜上皮癌细胞系( KB )和人口腔黏膜上皮癌耐长春新碱细胞系( KB/VCR )。荧光显微镜观察和流式细胞仪分析肿瘤细胞感染后 GFP 的表达; Western blotting 检测感染后肿瘤细胞 GFP 蛋白表达及 ERK 和 AKT 磷酸化水平; Real-time PCR 检测肿瘤细胞内 GFP 的 mRNA 表达量、DNA 拷贝数, 以及细胞表面受体 HSPG、 $\alpha_v$  integrin 和 FGFR-1 的 mRNA 表达。结果: 流式细胞结果显示, rAAV2-GFP 联合 Ad5-RFP 或 Ad5-TERT-RFP 感染肿瘤细胞 24 h 后, GFP 阳性细胞率和 GFP 平均荧光亮度分别提高了约 0.3 ~ 3 倍和 4 ~ 8 倍。Western blotting 证实联合应用 Ad5-RFP 感染肿瘤细胞后 24 h, GFP 蛋白表达增加约 4 ~ 6 倍, 肿瘤细胞内 ERK 和 AKT 磷酸化水平升高。联合感染后细胞内 GFP 的 mRNA 表达量提高了 3.83 ~ 7.33 倍, DNA 拷贝数未见明显改变, HSPG、 $\alpha_v$  integrin 和 FGFR-1 的 mRNA 表达轻微提高。结论: 低剂量腺病毒显著提高 rAAV2 在耐药与非耐药肿瘤细胞中的基因表达水平, 可能与激活信号传导通路、增加细胞内转录有关。

**[ 关键词 ]** 重组腺相关病毒; 复制缺陷型腺病毒; 条件复制型腺病毒; 肿瘤细胞; 基因表达

[ 中图分类号 ] R730.54

[ 文献标志码 ] A

**Adenovirus enhances adeno-associated virus expression in drug-sensitive and drug-resistant tumor cells and the related mechanism**

ZHANG Sheng-hai<sup>1</sup>▲, WU Ji-hong<sup>1</sup>▲, DONG Xiao-yan<sup>2</sup>, WU Xiao-bing<sup>2</sup>, TIAN Yu-hua<sup>1</sup>, LIU Xin-jian<sup>1</sup>, HUANG Qian<sup>1\*</sup>( 1. Central Laboratory, The First People's Hospital of Shanghai Affiliated to Shanghai Jiaotong University 200080, China; 2. State Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, China Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China )

**[ Abstract ] Objective:** To investigate the enhancing effect of low dose adenovirus on rAAV2 expression in drug-sensitive and drug-resistant tumor cells and to explore the related mechanism. **Methods:** Human small cell lung cancer NCI-H446 cells, human lung adenocarcinoma A549 cells, human gastric cancer SGC7901 cells, human oral epithelial cancer KB cells, and VCR-resistant KB cells ( KB/VCR ) were transfected with rAAV2-GFP alone or combined with Ad5-RFP or with Ad5-TERT-RFP. GFP expression in the infected tumor cells was observed and analyzed by fluorescence microscope and fluorescence activated cell sorting ( FACS ). GFP protein and phosphorylation level of ERK and AKT in the infected tumor cells were detected by Western blotting. Quantitative analysis of DNA copies of GFP and mRNA expression of GFP, HSPG,  $\alpha_v$  integrin, FGFR-1 in the infected tumor cells were performed by Real-time PCR. **Results:** The results of FACS demonstrated that the mean intensity of GFP fluorescence and the GFP positive rate after infection with rAAV2-GFP com-

**[ 基金项目 ]** 国家自然科学基金杰出青年资助项目( No. 30325043 ); 国家重点基础研究发展( 973 )计划资助项目( No. 2004CB518804 ); 上海市卫生局医学领军人才基金资助项目; 上海市科委攻关计划( No. 064119539 )。Supported by the National Natural Science Foundation of China ( No. 30325043 ); The Major State Basic Research Development Program ( 973 ) of China ( No. 2004CB518804 ); the Shanghai Outstanding Field Leaders Program; Key Science and Technology Research Project of Shanghai ( No. 064119539 )

**[ 作者简介 ]** 张圣海( 1972- )男, 山东省泰安市人, 博士研究生, 主要从事肿瘤及眼底病基因治疗方面的研究; 吴继红( 1971- ), 女, 辽宁省沈阳市人, 副研究员, 主要从事眼底病基因治疗方面的研究

▲两者对本研究贡献相同, 同为第一作者

\* Corresponding author. E-mail: qhuang@sjtu.edu.cn

combined with Ad5-RFP or Ad5-TERT-RFP increased by 0.3-3 and 4-8 folds, respectively. GFP expression in the tumor cells with combined infection showed 4-6 folds increase and the phosphorylation level of ERK and AKT also increased. GFP mRNA expression in the combined infection tumor cells increased by 3.83-7.33 folds; there was no differences in the GFP DNA copies between rAAV2-GFP group and rAAV2-GFP plus Ad5-RFP group. Cellular receptors HSPG,  $\alpha_v$  integrin and FGFR-1 mRNA expression was slightly increased in rAAV2-GFP plus Ad5-RFP. **Conclusion:** Lower dose of recombinant adenovirus can obviously enhance the expression of rAAV2 in drug-sensitive and drug-resistant tumor cells, which might be related to the activation of signal transduction pathway and increase of intracellular transcription.

[ **Key words** ] recombinant adeno-associated virus; replication-defective adenovirus; replication-conditional adenovirus; tumor cells; gene expression

[ Chin J Cancer Biother, 2007, 14(5): 405-410 ]

重组腺相关病毒(recombined adeno-associated virus, rAAV)具有免疫源性低、安全性好、介导外源基因稳定表达等独特的优越性,是基因治疗领域理想的病毒载体<sup>[1-4]</sup>。rAAV介导血管抑制因子或免疫调节因子在恶性肿瘤基因治疗中逐渐显示出巨大的应用潜力<sup>[5-9]</sup>。但是,rAAV在肿瘤细胞中的转导效率和基因表达水平相对较低,且外源基因需要较长时间才开始表达,所以在实际应用中难以达到预期的治疗效果<sup>[10-12]</sup>。这一局限性,像瓶颈一样束缚着rAAV在肿瘤基因治疗领域的应用,迫切需要得到解决。本实验研究了低剂量腺病毒加快并提高rAAV在肿瘤细胞中基因表达水平的新方法,并初步探讨了其可能的机制,为进一步改善恶性肿瘤基因治疗效果提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和主要试剂

人非小细胞肺癌细胞系 NCI-H446、人肺腺癌细胞系 A549 和人胃癌细胞系 SGC7901 分别由中国科学院上海生命科学院细胞资源中心、上海交通大学肿瘤研究所和第四军医大学提供。涉及人口腔黏膜上皮癌细胞系 KB 和人口腔黏膜上皮癌耐长春新碱细胞系 KB/VCR 的实验在中国科学院上海药物研究所完成。

A549 和 SGC7901 细胞分别采用含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12、10% 新生小牛血清的 RPMI 1640 培养液培养; NCI-H446 细胞、KB 细胞和 KB/VCR 细胞用含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养液培养。复制缺陷型腺病毒(Ad5-RFP)和 TERT 调控 E1A/E1B 表达的条件复制型腺病毒(Ad5-TERT-RFP)由本实验室构建并保存,这两种病毒载体均由 CMV 启动子调控 RFP 表达。rAAV2-GFP 购自本元正阳基因有限公司。

小鼠抗 GFP 单抗购自 MBL 公司;小鼠抗 AKT、

p-AKT、ERK 和 p-ERK 单抗均购自 Cell Signal Technology 公司;羊抗小鼠二抗购自 Santa Cruz 公司;化学发光试剂盒 Lumi-LightPLUS Western Blotting Kit 购自 Roche 公司;DMEM 培养液、DMEMF-12 培养液、RPMI 1640 培养液、一步法总 RNA 抽提试剂 TRIzol Reagent、Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG 和 Superscript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis system for RT-PCR 均购自 Invitrogen 公司;细胞基因组 DNA 抽提试剂盒为 TAKARA 公司产品。

### 1.2 荧光显微镜观察和 FACS 检测肿瘤细胞感染后 GFP 的表达

分别将 SGC7901、NCI-H446、A549、KB 和 KB/VCR 细胞按  $1 \times 10^4$  个/孔接种在 24 孔细胞培养板中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,24 h 后细胞贴壁。rAAV2-GFP 的使用量为  $1 \times 10^4$  vg/cell;联合应用的腺病毒的感染复数(MOI)如下:Ad5-RFP 分别为 0.1、1、10 和 100 MOI;Ad5-TERT-RFP 分别为 0.1、1 和 10 MOI。rAAV2-GFP 单独或分别联合不同 MOI 的 3 种腺病毒感染上述肿瘤细胞。每种肿瘤细胞都设有空白对照孔和仅加入不同 MOI 的 3 种腺病毒孔,每个实验孔和对照孔都设有 3 个复孔。感染后 12、24 和 72 h 用倒置荧光显微镜(德国 Zeiss Axio 100)观察并照相记录被感染的细胞 GFP 荧光亮度和病变状态。流式细胞仪(BeckMan coulter EPICS XL)检测被感染的肿瘤细胞中 GFP 阳性率和平均荧光强度。上述实验重复 3 次。

### 1.3 Western blotting 检测肿瘤细胞感染后 GFP、AKT、p-AKT、ERK 和 p-ERK 蛋白的表达

将肿瘤细胞 A549、KB、KB/VCR 分别按  $1 \times 10^5$  个/孔接种在 6 孔细胞培养板中,24 h 后细胞贴壁。rAAV2-GFP( $10^4$  vg/cells)联合 Ad5-RFP(1 MOI)分别感染上述肿瘤细胞,每种肿瘤细胞都设有空白对照孔和仅加入腺病毒孔。感染后 24 h 弃培养液,收取细胞蛋白成分,采用 Western blotting 分别检测 A549、KB

和 KB/VCR 细胞中 GFP 表达及 A549 细胞中 AKT、p-AKT、ERK 和 p-ERK 蛋白水平<sup>[13]</sup>。GFP、AKT、p-AKT、ERK 和 p-ERK 的抗体稀释比例分别为 1:1 000、1:500、1:1 000、1:1 000 和 1:1 000,羊抗小鼠二抗稀释比例为 1:2 000。采用 Image pro Plus 专业图像分析软件对 Western blotting 结果进行定量分析。

#### 1.4 Real-time PCR 检测病毒感染 A549 细胞后 GFP、HSPG、 $\alpha_v$ integrin 和 FGFR-1 的 mRNA 表达及 GFP 基因 DNA 拷贝数

将 A549 细胞按  $1 \times 10^4$  个/孔接种在 24 孔培养板中, rAAV2-GFP ( $1 \times 10^4$  vg/cell) 单独或联合 Ad5-RFP (1 MOI) 感染细胞。设空白对照孔和仅加入腺病毒孔,每孔都设 2 个复孔。于感染后 12、24、48 和 72 h,分别制备细胞总 RNA 和 DNA。以 GAPDH 为内参,待测样本均做复孔,Real-time PCR 检测 A549 感染后 GFP、HSPG、 $\alpha_v$  integrin 和 FGFR-1 的 mRNA 表达及 GFP 基因 DNA 拷贝数。扩增条件:95 °C、2 min 预变性,然后按 94 °C、30 s,55 °C、30 s,72 °C、30 s,扩增 40 个循环<sup>[13]</sup>。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

Gene	Primer sequences	bp
HSPG	5'-CGATGACTACGCTTCTGC-3'	209
	5'-TATCCTCTTCGGCTGGGT-3'	
FGFR1	5'-CCTACTTCTCCGTCATGTTT-3'	210
	5'-CACTGGAAGGGCATTGAAC-3'	
$\alpha_v$ integrin	5'-AGGCAGTGCTATTCCCAGTA-3'	199
	5'-CCCCTAACTCTGGTCACATA-3'	
GFP	5'-AGAAGAACGGCATCAAGGTG-3'	200
	5'-GAACTCCAGCAGGAC CATGT-3'	
GAPDH	5'-ATGGAATCCCATCACCATCTT-3'	241
	5'-CGCCCACTTGATTTTGG-3'	

采用比较 Ct 法处理荧光实时定量 PCR 数据,计算公式为: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  $\Delta\Delta Ct = (\text{实验组 mRNA Ct 或 DNA Ct} - \text{实验组 GAPDH mRNA Ct 或 DNA Ct}) / (\text{阴性对照组 mRNA Ct 或 DNA Ct} - \text{阴性对照组 GAPDH mRNA Ct 或 DNA Ct})$ ,计算结果表示实验组目的基因 mRNA 或 DNA 表达量对阴性对照组目的基因 mRNA 或 DNA 表达量的比值<sup>[14-15]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 肿瘤细胞感染后 GFP 的表达及细胞病变

rAAV2-GFP 单独感染 5 种肿瘤细胞后 24 h 才能观察到微弱的 GFP 荧光。联合 Ad5-RFP (0.1、1、10 或 100 MOI) 或 Ad-TERT-RFP (0.1、1 或 10 MOI) 感染肿瘤细胞后 12 h 即可观察到 GFP 荧光;随后,GFP 阳性细胞数量和荧光亮度均迅速增加;在相同时间点,与单独感染的细胞相比,无论是 GFP 阳性细胞数量,还是 GFP 荧光亮度都显著提高(图 1)。然而,并不是表达 GFP 荧光细胞都表达 RFP 荧光(图 2)。感染后 24 h 流式细胞术检测结果显示,联合感染与单独感染的肿瘤细胞相比,GFP 阳性细胞率和 GFP 平均荧光亮度分别提高了约 0.3 ~ 3 倍和 4 ~ 8 倍(图 3)。以 rAAV2-GFP 单独或联合 1 MOI Ad5-RFP 感染肿瘤细胞 A549、KB 和 KB/VCR 为例,感染后 24 h Western blotting 检测细胞内 GFP 蛋白含量,联合应用比单独应用分别提高了 6.1、4.5 和 4.9 倍(图 4)。值得一提的是,联合应用的 Ad5-RFP 或 Ad-TERT-RFP 的 MOI 值越高,GFP 阳性细胞数量和平均荧光亮度提高的幅度越大。但是,当 100 MOI Ad5-RFP 或 10 MOI Ad-TERT-RFP 联合感染肿瘤细胞 72 h 后,有较多的细胞变圆、漂浮,呈凋亡征象。

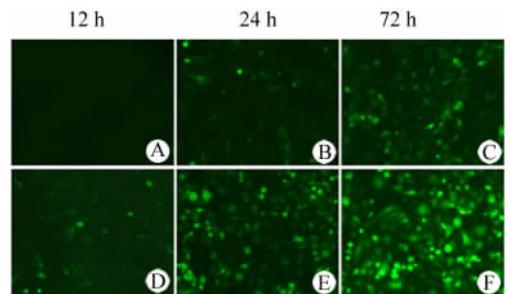


图 1 荧光显微镜观察 A549 细胞感染后 GFP 荧光表达(×100)

Fig1 GFP expression in A549 cells after infection under inverted fluorescent microscope(×100)

A, B, C: rAAV2-GFP transfection at 12, 24, and 72 h after infection, respectively; D, E, F: rAAV2-GFP plus 1 MOI Ad5-RFP at 12, 24, 72 h after infection, respectively

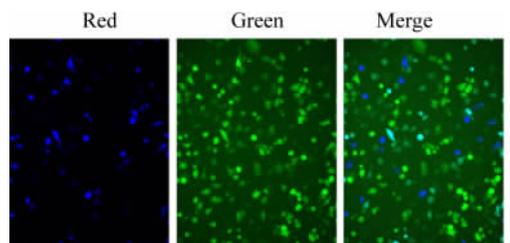


图 2 双通道荧光显微镜观察 A549 细胞感染后 GFP 及 RFP 荧光表达(×100)

Fig. 2 GFP and RFP expression in A549 cells after infection under double channel fluorescent microscope (×100)

2.2 肿瘤细胞病毒感染后 GFP 的 DNA 拷贝数和 mRNA 的表达

与单独使用 rAAV2-GFP 相比,联合 1 MOI Ad5-RFP 感染 A549 细胞后 12、24、48 和 72 h, GFP 的 DNA 拷贝数未见明显变化,而 mRNA 表达按照时间顺序分别提高了约 3.83、6.83、7.02 和 7.33 倍(表 2)。

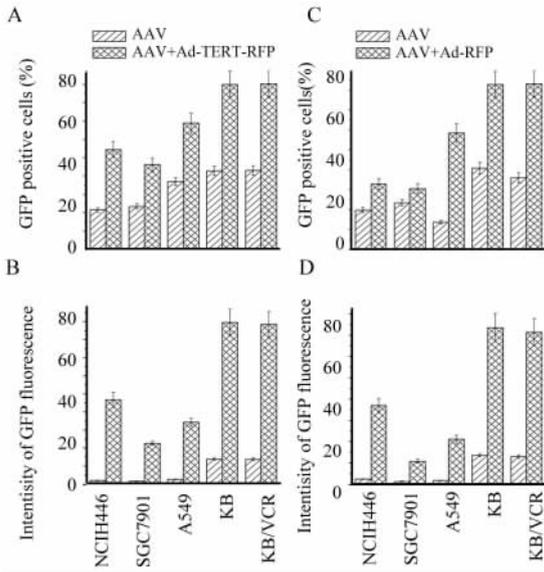


图 3 流式细胞术分析 rAAV2-GFP 单独或联合 1 MOI Ad5-RFP 或 0.1 MOI Ad-TERT-RFP 感染肿瘤细胞 GFP 的表达

Fig.3 Quantitative analysis of GFP expression in tumor cells infected by rAAV2-GFP alone or combined with 1 MOI Ad5-RFP or 0.1 MOI Ad-TERT-RFP 24 h after infection

A, B: Combined with 0.1 MOI Ad-TERT-RFP;  
C, D: Combined with 1 MOI Ad5-RFP

表 2 rAAV2-GFP 单独或联合 1 MOI Ad5-RFP 感染 A549 细胞后 GFP 的 DNA 拷贝数和 mRNA 表达及细胞表面受体 mRNA 表达

Tab.2 DNA copies and mRNA expression of GFP and cellular surface receptors in A549 cells infected by rAAV2-GFP alone or combined with 1MOI Ad5-RFP

Gene of interest	$2^{-\Delta\Delta\Delta\Delta(1)}$			
	12 h	24 h	72 h	120 h
GFP genome	1.02 ± 0.24	1.05 ± 0.12	0.96 ± 0.27	0.87 ± 0.23
GFP mRNA	3.83 ± 0.57	6.83 ± 0.76	7.02 ± 0.46	7.33 ± 0.14
HSPG mRNA	1.98 ± 0.77	2.35 ± 0.28	1.06 ± 0.84	1.17 ± 1.22
$\alpha_v$ integrin mRNA	2.34 ± 0.25	2.66 ± 0.46	2.17 ± 0.44	0.94 ± 0.60
FGFR-1 mRNA	0.96 ± 0.69	1.36 ± 0.57	1.01 ± 0.79	1.26 ± 0.88

3 讨论

尽管 rAAV 是目前基因治疗领域最安全的病毒

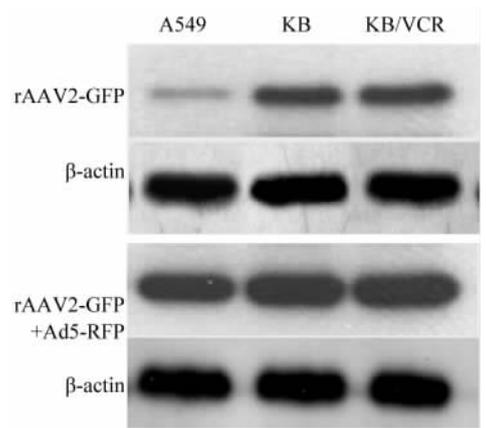


图 4 rAAV2-GFP 单独或联合 1 MOI Ad5-RFP 感染肿瘤细胞后 GFP 蛋白的表达

Fig.4 Expression of GFP protein in tumor cells infected by rAAV2-GFP alone or combined with 1 MOI Ad5-RFP

2.3 肿瘤细胞感染后细胞表面受体 HSPG、 $\alpha_v$  integrin 和 FGFR-1 的 mRNA 表达

单独使用 rAAV2-GFP 感染 A549 细胞不引起 HSPG、 $\alpha_v$  integrin 和 FGFR-1 mRNA 表达的改变。联合 1 MOI Ad5-RFP 感染细胞后,HSPG、 $\alpha_v$  integrin 和 FGFR-1 的 mRNA 表达均有轻微提高,其中以感染 24 h 后升高较为明显(表 2)。

2.4 Western blotting 检测肿瘤细胞感染后 AKT 和 ERK 的磷酸化水平

A549 肿瘤细胞感染后 24 h, Western blotting 检测 AKT、p-AKT、ERK 和 p-ERK 的蛋白含量,表明联合 Ad5-RFP 后,ERK 和 AKT 的磷酸化水平均有提高(图 5)。

载体,但它介导外源基因表达所需时间长、对肿瘤细胞的转导效率和基因表达水平低,这些缺点在很大程度上限制了 rAAV 在恶性肿瘤基因治疗中的应

用<sup>[12]</sup>。因此,如何提高 rAAV 对细胞的转导效率和基因表达水平,已经引起越来越多的学者的关注和重视。本实验利用低剂量腺病毒加快并提高 rAAV2 在多种肿瘤细胞中的基因表达水平,并研究了与 rAAV2 进入细胞相关的主要受体的变化及可能的作用机制。

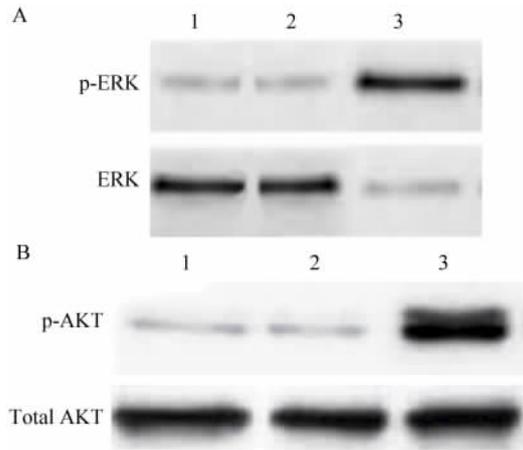


图5 rAAV2-GFP 单独或联合 1 MOI Ad5-RFP 感染 A549 细胞后 ERK (A) 和 AKT (B) 的磷酸化水平  
Fig.5 Phosphorylation level of ERK (A) and AKT (B) in A549 cells infected by rAAV-GFP alone or combined with 1 MOI Ad5-RFP

A: A549 cells infected with rAAV-GFP alone; B: A549 cells infected with rAAV-GFP combined with 1 MOI Ad5-RFP  
1: Negative; 2: rAAV2-GFP; 3: rAAV-GFP + Ad5-RFP

实验结果显示,不管是复制缺陷型(Ad5-RFP)还是条件复制型腺病毒(Ad-TERT-RFP),均可以加快和提高 rAAV2 介导的外源基因在肿瘤细胞中的表达水平。并且,随着所使用的腺病毒的 MOI 增加,外源基因表达水平提高的幅度也增加。但当 Ad5-RFP 的 MOI 为 100、Ad-TERT-RFP 的 MOI 为 10 时,细胞在被感染后 72 h 就会出现凋亡。这一结果提示,从提高 rAAV2 基因表达水平的角度讲,腺病毒存在一个最佳的滴度范围,即在这个滴度范围内,腺病毒既能最大限度的提高 rAAV2 在细胞中的表达水平,又不导致细胞的病变。同时,在这个最佳范围内,腺病毒滴度越低,产生的不良反应越小,越容易在实际应用中得到采纳。此外,实验结果还提示,在使 rAAV2 达到相同的基因表达水平的条件下,所需要 Ad5-TERT-RFP 的滴度比 Ad5-RFP 低 10 倍。尤其值得一提的是,这种利用低剂量腺病毒提高 rAAV 基因表达水平的方法,不仅适用于非耐药的肿瘤细胞,同样适用于耐药细胞,具有较广泛的应用范围。

腺病毒可以作为辅助病毒使野生型腺相关病毒产生毒性复制。同样,在重组腺相关病毒的制备过程中需要腺病毒的参与<sup>[16]</sup>。有研究报道腺病毒中参与提供辅助功能的基因包括 E1A、E1B、E2A 和 E4。其中,E4(orf6)可以提高 rAAV2 的转导效率并促进 rAAV2 由单链转变成双链<sup>[17-19]</sup>;E2A 可以促进环形双链 DNA 的形成<sup>[20]</sup>。

本实验涉及的复制缺陷型和条件复制型腺病毒基因组都包括 E2A 和 E4 区域,为了进一步探讨 E2A 和 E4 在提高 rAAV2 基因表达水平中的作用,专门检测了 rAAV2 单独或联合腺病毒感染肿瘤细胞后 GFP 的 DNA 拷贝数和 mRNA 表达,结果发现 DNA 没有发生明显变化,只是 mRNA 水平显著提高。同时,rAAV2 进入细胞的主要受体 HSPG、 $\alpha_v$  integrin 和 FGFR-1 在联合感染腺病毒后只有轻微升高,这种升高程度不足以引起 rAAV-2 介导的外源基因水平的成倍增加。这些结果反映出腺病毒提高 rAAV2 在肿瘤细胞中的基因表达水平可能是在转录水平起作用的。

Western blotting 结果表明,Ad5-RFP 可以使肿瘤细胞内 ERK 和 AKT 的磷酸化水平提高。ERK 可以直接进入细胞核促进细胞转录过程,而 AKT 可以通过激活细胞增殖和存活的相关信号通路,来提高细胞内转录过程,使基因表达水平提高。然而,并不是所有被 rAAV2-GFP 感染后表达 GFP 荧光的肿瘤细胞均能被 Ad 感染和表达 RFP 荧光,也并不是被 Ad 感染后表达 RFP 荧光的细胞都表达 GFP 荧光。只有 5% ~ 10% 的细胞同时表达 RFP 和 GFP 荧光。对于这个现象可能的解释是,腺病毒提高腺相关病毒基因表达水平,也许不仅仅是由于腺病毒直接进入细胞,引起相关的信号传导通路的变化,还可能跟其他因素有关,例如,被腺病毒感染的肿瘤细胞在腺病毒作用下分泌某些因子,这些因子可以对周围未被感染的细胞产生作用,最终导致细胞转录过程加快或提高。至于被腺病毒感染的细胞中只有 40% ~ 50% 表达 GFP 荧光的原因,目前还无法解释。

Ad5-RFP 和 Ad-TERT-RFP 加快和提高 rAAV2 在肿瘤细胞中的基因表达水平,可能涉及更加复杂的信号转导过程,有待于进一步深入研究并找出其中关键的环节和因素,为探寻提高 rAAV2 在肿瘤细胞中的转导效率和基因表达的有效方法提供理论依据。

#### [ 参考文献 ]

[ 1 ] Witlox MA, Lamfers ML, Wuisman PI, et al. Evolving gene ther-

- apy approaches for osteosarcoma using viral vectors: review[ J ]. Bone, 2007, 40( 4 ): 797-812.
- [ 2 ] Young LS, Searle PF, Onion D, *et al.* Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application[ J ]. J pathol, 2006, 208( 2 ):299-318.
- [ 3 ] Zaiss AK, Muruve DA. Immune responses to adeno-associated virus vectors[ J ]. Curr Gene Ther, 2005, 5( 3 ): 323-331.
- [ 4 ] Verma IM, Weitzman MD. Gene therapy: twenty-first century medicine[ J ]. Annu Rev Biochem, 2005, 74: 711-738.
- [ 5 ] Mahadevan M, Liu Y, You C, *et al.* Generation of robust cytotoxic T lymphocytes against prostate specific antigen by transduction of dendritic cells using protein and recombinant adeno-associated virus[ J ]. Cancer Immunol Immunother, 2007, 56( 10 ): 1615-1624.
- [ 6 ] Ma H, Liu Y, Liu S, *et al.* Oral adeno-associated virus-sTRAIL gene therapy suppresses human hepatocellular carcinoma growth in mice[ J ]. Hepatology, 2005, 42( 6 ): 1355-1363.
- [ 7 ] Ponnazhagan S, Mahendra G, Lima J, *et al.* Augmentation of antitumor activity of a recombinant adeno-associated virus carcinoembryonic antigen vaccine with plasmid adjuvant[ J ]. Hum Gene Ther, 2004, 15( 9 ): 856-864.
- [ 8 ] Mohr A, Henderson G, Dudus L, *et al.* AAV-encoded expression of TRAIL in experimental human colorectal cancer leads to tumor regression[ J ]. Gene Ther, 2004, 11( 6 ): 534-543.
- [ 9 ] Paul D, Qazilbash MH, Song K, *et al.* Construction of a recombinant adeno-associated virus ( rAAV ) vector expressing murine interleukin-12 ( IL-12 ) [ J ]. Cancer Gene Ther, 2000, 7( 2 ): 308-315.
- [ 10 ] El-Aneed A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy[ J ]. J Control Release, 2004, 94( 1 ): 1-14.
- [ 11 ] Ponnazhagan S. Parvovirus vectors for cancer gene therapy[ J ]. Expert Opin Biol Ther, 2004, 4( 1 ): 53-64.
- [ 12 ] Carter PJ, Samulski RJ. Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles[ J ]. Int J Mol Med, 2000, 6( 1 ): 17-27.
- [ 13 ] 张圣海,吴继红,刘新建,等. 依托泊苷提高复制缺陷型腺病毒介导外源基因在肿瘤细胞中的表达水平[ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007, 14( 1 ): 14-20.
- [ 14 ] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[ J ]. Nucleic Acids Res, 2001, 29( 9 ): e45.
- [ 15 ] Vu HL, Troubetzkoy S, Nguyen HH, *et al.* A method for quantification of absolute amounts of nucleic acids by ( RT )-PCR and a new mathematical model for data analysis[ J ]. Nucleic Acids Res, 2000, 28( 7 ): E18.
- [ 16 ] Geoffroy MC, Salvetti A. Helper functions required for wild type and recombinant adeno-associated virus growth[ J ]. Curr Gene Ther, 2005, 5( 3 ): 265-271.
- [ 17 ] Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, *et al.* Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors[ J ]. J Virol, 1996, 70( 5 ): 3227-3234.
- [ 18 ] Fisher KJ, Gao GP, Weitzman MD, *et al.* Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis[ J ]. J Virol, 1996, 70( 1 ): 520-532.
- [ 19 ] Sanlioglu S, Duan D, Engelhardt JF. Two independent molecular pathways for recombinant adeno-associated virus genome conversion occur after UV-C and E4orf6 augmentation of transduction [ J ]. Hum Gene Ther, 1999, 10( 4 ): 591-602.
- [ 20 ] Duan D, Sharma P, Yang J, *et al.* Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue[ J ]. J Virol, 1998, 72( 11 ): 8568-8577.
- [ 收稿日期 ] 2007 - 06 - 25 [ 修回日期 ] 2007 - 08 - 16  
[ 本文编辑 ] 郁晓路

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中计量单位使用的要求

本刊严格执行国务院颁发的《中华人民共和国法定计量单位》，全面贯彻国家标准 GB3100-3102-1993《量和单位》的规定，正确使用量和单位的名称和符号。(1) 量符号以斜体拉丁和希腊字母表示 (pH 用正体除外)，例如  $m$  (质量)、 $t$  (时间)、 $c$  (浓度)、 $V$  (体积)、 $p$  (压力)、 $F$  (力) 等。(2) 单位符号一律以正体拉丁或希腊字母表示，例如 kg (千克)、m (米)、h (小时)、mol/L (摩尔每升) 等。(3) 表示人体检验指标的量浓度或质量浓度时，一般使用 L (升) 作为检验组成含量单位的分母。(4) 表示用药剂量单位时，不能写成 mg/kg/d 的形式，应写成 mg/(kg·d) 或  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  的形式。(5) 单位符号常见书写错误：长度单位符号  $\text{\AA}$  (埃) 已不用，应写作 0.1 nm；时间单位“小时”符号为 h (不是 hr)、“秒”符号为 s (不是 sec)；转速单位符号为 r/min (不是 rpm)；量浓度单位符号为 mol/L (不是 M、N，也不是 mol/mm<sup>3</sup>)；力的单位“牛顿”符号为 N [不是 dyn (达因)]、kgf (千克力)，换算 1 dyn = 10<sup>-5</sup> N；热量单位“焦耳”符号为 J [不是 cal (卡)、kcal (千卡)]，换算 1 cal = 4.187 J；放射性活度单位符号为 Bq [不是 Ci (居里)]，换算 1 Ci = 3.7 × 10<sup>10</sup> Bq。

(本刊编辑部)