

[文章编号] 1007-385X(2008)03-0243-05

· 论 著 ·

腺病毒介导人 VEGF-siRNA 对裸鼠移植骨肉瘤的抑制作用

高悠水, 梅炯*, 童天朗, 胡牧, 薛华明, 蔡宣松 (同济大学 同济医院 骨科, 上海 200065)

[摘要] 目的: 研究腺病毒介导人 VEGF-siRNA 对裸鼠移植骨肉瘤的治疗作用。方法: 利用腺病毒重组技术将 VEGF-siRNA 基因克隆入增殖缺陷型腺病毒基因组中, 构建重组腺病毒 Ad-VEGF-siRNA, 重组腺病毒体外感染骨肉瘤 MG63 细胞, RT-PCR 检测 MG63 细胞 VEGF 的表达水平。建立荷人骨肉瘤 MG63 裸小鼠动物模型, 以 Ad-VEGF-siRNA 瘤组织注射治疗, 检测移植瘤组织中 VEGF 的表达情况及 Ad-VEGF-siRNA 对肿瘤生长和肺转移的抑制作用。结果: 成功构建了表达 VEGF-siRNA 的重组腺病毒载体 Ad-VEGF-siRNA; 体外与体内实验检测 Ad-VEGF-siRNA 转染骨肉瘤细胞 MG63 后显著抑制 VEGF 表达。荷人骨肉瘤裸鼠经 Ad-VEGF-siRNA 治疗后, 显示其对移植骨肉瘤生长有明显抑制作用 ($P < 0.05$), 并且对骨肉瘤的肺转移有显著的抑制作用 ($P < 0.05$)。结论: 所构建的 Ad-VEGF-siRNA 可以有效抑制骨肉瘤中 VEGF 表达, 使裸鼠移植骨肉瘤生长减慢, 并且显著抑制荷瘤裸小鼠肺转移的发生。

[关键词] 腺病毒; 血管内皮生长因子; 骨肉瘤; RNA 干扰; 基因治疗; 抗血管生成治疗

[中图分类号] R738.1; R730.54

[文献标志码] A

Inhibitory effect of adenovirus mediated VEGF-siRNA on transplanted osteosarcoma in nude mice

GAO You-shui, MEI Jiong*, TONG Tian-lang, HU Mu, XUE Hua-ming, CAI Xuan-song (Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of adenovirus-mediated VEGF-siRNA on transplanted osteosarcoma in nude mice. **Methods:** VEGF-siRNA gene was cloned into the genome of replication-deficient adenovirus to construct Ad-VEGF-siRNA; the latter was then used to infect osteosarcoma MG63 cell line *in vitro*; and the expression of VEGF gene was detected by RT-PCR. Osteosarcoma transplantation model was established in nude mice; VEGF expression in tumor tissue was analyzed and the inhibitory effect on tumor growth and lung metastasis were also observed. **Results:** The recombinant adenovirus vector Ad-VEGF-siRNA was successfully constructed. *In vivo* and *in vitro* experiment both showed that Ad-VEGF-siRNA significantly downregulated VEGF expression in MG63 cells and transplanted tumor tissue. It was found that Ad-VEGF-siRNA significantly inhibited transplanted osteosarcoma growth ($P < 0.05$) and lung metastasis ($P < 0.05$) in tumor-bearing nude mice. **Conclusion:** The constructed Ad-VEGF-siRNA can effectively inhibit the expression of VEGF, depress transplanted tumor growth, and inhibit lung metastasis in nude mice.

[Key words] adenovirus; vascular endothelial growth factor (VEGF); osteosarcoma; RNA interference (RNAi); gene therapy; antiangiogenic therapy

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(3): 243-247]

骨肉瘤作为一种富含血管的恶性肿瘤, 其生长和转移都有赖于新生血管的形成, 而血管生成促进因子尤其是血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在这一过程中有着重要作用。自从 Folkman^[1] 提出将肿瘤新生血管作为治疗靶向的抗血管生成治疗 (antiangiogenic therapy) 以后, 一系列实验已经证实其具有理想的治疗作用^[2-3]。和抗血管生成化疗 (antiangiogenic chemotherapy) 不同, 本实验采用基因治疗手段, 构建了携带人 VEGF-

siRNA 基因的复制缺陷型腺病毒载体, 通过进行体内外实验观察对荷人骨肉瘤裸小鼠的治疗效果, 为骨肉瘤的抗血管生成基因治疗提供一定的参考。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30471760)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30471760)

[作者简介] 高悠水 (1981-), 男, 安徽省无为县人, 硕士研究生, 主要从事骨肿瘤的基础研究

* Corresponding author. Tel: 021-66111092; E-mail: meijiong@163.com

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

质粒 pSilencer3.1-neo-H1 购于美国 Ambion 公司,质粒载体 pDC311 与腺病毒载体 pHGE3 购于加拿大 Microbix Biosystems 公司。人血清 5 型腺病毒(WAd5)、Ad-EGFP 由第二军医大学基因病毒研究室提供, MG63 细胞系来自美国 ATCC 由中国典型培养物保藏中心(CATCC)提供; 293 细胞系购于加拿大 Microbix Biosystems 公司。BALB/c 裸鼠, 4~6 周龄, 由中科院上海实验动物中心提供[实验动物合格证号: SCXK(沪)2004-0002]。DMEM 培养液、胰酶、胎牛血清、RPMI 1640 培养液购自 Gibco 公司, Envision 免疫组化试剂盒购自丹麦 DAKO 公司, Superscript III 逆转录酶试剂盒、各种 PCR 反应酶购自 Invitrogen 公司, Whatman 3MM 滤纸购于 Whatman 公司, DAB 显色剂购自上海华舜公司。

1.2 载体 pSilencer3.1-H1-VEGF-siRNA 的构建

实验选择人 VEGF 基因外显子 3 的碱基编码序列(5'-AAGCTACTGCC ATCCAATCGA-3')作为实施干扰靶序列, 相应设计小片段干扰 RNA 为 5'-GC-UACUGCCAUCCAUCGAdTdT-3' (sense); 3'-dT-dTCGAUGACGGUAGGUUAGCU-5' (antisense), 将正向序列 19 bp 和反向序列 19 bp 之间插入 9 bp 与编码区非同源的内含子序列, 从而形成短发夹状 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 框架, 交由上海博亚生物技术有限公司化学合成该 dsDNA, 命名为 VEGF-siRNA-dsDNA。将合成单链脱氧寡核苷酸各 25 μg 加超纯水配成 100 μl 的体积(终质量浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 缓慢冷却至室温。将退火产物稀释成工作浓度, 双酶切 pSilencer3.1-neo-H1 质粒, 将退火产物克隆入。酶切及测序鉴定结果正确后命名为 pSilencer3.1-VEGF-siRNA。双酶切回收 pSilencer3.1-VEGF-siRNA 质粒 H1 后的 160 bp 目的基因片段和 pDC3.1 载体连接, 产物酶切鉴定正确后命名为 pSilencer3.1-H1-VEGF-siRNA。

1.3 腺病毒 Ad-VEGF-siRNA 的重组及鉴定

将质粒 pSilencer3.1-H1-VEGF-siRNA 分别与 5 型含有腺病毒右臂的质粒 pHGE3(包含除了 5 型腺病毒 188~1339 bp 以外的整个 5 型腺病毒基因)通过 Lipofectamine 2000 共转染至 293 细胞。共转染后 9~14 d 出现病毒空斑, 经过 3 次病毒空斑纯化, 应用 QIAamp DNA Blood Mini Kit 提取腺病毒 DNA, 应用 PCR 进行鉴定。经鉴定正确的腺病毒命名为 Ad-VEGF-siRNA, 即携带 H1 基因为启动子的

针对人 VEGF 基因 RNA 干扰片段的非增殖型腺病毒。

腺病毒的扩增及纯化采用 293 细胞及氯化铯纯化常规方法, 病毒滴度测定采用 Qbiogene 公司的 TCID₅₀ 法。

1.4 RT-PCR 检测重组腺病毒感染 MG-63 细胞中 VEGF 的表达

MG63 细胞用 DMEM (含 10% 胎牛血清) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 条件下培养和传代。转染前 24 h 将处于生长对数期的 MG63 胰酶消化并计数, 调整细胞密度为 1×10^5 个/ml 重新接种于 6 孔板, 生长近 60% 贴壁时将 Ad-VEGF-siRNA 转染入 MG63, 按 LipofectAMINE™ 2000 脂质体说明书操作。

按照 Trizol(GibcoBRL 公司)操作说明分别从感染 Ad-VEGF-siRNA 的 MG63 细胞及荷瘤裸小鼠移植瘤中提取总 RNA, 用 TaKaLa 公司的 One Step RNA PCR 试剂盒完成 RT-PCR 反应, VEGF 引物为: 上游引物 5'-CCTGCTGGACAT CTTCCAGGAGTACC-3'; 下游引物 5'-GAAGCTGATCTCTCCTATGTGCTGGC-3'。内参照 β -actin 的上游引物为 5'-CAC-CCCCACTGAAAAAGATGA-3'; 下游引物为: 5'-CATCTTCAAAA CCTCCATGACG-3'。

1.5 Ad-VEGF-siRNA 对荷人骨肉瘤裸小鼠的治疗

取 MG63 单细胞悬液 0.2 ml (1.5×10^7 个/ml), 裸鼠左侧腋背部皮下注射, 成瘤后随机分为 Ad-VEGF-siRNA 治疗组和 Ad-EGFP、Ad-buffer 对照组, 每组各 15 只。治疗组的裸小鼠隔天瘤内多点注射 Ad-VEGF-siRNA 病毒纯化液 2.0×10^9 PFU, 共 5 次; Ad-EGFP 组注射等剂量的 Ad-EGFP 病毒纯化液; Ad-buffer 组注射等量的 Ad-buffer。各治疗组动物分别于注射当天及其后 8、10、12、14、16 d 用游标卡尺测量肿瘤大小, 计算肿瘤体积及抑瘤率。肿瘤体积计算按公式: 肿瘤体积 (mm^3) = $1/2ab^2$ (a, b 为肿瘤的最大径和最小径); 抑瘤率 (%) = $(1 - \text{治疗组体积}/\text{对照组体积}) \times 100\%$ 。

1.6 观察 Ad-VEGF-siRNA 对荷人骨肉瘤裸小鼠肺转移的抑制作用

取 MG63 单细胞悬液 0.1 ml (细胞密度同前), 接种于裸小鼠右前肢近膝关节处。30 只裸小鼠接种 7 d 后分为 Ad-VEGF-siRNA 治疗组和 Ad-EGFP、Ad-buffer 对照组, 每组各 10 只。治疗组于接种细胞后的第 7 天开始自尾静脉注射 Ad-VEGF-siRNA 0.1 ml, 每周 3 次, 共计 9 次, 总量为 1.8×10^{10} PFU。Ad-EGFP 和 Ad-buffer 对照组同法自尾静脉注射 Ad-EGFP 和 Ad-buffer。接种后 14 d, 处死并解剖裸

小鼠,肉眼观察肺表面有无转移灶,摘出肺脏,10%中性甲醛固定,48 h 后取出,流水冲洗 30 min,常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明并行石蜡包埋,连续切片后 H-E 染色,显微镜下观察有无转移病灶。

1.7 统计学处理

所有的结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据的统计用方差分析,结果通过 SPSS12.0 软件进行相应的统计学分析。

2 结果

2.1 Ad-VEGF-siRNA 的成功构建及鉴定

pSilencer3.1-VEGF-siRNA 中的 VEGF 片段测序结果与实验设计完全一致;插入到 pDC311 后经酶切及 PCR 鉴定正确的阳性克隆命名为 pDC311-VEGF-siRNA。pDC311-VEGF-siRNA 与腺病毒右臂质粒 pBHGE3 在 293 细胞中进行同源重组,9~14 d 后可见明显病毒空斑,进行 PCR 鉴定正确,腺病毒命名为 Ad-VEGF-siRNA。Ad-VEGF-siRNA 经氯化铯密度梯度离心纯化,病毒滴度达 2.0×10^{10} PFU/ml。

2.2 Ad-VEGF-siRNA 治疗后 MG-63 细胞和荷瘤裸鼠瘤体内 VEGF 的变化

RT-PCR 检测发现,人骨肉瘤 MG63 细胞在转染 Ad-VEGF-siRNA 质粒 48 h 后,VEGF 的表达受到明显的限制(图 1)。

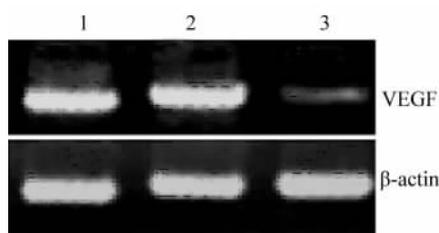


图 1 感染 Ad-VEGF-siRNA 48 h 后 MG-63 细胞 VEGF 表达的下降

Fig. 1 Downregulation of VEGF expression in MG-63 cells 48 h after Ad-VEGF-siRNA infection

1: Ad-buffer; 2: pSilencer3.1-neo-H1; 3: Ad-VEGF-siRNA

各组裸鼠经相应治疗后检测瘤体内 VEGF 水平,结果显示 Ad-VEGF-siRNA 治疗组随着时间推移 VEGF 表达量逐渐减少,而两对照组的 VEGF 水平没有发生明显改变(图 2)。至 19 d 时,Ad-VEGF-siRNA、Ad-EGFP、Ad-buffer 组 VEGF 含量分别为 (3921.4 ± 521.1) 、 (5576.1 ± 496.3) 、 (5416.9 ± 552.3) pg/ml, Ad-VEGF-siRNA 组的 VEGF 表达水

平明显低于其他两对照组($P < 0.05$)。

2.3 Ad-VEGF-siRNA 对裸鼠移植骨肉瘤生长的抑制

裸小鼠肿瘤细胞皮下接种后 5~8 d,可观察到大小约 5~7 mm 皮下肿瘤结节,成瘤率为 100%。随后观察到两对照组裸小鼠瘤体均呈进行性增大,而经携带有 VEGF-siRNA 干扰片段的腺病毒的治疗组,其肿瘤生长抑制明显,瘤体增长速度缓慢(表 1)。至接种第 10 天起,治疗组的肿瘤体积明显小于两对照组($P < 0.05$),其抑瘤率为 37.2%。

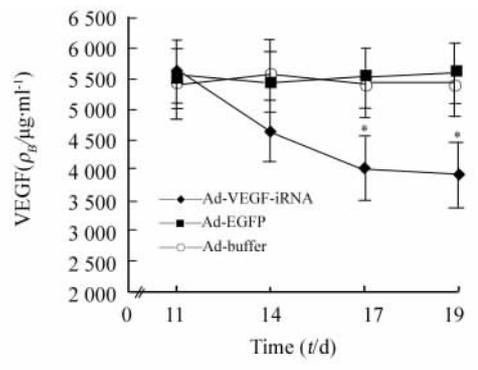


图 2 Ad-VEGF-siRNA 治疗对裸鼠移植瘤组织 VEGF 表达的影响

Fig. 2 VEGF expression in transplanted tumor tissue in nude mice after Ad-VEGF-siRNA treatment

* $P < 0.05$ vs Ad-EGFP or Ad-buffer

2.4 Ad-VEGF-siRNA 对荷瘤裸小鼠肺转移的影响

Ad-VEGF-siRNA 抑制肺转移实验的第 14 天时,各组处死的 5 只小鼠中,肉眼观察只有 Ad-EGFP 组 1 只裸鼠发生肺表面转移;病理观察,Ad-VEGF-siRNA 治疗组无转移,Ad-EGFP、Ad-buffer 组分别有 2 只和 1 只有肺转移。第 26 天时,治疗组剩余 5 只裸鼠有 1 只发生肺转移,两对照组各有 2 只发生肺转移;病理切片发现治疗组裸鼠中 2 只发生肺转移且为单发灶,而对照组各有 3 只发现转移灶,其中各有 2 只为多发性转移(图 3A、B)。合计之,Ad-VEGF-siRNA 组共有 3 只裸鼠肺转移,而 Ad-EGFP 和 Ad-buffer 对照组分别有 8 只和 6 只发现肺转移。Ad-VEGF-siRNA 治疗组和 Ad-EGFP 组肺转移发生数量差别具有统计学意义($P < 0.05$);和 Ad-buffer 组比较差异无统计学意义,这可能与样本数量较少以及病理组织取材部位有关。

3 讨论

骨肉瘤患者 5 年生存率较 20 年前已有明显升

高^[4],骨肉瘤生长和转移与肿瘤血管生成密切相关。肿瘤血管的发生受到一系列细胞因子的控制,目前认为主要即为 VEGF,它能够与间质细胞、内皮细胞上酪氨酸激酶受体 VEGF-R 结合,引起新的内皮细胞分化、增殖并形成管腔样结构^[5-7]。骨肉瘤的生长不仅依赖于 VEGF 的作用为其提供丰富的血

供,在临床,其已经成为骨肉瘤预后的重要独立指标。Charity 等^[8]通过回顾性分析发现,骨肉瘤细胞表达 VEGF 较高的患者其总体生存率和无瘤生存率都较短;Oda 等^[9]发现 VEGF 对骨肉瘤肺转移有一定的预见价值;Lee 等^[10]也指出高表达的 VEGF 和骨肉瘤患者预后较差有相关关系。

表 1 Ad-VEGF-siRNA 治疗后裸鼠移植瘤体积的变化 ($\bar{x} \pm s, V/cm^3$)

Tab. 1 Changes of transplanted tumor volume in nude mice after treatment by Ad-VEGF-siRNA($\bar{x} \pm s, V/cm^3$)

Group	Time after plantation (t/d)				
	10	12	14	16	18
Ad-VEGF-siRNA	0.044 ± 0.043 *	0.058 ± 0.057 *	0.260 ± 0.317 *	0.291 ± 0.267 *	0.313 ± 0.179 *
Ad-EGFP	0.136 ± 0.075	0.221 ± 0.084	0.828 ± 0.587	0.814 ± 0.380	1.213 ± 0.290
Ad-buffer	0.142 ± 0.120	0.178 ± 0.138	0.646 ± 0.410	0.947 ± 0.170	1.430 ± 0.948

* P < 0.05 vs Ad-EGFP or Ad-buffer

表 2 Ad-VEGF-siRNA 治疗后荷瘤裸鼠的肺转移结节(n)

Tab. 2 Lung metastasis nodes in tumor-bearing nude mice after treatment by Ad-VEGF-siRNA(n)

Group	14 d		26 d		Total		Total lung metastasis
	Macro	Micro	Macro	Micro	Macro	Micro	
Ad-VEGF-siRNA	0	0	1	2	1	2	3*
Ad-EGFP	1	2	2	3	3	5	8
Ad-buffer	0	1	2	3	2	4	6

Macro: Macroscopic examination; Micro: Microscopic examination; P < 0.05 vs Ad-EGFP

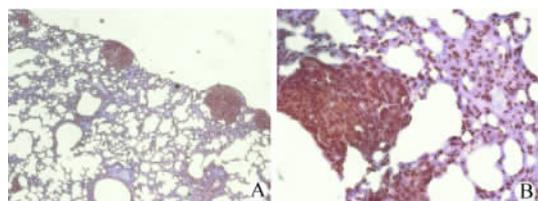


图 3 荷瘤小鼠肿瘤组织病理学观察

Fig. 3 Pathological observation of tumor tissue in osteosarcoma-bearing nude mice

A: Multiple metastases in the margin of the lung (H-E, ×10);
B: Lung metastases showing the nuclei of tumor cells with heavy-staining and heteromorphism (H-E, ×100)

基因治疗技术应用病毒载体或非病毒载体将特定的基因片段在体内或体外环境下导入靶向细胞,使其表达本来不表达的基因,或关闭、抑制某种特定基因表达,从而达到治疗疾病的目的。目前已有将基因治疗应用于骨和软组织肿瘤等疾病^[11],而使用病毒载体进行骨肉瘤的基因治疗也是骨肿瘤治疗学

上一个重要的研究方向^[12]。

双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)可以抑制其同源基因的表达,产生特异性的基因沉默(gene silencing),即为 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)^[13]。RNA 干扰的特点包括高特异性抑制目的基因、高效性、稳定性以及对发育中的个体影响较小。本研究利用腺病毒作为载体将 VEGF-siRNA 序列导入人骨肉瘤细胞株 MG-63 中,转录后其可以高效率地抑制骨肉瘤细胞表达 VEGF。鉴于 RNA 干扰技术在基因治疗方面广阔的应用前景,国内外进行一系列的体内和体外实验。国内吴强等^[14]利用干扰 RNA 沉默 HIF-1 α 研究在缺氧状况下对骨肉瘤细胞 VEGF 表达的影响;Shen 等^[15]通过 RNA 干扰技术成功地下调了人类白血病细胞株 K562 的 VEGF 表达。Takei^[16]和 Filleur^[17]分别各自通过实验证实了 RNA 干扰可以抑制肿瘤细胞 VEGF 的表达,进而观察到了其可以遏制血管生成以及肿瘤生长。通过 VEGF-siRNA 减少或完全阻止 VEGF 的表

达,进而影响肿瘤血管的生成,对于治疗富含血管的肿瘤将具有重要意义。

本研究通过腺病毒为载体的 RNA 干扰技术,构建 Ad-VEGF-siRNA,并实现其能够在体内成功转染 MG63 骨肉瘤细胞株,进而干扰 VEGF 的表达,使得肿瘤组织内 VEGF 含量下降。不仅抑制了原发灶的生长,而且遏制了骨肉瘤的肺转移。本研究在 RNA 干扰抗血管生成治疗骨肉瘤方面所作的初步的探索,不仅可以为抗血管生成治疗骨肉瘤的临床应用提供理论指导,也为其他实体肿瘤的抗血管生成治疗提供了有价值的借鉴。由于肿瘤血管生成因子家族非常复杂,VEGF 的表达下调是否会引起其他血管生成因子表达的上调?腺病毒载体尚能引起患者严重的过敏反应,怎样才能降低其对人体的伤害或者选择更加安全有效的载体?如何进行多靶向基因治疗?这些都是有待进一步探讨的问题^[10,18-19]。

[参 考 文 献]

- [1] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [2] Miller KD, Sweeney CJ, Sledge GW. Redefining the target: chemotherapeutics as antiangiogenics[J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(4): 1195-1206.
- [3] Folkman J. Angiogenesis[J]. *Annu Rev Med*, 2006, 57: 1-18.
- [4] Longhi A, Errani C, De Paolis M, *et al.* Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art[J]. *Cancer Treat Rev*, 2006, 32(6): 423-436.
- [5] DuBois S, Demetri G. Markers of angiogenesis and clinical features in patients with sarcoma[J]. *Cancer*, 2007, 109(5): 813-819.
- [6] Weiss KR, Cooper GM, Jadlowiec JA, *et al.* VEGF and BMP expression in mouse osteosarcoma cells[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2006, 450: 111-117.
- [7] 张立智,蔡宣松,钱志康,等. VEGF 特异 siRNA 对骨肉瘤细胞凋亡和仿血管发生的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007,14(4):352-356.
- [8] Charity RM, Foukas AF, Deshmukh NS, *et al.* Vascular endothelial growth factor expression in osteosarcoma[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2006, 448: 193-198.
- [9] Oda Y, Yamamoto H, Tamiya S, *et al.* CXCR4 and VEGF expression in the primary site and the metastatic site of human osteosarcoma: an analysis within a group of patients, all of whom developed lung metastasis[J]. *Mod Pathol*, 2006, 19(5): 738-745.
- [10] Lee YH, Tokunaga T, Oshika Y, *et al.* Cell-retained isoforms of vascular endothelial growth factor (VEGF) are correlated with poor prognosis in osteosarcoma[J]. *Europ J Cancer*, 1999, 35(7): 1089-1093.
- [11] Jüllig M, Zhang WV, Stott NS. Gene therapy in orthopaedic surgery: the current status[J]. *ANZ J Surg*, 2004, 74(1-2): 46-54.
- [12] Witlox MA, Lamfers ML, Wuisman PI, *et al.* Evolving gene therapy approaches for osteosarcoma using viral vectors: review[J]. *Bone*, 2007, 40(4): 797-812.
- [13] Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
- [14] 吴 强,杨述华,王锐英,等. 干扰 RNA 沉默 HIF-1 α 在缺氧状态下对骨肉瘤细胞 VEGF 表达的影响[J]. *癌症*,2005,24(5):531-535.
- [15] Shen HL, Xu W, Wu ZY, *et al.* Vector-based RNAi approach to isoform-specific downregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF)165 expression in human leukemia cells[J]. *Leuk Res*, 2007, 31(4): 515-521.
- [16] Takei Y, Kadomatsu K, Yuzawa Y, *et al.* A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(10): 3365-3370.
- [17] Filleur S, Courtin A, Ait-Si-Ali S, *et al.* siRNA-mediated inhibition of vascular endothelial growth factor severely limits tumor resistance to antiangiogenic thrombospondin-1 and slows tumor vascularization and growth[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(14): 3919-3922.
- [18] Ternovoi VV, Curiel DT, Smith BF, *et al.* Adenovirus-mediated p53 tumor suppressor gene therapy of osteosarcoma [J]. *Lab Invest*, 2006, 86(8): 748-766.
- [19] 张伟滨. 骨肉瘤生物治疗基础研究的现状[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*,2008,15(2):101-104.

[收稿日期] 2008 - 02 - 28

[修回日期] 2008 - 04 - 15

[本文编辑] 郁晓路

《中国肿瘤生物治疗杂志》欢迎投稿!