

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.02.005

缺氧促进 5HRE 和 AFPp 调控的 NTR/CB1954 自杀基因系统特异杀伤 HepG2 细胞

王 炜, 孙学军, 郑见宝, 禄韶英* (西安交通大学医学院 第一附属医院 普外科, 陕西 西安 710061)

[摘要] 目的: 研究 5 拷贝缺氧反应元件(5HRE)和甲胎蛋白启动子(AFPp)联合调控的自杀基因系统硝基还原酶/CB1954(nitro-reductase/CB1954, NTR/CB1954)在缺氧环境下对人肝癌细胞株 HepG2 生长的抑制作用。方法: 利用 5HRE 作为增强子和 AFPp 构成联合调控元件, 与自杀基因 NTR 构成真核表达载体。将载体转染 AFP 阳性的人肝癌细胞株 HepG2 及 AFP 阴性的人胃癌细胞株 MKN45, 利用 G418 筛选稳定转染的细胞。用 RT-PCR 和 Western blotting 检测 NTR 的表达。将前体药物 CB1954 加入稳定表达 NTR 基因的细胞, 用 MTT 法观察其毒性代谢产物 4-羟胺还原产物对肿瘤细胞生长的抑制作用。结果: 成功筛选出稳定表达 NTR 的单克隆 HepG2 细胞和 MKN45 细胞。RT-PCR 和 Western blotting 证实单克隆 HepG2 细胞中 NTR 在 mRNA 和蛋白水平的表达, 且缺氧环境中的表达量更高; 单克隆 MKN45 细胞在常氧和缺氧环境中均无 NTR 表达。MTT 法检测发现, 缺氧环境下 NTR 基因能有效地活化前体药物 CB1954, 剂量依赖性地抑制 NTR 阳性的 HepG2 细胞的生长 ($P < 0.05$); 但对 MKN45 细胞和野生型 HepG2 细胞无抑制作用。结论: 5HRE 和 AFPp 双重调控的 NTR/CB1954 自杀基因系统在体外缺氧环境下可促进对人肝癌细胞株 HepG2 靶向性杀伤作用。

[关键词] 肝肿瘤; NTR/CB1954 自杀基因系统; 缺氧环境; AFP

[中图分类号] R656.9 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2009)02-0125-05

Hypoxia enhances 5HRE and AFPp-regulated NTR/CB1954 suicide gene system in killing hepatocellular carcinoma cell line HepG2

WANG Wei, SUN Xue-jun, ZHENG Jian-bao, LU Shao-ying* (Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the inhibitory effect of Nitro-reductase/CB1954 (NTR/CB1954) suicide gene system, which contains 5 copies of hypoxia-responsive element (5HRE) and promoter of alpha-fetoprotein gene (AFPp), against human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 under hypoxia condition *in vitro*. **Methods:** 5HRE- and AFPp-regulated nitroreductase (NTR) gene eukaryotic expression vector was transfected into AFP-positive human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and AFP-negative human gastric carcinoma cell line MKN45 by Lipofectamine 2000. Stably transfected cell lines were selected by G418. RT-PCR and Western blotting were employed to examine the expression of NTR mRNA and NTR protein, respectively. Pro-drug CB1954 was added into stably-transfected cell lines; inhibitory activity of its derivative product (4-hydroxylamine) was observed by MTT. **Results:** Monoclonal HepG2 cells stably expressing NTR were successfully obtained. Expression of NTR mRNA and NTR protein in monoclonal HepG2 cells under hypoxia condition was significantly higher than those under normoxia condition as confirmed by RT-PCR and Western blotting, respectively. Monoclonal MKN45 cells did not express NTR protein under either hypoxia condition or normoxia condition. NTR effectively activated CB1954 under hypoxia condition, resulting in dose-dependent inhibition on the proliferation of HepG2 cells as shown by MTT assay ($P < 0.05$). But CB1954 did not inhibit proliferation of MKN45 cells and wild type HepG2 cells. **Conclusion:** 5HRE- and AFPp-regulated NTR/CB1954 suicide gene system can specifically kill human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 under hypoxia condition.

[Key words] liver neoplasms; NTR/CB1954 suicide gene system; hypoxia environment; AFP

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(2): 125-129]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30672070, No. 30400430)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30672070, No. 30400430)

[作者简介] 王 炜(1982-),男,陕西省西安市人,博士研究生,主要从事消化道肿瘤生物治疗的研究

* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: robertlu@mail.xjtu.edu.cn

肝细胞癌是一种常见的消化系统恶性肿瘤,其发生是多因素、多步骤的过程,有多基因参与,为多基因突变所致。目前的常规治疗方法效果并不理想,国内外许多学者试图通过基因治疗获得突破。Nitro-reductase/CB1954(NTR/CB1954)是一种较新型的自杀基因系统,通过在肿瘤细胞内表达硝基还原酶(nitro-reductase, NTR),使无毒性的前体药物 CB1954 转化为有毒性的 4-羟胺还原产物,具有很强的肿瘤杀伤效应^[1]。本实验在先前工作^[2]的基础上,利用构建的由 5 拷贝缺氧反应元件(5HRE)和甲胎蛋白启动子(AFPp)联合调控的 NTR 真核表达载体 Pires2-EGFP-5HRE-AFPp-NTR(简称 5HAN),转染人肝癌细胞株 HepG2,并筛选出阳性单克隆细胞,在细胞水平上观察其对 AFP 阳性的肝癌细胞株的靶向性杀伤效应,为下一步的体内实验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株

AFP 阳性的肝癌细胞株 HepG2 和 AFP 阴性的胃癌细胞株 MKN45 均获赠于第四军医大学唐都医院中心实验室。两种细胞均置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度细胞培养箱中,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养。

1.2 质粒和主要试剂

5HRE 和 AFPp 联合调控的 NTR 真核表达载体 Pires2-EGFP-5HRE-AFPp-NTR(5HAN)由本课题组自行构建^[2]。质粒提取试剂盒以及胶回收试剂盒购自北京天为时代公司,去内毒素质粒提取试剂盒购自北京百泰克公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,RPMI-1640 培养基及 G418 购自 Gibco/BRL 公司,脂质体 Lipofectamine™2000 及 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,Western blotting 用单克隆一抗购自北京天根生物公司,Western blotting 用二抗购自北京中杉金桥公司。RT-PCR 试剂盒购自北京博日公司,Western blotting 化学发光试剂盒购自 Pierce 公司,前体药物 CB1954 及 MTT 购自 Promega 公司。

1.3 免疫细胞化学检测肿瘤细胞 AFP 的表达

对处于对数生长期的 HepG2 细胞和 MKN45 细胞进行免疫细胞化学染色,使用 1:200 AFP 鼠抗人一抗孵育 2 h,加入 1:500 兔抗鼠二抗孵育 1 h,然后加入 DAB 染色,于光镜下观察细胞着色情况。

1.4 真核表达载体稳定转染 HepG2 细胞及 MKN45 细胞

用质粒提取试剂提取质粒 pEGFP-5HRE-AFPp-NTR、pEGFP-5HRE-AFPp[仅包含 5 拷贝缺氧反应

元件(5HRE)和甲胎蛋白启动子(AFPp)联合调控元件的真核表达载体,以下简称 5HA],pEGFP-AFPp-NTR[甲胎蛋白启动子(AFPp)调控的 NTR 真核表达载体,以下简称 AN],在无菌 24 孔板中分别接种对数生长期 HepG2 细胞及 MKN45 细胞(1×10^5 /孔),过夜培养至细胞 90% 融合。按照 Lipofectamine™2000 试剂盒说明书标准方案将上述质粒转入 HepG2 细胞及 MKN45 细胞。转染 48 h 后,更换选择性培养基(含 G418 500 μg/ml),培养 4 周,筛选出稳定表达 NTR 的阳性细胞^[3]。

1.5 筛选单克隆的稳定转染细胞株

胰酶消化阳性转染细胞并计数,以每孔 1 个细胞接种于 96 孔板,光镜下观察只含有单个细胞的孔并做标记。用选择性培养基培养,直至细胞达到 90% 融合。胰酶消化后,将细胞重新接种于 6 孔板中,继续用选择性培养基培养,细胞达到 50% 融合后,胰酶消化,然后将细胞转入培养瓶中培养^[4]。

1.6 RT-PCR 检测转染细胞 NTR mRNA 的表达

取筛选的单克隆细胞(约 6×10^7 个),在缺氧环境中培养 24 h,利用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,用 RT-PCR 试剂盒将提取的 RNA 做 RT-PCR,25 μl 反应体系,94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,35 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,通过紫外凝胶扫描仪观察 NTR 和内参 β-actin 的条带。

1.7 Western blotting 检测转染细胞 NTR 蛋白的表达

提取细胞总蛋白,行 10% SDS-PAGE,每孔蛋白 100 μg,然后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上。膜用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温阻断 2 h,加入鼠抗人 6-His 单克隆抗体(1:500 稀释),室温孵育 2 h, TBST 洗 2 次,每次 10 min,再用 TBS 洗 1 次,10 min。加入 HRP 标记的兔抗鼠二抗(1:2500 稀释)室温孵育 2 h, TBST 洗 2 次,每次 10 min,再用 TBS 洗 1 次,10 min。Western blotting 化学发光试剂在 X 线胶片上曝光。

1.8 MTT 法检测 NTR/CB1954 对肿瘤细胞的杀伤作用

细胞按 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板,并设空白及阴性对照。37℃、5% CO₂ 饱和湿度细胞培养箱中培养,使细胞融合至 60%;缺氧环境中培养 24 h 后,解除缺氧继续培养 36 h;然后加入不同质量浓度的前体药物 CB1954(分别为 1、10、50、100、500、1000 μg/L),每种浓度设 4 个复孔,培养 48 h。每孔加入 20 μl MTT 溶液(5 mg/ml),37℃、5% CO₂ 饱和湿度细胞培养箱中继续培养 4 h,弃去上清,每

孔加入 200 μ l 二甲基亚砜(DMSO), 震荡 10 min, 酶联检测仪上测定各孔 490 nm 波长处光密度值(D), 绘制细胞在不同浓度 CB1954 作用下的生长曲线。

1.9 统计学处理

所有资料均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 应用 Excel 行 t 检验, 采用 SPSS10.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 AFP 在 HepG2 细胞及 MKN45 细胞中的表达

免疫细胞化学检测 HepG2 细胞及 MKN45 细胞中 AFP 表达情况, 镜下可见 HepG2 细胞质内有棕黄色的 AFP 染色颗粒, 而 MKN45 细胞质内无棕黄色颗粒(图 1)。

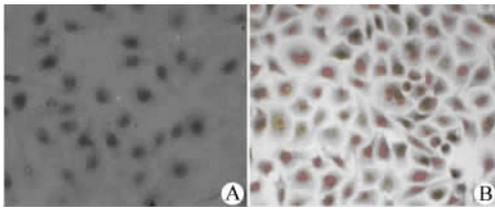


图 1 免疫细胞化学法检测 HepG2 细胞及 MKN45 细胞中 AFP 的表达($\times 200$)

Fig. 1 Expression of AFP in HepG2 cells and MKN45 cells as detected by immunohistochemistry($\times 200$)

A: HepG2 cells; B: MKN45 cells

2.2 绿色荧光蛋白在转染后 HepG2 和 MKN45 细

胞中的表达

瞬时转染 24 h 后, 分别于光镜和荧光显微镜下观察转染 5HAN 质粒及对照 5HA 和 AN 质粒的 HepG2 细胞, 可见瞬时转染时绿色荧光蛋白阳性的细胞比例均较低, 5HAN 组与 5HA 组荧光水平基本一致, AN 组荧光水平较前两组低。G418 筛选后的稳定转染 5HAN 质粒的单克隆 HepG2 细胞及对照 MKN45 细胞, 于荧光显微镜下观察, 几乎所有 HepG2 细胞均表达绿色荧光蛋白, 而 MKN45 细胞基本无绿色荧光蛋白表达(图 2)。

2.3 5HAN 阳性单克隆 HepG2 细胞中 NTR mRNA 的表达

RT-PCR 检测发现, 在 AFP 启动子调控及 5HRE 缺氧诱导作用下, HepG2 细胞在有氧以及缺氧环境下均有 NTR 基因的转录表达, 1.5% 琼脂糖电泳上表现为 700 bp 附近高亮条带, 且缺氧环境的表达量高于有氧环境。在 AFP 启动子的调控下, MKN45 细胞中 NTR 基因在有氧及缺氧环境下均不能表达(图 3)。

2.4 5HAN 阳性单克隆 HepG2 细胞 NTR 蛋白表达

Western blotting 检测发现, 在 AFP 启动子调控及 5HRE 缺氧诱导的作用下, 转染了 5HAN 质粒的单克隆 HepG2 细胞在有氧及缺氧环境下均表达 NTR 蛋白, 且缺氧组 NTR 表达高于有氧组。而 MKN45 细胞在有氧及缺氧环境下均不表达 NTR 蛋白(图 4)。

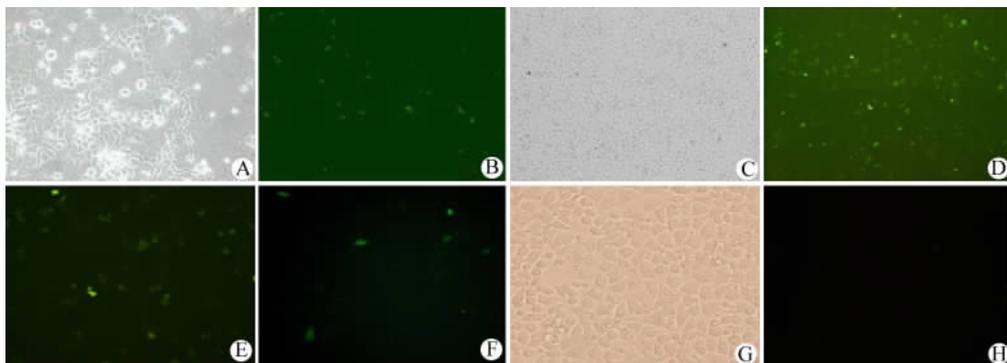


图 2 各组转染细胞中绿色荧光蛋白的表达

Fig. 2 Expression of EGFP in different transfected cells

A: Transient 5HAN HepG2 cells under optical microscope($\times 100$); B: Transient 5HAN HepG2 cells under fluorescence microscope($\times 100$); C: Monoclonal 5HAN HepG2 cells under optical microscope($\times 100$); D: Monoclonal 5HAN HepG2 cells under fluorescence microscope($\times 100$); E: Transient 5HA HepG2 cells under fluorescence microscope($\times 200$); F: Transient AN HepG2 cells under fluorescence microscope($\times 200$); G: Monoclonal 5HAN MKN45 cells under optical microscope($\times 200$); H: Monoclonal 5HAN MKN45 cells under fluorescence microscope($\times 200$)

2.5 NTR/CB1954 靶向杀伤 5HAN 阳性 HepG2 细胞

稳定转染 5HAN 的 HepG2 单克隆细胞加入不

同浓度的前体药物 CB1954, 结果发现, 低浓度 CB1954 对细胞存活基本无影响, 随着 CB1954 浓度的增加(1、10、50、100、500、1 000 $\mu\text{g/L}$), HepG2 细胞存活率逐渐降低[分别为(94.2 \pm 0.08)%、(83.4 \pm 0.16)%、(72.8 \pm 0.11)%、(48.6 \pm 0.15)%、(14.8 \pm 0.14)%、(7.9 \pm 0.14)%], 最高浓度 CB1954 时 5HAN 阳性的 HepG2 细胞几乎全部死亡。同样条件下, 不同浓度的 CB1954 均不能杀伤 5HAN 阳性的 MKN45 细胞和野生型 HepG2 细胞。结果说明, NTR/CB1954 自杀基因系统可靶向性杀伤转染 5HAN 的 AFP 阳性的 HepG2 细胞(图 5)。

原酶(NTR)还原, 产生具有细胞毒性的 4-羟胺还原产物, 杀伤肿瘤细胞, 同时具有"旁观者效应"^[5-8]。

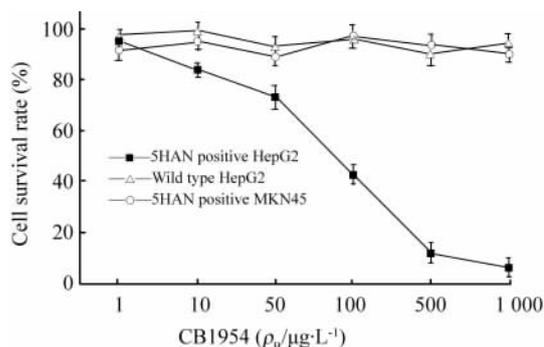


图 5 NTR/CB1954 自杀基因系统靶向杀伤 5HAN 阳性的 HepG2 细胞

Fig. 5 NTR/CB1954 suicide gene system specifically killed 5HAN positive HepG2 cells

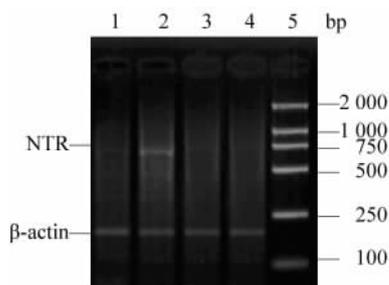


图 3 有氧和缺氧环境下 5HAN 阳性 HepG2 单克隆细胞中 NTR mRNA 的表达

Fig. 3 Expression of NTR mRNA in 5HAN positive monoclonal HepG2 cells under normoxia and hypoxia condition

- 1: 5HAN positive HepG2 cells under normoxia condition;
- 2: 5HAN positive HepG2 cells under hypoxia condition;
- 3: 5HAN positive MKN45 cell under normoxia condition;
- 4: 5HAN positive MKN45 cell under hypoxia condition;
- 5: DL2000 Marker

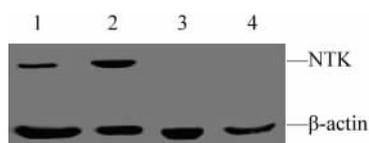


图 4 Western blotting 检测 5HAN 阳性单克隆 HepG2 细胞中 NTR 蛋白的表达

Fig. 4 Expression of NTR protein in 5HAN positive monoclonal HepG2 cells detected by Western blotting

- 1: 5HAN positive HepG2 cells under normoxia condition;
- 2: 5HAN positive HepG2 cells under hypoxia condition;
- 3: 5HAN positive MKN45 cell under normoxia condition;
- 4: 5HAN positive MKN45 cell under hypoxia condition

3 讨论

本实验采用的 NTR/CB1954 自杀基因系统是一种较新的治疗系统。前体药物 CB1954 可被硝基还

肿瘤细胞迅速增长以及肿瘤血管的相对增长缓慢, 导致肿瘤组织内的缺氧^[9-10], 缺氧与肿瘤细胞对放疗、化疗的抵抗程度、恶性进展和远处转移密切相关^[11-12]。肿瘤放疗、栓塞化疗等治疗还可导致肿瘤组织继发性缺氧^[13]。研究发现缺氧可使 HepG2 细胞中的 VEGF 基因表达增加^[14], VEGF 基因的 5'端存在与 HIF-1 结合的 HRE, 与 HIF-1 结合后可明显上调靶基因的转录水平^[15-17]。甲胎蛋白(AFP)在肝癌组织特异性表达, 其表达调控主要在转录水平, 但其启动子活性较低。

在以上研究的基础上, 本研究将 5 个拷贝的 HRE 连接到 AFP 启动子的上游, 并在其下游连接 NTR, 构建了以 AFPp 为启动子的 5HRE 强化缺氧诱导的 NTR/CB1954 自杀基因系统^[2]。通过 5HRE 增强子和 AFPp 启动子的特异性, 使 NTR 特异性地在 AFP 阳性肝癌细胞中表达, 使无毒性的 CB1954 活化为有毒性的药物, 从而杀死 AFP 阳性肝癌细胞。细胞选择方面, 根据所用的 AFP 启动子, 故选择了 AFP 阳性的人肝癌细胞株 HepG2 作为实验细胞。考虑实验室情况以及预实验效果, 选择了 AFP 阴性的人胃癌细胞株 MKN45 作为对照细胞。本实验选用 pIRES2-EGFP^[18]作为 5HAN 的表达载体, 并以 5HA 和 AN 作为对照载体, 其带有增强型绿色荧光蛋白(Enhanced GFP, EGFP)报告基因^[19], 可直接于荧光显微镜观察 EGFP 的表达, EGFP 的表达量及阳性细胞率与调控序列的活性成正比。结果发现, 向 AFP 阳性 HepG2 细胞中转染 5HAN 和 5HA 后, EGFP 的表达水平基本一致, 而转染 AN 后 EGFP 的表达水平较低, 验证了 5HRE 作为增强子与 AFPp 联

合调控相对于单用 AFPp, 可明显提高目的基因的表达水平, 与预期相符。AFP 阴性 MKN45 细胞中转染上述质粒, 经多次实验均未发现 EGFP 的明显表达, 可能与载体构建时破坏了载体自带的 CMV 启动子, 以及细胞本身的转染效率有关。

本实验检测了转染细胞中 NTR 基因的表达情况, 证明在 AFP 启动子的调控下, NTR 基因在 AFP 阳性的 HepG2 中表达, 而在 AFP 阴性的 MKN45 细胞中不表达, 且缺氧环境的表达高于有氧环境, 证实了 5HRE 作为缺氧调控元件对 NTR 表达的增强作用。NTR 作为细菌蛋白转染入真核细胞能否正常表达, 其功能活性如何是本课题的一个关键性问题。MTT 检测结果显示, 缺氧环境中 NTR 阳性的单克隆 HepG2 细胞随着 CB1954 浓度的升高存活率明显下降; 当 CB1954 浓度小于 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时, 细胞存活率在 90% 左右, 其杀伤效果并不明显; 当 CB1954 浓度超过 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时, 细胞存活率在 10% 以下。而 CB1954 对野生型 HepG2 细胞及 AFP 阴性 MKN45 细胞无明显杀伤作用。该结果可为使用 NTR/CB1954 自杀基因系统时 CB1954 的用量提供初步的依据, 也为之后的体内实验确定合适药物浓度提供参考。本研究结果说明, 通过 5HRE 增强子和 AFP 启动子的共同作用, 在缺氧环境中, AFP 阳性的 HepG2 细胞中 NTR 的基因可有效激活 CB1954 并杀伤肿瘤细胞。

本课题组前期实验证明 HRE 和 AFPp 联合调控具有靶向特异性, 5HRE 具有较高的增强效应^[3]。应用多拷贝的 VEGF 基因 5'-端缺氧反应元件 HRE 和 AFP 基因启动子联合构成调控元件, 不但增强了 AFP 启动子的活性, 还增加了基因治疗的特异性, 有利于在临床应用中选择合适的治疗时机, 配合肿瘤的栓塞化疗和放射治疗, 这有可能成为一种比较有前途的辅助治疗方案。另外 NTR/CB1954 自杀基因系统对缺氧的细胞有着更强的杀伤活性。目前对于缺氧微环境、AFP、自杀基因的研究较多, 但是用 5HRE 和 AFPp 双重调控自杀基因 NTR 的研究尚未见报道。本研究证实了 NTR/CB1954 自杀基因系统对肝癌细胞的杀伤效应, 为下一步的动物体内实验奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] Emptage CD, Knox RJ, Danson MJ, *et al.* Nitroreductase from *Bacillus licheniformis*: a stable enzyme for prodrug activation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77(1): 21-29.
- [2] 周培华, 孙学军, 禄韶英, 等. 5HRE 强化的肝癌靶向性自杀基因载体的构建 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2007, 14(2): 163-167.

- [3] 禄韶英, 王 燕, 孙学军, 等. 缺氧诱导的肝癌靶向性基因治疗载体的构建及检测 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2006, 13(1): 59-62.
- [4] 张 霞, 王晓燕, 高 琦, 等. PDCD4 基因在胶质瘤细胞系的稳定表达及其对肿瘤细胞生长的影响 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(4): 347-350.
- [5] Helsby NA, Ferry DM, Patterson AV, *et al.* 2-Amino metabolites are key mediators of CB1954 and SN23862 bystander effects in nitroreductase GDEPT [J]. *Br J Cancer*, 2004, 90(5): 1084-1092.
- [6] Shibata T, Giaccia AJ, Brown JM. Hypoxia-inducible regulation of a prodrug-activating enzyme for tumor-specific gene therapy [J]. *Neoplasia*, 2002, 4(1): 40-48.
- [7] Mitchell DJ, Minchin RF. *E. coli* nitroreductase/CB1954 gene-directed enzyme prodrug therapy: role of arylamine *N*-acetyltransferase 2 [J]. *Cancer Gene Ther*, 2008, 15(11): 758-764.
- [8] Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumor hypoxia in cancer treatment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(6): 437-477.
- [9] Welsh SJ, Powis G. Hypoxia inducible factor as a cancer drug [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2003, 3(6): 391-405.
- [10] Rudolfsson SH, Bergh A. Hypoxia drives prostate tumor progression and impairs the effectiveness of therapy, but can also promote cell death and serve as a therapeutic target [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2009, 13(2): 219-225.
- [11] Greco O, Maples B, Joiner MC, *et al.* How to overcome (and exploit) tumor hypoxia for targeted gene therapy [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 197(3): 312-325.
- [12] Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(12): 967-975.
- [13] De Vreeze RSA, de Jong D, Haas RL, *et al.* Effectiveness of radiotherapy in myxoid sarcomas is associated with a dense vascular pattern [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008, 72(5): 1480-1487.
- [14] 李兴睿, 廖晓峰, 易继林. 缺氧对肝癌细胞系 Hep-G2 表达 VEGF 的影响 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2005, 12(5): 477-479.
- [15] Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, *et al.* Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(3): 295-305.
- [16] Shibata T, Giaccia AJ, Brown JM. Development of a hypoxia-responsive vector for tumor-specific gene therapy [J]. *Gene Ther*, 2000, 7(6): 493-498.
- [17] 吴欣爱, 孙 燕, 樊青霞, 等. siRNA 沉默 HIF-1 α 在缺氧状态下对食管鳞癌细胞 VEGF 表达的影响 [J]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34(10): 743-746.
- [18] Plotnikov AN, Shlapakova I, Szaboles MJ, *et al.* Xenografted adult human mesenchymal stem cells provide a platform for sustained biological pacemaker function in canine heart [J]. *Circulation*, 2007, 116(7): 706-713.
- [19] Chen Y, Muller JD, Ruan QQ, *et al.* Molecular brightness characterization of EGFP *in vivo* by fluorescence fluctuation spectroscopy [J]. *Biophys J*, 2002, 82(1): 133-144.

[收稿日期] 2008 - 12 - 24

[修回日期] 2009 - 02 - 20

[本文编辑] 徐红梅