

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.06.008

· 基础研究 ·

胞嘧啶脱氨酶基因突变体 *D314A* 对人结肠癌细胞的抑制作用

孙茂才, 黄一鸣, 朱正才, 王建平, 沈历宗*, 吴文溪 (南京医科大学第一附属医院 普通外科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 构建大肠埃希菌胞嘧啶脱氨酶 (*E. coli* cytosine deaminase, *EC-CD*) 基因突变体 *D314A* (即 *EC-CD* 基因开放阅读框第 314 位氨基酸由天冬氨酸突变为丙氨酸) 并研究其抗肿瘤作用。方法: 构建含 *EC-CD* 基因的真核表达质粒 pcDNA3.1-CD^{wt}, 应用点突变技术将 pcDNA3.1-CD 中 *EC-CD* 基因开放阅读框第 314 位氨基酸的碱基由 A 突变为 C, 即构成 pcDNA3.1-CD^{D314A}。用 Lipofectamine™2000 将 *EC-CD* 基因或 *D314A* 基因转入人结肠癌细胞系 LoVo 细胞, 以 G418 筛选出稳定表达的阳性克隆 LoVo-CD^{wt} 及 LoVo-CD^{D314A}。应用 MTT 法检测 *EC-CD* 基因及 *D314A* 基因对 LoVo 细胞的直接杀伤作用及旁观者效应。结果: 成功构建 *EC-CD* 基因突变体 *D314A* 并经测序确认。LoVo 细胞转染 *EC-CD* 基因及 *D314A* 基因后均能表达相应的 mRNA, LoVo-CD^{D314A} 细胞对 5-FC 的 IC₅₀ 为 (85.13 ± 0.60) mmol/L, 显著低于 LoVo-CD^{wt} 细胞的 (689.76 ± 0.45) μmol/L, (P=0.000); 在旁观者试验中, 当 LoVo-CD^{wt} 细胞和 LoVo-CD^{D314A} 细胞比例均为 30% 时, 细胞存活率分别为 (48.5 ± 0.49)% 与 (17.3 ± 0.40)% (P=0.000)。结论: *EC-CD* 基因突变体 *D314A* 的抗 LoVo 细胞作用显著强于野生型 *EC-CD* 基因, 有望成为新的肿瘤基因治疗候选基因。

[关键词] 胞嘧啶脱氨酶基因; 点突变; 自杀基因治疗; 结肠肿瘤

[中图分类号] R735.3⁺5; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)06-0595-05

Inhibitory effect of mutant cytosine deaminase *D314A* against human colon cancer cells

SUN Mao-cai, HUANG Yi-ming, ZHU Zheng-cai, WANG Jian-ping, SHEN Li-zong*, WU Wen-xi (1. Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a mutant *D314A* of *Escherichia coli* cytosine deaminase (*EC-CD*, substitution of an alanine (A) for the aspartic acid (D) at position 314 of cytosine deaminase) and investigate its antitumor effect. **Methods:** Eukaryotic expression plasmid containing *EC-CD* gene (pcDNA3.1-CD^{wt}) was constructed, and the mutant pcDNA3.1-CD^{D314A} plasmid, with aspartic acid (D) at position 314 of *EC-CD* gene substituted by alanine (A) (*EC-CD*^{D314A}), was established by site-directed mutation. *EC-CD*^{wt} and *EC-CD*^{D314A} were transfected into human colon cancer cell line LoVo via Lipofectamine™2000, and positive LoVo-CD^{wt} and LoVo-CD^{D314A} cells stably expressing corresponding genes were selected by G418. The cytotoxicity and bystander effects of *EC-CD* and *EC-CD*^{D314A} genes on LoVo cells were evaluated by MTT assay. **Results:** The mutant *D314A* was confirmed by sequence analysis. *EC-CD* and *EC-CD*^{D314A} mRNA were expressed after transfected into LoVo cells. The IC₅₀ of Lovo-CD^{D314A} cells was (85.13 ± 0.60) mmol/L, which was significantly lower than that of LoVo-CD^{wt} cells ([689.76 ± 0.45] μmol/L, P=0.000). Bystander effect assay showed that, when at the ratio of 30%, the survival rates of LoVo-CD^{wt} cells and Lovo-CD^{D314A} cells were (48.5 ± 0.49)% and (17.3 ± 0.40)% (P=0.000), respectively. **Conclusion:** Mutatant *EC-CD* gene (*EC-CD*^{D314A}) has a significantly increased antitumor effect on LoVo cells compared with wild type *EG-CD* gene, and it may become a new candidate gene for tumor gene therapy.

[Key words] cytosine deaminase; site-directed mutation; suicide gene therapy; colon neoplasms

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(6): 595-599]

大肠埃希菌胞嘧啶脱氨酶 (*E. coli* cytosine deaminase, *EC-CD*) 基因是广泛用于肿瘤基因治疗研究的自杀基因之一^[1-3]。*EC-CD* 基因的编码产物胞嘧啶脱氨酶能够将不具细胞毒性的 5-氟胞嘧啶 (5-fluorocytosine, 5-FC) 代谢为细胞毒性产物 5-氟尿嘧

[基金项目] 南京市科技局社会发展基金项目 (No. 200605010)。Supported by the Social Development Foundation from Science and Technology Bureau of Nanjing (No. 200605010)

[作者简介] 孙茂才 (1983-), 男, 汉族, 江苏省盐城市人, 硕士, 主要从事胃肠道肿瘤基础及临床研究。E-mail: sunmc@163.com

* 通信作者 (Corresponding author)。E-mail: shenzl@163.com

啉(5-fluorouracil, 5-FU), 从而发挥抗肿瘤作用, 并具旁观者效应^[4], 在多种肿瘤模型中取得较好的疗效^[1, 5-8]。但由于 5-FC 不是胞嘧啶脱氨酶的最佳底物, 其转化 5-FC 的效率较低, 限制了该基因对肿瘤的杀伤作用^[9]。原核细胞研究^[9-10]显示, 该基因突变体 *D314A* 的编码产物对 5-FC 具有良好的底物专一性和高效的 5-FC 转化率。Kaliberov 等^[11]应用 *D314A* 基因治疗神经胶质瘤, 该基因介导的细胞毒作用与放疗增敏作用比野生型 *EC-CD* 基因更强, 亦能更延长荷瘤裸鼠的生存期。本研究应用点突变技术成功构建 *EC-CD* 基因突变体 *D314A*, 并以人结肠癌细胞系 LoVo 细胞为模型, 研究该突变体 *D314A* 的抗肿瘤效应, 为设计新的自杀基因治疗方案提供依据。

1 材料与与方法

1.1 主要试剂、质粒及引物

含 *EC-CD* 基因的 pMDS-CD 载体、人结肠癌细胞系 LoVo 细胞由本科保存; pcDNA3.1 质粒由南京医科大学生殖毒理实验室惠赠; *Hind* III 酶、*Kpn* I 酶、T4 DNA Ligases 酶、*pfu* DNA 聚合酶、*Dpn* I 酶购自 Fermentas 公司; 脂质体 Lipofectamine™ 2000 (LF2000)、TRIzol 为 Invitrogen 公司产品; G418、RPMI 1640 为 Gibco 公司产品; 5-FC、5-FU、MTT 为 Sigma 公司产品; 质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京 TIANGEN 公司; 逆转录试剂盒购自 Promega 公司。

EC-CD 基因引物序列为: 上游 5'-GGCCAAGCT-TATGTCGAATAACGCTTTACAAAC-3', 下游 5'-GCCGGGTACCTCCACGTTTGTAAATCGATGGC-3'; *EC-CD* 基因定点突变引物序列为: 上游 5'-CTTTG-GTCACGATGCTGTCTTCGATCCG-3', 下游 5'-CG-GATCGAAGACAGCATCGTGACCAAAG-3'。均由上海 Sangon 公司合成。

1.2 质粒扩增、*EC-CD* 基因测序及 pCDNA3.1-CD^{wt} 质粒的构建

将 pMDS-CD 在感受态大肠埃希菌中大量扩增后, 按质粒提取试剂盒说明书提取并纯化质粒, 然后将提取的质粒送上海 Sangon 公司测序。

从含 *EC-CD* 基因的 pMDS-CD^{wt} 质粒中用 *Hind* III 酶和 *Kpn* I 酶切取 *EC-CD* 基因, 并克隆入真核表达质粒 pcDNA3.1 中, 构建 pcDNA3.1-CD^{wt} 质粒, 用 *Hind* III/*Kpn* I 酶切鉴定。

1.3 *EC-CD* 基因定点突变

应用定点突变技术^[12-13]将 *EC-CD* 基因开放阅

读框第 314 位氨基酸(天冬氨酸)所对应的碱基由 A 突变为 C, 则构成由天冬氨酸突变为丙氨酸的突变体 *D314A*。设计定点突变引物序列为如上述。PCR 50 μl 反应体系: 10 × buffer 5 μl, DNA 模板 100 ng, 上、下游突变引物各 125 ng, 100 mmol/ml 的 dNTPs 1 μl, *pfu* DNA 聚合酶 2.5 U(最后加), 加水至 50 μl。循环参数为 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 1 min, 68 °C 延伸 7 min, 共 18 个循环。PCR 反应结束后将产物至于冰上 2 min, 使之冷却至 ≤37 °C。将 10 U *Dpn* I 限制性内切酶直接加入到反应物中, 混匀离心 1 min 后立即 37 °C 孵育 1 h 以消化模板 DNA。然后将反应产物转化感受态大肠埃希菌中, 筛选、挑取阳性克隆, 测序验证, 最后扩增提取含突变体质粒 pcDNA3.1-CD^{D314A}。

1.4 基因转移及阳性克隆筛选与鉴定

在 24 孔板中分别接种 1.5×10^5 个 LoVo 细胞, 待细胞长至 90% 融合时, 以含 0.8 μg 质粒 DNA 和 2 μl Lipofectamine™ 2000 的 100 μl 无血清 RPMI 1640 培养液培养 6 h 后, 更换含血清的完全培养基, 再培养 24 h, 以含 0.1 g/L G418 及 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基传代培养转染细胞, 同时设未转质粒的对照孔。每 3~4 d 换液 1 次, 约 1 周后转基因孔中细胞大部分死亡, 留下少数抗性克隆。待克隆长满后, 消化传代, 不断增加 G418 浓度继续筛选, 直至质量浓度为 0.6 g/L。未转基因孔细胞在 0.1 g/L G418 作用约 6 d 后全部死亡。

抗性克隆的鉴定采用 RT-PCR 法: 采用 TRIzol 一步法提取总 RNA。以 OligodT 为引物合成链, 基本按试剂盒说明书进行。再以第一链为模板进行 PCR 扩增。PCR 循环参数为 94 °C 变性 50 s, 60 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环。以质粒 pcDNA3.1-CD^{wt} 为模板作为阳性参照, 以质粒 pBluescript 为模板作为阴性对照。

1.5 转基因 LoVo 细胞对 5-FU 敏感性测定

将 LoVo 细胞、转染 *EC-CD* 基因(LoVo-CD^{wt})或突变体 *D314A* (LoVo-CD^{D314A}) 的细胞以 1×10^4 /孔接种到 96 孔培养板中, 培养 24 h 后加入 5-FU, 5-FU 浓度按 0、0.1、1、10、100、1 000 μmol/L 递增, 每种浓度设 4 个复孔, 以 MTT 法检测细胞活性。

1.6 5-FC 对转基因 LoVo 细胞的直接杀伤作用及旁观者效应

将 LoVo、LoVo-CD^{wt}、LoVo-CD^{D314A} 细胞以 1×10^4 /孔接种到 96 孔培养板中, 培养 24 h 后加入不同浓度的 5-FC, 每种浓度设 4 个复孔, 以 MTT 法检测细胞活性。将 LoVo-CD^{wt}、LoVo-CD^{D314A} 细胞分别

与 LoVo 细胞以 100%、50%、30%、20%、10%、0% 比例混合接种至 24 孔板中,以含 1 mmol/L 5-FC 的 RPMI 1640 培养,以 MTT 法检测细胞活性。

1.7 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS13.0 软件进行方差分析与 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 pcDNA3.1-CD^{wt}与 pcDNA3.1-CD^{D314A}的构建与鉴定

构建 pcDNA3.1-CD^{wt}与 pcDNA3.1-CD^{D314A}质粒并纯化后,首先进行酶切鉴定。如图 1 所示,pcDNA3.1-CD^{wt}质粒用 *Hind* III/*Kpn* I 酶切后,得到 1.38 kb 的 *EC-CD* 片段;pcDNA3.1-CD^{D314A}质粒酶切后亦得到相同长度的片段。

pcDNA3.1-CD^{wt}与 pcDNA3.1-CD^{D314A}质粒分别进行测序,结果显示 pcDNA3.1-CD^{D314A}中 CD 基因的第 1 103 位碱基 A 突变为碱基 C(图 2),与设计要 求一致,即将 *EC-CD* 基因开放阅读框第 314 位氨基酸由天冬氨酸突变为丙氨酸。提示本实验成功构建了 *EC-CD* 基因突变体 *D314A*。

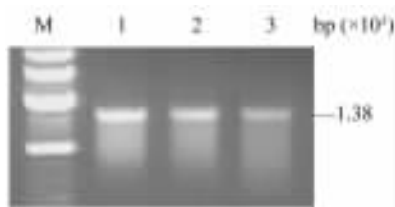


图 1 pcDNA3.1-CD^{wt}与 pcDNA3.1-CD^{D314A}的酶切鉴定

Fig.1 Identification of pcDNA3.1-CD^{wt} and pcDNA3.1-CD^{D314A} by restriction endonuclease

M: Marker VII; 1: pcDNA3.1-CD^{wt}; 2: pcDNA3.1-CD^{wt} digested with *Hind* III and *Kpn* I; 3: pcDNA3.1-CD^{D314A} digested with *Hind* III and *Kpn* I

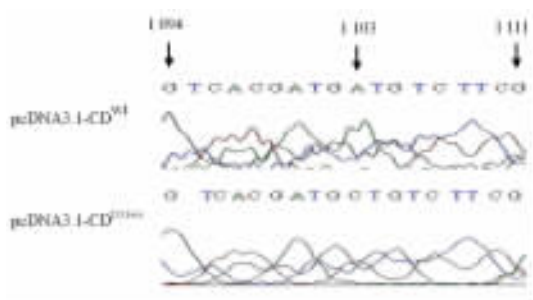


图 2 pcDNA3.1-CD^{wt}与 pcDNA3.1-CD^{D314A}的测序分析(1 094 ~ 1 111)

Fig.2 Sequence analysis of pcDNA3.1-CD^{wt} and pcDNA3.1-CD^{D314A}

2.2 LoVo-CD^{wt}与 LoVo-CD^{D314A}中 *EC-CD* mRNA 的表达

应用 RT-PCR 检测 LoVo-CD^{wt}细胞与 LoVo-CD^{D314A}细胞中 *EC-CD* 基因 mRNA 表达,结果如图 3 所示,LoVo-CD^{wt}细胞与 LoVo-CD^{D314A}细胞均有 *EC-CD* 基因表达。

2.3 转染基因没有改变 LoVo 细胞对 5-FU 的敏感性

实验结果如图 4 所示,LoVo 细胞、LoVo-CD^{wt}细胞与 LoVo-CD^{D314A}细胞三者对 5-FU 的敏感性相似,IC₅₀分别为(15.70 ± 1.13)、(18.96 ± 1.12)、(17.18 ± 1.13) μmol/L,提示 *EC-CD*或 *EC-CD*^{D314A}基因转移没有影响 LoVo 细胞对 5-FU 的敏感性($P = 0.886$)。



图 3 LoVo-CD^{wt}与 LoVo-CD^{D314A}细胞中 *EC-CD* mRNA 的表达

Fig.3 *EC-CD* mRNA expression in LoVo-CD^{wt} and LoVo-CD^{D314A} cells

M: Marker VII; 1: LoVo-CD^{wt} cells; 2: LoVo-CD^{D314A} cells; 3: pcDNA3.1-CD^{wt} as positive control; 4: LoVo cells; 5: pBluscript as negative control

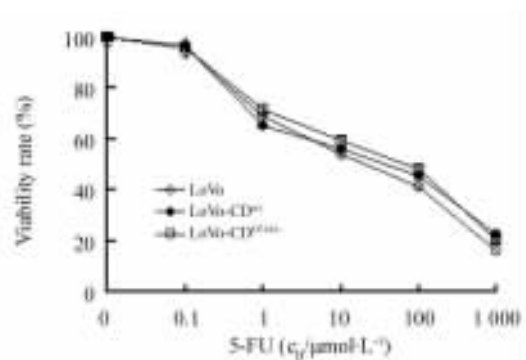


图 4 转基因 LoVo 细胞对 5-FU 的敏感性

Fig.4 Sensitivity of transfected-LoVo cells to 5-FU

2.4 5-FC 对转基因 LoVo 细胞的直接杀伤作用及旁观者效应

实验结果(图 5)显示,LoVo 细胞对 5-FC 不敏感,IC₅₀为 > 5 000 μmmol/L,而转染自杀基因后对 5-FC 的敏感性显著增强,LoVo-CD^{wt}对 5-FC 的 IC₅₀为(689.76 ± 0.45) μmol/L($P = 0.000$,LoVo-CD^{wt}细

胞 vs LoVo 细胞); LoVo-CD^{D314A} 细胞对 5-FC 的 IC₅₀ 为 (85.13 ± 0.60) mmol/L, 提示 LoVo-CD^{D314A} 细胞对 5-FC 的敏感性显著强于 LoVo 细胞 ($P = 0.000$, LoVo-CD^{D314A} 细胞 vs LoVo 细胞) 及 LoVo-CD^{wt} ($P = 0.000$, LoVo-CD^{D314A} 细胞 vs LoVo-CD^{wt} 细胞), 说明在 5-FC 存在情况下, 突变体 *D314A* 基因的细胞毒作用显著强于野生型 *EC-CD* 基因。

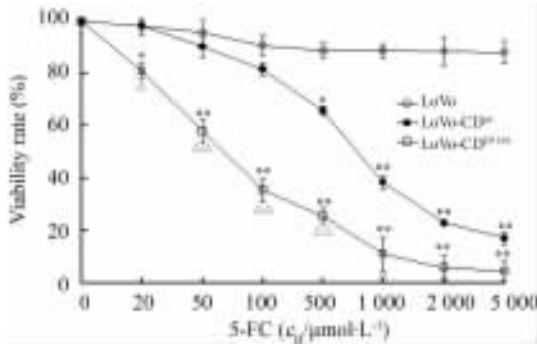


图 5 5-FC 对转基因 LoVo 细胞的直接杀伤作用

Fig.5 Direct cytotoxicity effect of 5-FC on transfected-LoVo cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs LoVo cells;

△ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ vs LoVo-CD^{wt} cells

LoVo-CD^{wt}、LoVo-CD^{D314A} 细胞均具备良好的旁观者效应。如图 6 所示, 当 LoVo-CD^{wt} 细胞比例为 30% 时, 细胞存活率为 (48.5 ± 0.49)%, 显著低于 LoVo-CD^{wt} 细胞比例为 10% 的细胞存活率 (71.2 ± 0.86) % ($P = 0.000$)。当 LoVo-CD^{D314A} 细胞比例为 30% 时, 细胞存活率为 (17.3 ± 0.40)%, 显著低于 LoVo-CD^{D314A} 细胞比例为 10% 时的细胞存活率 (46.0 ± 0.59) % ($P = 0.000$)。当 LoVo-CD^{wt} 细胞和 LoVo-CD^{D314A} 细胞比例均为 30% 时, 细胞存活率分别为 (48.5 ± 0.49) % 与 (17.3 ± 0.40) % ($P = 0.000$), 提示 *EC-CD* 基因突变体 *D314A* 的旁观者效应显著强于其野生型。

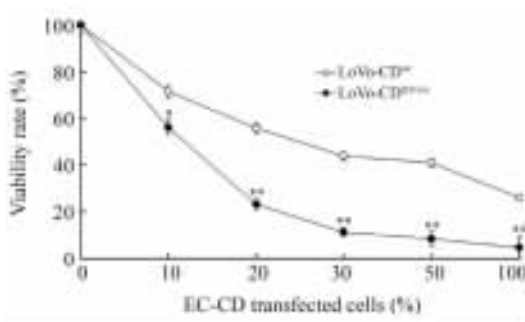


图 6 *EC-CD* 基因转染 LoVo 细胞后产生的旁观者效应

Fig.6 Bystander effect of *EC-CD* gene-transfected LoVo cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs LoVo-CD^{wt}

3 讨论

自杀基因是肿瘤基因治疗的重要策略^[1, 2, 14]。自杀基因是一类存在于病毒、细菌或真菌而哺乳动物不具备的基因, 其编码产物能将无毒或低毒的化合物(前药)转变为具有细胞毒性的物质。*EC-CD* 编码产物胞嘧啶脱氨酶可将胞嘧啶代谢为尿嘧啶和氨, 亦可将 5-FC 代谢为 5-FU, 而后者则是目前常用的基本细胞毒性化学药物^[4]。自杀基因除具有直接杀伤作用外, 还具有旁观者效应, 即不仅转染自杀基因的细胞可被前药杀死, 而且与其相邻的或远隔的未被转染的细胞也可被杀死^[1], 自杀基因的这一特性拓展了自杀基因在肿瘤基因治疗中的应用^[15]。

但是, *EC-CD* 自杀基因存在明显的不足, 体内、外显示 *EC-CD* 基因不能完全抑制肿瘤细胞的生长, 不能使体内肿瘤完全消退。尤其在经过肿瘤专一性启动子如癌胚抗原启动子改造后其细胞毒作用远不及 CMV 启动子^[4, 5], 使得 *EC-CD* 基因治疗前景不够理想。近年研究显示, 其主要原因在于胞嘧啶脱氨酶不能充分转化 5-FC, 5-FC 不是胞嘧啶脱氨酶的最佳底物, 酶动力学研究证实相对于天然底物-胞嘧啶, 胞嘧啶脱氨酶对 5-FC 的转化效率仅是胞嘧啶的 6%^[10]。Mahan 等^[10]运用随机突变法, 在多个 *EC-CD* 基因突变体中筛选获得 *D314A* 突变体, 其编码产物转化 5-FC 的效率是野生型 *EC-CD* 的 19 倍^[9], 该发现为 *EC-CD* 自杀基因治疗带来了新的希望。但 *EC-CD* 基因突变体 *D314A* 在人类肿瘤细胞中的作用研究尚不多, 由于 5-FU 是结肠癌化学治疗的基本药物, 本研究在构建该突变体的基础上, 以人结肠癌细胞系为模型研究该突变体的抗肿瘤作用。

本研究应用定点突变技术构建了 *EC-CD* 基因突变体 *D314A*, 通过酶切鉴定、测序分析等证实所构建的突变体符合实验设计要求。本研究将该突变体 *D314A* 转入人结肠癌细胞系 LoVo 细胞中, 并筛选得到稳定表达 *D314A* 的细胞系 LoVo-CD^{D314A}。为研究该突变体的抗肿瘤效应, 建立了稳定表达野生型 *EC-CD* 基因的细胞系 LoVo-CD^{wt}。进一步研究显示 LoVo 细胞表达野生型或突变型 *EC-CD* 基因后, 其对 5-FU 的敏感性无明显变化, 而且 LoVo 细胞本身对 5-FC 不敏感 (IC₅₀ 为 > 5 000 μmol/L), 提示基因转移后对 5-FC 敏感性的改变与所转移基因有关。

本实验比较了突变体 *D314A* 与野生型 *EC-CD* 基因的体外细胞毒作用及旁观者效应。LoVo 细胞转染自杀基因后对 5-FC 的敏感性均显著增强, 但与

LoVo-CD^{wt}比较,LoVo-CD^{D314A}细胞对5-FC敏感性更强($P=0.000$),提示突变体*D314A*的细胞毒作用显著增强。与LoVo-CD^{wt}相似,LoVo-CD^{D314A}细胞亦具有旁观者效应,当LoVo-CD^{wt}细胞和LoVo-CD^{D314A}细胞比例均为30%时,细胞存活率分别为(48.5 ± 0.49)%与(17.3 ± 0.40)%($P=0.000$),提示*EC-CD*基因突变体*D314A*的旁观者效应显著强于其野生型。尽管仅仅是体外实验,但这些结果均提示突变体*D314A*显示了更为强大的抗肿瘤效应,有望成为新的肿瘤自杀基因治疗的候选基因。Kaliberov等^[11,16]应用*D314A*基因治疗神经胶质瘤及胰腺癌的体外、体内研究,均显示该突变体比野生型*EC-CD*基因具有更强的转化5-FC能力,突变体*D314A*联合放射治疗在神经胶质瘤及胰腺癌均取得了令人满意的实验治疗效果。为克服野生型*EC-CD*基因对5-FC转化效率差的缺陷,目前主要有*EC-CD*与其他基因或其他疗法联合^[17-18]、*EC-CD*基因联合细胞因子等策略^[5,19]。但最近Fuchita等^[20]报告通过进一步筛选获得*EC-CD*基因新突变体1525,该突变体显示了比*D314A*突变体更加强化的转化5-FC能力及更好的应用前景,可见自杀基因突变体研究为肿瘤自杀基因治疗增添了新的策略。

[参 考 文 献]

- [1] Altaner C. Prodrug cancer gene therapy [J]. *Cancer Lett*, 2008, 270(2): 191-201.
- [2] Park JI, Cao L, Platt VM, *et al.* Antitumor therapy mediated by 5-fluorocytosine and a recombinant fusion protein containing TSG-6 hyaluronan binding domain and yeast cytosine deaminase [J]. *Mol Pharm*, 2009, 6(3): 801-812.
- [3] You MH, Kim WJ, Shim W, *et al.* Cytosine deaminase-producing human mesenchymal stem cells mediate an antitumor effect in a mouse xenograft model [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(8): 1393-1400.
- [4] Shen LZ, Wu WX, Xu DH, *et al.* Specific CEA-producing colorectal carcinoma cell killing with recombinant adenoviral vector containing cytosine deaminase gene [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(2): 270-275.
- [5] 沈历宗,华一兵,吴文溪,等. 白介素-2 基因增强胞嘧啶脱氨酶基因的抗结肠癌效应 [J]. *中华胃肠外科杂志*, 2004, 7(5): 411-413.
- [6] Kumar S, Brown SL, Kolozsvary A, *et al.* Efficacy of suicide gene therapy in hypoxic rat 9L glioma cells [J]. *J Neurooncol*, 2008, 90(1): 19-24.
- [7] Lee CH, Wu CL, Shiau AL. Hypoxia-induced cytosine deaminase gene expression for cancer therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2007, 18(1): 27-38.
- [8] Lv SQ, Zhang KB, Zhang EE, *et al.* Antitumor efficiency of the cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy system on malignant gliomas: an *in vivo* study [J]. *Med Sci Monit*, 2009, 15(1): BR13-20.
- [9] Mahan SD, Ireton GC, Stoddard BL, *et al.* Alanine-scanning mutagenesis reveals a cytosine deaminase mutant with altered substrate preference [J]. *Biochemistry*, 2004, 43(28): 8957-8964.
- [10] Mahan SD, Ireton GC, Knoeber C, *et al.* Random mutagenesis and selection of *Escherichia coli* cytosine deaminase for cancer gene therapy [J]. *Protein Eng Des Sel*, 2004, 17(8): 625-633.
- [11] Kaliberov SA, Market JM, Gillespie GY, *et al.* Mutation of *Escherichia coli* cytosine deaminase significantly enhances molecular chemotherapy of human glioma [J]. *Gene Ther*, 2007, 14(14): 1111-1119.
- [12] Tseng WC, Lin JW, Wei TY, *et al.* A novel megaprimered and ligase-free, PCR-based, site-directed mutagenesis method [J]. *Anal Biochem*, 2008, 375(2): 376-378.
- [13] Zheng L, Baumann U, Reymond JL. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(14): e115.
- [14] 周丽君,李秋香,李冬田,等. 重组腺病毒 rAd-E1A-CDglyTK 对人卵巢癌 SKOV3 细胞的抑制作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(3): 223-227.
- [15] 沈历宗,吴文溪,华一兵,等. 胞嘧啶脱氨酶基因旁观者效应与宿主免疫状态关系 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2004, 9(3): 237-240.
- [16] Kaliberova LN, Della Manna DL, Krendelchchikova V, *et al.* Molecular chemotherapy of pancreatic cancer using novel mutant bacterial cytosine deaminase gene [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(9): 2845-2854.
- [17] Tanaka T, Dufrot-Dancer A, Tiraby M, *et al.* Bystander effect from cytosine deaminase and uracil phosphoribosyl transferase genes *in vitro*: a partial contribution of gap junctions [J]. *Cancer Lett*, 2009, 282(1): 43-47.
- [18] Freytag SO, Barton KN, Brown SL, *et al.* Replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy with radiation in a pre-clinical model of pancreatic cancer [J]. *Mol Ther*, 2007, 15(9): 1600-1606.
- [19] Khatri A, Husaini Y, Ow K, *et al.* Cytosine deaminase-uracil phosphoribosyltransferase and interleukin (IL)-12 and IL-18: a multimodal anticancer interface marked by specific modulation in serum cytokines [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(7): 2323-2334.
- [20] Fuchita M, Ardiani A, Zhao L, *et al.* Bacterial cytosine deaminase mutants created by molecular engineering show improved 5-fluorocytosine-mediated cell killing *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(11): 4791-4799.

[收稿日期] 2009 - 09 - 20

[修回日期] 2009 - 11 - 06

[本文编辑] 王莹