

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.03.010

· 基础研究 ·

## 含 AFP 基因调控序列的 pAFP-P53-EGFP 质粒诱导 AFP 阳性肝癌细胞凋亡

张焕铃, 王俊霞, 尤红煜, 刘健敏, 郑 龙, 连伟光, 刘福英(河北医科大学 分子生物学研究室, 河北省实验动物重点实验室, 河北 石家庄 050017)

**[摘要]** 目的: 观察含 AFP 基因调控序列的载体对 AFP 阳性肝癌细胞的靶向致凋亡作用。方法: 将 AFP 启动子、沉默子和远端增强子 III 组合为 1.2 kb 的 AFP 基因调控序列, 构建 pAFP-EGFP 载体, 分别转染人肝癌 HepG2 (AFP 阳性)、人肝癌 SMMC7721 (AFP 阴性) 和人宫颈癌 HeLa (AFP 阴性) 细胞, 荧光显微镜下观察 EGFP 荧光蛋白表达强度。引入 P53 基因片段, 构建 pAFP-P53-EGFP 重组质粒, 转染 HepG2、SMMC7721 和 HeLa 细胞, Western blotting 检测各组细胞 P53 蛋白的表达, 流式细胞术分析各组细胞凋亡率及细胞周期。结果: 成功构建了 pAFP-EGFP 和 pAFP-P53-EGFP 重组质粒。pAFP-EGFP 转染后, AFP 阳性的 HepG2 细胞中 EGFP 荧光蛋白表达显著高于 AFP 阴性的 SMMC7721 和 HeLa 细胞。pAFP-P53-EGFP 转染后, HepG2 细胞中 P53 蛋白的表达量明显高于 SMMC7721 和 HeLa 细胞; HepG2 细胞的 G<sub>1</sub> 期细胞及细胞凋亡率明显高于 SMMC7721 和 HeLa 细胞 [ (66.7 ± 0.25)% vs (50.5 ± 0.18)%, (51.0 ± 0.20)%,  $P < 0.05$ ; (2.65 ± 0.08)% vs (0.42 ± 0.03)%, (0.39 ± 0.02)%,  $P < 0.05$  ], 但 S 期细胞明显低于转染后 SMMC7721 和 HeLa 细胞 [ (20.1 ± 0.22)% vs (29.8 ± 0.18)%, (37.8 ± 0.21)%,  $P < 0.05$  ]。结论: 含 AFP 基因调控序列的 pAFP-P53-EGFP 载体可专一性地作用于 AFP 阳性肝癌细胞, 引起肝癌细胞周期阻滞和凋亡。

**[关键词]** AFP 基因; 肝癌细胞; 表达调控; P53; 细胞周期阻滞; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R730.54; R735.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2010)03-0297-05

## pAFP-P53-EGFP plasmid containing AFP regulation sequence induces apoptosis of AFP positive hepatoma cells

ZHANG Huan-ling, WANG Jun-xia, YOU Hong-yu, LIU Jian-min, ZHENG Long, LIAN Wei-guang, LIU Fu-ying (Molecular Biology Laboratory of Hebei Medical University, Key Laboratory of Laboratory Animal of Hebei Province, Shijiazhuang 050017, Hebei, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the targeting pro-apoptotic effect of expression vector containing AFP regulation sequence on AFP positive hepatoma cells. **Methods:** AFP promoter, silencer and the most remote enhancer III were ligated to construct a 1.2 kb AFP regulation sequence, which was then used to construct a pAFP-EGFP plasmid. The pAFP-EGFP was used to transfect human hepatoma HepG2 (AFP positive), human hepatoma SMMC7721 (AFP negative) and human cervical carcinoma HeLa (AFP negative) cells; the fluorescent protein expression intensities were observed under fluorescence microscope. A pAFP-P53-EGFP plasmid was further constructed by inserting P53 gene into pAFP-EGFP, which was then transfected into HepG2, SMMC7721 and HeLa cells. P53 protein expressions were detected by Western blotting analysis in different groups; apoptosis rates and cell cycles were examined by flow cytometry. **Results:** pAFP-EGFP and pAFP-P53-EGFP recombinant plasmids were successfully constructed. The expression of EGFP fluorescent protein in pAFP-EGFP-transfected AFP positive HepG2 cells was significant higher than those in AFP negative SMMC7721 and HeLa cells; P53 protein expression in HepG2 cells transfected with pAFP-P53-EGFP was also significantly higher than those in SMMC7721 and HeLa cells. The G<sub>1</sub> phase proportion and apoptosis rate of pAFP-P53-EGFP-transfected HepG2 cells were significantly higher than those of SMMC7721 and HeLa cells [ (66.7 ± 0.25)% vs (50.5 ± 0.18)%, (51.0 ± 0.20)%,  $P < 0.05$ ; (2.65 ± 0.08)% vs (0.42 ± 0.03)%, (0.39 ± 0.02)%,  $P < 0.05$  ], but S phase pro-

**[基金项目]** 河北省科技支撑计划重点基金项目 (No.09276426D)。Project supported by the Key Program of Science and Technology Supporting Foundation of Hebei Province (No.09276426D)

**[作者简介]** 张焕铃 (1978 -), 女, 河北省石家庄市人, 讲师, 硕士生, 从事分子生物学方面研究。E-mail: lha78@163.com

**[通信作者]** 刘福英 (LIU Fu-ying, corresponding author), E-mail: lfy5579@126.com

portion of pAFP-P53-EGFP-transfected HepG2 cells was significantly lower than those of SMMC7721 and HeLa cells ( $[20.1 \pm 0.22]\%$  vs  $[29.8 \pm 0.18]\%$ ,  $[37.8 \pm 0.21]\%$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The pAFP-P53-EGFP plasmid containing *AFP* regulation sequence can specifically target *AFP* positive hepatoma cells, inducing cell cycle arrest and apoptosis of hepatoma cells.

[ **Key words** ] *AFP* gene; hepatoma cell; expression and regulation; *P53*; cell cycle arrest; apoptosis

[ Chin J Cancer Biother, 2010, 17(3): 297-301 ]

如何使治疗基因产物专一地杀伤肝癌细胞, 而不损害正常的肝脏细胞及其他正常细胞, 提高治疗效果, 避免毒性作用, 是肝癌基因治疗的瓶颈。甲胎蛋白基因( alpha fetoprotein, *AFP*)是在发育过程中受到严格调控的, 出生后甲胎蛋白的表达迅速降低。然而在原发性肝癌、肝细胞癌和畸胎瘤中 *AFP* 基因又重新被活化<sup>[1-5]</sup>, 说明肝细胞癌和畸胎瘤中存在 *AFP* 表达调控机制, 因此 *AFP* 被认为是肝细胞癌的标志分子。*AFP* 基因上游有 7 kb 的调控序列, 该调控区域有 1 个组织特异性启动子、3 个独立的增强子和 1 个沉默子<sup>[6]</sup>。非组织特异性转录因子和组织特异性转录因子共同作用于 *AFP* 的表达调控元件, 使 *AFP* 的表达具有严格的时间空间特异性。*AFP* 最远端的增强子 III, 位于 -6.1 kb ~ -5.8 kb, 已被证实最具增强子活性。本研究将大鼠来源 *AFP* 最远端增强子 III<sup>[7-8]</sup> 及其下游位于 -800 bp ~ -250 bp 的沉默子和启动子进行优化组合, 构建了 1.2 kb 的基因表达调控序列, 将其克隆入 pEGFP-N1, 连接抑癌基因 *P53*, 通过对细胞周期阻滞作用来证明此治疗载体具有肝癌细胞的专一性。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与试剂

实验用人肝癌 HepG2 细胞株、人肝癌 SMMC7721 细胞株和人宫颈癌 HeLa 细胞株由本室保存。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本室保存。pEGFP-N1 质粒由本室保存, pCMV-P53 质粒引自中国疾病预防控制中心。

引物、*EcoR* I、*Sma* I、*Xho* I、T4 DNA 连接酶和平末端连接试剂盒均购自 TaKaRa 生物制品有限公司, *Ase* I 和 *Nhe* I 购自 Toyobo 生物制品有限公司, TaqDNA 聚合酶、dNTP 混合物和 DNA Marker III 为 Tiangen 产品, lipofectamine<sup>TM</sup>2000 为 Invitrogen 公司产品, 免抗 P53 抗体、辣根酶标记羊抗兔 IgG 为北京博奥森生物公司产品。

### 1.2 pAFP-EGFP 重组质粒的构建

以 *Ase* I 和 *Nhe* I 切除 pEGFP-N1 质粒的启动子 CMV, 胶回收 4 100 bp 的片段, 采用平末端连接试

剂盒, 将 4 100 bp 的两个末端补平后进行连接。

由于人和大鼠的 *AFP* 基因具有高度同源性, 本实验以 SD 大鼠肝脏的基因组 DNA 为模板, 扩增 *AFP* 900 bp 启动子和 300 bp 增强子。900 bp 启动子上游引物为 5'-TCCCCCGGGAATGCCCTCTTCTGACCTCT-3', 下游引物为 5'-CGGAATTCATACTGTGAGCAGTAGCGCT-3'。300 bp 增强子上游引物为 5'-CCGCTCGAGTGTCTAGTGTACC-3', 下游引物为 5'-TCCCCCGGCTTTGTTTAATTCGAGCCTAT-3'。将 PCR 产物分别胶回收后用 *Sma* I 进行酶切, 纯化后将两片段 16 °C 进行连接过夜; 以连接产物为模板, 5'-CCGCTCGAGTGTCTAGTGTACC-3'、5'-TCCCCCGGCTTTGTTTAATTCGAGCCTAT-3' 为引物, 扩增后回收 1 200 bp 产物与去 CMV 的 pEGFP-N1 质粒, 分别 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 回收酶切片段, 16 °C 连接过夜, 转化, 次日挑取克隆, 分别进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定和 PCR 鉴定。

### 1.3 以 pAFP-EGFP 质粒转染肿瘤细胞并验证 AFP 阳性细胞的专一性

取对数生长期的 HepG2、SMMC7721 和 HeLa 细胞, 以  $1 \times 10^6$ /孔接种于 12 孔板中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。在细胞铺满孔底约 90% 时进行转染。转染前 1 h, 每孔更换无抗生素无小牛血清的 DMEM 培养基 0.8 ml。以 12 孔板的一个孔为例: 在 100  $\mu$ l 无血清、无抗生素 DMEM 培养基中加入 DNA 1.6 ng, 并轻轻混匀; 取 4.0  $\mu$ l lipofectamine<sup>TM</sup>2000 加入到 100  $\mu$ l 无血清无抗生素 DMEM 中; 将稀释的质粒和脂质体共 200  $\mu$ l 迅速混匀, 在室温下孵育 20 min; 细胞板的每孔中加入混合液 200  $\mu$ l, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中培养 24 h。用荧光显微镜观察荧光表达强度。

### 1.4 pAFP-P53-EGFP 重组质粒的构建

以 pCMV-P53 为模板, 通过 PCR 反应克隆 *P53* 基因片段, *P53* 的 5'-端引物为 5'-CGGAATTCAC-CATGGAGGAGCCGAGTCA-3', 3'端引物为 5'-CGG-GATCCTGAGTCAGGCCCTTCTGTCTTGACC-3'。以 *EcoR* I 和 *Bam*H I 对 *P53* 的 PCR 产物和 pAFP-EGFP 分别进行双酶切, 16 °C 连接过夜, 得到 pAFP-

P53-EGFP 重组质粒,分别进行 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定和 PCR 鉴定。

### 1.5 Western blotting 检测 pAFP-P53-EGFP 重组质粒转染细胞中 P53 蛋白的表达

以 pAFP-P53-EGFP 转染 HepG2、SMMC7721 和 HeLa 细胞,方法同 pAFP-EGFP 转染,并以未转染 pAFP-P53-EGFP 的 HepG2、SMMC7721 和 HeLa 做对照。

收集转染 pAFP-P53-EGFP 的 HepG2、SMMC7721 和 HeLa 细胞及未转染重组质粒的 HepG2、SMMC7721 和 HeLa 细胞,每种细胞调整至  $4 \times 10^5$ /ml,用裂解法制备细胞总蛋白。将蛋白与加样缓冲液按 4:1 比例混合,100 °C 煮沸 5 min,离心取上清 30  $\mu$ l/孔,15% SDS-PAGE,转膜,封闭,一抗、二抗分别结合,HRP 显色、拍照,Bandscan 进行灰度扫描,条带定量分析。

### 1.6 流式细胞术分析细胞周期和凋亡率

转染 pAFP-P53-EGFP 的 HepG2、SMMC7721 和 HeLa 细胞在 36 h 后收集,细胞调整密度至  $1 \times 10^7$ /ml,PBS 洗 2 次,75% 乙醇固定过夜,调整细胞密度制备单细胞悬液,PI 和 Hoechst 33342 活细胞荧光双染,避光染色 30 min,上流式细胞仪检测细胞周期和凋亡率。

### 1.7 数据统计处理

数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间比较采用 *t* 检验,采用 SAS10.0 统计软件进行分析。

## 2 结果

### 2.1 pAFP-EGFP 重组质粒的鉴定

*Ase* I 和 *Nhe* I 酶切 CMV 后的 pEGFP-N1 质粒(图 1)为 4 100 bp,AFP 调控序列为 1 200 bp,两者连接后构成 5 300 bp 的质粒 pAFP-EGFP,经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定及 PCR 鉴定插入序列为 1.2 kb 片段(图 2),与 AFP 调控序列长度相等。

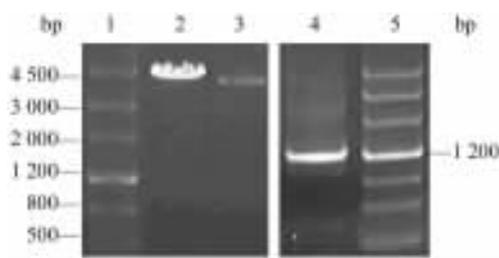


图 1 pAFP-EGFP 质粒的构建

Fig. 1 Constructions of pAFP-EGFP plasmid

1,5: Marker; 2: pEGFP-N1; 3: pEGFP-N1 digested by *Ase* I and *Nhe* I; 4: Amplified AFP

### 2.2 重组质粒 pAFP-EGFP 转染后 AFP 阳性细胞表达 EGFP 荧光蛋白

pAFP-EGFP 分别转染 HepG2、SMMC7721 和 HeLa 细胞,荧光显微镜下观察荧光蛋白表达强度。结果如图 3 所示,AFP 表达阳性的 HepG2 细胞中荧光蛋白表达强度明显高于 AFP 表达阴性的 SMMC7721 和 HeLa 细胞。

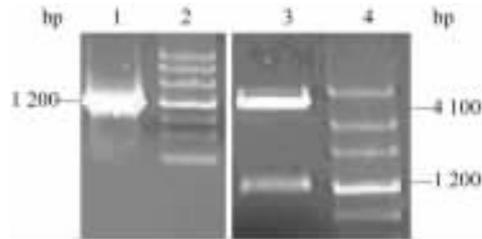


图 2 pAFP-EGFP 质粒的鉴定

Fig. 2 Identification of pAFP-EGFP plasmid

1: Amplified AFP; 2,4: Marker; 3: pAFP-EGFP digested by *EcoR* I and *Xho* I



图 3 pAFP-EGFP 转染后 HepG2、HeLa 和 SMMC7721 细胞 EGFP 荧光蛋白的表达(  $\times 100$  )

Fig. 3 Expressions of EGFP in HepG2, HeLa and SMMC7721 cells after transfection with pAFP-EGFP(  $\times 100$  )

A: HepG2 cells; B: HeLa cells; C: SMMC7721 cells

### 2.3 pAFP-P53-EGFP 重组质粒的鉴定

扩增得到的 P53 基因序列与双酶切后的 pAFP-EGFP 质粒连接构成 6 480 bp 的质粒 pAFP-P53-EGFP,经 *EcoR*I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定及 PCR 鉴定插入序列为 1 180 bp 片段(图 4),与 P53 序列长度相等。

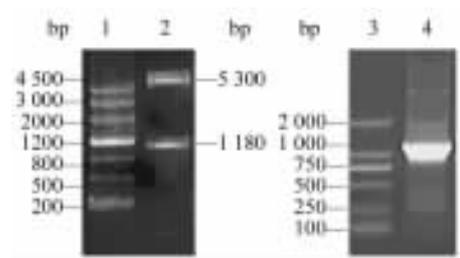


图 4 pAFP-P53-EGFP 质粒的鉴定

Fig. 4 Identification of pAFP-P53-EGFP plasmid

1,3: Marker; 2: pAFP-P53-EGFP digested by *EcoR* I and *Bam*H I; 4: Amplified P53

### 2.4 转染 pAFP-P53-EGFP 后 HepG2、SMMC7721 和 HeLa 细胞中 P53 蛋白的表达

Western blotting 检测转染 pAFP-P53-EGFP 后的 HepG2、SMMC7721 和 HeLa 细胞,以及未转染的 HepG2、SMMC7721 和 HeLa 细胞中 P53 蛋白的表达,各细胞表达蛋白的灰度对数值分别为  $7.20 \pm 0.05$ 、 $6.77 \pm 0.16$ 、 $6.81 \pm 0.12$  和  $6.67 \pm 0.15$ 、 $6.65 \pm 0.25$ 、 $6.69 \pm 0.13$ 。转染 pAFP-P53-EGFP 的 HepG2 细胞 P53 蛋白的表达量要明显高于转染的 SMMC7721 和 HeLa 细胞及未转染的 HepG2、SMMC7721 和 HeLa 细胞,说明在 AFP 启动子的驱动下,P53 融合蛋白表达具有细胞相对专一性(图5)。



图5 转染 pAFP-P53-EGFP 后 HepG2、SMMC7721 和 HeLa 细胞中 P53 蛋白的表达

Fig.5 Expressions of P53 in HepG2, SMMC7721 and HeLa cells transfected with pAFP-P53-EGFP

1,2,3: SMMC7721, HeLa and HepG2 cells transfected with pAFP-P53-EGFP; 4,5,6: HepG2, HeLa and SMMC7721 cells

### 2.5 转染 pAFP-P53-EGFP 重组质粒后 HepG2、SMMC7721 和 HeLa 细胞周期时相和凋亡率的变化

流式细胞术检测转染 pAFP-P53-EGFP 重组质粒的 HepG2、SMMC7721 和 HeLa 细胞周期时相和凋亡率的差异。结果(图6、7)显示,HepG2 细胞凋亡率为( $2.65 \pm 0.08$ )%,  $G_1 = (66.7 \pm 0.25)\%$ 、 $G_2 = (11.8 \pm 0.23)\%$ 、 $S = (20.1 \pm 0.22)\%$ ;HeLa 细胞凋亡率为( $0.42 \pm 0.03$ )%、 $G_1 = (50.5 \pm 0.18)\%$ 、 $G_2 = (20.5 \pm 0.19)\%$ 、 $S = (29.8 \pm 0.18)\%$ ;SMMC7721 细胞凋亡率为( $0.39 \pm 0.2$ )%、 $G_1 = (51.0 \pm 0.20)\%$ 、 $G_2 = (10.6 \pm 0.13)\%$ 、 $S = (37.8 \pm 0.21)\%$ 。由此可见,转染 pAFP-P53-EGFP 重组质粒的 HepG2 细胞的凋亡率及  $G_1$  期细胞明显高于 SMMC7721 细胞和 HeLa 细胞(均  $P < 0.05$ ),而 HepG2 的 S 期细胞明显低于 SMMC7721 和 HeLa 细胞(均  $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

利用肿瘤细胞专一性较好的基因表达调控序列调控治疗基因只在肿瘤细胞中表达,而在正常细胞中不表达,对于肿瘤基因治疗非常重要。已知 AFP

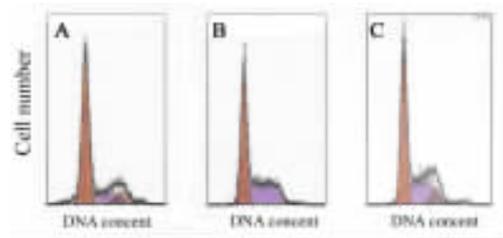


图6 流式细胞术检测转染 pAFP-P53-EGFP 后 HepG2、SMMC7721 和 HeLa 细胞的细胞周期  
Fig.6 Cell cycles of HepG2, SMMC7721 and HeLa cells transfected with pAFP-P53-EGFP as detected by flow cytometry

A: HepG2 cells; B: HeLa cells; C: SMMC7721 cells

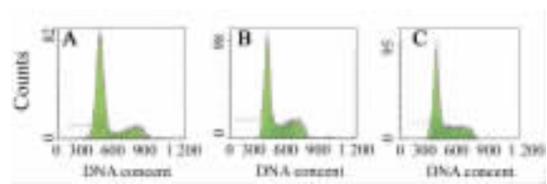


图7 流式细胞术检测转染 pAFP-P53-EGFP 后 HepG2、SMMC7721、HeLa 细胞的凋亡率

Fig.7 Apoptosis rates of HepG2, SMMC7721 and HeLa cells transfected with pAFP-P53-EGFP as detected by flow cytometry

A: HepG2 cells; B: HeLa cells; C: SMMC7721 cells

是一个肝癌细胞的标志性蛋白质,81%以上的原发性肝细胞肝癌患者血清中 AFP 水平明显升高<sup>[3]</sup>,说明有一个特异的基因表达调节机制存在于 AFP 阳性肝癌细胞中调控着 AFP 的表达。AFP 的上游表达调控序列长达 7 kb,而目前使用的基因治疗的载体,都无法容纳 7 kb 这么大的插入物。本研究将与人类高度同源的大鼠来源 AFP 最远端的增强子 III 及位于其下游的沉默子和启动子进行优化组合,构建成 1.2 kb 的基因表达调控序列,并将其克隆入 pEGFP-N1,取代启动子 CMV,构成重组质粒 pAFP-EGFP。pAFP-EGFP 质粒转染 AFP 阳性的 HepG2 细胞和 AFP 阴性的 SMMC7721 细胞及 HeLa 细胞。结果显示, HepG2 中荧光表达强度明显高于 SMMC7721 和 HeLa 细胞,证明了 pAFP-EGFP 的表达调控序列的相对专一性。然而质粒在 AFP 阴性的 SMMC7721 和 HeLa 细胞中也有微弱表达,这与许多文献报道的在 AFP 阴性细胞中不表达有所不同<sup>[1,7,9-10]</sup>。原因可能是由于截短的 AFP 启动子不能折叠成正确的空间构象,不利于 DNA 结合蛋白彼此相互作用来抑制下游基因在 AFP 阴性的细胞中表达。AFP 的表达调控序列长达 7kb,和这些调控

元件相结合的转录因子之间要发生相互作用,形成网络协同调控下游基因的表达,如果两个转录因子之间的结合序列距离较远(如增强子Ⅲ和启动子),那么它们之间要发生相互作用就需要第3种因子的参与,如HMG-1,它介导了DNA的弯曲,使表达调控元件折叠成一种有利于上下游转录因子相互作用的构象,这种调控方式已经在人类 $\beta$ 干扰素的表达中得到证实。然而本研究采用了这种截短的调控序列组合,很可能使上下游的转录因子距离拉近,但还达不到相互作用的距离要求,也不能通过弯曲蛋白将DNA弯曲成有利于上下游转录因子相互作用的构象。另外,实验中1.2 kb的表达调控序列,含有启动子的核心序列和沉默子以及远端的增强子Ⅲ,但决定组织特异性表达的因素还包括与增强子Ⅰ、增强子Ⅱ结合的转录因子,这也是造成pAFP-EGFP在AFP阴性细胞中微弱表达的原因之一。

为了探索重组质粒靶向治疗的可行性,本研究在pAFP-EGFP质粒的多克隆位点插入了野生P53基因<sup>[11]</sup>,并通过引物设计引入了能增强下游基因在真核细胞表达的Kozak序列,形成P53-EGFP的融合基因。当DNA受到损伤,P53蛋白使细胞周期停滞在G<sub>1</sub>期,使受损的DNA修复,如果不能修复则诱导凋亡<sup>[12-14]</sup>。本研究构建了pAFP-p53-EGFP质粒,并将其转染HepG2, SMMC7721和HeLa细胞,用Western blotting检测这3种细胞P53蛋白表达量的差异。结果显示,HepG2细胞中P53蛋白的表达量要明显高于其他两种细胞,进一步证明了AFP启动子的相对专一性。然而在未转染的HepG2、SMMC7721和HeLa细胞中也检测到P53蛋白的表达(均低于转染pAFP-P53-EGFP的细胞),说明可能在这些细胞中P53并没有完全失活。通过流式细胞仪检测转染pAFP-P53-EGFP的3种细胞的凋亡率,及各细胞周期的变化,HepG2的凋亡率及G<sub>1</sub>细胞百分比要明显高于其他两种细胞,证明P53的表达具有细胞相对专一性,但实验结果中各细胞的凋亡率均较低,可能与检测凋亡所采用的染料及方法有关。HepG2细胞的凋亡率只有2.6%左右,还远远不能达到本研究所预想的治疗效果。可能原因有:(1)P53在癌细胞中被其他的结合蛋白结合,抑制了其细胞周期阻滞和促凋亡的功能;(2)1.2 kb的表达调控序列不能高效地调控下游基因的表达,不能有效地激活转录;(3)P53和AFP的表达调控序列相结合抑制了其自身表达载体的转录活性。以上假

设都有待于本课题后续研究去进一步证实。

## [参考文献]

- [1] Shi YJ, Gong JP, Liu CA. Construction of a targeting adenoviral vector carrying AFP promoter for expressing EGFP gene in AFP-producing hepatocarcinoma cell [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(2): 186-189.
- [2] 徐建业, 林丁, 李伟道, 吴立翔, 刘预, 易玲, 等. 甲胎蛋白诊断原发性肝癌准确性的系统评价[J]. 中国循证医学杂志, 2009, 9(5): 525-530.
- [3] 赵斌, 赵经川, 李昭宇. AFP联合三项血清酶对原发性肝癌的诊断评价[J]. 宁夏医学杂志, 2010, 32(1): 20-21.
- [4] 辛永宁, 宣世英. 原发性肝癌与甲胎蛋白研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2007, 23(2): 141-143.
- [5] 姚登福, 顾文静, 李月明. 肝细胞癌变过程中相关生长因子的表达与动态变化[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(23): 2570-2575.
- [6] Ramesh TM, Ellis AW, Spear BT. Individual mouse alpha-fetoprotein enhancer elements exhibit different patterns of tissue-specific and hepatic position-dependent activities [J]. Mol Cell Bio, 1995, 15(9): 4947-4955.
- [7] Lu SY, Sui YF, Li ZS. Construction of a regulable gene therapy vector targeting for hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(4): 688-691.
- [8] 许德华, 戈凯, 郑仲承, 刘新垣. 两种阳性肝癌细胞专一基因AFP表达调控序列的构建[J]. 生物化学与生物物理学报, 1998, 30(4): 363-368.
- [9] 全硕, 潘国宗, 鲁重美, 刘东远, 左瑾, 方福德, 等. 甲胎蛋白特异启动元件介导的肝癌靶向性基因治疗的体外实验研究[J]. 中国医学科学院学报, 1999, 21(2): 111-117.
- [10] 程纪华, 冷希圣, 彭吉润, 何湘君, 蔡胜利, 张佑彬, 等. 甲胎蛋白启动子调控表达P53基因的肝癌细胞靶向性基因治疗载体的研究[J]. 中华医学杂志, 2000, 80(6): 461-463.
- [11] Bourdon JC. p53 and its isoforms in cancer [J]. British J Cancer, 2007, 97(3): 277-282.
- [12] Fuster JJ, Sanz Gonzalez SM, Moll UM. Classic and novel roles of p53: Prospects for anticancer therapy [J]. Trends Mol Med, 2007, 13(5): 192-199.
- [13] Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(14): 8424-8429.
- [14] 彭程, 张阳德, 李年丰, 龚连生, 彭健. 野生型P53基因诱导人肝癌HepG2/5-Fu耐药细胞株凋亡的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(20): 2441-2448.

[收稿日期] 2010-02-23

[修回日期] 2010-04-12

[本文编辑] 韩丹