

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.03.05

· 基础研究 ·

减毒水泡性口炎病毒诱导宫颈癌 HeLa 细胞的凋亡及其作用机制

连海¹, 张静敏², 夏志平¹, 汤晶², 张爽¹, 于玲¹(1. 军事医学科学院第十一研究所 基础研究室, 吉林 长春 130062; 2. 吉林大学 药学院, 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的: 研究减毒水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)对宫颈癌 HeLa 细胞的凋亡诱导作用, 并探讨其可能的机制。方法: 将减毒 VSV 以 1.0 MOI 的接种密度感染 HeLa 细胞, 在 6、12、18、24 和 30 h 后收集细胞, MTT 法检测 HeLa 细胞的增殖; AO/EB 染色观察 HeLa 细胞凋亡形态学变化, Annexin V-FITC/PI 双染法检测 HeLa 细胞早期凋亡率, 流式细胞术分析 HeLa 细胞 sub-G₁ 凋亡峰, JC-1 染色法测定细胞线粒体跨膜电位水平, caspase 试剂盒检测 HeLa 细胞 caspase-3、caspase-8 及 caspase-9 的活性。结果: 减毒 VSV 感染 HeLa 细胞 12 和 24 h 后, HeLa 细胞增殖活力分别为 (78.4 ± 1.9)% 和 (63.1 ± 5.6)% ($P < 0.01$); 早期凋亡细胞率分别为 (16.88 ± 2.48)% 和 (31.9 ± 4.24)% ($P < 0.01$), sub-G₁ 凋亡峰分别为 (14.85 ± 1.48)% 和 (21.05 ± 2.28)% ($P < 0.01$)。随着减毒 VSV 感染时间的增加, HeLa 细胞线粒体跨膜电位逐渐降低 ($P < 0.05$), caspase-9 和 caspase-3 的活性显著升高 (均 $P < 0.05$)。结论: 减毒 VSV 能够抑制 HeLa 细胞的增殖, 并通过 caspase-9 和 caspase-3 依赖的途径诱导 HeLa 细胞凋亡。

[关键词] 水泡性口炎病毒; 宫颈肿瘤; HeLa 细胞; 凋亡

[中图分类号] R737.33; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)03-0264-06

Attenuated vesicular stomatitis virus induces apoptosis in cervical cancer HeLa cells and its mechanism

LIAN Hai¹, ZHANG Jing-min², XIA Zhi-ping¹, TANG Jing², ZHANG Shuang¹, YU Ling¹(1. Department of Basic Sciences, Eleventh Institute of Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, Jilin, China; 2. School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, Jilin, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the apoptosis-inducing effect of an attenuated vesicular stomatitis virus in cervical cancer HeLa cells, and to explore the possible mechanism. **Methods:** HeLa cells were infected with VSV (MOI = 1.0) and the cell proliferation was determined by MTT assay at 6, 12, 18, 24, and 30 h after infection. Morphological changes of apoptosis were observed by acridine orange (AO)/ethidium bromide (EB) staining. Annexin V/PI double-staining was performed to detect early apoptosis rate of HeLa cells and the sub-G₁ apoptotic peak was examined by flow cytometry. The mitochondrial membrane potential of HeLa cells was measured by the JC-1 staining. The activities of caspase-9, -8 and -3 were measured by caspase assay kit. **Results:** After HeLa cells were exposed to attenuated VSV for 12 h and 24 h, the viabilities of cells were reduced to (78.4 ± 1.9)% and (63.1 ± 5.6)% ($P < 0.01$); the early apoptosis rates were (16.88 ± 2.48)% and (31.9 ± 4.24)% ($P < 0.01$); the Sub-G₁ apoptotic peaks were (14.85 ± 1.48)% and (21.05 ± 2.28)% ($P < 0.01$), respectively. Attenuated VSV significantly decreased mitochondrial membrane potential in HeLa cells with the increase of infection time ($P < 0.05$). The activities of caspase-9 and caspase-3 of HeLa cells were significantly increased after VSV infection (all $P < 0.05$). **Conclusion:** The attenuated VSV can inhibit the proliferation

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 31001070); 吉林省科技发展计划项目(No. 20100146); 军事医学科学院第十一研究所创新启动基金资助项目(No. YCX0902)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31001070), the Science and Technology Development Foundation of Jilin Province (No. 20100146), and the Innovative Start-up Foundation of the Eleventh Institute of Academy of Military Medical Sciences (No. YCX0902)

[作者简介] 连海(1975 -), 男, 吉林省四平市人, 博士, 助理研究员, 主要从事病毒及其结构蛋白诱导细胞凋亡的信号转导机制研究。E-mail: lhuman@163.com

[通信作者] 张静敏(ZHANG Jing-min, corresponding author), E-mail: zjm6987@hotmail.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110531.1700.007.html>

of HeLa cells and trigger apoptosis via caspase-9 and caspase-3-dependent pathway.

[**Key words**] vesicular stomatitis virus (VSV); cervical cancer; HeLa cell; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(3): 264-269]

宫颈癌是一种发生在子宫颈上皮的恶性肿瘤,作为全球女性恶性肿瘤的第二大杀手,宫颈癌的防治已成为全球性的公共卫生问题^[1]。统计数据显示,全球每年新发宫颈癌病例约有 55.51 万,其中我国新发病例占 28.8%,达到 13.15 万。全世界每年约有 30.98 万人死于宫颈癌,我国约有 2~3 万人^[2]。值得关注的是,近年来我国宫颈癌的发病率不仅有上升趋势,而且有明显的年轻化倾向,因而宫颈癌的防治任务仍十分艰巨^[3]。

溶癌病毒是一类具有复制能力的肿瘤杀伤型病毒,其可以依靠病毒本身在肿瘤细胞中特异性复制而杀死并裂解肿瘤细胞,从中释放出来的病毒又可以进一步感染周围的肿瘤细胞,达到理想的肿瘤治疗效果^[4,5]。水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)是一种溶癌病毒,属于弹状病毒科(rhabdoviridae)水泡病毒属(vesiculovirus)的典型成员,其基因组为单股负义 RNA^[6,7]。VSV 在体外能够诱导多种肿瘤细胞凋亡,但其作用机制并未完全阐明^[8]。一般来说,VSV 减毒株因基质蛋白 M 的变异能够在肿瘤细胞中具有较好的增殖特性。本研究主要探索一株实验室减毒水泡性口炎病毒诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的作用机制,为其进一步用于宫颈癌的防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

印第安纳株水泡性口炎病毒(VSV-IND)由本实验室保存,在 BHK-21 细胞上经多次传代减毒,病毒滴度为 6×10^7 PFU/ml。HeLa 细胞由军事医学科学院吴广谋副研究员惠赠,由本室传代并保存。细胞生长于含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基中,置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养。RPMI 1640 培养基、新生牛血清和谷氨酰胺购自 Gibco 公司,胰蛋白酶和胎牛血清购自 Hyclone 公司。MTT、AO/EB、细胞 DNA 含量检测试剂盒、Anexin V-FITC 凋亡检测试剂盒、JC-1 染色试剂盒以及 caspase-3、-8 和 -9 活性检测试剂盒均购自南京凯基生物技术有限公司。

1.2 减毒 VSV 感染 HeLa 细胞

将 HeLa 细胞用胰酶分散后,培养于 6 孔培养板(1×10^6 /孔),培养细胞丰度达 80% 后,用 PBS 洗

2 次,将减毒 VSV 接种于 HeLa 细胞(MOI = 1.0),同时设接种相同体积培养液的 mock 感染组;吸附 40 min,洗去未吸附的病毒,添加含有 2% 胎牛血清的 RPMI 1640 维持液。

1.3 MTT 检测减毒 VSV 对 HeLa 细胞存活的影响

将减毒 VSV 感染 HeLa 细胞后,分别于感染后 6、12、18、24、30 h 加入 MTT 溶液(5 mg/ml,溶于 PBS 中)20 μ l,37 °C、5% CO₂ 继续培养 4 h,中止培养,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 150 μ l DMSO,震荡 10 min,使结晶物充分溶解。酶联免疫检测仪 490 nm 处测各孔 D 值。细胞存活率(%) = (实验组细胞 D/对照组细胞 D) \times 100%。

1.4 吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)染色观察 HeLa 细胞的形态

用细胞刮刀收集经减毒 VSV 感染的 HeLa 细胞,PBS 洗涤细胞 2 次,离心 $2\,000 \times g$ 、5 min,收集并调整细胞密度至 5×10^5 /ml。用 1 μ l AO/EB 溶液(AO 与 EB 的质量浓度比为 1:1)孵育 25 μ l 悬浮细胞($0.5 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 个),轻微混合。置 10 μ l 悬浮细胞于显微载玻片上,加盖玻片,荧光显微镜 510 nm 激发波长观察至少 200 个细胞。

1.5 流式细胞术分析细胞 sub-G₁ 凋亡峰值

用细胞刮刀收集经减毒 VSV 感染的 HeLa 细胞,PBS 洗涤细胞 1 次,离心 $2\,000 \times g$ 、5 min 收集并调整细胞密度至 1×10^6 /ml。制备的单细胞悬液用 70% 乙醇固定,4 °C 保存,染色前用 PBS 洗去固定液。加 100 μ l RNase A 37 °C 水浴 30 min,再加入 400 μ l PI 染色混匀,4 °C 避光 30 min,上机检测,记录激发波长 488 nm 处红色荧光。

1.6 Annexin V-FITC/PI 双染法检测减毒 VSV 感染 HeLa 细胞的凋亡

用细胞刮刀收集经减毒 VSV 感染的 HeLa 细胞,PBS 洗涤细胞 1 次,离心 $2\,000 \times g$ 、5 min,收集并调整细胞密度至 5×10^5 /ml。加入 500 μ l 的结合缓冲液悬浮细胞,加入 5 μ l Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μ l PI 混匀,室温避光反应 10 min。用流式仪检测,激发波长为 488 nm,Annexin V-FITC 的绿色荧光通过 FITC 通道(FL1)检测,PI 红色荧光通过 PI 通道(FL3)检测。

1.7 JC-1 染色分析细胞线粒体的跨膜电位($\Delta\Psi_m$)

用细胞刮刀收集经减毒 VSV 感染的 HeLa 细

胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次,离心 $2\ 000 \times g$ 、5 min,收集不多于 1×10^6 个细胞。吸取 500 μl 孵育缓冲液,加入 1 μl JC-1,涡旋混匀配成 JC-1 工作液。取 500 μl JC-1 工作液将细胞均匀悬浮,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育 15 ~ 20 min。室温离心 $2\ 000 \times g$ 、5 min,收集细胞,用孵育缓冲液洗 2 次,吸取 500 μl 孵育缓冲液重新悬浮细胞。流式仪检测,绿色荧光通过 FITC 通道通常为 FL1 来检测,红色荧光通过 PI 通道通常为 FL2 来检测。

1.8 Caspase 试剂盒检测减毒 VSV 感染后 HeLa 细胞的 caspase 活性

用细胞刮刀收集经减毒 VSV 感染的 HeLa 细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次,离心 $2\ 000 \times g$ 、5 min,收集不多于 5×10^6 个细胞。在收集的沉淀细胞中加入 50 μl 冰冷裂解缓冲液,吹打均匀。置冰上裂解 20 ~ 60 min,其间振荡 3 ~ 4 次,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 $10\ 000 \times g$ 、1 min,小心吸取上清液转移至新的管中,并放置冰上待用。取少量上清液(1 ~ 2 μl),常规方法测定其中的蛋白浓度。吸取 50 μl 含 100 ~ 200 μg 蛋白的细胞或组织裂解上清液,caspase 检测试剂盒检测 caspase 活性:加入 50 μl 的 $2 \times$ 反应缓冲液,加入 5 μl caspase-3(caspase-8 或-9)底物并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 4 h,用酶标仪在 λ 为 405 nm 或 400 nm 处测定其光密度(D)值。Caspase 活性(%) = (VSV 感染细胞 D /MOCK 感染细胞 D) $\times 100\%$ 。

1.9 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 软件进行 t 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 减毒 VSV 感染抑制 HeLa 细胞的增殖

用 MTT 法检测减毒 VSV 感染对 HeLa 细胞增殖的抑制作用,结果如图 1 所示,减毒 VSV 感染 HeLa 细胞 6、12、18、24 和 30 h 后,细胞存活率分别为 $(92 \pm 3.8)\%$ 、 $(78.4 \pm 1.9)\%$ 、 $(73.5 \pm 3.6)\%$ 、 $(63.1 \pm 5.6)\%$ 和 $(50.3 \pm 5.5)\%$,明显地随时间延长呈递减趋势。因此,减毒 VSV 感染时间依赖性地抑制 HeLa 细胞的增殖。

2.2 减毒 VSV 诱导 HeLa 细胞凋亡的形态学变化

AO/EB 染色结果显示,减毒 VSV 感染 HeLa 细胞 12 和 24 h 后,部分细胞呈现形态不规则、核染色质凝聚、胞核固缩染色等典型的凋亡形态学变化。而 mock 感染组细胞由于细胞形态完整,呈均匀的绿色分布(图 2)。

2.3 减毒 VSV 感染诱导 HeLa 细胞的 sub- G_1 凋亡峰

取减毒 VSV 感染后 12 和 24 h 的 HeLa 细胞,经乙醇固定、PI 染色后,用流式细胞仪测定其核酸 DNA 降解情况,评价感染细胞的凋亡水平。结果如图 3 所示,减毒 VSV 感染细胞在 G_0/G_1 期前都出现了亚二倍体 DNA 峰,减毒 VSV 感染 12 h 后凋亡细胞比例为 $(14.85 \pm 1.48)\%$ ($P < 0.01$ vs mock),24 h 达到 $(21.05 \pm 2.28)\%$ ($P < 0.01$ vs mock),而 mock 感染细胞无明显的亚二倍体 DNA 峰,凋亡细胞比例仅为 $(5.38 \pm 1.07)\%$ 。

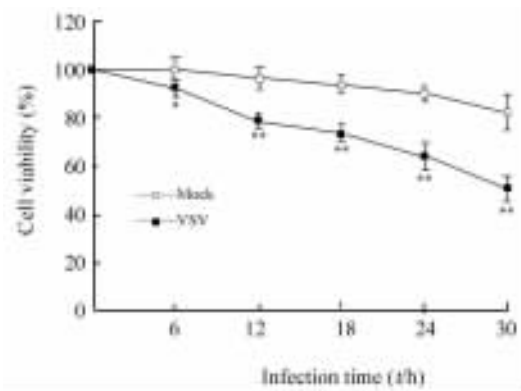


图 1 减毒 VSV 感染时间依赖性地抑制 HeLa 细胞的增殖

Fig.1 Attenuated VSV time-dependently inhibited proliferation of HeLa cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs mock

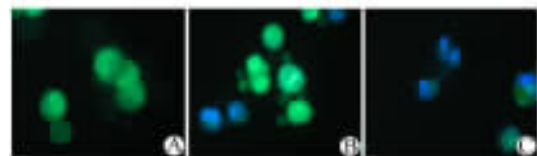


图 2 减毒 VSV 感染后 HeLa 细胞的形态学变化($\times 400$)

Fig.2 Morphological changes of HeLa cells after attenuated VSV infection($\times 400$)

A: Mock-infected cells; B: Attenuated VSV-infected cells at 12 h; C: Attenuated VSV-infected cells at 24 h

2.4 减毒 VSV 感染诱导 HeLa 细胞早期凋亡

通过 Annexin V 和 PI 对 HeLa 细胞进行双标记后,用流式细胞仪检测早期凋亡细胞。结果显示,随着感染时间的增加,细胞早期凋亡率随之升高。减毒 VSV 感染 HeLa 细胞 12 h 和 24 h 后,HeLa 细胞早期凋亡率分别为 $(16.88 \pm 2.48)\%$ 和 $(31.9 \pm 4.24)\%$ (均 $P < 0.01$ vs mock),mock 感染组细胞早期凋亡率为 $(2.95 \pm 0.65)\%$ (图 4)。

2.5 减毒 VSV 感染前后 HeLa 细胞线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$)水平

由于细胞早期凋亡往往伴随着线粒体跨膜电位的下降,因此,本研究通过 JC-1 染色结合流式细胞仪分析评价减毒 VSV 感染前后 HeLa 细胞线粒体跨

膜电位水平。结果如图 5 所示,减毒 VSV 感染 12 h 后即检测到 HeLa 细胞线粒体膜电位下降(61.82 ± 3.02)% vs (77.68 ± 4.45)%, $P < 0.05$),24 h 后线粒体跨膜电位下降的细胞比例明显增加(57.31 ± 3.23)% vs (77.68 ± 4.45)%, $P < 0.01$)。

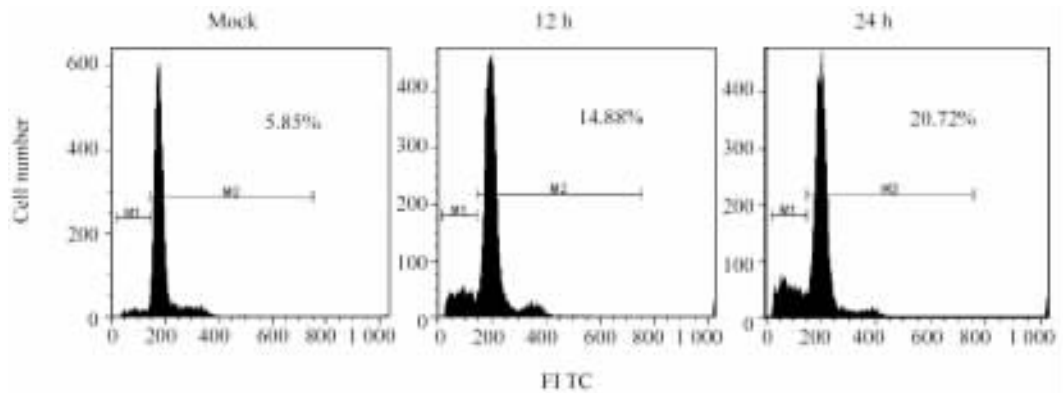


图 3 流式细胞术检测减毒 VSV 感染后 HeLa 细胞的 Sub-G 凋亡峰

Fig. 3 Sub-G apoptotic peaks of HeLa cells after attenuated VSV infection as detected by flow cytometry

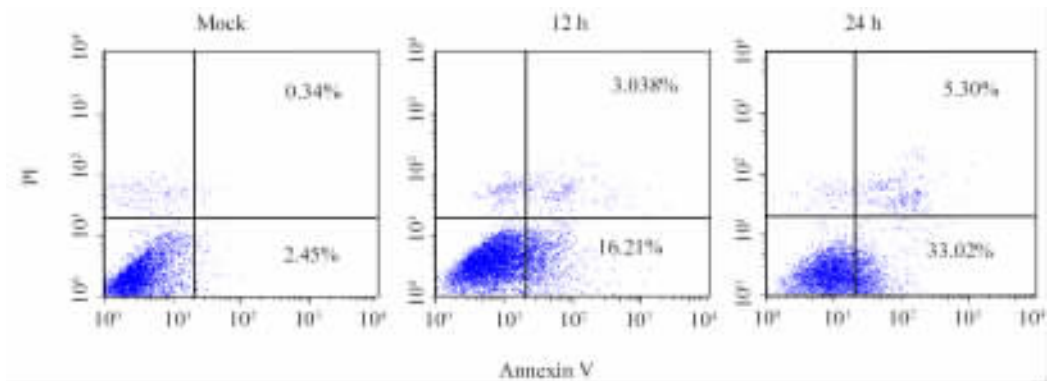


图 4 Annexin V/PI 染色检测减毒 VSV 诱导 HeLa 细胞的早期凋亡

Fig. 4 Early apoptosis of HeLa cells after attenuated VSV infection as detected by Annexin V/PI staining

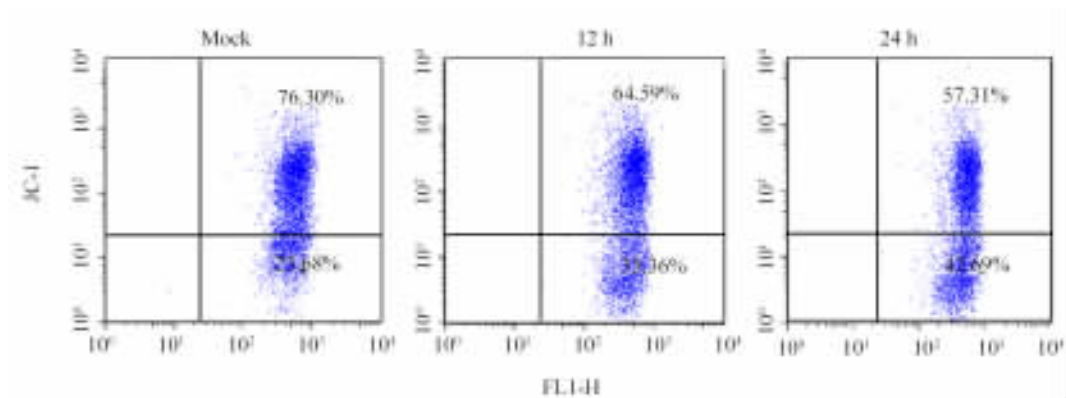


图 5 JC-1 染色检测减毒 VSV 感染后 HeLa 细胞线粒体跨膜电位的水平

Fig. 5 Mitochondrial membrane potential level of HeLa cells after attenuated VSV infection as detected by JC-1-staining

2.6 减毒 VSV 对 HeLa 细胞 caspase 活性的影响

本研究进一步通过酶标仪检测了减毒 VSV 感染前后 HeLa 细胞 caspase 活性变化。结果如图 6 所示,与 mock 感染组相比,减毒 VSV 感染 HeLa 细胞 12 h 和 24 h 后, HeLa 细胞内 caspase-9 [12 h: (189.4 ± 15.81)%, $P < 0.05$ vs mock; 24 h: (224.58 ± 10.49)%, $P < 0.01$ vs mock] 与 caspase-3 [12 h: (166.81 ± 10.2)%, $P < 0.05$ vs mock; 24 h: (204 ± 9.35)%, $P < 0.01$ vs mock] 的活性明显升高, caspase-8 [12 h: (126.78 ± 11.15)%, $P > 0.05$ vs mock; 24 h: (140.25 ± 13)%, $P > 0.05$ vs mock] 的活性升高不明显。

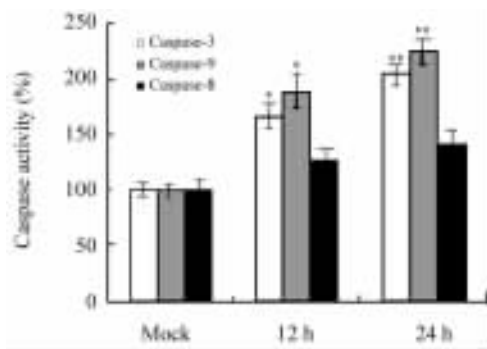


图 6 减毒 VSV 感染后 HeLa 细胞 caspases-3, -8 和 -9 的活性
 Fig. 6 Caspases-3, -8 and -9 activities in HeLa cells after attenuated VSV infection
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs mock

3 讨论

到目前为止,在癌症基因治疗领域,没有哪一种基因传递策略对肿瘤细胞的转导效率能够达到 100% [9]。基因治疗的效果不仅依靠对最初癌细胞的转导效率,而且也依靠癌细胞周围的环境。从这个意义上讲,为了达到更高的溶瘤效率,所谓的“旁路效应”或那些经宿主细胞调节的间接抗肿瘤策略,具有潜在的优势[6-11]。溶瘤病毒治疗就是满足这一要求的理想策略之一。普通的基因治疗,基因导入效率就依靠最初的转导效率,而溶瘤病毒感染细胞后还可以侵入周围的细胞,另外病毒感染后还可以调动机体的免疫反应,如诱导细胞因子等杀死肿瘤细胞。在病毒治疗中,溶瘤病毒不但自身在肿瘤细胞内复制,导致细胞溶解和死亡,而且能通过死亡的细胞释放出病毒颗粒,产生一种级联效应,放大溶瘤效果,直至肿瘤细胞被清除。同时,肿瘤细胞的破裂会

导致肿瘤抗原从肿瘤细胞中释放,从而诱导体内系统性的抗肿瘤免疫反应,增强病毒的溶细胞活性[5,12]。

溶瘤病毒的历史最早可以追溯到 20 世纪初期,早期应用于人的报道是减毒狂犬病疫苗致子宫颈癌患者的肿瘤消退,以及患有麻疹后霍奇金淋巴瘤患者的症状明显减轻[4,12]。近几年来,复制型溶瘤病毒发展迅速,目前正在研发的有腺病毒、单纯疱疹病毒、痘苗病毒、新城疫病毒和 VSV 等十余种[6,13-16]。

VSV 是溶瘤病毒家族中的新成员, VSV 在体外能够感染和杀死多种肿瘤细胞,但其在正常细胞和原代细胞的作用明显减弱[6-8]。目前认为,导致这一重大变化的主要原因在于肿瘤细胞干扰素反应缺陷[8]。VSV 作为新型溶瘤病毒具有以下优势: VSV 生长迅速,短时间内就能产生很高的病毒滴度; VSV 相对温和,不会对人和灵长类动物造成大的危害;大多数人体内没有抗 VSV 的抗体存在;由于 VSV 复制快,能够先于机体产生抗体之前就杀死肿瘤细胞; VSV 相对安全,整合到宿主基因组的概率很小。

本研究探索一株实验室减毒 VSV 在体外对 HeLa 细胞的杀伤作用,结果表明,随着减毒 VSV 感染时间的增加, HeLa 细胞的存活率明显降低,呈明显的时间依赖性。形态学研究结果表明,减毒 VSV 在体外能够有效地诱导 HeLa 细胞凋亡。细胞凋亡是机体清除异常细胞的一个自然过程,凋亡的异常可能破坏机体细胞增殖和死亡之间的微妙平衡,最终导致疾病的发生[17]。目前认为,参与细胞凋亡的信号转导途径主要分为两种:一种是线粒体途径,即细胞内途径;另一种是死亡受体途径,即细胞外途径[18]。现已广泛接受线粒体通过释放大量的促凋亡蛋白在调节凋亡通路中起中心作用观点[19]。线粒体可整合跨膜转位蛋白和钙流信号,使动态的微管网络发生聚合和分离,从而改变线粒体的形态。凋亡刺激信号使线粒体外膜通透性增加,线粒体内许多促凋亡蛋白释放入胞质,随后启动天胱蛋白酶 (caspase) 级联反应,或在胞核内激活核酸内切酶,最终引发细胞凋亡[19-20]。本研究通过 Annexin V-FITC/PI 双染法结合细胞 DNA 含量分析 sub-G₁ 凋亡峰值,评价了减毒 VSV 对 HeLa 细胞的凋亡诱导作用。结果显示,减毒 VSV 感染 24 h 后,早期凋亡细胞率为 (31.9 ± 4.24)%, sub-G₁

峰细胞凋亡率为(21.05 ± 2.28)% ($P < 0.01$),说明减毒 VSV 能够快速诱导 HeLa 细胞凋亡。另外,随着减毒 VSV 感染时间的延长,HeLa 细胞线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$)逐渐下降,说明减毒 VSV 感染造成 HeLa 细胞线粒体严重受损。

为了评价减毒 VSV 诱导 HeLa 细胞凋亡的信号转导通路,进一步检测了细胞 caspase-3、caspase-8 及 caspase-9 的活性变化。结果显示,减毒 VSV 感染后显著激活 caspase-9 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)和 caspase-3 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但 caspase-8 活性无明显改变。综上所述,本研究认为,减毒 VSV 感染 HeLa 细胞后,主要作用于细胞线粒体,激活 caspase-9 和 caspase-3,通过细胞内源线粒体通路诱导细胞凋亡。但由于细胞凋亡是一个错综复杂的过程,不同凋亡通路之间可能会存在交叉反应,因此,上游 caspase 成员 caspase-8 可能也部分参与这一过程。

[参 考 文 献]

- [1] Barbera L, Thomas G. Management of early and locally advanced cervical cancer [J]. *Semin Oncol*, 2009, 36(2): 155-169.
- [2] 刘继红,李玉洁. 我国宫颈癌预防面临的机遇和挑战 [J]. *中国肿瘤*, 2010, 19(7): 424-426.
- [3] 王临虹,邱琇,郑睿敏,等. 我国宫颈癌流行病学状况及防治策略的回顾与展望 [J]. *中国妇幼卫生杂志*, 2010, 1(3): 146-149.
- [4] Wojton J, Kaur B. Impact of tumor microenvironment on oncolytic viral therapy [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21(2): 127-134.
- [5] Ries SJ, Brandts CH. Oncolytic viruses for the treatment of cancer: Current strategies and clinical trials [J]. *Drug Discov Today*, 2004, 9(17): 759-768.
- [6] Giedlin MA, Cook DN, Dubensky TW. Vesicular stomatitis virus: An exciting new therapeutic oncolytic virus candidate for cancer or just another chapter from field's virology [J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(4): 241-243.
- [7] Barber GN. Vesicular stomatitis virus as an oncolytic vector [J]. *Viral Immunol*, 2004, 17(4): 516-527.
- [8] Lichty BD, Power AT, Stojdl DF, et al. Vesicular stomatitis virus: Re-inventing the bullet [J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10(5): 210-216.
- [9] El-Aneedy A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy [J]. *J Control Release*, 2004, 94(1): 1-14.
- [10] Yamamoto M, Curiel DT. Cancer gene therapy [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2005, 4(4): 315-330.
- [11] Lu Y, Madu CO. Viral-based gene delivery and regulated gene expression for targeted cancer therapy [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2010, 7(1): 19-35.
- [12] 侯剑刚,丁强. 溶瘤病毒与癌症治疗 [J]. *微生物与感染*, 2009, 4(1): 35-39.
- [13] 李月敏,宋三泰,江泽飞,等. 选择性增殖腺病毒 CNHK500 治疗乳腺癌的实验研究 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2005, 12(2): 124-128.
- [14] Thorne SH. Oncolytic vaccinia virus: From bedside to benchtop and back [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2008, 10(4): 387-392.
- [15] Nettelbeck DM. Cellular genetic tools to control oncolytic adenoviruses for virotherapy of cancer [J]. *J Mol Med*, 2008, 86(4): 363-377.
- [16] 苏君,张学新,张相形,等. 单纯疱疹病毒 1 型 tk 基因的克隆及其真核表达载体的构建 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1999, 6(1): 27-30.
- [17] Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease [J]. *Science*, 1995, 267(5203): 1456-1462.
- [18] Danial, NN, Korsmeyer, SJ. Cell death: Critical control points [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 205-219.
- [19] 赵婧,屈艺,母得志. Akt 与细胞线粒体凋亡途径 [J]. *生命的化学*, 2010, 30(4): 528-532.
- [20] Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(9): 621-632.

[收稿日期] 2011-02-20

[修回日期] 2011-04-15

[本文编辑] 韩丹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358-93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} ,不用大写 X ,也不用 Mean 或 M ;(2)标准差用英文小写 s ,不用 SD;(3)标准误用英文小写 s_x ,不用 SE;(4) t 检验用英文小写 t ;(5) F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用希腊小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用希腊小写 ν ;(9)样本数用英文小写 n ;(10)概率用英文大写 P ;(11)以上符号 \bar{x} 、 s 、 s_x 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)