

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.06.008

腺病毒 *E1a* 基因增强 *P16* 基因诱导 SMMC-7721 肝癌细胞的凋亡

胡还章^{1,2}, 王伟国³, 马炬明³, 苏长青², 江艺¹(1. 南京军区福州总医院 肝胆外科, 福建 福州 350025; 2. 第二军医大学 东方肝胆外科医院 病毒治疗研究室, 上海 200438; 3. 南京军区 117 医院 消化内科, 浙江 杭州 310004)

[摘要] 目的: 研究腺病毒 *E1a* 基因与 *P16* 抑癌基因协同对肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡和增殖的影响, 探索肿瘤基因治疗新模式。方法: 构建 *E1a* 基因真核表达质粒 pDC315-E1a 和携带 *P16* 的重组病毒 AdCMV-P16, RT-PCR 和免疫荧光标记法检测 pDC315-E1a 质粒转染或 AdCMV-P16 病毒感染后 SMMC-7721 细胞中 *P16* 和 *E1a* 的表达。建立裸鼠 SMMC-7721 细胞移植瘤模型, pDC315-E1a 和 AdCMV-P16 单独或联合治疗, 观察其对移植瘤生长的抑制作用, 免疫组化和 TUNEL 法分别检测移植瘤组织中 *P16*、*E1a* 蛋白的表达和移植瘤细胞的凋亡。结果: SMMC-7721 细胞感染 AdCMV-P16 或转染 pDC315-E1a 后, *P16*、*E1a* mRNA 和蛋白水平均呈阳性表达。与空白对照组相比, AdCMV-P16 治疗组移植瘤细胞凋亡率为 $(14.3 \pm 2.5)\%$ ($P < 0.01$), 抑瘤率为 36.1% ($P < 0.01$); pDC315-E1a 治疗组抑瘤率为 17.1% ($P > 0.05$), 移植瘤细胞凋亡率为 $(8.5 \pm 2.9)\%$ ($P < 0.01$); AdCMV-P16 联合 pDC315-E1a 治疗组移植瘤细胞凋亡率为 $(27.3 \pm 6.3)\%$ ($P < 0.01$), 抑瘤率达 57.2% ($P < 0.01$)。结论: 腺病毒 *E1a* 基因能够增强 *P16* 基因对肝癌 SMMC-7721 细胞移植瘤的抑制作用, 促进移植瘤细胞的凋亡, 增强 *P16* 基因治疗的效果。

[关键词] 肝癌; *P16* 基因; *E1a* 基因; 腺病毒; 凋亡

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)06-0630-05

Adenovirus *E1a* gene enhances *P16* gene-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells

HU Huan-zhang^{1,2}, WANG Wei-guo³, MA Ju-ming³, SU Chang-qing², JIANG Yi¹(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Area Command of PLA, Fuzhou 350025, Fujian, China; 2. Institute of virus therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200438; 3. Department of Internal Medicine, No. 117 Hospital of Nanjing Military Area Command of PLA, 310004 Hangzhou, Zhejiang, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the synergistic effect of anti-cancer *P16* gene and adenovirus *E1a* gene on apoptosis and proliferation of hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells, and to explore the novel therapeutic strategy for tumor gene therapy. **Methods:** Eukaryotic expression plasmid pDC315-E1a and adenoviral vector AdCMV-P16 were constructed. The expression of *P16* and *E1a* in SMMC-7721 cells after pDC315-E1a transfection or AdCMV-P16 infection was determined by RT-PCR and immunofluorescent labeling. SMMC-7721 cell transplanted tumors in nude mice was established. The effect of pDC315-E1a and AdCMV-P16 alone or in combination on tumor growth was observed, and the expressions of *P16* and *E1a* in transplanted tumor tissues and apoptosis of transplanted tumor cells were determined by immunohistochemistry and TUNEL assay, respectively. **Results:** SMMC-7721 cells showed positive expression of both mRNA and protein levels of *E1a* and *P16* after pDC315-E1a transfection or AdCMV-P16 infection, respectively. Compared with the control group, the apoptosis rate of transplanted tumor cells was $(14.3 \pm 2.5)\%$ ($P < 0.01$) and tumor inhibitory rate was 36.1% ($P < 0.01$) in AdCMV-P16 therapy group; those in pDC315-E1a therapy group was $(8.5 \pm 2.9)\%$ ($P < 0.01$)

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81071866, No. 81172303)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81071866, No. 81172303)

[作者简介] 胡还章(1972 -), 男, 湖北省荆州市人, 博士, 主治医师, 主要从事肝胆肿瘤的临床与基础研究工作。E-mail: huhuanzhang@med-mail.com.cn

[通信作者] 江艺(JIANG Yi, corresponding author), E-mail: jiangyi183@yahoo.com.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20111111.1118.004.html>

and 17.1% ($P > 0.05$); and in AdCMV-P16 combined pDC315-E1a therapy group was (27.3 ± 6.3)% ($P < 0.01$) and 57.2% ($P < 0.01$), respectively. **Conclusion:** Adenovirus *E1a* gene can increase *P16*-induced apoptosis and cell growth inhibition in SMMC-7721 cell transplanted tumors, and thus enhance the efficacy of *P16* gene therapy.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; *P16* gene; *E1a* gene; adenovirus; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(6): 630-634]

细胞凋亡在肿瘤发生、发展过程中起重要作用,是当今肿瘤发生机制与靶向治疗研究的热点。影响肿瘤细胞凋亡的因素很多,包括肿瘤细胞的遗传背景、细胞周期分布、肿瘤微环境等等,这些因素直接影响着临床治疗的疗效^[1-2]。癌基因的异常激活与抑癌基因的失活是导致肿瘤细胞凋亡异常的关键遗传学机制。*P16* 基因在正常细胞中主要通过抑制细胞周期素依赖性激酶 4(cyclin-dependent kinase 4, CDK4)而阻止细胞由 G_1 期进入 S 期,抑制细胞增殖^[3];当 *P16* 基因突变或丢失时,细胞增殖失去控制而致细胞无限制地增殖^[4]。以往的研究^[5]发现,肿瘤细胞在转染 *P16* 基因后,可以诱导肿瘤细胞的凋亡和细胞周期阻滞,其主要作用机制是通过下调肿瘤细胞 Akt 酪氨酸受体激酶活性,降低细胞核内生存素(survivin)的表达。为深入探讨 *P16* 基因与肿瘤细胞凋亡之间的调控机制,本课题研究人腺病毒早期区域 *Ia* 基因(*E1a*)与 *P16* 诱导 SMMC-7721 肝癌细胞凋亡之间的关系,为优化肿瘤基因治疗方案提供指导。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

鼠抗人 *E1a* 和 *P16* 单克隆抗体、荧光素 FITC 标记的羊抗鼠 IgG、即用型 SP 试剂盒、TUNEL 试剂盒均购自福州迈新生物技术公司, Lipofactamine™2000 试剂盒为美国 Invitrogen 公司产品,质粒 pXC1 和 pDC315 为加拿大 Microbix Biosystems 公司产品,引物由上海生工生物公司合成。人肝癌细胞株 SMMC-7721 由中国科学院上海细胞所提供。BALB/c 裸鼠(雄性、4 周龄)购自中科院上海斯莱克实验动物中心,实验动物合格证号为 SCXK(沪)2009-0005。

1.2 pDC315-E1a 和 AdCMV-P16 的构建

合成腺病毒 *E1a* 基因 PCR 引物(P1: 5'-CG-GAATTCACCATGAGACATATTATC-3', P2: 5'-GCG TCGACTTATGGCCTGGGCG-3'),以 pXC1 为模板,扩增腺病毒完整的 *E1a* 区,片段长度 1 005 bp,上游引入 *EcoR* I,下游引入 *Sal* I 酶切位点。*EcoR* I + *Sal* I 酶切后,克隆入 pUC19 质粒相应位点,pUC19-

E1a 测序正确的克隆,*EcoR* I + *Sal* I 酶切回收,插入 pDC315/*EcoR* I + *Sal* I 位点,构建含完整野生型 *E1a* 的表达质粒 pDC315-E1a。携带 *P16* 基因的不含 *E1a* 基因的增殖缺陷型腺病毒 AdCMV-P16 的构建参见文献[5]。

1.3 RT-PCR 检测 SMMC-7721 细胞中 *E1a* 或 *P16* mRNA 的表达

培养 SMMC-7721 细胞, 1×10^5 /孔细胞数铺 24 孔板,24 h 后,按病毒感染复数(MOI) = 50 pfu/细胞感染重组腺病毒 AdCMV-P16。采用 Lipofactamine 2000 试剂盒,按每孔 20 ng 剂量转染 pDC315-E1a。继续培养 72 h,收集细胞,提取细胞总 RNA,以 *E1a* 引物(P1/P2, 见上)和 *P16* 引物(P3: 5'-CG-GCTAGCGAATTCACCATGGAGCCTTCGGC-3', P4: 5'-CGACGCGTGCAGCTTATCAATCG GGGATGTC-3')鉴定 *E1a* 或 *P16* mRNA 的表达。

1.4 免疫荧光标记法检测细胞中 *P16* 及 *E1a* 蛋白的表达

涂片做免疫荧光细胞化学标记,鉴定 *P16* 及 *E1a* 基因在蛋白水平的表达。鼠抗人 *E1a* 和 *P16* 单克隆抗体工作稀释度为 1:500,荧光素 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 工作稀释度为 1:200,荧光显微镜下计数 5 个高倍视野下阳性细胞比例。

1.5 AdCMV-P16 和 pDC315-E1a 对 SMMC-7721 细胞裸鼠移植瘤的影响

健康纯种 BALB/c 裸鼠 20 只,随机分为 *P16*/*E1a* 组、*P16* 组、*E1a* 组、空白对照组,每组 5 只。体外培养 SMMC-7721 细胞,收集并调整细胞密度至 1×10^7 /ml,每只裸鼠于右腋部皮下接种 100 μ l。接种后 2 周左右时间,接种区皮下出现移植瘤,直径大约 0.5 cm 左右。*P16* 治疗组直接瘤内多点注射重组病毒 AdCMV-P16,每只 2×10^6 pfu/ μ l,隔天 1 次,共 5 次;*E1a* 治疗组直接瘤内多点注射质粒 pDC315-E1a,每只 0.1 μ g/ μ l,隔天 1 次,共 5 次;*P16*/*E1a* 组同时给予同剂量 AdCMV-P16 和 pDC315-E1a;空白对照组以生理盐水注射,100 μ l \times 5 次。治疗后,定时测瘤体大小,按公式计算瘤体体积。 $V = 1/2ab^2$, a 为肿瘤长直径, b 为肿瘤短直径。

1.6 免疫组化法检测移植瘤组织中 *P16* 和 *E1a* 蛋

白的表达

观察期结束,立即断颈处死小鼠,取瘤体标本,以10%中性缓冲甲醛固定,石蜡包埋切片。SP法免疫组化检测肿瘤组织中P16和E1a的表达,鼠抗人E1a和P16单克隆抗体工作稀释度为1:500,DAB显色,荧光显微镜下计数5个高倍视野下阳性细胞百分比,超过10%细胞显色记为阳性。

1.7 TUNEL法检测肿瘤细胞凋亡

TUNEL试剂盒检测移植瘤细胞的凋亡,TUNEL反应液反应条件为37℃温育90min,DAB显色,荧光显微镜下计数5个高倍视野下阳性细胞并计算凋亡率。

1.8 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS13.0软件,数据两两比较采用t检验,多组之间比较采用ANOVA检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pDC315-E1a转染和AdCMV-P16感染后SMMC-7721细胞E1a和P16 mRNA的表达

在24孔培养板内,以MOI=50 pfu/细胞的强度感染腺病毒AdCMV-P16,或以每孔20ng剂量转染pDC315-E1a。RT-PCR检测SMMC-7721细胞中E1a和P16 mRNA的表达,结果(图1)显示,亲本SMMC-7721细胞为阴性表达,感染腺病毒AdCMV-P16或转染pDC315-E1a的SMMC-7721细胞呈现较强的P16或E1a表达。

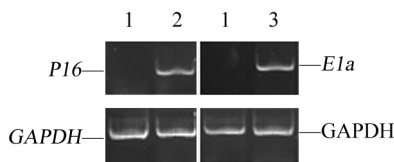


图1 RT-PCR法鉴定SMMC-7721细胞中E1a和P16 mRNA的表达

Fig. 1 Identification of E1a and P16 mRNA expression in SMMC-7721 cells as detected by RT-PCR

1: Control; 2: AdCMV-P16; 3: pDC315-E1a

2.2 pDC315-E1a质粒转染和AdCMV-P16病毒感染后SMMC-7721细胞中E1a和P16蛋白的表达

上述感染腺病毒AdCMV-P16或转染pDC315-E1a的SMMC-7721细胞,以FITC标记的免疫荧光检测E1a和P16蛋白的表达,亲本SMMC-7721细胞P16+E1a双抗体标记无荧光表达,感染腺病毒AdCMV-P16或转染pDC315-E1a的SMMC-7721细胞

呈现较强的P16或E1a蛋白表达荧光(图2)。

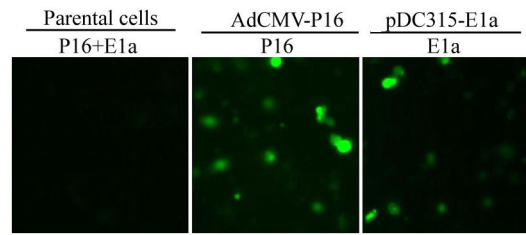


图2 免疫荧光标记法鉴定SMMC-7721细胞中E1a和P16蛋白的表达(x200)

Fig. 2 Identification of E1a and P16 protein expressions in SMMC-7721 cells as detected by immunofluorescent labeling(x200)

2.3 pDC315-E1a联合AdCMV-P16治疗抑制裸鼠SMMC-7721细胞移植瘤的生长

SMMC-7721细胞植于裸鼠皮下,构建SMMC-7721细胞移植瘤模型,分组治疗。4周后,P16/E1a组[瘤体体积(510.18±120.83)mm³]和P16组[瘤体体积(760.94±110.65mm³)]的抑瘤率分别为57.2%、36.1%,与空白对照组[瘤体体积(1190.71±150.66mm³)]相比差异有统计学意义(P<0.01)。且P16/E1a组疗效明显优于P16组(P<0.05),而E1a组[瘤体体积(987.21±181.76)mm³,抑瘤率为17.1%]与空白对照组相比,差异无统计学意义(P>0.05,图3)。因此,pDC315-E1a可增强AdCMV-P16对裸鼠移植瘤的抑制作用。

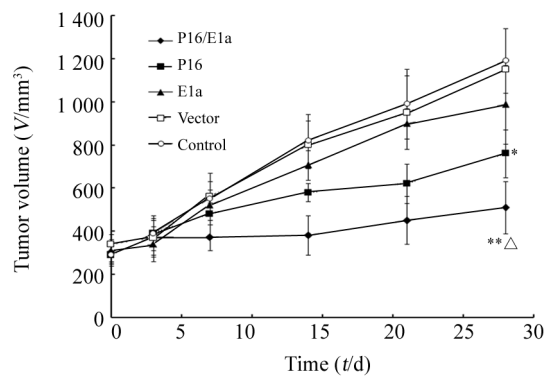


图3 pDC315-E1a增强AdCMV-P16对裸鼠SMMC-7721细胞移植瘤的抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effect of AdCMV-P16 on SMMC-7721 cell transplanted tumors in nude mice enhanced by pDC315-E1a

*P<0.05, **P<0.01 vs control group; ^P<0.05 vs P16 group

2.4 基因治疗后转移瘤中P16和E1a蛋白的表达

取裸鼠移植瘤标本,采用SP免疫组化法检测移

植瘤组织中 *P16* 和 *E1a* 的表达。结果(图 4)显示, *P16/E1a* 组和 *P16* 组移植瘤组织 *P16* 阳性表达, *P16/E1a* 组和 *E1a* 组移植瘤组织 *E1a* 阳性表达,空白对照组 *P16* 和 *E1a* 表达均为阴性。

2.5 pDC315-*E1a* 促进 AdCMV-*P16* 诱导的 SMMC-7721 细胞凋亡

采用 TUNEL 法检测移植瘤细胞凋亡, *P16/E1a* 组、*P16* 组、*E1a* 组、空白对照组细胞凋亡率分别为

(27.3 ± 6.3)%、(14.3 ± 2.5)%、(8.5 ± 2.9)%、(2.9 ± 1.1)%。与空白对照组相比, *P16/E1a* 组、*P16* 组、*E1a* 组的移植瘤细胞凋亡率均显著升高 ($P < 0.01$)。 *P16/E1a* 组与 *P16* 组相比, 移植瘤细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.01$, 图 5)。由此可见, pDC315-*E1a* 促进 AdCMV-*P16* 诱导的 SMMC-7721 细胞移植瘤细胞的凋亡。

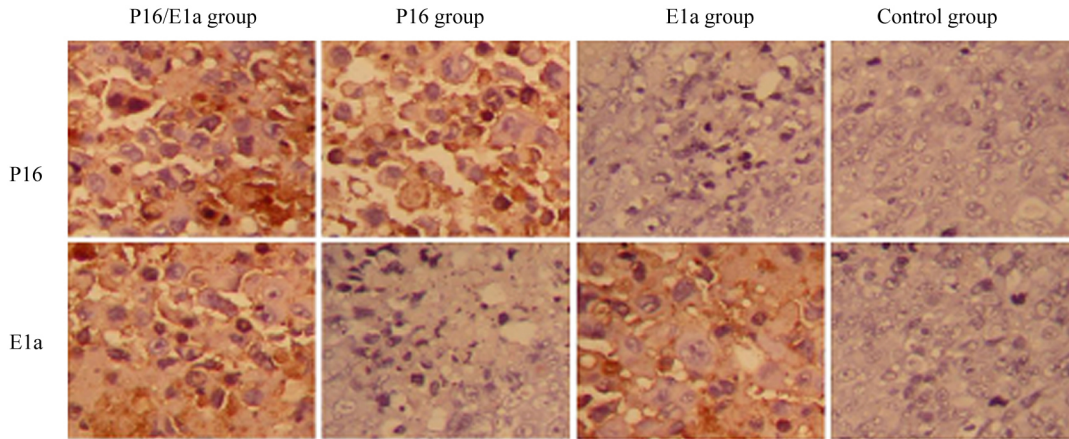


图 4 免疫组化检测 SMMC-7721 移植瘤组织 *P16* 和 *E1a* 蛋白的表达 (×200)
 Fig. 4 *P16* and *E1a* protein expression in SMMC-7721 cell transplanted tumor tissues as detected by immunohistochemistry assay (×200)

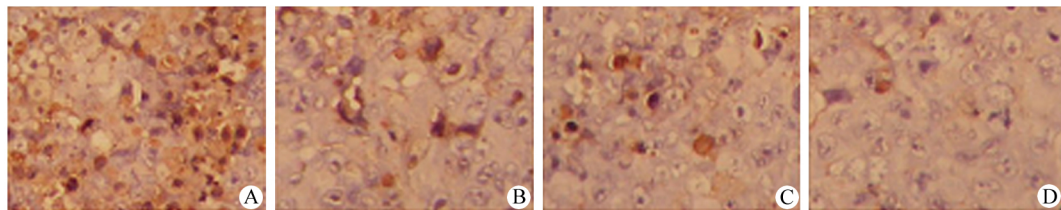


图 5 TUNEL 法检测 *P16* 联合 *E1a* 基因治疗诱导 SMMC-7721 移植瘤细胞的凋亡 (×200)
 Fig. 5 Apoptosis of SMMC-7721 cell transplanted tumor cells induced by *P16* combined with *E1a* gene therapy as detected by TUNEL assay (×200)
 A: *P16/E1a* group; B: *P16* group; C: *E1a* group; D: Control group

3 讨论

细胞周期的运行是在一系列调控因子的平衡作用下有序进行的, 细胞周期素 (cyclin) 和 CDK 结合形成复合体, CDK 的激酶活性被激活, 通过 CDK 催化的磷酸化和去磷酸化调节, 推动细胞周期演进。细胞内还存在着—类负调控因子, 即细胞周期素依赖性激酶抑制因子 (cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI), 能与 cyclin 竞争结合 CDK, 抑制 CDK 活

性, 终止细胞周期行进^[6-7]。其他很多蛋白也影响 CDK 活性, 如 Rb、P53、Myc 等, 进而调节细胞分化和细胞凋亡^[8-9]。 *P16* 蛋白与 cyclin 竞争结合 CDK, 特异地抑制 CDK 活性, 阻滞细胞周期的进行, 而 *P16* 失活则使肿瘤细胞获得增殖生长的优势, 易于浸润和转移。已有研究^[10]证明, 当肿瘤细胞中获得外源性 *P16* 基因, 其细胞周期被抑制, 不但出现 G_1 期阻滞, 细胞对放射治疗和化学治疗的敏感性也得到提高, 这有助于联合 *P16* 基因治疗和其他治疗手

段, 进一步提高肿瘤的治疗效果。

腺病毒的某些病毒蛋白具有抗肿瘤作用, 如 *E1a* 通过抑制 *Her-2/neu* 基因的转录、阻断 NF- κ B 的活性, 诱导肿瘤细胞凋亡, 提高肿瘤细胞对化疗、放疗的敏感性^[11-12]。美国 FDA 在 1996 年正式批准了 *E1a* 的临床试验, 其 I、II 期临床试验已取得较好的效果^[13-14]。为了更深入地探讨 *E1a* 与其他细胞周期调节基因之间的相互作用, 本课题研究了腺病毒增殖基因 *E1a* 与抑癌基因 *P16* 之间抗肿瘤活性的协同效应。

研究发现, *E1a* 敲除的增殖缺陷型腺病毒 AdC-MV-P16 和真核表达质粒 pDC315-*E1a*, 能够有效地介导 *P16* 和 *E1a* 基因在 SMMC-7721 肝癌细胞中表达。通过 AdCMV-P16 单独导入 *P16* 基因, 对裸鼠 SMMC-7721 肝癌移植瘤具有明显抑制作用, 抑瘤率为 36.1%, 移植瘤细胞凋亡率为 (14.3 ± 2.5)%; 通过真核表达质粒 pDC315-*E1a* 单独导入 *E1a* 基因, 对裸鼠 SMMC-7721 肝癌移植瘤的抑瘤率仅为 17.1% ($P > 0.05$), 细胞凋亡率仅为 (8.5 ± 2.9)% ($P < 0.05$); 如同时导入 *P16* 基因和 *E1a* 基因, 则对移植瘤生长的抑制效果明显增强, 抑瘤率可达 57.2%, 细胞凋亡率也升至 (27.3 ± 6.3)%。因此, 腺病毒的 *E1a* 基因能够增强 *P16* 基因治疗的效果。

由于 *P16* 是一个多肿瘤抑制基因, 而文献报道腺病毒 *E1a* 基因也对卵巢癌、头颈部癌、乳腺癌、肝癌等多种肿瘤有抗肿瘤效应^[13-14]。目前, 基因治疗常用的增殖缺陷型腺病毒载体缺少 *E1a* 基因, 而 *E1a* 本身也具有一定的抗癌功能, 且能增强 *P16* 基因治疗的效果。因此, 如果能保留腺病毒载体的 *E1a* 基因, 再携带 *P16* 基因, 这种联合 *P16* 和 *E1a* 基因的抗肿瘤生物治疗策略将适用于广谱肿瘤的治疗。针对 *E1a* 的功能, 研究人员已开发了一系列增殖型腺病毒载体, 保留野生型 *E1a* 或改造型 *E1a* 基因, 并采用肿瘤特异性启动子调控 *E1a* 基因的表达, 使腺病毒载体能够靶向肿瘤细胞增殖并溶解肿瘤细胞, 因而此类载体又称为溶瘤病毒^[15-17]。溶瘤病毒载体在自身增殖的同时, 又能够介导其所携带的抗肿瘤基因复制并高效表达, 发挥更强的抗肿瘤效果。

[参考文献]

- [1] Inuzuka H, Shaik S, Onoyama I, et al. SCF (FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction [J]. Nature, 2011, 471(7336): 104-109.
- [2] Jazirehi AR. Regulation of apoptosis-associated genes by histone deacetylase inhibitors: Implications in cancer therapy [J]. Anti-

cancer Drugs, 2010, 21(9): 805-813.

- [3] Konecny GE, Winterhoff B, Kolarova T, et al. Expression of p16 and retinoblastoma determines response to CDK4/6 inhibition in ovarian cancer [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(6): 1591-1602.
- [4] Rivadeneira DB, Mayhew CN, Thangavel C, et al. Proliferative suppression by CDK4/6 inhibition: Complex function of the retinoblastoma pathway in liver tissue and hepatoma cells [J]. Gastroenterology, 2010, 138(5): 1920-1930.
- [5] Hu H, Li Z, Chen J, et al. P16 reactivation induces anoikis and exhibits antitumour potency by down regulating Akt/survivin signaling in hepatocellular carcinoma cells [J]. Gut, 2011, 60(5): 710-721.
- [6] Wu Z, Yu Q. E2F1-mediated apoptosis as a target of cancer therapy [J]. Curr Mol Pharmacol, 2009, 2(2): 149-160.
- [7] Marretta RM, Ales F. Cancer cell(s) cycle sequencing reveals universal mechanisms of apoptosis [J]. Mol Cell Biomech, 2010, 7(4): 225-266.
- [8] Krystof V, Uldrijan S. Cyclin-dependent kinase inhibitors as anti-cancer drugs [J]. Curr Drug Targets, 2010, 11(3): 291-302.
- [9] Hydbring P, Bahram F, Su Y, et al. Phosphorylation by Cdk2 is required for Myc to repress Ras-induced senescence in co-transformation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(1): 58-63.
- [10] Moolmuang B, Tainsky MA. CREG1 enhances p16(INK4a) -induced cellular senescence [J]. Cell Cycle, 2011, 10(3): 518-530.
- [11] Su JL, Chen PB, Chen YH, et al. Downregulation of microRNA miR-520h by E1A contributes to anticancer activity [J]. Cancer Res, 2010, 70(12): 5096-5108.
- [12] Savelyeva I, Dobbstein M. Infection with E1B-mutant adenovirus stabilizes p53 but blocks p53 acetylation and activity through E1A [J]. Oncogene, 2011, 30(7): 865-875.
- [13] Madhusudan S, Tamir A, Bates N, et al. A multicenter phase I gene therapy clinical trial involving intraperitoneal administration of E1A-lipid complex in patients with recurrent epithelial ovarian cancer overexpressing HER-2/neu oncogene [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(9): 2986-2996.
- [14] Su JL, Cheng X, Yamaguchi H, et al. FOXO3a dependent mechanism of E1A-Induced chemosensitization [J]. Cancer Res, 2011. [Epub ahead of print]
- [15] Pesonen S, Kangasniemi L, Hemminki A. Oncolytic adenoviruses for the treatment of human cancer: Focus on translational and clinical data [J]. Mol Pharm, 2011, 8(1): 12-28.
- [16] Bhattacharyya M, Francis J, Eddouadi A, et al. An oncolytic adenovirus defective in pRb-binding (dl922-947) can efficiently eliminate pancreatic cancer cells and tumors *in vivo* in combination with 5-FU or gemcitabine [J]. Cancer Gene Ther, 2011, 18(10): 734-743.
- [17] Eager RM, Nemunaitis J. Clinical development directions in oncolytic viral therapy [J]. Cancer Gene Ther, 2011, 18(5): 305-317.

[收稿日期] 2011 - 08 - 15

[修回日期] 2011 - 10 - 11

[本文编辑] 王莹