

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.06.010

· 基础研究 ·

辐射诱导溶瘤腺病毒联合放疗对宫颈癌细胞 HeLa S3 的作用效果

李笑梅^{1,2}, 王海波², 黄建²(1. 上海健康职业技术学院 生物化学教研室, 上海 200237; 2. 上海交通大学医学院 生物化学与分子生物学教研室, 上海 200025)

[摘要] 目的: 构建受辐射诱导的 EGR-1 启动子调控的携带人 TRAIL 基因的新型溶瘤腺病毒 Ad-EGR-TRAIL, 研究其联合放疗对宫颈癌细胞株 HeLa S3 的杀伤效果。方法: 构建重组腺病毒 Ad-EGR-TRAIL, 用腺病毒 Ad-GFP 检测对 HeLa S3 细胞的感染效率。CCK-8 法检测 Ad-EGR-TRAIL 组、单纯放疗组以及 Ad-EGR-TRAIL 联合放疗组对 HeLa S3 细胞的杀伤效应, 同时观察它们对正常宫颈细胞的作用。结果: 成功构建腺病毒 Ad-EGR-TRAIL, 当 MOI 为 100 时, HeLa S3 细胞的腺病毒感染效率最高。单纯 Ad-EGR-TRAIL 或放疗对 HeLa S3 细胞增殖的抑制率分别为(8.07 ± 3.02)% 和(23.02 ± 4.03)%, Ad-EGR-TRAIL 联合放疗对 HeLa S3 细胞增殖的抑制率达(79.77 ± 9.15)%; 同样的处理对正常宫颈细胞无明显抑制作用。结论: Ad-EGR-TRAIL 联合放疗对宫颈癌细胞 HeLa S3 有显著的杀伤作用。

[关键词] TRAIL; 腺病毒; 基因疗法; 放射治疗; 凋亡

[中图分类号] R737.33; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)06-0641-06

Effect of radiation-induced oncolytic adenovirus combined with chemotherapy on cervical cancer HeLa S3 cells

LI Xiao-mei^{1,2}, WANG Hai-bo², HUANG Jian²(1. Department of Biochemistry, Shanghai Health Vocational and Technical College, Shanghai 200237, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a new radiation-induced, EGR-1 promoter-regulated, human TRAIL gene containing oncolytic adenovirus Ad-EGR-TRAIL, and to investigate the cytotoxicity effect of Ad-EGR-TRAIL combined with chemotherapy on cervical cancer HeLa S3 cells. **Methods:** Recombinant adenovirus Ad-EGR-TRAIL was constructed. HeLa S3 cells were infected with Ad-GFP, and infection efficiency was observed. The cytotoxicity effect of Ad-EGR-TRAIL, radiotherapy (RAD), and Ad-EGR-TRAIL + RAD on HeLa S3 cells, as well as on normal human cervical cells, was examined by CCK-8 method. **Results:** Recombinant adenovirus Ad-EGR-TRAIL was successfully constructed. Ad-EGR-TRAIL showed the highest infection efficiency at MOI = 100 in HeLa S3 cells. The inhibitory rates of HeLa S3 cells were (8.07 ± 3.02)% and (23.02 ± 4.03)% when Ad-EGR-TRAIL or RAD was used alone; however, the inhibitory rate reached (79.77 ± 9.15)% when Ad-EGR-TRAIL and RAD were used in combination; and normal cervical cells did not significantly respond to the combination Ad-EGR-TRAIL and RAD therapy. **Conclusion:** Ad-EGR-TRAIL combined with chemotherapy can significantly kill cervical cancer HeLa S3 cells.

[Key words] TRAIL; adenovirus; gene therapy; radiotherapy; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(6): 641-646]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 10979034, No. 31071228); 上海市自然科学基金资助项目(No. 09ZR1416400)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 10979034, No. 31071228), and the Natural Science Foundation of Shanghai (No. 09ZR1416400)

[作者简介] 李笑梅(1964 -), 女, 安徽省巢湖市人, 硕士, 副教授, 主要从事生物化学与分子生物学方面的教学研究。E-mail: xmxm16@sohu.com

[通信作者] 黄建(HUANG Jian, corresponding author), E-mail: jyhuanj@shsmu.edu.cn

宫颈癌是世界范围内所有妇科肿瘤中发病率列第 2 位的恶性肿瘤^[1]。复发或者晚期宫颈癌患者预后往往很差^[2-3]。目前,对不能手术治疗的宫颈癌患者,放疗仍然是首选治疗方案,但是放疗需要高剂量照射,增加了对正常组织的损害,导致患者的不良反应甚至死亡。增殖型腺病毒又称溶瘤腺病毒,是一种有效的肿瘤基因治疗载体,利用肿瘤与正常组织细胞间结构及代谢途径的差异,靶向性地在肿瘤细胞内复制增殖,最终裂解肿瘤细胞^[4]。

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(the tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand, TRAIL)是 TNF 超家族中的新成员,能快速、有效地诱导肿瘤细胞凋亡,对大多数正常组织细胞没有毒性^[5],这使其在肿瘤的治疗中具有较重要的研究价值和前景。1992 年 Datta 等^[6]首次发现,早期增殖反应因子-1(early growth response-1, *EGR-1*)基因启动子可感受电离辐射的刺激而诱导 *EGR-1* 基因的表达^[7]。1994 年 Weichselbaum 等^[8]首次将电离辐射敏感性 *EGR-1* 启动子与人 *TNF-α* 基因构建成质粒 pEGR-TNF,用于肿瘤的治疗,结果提示 *EGR-1* 启动子与细胞毒性基因的配伍可受电离辐射的调控。本研究拟以溶瘤腺病毒载体为基础,构建含有 *EGR-1* 启动子和 *TRAIL* 基因的增殖型腺病毒,利用基因治疗的方法增强放疗的敏感性,以期降低放疗的剂量,在减少不良反应的同时,达到治疗宫颈癌的目的。

1 材料与方法

1.1 主要材料

质粒 pBlue-Egr 由本实验室构建,质粒 pDC318-TRAIL、pENTER15、pPE3-ccdB、pXC20-ΔE1b55Kda 和腺病毒 Ad-GFP 购自上海医元生物基因科技发展有限公司。腺病毒载体 pXC1 购自加拿大 Microbix Biosystems 公司。HEK 293 和 HeLa S3 细胞株购自美国 ATCC 公司,人正常宫颈上皮细胞由本实验室培养。限制性内切酶、T4 连接酶、Taq 酶、蛋白酶 K、RNA 酶分别购自 NEB 公司、申能博彩公司、TaKaRa 公司和 Promega 公司。引物由上海生工公司合成。胎牛血清、小牛血清、DMEM、Lipofectamine 2000 试剂盒购自 Gibco 公司。CCK-8 试剂盒购自 Dojindo Laboratories 公司。胶回收试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒、病毒 DNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司。

1.2 增殖型腺病毒 pPE3-EGR-TRAIL 的构建

pBlue-Egr 和 pDC318-TRAIL 载体分别用 *Xba* I

和 *Xho* I 酶切,将酶切后 *EGR-1* 启动子片段和酶切后 pDC318-TRAIL 载体连接,连接产物转化 DH5α 大肠杆菌感受态,挑取增殖的细菌单克隆,PCR 法筛选阳性克隆。抽提阳性克隆的质粒 DNA,酶切鉴定并测序(上海生工公司)正确后命名为 pDC318-EGR-TRAIL。将 pDC318-EGR-TRAIL 用 *Xba* I 和 *Sal* I 酶切,pENTER15 载体用 *Spe* I 和 *Sal* I 酶切,将酶切后 EGR-TRAIL 片段与酶切后的 pENTER15 载体连接,转化 DH5α 大肠杆菌感受态,挑取增殖的细菌单克隆,PCR 法筛选阳性克隆。抽提阳性克隆的质粒 DNA,PCR 及酶切鉴定,鉴定正确后命名为 pENTER15-EGR-TRAIL。在 Gateway LR 重组酶(Invitrogen 公司)的作用下,将 pENTER15-EGR-TRAIL 和 pPE3-ccdB 重组,重组产物转化 DH5α 大肠杆菌感受态,挑取增殖的细菌单克隆,PCR 法筛选阳性克隆。抽提阳性克隆的质粒 DNA,酶切鉴定正确后命名为 pPE3-EGR-TRAIL(图 1)。

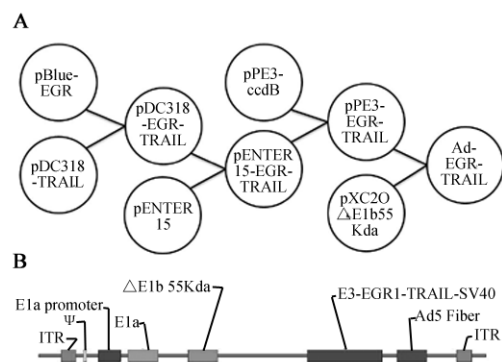


图 1 腺病毒 Ad-EGR-TRAIL 的构建和结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the construction and structure of Ad-EGR-TRAIL adenovirus

A: Construction of Ad-EGR-TRAIL;

B: Structure of Ad-EGR-TRAIL

1.3 增殖型腺病毒 Ad-EGR-TRAIL 的包装及鉴定

将质粒 pPE3-EGR-TRAIL 与 pXC20-ΔE1b55Kda 用 Lipofectamine 2000 共转染至 HEK 293 细胞。共转染后 9~14 d 出现病毒空斑,经过 3 次病毒空斑纯化,提取腺病毒 DNA,PCR 进行鉴定。经鉴定正确的腺病毒命名为 Ad-EGR-TRAIL(图 1B),即由 *EGR-1* 启动子调控的、携带人 *TRAIL* 基因的 5 型增殖型腺病毒。氯化铯密度梯度离心法纯化病毒,TCID₅₀ 方法测病毒滴度, -80℃ 保存。

1.4 HeLa S3 细胞腺病毒感染率的测定

在腺病毒感染前一天,以每孔 5×10^4 、 2×10^4 、 1×10^4 个 HeLa S3 细胞接种于 6、24 和 96 孔板,腺

病毒在无血清的 DMEM 培养液中感染细胞 2 h, 补加等体积的含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 继续在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养。HeLa S3 细胞被含报告基因的 Ad-GFP 腺病毒感染, MOI 分别为 0、10、20、50、100 和 200, 感染 48 h 后在荧光显微镜下评估 GFP 阳性细胞比率, 以此计算 HeLa S3 细胞的最佳感染效率。

1.5 CCK-8 法检测基因治疗联合放疗对肿瘤细胞的杀伤作用

将 HeLa S3 细胞分别按 5×10^3 /孔接种于 96 孔板, 总共接种 2 板, 每板接种 48 孔, 培养液采用 5% 小牛血清的 DMEM。24 h 后, 将 Ad-EGR-TRAIL 和 Ad-GFP 以 MOI = 100 分别感染 HeLa S3 细胞中的 24 孔(另 24 孔不感染病毒的细胞作为空白对照)。感染后细胞分成两组, 一组在培养箱中常规培养, 另一组感染 24 h 后用直线加速器以 2.5 Gy/min 剂量率照射细胞 4.8 min 后继续培养。感染后第 1、3、5 天用 CCK-8 法分别检测不同处理组细胞增殖抑制率。检测方法简述如下: 吸弃培养孔中的培养液, 每孔内加入 100 μ l DMEM 和 20 μ l 的 CCK-8 试剂(同时以只含 100 μ l DMEM 和 20 μ l CCK-8 试剂的培养孔作为调零孔), 培养 2 h, 然后用酶标仪测定 450 nm 处的光密度值(D), 结果以相对存活率表示。同时, 将人正常宫颈细胞按照上面方法接种和处理, 在腺病毒感染后第 5 天用 CCK-8 法检测其增殖抑制率。细胞增殖抑制率(%) = (对照孔 D 值 - 实验孔 D 值)/对照孔 D 值 \times 100%

1.6 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.0 统计软件, 用 U 检验进行统计分析。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pENTER15-EGR-TRAIL 载体的成功构建

用 *Bgl* I 和 *Pst* I 酶切质粒 pENTER15-EGR-TRAIL, 电泳(图 2)显示 330、364、802 和 2 345 bp 的条带, 1~5 号克隆酶切鉴定结果与预期一致, 表明载体构建正确, 可进行后续实验。

2.2 pPE3-EGR-TRAIL 的成功构建

用 *Hind* III 或 *Bam*H I 酶切质粒 pPE3-EGR-TRAIL, *Hind* III 酶切电泳显示 8 010、6 396、5 322、4 597、4 360、2 937、2 791、2 081、1 522 bp 和 75 bp 的条带; *Bam*H I 酶切电泳显示 20 674、8 415、5 519、1 741、1 341、401 bp 的条带。如图 3 所示, 1、2、4 号克隆酶切鉴定结果与预期一致, 表明载体构建正确,

可进行后续实验。

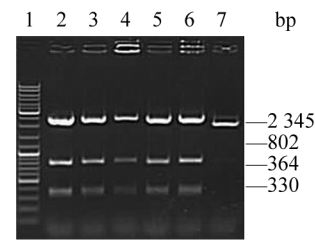


图 2 pENTER15-EGR-TRAIL 载体的酶切鉴定
Fig. 2 Identification of pENTER15-EGR-TRAIL vector by endonuclease digestion

1: Mix DNA Ladder; 2-7: pENTER15-EGR-TRAIL digested by *Bgl* I and *Pst* I

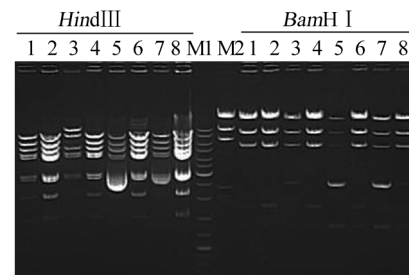


图 3 pPE3-EGR-TRAIL 载体的酶切鉴定
Fig. 3 Identification of pPE3-EGR-TRAIL vector by endonuclease digestion

M1: Mix DNA Ladder; M2: Lambda DNA Marker; 1-8(left): pPE3-EGR-TRAIL digested by *Hind* III; 1-8(right): pPE3-EGR-TRAIL digested by *Bam*H I

2.3 腺病毒 Ad-EGR-TRAIL 的 PCR 鉴定结果

以 Ad-EGR-TRAIL 的 DNA 为模板, 引物 P1: 5'-ATGGCTATGATGGAGGTCCAG-3' 和 P2: 5'-TTAGC-CAACTAAAAAGGCC-3' 行 PCR 扩增 *TRAIL* 基因, 扩增的 DNA 片段在 846 bp 左右, 1~4 号病毒与预计相符, 以引物 P3: 5'-CTAGTCTAGACGCCGAC-CCGAAACGCC-3' 和 P4: 5'-CCGCTCGAGCCAAGT-TCTGCGCGCTGGG-3' 行 PCR 扩增 *EGR-1* 启动子, 扩增的 DNA 片段在 468 bp 左右, 1~4 号病毒与预计相符(图 4), 表明 *EGR-1* 启动子和 *TRAIL* 基因成功克隆入腺病毒中。同时以引物 P5: 5'-AGCCCAT-GGAACCCGAGAGC-3' 和 P6: 5'-CCTCAATCTG-TATCTTCATC-3' 行 PCR 扩增 E1b 55 kDa, 检测构建腺病毒是否真正缺失 E1b 55 kDa, 如缺失扩出 354 bp, 如未缺失与 PXC1 一样扩增出 1 309 bp 片段。结果(图 5)显示, 1~4 号病毒 E1b 55 kDa 缺失, 表明成功构建增殖性腺病毒 Ad-EGR-TRAIL。最后实

验选择 1 号病毒大量扩增进行后续实验。

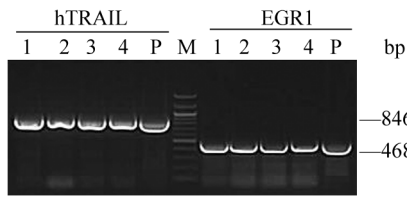


图 4 PCR 鉴定重组腺病毒 Ad-EGR-TRAIL 的 TRAIL 基因和 EGR-1 启动子

Fig. 4 Identification of TRAIL gene and EGR-1 promoter in recombinant adenovirus Ad-EGR-TRAIL by PCR analysis

1-4 (left): TRAIL gene amplified from Ad-EGR-TRAIL;
 1-4 (right): EGR-1 promoter amplified from Ad-EGR-TRAIL;
 P: Positive control (pPE3-EGR-TRAIL);
 M: 100 bp DNA Ladder

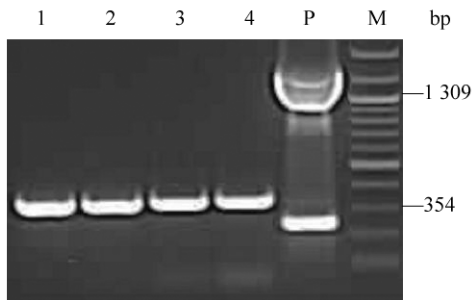


图 5 PCR 鉴定重组腺病毒 Ad-EGR-TRAIL 的 E1b 55 kDa 基因

Fig. 5 Identification of E1b 55 kDa gene in recombinant adenovirus Ad-EGR-TRAIL by PCR analysis

1-4: E1b55 kDa gene amplified from Ad-EGR-TRAIL;
 P: Positive control (PXC1); M:100 bp DNA Ladder

2.4 腺病毒在 HeLa S3 细胞中的感染效率

为了优化 Ad-EGR-TRAIL 的治疗效果,本实验首先用 GFP 报告基因腺病毒(Ad-GFP)感染 HeLa S3 细胞,检测 HeLa S3 细胞的腺病毒感染效率。当 HeLa S3 细胞感染不同 MOI 的 Ad-GFP 48 h 后,在 MOI 值从 0 到 50 时,GFP 阳性细胞数逐渐增多,直到 MOI 为 100 时达到最大值。然而,在 MOI 为 200 时,由于腺病毒对细胞的毒性增大,致使 HeLa S3 细胞部分死亡,造成 GFP 阳性细胞数下降(图 6)。因此,后续研究中用 MOI = 100 感染 HeLa S3 细胞。

2.5 Ad-EGR-TRAIL 联合放疗抑制 HeLa S3 细胞的增殖

为了验证受辐射调控溶瘤腺病毒 Ad-EGR-TRAIL 联合放疗的抗肿瘤策略是否可以显著杀伤肿瘤细胞,本研究选取了对腺病毒敏感的 HeLa S3 细

胞进行细胞毒性试验。结果(图 7A)显示,Ad-EGR-TRAIL 组、放疗组或者 Ad-EGR-TRAIL 联合放疗组第 2 天开始细胞存活率小幅下降,至第 6 天,阴性对照 Ad-GFP 和放疗组 HeLa S3 细胞的增殖抑制率分别为(8.07 ± 3.02)% 和(23.02 ± 4.03)%, 而 Ad-EGR-TRAIL 联合放疗组 HeLa S3 细胞的增殖抑制率为(79.77 ± 9.15)%。以上数据表明,溶瘤腺病毒 Ad-EGR-TRAIL 联合放疗能够显著抑制 HeLa S3 细胞的增殖,增强抗癌效果。在人正常宫颈细胞中,单纯治疗组和联合治疗组都基本没有明显阻抑细胞的增殖(图 7B)。

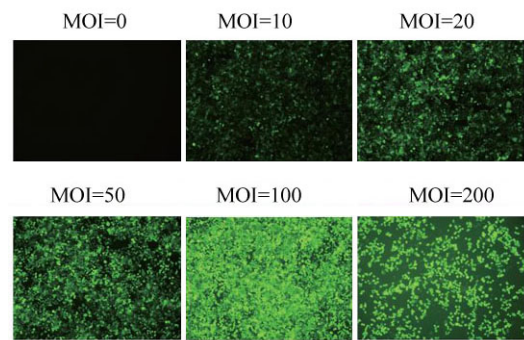


图 6 不同 MOI Ad-GFP 感染 HeLa S3 细胞的效率(×100)
 Fig. 6 Efficiency of Ad-GFP infection at different MOI in HeLa S3 cells (×100)

3 讨论

肿瘤的传统治疗方法如手术、化疗、放疗等都不能达到靶向治疗的效果,并且对机体会产生很大的不良反应,所以如何靶向性的治疗肿瘤,并且和传统治疗方法结合起来,以期产生更好的治疗效果已经成为当前肿瘤基因治疗研究中的热点。溶瘤腺病毒 H101 就是其中的典型代表,由于野生型 P53 对 H101 病毒复制的抑制,使得 H101 能特异地裂解 P53 缺陷的肿瘤细胞而不影响正常细胞。然而,尽管已经上市,但是单独使用 H101 治疗肿瘤的效果仍有限。目前 H101 仍需要与常规肿瘤治疗方法(如放疗)相结合来应用于临床治疗^[9]。本研究所用的腺病毒载体即是类似于 H101 病毒,是缺失了 E1b 55 kDa 和 E3 的人血清 5 型腺病毒,它可以特异性杀伤 P53 活性缺失的肿瘤细胞,而对正常细胞无杀伤作用。

宫颈癌的发病和人乳头状瘤病毒(human papilloma virus,HPV)感染有密切关系^[10],研究^[11-12]发现,超过 90% 的宫颈癌患者感染 HPV,尤以

HPV16 亚型感染最多。HPV 病毒含有 *E6* 和 *E7* 基因,它们可以使正常细胞转化为肿瘤细胞。*E6* 蛋白可以特异性与 P53 蛋白相互作用,导致 P53 蛋白泛素化降解^[13]。宫颈癌细胞中 P53 蛋白功能的缺失,可以使本研究所用的溶瘤腺病毒特异性杀伤宫颈癌细胞,而对正常细胞无损害。

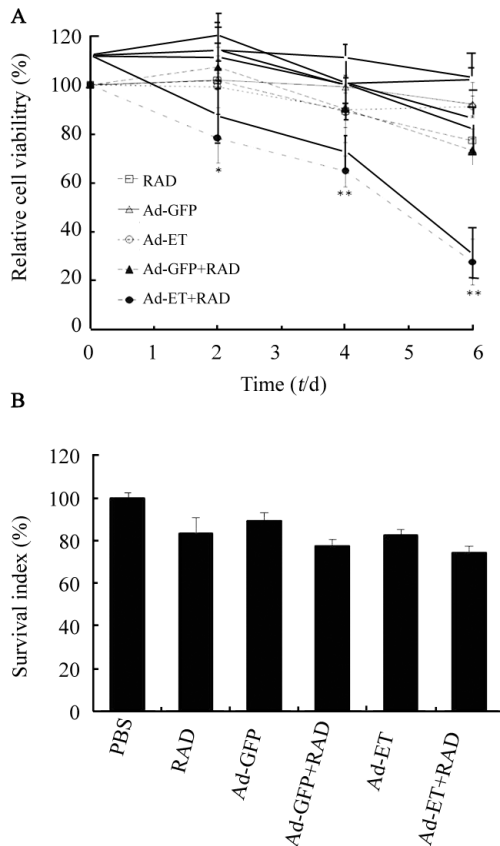


图7 Ad-EGR-TRAIL 联合放疗组 HeLa S3 细胞的相对细胞活力

Fig.7 Relative cell viability of HeLa S3 cells in Ad-EGR-TRAIL combined with radiotherapy treatment group

A: HeLa S3 cells; B: Normal cervical keratinocytes

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ad-ET or RAD

Ad-ET: Ad-EGR-TRAIL; RAD: Radiotherapy

基因治疗中目的基因的选择是肿瘤基因治疗有效性的首要决定因素,它取决于肿瘤的生物学特性。目前应用于宫颈癌基因治疗的目的基因有自杀基因、免疫基因、抑癌基因等,其中应用最多的是自杀基因。本研究所用的治疗基因所表达的 TRAIL 蛋白主要与细胞表面 TRAILR 结合,激活细胞内 caspase 级联反应,最终诱导细胞凋亡。并且有研究^[14]发现,TRAIL 基因具有独特的“旁观者效应”,这样就能更好的杀伤肿瘤。近年来,可溶性的重组人 TRAIL 蛋白对肿瘤细胞的杀伤作用在许多研究

中已得到证实^[15-16],但是,可溶性 TRAIL 的半衰期小于 5 h^[17],因此,需要持续给药才能维持其在靶细胞内的有效治疗浓度,并抑制肿瘤细胞的增殖。本研究借助溶瘤腺病毒载体,使 TRAIL 基因可以在肿瘤细胞内持续表达,起到长效杀死靶细胞的作用,克服了 TRAIL 作用时间短的缺点。

一个有效的提高肿瘤放疗敏感性的方法是使用射线诱导启动子,使治疗基因在照射野内表达。早期增殖反应因子 1 (early growth response-1, *EGR-1*) 基因启动子区含有 6 个高度保守的 CC(A+T)6GG 模体 (motif),可在电离辐射产生的氧自由基刺激下诱导下游基因的表达^[6]。有报道^[18-19]利用 *EGR-1* 基因启动子的这一特性,与相应的目的基因构建放射诱导基因表达调控系统。*EGR-1* 启动子介导的基因治疗有两点值得重视^[20]:(1)*EGR-1* 启动子的诱导剂——辐射本身对肿瘤也有治疗作用,由于电离辐射具有靶向性和可控性,从而可从时、空调控治疗基因在肿瘤局部的表达。(2)放疗与转基因产物有协同作用,如 TNF- α 增强放疗的效应。许多肿瘤对辐射敏感,但治疗量的放射线往往对正常组织亦有较大的损伤,因而有必要寻找更低辐射量、对正常组织损伤少、且有效的治疗方案。应用鼠 *EGR-1* 启动子调控目的基因 TRAIL 在时间和空间上的表达,理论上能在肿瘤局部用辐射控制 TRAIL 基因的表达,充分发挥 TRAIL 基因的毒性作用及其“旁观者效应”。本研究将 *EGR-1* 启动子和治疗基因 TRAIL 构建入溶瘤腺病毒中,用这种新型溶瘤腺病毒 Ad-EGR-TRAIL 联合放疗,相对于单纯治疗对 HeLa S3 细胞有更明显的杀伤作用,而对正常细胞几乎无杀伤作用。

TRAIL 蛋白通过 Fas 相关死亡结构域激活 caspase 级联反应凋亡途径^[21];离子射线可以直接损坏 DNA 双链,启动线粒体依赖的凋亡途径^[22]。TRAIL 基因治疗联合放疗可能就是通过激活线粒体依赖和非线粒体依赖两条不同的凋亡通路实现增强治疗效果的目的。此外,研究^[23]发现,离子射线可以增强病毒的感染效率和转入基因的表达。Yoon 等^[24]研究发现,顺铂可以明显增强肿瘤组织中腺病毒的数量。本研究中可能有相似的机制,离子射线使腺病毒释放更多的病毒感染邻近的肿瘤细胞,增强溶瘤腺病毒对肿瘤的杀伤作用。

总之,Ad-EGR-TRAIL 溶瘤腺病毒联合放疗是一个有效的宫颈癌治疗方法,尤其对那些有射线抗性的肿瘤。本研究为溶瘤腺病毒联合放疗用于临床前研究提供了有力的实验依据。

[参 考 文 献]

[1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.

[2] del Carmen MG, McIntyre JF, Goodman A. The role of intraoperative radiation therapy (IORT) in the treatment of locally advanced gynecologic malignancies [J]. Oncologist, 2000, 5(1): 18-25.

[3] Höckel M, Dornhöfer N. Treatment of early endometrial carcinoma: Is less more? [J]. Lancet, 2009, 373(9658): 97-99.

[4] Jiang G, Xin Y, Zheng JN, et al. Combining conditionally replicating adenovirus-mediated gene therapy with chemotherapy: A novel antitumor approach [J]. Int J Cancer, 2011, 129(2): 263-274.

[5] Cretney E, Shanker A, Yagita H, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand as a therapeutic agent in autoimmunity and cancer [J]. Immunol Cell Biol, 2006, 84(1): 87-98.

[6] Datta R, Rubin E, Sukhatme V, et al. Ionizing radiation activates transcription of the EGR1 gene via CArG elements [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(21): 10149-10153.

[7] Datta R, Taneja N, Sukhatme VP, et al. Reactive oxygen intermediates target CC(A/T)6GG sequences to mediate activation of the early growth response 1 transcription factor gene by ionizing radiation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(6): 2419-2422.

[8] Weichselbaum RR, Hallahan DE, Beckett MA, et al. Gene therapy targeted by radiation preferentially radiosensitizes tumor cells [J]. Cancer Res, 1994, 54(16): 4266-4269.

[9] Yu W, Fang H. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2007, 7(2): 141-148.

[10] Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia [J]. J Natl Cancer Inst, 1993, 85(12): 958-964.

[11] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide [J]. J Pathol, 1999, 189(1): 12-19.

[12] Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) study group [J]. J Natl Cancer Inst, 1995, 87(11): 796-802.

[13] Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, et al. The E6 oncoprotein

tein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53 [J]. Cell, 1990, 63(6): 1129-1136.

[14] Shareef MM, Cui N, Burikhanov R, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and TRAIL in high-dose radiation-induced bystander signaling in lung adenocarcinoma [J]. Cancer Res, 2007, 67(24): 11811-11820.

[15] Yamamoto TH, Nagano M, Sakon M, et al. Partial contribution of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/TRAIL receptor pathway to antitumor effects of interferon-alpha/5-fluorouracil against hepatocellular carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(23): 7884-7895.

[16] Hyer ML, Croxton R, Krajewska M, et al. Synthetic triterpenoids cooperate with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand to induce apoptosis of breast cancer cells [J]. Cancer Res, 2005, 65(11): 4799-4808.

[17] Walczak H, Miller RE, Ariail K, et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo* [J]. Nat Med, 1999, 5(2): 157-163.

[18] 杜楠, 裴雪涛, 孙君重, 等. 氟脲嘧啶促进 Egr-1 启动子上调人骨髓基质细胞 GM-CSF 的表达 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15(5): 428-432.

[19] Kawashita Y, Ohtsuru A, Kaneda Y, et al. Regression of hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* by radiosensitizing suicide gene therapy under the inducible and spatial control of radiation [J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(9): 1509-1519.

[20] Paillard F. The control of transgene expression with radiation [J]. Hum Gene Ther, 1998, 9(10): 1393-1394.

[21] Ferreira CG, Epping M, Kruyt FA, et al. Apoptosis: Target of cancer therapy [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(7): 2024-2034.

[22] Kulms D, Schwarz T. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis [J]. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2000, 16(5): 195-201.

[23] Zeng M, Cerniglia GJ, Eck SL, et al. High-efficiency stable gene transfer of adenovirus into mammalian cells using ionizing radiation [J]. Hum Gene Ther, 1997, 8(9): 1025-1032.

[24] Yoon AR, Kim JH, Lee YS, et al. Markedly enhanced cytotoxicity by E1B-19kD-deleted oncolytic adenovirus in combination with cisplatin [J]. Hum Gene Ther, 2006, 17(4): 379-390.

[收稿日期] 2011 - 08 - 15 [修回日期] 2011 - 09 - 10
 [本文编辑] 王莹



本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司 封二

上海医元生物基因发展有限公司 封三

碧迪医疗器械有限公司 封四