

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.01.003

携 *Apoptin* 和 *PEG3* 启动子双特异性溶瘤腺病毒对结直肠癌的抑制作用

陈智飞^{1,2}, 李一权², 胡宁宁², 兰添², 周晔^{2,3}, 李霄², 孙丽丽^{2,4,Δ}, 金宁一²(1. 吉林大学动物医学学院 预防兽医学教研室, 吉林 长春 130062; 2. 军事医学科学院 军事兽医研究所 病毒研究室, 吉林 长春 130122; 3. 长春中医药大学附属医院 检验科, 吉林 长春 130103; 4. 吉林省肿瘤医院 头颈外一科, 吉林 长春 130012)

[摘要] **目的:** 探讨携带凋亡素基因(*Apoptin*)和进行性增量基因3(*progression-elevated gene 3*, *PEG3*)启动子的双特异性溶瘤腺病毒 Ad-*Apoptin*-*PEG3p*-E1a 对结直肠癌的体内、外抑制效果。**方法:** 以 Ad-*Apoptin*-*PEG3p*-E1a、Ad-*PEG3p*-E1a、Ad-*Apoptin*、Ad-mock(均为前期工作构建)分别感染人结直肠癌 SW1116 细胞和胃黏膜上皮 GES 细胞, MTT 法检测感染后细胞的增殖水平; 流式细胞术检测细胞的凋亡情况; 采用 DCFH-DA 和 Rho123 染色流式细胞术分别检测细胞活性氧水平和线粒体膜电位, Western blotting 检测细胞色素 C 的释放。建立 BALB/c 小鼠结直肠癌 CT26 细胞皮下移植瘤模型, 观察 Ad-*Apoptin*-*PEG3p*-E1a 对结直肠癌皮下移植瘤的抑制作用。**结果:** Ad-*Apoptin*-*PEG3p*-E1a 抑制 SW1116 细胞增殖, 并具有一定的剂效和时效关系, 以 MOI = 100 感染 72 h 后抑制率达到(56.23 ± 6.64)%, 其抑制能力明显强于 Ad-*PEG3p*-E1a 和 Ad-*Apoptin* 等对照组(均 $P < 0.05$)。Ad-*Apoptin*-*PEG3p*-E1a 感染导致 SW1116 细胞活性氧水平上调、线粒体膜电位下降以及细胞色素 C 释放增加, 最终诱导 SW1116 细胞凋亡, 凋亡率为(37.97 ± 3.78)%, 但对正常 GES 细胞的上述各项指标均无明显影响。Ad-*Apoptin*-*PEG3p*-E1a 能显著抑制小鼠皮下移植瘤生长($P < 0.05$); 有效延长模型动物平均生存期, Ad-*Apoptin*-*PEG3p*-E1a 治疗组平均生存期为(41.0 ± 0.7)d, 显著高于 Ad-*PEG3p*-E1a 的(34.4 ± 1.6)d、Ad-*Apoptin* 的(33.2 ± 1.2)d 和 Ad-mock 的(28.4 ± 1.4)d(均 $P < 0.05$)。**结论:** Ad-*Apoptin*-*PEG3p*-E1a 可以特异性有效抑制结直肠癌细胞增殖及皮下移植瘤的生长。

[关键词] 溶瘤腺病毒; 凋亡素基因; 进行性增量基因 3; 结直肠癌; SW1116 细胞; GES 细胞

[中图分类号] R735.3; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)01-0016-06

Anti-tumor effects of a dual cancer-specific oncolytic adenovirus carried *Apoptin* and *PEG3* promoter on colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*

Chen Zhifei^{1,2}, Li Yiquan², Hu Ningning², Lan Tian², Zhou Ye^{2,3}, Li Xiao², Sun Lili^{2,4,Δ}, Jin Ningyi²(1. Department of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China; 2. Department of Virus, Institute of Military Veterinary Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130122, Jilin, China; 3. Department of Laboratory Medicine, Changchun University of Chinese Medicine-Affiliated Hospital, Changchun 130103, Jilin, China; 4. No. 1 Department of Head and Neck Surgery, Tumor Hospital of Jilin Province, Changchun 130012, Jilin, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-tumor effects of a dual cancer-specific oncolytic adenovirus Ad-*Apoptin*-*PEG3p*-E1a on colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** A dual cancer-specific oncolytic adenovirus vector carried *Apoptin* and *PEG3* promoter (Ad-*Apoptin*-*PEG3p*-E1a) was constructed. In experiments *in vitro*, colon cancer SW1116 cells and gastric epithelial GES cells were infected with the constructed adenoviral vector. At various time points after in-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81101140); 国家科技重大专项子课题(No. 2014ZX09304314-002); 国家高技术研究发展计划(863计划)资助(No. 2012AA02A407); 吉林省重点科技攻关项目资助(No. 20130206041NY)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81101140), the Grants from the National Science and Technology Major Project(No. 2014ZX09304314-002), the National High-Technology Research and Development Project of China(863 project)(No. 2012AA02A407), and the Key Program of Science and Technology from Jilin Province(No. 20130206041NY)

[作者简介] 陈智飞(1989-), 男, 安徽省安庆市人, 硕士生, 主要从事肿瘤疫苗的研究, E-mail: yanpingyiyun@163.com

[通信作者] 金宁一(Jin Ningyi, corresponding author), E-mail: ningyik@126.com; 孙丽丽(Sun Lili, co-corresponding author), E-mail: linjiaxiaoya@163.com。Δ共同通信作者

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20150205.1442.003.html>

fection, cell viability was assessed by MTT assay, apoptosis, levels of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential (MMP) and cytochrome C (Cyt C) by flow cytometry. In experiments *in vivo*, BALB/c mice bearing established subcutaneous transplantation tumors were treated with Ad-Apoptin-PEG3p-E1a and a control vector respectively. Tumor growth kinetics and mean survival time were assessed. **Results:** *In vitro*, Ad-Apoptin-PEG3p-E1a significantly suppressed proliferation, increased ROS production, reduced MMP levels and enhanced Cyt C release in a dose- and time-dependent manner in SW1116 cells, as compared with the control vector. Ad-Apoptin-PEG3p-E1a infection also resulted in increased apoptosis in SW1116 cells but had no significant effects on GES cells. *In vivo*, Ad-Apoptin-PEG3p-E1a inhibited the growth of subcutaneous transplantation tumors significantly and extended the lifespan of the animals (41.0 ± 0.7 days), while Ad-PEG3p-E1a-, Ad-Apoptin- and Ad-mock-treated animals had shorter mean survival time (34.4 ± 1.6 days, 33.2 ± 1.2 and 28.4 ± 1.4 , respectively, $P < 0.05$). **Conclusion:** The dual cancer-specific oncolytic adenovirus vector carrying *Apoptin* and *PEG3p* may offer a promising gene therapy for colon cancer.

[**Key words**] oncolytic adenovirus; *Apoptin*; progression-elevated gene 3 (*PEG3*); colorectal cancer (CRC); SW1116 cell; GES cell

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(1): 16-21]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)严重威胁人类健康,其发病率和病死率分别位居全球第三位和第四位^[1]。目前恶性肿瘤治疗以手术、化疗和放疗为主,但传统放疗毒性作用大且抗肿瘤特异性差,因此,靶向性和有效性成为肿瘤治疗过程中亟待解决的问题。目前,基因治疗逐渐受到关注,其中腺病毒载体基因治疗已成为抗肿瘤研究的热点^[2-4]。凋亡素基因(*Apoptin*)能够通过诱导凋亡特异性地杀伤肿瘤细胞,但对正常细胞几乎没有细胞毒性^[5-6]。进行性增量基因 3 (progression-elevated genes 3, *PEG3*)是一种有效的肿瘤标志物,在肿瘤细胞中的表达量要远远高于正常细胞,因此 *PEG3* 启动子 (progression-elevated genes 3 promoter, *PEG3p*)具有良好的肿瘤特异性^[7]。本课题组前期构建结合 *Apoptin* 和 *PEG3p* 的具有肿瘤特异性杀伤和携带复制功能的双重特异性溶瘤腺病毒 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a^[8],在此腺病毒中,以 RAPAD. I 为载体,由巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子驱动特异性抑癌基因 *Apoptin*,由 *PEG3p* 驱动腺病毒 5 型早期区 1A 基因(early region 1A, *E1a*)。本研究利用此溶瘤腺病毒 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 开展结直肠癌的体内外抑瘤实验,探索结直肠癌基因治疗的新方法。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞株与主要试剂

重组腺病毒 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a、Ad-PEG3p-E1a、Ad-Apoptin、Ad-mock, 人结直肠癌细胞 SW1116、鼠结直肠癌细胞 CT26 和人胃黏膜上皮细胞 GES 均由本实验室保存。3-(4,5-二甲噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT)、DCFH-DA 及

Rho123 购自 Sigma 公司,Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物研究所,细胞色素 C(Cyt C) 兔单抗、辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购自 Cell Signaling 公司。6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠由军事医学科学院实验动物中心[实验动物合格证号: SCXK (军)2007-004]提供。

1.2 MTT 法检测 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 对结直肠癌 SW1116 细胞增殖的影响

于 96 孔培养板制备 SW1116 单层细胞(5×10^3 个/孔),利用不同感染复数(1、10、100 MOI)的 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a、Ad-PEG3p-E1a、Ad-Apoptin 及 Ad-mock 分别感染 24、48、72 和 96 h,每组均设 3 个复孔。于培养结束前,每孔加入 20 μ l MTT(5 mg/ml),37 $^{\circ}$ C 继续作用 4 h,加入 150 μ l/孔 DMSO 溶解紫色结晶。GES 细胞接受同样处理作为对照。用酶标仪(TECAN 公司)在 490 nm 下测定光密度(*D*)值,细胞增殖抑制率(%)=(对照孔 *D* 值 - 实验孔 *D* 值)/对照孔 *D* 值 $\times 100\%$ 。

1.3 流式细胞术检测 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 对结直肠癌 SW1116 细胞凋亡的影响

于 6 孔培养板制备 SW1116 单层细胞(1×10^6 个/孔),用 100 MOI 的 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a、Ad-PEG3p-E1a、Ad-Apoptin 及 Ad-mock 感染细胞 48h 后,收集 1×10^5 个细胞,分别用 200 μ l Annexin V-FITC 结合液室温避光作用 10 min,离心,用 190 μ l Annexin V-FITC 结合液和 10 μ l PI 重悬沉淀;GES 细胞接受同样处理作为对照。用流式细胞仪进行分析。实验重复 3 次。

1.4 DCFH-DA 和 Rho123 染色流式细胞术分别检测 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 对 SW1116 细胞活性氧

(reactive oxygen species, ROS)和线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)的影响

于 6 孔培养板制备 SW1116 单层细胞(2.5×10^5 个/孔), 用 100 MOI 的 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a、Ad-PEG3p-E1a、Ad-Apoptin 及 Ad-mock 分别感染细胞 48 h。每组设 3 个复孔。收集细胞, 分别加入 $10\mu\text{l}$ DCFH-DA 及 $10\mu\text{l}$ Rho123, 37°C 培养 30 min。GES 细胞接受同样处理作为对照。利用流式细胞仪进行 ROS 和 MMP 分析, Cell Quest Pro 软件分析数据。

1.5 Western blotting 检测 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 对结肠直肠癌 SW1116 细胞 Cyt C 释放的影响

于 6 孔培养板制备 SW1116 单层细胞(2.5×10^5 个/孔), 用 100 MOI 的 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a、Ad-PEG3p-E1a、Ad-Apoptin 及 Ad-mock 分别感染细胞 48 h 后, 离心收集细胞。分别用细胞裂解液重悬浮细胞, 冰浴 5min, $600 \times g$ 离心 5 min, 其上清 $10\,000 \times g$ 离心 30 min 得到线粒体和细胞质, 其中沉淀用缓冲液[10 mmol/L Tris (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 5 mmol/L EDTA (pH 8.0)]溶解。GES 细胞接受同样处理作为对照。提取的样本进行蛋白变性, SDS-PAGE 分离蛋白后, 小心转移至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂乳室温封闭 1 h, 再用 TBST 洗涤 3 次, 加入 Cyt C 兔一抗, 室温孵育 1 h, 再用 TBST 洗涤 3 次, 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG, 室温孵育 1 h, 再用 TBST 洗涤 3 次。用 ECL 试剂盒检测显色情况。实验重复 3 次。

1.6 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 对小鼠皮下结直肠癌移植瘤的治疗实验

BALB/c 小鼠右后肢皮下接种 1×10^6 个 CT26 细胞, 待荷瘤成功后, 将小鼠随机分为 5 组(每组 5 只): 生理盐水对照组, Ad-mock 治疗组, Ad-PEG3p-E1a 治疗组, Ad-Apoptin 治疗组和 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 治疗组。生理盐水组注射 $50\mu\text{l}$ 生理盐水, 病毒组分别瘤内注射 $50\mu\text{l}$ (1×10^9 VP/ml) 重组腺病毒。治疗过程如下: 第 1 周瘤内注射 3 次/周; 1 周后瘤内注射 1 次/周, 共 2 周。实验期间每 3 d 测量肿瘤长径 a 和短径 b 一次, 计算肿瘤体积 $V = 1/2ab^2$ 。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 小鼠生存时间采用 Kaplan-Meier 法分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 特异性抑制结肠直肠癌

细胞的增殖

MTT 法检测(图 1A)显示, 重组腺病毒 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 有明显的抑瘤作用, 且抑瘤效果要强于 Ad-PEG3p-E1a、Ad-Apoptin 和 Ad-mock。在感染时间一定的条件下, 随感染剂量的增加, Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 对 SW1116 细胞的抑制率明显增加, 具有剂量效应关系($P < 0.05$); 在感染剂量一定的条件下(100 MOI), 随感染时间的延长, Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 对 SW1116 细胞的抑制率明显增加, 具有时间效应关系($P < 0.05$)。Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 对 SW1116 细胞的抑制率在 72 h 达到(56.23 ± 6.64)%, 显著高于 Ad-mock 与 Ad-Apoptin 感染 72 h 的抑制率($P < 0.05$)。Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 对正常细胞 GES 的增殖无明显的影响(图 1B)。

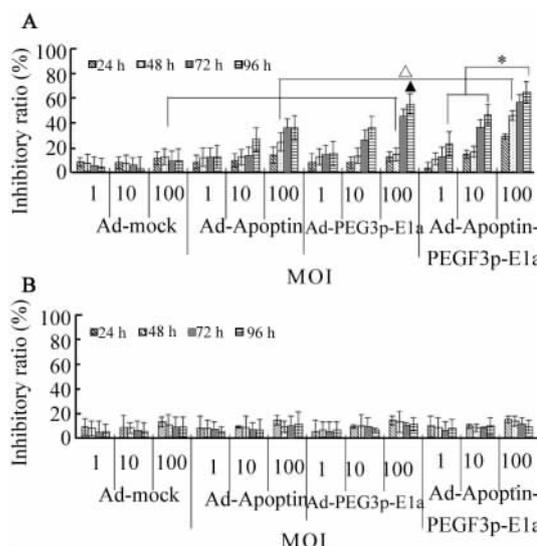


图 1 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 对人结肠直肠癌 SW1116 细胞 (A) 和人胃黏膜上皮细胞 GES (B) 的选择性抑制作用
Fig.1 Selective inhibitory effects of Ad-Apoptin-PEG3p-E1a on the human colorectal cancer SW1116 cells (A) and the epithelial cells of gastric mucosa (B)

* $P < 0.05$ vs Ad-Apoptin-PEG3p-E1a at MOI of 10 or 1 at 96 h;
△ $P < 0.05$ vs Ad-PEG3p-E1a, Ad-Apoptin or Ad-mock at MOI of 100 at 48 h; ▲ $P < 0.05$ vs Ad-mock at MOI of 100 at 96 h

2.2 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 通过线粒体途径特异性诱导结肠直肠癌细胞凋亡

AnnexinV 染色流式细胞术检测结果(图 2)显示, 与对照组相比, Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 能够特异性地诱导结肠直肠癌细胞发生凋亡, 凋亡率达(37.97 ± 3.78)%, 而对正常细胞 GES 无明显影响。流式细胞术和 Western blotting 法检测结果(图 3)显示, Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 感染 SW1116 细胞 48 h 后, 胞内 ROS 水平

明显上调, MMP 水平下降, Cyt C 释放增加。结果表明, Ad-Apoptin- PEG3p-E1a 诱导 SW1116 细胞凋亡可能与

线粒体途径密切相关。而经同样处理的 GES 细胞 ROS、MMP 及 Cyt C 水平无明显变化。

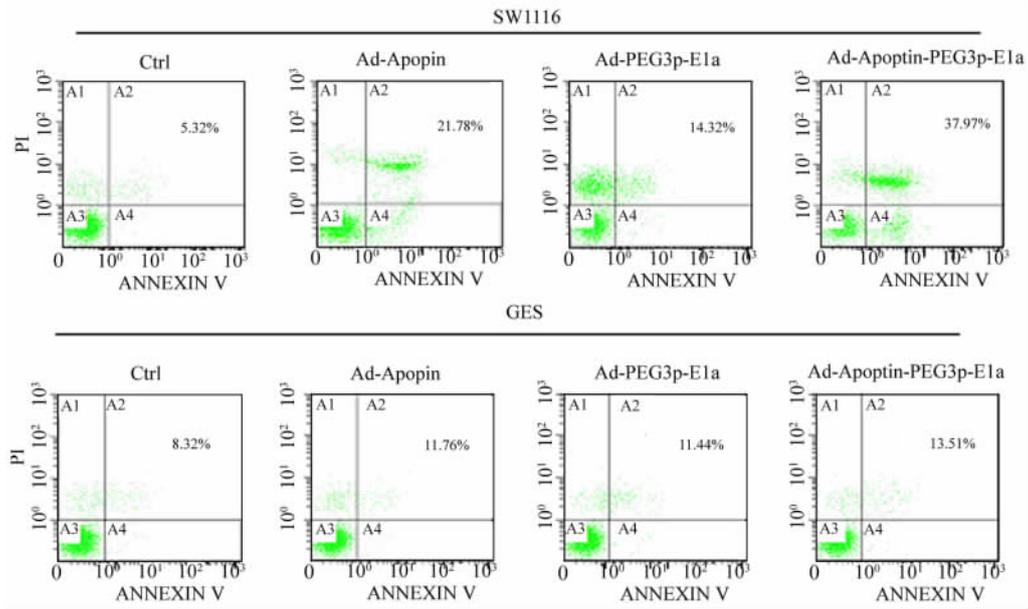


图2 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 选择性诱导结直肠癌 SW1116 细胞凋亡

Fig. 2 Selective induction of apoptosis in colorectal cancer SW1116 cells by Ad-Apoptin-PEG3p-E1a

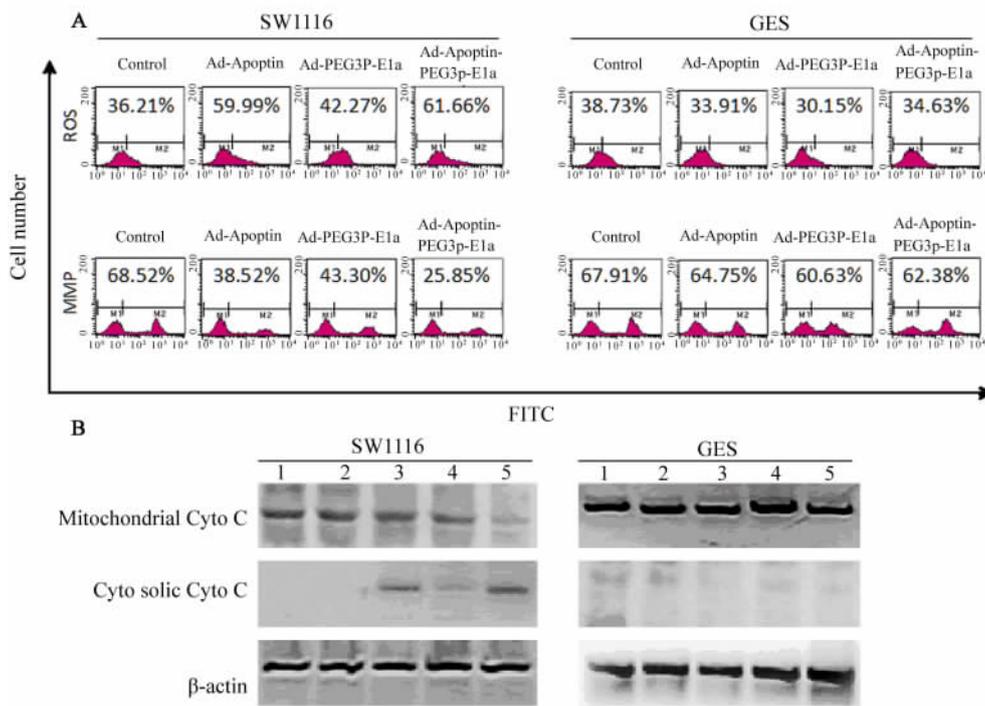


图3 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 感染对 SW1116 细胞和 GES 细胞线粒体膜通透性、活性氧水平及细胞色素 C 释放的影响

Fig. 3 Effect of Ad-Apoptin-PEG3p-E1a on mitochondrial permeability transition, levels of reactive oxygen species and cytochrome C in SW1116 cells and GES cells

A: Flow cytometric determination of ROS and MMP of SW1116 and GES cells infected with the recombinant adenoviruses;

B: Western blotting analyze the expression of cytochrome C. 1: Control; 2: Ad-mock; 3: Ad-PEG3p-E1a;

4: Ad-Apoptin; 5: Ad-Apoptin-PEG3p-E1a

2.3 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 抑制小鼠结直肠癌皮下移植瘤的生长

小鼠体内实验结果(图 4)显示,瘤内注射 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 明显抑制皮下移植瘤生长并有效延长小鼠平均生存期。生理盐水组和 Ad-mock 治疗组小鼠肿瘤生长速度最快, Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 治疗组肿瘤生长呈消退趋势 ($P < 0.05$, 图 4A)。生理盐水组平均生存期为(26.0 ± 1.8)d, Ad-mock 治疗组平均生存期为(28.4 ± 1.4)d, Ad-PEG3p-E1a 治疗组平均生存期为(34.4 ± 1.6)d, Ad-Apoptin 治疗组平均生存期为(33.2 ± 1.2)d, Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 治疗组平均生存期为(41.0 ± 0.7)d。与对照组相比, Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 治疗组小鼠平均生存期明显延长 ($P < 0.05$, 图 4B)。

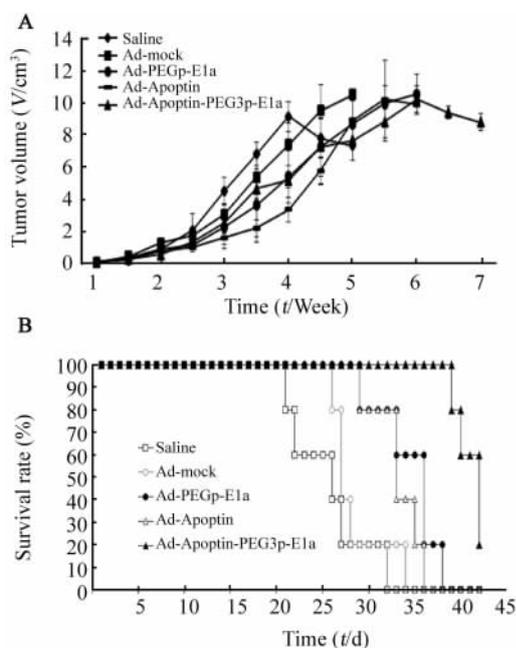


图 4 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 抑制结直肠癌皮下移植瘤的生长和延长小鼠的生存期

Fig. 4 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a inhibited the growth of subcutaneous transplantation tumors and extended the survival times of the mice

A: Tumor growth trend of mice that treated with recombinant adenoviruses by intratumoral injection;
B: Survival curves of mice treated intratumorally

3 讨论

随着对肿瘤发生发展分子机制认识的不断深入, 肿瘤的基因治疗已成为攻克和治愈肿瘤最具希望的研究领域^[9], 其中基于溶瘤腺病毒的肿瘤基因

治疗逐渐成为研究焦点^[10-14]。目前, 如重组人 5 型腺病毒及重组人 p53 腺病毒均已上市^[15-16]。但溶瘤腺病毒的肿瘤特异性及靶向性问题尚待解决^[17]。人们通过删除腺病毒复制必需基因, 而将其置于肿瘤特异性启动子控制下, 制备了具有肿瘤特异性复制功能的重组腺病毒, 在一定程度上解决了溶瘤腺病毒肿瘤特异性的问题^[18]。本课题组利用 PEG3 启动子驱动腺病毒复制必需基因 E1a, 并将肿瘤特异性抑制基因 Apoptin 植入该重组腺病毒, 制备了具有肿瘤特异性杀伤和肿瘤特异性复制双重特性的重组腺病毒 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a^[8]。本研究基于上述双重特性溶瘤腺病毒, 探讨了其对结直肠癌的体内、外抑瘤作用。

实验表明, 在感染剂量一定条件下, 随感染时间延长, Ad-Apoptin-PEG3p-E1a、Ad-PEG3p-E1a 和 Ad-Apoptin 分别对 SW1116 细胞抑制率均显著升高, 并具有时间效应关系 ($P < 0.05$)。感染时间一定条件下, 特别是 72 和 96 h, 随感染剂量增加, Ad-Apoptin-PEG3p-E1a、Ad-PEG3p-E1a、Ad-Apoptin 分别对 SW1116 细胞抑制率均有不同程度升高, 且 $100 > 10 > 1$ MOI ($P < 0.05$)。随感染时间延长和感染剂量增加, Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 明显抑制 SW1116 细胞生长, 而 Ad-PEG3p-E1a、Ad-Apoptin 和 Ad-mock 抑瘤作用远不及 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a, 这可能与缺失 E1a、PEG3p 及 Apoptin 有关。PEG3p 已经被证实是一种肿瘤特异性启动子, 已广泛用于乳腺癌、前列腺癌等多种肿瘤的治疗研究^[19-21]。本研究将 E1a 基因置于 PEG3p 下游, 解决了 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 在结直肠癌细胞中特异性复制问题。Apoptin 可以特异性诱导肿瘤细胞凋亡而不会影响正常细胞的生长^[22-23], 同时又将 Apoptin 置于 CMV 启动子下游, 解决了 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 对结直肠癌细胞的特异性杀伤问题。

实验证明, Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 的感染导致 SW1116 细胞 ROS 水平上调, MMP 水平下降, Cyt C 释放增加, 最终诱导 SW1116 细胞凋亡。有文献报道^[24], 释放的 Cyt C 促进 Apaf-1 寡聚化, 激活 caspase 9 前体, 形成 cyt C/Apaf-1/caspase 9 凋亡小体, 促进细胞凋亡。本实验结果表明, Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 主要是通过经典凋亡途径诱导结直肠癌细胞凋亡, 从而实现对 SW1116 细胞的抑制作用。Ad-PEG3p-E1a 可以靶向于 SW1116 细胞, 并进行复制, 但并未植入 Apoptin 基因而使其杀伤能力受限, 因此 Ad-PEG3p-E1a 只具有肿瘤特异性复制特性。对于 Ad-Apoptin 而言, 虽然具有肿瘤特异性杀伤特

性,但因缺乏复制功能,抑瘤效果也受到制约。同时动物模型实验数据也进一步验证了上述结果,Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 有效抑制结直肠癌皮下移植瘤的生长,并在第 5 周肿瘤开始有消退趋势($P < 0.05$);Ad-PEG3p-E1a 和 Ad-Apoptin 对移植瘤有抑制趋势,但并不明显,截至第六周小鼠全部死亡;而 Ad-mock 和生理盐水组并没有表现出对移植瘤生长起抑制作用。另外,Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 治疗组平均生存期为(41.0 ± 0.7)d,显著延长了模型动物平均生存期。

综上所述,本实验体内、外研究显示 Ad-Apoptin-PEG3p-E1a 对结直肠癌生长具有显著的抑制作用,其在结直肠癌的治疗中具有潜在临床开发价值。

[参 考 文 献]

- [1] Li ST, Chi P. Evolution of the management of colorectal cancer using integrative medicine [J]. Chin J Integr Med, 2011, 17 (1): 73-79.
- [2] Barnes MN, Pustilnik TB. Current strategies in gene therapy for ovarian cancer [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2001, 13(1): 47-51.
- [3] Shirakawa T. The current status of adenovirus-based cancer gene therapy [J]. Mol Cells, 2008, 25(4): 462-466.
- [4] Kang E, Yun CO. Current advances in adenovirus nanocomplexes: More specificity and less immunogenicity [J]. BMB Rep, 2010, 43(12): 781-788.
- [5] Panigrahi S, Klonisch T, Los M. The art of killing: Double stroke with apoptin and survivin as a novel approach in cancer therapy [J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(7): 1061-1062.
- [6] Yuan LJ, Zhang LQ, Dong XL, et al. Apoptin selectively induces the apoptosis of tumor cells by suppressing the transcription of HSP70 [J]. Tumour Biol, 2013, 34(1): 577-585.
- [7] Hollander MC, Poola-Kella S, Fornace AJJR. Gadd34 function domains involved in growth suppression and apoptosis [J]. Oncogene, 2003, 22(25): 3827-3832.
- [8] 李霄. 双特异性抗肿瘤重组腺病毒的构建、鉴定及实验免疫 [D]. 吉林: 吉林大学, 2009.
- [9] 赵新汉, 田方, 王志宇. 肿瘤基因治疗载体的研究现状和展望 [J]. 现代肿瘤医学, 2007, 15(12): 1879-1882.
- [10] Delman KA, Bennett JJ, Zager JS, et al. Effects of preexisting immunity on the response to herpes simplex-based oncolytic viral therapy [J]. Hum Gene Ther, 2000, 11(18): 2465-2472.
- [11] Parato KA, Senger D, Forsyth PA, et al. Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(12): 965-976.
- [12] Lian H, Jin NY, Li X, et al. Induction of an effective anti-tumor immune response and tumor regression by combined administration of IL-18 and Apoptin [J]. Cancer Immunol Immunother, 2007, 56(2): 181-192.
- [13] Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, et al. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents [J]. Nat Med, 1997, 3(6): 639-645.
- [14] Vos A, Neubert A, Pommerening E, et al. Immunogenicity of an E1-deleted recombinant human adenovirus against rabbits by different routes of administration [J]. J Gen Virol, 2001, 82(9): 2191-2197.
- [15] Ma TJ, Han CB, Zhao JZ, et al. Synergistic cytotoxic effects of recombinant human adenovirus p53 and radiation at various time points in A549 lung adenocarcinoma cells [J]. Oncol Lett, 2012, 4(3): 529-533.
- [16] Chiocca EA, Abbed KM, Tatter S, et al. A phase I open-label dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1B-attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting [J]. Mol Ther, 2004, 10(5): 958-966.
- [17] Vorburger SA, Hunt KK. Adenoviral gene therapy [J]. Oncologist, 2002, 7(1): 46-59.
- [18] Crompton AM, Kim DH. From ONYX-015 to armed vaccinia viruses: The education and evolution of oncolytic virus development [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2007, 7(2): 133-139.
- [19] Su ZZ, Gopalkrishnan RV, Narayan G, et al. Progression elevated gene-3, PEG-3, induce genomic instability in rodent and human tumor cells [J]. J Cell Physiol, 2002, 192(1): 34-44.
- [20] Su ZZ, Shi Y, Fisher PB. Cooperation between API1 and PEA3 sites within the progression elevated gene-3 (PEG-3) promoter regulate basal and differential expression of PEG-3 during progression of the oncogenic phenotype in transformed rat embryo cells [J]. Oncogene, 2000, 19(30): 3411-3421.
- [21] Chang YW, Hung MC, Su JL. The anti-tumor activity of E1A and its implications in cancer therapy [J]. Arch Immunol Ther Exp, 2014, 62(3): 195-204.
- [22] Taebunpakul P, Sayan BS, Flinterman M, et al. Apoptin induce apoptosis by changing the equilibrium between the stability of TAp73 and ΔNp73 isoforms through ubiquitin ligase PIR2 [J]. Apoptin, 2012, 17(8): 762-776.
- [23] Kovalenko OA, Kaplunov J, Herbig U, et al. Expression of (NES-)hTERT in cancer cells delays cell cycle progression and increases sensitivity to genotoxic stress [J]. PLoS ONE, 2010, 5(5): e10812.
- [24] Long JS, Ryan KM. New frontiers in promoting tumour cell death: Targeting apoptosis, necroptosis and autophagy [J]. Oncogene, 2012, 31(49): 5045-5060.

[收稿日期] 2014 - 10 - 23

[修回日期] 2014 - 12 - 07

[本文编辑] 阮芳铭