

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.12.003

· 研究快报 ·

携带凋亡素基因的溶瘤腺病毒 ATV 对人宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用

尹逊哲^{1,2}, 陈爽^{2,4}, 李文杰^{1,2}, 朱羿龙^{1,2}, 李一权², 崔传信², 李敏², 崔英丽², 赵津², 李善智², 郑颖⁵, 孙丽丽⁵, 李霄², 郭焱³, 金宁一^{2Δ}(1. 长春中医药大学药学院, 吉林长春 130117; 2. 军事科学院军事兽医研究所分子病毒学与免疫学实验室, 吉林长春 130122; 3. 长春中医药大学基础医学院, 吉林长春 130117; 4. 吉林医药学院检验学院, 吉林吉林 132013; 5. 吉林省肿瘤医院头颈外一科, 吉林长春 130021)

摘要 **目的:** 探讨携带凋亡素基因 (*apoptin*) 的溶瘤腺病毒 ATV 感染对人宫颈癌 HeLa 细胞自噬和凋亡的影响。**方法:** 分别用携带凋亡素基因的溶瘤腺病毒 ATV 与对照病毒 Ad-MOCK(均为前期工作构建)感染 HeLa 细胞后, 应用 WST-1 法检测 ATV 感染对 HeLa 细胞增殖的影响, 流式细胞术检测 ATV 感染对 HeLa 细胞凋亡和细胞周期的影响, Western blotting 法检测 ATV 感染对 HeLa 细胞自噬相关蛋白 LC3、P62 与 mTOR 表达的影响, MDC 染色法检测 ATV 感染对 HeLa 细胞自噬水平的影响。**结果:** ATV 感染后抑制 HeLa 细胞增殖, 并具有一定的时间效应关系; 以 ATV 100 MOI 感染 72 h 后抑制率达到 59.26%, 其抑制能力明显强于同时段对照组 ($P < 0.01$)。ATV 感染 48 h, ATV 组 HeLa 细胞凋亡率显著高于对照组 [(38.995±4.009)% vs (14.680±1.174)%], $P < 0.01$ 。感染后的 HeLa 细胞, 随着 ATV 作用时间的延长, S 期出现阻滞, 48 h 阻滞最强, 显著高于对照组 [(58.490±2.447)% vs (43.235±4.419)%], $P < 0.05$]。与对照组相比, ATV 感染 HeLa 后, LC3 表达量 6、12 h 逐渐增高, 12 h 达到最大值 ($P < 0.01$), 24 h 表达量最低 ($P < 0.01$); P62 蛋白在 24 h 出现最高表达水平 ($P < 0.01$); 而 mTOR 随着作用时间延长逐渐降低 (48 h 时, $P < 0.01$)。荧光显微镜下可见 HeLa 细胞核周区域 MDC 阳性染色, 随着 ATV 作用时间延长, 自噬小体明显增多; 与对照组相比, 6、12 h 自噬小体数量显著增多 [(28.000±2.828) vs (8.500±2.121), (37.000±4.243) vs (14.000±1.414)]; 均 $P < 0.01$], 24 h 相对减少 [(12.000±2.828) vs (17.000±1.414)], $P < 0.01$]。**结论:** 携带凋亡素基因的 ATV 溶瘤腺病毒可促进人宫颈癌 HeLa 细胞的凋亡和自噬水平, 进而特异性杀伤肿瘤细胞。

关键词 宫颈癌; HeLa 细胞; 凋亡素基因; 溶瘤腺病毒; 自噬; 凋亡

[中图分类号] R730.54; R737.33 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385X(2017)012-1356-06

Inhibitory effect of *apoptin*-loaded oncolytic adenovirus ATV on human cervical carcinoma HeLa cells

YIN Xunzhe^{1,2}, CHEN Shuang^{2,4}, LI Wenjie^{1,2}, ZHU Yilong^{1,2}, LI Yiquan², CUI Chuanxin², LI Min², CUI Yingli², ZHAO Jin², LI Shanzhi², ZHENG Ying⁵, SUN Lili⁵, LI Xiao², GUO Yan³, JIN Ningyi^{2Δ}(1. College of Pharmacy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, Jilin, China; 2. Molecular Virology and Immunology Laboratory, Institute of Military Veterinary and Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130122, Jilin, China; 3. College of Basic Medicine, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, Jilin, China; 4. College of Examination, Jilin Medical College, Jilin 132013, Jilin, China; 5. Department of Head and Neck Surgery, Jilin Tumor Hospital, Changchun 130021, Jilin, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of *apoptin*-loaded oncolytic adenovirus ATV infection on the autophagy and apoptosis of human cervical carcinoma HeLa cells. **Methods:** *Apoptin*-loaded oncolytic adenovirus

[基金项目] 国家重点研发计划(973计划)资助项目(No. 2016YSC1200900); 国家“重大新药创制”科技重大专项资助(No. 2014ZX09304314); 吉林省重大科技攻关项目资助(No. 20150201002YY); 吉林省产业技术创新战略联盟项目资助(No. 20140309006YY); 长春市重大科技攻关项目资助(No.16ss11); 吉林省科技发展计划项目资助(No. 20150101124JC)。Project supported by the National Key R&D Program (973 Program) of China (No. 2016YSC1200900), the Major New Drugs Innovation and Development(No. 2014ZX09304314), the Key Technologies R&D Program of Jilin Province(No. 0150201002YY), the Industrial Technology Innovation Strategic Alliance Project of Jilin Province(No. 20140309006YY), the Major Scientific and Technological Project of Changchun City(No.16ss11), and the Technology Development Project of Jilin Province(No. 20150101124JC)

[作者简介] 尹逊哲(1991-),男,硕士生,主要从事肿瘤生物治疗研究, E-mail: yoonzhe@126.com

[通信作者] 郭焱(GUO Yan, corresponding author), 博士,教授,博士生导师,主要从事微生物与免疫学研究, E-mail: ccguoyan@163.com; 金宁一(JIN Ningyi, corresponding author), 研究员,博士生导师,中国工程院院士,主要从事分子病毒学与免疫学研究, E-mail: ningyik@126.com。Δ共同通信作者

[优先出版] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20171215.1805.008.html>

ATV and the control virus Ad-MOCK (both were constructed previously) were transfected into HeLa cells. The effect of ATV infection on proliferation of HeLa cells was measured through WST-1 assay; The effect of ATV infection on apoptosis and cell cycle of HeLa cells was detected by flow cytometry; Western blotting was used to detect the effect of ATV infection on the expression of autophagy-related proteins (LC3, P62 and mTOR) in HeLa cells; MDC staining was used to detect the effect of ATV infection on autophagy of HeLa cells. **Results:** ATV infection inhibited HeLa cell proliferation in a time-dependent manner; and the inhibitory rate reached 59.26% with ATV 100 MOI at 72 h, which was significantly higher than that of the control group ($P < 0.01$); The apoptotic rate of HeLa cells in ATV group was significantly higher than that in control group [$(38.995 \pm 4.009)\%$ vs $(14.680 \pm 1.174)\%$, $P < 0.01$] 48 h after infection. With the infection of ATV, flow cytometry analysis showed that the cell cycle of HeLa was blocked at S phase, which was most significant at 48 h and significantly higher than that in control group [$(58.490 \pm 2.447)\%$ vs $(43.235 \pm 4.419)\%$, $P < 0.05$]. Western blotting revealed that after ATV infection, LC3 expression was gradually increase at 6, 12 h, with a highest level at 12 h (0.368 ± 0.010 , $P < 0.01$) and a lowest level at 24 h (0.106 ± 0.023 , $P < 0.01$), P62 protein showed the highest expression level at 24 h (6.004 ± 1.423 , $P < 0.01$), while mTOR gradually reduced (0.042 ± 0.010 , 48 h, $P < 0.01$) with the extension of infection time; under fluorescent microscope, monodansylcadaverin (MDC) positive staining of autophagosomes was observed in the peripheral region of the nucleus of HeLa cells; the number of autophagosomes of ATV group was significantly increased as the ATV infection time prolonged; compared with control group, the number of autophagosomes of ATV group significantly increased at 6 h and 12 h [(28.000 ± 2.828) vs (8.500 ± 2.121) , (37.000 ± 4.243) vs (14.000 ± 1.414) , $P < 0.01$], but relatively reduced at 24 h [(12.000 ± 2.828) vs (17.000 ± 1.414) , $P < 0.01$]. **Conclusion:** *Apoptin*-loaded oncolytic adenovirus ATV can promote the autophagy and apoptosis of human cervical cancer HeLa cells and then specifically kill tumor cells.

[**Key words**] cervical cancer; HeLa cell; *apoptin* gene; oncolytic adenovirus; autophagy; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(12): 1356-1361. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.12.003]

细胞自噬 (autophagy) 又称为 II 型细胞死亡, 它是一种细胞程序性死亡^[1]。自噬是真核生物细胞普遍存在的现象, 以细胞质内出现自噬体为特征, 一方面实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新, 同时自噬性死亡也可在细胞无法维持自身生存时发生^[2-5]。鉴于自噬的两面性, 自噬在肿瘤发生发展及肿瘤治疗中引起了极大的关注。

来源于鸡贫血病毒 (chicken anemia virus, CAV) 的凋亡素基因 (*apoptin*) 能够特异性诱导肝癌、淋巴瘤、胆管癌、黑色素瘤、乳腺癌、肺癌和结肠癌等人源肿瘤发生凋亡, 而对正常成纤维细胞、角质化细胞和平滑肌细胞等无影响^[6]。溶瘤病毒能够特异性识别肿瘤细胞并具备复制能力, 新复制的病毒颗粒可以在瘤内扩散, 通过直接溶瘤而杀伤肿瘤细胞, 也可散布至肿瘤的远处转移部位^[7]。溶瘤腺病毒可作为新一类抗癌剂, 并可在恶性细胞中选择性感染和复制, 同时保护正常细胞, 是极具潜力的抗肿瘤方法之一^[8-9]。李霄等^[10]构建的具有肿瘤特异启动子人端粒酶逆转录酶 (hTERT) 以及肿瘤细胞选择性凋亡诱导基因凋亡素的重组溶瘤腺病毒 Ad-Apoptin-hTERTp-E1a (ATV), hTERT 启动子在多数正常细胞中没有活性, 却在人的多种肿瘤细胞中表现出较高活性, 能够

高效性和特异性靶向肿瘤细胞^[11-12]。

本实验采用凋亡素构建的具有肿瘤特异性杀伤和肿瘤特异性复制能力的双特异性溶瘤腺病毒 ATV 与对照病毒 Ad-MOCK, 观察它们对宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用, 为宫颈癌的治疗与基础研究提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞株与主要试剂

溶瘤腺病毒 ATV 与人宫颈癌细胞株 HeLa 由军事医学科学院军事兽医研究所分子病毒学与免疫学实验室保存。RPMI-1640 培养液、胎牛血清购自 Hyclone 公司, 一抗抗体购自 CST 公司, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔 IgG 抗体购自中杉金桥, BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司, FITC 偶联 Annexin-V 凋亡试剂盒、PI/RNase 染色溶液购自 BD 公司; 水溶性四唑盐-1 (water soluble tetrazole salt, WST-1) 购自 Roche 公司, 单丹磺酰尸胺 (monodansyl cadaverine, MDC) 购自 Sigma 公司, UNIQ-10 柱式 TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒购自生工公司。

1.2 WST-1 法检测 ATV 感染对 HeLa 细胞增殖的影响
将处于对数生长期的人宫颈癌细胞 HeLa 以 $5 \times$

10³个/孔的密度培养于96孔板中,每孔培养体积为100 μl,于37℃、5% CO₂培养箱中培养12~24 h,然后用ATV 100 MOI分别感染HeLa细胞,同时间段接毒Ad-MOCK作为对照组,每组均设3个复孔。37℃、5% CO₂培养箱中分别培养6、12、24、48和72 h后,每孔加入WST-1,37℃、5% CO₂培养箱避光孵育90 min,对照孔同法处理。用酶标仪在490 nm测量每孔的光密度(D)值,按照公式计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率(%)=(对照孔D值-处理孔D值)/对照孔D值×100%。

1.3 流式细胞术检测ATV感染对HeLa细胞凋亡的影响

用6孔板制备HeLa单层细胞,细胞密度为3×10⁵个/孔,于37℃、5% CO₂培养箱中培养12~24 h后,用ATV 100 MOI感染HeLa细胞6、12、24、48和72 h,同时间段接毒Ad-MOCK作为对照组。采用FITC偶联Annexin-V凋亡试剂盒处理HeLa细胞,将细胞通过FACS流式细胞仪上样检测,分析各组细胞凋亡率。

1.4 流式细胞术检测ATV感染对HeLa细胞周期的影响

于6孔板中制备HeLa单层细胞(2.5×10⁵个/孔),37℃、5% CO₂培养箱中过夜培养,ATV 100 MOI感染HeLa细胞6、12、24、48和72 h,同时间段接毒Ad-MOCK作为对照组。到达作用时间后,将细胞悬液收集到15 ml离心管,PBS清洗细胞,离心,弃上清;逐滴加入预冷的乙醇,漩涡振荡细胞,4℃避光过夜。离心,弃上清。PBS清洗细胞后,染色液清洗细胞,PI/RNase染色液重悬细胞,转移至流式管,上机检测细胞周期情况。

1.5 Western blotting法检测ATV感染对HeLa细胞内自噬相关蛋白LC3、p62和mTOR表达水平的影响

用6孔板制备HeLa单层细胞,细胞密度为3×10⁵个/孔,于37℃、5% CO₂培养箱中培养12~24 h后,用ATV 100 MOI感染HeLa细胞6、12、24和48 h,同时间段接毒Ad-MOCK作为对照组。到达作用时间后,收集细胞至EP管,提取细胞蛋白质,采用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度并进行定量。每孔加100 μg蛋白样品,ddH₂O补至80 μl,加入5×上样缓冲液20 μl。样品行SDS-PAGE,并电转至硝酸纤维素膜,5%脱脂乳室温封闭,一抗孵育过夜。用1×TBST充分洗膜后,再在室温下与结合二抗,用1×TBST充分洗膜,曝光,显影。利用ImageJ软件进行灰度值分析,计算蛋白相对表达量。

1.6 MDC染色法检测ATV感染对HeLa细胞自噬水平的影响

将爬片置于6孔板中,制备HeLa单层细胞(2×10⁵个/孔),37℃、5% CO₂培养箱中过夜培养,ATV 100 MOI感染HeLa细胞6、12、24和48 h,同时间段接

毒Ad-MOCK作为对照组。到达作用时间后,弃培养基,PBS清洗两遍,加入MDC染色液(50 μmol/L)750 μl,37℃、5% CO₂培养箱中避光孵育15 min。弃工作液,PBS清洗两遍,加入无血清、无抗生素RPMI-1640培养基。荧光显微镜下观察(激发滤光片波长355 nm,阻断滤光片波长512 nm),每组统计100个细胞,通过统计含有点状结构的细胞占观察细胞的比例,计算自噬细胞的数量。

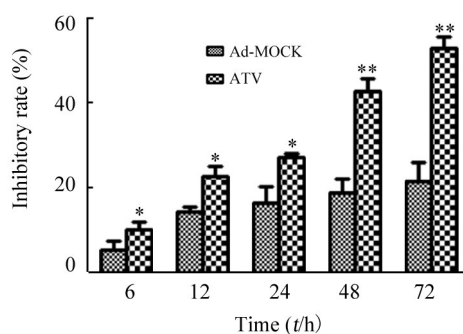
1.7 统计学处理

采用GraphPad Prism5统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATV抑制HeLa细胞的增殖

携带凋亡素基因的溶瘤腺病毒ATV可特异性杀伤HeLa细胞。WST-1法检测(图1)结果显示,在感染剂量一定的条件下,随着感染时间的延长,ATV对HeLa细胞的抑制率明显增加,ATV感染48 h时的增殖抑制率显著高于Ad-MOCK对照组[(42.904±3.969)% vs (17.837±3.255)%, $P < 0.01$],6、12、24、48和72 h的抑制率分别为(10.235±2.270)%、(22.710±3.535)%、(27.154±1.487)%、(42.904±3.969)%、(53.053±3.938)% ,具有时间效应关系。结果表明,携带凋亡素基因的溶瘤腺病毒ATV可抑制HeLa细胞增殖。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ad-MOCK group

图1 WST-1检测ATV对HeLa细胞增殖的抑制
Fig.1 Inhibition effect of ATV on proliferation of HeLa cells detected by WST-1

2.2 ATV感染提高HeLa细胞凋亡率

Annexin V可检测细胞早期凋亡,PI可结合凋亡中晚期的细胞,坏死细胞可以同时与Annexin V和PI结合显色。FACS流式细胞术结果(图2、3)显示,ATV感染48 h时,ATV诱导HeLa细胞的凋亡率明显高于Ad-MOCK对照组[(38.995±4.009)% vs (14.680±

1.174)%, $P<0.01$], 6、12、24、48 和 72 h 的凋亡率分别为 (8.358 ± 0.792)%、(19.990 ± 6.670)%、(23.800 ± 2.772)%、(38.995 ± 4.009)%、(45.315 ± 5.013)%。随着作用时间延长凋亡率逐步增加, 72 h 凋亡率达最高。

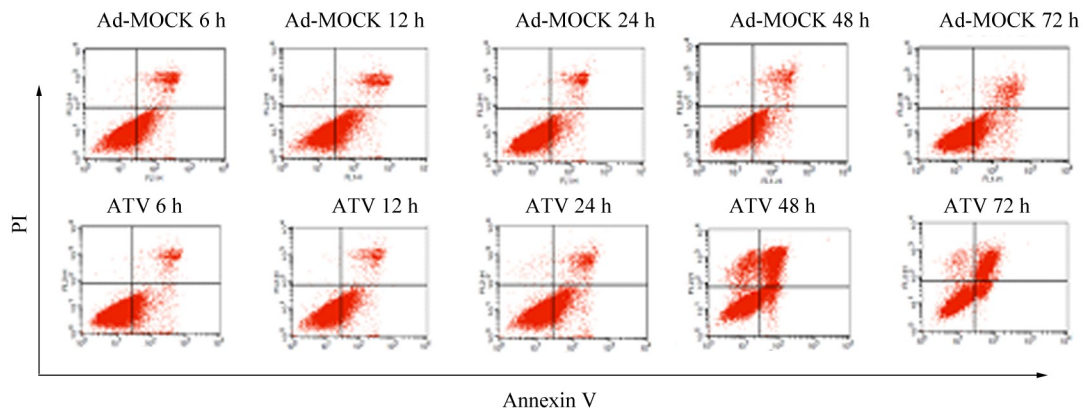
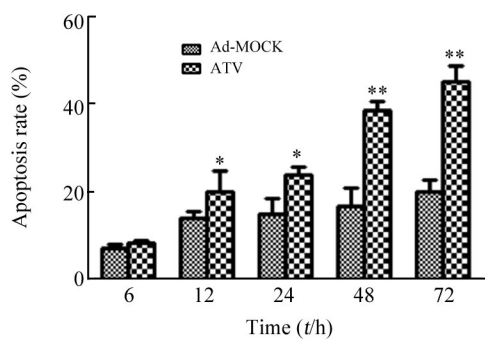


图2 ATV 对 HeLa 细胞凋亡和坏死的影响
Fig.2 Effects of ATV on apoptosis and necrosis of HeLa cells



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs Ad-MOCK group

图3 ATV 感染提高 HeLa 细胞的凋亡率
Fig.3 ATV infection improved the apoptosis rate of HeLa cells

2.3 ATV 感染阻滞 HeLa 细胞周期于 S 期

流式细胞术检测结果(图4)显示,随着 ATV 作用

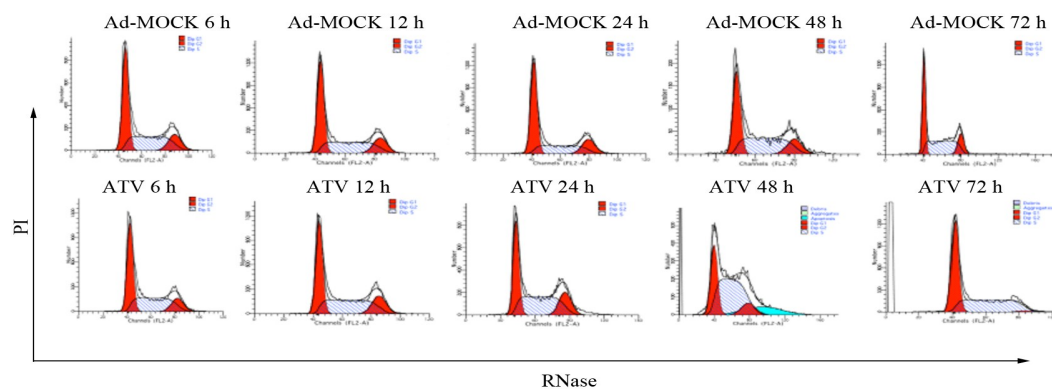
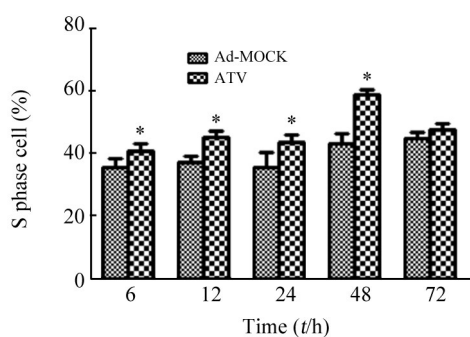


图4 ATV 对 HeLa 细胞的细胞周期影响
Fig.4 Effect of ATV on cell cycle of HeLa cells

时间的延长, S 期细胞逐渐增多, S 期延长; 48 h 阻滞达到最强, 显著高于 Ad-MOCK 感染组 [(58.490 ± 2.447)% vs (43.235 ± 4.419)%, $P<0.05$, 图5], 说明 ATV 引发的自噬阻滞在 HeLa 细胞 S 期, 延缓了完整的细胞周期, ATV 可能引发的凋亡与自噬参与了细胞周期阻滞反应, 从而影响 HeLa 细胞的增殖。

2.4 ATV 感染后 HeLa 细胞内自噬相关蛋白的表达量变化

Western blotting 检测结果显示(图6A), 与对照组相比, LC3 蛋白表达量在 6、12 h 逐渐增加, 12 h 达到最大值 (0.368 ± 0.010, $P<0.01$), 24 h 表达量最低 (0.106 ± 0.023, $P<0.01$); 在自噬通路中, 与 LC3 匹配的 P62 蛋白在 24 h 出现最高表达量 (6.004 ± 1.423, $P<0.01$); mTOR 蛋白的表达量则随着作用时间的延长逐渐降低 (0.042 ± 0.010, 48 h, $P<0.01$)。结果说明 ATV 感染细胞后, 促进了 HeLa 细胞早期自噬的发生。



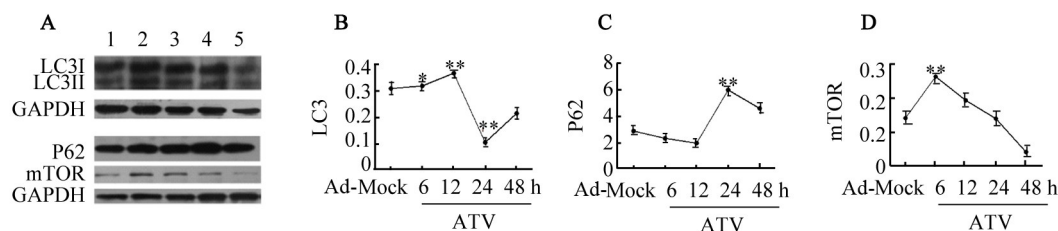
* $P < 0.05$ vs Ad-MOCK group

图5 ATV对HeLa细胞S期的影响

Fig.5 Effect of ATV on S phase of HeLa cells

2.5 ATV感染后HeLa细胞自噬水平的变化

荧光显微镜下可见,ATV感染后的HeLa细胞核周区域MDC阳性染色呈点状结构的自噬小体。随着ATV作用时间延长,MDC染色自噬小体的数目逐渐增多。与同时间段Ad-MOCK组相比(图7),每组统计100个细胞,点状聚集MDC荧光的细胞中(图8),6、12 h自噬小体的数目显著增多[6 h: (28.000 ± 2.828) vs (8.500 ± 2.121) 个, 12 h: (37.000 ± 4.243) vs (14.000 ± 1.414) 个, 均 $P < 0.01$],说明ATV感染增强了HeLa细胞自噬水平。但是感染24 h时自噬小体数目减少[(12.000 ± 2.828) vs (17.000 ± 1.414) , $P < 0.01$],表明ATV感染24 h后细胞死亡形式可能从自噬转移为凋亡,抑制了自噬发生,导致自噬小体数目的减少。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ad-MOCK group

1: Ad-MOCK; 2: ATV 6 h; 3: ATV 12 h; 4: ATV 24 h; 5: ATV 48 h

B, C, D: Effect of ATV on expression of LC3, P62, mTOR

图6 ATV感染HeLa细胞后对LC3、P62和mTOR蛋白表达的影响变化

Fig.6 Effect of ATV on the expressions of LC3, P62 and mTOR protein in HeLa cells

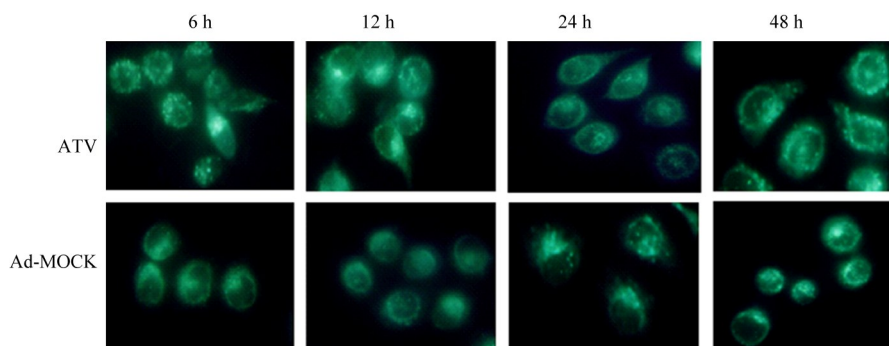


图7 MDC示踪HeLa细胞自噬小体($\times 50$)

Fig.7 MDC traced autophagosomes of HeLa cells ($\times 50$)

3 讨论

凋亡素基因能够诱导人的转化细胞及恶性肿瘤细胞发生凋亡,而对人的正常二倍体细胞如上皮细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞等没有凋亡诱导的功能。肿瘤细胞对凋亡素诱导的凋亡很敏感,然而正常细胞对凋亡素却不敏感,这可能于凋亡素涉及多种凋亡相关信号通路有关^[13-15]。目前,基因治疗和基因治疗药物及溶瘤病毒的研究已成为肿瘤治疗的热

点,溶瘤病毒通过感染的方式进入肿瘤细胞,对肿瘤细胞有细胞毒作用^[16]。

实验表明,在感染剂量一定的条件下,ATV对HeLa细胞的抑制具有时间效应关系。本研究结果显示双特异性溶瘤腺病毒ATV可以诱导肿瘤细胞早期凋亡与中晚期凋亡,以此抑制肿瘤细胞增殖。ATV诱导肿瘤细胞凋亡,提高了肿瘤细胞对溶瘤腺病毒的敏感性^[16],同时间段细胞增殖抑制率高于细胞凋亡率,除了溶瘤腺病毒ATV诱导细胞凋亡外,怀疑自噬

可能参与其中。

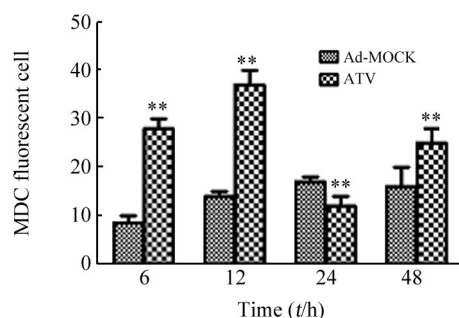


图8 ATV组与Ad-MOCK组点状聚集MDC荧光细胞数
Fig.8 Number of the pointlike distribution MDC fluorescent cells in ATV and Ad-MOCK

研究^[17]表明:一方面,自噬作为一种保护机制使肿瘤细胞避免受到低营养电离辐射和化疗所致的损伤而持续生存;另一方面,过度的自我吞噬效应会引起自噬性死亡,从而抑制肿瘤的发生发展。LC3是哺乳动物细胞中酵母ATG8基因的同源物,能靶向定位于自噬体膜,参与自噬的形成,LC3分为I型和II型,I型常规表达、游离存在于胞质中,而LC3 II始终稳定地保留在自噬体膜上直到与溶酶体融合,其含量与自噬泡数量成正比^[18]。本研究发现,ATV感染后在HeLa细胞中LC3 II蛋白随着作用时间延长,12 h蛋白表达水平明显升高,表明自噬活性或者发生自噬的潜能明显上升,同时,自噬小体的数目逐渐增多,这种改变可能参与了宫颈癌的发生;而ATV感染24 h后,LC3 II表达相比于对照组降低,点状聚集MDC荧光细胞数减少,结果证明,细胞死亡形式可能从自噬转移为凋亡,抑制了细胞自噬发生,导致自噬小体数目的减少,细胞周期的各个时相均存在检验点,ATV可能引发的凋亡与自噬参与了细胞周期阻滞反应,阻滞集中在HeLa细胞S期,ATV感染48 h阻滞到达最强,进而影响HeLa细胞的增殖。

综上所述,针对宫颈癌HeLa细胞,ATV能引起细胞凋亡和自噬,细胞死亡的形式以凋亡为主体,同时伴随着自噬进而可能会引起肿瘤细胞程序性死亡,对于临床肿瘤治疗具有参考价值。

[参考文献]

- [1] 褚静, 荆亚茹, 贾敏. TRAIL及其受体DR5、DcR1在宫颈癌中的表达[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(9):1749-1751.
- [2] JIN S M, JANG H W, SOHN S Y, et al. Role of autophagy in the resistance to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in papillary and anaplastic thyroid cancer cells [J]. Endocrine, 2014, 45(2): 256-262. DOI:10.1007/s12020-013-9997-8.
- [3] WHITE E, DIPAOLA R S. The double-edged sword of autophagy

modulation in cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(17): 5308-5316. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-5023.

- [4] HE W, WANG Q, XU J, et al. Attenuation of TNFSF10/TRAIL-induced apoptosis by an autophagic survival pathway involving TRAF2- and RIPK1/RIP1-mediated MAPK8/JNK activation[J]. Autophagy, 2012, 8(12):1811-1821. DOI:10.4161/auto.22145.
- [5] NIU T K, CHENG Y, REN X, et al. Interaction of Beclin 1 with survivin regulates sensitivity of human glioma cells to TRAIL-induced apoptosis[J]. FEBS Letters, 2010, 584(16): 3519-3524. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-5023.
- [6] ORO C, JANS D A. The tumour specific pro-apoptotic factor apoptin (Vp3) from chicken anaemia virus[J]. Curr Drug Targets, 2004, 5(2): 179-190. DOI: 10.2174/1389450043490631.
- [7] SU Z, YANG Z, XU Y, et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis[J/OL]. Mol Cance, 2015, 14(1): 48[2017-07-06]. <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-015-0321-5>. DOI: 10.1186/s12943-015-0321-5.
- [8] LEUNG E Y, WEIGERT M, WALTON J B, et al. Role of innate immune responses in the effectiveness of oncolytic adenovirus as an anticancer agent[J/OL]. Lancet, 2017, 389: S61[2017-07-06]. https://www.researchgate.net/publication/314251057_Role_of_innate_immune_responses_in_the_effectiveness_of_oncolytic_adenovirus_as_an_anticancer_agent. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30457-9.
- [9] 杨冬梅, 方先龙, 杨珂. 疏利达嗪联合溶瘤腺病毒ZD55-TRAIL对HeLa细胞抑制作用及其机制探讨[J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(5): 595-601. DOI: 10.11844/cjcb.2014.05.0378.
- [10] 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]. 吉林大学, 2009.
- [11] 郭海宁, 张萍, 韩继成, 等. 转瓶培养与生物反应器微载体培养重组腺病毒的比较[J]. 中国病原生物学杂志, 2016(1):1-4. DOI: 10.13350/j.cjpb.160101.
- [12] LOW K C, TERGAONKAR V. Telomerase: central regulator of all of the hallmarks of cancer[J]. Trends Biochem Sci, 2013, 38(9): 426-434. DOI: 10.1016/j.tibs.2013.07.001.
- [13] PAL P, AGARWAL K, RAI A, et al. Apoptotic activity of chicken anaemia virus VP3 gene cloned in replicase based eukaryotic vector[J]. J Microbio Biotech & Food Sci, 2013, 3(3): 240-242.
- [14] YANG J, WANG J, ZUO Y, et al. Molecularly modified VP3 (30-121) induces apoptosis in human bladder cancer (EJ) cells but not in normal (3T3) cells[J]. Cell Biol Int, 2012, 36(11):1037-1042. DOI: 10.1042/CBI20110390.
- [15] YUAN L, ZHANG L, DONG X, et al. Apoptin selectively induces the apoptosis of tumor cells by suppressing the transcription of HSP70[J]. Tumour Biol, 2013, 34(1): 577-585. DOI: 10.1007/s13277-012-0585-y.
- [16] 杨景文. 5-Fu诱导人结肠癌HCT-116细胞自噬与凋亡的关系及机制研究[D]. 天津医科大学, 2013.
- [17] MATHEW R, KONGARA S, BEAUDOIN B, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability[J]. Genes Dev, 2007, 21(11):1367-1381. DOI: 10.1101/gad.1545107.
- [18] PENG W, TONG D U, ZHANG Z, et al. Knockdown of autophagy-related gene LC3 enhances the sensitivity of HepG2 cells to epirubicin[J]. Exp Ther Med, 2015, 9(4): 1271-1276. DOI: 10.3892/etm.2015.2266.

[收稿日期] 2017-09-05

[修回日期] 2017-10-27

[本文编辑] 黄静怡