

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.02.004

· 基础研究 ·

重组诱导性质粒 Egr1-XPO4 的构建及其与 5-FU 联合对肝癌细胞 SK-Hep1 的协同抑制作用

吴楠^{1,2}, 黄静¹, 陈阳³, 刘侃¹, 刘好¹, 王晓梅¹(1. 深圳大学 医学部, 广东 深圳 518000; 2. 深圳市南山区疾病预防控制中心, 广东 深圳 518000; 3. 深圳中生健康产业集团, 广东 深圳 518000)

[摘要] **目的:** 构建重组诱导性质粒 Egr1-XPO4, 探讨其与 5-FU 联合对肝癌细胞 SK-Hep1 的协同抑制作用。**方法:** 将 XPO4 基因插入带诱导性启动子 Egr1 的质粒载体中, 构建 Egr1-XPO4 重组质粒。将 Egr1-XPO4 质粒转染肝癌细胞 SK-Hep1 并经化疗药物 5-FU 诱导, 采用 Western blotting 检测转染细胞中 XPO4 蛋白表达水平, CCK 法检测转染诱导后 SK-Hep1 细胞的增殖水平, Annexin V-FITC/PI 流式细胞仪检测 SK-Hep1 细胞凋亡情况。动物实验观察 Egr1-XPO4 质粒联合 5-FU 对裸鼠移植瘤的治疗效果。**结果:** 成功构建携 XPO4 基因和启动子 Egr1 的重组诱导性质粒 Egr1-XPO4, 重组质粒转染 SK-Hep1 细胞并经 5-FU 诱导后, 细胞中 XPO4 蛋白表达量明显增加, 且与 5-FU 的质量浓度明显依赖。Egr1-XPO4 转染联合 5-FU 诱导对 SK-Hep1 细胞增殖抑制明显强于单纯转染或 5-FU 诱导 ($P < 0.05$), 同时导致 SK-Hep1 细胞的早期凋亡率显著高于单纯转染或诱导 ($P < 0.05$)。以 Egr1-XPO4 质粒联合 5-FU 治疗后, 裸鼠肝癌移植瘤的体积明显小于 Egr1-XPO4 或 5-FU 单独治疗 ($P < 0.05$)。**结论:** 重组诱导性质粒 Egr1-XPO4 联合 5-FU 对肝癌细胞 SK-Hep1 产生协同抑制作用。

[关键词] 肝癌; SK-Hep1 细胞; XPO4 基因; Egr1 启动子; 5-氟尿嘧啶; 协同作用

[中图分类号] R735.7; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)02-0132-05

Construction of recombinant plasmids Egr1-XPO4 and its synergic inhibition with 5-FU against hepatocarcinoma SK-Hep1 cells

WU Nan^{1,2}, HUANG Jing¹, CHEN Yang³, LIU Kan¹, LIU Hao¹, WANG Xiaomei¹(1. Department of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen 518000, Guangdong, China; 2. Disease Control and Prevention Center of Nanshan District, Shenzhen 518000, Guangdong, China; 3. China Life Health Industry Group, Shenzhen 518000, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To construct recombinant plasmid Egr1-XPO4 and evaluate its synergic inhibition with 5-FU against hepatocarcinoma SK-Hep1 cells. **Methods:** The XPO4 gene was inserted into vector carrying promoter Egr1 to construct a new recombinant vector, Egr1-XPO4, which was then transfected into human hepatocarcinoma cell line SK-Hep1 and sensitized with chemotherapeutic drug 5-FU. Western blotting was adopted to examine the protein expression of XPO4; CCK assay was used to detect SK-Hep1 cell proliferation after transfection, and Flow Cytometry with Annexin V-FITC/PI staining was used to detect the apoptosis of SK-Hep1 cells. SK-Hep1 cell xenograft model was constructed on nude mice, and the effect of Egr1-XPO4 in combination with 5-FU on the growth of xenograft was observed. **Results:** The recombinant plasmid Egr1-XPO4 was successfully constructed. With the sensitization of 5-FU, the expression of XPO4 protein in SK-Hep1 cells was significantly elevated after Egr1-XPO4 transfection, and the elevation was in a 5-FU dose-depend manner. The combined treatment of Egr1-XPO4 and 5-FU produced a significantly stronger inhibition against SK-Hep1 cell proliferation and greatly promoted apoptosis of SK-Hep1 cells compared with 5-FU or pEgr-XPO4 mono-treatment group (all $P < 0.05$). And *in vivo* antitumor experiment showed that the tumor volume in Egr1-XPO4 + 5-FU treatment group was significantly smaller than that of Egr1-XPO4 or 5-FU mono-treatment group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The recombinant plasmid Egr1-XPO4 in combination with 5-FU could exertsynergic inhibition against hepatocarcinoma SK-Hep1 cells.

[Key words] hepatocarcinoma; SK-Hep1 cell; XPO4 gene; Egr1 promoter; 5-FU; synergic effect

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(2): 132-136. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.02.004]

[基金项目] 深圳国际合作研究资助项目(No.GJHZ20170313111237888)。Project supported by the Shenzhen International Cooperation Research Project (No.GJHZ20170313111237888)

[作者简介] 吴楠(1980-), 男, 博士, 副教授, 主要从事肿瘤免疫及基因治疗的研究, E-mail: wnwunan@163.com

[通信作者] 王晓梅(WANG Xiaomei, corresponding author), 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤生物治疗的研究, E-mail: xmwang@szu.edu.cn

肝癌居全世界恶性肿瘤病死率第2位^[1]。原发性肝细胞癌在肝癌中发病率、致死率最高^[2-3]。化疗诱导基因治疗方法^[4]是将具有诱导性启动子(目前研究较多的是Egr-1启动子)与肿瘤杀伤基因相连,诱导性启动子能被化疗药物(如5-FU)产生的氧自由基启动,诱导下游肿瘤杀伤基因高效表达,从而对肿瘤起到协同杀伤作用^[5-7]。XPO4基因是细胞核转运因子家族成员,可从细胞核中输出Smad3、Eif5a^[8-9]。XPO4在肝细胞中的去除会引起细胞核Smad3的增加,癌变概率增加^[10]。有研究^[11]表明,肝癌中XPO4的表达降低与肿瘤大小及病理分级相关,XPO4的缺失提示预后差,XPO4可以作为一个独立的抑癌基因。本研究构建Egr1-XPO4表达载体,进行化疗诱导基因治疗肝癌的实验研究,观察化疗和基因对肝癌协同作用的疗效。

1 材料与方法

1.1 实验细胞与动物

人肝癌细胞株SK-Hep1(XPO4基因完全缺失)由香港中文大学胡宝光博士惠赠,复苏、培养至一定条件下进行实验。BALB/c裸鼠24只,雄性,体质量21~23 g,购自广东省医学实验动物中心,合格动物证号:SCXK(粤)2017-0025。自由养1周后开始动物实验。

1.2 主要试剂和仪器

pcDNA3.1-Egr1质粒由汕头大学赠送,携XPO4基因的质粒pCR4-TOPO-XPO4购自Invitrogen公司。大肠埃希菌株DH5a由本所保存。Wizard RSV Gel and PCR Clean-Up system试剂盒购自Promega公司,T4 DNA连接酶、PrimeSTAR HS DNA Polymerase、dNTP mixture试剂盒、限制性内切酶Kpn I、EcoR V、Xba I试剂盒购自TaKaRa公司,无内毒素质粒提取试剂盒购自Omega公司,Lipofectamine3000购自Invitrogen公司,XPO4一抗购自Thermo公司, β -actin一抗购自北京博奥森公司,羊抗兔二抗购自武汉博士德公司。

1.3 构建Egr1-XPO4载体

XPO4基因上游引物为5'-GGGGGTACCATG-GTCAATAATGAACAA-3',下游引物为5'-GGG GATATCTTATTTTACACAAAGGAG-3'。以PCR4-TOPO-XPO4为模板,PCR扩增XPO4基因。PCR产物凝胶电泳,切下目的条带,进而进行DNA凝胶回收。酶切pcDNA3.1-Egr1质粒和目的基因XPO4后,16℃连接过夜。转化大肠埃希菌DH5a,提取无内毒素质粒。

1.4 Egr1-XPO4质粒转染SK-Hep-1细胞

将SK-Hep1细胞接种至6孔板,每孔2 ml,细胞密度为 2×10^5 个/ml,12 h后进行质粒转染,Egr1-

XPO4质粒转染SK-Hep-1细胞,按照Lipofectamine3000转染试剂的说明书进行。转染24 h后,各剂量组细胞中分别加入梯度浓度5-FU(0、2、5、10、20 μ g/ml)进行诱导。

1.5 Western blotting检测XPO4蛋白表达水平

收集细胞进行蛋白提取,用改良型Branford法蛋白浓度检测试剂盒对所提蛋白进行浓度检测。取20 μ g蛋白和4 μ l 2 \times SDS上样缓冲液混合均匀,100℃变性10 min;上样,12% SDS-PAGE分离后转至PVDF膜上,用5%脱脂牛奶封闭1 h;PBS洗膜;PBS洗膜后分别加入一抗,在4℃下孵育过夜,PBS洗膜;加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗孵育0.5 h,PBS洗膜,用ECL化学发光进行显色。以 β -actin为内参蛋白,后采用Image J图像分析软件进行灰度值分析。

1.6 CCK-8法检测SK-Hep-1细胞转染前后增殖水平的变化

将转染诱导后SK-Hep1细胞接种于96孔培养板中,每孔100 μ l,细胞密度为 2×10^4 个/ml。向96孔板每个孔中加样100 μ l混合液(90 μ l完全培养基+10 μ l CCK-8试剂),37℃下孵育2 h,然后用酶标仪在450 nm波长处检测每孔的光密度(D)值,连续5 d进行细胞增殖水平检测。

1.7 Annexin V-FITC/PI染色流式术检测SK-Hep-1细胞凋亡情况

将转染诱导后SK-Hep1细胞接种至6孔板中培养。收集细胞至1.5 ml EP管中,加入500 μ l的Binding Buffer悬浮细胞,向其内加入5 μ l Annexin V-FITC,再加入5 μ l Propidium Iodide,轻轻吹打混匀。室温避光反应10 min,再于1 h内进行Annexin V-FITC/PI染色流式仪分析。

1.8 动物实验观察裸鼠肿瘤的生长情况

每只BALB/c-nu裸鼠右后肢皮下接种SK-Hep1细胞(5×10^6 个/ml)0.2 ml,待肿瘤长至直径约5 mm时以数字表法随机分为4组(PBS组、5-FU组、Egr1-XPO4组和Egr1-XPO4+5-FU组),每组6只。电转染方法介导质粒体内治疗(20 μ g质粒/次,电转参数:电压200 V,脉冲20 ms,间隙20 ms),同时腹腔注射5-FU(40 mg/kg),每7 d进行1次治疗,连续5次。动态观察肿瘤生长情况,测量肿瘤体积,第28天处死。肿瘤体积=长 \times 宽 \times 宽/2。

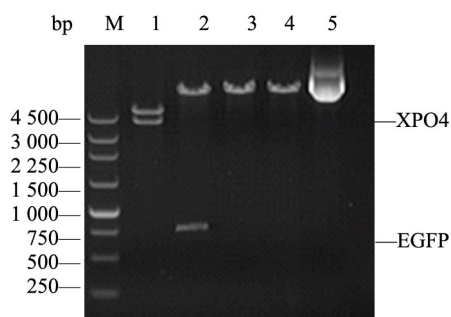
1.9 统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件,计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组载体酶切鉴定表明 XPO4 基因正确插入载体中

酶切 Egr1-XPO4-EGFP 质粒, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物, 显示 *Kpn* I、*Xba* I 双酶切后出现两条带, 大小分别与空质粒和 XPO4 相符; *Ecor* V、*Xba* I 双酶切后, 也可见两条带, 大小分别与 Egr1-XPO4 和 EGFP 相符(图 1)。结果表明, XPO4 基因正确插入载体中。



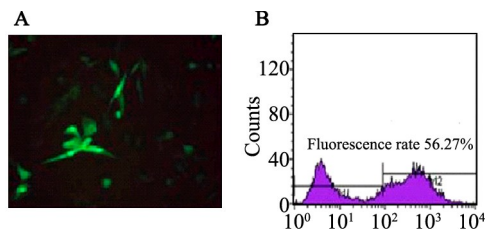
M: 250 bp DNA Ladder; 1: *Kpn* I and *Xba* I Double enzyme cutting; 2: *Ecor* V and *Xba* I Double enzyme cutting; 3: *Ecor* V single enzyme cutting; 4: *Xba* I single enzyme cutting; 5: Egr1-XPO4-EGFP plasmid

图 1 Egr1-XPO4-EGFP 质粒鉴定

Fig 1 Identification of Egr1-XPO4-EGFP plasmids

2.2 重组质粒转染 SK-Hep1 细胞后荧光表达效率明显提高

重组质粒转染 SK-Hep1 细胞后, 采用化疗药物 5-FU (5 μ g/ml) 进行诱导, 48 h 后在荧光显微镜下观察到绿色荧光的细胞(图 2A), 流式细胞仪检测荧光表达率明显提高 [(56.06 \pm 0.33)% vs (42.59 \pm 0.55)%], $P < 0.05$, 图 2B)。



A: Representative photos of EGFP expression in SK-Hep1 cells (Fluorescent staining, $\times 20$);

B: Fluorescence rate examination by flow cytometry

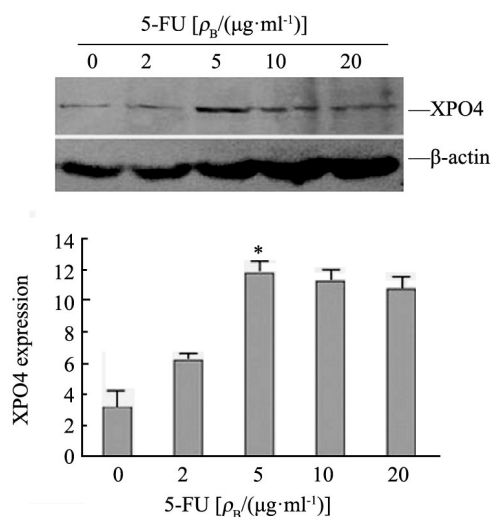
图 2 XPO4 基因转染 SK-Hep1 细胞的效率

Fig. 2 Efficiency of SK-Hep1 cells transfected by XPO4 gene

2.3 重组质粒转染 SK-Hep1 细胞后随着 5-FU 质量浓度的增加提高 XPO4 蛋白表达水平

重组质粒转染 SK-Hep1 细胞 48h, 并经 0、2、5、

10、20 μ g/ml 5-FU 的诱导, Western blotting 检测结果(图 3)显示, 随着 5-FU 诱导质量浓度的增加, XPO4 蛋白的表达水平相应提高, 5 μ g/ml 5-FU 诱导效果达到最高 ($P < 0.05$), 继续增加质量浓度, 蛋白表达量未见增加。



* $P < 0.05$ vs 0 or 2 μ g/ml group

图 3 Western blotting 检测 XPO4 蛋白表达水平的变化

Fig. 3 Changes in the expression of XPO4 protein by Western blotting

2.4 质粒 Egr1-XPO4 与 5-FU 联合作用明显抑制 SK-Hep1 细胞体外增殖

转染诱导 SK-Hep1 细胞 24 h 后, CCK-8 检测结果(图 4)显示, 与 SK-Hep1 对照组相比, Egr1-XPO4、5-FU (5 μ g/ml)、Egr1-XPO4+5-FU (5 μ g/ml) 组的 SK-Hep1 细胞增殖水平均明显降低 ($P < 0.05$)。质粒 Egr1-XPO4 与 5-FU 联合作用后, 进一步抑制 SK-Hep1 细胞增殖 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

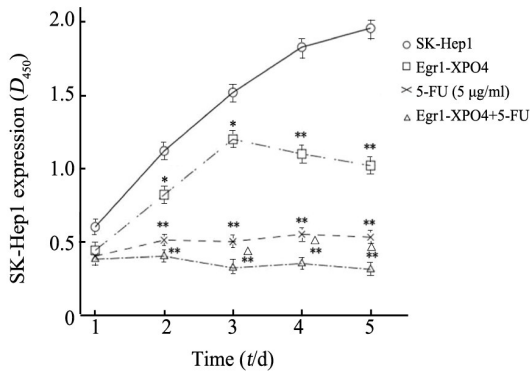
2.5 质粒 Egr1-XPO4 与 5-FU 联合作用明显增加 SK-Hep1 细胞早期凋亡率

转染质粒至 SK-Hep1 细胞 48 h 后, Annexin V-FITC/PI 检测结果(图 5)显示, Egr1-XPO4+5-FU (5 μ g/ml) 组、5-FU (5 μ g/ml) 组、Egr1-XPO4 组早期凋亡率均高于 SK-Hep1 细胞对照组 [(42.96 \pm 0.72)%、(34.92 \pm 0.83)%、(19.73 \pm 1.77)% vs (7.64 \pm 1.21)%], $P < 0.01$ 。而 Egr1-XPO4+5-FU 组早期凋亡率分别高于 5-FU 组 ($P < 0.05$) 和 Egr1-XPO4 组 ($P < 0.01$)。

2.6 质粒 Egr1-XPO4 与 5-FU 联合作用明显抑制荷瘤小鼠肿瘤的增长

各组荷瘤鼠每 7 d 进行 1 次治疗, 连续 5 次, 观察肿瘤生长情况。治疗 4 周后, 5-FU (40 mg/kg) 组、Egr1-XPO4 质粒组、Egr1-XPO4+5-FU (40 mg/kg) 组肿瘤体积均小于 PBS 对照组 [(76.38 \pm 5.48)、

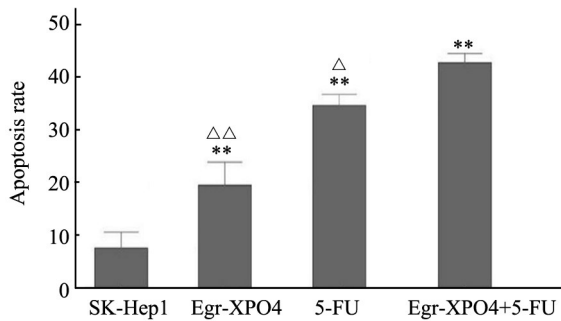
(94.92 ± 6.83)、(61.86 ± 5.31) vs (120.30 ± 5.32) mm^3 , 均 $P < 0.01$]。而 Egr1-XPO4+5-FU 组肿瘤体积分别小于 5-FU 组 ($P < 0.05$) 和 Egr1-XPO4 组 ($P < 0.01$)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs SK-Hep1 group; $\Delta P < 0.05$ vs 5-FU group

图4 CCK-8法检测SK-Hep1细胞增殖情况

Fig. 4 Proliferation of SK-Hep1 cells by CCK-8 assay

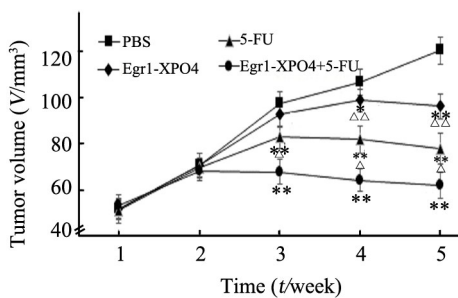


** $P < 0.01$ vs SK-Hep1 group;

$\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Egr1-XPO4+5-FU group

图5 Annexin V-FITC/PI检测SK-Hep1细胞凋亡情况

Fig.5 Detection of apoptosis of SK-Hep1 cells by Annexin V-FITC/PI



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PBS group;

$\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Egr1-XPO4+5-FU group

图6 各组裸鼠治疗后肿瘤体积生长情况

Fig. 6 Tumor growth in nude mice of each treatment group

3 讨论

肿瘤发生涉及复杂的机制,常与其相关基因的突变积累有关^[12]。*XPO4*是一种重要的抑癌基因,检

索乳腺癌中基因拷贝数变化的数据库时,发现在30%以上的肿瘤中*XPO4*基因缺失。*XPO4*属于importin β 家族,介导eIF-5A和Smad 3核输出,从而参与TGF- β 信号通路。*XPO4*在肝细胞中的去除会引起细胞核Smad3的增加,并伴随有TGF- β 靶基因的上调^[13-14]。对TGF- β 的这种影响可以很好地解释去除*XPO4*后癌变的增加,这说明当*XPO4*基因缺失导致TGF- β 信号转导通路的紊乱,可使细胞逃避TGF- β 介导的生长抑制效应,导致多种肿瘤发生。

利用放射或化疗诱导特定启动子,可带动下流抑癌基因的表达^[15-16],从而达到对肿瘤的双重杀伤效果,这种疗法是肿瘤治疗的一个新的方向;在一些研究中这种疗法的有效性得到证实^[17-20]。本实验中利用低剂量的5-FU诱导Egr1启动子,带动抑癌基因*XPO4*表达,进而杀伤肿瘤细胞。根据Egr1的特性^[21-22],本实验构建了Egr1-XPO4表达型载体。载体经PCR鉴定、酶切鉴定,与预期相符合。为研究Egr1调控抑癌基因*XPO4*对肝癌细胞进行化疗-基因治疗奠定了基础。

通过荧光显微镜观察和流式细胞仪的分析发现,不同质量浓度的5-FU,均能够诱导Egr1-EGFP表达,产生绿色荧光,随着5-FU质量浓度的增加,荧光强度不断增强。当5-FU浓度为5 $\mu\text{g/ml}$ 时,荧光强度最大。说明经过5-FU的作用后,激活了Egr1启动子,引起了EGFP基因的表达。通过Western blotting分析发现,不同质量浓度的5-FU,均能够诱导Egr1-XPO4质粒中*XPO4*蛋白表达。随着5-FU质量浓度的增加,*XPO4*蛋白表达量不断增强。当5-FU浓度为5 $\mu\text{g/ml}$ 时,表达量最大;随着5-FU质量进一步增大,表达量未见增加。因此5 $\mu\text{g/ml}$ 可能是5-FU诱导激活Egr1启动子的最佳剂量。

本实验为验证*XPO4*基因的抑癌作用,体外转染Egr1-XPO4质粒至肝癌SK-Hep1细胞。检测发现,Egr1-XPO4质粒对肿瘤细胞产生一定的抑制作用,肿瘤细胞存活率降低和早期凋亡率增加;而与5-FU联合作用后,产生了更强的抑制效果。进一步的体内实验发现,Egr1-XPO4治疗组肿瘤体积小于对照组,联合5-FU后,肿瘤生长进一步受到抑制。

综上所述,化疗药物5-FU联合Egr1-XPO4新型表达载体,可协同杀伤肝癌细胞。表明化疗与基因治疗结合可降低化疗药物的使用剂量,避免产生耐药性,同时又能够诱导基因协同治疗,显示了化疗联合基因治疗的潜在优势,为肿瘤治疗提供了新的理论依据。

[参考文献]

[1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics,

- 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (2): 87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- [2] CONG W M, BU H, CHEN J, et al. Practice guidelines for the pathological diagnosis of primary liver cancer: 2015 update[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(42): 9279-9287. DOI: 10.3748/wjg.v22.i42.9279.
- [3] CHEN W Q, ZHENG R S, ZHANG S W. Liver cancer incidence and mortality in China, 2009[J]. Chin J Cancer, 2013, 32(2): 162-169. DOI:10.5732/cjc.013.10027.
- [4] MEZHIR J J, SMITH K D, POSNER M C, et al. Ionizing radiation: a genetic switch for cancer therapy[J]. Cancer Gene Ther, 2006, 13 (1): 1-6. DOI: 10.1038/sj.cgt.7700879.
- [5] EHRENGRUBER M U, MUHLEBACH S G, SÖHRMAN S, et al. Modulation of early growth response (EGR) transcription factor-dependent gene expression by using recombinant adenovirus[J]. Gene, 2000, 258(2): 63-69. DOI: 10.1016/S0378-1119(00)00445-5.
- [6] GERALD T. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1[J]. Cellular Physiol, 2002, 193(4): 287-292. DOI: 10.1002/jcp.10178.
- [7] WAGNER M, SCHMELZ K, DÖRKEN B, et al. Transcriptional regulation of human survivin by early growth response Egr-1 transcription factor[J]. Int J Cancer, 2008, 122(6): 1278-1287. DOI: 10.1002/ijc.23183.
- [8] KURISAKI A, KURISAKI K, KOWANETZ M, et al. The Mechanism of nuclear export of smad3 involves exportin 4 and ran[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(4): 1318-1332. DOI: 10.1128/MCB.26.4.1318-1332.2006.
- [9] GONTAN C, GÜTTLER T, ENGELEN E, et al. Exportin 4 mediates a novel nuclear import pathway for Sox family transcription factors [J]. J Cell Biol, 2009, 185(1): 27-34. DOI: 10.1083/jcb.200810106.
- [10] ZHANG H, WEI S, NING S, et al. Evaluation of TGF β , XPO4, eIF5A2 and ANGPTL4 as biomarkers in HCC[J]. Exp Ther Med, 2013, 5(1): 119-127. DOI: 10.3892/etm.2012.750.
- [11] LIANG X T, PAN K, CHEN M S, et al. Decreased expression of XPO4 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(3): 544-549. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06434.x.
- [12] ARAVALLI R N, CRESSMAN E N, STEER C J. Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update[J]. Arch Toxicol, 2013, 87(2): 227-47. DOI: 10.1007/s00204-012-0931-2.
- [13] ZHANG F, FAN Y C, MU N N, et al. Exportin 4 gene expression and DNA promoter methylation status in chronic hepatitis B virus infection [J]. Viral Hepat, 2014, 21(4): 241-250. DOI: 10.1111/jvh.12136.
- [14] ZAIN S M, MOHAMED Z, PIRMOHAMED M, et al. Copy number variation in exportin-4 (XPO4) gene and its association with histological severity of non-alcoholic fatty liver disease[J/OL]. Sci Rep, 2015, 5: 13306[2017-11-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4543956/>. DOI: 10.1038/srep13306.
- [15] LI Z L, LIANG S, WANG Z C, et al. Expression of Smac induced by the Egr1 promoter enhances the radiosensitivity of breast cancer cells[J]. Cancer Gene Ther, 2014, 21(4): 142-149. DOI: 10.1038/cgt.2014.9.
- [16] TANEJA S S. Prospective randomized phase 2 trial of intensity modulated radiation therapy with or without oncolytic adenovirus-mediated cytotoxic gene therapy in intermediate-risk prostate cancer [J]. Urol, 2015, 193(3): 847-854. DOI: 10.1016/j.juro.2014.12.076.
- [17] MEZHIR J J, SMITH K D, POSNER M C, et al. Ionizing radiation: a genetic switch for cancer therapy[J]. Cancer Gene Ther, 2006, 13 (1): 1-6. DOI: 10.1038/sj.cgt.7700879.
- [18] LIN M, HUANG J, SHI Y, et al. Influential factors and synergies for radiation-gene therapy on cancer[J/OL]. Anal Cell Pathol, 2015, 2015: 313145[2017-11-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4689877/>. DOI: 10.1155/2015/313145.
- [19] LI L, ZHANG C L, KANG L, et al. Enhanced EJ cell killing of 125i radiation by combining with cytosine deaminase gene therapy regulated by synthetic radio-responsive promoter[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2015, 30(8): 342-348. DOI: 10.1089/cbr.2015.1862.
- [20] 吴叶婷, 杨愁, 黄静, 等. 多靶点抗原肽自体免疫细胞联合 TACE 治疗原发性肝癌[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(2): 151-157. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.02.009.
- [21] SHAJAHAN-HAQ A N, BOCA S M, JIN L, et al. EGR1 regulates cellular metabolism and survival in endocrine resistant breast cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(57): 96865-96884. DOI: 10.18632/oncotarget.18292.
- [22] 黄静, 胡晓云, 陈晓薇, 等. 多靶点抗原肽自体免疫细胞治疗原发性肝癌的临床安全性[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23 (1): 11-16. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.002.

[收稿日期] 2017-10-16

[修回日期] 2017-12-31

[本文编辑] 王映红

· 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 $s_{\bar{x}}$, 不用 SE; (4) t 检验用英文小写 t ; (5) F 检验用英文大写 F ; (6) 卡方检验用希腊文小写 χ^2 ; (7) 相关系数用英文小写 r ; (8) 自由度用希腊文小写 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 、 $s_{\bar{x}}$ 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。

(本刊编辑部)