

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.12.009

· 基础研究 ·

重组溶瘤腺病毒对荧光素酶标记和非标记人肺癌 A549 细胞抑制作用比较

马艺珍^{1,2}, 范园园², 聂鑫³, 孙丽丽⁴, 朱羿龙^{1,2}, 李一权², 李文杰², 尹逊哲^{1,2}, 李善智², 赵津², 李霄², 郭焱¹, 金宁一²
(1. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117; 2. 军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所 分子病毒学与免疫学实验室, 吉林 长春 130122; 3. 解放军 65316 部队, 吉林 长春 130000; 4. 吉林省肿瘤医院, 吉林 长春 130021)

[摘要] **目的:**探讨重组溶瘤腺病毒 Ad-Apoptin-hTERTp-E1A(ATV)对荧光素酶标记人肺癌细胞(A549-luc)和人肺癌细胞(A549)的体外抑制作用差异。**方法:**利用 ATV 分别感染 A549 细胞和 A549-luc 细胞,通过 WST-1 和结晶紫染色法确定 ATV 的抑制作用的差异性,通过 Hoechst 和 Annexin V-FITC/PI 染色验证 ATV 的抑制方式。**结果:**ATV 对 A549 和 A549-luc 细胞均具有明显抑制作用($P<0.05$)。ATV 在 24、48、72 h 对两种细胞均有明显抑制作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且 72 h 抑制率最强;剂量分别为 1、10 和 100 MOI 的 ATV 对两种细胞均有抑制作用,且 100 MOI 抑制率最高。A549 细胞和 A549-luc 细胞感染 ATV 后,均呈现核碎裂典型浓染和边集的凋亡现象,且凋亡率随时间的增加而增大,具有显著的时间效应($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且凋亡率均在 72 h 达到峰值。**结论:**荧光素酶的插入没有明显改变 ATV 对 A549-luc 细胞的抑制作用和抑制方式,ATV 是通过诱导 A549-luc 细胞和 A549 细胞凋亡从而达到对其显著性体外抑制作用

[关键词] 溶瘤腺病毒;荧光素酶;A549-luc 细胞;抑制作用

[中图分类号] R730.51;R735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)12-1264-06

Inhibitory effect of recombinant oncolytic adenovirus on luciferase-labeled and non-labeled human lung cancer A549 cells

MA Yizhen^{1,2}, FAN Yuanyuan², NIE Xin³, SUN Lili⁴, ZHU Yilong^{1,2}, LI Yiquan², LI Wenjie², YIN Xunzhe^{1,2}, LI Shanzhi², ZHAO Jin², LI Xiao², GUO Yan¹, JIN Ningyi²(1. Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, Jilin, China; 2. Laboratory of Molecular Virology and Immunology, Institute of Veterinary Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Changchun 130122, Jilin, China; 3. Unit 65316, People's Liberation Army, Changchun 130000, Jilin, China; 4. Tumor Hospital of Jilin Province, Changchun 130021, Jilin, China)

[Abstract] Objective: To investigate the inhibitory effect of recombinant oncolytic adenovirus Ad-Apoptin-hTERTp-E1A (ATV) on luciferase-labeled human lung cancer cells (A549-luc) and human lung cancer A549 cells, and to compare the differences in the inhibitory effect on two cell lines. **Methods:** ATV was used to infect A549-luc cells and A549 cells respectively. WST-1 and crystal violet staining were used to determine the difference in the inhibitory effect of ATV. Hoechst and Annexin V-FITC/PI staining were used to verify the inhibition mode of ATV. **Results:** WST-1 and crystal violet staining showed that ATV had significant inhibitory effect on both A549-luc and A549 cells ($P<0.05$). ATV showed significant inhibitory effect on both cells at 24, 48 and 72 h ($P<0.05$ or $P<0.01$), and reached the peak at 72 h; ATV at concentrations of 1, 10 and 100 MOI all showed inhibitory effect on both cells, and reached the peak at 100 MOI. Hoechst staining showed that A549-luc cells and A549 cells infected with ATV showed typical nuclear fragmentation and marginal set. The results of Annexin V-FITC/PI Flow cytometry showed that ATV infection resulted in apoptosis of A549-luc and A549 cells, which was in a time-dependent manner and reached the peak at 72 h ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** Insertion of luciferase didn't significant-

[基金项目] 国家重点研发计划重要新发传染病防治处治技术与研究资助项目(No.2016YFC1200900);长春市重大科技攻关资助项目(No.16ss11);国家科学技术重大新药创制专项(No.2018ZX09301053-004-001)。Project supported by the National Key Research and Development Program of China on Prevention and Treatment of Important New Outbreaks of Disease (No. 2016YFC1200900), the Major Science and Technology Program of Changchun City (No. 16ss11), and the National Major Scientific and Technological Special Project for "Significant New Drugs Development" (No.2018ZX09301053-004-001)

[作者简介] 马艺珍(1993-),女,硕士生,主要从事肿瘤生物治疗的研究,E-mail:18689725827@163.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, co-corresponding author),博士,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

ly change the inhibitory effect and inhibitory mode of ATV on A549-luc cells. ATV exerted its *in vitro* inhibitory effect on A549-luc and A549 cells by inducing cell apoptosis.

[Key words] oncolytic adenovirus; luciferase; A549-luc cell; inhibitory effect

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(12): 1264-1269. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.12.009]

当今,癌症严重威胁人类健康,是人类生命的最大杀手。目前,生物治疗已经成为治疗癌症的主要手段之一。近年来已经有十多种不同的腺病毒进入临床试验阶段^[1],腺病毒通过诱导肿瘤细胞自噬、凋亡等对其起到抑制作用^[2],其中 E1B-55kD 蛋白缺陷型腺病毒 Onyx-015 是疗效最好、最具前景的一种腺病毒。Onyx-015 是由美国 Onyx 公司开发的一种能够在肿瘤细胞中特异性复制并裂解肿瘤细胞的腺病毒药物。1996 年该药物首次进行 I 期临床试验,在 14 例复发的头颈部肿瘤患者中,6 例患者肿瘤大小减少 50% 以上,部分患者病情得到改善;II 期临床试验的 40 例头颈部肿瘤患者,经瘤内注射 Onyx-015 治疗后,14% 的患者肿瘤大小平均缩小 50%。此外,溶瘤腺病毒对于放疗和化疗也可以起到佐剂作用,从而减轻放、化疗对人体的伤害。Onyx-015 可与化疗联合应用于肿瘤治疗,目前已进入 III 期临床试验阶段^[3]。近年来,对于肿瘤治疗,中国科学家刘新垣和钱其军还提出了基因-病毒靶向治疗的新策略^[4]。本研究通过 WST-1、结晶紫染色、Hoechst 和 Annexin V-FITC/PI 流式术检测等一系列体外实验证实重组溶瘤腺病毒 Ad-Apoptin-hTERTp-E1A(ATV)对荧光素酶标记人肺癌细胞(A549-luc)^[5]和人肺癌 A549 细胞的体外抑制作用和抑制途径有无显著差异,为探究 ATV 在动物体内对肿瘤的抑制作用提供了可靠手段。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒与主要试剂

重组溶瘤腺病毒 ATV 与荧光素酶标记人肺癌细胞 A549-luc 由军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所分子病毒学与免疫学实验室构建并保存^[6],人肺癌细胞 A549 由本实验室冻存。0.25% 胰酶、胎牛血清购自 BI 公司, F12 培养液购自 Hyclone 公司, 荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司, WST-1 购自 Roche 公司, 结晶紫染料购自碧云天公司, Hoechst 染料购自 Life 公司, FITC Annexin V 凋亡检测试剂盒购自 BD 公司。

1.2 荧光素酶报告基因检测 A549-luc 细胞传代的活性

取本实验室前期工作构建的 A549-luc 冻存细胞^[11],复苏后连续传代 5 代,利用荧光素酶报告基因检测试剂盒检测 1、3、5 代荧光素酶活性,同时将 1、3、5 代 A549-luc 细胞按 1:2 的比例依次稀释接种于 96

孔板中,加入荧光素酶底物(150 $\mu\text{g/ml}$),利用小动物活体成像系统进行检测。实验重复 3 次。

1.3 结晶紫染色法检测 ATV 对 A549 和 A549-luc 细胞抑制作用

将鉴定后的 A549 细胞和 A549-luc 细胞分别以 3×10^5 个/孔密度培养于 12 孔板中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h,用 1、10、100 MOI 2 种重组腺病毒 ATV 和 Ad-Mock 分别感染 2 种细胞,于培养箱继续培养 24、48、72 h,每孔加入结晶紫染料,室温孵育 5 min,进行拍照并分析结果。实验重复 3 次。

1.4 WST-1 法检测 A549 和 A549-luc 细胞活力或细胞增殖

将处于对数生长期的 A549 和 A549-luc 细胞以 5×10^3 个/孔密度培养于 96 孔板中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h,用 1、10、100 MOI 2 种重组腺病毒 ATV 和 Ad-Mock 分别感染 2 种细胞,继续培养 24、48、72 h,每孔加入稀释后的 WST-1,用酶标仪在 450 nm 测定各孔光密度(D)值,通过公式计算 ATV 对 2 种细胞抑制率。实验重复 3 次。

1.5 Hoechst 染色法检测 ATV 对 A549 和 A549-luc 细胞抑制方式

将处于对数生长期的 A549 和 A549-luc 细胞以 4×10^5 个/孔密度培养于 6 孔板中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h,用 100 MOI 的两种重组腺病毒 ATV 和 Ad-Mock 分别感染 2 种细胞,于培养箱中继续培养 24、48、72 h,每孔加入稀释后的 Hoechst 100 μl ,避光孵育 15 min,倒置在荧光显微镜下拍照并分析结果。实验重复 3 次。

1.6 Annexin V-FITC/PI 流式法检测 ATV 诱导下 A549 和 A549-luc 细胞的凋亡率

将处于对数生长期的 A549 和 A549-luc 细胞以 4×10^5 个/孔密度分别培养于 6 孔板中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h,用 100 MOI 2 种重组腺病毒 ATV 和 Ad-Mock 分别感染 2 种细胞,于培养箱中继续培养 24、48、72 h,向细胞中加入 Annexin V-FITC 和 PI,避光孵育 20 min,利用 FACS 流式细胞仪进行检测并分析结果。实验重复 3 次。

1.7 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计学软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;多组间均数比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 SNK-*q* 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 第1代A549-luc细胞荧光素酶活性最强

荧光素酶报告基因检测结果(图1A)显示,复苏后第1、3、5代A549-luc细胞荧光素酶活性中,第1代细胞荧光素酶活性最强,达到926 360。荧光素酶活性检测体外成像结果(图1B)显示,复苏后A549-luc细胞的荧光素酶基因能够稳定表达,且A549-luc细胞生物发光强度随细胞数目的增多而增大,表明本实验室前期工作构建的荧光素酶标记的A549-luc细胞可用于后续试验。

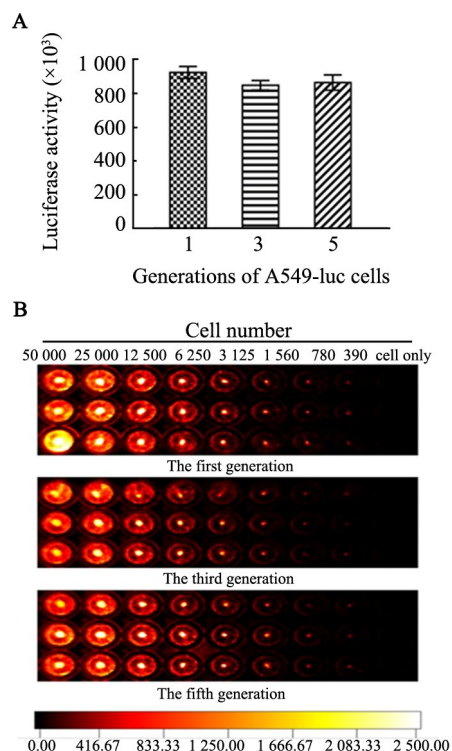
2.2 ATV对A549和A549-luc细胞具有明显抑制作用

结晶紫染色结果(图2A、B)显示,ATV对A549和A549-luc细胞均具有明显抑制作用(紫色越深表示细胞数目越多,越浅表示越少)($P < 0.05$),且对两种细胞的抑制作用无显著差异($P > 0.05$),该抑制作用具有一定的时间效应和剂量效应;而对照组Ad-Mock对A549和A549-luc细胞均无明显抑制作用($P > 0.05$)。

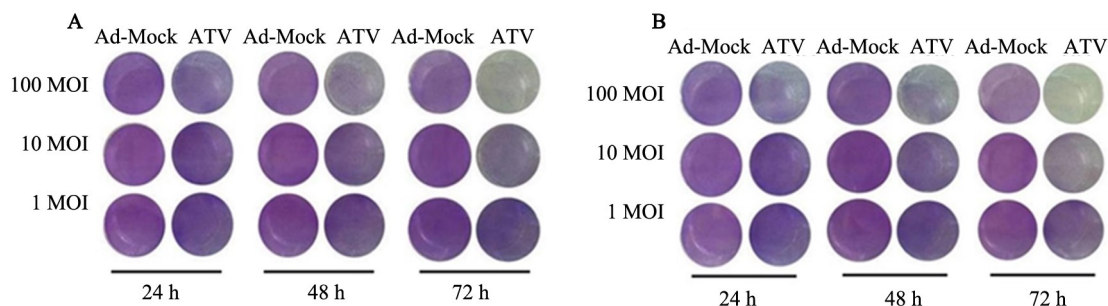
2.3 ATV对A549和A549-luc细胞抑制的最佳剂量和最佳作用时间

WST-1检测结果(图3A、B)显示,ATV对A549和A549-luc细胞具有抑制作用,该作用具有显著的时效与剂效关系($P < 0.05$)。ATV在24、48、72 h对2种细胞均有明显抑制作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且72 h抑制率最强,剂量分别为1、10和100 MOI的ATV对2种细胞均有抑制作用,且100 MOI抑制率最强;但Ad-Mock对

A549和A549-luc细胞均无明显抑制($P > 0.05$)。



A: The luciferase activity of the 1st, 3rd, 5th passages of A549-luc cells; B: *In vitro* living imaging of A549-luc cells
图1 各代A549-luc细胞荧光素酶活性验证结果
Fig.1 Verification results of luciferase activity of A549-luc cells from different generations



A: The crystal violet staining results of A549 cells; B: The crystal violet staining results of A549-luc cells

图2 ATV对A549和A549-luc细胞的抑制作用
Fig.2 Inhibitory effect of ATV on A549 and A549-luc cells

2.4 ATV以诱导凋亡方式抑制A549细胞和A549-luc细胞

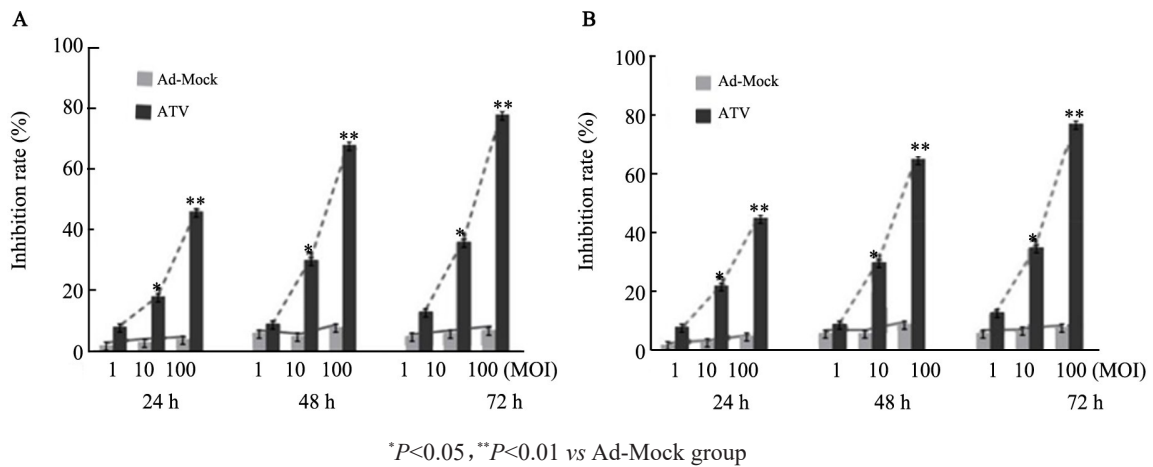
Hoechst染色法检测(图4A、B)显示,ATV感染A549和A549-luc细胞24、48、72 h后,均有部分细胞呈核碎裂典型的浓染和边集现象,随着时间的增长,该现象更加明显,而Ad-Mock感染的两种细胞呈现均一的蓝色荧光。由上述结果可知,ATV对A549和A549-luc细胞的抑制方式相同,均为诱导细胞凋亡,

且初步推断ATV诱导A549和A549-luc细胞凋亡具有一定的时间效应。

2.5 ATV诱导A549和A549-luc细胞凋亡具有时间效应

Annexin V-FITC/PI流式检测结果(图5)显示,ATV可诱导A549和A549-luc细胞凋亡,且凋亡率随着时间的增加而增大,具有显著的时间效应($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而Ad-Mock对两种细胞凋亡无明显影响

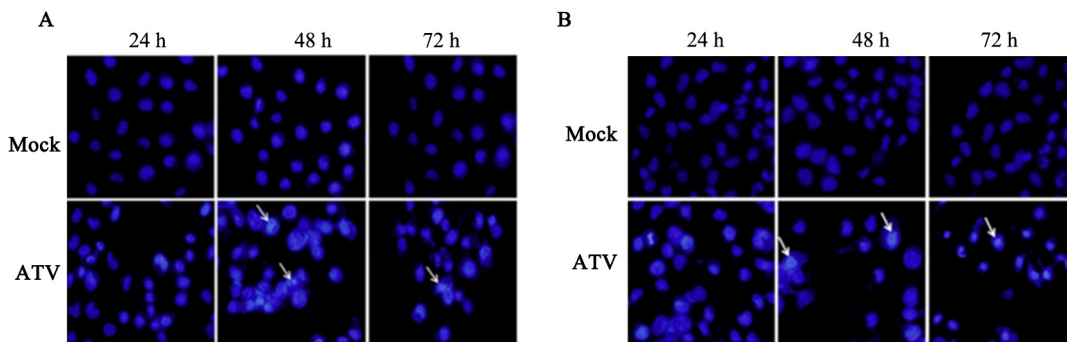
($P>0.05$)。上述结果表明, ATV 主要通过诱导细胞凋亡的方式对 A549 和 A549-luc 细胞发挥抑制作用, 且凋亡率均在 72 h 达到峰值。



A: The inhibition rate of ATV on A549 cells; B: The inhibition rate of ATV on A549-luc cells

图3 WST-1 法检测 ATV 对 A549 和 A549-luc 细胞的抑制率

Fig.3 The inhibition rate of ATV on A549 and A549-luc cells was detected by WST-1



A: The inhibitory mode of ATV on A549 cells; B: The inhibitory mode of ATV on A549-luc cells

图4 Hoechst 染色检测 ATV 的抑制方式($\times 400$)

Fig.4 The inhibitory mode of ATV detected by Hoechst staining assay ($\times 400$)

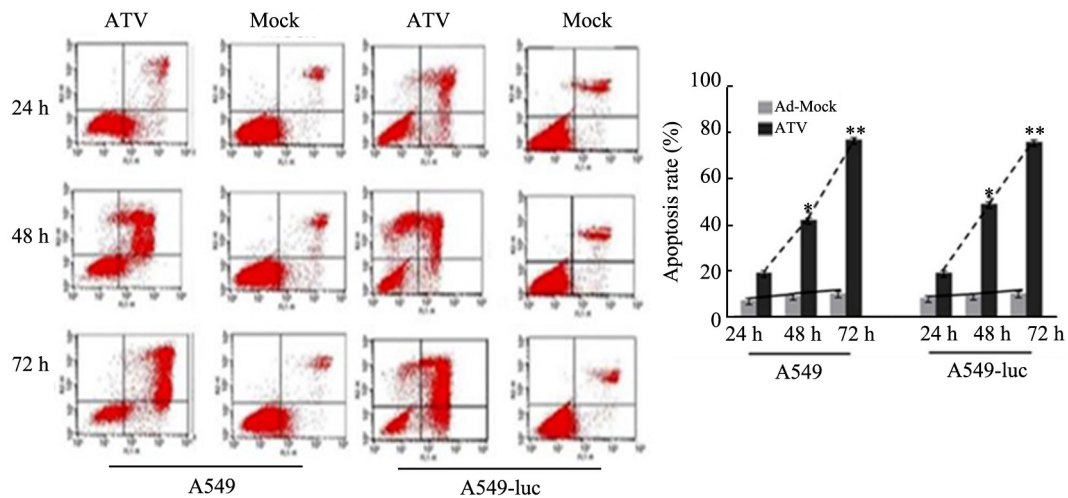


图5 ATV 诱导对 A549 和 A549-luc 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of ATV induction on apoptosis of A549 and A549-luc cells

3 讨论

本研究使用的重组溶瘤腺病毒 Ad-Apoptin-hTERTp-E1A(ATV)是由李霄^[6]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。人端粒酶逆转录酶 hTERTp 启动子在肿瘤细胞中特异性启动,在多数正常细胞中无活性;E1A 基因为病毒复制必须基因;hTERTp 和 E1A 共同决定 ATV 的肿瘤特异性复制能力。凋亡素基因 *Apoptin* 来源于鸡贫血病毒,它是由 VP3 基因编码的一种小分子蛋白质,*Apoptin* 能够诱导人恶性肿瘤细胞发生凋亡,其诱导肿瘤细胞凋亡机制主要通过增加线粒体膜通透性转运孔开放,使细胞色素 C 释放,激活半胱氨酸蛋白酶,活化 caspases-9,并形成凋亡小体及多种蛋白复合物,进而活化下游 caspase-3 放大信号,诱导肿瘤细胞凋亡^[7-9],而对人体正常纤维细胞、上皮细胞、平滑肌细胞和二倍体细胞无影响,Apoptin 决定 ATV 肿瘤特异性杀伤能力。大量研究表明,ATV 对肺癌^[10]、胃癌^[11]、前列腺癌^[12]、结直肠癌^[13-14]等多种肿瘤细胞均有显著性抑制作用。ATV 对人结直肠癌细胞和人宫颈癌细胞的抑制率分别可达到 $(56.230 \pm 6.640)\%$ ^[13]和 $(53.053 \pm 3.938)\%$ ^[15];ATV 通过诱导肿瘤细胞凋亡抑制肿瘤细胞增殖,ATV 诱导人结直肠癌细胞及人宫颈癌细胞凋亡的凋亡率分别可达到 $(37.970 \pm 3.780)\%$ ^[13]和 $(45.315 \pm 5.013)\%$ ^[15],以上结果均显著高于对照组,而 ATV 对正常的人体细胞无影响^[16]。

本实验室大量前期研究^[17-19]表明,ATV 对肿瘤细胞具有显著抑制作用。杨国华等^[20]研究显示,MTT 染色法结果表明,72 h ATV 对人结肠癌细胞(SW1116)的抑制率可达到 $(66.7 \pm 8.8)\%$,显著高于对照组;DAPI 染色结果显示,感染 ATV 的 SW1116 细胞呈现细胞皱缩、染色质边集、核碎裂等凋亡显著特征,DAPI 染色结果还显示,在总数为 (419 ± 25) 个的 SW1116 细胞中,感染 ATV 的实验组凋亡细胞数为 (149 ± 31) 个,显著高于对照组;利用小鼠结肠癌细胞(CT26)构建 BALB/c 小鼠荷瘤模型,包括实体瘤与转移瘤模型,通过皮下瘤内注射和血管给药 2 种方式利用 ATV 对荷瘤小鼠进行治疗,结果表明,ATV 治疗组小鼠的生存时间较对照组显著延长,生存率大大提高;ATV 显著抑制 CT26 肿瘤的生长速度。王金辉等^[21]研究表明,96 h 时 ATV 对人前列腺癌细胞(PC-3)的抑制率可达到 60%,显著高于对照组;利用小鼠前列腺癌细胞(RM-1)构建了 C57BL/6 小鼠荷瘤模型,并利用 ATV 对荷瘤小鼠进行治疗,结果表明,ATV 治疗组小鼠的肿瘤生长速度较对照组显著降低,荷瘤 65 d 后,ATV 治疗组小鼠存活率为 80%,显著高于

对照组。刘磊^[22]研究表明,ATV 可显著诱导人胃癌细胞(SGC7901)凋亡,早期凋亡率可达到 47.18%;利用 SGC7901 细胞构建 BALB/c 荷瘤裸鼠模型,并利用 ATV 对荷瘤小鼠进行治疗,结果表明,ATV 治疗组小鼠的肿瘤生长速度较对照组显著降低,ATV 治疗组小鼠平均生存期为 63 d,显著高于对照组,ATV 治疗可显著提高荷瘤动物模型的生存率。

本研究采用实验室前期工作构建的荧光素酶标记人肺癌细胞 A549-luc 和实验室冻存的人肺癌细胞 A549,通过一系列体外实验证实 ATV 对 A549-luc 细胞和 A549 细胞的体外抑制作用和抑制途径均无显著差异。感染剂量为 10 MOI 时,ATV 在 24、48、72 h 对 A549-luc 细胞和 A549 细胞有显著性抑制;感染剂量为 100 MOI 时,ATV 在 24、48、72 h 对 A549-luc 细胞和 A549 细胞抑制作用更明显,且抑制率在 72 h 达到峰值;ATV 对 A549-luc 细胞和 A549 细胞抑制作用具有显著时间效应和剂量效应。通过 Hoechst 染色和 Annexin V-FITC/PI 流式检测表明,ATV 通过诱导 A549-luc 细胞和 A549 细胞凋亡抑制其增殖,且凋亡率在 72 h 达到峰值。

综上,荧光素酶的插入没有明显改变 ATV 对 A549 细胞的抑制作用和抑制方式,ATV 是通过诱导 A549-luc 细胞和 A549 细胞凋亡来达到对其的显著性体外抑制作用。本研究为下一步探究 ATV 对 A549-luc 细胞的体内抑制作用奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 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]. *Lancet*, 2017, 389(1):S61-S61. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30457-9.
- [2] SU Z, YANG Z, XU Y, et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14(1):48-52. DOI: 10.1186/s12943-015-0321-5.
- [3] KHURI F R, NEMUNAITIS J, GANLY I, et al. a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer[J]. *Nat Med*, 2000, 6(8): 879-885. DOI: 10.1038/78638.
- [4] 刘新垣, 李华光. 癌症的基因-病毒靶向治疗[J]. *医学研究杂志*, 2009, 38(3): 1-2. DOI: 10.3969/j.issn.1673-548X.2009.03.001.
- [5] 范园园. 溶瘤腺病毒 Ad-VT 对荧光素酶标记人肺癌细胞的抑制作用研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2017.
- [6] 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]. 长春: 吉林大学, 2009.
- [7] 朱文赫, 沈楠, 徐俊杰, 等. 微波辐射对大鼠能量代谢及心肌细胞凋亡的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(4):647-651. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2015.04.013.
- [8] PRZEMYSŁAW S, EWA S, MONIKA T, et al. A preliminary study

- of apoptosis induction in glioma cells via alteration of the Bax/Bcl-2-p53 axis by transformed and non-transformed root extracts of *leonurus sibiricus*[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(7): 8753-8764. DOI: 10.1007/s13277-015-4714-2.
- [9] QIN F. Nucleophosmin mutations induce chemosensitivity in THP-1 leukemia cells by suppressing NF- κ B activity and regulating Bax/Bcl-2 expression[J]. *J Cancer*, 2016, 7(15): 2270-2279. DOI: 10.7150/jca.16010.
- [10] 李文杰, 陈智飞, 郭丽娇, 等. 溶瘤腺病毒 ATV 联合顺铂协同抑制 A 549 细胞的研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2017, 22(3): 252-257. DOI:10.13350/j.cjpb.170313.
- [11] LIU L, WU W, ZHU G, et al. Therapeutic efficacy of an hTERT promoter-driven oncolytic adenovirus that expresses apoptin in gastric carcinoma[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(4): 747-754. DOI: 10.3892/ijmm.2012.1077.
- [12] ZHANG M, WANG J, LI C, et al. Potent growth-inhibitory effect of a dual cancer-specific oncolytic adenovirus expressing apoptin on prostate carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(3): 1052-1060. DOI: 10.3892/ijo.2013.1783.
- [13] 陈智飞, 李一权, 胡宁宁, 等. 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[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22(1): 16-21. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2015.01.003.
- [14] YANG G, MENG X, SUN L, et al. Antitumor effects of a dual cancer-specific oncolytic adenovirus on colorectal cancer in vitro and in vivo[J]. *Exp Therapeut Med*, 2015, 9(2): 327-332. DOI: 10.3892/etm.2014.2086.
- [15] 尹逊哲, 陈爽, 李文杰, 等. 携带凋亡素基因的溶瘤腺病毒 ATV 对宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(12): 1356-1361. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.12.003.
- [16] ORO C, JANS D A. The tumour specific pro-apoptotic factor apoptin (Vp3) from chicken anaemia virus[J]. *Current Drug Targets*, 2004, 5(2): 179-190. DOI: 10.2174/1389450043490631.
- [17] 赵津. 重组溶瘤腺病毒对肿瘤细胞的体内外抑制作用研究[D]. 长春: 长春工业大学, 2016.
- [18] 兰添. 双特异性溶瘤腺病毒 Ad-Apoptin-hTERTp-E1A 对乳腺癌的体内外抑制作用研究[D]. 延吉: 延边大学, 2016.
- [19] 苏加强. 双特异性溶瘤腺病毒对人食管癌细胞 EC-109 的体内外抑制作用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2012.
- [20] 杨国华. 重组腺病毒 Ad-Apoptin-hTERT-E1a 对结肠癌抑制作用的实验研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [21] 王金辉. 基于 hTERT 启动子的表达 Apoptin 基因重组腺病毒对前列腺癌细胞的体内外抑制作用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [22] 刘磊. 基于 hTERT 启动子表达 Apoptin 基因溶瘤腺病毒对胃癌的抑制作用[D]. 长春: 吉林大学, 2012.

[收稿日期] 2018-06-19

[修回日期] 2018-10-18

[本文编辑] 王映红