

HSV1-TK 自杀基因系统对小鼠肝癌细胞移植瘤的抑制效应

吴映雅, 杜标炎, 谭宇蕙, 赵鹏, 王慧峰

吴映雅, 谭宇蕙, 广州中医药大学生化教研室 广东省广州市 510405
杜标炎, 赵鹏, 王慧峰, 广州中医药大学病理教研室 广东省广州市 510405
吴映雅, 女, 1969-03-31 生, 广东省南海人, 汉族, 1991 年南京大学本科毕业, 1997 年暨南大学硕士研究生毕业, 2003 年广州中医药大学在职博士生, 讲师, 主要从事中西医结合分子肿瘤学研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30171201
广州市科技计划项目, No. 2002J1-C7041
通讯作者: 杜标炎, 510405, 广东省广州市机场路 12 号, 广州中医药大学病理教研室, tyuhui@tom.com
电话: 020-36585475
收稿日期: 2005-05-13 接受日期: 2005-06-15

Inhibitory effect of HSV1-TK suicide gene system induced by retrovirus on murine transplanted hepatocarcinoma

Ying-Ya Wu, Biao-Yan Du, Yu-Hui Tan, Peng Zhao, Hui-Feng Wang

Ying-Ya Wu, Yu-Hui Tan, Department of Biochemistry, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China
Biao-Yan Du, Peng Zhao, Hui-Feng Wang, Department of Pathology, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30171201, and the Fund from Guangzhou Science and Technology Project, No. 2002J1-C7041
Correspondence to: Biao-Yan Du, Department of Pathology, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 12 Jichang Road, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China. tyuhui@Tom.com
Received: 2005-05-13 Accepted: 2005-06-15

Abstract

AIM: To establish the HSV1-*tk*/GCV tumor suicide system by constructing a recombinant retroviral vector, and to determine the inhibitory effect of this system on murine transplanted hepatocarcinoma *in vivo*.

METHODS: The HSV-*tk* cDNA was orientationally cloned into the retroviral vector plasmid (pLXSN) using DNA recombinant technique. The recombinant plasmid (pLXSN-*tk*) was mixed with PolyFect Transfection reagent and was transfected into the packaging cell line PT67. Then, a stable virus-producing packaging cell lines was obtained by G418 screening, and was transfected into murine hepatocarcinomatous H22 cells. An anti-G418 clone named H22/*tk* was obtained by G418 screening. H22/*tk* and H22 wild type cells were mixed in a proportion of 1 : 4. Then the mixed cells were inoculated subcutaneously into Kunming mice. The tumor-bearing mice were randomly divided into model control group and GCV treated group,

and the tumor inhibitory effect was observed by measuring tumor sizes.

RESULTS: HSV1-*tk* was inserted into recombinant plasmid pLXSN-*tk* successfully. The anti-G418 positive cell strain PT67/*tk*, which could excrete retrovirus recombinant, was obtained. The titer of the virus was 4×10^7 cfu/L. After the infection of H22, the anti-G418 positive cell strain H22/*tk* was also obtained. The sensibility to GCV showed in H22/*tk* cells was much higher than that in H22. Nearly all the cells lysed and became granule-like after treated with GCV (1 000 mg/L) for 72 h. The tumor growth in the GCV treated group was significantly inhibited as compared with that in the control group. There was no significant difference in tumor size between the two groups before the mice were treated with GCV. But at the 8th, 10th, 12th, 14th day after treatment with GCV, the tumor sizes in the GCV treated group were obviously decreased as compared with those in the control group (231 ± 155 mm³ vs 356 ± 205 mm³, $t = -2.25$, $P = 0.03$; 413 ± 252 mm³ vs 635 ± 382 mm³, $t = -2.14$, $P = 0.04$; 592 ± 420 mm³ vs 963 ± 580 mm³, $t = -2.38$, $P = 0.02$; 939 ± 847 mm³ vs $1 509 \pm 1 105$ mm³, $t = -1.92$, $P = 0.06$), and the tumor inhibitory rates were 35.0%, 35.0%, 38.5% and 37.8%, respectively.

CONCLUSION: The recombinant retrovirus expressing HSV1-*tk* is obtained successfully, and the HSV1-*tk*/GCV suicide gene system shows marked inhibitory effect on murine transplanted hepatocarcinoma.

Key Words: HSV1-*tk*; Suicide gene system; Hepatocarcinoma

Wu YY, Du BY, Tan YH, Zhao P, Wang HF. Inhibitory effect of HSV1-TK suicide gene system induced by retrovirus on murine transplanted hepatocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(16):1959-1963

摘要

目的: 构建表达单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(HSV1-*tk*)的重组逆转录病毒, 建立 HSV1-*tk*/GCV 肿瘤自杀基因治疗系统并检测其对小鼠肝癌细胞H22移植瘤的抑制效应。

方法: 构建携带 HSV1-*tk* 基因的逆转录病毒载体 pLXSN-*tk*, 用 PolyFect Transfection 试剂介导重组逆转

录病毒转染入包装细胞系 PT67, 通过 G418 筛选建立稳定产病毒的细胞株, 将该重组逆转录病毒感染小鼠肝癌细胞 H22, 以 G 418 筛选的抗性克隆(命名为 H22/*tk*); 将 H22/*tk* 细胞与未经基因修饰的 H22 细胞按 1:4 混合接种小鼠皮下, 联合应用 GCV, 观察其抑瘤作用 ($n = 19$).

结果: 经酶切鉴定和 DNA 序列测定, 证明 HSV1-*tk* 基因成功定向插入到 pLXSN 逆转录病毒载体中; 重组病毒 DNA 转染包装细胞 PT67, 获取病毒滴度为 4×10^7 cfu/L 的重组逆转录病毒培养液; 感染小鼠肝癌细胞 H22 后再筛选出 G418 抗性克隆株 H22/*tk*. H22/*tk* 细胞与 H22 细胞混合所致荷瘤鼠在 GCV 治疗前, 各组间肿瘤体积无显著性差异; GCV 治疗后, 与对照组相比, GCV 治疗组肿瘤的生长明显受到抑制, 到第 8, 10, 12, 14 d, 致瘤模型对照组的肿瘤体积分别为 356 ± 205 , 635 ± 382 , 963 ± 580 , $1\ 509 \pm 1\ 105$ mm³, 而 GCV 治疗组分别为 231 ± 155 (vs 对照组, $t = -2.25$, $P = 0.03$), 413 ± 252 (vs 对照组, $t = -2.14$, $P = 0.04$), 592 ± 420 (vs 对照组, $t = -2.38$, $P = 0.02$), 939 ± 847 mm³ (vs 对照组, $t = -1.92$, $P = 0.06$), GCV 治疗组的肿瘤生长抑制率分别为 35.0%, 35.0%, 38.5%, 37.8%.

结论: 成功获取表达 HSV1-*tk* 基因的逆转录病毒, 已建立显示出体内抑瘤活性的自杀基因治疗系统, 为进一步研究中医药对自杀基因抗肿瘤的增效作用奠定基础.

关键词: 单纯疱疹病毒胸苷激酶基因; 自杀基因系统; 肝癌

吴映雅, 杜标炎, 谭宇慧, 赵鹏, 王慧峰. HSV1-TK 自杀基因系统对小鼠肝癌细胞移植瘤的抑制效应. 世界华人消化杂志 2005;13(16):1959-1963
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1959.asp>

0 引言

肝癌除了手术、化疗等尚无很好的治疗方法, 而且除根治性切除有可能根治肝癌外, 多数患者在确诊以后的生存时间较短. 自杀基因疗法是具有应用前景的肿瘤治疗新措施^[1-5]. 限制该方法广泛应用的关键之一是体内转染率通常较低. 因其具有旁观者效应的特点(即加入前体药物后, 不仅导入了自杀基因的细胞被杀死, 邻近未导入的细胞也可被杀死), 故寻求与其他疗法联合以增强旁观者效应已成为提高自杀基因疗效的重要策略. 我们重组逆转录病毒表达载体 pLXSN/*tk*, 并观察其体内对小鼠肝癌细胞移植瘤的抑瘤作用, 为探讨中医药增强自杀基因疗法疗效的可行性进行前期准备工作.

1 材料和方法

1.1 材料 携带 1.7 kb 的 *tk* cDNA 片段的质粒 pIC19R/MC1-*tk* 由美国匹兹堡大学药理教研室 Huang L. 教授惠赠, 广州军区总医院赵亚刚博士提供; pLXSN 逆转录病

毒表达载体、病毒包装细胞 PT67 均购自美国 Clontech 公司; 小鼠 H22 肝癌细胞株和小鼠 NIH3T3 细胞均购自于中山大学实验动物中心细胞库; *E. coli* DH5 α 菌株山本室保存. 昆明小鼠, 18-22 g, 雌性, 健康, 清洁级, 由广州中医药大学实验动物中心提供; 高纯度质粒提取试剂盒和 DNA 片段凝胶回收试剂盒, 购自上海 Sangon 生物工程技术有限公司; DNA 片段连接试剂盒, 购自广州宝泰克生物科技有限公司; 转染试剂盒 Polyfect Transfection 为 Qiagen 公司产品; 多聚阳离子 (polybrene)、G418、GCV 均为 Sigma 公司产品; DMEM、胎牛血清和 RPMI 1640 均为 Gibco 公司产品; 新生牛血清为杭州四季青公司产品.

1.2 方法 pIC19R/MC1-*tk* 质粒和逆转录病毒表达载体 pLXSN 质粒均转化 DH5 α 后扩增、抽提纯化, 均用限制性内切酶 *EcoR* I/*BamH* I 酶切, 凝胶电泳证实 pIC19R/MC1-*tk* 质粒有 1.7 kb HSV-*tk* cDNA 目的片段, 回收、纯化此片段及 pLXSN 载体双酶切后的大片段, 在适当的反应体系中加入 DNA 片段连接试剂盒所提供的连接酶体系, 连接后转化感受态 *E. coli* DH5 α 细菌, 挑选阳性克隆, 提取重组质粒, 酶切鉴定, 并命名为的 pLXSN-*tk*. DNA 序列测定由上海 Sangon 生物技术服务有限公司提供自动测序. 细胞培养方式: 包装细胞 PT67、NIH3T3 为贴壁细胞, 分别培养于 100 mL/L 新生牛血清的 DMEM 高糖培养液和 RPMI 1640 培养液中, 置于 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 的培养箱内, 2.5 g/L 胰酶-EDTA 消化传代. 小鼠肝癌细胞 H22 为悬浮细胞, RPMI 1640 培养液培养, 无需胰酶-EDTA 消化即可传代. PT67 的转染及阳性克隆细胞的筛选: 将 2.5 μ g 的重组质粒 DNA 转染到 PT67 细胞中(具体操作按转染试剂盒说明书进行), 2 d 后用 G418 (400 mg/L) 筛选 2 wk, 获得抗性细胞集落后, 提高 G418 的浓度分别继续扩大培养, 选择最高抗性克隆留种, 命名为 PT67/*tk* 细胞. 取其细胞上清液, 参照试剂盒说明书操作, 用 NIH3T3 感染法进行病毒滴度测定, 病毒滴度以 cfu/L (colony forming units/L) 来表示. 收集 PT67/*tk* 细胞上清液, 以 0.45 μ m 的过滤器过滤, 加到对数生长期 H22 细胞中, 加多聚阳离子至终浓度为 8 mg/L, 2 d 后更换含 400 mg/L G418 的选择培养液, 连续筛选 2 wk 后, 获得抗性细胞克隆, 命名为 H22/*tk*. 将 H22/*tk* 和 H22 细胞分别以 2×10^3 、 3×10^3 、 5×10^3 /孔接种 96 孔板, 同时加入不同浓度的 GCV 使终浓度分别为 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1 000 mg/L, 以不加药的细胞作对照, 每实验组设 4 个复孔, 倒置显微镜观察. 将 H22/*tk* 和 H22 (*tk*) 按 1:4 混合, 混合后的小鼠肝癌细胞制备成 1×10^{10} /L 的细胞悬液, 台盼蓝活细胞计数 >90%, 按 0.2 mL/只的量接种于昆明

种小鼠的右腋皮下. 实验动物随机分为致瘤模型组和治疗实验组, 每组 19 只, 动物致瘤模型对照组在接种后 6 d 起每日 ip 生理盐水 0.25 mL, 连续 10 d; 治疗实验组接种后第 6 d 起每日 ip GCV 0.25 mL (100 mg/kg), 连续 10 d. 观察小鼠活动情况, 毛发、营养等情况; 在治疗期间, 在肿瘤出现后每 2 d 用游标卡尺测定肿块的长径 A (mm) 及与短径 B (mm), 肿瘤大小按公式: 体积 (V) = $1/2 \times A \times B^2$ 计算, 单位为 mm^3 . 根据测量的肿瘤体积大小绘制肿瘤生长体积曲线图. 在治疗实验结束后处死小鼠, 取出肿瘤组织, 称重, 用 40 g/L 中性甲醛固定, 常规石蜡切片, HE 染色, 光镜观察其病理组织学变化.

统计学处理 各组数据用采用 SPSS11.5 统计软件包, 数据先进行对数转换后进行 t -test.

2 结果

2.1 重组质粒的构建、鉴定和转染 逆转录病毒载体 pLXSN 质粒经 *EcoR* I, *Bam* H I 单酶切后为 5.9 kb 的 DNA 带, 新构建的 pLXSN-*tk* 质粒经 *EcoR* I/*Bam* H I 双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳显示为 1.7 kb 和 5.9 kb 左右的 2 条 DNA 带 (图 1). 重组 pLXSN-*tk* 质粒结构见图 2. 测序结果经分析比较, 碱基序列与文献 [6] 报道基本一致, 证明 HSV-*tk* 基因已被定向克隆入 pLXSN 载体中. 所构建的表达载体中, 于插入基因的上游设有启动了序列、增强了序列、病毒包装信号序列 Ψ^+ , 下游有选择标记基因 *Neo*^r, 经转染进包装细胞可被包装成具有感染性的逆转录病毒颗粒, 在感染动物细胞后可表达目的基因. 包装细胞 PT67 经转染后选择 G418 抗性最高达 1 g/L 的阳性克隆 (命名为 PT67/*tk*) 扩大培养, 收集上清液, 测定滴度为 4×10^7 cfu/L. 取 PT67/*tk* 细胞上清液, 感染对数生长期 H22 细胞, 2 d 后更换含 400 mg/L G418 的选择培养液, 连续筛选 2 wk 后, 获得抗性细胞克隆, 命名为 H22/*tk*.

2.2 GCV 的敏感性和治疗作用 细胞铺板后倒置显微

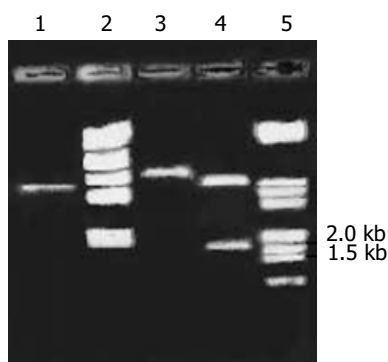


图 1 pLXSN-*tk* 质粒的酶切鉴定电泳图谱. 1: pLXSN 质粒 / *EcoR* I; 2: marker (λ DNA *Hind* III); 3: pLXSN-*tk* 质粒 / *EcoR* I; 4: pLXSN-*tk* 质粒 / *Bam* H I + *EcoR* I; 5: marker (λ DNA / *EcoR* I + *Hind* III).

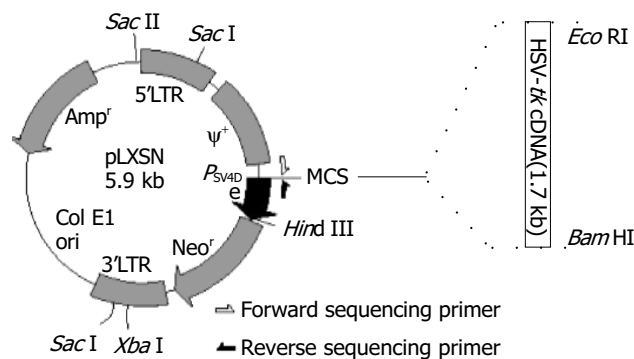


图 2 pLXSN-*tk* 质粒结构图.

下观察, 细胞均匀透亮, 胞膜完整, 胞体呈圆形, 悬浮于培养液中; GCV 作用 72 h 后, H22/*tk* 细胞的 1 000 mg/L 浓度用药组中 H22/*tk* 全部细胞碎裂成小粒状, 孔内基本无活细胞生存, 100 mg/L 浓度用药组中只能观察到极个别的存活细胞, 而其他各组包括 H22 (*tk*) 细胞的各浓度 GCV 作用组则呈现正常的明显的细胞增殖, 说明 H22/*tk* 对 GCV 的敏感性大大高于 H22 (*tk*) 细胞, HSV-*tk* 基因已在肝癌细胞中表达. 致瘤模型组 and GCV 治疗组在接种后 6 d 左右均能触及皮下肿瘤, 接种成功率 100%, 随着肿瘤的增大, 小鼠逐渐表现为形体明显消瘦, 体重下降, 活动弛缓, 被毛无光泽. 但 GCV 治疗组在治疗后小鼠状态明显好于致瘤模型组. 治疗前各组间肿瘤体积无显著性差异. 随着治疗进行, 治疗组体积与致瘤模型对照组的差别逐渐增大, 肿瘤呈现生长抑制状态, 到第 8, 10, 12, 14 d, 致瘤模型对照组的肿瘤体积分别为 $356 \pm 205 \text{ mm}^3$, $635 \pm 382 \text{ mm}^3$, $963 \pm 580 \text{ mm}^3$, $1\ 509 \pm 1\ 105 \text{ mm}^3$, 而 GCV 治疗组分别为 $231 \pm 155 \text{ mm}^3$ (vs 对照组, $t = -2.25$, $P = 0.03 < 0.05$), $413 \pm 225 \text{ mm}^3$ (vs 对照组, $t = -2.14$, $P = 0.04 < 0.05$), $592 \pm 420 \text{ mm}^3$ (vs 对照组, $t = -2.38$, $P = 0.02 < 0.05$), $939 \pm 847 \text{ mm}^3$ (vs 对照组, $t = -1.92$, $P = 0.06$), GCV 治疗组的肿瘤生长抑制率分别为 35.0%, 35.0%, 38.5%, 37.8% (图 3). 到第 16 d 剥取瘤块称重结果为: 致瘤模型对照组肿瘤质量为 $1.58 \pm 1.24 \text{ g}$, GCV 治疗组为 $0.99 \pm 0.98 \text{ g}$, 抑瘤率为 37.4% (vs 对照组, $t =$

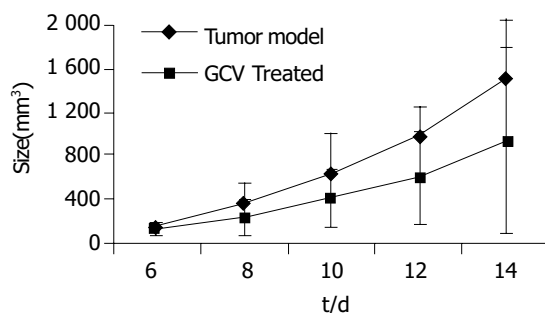


图 3 小鼠肿瘤生长曲线.

1.74, $P = 0.09 > 0.05$). 病理观察显示致瘤模型组的肿瘤组织内肿瘤细胞数量较多, 密集, 大小不一, 核大而深染, 形状不规则, 肿瘤组织内肿瘤细胞坏死, 呈核固缩表现, 并见大片红染无结构的坏死组织, 肿瘤周边纤维组织增生不明显, 未见明显包膜. 肿瘤边缘见少量炎细胞浸润; GCV治疗组的肿瘤组织内肿瘤细胞数量密度相对较少, 肿瘤组织内肿瘤细胞坏死, 呈核固缩表现, 并见大片红染无结构的坏死组织, 肿瘤周边纤维组织增生较明显, 形成较明显的假包膜, 肿瘤边缘纤维结缔组织内见较多量炎细胞浸润.

3 讨论

我国是肝癌的高发国家, 目前对肝癌的治疗最常用的方法是“以手术为主综合治疗”的原则. 但肝癌对化疗和放疗均不敏感, 能手术根治的肝癌仅占15%. 肝癌的基因治疗, 在控制肿瘤的增殖、预防和延缓复发、转移以及提高患者生活质量方面可能具有独特的优势. 近年来肝癌基因治疗成为肝癌治疗活跃的研究领域. 肿瘤的基因治疗, 特别是自杀基因治疗, 已经成为继传统的手术切除, 放射治疗, 化学药物治疗等治疗方法之后一种新的抗肿瘤治疗措施^[7-12]. HSV-TK/GCV治疗系统为其中最常用、最重要的治疗系统之一.

基因治疗的临床应用由于存在体内基因转染效率低等问题而受到限制, 目前的研究热点多集中在如何提高旁观者效应^[8, 13-29]. 根据其产生的机制人们认为提高旁观者效应可通过下列途径: (1) 增加细胞间的“缝隙连接”, 使GCV的代谢产物从 tk^+ 细胞进入 tk^- 细胞增多; (2) 延长凋亡细胞存在时间, 增强机体抗肿瘤免疫反应; (3) 改善自杀基因抗肿瘤作用的整体免疫状态和局部炎症免疫微环境. 中药是一个天然药物宝库, 在促进肿瘤细胞的缝隙连接胞间通讯、诱导癌细胞凋亡或提高患瘤机体免疫力这三方面都有优势或潜力, 且具有价廉低毒、给药方便等优势. 因而设想中药方药能够通过上述机制提高自杀基因旁观者效应, 增强自杀基因的抗肿瘤作用. 我们准备对上述设想进行一系列的验证工作, 以期建立自杀基因联合中医药治疗的中西医结合肿瘤基因治疗的联合治疗方案^[30].

我们将HSV-tk基因定向克隆入逆转录病毒载体pLXSN中, 并进行病毒包装, 筛选出稳定生产带有该重组逆转录病毒的细胞株PT67/ tk . 将逆转录病毒感染肿瘤细胞, 检测HSV-tk自杀基因治疗系统在体外的抗肿瘤效应, 经GCV对小鼠肝癌细胞H22的体外杀伤试验, 结果表明HSV-tk基因已在肝癌细胞中表达; 体内抑瘤实验显示, 在肿瘤细胞移植后的8, 10,

12 d, HSV-tk/GCV系统对移植瘤的生长有明显的抑制作用, H22/ tk 混合接种肿瘤细胞用GCV治疗后显示35.0-38.5%的抑瘤率. 但在肿瘤细胞移植后14 d(即在GCV治疗第8 d)治疗组虽还显示抑瘤趋势, 但差异无统计学意义, 第16 d剥取瘤块的质量比较也显示类似结果, 可能是由于H22/ tk 细胞已经有大部分被杀死而剩余的野生型 tk 细胞已经开始占主要地位继续生长所致. 本实验在筛选时由于条件限制没有进行严格的单克隆分选, H22/ tk 细胞群中可能混有少量的野生型细胞, 但在这样的细胞混合比例下仍显示出明显的抑瘤效果, 说明采用20%H22/ tk 混合接种肿瘤细胞的方案可为自杀基因与中医药联合疗法的研究提供较为适当的动物实验模型, 因为这可留下空间让我们观察中医药的作用.

本研究构建HSV-TK/GCV自杀基因治疗系统并进行体内抑瘤实验为今后的研究工作打下了基础.

4 参考文献

- Seth P. Vector-Mediated cancer gene therapy: an overview. *Cancer Biol Ther* 2005;4:[Eupb ahead of print]
- Niculescu-Duvaz I, Springer CJ. Introduction to the background, principles, and state of the art in suicide gene therapy. *Mol Biotechnol* 2005;30:71-88
- Hadaczek P, Mirek H, Berger MS, Bankiewicz K. Limited efficacy of gene transfer in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir gene therapy for brain tumors. *J Neurosurg* 2005;102:328-335
- El-Aneed A. Current strategies in cancer gene therapy. *Eur J Pharmacol* 2004;498:1-8
- Simpson E. Immunotherapy and gene therapy. *IDrugs* 2004; 7:105-108
- Wagner MJ, Sharp JA, Summers WC. Nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:1441-1445
- Wang XP, Yazawa K, Yang J, Kohn D, Fisher WE, Brunicaudi FC. Specific gene expression and therapy for pancreatic cancer using the cytosine deaminase gene directed by the rat insulin promoter. *J Gastrointest Surg* 2004;8:98-108
- Wang CJ, Li JJ, Wen XM, Deng L. Effect of recombinant adenoviruses with CD/TK fusion suicide gene on human hepatocellular carcinoma cells. *Zhongxiyi Jiehe Xuebao* 2004; 2:42-45
- Hu WX, Zeng ZJ, Luo SQ, Chen Q. Suicide gene therapy of human breast cancer in SCID mice model by the regulation of Tet-On. *Chin Med J (Engl)* 2004;117:434-439
- Wang J, Lu XX, Chen DZ, Li SF, Zhang LS. Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir suicide gene therapy for human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10: 400-403
- He J, Chen Y, Li H, Lu Y, Yan Y, Tan X. Studies on herpes simplex virus thymidine kinase gene and GCV system for treatment of human bladder carcinoma. *Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi* 2004;21:428-432
- Fischer U, Steffens S, Frank S, Rainov NG, Schulze-Osthoff K, Kramm CM. Mechanisms of thymidine kinase/ganciclovir and cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy-induced cell death in glioma cells. *Oncogene* 2005; 24:1231-1243
- 陈道斌, 张丽珊. 自杀基因治疗中的旁观者效应及机制. *国外医学·遗传学分册* 2002;25:199-201

- 14 Cho HS, Lee HR, Kim MK. Bystander-mediated regression of murine neuroblastoma via retroviral transfer of the HSV-TK gene. *J Korean Med Sci* 2004;19:107-112
- 15 Zhang A, Wang Q, Han Z, Wu S, Chen G, Li J, Liao G, Lu Y, Ma D. Relationship between the expression of connexin43 and bystander effect of suicide gene therapy in ovarian cancer. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2004;24:476-479
- 16 王卫东, 陈正堂, 王志新. 缝隙连接与自杀基因旁观者效应研究进展. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2001;8:231-233
- 17 杨文字, 黄宗海. 自杀基因治疗恶性肿瘤的载体效率及基因表达. *世界华人消化杂志* 2004;12:194-198
- 18 Stefani AL, Barzon L, Castagliuolo I, Guido M, Pacenti M, Parolin C, Farinati F, Palu G. Systemic efficacy of combined suicide/cytokine gene therapy in a murine model of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005;42:728-735
- 19 Zhang JH, Wan MX, Yuan JY, Pan BR. Do there exist synergistic antitumor effects by coexpression of herpes simplex virus thymidine kinase with cytokine genes on human gastric cancer cell line SGC7901? *World J Gastroenterol* 2004;10:147-151
- 20 Guo SY, Gu QL, Zhu ZG, Hong HQ, Lin YZ. TK gene combined with mL-2 and mGM-CSF genes in treatment of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:233-237
- 21 徐如祥, 涂艳阳, 邹春芽, 杨志林, 陈招, 蔡颖谦, 杜谋选. 尼莫地平增强 H_vTK/ACV 自杀基因对脑胶质瘤细胞的杀伤作用. *肿瘤防治杂志* 2003;10:1129-1133
- 22 Beltinger C, Fulda S, Walczak H, Debatin KM. TRAIL enhances thymidine kinase/ganciclovir gene therapy of neuroblastoma cells. *Cancer Gene Ther* 2002;9:372-381
- 23 Nicholas TW, Read SB, Burrows FJ, Kruse CA. Suicide gene therapy with Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir is enhanced with connexins to improve gap junctions and bystander effects. *Histol Histopathol* 2003;18:495-507
- 24 Janouskova O, Sima P, Kunke D. Combined suicide gene and immunostimulatory gene therapy using AAV-mediated gene transfer to HPV-16 transformed mouse cell: decrease of oncogenicity and induction of protection. *Int J Oncol* 2003;22:569-577
- 25 陈纲, 李世拥, 丁波, 安萍, 蔡慧芸, 郭文华. CD/5-FU 联合亚硝酸钙对自杀基因细胞杀伤作用的研究. *肿瘤防治杂志* 2001;8:611-613
- 26 Huang GQ, Song Y, Zhang J, Lu YR, Xiao L, Yang Y, Guo YB. Enhancement of the bystander effect by tanshinone IIA in HSV-tK/GCV system is related to expression of connexin 43 mRNA. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2004;26:146-149
- 27 Robe PA, Jolois O, N'Guyen M, Princen F, Malgrange B, Merville MP, Bours V. Modulation of the HSV-TK/ganciclovir bystander effect by n-butyrate in glioblastoma: correlation with gap-junction intercellular communication. *Int J Oncol* 2004;25:187-192
- 28 Kanazawa T, Mizukami H, Nishino H, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Kitamura K, Ichimura K, Ozawa K. Topoisomerase inhibitors enhance the cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on head and neck cancer cells. *Int J Oncol* 2004;25:729-735
- 29 Fulda S, Debatin KM. Apoptosis signaling in tumor therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1028:150-156
- 30 杜标炎, 谭宇慧, 吴映雅, 苏宁, 何颜丽, 钟子健. 自杀基因联合中医药疗法治疗肿瘤的理想. *广州中医药大学学报* 2002;19:1

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第五届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会

本刊讯 第五届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会暨“消化道恶性梗阻的动脉内灌药联合内支架治疗应用技术”和“食管良恶性狭窄治疗新进展”国家级继续医学教育学习班将于2005-10-28/2005-11-02在江苏省南京市举办。

“消化道恶性梗阻的动脉内灌药联合内支架治疗应用技术”是卫生部第二轮面向农村基层适宜技术推广“十年百项”计划项目和上海市“重大医学成果转化”项目,也是国家级继续医学教育项目。“动脉内灌药联合内支架治疗应用技术”是一项涉及肿瘤内科诊治、消化内镜操作及介入放射学操作技术的边缘学科。鉴于其对消化道恶性梗阻性病变治疗的实用性较强、临床疗效较好,因而深受肿瘤、消化及介入学界从业医师的普遍欢迎。本次会议由上海同仁医院和江苏省人民医院联合主办,中华消化内镜杂志、介入放射学杂志协办。会议将邀请肖湘生、李麟荪、杨仁杰、徐克以及张齐联、林三仁、李兆生、吴云林、张志宏等国内著名的介入放射及消化内镜专家讲学研讨。(世界华人消化杂志 2005-08-26)