

# Tet-On 调控自杀基因治疗系统对 乳腺癌细胞的 DNA 损伤效应

李弘德, 向生光, 马楠, 胡维新, 曾赵军

(中南大学生物科学与技术学院分子生物学研究中心, 长沙 410078)

**[摘要]** 目的: 研究重组腺相关性病毒(rAAV)介导的含有 Tet-On 调控元件的 HSV-TK/GCV 自杀基因调控治疗系统对人类乳腺癌细胞株 MCF-7 DNA 损伤的影响及损伤应答的分子机制。方法: 彗星实验检测 HSV-TK/GCV 自杀基因治疗系统对 MCF-7 DNA 损伤的影响, 并对主要的 DNA 损伤应答的相关活性基因和表达蛋白进行 RT-PCR 和 Western 印迹检测, 分析其表达变化情况。结果: 与各对照组相比, 实验组 MCF-7 细胞的彗星实验结果有明显的彗星拖尾现象, DNA 损伤应答的相关活性基因和活性蛋白(如 ATM, p53 和 p27)的表达水平产生了明显的差异, 而 CyclinE 和 CDK2 的表达水平没有明显变化。结论: HSV-TK/GCV 自杀基因治疗系统可以导致 MCF-7 的 DNA 损伤反应, 这种损伤反应可能是通过一种 p53 依赖的信号通路引起细胞阻滞导致死亡。

**[关键词]** 乳腺癌; 自杀基因治疗; 彗星实验; HSV-TK/GCV; DNA 损伤

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2011.09.004

## DNA damage caused by suicide gene therapy system under Tet-On regulation in breast cancer cells

LI Hongde, XIANG Shengguang, MA Nan, HU Weixin, ZENG Zhaojun

(Molecular Biology Research Center, School of Biological Science and Technology, Central South University, Changsha 410078, China)

**Abstract:** **Objective** To determine the effect and molecular mechanism of DNA damage caused by suicide gene therapy system HSV-TK/GCV under Tet-On regulation in human breast cancer cell line MCF-7 infected by recombinant adeno-associated virus (rAAV). **Methods** We used comet assay to detect the effect of HSV-TK/GCV suicide gene regulation system on MCF-7 DNA damage, and analyzed the expression change of relative DNA damage response active genes and proteins with RT-PCR and Western blot. **Results** Compared with other control groups, the comet assay showed that MCF-7 cells with HSV-TK/GCV treatment had obvious comet tails, and the expression level of DNA damage response active genes and proteins changed obviously in the HSV-TK/GCV treatment group, such as ATM, p53 and p27, but CyclinE and CDK2 did not change. **Conclusion** DNA damage on MCF-7 cells is resulted from HSV-TK/GCV in suicide gene therapy system through a p53-dependent signal pathway, causing cell cycle arrest and cell death.

**Key words:** breast cancer; suicide gene therapy; comet assay; HSV-TK/GCV; DNA damage

收稿日期 (Date of reception) 2011-04-20

作者简介 (Biography) 李弘德, 硕士, 主要从事恶性肿瘤的自杀基因治疗研究。

通信作者 (Corresponding author) 曾赵军, E-mail: zengzj71@hotmail.com.

基金项目 (Foundation items) 国家自然科学基金(30600753, 81172154)。 This work was supported by the National Natural Science Foundation of China(30600753, 81172154).

乳腺癌是人类常见的一种恶性肿瘤,也是女性主要恶性肿瘤之一。自杀基因治疗作为一种新的肿瘤治疗方法,受到了许多研究人员的关注。在多种不同的自杀基因治疗系统中,目前研究最深入且与肿瘤治疗关系最密切的是单纯疱疹病毒胸苷激酶/丙氧鸟苷(herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK/ganciclovir, GCV)和胞嘧啶脱氨酶/氟胞嘧啶(CD/FC)<sup>[1]</sup>。以 HSV-TK/GCV 为例,HSV-TK 引入肿瘤细胞后,TK 编码的胸苷激酶将无毒的 GCV 磷酸化成有毒的三磷酸化 GCV(GCVTP),进而掺入正在复制的 DNA 链中,导致复制提前终止,杀灭癌细胞<sup>[2]</sup>。这种治疗方法的优点是具有“旁观者效应”,通过这种效应,未被转导自杀基因 HSV-TK 的肿瘤细胞也可以被杀死<sup>[3]</sup>。彗星实验即单细胞凝胶电泳技术,是由 Ostling 和 Johnson<sup>[4]</sup>于 1984 年发明的,它可以灵敏地检测 DNA 单链断裂,双链断裂,DNA 链内交联和碱性易变位点<sup>[5]</sup>,是用于判断在单个细胞中 DNA 损伤程度和修复能力的一种实验方法<sup>[6-8]</sup>。彗星实验至今已经形成了 2 种模式:Singh 等<sup>[9]</sup>提出的碱性彗星实验用于检测 DNA 单链断裂片段;Olive 等<sup>[10]</sup>将改进的中性彗星实验用于检测 DNA 双链断裂片段。彗星实验的工作原理是:真核细胞的生物膜在细胞裂解液的作用下被破坏,细胞内的 DNA、蛋白质及其他成分进入凝胶,继而扩散到裂解液中,唯有核 DNA 仍附着在剩余的核骨架上而留在原位。如果细胞未受损伤,电泳中核 DNA 停留在核基质中,经荧光染色后呈现圆形的荧光团,无拖尾现象。若细胞受到损伤,在碱性 pH > 13 电泳液中,DNA 双链解螺旋且碱变性为单链。单链断裂的碎片离开核 DNA 向阳极迁移,形成拖尾。细胞核 DNA 受损伤越严重,产生的断链或碱变性碎片就越多,电泳表现为彗星拖尾现象越明显。通过荧光倒置显微镜观察有无彗星,并用 CASP 彗星分析软件和 Microsoft Excel 软件获取和统计分析彗星数据来判断细胞 DNA 有无受到损伤及损伤程度。近 30 年来,在彗星实验技术不断探索改进的过程中,人们对肿瘤细胞 DNA 损伤和修复也开展了不少的研究,通过量化突变引起的 DNA 损伤和修复,彗星实验已经用于评估癌症发生的风险<sup>[11]</sup>。本研究旨在用重组腺相关病毒(rAAV)介导的含 Tet-On 调控元件 HSV-TK/GCV 自杀基因调控治疗系统处理乳腺癌细胞 MCF-7,以碱性彗星实验检测该系统是否造成 MCF-7 细胞的 DNA 损伤。并结合 RT-PCR 和 Western 印迹等实验

技术,初步分析该系统导致 DNA 损伤的分子机制及细胞周期调控通路,为 DNA 损伤反应的研究提供相关的实验证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞培养

人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞来源于 1 位 69 岁高加索妇女乳腺癌(腺癌)患者胸膜渗出液中的癌细胞,该细胞株由中南大学分子生物学研究中心保存。培养体系为含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基,在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。

#### 1.1.2 主要试剂

正常熔点琼脂糖、低熔点琼脂糖和碘化丙啶 PI 购于美国 Sigma 公司;DMEM 干粉和小牛血清购于美国 Gibco 公司;rTaq DNA 聚合酶、dNTP 和 λDNA *Hin* dIII Marker 购于中国大连宝生物工程有限( TaKaRa ); rAAV/TRE/Tet-On/HSV-TK 为本实验中心构建;细胞裂解液(2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, 1% 十二烷基肌氨酸钠, 10 mmol/L Tris pH 10.0, 使用前加 1% Triton X-100, 1% DMSO);解旋液(1 mmol/L EDTA, 300 mmol/L NaOH, pH > 13);中和液(0.4 mol/L Tris-Cl, pH7.5)。

#### 1.1.3 抗体及引物

鼠抗人 ATM 和 p27 单克隆抗体购于美国 Abcam 公司;兔抗人磷酸化 p53 (ser6) 单克隆抗体、鼠抗人 p53 单克隆抗体、山羊抗兔 IgG 和山羊抗鼠 IgG 均购于中国北京中杉金桥生物有限公司;兔抗人 CDK2 和 CyclinE 单克隆抗体购于中国北京博奥森生物技术有限公司。各蛋白编码基因引物由上海英俊生物技术有限公司合成,引物序列见表 1。

### 1.2 彗星实验

把待处理的 MCF-7 细胞分为实验组和对照组,实验组即 rAAV + Dox + GCV 组,对照组包括 rAAV + Dox 组、rAAV + GCV 组、rAAV 组以及阴性对照(NC)组;将乳腺癌细胞 MCF-7 以  $4 \times 10^4$ /mL 的密度接种于 6 孔板中,待细胞生长至对数期,用 rAAV(病毒感染滴度为  $1.7 \times 10^5$ /cell)感染乳腺癌细胞 MCF-7, 12 h 后加入终浓度为 1 μg/mL 的 Tet-On 调控元件的诱导物 DOX, 12 h 后再加入终浓度为 4 μg/mL 的前体药物 GCV, 此后培养细胞 48 h。

表1 各蛋白编码基因引物序列

Tab.1 Sequence of protein coding gene primers

| 蛋白      | 引物                                    | 退火温度/℃ |
|---------|---------------------------------------|--------|
| ATM     | 上游 5'-CGGGATCCAGCTATTTGGTTTG-3'       | 57     |
|         | 下游 5'-CGGAATTCACACCTTCAACACCCGTAAT-3' |        |
| P53     | 上游 5'-TCCCTGTTGGTCGG-3'               | 59     |
|         | 下游 5'-GGGAGGCAAAGCT-3'                |        |
| P27     | 上游 5'-CGACTGAGATGGCTAATGG-3'          | 46     |
|         | 下游 5'-TGGTAGAAATCTGTCACTGCTGGT-3'     |        |
| CDK2    | 上游 5'-GATGCTGTTGTAATTCCTG-3'          | 49     |
|         | 下游 5'-CATACTGAGTGTACCCGTTG-3'         |        |
| CyclinE | 上游 5'-GGGTATCAGTGGTCCGACAT-3'         | 47     |
|         | 下游 5'-ACTTTGCCTGTTTATGATGCA-3'        |        |
| β-actin | 上游 5'-AGTTGCGTTACACCCCTTTC-3'         | 55     |
|         | 下游 5'-AGTGGGGTGGCTTTTATGGA-3'         |        |

彗星实验根据 Olive 等<sup>[12]</sup>描述方法并适当改进后进行。1)制备单细胞悬液。4℃胰酶消化处理各组的 MCF-7 细胞,用 4℃的 PBS 冲洗下来收集于 1.5 mL Eppendorf 管,并轻轻吹打;1 500 r/min 离心 5 min,离心后用 4℃的 PBS 洗 3 次,每次洗后以 900 r/min 短时低速离心去除细胞碎片,重悬 MCF-7 细胞;细胞计数并调整细胞浓度为  $5 \times 10^5$ /mL。整个过程尽量在 4℃进行。2)制胶板。取 100 μL 0.5% 普通熔点琼脂糖凝胶滴于 4℃预冷的特制载玻片上,用盖玻片压平胶面,制备第 1 层胶;将 37℃0.7% 的低熔点琼脂糖凝胶与制备好的单细胞悬液混匀,细胞密度为  $5 \times 10^4$ /mL,取 80 μL 混合液滴于第 1 层胶上,迅速用盖玻片压平,于 4℃冷却 15 min 后小心移除盖玻片制备第 2 层胶(本实验采用 2 层胶,而非传统的“三明治式”胶板)。3)裂解。胶板于 4℃的细胞裂解液避光裂解 2~12 h。4)解旋。胶板于 4℃的解旋液中解旋 30 min。5)电泳。胶板于 4℃的新鲜配置电泳缓冲液(即解旋液)中 25 V, 150 mA 下电泳 20 min。6)中和。胶板于中和液(0.4 mol/L Tris, pH 7.5)中和 15 min。7)染色。待胶板自然晾干,用 100 μg/mL 的 PI 滴于胶板上,并用干净的盖玻片封片,避光染色 2~16 h。8)观察。用倒置荧光显微镜绿色激发光(激发波长 567 nm, 阻挡波长 590 nm)激发 PI 显色,于镜下观察并摄取图像。

### 1.3 彗星实验结果分析

每样本随机选取 100 个细胞,用 CASP 软件处

理彗星实验图片,得出各处理组的实验数据。彗距为彗星头部中心距彗尾末端的距离,彗尾面积百分率为彗尾面积/(头部面积+彗尾面积),彗距、彗尾面积百分率越大表明 DNA 损伤水平越高。

### 1.4 半定量 RT-PCR

将培养的 MCF-7 细胞以  $4 \times 10^4$ /mL 的密度接种于细胞培养瓶中,按照 1.2 中所述进行实验分组及处理细胞后,分别提取 rAAV + Dox + GCV 组、rAAV + GCV 组、rAAV + Dox 组、rAAV 组及阴性对照(NC)组的总 RNA。测定浓度后,取等量的总 RNA 在 42℃反转录 1 h,生成 cDNA;之后,根据不同的引物的退火温度按照 94℃,5 min 预变性;94℃变性 30 s,退火 30 s,72℃延伸 60 s(32 个循环);72℃总延伸 10 min,进行 PCR 反应。得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像系统中观察并摄取图像。

### 1.5 Western 印迹

将培养的 MCF-7 细胞以  $4 \times 10^4$ /mL 的密度接种于细胞培养瓶中,按照 1.2 中所述进行实验分组及处理细胞后,提取各组细胞总蛋白质。Western 印迹具体步骤如下:取等质量的各组蛋白质与 5×SDS 混匀,热变性 5 min 后点样;用 Bio-Rad 电泳仪在 60 V 和浓缩胶中电泳 1 h,之后在 100 V 和分离胶中电泳 2~4 h(ATM 蛋白分子质量为 350 kD,SDS-PAGE 凝胶电泳采用 7.5% 的分离胶,同样的电压下电泳 6 h);Bio-Rad 湿转膜仪在 80 V,200 mA 条件下转膜 2~3 h(ATM 蛋白转膜 6 h);用含 3% 脱脂奶粉的 TBST 溶液 4℃封闭 2~16 h;用含 3% 脱脂奶粉的 TBST 溶液适当稀释一抗,4℃孵育过夜;用含 3% 脱脂奶粉的 TBST 溶液适当稀释二抗,室温孵育 1.5 h;用 ECL 发光试剂盒对 PVDF 膜蛋白信号曝光显色,ImageQuant350 化学发光系统照像保存实验图片。

### 1.6 统计学处理

用 Microsoft Excel 软件进行单因素多变量方差分析,得出各处理组的彗矩(μm, comet moment, CM)和彗尾面积百分率(% , tail area/comet area)的统计学分析结果,比较各组变量之间的差别;用 Microsoft Excel 软件对 DNA 损伤反应相关的基因和蛋白表达的情况进行计量资料的单因素多变量方差分析; $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 彗星实验结果

rAAV + DOX + GCV 组产生了明显的拖尾现象

(图 1A), 而 rAAV + DOX 组, rAAV + GCV 组, rAAV + DOX + GCV 组的彗矩和彗尾面积百分率远大于各对照组 ( $P < 0.05$ , 图 1B)。

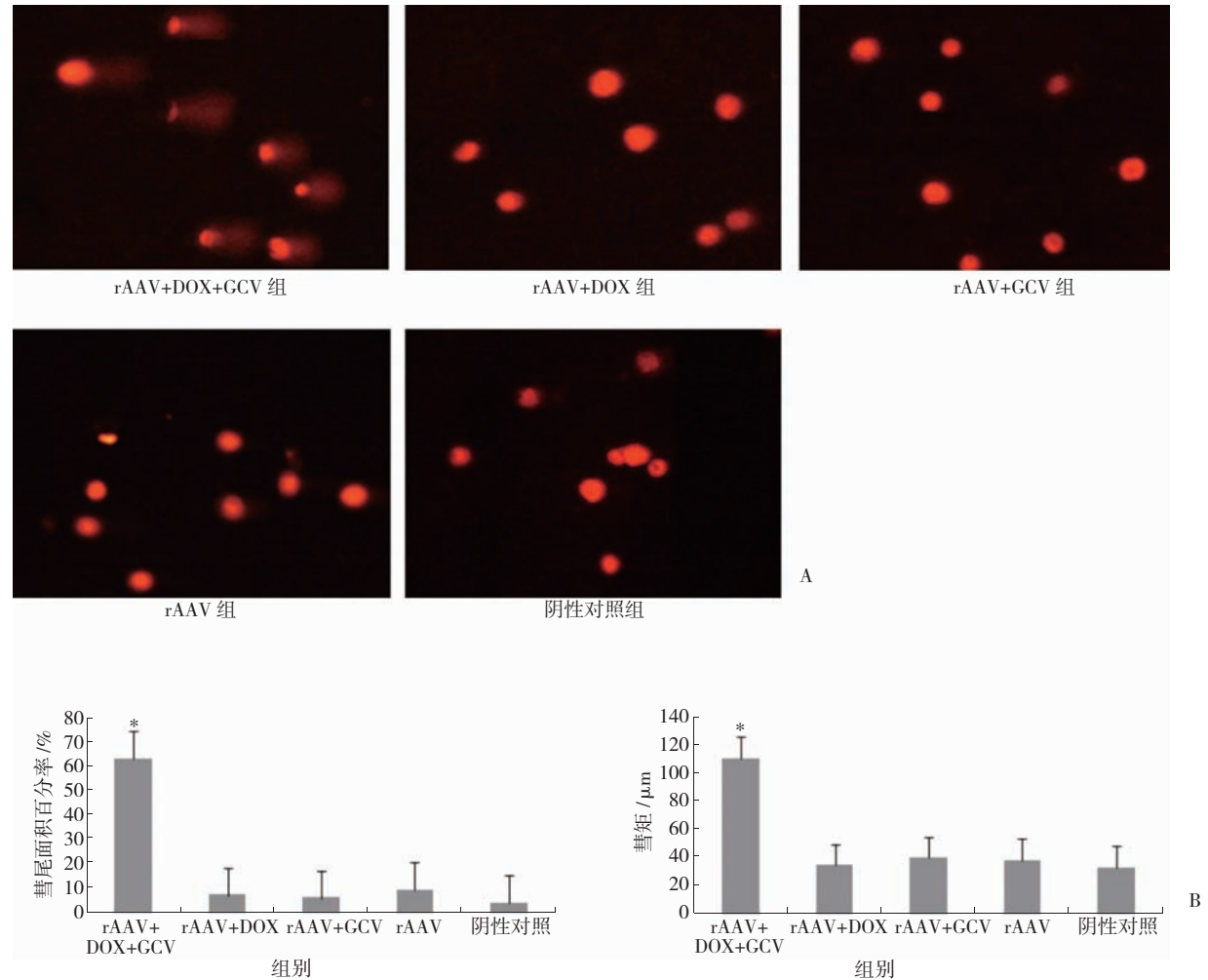


图 1 彗星实验示 DOX 诱导下 GCV 处理 MCF-7 细胞引起的 DNA 损伤情况。A: 彗星实验结果图 ( $\times 400$ ); B: 彗矩和彗尾面积百分率数据统计分析直方图 ( $\bar{x} \pm s, n = 100$ )。与各对照组比较,  $* P < 0.05$ 。

**Fig. 1 Comet assay showing levels of DNA damage of MCF-7 cell administrated with GCV under the induction of DOX.** A: Results of comet assay ( $\times 400$ ); B: Bars of data statistical analysis of comet moment and comet tail area percentage ( $\bar{x} \pm s, n = 100$ ). Compared with the controls,  $* P < 0.05$ .

## 2.2 半定量 RT-PCR 结果

实验组 rAAV + Dox + GCV 组与各对照组相比, ATM, p27 和 p53 基因的表达水平明显上调 ( $P < 0.05$ , 图 2), 而 CyclinE 和 CDK2 基因的表达水平基本维持不变 ( $P > 0.05$ , 图 2)。

## 2.3 Western 印迹结果

乳腺癌细胞株 MCF-7 经 rAAV 介导的含 Tet-On 调控元件的自杀基因治疗系统 HSV-TK/GCV 处理

后, 与各对照组相比, 损伤相关活性蛋白 ATM, P53 和 P27 表达水平明显上调, CDK2 和 CyclinE 的表达水平没有明显的变化 (图 3); 统计分析结果显示: 实验组与各对照组相比, ATM 蛋白、phospho-P53 蛋白和 P27 蛋白表达明显上调, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 蛋白 CDK2 和 CyclinE 表达水平没有明显的变化 ( $P > 0.05$ , 图 4)。

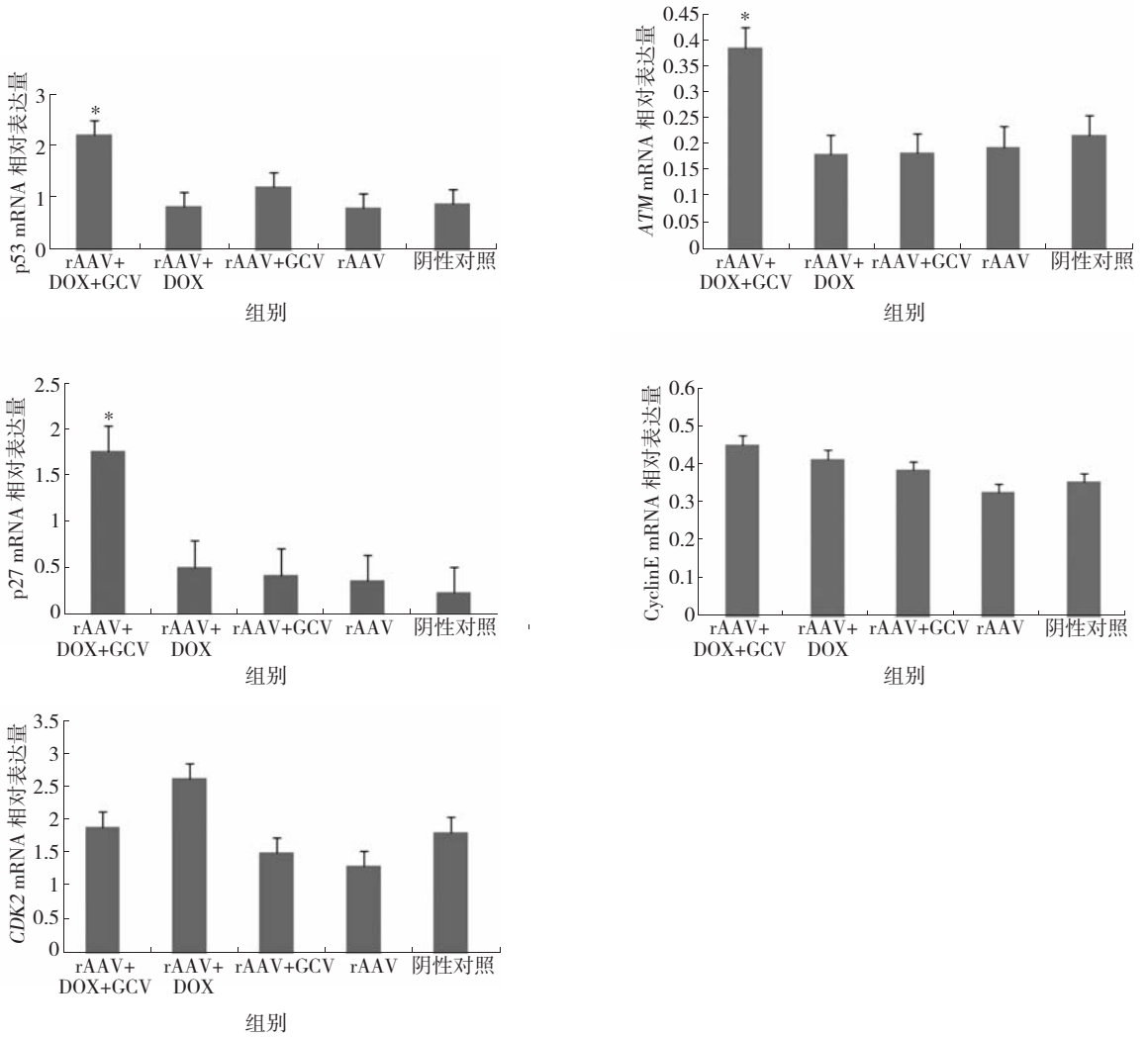


图2 RT-PCR 示 DNA 损伤相关基因的表达水平。经  $\beta$ -actin 校正分析后,RT-PCR 结果数据分析直方图( $\bar{x} \pm s$ )。与各对照组比较, \*  $P < 0.05$ 。

Fig.2 RT-PCR showing expression levels of DNA damage associated genes. Bars of data analysis of RT-PCR results by correction analysis of  $\beta$ -actin( $\bar{x} \pm s$ ). Compared with the controls, \*  $P < 0.05$ .

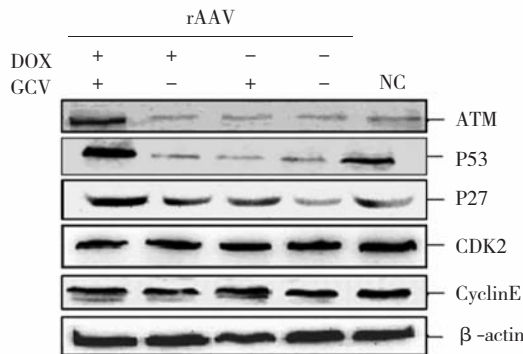


图3 Western 印迹示 DNA 损伤相关蛋白的表达水平。

Fig. 3 Western blot showing expression levels of DNA damage associated proteins.

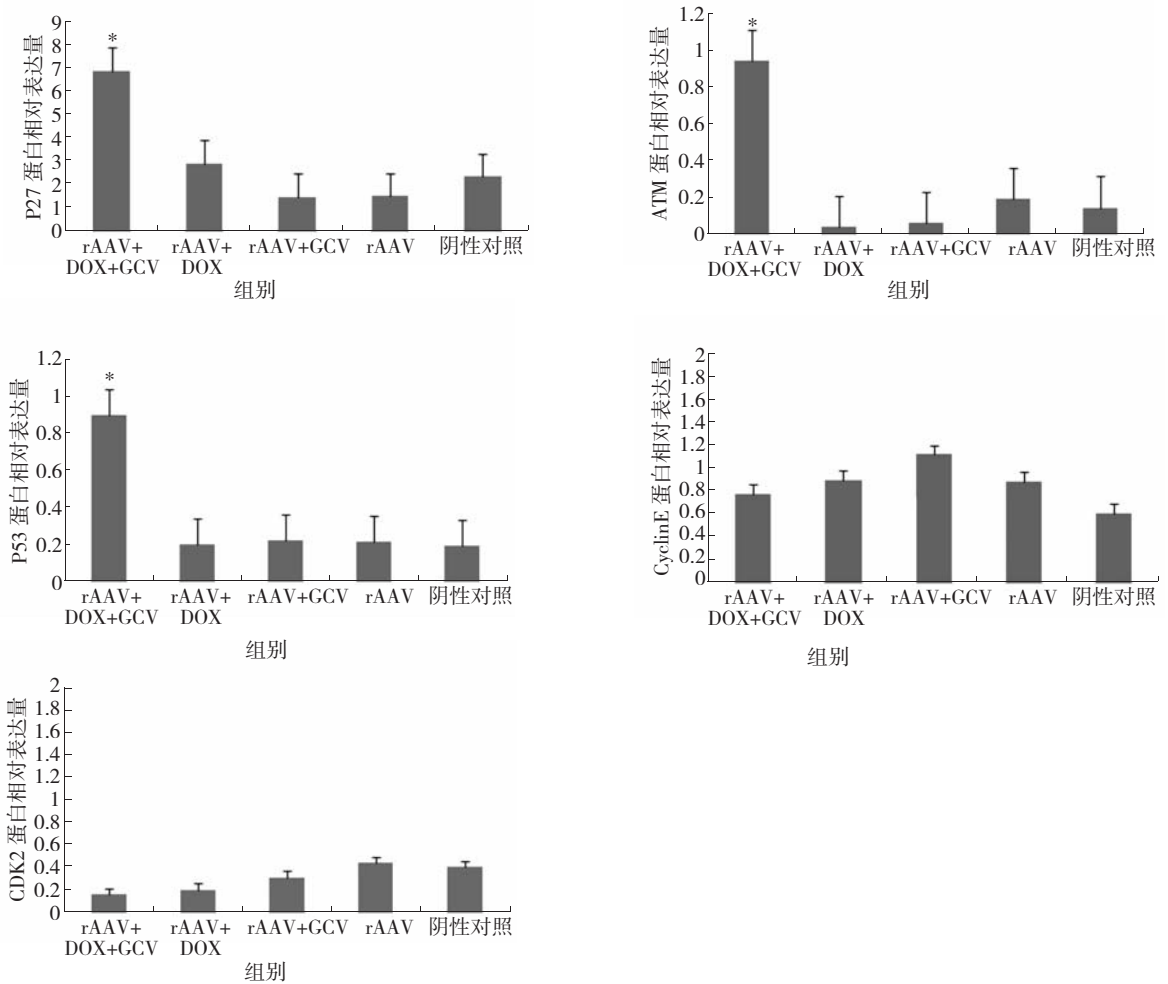


图4 经  $\beta$ -actin 校正分析后,Western 印迹结果统计直方图显示 DNA 损伤相关蛋白的表达水平( $\bar{x} \pm s$ )。与各对照组比较,  $* P < 0.05$ 。

Fig. 4 Bars of data analysis of Western blot by correction analysis of  $\beta$ -actin( $\bar{x} \pm s$ ). Compared with the controls,  $* P < 0.05$ .

### 3 讨 论

自杀基因疗法是基因治疗的策略之一,它通过转基因的方法将哺乳动物不含有的药物酶基因转入肿瘤细胞内,其表达产物可将无毒性的药物前体转化为有毒性的代谢产物,影响细胞的生物合成,最终导致细胞死亡。有效地控制外源基因的表达是基因治疗应用于临床医疗工作面临的重大难题,Gossen 等<sup>[13-14]</sup>人建立和完善了用四环素(tetracycline, Tc)来严密控制基因表达的一种高效、稳定、无毒的基因表达调控系统,称为 Tet-On 基因表达调控系统。该系统的特征是:利用原核调控元件在真核细胞中特异的定量控制外源基因的表达。在 Tet-On 调控系统中,当 DOX 存在时,可诱导目的基因的表达;当 DOX 从系统中除去后,目的基因转录关闭。本课题

组在前期工作中,利用 rAAV 介导的含 Tet-On 调控元件的 HSV-TK/GCV 自杀基因系统对乳腺癌移植瘤裸鼠进行体外调控性治疗,通过 MTT 检测、裸鼠荷瘤实验等方法证实了该自杀基因系统能够有效地杀死乳腺癌细胞<sup>[15-16]</sup>。通过进一步实验研究还发现:该系统中治疗组肿瘤细胞大量阻滞于 S 期,同时 p21 的表达上调,导致增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA), Cyclin B 和 CDK1 等在细胞内的含量降低,使细胞周期进一步受阻。利用全基因芯片检测该调控系统对乳腺癌细胞基因表达谱的影响,结果显示:rAAV + DOX + GCV 处理组细胞相较于其他各处理组细胞 246 个基因表达上调,64 个基因表达下调,其中与 DNA 复制、DNA 损伤与修复相关的基因比较多,以及很多锌指结构蛋白(数据未发表)。在本研究中,笔者结合基因芯片的结果,采用彗星实验检测 HSV-TK 自杀基因调控治疗

系统对乳腺癌细胞 MCF-7 DNA 损伤的影响。结果发现:rAAV + DOX + GCV 组处理的 MCF-7 细胞产生了明显的拖尾现象,而其他 4 个对照组基本没有拖尾现象产生。这表明在体外培养条件下,HSV-TK/GCV 自杀基因 Tet-On 调控治疗系统会造成 MCF-7 细胞的 DNA 损伤。彗星实验中的拖尾现象根据其原理解释为检测出的 DNA 单链和双链断裂片段的水平,研究证明 DNA 双链断裂是导致不可逆转的 DNA 损伤和细胞死亡的最危险的 DNA 损伤形式<sup>[17-18]</sup>。DNA 双链断裂片段能激活一系列 DNA 修复相关的分子,包括 ATM,ATR 和 DNA-PKCs<sup>[17-19]</sup>。之后 ATM 和 ATR 分别磷酸化 CHK1 和 CHK2,从而激活被损伤的 DNA 检测点通路,导致细胞周期阻滞和 DNA 损伤的修复<sup>[20]</sup>。经过基因毒性或非基因毒性应力信号如 DNA 损伤、异常生长信号的表达、化学治疗性药物、紫外光等的作用,蛋白激酶 ATM,CK1,CHK2 等可分别使 P53 的 N 端 (Ser6, Ser9, Ser15, Ser20, Ser28 等) 及 C 端一些氨基酸发生磷酸化,并最终引起细胞生长阻滞、凋亡,或适应 DNA 损伤的存活<sup>[21]</sup>。

通过选取基因芯片中的有关 DNA 损伤修复的相关基因和表达蛋白进行 RT-PCR 和 Western 印迹检测和分析,发现与 DNA 损伤有关的基因和蛋白表达明显增高,如 ATM,phospho-p53 和 p27,而 CyclinE 和 CDK2 的表达水平则基本没有变化。野生型 p53 基因是一种肿瘤抑制基因,对细胞的生长呈负调节作用,其编码的蛋白是一种核磷酸蛋白质——P53。研究发现,P53 蛋白作为一种肿瘤抑制因子,可以通过转录激活作用上调下游的信号蛋白,引起细胞周期阻滞。通常情况下,p53 是 p21 主要的转录激活者,p21 的表达水平在 G<sub>1</sub> 期 DNA 损伤的情况下会以一种 p53 依赖的方式增加。P27 是一种与 P21 相关的蛋白,作为一种 G<sub>1</sub> 期转换的负调节因子,人们认为 P27 介导了 TGF- $\beta$  诱导 G<sub>1</sub> 期阻滞,而 P27 在一定程度上可与 CyclinE 和 CDK2 结合相互作用<sup>[22]</sup>。我们知道,细胞周期的进程是通过一系列细胞周期蛋白依赖性激酶(包括被称作 CDKs 的催化亚基和被称作 Cyclins 的激活亚基)进行调节的,有序的细胞周期进程需要不同的周期蛋白及其依赖性激酶的组合在适当的时间激活和失活。还有一系列的蛋白被描述成细胞分裂的抑制因子,其中包括 P21 和 P27,它们可以通过与 Cyclin-CDK 复合物的结合起到抑制细胞周期转换作用的功能。据此推测,自杀基因系统 HSV-TK/GCV 导致乳腺癌细胞损伤效应的机制可能是 DNA 损伤激活损伤起始信号蛋白 ATM,进

而通过 ATM 的磷酸化作用激活 p53 的功能,并以一种 p53 依赖的级联反应影响下游相关基因的表达水平,即 p53 作为转录因子上调 p27 的表达,p27 通过结合 CyclinE-CDK2 复合物发挥抑制作用,从而导致了由损伤应答引起的细胞周期阻滞,使细胞周期阻滞于 G<sub>1</sub>/S,从而杀灭乳腺癌细胞。这一分子机制的研究从一个新的角度阐明了自杀基因治疗杀伤肿瘤细胞的原理,也为我们寻找肿瘤治疗新途径提供了一个新的思路和方法。

## 参考文献:

- [1] Portsmouth D, Hlavaty J, Renner M. Suicide genes for cancer therapy[J]. *Mol Aspects Med*,2007,28(1):4-41.
- [2] Moolten F L. Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy[J]. *Cancer Gene Ther*,1994,1(4):279-287.
- [3] Wang J, Lu X X, Chen D Z, et al. Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir suicide gene therapy for human pancreatic cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2004,10(3):400-403.
- [4] Ostling O, Johanson K J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,1984,123(1):291-298.
- [5] Tice R R, Agurell E, Anderson D, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing[J]. *Environ Mol Mutagen*,2000,35(3):206-221.
- [6] McKelvey-Martin V J, Green M H, Schmezer P, et al. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review[J]. *Mutat Res*,1993,288(1):47-63.
- [7] Collins A R, Fleming I M, Gedik C M. In vitro repair of oxidative and ultraviolet-induced DNA damage in supercoiled nucleoid DNA by human cell extract[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994,1219(3):724-727.
- [8] Olive P L, Banáth J P. Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA cross-linking agent[J]. *Exp Cell Res*,1995,221(1):19-26.
- [9] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. *Exp Cell Res*, 1988,175(1):184-191.
- [10] Olive P L, Wlodek D, Banáth J P. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis [J]. *Cancer Res*, 1991,51(17):4671-4676.
- [11] Saha D T, Davidson B J, Wang A, et al. Quantification of DNA repair capacity in whole blood of patients with head and neck cancer and healthy donors by comet assay[J]. *Mutat Res*,2008,650(1):55-62.
- [12] Olive P L, Banáth J P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells[J]. *Nat Protoc*,2006,1(1):23-29.

- [13] Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992,89(12):5547-5551.
- [14] Gossen M, Freundlieb S, Bender G, et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells[J]. Science, 1995, 268(5218):1766-1769.
- [15] 陈迁, 李子博, 曾赵军, 等. Tet-On 调控 HSV-TK 表达的重组腺相关病毒载体的构建和感染活性的检测[J]. 生物工程学报, 2005, 21(3): 360-364.  
CHEN Qian, LI Zibo, ZENG Zhaojun, et al. The construction of recombinant AAV vector expressing HSV-TK gene controlled by Tet-On and the detection of its activity[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2005, 21(3):360-364.
- [16] Li Z B, Zeng Z J, Chen Q, et al. Recombinant AAV-mediated HSV-TK gene transfer with direct intratumoral injections and Tet-On regulation for implanted human breast cancer[J]. BMC Cancer, 2006, 6(1):66.
- [17] Beckman H J, Trego K S, Turchi J J. Cisplatin sensitizes cancer cells to ionizing radiation via inhibition of nonhomologous end joining[J]. Mol Cancer Res, 2005, 3(5):277-285.
- [18] Siddik Z H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance[J]. Oncogene, 2003, 22(47):7265-7279.
- [19] Petrini J H, Stracker T H. The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators [J]. Trends Cell Biol, 2003, 13(9):458-462.
- [20] Reinhardt H C, Aslanian A S, Lees J A, et al. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage[J]. Cancer Cell, 2007, 11(2):175-189.
- [21] Colman M S, Afshari C A, Barrett J C. Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress[J]. Mutat Res, 2000, 462(2/3):179-188.
- [22] Polyak K, Kato J Y, Solomon M J, et al. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest[J]. Genes Dev, 1994, 8(1):9-22.

(本文编辑 郭征)

## 欢迎订阅 2012 年《中南大学学报(医学版)》

《中南大学学报(医学版)》原名《湖南医科大学学报》,创刊于 1958 年,为教育部主管、中南大学主办的医药卫生类综合性学术期刊。该刊已被美国医学文献分析和联机检索系统(Medline, Pubmed)及其《医学索引》(IM)、荷兰《医学文摘》(EM)、美国《化学文摘》(CA)、WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM)、中国科学引文数据库(核心库)(CSCD)等国内外多家重要数据库和权威文摘期刊收录;是中国科技论文统计源期刊、中文核心期刊及中国期刊方阵“双效”期刊;为“第 2 届、第 3 届中国高校精品科技期刊”、“2008 年中国精品科技期刊”和湖南省“十佳科技期刊”。

本刊为月刊,国际标准开本(A4 幅面),每月月末出版。内芯采用进口亚光铜版纸印刷,图片彩色印刷。定价 20 元/册,全年 240 元。国内外公开发售。国内统一刊号:CN43-1427/R,国际标准刊号:ISSN 1672-7347;国内邮发代号:42-10,国外邮发代号:BM422;欢迎新老用户向当地邮局(所)订阅,漏订或需增订者也可直接与本刊编辑部联系订阅。

### 欢迎投稿

### 欢迎订阅

地址:湖南省长沙市湘雅路 110 号湘雅医学院 75 号信箱

邮编:410078

电话:0731-84805495, 0731-84805496

传真:0731-84804351

E-mail:xyxb2005@vip.163.com, xyxb2005@126.com

Http://www.csumed.org;http://xyxb.xysm.net