

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2008)03-0233-05

pGL3-hTERT-tk/GCV 对胃癌细胞的促凋亡作用

邓志华^{1*}, 杨长青¹, 王桂琴², 王晶晶²(1. 山西医科大学第二医院消化科, 山西太原 030001; 2. 山西医科大学基础医学院微生物与免疫学教研室, 山西太原 030001)

[摘要] 目的: 探讨重组质粒 pGL3-hTERT-tk/GCV 对胃癌细胞的促凋亡作用。方法: 以基因工程方法构建重组质粒 pGL3-hTERT-tk 和相应的荧光报告质粒 pGL3-hTERT-tk-Luc⁺; 脂质体 LipofectamineTM2000 瞬时转染胃癌细胞系 SGC-7901 并用 GCV 干预, 荧光显微镜观察细胞形态变化和转染效率, TUNEL 标记和流式细胞术观察转染后胃癌细胞的凋亡; 以上实验均以正常肝细胞 L-02 为对照。结果: 经鉴定, 重组质粒 pGL3-hTERT-tk 中 tk 片段的长度为 1 100 bp。荧光素酶标记的阳性、阴性对照及治疗报告质粒 pGL3-hTERT-tk-Luc⁺ 均能有效转染高表达端粒酶活性的胃癌细胞 SGC-7901, 转染效率为(8.2 ± 1.14)%。重组质粒转染胃癌细胞后与 GCV 共育 4 d, 细胞的凋亡率为(60.0 ± 1.56)%; 被 pGL3-hTERT-tk 转染的肿瘤细胞细胞周期发生了变化, 处于细胞周期早期的细胞大量凋亡, 早期凋亡率为(47.1 ± 1.35)%。结论: pGL3-hTERT-tk/GCV 对胃癌细胞有强烈的杀伤作用, 但不影响正常细胞的生长, 有潜在临床应用前景。

[关键词] 胃癌; 基因治疗; hTERT 启动子; 自杀基因; 单纯疱疹病毒胸苷激酶

[中图分类号] R735.2; R730.54

[文献标志码] A

Pro-apoptosis effect of pGL3-hTERT-TK/GCV on gastric cancer cells

DENG Zhi-hua¹, YANG Chang-qing, WANG Gui-qin², WANG Jing-jing²(1. Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Department of Microbiology and Immunology, Preclinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the pro-apoptosis effect of pGL3-hTERT-tk/GCV on human gastric cancer cells *in vitro*. **Methods:** Recombinant plasmid pGL3-hTERT-tk and the corresponding reporter plasmid pGL3-hTERT-tk-Luc⁺ were constructed by gene engineering. The recombinant plasmids were then used to transiently transfect gastric cancer cells SGC-7901 *via* LipofectamineTM2000 and was intervened by GCV. Fluorescence microscope was used to observe the changes of cell morphology and the transfection efficiency. Cell apoptosis was examined by TUNEL labeling and the apoptosis rate was determined by flow cytometry. Normal hepatic cells L02 were used as control in all experiments. **Results:** The length of tk of therapeutic plasmid pGL3-hTERT-tk was 1 100 bp. pGL3-control-tk-Luc⁺, pGL3-basic-tk-Luc⁺ and pGL3-hTERT-tk-Luc⁺ all could effectively transfect SGC-7901 cells with high telomerase activity, with the transfection rate being (8.2 ± 1.14)%. After SGC-7901 was transfected with therapeutic pGL3-hTERT-tk and cultured with GCV for 4 d, the apoptosis rate was (60.0 ± 1.56)% and cell cycle also significantly changed; more cells at the early stage of cell cycle became apoptotic, with an apoptosis rate of (47.1 ± 1.35)%. **Conclusion:** pGL3-hTERT-tk has strong killing effect against gastric cancer cells and has no influence on the growth of normal cells, showing a potential in future clinical application.

[Key words] gastric cancer; gene therapy; h-TERT promoter; suicide gene; herpes simplex virus-thymidine kinase

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(3): 233-237]

与传统的肿瘤治疗方法相比, 自杀基因治疗对机体损伤小, 而且对晚期肿瘤、转移瘤均有效, 有潜在临床应用前景。单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus-thymidine kinase, HSV-tk)在细胞内的代谢产物具有抑制肿瘤细胞 DNA 聚合酶作用, 其次 HSV-tk 还具有独特的旁观者效应(bystander effect)。Gillian^[1]曾将自杀基因导入胰腺癌细胞, 发

现虽然导入效率只有 5%, 但 78% 的肿瘤细胞死亡,

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30672405), 山西省青年科技基金(No. 20001028)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30672405); Young Scholar Science and Technology Foundation of Shanxi Province (No. 20001028)

[作者简介] 邓志华(1963-), 女, 山西省大同市人, 博士, 教授, 主要从事肿瘤基因治疗方面的研究

* Corresponding author. E-mail: ykdzh@yahoo.com.cn

由此可见旁观者效应在自杀基因治疗中的威力。

大量研究^[2-4]发现,85%以上的肿瘤细胞表达端粒酶活性而正常组织细胞不表达,端粒酶在胃癌细胞中也有很高活性。Song等^[5]在卵巢癌、肺癌的研究中在端粒酶催化亚单位(hTERT)核心启动子下游插入自杀基因,发现自杀基因在这些肿瘤细胞中能特异高表达。因此可以设想利用胃癌细胞中特异的端粒酶启动子来驱动自杀基因表达而实现靶向治疗胃癌的目的。

本实验尝试将hTERT驱动的自杀基因tk导入胃癌细胞,观察胃癌细胞中hTERT对HSV-tk的驱动作用及胃癌细胞的结局,并探讨自杀基因靶向抗胃癌的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验用细胞和试剂

胃癌细胞SGC-7901购自武汉医科大学细胞所,正常肝细胞L02为本科室保存。更昔洛韦(ganciclovir, GCV)为Sigma公司产品。T4 DNA连接酶、限制性内切酶、JM109大肠杆菌、DNA Marker等均为Takara公司产品。LipofectamineTM2000脂质体购自Invitrogen公司。小量质粒抽提试剂盒为天根公司产品。pGL3-control(SV40启动子驱动的Luc⁺质粒)、pGL3-basic(无启动子驱动的Luc⁺的质粒)荧光素酶质粒、荧光素酶检测试剂盒购自美国Promega公司。TUNEL凋亡检测试剂盒为凯基公司产品。含hTERT启动子和自杀基因tk的pGL3-hTERT-tk质粒由韩国大学Song教授赠送。

端粒酶检测使用的TRAP试剂和ELISA试剂均为宝灵曼公司产品。

1.2 细胞培养和质粒重组

胃癌细胞系SGC-7901、正常肝细胞L02常规培养在含10%胎牛血清、3.7 g/L NaHCO₃、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素的高糖DMEM培养液中,37℃、5% CO₂湿润培养。治疗质粒pGL3-hTERT-tk转染感受态的JM109大肠杆菌,筛选阳性克隆、扩增,抽提纯化质粒,用限制性内切酶Hind III和Xba I酶切pGL3-hTERT-tk质粒中tk基因片段,再用同样的酶切pGL3-basic和pGL3-control中的Luc⁺基因片段,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。将tk基因片段插入到pGL3-basic和pGL3-control质粒中Luc⁺基因片段的相应酶切位点,构建成pGL3-basic-tk质粒和pGL3-control-tk质粒(作为pGL3-hTERT-tk治疗质粒的阴性、阳性对照);随后将Luc⁺基因片段插入到hTERT启动子的下游,构建成

功pGL3-hTERT-Luc⁺荧光报告质粒。

1.3 质粒转染

采用脂质体LipofectamineTM2000将荧光报告质粒pGL3-hTERT-tk-Luc⁺、治疗质粒pGL3-hTERT-tk、阴性对照pGL3-basic-tk、阳性对照pGL3-control-tk分别转染SGC-7901和L02细胞。转染前24 h在12孔板中每孔加入4×10⁵/ml细胞于1 ml不含抗生素的DMEM培养液中培养,转染时用100 μl不含血清的DMEM培养液分别稀释Lipofectamine2000和上述4种质粒,质粒(μg)和Lipofectamine2000(μl)两者的比例为1:2.5,室温放置5 min后将两者混合均匀,室温孵育30 min以上。将上述4种脂质体质粒混合物分别加入到不含血清的细胞培养孔中,摇匀,置于5% CO₂、37℃培养箱培养,6 h后弃去无血清培养液,换为含10%胎牛血清的DMEM培养液,24 h后给转染有治疗质粒的细胞换50 μg/ml GCV的10%胎牛血清培养液。基因转染效率测定:转染后48 h调整细胞密度为(100~200)×10⁷/L,2.5 g/L胰酶消化,血球计数板普通视野下计细胞数A,荧光镜相同视野计荧光细胞数a,转染效率(%)=a/A×100%。

1.4 SGC-7901和L-02细胞荧光素酶表达的检测

用细胞刮收集转染有pGL3-hTERT-Luc⁺荧光报告质粒的SGC-7901和L02细胞,细胞裂解液裂解,此间可做1次细胞冻融循环,10 000×g离心20 min后取上清,上清即含有转染细胞表达的荧光素酶产物,加100 μl的荧光素酶检测底物,2 s后在荧光显微镜下观察,拍照。

1.5 TRAP-PCR-ELISA^[6]检测细胞端粒酶活性

(1)细胞标本制备:1×10⁶培养细胞PBS洗2次,加裂解液200 μl,冰浴120 min,16 000×g低温离心20 min,取上清175 μl,置液氮保存,同时测蛋白含量。(2)TRAP-PCR-ELISA:取细胞抽提液2 μl,加入TRAP反应液25 μl,DEPC水23 μl,PCR扩增反应为:25℃30 min,94℃5 min,循环1次;再以94℃30 s、50℃30 s、72℃90 s共循环30个周期,最后72℃延伸10 min。(3)端粒酶活性定性检测(聚丙烯酰胺凝胶-银染法):PCR产物加等量氯仿-异戊醇抽提,乙酸钠、无水乙醇沉淀,双蒸水溶解DNA后电泳,硝酸银显色。(4)ELISA法定量检测端粒酶活性:PCR产物5 μl,加变性液20 μl混匀,室温作用10 min,加入杂交液225 μl充分混匀后取出100 μl加入MTP包被的微量反应板中,37℃孵育2 h,弃杂交液,向每一孔加入100 μl抗地高辛过氧化物酶(浓度为0.5 U/ml),室温20 min

加入终止液,在酶标仪上测 450 nm、690 nm 波长的光密度值,端粒酶活性等于 $D_{450} - D_{690}$ 。

1.6 TUNEL 法及流式细胞术检测质粒转染前后 SGC-7901 和 L02 细胞的凋亡

质粒转染前 24 h, 4×10^5 /ml 细胞在 Nuclun 6 孔培养板进行细胞爬片,第 2 天按照脂质体转染方法用 pGL3-hTERT-tk 质粒转染 SGC-7901 和 L02 细胞,常规培养。24 h 后每天更换 50 μ g/ml GCV 培养液继续培养。4 d 后取出爬片细胞,进行固定、通透、TUNEL 标记反应,最后苏木精染色,封片,拍照。同时用不含 GCV 培养液培养的 SGC-7901 和 L02 做对照。

细胞转染 4 d 后,胰酶消化收集 12 孔板中转染有 pGL3-hTERT-tk、pGL3-control-tk 和 pGL3-basic-tk 3 种质粒的 SGC-7901 及 L02 细胞,3 000 $\times g$ 离心 5 min, PBS 洗涤 2 次。一组细胞直接用 Annexin V-FITC/PI 双标记检测;另一组 4 $^{\circ}$ C、70% 乙醇固定 2 h 以上,离心去除乙醇,再用碘化丙啶(PI)染色,流式细胞术检测各组细胞凋亡率和细胞周期分析。

1.7 统计学处理

资料分别经 Cellquest 软件和 Modfit 软件收集和分析,组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 SGC-7901 和 L02 细胞的端粒酶活性

TRAP-ELISA 定性检测结果显示,胃癌细胞表达端粒酶活性而正常肝细胞 L02 不表达。图 1 中可见聚丙烯酰胺凝胶电泳胃癌细胞裂解液扩增后出现以 6 bp 递增的 Ladder,进一步证实胃癌细胞 SGC-7901 表达端粒酶活性而正常肝细胞 L02 不表达。

2.2 治疗质粒的酶切电泳鉴定

pGL3-hTERT-tk 质粒 37 $^{\circ}$ C、限制性内切酶酶切 4 h 的产物经琼脂糖凝胶电泳,在 300 bp、1 100 bp 位置出现 2 个清晰条带,与 tk 片段长度相吻合(图 2)。hTERT 促进子位于 -204 ~ +56,这一区域含有核促进子和 2 个 E-boxes。

2.3 质粒转染后 SGC-7901 和 L02 荧光素酶基因的表达

pGL3-hTERT-Luc⁺ 质粒分别转染 SGC-7901 与 L02 细胞,10 h 后荧光显微镜下观察,绿色荧光只在端粒酶阳性的 SGC-7901 细胞中出现,L02 不表达端粒酶活性,没有观察到绿色荧光(图 3)。说明端粒酶启动子能通过 hTERT 促进子驱动下游基因的表达。pGL3-hTERT-Luc⁺ 质粒转染 SGC-7901 的效率为 $(8.2 \pm 1.14)\%$ 。

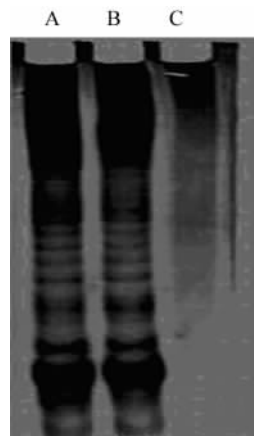


图 1 SGC-7901 和 L-02 细胞的端粒酶活性

Fig. 1 Telomerase activity in SGC-7901 and L02 cell lines

A: K-562 cells; B: SGC-7901 cells; C: L-02 cells

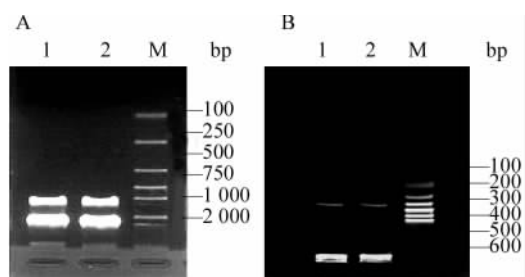


图 2 重组质粒 pGL3-hTERT-tk 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pGL3-hTERT-tk plasmid by enzyme digestion

A: The tk fragment digested by Hind III and Xba I; B: The hTERT fragment digested by Hind III and Bgl III; M: DNA marker DL2 000(100 - 2 000), DNA marker DL600(100 - 600); A1, A2: tk fragment; B1, B2: hTERT fragment

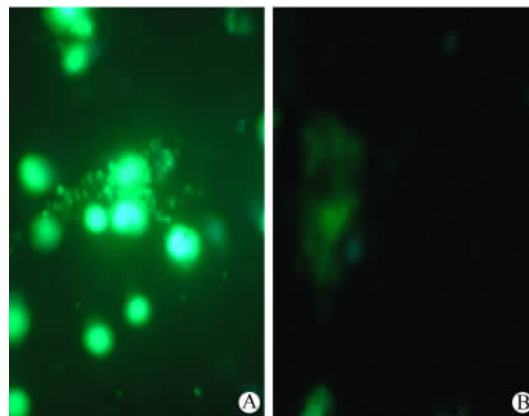


图 3 质粒转染后 SGC-7901 和 L02 细胞荧光素酶基因的表达($\times 800$)

Fig. 3 Expression of luciferase gene in SGC-7901 and L-02 cells transfected with pGL3-hTERT-Luc⁺ under fluorescence microscope($\times 800$)

A: SGC-7901 cells; B: L-02 cells

2.4 重组质粒转染后 SGC-7901 和 L02 细胞凋亡的 TUNEL 检测结果

TUNEL 法可以对单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色,准确反映细胞凋亡最典型的生化和形态特征。TUNEL 染色后光镜显示,转染 pGL3-hTERT-Luc⁺ 质粒的 SGC-7901 被染成棕色,说明细胞发生了凋亡(图 4 A)。GCV 进一步作用 4 d 后 SGC-7901 细胞凋亡率为(60.0 ± 1.56)%;而未被 GCV 作用的 SGC-7901 细胞凋亡率只有(15.1 ± 1.67)%;pGL3-basic-tk 质粒不含 hTERT 启动子,tk 不被表达,细胞生长不受影响,呈白色透明状态(图 4 B),未观察到细胞凋亡;L02 肝细胞无论何种质粒转染及是否 GCV 干预,细胞生长均不受影响也未观察到凋亡。

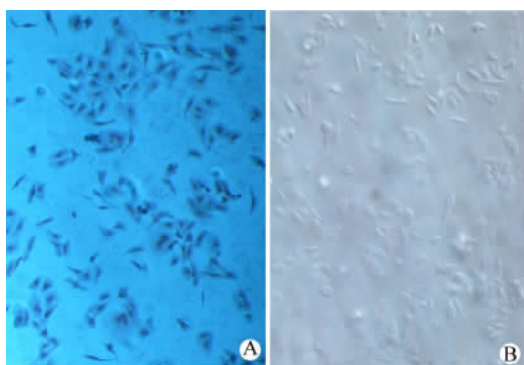


图 4 TUNEL 检测 SGC-7901 细胞转染质粒后的凋亡状态(×800)

Fig. 4 Apoptosis of SGC-7901 cells after treatment with recombinant plasmid by TUNEL(×800)

A: hTERT-tk/GCV(+) transfected SGC-7901;

B: hTERT-tk/GCV(-) transfected SGC-7901

2.5 细胞凋亡的流式细胞术检测结果

Annexin V 与 PI 匹配使用染色后,流式细胞术可将细胞清楚地分为处于凋亡早期及凋亡晚期的细胞。流式细胞术结果显示 pGL3-hTERT-tk、pGL3-Control-tk 转染的 SGC-7901 细胞经 GCV 作用 4 d 的凋亡率分别为(60.0 ± 1.56)%和(69.6 ± 1.93)%,肝细胞 L02 的凋亡率分别为(14.5 ± 0.27)%和(20.3 ± 1.46)%,pGL3-basic-tk 质粒作用的胃癌细胞与 L02 细胞凋亡率很低,分别为(11.8 ± 1.18)%和(11.6 ± 2.06)%。方差分析结果显示:pGL3-hTERT-tk、pGL3-control-tk 致 SGC-7901 细胞的凋亡率显著高于 pGL3-basic-tk(P < 0.01);而对 L02 无明显致凋亡作用,与 pGL3-basic-tk 相似(表 1)。

3 讨论

胃癌发生是幽门螺杆菌感染、不良饮食习惯、遗传背景等综合因素作用造成的细胞永生化和无限恶性增殖的结果,因此遏制肿瘤细胞的生长和永生化才是治愈和延长胃癌患者生存期的关键^[7]。端粒酶能延长染色体末端端粒序列的合成,在细胞永生化和恶变中起决定性作用^[8]。目前人端粒酶中的 3 个亚单位基因已被克隆,其中端粒酶催化亚单位(hTERT)是端粒酶活性的限速因素,hTERT 的高表达依赖于 hTERT 启动子在肿瘤细胞中的高转录^[9]。利用端粒酶催化亚单位 hTERT 启动子在胃癌细胞中高转录的特点^[10],本课题构建了通过端粒酶启动子驱动的促进子-自杀基因表达质粒 pGL3-hTERT-tk,后者转染胃癌细胞后在肿瘤细胞自身端粒酶启动子的作用下启动端粒酶催化亚单位表达,再通过催化亚单位促进子的作用驱动自杀基因 tk 高表达。

表 1 流式细胞术检测转染不同重组质粒后 SGC-7901 和 L02 细胞的凋亡(%)

Tab. 1 Apoptosis of SGC-7901 and L02 cells after transfected with different plasmids by flow cytometry

Group	SGC-7901		L02	
	Early apoptosis	Late apoptosis	Early apoptosis	Late apoptosis
pGL3-hTERT-tk	47.1 ± 1.35**	13.0 ± 0.21	6.9 ± 0.15	7.6 ± 0.12
pGL3-control-tk	60.3 ± 1.61**	9.3 ± 0.32	9.8 ± 1.19	10.5 ± 0.27
pGL3-basic-tk	5.1 ± 1.01	6.7 ± 0.17	5.3 ± 1.95	6.3 ± 0.11

** P < 0.01 vs pGL3-basic-tk

本实验构建的 3 种质粒分别是 pGL3-hTERT-tk、pGL3-control-tk 和 pGL3-basic-tk, hTERT-tk 中的启动子为表达端粒酶活性的肿瘤细胞本身的催化亚单位启动子序列;Control-tk 中的启动子为具有强烈

驱动作用的 SV40, Basic-tk 不含启动子序列。外源基因(除少数癌基因外)转染入细胞后,绝大多数转染基因对细胞形态学、细胞增殖等生物学特性无显著影响,无法鉴定外源基因是否导入受体细胞^[10]。

为解决这一问题,在所构建质粒的启动子下游插入荧光素酶报告基因,使被转染的基因在细胞中可以发出荧光而便于观察。结果显示:pGL3-control-Luc⁺、pGL3-hTERT-tk-Luc⁺转染胃癌细胞后荧光显微镜下显示强烈荧光,表明hTERT、SV驱动的tk能在胃癌细胞中高表达,即pGL3-hTERT-tk、pGL3-control-tk都能转染胃癌细胞SGC-7901(图3);而pGL3-basic-Luc⁺在荧光显微镜下无绿色荧光,其原因为basic-tk没有启动子序列,不能驱动下游荧光素酶报告基因的表达。

治疗质粒转染胃癌细胞后再用含有50 μg/ml的GCV作用,可见胃癌细胞SGC-7901出现凋亡的特征性变化:细胞核染色质边集、细胞核浓缩,继而核碎裂形成凋亡小体。胃癌细胞凋亡指数达到(60.0 ± 1.56)%。转染细胞培养液中加入的GCV本身对细胞无毒性,但自杀基因的tk蛋白能将细胞内非毒性的GCV转化为高毒性的三磷酸GCV,后者为DNA合成的链终止因子和DNA聚合酶抑制剂^[12]。正是这一毒性产物在细胞内的作用造成大量胃癌细胞的自杀死亡。

实验中显示,荧光素酶报告质粒显示的转染效率为8.21%,虽然转染效率低,仍有大量细胞发生凋亡,其原因为邻近未被转染的胃癌细胞吞噬了死亡细胞的碎片,后者含有细胞毒性GCV,被细胞吞噬后致使细胞中毒死亡,为旁观者效应^[14]。

本实验利用Annexin V与PI双染色发现,pGL3-hTERT-tk主要对处于细胞周期早期的胃癌细胞有促进凋亡的作用,细胞周期早期凋亡指数达到47.08%,是细胞周期晚期凋亡指数的3倍。流式细胞术的研究结果还显示,pGL3-hTERT-tk转染后的胃癌细胞细胞周期比例发生了显著变化,即S期细胞百分数增加而G₂/M期比例下降,说明发生凋亡的细胞为处于分裂增殖状态的细胞,而生长受阻于G₂/M期的细胞凋亡率低。pGL3-hTERT-tk对细胞周期改变的调控机制还需要进一步研究。

Daniel等^[15]曾在临床研究中应用HSV-tk自杀基因治疗了21例恶性胸膜间皮瘤患者,有2例患者的生存期超过了6.5年。本研究利用胃癌细胞已经开启的特异性hTERT启动子驱动自杀基因高效表达,使肿瘤细胞自杀死亡而不影响正常细胞生长。自杀基因治疗胃癌可能有潜在临床应用前景,值得进一步研究。

[参考文献]

[1] Gilliam AD, Watson SA. Emerging biological therapies for pancre-

atic carcinoma[J]. Eur J Surg Oncol, 2002,28(4): 370-378.

- [2] Kelland L. Targeting the limitless replicative potential of cancer: the telomerase/telomere pathway[J]. Clin Cancer Res, 2007,13(17): 4960-4963.
- [3] 卫立辛,吴孟超. 端粒酶:肿瘤治疗研究的新希望[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2008,13(5): 325-328.
- [4] Gümüş-Akay G, Unal AE, Bayar S. Telomerase activity could be used as a marker for neoplastic transformation in gastric adenocarcinoma: but it does not have a prognostic significance[J]. Genet Mol Res, 2007,15;6(1): 41-49.
- [5] Song JS. Adenovirus-mediated suicide SCLC gene therapy using the increased activity of the hTERT promoter by the MMRE and SV40 enhancer[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2005, 69(1), 56-62.
- [6] 邓志华,韩子岩,王琦. 抑制端粒酶活性对As₂O₃诱导肝癌细胞凋亡的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006, 13(6): 457-461.
- [7] Fujiwara T, Kagawa S, Kishimoto H, et al. Enhanced antitumor efficacy of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent OBP-401 with docetaxel: preclinical evaluation of chemovirotherapy[J]. Int J Cancer, 2006, 119(2): 432-440.
- [8] Yu J, Guo QL, You QD, et al. Repression of telomerase reverse transcriptase mRNA and hTERT promoter by gambogic acid in human gastric carcinoma cells[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2006, 58(4): 434-443.
- [9] Deng WG, Jayachandran G, Wu G, et al. Tumor-specific activation of human telomerase reverses transcriptase promoter activity by activating enhancer-binding protein-2beta in human lung cancer cells[J]. J Biol Chem, 2007, 282(36): 26460-264670.
- [10] Tani N, Ichikawa D, Ikoma D, et al. Circulating cell-free mRNA in plasma as a tumor marker for patients with primary and recurrent gastric cancer[J]. Anticancer Res, 2007, 27(2): 1207-1212.
- [11] Irving J, Wang Z, Powell S et al. Conditionally replicative adenovirus driven by the human telomerase promoter provides broad-spectrum antitumor activity without liver toxicity[J]. Cancer Gene Ther, 2004, 11(3): 174-185.
- [12] Willmon CL, Krabbenhoft E, Black ME. A guanylate kinase/HSV-1 thymidine kinase fusion protein enhances prodrug-mediated cell killing[J]. Gene Ther, 2006, 13(17): 1309-1312.
- [13] Wang YZ, Feng ZQ. Induction of apoptosis by L-NMMA, via FKHL1/ROCK pathway in human gastric cancer cells[J]. Biomed Environ Sci, 2006, 19(4): 285-2891.
- [14] Pastorakova A, Hlubinova K, Jakubikova J, et al. Combine cancer gene therapy harnessing plasmids expressing human tumor necrosis factor alpha and Herpes simplex thymidine kinase suicide gene[J]. Neoplasma, 2006, 53(5): 353-62.
- [15] Serman DH, Recio A, Vachani A, et al. Long-term follow-up of patients with malignant pleural mesothelioma receiving high-dose adenovirus herpes simplex thymidine kinase/Ganciclovir suicide gene therapy[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(20): 7444-7453.

[收稿日期] 2008-02-21

[修回日期] 2008-04-15

[本文编辑] 王莹