

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.014

## 5HRE 增强子和 hTERT 启动子联合调控 CDX2 基因对人结肠癌细胞系 LoVo 增殖的抑制

贺赛, 郑见宝<sup>△</sup>, 孙学军, 陈南征, 周培华, 魏光兵, 王晖, 姚建锋, 张立, 贾蓬勃(西安交通大学医学院第一附属医院 普通外科 陕西 西安 710061)

**[摘要]** **目的:**检测已构建的缺氧反应元件(hypoxia response element, HRE)和人端粒酶催化亚单位(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)启动子调控 CDX2 基因表达的载体 pLVX-5HRE-hTERTp-CDX2-3FLAG(5HhC)对人结肠癌细胞系 LoVo 增殖的影响。**方法:**复苏前期筛选的转染 pLVX-hTERTp-CDX2-3FLAG(hC)的 LoVo 细胞(hC/LoVo)、转染 pLVX-5HRE-hTERTp-3FLAG(5Hh)的 LoVo 细胞(5Hh/LoVo)、转染 pLVX-5HRE-hTERTp-CDX2-3FLAG(5HhC)的 LoVo 细胞(5HhC/LoVo)及空白 LoVo 细胞,各组细胞均在常氧条件和缺氧条件(加入缺氧模拟剂 CoCl<sub>2</sub>)展开实验。MTT 检测细胞增殖情况,平板克隆实验观察细胞集落形成,流式细胞术分析细胞周期。**结果:**成功复苏转染 5HhC 的 LoVo 细胞及各组对照 LoVo 细胞。hC/LoVo、5HhC/LoVo 细胞增殖显著低于 LoVo 及 5Hh/LoVo,且缺氧微环境下的 5HhC 对于 LoVo 细胞的增殖速度抑制更为明显[细胞增殖率,第 5 天,常氧 vs 缺氧:(48.62 ± 3.32)% vs (36.81 ± 2.83)%, P < 0.05;第 7 天,常氧 vs 缺氧:(56.44 ± 2.28)% vs (38.51 ± 3.21)%, P < 0.05]。hC/LoVo、5HhC/LoVo 组的平板克隆数显著低于 LoVo 及 5Hh/LoVo 组,且缺氧微环境下的 5HhC 对 LoVo 细胞集落形成能力的抑制较常氧环境下更为显著[集落数:(44.2 ± 3.5)个 vs (90.8 ± 9.3)个, P < 0.05];hC/LoVo、5HhC/LoVo 组 G<sub>1</sub> 期细胞比例较 LoVo 细胞及 5Hh/LoVo 组明显提高[(63.59 ± 0.55)%、(64.82 ± 2.22)% vs (51.38 ± 0.70)%、(51.59 ± 0.38)%, P < 0.05],且在缺氧微环境下,5HhC/LoVo 组 G<sub>1</sub> 期细胞比例提高更加显著[(71.38 ± 3.02)% vs (64.82 ± 2.22)%, P < 0.05]。**结论:**治疗载体 5HhC 可使人结肠癌细胞系 LoVo 发生 G<sub>1</sub> 期阻滞,增殖及集落形成能力受到抑制,且在缺氧诱导下 5HhC 的抑制能力更为显著。

**[关键词]** 基因治疗;结肠癌;缺氧;CDX2 基因;细胞增殖

**[中图分类号]** R735.3<sup>+</sup>5; R730.59

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2014)03-0314-06

## Effects of a hypoxia-induced, tumor-specific gene therapy vector on proliferation of human colon carcinoma cell line LoVo Human colon adenocarcinoma cell line

He Sai, Zheng Jianbao<sup>△</sup>, Sun Xuejun, Chen Nanzheng, Zhou Peihua, Wei Guangbing, Wang Hui, Yao Jianfeng, Zhang Li, Jia Pengbo (Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

**[Abstract]** **Objective:** Homeobox transcription factor 2 (CDX2) has been described as a colorectal tumor suppressor. This study aimed to evaluate the effect of overexpression of the hypoxia response element enhancer (HRE) sequence-inserted CDX2 gene under the control of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter on proliferation of human colon adenocarcinoma LoVo cells *in vitro*. **Methods:** Stable clones of LoVo cells expressing pLVX-hTERTp-CDX2-3FLAG (hC), pLVX-5HRE-hTERTp-3FLAG (5Hh) and pLVX-5HRE-hTERTp-CDX2-3FLAG (5HhC), respectively,

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81101874, No. 81172362, No. 81172359);陕西省科学技术研究发展计划项目(No. 2011-K12-19);陕西省科技统筹创新工程计划项目(No. 2013KTCQ03-08)。Project supported by the Natural Science Foundation of China(No. 81101874, No. 81172362, No. 81172359), the Science and Technology Foundation of Shaanxi Province(No. 2011-K12-19), and the Science and Technology Co-ordinative Innovation Project of Shaanxi Province(No. 2013KTCQ03-08)

**[作者简介]** 贺赛(1987-),男,陕西省延安市人,硕士生,主要从事消化系统肿瘤的基础与临床研究,E-mail: hesai.2006@stu.xjtu.edu.cn;

郑见宝(1981-),男,陕西省渭南市人,博士,主治医师,主要从事消化系统肿瘤的基础与临床研究,E-mail: bob.zheng@stu.xjtu.edu.cn。△共同第一作者

**[通信作者]** 孙学军(Sun Xuejun, corresponding author),E-mail: sunxy@mail.xjtu.edu.cn

were generated. LoVo cells stably expressing hC, 5Hh, and 5HhC, respectively, were cultured under hypoxia control (CoCl<sub>2</sub> 200 μmol/L) and normoxia, respectively. At the designated time points of culture, cell viability was assessed by MTT assays, colony-forming capacity by trypan blue staining and cell cycle progression by flow cytometry. **Result:** Viability was significantly decreased in hC- and 5HhC-expressing LoVo cells as compared with wild-type LoVo cells and 5Hh-expressing LoVo cells. The proliferation rates under normoxia and hypoxia respectively were (48.62 ± 3.32)% and (36.81 ± 2.83)% at 5 days ( $P < 0.05$ ) and (56.44 ± 2.28)% and (38.51 ± 3.21)% at 7 days ( $P < 0.05$ ) in 5HhC-expressing cells. LoVo cells stably expressing hC and 5HhC, respectively, formed significantly less clones than cells stably expressing 5Hh under a hypoxic condition (44.2 ± 3.5 vs 90.8 ± 9.3,  $P < 0.05$ ). The proportion of cells at G<sub>1</sub> phase arrest was (63.59 ± 0.55)% and (64.82 ± 2.22)% in cells stably expressing hC and 5HhC respectively, significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that in wild type LoVo cells and cells stably expression 5Hh (51.38 ± 0.70 and 51.59 ± 0.38) under normoxia. Under a hypoxic condition, as high as 71.38 ± 3.02 5HhC-expressing LoVo cells were arrested at G<sub>1</sub> phase. **Conclusion:** Overexpression of the CDX2 gene carrying the HRE sequence driven by the hTERT promoter may significantly inhibit proliferation and colony formation of human colon adenocarcinoma LoVo cells in vitro, through inducing G<sub>1</sub> phase arrest. These effects were more significant under hypoxia.

[ **Key words** ] gene therapy; colon cancer; hypoxia; CDX2 gene ; cell proliferation

[ Chin J Cancer Biother, 2014, 21(3): 314-319 ]

结肠癌是全世界常见的恶性肿瘤,其病死率位居恶性肿瘤死因的第二位<sup>[1]</sup>,预后不甚理想。随着生活水平的提高和饮食方式的转变,我国结肠癌的发病率呈上升趋势<sup>[2]</sup>。结肠癌的治疗是当今世界面临的一个重要难题,现代医学越来越关注肿瘤的基因治疗<sup>[3-5]</sup>。本课题组前期工作<sup>[6]</sup>构建了5个拷贝的缺氧反应元件(hypoxia response element, HRE)和人端粒酶催化亚单位(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)双靶向联合调控元件,调控抑癌基因 CDX2 表达的慢病毒表达载体 pLVX-5HRE-hTERTp-CDX2-3FLAG(5HhC)及其对照载体 pLVX-hTERTp-CDX2-3FLAG(hC)、pLVX-5HRE-hTERTp-3FLAG(5Hh),并将上述载体进行病毒包装,转染人结肠癌 LoVo 细胞,获得了稳定表达 5HhC 的 LoVo 细胞(5HhC/LoVo)及稳定表达 hC、5Hh 的 LoVo 细胞(hC/LoVo、5Hh/LoVo),旨在利用增强子 HRE 和特异性启动子 hTERT 组成的调控元件,高效、特异地增强其下游抑癌基因 CDX2 的表达,从而对肿瘤细胞进行有效杀伤。本实验采用 MTT 法、平板克隆形成实验、流式细胞术观察该重组载体 5HhC 对人结肠癌 LoVo 细胞增殖的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人结肠癌细胞株 LoVo 及单克隆细胞 hC/LoVo、5Hh/LoVo、5HhC/LoVo 均由本课题组前期<sup>[6]</sup>保存。胎牛血清和 DMEM 培养基购自 GIBCO 公司。DM-SO、二氯化钴(CoCl<sub>2</sub>, 相对分子质量 237 930)、四唑

氮蓝(MTT)购自 Sigma 公司。

### 1.2 细胞培养及分组

人结肠癌细胞系 LoVo 及单克隆细胞 hC/LoVo、5Hh/LoVo、5HhC/LoVo 均培养于含 10% 胎牛血清、pH7.3 的 DMEM 培养液,37 °C、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中,应用质量浓度为 2.5 g/L 胰酶消化,每 2~3 d 传代 1 次。实验均采用以下顺序分组:hC/LoVo 细胞、LoVo 细胞、5Hh/LoVo 细胞及 5HhC/LoVo 细胞,各组均以模拟缺氧细胞(加入缺氧模拟剂 CoCl<sub>2</sub> 200 μmol/L)作对照。

### 1.3 MTT 法检测 5HhC 对人结肠癌细胞系 LoVo 生长的抑制

将对数生长期的各组细胞以 2 000 个/孔接种 8 块 96 孔培养板,每组细胞增设 5 个平行孔,培养箱中孵育 24 h;待细胞贴壁后,任选 4 块 96 孔培养板每孔添加化学缺氧模拟剂 CoCl<sub>2</sub>(终浓度 200 μmol/L),待细胞生长 1、3、5、7 d 后分别终止 2 块(缺氧处理和常氧各 1 块),每孔加入 50 μl MTT 溶液(5 mg/ml),继续培养 4 h;小心吸弃上清液,每孔内加入 150 μl 二甲亚砜(DMSO),振荡 15 min 溶解沉淀,酶标仪在 490 nm 下读取光密度 D 值。绘制各组细胞的生长曲线,并按照公式计算细胞生长增殖率。增殖率(%) = 实验组 D<sub>490</sub>/对照组 D<sub>490</sub>。

### 1.4 平板克隆实验检测 5HhC 对人结肠癌细胞系 LoVo 集落形成能力的影响

取对数生长期各组细胞,胰蛋白酶消化后,锥虫蓝染色作活细胞计数,调整细胞密度,将调整后的细胞悬液接种于直径 6 cm 的平皿,培养基 10 ml/皿,

每皿 200 个细胞, 各组细胞设缺氧对照。置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的温箱中培养 21 d。弃生长液, PBS 漂洗 2 次, 甲醇 5 ml 固定 15 min, 吉姆萨染液染色 20 min。在 100 倍显微镜下计细胞集落数(以含有 50 个以上细胞的细胞团为一个细胞集落)并照相。

### 1.5 流式细胞术检测分析细胞周期

将各组细胞按  $1 \times 10^5$ /L 密度稀释后接种在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 每组 2 瓶。接种 24 h 后, 每组任选一瓶加入终浓度 200 μmol/L CoCl<sub>2</sub>, 再培养 24 h 后, 分别收集细胞。1 000 × g 离心 5 min, 弃培养液; 预冷 PBS 洗涤 2 次; 离心后加入预冷的 75% 乙醇固定, 4℃ 避光 2 h。1 000 × g 离心 5 min, 去上清; PBS 清洗 2 次; 重悬细胞于 0.01% RNase 和 0.5% 碘化丙啶(PI), 4℃ 孵育 20 min, 过 300 目尼龙网, 上流式细胞仪分析细胞周期。

### 1.6 统计学处理

上述实验均重复 3 次, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。两样本均数比较用 *t* 检验, 多个样本均数比较用单因素 *F* 方差分析, 所有数据均采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 5HhC 转染抑制人结肠癌细胞系 LoVo 的增殖

MTT 法检测 hC、5Hh、5HhC 对 LoVo 细胞的增殖能力的影响, 实验结果(图 1A)显示, 与 5Hh/LoVo 细胞相比, 5HhC/LoVo 细胞的增殖受到抑制, 且在第 5 天后更加明显[5Hh/LoVo vs 5HhC/LoVo, 第 5 天:  $(98.23 \pm 1.55)\%$  vs  $(48.69 \pm 3.32)\%$ , *P* < 0.05; 第 7 天:  $(97.85 \pm 1.69)\%$  vs  $(56.40 \pm 2.28)\%$ , *P* < 0.05]。与常氧条件比, 在缺氧微环境下, 5HhC 对 LoVo 细胞增殖的抑制更加显著[第 5 天:  $(48.62 \pm 3.32)\%$  vs  $(36.81 \pm 2.83)\%$ , *P* < 0.05; 第 7 天,  $(56.44 \pm 2.28)\%$  vs  $(38.51 \pm 3.21)\%$ , *P* < 0.05], 而 hC 对 LoVo 细胞增殖的抑制没有太大变化(图 1B)。

### 2.2 5HhC 转染抑制人结肠癌细胞系 LoVo 的集落形成能力

平板克隆实验结果(图 2)显示, 4 组细胞在生长 3 周后, hC/LoVo 细胞、5HhC/LoVo 细胞克隆集落数的数量明显少于 LoVo 细胞、5Hh/LoVo 细胞 [ $(110.3 \pm 11.2)$  个、 $(90.8 \pm 9.3)$  vs  $(160.2 \pm 13.2)$  个、 $(150.0 \pm 10.2)$  个, *P* < 0.05], 所形成克隆团的直径也小于对照组。在缺氧微环境下, 5HhC 对 LoVo 细胞集落形成能力的抑制较常氧环境下更

为显著 [ $(44.2 \pm 3.5)$  个 vs  $(90.8 \pm 9.3)$  个, *P* < 0.05], 而 hC/LoVo 细胞、LoVo 细胞、5HhC/LoVo 细胞集落形成能力的变化不大 (*P* > 0.05)。

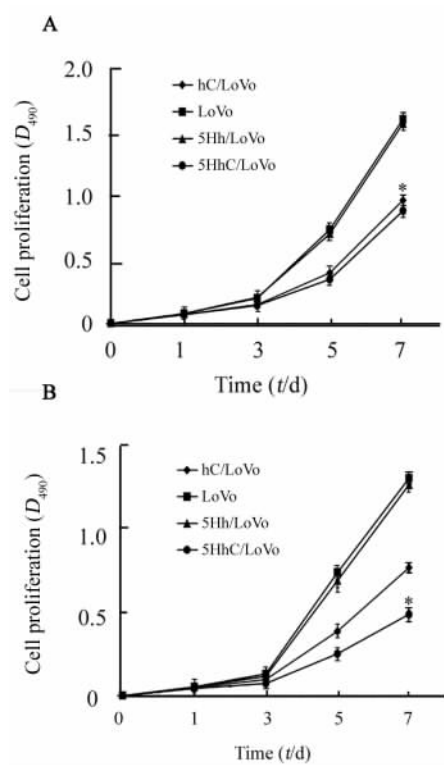


图 1 5HhC 转染抑制人结肠癌细胞 LoVo 的增殖

Fig. 1 Transfection of 5HhC inhibited the proliferation of human colon carcinoma LoVo cells

\* *P* < 0.05 vs 5Hh/LoVo cells in normoxia condition and the LoVo or 5Hh/LoVo cells in normoxia or hypoxia condition  
A: Normoxia; B: Hypoxia

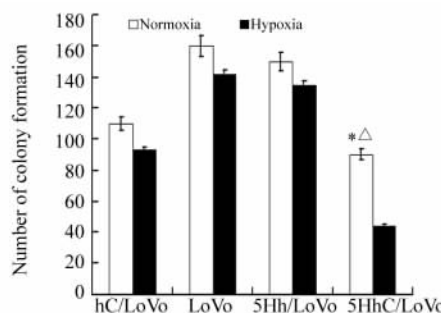


图 2 5HhC 转染抑制人结肠癌细胞 LoVo 的集落形成能力  
Fig. 2 Transfection of 5HhC inhibited the clone formation ability of human colon carcinoma LoVo cells

\* *P* < 0.05 vs 5Hh/LoVo or LoVo cells in normoxia condition ;  
Δ *P* < 0.05 vs hypoxia

### 2.3 5HhC 转染可使人结肠癌细胞系 LoVo 发生 G<sub>1</sub>

期阻滞

流式细胞术检测结果(图3)表明,hC/LoVo 细胞、5HhC/LoVo 细胞 G<sub>1</sub> 期细胞比例与 LoVo 细胞、5Hh/LoVo 细胞相比明显提高[ (63.59 ± 0.55)%、(64.82 ± 2.22)% vs (51.38 ± 0.70)%、(51.59 ± 0.38)% ,P < 0.05)。在缺氧微环境下,5HhC/LoVo

G<sub>1</sub> 期阻滞更为明显,与常氧组相比其细胞数提高显著[ (71.38 ± 3.02)% vs (64.82 ± 2.22)% ,P < 0.05 ],其他组没有明显变化(表1)。提示 5HhC 表达可使结肠癌细胞 LoVo 出现 G<sub>1</sub> 期阻滞,且在缺氧微环境下,其效果更为显著(P < 0.05)。

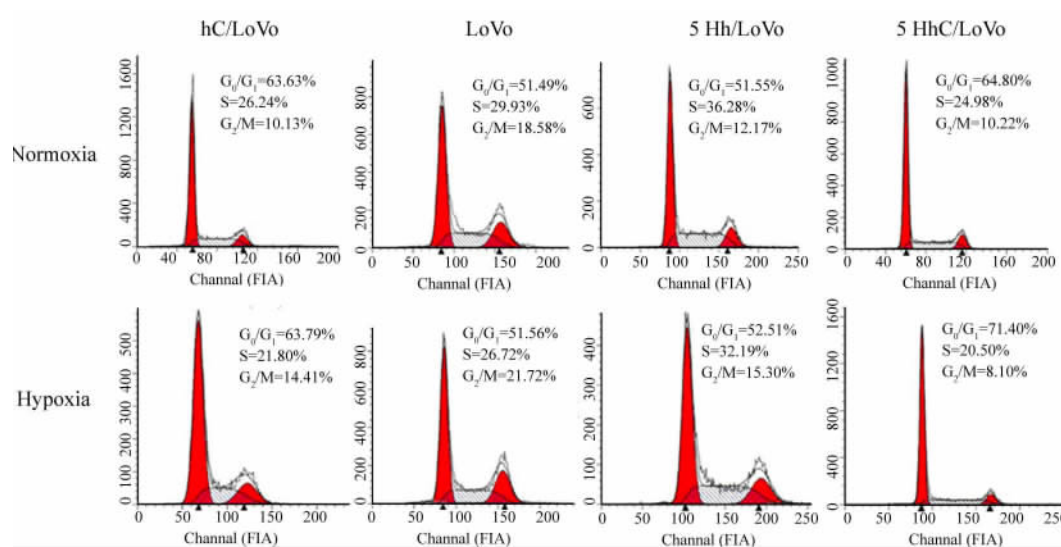


图3 5HhC 转染可使人结肠癌细胞 LoVo 发生 G<sub>1</sub> 期阻滞

Fig. 3 Transfection 5HhC arrested the G<sub>1</sub> phase of human colon carcinoma LoVo cells

表 1 流式细胞仪检测各组细胞周期分布(%)

Tab. 1 Percentages of cells in each phase of the cell cycle are indicated by flow cytometry(%)

Group	Condition	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
hC/LoVo*	Normoxia	63.59 ± 0.55	26.01 ± 2.21	10.40 ± 1.32
	Hypoxia	63.65 ± 0.44	21.94 ± 2.04	14.41 ± 0.98
LoVo	Normoxia	51.38 ± 0.70	30.02 ± 0.66	18.60 ± 1.13
	Hypoxia	51.44 ± 0.56	26.73 ± 0.61	21.83 ± 1.25
5Hh/LoVo	Normoxia	51.59 ± 0.38	36.19 ± 1.12	12.22 ± 0.30
	Hypoxia	52.60 ± 0.99	32.04 ± 1.23	15.36 ± 0.17
5HhC/LoVo	Normoxia	64.82 ± 2.22*	24.88 ± 1.98	10.30 ± 0.32
	Hypoxia	71.38 ± 3.02 <sup>△</sup>	20.62 ± 1.59	8.00 ± 0.33

\* P < 0.05 vs LoVo or 5Hh/LoVo cells in normoxia; <sup>△</sup> P < 0.05 vs 5HhC/LoVo cells in normoxia condition

### 3 讨论

以分子生物学技术为基础的生物治疗有望为结肠癌的综合治疗提供帮助。设计更具靶向性和高效性的基因转运系统,寻找结肠癌特异性转录调控元

件,从而使外源基因能够持续、稳定和特异的表达,是目前结肠癌基因治疗的主要研究方向之一<sup>[7-9]</sup>。近年来,国内外研究者开始努力探索特异性作用于肿瘤细胞的基因治疗方法,即靶向性基因治疗;甲胎蛋白(human alpha fetoprotein, AFP)、癌胚抗原

(carcino-embryonic antigen, CEA)、前列腺特异性抗原( prostate-specific antigen, PSA)、人端粒酶催化亚单位( human telomerase reverse transcriptase, hTERT)等基因的启动子被作为抗肿瘤基因的调控元件用于靶向性基因治疗的尝试<sup>[10-12]</sup>。其中 hTERT 基因启动子的作用已被广泛认可<sup>[13-15]</sup>。低氧是实体肿瘤的共同特征, 不断增殖的肿瘤细胞导致细胞耗氧量的增加<sup>[16-17]</sup>, 容易造成肿瘤内缺氧微环境。在缺氧条件下, 肿瘤细胞内的诸多靶基因的转录、表达发生变化, 对缺氧做出应激反应, 因而可以利用实体肿瘤独特的缺氧微环境来刺激基因在肿瘤中特异性表达, 实施肿瘤特异性的基因治疗<sup>[18]</sup>。缺氧反应元件( hypoxia response element, HRE)是位于低氧相关基因3或5端的一段 DNA 序列, 其核心序列可与缺氧诱导因子( HIF-1)特异结合, 从而启动靶基因的转录<sup>[19-20]</sup>。近年来, 为了增加目的基因在缺氧微环境下的表达水平, 5个拷贝的缺氧反应元件( HRE)作为一种增强子, 经常被应用于治疗载体的构建, Shibata 等<sup>[21]</sup>首先构建了 5HRE 并研究发现其在缺氧的微环境下可将调控的靶基因表达水平增加 40 ~ 50 倍, Wang 等<sup>[22]</sup>证明 5HRE 调控的 *TSST-1* 基因的表达在缺氧微环境下能够明显上调。

基于上述思路, 本课题组前期构建了<sup>[6]</sup>由 5HRE 增强子和 hTERT 启动子联合调控抑癌基因 *CDX2* 表达的慢病毒表达载体 5HhC 及其对照载体 hC、5Hh, 并对其进行病毒包装, 且筛选获得了稳定表达 5HhC、hC、5Hh 的 LoVo 细胞( 5HhC/LoVo、hC/LoVo、5Hh/LoVo), 该实验中使用的化学缺氧模拟剂  $\text{CoCl}_2$  的浓度是 200  $\mu\text{mol/L}$ , 也是前期经过 MTT 及 Western blotting 筛选的对细胞毒性最小且可以通过作用于 5HRE 增强子明显上调 *CDX2* 表达量的剂量。本实验中, 在载体 hC、5HhC 表达后, 结肠癌细胞系 LoVo 的增殖速度、集落形成能力均显著降低, 这是抑癌基因 *CDX2* 表达的结果, 与文献报道一致<sup>[23-26]</sup>; 在进一步缺氧处理后, 5HhC/LoVo 的增殖速度、集落形成能力较常氧环境相比, 降低更加明显, 这是 5HRE 增强子在缺氧环境下上调抑癌基因 *CDX2* 表达引起的。通过流式细胞术发现, 5HhC/LoVo、hC/LoVo 细胞发生  $G_1$  期阻滞, 且在缺氧微环境下, 5HhC/LoVo 细胞阻滞更为显著, 提示 5HhC 影响了结肠癌细胞系 LoVo 的细胞周期, 使其细胞周期滞后。

综上所述, 本研究发现缺氧诱导的肿瘤特异性基因治疗载体 5HhC 通过抑制人结肠癌细胞系 LoVo 从  $G_1$  期进入 S 期, 从而使 LoVo 细胞的增殖能力

明显下降, 且在缺氧环境下, 其抑制效果更加明显, 为后续该治疗载体 5HhC 在动物体内的功能研究奠定了基础。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Laszlo L. Predictive and prognostic factors in the complex treatment of patients with colorectal cancer [ J ]. *Magy Onkol*, 2010, 54( 4 ): 383-394.
- [ 2 ] 陈宣辰, 程军, 张意. 结直肠癌相关炎症因子的研究进展 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19( 1 ): 103-106.
- [ 3 ] Shayakhmetov DM, DI Paolo NC, Mossman KL. Recognition of virus infection and innate host responses to viral gene therapy vectors [ J ]. *Mol Ther*, 2012, 18( 8 ): 1422-1429.
- [ 4 ] Chen EQ, Song XQ, Wang YL, et al. Construction of a highly-active, liver-specific transcriptional regulatory element through combination of the albumin promoter and  $\alpha$ -fetoprotein enhancer [ J ]. *Plasmid*, 2011, 65( 2 ): 125-131.
- [ 5 ] Dong K, Wang R, Wang X, et al. Tumor-specific RNAi targeting eIF4E suppresses tumor growth, induces apoptosis and enhances cisplatin cytotoxicity in human breast carcinoma cells [ J ]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 113( 3 ): 443-456.
- [ 6 ] 郑见宝, 贺赛, 孙学军, 等. 双靶向调控 *CDX2* 基因慢病毒表达载体的构建及鉴定 [ J ]. *中国普外基础与临床杂志*, 2014, 21( 4 ): 414-419.
- [ 7 ] Asayama M, Kadowaki S, Yamaguchi K. Issues of molecular targeted therapies in combination with chemotherapy in metastatic colorectal cancer [ J ]. *Nihon Rinsho*, 2011, 69( 3 ): 464-471.
- [ 8 ] 王炜, 孙学军, 王伟, 等. 缺氧微环境对 *TSST-1* 诱导的抗 CEA<sup>+</sup>LoVo 细胞免疫治疗的调控 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18( 6 ): 597-604.
- [ 9 ] Liu J, Harada H, Ogura M, et al. Adenovirus-mediated hypoxia-targeting cytosine deaminase gene therapy enhances radiotherapy in tumour xenografts [ J ]. *Br J Cancer*, 2007, 96( 12 ): 1871-1878.
- [ 10 ] Zeng H, Wei Q, Huang R, et al. Recombinant adenovirus mediated prostate-specific enzyme pro-drug gene therapy regulated by prostate-specific membrane antigen( PSMA ) enhancer/promoter [ J ]. *J Androl*, 2007, 28( 6 ): 827-835.
- [ 11 ] Chen L, Tang XD, Yu ST, et al. Induction of anti-tumor immunity by dendritic cells transduced with hTERT recombinant adenovirus in mice [ J ]. *J Pathol*, 2009, 217( 5 ): 685-692.
- [ 12 ] 贺赛, 孙学军, 郑见宝, 等. hTERT、CEA 及 CMV 启动子在人结肠癌细胞株中的转录活性比较 [ J ]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23( 1 ): 74-80.
- [ 13 ] Xu Y, Hou J, Liu Z, et al. Gene therapy with tumor-specific promoter mediated suicide gene plus IL-12 gene enhanced tumor inhibition and prolonged host survival in a murine model of Lewis lung carcinoma [ J ]. *J Transl Med*, 2011, 9( 1 ): 39.
- [ 14 ] Zhang H, Liao ZK, Sun WJ, et al. Enhanced suicide gene therapy using a tumor-specific promoter in combination with cisplatin [ J ]. *Mol Med Rep*, 2009, 2( 6 ): 1017-1022.
- [ 15 ] Nemunaitis J, Tong AW, Nemunaitis M, et al. A phase I study of telomerase-specific replication competent oncolytic adenovirus

- (telomelysin) for various solid tumors [ J ]. *Mol Ther*, 2010, 18 ( 2 ): 429-434.
- [ 16 ] Dang DT, Chen F, Gardner LB, et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  promotes nonhypoxia-mediated proliferation in colon cancer cells and xenografts [ J ]. *Cancer Res*, 2006, 66( 3 ): 1684-1693.
- [ 17 ] Jubb AM, Buffa FM, Harris AL. Assessment of tumor hypoxia for prediction of response to therapy and cancer prognosis [ J ]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14( 1/2 ): 18-29.
- [ 18 ] 孙学军, 卢乐, 禄韶英, 等. 5HRE 联合 PCEA 调节 TSST-1/CD80TM 重组基因表达的逆转录病毒载体的构建 [ J ]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25( 10 ): 863-865.
- [ 19 ] Law AYS, Ching LY, Lai KP, et al. Identification and characterization of the hypoxia-responsive element in human stanniocalcin-1 gene [ J ]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 314( 1 ): 118-127.
- [ 20 ] Hu J, Stiehl DP, Setzer C, et al. Interaction of HIF and USF signaling pathways in human genes flanked by hypoxia-response elements and E-box palindromes [ J ]. *Mol Cancer Res*, 2011, 9 ( 11 ): 1520-1536.
- [ 21 ] Shibata T, Giaccia AJ, Brown JM. Development of a hypoxia-responsive vector for tumor-specific gene therapy [ J ]. *Gene Therapy*, 2000, 7( 6 ): 493-498.
- [ 22 ] Wang W, Sun XJ, Lu L, et al. Cytotoxicity of lymphocytes activated by superantigen toxic-shock-syndrome toxin-1 against colorectal cancer LoVo cells [ J ]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 376( 1/2 ): 1-9.
- [ 23 ] Zheng JB, Sun XJ, Wang W, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha modulates the down-regulation of the homeodomain protein CDX2 in colorectal cancer [ J ]. *Oncology Reports*, 2010, 24( 1 ): 97-104.
- [ 24 ] Olsen AK, Coskun M, Bzorek M, et al. Regulation of APC and AXIN2 expression by intestinal tumor suppressor CDX2 in colon cancer cells [ J ]. *Carcinogenesis*, 2013, 34( 6 ): 1361-1369.
- [ 25 ] Xie Y, Li L, Wang X, et al. Overexpression of Cdx2 inhibits progression of gastric cancer in vitro [ J ]. *Int J Oncol*, 2010, 36( 2 ): 509-516.
- [ 26 ] Gross I, Duluc I, Benameur T, et al. The intestine-specific homeobox gene Cdx2 decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells [ J ]. *Oncogene*, 2008, 27( 1 ): 107-115.
- [ 收稿日期 ] 2013 - 12 - 20 [ 修回日期 ] 2014 - 03 - 26  
[ 本文编辑 ] 阮芳铭, 韩丹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 凡临床试验都应在中国临床试验注册中心注册

中国临床试验注册中心( Chinese Clinical Trial Register, ChiCTR )为卫生部下属的国家临床试验注册中心,是世界卫生组织国际临床试验注册协作网一级注册机构( World Health Organization International Clinical Trial Registration Platform Primary Register, WHO ICTRP Primary Register ),由卫生部中国循证医学中心和四川大学华西医院等于 2005 年 7 月 25 日正式成立并运行。

全球临床试验注册制度由世界各国政府共同决定由 WHO 领导建立。临床试验注册具有伦理和科学的双重意义,目的是为了尊重和珍惜所有试验参与者的贡献,他们的贡献用于改善全社会的医疗保健,因此,任何临床试验都与公众利益相关。公开临床试验的信息,并将其置于公众监督之下是试验研究者的义务和道德责任。临床试验注册不仅能确保追溯每个临床试验的结果,公开在研试验或试验结果信息还有助于减少不必要的重复研究。

ChiCTR 的宗旨是联合中国和全球的临床医师、临床流行病学家、统计学家、流行病学家和医疗卫生管理者,严格科学地管理中国临床试验信息,提高其质量,为广大医务工作者、医疗卫生服务消费者和政府卫生政策制定者提供可靠的临床试验证据,让医疗卫生资源更好地服务于中国人民和全人类的健康事业。

所有在人体实施的试验均属于临床试验,都应该先注册后实施。凡已注册临床试验都会被授予 WHO ICTRP 全球统一的唯一注册号。

我国众多医学期刊已和中国临床试验注册中心共同建立了临床试验报告发表机制,正在分步实施优先发表、直到只发表具有全球性唯一注册号的临床试验报告。

ChiCTR 接受中国地区及全球的临床试验注册申请,还接受获得 WHO ICTRP 认证的二级注册机构输送的注册资料,并向 WHO ICTRP 中央数据库输送注册信息供全球检索。除注册临床试验外,ChiCTR 以卫生部中国循证医学中心、循证医学教育部网上合作研究中心、中国 Cochrane 中心、英国 Cochrane 中心、四川大学华西医院国际临床流行病学网华西资源与培训中心为人才和技术支持平台,负责指导临床试验设计、中心随机、论文写作、教育培训,推动提高我国临床试验的质量。

通过 ChiCTR 检索入口网址 [www.chictr.org](http://www.chictr.org), 公众可方便地查询已注册临床试验信息,并与 WHO 全球检索入口链接,可方便地查询全球已注册临床试验。

( 本刊编辑部 )