论著

文章编号:1000-5404(2009)15-1462-05

靶向重组腺病毒载体逆转肝癌细胞多药耐药的实验研究

梅 英,杜 伟,丁 雄,陈晓光,简华刚,龚建平,刘长安 (重庆医科大学附属第二医院肝胆外科,重庆 400010)

摘 要:目的 探讨携带多药耐药基因1(multidrug resistance gene 1,mdr1)反义RNA重组腺病毒载体靶向逆转甲胎蛋白阳性(AFP+)的肝癌多药耐药细胞HepG2R的疗效及作用机制。**方法** 将携带AFP启动子和EGFP基因的重组腺病毒载体Adeno-EGFP转染人正常肝细胞LO2(AFP-)、人宫颈癌细胞HeLa(AFP-)及HepG2(AFP+)细胞,检测EGFP基因在各细胞的转录水平,证实重组腺病毒载体的靶向性;将携带AFP启动子和mdr1基因反义核苷酸片段的重组腺病毒载体Adeno-asmdr转染HepG2R细胞和HepG2R裸鼠皮下移植瘤模型,检测Adeno-asmdr在体外和体内逆转HepG2R的活性。**结果** EGFP基因在AFP阳性的HepG2细胞可得到显著的转录,而在LO2细胞和HeLa细胞,其转录和表达量极少,显示了该载体的良好转录活性以及靶向特异性;Adeno-asmdr转染HepG2R细胞后,mdr1转录水平下降;Rhodamine 123在细胞内聚集量有所下降;在裸鼠皮下移植瘤实验中,经Adeno-asmdr+ADM处理组,移植瘤体积无增大,TUNEL法检测移植瘤内凋亡细胞增加,而经PBS和ADM处理组移植瘤体积明显增大($P<0.05$),ADM处理组移植瘤中出现少量的凋亡细胞,而PBS处理组移植瘤未见凋亡细胞。**结论** 实验构建的Adneo-asmdr重组腺病毒载体可在AFP阳性HepG2R细胞内特异靶向性表达目的基因,有效降低mdr1基因产物P-gp170的表达,从而达到对HepG2R细胞MDR的逆转作用;结合化疗药物的作用,可以导致裸鼠皮下移植瘤细胞凋亡增加,阻止瘤体生长。

关键词: 肝癌;多药耐药;腺病毒;基因治疗;反义技术;多药耐药基因1
中图法分类号: R394-33; R394.6; R735.7 **文献标识码:** A

Experimental study of the targeting recombinant adenoviral vector in reversing the mdr hepatocarcinoma cells

MEI Ying, DU Wei, DING Xiong, CHEN Xiao-guang, JIAN Hua-gang, GONG Jian-ping, LIU Chang-an (Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the therapeutic efficacy and the possible action mechanisms of the recombinant adenovirus vector carrying antisense multidrug resistance gene 1 (mdr1) targeting the reverse of α-fetoprotein (AFP+) positive MDR of HepG2R cells. **Methods** After transfection of the recombinant adenoviral vector Adeno-EGFP carrying AFP promoter and EGFP gene into LO2, a normal human liver cell line (AFP-), HeLa (AFP-), a human cervical cell line, and HepG2 (AFP+), the transcription level and the EGFP protein expression were detected by Northern blot and fluorescence microscopy. After the transfection of the recombinant adenovirus vector Adeno-asmdr carrying AFP promoter and antisense mdr1 into HepG2R cells and subcutaneous transplanted tumor carrying HepG2R in nude mice, the reverse activity of HepG2R cells was detected *in vivo* and *in vitro*. **Results** The results showed that the EGFP gene and protein were markedly transcribed and expressed in HepG2 cells, however, they were very weak in LO2 or HeLa cells. The results also showed a good transcription ability and AFP-targeting specificity of the recombinant adenoviral vector. RT-PCR showed that the mdr1 was markedly down-regulated at 7 d after transfection. Rhodamine 123 efflux tests showed that the retention of the fluorescence reagent was markedly increased in HepG2R cells at 48 h after transfection. The tumor volume following injection with Adeno-asmdr plus ADM group did not increase, but increased significantly in the PBS and ADM groups ($P<0.05$). A high rate of apoptosis of cells was detected

基金项目: 重庆市卫生局重点课题(01-1-018)
Supported by the Key Project of Chongqing municipal Health Bureau (01-1-018)
作者简介: 梅 英,男,重庆市人,硕士研究生,主要从事肝癌基因治疗方面的研究,现在创伤外科。电话:(023)63693365,E-mail:meiying1975@sina.com
通信作者: 陈晓光,E-mail:32955@126.com
收稿日期: 2008-07-01;**修回日期:** 2008-10-26

by pathological assay in the treatment group with ADM plus Adeno-asmdr. **Conclusion** The recombinant adenoviral expression vector could express the specific target gene in AFP producing hepatocarcinoma cell and block the mRNA expression of mdr1, down-regulate p-gp170, and reverse MDR. Combined with chemotherapeutic agents, the adeno-asmdr could partly reverse the mdr1 gene expression in vivo. It has a potential value for clinical application.

Key words: hepatocarcinoma; multidrug resistance; adenovirus; gene therapy; antisense technology; mdr1

肝癌化疗失败常常困扰着临床治疗。有研究报道肝癌化疗失败的主要原因是肝癌细胞对多种化疗药物极不敏感[1]。随着现代分子生物学理论和技术的进步,发现在多药耐药肝癌细胞中有特定基因的高转录和高表达,这些基因主要是多药耐药基因 1(multidrug resistance gene 1, mdr1)和多药耐药相关蛋白基因(multidrug resistance-related protein gene, MRP)等,其中 mdr1 的作用显得尤为重要。

本研究运用基因技术,用构建携带 mdr1 反义 RNA 重组腺病毒封闭表达 AFP 阳性的肝癌多药耐药细胞 HepG2R,下调 P-gp170 的过度表达,恢复肝癌细胞对抗癌药物的敏感性,导致裸鼠皮下移植瘤细胞凋亡,并初步证实了其靶向性。

1　材料与方法

1.1　细胞和试剂

人重组腺病毒载体 Adeno-asmdr[2] 和 Adeno-EGFP[3] 由石毓君博士构建,肝癌细胞系 HepG2、多药耐药细胞 HepG2R[4]、人正常肝细胞系 LO2、人宫颈癌细胞系 HeLa 由重庆医科大学附属第二医院外科实验室长期保存,低传代人胚肾 293 细胞(HEK293)购自中科院上海细胞及生化研究所;EX tap DNA 聚合酶、T_4 连接酶、DNA 提取试剂盒 Wizard Genomic DNA Purification Kit、质粒抽提试剂盒 Wizard PCR Preps DNA Purification System 购自美国 Promega 公司;限制性内切酶、DNA 分子标记(mark)购自大连宝生物工程有限公司;转染试剂盒 Lipofectamine™ reagent 购自美国 Invitrogen 公司,小鼠抗人 P-gp170 抗体购自美国 Chemicon 公司。

1.2　动物

BALB/c 裸小鼠 36 只,雄性,4 周龄,体质量 20 ~ 22 g,购自中科院上海实验动物中心,代养于重庆医科大学实验动物中心(SPF 级)。

1.3　检测 EGFP 基因转录水平

将 Adeno-EGFP 转染至 HepG2、LO2 和 HeLa 3 种细胞中,以 Northern blot 检测 EGFP 基因转录水平。

1.4　检测 Adeno-asmdr 对 HepG2R 细胞 MDR 的逆转效果

1.4.1　MTT 法检测细胞活性　　将 HepG2R 细胞按 1×10^4/孔接种于 96 孔板,待细胞进入对数生长期,以 MOI 值为 100 pfu/cell 的 Adeno-asmdr 进行细胞转染,转染后分为 0、24、48、72 h 和 7 d 共 5 组,每组 12 孔,分别检测 HepG2R 细胞在 1/2 IC_{50}剂量药物作用下,即在 1.75 μg/ml 阿霉素、1.25 μg/ml 5-FU、1 μg/ml 紫杉醇作用下的抑制率改变。

1.4.2　RT-PCR 检测转染前后 HepG2R 细胞 MDR1 转录水平

将细胞分为 5 组,分别取转染后 0、24、48、72 h 和 7 d 的细胞,提取总 RNA,检测细胞 MDR1 表达水平,并设立 HepG2 细胞组作对照。应用 Primer premier5 软件设计 RT-PCR 反应的引物;MDR1 上游:5′-ATGCTCGTGTTTGGAGA-3′;下游:5′-AGCCAGAACATTCTTCC-3′,产物为 510 bp。β-actin 作为内参照,由上海博亚生物公司合成,上游:5′-ACCACAGCTGAGGGAAATCG-3′;下游:5′-AGAGGTCTTTAC GGATGTCAACG-3′,产物为 281 bp。取 RT-PCR 产物,进行琼脂糖凝胶电泳,在 Doc Gel 2000(Bio-Rad)凝胶成像系统下成像并以 Bio-Image Analysis System 进行半定量检测,结果以 A 值 × 面积(S)表示。mRNA 相对含量 = (A 目的基因 × S)/(A β-actin × S)。

1.4.3　FCM 检测细胞对 Rhodamine 123 泵出率改变　　收集转染后 0、24、48、72 h 和 7 d 的 HepG2R 细胞 1×10^6 个,PBS 洗涤 2 次,重悬于 1 ml 含 150 ng/ml Rhodamine 123 的无血清 DMEM 培养液中,37℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱中孵育 15 min;PBS 洗 2 次;加入 1 ml 含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液中继续培养 1 h 后,再次离心取沉淀细胞,PBS 洗两次,将细胞吹打成单细胞悬液,70% 冰乙醇固定后,以 FACSCalibar(BECTON DICKINSON,美国)流式细胞仪在 530 nm 激发波长测定细胞内 Rhodamine 123 的潴留率,从而推算细胞对 Rhodamine 123 的泵出率。同时设立 HepG2 细胞组作为对照。

1.5　细胞培养和腺病毒的扩增纯化

参考文献[5]方法进行。

1.6　检测 Adeno-asmdr 对裸鼠体内 HepG2R 细胞 MDR 的逆转效果

1.6.1　荷瘤裸鼠模型建立　　取生长良好的 HepG2R 细胞,0.25% 胰蛋白酶消化,PBS 清洗 2 遍后,以 1×10^8/ml 重悬于 PBS 中,于 36 只正常 BALB/c 裸小鼠左前肢腋下皮下注射 0.1 ml,即注入 1×10^7 个 HepG2R 细胞,7 d 可观察到皮下移植瘤生成,成瘤率达到 86%,14 d 时瘤体直径可达到 5 ~ 6 mm,可用于实验。

1.6.2　重组腺病毒载体 Adeno-asmdr 对裸鼠移植瘤的逆转录活性　　选取 18 只荷瘤裸鼠(荷瘤 2 周),随机分成 3 组:PBS 组、ADM(2 mg/L)组和 ADM + Adeno-asmdr 组(ADM 为 2 mg/L、Adeno-asmdr 为 1×10^7 PFU/ml),瘤体内分别多点注射 PBS、ADM 及 ADM + Adeno-asmdr 各 0.1 ml,每周 1 次。自瘤体内注

射日起每3天测量1次瘤体长短径,连续观察4周,根据公式确定移植瘤体积。

瘤体积(mm^3) = 0.5 × 瘤长径 × 瘤短径^2

1.6.3 TUNEL法检测移植瘤组织细胞凋亡 另选取18只荷瘤裸鼠(荷瘤2周),随机分成3组:PBS组、ADM(2 mg/L)组和ADM + Adeno-asmdr组(ADM为2 mg/L、Adeno-asmdr为1 × 10^7PFU/ml),瘤体内分别多点注射PBS、ADM及ADM + Adeno-asmdr各0.1 ml,1周后处死荷瘤裸鼠,取下肿瘤组织,固定,常规病理切片,石蜡包埋,用原位细胞凋亡检测试剂盒检测。

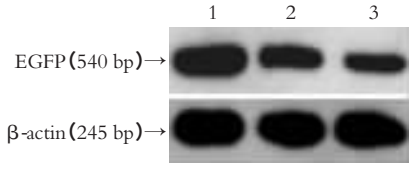
1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 10.0统计软件进行 t 检验,组间差异采用方差分析。

2 结果

2.1 Northern blot检测EGFP基因转录水平

Northern blot检测发现EGFP基因在HepG2中表达高于在LO2和HeLa;通过半定量分析,HepG2、LO2和HeLa 3种细胞中的表达量之比为1∶0.38∶0.17,如图1所示。



1: HepG2; 2: LO2; 3: HeLa

图1 Northern blot检测EGFP基因转录水平

2.2 MTT法检测细胞活性

阿霉素、5-FU及紫杉醇3种药物各在相同浓度下作用于转染Adeno-asmdr的HepG2R细胞,检测其细胞活性,在48、72 h、7 d时,HepG2R细胞活性被显著抑制,与转染前(0时)和转染后24 h组比较具有非常显著差异($P<0.01$);转染后24 h组与转染前比较差异无显著性($P>0.05$)。如图2所示。

2.3 RT-PCR检测转染Adeno-asmdr后不同时段mdr1转录水平

Adeno-asmdr转染HepG2R细胞后,mdr1转录水平在转染后24 h无明显降低,48 h转录水平稍有下降;至72 h,进一步下降,但与48 h相比,降低幅度并不明显;7 d时可见较大幅度下降,但与HepG2相比较,仍然明显高于诱导耐药前水平,表明细胞mdr1转录水平虽有下降,但并未被完全阻断表达。半定量分析,HepG2R细胞在Adeno-asmdr转染72 h后,其mdr1转录水平约为转染0 h的63%,至7 d时可达到35%左右,HepG2细胞与HepG2R细胞的mdr1转录水平相比约为18%。如图3所示。

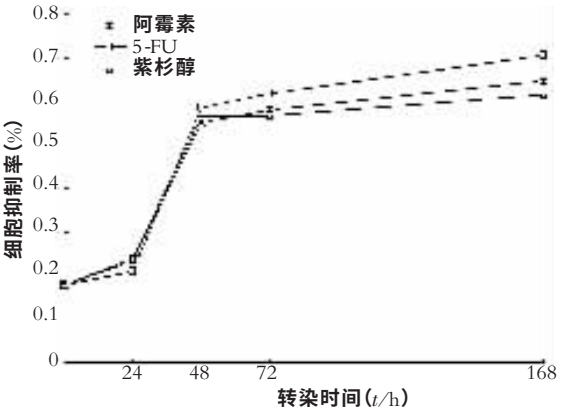
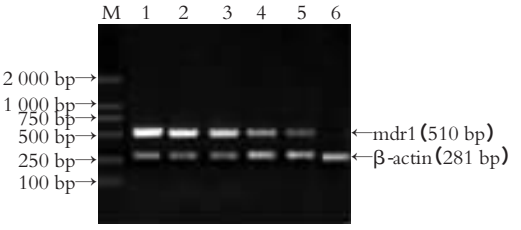


图2 3种药物对转染Adeno-asmdr的HepG2R细胞的抑制率



M:标准;1 - 5:HepG2R转染后0、24、48、72 h和7 d;6: HepG2

图3 RT-PCR检测转染Adeno-asmdr后细胞mdr1转录水平

2.4 FCM检测HepG2R细胞对Rhodamine 123的泵出率

HepG2R细胞转染Adeno-asmdr后24 h细胞内Rhodamine 123潴留量无明显变化,如图4A、B、C所示,转染后48 h至7 d细胞内Rhodamine 123潴留量明显下降,如图4D、E、F所示,但仍然比HepG2细胞内Rhodamine 123潴留量高,如图4A所示。

2.5 PBS、ADM、ADM + Adeno-asmdr对裸鼠移植瘤体积的影响

统计学分析表明ADM + Adeno-asmdr组与PBS组、ADM + Adeno-asmdr组与ADM组间差异有统计学意义($P<0.05$);PBS组与ADM组间差异无统计学意义($P>0.05$)。PBS处理组裸鼠移植瘤体积未受影响,瘤体积继续增加,ADM处理组裸鼠移植瘤体积也为上升趋势但其增幅小于PBS组,而ADM + Adeno-asmdr组裸鼠移植瘤体积未观察到明显增大,约有缩小。如表1所示。

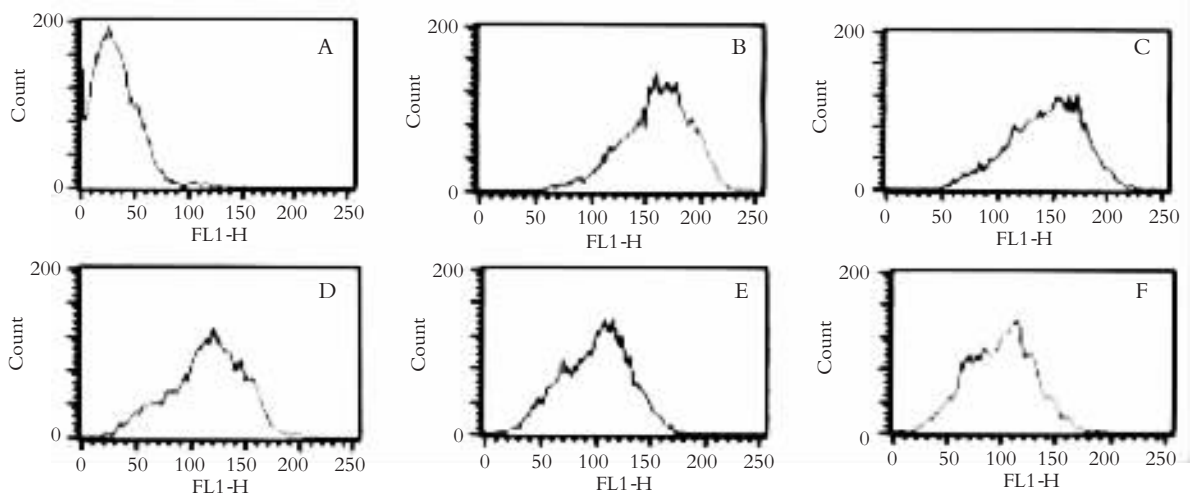
2.6 TUNEL法检测移植瘤组织细胞凋亡

经ADM + Adeno-asmdr组处理7 d,可见凋亡细胞增加,ADM组处理的裸鼠移植瘤组织中出现少量的凋亡细胞,而PBS组处理的裸鼠移植瘤未见凋亡细胞。如图5所示。

表1 各组各时间段肿瘤体积比较($n=6$, mm^3, $\bar{x} \pm s$)

组别	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d	24 d	27 d	30 d
PBS组	24.32 ± 2.41	26.5 ± 2.33	31.12 ± 10.25	48.74 ± 13.41	51.47 ± 18.93	71.36 ± 26.74[a]	97.38 ± 28.12[a]	119.37 ± 32.11[a]	129.47 ± 36.12[a]	201.56 ± 37.34[a]	260.85 ± 38.26[a]
ADM组	24.85 ± 2.38	25.32 ± 2.47	29.47 ± 10.36	38.27 ± 14.63	47.55 ± 23.17	57.28 ± 21.46	75.42 ± 19.27[a]	87.35 ± 26.79[a]	99.35 ± 26.28[a]	113.42 ± 29.36[a]	138.54 ± 26.17[a]
ADM + Adeno-asmdr组	24.68 ± 2.14	25.11 ± 2.31	26.32 ± 2.19	26.54 ± 3.23	26.13 ± 4.25	25.96 ± 5.49	25.77 ± 4.12	24.38 ± 4.92	24.16 ± 4.12	23.86 ± 3.95	23.52 ± 4.21

a: $P<0.05$,与ADM + Adeno-asmdr组比较



A：HepG2 细胞；B：未转染 Adeno-asmdr 的 HepG2R 细胞；C：转染 Adeno-asmdr 后 24 h 的 HepG2R 细胞；D：转染 Adeno-asmdr 后 48 h 的 HepG2R 细胞；E：转染 Adeno-asmdr 后 72 h 的 HepG2R 细胞；F：转染 Adeno-asmdr 后 7 d 的 HepG2R 细胞

图 4　HepG2、转染和未经转染 Adeno-asmdr 的 HepG2R 细胞内,各时段 Rhodamine 123 的潴留



A：ADM + Adeno-asmdr 组；B：ADM 组；C：PBS 组

图 5　移植瘤组织细胞凋亡检测　（TUNEL × 100）

3　讨论

肿瘤细胞在化疗过程中产生 MDR 往往是临床化疗失败的主要原因,其中一个重要原因是 mdr1 基因在化疗过程中的表达被诱导上调,导致其编码产物 P-gp170 蛋白在肿瘤细胞膜过度表达[6],同样现象也存在于肝癌患者的化疗过程中[7]。目前临床上用于逆转 MDR 的方案很多,如钙通道阻滞剂维拉帕米、砷化合物、酚噻嗪以及中药成分人参皂甙等,但这些药物疗效并不理想且有些药物的毒副作用较大,所以在临床应用受到限制。现代医学的进展,从基因转录或翻译水平着手或许是从根本上逆转肿瘤细胞 MDR 的关键[8-10]。

我们运用反义技术,将 mdr1 编码区起始位点开始的 200 bp 结构基因反向插入到重组腺病毒载体,利用腺病毒可自动感染细胞并在细胞内转录插入后目的基因的特性,在 MDR 表型的 HepG2R 细胞转录 mdr1 反义 RNA,以期达到封闭 mdr1 的转录和表达[2]。

AFP 已经在临床工作中作为检测肝癌时广泛采用的血清学标志物。以往的研究发现,AFP 调控序列全长为 5.1 kb[11],而临近转录起始点处约 300 bp 长度的序列即可达到启动下游基因转录的作用。我们在实验中构建携带 271 bp AFP 启动子和以 EGFP 基因作为报告基因的重组腺病毒载体[3],并且保留了 pshuttle 原来的增强子,可在 AFP 阳性 HepG2 肝癌细胞中被有效转录,在极微量 AFP 表达的正常肝细胞 LO2 中以及无 AFP 表达的 HeLa 细胞中,EGFP 仅有极少量转录,充分体现了该腺病毒载体的靶向性和 AFP 启动子的有效性,进而将 200 bp mdr1 序列反向插入至腺病毒中,构建 Adeno-asmdr 腺病毒载体,使其亦具备相似的靶向性特征。

实验中发现,以 100 pfu/ml 的 Adeno-asmdr 转染

HepG2R 细胞,其 mdr1 在转染后 7 d 表达明显下降,以后维持在较低水平。对阿霉素、5-FU、紫杉醇等 3 种化疗药物的反应也呈现相似的趋势,即从转染后 48 h 开始,对 3 种药物的敏感性得到极大的提高。用 FCM 检测 HepG2R 细胞对 Rhodamine 123 泵出率的改变,发现转染前 HepG2R 细胞对药物具有很强的泵出功能,细胞内潴留的 Rhodamine 123 很少,转染后 48 h 的细胞开始出现较多量潴留,间接反应了细胞对药物的泵出能力下降。

在裸鼠移植瘤实验中发现,应用高滴度重组腺病毒载体 Adeno-asmdr(1×10^7 PFU/ml)联合 ADM 瘤体内多点注射,每周 1 次,连续注射 4 周,移植瘤体积未明显增大,而 2 mg/L 的 ADM 对裸鼠移植瘤无明显抑制作用,移植瘤组织仍可继续生长,表明经 Adeno-asmdr 处理后,可明显恢复移植瘤细胞对 ADM 敏感性,证实 Adeno-asmdr 可有效逆转肿瘤细胞的 MDR。通过 TUNEL 检测发现,在 Adeno-asmdr + ADM 处理组,1 周后即可检测到明显的细胞凋亡,而至后期则在瘤体内可见大面积坏死组织, ADM 处理组仅有较少的细胞凋亡,而 PBS 处理组几乎无凋亡细胞发现,这与 Schaich 等[12]研究关于凋亡调节基因 Bcl-2 家族及 BAX 基因表达水平与 mdr1 的表达水平有相关性的是一致的,也是在以后工作中值得进行深入研究的方向。

以上实验均证实了 Adeno-asmdr 可在 AFP 阳性的 HepG2R 细胞及裸鼠皮下移植瘤中有效逆转其 MDR 表型,但并不能被完全逆转,分析原因,可能为:①参与 MDR 的基因并不只有 mdr1,研究已经发现多药耐药相关蛋白基因 MRP 等同样具有重要作用[13];单纯封闭了 mdr1 基因,并不能完全逆转 MDR;②反义技术本身仍然有许多疑惑尚待深入研究,目前任何基因封闭技术都难以达到对目的基因的完全封闭[14];③重组腺病毒滴度不足。本实验在测定了腺病毒滴度后,参考操作手册,以 100 pfu/ml 的 MOI 进行细胞转染,我们认为该滴度重组腺病毒对细胞的转染效率是满意的,并且细胞未出现明显 CPE,因此未进一步摸索更合理的病毒滴度;④重组腺病毒中 AFP 启动子效率有限。在本实验中我们运用的 AFP 基因上游调控序列为转录位点上游约 300 bp 片段,远远小于 5.1kb 的全长调控序列,可能与全长序列相比,其转录活性受到一定影响。⑤裸鼠皮下移植瘤受体内环境影响因素较多,许多是我们在实验中尚未考虑到的,这对实验也有一定的干扰,也是实验需要深入的方向。

参考文献:

[1] Lee E J, Jameson J L. Cell-specific Cre-mediated activation of the diphtheria toxin gene in pituitary tumor cells: potential for cytotoxic gene therapy[J]. Hum Gene Ther, 2002, 13(4): 533 - 542.

[2] 梅 英,石毓君,丁 雄, 等. 携多药耐药基因 1 反义 RNA 重组腺病毒逆转肝癌多药耐药细胞的实验研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2007, 15(3): 199 - 203.

[3] Shi Y J, Gong J P, Liu C A, *et al*. Construction of a targeting adenoviral vector carrying AFP promoter for expressing EGFP gene in AFP-producing hepatocarcinoma cell[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(2): 186 - 189.

[4] 梅 英,石毓君,刘长安,等. 一种肝癌多药耐药细胞系的建立及鉴定[J]. 中国药业, 2006, 15(20): 8 - 10.

[5] 石毓君,刘长安,龚建平, 等. 靶向腺病毒载体介导的 EGFP 基因在甲胎蛋白阳性肝癌细胞的特异表达[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(1): 159 - 162.

[6] Illmer T, Schaich M, Platzbecker U, *et al*. P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate[J]. Leukemia, 2004, 18(3): 401 - 408.

[7] Bonin S, Pascolo L, Croce L S, *et al*. Gene expression of ABC proteins in hepatocellular carcinoma, perineoplastic tissue, and liver diseases[J]. Mol Med, 2002, 8(6): 318 - 325.

[8] Fruehauf S, Veldwijk M R, Berlinghoff S, *et al*. Gene therapy for sarcoma[J]. Cells Tissues Organs, 2002,172(2): 133 - 144.

[9] 阚和平,谭永法,林艺雄,等. 阿霉素免疫毫微粒对肝癌细胞多药耐药的逆转[J]. 中华消化外科杂志, 2008, 7(5): 363 - 365.

[10] 胥雄阳,何 松. 苦参碱逆转人肝癌细胞株 QGY/CDDP 多药耐药性的实验研究[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(4): 411 - 415.

[11] Nakabayashi H, Hashimoto T, Miyao Y, *et al*. A position-dependent silencer plays a major role in repressing alpha-fetoprotein expression in human hepatoma[J]. Mol Cell Biol, 1991, 11(12): 5885 - 5893.

[12] Schaich M, Illmer T, Seitz G, *et al*. The prognostic value of Bcl-XL gene expression for remission induction is influenced by cytogenetics in adult acute myeloid leukemia[J]. Haematologica, 2001, 86(5): 470 - 477.

[13] Chuah M K, Collen D, VandenDriessche T. Biosafety of adenoviral vectors[J]. Curr Gene Ther, 2003, 3(6): 527 - 543.

[14] Milhavet O, Gary D S, Mattson M P. RNA interference in biology and medicine[J]. Pharmacol Rev, 2003, 55(4): 629 - 648.

(编辑 吴培红)