论著

文章编号:1000-5404(2010)22-2404-05

曲古菌素A上调食管癌CAR的表达及增强溶瘤腺病毒转染效率的体外研究

冯 婷[1],刘 霞[2],黄幼田[3],杨红艳[3],董子明[3] (450052 郑州,郑州大学:护理学院基础教研室[1],基础医学院病理生理学教研室[3];221003 江苏 徐州,徐州医学院附属第三医院病理科[2])

【摘要】 **目的** 通过观察组氨酸去乙酰化酶(histone deacetylase,HDAC)抑制剂曲古菌素(trichostatin A,TSA)对食管癌细胞株EC9706膜表面柯萨奇-腺病毒受体(Coxsackie and adenovirus receptor,CAR)表达水平的影响,观察TSA能否通过上调食管癌EC9706 CAR表达而增强其对腺病毒基因转染效率。**方法** 采用免疫细胞组织化学、RT-PCR、Western blot检测食管癌EC9706细胞CAR的表达情况,再用上述方法检测TSA作用EC9706细胞后,CAR mRNA和CAR蛋白表达的改变;同时采用流式细胞术测定病毒转染效率,MTT实验评价腺病毒携带的胸苷激酶(Ad-TK)的体外抗瘤效应。**结果** 0.5 μmol/L TSA处理EC9706细胞12、24、48 h后,CAR mRNA和蛋白表达量[分别为(0.44±0.01)、(0.37±0.02),(0.66±0.04)、(0.58±0.01),(0.77±0.05)、(0.70±0.03)]与未加TSA处理组[(0.27±0.02)、(0.22±0.03)]相比,CAR mRNA和蛋白表达水平显著提高($P<0.05$,$P<0.01$),呈现出时间依赖关系。流式细胞仪分析Ad-GFP转染后GFP的表达发现,未加TSA处理细胞转染效率为(1.35±0.11)%,0.5 μmol/L TSA作用12、24 h和48 h后,细胞转染效率分别为(2.58±0.17)%、(4.96±0.14)%、(6.36±0.15)%。MTT检测Ad-TK介导的体外杀伤作用结果显示,0.5 μmol/L TSA作用48 h比未加TSA增强8倍。**结论** TSA通过上调CAR表达量从而增强腺病毒对食管癌细胞的腺病毒基因转染效率。

【关键词】 柯萨奇-腺病毒受体;曲古菌素;食管癌细胞株EC9706;腺病毒;基因转染

【中图法分类号】 R394.2;R730.53;R735.1 【文献标志码】 A

Trichostatin A enhances transfection efficiency of oncolytic adenovirus *in vitro* through up-regulating CAR in human esophageal cancer cell line EC9706

Feng Ting[1], Liu Xia[2], Huang Youtian[3], Yang Hongyan[3], Dong Ziming[3] ([1]Department of Basic Nursing, College of Nursing, [2]Department of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052; [3]Department of Pathology, Third Affiliated Hospital, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu Province, 221003, China)

【**Abstract**】 **Objective** To explore the effect of histone deacetylase (HDAC) inhibitor, trichostatin A (TSA), on the expression of Coxsackie and adenovirus receptor (CAR) in esophageal cancer cell line EC9706. **Methods** Immunocytochemistry, RT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of CAR in EC9706 cells, and its mRNA and protein expressions after the treatment of 0.5 mol/L TSA for 12, 24 and 48 h were also studied. Transfection efficiency of virus Ad-GFP in the EC9706 cells with or without 0.5 mol/L TSA treatment was determined by flow cytometry. Anti-tumor effect of adenovirus carrying thymidine kinase (Ad-TK) was evaluated by MTT assay. **Results** After 0.5 μmol/L TSA treatment for 12, 24 and 48 h, CAR mRNA and protein expression were 0.44±0.01 and 0.37±0.02, 0.66±0.04 and 0.58±0.01, and 0.77±0.05 and 0.70±0.03 respectively. Compared to those of control group (0.27±0.02 and 0.22±0.03), the CAR mRNA and protein expressions were significantly increased in EC9706 cells after TSA treatment ($P<0.05$, 0.01), and the expressions showed a time-dependent manner. Flow cytometry indicated that the transfection efficiency was (1.35±0.11)% in the EC9706 cells, but was (2.58±0.17)%, (4.96±0.14)%, and (6.36±0.15)% respectively in the cells after 0.5 μmol/L TSA treatment for 12, 24 and 48 h. MTT results showed that the Ad-TK-mediated cytotoxicity in the cells with 0.5 μmol/L TSA treatment for 48 h was eight times higher than in the cells untreated. **Conclusion** TSA can increase gene transfer efficiency

【基金项目】 教育部科技创新工程基金资助重点项目(207150)

【通信作者】 董子明,E-mail:dongzm@zzu.edu.cn

of adenovirus into cancer cells by upregulating CAR.

【Key words】 Coxsackie and adenovirus receptor; trichostatin A; esophagus cancer cell line EC9706; adenovirus; gene extension dyes

Supported by the Key Project of of Science and Technology Innovation Program of Ministry of Education (207150). Corresponding author: Dong Ziming, E-mail: dongzm@zzu.edu.cn

腺病毒(adenovirus,Ad)作为溶瘤病毒或基因治疗的载体已被用于恶性肿瘤的治疗,随着对腺病毒认识水平的提高,通过遗传工程可以对其改造,使之能特异性裂解肿瘤细胞而对正常细胞不产生作用。溶瘤病毒用于肿瘤治疗已近60年,期间对病毒的改造、给药途径、疗效观察、机制及危险性等方面进行了深入的探讨,人们对溶瘤病毒的认识更加深入,溶瘤病毒有望成为治疗肿瘤的重要武器。而柯萨奇-腺病毒受体(Coxsackie and adenovirus receptor, CAR)作为腺病毒进入细胞的一个主要受体,在不同细胞表面的表达水平直接影响病毒入胞及其后所产生的一系列生物学效应[1],它不仅在正常细胞表面的表达各异,而且在不同肿瘤细胞上的表达存在很大差异。研究表明,溶瘤病毒的临床疗效在很大程度上受CAR的影响,即宿主细胞表面特异性受体对病毒感染及继后产生的生物学效应密切相关[2]。靶细胞CAR表达水平与腺病毒携带的外源基因表达效率呈正相关[3-7],但肿瘤细胞中的CAR常常呈现低表达或者缺失,这也是导致溶瘤病毒转导效率低下的主要原因。因此,研究各种肿瘤细胞表面的CAR表达水平,如何有针对性提高肿瘤细胞中的腺病毒感染效率,是腺病毒应用到基因治疗亟待解决的问题。

组氨酸去乙酰化酶(histone deacetylase,HDAC)是最近研究最多的抗肿瘤药物,它可以调节肿瘤的分化、迁移、转移和血管生成。它的抑制剂曲古菌素(trichostatin A,TSA)可以上调某些肿瘤表面CAR的表达,但能否上调食管癌细胞表面的CAR表达少见报道。因此在本实验中我们先检测食管癌细胞株CAR的表达,明确EC9706细胞CAR的表达量,为进一步探讨一定浓度的TSA对其处理后能否提高EC9706细胞株CAR的表达提供参照。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

食管癌细胞株EC9706由中国医学科学院肿瘤研究所分子肿瘤国家重点实验室惠赠,HeLa细胞由郑州大学病理生理教研室馈赠,腺病毒携带的胸苷激酶(Ad-TK)由郑州大学药理教研室构建保存。TSA购自Sigma公司(由DMSO溶解至1 mol/L,使用前按照相应浓度稀释加入培养基中),RPMI1640购自Gibco BRL公司,胎牛血清购自北京宝赛公司,更昔洛韦购自湖北科药益制药厂,甘磷酰芥由海正药业制造,MTT购自美国Sigma公司,兔抗人CAR单克隆抗体及兔抗人β-actin多克隆抗体和辣根酶标记羊抗兔二抗均购买于Santa Cruz公司,免疫组化S-P试剂盒购自北京中杉金桥公司,ECL显色试剂盒购买于北京中杉,RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司,总RNA提取试剂Trizol购自Invitrogen公司,DNA酶和M-MLV逆转录酶为Santa Cruz公司产品。酶标仪、凝胶成像仪器为美国Alpha Innotech公司产品,蛋白垂直电泳仪和印迹转膜仪购买于美国Bio-Rad公司。

1.2 细胞培养

细胞株均生长在含10%胎牛血清的1640培养基里。放置于5% CO_2、37 ℃的恒温培养箱里培养。含报告基因并载有绿色荧光GFP的腺病毒(Ad-GFP)由本实验中心构建和保存。病毒在转化有腺病毒片段的人胚肾293细胞(中国医学科学院分子肿瘤学国家重点实验中心馈赠)中扩增、氯化铯超速离心、纯化、滴度测定后保存于-80 ℃冰箱中。

1.3 免疫组化检测CAR蛋白的表达

严格采用免疫组化S-P法试剂盒操作说明书进行检测。随机挑选制作好的细胞爬片,将封闭好的爬片用PBS洗涤3 min×3次,用5%的正常羊血清于室温下封闭非特异性抗原15 min,弃去多余的血清,滴加适当稀释的一抗(1∶50),在湿盒内4 ℃冰箱过夜,隔日室温复温1 h后用PBS洗涤3 min×3次,滴加适当二抗(1∶200)孵育30 min。阴性对照用PBS代替一抗。显色、脱水、封片。倒置显微镜下观察表达情况。

1.4 RT-PCR检测各组细胞CAR mRNA的表达

严格参照Trizol试剂盒说明书从分组并处理好的EC9706细胞中提取总RNA;以随机引物1 μl做逆转录引物,2 μl RNA在AMV的作用下合成cDNA第1链,以逆转录产物3 μl作PCR模板进行检测。CAR上游引物5′-TTCAGGTGCGAGATGTTA-3′,下游引物5′-GAATGATTACTGCCGAT-3′,产物大小460 bp;β-actin上游引物5′-AAATCTGGCACCACACCTT-3′,下游引物5′-TAGCACAGCCTGGATAGCAA-3′,产物大小为170 bp。PCR反应条件:95 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,74 ℃ 1 min,30个循环,最后72 ℃延伸10 min;PCR产物各2 μl行1.5%琼脂糖凝胶电泳。凝胶成像仪扫描分析电泳结果,检测CAR mRNA的表达水平。

1.5 MTT法检测TSA对细胞生长的抑制作用

将食管鳞癌细胞EC9706在含10%胎牛血清的1640完全培养基中培养至对数生长期,0.05%的胰酶消化接种在96孔板,接种细胞数每孔约5×10^3,分为TSA处理组和空白对照组(未加TSA处理);将96孔板放于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养24 h;TSA处理组分别含0.01、0.03、0.05、0.1、0.3、0.5、1.0、2.0、3.0 μmol/L TSA;对照组改换为等浓度的DMSO溶液,同时再设仅加培养基的阴性对照组和空白组,每组设6个复孔;培养72 h后,加入20 μl 5 mg/ml的MTT溶液,继续37 ℃、5%

CO_2培养箱培养4 h后收集细胞，轻轻吸去上清，加入150 μl DMSO，室温下摇床振荡10 min使紫色结晶完全溶解后，在96孔酶标仪上以空白对照孔调零（MTT、DMSO、培养基），对照孔（MTT、DMSO、培养基、相同细胞浓度溶解介质）570 nm处读取光密度值[D(570)]；按公式计算不同浓度的TSA对EC9706细胞增殖活力的抑制。

细胞存活率 = [实验孔平均D(570)/对照孔平均D(570)] ×100%

1.6 细胞处理及病毒转导效率的测定

将TSA处理后的EC9706细胞及未处理组的细胞以5×10^6/ml接种于直径35 mm培养皿，Ad-GFP感染细胞前弃去原培养液用PBS轻轻洗3遍，加入500 μl含一定量Ad-GFP的无血清1640培养液，使其感染复数（MOI）分别达到100、200。放置37 ℃、5% CO_2培养箱孵箱中培养90 min，期间每隔10～15 min十字型轻轻晃动培养皿1次，使之均匀分布病毒液。病毒感染后48 h常规消化处理后转移入1.5 EP管中，1 000 r/min离心15 min收集细胞，用预冷的PBS洗3次后再加入500 μl PBS将细胞轻轻吹打至均匀，直接上流式细胞仪，在510 nm波长检测发出的绿色荧光，每次至少检测2×10^4细胞。

1.7 MTT检测Ad-TK体外杀伤作用

收集生长状态良好的EC9706细胞，胰酶消化后用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基配制成3×10^4的细胞悬液，接种于96孔板内，每孔100 μl，置于37 ℃、5% CO_2培养箱内，待细胞完全贴壁后弃去培养基，加入不含TSA和0.5 μmol/L TSA的完全培养基。培养48 h后弃去培养液，加入1×10^7 VP/ml滴度的Ad-TK，每孔100 μl，在培养箱内孵育2 h后，每孔再加入100 μl的更昔洛韦（GCV，400 μg/ml）同时设未加TSA细胞对照、病毒对照和阳性对照（甘磷酰芥，0.1 μg/ml）。在37 ℃，5% CO_2培养箱内培养3 d。弃去培养液。每孔加入100 μl MTT溶液，孵育4 h后弃上清加入DMSO 150 μl，轻微振荡后酶标仪检测波长570 nm，参考波长630 nm下的光密度值[D(570)]，按照下列公式计算肿瘤生长抑制率，实验重复3次。

细胞生长抑制率 = [1 -（加TSA处理组细胞D(570)/未加TSA处理组细胞D(570)] ×100%

1.8 统计学方法

采用SPSS 11.0统计软件，计量资料以$\bar{x} \pm s$表示，两组均数比较行t检验，两组以上均数比较行方差分析。

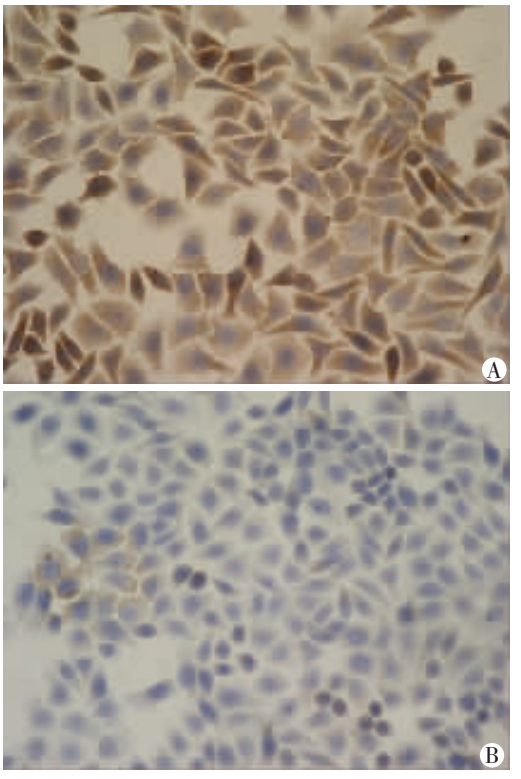
2 结果

2.1 免疫细胞化学方法检测EC9706和HeLa细胞表面CAR的表达

HeLa是已被证实CAR表达水平高的细胞，我们选取作为阳性对照以便对比EC9706细胞CAR的表达情况，观察EC9706能否作为研究的靶细胞。CAR蛋白在细胞中的阳性表达主要表现为细胞膜着色为黄色。与HeLa细胞中细胞膜黄色表达的细胞（0.76 ± 0.03）相比较，EC9706细胞黄色表达（0.25 ± 0.04）数目较少，颜色过浅（P < 0.05，图1）。

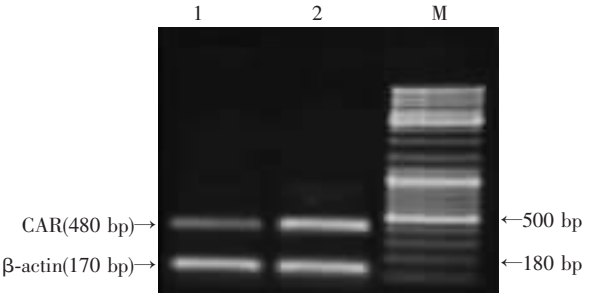
2.2 RT-PCR检测EC9706细胞CAR mRNA的表达

RT-PCR检测EC9706 CAR mRNA表达量为（0.26 ± 0.06），对比HeLa的表达量（0.70 ± 0.05），EC9706细胞表面CAR mRNA量表达量明显低于HeLa细胞（P < 0.05，图2）。其表达水平与免疫细胞化学结果相一致。



A：HeLa细胞；B：EC9706细胞

图1 免疫细胞化学检测EC9706和HeLa细胞CAR的表达（S-P ×400）

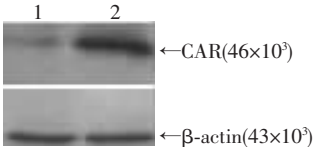


1：EC9706细胞；2：HeLa细胞；M：DNA标准

图2 RT-PCR检测EC9706细胞CAR mRNA的表达

2.3 Western blot检测肿瘤细胞表面CAR蛋白的表达

EC9706CAR蛋白表达量为（0.21 ± 0.07），与HeLa细胞CAR蛋白表达量（0.72 ± 0.05）相比较，EC9706细胞表面的CAR的蛋白表达量明显低下（P < 0.05，图3）。这与RT-PCR、免疫细胞化学检测趋势相一致。



1：EC9706细胞；2：HeLa细胞

图3 Western blot检测EC9706细胞CAR蛋白的表达

2.4 TSA对细胞生长的抑制作用

通过细胞株生长抑制实验确定TSA的有效作用浓度。图4

显示,不影响 EC9706 细胞株生长的 TSA 最大浓度为 0.5 μmol/L。

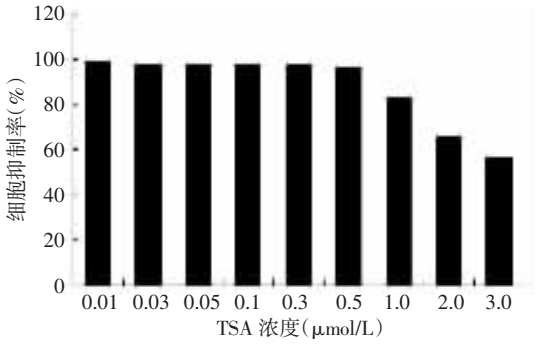
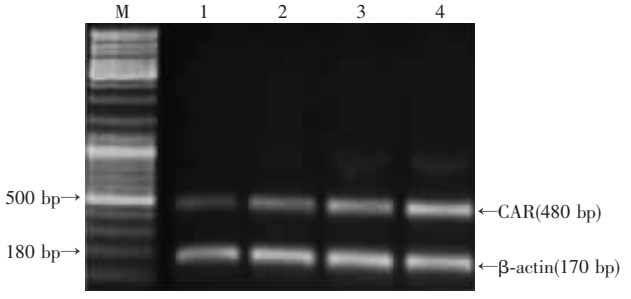


图 4　不同浓度的 TSA 对 EC9706 细胞生长的抑制作用

2.5　RT-PCR 检测 TSA 作用后不同时间 EC9706 细胞 CAR mRNA 的表达

EC9706 细胞经过 0.5 μmol/L TSA 处理 12、24、48 h 后,细胞表面的 CAR mRNA 表达量明显上调,表达量分别为(0.44 ± 0.01)、(0.66 ± 0.04)、(0.77 ± 0.05),与未加 TSA 处理组(0.27 ± 0.02)相比,CAR mRNA 表达水平显著增加($P<0.05$, $P<0.01$),并随着 TSA 作用时间的增加而增强,呈时间依赖关系。见图 5。



M:DNA 标准;1:未加 TSA 处理组;2:TSA 处理 12 h;3:TSA 处理 24 h;4:TSA 处理 48 h

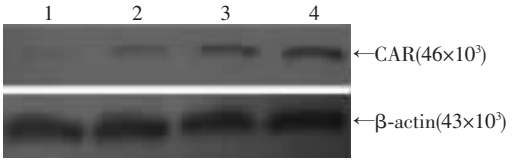
图 5　RT-PCR 检测 TSA 作用后不同时间 EC9706 细胞 CAR mRNA的表达

2.6　Western blot 检测 TSA 作用后不同时间 EC9706 细胞 CAR 蛋白的表达

EC9706 细胞经过 0.5 μmol/L TSA 的处理 12、24、48 h 后,细胞表面的 CAR 蛋白的表达量明显上调,表达量分别为(0.37 ± 0.02)、(0.58 ± 0.01)、(0.70 ± 0.03),与未加 TSA 处理组(0.22 ± 0.03)相比,CAR 蛋白表达水平显著增加($P<0.05$, $P<0.01$),并随着 TSA 作用时间的增加而增强,呈时间依赖关系。见图 6。

2.7　流式细胞仪检测 TSA 处理 EC9706 细胞腺病毒转染效率

EC9706 细胞经过 0.5 μmol/L TSA 处理前后转染 Ad-GFP,流式细胞仪检测细胞中 GFP 的表达情况,发现经过 0.5 μmol/L TSA 处理的细胞转染率明显提高,未加 TSA 处理细胞转染率为(1.35 ± 0.11)%,0.5 μmol/L TSA 作用 12、24 h 和 48 h 后,细胞转染效率分别为(2.58 ± 0.17)%、(4.96 ± 0.14)%、(6.36 ± 0.15)%。与未加 TSA 处理组相比,转导效率分别提高了 2、4、6 倍($P<0.05$),表现出时间效应。

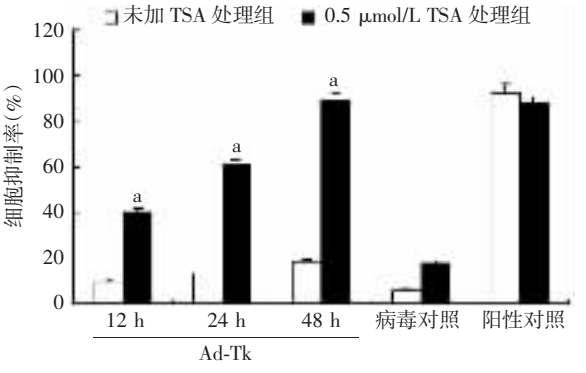


1:未加 TSA 处理组;2:TSA 处理 12 h;3:TSA 处理 24 h;4:TSA 处理 48 h

图 6　Western blot 检测 TSA 作用后不同时间 EC9706 细胞 CAR 蛋白的表达

2.8　MTT 检测 TSA 作用 EC9706 细胞不同时间腺病毒介导体外杀伤的作用

如图 7 所示,EC9706 细胞经过 TSA 处理后,腺病毒介导的体外杀伤作用明显增强,并随着作用时间的延长,杀伤效力逐渐增强,表现出时间依赖性。与未加 TSA 相比,杀伤率分别提高了 5 ~ 8 倍($P<0.05$),表现出时间效应。



a:$P<0.05$,与未加 TSA 处理组比较

图 7　0.5 μmol/L TSA 作用 EC9706 细胞不同时间段 Ad-TK 介导的体外杀伤作用变化

3　讨论

本研究表明,HDACI 类药物 TSA 可以上调 EC9706 表面 CAR 的表达,从而增强 EC9706 对腺病毒基因转染效率。将含 CAR 全长的真核表达载体转染至 CAR 表达缺失的食管癌细胞株 EC9706 中,可以抑制它的侵袭,转移表型并且增强对腺病毒基因转染效率。1997 年发现的 CAR 是 Ad5 和 Ad2 的受体,CAR 在不同组织来源肿瘤细胞中的表达水平有明显的差异性,即使在同一组织来源的肿瘤细胞中差异也很明显[8-10],这种差异有可能影响了腺病毒的转导效率,从而影响以腺病毒为载体的基因治疗药物在不同肿瘤类型甚至同种肿瘤的不同个体中的疗效。

TSA 作为一类抗肿瘤药物,是 HDAC 抑制剂的代表药物之一。已证实其在血液病肿瘤和实体肿瘤中均具有强大的抗肿瘤活性,HDAC 抑制剂使靶细胞中组蛋白高度乙酰化,通过乙酰化修饰改变了 DNA 链间与组蛋白的结合状态,使染色体结构变得疏松,从而通过

抑制转录因子与DNA的结合而改变基因的转录。在体外实验中,TSA对HDAC的抑制活性已得到充分证明,在肾癌、肺癌、SLE、膀胱癌等体外实验均有报道,动物模型实验也有报道,但所有的目光只局限在TSA抑制乙酰化酶的活性上[11,12]。以前认为TSA抗瘤作用主要是通过抑制肿瘤细胞生长和诱导其凋亡而实现的[13-15],但最新的观念和研究显示TSA可以上调一系列黏附分子的表达,包括CAR。

CAR最早是作为细胞表面的病毒受体为人们所认识,后来发现它在细胞黏附、上皮细胞极性形成以及细胞的接触抑制等方面起着重要作用,并且可以抑制肿瘤的恶性侵袭转移[16,17]。在大多数肿瘤细胞和组织中,CAR表达往往下调或者缺失,其表达与肿瘤的分级、分期相关,低水平表达的CAR无疑是制约Ad转导效率的主要原因,甚至在某些肿瘤细胞还表现为对Ad转染呈现一定的抗性。因此,如果能找到有效调节CAR的方法,就可解决基因治疗过程中某些肿瘤组织Ad转导效率低下的难题。

在前期实验中我们检测了TSA对食管癌EC9706细胞生物活性的影响,发现0.5 μmol/L浓度之上的TSA抑制食管癌EC9796细胞的生长、诱导EC9706细胞凋亡。有研究表明,溶瘤腺病毒发挥作用主要是在宿主细胞的S期进行复制增殖,因为该期有其复制所需的原料,可以利用宿主细胞的复制原料,大量增殖,从而裂解细胞,一旦细胞周期受到抑制或者细胞被诱导凋亡,即使CAR表达得到提高,腺病毒的转导效率也会受到影响[4,7]。因此,需要在提高CAR表达水平的同时兼顾到TSA所用浓度不会促使EC9706细胞周期阻滞和凋亡产生。

在本实验中我们开始检测了EC9706细胞CAR的表达情况,证实其细胞CAR表达低下,再用0.5 μmol/L TSA作用于EC9706,观察上调食管癌EC9706细胞CAR水平与其对腺病毒基因转染效率之间的关系,对处理前后的细胞以相同滴度携带报告基因GFP的腺病毒进行转染,通过流式细胞仪检测不同时间的转染效率,发现处理后的转染效率随着TSA作用时间的提高,转染效率较未处理组高了2~6倍以上,细胞体外杀伤能力也增强了3~7倍。本实验证明了0.5 μmol/L TSA可以上调食管癌细胞株EC9706中的CAR表达,从而提高针对以其腺病毒为载体的基因治疗的体外的疗效。TSA上调食管癌CAR的表达,在提高基因治疗效果和抑制肿瘤生长和增强腺病毒转染效率研究方面提供了新的研究途径。

参考文献:

[1] 范良生,陈刚,马丁. 柯萨奇-腺病毒受体在肿瘤发生发展机制中的研究进展[J]. 癌症,2009,28(3):333-336.

[2] Kanerva A, Mikheeva G V, Krasnykh V, *et al*. Targeting adenovirus to the serotype 3 receptor increases gene transfer efficiency to ovarian cancer cells [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(1):275-280.

[3] Yamashita M, Ino A, Kawabata K, *et al*. Expression of coxsackie and adenovirus receptor reduces the lung metastatic potential of murine tumor cells[J]. Int J Cancer, 2007, 121(8):1690-1696.

[4] 夏忠军,常建华,张力,等. 基因工程腺病毒(H101)瘤内注射联合化疗治疗头颈部及食管鳞癌的Ⅲ期临床研究[J]. 癌症,2004,23(12):1666-1670.

[5] Kasman L, Lu P, Voelkel-Johnson C. The histone deacetylase inhibitors depsipeptide and MS-275, enhance TRAIL gene therapy of LNCaP prostate cancer cells without adverse effects in normal prostate epithelial cells[J]. Cancer Gene Ther, 2007, 14(3):327-334.

[6] Wu Z Q, Zhanq R, Chao C, *et al*. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A induced caspase-independent apoptosis in human gastric cancer cell[J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(23):2112-2118.

[7] 陈刚,王蓓蓓,李辅军,等. HDAC抑制剂TSA增强卵巢癌细胞株A2780对腺病毒基因转染效率的体外研究[J]. 癌症,2005,24(10):1196-1200.

[8] Thoelen I, Keyaerts E, Lindberg M, *et al*. Characterization of a cDNA encoding the bovine coxsackie and adenovirus receptor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 288(4):805-808.

[9] Assem M, Schuetz E G, Leggas M, *et al*. Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice[J]. J Biol Chem, 2004, 279(21):22250-22257.

[10] 孙景然,龚莉,李君文. 柯萨奇-腺病毒受体在恶性肿瘤细胞中的表达研究[J]. 现代临床医学,2009,35(4):246-247.

[11] 周玉美,王林,钱俊杰,等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂的构效关系研究进展[J]. 解放军药学学报,2006,22(3):206-209.

[12] Rajkumar S V, Richardson P G, Hideshima T, *et al*. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(3):630-639.

[13] 田凡清,陈新胜,谢军,等. 曲古菌素A对K562细胞中HDAC1表达的影响[J]. 中国现代医学杂志,2006,16(11):1642-1645.

[14] Glaser K B. HDAC inhibitors:clinical update and mechanism-based potential[J]. Biochem Pharmacol, 2007, 74(5):659-671.

[15] Ungerstedt J S, Sowa Y, Xu W S, *et al*. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(3):673-678.

[16] Maglich J M, Parks D J, Moore L B, *et al*. Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes[J]. J Biol Chem, 2003, 278(19):17277-17283.

[17] Wakayama M, Abei M, Kawashima R, *et al*. E1A, E1B double-restricted adenovirus with RGD-fiber modification exhibits enhanced oncolysis for CAR-deficient biliary cancers[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(10):3043-3050.

(收稿 2010-06-14 修回 2010-09-12)

(编辑 张 维)