论著

文章编号:1000-5404(2011)15-1582-04

全反式维甲酸增强携单纯疱疹病毒胸苷酸激酶基因的超声微泡对SMMC-7721细胞的旁观者效应

廖 伟,李生伟,刘长安,龚建平,丁 雄,蔡 宇,周世骥 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院肝胆外科)

[摘要] **目的** 观察经全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)诱导后,单纯疱疹病毒胸苷酸激酶/丙氧鸟苷系统(HSV-TK/GCV)对人肝癌细胞SMMC-7721旁观者效应的影响。**方法** 免疫组化法观察经全反式维甲酸诱导前后SMMC-7721细胞连接蛋白Cx32的表达;将含有HSV-TK基因的质粒通过静电吸附在脂质微泡表面上,采用超声辐照转染并用倒置显微荧光镜及RT-PCR观察TK基因的转入及表达;MTT法观察经全反式维甲酸诱导后HSV-TK/GCV对肝癌细胞SMMC-7721的旁观者效应。**结果** 经全反式维甲酸诱导后SMMC-7721细胞膜上Cx32表达明显增加,而胞质内仅少量表达;通过超声辐照后HSV-TK基因可顺利转入SMMC-7721细胞中并稳定表达;与对照组相比,经全反式维甲酸诱导组可明显提高HSV-TK/GCV对肝癌细胞SMMC-7721的旁观者效应($P<0.05$)。**结论** 全反式维甲酸可提高SMMC-7721细胞中连接蛋白Cx32的表达且能正确定位于细胞膜上,这可能与其能增强HSV-TK/GCV系统对肝癌细胞SMMC-7721的旁观者效应有关。

[关键词] 维甲酸;肝癌;超声微泡;连接蛋白32;单纯疱疹病毒胸苷酸激酶/丙氧鸟苷
[中图法分类号] R394.2; R73-362; R735.7 [文献标志码] A

All-trans retinoic acid enhances bystander effect of HSV-TK/GCV transfected by ultrasound microbubbles in SMMC-7721 cells

Liao Wei, Li Shengwei, Liu Chang'an, Gong Jianping, Ding Xiong, Cai Yu, Zhou Shiji (Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK) transfected by ultrasound microbubbles and ganciclovir (GCV) in SMMC-7721 hepatoma cells after the treatment of all-trans retinoic acid (ATRA). **Methods** MTT assay was used to test the proper concentration of ATRA or GCV in treatment of SMMC-7721 cells. Immunohistochemistry was used to survey the expression of Cx32 protein in SMMC-7721 cells after ATRA treatment. Fluorescence microscopy and RT-PCR were used to detect the expression of TK in SMMC-7721 cells transfected with pIRES2-EGFP-TK with ultrasound microbubbles under ultrasound wave irradiation, and MTT assay was used to survey the changed bystander effect of SMMC-7721 on HSV-TK/GCV after ATRA treatment. **Results** The proper concentrations of ATRA and GCV were 10^{-6} mol/L and 40 μg/ml respectively in the treatment of SMMC-7721 cells. After the cells exposure to 10^{-6} mol/L ATRA, Cx32 protein was in high expression on the cell membrane but in low expression in the cytoplasm. HSV-TK was transfected into SMMC-7721 cells by ultrasound wave irradiation and expressed stably. ATRA treatment enhanced the bystander effect of HSV-TK/GCV on SMMC-7721 cells compared with the cells without ATRA treatment ($P<0.05$). **Conclusion** ATRA can improve the expression of Cx32 protein and lead Cx32 protein to cell membrane, which might be involved in ATRA enhancing the bystander effect of HSV-TK/GCV on SMMC-7721 cells.

[**Key words**] retinoic acid; hepatoma; ultrasound microbubbles; Cx32; herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30872977) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2008BB5229). Corresponding author: Li Shengwei, E-mail: cqlsw@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30872977);重庆市自然科学基金(CSTC2008BB5229)

[通信作者] 李生伟,E-mail:cqlsw@yahoo.com.cn

单纯疱疹病毒胸苷酸激酶(herpes simplex virus thymidine kinase, HSV-TK)/丙氧鸟苷(ganciclovir, GCV)系统是目前研究较为广泛的自杀基因治疗系统,

前人研究结果发现该系统对多种恶性肿瘤细胞株具有明显的杀伤作用,但该系统对不同的肿瘤细胞杀伤作用差异巨大,可能与该系统在不同肿瘤细胞株中的旁观者效应不同有关[1]。旁观者效应这一概念由 Culver 等于 1992 年最早提出,简单来说就是通过转基因细胞产生的毒性产物通过细胞间隙连接(gap junction,GJ)传递到邻近肿瘤细胞而导致同步死亡。全反式维甲酸(all-trans retinoic acid,ATRA)是目前发现能显著改变细胞间隙连接的物质之一,在许多肿瘤细胞中已发现有此改善作用[2-3]。为进一步增强自杀基因在肝癌治疗中的疗效及应用,本实验探讨经 ATRA 诱导后,自杀基因 HSV-TK/GCV 系统对人肝癌细胞 SMMC-7721 旁观者效应的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

增强型绿色荧光蛋白与单纯疱疹病毒Ⅰ型胸苷激酶真核共表达质粒载体(pIRES2-EGFP-TK)由本课题组前期合成[4],超声微泡造影剂由重庆医科大学附属第二医院超声研究所惠赠,肝癌细胞株 SMMC-7721 由重庆医科大学生物工程研究所提供,ATRA、GCV 均购于 Sigma 公司,RT-PCR 试剂盒购于美国 Promega 公司,SABC 免疫组化试剂盒购于北京中山生物技术有限公司,无内毒素质粒大提试剂盒为 TIANGEN 产品,兔抗人 Cx32 单抗购于美国 GDB 公司。

1.2 方法

1.2.1 ATRA 处理及细胞增殖实验 以每孔 5×10^3 细胞接种于 96 孔板,培养 24 h 后对照组加入无血清 RPMI1640 液,实验组避光加入 ATRA,每个浓度 6 个复孔,使终浓度分别为 10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8} mol/L,置培养箱中培养。24 h 取出 96 孔板,弃上清液,每孔避光加入 20 μl MTT 液(5 mg/ml),温箱孵育 4 h 后每孔加入 150 μl DMSO,摇床震荡 10 min,用酶标仪在波长 570 nm 测定每孔光密度值[$D(570)$],计算抑制率。抑制率 = $[1-D(570)_{实验组}/D(570)_{对照组}]\times100\%$。

1.2.2 GCV 对 SMMC-7721 细胞毒性作用 以每孔 1×10^4 细胞接种于 96 孔板,培养 24 h 后避光加入 GCV(终浓度为 0、20、40、60、80、100 μg/ml),48 h 后弃上清液,每孔避光加入 20 μl MTT 液(5 mg/ml),温箱孵育 4 h 后每孔加入 150 μl DMSO,摇床震荡 10 min,用酶标仪在波长 570 nm 测定每孔光密度值[$D(570)$],计算抑制率。抑制率 = $[1-D(570)_{实验组}/D(570)_{对照组}]\times100\%$。

1.2.3 SABC 法观察 SMMC-7721 细胞胞质及胞膜上 Cx32 蛋白的表达 将 6 张泡酸、高温消毒后的载玻片放入 6 孔板内,每孔加入正常 SMMC-7721 细胞 2×10^4,然后分别用不含 ATAR 及含有 10^6 mol/L ATRA 的培养基各加 3 孔至 2 ml,温箱孵育 48 h 后,待载玻片上细胞密度约 80% 时行细胞爬片处理。然后按照 SABC 免疫组化试剂盒说明书操作行细胞免疫组化,苏木精复染、梯度酒精(70% ~100%)脱水、二甲苯透明及树脂封片后,于显微镜下观察、摄片后用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件进行平均强度分析。

1.2.4 重组质粒 DNA 的提取及 SMMC-7721 克隆筛选 载有 pIRES2-EGFP-TK 质粒的大肠杆菌在 LB 培养基过夜培养后,按试剂盒说明书操作提取质粒,经紫外分光光度计测定合格(纯度为 1.9,调整浓度为 1 μg/μl)。所提取质粒以 0.2 μg/μl 按 1∶4 的浓度与脂质微泡混合,4 ℃静置 30 min,超声辐照转染(条件设定:30 s,1 MHz,0.5 W/cm^2)[4] 后于含 G418 培养液中筛选 1 ~3 周,设阴性对照,扩增培养阳性克隆细胞 SMMC-7721,倒置荧光显微镜下观察转染后细胞生长情况并提取阳性克隆细胞 RNA,采用 RT-PCR 鉴定 TK 基因的转染及表达。

1.2.5 ATRA 增强 HSV-TK/GCV 旁杀效应的观察 将筛选后的 TK^+ SMMC-7721 细胞和未经转染的 TK^- SMMC-7721 细胞离心后悬浮,然后按不同比例(TK^+ SMMC-7721 细胞/TK^- SMMC-7721 细胞分别为 0%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%)混合后接种于 96 孔板,每组 6 复孔,其中 5 孔为含终浓度 10^{-6} mol/L ATRA 的培养基,另一孔不含 ATRA 为组内对照。约 80% 融合后换含 GCV 40 μg/ml 的培养基,72 h 后测光密度值,每孔杀伤率 = $\{[D(570)_{对照组}-D(570)_{实验组}]/D(570)_{对照组}\}\times100\%$,求均值。

1.3 统计学分析

所有数据采用 SPSS 17.0 软件处理,多组数据间采用多因素的 q 检验分析,2 组数据间采用 t 检验分析,结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 ATRA 作用于 SMMC-7721 细胞最适浓度选定

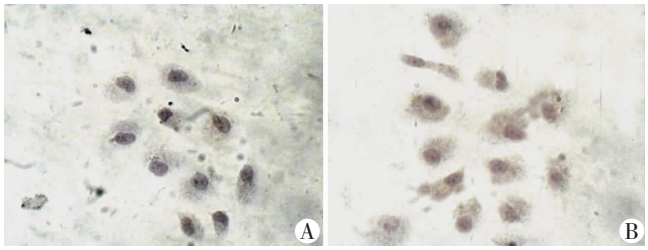
当 ATRA 浓度在 10^{-4} mol/L 时对 SMMC-7721 的抑制率为(45.03 ±2.40)%,与其他浓度组比较差异有统计学意义;当浓度为 10^{-5} mol/L 时对细胞生长有轻度抑制作用,抑制率约为(9.48 ±1.73)%,与 10^{-4} mol/L 浓度组比较差异有统计学意义($P<0.01$);浓度为 10^{-6}、10^{-7}、10^{-8} mol/L 时,抑制率分别为(2.81 ±1.02)%、(2.72 ±0.94)%、(1.78 ±0.12)%,与 10^{-4} mol/L 及 10^{-5} mol/L 浓度组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。故本实验在后面观察 ATRA 对增强 HSV-TK/GCV 系统旁观杀伤效应时,选用 10^{-6} mol/L 浓度,以排除 ATRA 本身对细胞的抑制杀伤效应。

2.2 GCV 对 SMMC-7721 细胞的毒性作用

60、80、100 μg/ml 浓度组细胞成活率分别为(60.43 ±0.06)%、(5.68 ±0.24)%、(4.19 ±0.07)%,而 0、20、40 μg/ml 浓度组细胞存活率分别为(99.81 ±0.01)%、(98.42 ±0.03)%、(95.16 ±0.04)%,前 3 个浓度组间两两相比 60 μg/ml 组存活率明显高于其他 2 组($P<0.01$),而后 3 个浓度组间两两相比则无统计学意义($P>0.05$);当 GCV 浓度≤40 μg/ml 时对细胞的生长无明显影响,存活率 >95%,与 60 μg/ml 比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.3 SMMC-7721 细胞内连接蛋白 Cx32 的表达

如图 1 所示,未经 ATRA 诱导的 SMMC-7721 细胞在其胞质内和胞膜上都仅有少量的淡棕黄色颗粒聚集;而经 10^6 mol/L 浓度 ATRA 诱导后的 SMMC-7721 细胞出现含有淡棕黄色的颗粒明显增加,主要分布在胞膜上,而胞质中呈少量表达。未经 ATRA 诱导组和 10^6 mol/L 浓度 ATRA 诱导组经 Image-Pro Plus6.0 分析染色强度分别为 0.13 ±0.04 和 0.24 ±0.06,2 组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

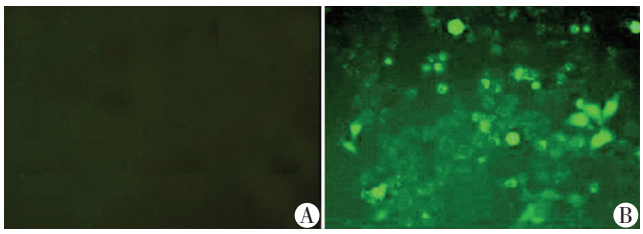


A:未加 ATRA 组;B:10^{6} mol/L ATRA 组

图1 免疫组化染色观察 Cx32 蛋白在细胞质及细胞膜的表达 (SABC ×400)

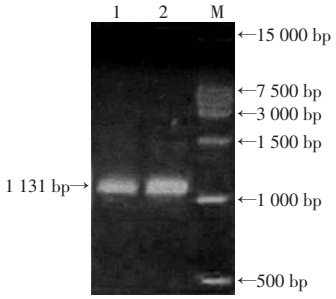
2.4 TK 阳性 SMMC-7721 细胞的建立

转染后7 d于倒置荧光显微镜下观察:阴性对照细胞全部死亡,未见绿色荧光表达(图2A);转染阳性细胞生长良好,细胞核内可见荧光表达(图2B)。经扩增传代培养后建立 SMMC-7721 TK^{+} 细胞,提取细胞 DNA,经 RT-PCR 检测看到特异性 1 131 bp 的 TK 基因片段(图3),提示 HSV-TK 基因成功的转入 SMMC-7721 细胞核内。



A:TK 基因阴性的 SMMC-7721 细胞组;B:TK 基因阳性的 SMMC-7721 细胞组

图2 倒置荧光显微镜观察转染后的 SMMC-7721-TK 细胞在含 G418 培养基培养 7 d 后的存活情况 (×400)



1:待测基因;2:TK 阳性对照;M:标准

图3 RT-PCR 鉴定 TK 基因的转染及表达

2.5 ATRA 对 HSV-TK/GCV 自杀基因系统治疗肝癌细胞 SMMC-7721 的旁观者效应

在 HSV-TK/GCV 组中 TK + 细胞为 80% 时基本达到其最大杀伤效应,此时癌细胞存活率约为 35% 左右;而在 ATRA + HSV-TK/GCV 组中 TK + 细胞仅需 60% 就可发挥最大杀伤效应,此时癌细胞存活率约 28% 左右,而 HSV-TK/GCV 组中细胞存活率约 46%,两者具有统计学差异($P<0.01$)。而在相同 TK^{+}/TK^{-} 细胞比值下,除了 0∶10 及 3∶7 两混合比例外,其余各比例经过 ATRA 诱导后 HSV-TK/GCV 系统对肝癌细胞的杀伤效应均提高了 10% 左右,且与非 ATRA 诱导组相比具有统计学意义($P<0.05$),见表1。

表1 ATRA 联合与否对 SMMC-7721 细胞旁杀效应的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

TK^{+}∶TK^{-} SMMC-7721 细胞混合比例	HSV-TK/GCV 组 细胞存活率	ATRA + HSV-TK/GCV 组 细胞存活率	t 值
0∶10	93.15 ± 0.09	92.87 ± 0.01[a]	0.82
1∶9	88.42 ± 0.13[b]	79.08 ± 0.04	1.78
2∶8	80.71 ± 0.05[b]	71.73 ± 0.03	1.41
3∶7	73.01 ± 0.09[a]	62.44 ± 0.04[a]	2.26
4∶6	66.85 ± 0.06[ab]	53.14 ± 0.01[a]	2.29
5∶5	54.21 ± 0.05[ab]	45.23 ± 0.05[a]	4.43
6∶4	46.24 ± 0.02[ab]	28.79 ± 0.04	3.94
7∶3	41.95 ± 0.03[ab]	25.13 ± 0.07	6.11
8∶2	35.23 ± 0.10[b]	24.12 ± 0.09	3.39
1∶9	33.16 ± 0.11[b]	25.42 ± 0.07	1.65
10∶0	32.18 ± 0.15[b]	24.54 ± 0.11	2.48

a:$P<0.01$,组内两两比较;b:$P<0.05$,与 ATRA + HSV-TK/GCV 组比较

3 讨论

自杀基因是目前肿瘤基因治疗中最有成效的方案,国内外众多研究结果表明 HSV-TK/GCV 自杀基因系统在治疗肿瘤时其效果与 TK 基因转染率和旁观者效应相关。在当下基因转染率不尽人意的情况下[5],探讨如何提高旁观者效应具有重要意义。目前旁观者效应具体作用机制尚未完全阐明,但间隙连接机制为大多数学者所接受。细胞间隙连接是由相邻细胞膜上的跨膜连接蛋白 Cx 组成的结合体对接而成,由其介导细胞间隙连接通讯(gap junctional intercellular communication,GJIC)。GJIC 通过相邻细胞的相互调控及物质交换促进细胞正常的生长及分化,国内外大量的研究结果显示在肝脏肿瘤发生时可以观察到 GJIC 功能会不同程度的降低乃至丧失[6-7]。因而 Ara 等[8]提出 Cx 基因可比非突变型抑癌基因,大多 GJIC 功能异常归根到底还是 Cx 表达及功能异常[9]。

Cx32 正常表达于肝细胞胞质内,是构成肝细胞间隙连接的主要蛋白之一。其表达可受到多种化学物质诱导的调节,如糖皮质激素、雌激素、环腺苷酸、全反式维甲酸(ATRA)等。ATRA 是一种良好的诱导分化剂,通过核维甲酸受体诱导肿瘤细胞分化和抑制增殖。本实验采用 10^{-6} mol/L 的 ATRA 浓度诱导肿瘤细胞中连接蛋白 Cx32 的表达,免疫细胞化学法(SABC 法)结果显示:与对照组相比,ATRA 诱导组中 SMMC-7721 细胞胞质内及胞膜上连接蛋白 Cx32 表达均增加,但以胞膜上增加更为明显。提示 ATRA 不仅可提高 Cx32 的表达,还可使 Cx32 正确定位于细胞膜。在此基础上观察经 ATRA 诱导前后 HSV-TK/GCV 系统对 SMMC-7721 细胞旁观者效应的影响,实验结果可见经 ATRA 诱导后,自杀基因 HSV-TK/GCV 系统对肝癌细胞的杀伤作用与非诱导组相比明显提高($P<0.05$)。类似的结论也出现在陈卫国等[10]的研究中,他们在研究 ATRA 联合 HSV-TK/GCV 系统对前列腺癌 PC-3 细胞治疗中发现:当 HSV-TK/GCV 组和 ATRA + HSV-TK/

GCV 组中 $TK^+:TK^-$ 细胞为50%时,前者细胞存活率为60%而后者为40%,两者相比具有统计学意义($P<0.05$),而当 $TK^+:TK^-\geq 80\%$ 时,2组间差别无统计学意义;在刘为青等[11]的研究中也可见上述相似结论,他们的研究结果发现不同 $TK^+:TK^-$ 时,与对照组相比,经 ATRA 诱导后 HSV-TK/GCV 系统对小鼠胰腺癌细胞的杀伤作用从10%提高到50%不等,可见 ATRA 能提高 HSV-TK/GCV 系统的旁观者效应。

以上结果提示:ATRA 可通过诱导促进人肝癌细胞 SMMC-7721 中 Cx32 的表达及正确定位,从而提高 HSV-TK/GCV 系统对治疗肝癌的旁观者效应。但本实验中仍有部分问题尚待解决,如 ATRA 是如何提高连接蛋白的表达以及 ATRA 是如何将 Cx32 正确定位于细胞膜上等。这些问题目前国内外还少见相关报道,我们可以以此作为深入探索研究的切入点。此外,本实验舍弃了体外实验传统的病毒载体或脂质载体等转染目的质粒方式,而是以超声微泡造影剂为载体通过超声辐照转染,其目的是为后续体内实验提供参考,并利用超声微泡造影剂在提高基因转染率[4]的同时具有相对安全性及靶向性的优势[12-13],具有一定的临床应用前景。

参考文献:

[1] Cross D, Burmester J K. Gene therapy for cancer treatment: past, present and future[J]. Clin Med Res, 2006, 4(3): 218-227.
[2] 刘志能, 姚珍薇, 唐良荅, 等. ATRA 调节人异位子宫内膜间质细胞 GJIC Connexin 基因、蛋白的作用及意义[J]. 生殖与避孕, 2008, 28(2): 84-88, 124.
[3] Long A C, Bomser J A, Grzybowski D M, *et al*. All-trans retinoic Acid regulates cx32 expression, gap junction communication and differentiation in primary lens epithelial cells[J]. Curr Eye Res, 2010, 35(8): 670-679.
[4] 唐勇, 刘作金, 周世骥, 等. 增强型绿色荧光蛋白与单纯疱疹病毒Ⅰ型胸苷激酶共表达质粒载体构建及在肝癌细胞株 HepG2 中表达的研究[J]. 中国实用外科杂志, 2009, 29(11): 937-940.
[5] Evaluation of transfection efficiency in skeletal muscle using microbubbles and ultrasound[J]. Ultrasound in Medicine, 2010, 36(7): 1196-1205.
[6] Leithe E, Sirnes S, Omori Y, *et al*. Downregulation of gap junctions in cancer cells[J]. Crit Rev Oncog, 2006, 12(3/4): 225-256.
[7] Mesnil M, Crespin S, Avanzo J L, *et al*. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1719(1/2): 125-145.
[8] Ara C, Massimi M, Devirgiliis-Conti L. Retinoic acid modulates gap junctional intercellular communication in hepatocytes and hepatoma cells[J]. Cell Mol Life Sci, 2002, 59(10): 1758-1765.
[9] 杨燕, 陶亮. 细胞缝隙连接与 HSV-TK/GCV 系统旁观者效应的关系[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(1): 9-12.
[10] 陈卫国, 严春寅, 侯建全, 等. 全反式维甲酸提高激素非依赖性前列腺癌自杀基因治疗的旁观者效应[J]. 中华男科学杂志, 2008, 14(2): 122-125.
[11] 刘为青, 杨军, 董坚. HSV-TK+GFP/GCV 自杀基因系统对小鼠胰腺癌的治疗作用[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(15): 1498-1503.
[12] 唐勇, 刘长安, 朱辉. 局部物理治疗肝癌的研究进展[J]. 临床超声医学杂志, 2009, 11(1): 43-45.
[13] 杨扬, 王志刚. 超声微泡造影剂实现肿瘤靶向性治疗研究进展[J]. 临床超声医学杂志, 2008, 10(9): 613-615.

(**收稿**:2011-01-13;**修回**:2011-03-05)
(编辑 吴培红)

(上接1581页)

显改善晚期胃癌患者的生存期,提高生活质量。晚期胃癌的一线治疗以氟尿嘧啶类加顺铂为基础,然而,治疗失败以后如何进行后续优化治疗,目前尚无大规模研究。经过一线联合方案治疗失败的晚期胃癌患者,一般情况多数较差,PS 评分多在1~2分,再行联合化疗时须充分考虑化疗的疗效及患者的耐受情况。

替吉奥胶囊(S-1)是新一代的氟尿嘧啶衍生物口服抗肿瘤药物,单药一线治疗晚期胃癌的有效率约为40%[1]。多西他赛是一种半合成的紫杉类抗肿瘤药物,抗瘤谱广,其活性较紫杉醇更高,其单药治疗晚期胃癌的有效率在20%左右[2]。之前大型Ⅲ期临床 V325 研究显示:DCF 方案(多西他赛、顺铂、5-Fu)和 CF 方案(顺铂、5-Fu)治疗晚期胃癌的 TTP 分别为5.6和3.7个月,MST 分别为9.2和8.6个月,Ⅲ~Ⅳ度的粒细胞减少分别为29%和12%,该结果显示 DCF 治疗晚期胃癌有效,但同时不良反应也较严重,导致患者难以耐受该方案化疗[3]。

我们对晚期胃癌的化疗方案进行进一步改良,结果显示,S-1 联合多西他赛治疗铂类失败的晚期胃癌,22例患者中5例 PR,9例 SD,RR 22.7%,DCR 63.6%,TTP 为2.9个月,MST 为5.1个月,其不良反应主要是骨髓抑制及消化道反应,白细胞总数及中性粒细胞减少发生率在75%以上,但多为Ⅰ、Ⅱ度,经及时治疗后多能缓解,基本不影响治疗进程。而目前晚期胃癌二线治疗常用的方案如伊立替康联合顺铂或氟尿嘧啶类的 DCR 在30%~40%[4]。相比而言,我们的研究结果显示 DS 方案的近期疗效较好,不良反应患者多可耐受。且口服 S-1 可以替代静脉持续输注5-Fu,减少了静脉穿刺和置管的风险和并发症。

参考文献:

[1] Tsushima T, Hironaka S, Boku N, *et al*. Safety and efficacy of S-1 monotherapy in elderly patients with advanced gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2010, 13(4): 245-250.
[2] Nishiyama M, Wada S. Docetaxel: its role in current and future treatments for advanced gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2009, 12(3): 132-141.
[3] Van-Cutsem E, Moiseyenko V M, Tjulandin S, *et al*. Phase Ⅲ study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(31): 4991-4997.
[4] Kang H, Kauh J S. Chemotherapy in the treatment of metastatic gastric cancer: is there a global standard? [J]. Curr Treat Options Oncol, 2011, 12(1): 96-106.

(**收稿**:2011-01-21;**修回**:2011-03-23)
(编辑 王 红)