基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000889

GRP78重组表达腺病毒的构建及在HepG2细胞的表达及其相关功能研究

吴 爽[1],张 祥[1],魏 杰[1],汪德强[2],罗 森[3]

(1. 重庆医科大学检验医学院,重庆 400016;2. 感染性疾病分子生物学教育部重点实验室,重庆 400016;
3. 重庆市渝北区人民医院医学检验科,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78,GRP78)重组表达腺病毒 pAd-GRP78,并感染 HepG2 细胞建立能够高表达 GRP78 的细胞模型,同时在 HepG2 细胞中研究重组表达 GRP78 腺病毒对细胞增殖能力的影响。**方法**:利用腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-TO4 构建载有 GRP78 基因的穿梭质粒 pAdTrack-TO4-GRP78 载体,并通过基因测序鉴定载体序列正确。将载体用 *Pme* Ⅰ酶切线性化,与 AdEasy-BJ5183 感受态细胞进行基因同源重组。将重组后的腺病毒载体经 *Pac* Ⅰ酶切线性化后,转染到 HEK293 细胞中进行包裹,根据增强绿色荧光蛋白(enhance green fluorescent protein,EGFP)的表达判断重组腺病毒的包装情况。通过反复离心和低温裂解细胞提取 GRP78 重组表达腺病毒。以人肝癌 HepG2 细胞为目标,进行病毒感染。通过 qRT-PCR 检测 GRP78 基因表达情况,使用 Western blot 检测 GRP78 蛋白的表达。最后感染 HepG2 细胞,通过 MTS 比色法检测重组表达 GRP78 腺病毒对细胞增殖的影响。**结果**:测序验证 pAdTrack-TO4-GRP78 构建成功,酶切验证重组腺病毒载体 pAd-GRP78 构建成功。在 HEK293 细胞中将 pAd-GRP78 包裹,GPF 荧光检测结果表示病毒包装成功。使用 pAd-GRP78 感染人肝癌 HepG2 细胞,qRT-PCR 检测到细胞中 GRP78 基因的过表达,Western blot 方法检测到 GRP78 蛋白的高表达。MTS 检测结果显示重组表达 GRP78 腺病毒对 HepG2 肝癌细胞有促增殖作用。**结论**:实验成功构建了 GRP78 重组表达腺病毒,并验证了构建的腺病毒载体可以收集并感染 HepG2 细胞表达 GRP78 蛋白。证明了重组表达 GRP78 腺病毒能够促进肝癌细胞的增殖。为进一步研究 GRP78 的功能奠定了基础。

【关键词】腺病毒;葡萄糖调节蛋白 78;HepG2 细胞;MTS

【中图分类号】Q71 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2015-07-16

Construction and expression of recombinant GRP78-expressed adenovirus and GRP78 expression in HepG2

Wu Shuang[1], *Zhang Xiang*[1], *Wei Jie*[1], *Wang Deqiang*[2], *Luo Miao*[3]

(*1. Department of Laboratory, Chongqing Medical University*;
2. Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University; *3. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Yubei District of Chongqing*)

【Abstract】*Objective*: To construct recombinant glucose regulated protein(GRP78)-expressed adenovirus, to establish a cell model by infecting HepG2 cells, and to study the effect of recombinant GRP78 adenovirus on cell proliferation in the HepG2 cells. ***Methods***: Plasmid pAdTrack-TO4-GRP78 containing GRP78 gene was constructed by using adenovirus shuttle plasmid pAdTrack-TO4, and the sequence was identified by restriction enzyme digestion method. After linearized by Enzyme digestion of *Pme* Ⅰ, it was homologous recombination with AdEasy-BJ5183 cells. The recombinant adenovirus vector was linearized by *Pac* Ⅰ enzyme and transfected into HEK293 cell. The packaging of recombinant adenovirus was judged by the expression of the enhanced green fluorescent protein. GRP78 recombinant adenovirus was extracted by repeated centrifugation and low temperature cracking. HepG2 cells were infected with recombinant adenovirus. The expression of GRP78 gene was detected by qRT-PCR. The expression of GRP78 protein was detected by Western blot. Then the GRP78 adenovirus infected HepG2 cells. The effect of recombinant GRP78 adenovirus on cell proliferation was detected by MTS colorimetric assay. ***Results***: It was proved by gene sequencing that pAdTrack-TO4-

作者介绍:吴 爽,Email:39480829@qq.com,
研究方向:病原微生物重要蛋白结构和功能。

通信作者:汪德强,Email:cquwangdq@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81301395)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160318.1152.018.html (2016-03-18)

GRP78 was successfully constructed. And by enzyme digestion validation, the recombinant adenovirus vector pAd-GRP78 was successfully constructed. After pAd-GRP78 being transfected into HEK293 cells, the GPF fluorescence results indicated that the virus was successfully packaged. HepG2 cells were infected with recombinant virus. And the expression of GRP78 gene was confirmed by qRT-PCR, and the expression of GRP78 protein was confirmed by Western blot. MTS showed that the recombinant expression of GRP78 adenovirus could promote the proliferation of HCC cells. ***Conclusion***: GRP78 recombinant adenovirus vector was successfully constructed, and the recombinant adenovirus vector could infect HepG2 cells and express GRP78 protein. GRP78 adenovirus could promote the proliferation of HCC cells. This study lay a foundation for further research on the function of GRP78.

【Key words】adenovirus; glucose regulated protein 78(GRP78); HepG2 cell; MTS

葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78, GRP78)，是热休克蛋白 70(heat shock proteins, HSPs)家族的成员之一。GRP78 作为定位于内质网的结合蛋白，有分子伴侣、维持内质网的稳定，保护细胞等多种功能。近年来研究发现 GRP78 在细胞应激时大量表达，降低细胞凋亡，对于慢性心功能障碍的发病机制和治疗研究及乳腺癌，肝癌等恶性肿瘤的诊断和治疗有重要意义[1-4]。

为了深入研究 GRP78 的功能和机制，本实验使用 AdEasy 系统构建了 GRP78 的重组腺病毒载体[5]，通过包装收集到了可保存的 GRP78 重组腺病毒。将 GRP78 重组腺病毒感染肝癌 HepG2 细胞，检测GRP78 在 HepG2 细胞中的表达。同时将重组 GRP78 腺病毒感染 HepG2 细胞中，检测其对肝癌细胞的增殖能力的影响。为 GRP78 介导肝癌的相关研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

实验所需的腺病毒系统 pAdTrack，以及感受态细胞 BJ5183，HepG2 细胞，HEK293 细胞均由本实验室提供。克隆所需酶 Primer star 购自 KaTaRa 公司，酶切鉴定所用限制性内切酶 *Eco* Ⅴ，*Bam*H Ⅰ购自 KaTaRa 公司，*Pme* Ⅰ、*Pac* Ⅰ购自 NEB 公司，胶回收试剂盒购自碧云天公司，培养细胞所需 DMEM 培养基以及 FBS 购自 Gibico 公司。转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。TriZol 试剂购自 lifetechnologies 公司。逆转录试剂盒购自 Promega。蛋白裂解液 RIPA 购自碧云天公司。GRP78 抗体购自 Abcom 公司。MTS 试剂购自 Promega。DMSO 购自 Invitrogen 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 构建重组穿梭质粒 pAdTrack-GRP78 载体 根据 GenBank 中 GRP78 序列，设计正反 2 条 GRP78 编码基因扩增的引物 GRP78-R:5'-CGGGATCCATGAAGCTCTCCCTGGTGGC-3'，GRP78-F;3'-CCGGATATCCTACAACTCATCTTTTTCTGC-5'，引物由六合华大基因有限公司合成。以基因组DNA 为模板扩增 GRP78 基因。将目的基因和载体同时以 *Eco* Ⅴ和 *Bam*H Ⅰ酶切，使用 T4 连接酶连接目的片段及 pAdTrack-TO4 载体。挑取卡那霉素选择性培养基筛选并通过菌液 PCR 鉴定的阳性克隆，提取质粒，再次使用 *Eco* Ⅴ和 *Bam*H Ⅰ双酶切法进行鉴定后测序。测序由六合华大基因有限公司完成。将正确构建的穿梭质粒命名为 pAdTrack-TO4-GRP78。

1.2.2 重组 GRP78 腺病毒载体的构建 将穿梭质粒 pAdTrack-TO4-GRP78 使用 *Pme* Ⅰ酶切使其线性化。在含腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的 AdEasy-BJ5183 感受态细胞使用电转方法将线性化质粒转入。使用卡那霉素选择性培养基筛选阳性克隆，挑取肉眼所见最小菌落于那卡液体培养基继续扩增培养。提取质粒，通过琼脂糖凝胶电泳，选取条带位置最高的质粒，*Pac* Ⅰ酶切鉴定质粒。选取酶切后显示 3.0 kb 或 4.5 kb 同时含有 12 kb 以上条带的克隆载体，将其命名为 pAd-GRP78 重组载体。之后将载体电转入 DH5B 感受态细胞，挑取单克隆菌落，扩大培养，提取 pAd-GRP78 质粒。

1.2.3 重组表达 GRP78 腺病毒在 HEK293 细胞包裹和转染 取 3~6 μg 质粒，通过 *Pac* Ⅰ酶切，乙醇纯化后加入 15 μl ddH_2O。采用 HEK293 细胞接种于 10 cm 培养皿，使其细胞密度保持在 40%~60%时准备转染上述线性化质粒。在 250 μl OPTI-MEM 培养基中加入制备的质粒溶液 15 μl，并加入 19 μl Lipofectamine 2000，于 37 ℃孵育 17 min。同时弃掉原细胞培养上清，PBS 清洗 3 次后，将 2.5 ml DMEM 培养基(不含抗生素和血清)加入 HEK293 细胞，质粒孵育完成后加入此培养基中，37 ℃培养 4~6 h 后更换 10 ml DMEM 培养基(含抗生素和 10%血清)。24 h 后荧光显微镜观察有无 GPF 绿色荧光，之后连续 10 d 观察荧光变化。

1.2.4 重组表达 GRP78 腺病毒的收集保存和滴度测定 通过观察，在 1/3 细胞漂浮后(大约第 10 天)，可以收集病毒。弃原细胞培养基，PBS 清洗 3 次，胰酶消化细胞后，将细胞收集于离心管，于 4 ℃在 4 000 r/min 条件下离心 5 min，弃上清，振匀。于液氮速冻 3 min 后取出，立刻置于 37 ℃纯水中溶解，振匀。反复冻融 3~5 次，再次 4℃在 4 000 r/min 条件下离心 5 min，之后加入 300 μl 病毒储存液。20 μl 为单位进行分装，并于-20 ℃保存。

为了验证 GRP78 重组腺病毒滴度，取重组病毒和空载腺病毒，感染 HepG2 细胞并进行病毒扩增，于 24 孔板上倍比加入不同体积含量的病毒，使其感染细胞，用感染细胞 GFP 阳性数目来计算感染复数（multiplicity of infection，MOI）以及病毒滴度。

1.2.5 qRT-PCR 检测重组表达 GRP78 腺病毒在 HepG2 细胞中表达　用体积分数 10% FBS 的 DMEM 培养液培养 HepG2 细胞 12 h，更换新鲜培养基，并按 MOI 为 20 的标准加入重组腺病毒（表达 GRP78 的腺病毒和空病毒对照），感染 48 h 后，荧光显微镜检测 HepG2 细胞 GFP 绿色荧光含量。72 h 后弃细胞培养基。用 TriZol 法提取细胞总 RNA，用 cDNA 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。qRT-PCR 检测 GRP78 是否表达，qRT-PCR 反应条件为：第一步，95 ℃，10 min，1 个循环；第二步，95 ℃，15 s，60 ℃，1 min，40 个循环；第 3 步，72 ℃，3 min，95 ℃，1 min，55 ℃，1 min，1 个循环；第 4 步，55 ℃，1 min，81 个循环。

1.2.6 重组表达 GRP78 腺病毒在 HepG2 细胞中表达的 Western blot 检测　按上述方法转染 HepG2 细胞 72 h，清洗细胞后，使用 RIPA 裂解细胞并提取蛋白。BSA 法检检测蛋白浓度。取 50 μg 蛋白上样量进行 SDS-PAGE 电泳，然后转移至 PVDF 膜上，封闭液封闭 1 h，GRP78 抗体孵育 4 ℃过夜，TBST 洗膜后，二抗常温孵育 1 h，再次 TBST 洗膜。加入化学发光剂 ECL，曝光获得相应的条带，分析结果。

1.2.7 重组表达 GRP78 腺病毒及干扰 GRP78 表达的 siRNA 在 HepG2 细胞中表达的 MTS 检测　按上述方法将 Ad-GRP78 转染于 HepG2 细胞，同时转染空白对照腺病毒 Ad-GFP 于另一批 HepG2 细胞。细胞培养 3 d 后，将过表达 GRP78 以及正常表达 GRP78 的 HepG2 细胞分为 5 组，每组 3 个副孔，分别铺于 96 孔板中，每孔细胞数为 4 000 个，并确保每孔培养基总体积为 200 μl。待细胞贴壁后，在避光情况下，于各批细胞的第 1 组中加入 MTS 试剂 20 μl。37 ℃细胞孵育箱中培养 2 h。使用酶标仪在 490 nm 波长条件下检测各空细胞数，此数据记录为第 1 天（12 h）数据。用同样的方法在第 2~5 组中检测第 2~5 天（48~96 h）数据。

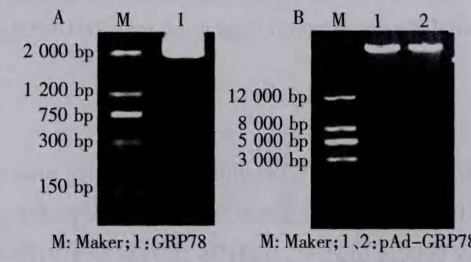
将 50 nmol 干扰 GRP78 表达的 siRNA 以及空白对照 RNA 分别加入 1.5EP 管中，并加入 200 μl Opti-MEM 培养基，10 μl Lipofectamine 2000，轻轻混匀后 37 ℃孵育 17 min。分别加入不同的 HepG2 细胞中。37 ℃孵育 4 h 后更换新鲜 DMEM 培养基。按上述方法将细胞铺于 96 孔板中，检测 5 d MTS。记录并分析数据。

2 结　果

2.1 重组表达 GRP78 腺病毒的构建结果

GRP78 基因扩增产物的电泳结果如图 1A 所示。将 GRP78 序列扩增回收成功后，通过检测，PCR 产物大小为 1 965 bp。GRP78 片段连接入 pAdTrack-TO4 载体中 *Eco* Ⅴ和 *Bam*HⅠ双酶切法处理后，阳性克隆菌落条带位置与理论长度一致。测序结果比对显示，阳性菌落测序结果与 GenBank 中 GRP78 序列完全一致。证明 GRP78 成功连接在 pAdTrack-TO4 载体上，pAdTrack-TO4-GRP78 载体构建成功。

通过酶切的 pAdTrack-TO4-GRP78 载体和 pAdEasy-1 质粒在 AdEasy-BJ5183 感受态细胞中重组后的质粒用 *Pac* Ⅰ酶切鉴定结果如图 1B 所示。结果显示，有 3.0 kb 及 12 kb 以上多条条带，符合相关文献和腺病毒说明书描述的酶切特征，说明重组表达 GRP78 腺病毒构建成功。



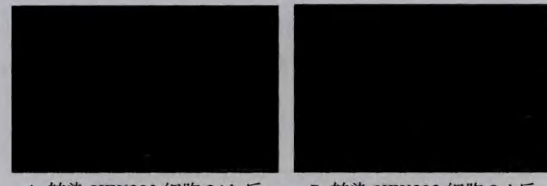
M: Maker；1：GRP78　　M: Maker；1、2：pAd-GRP78

图 1　pAdTrack-TO4-GRP78 载体和重组表达 GRP78 腺病毒的构建

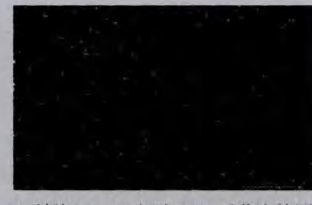
Fig.1　Construction of recombinant GRP78 adenovirus and pAdTrack-TO4-GRP78

2.2 重组表达 GRP78 腺病毒的包裹，转染及保存

将 *Pac* Ⅰ酶切后的质粒在 HEK293 细胞中转染。24 h 后显微镜观察有微弱荧光，如图 2A 所示；第 8 天观察荧光强烈，如图 2B 所示，说明重组表达 GRP78 腺病毒在细胞内包装成功。将收集并保存在-20 ℃条件下的病毒，转染 HepG2 细胞，24 h 荧光显微镜观察，荧光强烈，如图 2C 所示，说明重组表达 GRP78 腺病毒的收集和保存方法是有效的，可以得到能够保存的腺病毒。



A. 转染 HEK293 细胞 24 h 后荧光检测　　B. 转染 HEK293 细胞 8 d 后荧光检测



C. 转染 HepG2 细胞 24 h 后荧光检测

图 2　重组表达 GRP78 腺病毒的转染

Fig.2　Transfection of recombinant GRP78 adenovirus

2.3 重组表达 GRP78 腺病毒在 HepG2 细胞中表达

通过比对感染表达 GRP78 腺病毒的 HepG2 细胞与感染空腺病毒的 HepG2 细胞，qRT-PCR 结果显示，感染重组表达 GRP78 腺病毒的细胞 GRP78 的 mRNA 呈现高水平表达（1.45%），而空腺病毒感染的细胞 GRP78 的 mRNA 则呈现低水平表达（87.34%），差异有统计学意义（$P<0.05$）。如图 3A 所示。说明重组表达 GRP78 腺病毒可以在 HepG2 细胞中成

功表达。

Western blot 实验同样对比了重组 GRP78 腺病毒和空载腺病毒感染的 HepG2 细胞，结果如图 3B 所示。结果说明空载体不能感染细胞表达 GRP78 蛋白，而重组表达 GRP78 腺病毒可以感染细胞组表达 GRP78 蛋白。

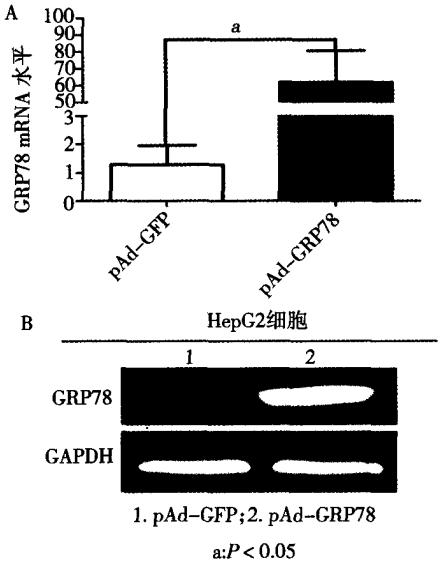


图 3 qRT-PCR 及 Western blot 检测重组表达 GRP78 腺病毒在 HepG2 细胞中表达

Fig.3 Expression of GRP78 gene in HepG2 cells detected by qRT-PCR and Western blot

2.4 MTS 检测 GRP78 对肝癌细胞增殖的影响

通过 MTS 法比较高表达 GRP78 蛋白以及正常表达 GRP78 蛋白的 HepG2 细胞的增殖情况。结果表明，GRP78 高表达的肝癌细胞其增殖能力高于正常表达的肝癌细胞，如图 4A 所示。

通过比较低表达 GRP78 蛋白以及正常表达 GRP78 蛋白的 HepG2 细胞的 MTS 结果，发现干扰 GRP78 表达后肝癌细胞的增殖能力降低，如图 4B 所示。

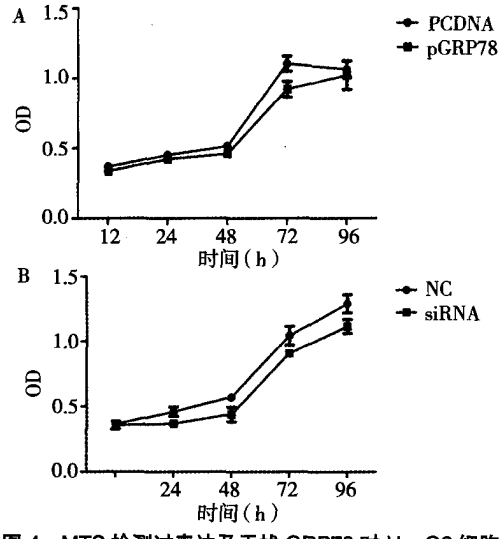


图 4 MTS 检测过表达及干扰 GRP78 对 HepG2 细胞影响

Fig.4 Effect of over expression and low expression GRP78 in HepG2 cells detected by MTS

3 讨 论

1977 年，自 GRP78 在无葡萄糖介质中培养成纤维细胞的过程中被发现以来，由于其独特的生物性质，GRP78 在医学上被广泛研究，尤其与肿瘤的相关研究一直处于研究重点。近年有研究表明，应激情况下大量表达的 GRP78 在肿瘤的研究中频繁出现，例如人非小细胞肺癌[6]、乙型肝炎性肝癌、人上皮细胞样癌、前列腺癌[7]、人胸腺癌[8]、骨髓瘤细胞和骨髓性白血病。研究发现在这些恶性肿瘤细胞中，GRP78 出现了被大量诱导并且异常表达的情况。这说明 GRP78 在某些恶性肿瘤细胞的生命周期中起着重要作用。同时也提示，GRP78 有可能作为一种新型的抗肿瘤靶点参与肿瘤的治疗。而在目前研究中肝癌已发现和 GRP78 有紧密联系。研究表明在肝癌细胞中 GRP78 的表达呈现逐渐增高的趋势，且 GRP78 高表达组的肿瘤组织微血管密度亦明显增高[9]，提示它可以作为新的标志物指示肝癌的发生。另有研究发现，GRP78 对肿瘤细胞的转移也是至关重要的[10]。因此建立 GRP78 感染肝细胞肝癌细胞方法学研究十分重要，可以为下一步人工介导 GRP78 在肝癌细胞的表达奠定实验基础。

对于热休克蛋白 70 家族，如果使用脂质体2000 等常规方法进行稳定转染，其存在的缺点包括位点整合不确定，转染时效低，表达效率低且不均一等问题。如果采用构建稳定细胞系的方法，同样有许多不足，例如，稳定细胞系筛选过程繁琐，周期长，表达量不够高等。而腺病毒则具有明显的优势，如宿主广泛，对人体致病能力低，能在不同类型的培养基中大量扩增，能大量感染悬浮细胞，感染效率高且便于观察，能同时表达多个基因等[11]。在此次实验中，作者设计构建了 GRP78 重组腺病毒载体，并成功包装成表达 GRP78 的腺病毒。利用重组腺病毒感染肝癌细胞 HepG2，通过 GFP 绿色荧光证明其具有感染效率高的特点。通过 real-time PCR 和Western blot 检测病毒感染后的细胞的 mRNA 水平变化和蛋白水平变化，证明 GRP78 可以在 HepG2 中高效表达，说明作者成功制备了的 GRP78 重组腺病毒。通过 MTS 实验检测了过表达 GRP78 后肝癌细胞的增殖情况，证明了 GRP78 在肝癌细胞中具有促增殖作用。使用干扰 GRP78 蛋白的 siRNA 再次检测，再次证明了 GRP78 在肝癌细胞的增殖过程中所起的重要作用。这为后期的 GRP78 在肝癌的研究中奠定了基础。

本文率先构建了 GRP78 重组腺病毒载体，并验

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000849

PCDH10减少多发性骨髓瘤细胞逃避表阿霉素杀伤

袁海汀，陈建斌，许永会，杨泽松
（重庆医科大学附属第一医院血液科，重庆 400016）

【摘 要】**目的**：探讨原钙黏蛋白 10(protocadherin-10，PCDH10)对表阿霉素杀伤多发性骨髓瘤(multiple myeloma，MM)细胞的影响及机制。**方法**：采用脂质体法将 PCDH10 基因转染入人 MM 细胞株 RPMI8226 细胞，RT-PCR 和 Western blot 法检测 PCDH10 基因和蛋白的表达；CCK-8 法检测表阿霉素对 RPMI8226 细胞的增殖抑制作用，求得半数抑制浓度(half-maximal inhibitory concentration，IC_{50})；Transwell 法检测表阿霉素和 PCDH10 对 RPMI8226 细胞迁移的影响；流式细胞术检测 CXC 族趋化因子受体 4(CXC chemokine receptor 4，CXCR4)蛋白表达；Western blot 方法检测 Ras 同源家族成员 A(ras homolog gene family member A，RhoA)和基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9，MMP-9)蛋白表达情况。**结果**：PCDH10 基因成功转染入 RPMI8226 细胞，并成功表达；PCDH10 转染组表阿霉素 IC_{50} 为(0.87 ± 0.07) μg/ml，明显低于空质粒转染组(1.27 ± 0.02) μg/ml(F=77.93，P=0.000)；PCDH10 减少表阿霉素所致的细胞迁移(F=34.943，P=0.000)并抑制 CXCR4(F=117.269，P=0.000)、RhoA(F=1 818.250，P=0.000)和 MMP-9(F=523.764，P=0.000)蛋白表达。**结论**：PCDH10 一方面可增强 MM 细胞对表阿霉素的敏感性，另一方面可通过抑制 CXCR4、RhoA、MMP-9 蛋白的表达来减少 MM 细胞逃避表阿霉素的杀伤，从而增强了表阿霉素的抗骨髓瘤效应。

【关键词】多发性骨髓瘤；PCDH10 基因；表阿霉素；CXC 族趋化因子受体 4；Ras 同源家族成员 A；基质金属蛋白酶 9
【中图分类号】R73-362 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-03-11

作者介绍：袁海汀，Email：1615486936@qq.com，
研究方向：多发性骨髓瘤的发生机制研究。
通信作者：陈建斌，Email：cqchenjianbin2007@126.com。
基金项目：重庆市卫生局医学科研计划资助项目(编号：2011-1-032)。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160109.2130.042.html
(2016-01-09)

证了构建的 GRP78 腺病毒载体能够高效感染HepG2细胞并且大量表达 GRP78 蛋白，证明了 GRP78 蛋白对肝癌细胞的促增殖影响。为进一步研究GRP78的功能和一些肿瘤细胞的临床诊断和治疗奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Zhang K，Kaufman RJ. Identification and characterization of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in vivo[J]. Methods Enzymol，2008(442)：395-419.

[2] Li J，Lee B，Lee AS. Endoplasmic reticulum stress induced apoptosis：multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis(PUMA) and NOXA by p53[J]. J Biol Chem，2006，281(11)：7260-7270.

[3] Chen WT，Zhu G，Pfaffenbach K，et al. GRP78 as a regulator of liver steatosis and cancer progression mediated by loss of the tumor suppressor PTEN[J]. Oncogene，2014，33(42)：4997-5005.

[4] Mintz PJ，Kim J，Do KA，et al. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients[J]. Nat Biotechnol，2003(21)：57-63.

[5] Luo JY，Deng ZL，Luo XJ，et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system[J]. Nature，2007，2(5)：1236-1247.

[6] Koomagi R，Mattern J，Volm M. Glueose-related Protein(GRP78) and its relationship to the drug-resistance P170，GST-pi，LRP56 and angiogenesis in non-small cell lung carcinomas[J]. Anticancer Res，1999，19(5B)：4333-4336.

[7] Wu C，Wang WC，Chen MF，et al. Glucose-regulated protein 78 mediates hormone-independent? prostate cancer? Progression and metastasis through maspin and COX-2 expression[J]. Tumour Biol，2014，35(1)：195-204.

[8] Gazit G，Lu J，Lee AS. Deregulation of GRP stress protein expression in human breast cancer cell lines[J]. Breast Cancer Res Treat，1999，54(2)：135-146.

[9] Dong D，Ni M，Li J，et al. Critical role of the stress chaperone GRP78/BiP in tumor proliferation，survival in transgene-induced mammary tumor development[J]. Cancer Res，2008，68(2)：498-505.

[10] Slotta-Huspenina J，Berg D，Bauer K，et al. Evidence of prognostic relevant expression profiles of heat-shock proteins and glucose-regulated proteins in oesophageal adenocarcinomas[J]. PLoS One，2012，7(7)：e41420.

[11] 陈娜娜，向冬喜，郑丛龙. 腺病毒及其研究进展[J]. 大连医科大学学报，2010，32(5)：4-7.

（责任编辑：冉明会）