

转录靶向性 KDR 启动子调控双自杀基因治疗肺癌的实验研究

Experimental Study on the Transcriptional Targeting Gene Therapy of Double Suicide Gene Driven by KDR Promotor in Lung Cancer

车国卫/CHE Guo-wei^{1,2}, 周清华/ZHOU Qing-hua^{1,2}, 刘伦旭/LIU Lun-xu¹, 步宏/BU Hong³,
王艳萍/WANG Yan-ping², 朱文/ZHU Wen², 陈晓禾/CHEN Xiao-he², 唐小军/TANG Xiao-jun¹

1. 四川大学华西医院胸心血管外科, 成都 610041
2. 四川大学华西医院四川省肺癌分子重点实验室, 成都 610041
3. 四川大学华西医院病理科, 成都 610041

1. Department of Cardiovascular and Thoracic Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China
2. Key Laboratory of Lung Cancer Molecular Biology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China
3. Department of Pathobiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[摘要] 从人肺癌细胞株中克隆 *KDR* 基因的启动子 (kinase domain receptor promotor, KDRp), 构建 *KDR* 基因启动子调控的双自杀基因 (*CDglyTK*) 真核表达质粒 pcDNA3-KDRp-CDglyTK, 将其导入 ECV304、L9981 和 NL9980 细胞, 建立相应的转基因细胞系, 并应用不同的前药处理。体内、外实验结果显示; KDR 启动子调控的双自杀基因在 KDR 高表达人肺癌细胞和人脐静脉内皮细胞靶向表达, 而在 *KDR* 不表达的正常细胞或正常血管内皮细胞中未检测到双自杀基因表达; 联合应用 5-FC 和 GCV 处理, 对转双自杀基因细胞的杀伤作用显著高于单独应用 5-FC 或 GCV, 且二者显示了良好的药物协同作用。

[关键词] 转录靶向性; 基因治疗; 双自杀基因; 肺癌

[中图分类号] Q784

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2006)05-0028-04

Abstract: Human kinase domain receptor promoter (KDRp) has been cloned into the pcDNA3-CDglyTK to construct the pcDNA3-KDRp-CDglyTK specialized expression vector. The pcDNA3-KDRp-CDglyTK plasmid was transfected into ECV304, L9981 and NL9980 cell, and established ECV304-cdtk, L9981-cdtk and NL9980-cdtk cell lines. The above cell lines were treated with 5-FC and/or GCV respectively. The result suggest that *cdtk* gene was specialized expressed in ECV304-*cdtk*, L9981-*cdtk* and NL9980-*cdtk* KDR-positive cells with *KDR* gene high expression, and prodrug/KDRp-CDglyTK system was effective in killing effect in KDR-positive cells. The killing effect in combined drug (5-FC and GCV) was remarkable stronger than that in GCV alone and 5-FC alone in the same pre-drug dose, and a significantly synergetic cytotoxic effect was found *in vivo* and *in vitro*.

Key Words: transcriptional targeted; gene therapy; double suicide gene; lung cancer

CLC Number: Q784

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2006)05-0028-04

1 引言

肺癌基因治疗在体外和动物体内实验中取得了较好的效果, 但临床试验及应用中却效果有限, 这主要是因为基因转导效率低、靶向性差、可调控性差和副作用大。因此, 研究和开发既能调控目的基因表达, 又能靶向于肿瘤血管内皮细胞和肿瘤细胞的组织特异性基因治疗, 是肿瘤靶向性基因治疗的前沿和发展方向^[1,2]。利用组织特异性启动子调控基因治疗过程中靶向性的研究, 已取得了

一定的进展。本研究应用基因工程技术, 构建了转录靶向性 *KDR* 基因启动子调控的双自杀基因载体质粒 pcDNA3-KDRp-CDglyTK; 应用脂质体法将 pcDNA3-KDRp-CDglyTK 转入 *KDR* 基因表达不同的细胞株并建立相应的转双自杀基因的细胞株; 体内和体外实验研究应用不同前药处理, 对转双自杀基因细胞的生长及裸鼠体成瘤性有影响。

收稿日期: 2005-06-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30400199), 中国博士后科学基金项目 (2004035697)

作者简介: 车国卫, 男, 成都市国学巷 37 号四川大学华西医院胸心血管外科, 讲师, 主要研究方向为肺癌休眠的分子机制及其靶向性基因治疗; E-mail: cheguowei@yahoo.com.cn

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 细胞株和动物

L9981 和 NL9980 细胞株为人肺大细胞肺癌细胞株, ECV304 为人脐静脉内皮细胞株, HepG2 为人肝癌细胞株, 均由四川大学华西医院四川省肺癌分子重点实验室提供。实验动物选用 BALB/CA nu/nu 裸小鼠, 均为雄性, 由四川大学实验动物中心提供(动物合格证号: 045)。鼠龄 6~8 周, 体重 20~25 g, 无特殊病原体环境饲养。

2.1.2 主要仪器和试剂

RNA 抽提试剂盒及 RT-PCR 一步法试剂盒、常用 TaqDNA 聚合酶, 均购自大连 TAKARA 公司。图像扫描仪(英国 PE 公司)。丙烯酰胺、聚丙烯酰胺和 KDR 抗体、5-FC 和 GCV, 均购自美国 Sigma 公司; 蛋白酶抑制剂(Protease inhibitor cocktail tablets)购自美国 Roche 公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; BCA 微量蛋白质定量试剂盒、Supersignal West PicoW 化学发光试剂盒, 购自 Pierce 公司。

2.1.3 引物

KDRp: 上游引物: 5'-GCT CGA GTT GTT GCT CTG GGA TGT TCT 3'; 下游引物: 5'-GAA GCT TGT GCC GGT AGG AGA GGA TAT 3'; 扩增片段长度为 366 bp。

β -actin 引物合成: 上游引物: 5'-GACTACCTCATGAAGATC 3'; 下游引物: 5'-GATCCACATCTGCTGGAA 3'; 扩增片段长度: 500 bp。

CD 引物: CD 基因序列号 Genbank S56903。上游引物: 5'-AAG CTT AGG CTA GCA ATG TCG AAT AAC GCT-3'; 下游引物: 5'-GGA TCC TCC ACG TTT GTA ATC GAT GGC TTC-3'; 满足条件; 起始密码 ATG, 终止密码由 TGA 突变为 GGA, 并在 5' 和 3' 端加上 Hind III 和 BamH I 酶切位点; 扩增片段长度: 1.3 kb。

TK 引物: TK 基因序列号 Genbank V00470。上游引物: 5'-GGA TCC GGC GGG GGC GGT GGA GGA GGG GGT ATG GCT TCG TAC-3'; 下游引物: 5'-TCT AGA TTA GTT AGC CTC CCC CAT CTC-3'; 满足条件; 在 5' 端加上 8 个编码甘氨酸的密码子和 BamH I 酶切位点, 3' 端加上 Xba I 酶切位点; 扩增片段长度: 1.1 kb。

以上引物均由北京赛百盛生物工程公司合成。

2.2 方法

2.2.1 细胞培养

各组细胞均应用 10% 的国产小牛血清, RPMI1640 培养基, 培养基中含有青霉素 100 ug/ml 及链霉素 100 μ g/ml, 在 5% CO₂、37℃ 培养箱内培养。细胞收集采用 0.25% 胰酶消化, Hank's 液洗涤, 离心。

2.2.2 体外实验

生长曲线(MTT 法), 具体方法参照说明书。

2.2.3 RT-PCR 检测 mRNA 表达

反应体系: RNA 2 μ g/4 μ l, 10 $\times$ PCR buffer 5 μ l, 25 mol/L MgCl₂ 3 μ l, 4 $\times$ dNTP(10 mmol/L) 3 μ l, 目的基因及内参照上、下游引物各 2 μ l, TaqDNA 聚合酶 0.5 μ l, 加双蒸水至反应总体积为 50 μ l。

反应条件: 48℃ 逆转录反应 30 min, 95℃ 变性 5 min, 然后 94℃ 变性 40 s, 55℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 60 s, 共 30 个循环, 再 72℃ 反应 7 min, 4℃ 终止反应。取产物 5 μ l 进行电泳。

2.2.4 裸鼠体内成瘤性

取 HepG2、HepG2-vector、HepG2-CDglyTK L9981、L9981-vector、L9981-CDglyTK 和 NL9980、NL9980-vector、NL9980-CDglyTK 共 9 组对数生长期的细胞, 每组注射 5 只小鼠, 每只小鼠前腿腋窝皮下注射 0.2 ml 各组细胞悬液(细胞数为 2 $\times$ 10⁶ 个)。

接种后的第 10 天开始经腹腔给药, 每组每只裸鼠均每 2 天经腹腔用药(GCV 125 mg/kg 和 5-FC 1 000 mg/kg), 共用药 14 次。每日观察小鼠的成瘤情况, 于第 1 次给药后第 30 天处死小鼠。成瘤性观察: 处死裸鼠后, 完整剥离肿瘤块, 称重。称重后瘤块一部分迅速石蜡包埋。

抑瘤率(%)=(对照组瘤重-实验组瘤重)/对照组瘤重 $\times$ 100%。

2.3 统计学方法

实验数据为计量资料, 应用 X₂ 或 F 检验, 用美国 SPSS10.0 统计软件, 并经计算机处理全部数据, 以 $p < 0.05$ 为有显著性差异, $p > 0.05$ 为无显著性差异。

3 结果

3.1 KDR 启动子的克隆与鉴定

KDRp 序列经 PCR 扩增后, 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 显示一条带, 未见其他非特异性杂带, 其片段大小与预期值(366 bp)一致。PCR 产物回收后, 测定 KDRp 的浓度: 1.7 mg/ml, 电泳可见一清晰的条带(图 1)。然后进行测序鉴定, KDRp 碱基序列与文献报道一致。说明 KDRp 已成功克隆。

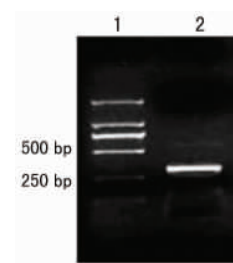


图 1 KDR 基因启动子

1. DL2 000 标准分子量; 2. KDRp

Fig. 1 The product of KDR promotor

3.2 pcDNA3-KDRp-CDglyTK 质粒的构建与鉴定

pcDNA3-CMVd-CDgly 质粒经限制性内切酶 *Nru*I 和 *Hind*III 消化, 将含有 *Nru*I 和 *Hind*III 酶切位点的 KDRp 基因片段与 pcDNA3-CMVd-CDgly 质粒 DNA 以 1:3 的比例混合均匀, 并在 T4 连接酶的作用下经克隆筛选获得环状 pcDNA3KDRp-CDglyTK 质粒(图 2), 再经 PCR 及酶切鉴定, 证明 pcDNA3KDRp-CDglyTK 质粒中含有 KDRp、CD 和 TK 基因, 且片段大小均与

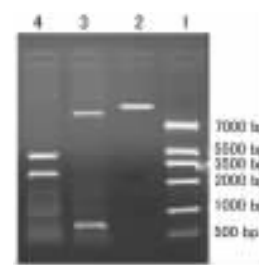


图 2 pcDNA3-KDRp-CDglyTK 质粒限制性酶切琼脂糖电泳图

1. DL7000; 2. pcDNA3KDRp-CDglyTK; 3. pcDNA3KDRp-CDglyTK (*Nru*I 和 *Hind*III); 4. pcDNA3KDRp-CDglyTK (*Hind*III 和 *Xba*I)

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of the restriction endonuclease digested pcDNA3-KDRp-CDglyTK and their purified insert fragment



图 3 pcDNA3KDRp-CDglyTK 质粒中 KDRp、TK、CD 基因琼脂糖凝胶电泳图

1.DL2000 分子标准;2.CD 基因;3.TK 基因;4.KDR 基因启动子

Fig. 3 The agarose electrophesis of KDRp,TK and CD gene in pcDNA3-KDRp-CdglyTK plasmid by PCR

理论值相符(图 3)。

3.3 转基因细胞株 CD 和 TK mRNA 表达的鉴定

各转基因细胞株在对数生长期时,提取细胞的总 RNA,应用 RT-PCR 检测 CD 和 TK mRNA 表达。结果显示,L9981,NL9980 和 ECV304 转基因细胞中均有 CD、TK mRNA 表达,且其片段大小分别为 1.3 kb、1.1 kb,分子量大小与理论值相符;而 HepG2 转基因后无 CD、TK mRNA 表达;说明在 KDR 表达阳性细胞中 KDRp 可以调控 CD、TK 基因的表达(图 4,图 5)。

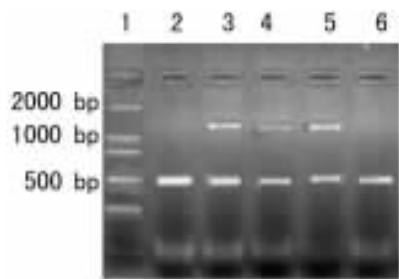


图 4 各转基因细胞株中 CD mRNA 表达琼脂糖凝胶电泳图

1.DL2000;2.空白对照;3.L9981;4.NL9980;5.ECV304 细胞;6.HepG2

Fig. 4 The agarose electrophesis of CD mRNA in transfected cells by RT-PCR

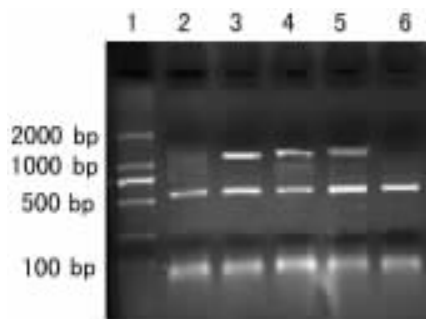


图 5 各转基因细胞株 TK mRNA 表达琼脂糖凝胶电泳图

1.DL2000;2.空白对照;3.L9981;4.NL9980;5.ECV304 细胞;6.HepG2

Fig. 5 The agarose electrophesis of TK mRNA in transfected cells by RT-PCR

3.4 联合应用 5-FC 和 GCV 对转双自杀基因细胞的杀伤作用

利用酶标仪分别检测,各实验组(L9981、NL9980、ECV304 和

HepG2)细胞于用药后第 3 天、第 6 天吸光度 A 值,共 2 次,计算出其细胞存活率。研究观察到以下几点。① 转染双自杀基因各组细胞(KDRp-CDglyTK)未使用前体药物时,光镜观察细胞的生长状态与转染空载体和原代细胞无明显差别,表明基因转染对细胞的生长无显著影响。② 原代细胞和转染空载体细胞联合应用 5-FC 和 GCV 处理,光镜观察细胞的形态与生长能力与用药前相比较无显著差异,细胞存活率亦无统计学差异,说明前体药物对未转染双自杀基因(CDglyTK)的各组细胞无显著杀伤作用。③ 转 KDRp -CdglyTK 细胞 (L9981 -CdglyTK、NL9980 -CdglyTK、ECV304-CdglyTK 和 HepG2-CdglyTK) 分别应用 5-FC、GCV 和 5-FC+GCV 处理后,HepG2 4 组细胞的存活率无显著性差异 ($P=0.57$),表明由于 HepG2 细胞没有 KDRp 转录活性,而使 HepG2-CDglyTK 细胞中双自杀基因(CDglyTK)均没有表达。而 L9981-CdglyTK、NL9980-CdglyTK、ECV304-CdglyTK 各 4 组之间细胞存活率均具有显著差异($P=0.01$)。两两比较,5-FC+GCV 处理组的各转基因细胞存活率均显著低于生理盐水组($P=0.01$);联合 5-FC+GCV 用药组各转基因细胞存活率显著低于单独用药组 5-FC 和 GCV ($P=0.014$, $P=0.018$);而分别单独用药 5-FC 或 GCV 组的各转基因细胞,其存活率无显著统计学差异($P=0.32$),说明 KDRp 能够调控双自杀基因(CDglyTK)在肺癌细胞和内皮细胞中的表达,5-FC 和 GCV 单独或联合用药均对各转基因细胞具有杀伤作用,且联合用药对各转基因细胞的杀伤能力显著强于 5-FC 或 GCV 单独用药($P=0.014$)(表 1)。

表 1 5-FC 和/或 GCV 处理对转双自杀基因的
各组细胞生长的影响

Tbl. 1 The influence of proliferation of transfected double suicide gene *in vitro*

组	细胞存活率(%)				p
	NS	5-FC/5μg/ml	GCV/100μg/ml	5-FC/5μg/ml+ GCV/100μg/ml	
HepG2-CDglyTK	99±3	94±5	97±6	96±3	0.57
L9981-CDglyTK	94±5	71±4	67±2	34±3	0.01
NL9980-CDglyTK	96±5	66±5	63±1	36±4	0.00
ECV304-CDglyTK	99±5	76±4	78±2	41±3	0.01

3.5 联合应用 5-FC 和 GCV 对转双自杀基因细胞株裸鼠种植瘤生长的影响

将 L9981-CdglyTK、NL9980-CdglyTK 和 HepG2-CdglyTK 3 组细胞分别接种在裸鼠右前腋皮下,7 d 后开始有可见到的肿块出现。10 d 后肿块直径约为 1 cm,第 10 天开始给药(剂量以体重计算),隔天一次,共 14 次,于给药后的第 30 天处死小鼠,解剖小鼠并称重肿瘤,同时计算抑瘤率。经 F 检验,3 组细胞的种植瘤重量有非常显著性差异 ($P=0.031$),两两比较:L9981-CDglyTK 和 NL9980-CdglyTK 细胞组瘤重显著低于 HepG2-Cdgly 细胞组 ($P=$

表 2 5-FC+GCV 抑制双自杀基因转染的 L9981、
NL9980 和 HepG2 细胞裸鼠种植瘤生长

Tbl. 2 The growth of double suicide gene transfected L9981, NL9980 and HepG2 in nude mice, which were inhibited with combined 5-FC and GCV infection

组	No	体重(g)X±s	瘤重(g)X±s	抑制率(%)
HepG2-CDglyTK	5	26.12 ±1.21	3.16 ±0.178	2.9
NL9980-CDglyTK	5	30.15 ±0.91	0.73 ±0.05	63.7
L9981-CDglyTK	5	30.02 ±0.91	1.02 ±0.08	61.8
p		0.201	0.031	0.021

0.011), 而 L9981-CDglyTK 和 NL9980-CDglyTK 细胞组瘤重无统计学差异($P=0.12$)。L9981-CDglyTK 和 NL9980-CDglyTK 组抑瘤率(61.8%和 63.7%)显著高于 HepG2-CDgly 组(2.9%)和原代细胞株组(0%)($P=0.021$)(表 2)。

4 讨论

基因表达的组织特异性与其表达调控元件密切相关,基因编码区的 5'侧翼调控序列与细胞中的反式作用元件相互作用,决定了某些基因只在特定组织细胞内表达。大量研究表明,KDR 不仅表达于肿瘤血管内皮细胞,而且广泛表达于不同组织来源的肿瘤细胞,如乳腺癌、肝癌、神经胶质瘤及肺癌等,且肿瘤细胞中 KDR 表达强度多高于肿瘤血管内皮细胞^[3-6]。此外,肿瘤组织中的血管平滑肌细胞及某些间质细胞也有 KDR 表达^[7,8]。应用 KDR 基因启动子调控目的基因在 KDR 基因表达的细胞中表达也取得了一定的进展。如 Modlich 等^[9]应用 KDR 启动子调控 TNF- α 在血管内皮细胞中表达,而 Szary 等^[10]应用 KDR 启动子转录调控 CD 基因在鼠肉瘤细胞及人卵巢癌细胞 OVP10 细胞中表达。本研究应用基因工程技术克隆了 KDR 启动子基因,该启动子包括 KDR 启动子活性的核心序列-225 bp~+125 bp,测序表明其碱基序列与理论值一致,构建了 KDR 启动子调控的双自杀基因表达载体质粒 pcDNA3-KDRp-CDglyTK,将其导入 KDR 蛋白表达水平不同的肺癌细胞中,发现在 KDR 基因高表达的细胞株中,CDglyTK 融合基因能够稳定表达,说明 KDR 启动子具有完整的转录活性。

已有的结果显示,联合应用不同的自杀基因系统比单一系统更有效。①二者具有协同的细胞毒作用。Rogulski 等^[11]的研究结果显示,转导 CDglyTK 融合基因的神经胶质瘤细胞更易被杀灭。②CDglyTK 表达细胞放射敏感性显著增加,敏感性增加比例是单用 CD5-FC 系统的 2.44 倍,BVdu/5-FC 系统的 3.90 倍。③双基因的应用,使宿主对前药敏感性增加,从而克服了由于复发的肿瘤细胞中存在对前体药物不敏感的耐药 HSV-TK+的细胞;同时也可以减少药物用量,增强了放射敏感性,以最低的辐射剂量使 DNA 双链断裂,杀灭瘤细胞^[12]。

应用 5-FC、GCV 和 5-FC+GCV 分别处理 HepG2、HepG2-vector 和 HepG2-CDglyTK,结果显示 3 组细胞的存活率均与对照组比较无显著差异,提示由于 HepG2 细胞没有 KDRp 转录活性而使 HepG2-CDglyTK 细胞株中双自杀基因没有表达。而对于 KDR 表达阳性的细胞株(L9981、NL9980 和 ECV304),单独应用 5-FC 或 GCV 时,各组转双自杀基因细胞的细胞存活率均较转空载体组和原代细胞株组显著降低,但单独用药两组之间细胞存活率无明显差异;各组转双自杀基因组联合使用 5-FC+GCV 时,细胞存活率显著低于单独用药组。说明 KDRp 调控双自杀基因可以在 KDR 表达阳性的肺癌细胞和血管内皮细胞中表达,并且 5-FC 和 GCV 联合用药对转双自杀基因细胞的杀伤作用显著强于 5-FC 或 GCV 单独用药。

将含转双自杀基因的肺癌细胞株(L9981 和 NL9980)及肝癌细胞株(HepG2)接种到裸鼠右腋下成瘤,系统给予前药 5-FC 和 GCV 后观察到,导入 KDRp-CDglyTK 基因的肺癌细胞种植瘤的生长明显受到抑制,对人肺高转移大细胞株肺癌 L9981 细胞株种植瘤的生长抑制作用显著高于人肺低转移细胞株 NL9980,而对肝癌细胞 HepG2 种植瘤的生长无影响。

本研究结果表明,KDR 启动子调控的双自杀基因可以靶向地在高表达 KDR 的人肺癌细胞和人脐静脉内皮细胞中表达,而在不表达 KDR 的正常细胞或正常血管内皮细胞中,双自杀基因

不表达或表达很低。联合应用 5-FC 和 GCV 处理,对转双自杀基因细胞的杀伤作用显著高于单独应用 5-FC 或 GCV,且二者显示了良好的药物协同作用。本研究在实体瘤和细胞水平上均证实,KDR 基因启动子可调控双自杀基因在人肺癌血管内皮细胞和肺癌细胞中特异性表达,为建立一个可能具有破坏肿瘤血管和杀伤肿瘤细胞作用并适用于多种恶性实体瘤的基因治疗方案,提供了理论基础和实验依据。

参考文献(References)

- [1] TAKUYA F, YUTAKA M, FRANCES M, et al. Development of a cancer-targeted tissue-specific promoter system [J]. Cancer Research, 2004, 64(1): 363-369.
- [2] SASSA Y, HATA Y, AIELLO L P, et al. Bifunctional properties of peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 in KDR gene regulation mediated via interaction with both Sp1 and Sp3[J]. Diabetes, 2004, 53(5): 1 222-1 229.
- [3] SPEIRS V, ATKIN S L. Production of VEGF and expression of the VEGF receptors Flt-1 and KDR in primary cultures of epithelial and stromal cells derived from breast tumours [J]. Br J Cancer, 1999, 80(5-6): 898-903.
- [4] YOSHIJI H, KURIYAMA S, YOSHII J, et al. Synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in murine hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2002, 35(4): 834-842.
- [5] MEISTER B, GRUNEBRAH F, Bautz F, et al. Expression of VEGF and its receptors in human neuroblastoma [J]. J Cancer, 1999, 35(3): 445-449.
- [6] DECAUSSIN M, SARTELET H, ROBERT C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival [J]. J Pathol, 1999, 188(4): 369-377.
- [7] BOOCOCK C A, CHARNOCK D S, SHARKEY A M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 1995, 87(7): 506-516.
- [8] CHE G W, ZHOU Q H, TANG M L et al. A study on angiogenesis and its clinical significance in lung neoplasms [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2002, 29(9): 9 609-9 612.
- [9] JAGGAR R T, CHAN H Y, HARRIS A L, et al. Endothelial cell-specific expression of tumor necrosis factor-alpha from the KDR or E-selectin promoters following retroviral delivery[J]. Hum Gene Ther, 1997, 8(18): 2 239-2 247.
- [10] SZARY J, KALITA K, PRZYBYSZEWSKA M, et al. KDR promoter can transcriptionally target cytosine deaminase suicide gene to cancer cells of nonendothelial origin [J]. Anticancer Res, 2001, 21(5): 3 471-3 475.
- [11] ROGULSKI K R, WING M S, PAIELLI D L, et al. Double suicide gene therapy augments the antitumor activity of a replication-competent lytic adenovirus through enhanced cytotoxicity and radiosensitization[J]. Hum Gene Ther, 2000, 1(1): 67-76.
- [12] COOL V, PIROTTE B, GERARD C, et al. Curative potential of herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer in rats with 9L gliosarcoma[J]. Hum Gene Ther, 1996, 7(5): 627-635.

(责任编辑 王 芷)