

携带凋亡素、内皮抑素双基因腺病毒载体的构建

黄庆娟,朱惠明,王娜,张茹

(广州暨南大学医学院第二临床学院(深圳)消化内科,广东 深圳 518020)

【摘要】 目的 构建携带有凋亡素(Apoptin、VP3)、内皮抑素(Endostatin)双基因的重组腺病毒载体,为其在肿瘤治疗的应用研究打下基础。方法 将VP3基因和Endostatin基因克隆入腺病毒穿梭质粒pDC316中,将该穿梭质粒与腺病毒骨架质粒pBHGloxE1,3Cre共转染HEK293细胞,包装出重组腺病毒颗粒Ad-vp3-IRES-sEndo-his。其后挑选病毒空斑获取克隆进行小剂量扩增并提取病毒DNA进行PCR、RT-PCR检查以筛选和鉴定毒种,之后大剂量扩增所得的病毒克隆并进行纯化、测定病毒的滴度。结果 所得腺病毒经PCR、RT-PCR检测表明重组腺病毒Ad-vp3-IRES-sEndo-his包装成功。测定病毒50%组织培养感染剂量(TCID₅₀)为 5.7×10^9 /ml,病毒颗粒滴度(VP)为 1.9×10^{11} /ml。结论 成功构建携带凋亡素、内皮抑素双基因腺病毒载体并对其进行了大剂量扩增及提纯,达到了细胞及动物实验使用的标准。

【关键词】 凋亡素;内皮抑素;腺病毒;载体

【中图分类号】 R730.231⁺.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2012)05-01-05

Construction of adenovirus vector carrying apoptin gene and endostatin gene. HUANG Qing-juan, ZHU Hui-ming, WANG Na, ZHANG Ru. Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of the Medical College of Jinan University, Shenzhen 518020, CHINA

【Abstract】 Objective To construct recombinant adenovirus vector carrying apoptin (VP3) gene and endostatin gene. **Methods** vp3 gene and endostatin gene were cloned into adenovirus shuttle plasmid pDC316. Then the recombinant shuttle plasmid was cotransformed into HEK293 cells with adenovirus backbone plasmid pBHGloxE1 to obtain recombinant adenovirus particles (Ad-vp3-IRES-sEndo-his). The adenovirus particles was screened and confirmed by PCR and RT-PCR, and the correct adenovirus clones screened were amplified in large scale and purified. The viral particle titration such as tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀) and virus particles (VP) was detected. **Results** PCR and RT-PCR test indicated that apoptin gene and endostatin gene were integrated into the adenoviral genome correctly. **Conclusion** The recombinant adenovirus vector carrying VP3 gene and endostatin gene was successfully constructed, which qualifies for use in cell and animal experiments.

【Key words】 Apoptin; Endostatin; Adenovirus; Vector

对肿瘤基因治疗的关注点集中在寻找更有效的基因,制备高效、靶向性、可控性基因导入系统,基因联合治疗等方面。制备良好的基因治疗运载系统,使其携带的基因具有更高的靶向性、杀伤力与稳定性是决定基因治疗成败的重要因素之一。利用病毒载体介导基因转移转染率高、靶向性好,是肿瘤基因治疗中应用最广泛的方法。其中,以腺病毒为载体具有众多优点,目前已广泛用于基因治疗研究。

凋亡素(Apoptin, VP3)是鸡贫血病毒(Chicken anemia virus, CAV)基因编码产生的一种功能性蛋白,可以单独激发肿瘤细胞凋亡过程,被命名为凋亡素^[1];内皮抑素(Endostatin)是一种新的血管内皮抑制因子,是

内皮细胞增殖的强效抑制剂,可抑制多种肿瘤的生长和转移,还能显著抑制体外培养的细胞生长,并诱导其凋亡。本研究构建腺病毒载体携带单独表达的凋亡素和内皮抑素两种基因,并通过内皮抑素表达后分泌至胞外以保证协同与增效作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料 pcDNA3-vp3质粒(含凋亡素基因全序列)、对照病毒Ad-cmv-EGFP由本室保存,pcDNA3-sEndo质粒(含内皮抑素基因全序列及人白介素2分泌信号)、腺病毒穿梭质粒由中山大学肿瘤医院肿瘤研究所刘然义教授惠赠,质粒pDC316-IRES-EGFP(腺病毒穿梭质粒)、pDC316-lacZ alpha(腺病毒穿梭质

粒)、腺病毒骨架质粒 pBHGloxE1,3Cre 购自本元正阳公司。宿主菌 *E. coli* DH5 α 由本室保存。细胞株 HEK293 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所。限制性内切酶 *EcoR* I、*Sac* I 以及 *rTaq* 酶、*ExTaq* 酶、DNA Marker DL2 000、DNA Marker DL15 000 为 TAKARA 产品, *Not* I 和 *Nhe* I *Age* I 为 NEB 产品, T₄DNA 连接酶、蛋白酶 K 为 MBI 公司产品; PCR 纯化试剂盒/DNA 纯化试剂盒为碧云天产品; 质粒小量提取试剂盒为 QIAGEN 公司产品; 胶回收试剂盒 (EZ-10 spin column DNA Gel Extraction Kit) 为上海生工产品; 转染试剂 Lipofetamine2000 为 Invitrogen 公司产品。

1.2 主要仪器设备 AMERSHAM 电泳仪为 PHARMACIA BIOTECH 产品, 离心机为 ECKMAN 产品, 核酸定量仪为 eppendorf 产品, 荧光显微镜 IX70, 为 OLYMPUS 产品, EPICS-ALTRA 流式细胞仪为 Coulter 产品, Mastercycler 梯度 PCR 仪为 Eppendorf 产品, 12 多道移液器 (排枪) 为德国 BRAND-Transferpette[®]-12 产品。

2 实验方法

2.1 pDC316-vp3-IRES-EGFP 质粒构建及鉴定

2.1.1 凋亡素基因片断 vp3 的 PCR 扩增 设计 VP3 基因的引物, 上游引入 *EcoR* I 酶切位点, 下游带入 *Sac* I 酶切位点, 以 pCDNA3.0-Vp3 质粒为模板高保真扩 VP3 基因, 委托上海生工公司合成。上游引物 Vp3-*EcoR* I -385-f:5'-GCCGAATTCAT GAACGCTC TCCAAGAA-3'; 下游引物 Vp3-*Sac* I -385-r:5'-GCCGA GCTCCTTACAGTCT TATACACC-3'。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 25 cycles, 72 $^{\circ}$ C 10 min, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳并回收目标条带的 PCR 产物 (按 RCR 回收试剂合说明操作)。

2.1.2 vp3 片段与载体 pDC316-IRES-EGFP 的 *EcoR* I、*Sac* I 双酶切 按 *EcoR* I、*Sac* I 限制酶说明书, 酶切后产物进行琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收酶切后 vp3 片段与 pDC316-IRES-EGFP 载体的大片段。

2.1.3 vp3 片段与载体片段连接并转化 pDC316-IRES-EGFP 质粒酶切产物片段与 vp3PCR 酶切产物片段连接后转化入感受态大肠杆菌 DH-5 α , 挑取单克隆菌落, 培养 18 h 后提取质粒 pDC316-vp3-IRES-EGFP (按质粒提取试剂合说明书)。

2.1.4 重组质粒 pDC316-vp3-IRES-EGFP 构建后鉴定 (1) pDC316-vp3-IRES-EGFP PCR 鉴定反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 25 cycles, 72 $^{\circ}$ C 10 min, PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳后观察结果。(2) 酶切鉴定: 将 PCR 鉴定正确的

质粒, 进一步行 *EcoR* I、*Sac* I 双酶切, 酶切后产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳后观察结果。

2.2 pDC316-sEndo-his 构建及鉴定

2.2.1 内皮抑素基因 sEndo 片段的 PCR 扩增 设计 sEndo 基因的引物, 设计上游引入 *Not* I 酶切位点, 下游引入 *Nhe* I 酶切位点, 且在下游带入编码 6 个组氨酸的 his 标签, 委托上海生工公司合成引物序列如下: sEndo-*Not* I -635-F:5'-GCCGCGGCCGCATG TACAGGATGCAACTC-3', sEndo-*Nhe* I -his-635-R:5'-GCCGCTAGCCTAatgatgatgatggtgCTTGGAGG CAGTCA-3', 以 pCDNA3-sEndo 为模板, 高保真扩增 sEndo 基因片段。反应条件 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 cycles, 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 回收 PCR 目标产物。

2.2.2 sEndo-his 片段与载体 pDC316-LacZ Alpha 的 *Not* I、*Nhe* I 双酶切 (按 *Not* I、*Nhe* I 限制酶说明书), 酶切后产物进行琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收酶切后 sEndo-His 片段与载体 pDC316-LacZ Alpha 的大片段。

2.2.3 连接酶切后 sEndo-his 片段、载体 pDC316-LacZ Alpha 并转化 连接后转化入感受态大肠杆菌 DH-5 α , 次日 X-gal+IPTG 筛选平板上的单克隆菌落, 接入 5 ml 氨卞 LB 培养基中培养 18 h。提取质粒 pDC316-sEndo-his。

2.2.4 重组质粒 pDC316-sEndo-his 构建后鉴定 pDC316-sEndo-his PCR 鉴定: 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 cycles, 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳后观察结果。酶切鉴定: 将 PCR 鉴定正确的质粒, 进行酶切鉴定, 酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 于凝胶电泳显示仪上观察结果。

2.3 pDC316-vp3-IRES-sEndo-his 质粒构建

2.3.1 vp3-IRES 片段 PCR 扩增 设计上游引入 *Age* I 酶切位点, 下游引入 *Not* I 酶切位点引物, 以 pDC316-vp3-IRES-EGFP 为模板扩增 vp3-IRES 片段, 引物序列如下: vp3-IRES-*Age* I -984-F:5'-GCCAC CGGTATGAACGCTCTCCAAGAAG-3', vp3-IRES-*Not* I -984-R:5'-GCCGCGGCCGCTGTGGCCATATTATC ATC-3', PCR 条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 25 cycles, 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 并切胶回收目标片段。

2.3.2 vp3-IRES 片段与载体 pDC316-sEndo-his 的 *Age* I、*Not* I 双酶切 酶切后产物进行琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收酶切后 vp3-IRES 片段与载体

pDC316-sEndo-his的大片段。

2.3.3 连接酶切载体pDC316-sEndo-his以及酶切vp3-IRES片段,转化大肠杆菌 连接后转化:以热休克法转化入感受态大肠杆菌DH-5 α ,挑取氨卞平板上的单克隆菌落培养18 h。提取质粒pDC316-vp3-IRES-sEndo-his。

2.3.4 重组质粒pDC316-vp3-IRES-sEndo-his构建后鉴定 (1) vp3-IRES片段的PCR鉴定:反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 25 cycles, 72 $^{\circ}$ C 10 min, PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳后观察结果。(2) sEndo-His片段的PCR鉴定:反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 cycles, 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳后观察结果。(3)将PCR鉴定正确的质粒,进一步酶切鉴定。凝胶电泳显示仪上观察结果。(4)测序鉴定:按照穿梭质粒说明书(Microbix公司)推荐的引物:上游测序引物pDC316-cexu-f,反向测序引物pDC316-cexu-r对pDC316-vp3-IRES-sEndo-his送上海生工进行测序,将测序结果与原始序列进行比对。

2.4 重组腺病毒的包装、鉴定、扩增、纯化及滴度测定

2.4.1 pDC316-vp3-IRES-sEndo-his与pBHGloxE1, 3Cre共转染HEK293细胞包装重组腺病毒 (1)转染HEK293细胞:前1~2 d接种HEK293细胞,当细胞融合度达90%~95%时可开始转染。转染过程见脂质体Lipofectamine2000说明书。脂质体Lipofectamine2000:质粒pBHGloxE1,3Cre:质粒pDC316-vp3-IRES-sEndo-his的比例为5(μ l):1(μ g):1(μ g)。转染后37 $^{\circ}$ C 5% CO₂孵育,6 d左右可见噬斑,10 d左右可行噬斑病毒分离。(2)病毒空斑挑选和小量扩增:具体操作参考AdEasyTM操作手册。取上清液-80 $^{\circ}$ C冻存。

2.4.2 重组腺病毒Ad-vp3-IRES-sEndo-his的鉴定 (1) vp3-IRES片段的PCR鉴定:裂解病毒,用PCR水进行10、100稀释,和原液作为模板。上游引物vp3-IRES-Age I -984-F:5'-GCCACCGGTATGAA CGCTCTCCAAGAAG-3',下游引物vp3-IRES-Not I -984-R:5'-GCCGCGGCCGCTGTGGCCATATTATCATC-3'阴性对照:(ddH₂O),阳性对照:DC316-vp3-IRES-endostatin-His。PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,30 cycles,72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳后观察。(2)sEndo-his片段的PCR鉴定:模板准备同前。上游引物:sEndo-Not I -635-F:5'-GCCGCGGCCGCTGTGGCCATATTATCATC-3',下游引物:sEndo-Nhe I -635-F:5'-GCCGCG

GGCCGChis-635-F:5'-GCCGCTAGCCTAatgatgatgatggtgCTTGGAGGCAGTCA-3',阴性对照:ddH₂O,阳性对照:pDC316-vp3-IRES-endostatin-his。PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 cycles, 72 $^{\circ}$ C 5 min, PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳后观察。

2.4.3 在293细胞中大量扩增重组腺病毒 具体操作参考AdEasyTM操作手册。

2.4.4 病毒纯化 CsCL透析纯化,具体操作参考AdEasyTM操作手册。收集透析后的纯化病毒,小份分装,-80 $^{\circ}$ C冰箱保存。

2.5.5 腺病毒滴度测定 (1)病毒颗粒数VP(Viral particle)/ml OD_{260nm}的测定,具体操作参考见AdEasyTM操作手册^[3]。测定4次OD_{260nm}值,取测定值的平均值作为最终结果。VP/ml=OD_{260x}病毒原液稀释度 1.1×10^{12} 。(2) 50%组织培养感染剂量法(TCID₅₀),具体操作参考AdEasyTM操作手册。重复两次实验,取平均值。

3 结果

3.1 穿梭质粒的构建的结果 重组质粒pDC316-vp3-IRES-sEndo-his构建后PCR鉴定,电泳结果如图1所示。重组质粒pDC316-vp3-IRES-sEndo-his构建后PCR鉴定电泳结果如图2所示。重组质粒pDC316-vp3-IRES-sEndo-his构建后酶切鉴定:酶切产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,电泳结果如图3所示。

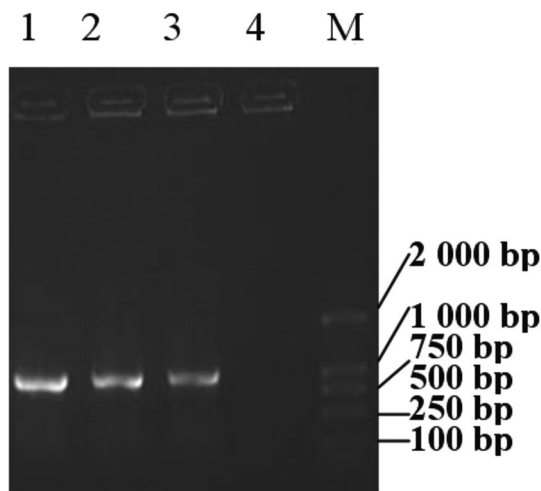


图1 重组质粒pDC316-vp3-IRES-sEndo-His构建后PCR鉴定

注:M:DL2000;1~2:以pDC316-vp3-IRES-sEndo-his质粒为模板的PCR产物,3:阳性对照(以pDC316-vp3-IRES-EGFP质粒为模板的PCR产物),4:阴性对照,以vp3-IRES-Age I -984-F和vp3-IRES-Not I -984-R为引物,pDC316-vp3-IRES-sEndo-His质粒为模板,PCR扩增大小应约为1000 bp,从电泳图看,PCR鉴定与阳性对照相同,说明该质粒中含有vp3-IRES片段。

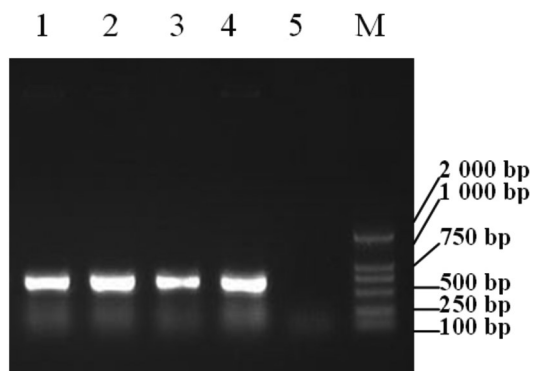


图2 重组质粒pDC316-vp3-IRES-sEndo-his构建后PCR鉴定
注: M:DL2000; 1~3:以pDC316-vp3-IRES-sEndo-his质粒为模板的PCR产物, 4:阳性对照(以pcDNA3-sEndo质粒为模板的PCR产物), 5:阴性对照, 以sEndo-Not I -635-F和sEndo-Nhe I -his-635-R为引物, 以pDC316-vp3-IRES-sEndo-his质粒为模板, PCR扩增大小应约为600 bp左右, 从电泳图看, PCR鉴定与阳性对照相同, 说明该质粒中含有sEndo-His片段。

3.2 腺病毒包装结果

3.2.1 噬斑形成 噬斑的形成见图4。

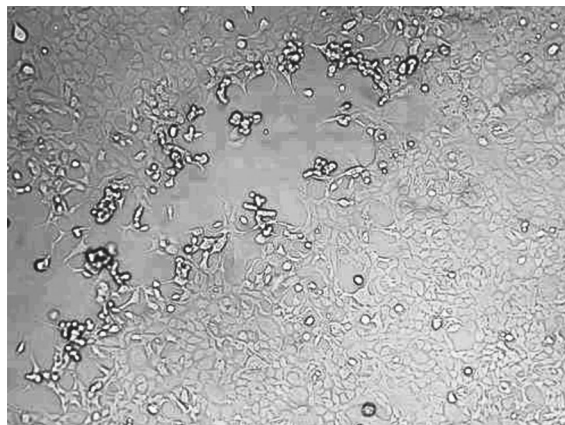


图4 噬斑(×5倍)

3.2.2 腺病毒的PCR鉴定 (1)腺病毒的sEndo

PCR鉴定:PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,电泳结果如图5所示。(2)腺病毒的vp3-IRES PCR鉴定:PCR产物进行电泳,电泳结果如图6所示。腺病毒滴度的测定-病毒颗粒数VP(viral particle)/ml的OD_{260nm}的测定:VP = OD₂₆₀×病毒原液稀释度×1.1×10¹²=0.16×1.1×1.1×10¹² VP/ml=1.9×10¹¹;50%组织培养感染剂量法(TCID₅₀)的测定:重复两次实验,阴性对照中无任何CPE且生长良好,最高稀释度100%阴性,最低稀释度100%阳性,测试有效。滴度T = 101+d(s-0.5) = 101+1(7.2-0.5),滴度T为10 μl的病毒液滴度, IU结果为5.8×10⁹。

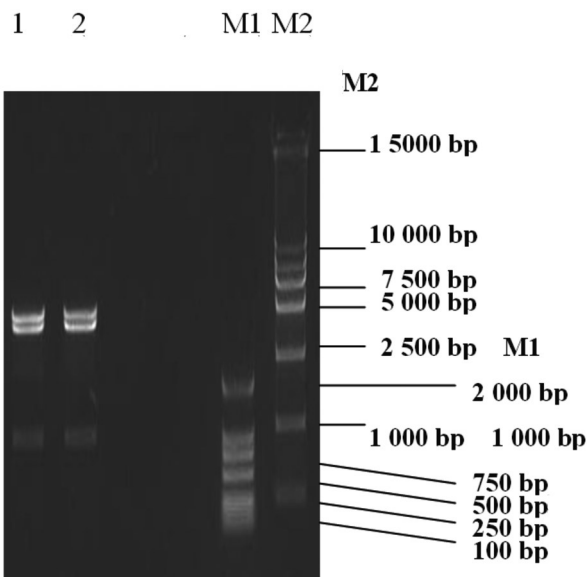


图3 重组质粒pDC316-vp3-IRES-sEndo-his构建后酶切鉴定
注: M1:DL2000; M2:DL15000, 1~2:Age I和Not I双酶切pDC316-vp3-IRES-sEndo-his质粒, Age I和Not I双酶切pDC316-vp3-IRES-sEndo-his质粒应获得4.5kb和971bp的片段, 从电泳图看实验结果。

3.2 穿梭质粒的测序鉴定 上游测序引物采用pDC316-cexu-f, 测序结果与vp3、IRES序列进行比对。另外采用反向测序引物pDC316-cexu-r, 反向测序结果与IRES、sEndo-his序列比对。从比对结果看, vp3、sEndo-his完全正确的插入载体中, IRES序列有三个碱基发生了突变, 但不影响IRES的功能。综合测序比对结果, vp3-IRES-sEndo-his完全正确。通过PCR、酶切及测序分析pDC316-vp3-IRES-sEndo-his质粒构建完全正确, 该质粒全长为5524 bp, Amp抗性。

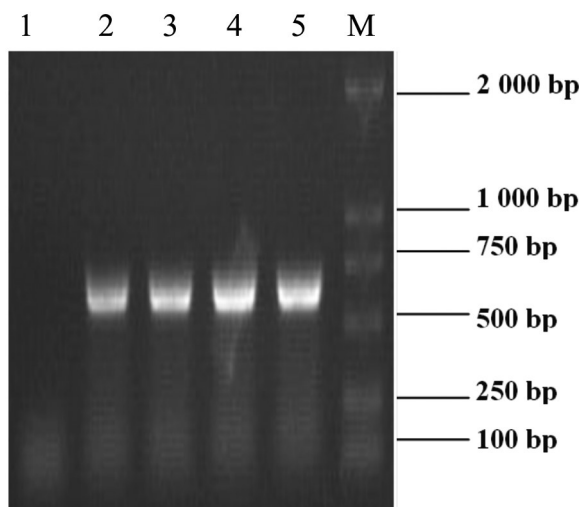


图5 腺病毒的sEndo PCR鉴定结果
注: 1:阴性对照; M: DL2000; 2:阳性对照; 3:Ad5-vp3-IRES-endostatin-his稀释100倍; 4:Ad5-vp3-IRES-endostatin-his稀释10倍; 5:Ad5-vp3-IRES-endostatin-His原液。

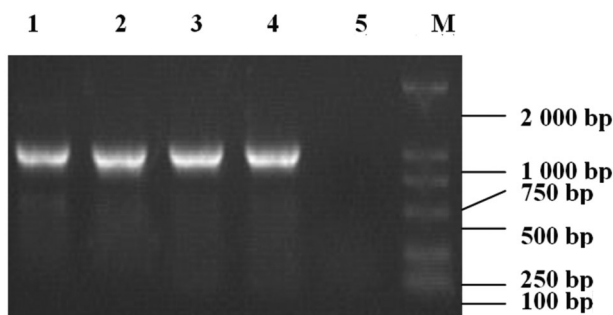


图6 腺病毒的vp3-IRES PCR鉴定

注:1: Ad5-vp3-IRES-endostatin-his 原液;2: Ad5-vp3-IRES-endostatin-his 稀释10倍;3: Ad5-vp3-IRES-endostatin-his 稀释100倍;4: 阳性对照;5: 阴性对照;M: DL2000。

4 讨论

肿瘤是当今社会影响人类健康的主要疾病之一。目前68%的基因治疗集中在肿瘤治疗方面,人们对肿瘤基因治疗的关注点集中在三个方面:(1)寻找更有效的基因。(2)基因联合治疗。肿瘤是一种多基因疾病,采用多基因治疗方案,更有利于促进肿瘤细胞的凋亡与解体,因此,强调基因的联合治疗将是基因治疗的方向之一^[2]。(3)制备高效、靶向性、可控性基因导入系统。利用病毒载体介导基因转移,其优点是转染率高和靶向性好,是肿瘤基因治疗中应用最广泛的方法。腺病毒载体则具有许多优点目前腺病毒已广泛用于基因治疗研究,其介导的p53以及tk等基因治疗肿瘤已经在美国进入临床应用阶段。

凋亡素是鸡贫血病毒(Chicken anemia virus, CAV)基因编码产生的一种功能性蛋白。研究发现,VP3可以单独激发细胞凋亡过程,因此将其命名为凋亡素^[1]。近年来,凋亡素导入包括免疫缺陷小鼠的异种移植肝癌模型、脑胶质瘤大鼠、人肝癌细胞HepG2细胞系、人类结肠癌细胞等,观察到明显的肿瘤细胞凋亡的现象。目前抗肿瘤血管治疗已成为当今肿瘤治疗的热点。内皮抑素是1997年O'Reily等^[3]从小鼠血管内皮瘤细胞(Murine hemangioendothelioma cell line, EO-MA)的培养上清液中纯化获得的一种新的血管内皮抑制因子,命名为内皮抑素。内皮抑素是公认的对血管内皮细胞生长繁殖抑制力度最大的内源性肿瘤血管生成抑制剂^[4]。内皮抑素还能显著抑制体外培养的肿瘤细胞生长,并诱导其凋亡^[5]。使用AdMax™包装系统是构建第一代腺病毒的方法。AdMax™包装

系统是双质粒共转染方法,在HEK293细胞内完成同源重组。与利用细菌内的同源重组的AdEasy™系统相比其主要优势在于:同源重组与产毒均在HEK293细胞内一次进行,减少了细菌内同源重组后扩增、筛选、酶切线性化再转染HEK293的步骤;环状质粒转染293细胞,提高了转化效率;增大了选择压力,不会因为在细菌中同源重组易产生细微的基因突变,减少了病毒的筛选工作。另外,AdMax™转染时利用了重组酶系统(Cre-loxP和FLP-frt),极大地提高了重组效率,它获得的重组腺病毒产量比较高,为不用重组酶系统的双质粒共转染方法的100倍^[6]。

构建双基因共表达载体系统需要考虑的因素较多。因研究表明凋亡素蛋白必须在肿瘤细胞内正确核定位后才能导致细胞凋亡,而内皮抑素的主要作用靶点是肿瘤血管的内皮细胞,因此需要两个基因分别表达,同时内皮抑素应该具有分泌特性。因此,本实验选择带IL-2分泌信号的内皮抑素基因。本载体携带了双基因,为避免超出或者接近病毒的最大转载量而严重影响包装产毒,所以两个基因共用了一个表达框,两个基因间隔一个核糖体结合位点(IRES),引入核糖体结合位点,实现一个启动子、一个表达框内两基因单独表达。

参考文献

- [1] Zhang YH, Abrahams PJ, van der EB AJ, et al. The viral protein Apoptin induces apoptosis in UV-C-irradiated cells from individuals with various hereditary cancer-prone syndroms [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(12): 3010-3015.
- [2] 章翔, 张曦. 联合基因治疗胶质瘤研究新进展[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2005, 4(4): 374-375.
- [3] O'Reily MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: all endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *Cell*, 1997, 88(2): 277-285.
- [4] 侯恩存. 肿瘤血管生成与抗血管生成治疗[J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2003, 10(2): 179-181.
- [5] Kim YM, Jang JW, Lee OH, et al. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase 2 [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(19): 5410-5413.
- [6] Ng P, Parks RJ, Cummings DT, et al. An enhanced system for construction of adenoviral vectors by the two-plasmid rescue method [J]. *Human Gene Therapy*, 2000, 11(20): 693-699.

(收稿日期:2011-11-20)