腺病毒介导 hIL-24 抑制裸鼠肝癌荷瘤生长及其机制研究

The Study of the Growth-Suppression and Mechanisms of Hepatocelluar Carcinoma Tumor in Nude Mice

汪小华，叶震敏，盛伟华，谢宇锋，王金志，杨吉成*

WANG Xiao-Hua，YE Zhen-Min，SHENG Wei-Hua，XIE Yu-Feng，WANG Jin-Zhi and YANG Ji-Cheng*

苏州大学医学院细胞与分子生物学教研室，苏州 215007

Cell and Molecular Biology，Institute of Medical College of Soochow University，Suzhou 215132，*China*

摘 要 为了研究腺病毒 hIL-24 抑制 SMMC-7721 肝癌细胞裸鼠荷瘤的生长抑制及其作用机制，构建了重组腺病毒载体 pAdeasy-1-pTrack-CMV-hIL-24(Ad-hIL-24)，经 *Pac*I 线性化后转染 QBI-293A 细胞，多轮感染后收获高效价腺病毒重组病毒子。用 SMMC-7721 肝癌细胞使 16 只裸鼠致瘤，然后随机 NS 分成干预组、5-Fu 组、Ad 组和 Ad-hIL-24 组，进行抗肿瘤试验。四组均使用瘤体内注射干预用药，100μL/只：NS 组、Ad 组(10^7 pfu)和 Ad-hIL-24 组(10^7 pfu)隔日一次，共注射 5 次；5-Fu 组 20μg/kg，连续注射 5d。用药前、用药后 1 周和 2 周分别测皮下瘤体的长径(L)、短径(W)，计算出瘤体体积，治疗开始后第 15 天，将裸鼠脱颈处死，摘取瘤体称重，计算出抑瘤率。显微镜观察细胞生长形态、免疫组化法测 caspase3 蛋白表达、P53 及 P27 核内抑癌基因表达、CD34 染色标记测定的 MVD 及 VEGF 蛋白表达。与 NS 组比较，Ad-hIL-24 组与 5-Fu 组的抑瘤率分别为 68.52%（$P<0.01$）和 65.64%（$P<0.01$）；镜下：Ad-hIL-24 组肿瘤组织的 caspase3 蛋白表达细胞数较其它 3 组呈显著性升高（$P<0.01$），P27 核内抑癌基因表达细胞数也较 NS 组明显增高（$P<0.01$），CD34 染色标记测定的 CD34 及 VEGF 较 NS 组和 Ad 组明显减少（$P<0.001$），P53 未见明显变化。结论 Ad-hIL-24 可以显著抑制裸鼠 SMMC-7721 荷瘤的生长，其机制可能通过激活 caspase 途径、上调 P27 抑癌基因表达、抑制血管形成等多途径发挥抑瘤作用。

关键词 构建，Ad-hIL-24，SMMC-7721 荷瘤，抑瘤，机制

中图分类号 Q785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2006)06-0925-06

Abstract Study effect and mechanisms of growth-suppression of hepatocelluar carcinoma(HCC) in nude mice. The construction of the pAdeasy-1-pTrack-CMV-hIL-24 recombined adenovirus vector(Ad-hIL-24) was completed and lineared with *Pac*I. Ad-hIL-24 were transfected into QBI-293 cells and obtained. 16 nude mice of the subcutaneous tumor models were established with SMMC-7721 HCC and were randomly divided into NS，5-Fu，Ad and Ad-hIL-24 groups. Then 100μL NS，Ad (10^7 pfu) and Ad-hIL-24 (10^7 pfu) for each one were given respectively QOD，and 5-Fu (20μg/kg) were injected Q.D.，for 5 times，with intra-tumor injections. After 15 d，16 mice were sacrificed and subcutaneous tumors were taken out. The volumes (before administration，1week and 2weeks after administration) were measured and the weights of tumor were weighed and ratios of tumor-suppression were calculated. The morphological changes of apoptotic tumor cells were observed under microscope. Caspase3，P53 and P27，CD34 and VEGF were tested in immunohistochemistry. In tumor subcutaneous model，compared with NS group，the ratios of tumor-suppression of Ad-hIL-24 group and 5-Fu group were 68.52% ($P<0.01$) and 65.64 ($P<0.01$)，respectively. Caspase3 protein in Ad-hIL-24 group was higher than other 3 groups significantly ($P<0.01$). The

Received：May 31，2006；Accepted：July 3，2006.

* Corresponding author. Tel：86-512-67162284；E-mail：jcyang@suda.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

expression of P27 also differed from NS group ($P < 0.01$). CD34 and VEGF protein in Ad-hIL-24 group can inhibit neovascularization obviously ($P < 0.001$), compared with NS and Ad groups. Ad-hIL-24 inhibits the growth of SMMC-7721 HCC on nude mice's. The mechanisms of tumor-suppression may be multi-pathways such as the induction of caspase3 pathway, P27 activities and the antiangiogenic mechanism.

Key words Ad-hIL-24, SMMC-7721 HCC, growth-suppression, mechanisms, mice

白细胞介素 24(IL-24)又名 mda-7(melanoma differentiation-associated gene),是人白细胞介素家族的新成员,也是一种分泌蛋白,它有细胞因子的特性,如过度表达,则表现为肿瘤生长抑制的作用。如由腺病毒载体介导(Ad-hIL-24),它能通过多途径发挥抑瘤作用,如诱导肿瘤免疫及免疫刺激作用[1,2],抑制肿瘤细胞生长和血管形成等,能杀伤多种培养的肿瘤细胞如肺癌、乳腺癌、鼻咽癌及前列腺癌细胞[3,4],而且对正常细胞无不利作用[5]。但应用 Ad-hIL-24 对肝癌细胞的抑瘤作用研究国外研究不多,国内也未见报道,本研究旨在探索 Ad-hIL-24 的构建及其体内抑制肝癌生长作用,并探讨其部分作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

pcDNA3.0-hIL-24 载体、*E. coli* 菌株 DH5α、BJ5183、QBI-293A 包装细胞、SMMC-7721 人肝癌细胞株为本科室保存,*Pac* Ⅰ和 *Pme* Ⅰ购自 New England Biolab 公司,*Sal* Ⅰ、*Eco*RV 和 T4 DNA 连接酶、MMLV 逆转录酶购自 TaKaRa 公司,*Taq* DNA 聚合酶购自上海申能博彩生物技术有限公司,VEGF、P27、P53、抗活性型 Caspase3 抗体检测试剂盒购自上海晶美公司,CD34 检测试剂盒购自深圳晶美生物公司。MTT 购自 Sigma 公司,引物合成及 RNA 抽提试剂盒由上海 Sangon 完成。携带 GFP 标记基因的 pTrack-CMV 转移载体、pAdEasy-1 腺病毒载体为复旦大学钟江教授惠赠。hIL-24[8] 由本室保存,5-氟脲嘧啶注射液购自江苏省南通精华制药有限公司。hIL-24 基因引物 1:上游:5′-CGCGTCGACATGAATTTTCAACAGAGGC-3′,下游:5′-CGCGATATCCTAGAGCTTGTAGAATTTCT-3′。hIL-24 基因引物 2:上游:ATGGATATCATGCAGGGCCAAGAATTCCACTT;下游 P2:GCACTCGAGTCAGAGCTTGTAGAATTTC。细胞培养血清为 5%小牛血清 RPMI-1640;6 周龄、体重 19~21g/只雄性 BALB/c-nu 裸鼠购自中科院上海实验动物中心;免疫组化由苏州大学医学院病理教研室高年制老师协助完成。

1.2 实验方法

1.2.1 腺病毒载体构建:

(1)hIL-24 转移载体质粒的构建:根据 hIL-24 序列合成引物 1,以本室构建的 pcDNA3.0-hIL-24 重组质粒为模板,PCR 扩增 hIL-24 基因和带有 GFP 标记基因的 pAdTrack-CMV 经 *Sal*Ⅰ、*Eco*RV 双酶切后,用胶回收试剂盒回收目的片段,再由 T4DNA 连接酶连接过夜,氯化钙法转化 DH5α 感受态细胞,筛选 pTrack-CMV-hIL-24 基因重组质粒的阳性克隆,测序鉴定。

(2) 重组腺病毒载体构建:将测序序列正确的 pTrack-CMV-hIL-24 基因重组质粒用 *Pme* Ⅰ单酶切线性化后,胶回收与 pAdEasy-1 腺病毒载体氯化钙法共转化 BJ5183 感受态,获得重组腺病毒载体,转化 DH5α 感受态细胞,Ad-hIL-24 转化子大量扩增。

1.2.2 Ad-hIL-24 病毒子的准备:

将本室构建的重组 Ad-hIL-24 感染单层贴壁的 QBI-293A 细胞,次日在荧光显微镜下观察荧光,4~6d 收集细胞悬液,2000r/min 离心 5min,细胞沉淀用无菌 NS 洗涤 2~3 次后,将细胞悬液反复冻溶 3 次,2000r/min 离心 5min,取上清,可获得高滴度重组病毒子(Ad-hIL-24)于 -80℃保存。同法制备 Ad 病毒子空载体。病毒效价的测定:将生长良好的 QBI-293A 细胞经胰酶消化后计数,稀释细胞浓度为 10^5 个/mL,然后以 100μL/孔接种于 96 孔板上。培养 24h 后,收获的重组病毒子再按 10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7} 稀释,每个稀释度按每孔 100μL 接种,培养 18h 后,荧光显微镜下,对荧光计数,按公式:病毒效价 = (荧光数 × 10)/相应稀释度。

1.2.3 SMMC-7721 荷瘤裸鼠模型及抗肿瘤试验:

将处于对数生长期的 SMMC-7721 用 NS 洗涤后经 2%胰酶消化,并用无血清培养液稀释后以 1500r/min 的速度离心 5min,细胞计数后配成 2.5×10^7/mL。取 19~21g 6 周龄雄性 BALB/C 裸鼠,安尔碘消毒其右前肢腋下,然后皮下注射 0.2mL(5×10^6)/只,4 周后肿瘤长至 5mm 左右时,将其随机分成 NS 组、5-Fu 组、Ad 组和 Ad-hIL-24 组,每组 4 只。三组均使用瘤体内注射干预用药,100μL/只:NS 组、Ad 组(1×10^7 pfu)和 Ad-hIL-24 组(1×10^7 pfu)隔日一次,共注射

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

5 次;5-Fu 组 20ug/kg,连续注射 5d。用药前、用药后 1 周、用药后 2 周分别测皮下瘤的长径(L)、短径(W),按公式计算瘤体体积($V = L \times W^2/2$),治疗开始后的第 15 天,将裸鼠脱颈处死,安尔碘消毒肿瘤局部皮肤后,切开皮肤,摘取瘤体称重,计算出抑瘤率,抑瘤率(%) = [1 – 实验组平均瘤重(体积)/对照组平均瘤重(体积)] × 100%。瘤体组织经 10% 福尔马林固定过夜,常规石蜡包埋待用,做组织 HE 染色及组织免疫组化指标测定。

1.2.4 治疗后肿瘤 HE 染色结果判断:HE 染色程序按常规进行[7]。判断标准:肿瘤细胞如呈现体积变小、细胞质浓缩、细胞核变小、染色质浓缩并凝结成块,出现染色质沿核膜内侧排列的核边聚,甚至表现为细胞核裂解形成凋亡小体(apoptotic bodies),则判断为肿瘤细胞凋亡。

1.2.5 免疫组化:免疫组化染色程序按免疫组化 SP 法常规进行[7]。肿瘤 caspase3 蛋白表达、P53 及 P27 基因表达:CD34 染色标记测定的 MVD 和 VEGF 蛋白表达计数方法:每张切片 400 倍光镜下观察 2 ~ 3 个视野,共记数 10 个视野进行统计分析。

1.3 统计学处理

用 SPSS011.0 统计学软件包对本研究所有数据进行多因素方差分析。

2 结 果

2.1 重组腺病毒质粒构建及质粒感染 QBI-293A 细胞和 SMMC-7721 细胞的鉴定

将获得的阳性克隆抽提质粒,经 PCR 鉴定在 600bp 附近有目的条带(图 1)(引物 1)。pTrack-hIL-24 质粒和空载体 pTrack 经 *Pme* Ⅰ 线性化后,与 pAdeasy-1 质粒共转化 BJ5183 大肠杆菌,卡那霉素筛选阳性克隆。鉴定正确的重组 pAdeasy-1-pTrack-CMV-hIL-24(Ad-hIL-24)质粒,经 *Pac* Ⅰ 酶切后,用 Lipofectamine 转染 QBI-293A 细胞,2 日在倒置荧光显微镜下可观察到的荧光,4 ~ 6d 后,收集细胞,反复冻溶的重组病毒子经多轮感染后,检测效价达到 10^8 ~ 10^9 pfu/mL 的重组病毒子于 – 80℃冻存备用。RT-PCR 鉴定重组 Ad-hIL-24 质粒感染 QBI-293A 细胞情况,在 500bp 附近有目的条带(引物 2)(图 2)。Ad-hIL-24 感染的 SMMC-7721 细胞经 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后显示,在 500bp 位置可观测到一条特异性条带(引物 2),而未感染基因的 SMMC-7721 细胞对照组中未出现预期条带(图 3),说明 Ad-hIL-24 在 SMMC-7721 细胞已获成功表达。

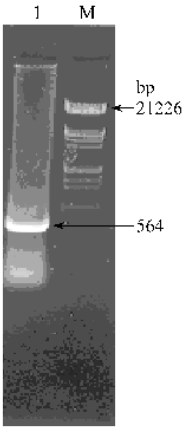


图 1 pTrack-IL-24 重组质粒的鉴定

Fig.1 Expression of pTrack-IL-24

1:PCR pTrack-IL-24;M:λDNA / *Hin*dⅢ + *Eco*RⅠ marker.

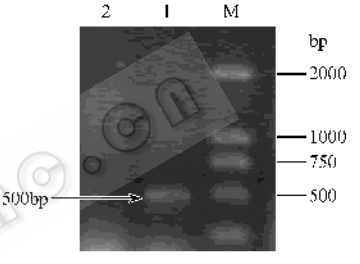


图 2 RT-PCR 鉴定重组病毒子转染 QBI-293A 细胞

Fig.2 Expression of Ad-hIL-24 on QBI-293A by RT-PCR

1:Ad-hIL-24;2:Ad;M:DNA marker.

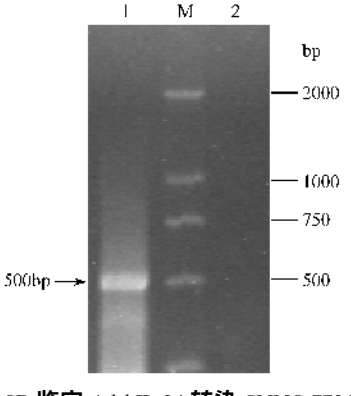


图 3 RT-PCR 鉴定 Ad-hIL-24 转染 SMMC-7721 肝癌细胞

Fig.3 Expression of Ad-hIL-24 on SMMC-7721 HCC by RT-PCR

M:DNA marker;1:Ad-hIL-24;2:Ad.

2.2 抑瘤效应

实验成功建立了裸鼠 SMMC-7721 肝癌实体模型。研究结果显示:Ad-hIL-24 组和 5-Fu 组与 NS 组和 Ad 组比较,治疗 1 周、2 周后的肿瘤体积有显著性差异($P < 0.01$),前两组的抑瘤率明显高于 NS 组和 Ad 组($P < 0.01$)(表 1)。2 周处死后,取出的肿瘤重量也得到同样的结果($P < 0.001$)(表 2 和图 4)。Ad-hIL-24 组和 5-Fu 组都有明显抑瘤作用,组间

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

无显著性差异(表 1 和表 2)。

2.3 治疗后肿瘤 HE 染色照片

显微镜观察,Ad-hIL-24 治疗组镜下可见凋亡细胞形态学改变,凋亡细胞表现为细胞浆浓缩、染色质浓集于核膜周围,还可见典型的凋亡小体形成,而细胞膜完整,细胞器结构基本正常(图 5)。

表 1 四组裸鼠治疗前后肿瘤体积(mm^3)及抑瘤率(%)的比较 ($\bar{X} \pm S$)

Table 1 SMMC-7721 hepatoma tumor volumes and tumor-suppression rates of nude mice before and after treated with Ad-hIL-24

Groups	NS	5-Fu		Ad		IL-24	
		Volumes	Tumor-suppression rates/%	Volumes	Tumor-suppression rates/%	Volumes	Tumor-suppression rates/%
Before administration	0.19 ± 0.05	0.16 ± 0.56		0.17 ± 0.03		0.18 ± 0.02	
1	0.40 ± 0.06	0.26 ± 0.03**	34.70 ± 3.85**	0.31 ± 0.07	21.90 ± 5.21	0.22 ± 0.06**	43.22 ± 7.55**
2	0.57 ± 0.03	0.30 ± 0.08***	46.95 ± 12.19***	0.43 ± 0.10	25.71 ± 12.99	0.24 ± 0.06***	58.07 ± 9.21***

Note: "***" means $P < 0.001$; "**" means $P < 0.01$ 1: week after administration; 2: weeks after administration.

表 2 裸鼠处死后肿瘤重量及抑瘤率的比较 ($\bar{X} \pm S$)

Table 2 Tumor weights and tumor-suppression rates after nude mice executed

Groups	Tumor weights/g	Tumor-suppression rates/%
NS	0.56 ± 0.10	
5-Fu	0.20 ± 0.08***	65.64 ± 8.38***
Ad	0.43 ± 0.13	23.82 ± 13.72
IL-24	0.18 ± 0.08***	68.52 ± 9.11***

Note: "***" means $P < 0.001$

图 4 裸鼠 SMMC-7721 肿瘤标本

Fig. 4 The picture of tumor samples

2.4 免疫组化结果

2.4.1 治疗后肿瘤 caspase3 蛋白的表达:caspase3 阳性反应产物呈棕黄色细颗粒状,定位于细胞浆(图 6)。表 3 所示,Ad-hIL-24 治疗组与其它 3 组比较,caspase3 阳性细胞数明显增多,存在显著性差异($P < 0.01$)。

2.4.2 P53 及 P27 表达:以细胞核内出现棕黄色颗粒散在或弥漫片状分布为 P53 及 P27 染色阳性细胞(图 6)。本研究显示,四组肿瘤组织的 P53 蛋白阳性细胞数无明显差异($P > 0.05$),故未附上相关图片。Ad-hIL-24 组的 P27 基因表达比 NS 组明显增多,有显著性差异($P < 0.01$),见表 3。

2.4.3 CD34 染色标记测定的 MVD 及 VEGF 蛋白的表达:CD34 染色标记显示与背景染色有明显区别的单个棕色细胞或细胞丛记为一个血管(图 7)。VEGF 阳性反应产物呈棕黄色细颗粒状,定位于细胞浆(图 8)。从表 3 可以看出,Ad-hIL-24 组与 5-Fu 组有明显抑制肿瘤血管形成的效应,与 NS 组和 Ad 组比较,有显著性差异($P < 0.001$)。

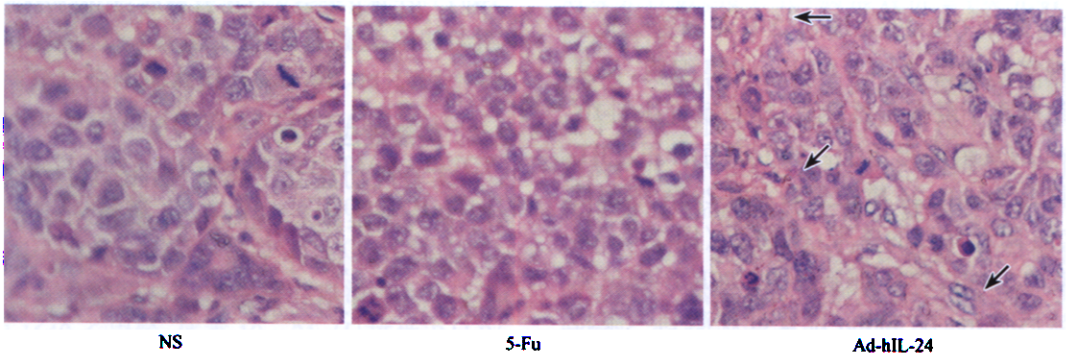


图 5 显微镜下细胞形态学观察结果(HE × 40)

Fig.5 Cellular morphologic pictures under microscope(HE × 40)

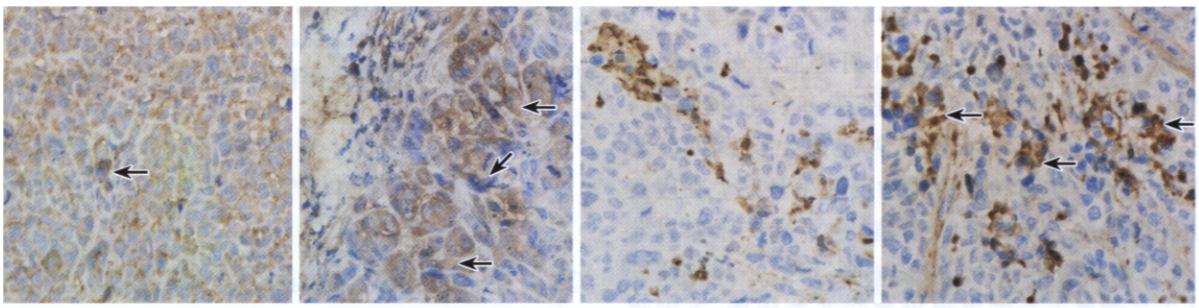
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 3 不同治疗组裸鼠肝癌免疫组化结果($n=10$)量数

Table 3 The number of HCC expression of Caspase3, P27, P53, CD34, VEGF in different groups of nude mice

Groups	Caspase3	P27	P53	CD34	VEGF
NS	29.10 ± 6.21	45.00 ± 9.33	59.60 ± 11.38	37.20 ± 4.59	33.90 ± 4.23
5-Fu	29.30 ± 6.11	88.60 ± 32.18**	46.00 ± 8.47	27.00 ± 3.23***	23.60 ± 2.63***
Ad	29.60 ± 4.93	77.40 ± 16.22**	44.60 ± 13.51	36.90 ± 6.59	34.50 ± 6.70
Ad-hIL-24	40.60 ± 10.15**	71.50 ± 9.96**	48.30 ± 17.04	27.40 ± 3.63***	24.40 ± 3.72***

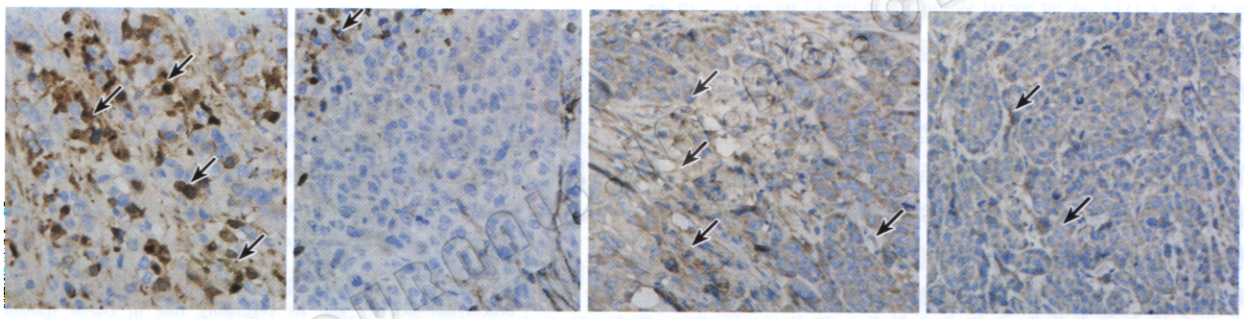
注:"***"表示 $P<0.001$ "**"表示 $P<0.01$



Caspase3(NS) Caspase3(Ad-hIL-24) P27(NS) P27(Ad-hIL-24)

图 6 Ad-hIL-24 治疗后肿瘤 Caspase3 蛋白表达及 P27 基因表达阳性细胞(HE × 40)

Fig. 6 The pictures of HCC expression of Caspase3, P27 in Ad-hIL-24 groups of nude mice



CD34(NS) CD34(Ad-hIL-24) VEGF(NS) VEGF(Ad-hIL-24)

图 7 Ad-hIL-24 治疗后肿瘤组织的微血管生长情况(HE × 40)

Fig. 7 The pictures of HCC expression of CD34, VEGF in Ad-hIL-24 groups of nude mice

3 讨论

肝癌是威胁人类生命的常见疾病,发展中国家的发病率更高,且治疗非常困难。目前的主要治疗手段是以手术、放疗为主,辅以中药,但 5 年生存率仍很低。近年来,随着医学分子生物学研究的深入,人们对疾病认识水平的提高,基因治疗逐渐成为肿瘤生物治疗学中的重要组成部分[8],在肝癌治疗中也显示出较好的应用前景。

本研究提示,Ad-hIL-24 能显著抑制 SMMC-7721 肝癌的生长,与传统治疗肝癌的化疗药物 5-Fu 相比,两者抑瘤效果无明显差异,而与 NS 组相比,则差异显著,有统计学意义。

电镜下观察,Ad-hIL-24 治疗组可见典型凋亡细胞形态学改变,凋亡细胞表现为细胞浆浓缩、典型的凋亡小体形成。

Caspase 是一组半胱氨酸蛋白酶家族,其家族成员在细胞凋亡过程中起重要作用,最终效应酶 Caspase3,也是该家族中最重要成员,它是激活细胞凋亡的关键酶,也是细胞凋亡的主要效应因子[9],而且其表达与肿瘤侵袭性有关[10]。本实验采用免疫组化技术检测了不同组治疗后肿瘤 Caspase3 的表达,Ad-hIL-24 组和 5-Fu 组的 caspase3 阳性细胞数与 NS 组比较明显增多,存在显著性差异($P<0.01$),提示 Caspase3 介导的细胞凋亡途径是 Ad-hIL-24 诱导 SMMC-7721 肝癌细胞凋亡的重要机制之一。

P53 是肿瘤抑制基因,它可促进肿瘤细胞凋亡,增加肿瘤细胞对药物的敏感性,同时还能通过改变血管内皮基因促进因子而调节血管内皮生长[11]。以往的研究显示,Ad-hIL-24 可通过或不通过 P53 来抑制肿瘤的生长[12]。本研究结果为,Ad-hIL-24 对 P53 蛋白表达影响不明显。另外细胞周期调节异常

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

是导致肿瘤细胞异常增殖的机制之一。Ad-hIL-24 干预后的 SMMC-7721 肿瘤细胞 G2/M 被抑制,而 Ad-hIL-24 诱导的 G2/M 抑制与 CDK 抑制剂 P27 的表达有关[13]。同时 P27 一个有效的 G1 期阻断剂,同时能诱导凋亡的抑癌基因[14],本研究结果提示,Ad-hIL-24 可促进 SMMC-7721 肝癌细胞 P27 蛋白的表达。至于 Ad 组的 P27 蛋白表达增加之原因,本研究尚未进一步探讨。

Ad-hIL-24 抑制 SMMC-7721 肝癌血管形成:新生血管形成是肿瘤细胞生长、侵袭和转移的基础,Foldman 等[15]研究认为,实体肿瘤的生长期可分为无血管的侵袭前期和血管化的侵袭生长期。在侵袭前期肿瘤细胞呈单克隆性增殖,主要靠扩张取得营养,当实体肿瘤直径大于 2mm 时,其中心部位和肿瘤的生长需要由血管来提供氧和营养物质,否则将发生缺氧和坏死[16],为了保持恶性肿瘤无限制侵袭性生长,肿瘤必须依赖持续和广泛的新血管形成。近年来,CD34 是血管内皮细胞表面的糖蛋白,也是肿瘤血管形成重要的调节因子,在实体瘤中表达增加[17],可被用作血管内皮细胞特异性标记物,应用 CD34 抗体通过免疫细胞化学染色方法测量肿瘤内微血管密度来估计肿瘤患者的预后[18]。VEGF 对新生血管的形成也起了重要作用,同时可促进肿瘤细胞向正常组织扩散[19]。本组研究显示,Ad-hIL-24 可明显抑制 SMMC-7721 实体瘤内 CD34 及 VEGF 蛋白的表达,与 NS 组相比,两者呈现显著性差异。

本研究发现,Ad-hIL-24 可以显著抑制裸鼠 SMMC-7721 荷瘤的生长,其机制可能通过激活 caspase 途径诱导细胞凋亡、促进 P27 抑癌基因表达、抑制血管形成等多途径发挥抑瘤作用,有望成为临床治疗肝癌的基因治疗药物之一。

REFERENCES(参考文献)

[1] Pankaj Gupta a, Zao-zhong Su a, Irina V Lebedeva *et al*. mda-7/IL-24: Multifunctional cancer-specific apoptosis-inducing cytokine. *Pharmacology & Therapeutics*, 2006, pp.1 – 33

[2] Ryo Miyahara, Sanjeev Banerjee, Kouichiro Kawano *et al*. Ad-mda7/IL-24 induces systemic anticancer immunity *in vivo*. *Molecular Therapy*, 2005, **11**(supplement 1): 267

[3] Mhashilkar B, Schrock D, Hindi M *et al*. Melanoma differentiation-associated gene 7(mda-7): a noval anti-tumor gene for cancer gene therapy. *Mol Med*, 2001, **7**: 271 – 282

[4] Zhao L, Gu J, Dong A, Zhang Y *et al*. Potent antitumor activity of oncolytic adenovirus expressing mda-7/IL-24 for colorectal cancer. *Hum Gene Ther*, 2005, **16**(7): 845 – 858

[5] Sarkar D, Su ZZ, Lebedeva IV *et al*. mda-7 (IL-24): signaling and functional roles. *Biotechnique*, 2002, **supplement**(10): 30 – 39

[6] Chen XY(陈雄艳), Li LE(李丽娥), Sheng WH(盛伟华) *et al*. hIL-24 molecular cloning and sequencing. *Suzhou University Journal of Medical Science* [苏州大学学报(医学版)], 2003, **23**(3): 279 – 281

[7] Christiane Kuropkat, Venkatesan TK, Caldarelli DD *et al*. Abnormalitiea of molecular regulators of proliferation and apoptosis in carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Auris Nasus Larynx*, 2002, **29**: 165 – 174

[8] Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*, 2003, **4**: 346 – 358

[9] Pidgeon GP, Kandoua M, Meram A *et al*. Mechanisms controlling cell cycle arrest and induction of apoptosis after 12-lipoxygenase inhibition in prostate cancer cells. *Cancer Research*, 2002, **62**(9): 2721 – 2727

[10] Zapata JM, Krajewska M, Krajewski S *et al*. Expression of multiple apoptosis regulatory genes in human breast cancer cell lines and primary tumors. *Breast Cancer Research Treat*, 1998, **47**: 129 – 140

[11] Greenblatt MS, Bebbett WP, Hollstein M *et al*. Mutations in the P53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*, 1994, **54**(18): 4855 – 4878

[12] Seaki T, Mhashilkar A, Chada, S *et al*. Tumor-suppression effects by adenovirus-mediated mda-7 gene transfer in non-small-cell lung cancer cells *in vitro*. *Gene therapy*. 2000. **7**: 2051 – 2057

[13] Noh EJ, Lee JS. Functional interplay between modulation of histone deacetylase activity and its regulatory role in G2-M transition, Biochem. Biophys. *Res Commun*, 2003, **310**: 267 – 273

[14] Christiane Kuropkat, Venkatesan TK, Caldarelli DD *et al*. Abnormalities of molecular regulators of proliferation and apoptosis in carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Aurix Nasus Larynx*, 2002, **29**: 165 – 174

[15] Foldman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biot Chen*, 1992, **267**: 10931 – 10934

[16] Semenza GL. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med*, 2003, **54**: 17 – 28

[17] Stabenow E, Tavares MR, Ab'Saber AM *et al*. Angiogenesis as an indicator of metastatic potential in papillary thyroid carcinoma. *Clinics*, 2005, **60**(3): 233 – 240

[18] Meihua Z. Difference of Microvessel Density and CD34 Expression between Carcinoma and Normal Mucosa. *Otolaryngology Head and Neck Surgery* (Research Posters), 2003, **8**: 166

[19] Marcus Schmitt1, Axel Horbach1, Ralf Kubitz *et al*. Disruption of hepatocellular tight junctions by vascular endothelial growth factor (VEGF): a novel mechanism for tumor invasion. *Journal of Hepatology*, 2004, **41**: 274 – 283

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn