

# 超声靶向微泡破碎联合半乳糖聚乙烯亚胺促凋亡素基因治疗肝癌移植瘤的实验

张园, 朱惠明, 李银鹏, 王娜, 王菲, 黄庆娟, 姜岭梅

## Study on VP3 Gene Therapy for Murine Transplanted Hepatocarcinoma Delivered by UT-MD and PEI-Gal

Zhang Yuan, Zhu Huiming, Li Yinpeng, Wang Na, Wang Fei, Huang Qingjuan, Jiang Lingmei

Department of Gastroenterology, Affiliated Second Medicine Hospital, J'nan University, Shenzhen 518020, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of VTMD and PEI-Gal on VP3 gene mediated apoptosis induction and proliferation suppression in murine transplanted Hepatocarcinoma. **Methods** Forty mice bearing hepatocarcinoma subcutaneously were divided randomly into 4 groups: control group; PEI-Gal + plasmid group; PEI-Gal + plasmid + ultrasound group and PEI-Gal + UTMD + plasmid group. Histological examination, apoptotic index and transfection efficiency were evaluated by the frozen section, the tumor size was measured regularly. The rate of tumor growth inhibition was calculated and the tumor growth curve was described. The protein expressions of Bcl-2 and Caspase-3 were investigated by immunohistochemistry. **Results** The highest transfection efficiency was observed in PEI-Gal + UTMD + plasmid group which was significantly higher than that in any other groups ( $P < 0.01$ ) and no tissue damage was seen histologically. The tumor inhibition rate (56.6%) and apoptotic index ( $34.57\% \pm 3.56\%$ ) were the highest in PEI-Gal + UTMD + pCDNA-VP3 group compared with those control group and PEI-Gal + pCDNA-VP3 group. The protein expression of Bcl-2 was down-regulated markedly, whereas Caspase-3 was up-regulated markedly ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** UTMD associated with PEI-Gal can enhance efficiency of gene transfection significantly. The method associated with VP3 gene can significantly induce apoptosis and inhibit proliferation of transplanted tumors in mice.

**Key words:** UTMD; PEI-Gal; VP3 gene; murine transplanted Hepatocarcinoma

**摘要: 目的** 探讨超声靶向微泡破碎(UTMD)联合半乳糖聚乙烯亚胺(PEI-Gal)介导凋亡素基因对小鼠肝癌移植瘤的抑制作用。**方法** 建立 c57BL/6 小鼠皮下肝癌移植瘤模型, 随机分为 4 组: 对照组; PEI-Gal + 质粒组; PEI-Gal + 超声 + 质粒组; PEI-Gal + UTMD + 质粒组。对组织行冰冻切片采用免疫荧光法检测转染率、Tunel 检测凋亡率。观察肿瘤的体积和组织学变化, 同时计算抑瘤率。采用免疫组织化学法检测移植瘤 Bcl-2 及 Caspase-3 蛋白在各组肿瘤标本中的表达。**结果** PEI-Gal + UTMD + pEGFP-N3 组基因转染效率明显高于对照组、PEI-Gal + 质粒组与 PEI-Gal + 超声 + 质粒组( $P$  均  $< 0.01$ )且对组织无明显损伤。治疗 12 天后 PEI-Gal + UTMD + pCDNA-VP3 组肿瘤凋亡率 ( $34.57\% \pm 3.56\%$ )、抑瘤率 (56.6%) 均显著高于对照组和 PEI-Gal + 质粒组 ( $P$  均  $< 0.01$ )。肿瘤组织中 Bcl-2 蛋白表达明显下降, Caspase-3 蛋白表达增加与其他各组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。**结论** 超声靶向微泡破碎联合半乳糖聚乙烯亚胺能显著增强基因转染效率, 且对组织无明显影响。联合凋亡素基因能通过诱导凋亡抑制肿瘤生长发挥抗癌作用。

**关键词:** 超声靶向微泡破碎; 半乳糖聚乙烯亚胺; 凋亡素基因; 肝癌移植瘤

**中图分类号:** R735.7    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1000-8578(2012)04-0389-05

## 0 引言

肝癌的基因治疗是一种非常有前景的治疗方式, 但需要提高基因的传递技术以利于临床应用。凋亡素基因能特异性诱导恶性肿瘤细胞凋亡而对正常细胞无影响, 研究显示凋亡素联合或单独作

用能有效地诱导体内外的肝癌细胞凋亡并有明显的治疗效果<sup>[1-4]</sup>。UTMD 通过空化作用介导基因的胞内传递, 已有效的转染心脏、胰腺、肌肉等多种组织<sup>[5-7]</sup>, 具有靶向、安全及可重复等特点, 成为非病毒基因转染研究的热点之一。PEI 是能够高效介导基因转染的阳离子复合物, 为进一步提高肝癌基因治疗的靶向性, 实验采用凋亡素基因与半乳糖化的 PEI 及超声微泡耦联, 通过超声辐照转染小鼠肝癌移植瘤, 观察基因的转染效果及对移植瘤的治疗作用。

收稿日期: 2011-07-18; 修回日期: 2011-08-21

基金项目: 深圳市科技计划资助项目(201002015)

作者单位: 518020 广东深圳,暨南大学附属第二临床医学院消化科

作者简介: 张园(1971-),女,博士在读,主治医师,主要从事消化系统肿瘤的治疗工作

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

C57BL/6J 小鼠 50 只,4~6 周龄,雌性 18~22 g,购自广东省实验动物中心[SCXK(粤)2008-0002],清洁级饲养。Hepa1-6 细胞购自鼎国公司;pCDNA-VP3、pEGFP-N3 菌液由本实验室保存;DMEM 培养液购自 Gibco 公司;质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司;超声微泡造影剂声诺维(SonoVue)为意大利 Bracco 公司产品;PEI-Gal 购自法国 Polyplus 公司;EGFP 兔多克隆抗体购自康为公司;二抗 anti rabbit-594 为中杉金桥产品;TUNEL 试剂盒为 Calbiochem 公司产品。

德迈超声仪,探头频率为 1MHz,内置数字计时器、强度调节器和占空比控制器。强度范围为 1.0~2.0 W/cm<sup>2</sup>;间歇性脉冲波重复频率(PRF)为 100Hz(作用 5 s,间歇 5 s);探头有效辐照面积 3 cm<sup>2</sup>±5%,占空比 10%、20%、50%;荧光显微镜为 Olympus 公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 质粒的提取及鉴定 将含 pEGFP-N3、pCDNA-VP3 质粒的菌液摇菌扩增后,用去内毒素 Qiagen 质粒提纯试剂盒提取质粒,并测定质粒浓度和纯度,纯度 E260/E280 nm≥1.8 时再用于试验,质粒浓度为 1 μg/μl,−20℃ 保存备用。

1.2.2 细胞培养 小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 条件下培养,培养液为 DMEM 加 10% 胎牛血清及双抗。动物造模前,取对数生长期的细胞制作单细胞悬液,血细胞计数器计数细胞并调整细胞浓度为 2×10<sup>7</sup>/ml。

1.2.3 转染复合物的制备 SonoVue 中加入 5 ml 的 0.9% 的氯化钠溶液,通过倒置或振荡使微泡均匀分布。泡径为 2~6 μm,密度为 (2×10<sup>8</sup>~5×10<sup>8</sup>)/ml。PEI-Gal/DNA 复合物的制备按 6 μl:50 μg 配比加入试剂盒提供的缓冲液中混匀,终体积为 200 μl,室温下孵育 15 min。PEI-Gal/DNA/微泡复合物的制备将 PEI-Gal/DNA 复合物 200 μl 与微泡 100 μl 混匀,室温下共孵育 15 min。

1.2.4 小鼠肝癌皮下移植瘤模型的建立、分组及处理方法 于小鼠右侧腰胁部皮下注射 0.1 ml Hepa1-6 细胞悬液(细胞浓度为 2×10<sup>7</sup>/ml),10~14 天皮下肿瘤直径达 0.5~1.0 cm 为造模成功(皮下移植瘤成瘤率约 80%)。随机抽取 20 只荷瘤鼠分为 4 组,每组 5 只。对照组注入 0.9% 的氯化钠溶液;PEI-Gal+质粒组注入 PEI-Gal/质粒复合物;PEI-Gal+超声+质粒组注入 PEI-Gal/质粒复合物后予以超声辐照;PEI-Gal+UTMD+质粒组注入 PEI-Gal/质粒及微泡复合物后予以超声辐照。注射质粒为 pEGFP-N3 以检测基因转染率。此后抽 18 只荷瘤鼠随机分为 3 组:对照组、PEI-Gal+质粒组、PEI-Gal+UTMD+质粒组。注射质粒为 pCDNA-VP3 观察 VP3 基因对肝癌移植瘤的治疗

作用。各组小鼠经尾静脉快速注药。超声组注药后将超声耦合凝胶涂布于瘤体表面使用超声探头辐照。辐照条件:探头频率 1 MHz,输出声强 2 W/cm<sup>2</sup>,辐照时间为 3 min,占空比 50%,间歇性脉冲波作用 5 s,间歇 5 s。

1.2.5 pEGFP-N3 表达的检测 注射质粒为 pEGFP-N3 的各组模型鼠于超声辐照 3 天后断颈处死,摘出移植瘤 OCT 包埋,并储存在 −80℃ 液氮中,用恒冷切片机做连续切片,采用免疫荧光法进行绿色荧光蛋白的半定量检测。冰冻切片经封闭、加一抗(兔抗 GFP 多抗)4℃ 过夜、加荧光二抗(荧光标记的羊抗兔)、封固、荧光显微镜镜检。每个切片随机选取 5 个不同视野,记录每高倍镜视野绿色荧光蛋白表达的阳性细胞数。基因转染率 = 阳性细胞数/细胞总数 × 100%。肿瘤组织常规 HE 染色。

1.2.6 肿瘤体积及瘤重测定 注射质粒 pCDNA-VP3 各组治疗后于第 3、6、9、12 天用游标卡尺测量肿瘤的长径和短径,肿瘤体积 = 0.5×肿瘤长径×肿瘤短径<sup>2</sup>,根据肿瘤体积绘制肿瘤生长曲线。注射后第 12 天处死小鼠取出移植瘤称其瘤重,肿瘤抑制率 = (对照组瘤重 − 治疗组瘤重)/对照组瘤重 × 100%。

1.2.7 Tunel 法检测肿瘤组织凋亡 凋亡的阳性肿瘤细胞其细胞核呈棕色至棕褐色深染,形态不整、大小不一。在光学显微镜下,每例组织切片随机选取 5 个高倍视野,对阳性细胞和细胞总数进行计数,凋亡指数(Apoptosis index, AI) = 凋亡细胞数/细胞总数 × 100%。

1.2.8 免疫组织化学 行免疫组织化学染色观察肿瘤组织内 Bcl-2、Caspase-3 的表达。组织经 PBS 冲洗后,4% 多聚甲醛固定,制成 5 μm 石蜡切片,并按常规方法进行。Caspase-3、Bcl-2 蛋白以肿瘤细胞内出现明显的黄色或棕黄色颗粒为阳性表达,阳性反应主要定位于胞质内。根据染色强度和阳性细胞百分比进行评分:1 分为无阳性表达;2 分为低强度染色,<10% 的阳性表达细胞;3 分为低到中等染色,10%~30% 的阳性表达细胞;4 分为中度到强烈染色,>30%~50% 的阳性表达细胞;5 分为弥漫性强染色,>50% 的阳性表达细胞。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 进行统计学分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析比较多组样本均数,组间两两比较采用 LSD 法,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

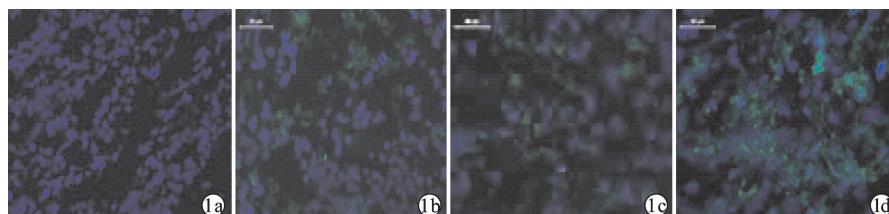
### 2.1 不同转染方法促 pEGFP-N3 质粒在小鼠肝癌移植瘤表达的效率比较

对照组无阳性细胞表达,PEI-Gal+质粒组、PEI-Gal+超声+质粒组可见阳性细胞表达转染率分别为 (28.84% ± 5.51%) 和 (29.71% ± 4.14%),PEI-Gal+UTMD+质粒组质粒可见较多阳性细胞

的表达, 转染率为( $47.46\% \pm 5.27\%$ ), 见图 1。PEI-Gal + UTMD + 质粒组转染率明显高于其他各组, 差异有统计学意义( $P = 0.000$ )。PEI-Gal + 质粒组与 PEI-Gal + 超声 + 质粒组比较两者差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 2.2 治疗后各组肿瘤体积和抑瘤率的比较

各组治疗后第 0 天与第 3 天的肿瘤体积比较, 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ); 治疗第 6~12 天, PEI-Ga + 质粒组和 PEI-Gal + UTMD + 质粒组肿瘤体积增长开始减小, 与对照组比较差异有统计学意义( $P$  均 $<0.05$ ); PEI-Gal + UTMD + 质粒组又较 PEI-Gal + 质粒组增长慢( $P < 0.05$ ), 有明显抑制肿瘤生长作用, 见图 2。治疗结束后切除肿瘤标本, 比较组间平均瘤重, PEI-Gal + UTMD 组的移植瘤重( $93.4 \pm 12.84$ ) mg 明显小于 PEI-Ga 组( $133.42 \pm 14.81$ ) mg 及对照组( $215.03 \pm 58.24$ ) mg。抑瘤率为 56.6%, PEI-Gal 组为 37.9%, 两者比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。



1a: Immunofluorescent staining of GFP in murine tumors 3d after intravenous injection normal saline; 1b: pEGFP-N3/PEI-Gal complex; 1c: pEGFP-N3/PEI-Gal complex with ultrasound irradiation; 1d: pEGFP-N3/SonoVue/PEI-Gal complex with ultrasound irradiation

图 1 绿色荧光蛋白在各组小鼠移植瘤中的表达

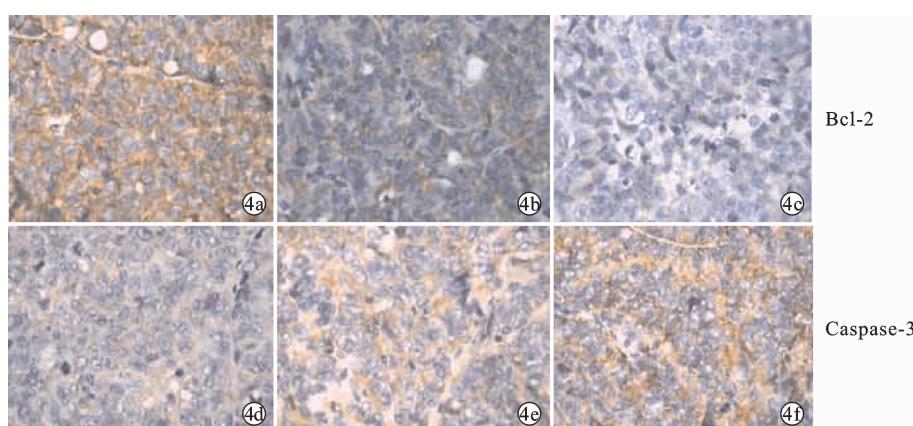
Figure 1 The expression of Green fluorescent protein in tumor tissue of different groups mice



3a: control group; 3b: pCDNA-VP3/PEI-Gal group; 3c: pCDNA-VP3/PEI-Gal + UTMD group

图 3 Tunel 染色检测凋亡细胞

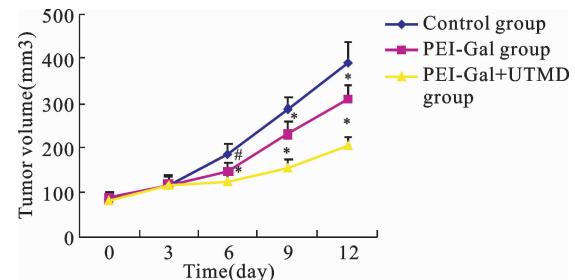
Figure 3 Apoptotic tumor cells in tumor tissue detected by Tunel



Representative expressions of bcl-2(4a, 4b and 4c) and caspase-3 (4d, 4e and 4f) protein were shown  
4a and 4d: control group; 4b and 4e: pCDNA-VP3/PEI-Gal group; 4c and 4f: pCDNA-VP3/PEI-Gal group + UTMD group

图 4 各组移植瘤组织 Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达

Figure 4 The expression of Bcl-2 and Caspase-3 protein in tumor tissue of three groups mice



Compared with the control group, \* :  $P < 0.01$ ; # :  $P < 0.05$

图 2 荷瘤鼠肿瘤生长曲线图

Figure 2 The line graph of tumor growth of mice

## 2.3 肿瘤组织 Tunel 检测结果

各组 AI 比较, 核棕黄色者为凋亡阳性细胞, 对照组有个别凋亡细胞, PEI-Gal 组、PEI-Gal + UTMD 组凋亡细胞增多, 后者显著, 见图 3。PEI-Gal + UTMD + pCDNA-VP3 组( $34.57 \pm 3.56$ )% 明显高于对照组( $1.16 \pm 1.45$ )% 和 PEI-Gal + pCDNA-VP3 组( $21.81 \pm 4.28$ )%, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

#### 2.4 免疫组织化学 Caspase-3、Bcl-2 的表达

Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白均在胞质中表达,以肿瘤细胞内出现明显的黄色或棕黄色颗粒为阳性表达,见图 4,PEI-Gal + UTMD + 质粒组肿瘤标本的 Bcl-2 蛋白阳性细胞表达明显较 PEI-Gal + 质粒组及对照组减弱[表达评分( $2.55 \pm 0.61$ ) vs. ( $3.71 \pm 0.82$ ) vs. ( $4.54 \pm 0.59$ ), $P$  均 $<0.01$ ],而 Caspase-3 蛋白阳性细胞表达均明显较 PEI-Gal + 质粒组及对照组增强[表达评分( $3.43 \pm 0.86$ ) vs. ( $2.61 \pm 0.76$ ) vs. ( $1.38 \pm 0.51$ ), $P$  均 $<0.01$ ]。

#### 2.5 组织学检查

HE 染色显示,对照组瘤细胞排列成团块状,细胞核大不规则,核质比例大核仁明显,可见较多核分裂相,PEGFP-N3 处理各组组瘤体完整无炎性细胞浸润,未见坏死及出血。PEI-Gal + UTMD + pCDNA-VP3 组肿瘤细胞体积变小,细胞核染色质浓缩,碎裂成片状,核分裂相少见。

### 3 讨论

将目的基因靶向性地高效导入到靶细胞内并发挥有效作用是肿瘤基因治疗的关键技术环节。非病毒载体因低毒、易组装、不会使宿主基因突变及无免疫原性等优点而被广泛研究,但转染率低缺乏靶向性限制了其应用。实验报道 UTMD 能有效增强体内和体外的基因传递效率,其作用机制仍未完全明确。但超声使携带基因的微泡破碎是其必不可少的条件。靶向性基因传递能提高转染率的同时减少不必要的并发症,避免一些潜在性的感染因素而引起广泛关注。肝细胞和肝癌细胞膜上具有高度特异性去唾液酸糖蛋白受体,能识别末端带有半乳糖残基的寡糖或寡糖蛋白并与之相结合,利用其介导可明显增强对肝的靶向性<sup>[8]</sup>。本研究通过凋亡素基因与半乳糖化的 PEI 及超声微泡耦联,并予以超声辐照转染小鼠肝癌移植瘤,以寻求体内靶向、安全和有效的基因治疗方式。

实验结果显示 UTMD 联合 PEI-Gal 能显著增强 pEGFP-N3 质粒对小鼠肝癌移植瘤的转染率,明显高于其他各组,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。PEI-Gal + 超声 + 质粒组转染率略高于 PEI-Gal + 质粒组但两者比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。本实验采用低强度超声,在适当条件下的单独或联合微泡的超声辐照均未观察到移植瘤及其周边组织有炎症、出血及坏死的改变。HE 染色电

子显微镜下观察组织无明显损伤。目前已有 UTMD 联合 PEI 促基因转染移植瘤的文献报道,Chumakova 等<sup>[9]</sup>将 PEI/DNA 与 PLGA 纳米微泡混合后经裸鼠尾静脉注射,同时给予前列腺癌移植瘤超声辐照,结果显示  $\beta$ -gal 基因转染率较无超声辐照的对照组提高 8 倍,并且无细胞死亡和组织损伤的表现。Chen 等<sup>[10]</sup>通过 UTMD 联合 PEI 靶向传递 survivin 基因于宫颈癌移植瘤模型,发现联合转染的方式使基因的表达为单独应用 PEI 的 10 倍和单独应用 UTMD 的 110 倍,联合应用 survivin 基因能够有效地诱导肿瘤细胞的凋亡并抑制肿瘤生长。研究认为超声能够在特定部位和时间发射超声使微泡破碎,对周围组织产生生物学效应,即使周围血管内皮细胞及组织细胞的间隙增宽,细胞膜通透性增加。微泡破裂产生的剪切力和压力梯度促使药物或基因进入靶细胞。而联合靶向性载体使基因更易附着于靶细胞使靶细胞膜上载基因量增加在微泡破碎的作用下进一步增强了基因的转染和表达。同时实验也显示仅超声作用转染率无明显改变,说明微泡破碎是联合提高转染率的关键。

PEI-Gal 联合 UTMD 转染凋亡素基因的抑瘤率均显著高于对照组和 PEI-Gal 组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。采用 Tunel 法评价肿瘤细胞的凋亡效应,与其他组相比 PEI-Gal + UTMD 组凋亡指数和凋亡细胞数目明显增多,表明 UTMD 联合 PEI-Gal 可通过提高 VP3 的转染和表达,使肿瘤凋亡增加,从而延缓肿瘤的生长,使肿瘤体积部分缩小,来发挥其抗肿瘤效应。Caspase-3 是半胱天冬酶下游的凋亡执行蛋白酶。Danen 等<sup>[11]</sup>发现凋亡素是直接激活 Caspase-3 来引发凋亡的。Bcl-2 是作用在 Caspase-3 上游的负调节因子。Bcl-2 蛋白可通过抑制线粒体膜的通透性和阻止细胞色素 C 的释放而发挥抑凋亡作用,在多数肿瘤细胞中过表达。朱惠明等<sup>[12]</sup>还发现凋亡素可通过下调细胞内 Bcl-2 家族蛋白中的 Mcl-1 蛋白而诱导凋亡。在本研究中,利用 UTMD 联合 PEI-Gal 转染凋亡素基因较对照组和 PEI-Gal 组 Bcl-2 蛋白表达显著下降,而 Caspase-3 蛋白表达明显增加,诱导了肿瘤组织凋亡,抑制细胞增殖。说明凋亡素可通过下调 Bcl-2 蛋白减少的表达来抑制肝癌细胞的增殖,同时有助于凋亡素的凋亡诱导作用。

非侵入性和靶向性的基因传递技术将利于临床基因治疗的应用。本研究显示作为一种非侵入方式

UTMD 联合 PEI-Gal 能够增强凋亡素基因对小鼠肝癌移植瘤的靶向性的传递和表达,通过诱导肿瘤细胞凋亡来抑制肿瘤的生长。并且通过静脉系统用药具有可操作性便于肿瘤的系统用药联合治疗。但实验也存在不足,如动物模型为皮下移植瘤,部分药物靶向肝脏,使得注射药物有效剂量增大定量计算不够精确。另外超声参数处理方式可能对转染有一定的影响,还需对超声参数及处理方式如注射时间间隔、DNA 用量等进行优化,为进一步提高转染率发挥抗肿瘤作用。

#### 参考文献:

- [1] Takahashi M, Kido K, Aoi A, et al. Spinal gene transfer using ultrasound and microbubbles[J]. *J Control Release*, 2007, 117 (2): 267-272.
- [2] Kodama T, Tan PH, Offiah I, et al. Delivery of oligodeoxynucleotides into human saphenous veins and the adjunct effect of ultrasound and microbubbles[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2005, 31(12): 1683-1691.
- [3] Xenariou U, Griesenbach U, Liang HD, et al. Use of ultrasound to enhance nonviral lung gene transfer in vivo [J]. *Gene Ther*, 2007, 14(9): 768-774.
- [4] Zhu HM, Cai XY, Huang X, et al. Apoptosis effect of gene therapy system on human hepatocarcinoma cells[J]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 2003, 42(9): 646-647. [朱惠明,蔡筱彦,黄勋,等.凋亡素基因治疗系统对人肝癌细胞的影响[J].中华内科杂志,2003,42(9):646-647.]
- [5] Liu Q, Fu H, Xing R, et al. Survivin knockdown combined with apotin overexpression inhibits cell growth significantly[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(7): 1053-1060.
- [6] Li X, Liu Y, Wen Z, et al. Potent anti-tumor effects of a dual specific oncolytic adenovirus expressing apotin in vitro and in vivo[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 9-10.
- [7] Pan Y, Fang L, Fan H, et al. Antitumor effects of a recombinant pseudotype baculovirus expressing Apotin in vitro and in vivo[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(11): 2741-2751.
- [8] Sagara K, Kim SW. A new synthesis of galactose-poly(ethylene glycol)-polyethylenimine for gene delivery to hepatocytes [J]. *J Control Release*, 2002, 79(1-3): 271-281.
- [9] Chumakova OV, Liopo AV, Andreev VG, et al. Composition of PLGA and PEI/DNA nanoparticles improves ultrasound-mediated gene delivery in solid tumors in vivo[J]. *Cancer Lett*, 2011 (2): 215-225.
- [10] Chen ZY, Liang K, Qiu RX. Targeted gene delivery in tumor xenografts by the combination of ultrasound-targeted microbubble destruction and polyethylenimine to inhibit survivin gene expression and induce apoptosis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29: 152.
- [11] Danen-van Oorschot AA, van Der Eb AJ, Noteborn MH. The chicken anemia virus-derived protein apotin requires activation of caspase for induction of apoptosis in human tumor cells [J]. *J Virology*, 2000, 74(15): 7072-7078.
- [12] Zhu HM, Li YP, Hou XH, et al. Variation and significance of Mcl-1 mRNA and protein concentration in the apoptosis of HepG2 cells induced by apotin[J]. *Zhongguo Bing Li Sheng Li Za Zhi*, 2009, 25(12): 2353-2356. [朱惠明,李银鹏,侯晓华,等.凋亡素诱导 HepG2 细胞凋亡过程中 Mcl-1 mRNA 和蛋白水平的变化及意义[J].中国病理生理杂志,2009, 25 (12): 2353-2356.]

[编辑:安 凤;校对:杨 卉]