

· 论 著 ·

溶瘤病毒 CNHK300-mIFN- γ 表达 mIFN- γ 及体外胃肠道肿瘤杀伤实验*彭林辉^{1,2}, 周杰², 霍枫¹, 詹世林¹, 张琪³, 苏长青⁴, 钱其军⁴, 石英^{1 Δ}

(1. 广州军区广州总医院肝胆外科, 广州 510010; 2. 南方医科大学南方医院肝胆外科, 广州 510515;

3. 中山大学第三附属医院肝脏病医院实验室, 广州 510630; 4. 第二军医大学东方肝胆外科医院

基因与病毒治疗实验室, 上海 200438)

摘要:目的 研究携带鼠干扰素- γ (mIFN- γ)基因的溶瘤病毒 CNHK300-mIFN- γ (简称 CNHK300-M γ)对胃肠道肿瘤细胞的体外杀伤作用和 mIFN- γ 的表达情况。方法 采用 CNHK300-M γ 、CNHK300、ONYX-015 和 AdEasy-mIFN- γ (简称 AdEasy-M γ)感染胃癌细胞株 SGC-7901、大肠癌细胞株 HT-29 和正常成纤维细胞株 MRC-5, 通过 TCID₅₀ 法、CPE 和四唑盐比色试验 (MTT) 检测 CNHK300-M γ 、CNHK300 和 ONYX-015 在上述肿瘤细胞和正常细胞中的增殖能力和杀伤作用, 通过酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 CNHK300-M γ 和 AdEasy-M γ 在上述肿瘤细胞和正常细胞中不同时相的 mIFN- γ 表达量。结果 CNHK300-M γ 具有类似于 CNHK300 的肿瘤细胞选择增殖性特性, 能在胃肠道肿瘤细胞中大量增殖并杀灭肿瘤细胞, 均强于 ONYX-015, 而在正常细胞中增殖和杀伤作用均较弱, 类似于 ONYX-015。CNHK300-M γ 感染胃肠道肿瘤细胞后有大量的 mIFN- γ 表达, 并随着感染时间延长表达量也相应上升, 而 AdEasy-M γ 感染后只有少量 mIFN- γ 的表达, 而且感染的时间延长表达量变化也不大。结论 CNHK300-M γ 能选择性增殖、杀灭肿瘤细胞, 同时大量表达具有抗肿瘤作用的治疗基因, 发挥多重抗癌作用, 有良好的临床应用前景。

关键词:溶瘤腺病毒; 端粒酶; 基因治疗; 肿瘤; 干扰素- γ

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.22.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)22-2233-04

Killing effect and mIFN- γ expression of the replicative oncolytic adenovirus**CNHK300-mIFN- γ on gastrointestinal malignant tumor in vitro***Peng Linhui^{1,2}, Zhou Jie², Huo Feng¹, Zhan Shilin¹, Zhang Qi³, Su Changqing⁴, Qian Qijun⁴, Shi Ying^{1 Δ}

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of the Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China;

2. Department of Hepatobiliary Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

3. Laboratory of Liver Disease Reseach, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;

4. Laboratory of Gene-Viral Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second

Military Medical University, Shanghai 200438, China)

Abstract: Objective To investigate the cytotoxicity and mouse IFN- γ (mIFN- γ) expression of oncolytic adenovirus CNHK300-mIFN- γ (CNHK300-M γ) containing mIFN- γ gene on gastrointestinal malignant tumor cell in vitro. **Methods** Human gastric carcinoma cell lines SGC-7901 and Human intestinal carcinoma cell lines HT29, and human normal fibroblastic cell line MRC-5 were cultured and added with CNHK300-M γ , CNHK300, ONYX-015 or AdEasy-mIFN- γ (AdEasy-M γ). TCID₅₀ assay was used to evaluate the replication ability of CNHK300-M γ , CNHK300 and ONYX-015 in carcinoma cell lines and normal cell line, and the cytotoxicity was evaluated by Cytopathic effect assay and MTT assay. The mIFN- γ expression in the supernatant was detected by ELISA after CNHK300-M γ or AdEasy-M γ infection in carcinoma cell lines and normal cell line. **Results** The tumor-specific replication ability and cytotoxicity of CNHK300-M γ was similar to that of CNHK300. The IC₅₀ was as low as MOI of 0.864 pfu/cell for the SGC-7901 cell, 0.086 pfu/cell for the HT-29 cell and was as high as MOI of 428.47 pfu/cell for the MRC-5 cell1, CNHK300-M γ was a more powerful killer of gastrointestinal malignant tumor cell than ONYX-015. ELISA showed that CNHK300-M γ expressed mIFN- γ efficiently in vitro and increased largely as the time prolong in SGC-7901 and HT-29 cells. The mIFN- γ expression of CNHK300-M γ was much higher than that of AdEasy-M γ in carcinoma cell lines, but was similar in normal cell line. **Conclusion** CNHK300-M γ can selectively replicate and effectively express mIFN- γ in carcinoma cells, and specifically kill tumor cells, holding a splendid future as a potential antitumor agent.

Key words: oncolytic adenovirus; telomerase; gene-therapy; carcinoma; interferon- γ

基因治疗和病毒治疗是近年来肿瘤治疗的研究热点。但是, 传统的基因治疗, 如常用的非增殖型腺病毒传输治疗基因

存在治疗基因表达率低、靶向性差^[1]; 病毒治疗单用时肿瘤的杀伤效率不够高, 如已进入临床的溶瘤病毒 ONYX-015 单独

应用治疗头颈部肿瘤有效率不到 10%^[2]。理论上,在溶瘤腺病毒中插入具有抗癌作用的基因,在病毒选择性感染、增殖时大量表达具有抗癌作用的细胞因子,是更有前景的抗癌新策略^[3]。CNHK300 病毒系统是本室构建的人端粒酶逆转录酶启动子(hTERT)调控的溶瘤病毒,体外实验和荷瘤动物实验均证明比 ONYX-015 有更强的抗肿瘤效果^[4]。为了进一步增强抗肿瘤效果,本研究将具有抗肿瘤作用的小鼠 γ -干扰素基因(mIFN- γ)插入 CNHK300,构建了基因病毒治疗系统 CNHK300-mIFN- γ (简称 CNHK300-M γ)^[5]。为了明确治疗基因插入是否影响溶瘤病毒的抗肿瘤作用和插入基因的表达情况,本究采用胃癌细胞株 SGC-7901、大肠癌细胞株 HT-29 和正常成纤维细胞株 MRC-5,以 CNHK300、ONYX-015 和 AdEasy-mIFN- γ (简称 AdEasy-M γ)作为对照,进行 CNHK300-M γ 抗肿瘤实验研究。

1 材料与与方法

1.1 材料 人胚胎肾 293 细胞株购自加拿大 Microbix Biosystems 公司。健康人成纤维细胞 MRC-5 和人大肠癌细胞 HT-29 购自美国 American Type Culture Collection(ATCC),人胃癌细胞株 SGC-7901 购自中国科学院上海细胞研究所。腺病毒 ONYX-015 由美国加州大学 Berk AJ 教授惠赠。重组腺病毒 CNHK300、CNHK300-M γ 和 AdEasy-M γ 由本实验室重组并保存。各细胞株培养液、培养血清及抗生素参照供应商推荐,在 37 °C、5%CO₂ 条件下培养,0.25%胰酶消化细胞、传代。

1.2 方法

1.2.1 病毒的扩增与纯化 腺病毒扩增采用 HEK293 细胞;病毒纯化采用常规氯化铯梯度离心纯化法;采用 Qbiogene 公司的 TCID₅₀ 法测定病毒滴度。

1.2.2 病毒增殖实验 分别收集上述肿瘤及正常细胞株,计数,按 5×10^6 /孔接种 6 孔板。24 h 后当肿瘤细胞达到对数生长期,正常细胞达到接触抑制,分别按 MOI = 5 感染 CNHK300-M γ 、CNHK300 和 ONYX-015。感染 2 h 后,将培养液替换成 5%血清培养液,放置在 37 °C 的 5%CO₂ 孵箱中培养。收集感染 0、48 h 细胞冻融液及上清,TCID₅₀ 法测定病毒滴度,以 0 h 病毒滴度为参照,算出病毒的增殖倍数。

1.2.3 细胞病理效应(CPE 实验, Cytopathic Effect) 将上述肿瘤及正常细胞按 5×10^4 个/孔的密度植入 24 孔板中,每孔加入 1 mL 的培养基。24 h 后对细胞换用无血清培养液,按 MOI=0、0.01、0.1、1、10、100 分别加入病毒 CNHK300-M γ 、CNHK300 和 ONYX-015,十字法摇匀,2 h 后换用 5%血清培养液,37 °C、5% CO₂ 孵箱培养 7 d,每日观察细胞的生长情况。7 d 后吸掉细胞培养液,每孔加入 500 μ L 结晶紫染色液(2%结晶紫溶于 20%甲醇),室温染色 15 min,在纯水中洗掉多余染液后拍照记录。

1.2.4 细胞杀伤实验 接种上述肿瘤及正常细胞至 96 孔细胞培养板(10⁴/孔),用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液在 5% CO₂ 条件下培养 24 h,按梯度 MOI 值感染细胞,分别加入病毒 CNHK300-M γ 、CNHK300 和 ONYX-015,7 d 后弃去病毒残液,四唑盐比色试验(MTT)检测 3 种病毒对各种细胞的杀伤作用。用酶联免疫检测仪在 570 nm 波长下测定光吸收值,参考波长为 650 nm。每个病毒 MOI 值做 8 个复孔,独立重复 3 次。MOI 为病毒数量与细胞数量之比。

1.2.5 双抗体夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 mIFN- γ 表达量 分别收集上述肿瘤及正常细胞株,计数,按 5×10^4 /孔接种于 24 孔板。24 h 后当肿瘤细胞达到对数生长期,正常细胞达到接触抑制,分别按 MOI = 1 感染 CNHK300-M γ 和 AdEasy-M γ (携带 mIFN- γ 的非增殖病毒)。感染 2 h 后,将培养液替换成 5%血清培养液,放置在 37 °C 的 5% CO₂ 孵箱中培养。收集感染 3、7 d 细胞培养上清液,用 ELISA 检测其中 mIFN- γ 的表达量。

1.3 统计学处理 统计学软件采用 Excel2003,所有定量实验均重复 3 次,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 CNHK300-M γ 和 CNHK300 病毒的扩增与纯化。 与野生型腺病毒比较,重组病毒 CNHK300 由 hTERT 调控 E1A 基因,而重组腺病毒 CNHK300-M γ ,在 hTERT 之前插入了 CMV 启动子调控 mIFN- γ 的基因表达盒。病毒在 293 细胞中反复扩增到需要量,纯化后进行滴度测定,CNHK300-M γ 和 CNHK300 滴度测定分别为 1.0×10^9 、 1.6×10^9 pfu/mL。

2.2 携带治疗基因的溶瘤腺病毒 CNHK300-M γ 选择性在胃肠道肿瘤细胞中增殖,在 SGC-7901、HT-29 和 MRC-5 中的增殖倍数分别为 32 536、25 150 和 50.2,如图 1 所示。在肿瘤细胞株和正常细胞株增殖差异比较中发现,SGC-7901/MRC-5 和 HT-29/MRC-5 在 CNHK300-M γ 分别为 648 和 501,在 CNHK300 分别为 450 和 280,在 ONYX-015 分别为 32 和 16。由此可见,与 CNHK300 相比,mIFN- γ 基因插入后,在各种细胞中的增殖能力均有所下降,但肿瘤细胞内的选择性增殖能力没有下降;与 ONYX-015 相比,CNHK300-M γ 显示出更为特异的肿瘤细胞内选择性增殖能力。

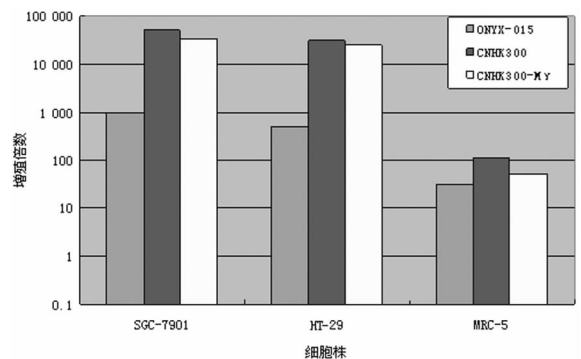


图 1 3 种病毒 48 h 增殖情况

2.3 CPE 实验 可以较为直观地看出 3 种病毒对胃肠道肿瘤细胞株和正常细胞株的杀伤能力。从图 2~4 中可以看出: CNHK300-M γ 对肿瘤细胞株的杀伤能力明显高于正常肝细胞株,在 MOI 值为 1 时均基本杀灭,而正常细胞株至 MOI 值为 100 时才有部分杀伤力。与 ONYX-015 相比,CNHK300-M γ 在肿瘤细胞株的杀伤能力明显增强而在正常细胞株中杀伤力进一步减弱。

2.4 MTT 试验 是一种检测细胞存活率、判定药物对细胞杀伤作用的通用方法。结果表明,CNHK300-M γ 、CNHK300 和 ONYX-015 均表现出了对胃肠道肿瘤细胞较强的杀伤力,CNHK300-M γ 对正常细胞株杀伤力最弱。对不同细胞的半杀伤剂量 IC₅₀ 的结果直观地表明 CNHK300-M γ 和 CNHK300 对肿瘤细胞的杀伤力与 ONYX-015 相比有明显提高。

CNHK300-M γ 虽然较 CNHK300 对肿瘤细胞的杀伤作用有所下降,但在正常细胞中下降更明显,在 MRC-5 细胞中,其 IC₅₀ 值是 CNHK300 的 8 倍以上(表 1)。

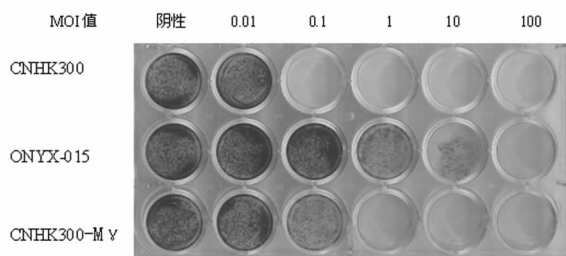


图 2 3 种病毒在 SGC-7901 细胞株中的 CPE 试验

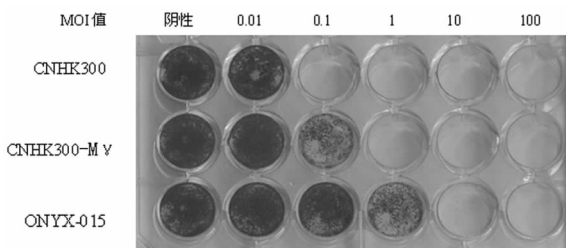


图 3 3 种病毒在 HT-29 细胞株中的 CPE 试验

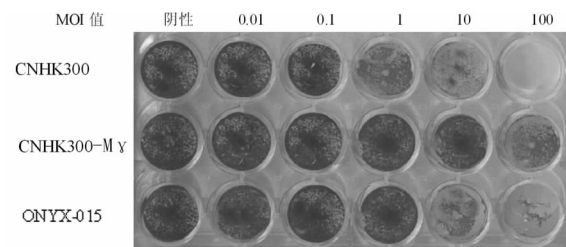


图 4 3 种病毒在 MRC-5 细胞株中的 CPE 试验

表 1 3 种病毒感染对不同细胞增殖的半抑制剂量 IC₅₀ (MOI) (pfu/cell)

病毒	HT-29	SGC-7901	MRC-5
CNHK300-M γ	0.086	0.864	428.47
CNHK300	0.043	0.052	50.00
ONYX-015	6.274	7.453	173.13

表 2 2 种病毒在不同细胞株上清液中 mIFN- γ 的表达量 (pg/mL)

细胞株	CNHK300-M γ		AdEasy-M γ	
	第 3 天	第 7 天	第 3 天	第 7 天
SGC-7901	57 537±18 431	254 981±8 726	242±48	246±13
TH-29	58 008±15 672	460 770±69 692	168±40	247±23
MRC-5	643±121	1 232±277	1 005±165	1 229±209

2.5 AdEasy-M γ 是携带 mIFN- γ 的非增殖型腺病毒,感染胃肠道肿瘤细胞后只有少量 mIFN- γ 的表达,感染时间延长,表达量变化不大;而 CNHK300-M γ 感染胃肠道肿瘤细胞后均有大量 mIFN- γ 的表达,感染的时间延长,表达量均成倍上升。SGC-7901 细胞株受 CNHK300-M γ 感染后 mIFN- γ 的表达量

是 AdEasy-M γ 的 238 倍(3 d 时)和 1 037 倍(7 d 时),HT-29 细胞株受 CNHK300-M γ 感染后 mIFN- γ 的表达量是 AdEasy-M γ 的 345 倍(3 d 时)和 1 865 倍(7 d 时)。对于正常细胞 MRC-5,2 种病毒感染后,mIFN- γ 的表达量相似,均不高,感染的时间延长变化也不大。上述结果提示利用增殖型腺病毒携带治疗基因能明显提高肿瘤局部治疗基因的表达。

3 讨论

20 世纪 90 年代初 Martuza 等^[6]应用基因工程的方法将病毒基因组进行改造,使病毒感染、复制及溶解细胞的能力在肿瘤细胞内得到有效增强,而对正常细胞影响大为减少,肿瘤病毒治疗逐渐成为研究的热点。这种经基因工程方法改造的病毒被称为复制选择性溶瘤病毒(replication-selective oncolytic virus),简称为溶瘤病毒,其相应的治疗理念被称为病毒治疗(virotherapy)^[7-8]。目前,改造腺病毒靶向机制主要有以下几个方面:(1)改造病毒表面的结合蛋白,与某些特定的肿瘤组织结合,从而使病毒只能感染特定的肿瘤组织。目前,研究主要集中于腺病毒外壳蛋白的改造,包括纤维蛋白(fiber)、五邻体(penton)及六邻体(hexon)蛋白^[9]。(2)根据肿瘤生物学行为上的一些异常表现,选择性地缺失病毒在正常细胞复制所必需而在肿瘤细胞中非必需的基因,如 ONYX-015 是 E1B-55 kD 缺失的腺病毒,它依据多数人类肿瘤细胞 p53 功能不良而正常细胞 p53 阳性的特点,可以特异地杀伤 p53 缺失或变异的肿瘤细胞。(3)在病毒增殖必须基因的上游插入肿瘤组织特异性启动子或增强子,从而使病毒只在特定的肿瘤细胞内增殖,而在其它细胞内处于失活状态,如甲胎蛋白(AFP)启动子^[10]、前列腺癌特异性抗原(PSA)启动子^[11]、缺氧启动子^[12]、端粒酶逆转录酶启动子(hTERT)等。其中 hTERT 是近年来的研究热点。在构成人端粒酶的 3 个亚单位中 hTERT 是决定其活性的主要因素^[13],在原发性肿瘤和肿瘤细胞中有高表达,而在正常细胞中不表达,并且 hTERT 的表达与端粒酶活性高度相关^[14]。hTERT 基因的启动子区域已经被克隆成功,是调控的是 hTERT 基因转录的主要部位^[15]。用 hTERT 启动子控制 E1A 表达而获得的增殖性腺病毒,具有选择性裂解端粒酶阳性肿瘤细胞的能力,而且杀伤能力与野生型腺病毒相当^[16],在本室构建的溶瘤病毒 CNHK300 中也观察到相似的结果^[4]。

为了优化溶瘤病毒的抗癌性,研究人员进一步将 CNHK300 携带上治疗基因,期望治疗基因在端粒酶阳性的肿瘤细胞中选择性地高表达,强化抗肿瘤效果。IFN- γ 是已证实有多重抗癌作用的细胞因子,其机理主要有^[17-18]:(1)影响细胞周期,诱导细胞凋亡,直接杀伤肿瘤细胞;(2)直接抑制肿瘤血管生成;(3)多重的免疫调节作用:调节 MHC I 和 MHC II 类分子在大多数免疫细胞(如单核巨噬细胞、内皮细胞、上皮细胞等)内的表达;诱导 Th2 向 Th1 分化,减少病毒抗体产生;增强肿瘤坏死因子的抑瘤作用;激活巨噬细胞及细胞毒细胞(CTL),增加淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)的抗肿瘤活性。虽然 IFN- γ 已应用到临床试验中^[19],但是不稳定、半衰期短、活性低,需要高剂量反复注射方能取得一定的疗效,不良反应较严重,费用高,因而应用明显受限。

在作者的前期研究中将腺病毒 E1A 基因置于 hTERT 启动子控制之下,并将含 mIFN- γ 的外源基因表达盒插入到腺病毒的基因组中,成功地构建一种新的基因-病毒治疗系统 CNHK300-M γ ^[5]。本研究发现,mIFN- γ 基因的插入虽然在各

种细胞株中的增殖能力和杀伤能力均有所降低,但正常细胞下降更明显,与 CNHK300 相比肿瘤细胞内选择性增殖能力和对肿瘤细胞的选择性杀伤能力均无下降,与 ONYX-015 相比,在肿瘤细胞中增殖能力和杀伤能力明显增强,而在正常细胞中的毒性进一步下降,可见 mIFN- γ 基因的插入没有改变溶瘤病毒自身特异性杀灭肿瘤细胞的能力。与 AdEasy-M γ 相比, CNHK300-M γ 在胃肠道肿瘤细胞中能随着病毒的增殖大量表达 mIFN- γ 并随时间相对延长,表达量成倍上升,能有效避免传统基因治疗中治疗基因表达率低的主要缺点。

胃肠道恶性肿瘤是十分常见的重大疾病,一经确诊绝大部分为中晚期,治疗非常棘手且预后不理想。国内外文献报道端粒酶阳性率在胃肠道肿瘤中为 85.0%~93.8%,端粒酶活性的表达和肿瘤浸润深度、淋巴结转移及 PTNM 分期显著相关^[20-24]。CNHK300-M γ 既有类似 CNHK300 的溶瘤病毒选择性杀伤端粒酶阳性的胃肠道肿瘤细胞的作用,同时也能随着病毒大量增殖高效表达 IFN- γ ,具备了基因治疗和病毒治疗的双重抗癌作用,进一步动物试验极可能显示比 CNHK300 更强的抗癌效果,拥有较高的胃肠道肿瘤治疗潜力。

参考文献:

- [1] Wu Q, Moyana T, Xiang J. Cancer gene therapy by adenovirus-mediated gene transfer[J]. *Curr Gene Ther*, 2001, 1(1):101-122.
- [2] Liu TC, Galanis E, Kirn D. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress[J]. *Nat Clin Pract Oncol*, 2007, 4(2):101-117.
- [3] Qian QJ, Jonathan S, Che XY, et al. Gene-vial vectors: a promising way to target tumor cells and express anticancer genes simultaneously[J]. *Chin Med J*, 2002, 115(8):1213-1217.
- [4] Su CQ, Sham J, Xue HB, et al. Potent antitumoral efficacy of a novel replicative adenovirus CNHK300 targeting telomerase-positive cancer cells[J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 2004, 130(10):591-603.
- [5] 彭林辉,张柏和,张琪,等.携带治疗基因的增殖型腺病毒 CNHK300-mIFN- γ 的构建[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(12):1483-1485.
- [6] Martuza RL, Malick A, Markert JM, et al. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant[J]. *Science*, 1991, 252:854-856.
- [7] Yamamoto M, Curiel DT. Current issues and future directions of oncolytic adenoviruses[J]. *Mol Ther*, 2010, 18(2):243-250.
- [8] Toth K, Dhar D, Wold WS. Oncolytic(replication-competent) adenoviruses as anticancer agents[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2010, 10(3):353-368.
- [9] Hernández-Alcoceba R. Recent advances in oncolytic virus design[J]. *Clin Transl Oncol*, 2011, 13(4):229-239.
- [10] 傅强,王慧萍,韦芳,等.一种更有效的肝癌靶向性条件复制型腺病毒的构建及体外抑瘤作用[J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9(10):1801-1804.
- [11] Small EJ, Carducci MA, Burke JM, et al. A phase I trial of intravenous CG7870, a replication-selective, prostate-specific antigen-targeted oncolytic adenovirus, for the treatment of hormone-refractory, metastatic prostate cancer [J]. *Mol Ther*, 2006, 14(1):107-117.
- [12] Zhang Q, Chen GH, Peng LH, et al. Increased safety with preserved antitumoral efficacy on hepatocellular carcinoma with dual-regulated oncolytic adenovirus [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(21):6523-6527.
- [13] 彭林辉,张柏和,吴孟超.端粒酶与肝癌[J]. *国外医学肿瘤学分册*, 2004, 31(2):138-141.
- [14] Poole J, Andrews L, Tollefsbol T. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT) [J]. *Gene*, 2001, 269(1-2):1-12.
- [15] Horikawa I, Cable PL, Afshari C, et al. Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene [J]. *Cancer Res*, 1999, 59:826-830.
- [16] Wirth T, Zender L, Schulte B, et al. A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(12):3181-3188.
- [17] 朱颖慧,朱兰才,刘然义,等.干扰素- γ 治疗肿瘤的研究进展[J]. *肿瘤学杂志*, 2008, 14(1):4-9.
- [18] 杨生海,殷宏,刘永生,等.干扰素- γ 研究进展[J]. *生物技术通报*, 2010, 26(8):29-34.
- [19] Schmidinger M, Steger GG, Wenzel C, et al. Sequential administration of interferon gamma and interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma: results of a phase II trial. Austrian Renal Cell Carcinoma Study Group [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2000, 49(7):395-400.
- [20] Park KH, Rha SY, Kim CH, et al. Telomerase activity and telomere lengths in various cell lines: changes of telomerase activity can be another method for chemosensitivity evaluation [J]. *Int J Oncol*, 1998, 13(3):489-495.
- [21] 杨仕明,房殿春,罗元辉,等.胃癌及癌前组织中端粒酶活性的检测及其临床意义[J]. *中华医学杂志*, 1988, 78(3):207-209.
- [22] 左明,吴俊辉,刘宝善,等.结直肠癌端粒酶活性检测及其对预后判断的意义[J]. *广东医学*, 2007, 28(8):1253-1254.
- [23] 刘亮,陈建,刘凤军.结肠癌中 hTERT 的表达及其与 Survivin 和 bcl-2 表达的关系[J]. *中国现代普通外科进展*, 2010, 13(3):173-176.
- [24] 王晓燕,陈萍,吴莺,等.端粒酶和端粒酶逆转录酶在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. *临床荟萃*, 2010, 25(4):299-301.