

胃肠道肿瘤研究中转基因载体的选择策略

刘卫仁, 于颖彦

刘卫仁, 于颖彦, 上海交通大学医学院附属瑞金医院 上海消化外科研究所 上海市 200025
国家自然科学基金资助项目, No. 30572127, No. 30770961
上海市浦江人才计划资助项目, No. PJ200700367
作者贡献分布: 论文撰写由刘卫仁完成; 论文审校由于颖彦完成.
通讯作者: 于颖彦, 200025, 上海市, 上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海消化外科研究所. yingyan3y@yahoo.com.cn
电话: 021-64370045 传真: 021-64373909
收稿日期: 2008-07-13 修回日期: 2008-08-08
接受日期: 2008-08-19 在线出版日期: 2008-09-18

Selection strategy of transgenic vectors in research of gastrointestinal tumors

Wei-Ren Liu, Ying-Yan Yu

Wei-Ren Liu, Ying-Yan Yu, Department of Surgery, Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Institute of Digestive Surgery, Shanghai 200025, China
Supported by: National Natural Science Foundation, No. 30572127, No. 30770961; and the Pujiang Talents' Project of Shanghai Municipality, No. PJ200700367
Correspondence to: Ying-Yan Yu, Department of Surgery, Ruijin Hospital Affiliated Hospital of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Institute of Digestive Surgery, Shanghai 200025, China. yingyan3y@yahoo.com.cn
Received: 2008-07-13 Revised: 2008-08-08
Accepted: 2008-08-19 Published online: 2008-09-18

Abstract

Along with the development of life science, the use of transgenic vectors is becoming more and more popular. Besides cloning and expressing target genes, this technology plays an important role in gene diagnosis, gene therapy and new drug development. In this article, we give an overview of transgenic vectors on their classification, characteristics, advantages, disadvantages and applications in the research of gastrointestinal tumors.

Key Words: Vector; Gene engineering; Gastrointestinal tumor

Liu WR, Yu YY. Selection strategy of transgenic vectors in research of gastrointestinal tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(26): 2969-2973

摘要

随着生命科学的发展, 转基因载体技术的应用

越加普遍. 近几年来, 除了克隆和表达目的基因以外, 转基因载体还在基因诊断, 基因治疗以及新药开发等方面发挥着重要作用. 本文试图从转基因载体的分类、特点、各自优缺点、适用范围以及在胃肠道肿瘤研究中的应用进展作一综述.

关键词: 载体; 基因工程; 胃肠道肿瘤

刘卫仁, 于颖彦. 胃肠道肿瘤研究中转基因载体的选择策略. 世界华人消化杂志 2008; 16(26): 2969-2973
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2969.asp>

0 引言

基因工程技术自20世纪70年代诞生以来发展十分迅速. 其中载体是基因技术的核心, 是基因转导的重要工具. 没有合适的载体, 外源基因难进入受体细胞中, 即使能够进入, 也无法进行复制和表达. 有了合适的载体, 通过体外DNA重组方式, 可以把目的基因和载体相连, 通过多种手段转入到适当的细胞中, 再进行无性繁殖, 从而获得大量的基因片段和蛋白质产物. 目前市售转基因载体的种类繁多, 不同实验室从事转基因研究所用载体各不相同. 如何比对不同实验室的实验结果, 在分子医学研究中如何选择适合自身研究的载体, 成为摆在众多研究人员面前的现实问题. 本文就转基因载体的分类、用途、各自特性以及在胃肠道肿瘤研究中的应用现状进行综述.

1 转基因载体的分类与用途

转基因载体按功能分为基因克隆载体(gene cloning vector)和基因表达载体(gene expressing vector). 基因克隆载体的用途是将感兴趣的外源DNA与载体基因进行末端连接, 借助于载体内的酶和dNTP等来扩增更大量的目的基因以满足实验需求. 基因表达载体的用途是将感兴趣的外源DNA与载体基因连接后转导入一定的宿主细胞, 利用宿主细胞的基因表达系统使外源性目的基因表达mRNA与蛋白质.

1.1 基因克隆载体 质粒(plasmid): 是存在与于细

■背景资料

胃肠道肿瘤在人群中发病率较高, 转基因技术为胃肠道肿瘤基础研究中的重要技术之一. 但如何选择合适的载体, 成为众多研究人员的现实问题.

■同行评议者

邵升, 副教授, 哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

■研发前沿

转基因载体从适用范围分克隆载体和表达载体两大类。利用载体来克隆目的基因或表达目的蛋白是实验顺利进行的重要保障。

菌染色体外能独立复制的双链闭环DNA分子,是细菌的辅助遗传单位。根据在一个细胞周期内质粒产生的拷贝数量又分为严谨型(低拷贝,复制1-2次)和松弛型(高拷贝,复制10-200次)。pBR322质粒是最早被当作转基因载体的质粒,他含有几个单一的限制性酶切位点以及2个可用于筛选的抗药基因,分别是氨苄青霉素耐药基因(ampr)和四环素耐药基因(tetr)。pBR322能独立于宿主染色体外自我复制^[1-3]。pUC、pGEM以及pGEX系列质粒均是在pBR322基础上的改良质粒,比如pUC具有来自pBR322质粒的复制起点, DNA序列产生变化的氨苄青霉素抗性基因,大肠杆菌(*E.coli*) β -半乳糖酶基因(lacZ)启动子,但其限制性酶切位点多于pBR322。而pGEM质粒则是在pUC基础上增加了两个来自噬菌体的启动子,即T7启动子和SP6启动子,为RNA聚合酶的附着提供特异性的识别位点。目前市售的PCR克隆载体pGEM-T或pUC-T的基本骨架同上,只是在线性化的载体5'端有一突出的碱基-T,使载体与PCR之间产生了小的互补黏端,用于PCR产物的克隆。上述基因克隆载体主要用于体外扩增目的基因、PCR产物纯化以及体外突变研究^[4-7]。

噬菌体类(Phage):噬菌体是细菌、真菌、放线菌或螺旋体等微生物的病毒。作为载体使用的噬菌体主要有 λ 噬菌体、黏粒、M13噬菌体等。 λ 噬菌体又分2种:一种是插入型,只具有一个可供外源DNA插入的克隆位点;另一种是置换型,具有成对的克隆位点,两个位点之间的DNA区段可以被外源插入的DNA所取代^[5]。 λ 噬菌体作为载体适用于20 kb以内较大基因组DNA的克隆、构建cDNA文库或基因组DNA文库^[8-9]。黏粒是一种用基因工程技术构建的*E.coli*质粒,它具有 λ 噬菌体的粘性末端位点和pBR322的DNA顺序,可容纳35-45 kb的外源DNA,有抗性标志及多种限制性酶切位点,他以感染方式进入宿主菌后,在宿主体内以质粒形式复制从而克服了大质粒转化困难的缺点,适用于基因组文库构建^[10-11]。M13是一种细线状单链DNA噬菌体,适用于制备已克隆于其他载体中的单链DNA序列^[12-14]。其缺点是插入片段不稳定,多次传代后可能丢失。

1.2 基因表达载体 基因表达载体带有调控基因表达所需要的转录和翻译信号,可以使插入的目的基因转录并翻译成具有生物学活性的蛋白质,因而适用于研究基因功能。根据基因表达载体所转染宿主的不同又分为原核表达载体与真核表达载体。

■相关报道

大量的研究表明,通过载体介导基因转染,能够有效的在体外实验和体内试验中研究基因功能,研发基因疫苗和开展基因治疗。

原核表达载体(prokaryotic expression vector):是一种除了具备载体的基本元件外还含有原核基因转录启动子、终止子和调节元件的载体;而*E.coli*是当前采用最多的原核表达宿主。*E.coli*具有培养简便、经济而又适合大规模生产的优点;缺点是*E.coli*缺乏转录后加工机制,其表达产物无翻译后修饰过程,故只能表达克隆的cDNA片段,不适用于真核基因组DNA的表达^[15-17]。另外,*E.coli*表达的蛋白质常常形成不溶性的包涵体,难以表达大量的可溶性蛋白质。pET是能够在*E.coli*克隆和表达的一种载体, pET载体也是以pBR322为基本骨架,但彼此间的先导序列、表达信号、融合标签、限制性酶切位点等有所不同。pET载体还可进一步分为转录载体和翻译载体。转录载体只转录目标RNA但不提供翻译信号,然后利用细菌自身翻译信号表达目的蛋白。翻译载体本身则含有用于蛋白表达的有效翻译起始信号^[18-19]。T7噬菌体具有一套专一性非常强的T7转录表达体系。T7 RNA聚合酶是一种高活性的RNA聚合酶,其合成mRNA的速度比*E.coli* RNA聚合酶快5倍左右,并可以转录某些不能被*E.coli* RNA聚合酶有效转录的序列。故当T7 RNA聚合酶和T7噬菌体启动子存在下,*E.coli*宿主本身基因转录都竞争不过T7噬菌体转录表达体系,使受T7噬菌体启动子调控的基因能高水平得到转录^[20-22]。医学研究中一般根据目的蛋白质的大小、蛋白质的需要量以及是否需要保留活性来选择原核表达载体系统。小的蛋白可选择以融合蛋白的形式在*E.coli*中表达;若用于产生抗体研究,则需选择便于靶蛋白纯化的表达系统;若表达蛋白用于结构研究,最好选择以可溶性蛋白形式表达的载体。

真核表达载体(eukaryotic expression vector):即可以在酵母、昆虫以及哺乳类动物细胞等宿主内进行外源基因表达的载体。其中pcDNA3、pLNCX、pCMV、pEGFP、pSG5与pSV2是常用的哺乳类动物细胞表达载体系统^[23-24]。pEGFP带有荧光蛋白基因,有利于确定外源基因在细胞内的表达和/或组织中的定位^[25-26]。酵母是最简单的单细胞真核生物。常用的酵母真核表达载体有pB42AD与pEG202。酵母载体可容纳300-1000 kb以上的外源DNA片段,既可表达克隆的cDNA,又可表达真核基因组DNA,表达的蛋白质可以被修饰^[27-28]。杆状病毒载体是昆虫细胞表达载体,与其他表达载体相比,杆状病毒载体系统允许插入较大的目的基因,并能高水平

表 1 分子医学研究中常用的病毒载体比较

病毒载体名称	外源基因容量(kb)	重组病毒滴度	外源基因整合与表达	基因转染效率
逆转录病毒载体	<9	中	随机整合分裂期细胞, 短暂或稳定表达	高
腺病毒载体	2-7	高	不整合, 表达短暂	高
腺相关病毒载体	<3.5	较低	整合率低, 表达稳定	高
慢病毒载体	<6	高	随机整合分裂期与非分裂期细胞, 稳定表达	高

■创新盘点

本文从载体的特点、分类、用途、各自特征以及在胃肠道肿瘤的应用出发, 为科研人员提供了借鉴, 同时也为转基因技术应用于临床指明了方向。

表达目的基因。昆虫细胞表达载体系统的缺点是, 当昆虫细胞感染重组病毒载体后4-5 d会裂解死亡, 因此不适合连续表达重组蛋白^[29-30]。昆虫细胞表达载体系统是指以病毒为基础的基因载体。构建病毒载体系统时需要病毒基因组进行操作和改造, 使他能携带外源基因和相关基因元件, 并被包装成病毒颗粒。以基因治疗和疫苗制备为目的实验研究需要病毒载体系统, 除了要求病毒载体能携带外源基因并能包装成病毒颗粒外, 还必须对宿主不致病, 并且在环境中不引起增殖和传播。常用的病毒载体有逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体与慢病毒载体等(表1)。逆转录病毒载体系统包括两部分: 一是用外源基因替换病毒结构基因的逆转录病毒载体; 一是基因组DNA中整合了逆转录病毒结构基因的包装细胞。该系统可产生具有感染力的假型病毒颗粒, 用含有假病毒颗粒的包装细胞培养上清感染靶细胞, 实现目的基因与靶细胞染色体DNA的整合, 来达到基因治疗目的^[31-32]。逆转录病毒载体系统具有基因转染效率高、基因表达持久而稳定、适用于大片段目的基因转染的优点。腺病毒是一种双链、无包膜DNA病毒, 其基因组双链DNA长约36 kb。现已发现6组100多个亚型腺病毒, 其中能感染人类细胞的腺病毒有50多种。当前, 人类基因治疗研究多选用2型和5型腺病毒作载体。腺病毒本身基本不致病, 可以感染人体多种细胞但不整合基因组。因此, 腺病毒载体具有安全、宿主范围广、载体性质稳定等优点。但由于腺病毒载体感染宿主细胞范围较广, 在感染靶细胞的同时可造成非靶细胞的感染, 故其靶向性相对较差。另外, 腺病毒感染后可很快被机体的单核巨噬细胞系统吞噬, 可导致其基因治疗持续时间较短, 还可能诱导宿主产生中和抗体等不足^[33-36]。腺相关病毒除了具备腺病毒载体系统的优点外, 还具有耐热、耐酸碱(pH3.0-9.0)以及耐有机溶剂处理等特点^[37-38]。慢病毒载体(lentiviral vector)是最近几年发展起来的新型载体, 该系统是在

HIV-1病毒改造基础上而成。慢病毒载体基因组是正链RNA, 其基因组进入细胞后, 在细胞浆中被其自身携带的反转录酶反转成DNA, 形成DNA整合前复合体, 进入细胞核后, DNA整合到细胞基因组中。整合后的DNA转录mRNA, 回到细胞浆中, 表达目的蛋白。由于慢病毒载体将目的基因整合到宿主细胞基因组中, 并随细胞基因组的分裂而分裂, 故慢病毒载体介导的基因表达持续且稳定^[39-40]。

2 转基因载体在胃肠道肿瘤研究中的应用

转基因载体技术发展的重要贡献之一是促进了肿瘤疫苗的研发。比如, 通过基因重组的方法从病原体基因中删除致病基因, 获得基因有缺失的病原体疫苗; 或者将病原体的保护性基因克隆到载体内制备基因工程活疫苗; 再通过向动物体内导入克隆基因从而激发免疫反应达到免疫目的。核酸疫苗是将编码保护性抗原的基因克隆到真核表达载体上, 然后将重组质粒导入机体, 使其被人体细胞摄取并表达抗原蛋白从而激活免疫系统。美国MD Anderson最近利用基因工程技术开发了一种靶向胃泌素的mAb G17DT, 并用于已发生转移的或无法切除的晚期胃癌治疗研究。研究显示, G17DT联合顺铂、5-FU治疗进展期胃癌可使患者生存时间明显延长^[41]。Kosoy *et al*利用转入癌相关抗原肽段激活免疫系统达到预防二甲基苄胺诱发C3H/He小鼠肿瘤发生的目的^[42-44]。胃肠道肿瘤的基因治疗是相对于传统的肿瘤化疗或放疗的全新概念。基因治疗是指将遗传物质通过基因工程技术转移到活体细胞内而达到治疗效果。基因治疗常用的载体多为病毒载体, 以逆转录病毒载体最常用。针对晚期胃癌术后复发和转移这一棘手问题, 上海交通大学医学院与附属瑞金医院联手开发了白介素2(IL-2)基因修饰人胃癌细胞瘤苗(HG-1/IL-2)。该瘤苗主要制备方法是以逆转录病毒载体将人IL-2cDNA转导入HLA-A2阳性的人胃癌细胞株MKN-45, 经⁶⁰Co照射灭活后, 制

应用要点

选择合适的载体, 为胃肠道肿瘤相关基因功能研究, 基因诊断, 基因治疗等提供指南.

备成HG-1/IL-2. 通过对15例胃癌术后复发/转移患者的临床实验性治疗显示, 大多数患者对IL-2基因修饰胃癌细胞瘤苗治疗耐受性好, 部分患者体液和细胞免疫指标得到明显改善. 该基因治疗可作为辅助治疗手段应用于胃癌术后复发转移的病例^[45].

干扰原癌基因功能以及体外表达抑癌基因研究已成为肿瘤相关基因功能验证的重要手段. 在这些基因功能研究中转基因载体已成为不可或缺的实验技术. 如Kanai *et al*通过转基因技术对胃癌研究发现, 人类胃癌组织中KLF4抑癌基因表达丢失伴随有Sp1转录因子的表达增高. 胃癌细胞体外过表达KLF4基因可以明显抑制Sp1基因表达, 从而达到抑制胃癌内新生血管形成、阻遏胃癌进展的目的^[46-48]. Song *et al*^[49]通过pLNCX质粒载体转入K-ras反义寡核苷酸达到体外抑制胃癌生长作用.

3 结论

转基因载体的选择、构建与转染等技术是基因工程的主要手段, 些技术在疾病的预防、诊断与治疗研究中具有广阔应用前景. 但截止到目前为止, 转基因载体对于宿主的安全性以及免疫源性等诸多问题尚未解决; 转基因载体的基因转染效率尚有待改善. 但随着分子医学的不断发展、转基因载体构建技术的不断进步, 该领域将有更加广阔的发展空间.

4 参考文献

- Balbás P, Bolívar F. Back to basics: pBR322 and protein expression systems in *E. coli*. *Methods Mol Biol* 2004; 267: 77-90
- Covarrubias L, Cervantes L, Covarrubias A, Soberón X, Vichido I, Blanco A, Kupersztosch-Portnoy YM, Bolívar F. Construction and characterization of new cloning vehicles. V. Mobilization and coding properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 and pBR328. *Gene* 1981; 13: 25-35
- Górska I, Nieradko J, Hartmann M. Expression of the replication region of phage lambda DNA cloned into pBR322 in *E. coli* minicells. *Acta Biochim Pol* 1982; 29: 227-233
- Kim SY, Nishioka M, Hayashi S, Honda H, Kobayashi T, Taya M. The gene *yggE* functions in restoring physiological defects of *Escherichia coli* cultivated under oxidative stress conditions. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 2762-2765
- Gruber DF, Pieribone VA, Porton B, Kao HT. Strict regulation of gene expression from a high-copy plasmid utilizing a dual vector system. *Protein Expr Purif* 2008; 60: 53-57
- Fendri A, Frikha F, Miled N, Gargouri Y. Cloning and molecular modelling of turkey pancreatic lipase: structural explanation of the increased interaction power with lipidic interface. *Biochimie* 2006; 88: 1401-1407
- Harper S, Speicher DW. Expression and purification of GST fusion proteins. *Curr Protoc Protein Sci* 2008; Chapter 6: Unit 6.6
- Muecke M, Samuels M, Davey M, Jeruzalmi D. Preparation of multimilligram quantities of large, linear DNA molecules for structural studies. *Structure* 2008; 16: 837-841
- Zhang Z, Shen C, Wang M, Han H, Cao X. Aqueous suspension of carbon nanotubes enhances the specificity of long PCR. *Biotechniques* 2008; 44: 537-538, 540, 542, passim
- Weis JH. Amplification of cosmid and plasmid libraries. *Curr Protoc Mol Biol* 2001; Chapter 5: Unit5.11
- Kuk S, Erensoy A. [Gene cloning, selection of plasmids and application of *Fasciola hepatica* cathepsin L1 gene] *Turkiye Parazitoloj Derg* 2008; 32: 16-22
- Khalil AS, Ferrer JM, Brau RR, Kottmann ST, Noren CJ, Lang MJ, Belcher AM. Single M13 bacteriophage tethering and stretching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 4892-4897
- Thomason L, Court DL, Bubunencko M, Costantino N, Wilson H, Datta S, Oppenheim A. Recombineering: genetic engineering in bacteria using homologous recombination. *Curr Protoc Mol Biol* 2007; Chapter 1: Unit 1.16
- Chung YS, Sabel K, Krönke M, Klimka A. Gene transfer of Hodgkin cell lines via multivalent anti-CD30 scFv displaying bacteriophage. *BMC Mol Biol* 2008; 9: 37
- Dobrovetsky E, Lu ML, Andorn-Broza R, Khutoreskaya G, Bray JE, Savchenko A, Arrowsmith CH, Edwards AM, Koth CM. High-throughput production of prokaryotic membrane proteins. *J Struct Funct Genomics* 2005; 6: 33-50
- Koschorreck M, Fischer M, Barth S, Pleiss J. How to find soluble proteins: a comprehensive analysis of alpha/beta hydrolases for recombinant expression in *E. coli*. *BMC Genomics* 2005; 6: 49
- Shen L, Xing L, Yang Y, Gao Q. Sequence analysis of functional Apisimin-2 cDNA from royal jelly of Chinese honeybee and its expression in *Escherichia coli*. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16 Suppl 1: 222-226
- Wang X, Fu M, Ren J, Qu X. Evaluation of different culture conditions for high-level soluble expression of human cyclin A2 with pET vector in BL21 (DE3) and spectroscopic characterization of its inclusion body structure. *Protein Expr Purif* 2007; 56: 27-34
- Li Q, Chen R, Li W, Qiao CL, Wu YJ. A genetically engineered *Escherichia coli*, expressing the fusion protein of green fluorescent protein and carboxylesterase B1, can be easily detected in the environment following degradation of pesticide residues. *Biotechnol Lett* 2007; 29: 1357-1362
- Elroy-Stein O, Moss B. Gene expression using the vaccinia virus/ T7 RNA polymerase hybrid system. *Curr Protoc Protein Sci* 2001; Chapter 5: Unit5.15
- Mamane H, Shemer H, Linden KG. Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis* spores, and MS2, T4, and T7 phage using UV/H₂O₂ advanced oxidation. *J Hazard Mater* 2007; 146: 479-486
- Johnson DE, Takahashi M, Hamdan SM, Lee SJ, Richardson CC. Exchange of DNA polymerases at the replication fork of bacteriophage T7. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A* 2007; 104: 5312-5317
- 23 Xiang RL, Zhou F, Yang Y, Peng JP. Construction of the plasmid pCMV4-rZPC' DNA vaccine and analysis of its contraceptive potential. *Biol Reprod* 2003; 68: 1518-1524
 - 24 Spatz K, Köhn H, Redenbach M. Characterization of the *Streptomyces violaceoruber* SANK95570 plasmids pSV1 and pSV2. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 213: 87-92
 - 25 Han JY, Choi DS, Kim C, Joo H, Min CK. Selective gene transfer to endometrial cancer cells by a polymer against matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). *Cancer Biother Radiopharm* 2008; 23: 247-258
 - 26 Dai LC, Xu DY, Yao X, Min LS, Zhao N, Xu BY, Xu ZP, Lu YL. Construction of a fusion protein expression vector MK-EGFP and its subcellular localization in different carcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7649-7653
 - 27 Watson MA, Buckholz R, Weiner MP. Vectors encoding alternative antibiotic resistance for use in the yeast two-hybrid system. *Biotechniques* 1996; 21: 255-259
 - 28 Frazer LN, O'Keefe RT. A new series of yeast shuttle vectors for the recovery and identification of multiple plasmids from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2007; 24: 777-789
 - 29 Mäkelä AR, Tuusa JE, Volkman LE, Oker-Blom C. Occlusion-derived baculovirus: interaction with human cells and evaluation of the envelope protein P74 as a surface display platform. *J Biotechnol* 2008; 135: 145-156
 - 30 Lesch HP, Turpeinen S, Niskanen EA, Mähönen AJ, Airenne KJ, Ylä-Herttua S. Generation of lentivirus vectors using recombinant baculoviruses. *Gene Ther* 2008 May 8. [Epub ahead of print]
 - 31 Katzourakis A, Pereira V, Tristem M. Effects of recombination rate on human endogenous retrovirus fixation and persistence. *J Virol* 2007; 81: 10712-10717
 - 32 Hong Y, Yu SS, Yoon NK, Kang SJ, Lee JT, Kim S, Kim JM, Lee K, Jang JW, Kim S. Development of an in vitro cell culture assay system for measuring the activation of a neighbouring gene by the retroviral vector. *J Gene Med* 2008; 10: 847-854
 - 33 Renaut L, Colin M, Leite JP, Benko M, D'Halluin JC. Abolition of hCAR-dependent cell tropism using fiber knobs of Adenovirus serotypes. *Virology* 2004; 321: 189-204
 - 34 Ogawara K, Rots MG, Kok RJ, Moorlag HE, Van Loenen AM, Meijer DK, Haisma HJ, Molema G. A novel strategy to modify adenovirus tropism and enhance transgene delivery to activated vascular endothelial cells in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 2004; 15: 433-443
 - 35 Koizumi N, Mizuguchi H, Sakurai F, Yamaguchi T, Watanabe Y, Hayakawa T. Reduction of natural adenovirus tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and alphav integrin-binding ablation. *J Virol* 2003; 77: 13062-13072
 - 36 Jang JH, Lim KI, Schaffer DV. Library selection and directed evolution approaches to engineering targeted viral vectors. *Biotechnol Bioeng* 2007; 98: 515-524
 - 37 Negrete A, Kotin RM. Production of recombinant adeno-associated vectors using two bioreactor configurations at different scales. *J Virol Methods* 2007; 145: 155-161
 - 38 Silver JN, Flotte TR. Towards a rAAV-based gene therapy for ADA-SCID: from ADA deficiency to current and future treatment strategies. *Pharmacogenomics* 2008; 9: 947-968
 - 39 Joo KI, Wang P. Visualization of targeted transduction by engineered lentiviral vectors. *Gene Ther* 2008 May 15. [Epub ahead of print]
 - 40 Miyazaki M, Sugiyama O, Zou J, Yoon SH, Wei F, Morishita Y, Sintuu C, Virk MS, Lieberman JR, Wang JC. Comparison of lentiviral and adenoviral gene therapy for spinal fusion in rats. *Spine* 2008; 33: 1410-1417
 - 41 Ajani JA, Randolph Hecht J, Ho L, Baker J, Oortgiesen M, Eduljee A, Michaeli D. An open-label, multinational, multicenter study of G17DT vaccination combined with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with untreated, advanced gastric or gastroesophageal cancer: the GC4 study. *Cancer* 2006; 106: 1908-1916
 - 42 Kossoy G, Ben-Hur H, Elhayany A, Schneider DF, Kossoy N, Zusman I. Preventive effect of the soluble tumor-associated antigens on DMBA induced tumorigenesis in C3H/He mice. *Oncol Rep* 2005; 14: 1625-1629
 - 43 Kossoy G, Ben-Hur H, Elhayany A, Schneider DF, Zusman I. Rat soluble tumor-associated antigens inhibit chemically-induced mammary tumorigenesis in syngeneic rats. *Oncol Rep* 2005; 13: 585-588
 - 44 Kossoy G, Avinoach I, Zusman I, Scheider DP, Ben-Hur H, Elhayany A. Human soluble p66 and p51 tumor-associated antigens promote the suppression of rat mammary tumors in comparison to commercial human albumin. *Oncol Rep* 2004; 11: 487-491
 - 45 张俊, 朱正纲, 程枫, 尹浩然, 王秀玲, 叶正宝, 燕敏, 刘炳亚, 钱关祥, 陈诗书, 林言箴. HG-1/IL-2基因修饰瘤苗治疗晚期胃癌的初步临床研究(附8例报告). *外科理论与实践* 2002; 7: 201-204
 - 46 Kanai M, Wei D, Li Q, Jia Z, Ajani J, Le X, Yao J, Xie K. Loss of Krüppel-like factor 4 expression contributes to Sp1 overexpression and human gastric cancer development and progression. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6395-6402
 - 47 Wei D, Kanai M, Jia Z, Le X, Xie K. Kruppel-like factor 4 induces p27Kip1 expression in and suppresses the growth and metastasis of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 4631-4639
 - 48 Wei D, Gong W, Kanai M, Schlunk C, Wang L, Yao JC, Wu TT, Huang S, Xie K. Drastic down-regulation of Krüppel-like factor 4 expression is critical in human gastric cancer development and progression. *Cancer Res* 2005; 65: 2746-2754
 - 49 Song JJ, Lee H, Kim E, Kim YS, Yoo NC, Roh JK, Kim BS, Kim J. Transduction effect of antisense K-ras on malignant phenotypes in gastric cancer cells. *Cancer Lett* 2000; 157: 1-7

同行评价

本文内容全面, 语言流畅, 参考价值较好, 但新颖性一般。

编辑 李军亮 电编 何基才