

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.11.013

· 基础研究 ·

双特异性溶瘤腺病毒和多柔比星对乳腺癌细胞增殖抑制作用的对比分析

李善智^{1,2}, 陈爽^{2,3}, 赵津², 李一权², 朱羿龙^{2,5}, 李文杰^{2,4}, 尹逊哲^{2,5}, 崔英丽², 王京², 刘行², 李霄^{2,Δ}, 金宁一²(1. 吉林农业大学 动物科学技术学院, 吉林 长春 130118; 2. 军事科学院军事兽医研究所 分子病毒学与免疫学实验室, 吉林 长春 130122; 3. 吉林医药学院 检验学院, 吉林 吉林 132013; 4. 广西大学 动物科学技术学院, 广西南宁 530005; 5. 长春中医药大学 药学院, 吉林 长春 130117)

[摘要] **目的:**探讨多柔比星和双特异性溶瘤腺病毒(Ad-VT、Ad-T、Ad-VP3、Ad-Mock)对乳腺癌细胞和正常乳腺细胞增殖抑制作用的差异。**方法:**通过WST-1实验比较多柔比星和Ad-VT、Ad-T、Ad-VP3、Ad-Mock对乳腺癌细胞增殖的抑制率,并比较两种药物对正常乳腺上皮细胞的存活率的影响。通过Annexin V流式术、Hoechst法、JC-1法检测研究溶瘤腺病毒和多柔比星对乳腺癌细胞和正常乳腺上皮细胞杀伤作用的影响,并比较其凋亡率差异。**结果:**4种双特异性溶瘤腺病毒均能有效地抑制乳腺癌细胞的增殖($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且抑制效果为Ad-VT>Ad-T>Ad-VP3>Ad-MOCK,抑制作用与时间成正相关。多柔比星也能有效地抑制乳腺癌细胞的增殖($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且随着浓度和时间的增加,抑制效果明显增强;但多柔比星对正常的乳腺上皮细胞也有较强的抑制作用,在72 h、5 μg/ml条件下抑制率达到80%,而溶瘤腺病毒Ad-VT在72 h对MCF-10A的抑制率为20%。双特异性溶瘤腺病毒诱导乳腺癌凋亡能力随时间的增加逐渐增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且致凋亡效率为Ad-VT>Ad-T>Ad-VP3>Ad-MOCK,而诱导正常乳腺细胞凋亡能力较弱。多柔比星诱导乳腺癌细胞和正常乳腺上皮细胞凋亡的能力基本相同($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且都为0.05<0.5<5 μg/ml。**结论:**双特异性溶瘤腺病毒能有效地抑制乳腺癌细胞的增殖,但对正常的乳腺细胞抑制作用较小,双特异性溶瘤腺病毒具有更好的安全性,为肿瘤的生物治疗提供了新的药物。

[关键词] 乳腺癌细胞;溶瘤腺病毒;多柔比星;凋亡

[中图分类号] R737.9; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)11-1159-07

Comparative study on the inhibitory effect of dual specific oncolytic adenovirus and doxorubicin on breast cancer cells

LI Shanzhi^{1,2}, CHEN Shuang^{2,3}, ZHAO Jin², LI Yiquan², ZHU Yilong^{2,5}, LI Wenjie^{2,4}, YIN Xunzhe^{2,5}, CUI Yingli², WANG Jing², LIU Xing², LI Xiao^{2,Δ}, JIN Ningyi^{2*} (1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China; 2. Key Laboratory of Molecular Virology and Immunology, Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130122, Jilin, China; 3. College of Examination, Jilin Medical College, Jilin 132013, Jilin, China; 4. College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 30005, Guangxi China; 5. College of Pharmacy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine Changchun 130117, Jilin, China)

[Abstract] Objective: To explore the difference in the proliferation inhibition of doxorubicin and dual specific oncolytic adenoviruses (Ad-VT, Ad-T, Ad-VP3 and d-Mock) on breast cancer cells and normal mammary cells. **Methods:** The proliferation inhibition rates of doxorubicin and recombinant adenovirus(Ad-VT, Ad-T, Ad-VP3 and Mock) on breast cancer cells were detected through WST-1 experiment, and the effects of two drugs on the inhibitory rates of normal mammary epithelial cells were also detected. Moreover, the apoptosis rates of doxorubicin and oncolytic adenoviruses on breast cancer cells and normal mammary epithelial cells were evaluated by Annexin V flow cytometry, Hoechst and JC-1 staining, and the difference in the apoptosis rates were also compared. **Results:** All the re-

[基金项目] 国家重大科技专项资助(重大新药创新与发展)项目(No.2018ZX09301053-004-001);国家重点研究发展计划资助项目(No.2016YFC1200900);长春市重大科技计划项目(No.16ss11)。Project supported by the National Science and Technology Major Project (Major New Drugs Innovation and Development) (No. 2018ZX09301053-004-001), the National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFC1200900), and the Major Science and Technology Program of Changchun City (No.16ss11)

[作者简介] 李善智(1992-),男,硕士生,主要从事肿瘤生物治疗研究,E-mail:2290587589@qq.com

[通信作者] 金宁一(JIN Ningyi, corresponding author),研究员,博士生导师,中国工程院院士,主要从事分子病毒学与免疫学研究,E-mail:ningyik@126.com;李霄(LI Xiao, co-corresponding author),博士,研究员,硕士生导师,主要从事分子病毒学与肿瘤学研究,E-mail:skylee6226@163.com。Δ为共同通信作者

combinant adenovirus could effectively suppress the proliferation of breast cancer cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the inhibition effects followed the order of Ad-VT>Ad-T>Ad-VP3>Ad-MOCK, and the inhibition effect was positively correlated with time. Doxorubicin could also effectively suppress the proliferation of breast cancer cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the inhibition effect was markedly enhanced with the increases in dose and time. However, doxorubicin also showed strong inhibition effect on the normal mammary epithelial cells, and the inhibition rate achieved 80% under 72 h and 5 $\mu\text{g/ml}$ doxorubicin, while that of oncolytic adenovirus Ad-VT on MCF-10A was 20% at 72 h. The apoptosis effects of oncolytic adenovirus-induced breast cancer cell were increased with time, and the apoptosis rate efficiency followed the order of Ad-VT>Ad-T>Ad-VP3>Ad-MOCK, but they displayed low ability to induce normal mammary cell apoptosis. The apoptosis effects of doxorubicin-induced breast cancer cell were similar to that of the normal mammary epithelial cell ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), which followed the dose of 0.05<0.5<5 $\mu\text{g/ml}$. **Conclusion:** Dual specific oncolytic adenoviruses can effectively suppress the proliferation of breast cancer cells, but they have low inhibition on normal mammary cells, which have displayed superior safety and provide a new method for the biotherapy of tumor.

[Key words] breast cancer cells; oncolytic adenovirus; doxorubicin; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(11): 1159-1165. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.11.013]

多柔比星一种抗肿瘤抗生素,是临床上治疗乳腺癌最为常见的蒽环类药物,抗癌谱较广,对机体可产生广泛的生物化学效应,具有强烈的细胞毒性作用。其作用机制主要是嵌入DNA而抑制核酸的合成^[1-5]。本课题选用多柔比星进行实验,是为了对比溶瘤腺病毒治疗方法与临床上最常用的化疗方法的优缺点。溶瘤腺病毒是能够选择性地在肿瘤细胞中复制并裂解细胞,且无严重的副反应。目前常用的腺病毒载体是5型腺病毒和2型腺病毒。然而,溶瘤腺病毒介导的肿瘤细胞裂解并不能完全地消除肿瘤,不利的肿瘤环境会影响溶瘤病毒疗法发挥溶瘤效果。如何改造溶瘤腺病毒载体以提高溶瘤腺病毒的选择性、疗效和安全性是目前临床关注的重要问题。

凋亡素(apoptin)是来自于鸡贫血病毒(chicken anemia virus, CAV)的一种蛋白,也被称为VP3蛋白,其功能是可以诱导凋亡,且能够选择性杀死多种癌细胞的蛋白,而在正常细胞中位于胞质中易降解。人端粒末端转移酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)长度及活力与细胞衰老和无限增殖有关,超过85%的恶性肿瘤细胞中端粒酶的表达同样上调,干扰酶活性能够抑制癌细胞的生长。靶向肿瘤细胞和目的蛋白高效表达也是依赖于hTERT启动子的高效性与特异性^[5-6]。

本课题组前期构建的重组腺病毒(Ad-VT、Ad-T、Ad-VP3和Ad-Mock)采用的是RAPAd.I包装系统,Ad-VT(Ad-Apoptin-hTERTp-E1A)是由肿瘤特异性启动子(hTERTp,人端粒酶逆转录酶)启动E1A基因(病毒复制必需基因)、巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子启动凋亡素基因^[7],因此Ad-VT既有肿瘤特异性杀伤又有肿瘤特异性复制能力的双特异性溶瘤腺病毒;对照病毒Ad-T(Ad-hTERTp-E1A)^[8]、Ad-VP3(Ad-CMV-Apoptin)和Ad-Mock^[9-12]。重组腺病毒可能对癌细胞杀伤作用较大,对正常细胞杀伤作用较小^[13],且副作用也较抗癌药物小。

本研究利用重组腺病毒Ad-VT开展乳腺癌细胞的抑瘤实验,比较溶瘤腺病毒治疗方法与传统的化疗方法的优缺点,探索乳腺癌基因治疗的新方法,实验依据为以后溶瘤腺病毒联合化疗药治疗乳腺癌提供前期实验依据。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞株与主要试剂

溶瘤腺病毒与人乳腺癌细胞株MCF-7和人正常乳腺上皮细胞株MCF-10A由所在军事医学科学院军事兽医研究所分子病毒学与免疫学实验室保存。多柔比星购自Sigma公司,RPMI 1640培养液、DMEM、胎牛血清购自Hyclone公司,FITC偶联Annexin-V凋亡试剂盒购自BD公司,WST-1购自Roche公司,Hoechst和JC-1购自Life公司。

1.2 WST-1法检测双特异性溶瘤腺病毒和多柔比星对人乳腺癌细胞MCF-7和人正常乳腺上皮细胞MCF-10A增殖的影响

将处于对数生长期的MCF-7细胞和MCF-10A细胞以 5×10^3 个/孔密度培养于96孔板中,每孔培养体积为100 μl ,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养12~24 h,然后用Ad-MOCK、Ad-VP3、Ad-T、Ad-VT各100 MOI分别感染MCF-7和MCF-10A细胞;同时另制备相同的细胞密度的96孔板,给药多柔比星,质量浓度为0.05、0.5、5 $\mu\text{g/ml}$,每组均设3个复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中分别培养24、48和72 h后,每孔加入10 μl WST-1染液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱避光孵育90 min,对照孔同法处理。用酶标仪在490 nm处测量每孔的光密度值(D),按照公式计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率(%)=(对照孔D值-处理孔D值)/对照孔D值 $\times 100\%$ 。

1.3 流式细胞术检测双特异性溶瘤腺病毒和多柔比星对乳腺癌细胞和乳腺上皮细胞的凋亡率

用6孔板制备MCF-7和MCF-10A单层细胞,细

胞密度为 2.5×10^5 个/孔,于 37°C 、 5% CO_2 培养箱中培养12~24 h后,用Ad-MOCK、Ad-VP3、Ad-T、Ad-VT各100 MOI分别感染MCF-7和MCF-10A细胞24、48和72 h,同时另制备相同的细胞密度的6孔板,给药多柔比星质量浓度为0.05、0.5、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$,处理24、48和72 h。采用FITC偶联Annexin-V凋亡试剂盒处理MCF-7和MCF-10A细胞,将细胞通过流式细胞仪上样检测并分析结果。

1.4 Hoechst染色法检测不同处理组对乳腺癌细胞和乳腺上皮细胞凋亡水平的影响

将爬片置于6孔板中,制备MCF-7和MCF-10A单层细胞,细胞密度为 2.5×10^5 个/孔,于 37°C 、 5% CO_2 培养箱中培养12~24 h后,用Ad-MOCK、Ad-VP3、Ad-T、Ad-VT各100 MOI分别感染MCF-7和MCF-10A细胞24、48和72 h;同时制备相同的细胞密度的6孔板,给药多柔比星,质量浓度为0.05、0.5、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$,处理24、48和72 h。到达时间后弃培养基,PBS清洗2遍,加入Hoechst染色液(1:1 000稀释的Hoechst染色液)1 ml, 37°C 、 5% CO_2 培养箱中避光孵育8 min。弃工作液,PBS清洗2遍,加入无血清、无抗生素RPMI 1640和DMEM培养基。荧光显微镜下观察(激发滤光片波长355 nm,阻断滤光片波长512 nm),并拍照。

1.5 JC-1染色法检测双特异性溶瘤腺病毒和多柔比星对乳腺癌细胞和乳腺上皮细胞凋亡水平的影响

1.5.1 荧光显微镜下观察JC-1染色法检测双特异性溶瘤腺病毒和多柔比星对乳腺癌细胞和乳腺上皮细胞凋亡水平的影响 将爬片置于6孔板中,制备MCF-7和MCF-10A单层细胞,细胞密度为 2.5×10^5 个/孔,于 37°C 、 5% CO_2 培养箱中培养12~24 h后,用Ad-MOCK、Ad-VP3、Ad-T、Ad-VT各100 MOI分别感染MCF-7和MCF-10A细胞24、48和72 h;同时另制备相同的细胞密度的6孔板给药多柔比星,质量浓度为0.05、0.5、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 处理24、48和72 h。到达作用时间后,弃培养基,PBS清洗2遍,加入JC-1染色液(1:1 000稀释的JC-1染色液)1 ml, 37°C 、 5% CO_2 培养箱中避光孵育15 min。弃工作液,PBS清洗2遍,加入无血清、无抗生素RPMI 1640和DMEM培养基。荧光显微镜下观察(激发滤光片波长485 nm,阻断滤光片波长530 nm;激发滤光片波长530 nm,阻断滤光片波长590 nm)并拍照。

1.5.2 流式术检测JC-1染色双特异性溶瘤腺病毒和多柔比星对乳腺癌细胞和乳腺上皮细胞凋亡水平的影响 用6孔板制备MCF-7和MCF-10A单层细胞,细胞密度为 2.5×10^5 个/孔,于 37°C 、 5% CO_2 培养箱中培养12~4 h后,用Ad-MOCK、Ad-VP3、Ad-T、Ad-VT

各100 MOI分别感染MCF-7和MCF-10A细胞24、48和72 h,同时另制备相同的细胞密度的6孔板给药多柔比星质量浓度为0.05、0.5、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$,处理24、48和72 h。采用JC-1试剂盒处理药物和毒处理过的MCF-7和MCF-10A细胞,将细胞通过FACS流式细胞仪上样检测,结果分析。

1.6 统计学处理

采用GraphPad Prism 5统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 双特异性溶瘤腺病毒和多柔比星对乳腺癌细胞和乳腺上皮细胞生长的抑制

Ad-VT特异性杀伤MCF-7肿瘤细胞,WST-1法检测(图1A)结果显示,凋亡素构建的溶瘤腺病毒Ad-VT,抑制增殖效果显著高于Ad-MOCK,且抑制效果 $\text{Ad-VT} > \text{Ad-T} > \text{Ad-VP3} > \text{Ad-MOCK}$ ($P < 0.01$)。在感染剂量一定的条件下,随着感染时间的延长,Ad-VT对MCF-7细胞的抑制率明显增加,同时具有时间效应关系,且溶瘤腺病毒对正常乳腺上皮细胞的抑制效果不明显(图1B)。而多柔比星在抑制肿瘤细胞增殖时,对正常的乳腺上皮细胞也有较强的抑制作用 $0.05 < 0.5 < 5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($P < 0.01$) (图1C,图1D)。

2.2 双特异性溶瘤腺病毒和多柔比星对MCF-7和MCF-10A细胞致凋亡作用的对比

流式细胞术结果显示,Ad-VT诱导细胞的凋亡率明显高于Ad-T、Ad-VP3、Ad-MOCK和对照组,且凋亡率是 $\text{Ad-VT} > \text{Ad-T} > \text{Ad-VP3} > \text{Ad-MOCK}$ (A) ($P < 0.01$),而溶瘤腺病毒诱导正常乳腺上皮细胞的凋亡率较小(图2A)。多柔比星对乳腺癌细胞和乳腺上皮细胞都有较强的诱导凋亡的作用,且随着剂量和时间的增加,凋亡率明显增加,作用效果为 $0.05 < 0.5, 5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($P < 0.01$) (图2B)。

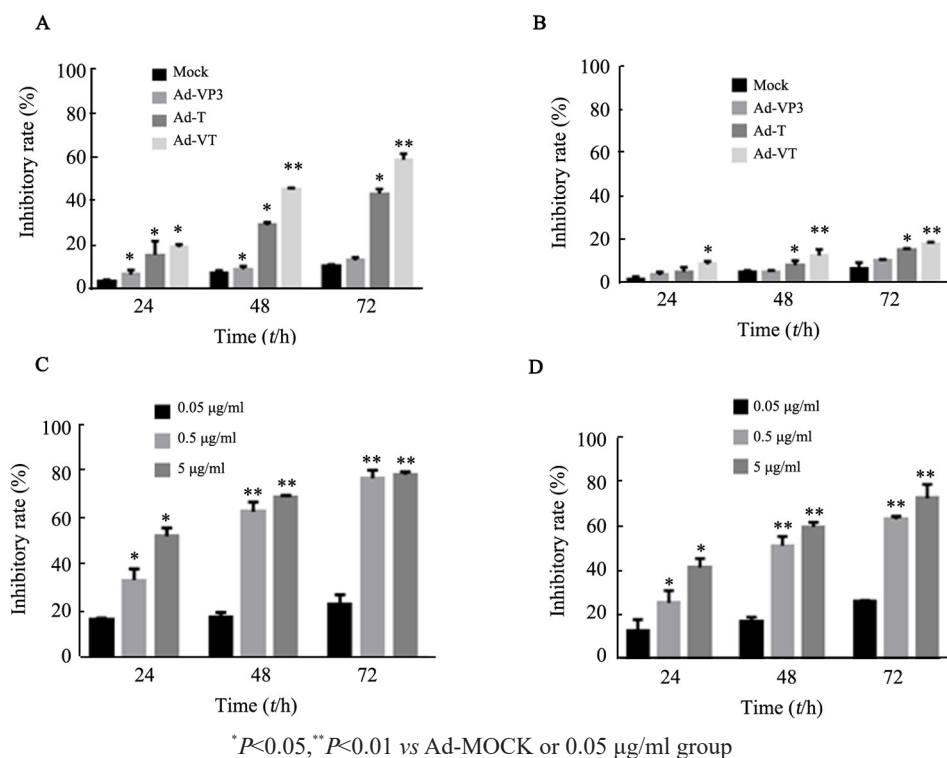
2.3 Hoechst染色检测4种重组腺病毒和多柔比星对MCF-7和MCF-10A细胞致凋亡作用的对比

不同的时间点Hoechst染色检测结果如图3所示,MCF-7细胞用4种重组腺病毒Ad-VT、Ad-T、Ad-VP3、Ad-MOCK作用后,感染Ad-VT、Ad-T、Ad-VP3的部分细胞核呈亮蓝色浓染或碎裂,而Ad-MOCK和对照组的细胞核呈均一蓝色荧光。MCF-10A细胞用4种毒作用后呈现亮染的只有Ad-VT组,且数量少,细胞核大部分呈现完好状态(图3A)。多柔比星作用于MCF-7和MCF-10A细胞后,细胞核均呈现亮蓝色浓染或破裂(图3B)。

2.4 JC-1 染色检测 MCF-7 和 MCF-10A 细胞的凋亡水平

JC-1 染色检测结果如图 4A 所示, 溶瘤腺病毒对细胞的抑制作用通过线粒体膜电位的变化而表现出来, 随着时间的增加, 凋亡细胞数逐渐增加且红色荧

光/绿色荧光的比值大小依次为: Ad-VT<Ad-T<Ad-VP3<Ad-MOCK ($P<0.01$)。但 MCF-10A 细胞凋亡数变化较小, 只在 72 h 有了明显变化(A)。而多柔比星作用于 2 种细胞均可引起较大份额凋亡, 且作用效果为 $0.05<0.5<5 \mu\text{g/ml}$ ($P<0.01$)(图 4B)。



A: Effect of oncolytic adenovirus on the survival rate of MCF-7 cells; B: Effect of oncolytic adenovirus on the survival rate of MCF-10A cells; C: Effect of doxorubicin on the survival rate of MCF-7 cells; D: Effect of doxorubicin on the survival rate of MCF-10A cells

图 1 双特异性溶瘤腺病毒和多柔比星对乳腺癌细胞和乳腺上皮细胞增殖的抑制

Fig.1 Inhibitory effect of oncolytic adenovirus and doxorubicin on proliferations of MCF-7 cells and MCF-10A cells

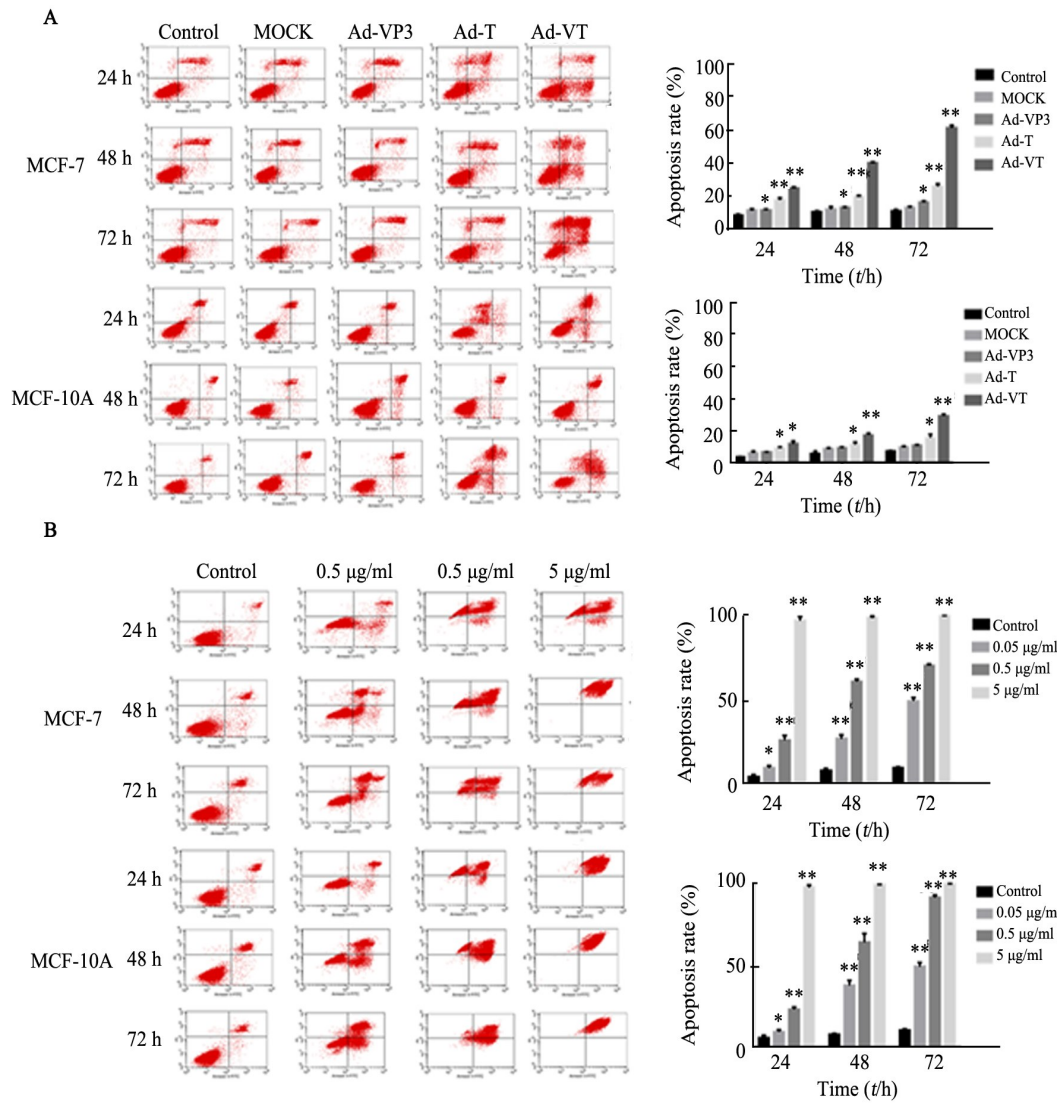
3 讨论

乳腺癌已成为日益危害国人身心健康的一种疾病, 对乳腺癌治疗的手段有很多种, 但最为常用的还是化疗和放疗。这两种方法虽然有效, 但伴随着的毒副作用也很大, 使患者不能得到高品质的生活保证。本研究旨在通过新型的生物治疗手段, 为乳腺癌的治疗提供一种新的方式和方法。

凋亡素能够诱导人的转化细胞及恶性肿瘤细胞发生凋亡, 而对人的正常二倍体细胞如上皮细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞等没有凋亡诱导的功能, 肿瘤细胞对凋亡素诱导的凋亡很敏感, 然而正常细胞对凋亡素却不敏感, 可能与凋亡素涉及多种凋亡相关信号通路有关^[13]。通过本实验也可验证含有凋亡素基因的双特异性溶瘤腺病毒 MCF-7 细胞有较强的抑制作用, 抑制率能达到 80%, 而对正常的细胞抑制率较小, 抑制率为 20%。这对未来临床肿瘤治疗具有很好的参考价值。

本研究利用 Ad-VT 感染 MCF-7 细胞进行 Annexin V 检测, 结果显示, 双特异性溶瘤腺病毒 Ad-VT 可以诱导肿瘤细胞早期凋亡与中晚期凋亡, 以此抑制肿瘤细胞增殖。本研究结果表明, 细胞凋亡是一个主动的过程, Ad-VT 明显促进 MCF-7 细胞凋亡发生, 提高了肿瘤细胞对溶瘤腺病毒的敏感性。通过与 WST-1 实验进行对比, 可以发现溶瘤腺病毒 Ad-VT 诱导凋亡导致肿瘤细胞死亡以外, 还有另外促进细胞状态变化的损伤形式^[14-16], 这可能包括细胞自噬与细胞坏死^[17]。

多柔比星是广谱的抗癌化疗药物, 虽然它对肿瘤细胞有很好的杀伤作用, 抑制率可达到 80% 以上, 但对正常细胞也有较强的抑制作用, 抑制率也在 80% 左右。这就说明多柔比星在杀伤肿瘤细胞的同时也杀伤正常细胞, 对人体的副作用较大。通过流式细胞术实验可以发现多柔比星主要是通过诱导细胞凋亡的方式来杀伤肿瘤细胞^[18-20]。但也有坏死的, 说明多柔比星引起细胞死亡是多种方式的。

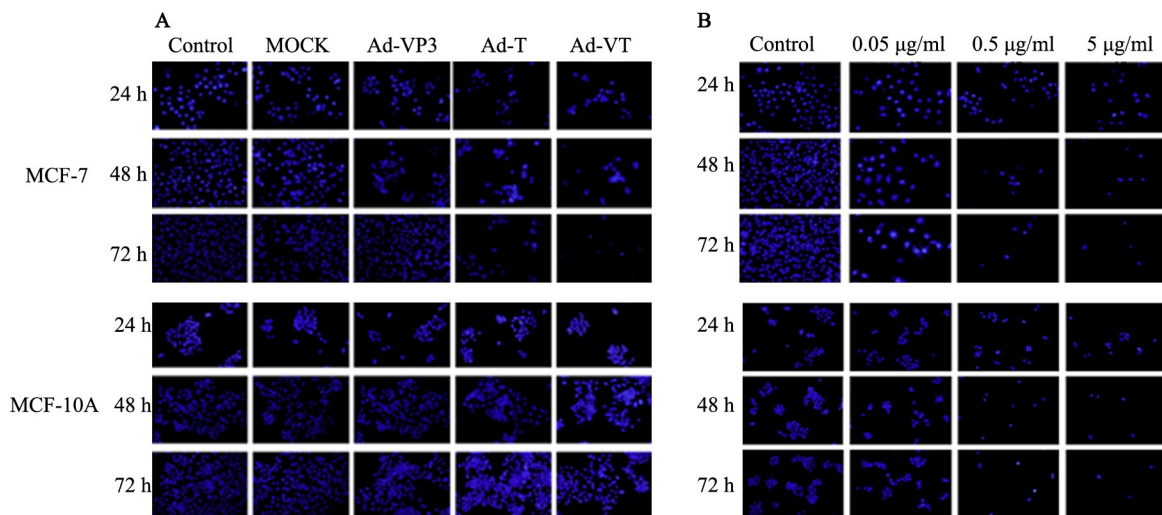


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group

A: Oncolytic adenovirus; B: Doxorubicin

图2 流式细胞术检测溶瘤腺病毒和多柔比星对MCF-7和MCF-10A细胞凋亡的影响

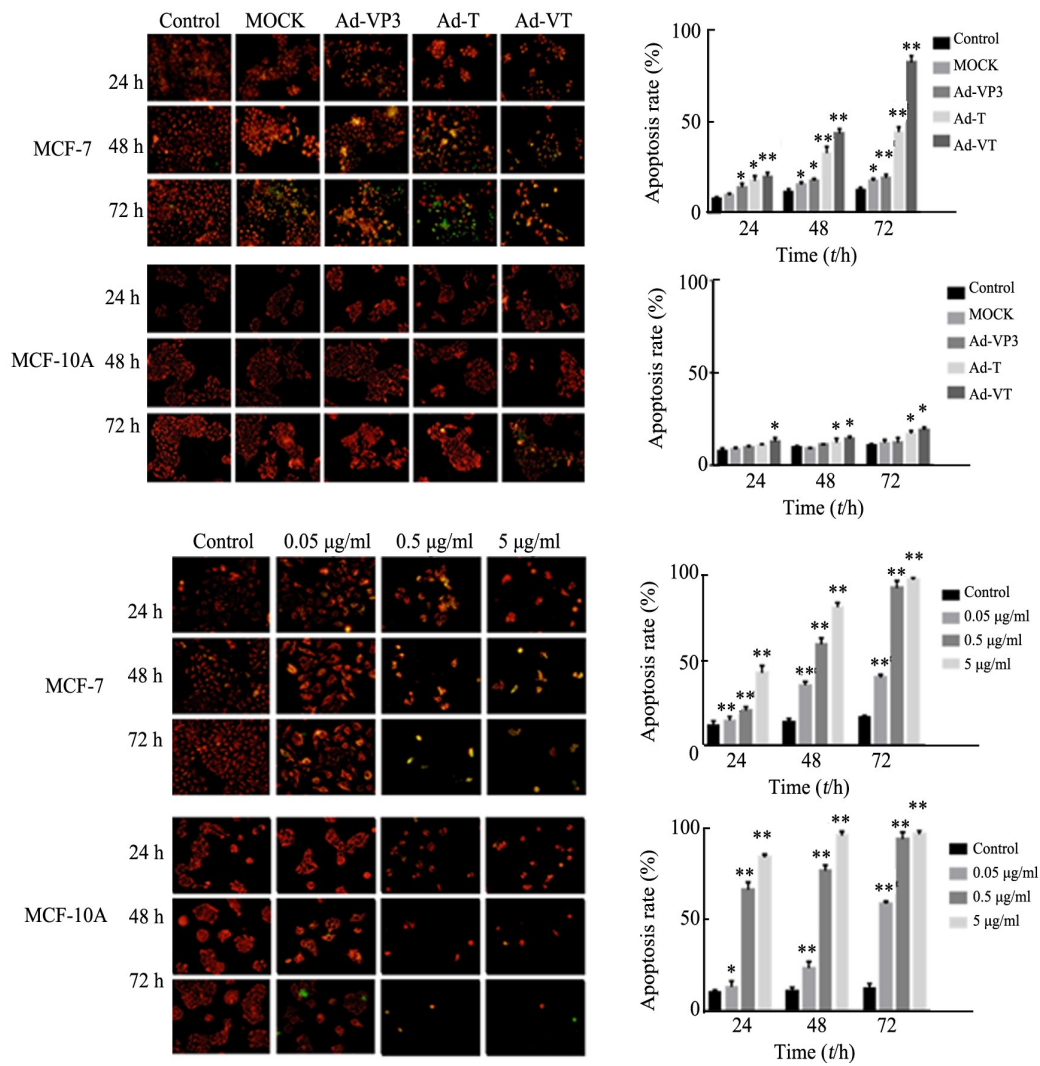
Fig.2 Effect of oncolytic adenovirus and doxorubicin on the apoptosis of MCF-7 and MCF-10A cells by FACS



A: Oncolytic adenovirus; B: Doxorubicin

图3 Hoechst染色检测4种重组腺病毒和多柔比星对MCF-7和MCF-10A细胞凋亡的影响

Fig.3 Effect of oncolytic adenovirus and doxorubicin on the apoptosis of MCF-7 and MCF-10A cells by Hoechst



A: Oncolytic adenovirus; B: Doxorubicin

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group

图4 JC-1染色检测4种重组腺病毒和多柔比星对MCF-7和MCF-10A细胞凋亡的影响

Fig.4 Effect of oncolytic adenovirus and doxorubicin on the apoptosis of MCF-7 and MCF-10A cells by JC-1

通过JC-1染色和Hoechst染色探讨双特异性溶瘤腺病毒和多柔比星对MCF-7细胞的杀伤途径,结果表明,Ad-VT、Ad-T和Ad-VP3均能诱导凋亡而产生杀伤作用^[21-22],但两者作用方式不同,分别为线粒体膜电位的改变和细胞核的变化(染色质浓染、细胞核碎裂)^[23]。

综上所述,化疗药物多柔比星对乳腺癌的抑制杀伤效果比较显著,但同时伴随的毒副作用也比较大,在杀伤肿瘤细胞的同时也杀伤了大量的正常细胞,构建的重组腺病毒对正常细胞几乎没有杀伤作用。重组腺病毒对乳腺癌细胞的抑制效果也十分显著^[24],与化疗药物多柔比星的抑瘤效果基本相同。这对临床改善乳腺癌患者的生活质量有很大提高,也为乳腺癌治疗提供了新的治疗方向。

[参考文献]

[1] DIZON D S, BLESSING J A, MCMEEKIN D S, et al. Phase II trial

of ixabepilone as second-line treatment in advanced endometrial cancer: gynecologic oncology group trial 129-P[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(19): 3104-3108. DOI: 10.1200/JCO.2008. 20.6995.

[2] KWANG K K, LANGE T S, SINGH R K, et al. Tetrathiomolybdate sensitizes ovarian cancer cells to anticancer drugs doxorubicin, fenretinide, 5-fluorouracil and mitomycin C[J]. Bmc Cancer, 2012, 12(1):147-147. DOI: 10.1186/1471-2407-12-147.

[3] ZHANG M, ZHANG H, FAN T, et al. Doxorubicin resistance mediated by cytoplasmic macrophage colony-stimulating factor is associated with switch from apoptosis to autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells[J]. Exp Biol Med, 2016, 241(18): 2086-2093. DOI: 10.1177/1535370216660399.

[4] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A, et al. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29. DOI: 10.3322/caac.21254.

[5] EFEYAN A, COMB W C, SABATINI D M. Nutrient sensing mechanisms and pathways[J]. Nature, 2015, 517(7534): 302. DOI: 10.1038/nature14190.

[6] BRAUNSTEIN M, LIAO L, LYTTLE N, et al. Downregulation of histone H2A and H2B pathways is associated with anthracycline

- sensitivity in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2016, 18(1): 16. DOI: 10.1186/s13058-016-0676-6.
- [7] LAI G H, LIEN Y Y, LIN M K, et al. VP2 of chicken anaemia virus interacts with apoptin for down-regulation of apoptosis through dephosphorylated threonine 108 on apoptin[J]. *Scientific Rep*, 2017, 7(1): 1. DOI: 10.1038/s41598-017-14558-8.
- [8] XI L, CECH T R. Inventory of telomerase components in human cells reveals multiple subpopulations of hTR and hTERT[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(13): 8565. DOI: 10.1093/nar/gku560.
- [9] MCDERMOTT M, EUSTACE A J, BUSSCHOTS S, et al. In vitro development of chemotherapy and targeted therapy drug-resistant cancer cell lines: a practical guide with case studies[J]. *Frontiers in oncology*, 2014, 4: 40. DOI: 10.3389/fonc.2014.00040
- [10] ZHAO S. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis.[J]. *Cell Proliferation*, 2012, 90(6): 487-498. DOI: 10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x.
- [11] TORY S, YAZANL S, FOOJ B, et al. Induction of apoptosis in mcf-7 cells via oxidative stress generation, mitochondria-dependent and caspase-independent pathway by ethyl acetate extract of *dillenia suffruticosa* and its chemical profile[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0127441[2018-3-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4457850/>. DOI:10.1371/journal.pone.0127441.
- [12] AHAM M, MUSTAFA E, ABU S H, et al. The cellular and molecular effects of the androgen receptor agonist, CI-4AS-1, on breast cancer cells[J]. *Endocrine Res*, 2016, 43(4): 1-12. DOI: 10.1080/07435800.2018.1455105.
- [13] LANZH L, ZIMMERMAN M E, BROUWER J, et al. Mitotic catastrophe triggered in human cancer cells by the viral protein apoptin [J/OL]. *Cell Death & Disease*, 2013, 4(2): e487[2018-3-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3734808/>. DOI: 10.1038/cddis.2013.2.
- [14] AFESEH N H, KANTHASAMY A, GU Y, et al. Manganese nanoparticle activates mitochondrial dependent apoptotic signaling and autophagy in dopaminergic neuronal cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 256(3): 227-240. DOI: 10.1016/j.taap.2011.07.018.
- [15] PENG W, TONG D U, ZHANG Z, et al. Knockdown of autophagy-related gene LC3 enhances the sensitivity of HepG2 cells to epirubicin[J]. *Exp Therap Med*, 2015, 9(4): 1271-1276. DOI: 10.3892/etm.2015.2266.
- [16] LAROCCA C J, HAN J, OLIVEIRA A R, et al. Oncolytic adenoviruses targeted to human papilloma virus-positive head and neck squamous cell carcinomas[J]. *Oral Oncology*, 2016, 56: 25-31. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2016.02.014.
- [17] HUANG J L, LAROCCA C J, YAMAMOTO M. Showing the way: oncolytic adenoviruses as chaperones of immunostimulatory adjuncts [J/OL]. *Biomedicine*, 2016, 4(3). PII:E23[2018-04-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5344254/>. DOI: 10.3390/biomedicine4030023.
- [18] APASSO C, HIERVINEN M, GAROFALO M, et al. Oncolytic adenoviruses coated with MHC-I tumor epitopes increase the antitumor immunity and efficacy against melanoma[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(4): e1105429[2018-04-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4839367/>. DOI:10.1080/2162402X.2015.1105429.
- [19] LI S, YUAN S, ZHAO Q, et al. Quercetin enhances chemotherapeutic effect of doxorubicin against human breast cancer cells while reducing toxic side effects of it[J]. *Biom Pharmacoth*, 2018, 100: 441-447. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.055.
- [20] BANU H, RENUKA N, FAHEEM S M, et al. Gold and silver nanoparticles biomimetically synthesized using date palm pollen extract induce apoptosis and regulate p53 and bcl-2 expression in human breast adenocarcinoma cells[J]. *Biol Trace Element Res*, 2018(1): 1-13. DOI: 10.1007/s12011-018-1287-0.
- [21] YAN X, YANG L, FENG G, et al. Lup-20(29)-en-3 β ,28-di-yl-nitrooxy acetate affects MCF-7 proliferation through the crosstalk between apoptosis and autophagy in mitochondria[J]. *Cell Death Dis*, 2018. DOI: 10.1038/s41419-017-0255-5.
- [22] WANG W, ZHANG Y, YAO G, et al. Synthesis of new sarsasapogenin derivatives with antiproliferative and apoptotic effects in MCF-7 cells[J]. *Steroids*, 2018, 131. DOI: 10.1016/j.steroids.2018.01.001.
- [23] MILLER D L, MYERS C L, BRENDEN R, et al. Adenovirus type 5 exerts genome-wide control over cellular programs governing proliferation, quiescence, and survival[J]. *Geno Biol*, 2007, 8(4): R58-R58. DOI: 10.1186/gb-2007-8-4-r58.
- [24] 李霄. 双特异性抗肿瘤重组腺病毒的构建、鉴定及实验免疫[D]. 吉林大学, 2009.

[收稿日期] 2018-06-19

[修回日期] 2018-10-18

[本文编辑] 韩丹, 阮芳铭