

携带凋亡素基因的重组腺病毒对人肺鳞癌细胞 SK-MES-1、人肺腺癌细胞 NCI-H1299 凋亡的影响^Δ

阮军^{1*}, 吴友茹¹, 缪李丽^{2#} (1. 绵阳市中心医院呼吸内科, 四川 绵阳 621000; 2. 重庆医科大学附属永川医院呼吸内科, 重庆 402160)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3066-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.13

摘要 目的: 研究携带凋亡素基因 VP3 的重组腺病毒载体 Adxsi-GFP-VP3 对人肺鳞癌细胞 SK-MES-1、人肺腺癌细胞 NCI-H1299 的凋亡的影响。方法: 取对数生长期 SK-MES-1、NCI-H1299 细胞, 各分为重组腺病毒(Adxsi-GFP-VP3)组、空病毒(Adxsi-GFP)组和细胞对照(磷酸盐缓冲液)组, 依次记为 A、B、C 组。采用逆转录-聚合酶链反应和 Western blot 法检测 A、B 组细胞转染 48、72 h 的 VP3 mRNA 和 Apoptin 表达情况, 透射电镜观察 A 组细胞转染 72 h 的超微结构变化。采用 MTT 法检测 3 组细胞转染 24、48、72、96 h 的细胞增殖活性; 流式细胞术检测细胞转染后 24、48、72 h 的凋亡率及细胞周期变化。结果: 与 B 组比较, A 组 SK-MES-1、NCI-H1299 细胞转染 48 h 后有 VP3 mRNA 表达, 转染 72 h 后有 Apoptin 表达。A 组转染 72 h 后 SK-MES-1、NCI-H1299 细胞均出现细胞凋亡的超微结构改变。与 B、C 组比较, A 组 SK-MES-1、NCI-H1299 细胞增殖活性降低、细胞凋亡率增加, 且与转染时间呈正相关; 转染 72 h S 期的 SK-MES-1、NCI-H1299 细胞比例降低、G₂/M 期细胞比例增加。以上差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: Adxsi-GFP-VP3 能有效诱导 SK-MES-1、NCI-H1299 细胞凋亡。

关键词 凋亡素基因 VP3; 重组腺病毒载体 Adxsi-GFP-VP3; 人肺鳞癌细胞 SK-MES-1; 人肺腺癌细胞 NCI-H1299; 蛋白表达; 凋亡; 细胞周期

Effects of Recombinant Adenovirus Carrying Apoptin Gene on the Apoptosis of Human Lung Squamous Carcinoma SK-MES-1 Cell Lines and Human Lung Adenocarcinoma NCI-H1299 Cell Lines

RUAN Jun¹, WU You-ru¹, MIAO Li-li² (1. Dept. of Respiratory Medicine, Mianyang Central Hospital, Sichuan Mianyang 621000, China; 2. Dept. of Respiratory Medicine, Yongchuan Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the effects of recombinant adenovirus vector Adxsi-GFP-VP3 carrying apoptin gene VP3 on the apoptosis of human lung squamous carcinoma SK-MES-1 cell lines and human lung adenocarcinoma NCI-H1299 cell lines. METHODS: The exponential phase SK-MES-1 and NCI-H1299 cell lines were respectively divided into a recombinant adenovirus (Adxsi-GFP-VP3) group, a empty virus (Adxsi-GFP) group and a cell control (phosphate buffer) group, which were marked as group A, B and C respectively. Reverse transcription polymerase chain reaction and Western blot method were used to detect the expressions of VP3 mRNA and Apoptin in the cells of groups A and B 48 and 72 h after transfection. The change in the ultrastructure of the cells in group A was observed under transmission electron microscope 72 h thereafter. MTT method was adopted to detect the cell proliferation activities of three groups 24, 48, 72 and 96 h thereafter and flow cytometry to determine the apoptosis rates and cell cycle changes 24, 48 and 72 h thereafter. RESULTS: Compared to group B, group A demonstrated the expression of VP3 mRNA in SK-MES-1 and NCI-H1299 cell lines 48 h after transfection, and Apoptin expression and ultrastructure change for apoptosis of SK-MES-1 and NCI-H1299 cell lines 72 h thereafter. Compared to groups B and C, group A showed lower proliferation activities and higher apoptosis rates of SK-MES-1 and NCI-H1299 cell lines, which had a positive correlation with transfection time; and in the group A, there was a decrease in the proportion of the SK-MES-1 and NCI-H1299 cell lines in S phase and an increase in the proportion of those in G₂/M phase, 72 h after transfection. There was statistically difference ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Adxsi-GFP-VP3 can effectively induce the apoptosis of SK-MES-1 and NCI-H1299 cell lines.

KEYWORDS Apoptin gene VP3; Recombinant adenovirus vector Adxsi-GFP-VP3; Human lung squamous carcinoma SK-MES-1 cell lines; Human lung adenocarcinoma NCI-H1299 cell lines; Protein expression; Apoptosis; Cell cycle

近年来, 基因治疗作为恶性肿瘤治疗的一种新策略, 因其

Δ 基金项目: 重庆市医学科研计划项目(No.2011-1-084)

* 医师, 硕士。研究方向: 肺癌的临床防治。电话: 0816-5903054。

E-mail: ruanjunksy@163.com

通信作者: 主任医师, 硕士生导师。研究方向: 肺癌的临床防治。电话: 023-85381603。E-mail: miao-lili@163.com

具有高效性、安全性及特异性强等优点, 已经引起了国内外学者的广泛关注与重视。凋亡素是来源于鸡贫血病毒 VP3 基因编码的一种功能蛋白, 具有广谱的诱导肿瘤细胞凋亡效应^[1], 能选择性地诱导多种肿瘤细胞和转化细胞凋亡, 而对人正常二倍体细胞无杀伤和毒副作用, 因此被视为具有广阔临床应用前景的新型抗肿瘤生物制剂^[2]。

目前,有关凋亡素特异性诱导人多种肿瘤细胞凋亡的研究报道很多,但尚未发现凋亡素对非小细胞肺癌细胞(人肺鳞癌细胞 SK-MES-1、人肺腺癌细胞 NCI-H1299)作用效果的研究见诸报道。为了深入了解凋亡素对人不同类型非小细胞肺癌细胞的作用效果,本文研究了携带凋亡素基因 VP3 的重组腺病毒载体 Adxsi-GFP-VP3 对人肺鳞癌细胞 SK-MES-1、人肺腺癌细胞 NCI-H1299 的凋亡作用。

1 材料

1.1 仪器

ELX-800 型自动酶标检测仪(美国 Bio-Tek 公司);BX-50 型倒置光学显微镜(日本 Olympus 公司);Hitachi-7500 型透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司);BD FACS Calidor 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 药品与试剂

Adxsi-GFP-VP3(重庆医科大学前期构建并保存);总 RNA 抽提试剂 Trizol、逆转录-聚合酶链反应(PCR)试剂盒(日本 TaKaRa 公司);蛋白提取试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒、电化学发光(ECL)试剂(上海碧云天生物技术有限公司);兔抗人 Apoptin 多克隆抗体(武汉晶赛生物工程公司);山羊抗兔二抗(杭州联科生物公司);Annexin V-PE/7AAD 凋亡检测试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司);RPMI 1640 培养基、胎牛血清和胰蛋白酶(美国 Gibco 公司)。

1.3 细胞

SK-MES-1 细胞、NCI-H1299 细胞购自中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养

取 SK-MES-1 细胞和 NCI-H1299 细胞培养于含 10% 胎牛血清、100 u/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液中,于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。

2.2 逆转录-PCR 法检测细胞中 VP3 mRNA 表达

取对数生长期 SK-MES-1、NCI-H1299 细胞,各分为重组腺病毒(Adxsi-GFP-VP3)组、空病毒(Adxsi-GFP)组,依次记为 A、B 组。以转染复数为 40 的 Adxsi-GFP-VP3、等量的空病毒载体转染细胞。转染 48 h 后提取细胞总 RNA,逆转录得到 cDNA 后进行 PCR 反应。VP3 基因(334 bp):上游引物 5'-AC-CATCAACGGTGTTCAGGC-3',下游引物 5'-TTACAGTCT-TATACACCTTCTTGC-3'。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参(127 bp):上游引物 5'-GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA-3',下游引物 5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3'。PCR 反应参数设置:95 °C 预变性 5 min;95 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。取 10 μl 扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶上电泳,观察 3 组细胞中 VP3 mRNA 表达情况。

2.3 Western blot 法检测细胞中 Apoptin 表达

按“2.2”项下方法分组转染细胞。转染 72 h 后收集各组细胞并用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,加入细胞裂解液裂解细胞、提取蛋白,用 12% PAGE 凝胶电泳分离蛋白,再电转移至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜以 5% 脱脂奶粉于室温振荡封闭 1 h,加入兔抗人 Apoptin 多克隆抗体,4 °C 保存过夜,以磷酸盐吐温缓冲液(PBST)(pH=7.4)漂洗膜 3 次,每次 5 min;再加入

辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗,37 °C 孵育 1 h,以 PBST 漂洗膜 3 次,每次 5 min;加 ECL 试剂显色,曝光底片,以 β-actin 为内参,观察 2 组细胞中 VP3 蛋白的表达情况。

2.4 透射电子显微镜观察细胞的超微结构

按“2.2”项下方法分组转染细胞。分别于转染后 24、48、72 h 收集细胞(每个标本细胞数 ≥ 2 × 10⁶),PBS 洗 2 次,以离心半径 4 cm、1 000 r/min 离心 10 min,3% 戊二醛固定 4 h 后再用 1% 锇酸固定 1 h,脱水、包埋、切片,醋酸钠-枸橼酸铅染色,透射电子显微镜下观察 2 组细胞转染后的超微结构,检测电压为 80 kV。

2.5 MTT 法检测细胞的增殖活性

取对数生长期的 SK-MES-1 和 NCI-H1299 细胞制备单细胞悬液,调整细胞密度为 2 × 10⁴ ml⁻¹,以 200 μl/孔接种于 96 孔培养板中,于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。试验分为重组腺病毒(Adxsi-GFP-VP3)组、空病毒(Adxsi-GFP)组和细胞对照(PBS)组,依次记为 A、B、C 组,每组设 5 个重复孔,以转染复数为 40 的 Adxsi-GFP-VP3、等量的空病毒载体和 PBS 转染细胞。转染细胞 24、48、72、96 h 后分别加入 5 mg/ml MTT 20 μl,37 °C 孵育 4 h 后移去含 MTT 的培养液,加入二甲基亚砷 200 μl,摇匀 15 min,使反应产物充分溶解,于酶标仪上 570 nm 波长处测定光密度(OD)。

2.6 流式细胞术检测细胞凋亡率

利用 Annexin V-PE/7AAD 细胞凋亡检测试剂盒,按照使用说明检测膜磷脂酰丝氨酸(PS)以评估细胞凋亡。分别于“2.5”项下转染细胞 24、48、72 h 后收集细胞并制备细胞悬液,调整细胞数为 (1~2) × 10⁶ ml⁻¹,按试剂盒说明书操作于流式细胞仪上检测 3 组细胞的凋亡率。

2.7 流式细胞术检测细胞周期

使用 0.25% 胰蛋白酶收集按“2.5”项下方法转染 72 h 后的 SK-MES-1 和 NCI-H1299 细胞悬液,调整细胞数为 (1~2) × 10⁶ ml⁻¹,经离心、PBS 洗涤后重悬细胞于 0.5 ml 的 PBS 中,将细胞悬液放置于 2~3 ml 预冷的 70% 乙醇中,混匀于 4 °C 固定过夜;以离心半径 4 cm、300 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 洗 2 次,再重悬于 PBS 中,加入碘化丙啶(PI)后于冰浴中避光染色 30 min,于流式细胞仪上定量分析 3 组细胞的周期变化。

2.8 统计学分析

用 SPSS 15.0 统计分析软件处理数据。全部数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,其中,MTT 试验数据和细胞凋亡率试验数据均采用重复测量的方差分析,细胞周期试验数据采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞中 VP3 mRNA 表达情况

结果显示,SK-MES-1 和 NCI-H1299 细胞 A 组均扩增出 1 条 334 bp 左右的条带,而细胞 B 组扩增结果为阴性,表明 VP3 mRNA 已在转染细胞中获得成功转录。逆转录 PCR 法检测细胞中 VP3 mRNA 的表达情况见图 1。

3.2 细胞中 Apoptin 表达情况

结果显示,各组细胞的内参 β-actin 蛋白的条带亮度相似,表明其在各组细胞内的表达基本一致;同时,SK-MES-1 和 NCI-H1299 细胞 A 组均出现 Apoptin 条带,表明 Apoptin 被成功转入细胞内并获得稳定表达,而 B 组未见 Apoptin 条带。Western blot 法检测细胞中 Apoptin 表达情况见图 2。

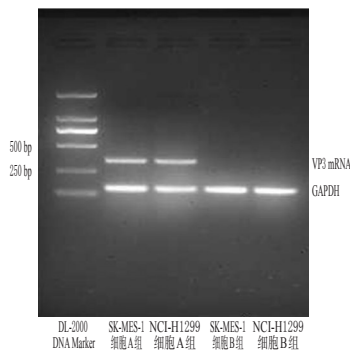


图1 逆转录-PCR法检测细胞中VP3 mRNA的表达情况
Fig 1 The VP3 mRNA expression in the cells detected by RT-PCR method

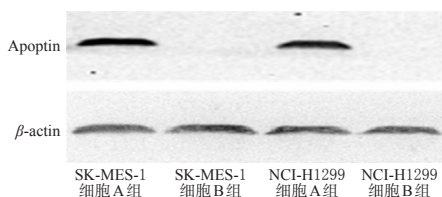


图2 Western blot法检测细胞中Apoptin的表达情况
Fig 2 The Apoptin expression in the cells detected by Western blot method

3.3 细胞超微结构观察结果

转染重组腺病毒后24~72 h通过透射电子显微镜观察的结果显示,转染细胞24、48、72 h后,SK-MES-1和NCI-H1299两组细胞均出现了细胞凋亡的超微结构改变,表现为细胞核膜表面凹凸不平,核形态不规整,核染色质边集、解离;细胞核固缩,由膜包裹的含胞质和染色质的凋亡小体形成。其中转染细胞72 h后的透射电子显微镜图见图3。

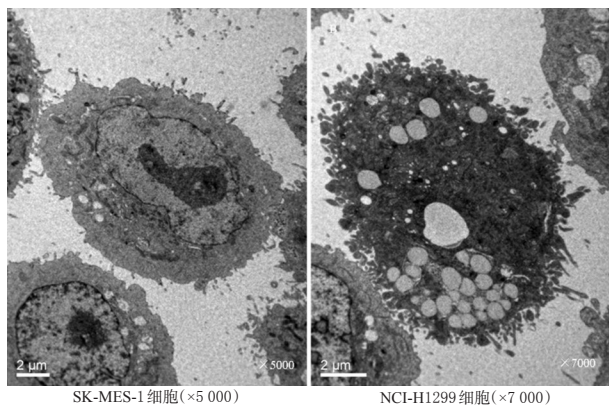


图3 转染细胞72 h后的透射电子显微镜图
Fig 3 Transmission electron micrograph 72 h after the cells were transfected

3.4 细胞增殖活性测定结果

结果显示,SK-MES-1和NCI-H1299细胞的A组细胞于转染24 h后即开始出现细胞增殖活性降低,随转染时间的延长,细胞增殖活性逐渐降低;转染96 h后A组细胞增殖活性与B组和C组比较明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。各组细胞增殖活性的测定结果见图4。

3.5 细胞的凋亡率变化

结果显示,与B、C组比较,SK-MES-1、NCI-H1299细胞的

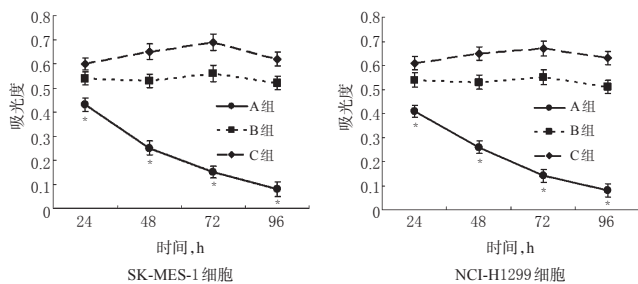


图4 各组细胞增殖活性的测定结果

注:与B、C组比较, $*P < 0.05$

Fig 4 Determination results of the proliferation activity of the cells in all groups

Note: vs. groups B and C, $*P < 0.05$

A组细胞凋亡率增加,且与转染时间呈正相关,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明VP3基因在细胞内的表达能有效诱导SK-MES-1、NCI-H1299细胞发生凋亡。各组细胞凋亡率的测定结果见图5。

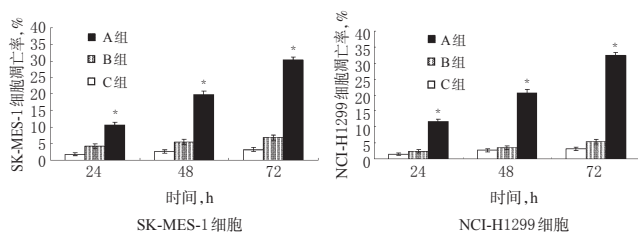


图5 各组细胞凋亡率的测定结果

注:与B、C组比较, $*P < 0.05$

Fig 5 Determination results of the apoptosis rate of the cells in all groups

Note: vs. groups B and C, $*P < 0.05$

3.6 细胞周期变化

结果显示,SK-MES-1、NCI-H1299细胞的A组S期细胞比例降低,DNA合成受阻;而G₂/M期细胞比例增加,DNA降解和异倍体细胞出现,与B组和C组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。这提示VP3可引起G₂/M期阻滞。各组细胞周期变化见表1。

表1 各组细胞周期变化($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Changes in the cycle of cells in all groups($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞	组别	细胞比例, %		
		G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
SK-MES-1	A组	58.34 ± 0.83	10.59 ± 0.52*	31.07 ± 0.67*
	B组	59.25 ± 0.55	29.37 ± 0.54	11.38 ± 0.59
	C组	60.02 ± 0.56	29.12 ± 0.68	10.86 ± 0.43
NCI-H1299	A组	63.17 ± 0.93	11.75 ± 0.49*	25.08 ± 0.63*
	B组	63.63 ± 0.78	27.05 ± 0.65	9.32 ± 0.47
	C组	64.91 ± 0.83	30.37 ± 0.57	4.72 ± 0.31

注:与B、C组比较, $*P < 0.05$

Note: vs. groups B and C, $*P < 0.05$

4 讨论

目前,肺癌是全球发病率及死亡率最高的恶性肿瘤,严重威胁着人类的生命和健康。其中非小细胞肺癌约占肺癌总数的75%~80%,5年总生存率低于15%^[9]。据原国家卫生计划生育委员会统计,近30年来我国肺癌死亡率逐年上升,增幅达

46.5%,且其仍呈持续上升的趋势。肺癌作为预后最差的恶性肿瘤之一,其早期临床诊断困难,大部分患者确诊时已属中晚期,失去手术根治的最佳时机,且手术、放疗和化疗等传统治疗手段难以达到令人满意的疗效^[4],因此探索新的非小细胞肺癌临床治疗策略成为临床研究的热点。

凋亡素是由鸡贫血病毒 VP3 基因编码的一种小分子凋亡蛋白,含有 2 个脯氨酸富含区和 2 个碱性区,其 C 端碱性区(11 个氨基酸)是核定位信号和/或 DNA 结合区域^[5];具有 2 个细胞核定位信号(NLS)功能区域,任何一个 NLS 的缺失均可导致核移位而显著降低其凋亡效应^[6]。凋亡素能够选择性地诱导人多种肿瘤细胞和转化细胞凋亡,而对正常二倍体细胞无杀伤和毒副作用;且这种凋亡效应既不依赖于 p53 介导,也不被 Bcl-2 的过表达所抑制^[7],提示凋亡素可以成为一种理想的新型抗肿瘤药物。此外有文献报道,以腺病毒载体介导凋亡素作用于多种肿瘤细胞的基因治疗,可高效地诱导肿瘤细胞发生凋亡^[8]。

目前,尽管凋亡素特异诱导肿瘤细胞凋亡的机制尚未完全明确,但不可否认,凋亡素在肿瘤基因治疗上的独特潜力使其具有广阔的抗肿瘤应用前景。研究发现,凋亡素诱导肿瘤细胞凋亡主要与其核定位效应、磷酸化调节、DNA 结合能力、与小分子蛋白之间特异性相互作用以及神经磷脂-神经酰胺调节等^[9-12]有关。此外,腺病毒载体因其独特的优点而被广泛应用于基因治疗研究,且已被美国 FDA 批准作为基因治疗载体应用于临床试验^[12]。本研究采用 Johns Hopkins 大学癌症研究中心 He 博士等构建的 AdEasy 系统,成功构建重组腺病毒载体 Adxsi-GFP-VP3,经酶切与测序鉴定证实连接正确,扩增纯化后检测病毒滴度可达 1.6×10^9 PFU/ml;其示踪剂绿色荧光蛋白(GFP)能有效追踪观察重组腺病毒的包装与 VP3 基因的表达,为本研究提供了极大方便。

在本研究中,笔者将前期成功构建的携带凋亡素基因的重组腺病毒载体 Adxsi-GFP-VP3,以最适感染复数 40 瞬时转染 SK-MES-1 细胞和 NCI-H1299 细胞。逆转录-PCR 和 Western blot 检测结果均显示,VP3 基因和 Apoptin 可在转染后的 SK-MES-1 细胞和 NCI-H1299 细胞中获得表达,这表明 VP3 能在 mRNA 水平和蛋白水平顺利表达。随后的凋亡检测结果显示,Adxsi-GFP-VP3 可有效地诱导不同的非小细胞肺癌细胞发生凋亡,转染后 72 h 后 SK-MES-1 细胞和 NCI-H1299 细胞凋亡率均为 30% 左右,与 B、C 组比较,A 组细胞凋亡率增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),这表明 VP3 在转染细胞获得表达后可显著诱导肺癌细胞凋亡。与此同时,流式细胞术检测转染后 SK-MES-1 细胞和 NCI-H1299 细胞周期变化的结果显示,A 组细胞周期变化表现为 S 期 DNA 合成受到限制,而 G₂/M 期细胞阻滞。MTT 法检测 SK-MES-1 细胞和 NCI-H1299 细胞增殖活性变化,结果发现,A 组细胞的增殖活性显著降低,并且随着转染时间呈现一定下降趋势,与 B、C 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。透射电子显微镜观察 SK-MES-1 细胞和 NCI-H1299 细胞的超微结构变化,结果发现,转染早期的细胞体积开始缩小,核染色质边集并向核膜靠拢,后期细胞核逐渐

固缩,由膜包裹的含胞质和染色质的凋亡小体形成,这进一步证实凋亡素特异性诱导肿瘤细胞凋亡与其细胞核定位密切相关。

综上所述,本研究结果表明 Adxsi-GFP-VP3 的体外表达能够明显降低 SK-MES-1 细胞和 NCI-H1299 细胞活性,并能有效诱导其发生细胞凋亡。这为凋亡素进一步的体内实验研究奠定了基础,也为凋亡素应用于非小细胞肺癌的基因治疗提供了试验依据。

参考文献

- [1] Los M, Panigrahi S, Rashedi I, et al. Apoptin, a tumor-selective killer[J]. *Bioch Bioph Acta*, 2009, 1793(8): 1335.
- [2] 阮军, 缪李丽. 凋亡素与肿瘤细胞凋亡的研究进展[J]. *中国药房*, 2014, 25(1): 82.
- [3] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69.
- [4] Zhu CQ, Pintilie M, John T, et al. Understanding prognostic gene expression signatures in lung cancer[J]. *Clin Lung Cancer*, 2009, 10(5): 331.
- [5] Backendorf C, Visser AE, de Boer AG, et al. Apoptin: therapeutic potential of an early sensor of carcinogenic transformation[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2008, 48(2): 143.
- [6] Kuusisto HV, Wagstaff KM, Alvisi G, et al. The C-terminus of apoptin represents a unique tumor cell-enhanced nuclear targeting module[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(12): 2965.
- [7] Pavet V, Portal MM, Moulin JC, et al. Towards novel paradigms for cancer therapy[J]. *Oncogene*, 2011, 30(1): 1.
- [8] 毛丽伟, 廖国清, 王亚林, 等. 放射敏感性启动子调控 Apoptin 基因表达对肺腺癌细胞的杀伤作用研究[J]. *免疫学杂志*, 2011, 28(7): 553.
- [9] Lanz HL, Florea BI, Noteborn MH, et al. Development and application of an in vitro apoptin kinase assay[J]. *Anal Biochem*, 2012, 421(1): 68.
- [10] Jiang J, Cole D, Westwood N, et al. Crucial roles for protein kinase C isoforms in tumor-specific killing by apoptin[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(18): 7242.
- [11] Maddika S, Panigrahi S, Wiechec E. Unscheduled Akt-triggered activation of cyclin-dependent kinase 2 as a key effector mechanism of apoptin's anticancer toxicity[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(5): 1235.
- [12] Kucharski TJ, Gamache I, Gjoerup O, et al. DNA damage response signaling triggers nuclear localization of the chicken anemia virus protein Apoptin[J]. *J Virol*, 2011, 85(23): 12638.

(收稿日期:2014-11-13 修回日期:2015-01-05)

(编辑:邹丽娟)