

重组腺病毒 Ad-GFP-C197 对 3 种肿瘤细胞的抑制作用研究^Δ

邬 贤^{1,2*}, 黄 莹³, 李舒婕², 段萍萍², 米鹏程¹, 陈文瑛^{1,2#} (1. 南方医科大学药学院, 广州 510515; 2. 南方医科大学第三附属医院药学部, 广州 515000; 3. 南方医科大学深圳医院药学部, 广东深圳 518000)

中图分类号 R966; R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)20-2800-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.20.14

摘要 目的: 研究以腺病毒载体系统装载人端粒酶逆转录酶 C 端片段(C197)制成的重组腺病毒 Ad-GFP-C197 对 3 种肿瘤细胞增殖的抑制作用。方法: 采用 HEK293 细胞扩增并纯化 Ad-GFP-C197。采用 Ad-GFP-C197 分别感染人胃癌细胞 SGC7901、人乳腺癌细胞 MCF7 和人结肠癌细胞 CaCO2。以空白腺病毒载体(Ad-GFP)为参比, 采用 Western blot 法检测 Ad-GFP-C197 感染后 3 种肿瘤细胞中 C197 的蛋白表达水平; 采用 MTT 法检测 Ad-GFP-C197 感染后对 3 种肿瘤细胞的抑制作用, 绘制细胞增殖曲线并计算增殖抑制率。结果: Ad-GFP 感染的 3 种肿瘤细胞中均未检测到 C197 蛋白表达, 而 Ad-GFP-C197 感染的上述细胞中 C197 蛋白均有明显表达; Ad-GFP-C197 感染后 3 种肿瘤细胞的增殖曲线随时间延长而呈明显抑制现象, 其增殖抑制率最高可达 37.31%~41.42%。结论: Ad-GFP-C197 对 SGC7901 细胞、MCF7 细胞、CaCO2 细胞增殖均有明显的抑制作用, 且起效迅速, 能够克服其他端粒酶抑制剂起效缓慢的缺点。

关键词 人端粒酶逆转录酶; 端粒酶抑制剂; 重组腺病毒; Ad-GFP-C197; 肿瘤细胞; 细胞增殖

Study on Inhibitory Effects of Recombinant Adenovirus Ad-GFP-C197 on 3 Kinds of Tumor Cells

WU Xian^{1, 2}, HUANG Ying³, LI Shujie², DUAN Pingping², MI Pengcheng¹, CHEN Wenying^{1, 2} (1. School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Dept. of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 515000, China; 3. Dept. of Pharmacy, Shenzhen Hospital of Southern Medical University, Guangdong Shenzhen 518000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the inhibitory effects of recombinant adenovirus Ad-GFP-C197, which prepared by adenovirus vector system-loading human telomerase reverse transcriptase (hTERT) C fragment (C197) on the proliferation of 3 kinds of tumor cells *in vitro*. **METHODS:** Ad-GFP-C197 was amplified and purified with HEK293 cells. Human gastric cancer cells SGC7901, human breast cancer cells MCF7 and human colorectal cancer cells CaCO2 were infected by Ad-GFP-C197 respectively. Using blank adenovirus carrier (Ad-GFP) as reference, the protein expression of C197 in 3 kinds of tumor cells infected by Ad-GFP-C197 was detected by Western blot assay. The inhibitory effects of Ad-GFP-C197 on 3 kinds of tumor cells were detected by MTT assay. The cell proliferation curve was drawn and the proliferation inhibition rate was calculated. **RESULTS:** The protein expression of C197 was not detected in 3 kinds of tumor cells infected by Ad-GFP, while significant protein expression of C197 was found in above cells infected by Ad-GFP-C197. The proliferation curves of the 3 kinds of tumor cells infected by Ad-GFP-C197 were significantly inhibited with the time extended, and the proliferation inhibitory rate reached 37.31% -41.42%. **CONCLUSIONS:** Ad-GFP-C197 shows significant inhibitory effects on the proliferation of SGC7901, MCF7 and CaCO2 cells, which is rapid to make up for the slow effect of other telomerase inhibitors.

KEYWORDS hTERT; Telomerase inhibitor; Recombinant adenovirus; Ad-GFP-C197; Tumor cell; Cell proliferation

- [16] 李向军, 王超, 王永, 等. 中药薄层色谱影响因素分析及应用[J]. 中国药业, 2011, 20(14): 13-15.
- [17] 章佳赧. 含柴胡的常用中成药中柴胡皂苷含量的测定及研究[D]. 上海: 复旦大学, 2010.
- [18] 李军, 石任兵, 刘斌, 等. 四逆散不同配伍对柴胡皂苷 a、b2 及柴胡总皂苷煎出量的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(2): 115-120.

报, 2007, 30(2): 115-120.

- [19] 阳毅, 莫伟彬, 李启畅. 甘草黄酮对运动大鼠肝组织自由基代谢及 p53 mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 245-249.
- [20] 孔繁阳, 陈真. 黄酮类化合物防治酒精性肝病的研究进展[J]. 北方药学, 2016, 13(5): 118-119.
- [21] 崔莹. 猪苓总黄酮提取工艺的研究[J]. 陕西农业科学, 2014, 60(12): 41-42, 56.
- [22] 段丽, 张永萍, 徐剑, 等. 精源胶囊的质量标准研究[J]. 中国药房, 2017, 28(9): 1231-1235.

^Δ 基金项目: 广州市天河区科技计划项目(No. 穗天科工信字[2016]19号-201604KW026)

* 药师, 硕士。研究方向: 抗肿瘤药理。电话: 020-62784812。E-mail: wuxian1991@163.com

通信作者: 主任药师, 博士。研究方向: 临床药理。电话: 020-62784827。E-mail: chenwenying2016@163.com

(收稿日期: 2017-12-13 修回日期: 2018-08-27)

(编辑: 陈宏)

端粒是位于染色体末端由串联重复碱基序列(TTAGGG)和端粒结合蛋白组成的特殊结构。在正常细胞中,端粒可随着细胞分裂而缩短,当缩短到一定程度时染色体末端会融合或降解,细胞则继而发生衰老和死亡;但在肿瘤细胞中,端粒不会随着细胞的分裂而缩短,因此肿瘤细胞才得以永生^[1-3]。端粒酶是一种由RNA模板和催化蛋白组成的核蛋白逆转录酶,能特异性地在染色体DNA末端加上碱基序列TTAGGG片段以防止端粒缩短;其在正常细胞中不表现活性,但在75%~95%的恶性肿瘤(如肺癌、胃癌、肝癌、大肠癌、肾癌、卵巢癌、乳腺癌等)组织中表现出明显活性,因此被认为是恶性肿瘤最为广泛的分子标记物^[4]。

人端粒酶主要组成包括模板RNA(hTR)和人端粒酶逆转录酶(hTERT),其以hTR作为模板在hTERT的催化作用下延伸端粒,转染hTERT基因到无端粒酶活性的正常组织细胞或肿瘤组织细胞中,可激活细胞中的端粒酶^[5]。因此,hTERT是决定端粒酶活性的主要因素^[6],其已成为肿瘤形成、生长及发展等多种效应的核心调控分子,是抗肿瘤治疗的重要靶点^[7-8]。hTERT由N端(RNA结合区)、逆转录区(催化活性区)和C端3个功能区组成,其中C端作为延长端粒的重要功能区^[9],目前相关研究较少,故本课题组对hTERT C端进行研究。

腺病毒载体系统(AdEasy-1)是一种E1区和E3区双缺失的复制缺陷型载体,主要由穿梭质粒(PAdTrack-CMV)和骨架质粒(PAdEasy-1)两部分组成,该载体可通过在细胞内的复制大大增加治疗基因的拷贝数,使治疗基因呈高水平表达;而且该载体不会整合到宿主细胞内,安全性好,是应用于临床的一种优良的基因治疗载体^[10]。本课题组在前期研究中,筛选得到hTERT C端第936~1 132位共197个氨基酸片段(命名为C197),并利用绿色荧光蛋白(GFP)标记的AdEasy-1(命名为Ad-GFP)来构建装载C197的重组腺病毒(命名为Ad-GFP-C197),结果发现C197能在细胞内高效表达;同时,Ad-GFP-C197在体内外对肿瘤细胞增殖和肿瘤组织生长均有抑制作用,且该抑制作用与其抑制端粒酶活性、下调hTERT蛋白水平、抑制NF- κ B通路中p65蛋白和I κ B α 蛋白的表达有关^[11]。本研究选取人胃癌细胞SGC7901、人乳腺癌细胞MCF7和人结直肠癌细胞CaCO2为对象,考察Ad-GFP-C197对上述3种肿瘤细胞增殖的抑制作用,为基于端粒酶的肿瘤基因治疗提供新的思路,并为进一步实现C197用于肿瘤的生物治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

BB15型CO₂细胞培养箱、FC型酶标仪(美国Thermo Fisher公司);Avanti J-30I型超速离心机(美国Beckman Coulter公司);BX43型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);1658003型电泳仪、GelDoc XR+型凝胶

成像仪(美国Bio-Rad公司);TE70XP半干转膜仪(美国Hoefler公司);T25培养瓶(美国Corning公司);Beckman离心管(香港弗科斯科有限公司);MD27透析袋(美国Viskase公司);FFC58暗盒(广州碧云天有限公司);JB-CJ-1500FX型超净工作台(苏州佳宝净化工程设备有限公司)。

1.2 试剂

重组腺病毒Ad-GFP-C197、不含C197的空白腺病毒Ad-GFP(本实验室自制,液氮保存);胎牛血清、1%双抗(青霉素-链霉素)(法国Biowest公司);氯化铯(CsCl,上海华蓝化学科技有限公司);DMEM培养基(美国Gibco公司);蛋白提取试剂盒(美国Omega公司);二甲基噻唑蓝(MTT,德国Sigma公司);鼠抗His抗体、羊抗鼠IgG抗体、内参GAPDH抗体(美国Santa Cruz公司);磷酸盐缓冲液(PBS,pH 6.8)、显影粉、定影粉、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(上海史瑞克生物科技有限公司);其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 细胞

人胚胎肾细胞系HEK293细胞、人胃癌SGC7901细胞、人乳腺癌MCF7细胞和人结直肠癌CaCO2细胞均购自上海信然生物科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

取HEK293细胞、SGC7901细胞、MCF7细胞和CaCO2细胞,在含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的DMEM培养基(以下简称“培养液”)中,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下常规培养(以下培养条件相同),待细胞生长至对数生长期时,取生长状态良好的细胞进行试验。

2.2 Ad-GFP-C197的扩增、纯化及滴度测定

2.2.1 Ad-GFP-C197扩增 将HEK293细胞铺于培养瓶中,细胞密度为 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个/mL,分别加入培养液2 mL,常规培养48 h后取出。取出液氮中保存的Ad-GFP-C197,在冰浴中融化后加入培养瓶,常规培养过夜。次日取出培养瓶,在倒置荧光显微镜下观察病毒感染情况(镜下可见感染病毒的细胞呈绿色彗星状)。培养3~5 d后,待1/3的细胞感染病毒时,回收细胞,在4 $^{\circ}$ C条件下以1 000 r/min离心10 min;取下层5 mL液体重悬细胞,将重悬后的细胞反复冻融(-80~37 $^{\circ}$ C)3次后即得病毒原液。

2.2.2 Ad-GFP-C197纯化 取Beckman离心管数根,用75%乙醇浸泡30 min后,于超净工作台风干。在每根Beckman管中先后加入不同浓度的CsCl溶液(4.2 mol/L)2 mL,再在最上层加入“2.2.1”项下制得的病毒原液1 mL,然后在4 $^{\circ}$ C条件下以20 000 r/min真空离心2 h。离心后小心取出,在超净工作台中,以5 mL注射器插入至Beckman管乳白色病毒带处,吸出病毒带液体。病毒带液体采用透析袋MD27(分子量:3 500 Da)于4 $^{\circ}$ C条件下

在600 mL透析液(含10%甘油的0.01 mol/L PBS)中搅拌透析,每6 h更换一次透析液,24 h后收集透析后的纯化病毒并分装,于-80 °C储存备用^[12]。

2.2.3 病毒滴度的测定 取纯化后 Ad-GFP-C197 和 Ad-GFP,用PBS分别稀释 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 共6个梯度(即分别稀释 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 倍)。将HEK293细胞铺于24孔板中,每孔 5×10^5 个细胞,常规培养。待细胞贴壁后,分为 Ad-GFP-C197 组和 Ad-GFP 组,分别加入不同梯度的 Ad-GFP-C197 溶液和 Ad-GFP 溶液(50 μ L/孔),继续常规培养48 h。各个梯度均设置3个复孔。常规培养完毕后,在倒置荧光显微镜下计数视野中的荧光细胞,每孔计数3个视野,以每个视野20~50个荧光细胞为最佳^[13]。根据荧光细胞数,按照公式计算病毒滴度:滴度(PFU/mL)=(每个视野的荧光细胞数 \times 每个孔的视野数)/(加入的病毒液体积 \times 稀释梯度)。根据滴度测定结果,按实际需要的感染复数(MOI),以PBS将病毒稀释至相应浓度,进行后续试验。

2.3 Ad-GFP-C197感染后3种肿瘤细胞中C197蛋白的表达水平检测

采用Western blot法测定C197蛋白的表达水平。试验分为SGC7901细胞组、MCF7细胞组和CaCO2细胞组,将上述3种细胞分别铺于培养瓶中,每瓶 2×10^6 个细胞,常规培养48 h;按MOI为100,分别采用 Ad-GFP-C197 和 Ad-GFP 感染上述细胞,继续常规培养48 h。收集感染后的3组肿瘤细胞,分别用蛋白提取试剂盒提取收集细胞蛋白,再经SDS-PAGE电泳、转膜后,置于5%脱脂奶粉封闭液中封闭1 h;先后加入一抗(鼠抗His抗体,1:2 000)、内参GAPDH抗体(1:2 000)和二抗(羊抗鼠IgG抗体,1:3 000),于4 °C孵育1 h后,用PBS洗脱3次。在暗室中用暗盒进行压片,经显影后曝光得胶片,晾干后拍照保存。采用Image J 1.48软件分析目标蛋白条带的灰度值以表示蛋白表达水平,重复分析3次,绘制柱状图。

2.4 Ad-GFP-C197感染后3种肿瘤细胞的增殖抑制率检测

采用MTT法^[14]测定细胞增殖抑制率。按“2.3”项下分组,将SGC7901细胞、MCF7细胞和CaCO2细胞分别铺于96孔板中,每孔 1×10^4 个细胞,每种细胞设置6个复孔,共铺7块板。按MOI为100,分别采用 Ad-GFP-C197 和 Ad-GFP 感染上述细胞,常规培养。每隔24 h取1块板,弃去培养基,每孔加入5 mg/mL MTT溶液20 μ L培养4 h后,吸弃孔内溶液,加入二甲基亚砷150 μ L,振荡10 min,使结晶物溶解。采用酶标仪在495 nm波长处测定吸光度(OD值),并对OD值-时间绘制细胞增殖曲线图,其中OD值越低,则表明细胞增殖受抑制程度越高;同时,按公式计算不同时间点的细胞增殖抑制率[抑制率(%)=(OD_{Ad-GFP}-OD_{Ad-GFP-C197})/OD_{Ad-GFP} \times 100%]。

2.5 统计学方法

试验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用GraphPad Prism 5统计作图软件进行统计学分析。组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Ad-GFP-C197扩增、纯化及滴度测定结果

3.1.1 扩增结果 Ad-GFP-C197感染HEK293细胞后第2天,显微镜下可见彗星状绿色荧光细胞(见图1),表明感染成功,Ad-GFP-C197能在细胞中复制;第5天时能观察到有三分之一的细胞被感染。

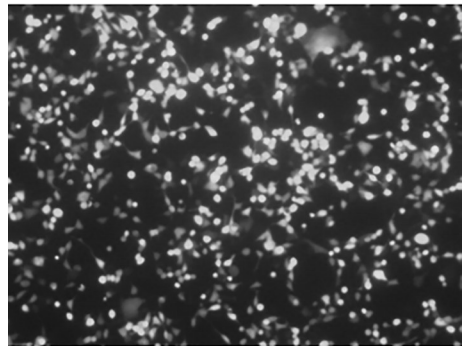


图1 Ad-GFP-C197感染HEK293细胞后的荧光显微镜图($\times 100$)

Fig 1 Fluorescent image of HEK293 cells after infected by Ad-GFP-C197($\times 100$)

3.1.2 纯化结果 经超速离心后,可在离心管中明显观察到一条清晰的乳白色病毒条带。

3.1.3 滴度测定结果 经检测,Ad-GFP-C197的滴度为 3.14×10^{11} PFU/mL,Ad-GFP的滴度为 2.10×10^{11} PFU/mL。

3.2 Ad-GFP-C197感染后肿瘤细胞内C197蛋白表达情况

Ad-GFP感染的SGC7901细胞、MCF7细胞和CaCO2细胞中均未检测到C197蛋白的表达,而Ad-GFP-C197感染的上述3种肿瘤细胞中C197蛋白均有明显表达。蛋白表达电泳图见图2,灰度值柱状图见图3(注:由于Ad-GFP感染细胞的C197蛋白表达均为阴性结果,因此只提供SGC7901细胞感染后的结果)。

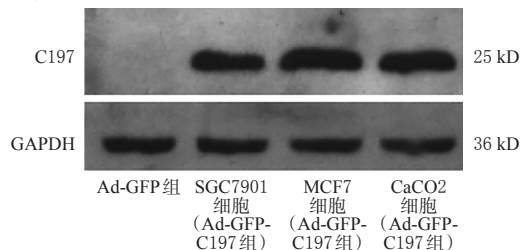
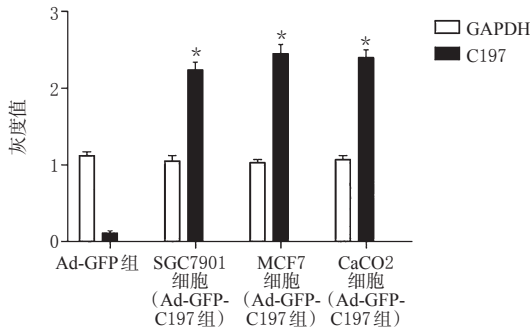


图2 3种肿瘤细胞中的C197蛋白表达电泳图

Fig 2 Electrophorogram of C197 protein expression in 3 kinds of tumor cells

3.3 Ad-GFP-C197感染后肿瘤细胞的增殖抑制情况

与Ad-GFP比较,Ad-GFP-C197感染后3种肿瘤细胞的增殖曲线均表现出抑制现象,SGC7901细胞、MCF7细胞均在第2天开始表现出受到抑制,CaCO2细胞在第



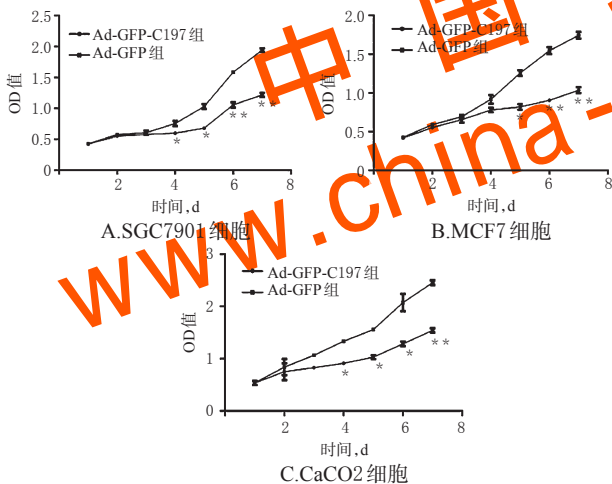
注:与GAPDH比较, * $P < 0.05$

Note: vs. GAPDH, * $P < 0.05$

图3 C197蛋白在3种肿瘤细胞中表达水平的灰度柱状图($n=3$)

Fig 3 Grayscale columnar of C197 protein expression levels in 3 kinds of tumor cells ($n=3$)

3天开始表现出受到抑制;3种肿瘤细胞的OD值分别从第4、5、4天开始组间差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见图4。此外,随作用时间的延长,3种肿瘤细胞的增殖抑制率均呈升高趋势;第3、4天时, CaCO2细胞增殖抑制率较其他2种细胞显著更高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);第6、7天时, MCF7细胞增殖抑制率较其他2种细胞显著更高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);3种肿瘤细胞的增殖抑制率最高可达37.31%~41.42%,详见表1。以上结果表明, Ad-GFP-C197对3种肿瘤细胞均有显著的增殖抑制作用。



注:与Ad-GFP感染细胞比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. cells infected by Ad-GFP, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图4 感染后3种肿瘤细胞的增殖曲线($n=6$)

Fig 4 Proliferation curve of 3 kinds of tumor cells after infection ($n=6$)

4 讨论

肿瘤细胞与正常细胞的最大区别之一是90%以上的肿瘤细胞表现出端粒酶活性,而端粒酶可以延长端粒,使肿瘤细胞得以永生,因此其成为区别肿瘤细胞与正常细胞的重要标志之一^[15-16]。端粒酶除了能通过延长端粒促进肿瘤生长外,还能通过与Wnt信号通路的

表1 感染后不同时间点3种肿瘤细胞的增殖抑制率比较($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

Tab 1 Comparison of the inhibitory rates of 3 kinds of tumor cells after infection at different time points ($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

时间点	SGC7901细胞	MCF7细胞	CaCO2细胞
第1天	1.64 ± 0.04	1.88 ± 0.14	2.20 ± 1.03
第2天	4.68 ± 0.46	6.43 ± 0.35	10.71 ± 0.55
第3天	4.61 ± 0.21	5.35 ± 1.08	22.16 ± 5.43* ^{###}
第4天	20.79 ± 0.79	14.94 ± 0.27	31.78 ± 2.89* [#]
第5天	33.98 ± 1.46	34.71 ± 3.09	33.85 ± 0.88
第6天	33.31 ± 3.89	41.42 ± 0.94* ^Δ	38.11 ± 0.49
第7天	37.31 ± 6.09	40.62 ± 7.69* ^Δ	37.23 ± 7.02

注:与SGC7901细胞比较, * $P < 0.05$;与CaCO2细胞比较, $^{\Delta}P < 0.05$;与MCF7细胞比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{###}P < 0.01$

Note: vs. SGC7901 cells, * $P < 0.05$; vs. CaCO2 cells, $^{\Delta}P < 0.05$; vs. MCF7 cells, $^{\#}P < 0.05$, $^{###}P < 0.01$

β -catenin及转录因子Brg1结合,发挥促进肿瘤发生相关靶基因(如*c-myc*)表达^[17-18]、调节细胞周期^[19]、抑制活性氧簇(ROS)诱导的细胞凋亡^[20]等作用。

人端粒酶主要由hTR、有逆转录活性的hTERT和端粒相关蛋白组成, hTERT是人端粒酶活性的限速酶,其表达异常增加通常被认为是肿瘤发生的前期标志^[21]。hTERT含有1132个氨基酸,主要有3个功能部分,即与hTR结合的N端、逆转录区、与DNA结合的C端。hTERT C端是端粒酶与染色体末端DNA 3'端悬突结合的功能区,是端粒酶活性的重要部分^[22]。与高度保守的逆转录区不同, C端同源性较弱、保守性较低,是hTERT与其他逆转录酶的主要区别之一,也是特异性抑制端粒逆转录酶的重要靶位^[23]。hTERT的C端含有多个结合位点和定位区,也是其在细胞内进行端粒末端复制所必需的结构域,因此笔者推测,当C197在细胞内大量表达后,因为其含有相应的结合位点,能竞争性与hTERT的底物DNA 3'端悬突结合,从而抑制细胞内hTERT活性,使细胞内的hTERT无法结合到Wnt通路启动子上,使该通路受到抑制,进而起到抗肿瘤作用。基于此,本课题组选择C197进行肿瘤细胞抑制作用研究。

目前抑制端粒酶活性的抗肿瘤化合物有很多,如端粒酶抑制剂GRN163L、G-四联体稳定剂Telomestatin等。其中GRN163L已进入II期临床试验,但进展缓慢,效果也难以令人满意,这是因为端粒酶抑制剂作用于端粒酶后需要较长的时间才能表现出明显的抑制作用,这一过程一般需要20d左右,而在体内给药时这一过程更长^[24]。在这个漫长的过程中,许多肿瘤细胞的端粒依然得以维持或代偿,使得上述抗肿瘤化合物难以发挥抑制端粒酶的理想效果^[25]。

本课题组前期研究对Ad-GFP-C197的表达载体进行设计时,在C197的N端加上了6个His标签,这不但有利于检测C197基因片段的表达,而且便于后续蛋白纯化^[11]。本研究发现, Ad-GFP-C197感染后, C197在

SGC7901 细胞、MCF7 细胞、CaCO2 细胞中均能高水平地表达;而且上述3种细胞的增殖均受到显著抑制,且从第2~3天起即开始表现出增殖抑制现象,起效迅速。这表明,Ad-GFP-C197 克服了其他端粒酶抑制剂起效慢的缺点,能够迅速发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用。

综上所述,Ad-GFP-C197 能够在 SGC7901 细胞、MCF7 细胞、CaCO2 细胞中高水平表达 C197,且对3种肿瘤细胞均有显著且迅速的增殖抑制作用。但 C197 能否对肿瘤细胞中 hTERT 的表达也产生影响尚不完全明确,其抗肿瘤作用机制还需后续进一步研究。

参考文献

- [1] SHAY JW, BACCHETTI S. A survey of telomerase activity in human cancer[J]. *Eur J Cancer*, 1997, 33(5): 787-791.
- [2] PIATYSZEK MA, KIM NW, WEINRICH SL, et al. Detection of telomerase activity in human cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) [J]. *Methods in Cell Science*, 1995, 17(1): 1-15.
- [3] 黄金,张胜平,邓兴力,等. 胶质瘤的端粒酶研究进展[J]. *医学综述*, 2010, 16(13): 1929-1931.
- [4] BOSCOLO-RIZZO P, MOSTO MCD, RAMPAZZO E, et al. Telomeres and telomerase in head and neck squamous cell carcinoma: from pathogenesis to clinical implications [J]. *Cancer Metast Rev*, 2016, 35(3): 457-474.
- [5] ARNDT GM, MACKENZIE KL. New prospects for targeting telomerase beyond the telomere[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(8): 508-524.
- [6] LIU Z, LI Q, LI K, et al. Telomerase reverse transcriptase promotes epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like traits in cancer cells[J]. *Oncogene*, 2013, 32(36): 4203-4213.
- [7] AUTEXIER C, LUE NF. The structure and function of telomerase reverse transcriptase[J]. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 493-517.
- [8] YANG G, LI J, ZHANG X, et al. Eimeria tenella: cloning and characterization of telomerase reverse transcriptase gene[J]. *Exp Parasitol*, 2010, 124(4): 380-385.
- [9] WICK M, ZUBOV D, HAGEN G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) [J]. *Gene*, 1999, 232(1): 97-106.
- [10] CONG TC, LU ZM, LI Y, et al. High efficient generation of replication-defective adenoviruses containing thymidine kinase by homogeneous recombination in bacteria[J]. *Chin Med J: Engl*, 2007, 20(18): 1622-1625.
- [11] WU X, CHEN J, CAO Y, et al. Antitumor effect of COOH-terminal polypeptide of human TERT is associated with the declined expression of hTERT and NF- κ B p65 in HeLa cells[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(6): 2909-2916.
- [12] 李培建,李兵仓. 一种重组腺病毒载体的扩增、纯化和病毒滴度检测方法[J]. *中华神经医学杂志*, 2002, 1(1): 52-55.
- [13] 孙鹏宇,张艳玲,荆玉明,等. 腺病毒滴度不同测定方法比较[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(2): 234-238.
- [14] BURTON JD. The MTT assay to evaluate chemosensitivity [J]. *Methods Mol Med*, 2005, 110: 69-78.
- [15] 刘惠芬,李峰,彭东旭,等. 端粒、端粒酶及靶向抗衰老研究[J]. *现代预防医学*, 2017, 44(3): 557-559.
- [16] PARKS JW, STONE MD. Single-molecule studies of telomeres and telomerase[J]. *Annu Rev Biophys*, 2017, 46: 357-377.
- [17] ZHANG Y, TOH L, LAU P, et al. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a novel target of the Wnt/ β -catenin pathway in human cancer[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(39): 32494-32511.
- [18] TANG B, XIE R, QIN Y, et al. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promotes gastric cancer invasion through cooperating with c-Myc to upregulate heparanase expression[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 11364-11379.
- [19] MUKHERJEE S, FIRPO EJ, WANG Y, et al. Separation of telomerase functions by reverse genetics[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(50): E1363-E1371.
- [20] NITTA E, YAMASHITA M, HOSOKAWA K, et al. Telomerase reverse transcriptase protects ATM-deficient hematopoietic stem cells from ROS-induced apoptosis through a telomere-independent mechanism[J]. *Blood*, 2011, 117(16): 4169-4180.
- [21] HUNGER RE, KERNLAND LK, MARKOWSKI CJ, et al. Vaccination of patients with cutaneous melanoma with telomerase specific peptides[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60(11): 1553-1564.
- [22] KYO S, TAKAKURA M, TAIRA T, et al. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(3): 669-677.
- [23] BANIK SS, GUO C, SMITH AC, et al. C-terminal regions of the human telomerase catalytic subunit essential for in vivo enzyme activity[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(17): 6234-6246.
- [24] MARTÍNEZ P, BLASCO MA. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(3): 161-176.
- [25] HARLEY CB, FUTCHER AB, GREIDER CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts[J]. *Nature*, 1990, 345(6274): 458-460.

(收稿日期:2018-01-24 修回日期:2018-08-24)

(编辑:段思怡)