

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.01.011

· 基础研究 ·

包载 TIMP-1 重组腺病毒微球的制备及其对肝癌细胞增殖的抑制

夏冬¹, 吴斌¹, 梁建群¹, 余少鸿², 徐亮¹ (1. 泸州医学院附属医院普外科, 四川泸州 646000; 2. 重庆市涪陵中心医院肝胆外科, 重庆 400800)

[摘要] 目的: 制备携带人基质金属蛋白酶组织抑制因子-1 (tissue inhibitors of metalloproteinase-1, TIMP-1) 的重组腺病毒乳酸聚乙烯醇 (poly-DL-lactide-poly, PELA) 微球, 探讨其对 HepG2 肝癌细胞增殖的影响。方法: 采用溶剂挥发法双乳液体系, 以可降解的生物材料 PELA 包被携带 TIMP-1 基因的重组腺病毒制成微球, 测定其粒径、载病毒量、包封率及释放规律。重组腺病毒微球感染 HepG2 细胞, 荧光显微镜观测感染效率, 透射电镜观测超微结构, 半定量 RT-PCR 检测 TIMP-1 mRNA 表达; MTT 法检测 HepG2 细胞增殖。结果: 成功构建包载 TIMP-1 重组腺病毒的 PELA 微球, 直径约 1.965 μm , 包封率为 60%, 载病毒量为 10.5×10^8 efu/mg, 在 120 h 内释放病毒量接近 60%, 总的释放时间长于 240 h。空白微球无毒性 PELA 病毒微球感染 HepG2 细胞后, 细胞稳定表达 TIMP-1 mRNA; 对 HepG2 细胞的增殖有明显抑制作用, 抑制率表达 47%。结论: 包载 TIMP-1 重组腺病毒的 PELA 微球可抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖, 为化学高分子载体运载基因治疗肝癌提供了实验依据。

[关键词] 肝肿瘤; 基质金属蛋白酶组织抑制因子; 腺病毒; 微球; 基因治疗

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)01-0057-05

Preparation of microsphere encapsulating recombinant TIMP-1 adenovirus and its inhibitory effects against hepatocellular carcinoma cells

XIA Dong¹, WU Bin¹, LIANG Jian-qun¹, YU Shao-hong², XU Liang¹ (1. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Fuling Central Hospital, Chongqing 400800, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare poly-DL-lactide-poly (PELA) microspheres encapsulating recombinant tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1) adenovirus, and to investigate their effects on the proliferation of hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Methods:** The microsphere was constructed by encapsulating recombinant adenovirus containing TIMP-1 in biodegradable PELA. The diameter of the microsphere, quantity of virus encapsulated, loading rate, and releasing kinetics were measured. HepG2 cells were infected with the microspheres; the infection efficiency was examined by fluorescent microscope; and the ultrastructure was observed by TEM. The expression of TIMP-1 mRNA in HepG2 cells was examined by semi-quantitative RT-PCR, and the proliferation of HepG2 cells was detected by MTT assay. **Results:** The microsphere encapsulating recombinant TIMP-1 adenovirus was successfully constructed, with its diameter, entrapment efficiency, and virus loading rate being 1.965, 60.0%, and 10.5×10^8 /mg, respectively. About 60% of the viruses were released within 120 h, and the total releasing time was longer than 240 h. Infection with rAdTIMP-1 PELA microsphere efficiently induced TIMP-1 expression in HepG2 cells, and significantly inhibited the proliferation of HepG2 cells, with the inhibitory rate being 47%. **Conclusion:** PELA microsphere encapsulating recombinant TIMP-1 adenovirus can markedly inhibit the proliferation of HepG2 cells, which provides an experimental basis for the combining macromolecular chemistry and gene therapy for treatment of hepatocellular carcinoma.

[Key words] hepatocellular carcinoma; tissue inhibitors of metalloproteinase; adenovirus; microsphere; gene therapy

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(1): 57-61]

[基金项目] 四川省教育厅课题资助 (No. 2006B108); 四川省卫生厅课题资助 (No. 090210)。Project supported by the Education Department Foundation of Sichuan Province (No. 2006B108), and the Health Department Foundation of Sichuan Province (No. 090210)

[作者简介] 夏冬 (1975 -), 男, 四川省南充市人, 医学博士, 讲师, 主要从事普通外科的基础与临床研究

[通信作者] 徐亮 (XU Liang, Corresponding author), E-mail: xiadong19750411@163.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的恶性肿瘤,局部浸润和远处转移是影响HCC预后的主要因素。基底膜(basal membrane, BM)的破坏以及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解是肝癌细胞浸润和转移的关键因素。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)及其抑制物(tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP)在此过程中起着关键作用, MMPs具有降解ECM的作用,而TIMP则通过抑制MMPs的活性抑制ECM的降解^[1]。本研究应用可降解的生物材料聚乳酸-聚乙烯醇(poly-DL-lact-poly, PELA)包被携带TIMP-1基因的重组腺病毒制成微球,感染人肝癌细胞HepG2并实现体外表达,观察该包被微球上调TIMP-1表达对HepG2细胞体外增殖的影响,为化学高分子载体与基因治疗结合应用于肝癌治疗提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 主要实验材料

腺病毒载体AdEasy系统系Johns Hopkins肿瘤中心的何桐川博士惠赠,其骨架质粒pAdEasy-1(Ampr)为E1区和E3区缺失的5型野生型腺病毒基因组质粒,穿梭质粒pAdTrack-CMV(Knar)携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因。限制性内切酶Kpn I、Hind III、Pme I及Pac I购自New England Biolabs公司。鼠抗人TIMP-1单克隆抗体购自Santa Cruz公司。MTT、DMSO购自Sigma公司。人胚肾细胞(293)及人肝癌细胞(HepG2)购自中科院上海细胞生物所。PELA由中科院成都有机化学研究所合成。Wistar大鼠(雄性成年鼠,体重约250~300 g)由四川大学华西医学动物实验中心提供(动物合格证号为川实动管质第58号)。

1.2 重组腺病毒rAdTIMP-1的构建^[2]

取新鲜HCC组织提取总RNA, RT-PCR扩增TIMP-1cDNA。测序正确后与pAdTrack-CMV同时行Kpn I和Hind III双酶切,将TIMP-1正向克隆至pAdTrack-CMV,构建成重组穿梭质粒pAdTrack-CMV-TIMP-1。再将其经Pme I酶切线性化,转化已转入骨架质粒pAdEasy-1的感受态BJ5183发生同源重组,生成重组腺病毒质粒pAdTIMP-1。Pac I酶切线性化,脂质体法转染293细胞,适时监测GFP表达。48~72 h后即有重组腺病毒AdTIMP-1生成,6~7 d后,收集上清(含AdTIMP-1)反复感染293细胞,直至达到理想的病毒滴度。

1.3 腺病毒微球的制备

以改进的溶剂挥发法双乳液体系($W_1/O/W_2$)

制备病毒微球。腺病毒水溶液配制 W_1 (内水相),二氯甲烷溶解PELA成20%溶液(200 g/L)配制 O (油相),2.0%聚乙烯醇(PVA)水溶液(20 g/L)配制 W_2 (外水相)。将腺病毒水溶液加至PELA二氯甲烷液中,搅拌(1 500 r/min)1 h,加入PVA水溶液中,搅拌(1 500 r/min)4 h,溶剂抽提法(50 g/L的异丙醇溶液)除去有机溶剂。离心($4\ 360 \times g$)8 min,然后双蒸水洗涤,共3次,冷冻干燥得腺病毒微球粉末。

1.4 腺病毒微球理化性质的测定及其病毒释放曲线

取2 mg微球粉末在蒸馏水中超声分散30 min,激光粒度衍射仪测定平均粒径、标准偏差及分布曲线。水化微球,空气干燥,扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察微球的表面形态及分散状态。测定微球包裹后剩余液中病毒的滴度,与前述病毒原液中病毒滴度相比较,按下式计算包封率及载病毒率:

$$\text{包封率}(\%) = \frac{(\text{病毒原液的病毒滴度} \times \text{液体量}) - (\text{剩余液的病毒滴度} \times \text{液体量})}{(\text{病毒原液的病毒滴度} \times \text{液体量})} \times 100\%$$

$$\text{载病毒率}(\%) = \frac{(\text{病毒原液的病毒滴度} \times \text{液体量}) - (\text{剩余液的病毒滴度} \times \text{液体量})}{\text{微球质量}} \times 100\%$$

取腺病毒微球溶于DMEM液(含10%小牛血清,青霉素/链霉素100 IU/ml),37℃搅拌,室温下1 500×g离心,吸取上清,更换培养液,荧光计数法分别测定0、24、48、72、96、120、144、168、192、216、240 h病毒的滴度,绘制病毒释放曲线。

1.5 毒性实验检测空白微球的毒性

将10只Wistar大鼠随机分为2组,分别以空白微球悬液(3.0×10^{11} efu/ml)、注射用生理盐水腹腔内注射,分笼饲养,观察大鼠的一般情况及存活期。

1.6 腺病毒微球感染HepG2细胞

取对数生长期的HepG2,常规消化,以 1×10^5 个/孔细胞接种于24孔培养板上,培养过夜后分别加入0.01、0.1、1、10、100 mg重组腺病毒微球。HepG2细胞在36~48 h出现病理效应,分别于48、120 h后弃液,倒置培养板于荧光显微镜下计数绿色荧光细胞(即GFP阳性细胞),同时计数细胞总数,两者之比即为感染效率。半定量RT-PCR检测TIMP-1 mRNA在培养48、120及240 h后的表达(以 β -actin为内参照)。于感染后48 h收集 1×10^6 个细胞,离心弃液,常规固定、脱水,环氧树脂包埋,超薄切片作透射电镜(transmission electron microscope, TEM)观察。

1.7 细胞计数法建立腺病毒微球感染后细胞的生长曲线

将感染腺病毒微球、空白微球的 HepG2 细胞及对照组 HepG2 细胞,分别以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板上,各组每天定时取 4 孔细胞,胰酶消化,制成细胞悬液,在改良 Neubauer 型计数板上计数细胞,取平均值,连续 6 d。以时间为横轴,细胞计数为纵轴,绘制细胞生长曲线。

1.8 MTT 实验检测腺病毒微球感染后细胞的增殖

将腺病毒微球 (3.5×10^{11} efu/ml)、空白微球分别感染 HepG2 细胞,次日消化后以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板上,分别设复孔,空白组为不含细胞的培养基,对照组为未感染病毒的 HepG2。加入 MTT 至终质量浓度 0.5 mg/ml,于 37 °C、5% CO₂ 培养 24 h,终止反应,加入 DMSO,酶联免疫检测仪于 490 nm 处测 D 值。按下式测得细胞增殖率:增殖率 (%) = (实验孔 D - 空白孔 D) / (对照孔 D - 空白孔 D) × 100%。

1.9 统计学处理

应用 SPSS11.5 软件进行统计学分析,多组间比较采用随机分组单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 腺病毒 AdTIMP-1 的获得及其病毒滴度

RT-PCR 合成 TIMP-1 的全长 cDNA,测序结果与 GenBank 一致。将其正向克隆到 pAdTrack-CMV 上,与 pAdEasy-1 在 BJ5183 受体菌中同源重组,生成携带 TIMP-1cDNA 的 AdTIMP-1。经 293 细胞包装,病毒滴度达 5×10^{11} efu/ml。

2.2 腺病毒微球的形态、理化性质及体外释放特征

扫描电子显微镜下见腺病毒微球呈圆球状,大小均匀,形态规则,微球间分散性好,无明显黏连(图 1)。激光粒度衍射仪测定微球平均粒径呈正态分布:50% 微球的粒径为 1.965 μm, <10% 的粒径为 1.250 μm, >40% 的粒径为 3.320 μm,微球平均间距为 1.360 μm。包封前病毒原液滴度为 3.5×10^{11} efu/ml,包封时加入病毒液量为 5 ml,包封后剩余液病毒滴度为 1.4×10^9 efu/ml,包封后剩余液量为 500 ml,包封时加入 PELA 重量为 1 000 mg,计算所得包封率为 60%,载病毒率为 10.5×10^8 efu/mg。腺病毒微球在 37 °C、DMEM 培养液中 120 h 内释放病毒量接近 60%,总的释放时间长于 240 h。

2.3 空白微球基本无毒性

20 只 Wistar 大鼠腹腔内分别注射空白微球悬

液及注射用生理盐水后,一般情况良好,未见活动异常、精神饮食不佳、脱毛等现象。观察 4 周后,未见动物死亡,实验组与对照组无差异,提示微球无毒,不良反应小,符合微球制剂体内应用的要求。

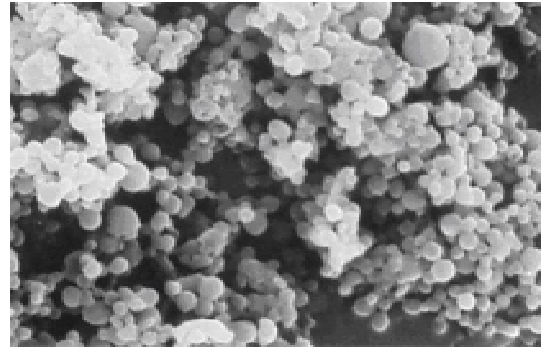


图 1 包载 TIMP-1 重组腺病毒微球的超微结构(SEM, × 2 500)
Fig. 1 Ultrastructure of microspheres encapsulating recombinant TIMP-1 adenovirus(SEM, × 2 500)

2.4 腺病毒微球成功感染 HepG2 细胞及其鉴定

腺病毒微球感染 HepG2 细胞 12 ~ 24 h 即出现细胞萎缩、脱落,36 ~ 48 h 细胞完全病变。随病毒量的倍增,其对 HepG2 的感染效率亦增加,当病毒量 >10 mg 时,感染效率可达 90% 以上。透射电镜观察,与未感染病毒微球的 HepG2 相比,细胞质内存在大量黑色、高电子密度的颗粒,即为转染成功的腺病毒(图 2)。

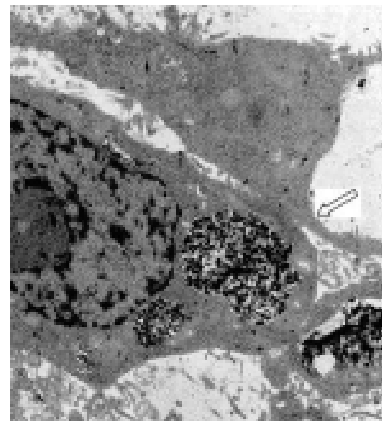


图 2 HepG2 细胞胞质中感染重组腺病毒微球(TEM, × 8 000)
Fig. 2 Microsphere granules (↓) in HepG2 cells infected with recombinant adenoviral microspheres (TEM, × 8 000)

2.5 腺病毒微球感染后 HepG2 细胞 TIMP-1 mRNA 的表达

半定量 RT-PCR 显示,腺病毒微球感染 HepG2

细胞后,细胞中 TIMP-1 mRNA 的表达强度在从 24 到 240 h 间仅略有下降,提示重组腺病毒微球携带的 TIMP-1 基因可在一定时间内稳定表达(图 3),并与腺病毒微球的释放时间相一致,更能够保证微球作用的长效及缓释。

2.6 腺病毒微球感染抑制 HepG2 细胞的生长

从细胞生长曲线可以看到,d 3 到 d 6,3 组细胞均处于对数生长期,细胞倍增时间为 18 ~ 24 h。腺病毒微球组细胞数明显低于空白微球组及对照组,说明重组腺病毒微球携带 TIMP-1 对肝癌细胞 HepG2 的增殖有抑制作用($P < 0.05$,图 4)。以空白微球组细胞增殖率为 100%,则腺病毒微球组细胞增殖率仅为 53%,提示重组腺病毒微球携带 TIMP-1 对 HepG2 细胞有增殖抑制作用($P < 0.05$)。

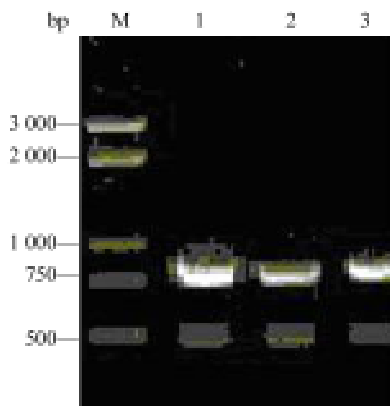


图 3 重组腺病毒微球感染诱导 HepG2 细胞 TIMP-1 mRNA 的表达

Fig. 3 Recombinant adenoviral microspheres infection induced TIMP-1 mRNA expression in HepG2 cells

M: DL 3 000 marker; 1: 24 h after infection; 2: 120 h after infection; 3: 240 h after infection

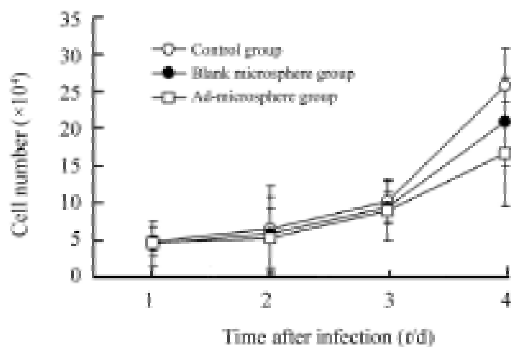


图 4 重组腺病毒微球感染抑制 HepG2 细胞的生长
Fig. 4 Recombinant adenoviral microspheres infection inhibited growth of HepG2 cells

* $P < 0.05$ vs control group or blank microsphere group

3 讨论

每年全球肝癌发病率位居恶性肿瘤的第 5 位,病死率位居第 3 位^[3],肝癌患者的 55% 分布在中国。我国 HCC 占到肝癌的 90%。HCC 恶性程度高、转移率高,预后极差,而浸润和转移中关键的一步可能正是降解 ECM 而致 BM 破坏。MMPs 和 TIMPs 是两组功能拮抗的蛋白酶,两者之间保持平衡是维持 ECM 内环境稳定的决定因素,ECM 降解、BM 破坏而致肿瘤转移是 MMPs-TIMPs 平衡失控的结果^[4-7]。TIMPs 常由分泌 MMPs 的同一细胞合成,可特异性地封闭其催化活性部位,在 ECM 重塑和肿瘤的侵袭、转移中发挥重要作用。目前已知 4 种 TIMPs,分别命名为 TIMP-1, -2, -3, -4,在肝脏中只发现 TIMP-1 和 TIMP-2 表达。TIMP-1 是相对分子质量为 285 000 的分泌型糖蛋白,可与几乎所有胶原酶形成 1:1 的复合物而抑制其活性。

腺病毒载体(adenovirus vector)是基因治疗常用的病毒载体^[8-9],具有感染能力强、滴度高、多拷贝高效性、无插入突变性、无遗传毒性等优点,其以游离型状态存在,不整合入宿主 DNA 中,感染宿主范围较广,尤其能感染复制分裂期细胞,但表达时间相对短暂,反复应用易致宿主免疫反应。希望找到一种载体,结合病毒进入宿主细胞,能延长病毒感染细胞的时间,减少反复应用导致机体的免疫反应。从理论上讲,以生物可降解的高分子材料为基质的靶向微球有望达到此要求。

现有的缓释给药系统载体包括微粒、纳米粒、微乳、亚微乳、脂质体等,结合腺病毒的理化生物学特性,选择微球作为腺病毒缓释给药系统的载体是基于:(1)腺病毒颗粒是大小约为 70 ~ 90 nm 的均一的正 20 面体,以纳米粒为载体,其包封率和载药量较低,将很难获得有效的给药;(2)选用微乳或亚微乳,腺病毒颗粒的大小将影响承载率,所加入的大量乳化剂将会降低腺病毒的活性;(3)脂质体尤其是阳离子脂质体广泛用于基因工程作为 DNA 载体,是由于其磷脂双分子层与生物膜的亲和性,但不具有缓释作用,且其转染率远低于腺病毒的转染率,加之脂质体本身不稳定,临用前进行制备,也不宜选用;(4)微球包被病毒基因载体仅见少数报道^[10],其实实验表明微球可减少病毒载体的免疫原性,并通过调节微球的大小控制病毒的释放速度,从而起到缓释效应。

聚乳酸-聚乙烯醇共聚物(PELA)是一种高分子可降解材料,由疏水性聚乳酸(PLA)与亲水性聚乙

烯醇(PEG)聚合而成,具有亲水、无毒、无免疫原性、高包封率、能提高包封物稳定性及可调节性等优点,是近年来生物材料研究的热点,已有人将其应用于包裹白蛋白、DNA、疫苗等方面^[11-12]。

本研究采用改良溶剂挥发法双乳液($W_1/O/W_2$)体系制备微球,不必长时间搅拌挥发有机溶剂,有机溶剂残留率低,病毒活性影响较小,其包封率可达60%,120 h 累积释放率亦接近60%。有研究者应用同位素标记法研究重组腺病毒微球体外释放,但由于缺乏具有生物活性的核素,常难以反映其中活性腺病毒的释放量^[13-14];用微球释放腺病毒感染293细胞,测定细胞荧光强度,虽然较核素标记法复杂、精密度较差,但可直接测得活性腺病毒的释放量,结果反较核标记法可靠。

本研究制得的微球粒径90%在3 μm 以内,平均粒径为1.965 μm ,分散性较好,平均间距为1.360 μm ,载病毒率为 10.5×10^8 efu/mg。以重组腺病毒微球感染人肝癌细胞HepG2,荧光显微镜及电镜观察到病毒转导成功。半定量RT-PCR检测提示,TIMP-1 mRNA可以在一定时间内稳定表达。MTT实验及细胞生长曲线证实重组腺病毒微球携载TIMP-1对HepG2细胞的体外增殖确有抑制作用。重组腺病毒在最初120 h内有一个较大比例的释放,且具有高度活性,继而以较慢的速度释放,总的释放时间长于240 h,从而解决了药物在体内清除过快,无法长时间、高效作用的问题。空白微球的急性毒理实验表明该法所制备的微球载体本身无毒性作用,能满足体内应用的要求。本研究利用重组微球高效、高载、缓释的特点,实现了TIMP-1基因在HCC细胞内较长时间稳定表达,并且通过上调TIMP-1表达,下调MMPs活性,进而抑制HCC细胞的生物学活性^[15]。但重组微球生效时间稍长,有待于后续试验改进。

在证实了重组腺病毒微球上调TIMP-1表达对HepG2细胞体外增殖的影响后,本研究拟将其用于HCC基因治疗的体内实验。重组腺病毒微球的成功构建及其对人肝癌细胞体外增殖的抑制,为进一步探讨HCC转移机制及基因治疗提供了技术平台和实验基础^[16]。

[参 考 文 献]

- [1] 夏冬,严律南. MMPs-TIMPs与肝癌转移[J]. 中华肝胆外科杂志, 2005, 11(8): 574-475.
- [2] Xia D, Yan LN, Tong Y, Wang XP, Zhang MM, Zhao LY. Construction of recombinant adenoviral vector carrying human tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene and its expression *in vitro*

[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2005, 4(1): 259-264.

- [3] EI-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. Gastroenterology, 2007, 132(7): 2557-2576.
- [4] Lee MH, Atkinson S, Rapti M, Handsley M, Curry V, Edwards D, *et al.* The activity of a designer tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 against native membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in a cell-based environment⁴ [J]. Cancer Lett, 2009, 6(2): 237-245.
- [5] Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors [J]. Int Biochem Cell Biol, 2008, 40(6): 1362-1378.
- [6] Xia D, Zhang MM, Yan LN. Recent advances in liver-directed gene transfer vectors [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2004, 3(2): 332-336.
- [7] Das B, Banerji A, Frei E, Chatterjee A. Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium [J]. Life Sci, 2008, 82(9/10): 467-476.
- [8] Benlahrech A, Harris J, Meiser A, Papagatsias T, Horning J, Hayers P, *et al.* Adenovirus vector vaccination induces expansion of memory CD4 T cells with a mucosal homing phenotype that are readily susceptible to HIV-1 [J]. Pro Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(47): 19940-19945.
- [9] Jiang Y. Aquaporin-1 activity of plasma membrane affects HT20 colon cancer cell migration [J]. IUBMB Life, 2009, 61(10): 1001-1009.
- [10] Beer SJ. Poly (lactic-glycolic) acid copolymer encapsulation of recombinant adenovirus reduces immunogenicity *in vivo* [J]. Gene Ther, 1998, 5(6): 740-746.
- [11] Zhou SB, Deng XM, Li XH. Investigation on a novel core-coated microspheres protein delivery system [J]. Controlled Release, 2001, 75(12): 27-32.
- [12] Tyagi RK, Sharma PK, Vyas SP, Mehta A. Various carrier system (s)-mediated genetic vaccination strategies against malaria [J]. Expert Rev Vaccines, 2008, 7(4): 499-520.
- [13] Steel JC, Cavanagh, HM, Burton MA, Kalle WH. Microsphere-liposome complexes protect adenoviral vectors from neutralizing antibody without losses in transfection efficiency *in vitro* [J]. J Pharm Pharmacol, 2004, 56(11): 1371-1378.
- [14] Schalch P, Rahman GF, Patrunas G, Goldschmidt RA, Carbray J, Retuerto MA, *et al.* Adenoviral-mediated transfer of vascular endothelial growth factor 121 cDNA enhances myocardial perfusion and excise performance in the nonischemic state [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004, 127(2): 535-540.
- [15] Elezkurtaj S, Kopitz C, Baker AH, Perez-Cantó A, Arlt MJ, Khokha R, *et al.* Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the liver: efficient protection against T-cell lymphoma and colon carcinoma metastasis [J]. J Gene Med, 2004, 6(11): 1228-1237.
- [16] Sangro B, Mazzollini G, Prieto J. Future therapies for hepatocellular carcinoma [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2005, 17(5): 515-521.

[收稿日期] 2009 - 11 - 09

[修回日期] 2009 - 12 - 28

[本文编辑] 韩丹