

[文章编号] 1000-8861(2008)06-0647-04

RGD-FasL 基因的构建、表达、纯化及其活性分析

苏金华^a, 李文珠^{a,b}, 王生育^a, 黎之静^a, 陈彩霞^b, 庄国洪^{a*} (厦门大学: a. 医学院抗癌研究中心, b. 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

[摘要] 目的 构建适于原核表达的重组蛋白 RGD-FasL 表达载体, 并进行重组蛋白的表达纯化及抗肿瘤活性分析。方法 通过重叠 PCR 将 RGD 序列插入到 FasL 基因的 N 端, 获得 RGD-FasL 基因, 构建 pGEX-5X-1/RGD-FasL 表达载体。转化大肠杆菌 BL21 (DE3), IPTG 诱导表达, GST 柱纯化。采用体外黏附实验、MTT 比色法、流式细胞法检测融合蛋白的功能。结果 通过重叠 PCR 获得了编码正确氨基酸序列的目的基因。目的蛋白以分泌的形式表达, 表达量占菌体总蛋白的 30% 以上。纯化后, 蛋白纯度达 95% 以上。体外黏附实验表明所纯化的融合蛋白可与宫颈癌 Hela 细胞发生特异结合。MTT 比色法与流式细胞技术均表明纯化的融合蛋白能特异性地诱导肿瘤细胞发生凋亡。结论 重组蛋白 RGD-FasL 表达载体的成功构建、表达、纯化及活性分析, 为进一步的功能研究奠定了基础。

[关键词] RGD-FasL; 肿瘤; 靶向治疗; 凋亡

[中图分类号] R392.33 **[文献标识码]** A

Construction, expression, and purification of RGD-FasL and analysis of its activities

SU Jin-hua, LI Weir-zhu, WANG Sheng-yu, LI Zhi-jing, CHEN Cai-xia, ZHUANG Guo-hong (Anti-Cancer Research Center, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

[Abstract] **Objective** To construct, express, and purify RGD-FasL gene and analysis its anti-tumor activities. **Methods** The RGD-FasL gene was constructed by overlapping PCR through inserting the sequence of RGD at the N-terminate of FasL gene, and then was inserted into vector pGEX-5X-1 and expressed efficiently in *E. coli* BL21 (DE3) under optimization condition. The expressed products were purified by GST resin column. The function of recombinant protein was detected by adhesion *in vitro* analysis, MTT colorimetric, and flow cytometry. **Results** The proteins were expressed mainly as secretion with a yield of more than 30% of total bacterial proteins. After purification, the purity of the proteins was more than 95%. The results of adhesion *in vitro* analysis showed that the purified protein could combine with Hela cells specifically. And the MTT colorimetric and flow cytometry suggested that the purified protein could induce tumor cell apoptosis. **Conclusion** The construction, expression, purification of RGD-FasL gene and analysis its anti-tumor activities provides a foundation for further studying.

[Key words] RGD-FasL; Tumor; Target therapy; Apoptosis

精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp, RGD) 三肽序列是多种生物细胞外基质 (ECM) 和血浆蛋白结构中常见的基本成分^[1], 也是广泛存在于细胞间识别系统的基本单位, 能与细胞表面整合素特异性结合, 从而不仅与肿瘤部位的内皮细胞特异性结合, 而且可以和肿瘤细胞产生特异结合^[2]。提示带有 RGD 基序的短肽可作为肿瘤靶向治疗系统^[3]。

细胞表面的死亡受体 Fas 蛋白与 FasL 结合后, 可诱导细胞凋亡^[4]。但由于 FasL 用于体内会产生

较严重的肝毒性, 限制了其作为药物的开发和应用^[5]。早在 1998 年, Arap 等^[6]用化学合成的方法将 RGD 同抗肿瘤药物阿霉素结合, 发现改变后的化合物增强了对移植裸鼠体内的人乳腺癌的作用, 且毒性降低。国内也有研究将特异性杀伤肿瘤的 sTRAIL 与 RGD 融合, 发现在体外能显著诱导人肺癌细胞 A549 的凋亡^[7]。王慧等^[8]构建了 RGD 多肽与重组改构人肿瘤坏死因子融合基因, 表达后的重组蛋白能够将 TNF- α 带到肿瘤血管处, 不仅降低了其肝毒性, 还提高了 TNF- α 的抗肿瘤效果。因此, 构建 RGD 与 FasL 的融合基因, 将 RGD 的靶向作用与 FasL 的诱导凋亡作用相结合, 可能提供控制肿瘤生长的有效途径。研究利用编码人 FasL 氨基酸基因的 N 端接上 RGD 短肽后进行克隆与表达, 并对重组蛋白 RGD-FasL 进行纯化和体外活性研究。

[收稿日期] 2008-03-11; [修回日期] 2008-06-04

[作者简介] 苏金华 (1965-), 男, 福建永定市人, 高级实验师, 主要从事细胞与分子生物学方面的研究。(Tel) 0592-2186125; (E-mail) sujh@xmu.edu.cn

共同第一作者

* 通讯作者: 庄国洪, (Tel) 0592-2180587; (E-mail) zhuanguohong@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 主要试剂 大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株、质粒 pGEX-5X-1 均购自 Novagen 公司。质粒 pGEX-5X-1/FasL 由本实验室制备、保存。引物由上海生工公司合成。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 Pfu DNA 聚合酶为 NEB 公司产品。质粒提取及胶回收试剂盒为 OMEGA 公司产品。GST Resin 蛋白纯化树脂为 Gen Script Corporation 公司产品。RPMI1640 培养基为 Gbco 公司产品。MTT 与 PI 均为 Sigma 公司产品。

1.2 实验材料 宫颈癌细胞 Hela 和脐静脉内皮细胞 ECV304 均由本实验室常规传代保存。

1.3 RGD-FasL 基因的构建^[9] 以 F1: 5'-CAG CAGCCCTTCAATTACCG-3 和 F18: 5'-GCTGCTCGACT TATATAAGC-3 为上、下游引物, 质粒 pGEX-5X-1/FasL 为模板, 常规 PCR 扩增 FasL 基因。通过重叠 PCR 将扩增所得片段与 RGD 相连, 再利用引物 F2: 5'-GTAGGATCCTCATGGGCTGCGATTGTCG-3 和 F18 常规 PCR 扩增得到 RGD-FasL 完整基因。常规 PCR 条件为: 95 预变性 4 min; 95 变性 40 s, 56 退火 45 s, 72 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 延伸 10 min。重叠 PCR 条件为: 95 预变性 4 min; 95 变性 40 s, 53 退火 45 s, 72 延伸 1 min, 循环 10 次; 95 变性 4 min; 95 变性 40 s, 58 退火 45 s, 72 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 延伸 10 min。

1.4 pGEX-5X-1/RGD-FasL 重组质粒构建^[9] PCR 产物及质粒分别用限制性内切酶 *Bam*H 和 *Xho* 消化, 胶回收。用 T4 DNA 连接酶将 RGD-FasL 基因克隆至质粒 pGEX-5X-1 中, 构建重组质粒 pGEX-5X-1/RGD-FasL, 转化 *E. coli* BL21 (DE3)。重组子提取质粒进行酶切鉴定, 阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。挑选测序正确的重组质粒 pGEX-5X-1/RGD-FasL 的 *E. coli* BL21 (DE3) 单菌落, 37 振荡培养过夜, 按 1:100 稀释到 LB 培养液中, 37 振荡培养至 $A_{600\text{nm}}$ 值 0.6~0.8 时, 加入终浓度为 0.7 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 7 h。目的蛋白的纯化参照 Gen Script Corporation 公司提供的 GST Resin 蛋白纯化操作手册进行。

1.5 RGD-FasL 对脐静脉内皮细胞 ECV304 和宫颈癌细胞 Hela 的体外黏附实验^[10] 用包被液 (150 mmol/L Na_2HPO_4 , pH7.3) 稀释纯化复性后的 RGD-FasL, 使其终质量浓度分别为 60 000、30 000、15 000、7 500、3 750、1 875 ng/mL, 以每孔 100 μL 的体积加入 96 孔细胞培养板, 4 包被过夜。0.9% 的 NaCl 洗板 3 次后, 每孔加入封闭液 200 μL (含 2% BSA 的 1640 完全培养基), 37 封闭 2 h, 再用 0.9%

的 NaCl 洗板 3 次。被测细胞用 0.9% 的 NaCl 洗涤 3 遍后, 用不完全 1640 培养基重悬细胞。每孔加入 100 μL 细胞悬液, 约含 3×10^4 个细胞。37, 5% CO_2 条件下培养 1 h 后, 用不完全培养基洗板, 以除去未黏附的细胞。黏附在培养孔内的细胞用固定液固定后, 0.5% 的结晶紫染色, 倒置显微镜观察细胞黏附情况并照相。

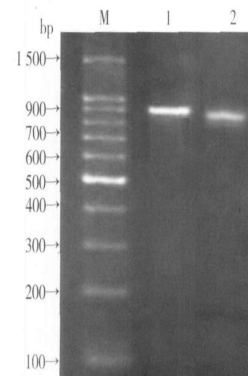
1.6 MTT 法检测 RGD-FasL 对脐静脉内皮细胞 ECV304 和宫颈癌细胞 Hela 的生长影响^[10] 计数细胞, 5×10^4 /孔接种培养板, 按 50.0、25.0、12.5、6.25、3.125 及 1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 加入 RGD-FasL, 培养 12 h。在光学显微镜下观察细胞形态的变化, 并拍照。加入 20 μL MTT (7.5 g/L) 继续培养 4 h, 加 100 μL 异丙醇, 于波长测定吸光度 $A_{570\text{nm}}$ 值, 并计算抑制率 (%)。实验重复 3 次, 取其平均值。抑制率 = (1 - 实验组的 A 值/对照组的 A 值) $\times 100\%$ 。

1.7 流式细胞仪检测 RGD-FasL 对脐静脉内皮细胞 ECV304 和宫颈癌细胞 Hela 生长的影响 将 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RGD-FasL 作用于细胞 12 h 后收集, PBS 洗 2 遍, 用 75% 的冰冷乙醇 4 固定过夜; 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用柠檬酸缓冲液 (pH7.4) 处理 15 min 后 300 目尼龙网过滤, 1 000 r/min 离心 10 min, 加入 100 μL PI 染色液染色 30 min, 上机检测。按 FACSsort 软件多正态拟合程序进行曲线拟合, 分析处理数据后获得 DNA 含量分布及凋亡情况。

1.8 统计学方法 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料的组间显著性检验采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 RGD-FasL 的基因构建 通过常规 PCR 扩增得到 850 bp 的 FasL 基因, 与 RGD 通过重叠 PCR 相连, 得到 901 bp 的 RGD-FasL 基因 (含酶切位点), PCR 产物大小均与理论值相符 (图 1)。

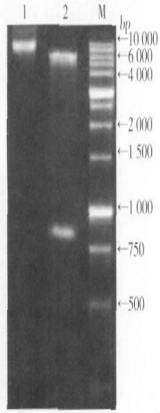


M) DNA marker; 1) RGD-FasL (901 bp); 2) FasL (850 bp)

图 1 PCR 产物电泳图

Fig 1 Analysis of PCR product by agarose gel electrophoresis

2.2 重组质粒的酶切鉴定 重组子质粒经 *Bam*H 及 *Xho* 酶切后,琼脂糖凝胶电泳鉴定,得到目的条带分别为 RCD-FasL 条带(882 bp)、pGEX-5X-1 条带(4 972 bp)(图 2)。测序结果表明载体构建正确。

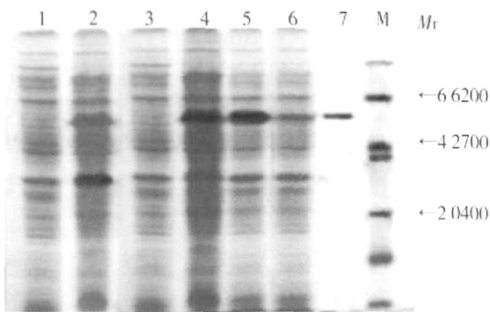


M) DNA marker; 1) pGEX-5X-1/RCD-FasL; 2) pGEX-5X-1/RCD-FasL digested by *Bam*H and *Xho* .

图 2 重组 pGEX-5X-1/RCD-FasL 质粒的双酶切鉴定

Fig 2 Restriction enzyme analysis of the constructed expression vector pGEX-5X-1/RCD-FasL

2.3 RCD-FasL 在大肠杆菌中的表达及纯化 含重组质粒 pGEX-5X-1/RCD-FasL 的 *E. coli* BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导表达后,通过不同的诱导时间和诱导剂浓度对重组菌进行诱导表达,确定其最适表达条件为 IPTG 终浓度为 0.7 mmol/L、30 诱导 12 h。目的蛋白主要存在上清中,表达量占菌体总蛋白的 30% 以上。过 GST Resin 柱纯化。经 SDS-PAGE 分析在 *M_r* 62 000 附近有一特异条带,符合目的蛋白理论推算值(*M_r* 约 62 700),扫描分析显示其纯度达 95% 以上(图 3)。



M) Marker; 1) Wild colony without IPTG; 2) Wild colony with IPTG; 3) Recombined colony without IPTG; 4) Recombined colony with IPTG; 5) Total soluble protein; 6) Total insoluble protein; 7) Purified protein;

图 3 RCD-FasL 表达及纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig 3 Analysis of the expression and purification of RCD-FasL by SDS-PAGE

2.4 RCD-FasL 对 ECV304 和 Hela 细胞生长的影响 经 MTT 法分析发现,ECV304 和 Hela 细胞对

RCD-FasL 敏感性不同,组间差异显著。Hela 细胞对 RCD-FasL 的敏感性高于对 FasL 的敏感性,表现为细胞死亡率与浓度升高成比例;ECV304 细胞对 RCD-FasL 和 FasL 都不敏感(图 4)。

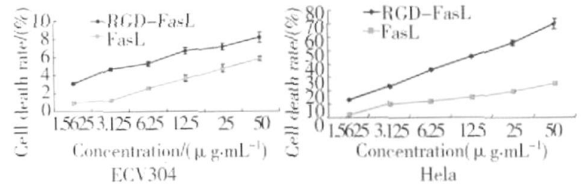


图 4 RCD-FasL 对 ECV304 和 Hela 细胞的细胞毒效应

Fig 4 Cytotoxic effects of RCD-FasL on ECV304 and Hela

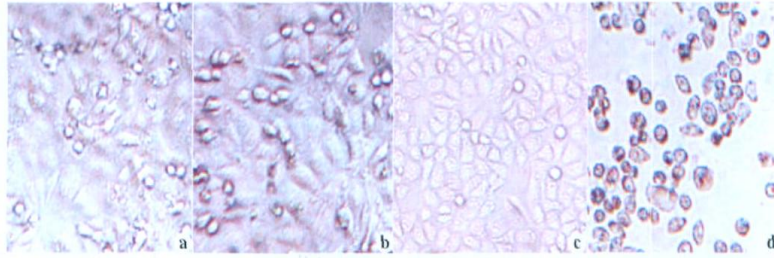
在 Hela 细胞中,当 FasL、RCD-FasL 浓度为 50 μg/mL 时,细胞死亡率分别为 (25.5 ± 3.01) % , (69.77 ± 1.51 %) ;1.562 5 μg/mL FasL、RCD-FasL 对细胞杀伤率分别为 (2.01 ± 0.51) % , (13.11 ± 3.01 %) 比较,差异显著 (*P* < 0.01)。同剂量的 FasL、RCD-FasL 分别应用,组间差异明显 (*P* < 0.01)。FasL、RCD-FasL 单独应用于 ECV304 细胞组间差异不明显 (*P* > 0.05)。

2.5 RCD-FasL 对 ECV304 和 Hela 细胞的形态学改变 高剂量 RCD-FasL 作用 Hela 细胞 4 h 后,显微镜观察细胞形态改变,细胞由正常的梭形、贴壁状态变为圆形、皱缩,并呈悬浮状态;而同等条件下 ECV304 细胞显微镜下观察,细胞形态基本没有改变(图 5)。

2.6 流式细胞仪检测 RCD-FasL 对 ECV304 和 Hela 细胞生长的影响 如图 6 显示,与对照组相比,采用 25 μg/mL 的 RCD-FasL 处理 Hela 细胞 12 h 后,细胞出现显著的凋亡峰。凋亡细胞数从 (2.8 ± 5.3) % 上升到 (13.8 ± 1.5) % , *P* < 0.05, *G₀/G₁* 期细胞比例增加 (28 ± 5.3) % ~ (42.5 ± 1.5) % , *P* < 0.05,而 *G₂/M* 期细胞比例则明显减少 (59.7 ± 5.3) % ~ (34.4 ± 2.6) % , *P* < 0.05(表 1),这说明 RCD-FasL 能使 Hela 细胞停留在 *G₁* 期,推迟进入 *S* 期,抑制细胞生长并诱导细胞发生凋亡。而同样的条件处理 ECV304 细胞,基本不起作用,说明 RCD-FasL 对正常的内皮细胞没有凋亡作用(表 1)。

表 1 RCD-FasL 对 ECV304 和 Hela 细胞周期、凋亡的影响
Tab 1 Effects of RCD-FasL on cell cycle and apoptosis of ECV304 and Hela cells

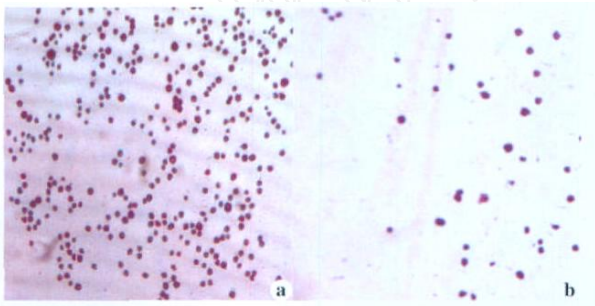
	ECV304		Hela	
	Control	RCD-FasL	Control	RCD-FasL
Cell apoptotic index (%)	3.4 ± 5.3	4.56 ± 4.9	2.8 ± 3.5	13.8 ± 1.5
<i>G₀/G₁</i> (%)	27.4 ± 2.6	31.6 ± 4.9	28 ± 4.3	42.5 ± 1.5
<i>S</i> (%)	10.4 ± 4.8	8.34 ± 3.6	9.5 ± 2.7	9.3 ± 2.3
<i>G₂/M</i> (%)	58.8 ± 2.5	55.5 ± 4.2	59.7 ± 1.2	34.4 ± 2.6



a) ECV304 cells; b) ECV304 cells treated with 50 µg/mL RGD-FasL for 12 h; c) HeLa cells; d) HeLa cells treated with 50 µg/mL RGD-FasL for 12 h
图 5 RGD-FasL 作用 ECV304 和 HeLa 细胞后显微镜观察细胞形态改变 (×200)

Fig 5 Observation of ECV304 and HeLa cells under optical microscope (×200)

2.7 RGD-FasL 与 HeLa 细胞的体外黏附实验 用不同浓度的 RGD-FasL 包被 96 孔板,经封闭与洗涤,与 HeLa 细胞共同培养 1 h 后,结晶紫染色。如图 6 可见,被 RGD-FasL 包被的孔内有细胞黏附,且黏附细胞数量随 RGD-FasL 浓度增加而增多,而被 FasL 包被的孔内仅有个别细胞黏附。结果表明, RGD-FasL 在体外对 HeLa 细胞具有黏附性,证实了其肿瘤靶向性。



a) HeLa cells treated with RGD-FasL (30 000 ng/mL); b) HeLa cells treated with FasL (30 000 ng/mL)

图 6 RGD-FasL 与 HeLa 细胞的体外黏附实验 (×200)

Fig 6 Adhesion of HeLa cells to RGD-FasL (×200)

3 讨论

Fas/FasL 系统是介导细胞凋亡的重要系统。当 Fas 与相应配体 FasL 结合后激活下游的信号传导,启动细胞凋亡。但是一些恶性肿瘤细胞也通过此途径来逃脱免疫监视。Herrnring 等^[11]经研究发现,乳腺癌组织比纤维肉瘤组织和正常乳腺组织表达较多的 FasL,但大量 mRNA 分析显示 FasL 高水平的拷贝数不仅存在于乳腺癌组织,也存在于纤维肉瘤中。这说明 FasL mRNA 并没有充分的翻译成蛋白质。与纤维肉瘤相比,乳腺癌组织似乎失去了控制转录和蛋白表达的能力。提示可以通过外源的 FasL 靶向作用于肿瘤细胞,来拮抗恶性肿瘤的免疫逃逸。

传统的肿瘤靶向治疗多采用多克隆抗体、单克隆抗体、基因工程抗体及抗体 Fab 段作为靶向载体,与放射性核素、抗癌药物和生物毒素等进行交联,取得了一定疗效^[12]。但是由于肿瘤抗原的特异性、异质性及可调变性,抗体用于人体后的异源性,偶联物

相对分子质量过大难以穿透肿瘤细胞生物屏障,以及化学偶联过程中抗体活性易损失等问题的存在,使得抗体导向治疗还需要解决很多难题^[13]。而以小分子肽作为导向载体,可以很方便地利用基因重组技术,将它融合在 FasL 的氨基末端,并在大肠杆菌中得到表达,对 FasL 结构影响很小,不会影响它的生物学活性,而且形成的导向性 FasL 在体内的免疫原性也将低于抗体导向的细胞因子。

研究选择的肿瘤靶向分子 RGD 肽是大部分整合素和其配体相互作用的识别位点。因此选择 RGD 肽作为肿瘤靶向载体,是肿瘤诊断及靶向治疗的新热点。Flavio 等^[14]将 TNF- 和 RGD-4c 融合后,增强了 TNF- 的抗肿瘤效应。Yixin Chen 等^[15]发现融合蛋白 RGD-Tachyplesin 能抑制肿瘤细胞的生长。此外, Buckley 等^[16]发现 RGD 肽进入细胞后可以导致 procaspase-3 的激活,直接诱导细胞凋亡。

实验设计主要在于增强 FasL 的靶向性,通过采用重叠 PCR 技术,在 FasL 5 端引入 RGD 序列,扩增出带有 RGD 的 FasL 基因并转化到大肠杆菌中,成功地实现其表达,经纯化得到具有天然生物活性的蛋白。体外黏附实验表明所纯化的蛋白可特异性的与宫颈癌 HeLa 细胞发生结合,提示融合蛋白具有与肿瘤细胞结合的靶向作用。进一步的抗肿瘤活性分析表明融合蛋白 RGD-FasL 能显著诱导肿瘤细胞的凋亡,且活性与单纯 FasL 相比没有明显下降。本实验为进一步验证体内 RGD-FasL 的抗肿瘤活性和靶向性奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Bi Q, Zhou X, Cen X, *et al.* Efficient targeted anticoagulant with active RGD motif [J]. *Thromb Res*, 2007, 120 (4): 541 - 547.
- [2] DeNardo SJ, Burke PA, Leigh BR, *et al.* Neovascular targeting with cyclic RGD peptide (cRGD-ACHA) to enhance delivery of radio immunotherapy [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2000, 15 (1): 71 - 79.

(下转第 655 页)

- [2] Nihalani D, Meyer D, Pajni S, *et al.* Mixed lineage kinase-dependent JNK activation is governed by interactions of scaffold protein JIP with MAPK module components [J]. *EMBO J*, 2001, 20 (13) :3447 - 3458.
- [3] Garcia EP, Mehta S, Blair LA, *et al.* SAP90 binds and clusters kainate receptors causing incomplete desensitization [J]. *Neuron*, 1998, 21(4) :727 - 739.
- [4] Pei DS, Sun YF, Guan QH. Postsynaptic density protein 95 antisense oligodeoxynucleotides inhibits the activation of MLK3 and JNK3 via the GuR6. PSD-95. MLK3 signaling module after transient cerebral ischemia in rat hippocampus [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 367(1) :71 - 75.
- [5] Kenney MB. Signal transduction molecules at the glutamatergic postsynaptic membrane [J]. *Brain Res Rev*, 1998, 26(2/3) : 243 - 257.
- [6] Hata Y, Takai Y. Roles of postsynaptic density-95/synapse-associated protein 90 and its interacting proteins in the organization of synapses [J]. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 56(56) : 461 - 472.
- [7] 齐静, 邵建敏, 胡书群, 等. 野生型/突变型 PSD-95 真核表达载体的构建及其表达 [J]. *免疫学杂志*, 2007, 23(1) :20 - 22.
- [8] Gu Z, Jiang Q, Zhang G. c-Jun N-terminal kinase activation in hippocampal CA1 region was involved in ischemic injury [J]. *Neuroreport*, 2001, 12(5) :897 - 900.
- [9] Jiang Q, Gu Z, Zhang G, *et al.* Diphosphorylation and involvement of extracellular signal - regulated kinases (ERK1 / 2) in glutamate-induced apoptotic-like death in cultured rat cortical neurons [J]. *Brain Res*, 2000, 857(1/2) :71 - 77.
- [10] Lin YH, Westenbroek C, Tie L, *et al.* Effects of glucose, insulin, and supernatant from pancreatic beta-cells on brain-pancreas relative protein in rat hippocampus [J]. *Neurochem Res*, 2006, 31(12) :1 417 - 1 424.
- [11] Gill R, Lodge D. Pharmacology of AMPA antagonists and their role in neuroprotection [J]. *Int Rev Neurobiol*, 1997, 40: 197 - 232.
- [12] Olney JW, Labruyere J, Price MT. Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs [J]. *Science*, 1989, 244 (4 910) :1 360 - 1 362.
- [13] Pei DS, Wang XT, Liu L, *et al.* Neuroprotection against ischaemic brain injury by a GuR6-9c peptide containing the TAT protein transduction sequence [J]. *Brain*, 2006, 129(Pt 2) :465 - 479.
- [14] Guan QH, Pei DS, Zhang QG, *et al.* The neuroprotective action of SP600125, a new inhibitor of JNK, on transient brain ischemia/reperfusion-induced neuronal death in rat hippocampal CA1 via nuclear and non-nuclear pathways [J]. *Brain Res*, 2005, 1 035(1) :51 - 59.
- [15] Pan J, Zhang QG, Zhang GY. The neuroprotective effects of K252a through inhibiting MLK3/MKK7/JNK3 signaling pathway on ischemic brain injury in rat hippocampal CA1 region [J]. *Neuroscience*, 2005, 131(1) : 147 - 159.

(编辑 李海鸥)

(上接第 650 页)

- [3] Han HD, Lee A, Hwang T, *et al.* Enhanced circulation time and antitumor activity of doxorubicin by comb like polymer-incorporated liposomes [J]. *J Controlled Release*, 2007, 120(3) : 161 - 168.
- [4] Li W, Wang S, Zhuang G, *et al.* Induction tumor cell lines apoptosis via Fas/DR5 [J]. *Cell Mol Immunol*, 2006, 3(6) : 467 - 471.
- [5] Calle PR, Hofmann WJ, Walczak H, *et al.* Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage [J]. *J Exp Med*, 1995, 182 (5) : 1 223 - 1 230.
- [6] Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model [J]. *Science*, 1998, 279 (16) : 377 - 380.
- [7] 赵丽红, 范清林, 邹文艺, 等. 重组人 RGD-sTRAIL 的表达、纯化及抗肿瘤活性研究 [J]. *生物技术通讯*, 2004, 15(3) :226-230.
- [8] 王慧, 颜真, 赵宁, 等. RGD 特异性结合多肽与重组改构人肿瘤坏死因子融合基因的克隆表达及其抑瘤活性 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2005, 18(3) :185 - 189.
- [9] 李文珠, 陶惠然, 庄国洪, 等. 诱骗受体 DcR3 的基因构建、表达及特异性鉴定 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, 22(2) :151 - 153.
- [10] Li W, Zhang C, Zhuang G, *et al.* Correlation between expression of DcR3 on tumor cells and sensitivity to FasL [J]. *Cell Mol Immunol*, 2007, 4 (6) : 455 - 460.
- [11] Herrring C, Reimer T, Jeschke U, *et al.* Expression of the apoptosis-inducing ligands FasL and TRAIL in malignant and benign human breast tumors [J]. *Histochem Cell Biol*, 2000, 113 (3) : 189 - 194.
- [12] Jones MK, Wang H, Peskar BM, *et al.* Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing [J]. *Nat Med*, 1999, 5 (12) : 1 418 - 1 423.
- [13] Jana S, Paliwal J. Apoptosis: potential therapeutic targets for new drug discovery [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14 (22) : 2 369 - 2 379.
- [14] Flavio C, Anna C, Angellina S, *et al.* Coupling tumor necrosis factor with integrin ligands improves its antineoplastic activity [J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (2) : 565 - 571.
- [15] Chen Y, Xu X, Hong S, *et al.* RGD-Tachyplesin inhibits tumor growth [J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (6) : 2 434 - 2 438.
- [16] Buckley CD, Pilling D, Henriquez NV, *et al.* RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation [J]. *Nature*, 1999, 397 (6 719) : 534 - 539.

(编辑 金晓琳)