

[文章编号] 1000-8861 (2009) 06-0680-05

重组人 RGD-Fa δ L 对胶质瘤细胞 U138/U343/U373 的体外抗肿瘤活性分析

罗芳洪¹, 李文珠^{1,2}, 丘劲华¹, 苏金华¹, 庄国洪^{1*}

[摘要] 目的 研究重组人 RGD-Fa δ L 对 3 株胶质瘤细胞 U138/U343/U373 的杀伤作用及机制。方法 采用 RT-PCR 方法、MTT 比色法、DNA 倍体分析、流式细胞术检测融合蛋白对 3 株胶质瘤细胞的杀伤作用; 利用 Western blot 法探讨其作用机制。结果 Fas mRNA 在 U138 和 U343 细胞中有表达, 在 U373 细胞中未有可见表达; DcR3 mRNA 在 3 株细胞中均有表达, 在 U373 细胞中强表达。采用流式细胞术检测肿瘤细胞表面两种受体的表达情况, 结果与 RT-PCR 相符。U138 细胞株对 RGD-Fa δ L 敏感并呈剂量依赖性; U343 细胞株对 RGD-Fa δ L 相对敏感; U373 细胞对 RGD-Fa δ L 不敏感。用 P 检测细胞周期与凋亡表明 RGD-Fa δ L 能使 U138/U343 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。Western blot 实验表明 RGD-Fa δ L 作用细胞后 caspase-8/3/9 的表达升高, Bcl-2 的表达降低。结论 重组人 RGD-Fa δ L 可以不同程度的诱导胶质瘤细胞凋亡, 其机制与其受体的表达和 caspase-8/3/9、Bcl-2 的表达有关。

[关键词] RGD-Fa δ L; 胶质瘤; 靶向治疗; 凋亡

[中图分类号] R34 [文献标志码] A

Anti-tumor activities of recombined human RGD-Fa δ L against three glioma cell lines U138/U373/U343

LUO Fanghong, LI Wenzhu, QIU Jinhua, SU Jinhua, ZHUANG Guohong

Anti-Cancer Research Center, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China

[Abstract] **Objective** To study the cytotoxic effects of RGD-Fa δ L on glioma cell lines U138/U373/U343 and the underlying mechanism. **Methods** Fas/DcR3 mRNA was detected by RT-PCR and its surface expression in the three cell lines was measured by flow cytometry analysis. Cytotoxicity exerted by RGD-Fa δ L on glioma cell lines was measured with MTT assay and the induced apoptosis was determined by agarose gel electrophoresis. The cell cycle and apoptosis were assessed by flow cytometry with PI staining. The expressions of Caspase8/9/3 and Bcl-2 in cells were detected by Western blotting. **Results** Approximately 25.5% of U138 cells, 13.7% of U373 cells, and 13.9% of U343 cells expressed Fas, while about 22.2% of U138 cells, 15.5% of U373 cells, and 23.4% of U343 cells expressed DcR3. The results were consistent with mRNA expressions of Fas and DcR3. Cell line U138 was sensitive to RGD-Fa δ L in a dose-dependent manner; cell line U343 was partially sensitive to RGD-Fa δ L; cell line U373 was sustained to RGD-Fa δ L. The cell cycle analysis suggested that RGD-Fa δ L could inhibit cells in G₀/G₁ phase and G₂/M phase, thus inhibit cell growth. In U138 cells treated with RGD-Fa δ L the AI was higher than that of Fa δ L-treated cells, while in U343 cells the result was on the contrary. The expressions of Caspase-8/9/3, RANKL, JNK2 were increased after treating with RGD-Fa δ L, while the expression of Bcl-2 was decreased obviously, suggesting RGD-Fa δ L might pass the apoptosis signal through Caspase activation. **Conclusion** Recombined human RGD-Fa δ L could induce apoptosis in glioma cell lines U138/U373/U343. The underlying mechanism may be relevant to the mRNA expressions of their receptors and the release of Caspase-8/9/3 and Bcl-2.

[Key words] RGD-Fa δ L; glioma; target therapy; apoptosis

细胞表面的凋亡受体 Fas 蛋白, 在与其配基 Fa δ L 结合后, 可启动细胞内凋亡信号通路^[1], 通过不同的途径, 激活末端的效应因子 caspase-3,

caspase-6, caspase-7, 使 DNA 碎裂成片段而降解, 最后使细胞发生凋亡^[2]。但是在人类恶性肿瘤的发展过程中, 常伴有肿瘤细胞表面 Fas 表达缺失或功能丧失、可溶性 Fas、Fa δ L 表达升高, 最终导致 Fas 与 Fa δ L 结合的降低, 协助肿瘤细胞逃脱凋亡。单独使用 Fa δ L 具有较强的肝毒性, 限制了其进一步的应用^[3]。

精氨酸 甘氨酸 天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp, RGD)

作者单位: 1. 厦门大学医学院抗癌研究中心; 2. 厦门大学生命科学学院

收稿日期: 2008-11-21; 修回日期: 2009-09-01

*通信作者: 庄国洪, 厦门大学医学院抗癌研究中心, 福建 厦门 361005; Tel: (0592) 2180587; E-mail: zhuangguohong@yahoo.com.cn
共同第一作者

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^[4],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结合,而且可以和肿瘤细胞产生特异结合^[5]。van Houdt WJ^[6]等构建了由 survivin 启动子调控基因 E1 和 RGD-4C 蛋白衣壳修饰物构成的腺病毒载体 (CRA ds),能有效的自我复制并且杀伤一系列胶质瘤细胞,而对正常的人肝脏器官没有活性作用。提示带有 RGD 基序的短肽可作为肿瘤靶向性肽将治疗成分导向肿瘤部位。因此,将外源表达的 FaL 多肽与 RGD 融合,可能提供控制肿瘤生长的有效途径。

本研究利用编码人 FaL 氨基酸基因的 N 端接上 RGD 短肽序列后获得的重组蛋白 RGD-FaL 进行体外抗肿瘤活性的研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 Trizol 试剂、AMV 一步法 RT-PCR 试剂盒购自上海生工公司。兔抗 Caspase-8/3/9 mAb、Bcl-2 mAb、RANKL mAb、JNK2 mAb 和 HRP 标记的大鼠抗兔 IgG 抗体购自 Sigma 公司。RPM1640 培养基为 Gibco 公司产品。MTT 与 P 均为 Sigma 公司产品。RGD-FaL 为本实验室合成^[7]。

1.2 实验材料 胶质瘤细胞 U138/U343/U373 现由本实验室常规保存 (由加拿大阿尔博塔大学郝春海博士、吉林大学基础医学院朱迅教授惠赠)。

1.3 RT-PCR 分析 Fas, DcR3 mRNA 的表达 参照文献 [8]。

1.4 MTT 法检测 RGD-FaL 对胶质瘤细胞 U373/U138/U343 的生长影响 计数细胞, 5×10^4 孔接种培养板,按 60.0、30.0、15.0、7.5、3.75 及 1.875 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 加入 RGD-FaL 及 FaL,培养 12 h,加入 20 μL MTT (7.5 g/L) 继续培养 4 h,加 100 μL 异丙醇,于波长 570 nm 测定吸光度 (A) 值,并计算抑制率 (%)。实验重复 3 次,取其平均值。抑制率 = $(1 - \text{实验组的 A 值} / \text{对照组的 A 值}) \times 100\%$ 。

1.5 琼脂糖凝胶电泳 细胞处理同前,收集细胞,调整细胞数为 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$,然后参照文献 [7] 进行琼脂糖凝胶电泳。

1.6 Western blot 检测细胞内 Caspase-8/9/3, Bcl-2 的蛋白表达 SDS-PAGE: 收集细胞提取蛋白,然后进行 SDS-PAGE 分离蛋白质。转膜: 把分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜。Ag-Ab 反应: 加入一抗,反应 1 h,洗涤液洗涤 3 次; 加入 HRP 标记的二抗,反应 1 h,洗涤。显色: DAB 显色。

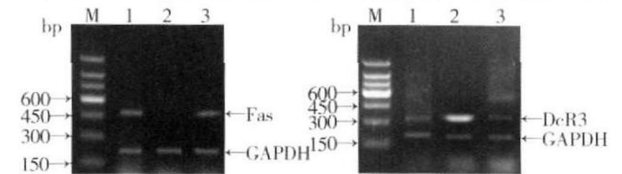
1.7 流式细胞仪检测 RGD-FaL 对胶质瘤细胞

U138/U373/U343 细胞生长的影响 将用 30.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RGD-FaL 作用于 3 株肿瘤细胞 12 h 后收集起来,用 FACS 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,用柠檬酸缓冲液 (pH 7.4) 处理 15 min 后 300 目尼龙网过滤,1 000 r/min 离心 10 min,加入 100 μL P 染色液染色 30 min,上机检测,应用专用的 DNA 拟合软件处理数据后获得 DNA 含量周期分布及凋亡情况。

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 Fas, DcR3 在胶质瘤细胞株 U373/U138/U343 的 mRNA 水平表达 通过 RT-PCR 检测 Fas, DcR3 mRNA 在 3 株肿瘤细胞的表达情况。结果提示 Fas, DcR3 mRNA 在不同肿瘤细胞的表达情况不同,其中 Fas mRNA 在 U138、U343 中有表达,在 U373 中无可见表达; DcR3 mRNA 在 3 株细胞中均有表达,但是在 U373 中表达最强。Fas 表达在 467 bp, DcR3 表达在 320 bp,电泳结果与理论计算值相符 (图 1)。



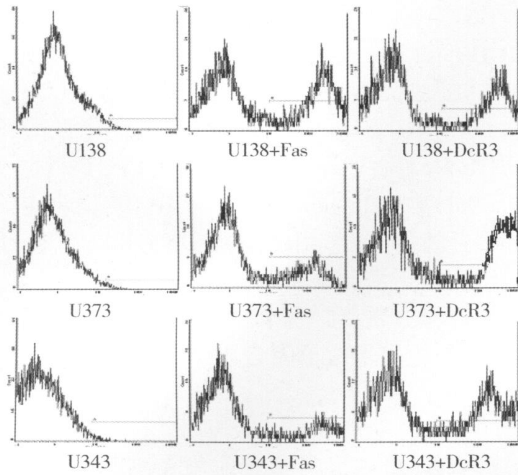
1) U138; 2) U373; 3) U343; M) DNA marker DcR3 located in 320bp. Fas located in 467 bp.

图 1 RT-PCR 检测 Fas, DcR3 mRNA 的表达

Fig 1 mRNA expressions of Fas and DcR3 were measured by RT-PCR

2.2 流式细胞仪检测 Fas, DcR3 在胶质瘤细胞株 U138/U373/U343 的表达水平 采用 anti-Fas mAb 和 anti-DcR3 mAb 和流式细胞仪技术直接检测不同胶质瘤细胞表面 Fas, DcR3 的表达水平。Fas 表达率分别为: U138 细胞 25.5%、U373 细胞 13.7%、U343 细胞 13.9%; DcR3 表达率分别为: U138 细胞 22.2%、U373 细胞 35.5%、U343 细胞 23.4%。不同胶质瘤细胞表面 Fas 和 DcR3 的表达水平有较大的差异,其中 Fas 在 U138 细胞中的表达水平高于其在 U373 和 U343 的表达, DcR3 在 U373 中的表达水平高于其在 U138 和 U343 中的表达 (图 2)。

2.3 RGD-FaL 对胶质瘤细胞株 U138/U373/U343 杀伤的研究 经 MTT 法分析发现,胶质瘤细胞株 U138/U373/U343 对 RGD-FaL/FaL 的敏感性不同,组间差异显著。U138 对 RGD-FaL 的敏感性高于对 FaL 的敏感性,都表现为细胞死亡率与浓度升高成比例;在低浓度时, U343 对 RGD-FaL 的敏感性低于对 FaL 的敏感性,当浓度超过 15.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$



The right curves are the surface expressions of Fas and DcR3 on cell lines checked by anti-Fas mAb and anti-DcR3 mAb. The left curves are surface expressions of Fas and DcR3 on cell lines checked by control.

图 2 流式细胞仪检测 Fas, DcR3 在 U138 / U373 / U343 表面的表达

Fig 2 Surface expressions of Fas and DcR3 on cell lines measured by flow cytometry

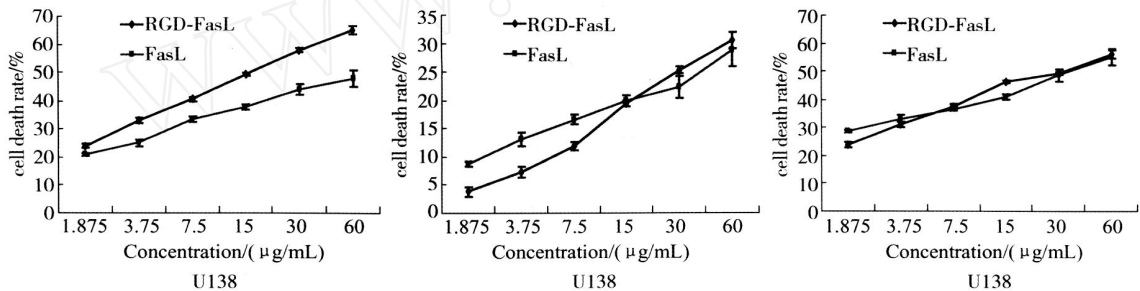


图 3 RGD-FasL 对 U138 / U373 / U343 的细胞毒效应

Fig 3 Cytotoxic effects of RGD-FasL on U138, U373, and U343

2.3.3 U343 细胞 高剂量的 FasL、RGD-FasL 单独应用于 U343 细胞时组间差异不明显 ($P > 0.05$), 而 $7.5 \mu\text{g/mL}$ FasL/RGD-FasL 作用细胞组间差异不明显 ($P < 0.05$); FasL、RGD-FasL 单独应用时各组间均有差异 ($P < 0.01$)。

2.4 RGD-FasL 杀伤胶质瘤细胞的可能机制

2.4.1 RGD-FasL 诱导胶质瘤细胞凋亡的形态学改变 高剂量 RGD-FasL 作用 U138/U373/U343 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 (图 4)。

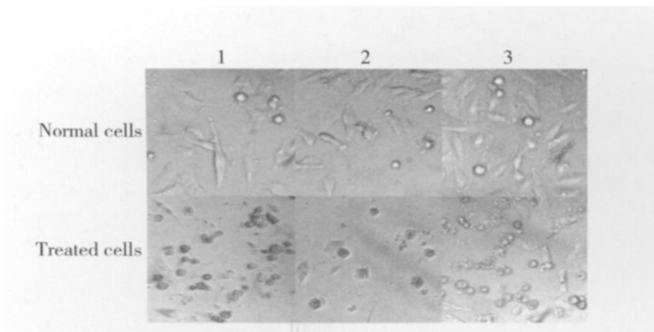
2.4.2 RGD-FasL 诱导细胞凋亡 DNA 断裂的定性检测 凋亡细胞 DNA 电泳时也出现特征性的“梯状”带。与对照组相比, 高剂量 RGD-FasL 处理 U138/U343 组, 细胞 DNA 可见明显的梯状带; 而高剂量 RGD-FasL 处理 U373 组无明显梯状带 (图 5)。

时, U343 对 RGD-FasL 的敏感性高于对 FasL 的敏感性, 都表现为细胞死亡率与浓度升高成比例; 在低浓度时, U343 对 RGD-FasL 的敏感性低于对 FasL 的敏感性, 当浓度超过 $7.5 \mu\text{g/mL}$ 时, U343 对 RGD-FasL 的敏感性高于对 FasL 的敏感性, 都表现为细胞死亡率与浓度升高成比例, 当浓度继续升高到 $30.0 \mu\text{g/mL}$ 时, U343 对 RGD-FasL/FasL 的敏感性相当 (图 3)。

2.3.1 U138 细胞 当 FasL、RGD-FasL 浓度为 $60 \mu\text{g/mL}$ 时, 细胞死亡率分别为 $(65.78 \pm 3.01)\%$, $(48.95 \pm 1.51)\%$; $1.875 \mu\text{g/mL}$ FasL、RGD-FasL 对细胞杀伤率分别为 $(24.99 \pm 0.51)\%$, $(20.41 \pm 3.01)\%$ 比较, 差异显著 ($P < 0.01$)。同剂量的 FasL、RGD-FasL 分别应用时组间差异明显 ($P < 0.01$)。

2.3.2 U373 细胞 高剂量的 FasL、RGD-FasL 单独应用于 U373 细胞时组间差异不明显 ($P > 0.05$), 而 $15.0 \mu\text{g/mL}$ FasL/RGD-FasL 作用细胞组间差异不明显 ($P < 0.05$); FasL、RGD-FasL 单独应用时各组间均有差异 ($P < 0.01$)。

2.4.3 流式细胞仪检测 RGD-FasL 对 U343/U373/U138 细胞生长的影响 如图 6 显示, 与对照组相比, 采用 $30.0 \mu\text{g/mL}$ 的 RGD-FasL 处理 U138/U343 细胞 12 h 后, 细胞出现显著的凋亡峰。U138 细胞凋亡指数从 $(4.2 \pm 5.3)\%$ 上升到 $(58.8 \pm 1.5)\%$, U343 细胞凋亡指数从 $(4.8 \pm 5.3)\%$ 上升到 $(47.56 \pm 4.9)\%$, $P < 0.05$, G_0/G_1 期细胞比例增加, 而 G_2/M 期细胞比例则明显减少 ($P < 0.05$, 表 2), 说明 RGD-FasL 能使 U138/U343 细胞停留在 G_1 期, 推迟进入 S 期, 抑制细胞生长并诱导细胞发生凋亡。与对照组相比, 采用 $30.0 \mu\text{g/mL}$ 的 RGD-FasL 处理 U373 细胞 12 h 后, 细胞凋亡指数从 $(10.2 \pm 4.3)\%$ 上升到 $(25.8 \pm 3.9)\%$, $P < 0.05$, G_0/G_1 期和 G_2/M 期细胞比例变化不明显 ($P > 0.05$) (表 2), 这说明 U373 细胞对 RGD-FasL 的敏感性不大。



1) U138; 2) U373; 3) U343. All cells were cultured with 50μg/mL RGD-FaL for 4 h

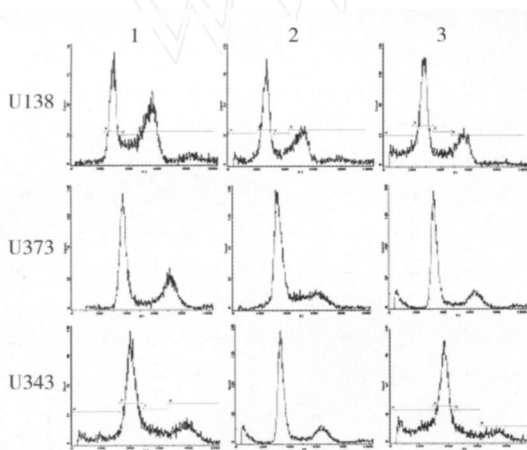
图 4 RGD-FaL 作用 U138/U373/U343 细胞后显微镜观察细胞形态改变 (×40)

Fig 4 U138/U373/U343 cells observed under optical microscope (×40)

表 2 RGD-FaL 对 U343/U373/U138 细胞周期、凋亡的影响

Tab 2 Effects of RGD-FaL on cell cycle and apoptosis of U343/U373/U138 cells

Items/%	U138			U373			U343		
	Control	FaL	RGD-FaL	Control	FaL	RGD-FaL	Control	FaL	RGD-FaL
A I	4.2 ± 5.3	44.56 ± 4.9	58.8 ± 1.5	10.0 ± 4.3	22.6 ± 1.2	25.8 ± 3.9	4.8 ± 5.3	48.8 ± 1.5	47.56 ± 4.9
G ₀ /G ₁	24.6 ± 5.3	31.6 ± 4.9	29.8 ± 1.5	39.5 ± 4.8	31.9 ± 2.5	31.6 ± 4.9	26 ± 4.3	32.5 ± 1.5	31.6 ± 4.9
S	9.9 ± 4.8	7.54 ± 3.6	7.0 ± 2.3	11.5 ± 4.0	11.9 ± 3.3	10.0 ± 2.6	8.4 ± 5.8	6.3 ± 2.3	7.34 ± 3.6
G ₂ /M	61.3 ± 2.5	16.3 ± 4.2	4.4 ± 2.6	39 ± 1.5	33.6 ± 0.6	32.6 ± 3.2	60.8 ± 2.5	12.4 ± 2.6	13.5 ± 4.2

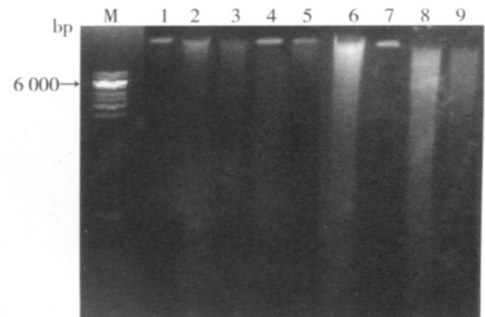


1) normal cells; 2) FaL treated cells; 3) RGD-FaL treated cells. All cells were cultured with 30.0 μg/mL RGD-FaL for 12 h

图 6 RGD-FaL 抑制 U138/U373/U343 细胞生长并引起部分细胞发生凋亡

Fig 6 Growth inhibition and apoptosis of U138/U373/U343 cells induced by RGD-FaL

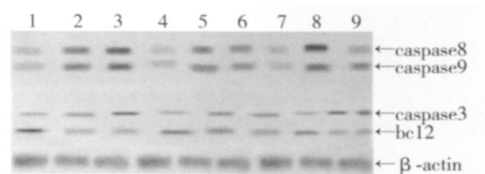
2.5 影响细胞凋亡的可能因素 通过 westem blot 检测肿瘤细胞内 Caspase-8/9/3, Bcl-2 的表达, 结果显示在 50 μg/mL FaL/RGD-FaL 作用细胞 12 h 后, 与对照组相比, 胶质瘤细胞 U138/U373/U343 中 Caspase-8/9/3 的表达上升; RGD-FaL 处理的 U138 细胞比 FaL 处理的 Caspase-8/9/3 的表达要较强, RGD-FaL 与 FaL 处理的 U373 细胞 Caspase-8/9/3



M) marker; 1) U373; 2) U373 + FaL; 3) U373 + RGD-FaL; 4) U138; 5) U138 + FaL; 6) U138 + RGD-FaL; 7) U343; 8) U343 + FaL; 9) U343 + RGD-FaL.

图 5 凝胶电泳检测 RGD-FaL 作用 4h 后细胞的 DNA 片段
Fig 5 Agarose gel electrophoresis analysis of the DNA fragment from of cells cultured with 50μg/mL RGD-FaL for 4 h

的表达没有明显差异, RGD-FaL 处理的 U343 细胞比 FaL 处理的 Caspase-8/9/3 的表达要较弱 (图 7)。Caspase-8、Caspase-3、Caspase-9、Bcl-2 蛋白大小分别为 55 000, 32 000, 46 000, 26 000。电泳结果与理论计算值相符。



1) U138; 2) U138 + FaL; 3) U138 + RGD-FaL; 4) U373; 5) U373 + FaL; 6) U373 + RGD-FaL; 7) U343; 8) U343 + FaL; 9) U343 + RGD-FaL.

图 7 Westem-blot 检测细胞内 Caspase-8/9/3, Bcl-2 的表达

Fig 7 Expressions of Caspase-8/9/3 and Bcl-2 analyzed by westem blot

3 讨论

RGD-FaL 能不同程度地诱导 3 株胶质瘤细胞凋亡, U138 对 RGD-FaL 敏感; U343 对 RGD-FaL 相对敏感; U373 对 RGD-FaL 耐受。通过 RT-PCR 和流式细胞术检测 3 株胶质瘤细胞中 Fas/DcR3 的表达, 发现 RGD-FaL 诱导细胞凋亡的能力与细胞表面 Fas, DcR3 的表达有一定的关系, 也说明了 Fas, DcR3 的表

达差异是 FasL 选择性诱导凋亡的关键点^[9]。

Smolarczyk 等^[10]发现 RGD-4C-GG-(D) (KLAK-LAK) 能成功的靶向高表达 α_3 的黑素瘤细胞 B16 (F10), 并且诱导其凋亡。Toublan 等^[11]第一次通过静电黏附的手段将包含 RGD 的短肽黏附到蛋白微球的表面, 研究表明能很好的靶向到高表达整合素受体的肿瘤细胞上, 进而发挥其作用。我们的实验发现同种细胞对 RGD-FasL 和 FasL 的敏感性不同, 可能与其表面整合素 α_3 的表达高低有关^[12]。

我们采用流式细胞术来检测 3 株胶质瘤细胞在 RGD-FasL 处理后的细胞周期变化, 结果表明 RGD-FasL 能使 U138/U343 细胞停留在 G_1 期, 推迟进入 S 期, 抑制细胞生长并诱导细胞发生凋亡。而相同条件下的 U373 细胞, 处理后细胞凋亡指数有所上升, 但 G_0/G_1 期和 G_2/M 期细胞比例变化不明显 ($P > 0.05$), 说明 U373 细胞对 RGD-FasL 的敏感性不大。实验结果与 MTT 结果基本相符。

Buckley 等^[13]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。Chen 等^[14]发现融合蛋白 RGD-Tachyplesin 能上调肿瘤细胞中 Caspase-8/9/3 的表达。本实验通过 Western blot 检测肿瘤细胞中凋亡相关蛋白的表达时发现, 与对照组相比, RGD-FasL 处理后的胶质瘤细胞 U138/U373/U343 中 Caspase-8/9/3 的表达上升, 与报道结果相符。

细胞凋亡过程中 Bcl-2 家族对细胞凋亡的调控起着重要的作用。由于 Bcl-2 对维持线粒体的完整性具有重要作用^[15], RGD-FasL 作用后, 3 株细胞的 Bcl-2 的表达明显降低, 表明其作用机制可能是通过下调 Bcl-2 蛋白的表达来促进线粒体内细胞色素 c 的释放, 从而导致肿瘤细胞的凋亡。

综上所述, RGD-FasL 诱导 3 株胶质瘤细胞凋亡的可能机制为通过融合蛋白中包含的 RGD 序列靶向到肿瘤细胞, 进而通过融合蛋白中包含的 FasL 与其死亡受体相结合, 上调 Caspase-8/9/3 的表达、下调 Bcl-2 的表达, 通作用肿瘤细胞诱导其凋亡。本实验对深入探索肿瘤细胞的耐药性的分子机制提供了新的信息与启示, 并为凋亡诱导剂的改进提供研究基础。

[参考文献]

[1] Liu YQ, Mu ZQ, You S, et al Fas/FasL signaling allows extracellular-signal regulated kinase to regulate cytochrome c release in oridonin-induced apoptotic U937 cells[J]. Bio Pharm Bull, 2006, 29(9): 1873-1879.
[2] Han HD, Lee A, Hwang T, et al Enhanced circulation

time and antitumor activity of doxorubicin by comblike polymer-incorporated liposomes[J]. J Control Release, 2007, 120(3): 161-168.

- [3] Giraud S, Bessette B, Boda C, et al *In vitro* apoptotic induction of human glioblastoma cells by Fas ligand plus etoposide and *in vivo* antitumor activity of combined drugs in xenografted nude rats[J]. Int J Oncol, 2007, 30(1): 273-281.
[4] Bi Q, Zhou X, Cen X, et al Efficient targeted anticoagulant with active RGD motif[J]. Thromb Res, 2007, 120(4): 541-547.
[5] 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.
[6] Van Houdt WJ, Haviv YS, Lu B, et al The human survivin promoter: a novel transcriptional targeting strategy for treatment of glioma[J]. J Neurosurg, 2006, 104(4): 583-592.
[7] 李文珠, 苏金华, 庄国洪, 等. RGD-FasL 基因的构建、表达、纯化及其活性分析[J]. 免疫学杂志, 2008, 24(6): 647-650.
[8] 李文珠, 李迎, 庄国洪, 等. 诱骗受体 DcR3 对佐剂型关节炎大鼠模型的作用分析[J]. 免疫学杂志, 2008, 24(1): 39-44.
[9] Horinaka M, Yoshida T, Shiraiishi T et al Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 up-regulation in human malignant tumor cells [J]. Oncogene, 2005, 138(1): 71-77.
[10] Smolarczyk R, Cichon T, Graja K, et al Antitumor effect of RGD-4C-GG-D (KLAKLAK) (2) peptide in mouse B16 (F10) melanoma model[J]. Acta Biochimica Polonica, 2006, 53(4): 801-805.
[11]oublan FJ, Boppart S, Suslick KS Tumor targeting by surface-modified protein microspheres[J]. J Am Chem Soc, 2006, 128(11): 3472-3473.
[12] Yamamoto S, Yoshida Y, Aoyagi M, et al Reduced transduction efficiency of adenoviral vectors expressing human P53 gene by repeated transduction into glioma cells *in vitro*[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(3): 913-921.
[13] Buckley CD, Pilling D, Henriquez NV, et al RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation[J]. Nature, 1999, 397(6719): 534-539.
[14] Chen Y, Xu X, Hong S, et al RGD-Tachyplesin inhibits tumor growth[J]. Cancer Res, 2001, 61(6): 2434-2438.
[15] Yildiz L, Baris S, Aydin O, et al Bcl-2 positivity in B and C hepatitis and hepatocellular carcinomas[J]. Virchows Archiv, 2007, 451(2): 213-213.

(编辑 金晓琳)