

双自杀基因 CDTK 载体系统对人视网膜母细胞瘤 Y79 细胞体外杀伤作用的研究

张永红¹, 唐罗生²

作者单位:¹(545006)中国广西壮族自治区柳州市人民医院眼科;²(410011)中国湖南省长沙市,中南大学湘雅二医院眼科
作者简介:张永红,博士,主治医师,研究方向:玻璃体视网膜疾病。

通讯作者:张永红, yonghongdoctor@126.com

收稿日期:2010-07-26 修回日期:2010-08-12

Killing effects of tumor cells specific vector of suicide gene of CDglyTK driven by hTERT promoter on Y79 cells *in vitro*

Yong-Hong Zhang¹, Luo-Sheng Tang²

¹Department of Ophthalmology, the People's Hospital of Liuzhou City, Liuzhou 545006, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China;

²Department of Ophthalmology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Correspondence to: Yong-Hong Zhang. Department of Ophthalmology, the People's Hospital of Liuzhou City, Liuzhou 545006, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. yonghongdoctor@126.com

Received:2010-07-26 Accepted:2010-08-12

Abstract

• **AIM:** To investigate the killing effects of tumor cells specific vector of suicide gene of CDglyTK driven by hTERT promoter on retinoblastoma Y79 cells *in vitro*.

• **METHODS:** At first, the recombinant plasmid was transferred into Y79 cells with electroblot as a delivery system. RT-PCR and Western blot analysis were used to determine the CDTK mRNA and protein expression in Y79 cells which had been transfected by pcDNA3.1-CMV-hTERT-CDTK plasmid vector. The conversion efficiency of 5-FC into 5-FU in CDglyTK-expressing Y79 cells was measured by HPLC. The killing effects of double suicide genes on Y79 cells that treated with 5-FC, GCV of different concentrations were determined by the method of MTT.

• **RESULTS:** The expression of CDTK gene in Y79 cells was certificated by RT-PCR and Western blot and a 59kD protein was obtained which was equal to the sequence expectation of CDTK gene. In MTT analysis, there was significant difference between transfected and non-transfected survival Y79 cells ($P < 0.05$). The survival Y79 cells treated with 5-FC and GCV was lower than 5-FC or GCV.

• **CONCLUSION:** The recombinant plasmid vector pcDNA3.1-

CMV-hTERT-CDTK can be transcribed and translated into CDTK fusion protein in Y79 cells. The transfer of the CDglyTK fusion gene into Y79 cells followed by the administration of 5-FC or GCV can kill Y79 cells *in vitro*. The killing effect of two predrugs is stronger than that of one predrug.

• **KEYWORDS:** CDglyTK gene; retinoblastoma; suicide gene therapy; 5-FC; GCV

Zhang YH, Tang LS. Killing effects of tumor cells specific vector of suicide gene of CDglyTK driven by hTERT promoter on Y79 cells *in vitro*. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(9):1668-1671

摘要

目的: 研究肿瘤特异性双自杀基因载体 pc-ChCDTK 对人视网膜母细胞瘤 Y79 细胞的体外杀伤作用。

方法: 将双自杀基因载体 pc-ChCDTK 电转染 Y79 细胞株。通过 RT-PCR 和 Western blot 方法确定 CDTK 在体外培养的细胞中表达情况。用 HPLC 法测定转染 Y79 细胞中 5-FC 向 5-FU 的转化效率。向载体转染和未转染的 Y79 细胞中加入不同浓度的前体药物 5-FC (0, 25, 50, 100, 200, 400, 800mg/L) 和/或 GCV (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64mg/L), 5d 后用 MTT 法检测 Y79 细胞的平均存活率。

结果: 双自杀基因载体 pc-ChCDTK 电转染 Y79 细胞成功: 在载体转染的 Y79 细胞中, RT-PCR 扩增出长度为 403bp 的特异条带, Western blot 检测见一 59kD 大小的条带, 与 CDTK 基因序列分析的预期结果一致。双自杀基因载体系统致 Y79 细胞存活率降低: 转染 Y79 细胞中, 5-FC 向 5-FU 转化的效率为 84.5%。转染和未转染 Y79 细胞中加入 5-FC 或 GCV 后平均细胞存活率均随浓度增加而降低, 两组比较当 5-FC 浓度达到 100mg/L, GCV 浓度达到 8mg/L 后各对应浓度组间均存在差异 ($P < 0.05$)。转染组间比较, 当 5-FC 达 200mg/L, GCV 达 16mg/L 后, 5-FC + GCV 组平均细胞存活率低于单加 5-FC 或 GCV 组, 有统计学差异 ($P < 0.05$)。

结论: 双自杀基因载体 pc-ChCDTK 转染 Y79 细胞后, 在 Y79 细胞被转录和翻译成 CDTK 双自杀基因蛋白。给予 5-FC 和 GCV 达到一定浓度时, 它们转化成细胞毒性物质对 Y79 细胞产生杀伤作用。双前体药物的杀伤作用大于单前体药物。

关键词: CDTK 基因; 视网膜母细胞瘤; 自杀基因治疗; 5-FC; GCV

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.09.009

张永红, 唐罗生. 双自杀基因 CDTK 载体系统对人视网膜母细胞

瘤 Y79 细胞体外杀伤作用的研究. 国际眼科杂志 2010;10(9): 1668-1671

0 引言

自杀基因治疗是近年来肿瘤研究的热点领域之一,也是目前最有可能有效应用于临床的肿瘤基因治疗策略之一。构建安全高效的载体是基因治疗的关键。我们已经成功的构建了含有 hTERT 启动子的肿瘤特异性杀伤载体 pc-ChCDTK^[1]。我们将探讨该载体对人视网膜母细胞瘤 Y79 细胞在体外的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 Y79 细胞株[美国模式菌种收集中心(ATCC)]; RPMI-1640 细胞培养基(Gibco);胎牛血清(Gibco);5-FC, 5-FU, GCV(Sigma);Reverse Transcription system kit(Invitrogen); Trizol(Gibco); QIAfilter™ plasmid Maxi kit(Qiagen); Triton X-100(CalBiochem); ECL 试剂盒(Amersham pharmacia biotech); PVDF 膜(Amersham pharmacia biotech);双丙烯酰胺(Bio-Rad); MTT(Sigma);鼠 TK mAb(QED 公司);兔抗鼠 IgG 二抗(KPL 公司);蛋白质 Marker(上海生化试剂公司);实验所用引物(上海生工生物工程有限公司): yCDrt:5'-ACGCTGTGTTGTCGCTGAGAA-3'; TKrt:5'-CAC CACCACGCAACTGCTG-3'; β -actin F:5'-CACCTGAAGTACCCATCG-3'; β -actin R:5'-TTGCCAATGGTGATGACCTG-3'。

1.2 方法 将经过证实的含有 pc-ChCDTK 质粒的 JM109 菌液 0.2mL 接种到 200mL 含 50mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37℃,280r/min 的摇床上培养 16h,将菌液转移到离心瓶中。然后按照 QIAfilter™ plasmid Maxi kit 提供的步骤进行操作提取质粒 pc-ChCDTK,干燥后,加无菌水溶解质粒 300 μ L,用 Duc 640 分光光度计测定 DNA 含量,-20℃ 分装保存。用 RPMI-1640 培养液培养 Y79 细胞,每日在倒置相差显微镜下观察。Y79 细胞悬浮生长,培养中细胞可聚集成团并沉集于培养瓶底部,当细胞基本铺满瓶底即可传代,按照 1:2~1:4 传代。将传代后的 Y79 细胞培养 24h 后,细胞进入对数生长期,即可用于电转化。未转染 Y79 细胞生长迅速,传代后培养 24h 后,细胞进入对数生长期。取上述进入对数生长期并基本铺满瓶底的细胞,在 22℃,1000r/min 的条件下,离心 10min,收集细胞。用 0.01mol/L PBS 10mL 重悬细胞,取细胞悬液 20 μ L,用细胞计数板计数,其余细胞在 22℃,1000r/min 条件下,离心 10min,重新收集细胞;根据计数结果,用 0.01mol/L PBS 以 6.25×10^9 /L 的密度重悬细胞。取 800 μ L 细胞重悬液加入到含有 pc-ChCDTK 质粒 20 μ g 的 EP 中,吹打混匀,然后转入 0.4cm 的电击杯中,以 2kV,25 μ F 的条件进行电击。电击后,迅速将电击产物分至已加入 10mL 200mL/L 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液的 75cm² 培养瓶中,置 37℃,50mL/L CO₂ 的细胞培养箱内培养。电转染后的 Y79 细胞生长与未转染细胞相似。倒置相差显微镜下见细胞悬浮生长,形状饱满,色泽鲜亮,聚集成团。

1.2.1 CDTK 基因表达的检测 提取 Y79 细胞 RNA;参照 reverse transcription system kit 进行 RT-PCR 反应;取逆转录产物 2 μ L 作为模板,以 yCDrt 和 TKrt 为引物扩增 CDTK,同时用 β -actin 扩增引物作对照,RT-PCR 产物用 8g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。另取未转染的 Y79 细胞设为

对照,同法处理。取转染 48h 和未转染的 Y79 细胞预处理;固定玻片;配制分离胶和堆积胶;上样;跑胶;转膜;封闭;加一抗;洗一抗;加二抗;洗二抗;显色;曝光。

1.2.2 5-FU 浓度的检测 人视网膜母细胞瘤细胞株 Y79 用含 200mL/L 胎牛血清 RPMI-1640 培养液在 37℃,50mL/L CO₂ 细胞培养箱中正常培养。细胞在转染肿瘤特异性杀伤载体 pc-ChCDTK 前 24h 换液,调整细胞密度使之在转染时达基本铺满瓶底。将细胞在 22℃,1000r/min 的条件下,离心 10min,收集细胞,用适当体积的无血清的 RPMI-1640 培养液重悬,细胞计数,使之密度为 6.25×10^9 /L。取细胞悬液 800 μ L 加入自杀基因载体 pc-ChCDTK 20 μ g,将其混匀,转入 0.4cm 的电击杯中,以 2kV,25 μ F 的条件进行电击。电击后,细胞接种入培养瓶中培养,24h 后收集细胞并用 1 \times PBS 洗 3 次,然后用含 200mL/L 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液配成细胞悬液,以每孔 2×10^5 个细胞的浓度植入 24 孔板,每孔培养液体积 1mL。24h 后加入前体药物 5-FC(200mg/L)。在加 5-FC 24h 后取其细胞上清,用高效液相色谱仪(HPLC)检测其 5-FU 的浓度。配 5-FC 及 5-FU 标准品的浓度梯度做标准曲线。LC-10A 高效液相色谱仪;分析柱:Shimpack CLC-ODS(5 μ m,150mm \times 4.6mm,ID);预柱 YWG-ODS(10 μ m,10mm \times 4.6mm,ID);流动相:甲醇/水(20/80);流速 1mL/min;检测波长 266nm;柱温 37℃。10 μ L 进样。

1.2.3 前体药物对细胞毒性的检测 采用 Western Blot 技术检测新融合自杀基因 CDTK 在视网膜母细胞瘤 Y79 细胞中的蛋白质水平表达。人视网膜母细胞瘤细胞株 Y79 用含 200mL/L 胎牛血清 RPMI-1640 培养液在 37℃,50mL/L CO₂ 细胞培养箱中正常培养。以 2×10^5 个细胞的密度将细胞接种到 96 孔板中培养,每孔体积 200 μ L。24h 后,加入不同浓度的前体药物 100 μ L,即 5-FC 以 0,25,50,100,200,400,800mg/L;GCV 以 0,2,4,8,16,32,64mg/L 加入 96 孔板。每个浓度梯度有 4 孔。留 1 孔不加细胞,只加培养液做空白对照孔。在 37℃,50mL/L CO₂ 的条件下,细胞不换液培养 5d 后,每孔加入(5g/L) MTT 溶液 20 μ L,37℃,继续孵育 4h,终止培养,吸去培养上清液。每孔加入 DMSO 150 μ L,振荡 10min,使结晶物充分溶解。比色:选择 490nm 波长,在酶联免疫检测仪上调定各孔吸收值。以每天进行换液的细胞做对照,假设细胞存活率为 100%,将其它各细胞孔的吸收值与其比较得出各处理组细胞的平均存活率。另视网膜母细胞瘤细胞在转染前 24h 换液,调整细胞密度使之在转染时达基本铺满培养瓶底。将 pc-ChCDTK 载体电转染 Y79 细胞。电击后,细胞接种入培养瓶中培养,24h 后,收集细胞并用 0.01mol/L PBS 洗 3 次,然后用含 200mL/L 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液配成细胞悬液,以每孔 2×10^5 个的密度植入 96 孔板中培养,每孔体积 200 μ L。24h 后加入不同浓度的前体药物 100 μ L,5-FC + GCV 以两药的对应浓度加入 96 孔板,每个浓度梯度有 4 孔。留一孔不加细胞,只加培养液做空白对照孔。然后用 MTT 法检测细胞存活率。

统计学分析:所得数据用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计,采用 Student-Neuman-Keuls(SNK)检验,以 $P < 0.05$ 为统计学上具有显著性差异。

2 结果

2.1 Y79 细胞转染后 CDTK 基因的表达 RT-PCR 检测结果显示,转染组可见一 403bp 特异条带,与预期大小一致(图 1)。而在未转染的对照组细胞中,未扩增出 403bp 特异条带。在两组中均扩增出作为内对照的 β -actin 产物 561bp 条带。分析结果显示:大小为 42kD 的内参 β -actin 蛋白条带在转染和未转染的 Y79 细胞中均可见,一个大小为 59kD 的条带,在转染了 pc-ChCDTK 载体的 Y79 细胞中可见,这与 yCDTK 基因序列分析的预期蛋白大小一致,为自杀基因 yCDTK 蛋白。未转染 pc-ChCDTK 的 Y79 细胞中则没有 59kD 的条带出现(图 2)。

2.2 Y79 细胞转染后 5-FC 转化效率 加 5-FC 24h 后上清中 5-FU 的浓度平均含量为 169mg/L,5-FC 向 5-FU 的转化效率约为 84.5%。

2.3 前体药物对 Y79 细胞的毒性 将生长良好的人视网膜母细胞瘤 Y79 细胞,按每孔 2×10^5 个细胞接种到 96 孔板中培养。加入不同浓度的前体药物 5-FC 培养 5d,平均细胞存活率分别为 98.2%,94.7%,90.5%,88.2%,89.4%,86.4% 和 83.9%。SNK 检验表明,各梯度间的细胞存活率存在显著性差异($P < 0.05$),表明 5-FC 对 Y79 细胞有低微毒性。加入不同浓度的前体药物 GCV 培养 5d 后,平均细胞存活率分别为 96.2%,95.2%,93.5%,93.3%,83.4%,68.9% 和 59.9%。SNK 统计分析表明后 3 个数据与前 4 个数据有显著性差异($P < 0.05$),表明高浓度的 GCV 对 Y79 细胞有较强的毒性作用,浓度越高毒性越大。

2.4 前体药物对用肿瘤杀伤载体转染的人视网膜母细胞瘤细胞的毒性检测 将电转了 pc-ChCDTK 的人视网膜母细胞瘤细胞,按相同的密度将细胞接种到 96 孔板中培养。加入不同浓度的前体药物 5-FC 培养 5d,平均细胞存活率分别为 94.0%,91.6%,85.1%,80.0%,72.7%,69.9% 和 62.7%。SNK 检验表明,各梯度间的细胞存活率存在显著性差异($P < 0.05$),与未转染的细胞对应浓度组比较,当 5-FC 浓度达到 100mg/L 后各对应浓度组间均存在差异($P < 0.05$)。当加入不同浓度的前体药物 GCV 培养 5d 后,平均细胞存活率分别为 94.7%,90.3%,87.6%,82.9%,68.6%,57.6% 和 55.9%。SNK 统计分析表明后 3 个数据与前 4 个数据有极显著性差异($P < 0.05$),与未转染的细胞对应浓度组比较,当 GCV 浓度达到 8 μ g/mL 各对应浓度组间均存在差异($P < 0.05$)。加入不同浓度的双前体药物 5-FC + GCV 培养 5d 后,平均细胞存活率分别为 94.6%,89.2%,84.2%,81.0%,66.3%,56.4% 和 53.5%。统计分析表明各梯度间的细胞存活率存在显著性差异($P < 0.05$)。5-FC, GCV 与 5-FC + GCV 组间采用 SNK 多重比较,当 5-FC 达 200mg/L, GCV 达 16 mg/L 后,三组间平均细胞存活率均有统计学差异($P < 0.05$),细胞存活率大小为:5-FC > GCV > 5-FC + GCV。

3 讨论

目前,相对于传统的视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB) 治疗方法而言, RB 基因治疗不仅可以弥补光凝固治疗、光动力学治疗、温热治疗、冷冻治疗的应用局限性,而且不会产生诸如化学治疗、放射治疗的副作用,更不会因为眼球摘除所导致的致残性而造成患儿心理障碍影响生

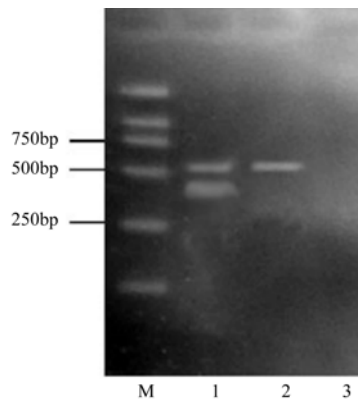


图 1 RT-PCR 产物凝胶电泳图 M:DL2000 Marker;1:转染组可见预期的 CDTK(403bp)目的片段和 β -actin(561bp);2:未转染组;3:阴性对照。

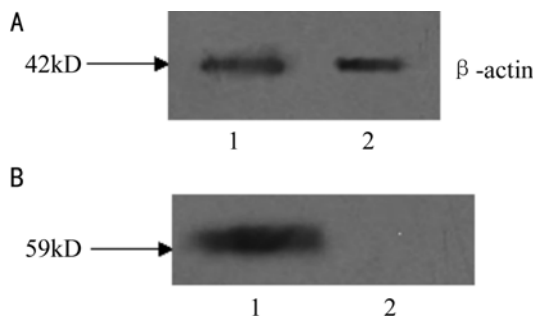


图 2 Western Blot 检测 CDTK 的表达 A:1,2: β -actin(42kD);B:1:转染 pc-ChCDTK 的 Y79 细胞,出现一条约 59kD 蛋白;2:未转染的 Y79 细胞。

存质量。因此, RB 基因治疗的研究越来越为人们所重视,并且通过不同的治疗策略取得了一系列的研究进展。现阶段对 RB 基因治疗的研究主要集中在 4 种不同的基因上,包括自杀基因、抑癌基因、抗血管生成基因以及促凋亡基因。RB 发生的分子机制还不是太清楚,而且与 RB 形成相关的抑癌基因凋亡诱导基因种类繁多,与肿瘤血管形成相关的诱导因子和抑制因子多种多样,且分子机制仍有待于进一步研究。我们选择双自杀基因 CDTK 作为目的基因,实施 RB 的自杀基因治疗。首先,自杀基因作为肿瘤基因治疗的候选基因,已经在多种肿瘤开展研究^[27]。其表达产物和前体药物相互作用来实现肿瘤基因治疗的机制比较清楚。其次,自杀基因和前体药物相互作用产生的毒性物质能通过不同方式实现对邻近肿瘤细胞的旁杀效应,包括直接分泌到细胞外旁杀,或通过细胞间隙连接旁杀,或通过产生凋亡小体、免疫介导来实现旁杀。同时,目前的研究表明,自杀基因系统治疗 RB 是安全有效的^[8]。我们设计的含有双自杀基因 CDTK 的载体通过电转染的方式导入了视网膜母细胞瘤细胞株 Y79 细胞。48h 后,提取转染 Y79 细胞 RNA, RT-PCR 的结果可见一 403bp 特异条带,与预期大小一致,显示双自杀基因 CDTK 在细胞中 mRNA 水平得到了表达。Western blot 的结果也同样显示,载体转染的 Y79 细胞中,59kD 的目的基因蛋白有明显的表达。这两个实验结果充分说明,我们构建的双自杀基因 CDTK 在靶细胞 Y79 中得到表达。先前的研究显示,被设计得的融合基因 yCD/UPRT、大肠杆菌 CDglyTK 以及 yCDglyTK 具有最强的催化前体药物向细胞毒物转化的能力。我们通过 HPLC 检测 5-FU 的浓度,上清中 5-FU

的浓度平均含量为 169mg/L,故 5-FC 向 5-FU 的转化效率约为 84.5%,说明我们所构建的肿瘤特异性双自杀基因载体具有很强的催化前体药物向细胞毒性物质转化的能力。

双自杀基因疗法是将两种自杀基因整合在一起,通过载体转导进入肿瘤细胞,其在肿瘤细胞内表达的融合基因产物具备两种酶的活性。因此,双自杀基因疗法可以大大提高抑制肿瘤生长的功效,同时使得前体药物的用量减半。大量资料表明双前体药物对肿瘤细胞的杀伤作用要强于单前体药物。但也有资料显示双自杀基因之间可能存在拮抗效应。在体外实验中,单独加 5-FC 的细胞杀伤最强,要高于 5-FC 和 GCV 都加的组,而单独加 GCV 的细胞杀伤力最低,CD 和 TK 之间没有协同作用,反而可能会相互干扰各自功能的运行。原因可能有两个方面:(1)可能是融合基因 yCDglyTK 在同时加 5-FC 和 GCV 时,CD/5-FC 和 TK/GCV 两种系统的功能出现拮抗效应;(2)可能是在 yCDglyTK 融合基因中,由于某种原因,CD 和 TK 的活性在这个融合基因中得到提高,使 CD/5-FC 和 TK/GCV 两种系统的抑瘤能力同时或其中一种得到增强。当 E. coli CD 和 HSV-1 TK 基因同时在一种细胞中表达时,会存在相互干扰作用。这种干扰作用的机制到目前还没搞清楚,但干扰作用可能不是发生在基因的转录期,而是在转录之后,TK 介导的 5-FUMP 的磷酸化会产生无毒的 5-FdUDP 和 5-FdUTP,而不是毒性产物 5-FUDP 和 5-FUTP,从而减低了 CD/5-FC 的细胞毒性作用;或者 CD 介导的对 GCV,ACV 等的脱胺反应减低了 TK/GCV 系统的细胞毒性。yCD/UPRT 基因中 UPRT 的酶活性与单独的 UPRT 酶活性大致相等,但是 yCD/UPRT 基因中的 CD 酶活性要高于单独 CD 酶活性 100 倍。这种酶活性的改变可能与这 3 种酶的蛋白质特性不同有关。加入不同浓度的前体药物 5-FC, GCV 或 5-FC + GCV 于电转了 pc-ChCDTK 的人视网膜母细胞瘤 Y79 细胞培养 5d, SNK 检验表明,与未转染的细胞对应浓度组比较,当 5-FC 浓度达到 100mg/L 后各

对应浓度平均细胞存活率组间均存在差异($P < 0.05$);与未转染的细胞对应浓度组比较,当 GCV 浓度达到 8mg/L 各对应浓度平均细胞存活率组间均存在差异($P < 0.05$);转染组间比较,当 5-FC 达 200mg/L, GCV 达 16mg/L 后,3 组间平均细胞存活率均有统计学差异($P < 0.05$),细胞存活率大小为:5-FC > GCV > 5-FC + GCV,既对双自杀基因转染的 Y79 细胞的杀伤作用大小顺序为:5-FC + GCV > GCV > 5-FC。在本实验中,单前体药物对双自杀基因 CDTK 载体转染的 Y79 细胞均有杀伤作用,但双前体药物的杀伤作用要强于单前体药物。分析产生这种结果的原因,我们认为:(1)双自杀基因载体具有很强的催化前体药物向细胞毒物转化的能力;(2)这可能与加入的 CMV 增强子能大大促进 hTERT 启动子启动下游目的基因的表达有关,因为 CMV 增强子具有强大的增强转录能力,且没有组织特异性。

参考文献

- 1 张永红,唐罗生,雷少波. hTERT 启动的双自杀基因 CDTK 载体的构建. 国际眼科杂志 2009;9(10):1876-1880
- 2 陈海金,黄宗海,苏国强,等. 慢病毒介导的双自杀基因对大肠癌细胞的靶向杀伤作用. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1681-1687
- 3 陈海金,苏国强,黄宗海,等. 慢病毒介导的双自杀基因对乳腺癌细胞的杀伤作用. 广东医学 2006;27(7):965-967
- 4 谭万龙,谢毅,吴元东,等. 腺病毒介导融合双自杀基因治疗膀胱癌. 南方医科大学学报 2006;26(5):594-597
- 5 陈祖兵,梁力建. 腺病毒载体介导的双自杀基因对人胆管癌细胞 QBC939 的体外杀伤实验. 中华肝胆外科杂志 2006;12(4):257-259
- 6 黄嘉凌,刘艳燕,刘然义,等. 肝癌特异性 HSV-TK/CD 基因表达质粒的构建及其杀伤活性. 中山大学学报(医学科学版)2005;26(2):142-145
- 7 朱文辉,谭万龙,黄河,等. CD-TK 双自杀基因系统对前列腺癌细胞的杀伤作用. 南方医科大学学报 2007;27(4):479-481
- 8 Chévez-Barrios P, Chintagumpala M, Mieler W, et al. Response of retinoblastoma with vitreous tumor seeding to adenovirus-mediated delivery of thymidine kinase followed by ganciclovir. *J Clin Oncol* 2005; 23(31):7927-7935