

# 新型 CDK 抑制剂联合 ZD55-MnSOD 溶瘤腺病毒体外抑制人结肠癌细胞增殖的研究

韩剑翠<sup>a</sup>, 马步云<sup>a</sup>, 吴程雨<sup>a</sup>, 王毅刚<sup>a</sup>, 王世兵<sup>a,b</sup>

(浙江理工大学, a. 新元医学与生物技术研究所; b. 生命科学学院科研实验中心, 杭州 310018)

**摘要:** 探究携带 MnSOD 的溶瘤腺病毒 Ad-E1B55Kd-MnSOD(ZD55-MnSOD)联合小分子药物新型 CDK 抑制剂 SNS-032 对人结肠癌细胞株 SW620、HCT116、HT-29 生长的体外抑制效果,通过溶瘤病毒与药物联合,以期寻求较好的抗癌作用。实验采用 MTT 法检测 5 MOI 的 ZD55-MnSOD 与不同剂量的 SNS-032(0、20、40、80、160 ng/mL)联合处理人结肠癌细胞株,发现病毒与药物联合处理有促进肿瘤细胞凋亡的作用。ZD55-MnSOD(5 MOI)与 SNS-032(80 ng/mL)联合处理 SW620、HT-29 细胞,发现联合作用具有很大程度上的时间依赖性,Hoechst33342 染色法和流式细胞仪检测细胞凋亡也显示 ZD55-MnSOD 与 SNS-032 联合处理组的细胞凋亡现象比二者单独使用均具有显著差异。该研究初步证实了 ZD55-MnSOD 与 SNS-032 联合具有互补作用,能有效地在体外抑制人结肠癌细胞的增殖。

**关键词:** 溶瘤腺病毒; SNS-032; 结肠癌; 抗癌作用

**中图分类号:** Q789 **文献标志码:** A

## 0 引言

ZD55 病毒是肿瘤特异性增殖型病毒,ZD55 溶瘤病毒它缺少在正常细胞中复制所必需的基因,因此它可以特异性地在肿瘤细胞中复制,然而在正常细胞中却不复制,由此达到抑制肿瘤细胞增殖的作用。目前,关于溶瘤腺病毒的研究迅速发展,可以通过改造启动子或者删除非必须基因来达到较好的靶向效果,也有人用溶瘤腺病毒作为载体携带抗体或 RNA 治疗癌症<sup>[1-2]</sup>。中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所的刘新垣院士在 2001 年首次正式提出了癌症的靶向基因一病毒治疗(Targeting Gene-Virotherapy)的概念<sup>[3-4]</sup>,基于此概念,本实验采用 ZD55 溶瘤腺病毒,因为它能够满足肿瘤基因一病毒治疗的两个需要元素:具有靶向性和有可插入外源

基因的位点,这为我们进一步开展肿瘤的靶向基因一病毒治疗提供了一个理想的平台。本实验采用的是锰超氧化物歧化酶基因(manganese superoxide dismutase, MnSOD),它是一种新型肿瘤抑制基因<sup>[5]</sup>,属于超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)家族。SOD 家族是将超氧阴离子转化为过氧化氢的抗氧化酶,可以保护细胞免受过氧化氢损伤,是机体内的一系列抗氧化防御系统。MnSOD 它作为细胞内重要的抗氧化酶,不但可以清除细胞内的活性氧(reactive oxygen species, ROS),从而减少失衡或高浓度的 ROS 的产生对细胞产生一系列的损伤,对蛋白和核酸的损伤所导致的细胞的变异包括细胞的癌变和细胞的死亡,进而防止细胞癌变<sup>[6]</sup>。实验证实,MnSOD 基因具有防止正常细胞转化为肿瘤细胞的功能,并且可以抑制肿瘤细胞的快速生

收稿日期: 2014-09-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(81272687);浙江省自然科学基金项目(LY13H080005, LZ13H160004);浙江省科技计划项目(2014C37101);浙江理工大学科研启动基金项目(1204807-Y)

作者简介: 韩剑翠(1988-),女,黑龙江林口人,硕士研究生,主要从事肿瘤的靶向基因一病毒治疗方面的研究。

通信作者: 王世兵, E-mail: wsb@zstu.edu.cn

长和促使肿瘤细胞的凋亡,MnSOD 基因在治疗人结肠癌方面具有很好的抗肿瘤效果<sup>[7-10]</sup>。然而,ZD55-MnSOD 又有一定的局限性,因为要达到一定的治疗效果就需要增加病毒的使用剂量,但是由于腺病毒它本身会对细胞产生一定的伤害,所以高的病毒剂量会增加治疗的风险。要实现使用很少的病毒剂量又要达到很好的治疗效果,笔者认为可否将病毒与新型小分子药物进行联合治疗。研究发现其与某些抗肿瘤药物的机制很不相同,二者有可能存在协同性,将二者进行联合作用有可能进一步有助于肿瘤方面的研究。

SNS-032(也称为 BMS-387032)是一种新型 CDK 抑制剂,它可以有效地选择性抑制 CDK2、CDK7、CDK9<sup>[11-17]</sup>。对于 SNS-032 的研究已有很多报道,它的抗肿瘤效果在多种细胞中都有很好的作用,如结肠癌<sup>[18]</sup>、乳腺癌<sup>[19]</sup>、肺癌<sup>[12]</sup>。该药已进入临床一期实验阶段<sup>[16,20]</sup>,无论是作用于实体瘤还是恶性胶质瘤细胞,甚至是肿瘤干细胞都显示出很好的抗肿瘤效果<sup>[21]</sup>,并且与一般的抗肿瘤药物相比,其具有更高的选择性,并且作用于实体瘤时毒性很弱,较低的药物剂量便可达到很好的抗肿瘤效果<sup>[14,20,22]</sup>。然而此药物与病毒联合治疗的效果尚不清楚,本实验研究溶瘤腺病毒 ZD55-MnSOD 与小分子药物 SNS-032 联合抑制人结肠癌细胞的抗癌作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药物及试剂

腺病毒 ZD55-MnSOD 由本实验室构建完成。SNS-032 购自 SELLECK 公司。细胞培养用 DMEM 及胎牛血清购自 GIBCO 公司。

#### 1.1.2 人结肠癌细胞株及培养

人结肠癌细胞株 HCT116、HT-29、SW620 均为本实验室保存。细胞培养在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,37℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下恒温培养,每 2~3 d 传代 1 次。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 MTT 法检测细胞存活率

将对数期生长的肿瘤细胞按每孔 5 000 个细胞植入 96 孔培养板中培养,每孔加入培养液的体积为 100 μL,待细胞贴壁后,加入相应的病毒与药物,体积为 20 μL,37℃,5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养至指定的时间,每孔加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT。37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养 4 h 后,每孔加入 150 μL DMSO,剧烈

震荡 10 min,在酶标仪上测定 490 nm 波长处的吸光值。实验中设不加细胞的空白对照孔。按以下公式计算肿瘤细胞的存活率:

肿瘤细胞存活率 = (处理组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) × 100%。

#### 1.2.2 Western blot 检测溶瘤腺病毒 ZD55-MnSOD 目的基因的表达

将 5 × 10<sup>5</sup> 个肿瘤细胞铺于 6 孔板,每孔加入培养液的体积为 1.6 mL,待细胞贴壁后,按照要求分别加入 5 MOI 的病毒、终浓度为 80 ng/mL 的 SNS-032 及加入 5 MOI 的病毒联合 80 ng/mL 的 SNS-032 各 400 μL,以不加病毒的细胞作为对照,在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养 48 h 后,用 4℃ 预冷的 PBS 洗板两次,每孔加入 100 μL 裂解液,冰上充分裂解 15 min 后,收入离心管,100℃ 变性 10 min,12 000 r/min,5 min。将上清分装于 -20℃ 备用,用时直接溶解上样。将定量蛋白以每孔加入 10 μg 总蛋白样加入 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后按半干转膜法转膜(PVDF 膜),5% 的脱脂奶粉中封闭 2 h,一抗孵育,按抗体说明书上的最佳稀释浓度稀释加一抗(1 : 1 000 稀释),室温下于摇床孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入稀释好的荧光二抗(1 : 15 000 稀释),室温下摇床孵育 45~60 min, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,用 LI-COR 扫膜仪扫膜,红外激光成像系统对待测蛋白进行分析。

#### 1.2.3 Hoechst33342 染色检测细胞的凋亡

将对数期的肿瘤细胞按 5 000 个/孔植入 96 孔培养板,每孔加入培养液的体积为 100 μL,在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养,待细胞贴壁后,用不同浓度的药物处理 HCT116 细胞,36 h 后,用 PBS 洗细胞两次,加入浓度为 1 mg/mL 的 Hoechst33342 体积为 1 μL,使 Hoechst33342 的终浓度在 0.5~10 μg/mL 之间,继续在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中孵育 15 min,然后在荧光显微镜下观察细胞核的变化并拍照。

#### 1.2.4 流式细胞仪检测细胞的凋亡

接种 5 × 10<sup>5</sup> 个肿瘤细胞铺于 6 孔板,每孔加入培养液的体积为 1.6 mL,待细胞贴壁后,按照要求分别加入 5 MOI 的病毒、终浓度为 80 ng/mL 的 SNS-032 及加入 5 MOI 的病毒联合 80 ng/mL 的 SNS-032 各 400 μL,以不加病毒的细胞作为对照,在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养 48 h 后,用 PBS 洗细胞两次,收集细胞,参照 AnnexinV/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒操作说明,于流式细胞仪上

检测。

### 1.3 统计学分析

使用 Excel 2003 分析数据,用 GraphPad5.0 作图,结果采用  $t$  检验,NS 表示差异不显著,  $P < 0.05$  表示差异显著,用“\*”表示,  $P < 0.01$  表示差异极显著,用“\*\*”表示。

## 2 结果

### 2.1 单独使用 SNS-032 对结肠癌细胞的存活率的影响

通过 MTT 法检测不同剂量的 SNS-032 对不同结肠癌细胞在不同时间的杀伤作用,结果如图 1 所示。图 1 显示 SNS-032 对人结肠癌细胞的抑制作用具有剂量依赖性和时间依赖性。较低剂量的 SNS-032 就可以达到很好的抑制肿瘤细胞增殖的作用;同时,可以看出不同的结肠癌细胞对药物的敏感度不同。如图 1 所示,在 24 h 时,药物剂量为 160 ng/mL SNS-032 对 HCT116 细胞和 SW620 细胞作用效果稍差于 80 ng/mL 的药物剂量,说明在短期内,细胞对较高的药物剂量具有一定的耐药性,因此,笔者进一步做了将病毒与不同的药物剂量联合处理不同的结肠癌细胞。

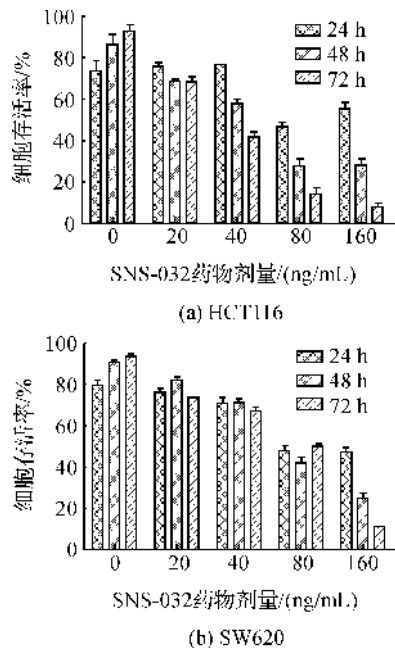


图1 MTT法检测 SNS-032 在不同时间不同剂量单独作用对人结肠癌细胞的抑制率

### 2.2 不同剂量的 SNS-032 与 5 MOI 的 ZD55-MnSOD 病毒联合作用于三种不同的结肠癌细胞 HCT116、HT-29、SW620 的抗癌效果

以不同剂量的 SNS-032 与 5MOI 的溶瘤腺病

毒联合分别感染 HCT116、HT-29、SW620 细胞,在 72 h 后,检测其对结肠癌细胞的存活率的影响,结果如图 2 所示。图 2 可见, SNS-032 与 ZD55-MnSOD 联合作用时,对三种结肠癌细胞的增殖均有明显的抑制作用,并且随着 SNS-032 药物浓度增加,对结肠癌细胞的抗癌效果越好,在剂量为 160 ng/mL 的 SNS-032 与 ZD55-MnSOD 联合作用于 HT-29 时, HT-29 细胞存活率大约只有 10% 左右。

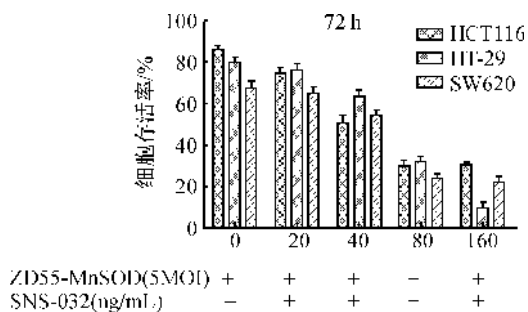


图2 ZD55-MnSOD 与 SNS-032 联合对人结肠癌细胞株的抑制率

### 2.3 用 5MOI 的溶瘤腺病毒与 80 ng/mL 的 SNS-032 药物联合,在不同时间对 HT-29 和 SW620 细胞的抗癌作用

用 5MOI 的溶瘤腺病毒与 80 ng/mL 的 SNS-032 药物处理 HT-29 细胞和 SW620 细胞 24、48、72 h 和 96 h 后, MTT 检测不同时间联合处理对肿瘤细胞增殖的影响,结果如图 3。SNS-032 与 ZD55-MnSOD 联合作用 HT-29 细胞 96 h 时,对肿瘤细胞的杀伤作用明显强于单独使用病毒或药物。SNS-032

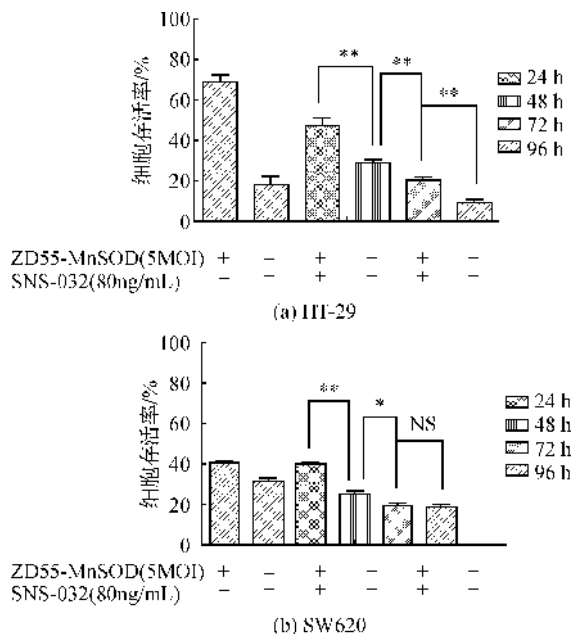


图3 ZD55-MnSOD 与 SNS-032 联合作用不同时间对人结肠癌细胞增殖的影响

与 ZD55-MnSOD 联合作用于 SW620 细胞 96 h 时,联合作用的效果明显高于单独使用药物或病毒,并且对 HT-29 和 SW620 细胞均呈现出随着时间的增加,作用效果越明显,说明病毒与药物联合具有明显的时间依赖性。

#### 2.4 Western blot 检测溶瘤腺病毒 ZD55-MnSOD 目的基因的表达

ZD55-MnSOD, SNS-032, ZD55-MnSOD 与 SNS-032 联合处理 HCT116 细胞,剂量分别为 5 MOI、80 ng/mL 以及 5 MOI+80 ng/mL,设立加等量的 PBS 作为对照组,在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养 48 h 后,Western blot 检测目的基因 MnSOD 的表达,结果如图 4。图 4 显示,GAPDH 为内参蛋白,单独使用 ZD55-MnSOD 处理 HCT116 细胞表达的 MnSOD 比对照组和单独使用 SNS-032 的量都明显提高,并且 ZD55-MnSOD 与 SNS-032 联合处理的表达量比任何一种也都明显提高,说明 ZD55-MnSOD 与 SNS-032 联合可以增加 MnSOD 的表达量。

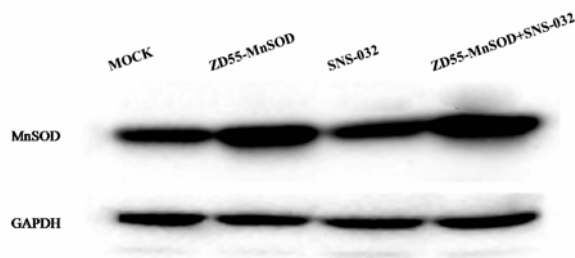


图 4 Western blot 检测目的基因 MnSOD 的表达

#### 2.5 Hoechst33342 染色观察细胞凋亡

通过染色,检测病毒及药物处理后细胞核的形态学变化及凋亡情况。如图 5 所示:PBS 处理的对照孔细胞没有发生形态学的变化,细胞密度大,并且均匀铺散开,基本没有细胞凋亡;然而病毒与药物处理组的细胞生长受到明显的抑制并且出现明显的细胞凋亡状态,发生凋亡的细胞其细胞核染色质会发生明显凝集、固缩、并伴有凋亡小体出现。并且,随着药物剂量的升高,凋亡增多。

#### 2.6 流式细胞术检测细胞凋亡

ZD55-MnSOD 与不同剂量的 SNS-032 (0、20、40、80、160 ng/mL)联合处理 HCT116 细胞,设立加等量 PBS 的对照组,在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养 48 h 后,用不含 EDTA 的胰酶收集细胞,AnnexinV/PI 双染参见流式试剂盒检测细胞凋亡(图 6)。图 6(a)显示,病毒与不同浓度的药物联合,所用药物浓度越高,早期和晚期凋亡都有增加,随着

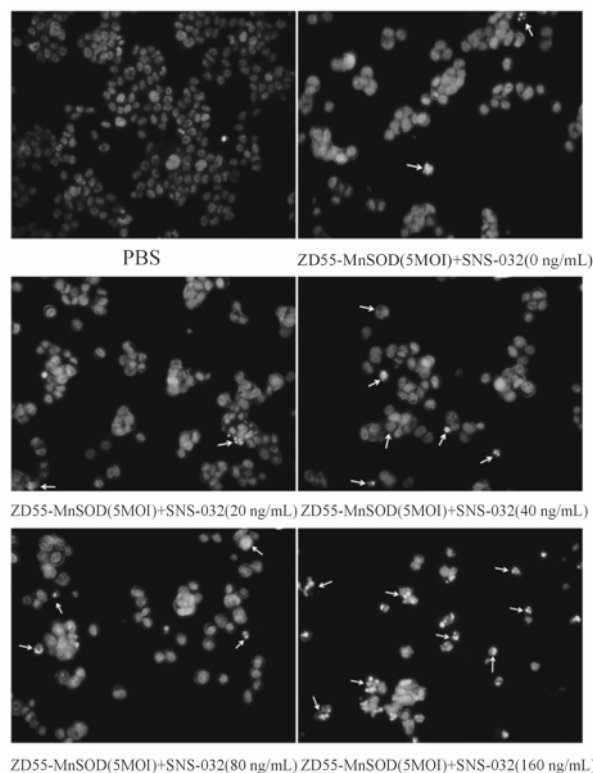


图 5 Hoechst33342 观察细胞凋亡现象

药物剂量的提高,早期和晚期凋亡现象越明显。在药物剂量为 160 ng/mL 时,早晚期凋亡共达到 12% 左右。图 6(b)为统计学分析对照组与加药组出现明显差异。

### 3 讨论

随着科技的不断发展,治疗癌症的药物大批涌现,但药物的副作用及其抗癌效果都还很难预测,找到一种科学合理的治疗方法势在必行。本实验采用 ZD55-MnSOD 与不同剂量的 SNS-032 联合作用于人结肠癌细胞株,实验证明二者的联合作用比单独使用病毒或单独使用药物效果均要显著,可以有效地抑制肿瘤细胞的增殖并促进肿瘤细胞的凋亡。MTT 结果表明,单独使用药物处理人结肠癌细胞时,在一定范围内随着药物剂量的增加,药物对肿瘤细胞的增殖有抑制作用,但较高的药物剂量时,会降低对肿瘤细胞的抑制能力。然而,用病毒与药物联合处理人结肠癌细胞,随着药物剂量的增加,对肿瘤细胞的杀伤能力越强,并且,二者的联合具有时间依赖性。Hoechst33342 染色观察发现,单独 SNS-032 或 ZD55-MnSOD 处理的细胞只有很少凋亡现象出现。而药物联合组有明显的凋亡小体出现,并且有大量细胞发生凋亡。应用流式细胞术检测肿瘤细胞的凋亡,验证发现与 MTT 结果符合,发现二者联合

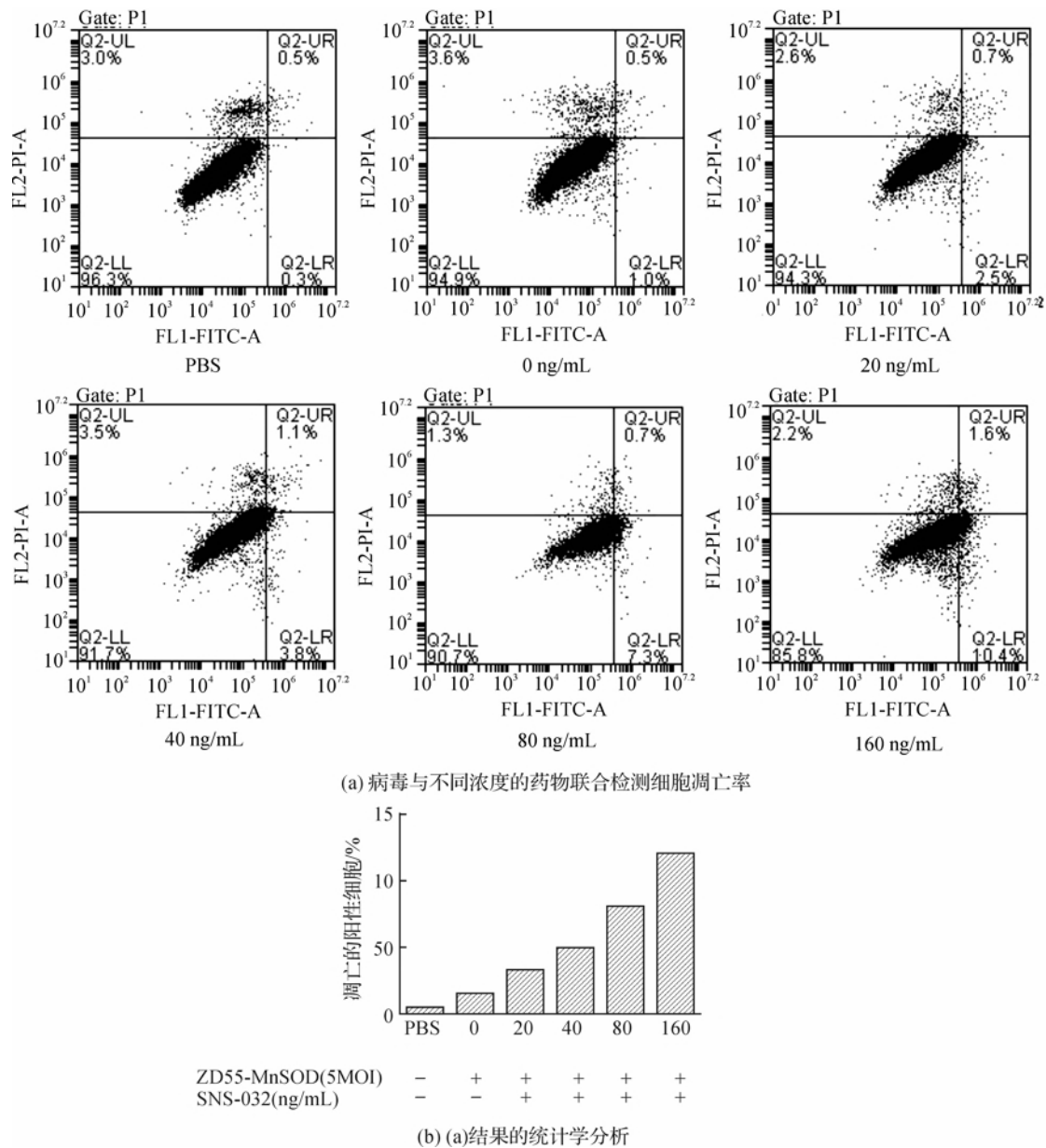


图6 流式细胞术检测病毒与药物联合处理对HCT116细胞凋亡率的影响

作用时,能有效地促进人结肠癌细胞发生凋亡,并且凋亡多发生于凋亡早期阶段。在本实验中,为了降低过高的病毒剂量可能会增加治疗的风险,采用较低的病毒剂量与药物联合,这样既能降低各自的剂量,又能达到很高的抗肿瘤效果。然而,ZD55-MnSOD联合SNS-032时,最佳协同作用的剂量以及具体的引起它们联合作用的机制仍有待进一步研究。并且笔者所用的SNS-032并不是具有广谱性的抗癌药物,因为研究表明它对某些细胞具有一定的耐药性,由于具有耐药性,有可能需加大药物的使用剂量,因此,SNS-032对其他肿瘤细胞的治疗效果还有待进一步验证。本实验为以后的体内实验打

下理论基础,对临床实验也具有一定的参考价值。

#### 参考文献:

- [1] Fernandez U I, Hammer K, Arndt M A, et al. Genetic delivery of an immunoRNase by an oncolytic adenovirus enhances anticancer activity[J]. *Int J Cancer*, 2014, 136(9): 2228-2240.
- [2] Chen X J, Zhang K, Xin Y, et al. Oncolytic adenovirus-expressed RNA interference of O-methylguanine DNA methyltransferase activity may enhance the antitumor effects of temozolomide[J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(5): 2201-2202.
- [3] Kirn D, Niculescu-Duvaz I, Hallden G, et al. The emerging fields of suicide gene therapy and virotherapy

- [J]. Trends Mol Med, 2002, 8(S4): 68-73.
- [4] Kirn D. Replication-selective oncolytic adenoviruses; virotherapy aimed at genetic targets in cancer[J]. Oncogene, 2000, 19(56): 6660-6669.
- [5] Bravard A, Sabatier L, Hoffschir F, et al. SOD2: a new type of tumor-suppressor gene? [J]. Int J Cancer, 1992, 51(3): 476-480.
- [6] Zhang Y H, Gu J F, Zhao L L. Complete elimination of colorectal tumor xenograft by combined manganese superoxide dismutase with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene virotherapy[J]. Cancer Res, 2006, 66(8): 4291-4298.
- [7] Kinnula V L, Crapo J D. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167(12): 1600-1619.
- [8] Oberley T D, Zhong W, Szweda L I, et al. Localization of antioxidant enzymes and oxidative damage products in normal and malignant prostate epithelium[J]. Prostate, 2000, 44(2): 144-155.
- [9] Hur G C, Cho S J, Kim C H, et al. Manganese superoxide dismutase expression correlates with chemosensitivity in human gastric Cancer Cell lines[J]. Clinical Cancer Research, 2003, 9(15): 5768-5775.
- [10] Hwang T S, Choi H K, Han H S. Differential expression of manganese superoxide dismutase, copper/zinc superoxide dismutase, and catalase in gastric adenocarcinoma and normal gastric mucosa[J]. Eur J Surg Oncol, 2007, 33(4): 474-479.
- [11] Misra R N, Xiao H Y, Kim K S, et al. N-(cycloalkylamino) acyl-2-aminothiazole inhibitors of cyclin-dependent kinase 2-N-[5-[[[5-(1, 1-dimethylethyl)-2-oxazolyl] methyl] thio]-2-thiazolyl]-4-piperidinecarboxamide (BMS-387032), a highly efficacious and selective antitumor agent[J]. J Med Chem, 2004, 47(7): 1719-1728.
- [12] Mukhopadhyay P, Ali M A, Nandi A, et al. The cyclin-dependent kinase 2 inhibitor down-regulates interleukin-1beta-mediated induction of cyclooxygenase-2 expression in human lung carcinoma cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(3): 1758-1766.
- [13] Simon F S, Peter K, Jenifer B, et al. Transient treatment with CDK inhibitors eliminates proliferative potential even when their abilities to evoke apoptosis and DNA damage are blocked[J]. Cell Cycle, 2008, 7(24): 3898-3907.
- [14] Ali M A, Choy H, Habib A A, et al. SNS-032 prevents tumor cell-induced angiogenesis by inhibiting vascular endothelial growth factor [J]. Neoplasia, 2007, 9(5): 370-381.
- [15] Chen R, Chubb S, Cheng T, et al. Responses in mantle cell lymphoma cells to SNS-032 depend on the biological context of each cell line[J]. Cancer Res, 2010, 70(16): 6587-6597.
- [16] Heath Elisabeth I, Bible K, Martell R E, et al. A phase 1 study of SNS-032 (formerly BMS-387032), a potent inhibitor of cyclin-dependent kinases 2, 7 and 9 administered as a single oral dose and weekly infusion in patients with metastatic refractory solid tumors[J]. Invest New Drugs, 2008, 26(1): 59-65.
- [17] Wu Y B, Chen C, Sun X Y, et al. Cyclin-dependent kinase 7/9 inhibitor SNS-032 abrogates FIP1-like-1 platelet-derived growth factor receptor alpha and bcr-abl oncogene addiction in malignant hematologic cells [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(7): 1966-1978.
- [18] Amelie B, Tina C, Greg H E. Chemoprevention of mouse intestinal tumorigenesis by the cyclin-dependent kinase inhibitor SNS-032[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2009, 2(9): 800-806.
- [19] Xie G E, Tang H P, Wu S Q, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor SNS-032 induces apoptosis in breast cancer cells via depletion of Mcl-1 and X-linked inhibitor of apoptosis protein and displays antitumor activity in vivo[J]. Int J Oncol, 2014, 45(2): 804-812.
- [20] Tong W G, Chen R, Plunkett W, et al. Phase I and pharmacologic study of SNS-032, a potent and selective CDK2, 7, and 9 inhibitor, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma [J]. Journal of Clinical Oncology, 2010, 28(18): 3015-3022.
- [21] 祁瑞哲, 纪庆, 张丽艳, 等. 细胞周期抑制剂 SNS-032 对小鼠造血干细胞生物活性的影响研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 21(3): 741-745.
- [22] Conroy A, Stockett D E, Walker D, et al. SNS-032 is a potent and selective CDK 2, 7 and 9 inhibitor that drives target modulation in patient samples[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2009, 64(4): 723-732.

## Preparation of Immobilized Extracellular Lipase from *Bacillus Licheniformis*

WU Cheng-yu, YE Piao, YANG Xiao-ting, XU Ye-qian, GONG Xiao-lei, TANG Qi-qing,  
ZHAO Fu-kun, PAN Jian-yi, CHEN Wei

(School of Life Science, Zhejiang Science and Technology University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Lipase is a kind of important hydrolase which is widely used in food, medicine, and chemical industry etc. Lipase immobilization can improve the usage efficiency of lipase. In this study, glutaraldehyde covalent linkage was applied to fix extracellular lipase from *Bacillus licheniformis* to amino carrier ZH-HA. After 1 g carrier was put into 10 mL enzyme solution and reacted for 3h, the activity of immobilized lipase was up to 60 U/g wet carrier. The temperature stability of the immobilized enzyme was significantly improved, and the highest enzyme activity reached up to 220 U/g wet carriers at 45°C. Moreover, immobilization made enzyme stability boost under alkaline condition, and the optimal pH value for reaction was 10. Working stability of this enzyme was investigated through self-made column reactor. After continuous hydrolysis reaction for 15 batches, the immobilized lipase still remained 90% activity and it showed good operational stability.

**Key words:** *Bacillus licheniformis*; lipase; immobilization; ZH-HA

(责任编辑: 许惠儿)

(上接第 693 页)

## In-Vitro Inhibitory Effect of Oncolytic Adenovirus ZD55-MnSOD Combined with New CDK Inhibitor on Human Colon Cancer Cells

HAN Jian-cui<sup>a</sup>, MA Bu-yun<sup>a</sup>, WU Cheng-yu<sup>a</sup>, WANG Yi-gang<sup>a</sup>, WANG Shi-bing<sup>a,b</sup>

(a. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, b. Research Centre, School of Life Science,  
Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** The research is to develop in-vitro inhibitory effect of MnSOD carried oncolytic adenovirus Ad-E1B55Kd-MnSOD (ZD55-MnSOD) combined with small molecular drug novel CDK inhibitor SNS-032 on colon cancer cell lines such as SW620, HCT116 and HT-29. Oncolytic virus and drugs were combined to seek good antitumor effects. In this experiment, MTT was used to detect the application effect of 5MOI ZD55-MnSOD combined with different dosage of SNS-032 (0, 20, 40, 80, 160 ng/mL) on human colon cell line. The authors found that the combination of oncolytic virus and drug could promote tumor cell apoptosis; and also found that treatment of SW620 and HT-29 with combined ZD55-MnSOD (5 MOI) and SNS-032 (80 ng/mL) had great time dependence. Hoechst33342 staining method and flow cytometry were used to detect apoptosis. The results also show that the apoptosis phenomenon in the group of combined use of ZD55-MnSOD with SNS-032 has better effects than separate use of oncolytic virus or drug alone. This research preliminarily proves ZD55-MnSOD (5 MOI) and SNS-032 have supplementary effect and can effectively inhibit the growth of colon cancer cells in vitro.

**Key words:** oncolytic adenovirus; SNS-032; colon cancer; antitumor effect

(责任编辑: 许惠儿)