



双基因溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5-shPKM2 抗肝癌活性的初步探究

杜春明¹, 刘新垣^{1,2}

(1. 浙江理工大学生命学院, 杭州 310018;

2. 中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要: 研究携带 mK5 和 shPKM2 的双基因溶瘤腺病毒(O^{Ad}-mK5-shPKM2)对肝癌细胞的体内和体外杀伤作用,通过 PCR 技术证明 O^{Ad}-mK5-shPKM2 中无野毒污染,Western blot 检测腺病毒早期基因 E1A 和抗癌基因的表达,CCK8 细胞增殖实验和动物实验检测溶瘤腺病毒对肝癌细胞的体外和体内杀伤作用。结果表明:O^{Ad}-mK5-shPKM2 在细胞实验和动物实验中均可有效地抑制肝癌细胞的增殖,并且 O^{Ad}-mK5-shPKM2 对肝癌细胞增殖的抑制效果要强于单基因溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5 或 O^{Ad}-shPKM2。双基因溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5-shPKM2 携带的两个基因可以共同促进溶瘤腺病毒对肝癌细胞的杀伤作用,为进一步研究恶性肿瘤的生物治疗提供理论依据。

关键词: O^{Ad}-mK5-shPKM2; 肝癌; 抗癌基因; 生物治疗

中图分类号: Q789

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2019) 01-0106-07

Antitumor effect of oncolytic adenovirus armed with mK5 and shPKM2 in liver cancer

DU Chunming¹, LIU Xinyuan^{1,2}

(1.College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2.Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy
of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: In vivo and in vitro killing effects of a recombinant oncolytic adenovirus armed with anticancer gene mK5 and shPKM2 (O^{Ad}-mK5-shPKM2) on liver cancer cells were explored in this study. PCR was used to prove the recombinant oncolytic adenovirus is free from wild virus contamination. Western blot was adopted to detect expression of early adenovirus gene E1A and anticancer gene. CCK8 cell proliferation experiment and animal experiment were employed to detect in vivo and in vitro killing effects of oncolytic adenovirus on liver cancer cells. The results showed that O^{Ad}-mK5-shPKM2 could effectively inhibit liver cancer cell proliferation in both cell experiment and animal experiment, and O^{Ad}-mK5-shPKM2 had a better antitumor effect than O^{Ad}-mK5 or O^{Ad}-shPKM2. This indicates that mK5 and shPKM2 can jointly enhance the antitumor effect of oncolytic adenovirus on liver cancer cells. This study provides basis for biotherapy of cancer.

Key words: O^{Ad}-mK5-shPKM2; liver cancer; antitumor gene; biotherapy

0 引言

基于人口结构和癌症死亡率的变化,肝癌将要在 2030 年成为美国第三大癌症死亡原因^[1]。在中国,乙肝患者具有很高的肝癌发生率,并且新发肝癌患者较多,占到全球肝癌患者总数的 55%,肝癌的治疗是一个对人类健康意义非常重大的课题,对我国人民的健康和人类的健康起到非常重要的作用^[2]。Hananha 等^[3]研究发现,肝癌不是由单一因素调控的疾病,而是一种由多个细胞信号通路来调控的多因素疾病,在肝癌的治疗过程中,针对几个靶点来用药的效果要好于针对单一靶点来用药。治疗肝癌的方法主要是放化疗和手术,对于早期的肝癌患者,传统的肝癌治疗方法可以取得显著的治疗效果;但传统的肝癌治疗方法对晚期肝癌患者往往没有特别好的治疗效果^[4]。

溶瘤病毒被广泛用于癌症治疗的研究,溶瘤病毒对肿瘤的治疗有非常好的效果^[5]。溶瘤病毒可以在肿瘤细胞中特异性地复制,而不伤害正常细胞^[6]。将抗癌基因插入到溶瘤腺病毒基因组中,溶瘤腺病毒介导抗癌基因进入肿瘤细胞,因而抗癌基因伴随着溶瘤病毒的复制而在肿瘤细胞中特异性地大量复制^[7]。Liu 等^[8]研究发现,癌症的靶向基因一病毒治疗策略对肿瘤的治疗效果,往往要强于单独用溶瘤病毒或单独用抗癌基因对肿瘤的治疗。在癌症的靶向基因一病毒治疗策略的基础上,向溶瘤病毒载体中插入两个抗癌基因,往往能取得更好的抗癌效果^[9]。

Survivin 蛋白是一种在肿瘤组织中表达量很高的蛋白,但是在正常的组织中,Survivin 蛋白的表达量非常低,很难被检测到^[10-11]。*survivin* 启动子被用于调控溶瘤腺病毒中 E1A 基因的转录,溶瘤腺病毒在 *survivin* 启动子的特异性转录作用下,在肿瘤细胞中特异性复制^[12]。mK5 是人血纤维蛋白溶酶原上第五个环装结构域 k5 的突变体,与 k5 相比, mK5 上第 71 位的亮氨酸被突变为精氨酸^[13]。Fan 等^[14]研究发现,这个突变使得 k5 与靶蛋白的结合能力变强, mK5 具有比 k5 更强的抑制血管生成的作用。PKM2 是丙酮酸激酶(PK)的 M2 亚型, PKM2 的高表达往往伴随着肿瘤恶性程度的增加^[15-16]。shPKM2 是 PKM2 的短发夹 RNA(shRNA),它可以特异性地清除肿瘤细胞中 PKM2 的信使 RNA,使 PKM2 无法表达,从而抑制肿瘤细胞的生长^[17]。

癌症的靶向基因一病毒治疗策略已经成为一个重要的肿瘤治疗策略^[18]。在癌症的靶向基因一病毒治疗策略的指导下,成功构建了双基因溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5-shPKM2。为了更好地靶向杀伤肿瘤,本文通过改造溶瘤腺病毒的方法,向溶瘤腺病毒的基因组中插入 mK5 抗癌基因和 shPKM2,通过 PCR 和 Western blot 检测其在溶瘤腺病毒基因组中的插入情况和表达水平;通过 CCK8 细胞增值实验和以裸鼠为模型的动物实验,检测携带抗癌基因的溶瘤腺病毒在体外和体内对肝癌细胞的杀伤作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人胚肾细胞 HEK293 (Microbix 公司); QSG-7701、Huh-7、Hep3B 和 HepG2(中科院上海细胞库);穿梭质粒 pShuttle-surp- Δ E1B(本实验室保存);大肠杆菌菌株 DH5 α 和 BJ5183-AdEasy-E3(本实验室保存);核酸染料 Gelstain(全式金生物技术有限公司);Western 实验所用到的抗体 Anti-mK5(本实验室保存);Anti-GAPDH (碧云天);Anti-PKM2 和 Anti-E1A(Santa Cruz 公司);细胞培养基和血清(Gibco 公司);HB-InfusionTM 试剂盒(汉恒生物);CCK8 试剂(同仁化学科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 溶瘤腺病毒的构建,包装和鉴定

mK5 抗癌基因和 shPKM2 的表达框被以酶切连接的方式插入到穿梭质粒 pShuttle-surp- Δ E1B 中,构建出携带 mK5 抗癌基因和 shPKM2 的穿梭质粒 pShuttle-mK5-surp- Δ E1B, pShuttle-surp- Δ E1B-shPKM2 和 pShuttle-mK5-surp- Δ E1B-shPKM2。通过基因同源重组原理,将携带抗癌基因的穿梭质粒转化到大肠杆菌 BJ5183-AdEasy-E3 中同源重组,然后涂平板,挑取单克隆菌落,37 °C 恒温摇床中 220 r/min 震荡培养过夜后,抽提质粒进行酶切鉴定,得到溶瘤腺病毒骨架质粒 pAd-surp- Δ E1B、pAd-mK5-surp- Δ E1B, pAd-surp- Δ E1B-shPKM2 和 pAd-mK5-surp- Δ E1B-shPKM2。在构建好溶瘤腺病毒骨架质粒的基础上,通过脂质体包埋技术,把溶瘤腺病毒骨架质粒转染到状态良好的 HEK293 细胞中,将细胞放入培养箱中培养 7 d, HEK293 细胞将出现空斑,并且大量细胞漂浮起来,既为病变现象,收取病毒,获得重组溶瘤腺病毒 O^{Ad}、O^{Ad}-mK5、O^{Ad}-shPKM2 和 O^{Ad}-mK5-shPKM2。重组溶瘤腺病毒

通过 PCR 的方法,确定溶瘤腺病毒中是否存在野生型溶瘤腺病毒。

1.2.2 CCK8 细胞增殖实验

向铺在 96 孔板中的 Huh-7 肝癌细胞中分别加入 0.1、1.0、10.0 MOI 以及 100 MOI 的溶瘤腺病毒;96 h 后采用 CCK8 法检测肿瘤细胞的活性。为了检测溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5-shPKM2 对不同肝癌细胞系的抗癌效果,以及对正常肝细胞的安全性,选择 3 种肝癌细胞和 1 种正常肝细胞用于 CCK8 实验。设置 4 个实验组,分别往各组中加入 10.0 MOI 的重组溶瘤腺病毒 O^{Ad}、O^{Ad}-mK5、O^{Ad}-shPKM2 和 O^{Ad}-mK5-shPKM2,同时设置对照组和空白组。分别在 24、48、72 h 和 96 h 后,CCK 法检测细胞活性,根据各孔的吸光度计算出溶瘤腺病毒对肿瘤细胞的杀伤力。

1.2.3 动物实验

本文所用动物为 4 周龄雌性 BALB/c 裸鼠,购买自上海灵畅生物科技有限公司。为了检测溶瘤腺病毒对实体瘤的杀伤能力,构建 BALB/c 裸鼠移植瘤模型。通过皮下成瘤的方式,往每只 4 周龄裸鼠右侧背部皮下注入 2×10^6 个驯化后的 Huh-7 肝癌细胞,待肿瘤体积达到 $80\sim 120\text{ mm}^3$,通过随机分组的方式,将裸鼠分为 5 组,每组 6 只。通过瘤内注射的给药方式,分别把 $50\text{ }\mu\text{L}$ 总量为 5×10^8 pfu 的重组溶瘤腺病毒 O^{Ad}、O^{Ad}-mK5、O^{Ad}-shPKM2 和

O^{Ad}-mK5-shPKM2 注射到不同组别的裸鼠肿瘤内,对照组注射等体积的 PBS 溶液。采用隔 1 d 给一次药的方式,一共给药 4 次。每隔 1 d 用游标卡尺测量一次肿瘤的体积。

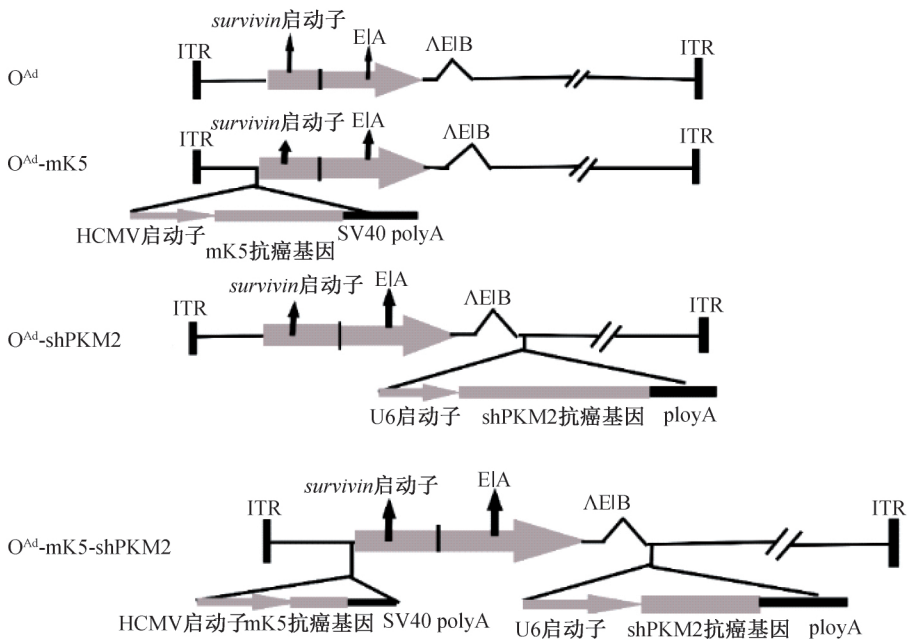
1.2.4 统计学分析

本文的相关实验数据,都以平均值±标准差表示,组间的比较,使用 Graphpad Prism 5 软件进行 *t* 检验或单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 溶瘤腺病毒的构建和鉴定

利用癌症的靶向基因一病毒治疗策略,成功构建 4 种重组溶瘤腺病毒,分别是 O^{Ad}、O^{Ad}-mK5、O^{Ad}-shPKM2 和 O^{Ad}-mK5-shPKM2,溶瘤腺病毒的基因骨架结构如图 1 所示。在成功构建出携带抗癌基因的重组溶瘤腺病毒的基础上,通过 PCR 的方法,证明重组溶瘤腺病毒中无野生型溶瘤腺病毒污染,结果如图 2 所示,PCR 结果显示重组溶瘤腺病毒中无野生型溶瘤腺病毒污染。为了确定溶瘤腺病毒中插入的 mK5 抗癌基因和 shPKM2 能否成功表达,通过 Western blot 的方法,检测其在溶瘤腺病毒中的表达情况,结果如图 3 所示。以上结果表明:重组溶瘤腺病毒中成功表达 mK5 抗癌蛋白和 shPKM2,并且腺病毒早期蛋白 E1A 表达正常。



注:ITR 为末端反向重复序列。

图 1 溶瘤腺病毒的基因骨架结构

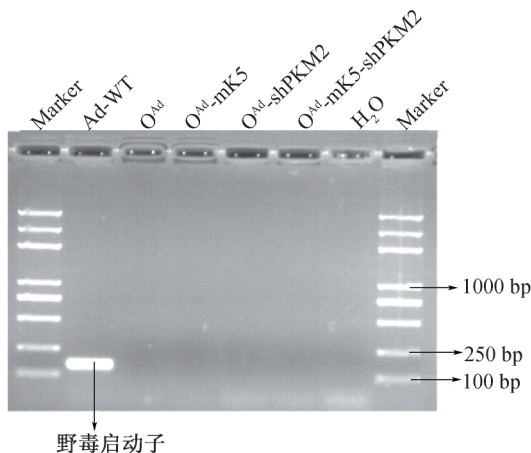
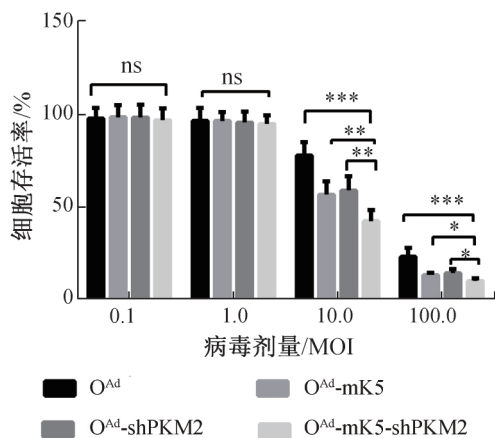


图 2 PCR 鉴定溶瘤腺病毒无野生型腺病毒污染



注: ns 表示无统计学差异($p>0.05$), $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ 。

图 4 细胞增殖实验检测细胞存活率

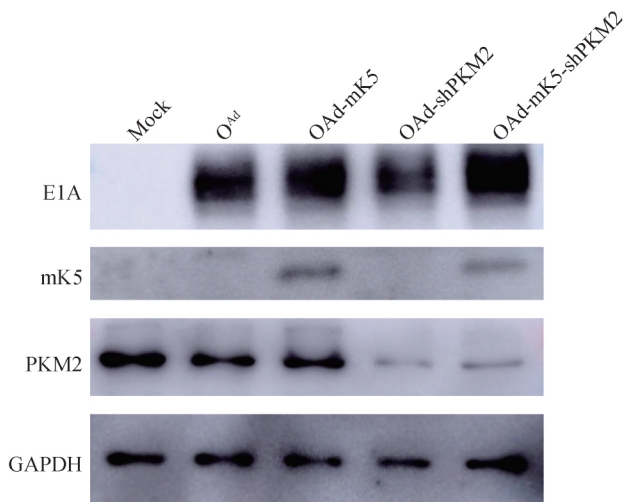


图 3 Western blot 检测抗癌蛋白和 E1A 的表达

2.2 溶瘤腺病毒对 Huh-7 肝癌细胞杀伤力的剂量梯度分析

为了获得合适的用于细胞实验的重组溶瘤腺病毒剂量,本文设计溶瘤腺病毒的剂量梯度实验,通过 CCK8 法检测不同剂量溶瘤腺病毒对肿瘤细胞的杀伤能力,结果如图 4 所示。由图 4 知,当溶瘤腺病毒的剂量是 0.1 MOI 或者是 1.0 MOI, Huh-7 细胞并没有受到显著的杀伤;当溶瘤病毒的剂量为 10.0 MOI 或 100.0 MOI 的时候, Huh-7 细胞受到显著的杀伤,并且双基因溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5-shPKM2 比单基因溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5 或 O^{Ad}-shPKM2 具有更强的对肿瘤细胞的杀伤能力。因为 100.0 MOI 是一个较大的用药剂量,不利于药物的安全性,所以本文选用 10.0 MOI 的剂量来做后续的细胞杀伤实验。

2.3 CCK8 细胞增殖实验检测溶瘤腺病毒对肝癌细胞的杀伤力以及对正常肝细胞的安全性

本文通过 CCK8 细胞增殖实验检测重组溶瘤腺

病毒 O^{Ad}、O^{Ad}-mK5、O^{Ad}-shPKM2 和 O^{Ad}-mK5-shPKM 对肝癌细胞的杀伤力,以及对正常肝脏细胞的安全性。实验结果如图 5 所示。由图 5 知,本文中的重组溶瘤腺病毒对肝癌细胞有明显的杀伤效果,可有效抑制肿瘤细胞的增殖。图 5(a)—(c)表明:相比于单基因溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5 或 O^{Ad}-shPKM2,双基因溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5-shPKM2 具有更强的抑制肝癌细胞增殖的能力;溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5-shPKM2 对 Hep3B 肝癌细胞具有非常强的杀伤能力,对 Huh-7 肝癌细胞的杀伤能力较强,对肝癌细胞 HepG2 的杀伤能力较弱。在 3 种肝癌细胞系中,双基因溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5-shPKM2 对肝癌细胞的杀伤效果均强于单基因溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5 或 O^{Ad}-shPKM2。其原因可能是双基因溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5-shPKM2 所携带的 mK5 抗癌基因和 shPKM2 共同促进 O^{Ad}-mK5-shPKM2 的抗肿瘤能力。由图 5(d)可知,在 CCK8 细胞增殖实验中,溶瘤腺病毒不能抑制正常肝细胞 QSG-7701 的增殖,表明溶瘤腺病毒对正常肝细胞 QSG-7701 没有杀伤作用,具有明显的安全性。

2.4 动物实验检测溶瘤腺病毒对肿瘤生长的抑制作用

通过构建 Huh-7 肝癌细胞的 BALB/c 裸鼠移植瘤模型评价溶瘤腺病毒在动物体内的抗癌效果,动物实验结果如图 6 所示。由图 6 可知,O^{Ad}、O^{Ad}-mK5、O^{Ad}-shPKM2 和 O^{Ad}-mK5-shPKM2 对实验裸鼠的肿瘤抑制率分别为 28%、50%、47%和 64%,重组溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5-shPKM 显著地抑制裸鼠 Huh-7 肝癌移植瘤模型肿瘤体积的增长;并且双基因溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5-shPKM2 的抗癌效果

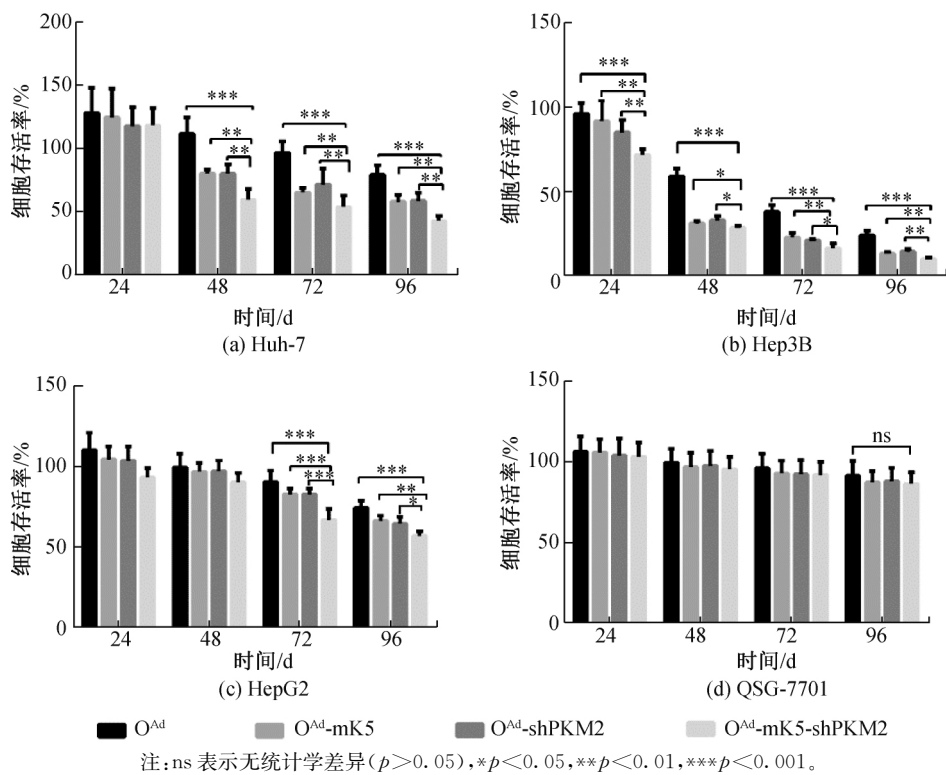


图5 CCK8细胞增殖实验检测细胞存活率

要明显地强于携带单一抗癌基因的溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5 或 O^{Ad}-shPKM2。

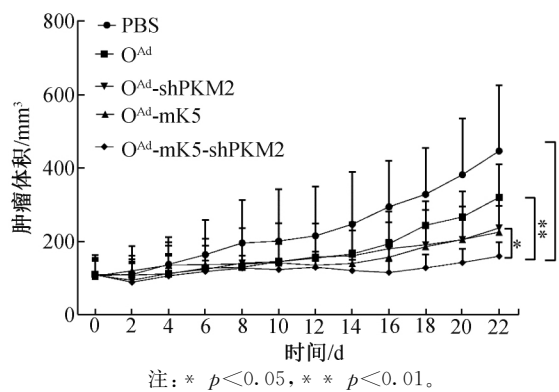


图6 溶瘤腺病毒在动物体内的抗癌效果

3 讨论

肝癌是我国高发的,对人体健康和生命危害极大的恶性肿瘤;肝癌的治疗难度较大以及肝癌患者的生存时间普遍较短,因而对肝癌治疗方法的研究十分重要^[19]。传统治疗肝癌的方法有外科手术、放疗和化疗,但治疗效果都不理想,癌症的生物疗法作为一种新的癌症治疗手段,可以突破传统疗法的局限。溶瘤病毒作为一种肿瘤生物疗法,可以特异性地消灭人体内的肿瘤细胞,是一种有效的抗癌手段。溶瘤腺病毒具有抗癌效果显著、可以在肿瘤组织中

特异性复制,安全性高等特点,是一种抗癌效果显著的溶瘤病毒,溶瘤腺病毒还可以作为抗癌基因的载体,携带抗癌基因进入肿瘤组织,使抗癌基因可以持续地在肿瘤组织中特异性表达,发挥抗癌作用。相较于空载的溶瘤腺病毒,携带抗癌基因的溶瘤腺病毒往往具有更强的抗癌效果^[20]。

本文获得的病毒 O^{Ad}-mK5-shPKM2 具有以下特点:第一、用 *survivin* 肿瘤特异性启动子取代溶瘤腺病毒野生型启动子,使溶瘤腺病毒在肿瘤细胞中可以特异性复制;第二、敲除溶瘤腺病毒的 E1B 区域,使溶瘤腺病毒在正常细胞中无法正常复制;第三、把 mK5 抗癌基因和 shPKM2 插入溶瘤病毒载体,抗癌基因伴随着溶瘤腺病毒的复制在肿瘤细胞中大量复制。通过以上的优化,可以极大地增强溶瘤腺病毒的抗癌效果。k5 有很强的抑制血管生成的作用,mK5 是 k5 的突变体,mK5 在 k5 的基础上,以定点突变的方式把 k5 亮氨酸结合结构域上面的第 71 位亮氨酸突变成精氨酸,增强此结构域对受体的结合^[13]。本文将 mK5 基因插入到溶瘤腺病毒基因组中,构建单基因溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5,在细胞实验和动物实验中,携带 mK5 的单基因溶瘤腺病毒对肝癌细胞有显著的抗癌效果。PKM2 不仅仅是糖酵解过程中的一个限速酶,还有很多非代谢功能,在多种癌症中 PKM2 都具有十分重要的作用。

用^[21-22]。PKM2 在肿瘤的发生发展过程中具有多种重要功能,并且 PKM2 的表达量与肝癌肿瘤病人的治疗效果成反比^[12]。本文将 PKM2 所对应的短发夹 RNA-shPKM2 插入到溶瘤腺病毒中,构建出携带 shPKM2 的溶瘤腺病毒。

多种溶瘤病毒类新药在抗肿瘤方面取得了非常好的效果,DNX-2401 是一款用于治疗神经胶质瘤的溶瘤病毒类药物,此药物已经获得美国国家食品药品监督管理局的批准^[12],Talimogene laherparepvec 是一款携带粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的溶瘤疱疹病毒,该溶瘤病毒可以治疗一些难以通过手术来治疗的黑色素瘤,目前已经在美国和欧洲上市^[23]。此外,一种通过瘤内注射方式给药的用来治疗复发恶性胶质瘤的呼肠孤病毒,也已经进入 I 期临床试验^[24]。综上所述,溶瘤病毒抗肿瘤是一种很有前景的抗癌策略。本文结果证实携带 mK5 抗癌基因和 shPKM2 的双基因溶瘤腺病毒相比于携带单个基因的溶瘤腺病毒具有更强的抗癌效果,mK5 抗癌基因和 shPKM2 在治疗肿瘤的过程中都发挥抗癌作用。k5 基因可以诱导肿瘤细胞的凋亡,shPKM2 基因可以抑制肿瘤细胞的自噬,mK5 抗癌基因和 shPKM2 可能在诱导细胞的凋亡和自噬的过程中,相互协同^[25-26]。此外,溶瘤腺病毒本身也能诱导肿瘤细胞的凋亡。

4 结 论

本文构建、包装和鉴定了以下 4 种溶瘤腺病毒: O^{Ad}、O^{Ad}-mK5、O^{Ad}-shPKM2 和 O^{Ad}-mK5-shPKM2;在细胞实验和动物实验中,对比 4 种溶瘤腺病毒的抗肿瘤效果发现:双基因溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5-shPKM2 的抗肿瘤效果要明显强于单基因溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5 或 O^{Ad}-shPKM2,双基因溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5-shPKM2 具有显著的抗肿瘤作用,因此利用双基因溶瘤腺病毒 O^{Ad}-mK5-shPKM2 对抗肿瘤是一个新的肝癌治疗思路。

参考文献:

- [1] Rahib L, Smith B D, Aizenberg R, et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States[J]. *Cancer Research*, 2014, 74 (11): 2913-2921.
- [2] Ma B, Wang Y, Zhou X, et al. Synergistic suppression effect on tumor growth of hepatocellular carcinoma by combining oncolytic adenovirus carrying XAF1 with cisplatin[J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2015, 141(3):419-429.
- [3] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: The next generation[J]. *Cell*, 2011, 14,(5):646-674.
- [4] Wang Y, Huang F, Cai H, et al. Potent antitumor effect of TRAIL mediated by a novel adeno-associated viral vector targeting to telomerase activity for human hepatocellular carcinoma [J]. *The Journal of Gene Medicine*, 2008, 10(5):518-526.
- [5] 郭婉,金槿,肖伯端,等. 基于溶瘤腺病毒抗肿瘤免疫治疗的前景与展望[J]. *中国细胞生物学学报*, 2018, 40 (6):1016-1022.
- [6] Russell S J, Peng K W, Bell J C. Oncolytic virotherapy [J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(7):658-670.
- [7] Zhao L, Gu J, Zhang Y, et al. Potent antitumor activity of oncolytic adenovirus expressing mda-7/IL-24 for colorectal cancer[J]. *Human Gene Therapy*, 2005, 16 (7):845-858.
- [8] Liu X Y, Gu J F. Targeting gene-virotherapy of cancer [J]. *Cell Research*, 2006, 16(1):25-30.
- [9] 王世兵,孟树林,武虎,等. 双基因溶瘤腺病毒联合 5-FU 抑制肺癌细胞增殖的研究[J]. *浙江理工大学学报*, 2014, 31(4):445-450.
- [10] Fukuda S, Pelus L M. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2006, 5(5):1087-1098.
- [11] Shepelev M V, Kopantzev E P, Vinogradova T V, et al. HTERT and BIRC5 gene promoters for cancer gene therapy: A comparative study[J]. *Oncology Letters*, 2016, 12(2):1204-121.
- [12] Xu Y, Chu L, Yuan S, et al. RGD-modified oncolytic adenovirus-harboring shPKM2 exhibits a potent cytotoxic effect in pancreatic cancer via autophagy inhibition and apoptosis promotion[J]. *Cell Death & Disease*, 2017, 8 (6):e2835.
- [13] Chang Y, Mochalkin I, McCance S G, et al. Structure and ligand binding determinants of the recombinant kringle 5 domain of human plasminogen [J]. *Biochemistry*, 1998, 37(10):3258-3271.
- [14] Fan J K, Xiao T, Gu J F, et al. Increased suppression of oncolytic adenovirus carrying mutant k5 on colorectal tumor [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 374(2):198-203.
- [15] Gao X, Wang H, Yang J J, et al. Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase[J]. *Molecular Cell*, 2012, 45(5):598-609.
- [16] Yang W, Xia Y, Hawke D, et al. PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and

tumorigenesis[J]. Cell, 2012, 150(4):685-696.

[17] 李玉环. PKM2 在肿瘤代谢及进展中的作用[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(5):818-821.

[18] Liu X Y, Li H G, Zhang K J, et al. Strategy of cancer targeting gene-viro-therapy (CTGVT) a trend in both cancer gene therapy and cancer virotherapy[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2012, 13 (9): 1761-1767.

[19] 刑荣春,秦周萍. 肝癌免疫治疗的研究进展[J]. 医药导报, 2018, 37(9):1094-1098.

[20] 肖睿娟,张越峰,潘素晶,等. 溶瘤腺病毒 ZD55-Mn-SOD 联合 TPL 对骨髓瘤细胞的生长抑制效应[J]. 浙江理工大学学报, 2012, 29(3):408-413.

[21] Wang X, Xu Y, Jiang C, et al. LincRNA-p21 suppresses development of human prostate cancer through inhibition of PKM2[J]. Cell Proliferation, 2017, 50(6):e12395.

[22] Li Y H, Li X F, Liu J T, et al. PKM2, a potential target for regulating cancer[J]. Gene, 2018, 668(1): 48-53.

[23] Andtbacka R H, Kaufman H L, Collichio F, et al. Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma[J]. Journal of Clinical Oncology, 2015, 33(25):2780-2788.

[24] Kicielinski K P, Chiocca E A, Yu J S, et al. Phase 1 clinical trial of intratumoral reovirus infusion for the treatment of recurrent malignant gliomas in adults[J]. Molecular Therapy, 2014, 22(5):1056-1062.

[25] 姚亚超. VDAC1 在 K5 诱导血管内皮细胞凋亡中的关键作用及机制研究[D]. 广州:中山大学, 2013:7-33.

[26] 张瑜,侯勇丽,平毅. PKM2 与恶性肿瘤关系的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(16):45-47.

(责任编辑:唐志荣)