

# 乏氧靶向性自杀基因治疗系统增强胰腺癌放疗效果的实验研究

刘军叶 郭鹏 郭国祯

【摘要】目的 探讨乏氧靶向性自杀基因治疗系统对胰腺癌放疗治疗的增强效应。方法 借助DNA重组技术构建乏氧依赖性表达的重组腺病毒载体Ad-5HRE/hCMVmpBCD。用Western blot检测细菌胞苷脱氨酶(BCD)的表达,细胞生长抑制实验检测人胰腺癌MIA-PACA2细胞对5-氟胞嘧啶(5-FC)的敏感性,裸鼠移植瘤实验观察Ad-5HRE/hCMVmpBCD/5-FC单独或联合放射治疗对MIA-PACA2细胞移植瘤的杀伤效应。结果 MIA-PACA2细胞感染Ad-5HRE/hCMVmpBCD后,乏氧处理可诱导BCD蛋白的表达,并显著提高细胞对5-FC的敏感性。裸鼠移植瘤实验结果显示,Ad-5HRE/hCMVmpBCD/5-FC与放射治疗均可抑制胰腺癌移植瘤的生长,但两者联合可显著增强对移植瘤的抑制效应。结论 乏氧靶向性的Ad-5HRE/hCMVmpBCD/5-FC自杀基因系统可显著增强胰腺癌细胞的放疗效果,具有良好的临床应用前景。

【关键词】细胞低氧;胰腺肿瘤;基因表达调控,肿瘤;胞苷脱氨酶;放射疗法

【中图分类号】R730.54 【文献标识码】A 【文章编号】1673-4114(2006)03-0168-05

## Hypoxia-targeted suicidal gene therapy system enhances antitumor effects of radiotherapy on pancreatic cancer

LIU Jun-ye, GUO Yao, GUO Guo-zhen.

(Department of Radiation Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

【Abstract】Objective To explore the effects of hypoxia-targeted suicidal gene therapy system combined with radiotherapy on pancreatic cancer. Methods The recombinant adenovirus Ad-5HRE/hCMVmpBCD was constructed by DNA recombinant technique. Western blot was used to detect hypoxia-induced expression of bacterial cytosine deaminase (BCD). Cell growth inhibition assay was used to determine the sensitivity of human pancreatic cancer cells MIA-PACA2 to 5-fluorocytosine(5-FC). Tumor xenograft growth delay assays was used to evaluate the effects of Ad-5HRE/hCMVmpBCD/5-FC combined with radiotherapy on pancreatic cancer. Results Western blot analysis demonstrated that hypoxia-induced BCD protein expression was achieved in MIA-PACA2 cells infected with Ad-5HRE/hCMVmpBCD. With hypoxia treatment, the sensitivity of MIA-PACA2 cells infected with Ad-5HRE/hCMVmpBCD to 5-FC significantly increased. Administration of either Ad-5HRE/hCMVmpBCD/5-FC or radiotherapy could inhibit the growth of MIA-PACA2 xenografts in nude mice. Moreover, combination of Ad-5HRE/hCMVmpBCD/5-FC could significantly enhance suppressing effects of radiotherapy on MIA-PACA2 xenografts. Conclusion Hypoxia-targeted suicidal gene therapy system Ad-5HRE/hCMVmpBCD/5-FC could enhance antitumor effects of radiotherapy on pancreatic cancer and can be used as a powerful adjunct to conventional radiotherapy.

【Key words】Cell hypoxia; Pancreatic neoplasms; Gene expression regulation, neoplastic; Cytosine deaminase; Radiotherapy

胰腺癌是常见的内脏恶性肿瘤之一。由于胰腺位于腹膜后,胰腺癌发病隐匿且早期常无症状,绝大多数患者就诊时已届晚期,失去了手术切除机

会。胰腺癌对化疗药物反应性差,化疗有效率很低。近年来,有学者尝试将放射治疗应用于胰腺癌患者,包括术中放疗、三维立体适形放疗以及放射性粒子植入,取得了一定的效果。但与其他实体肿瘤一样,胰腺癌放疗效果受肿瘤组织内部乏氧的影响<sup>[1]</sup>,乏氧肿瘤细胞对放射治疗的耐受性增强,通

作者单位:710032 西安,第四军医大学军事预防医学系放射医学教研室

通讯作者:郭国祯(E-mail: guozhengg@hotmail.com)

常导致肿瘤治疗失败甚至肿瘤复发和转移<sup>[2]</sup>。本研究拟构建基于细菌胞苷脱氨酶( bacterial cytosine deaminase, BCD) 的乏氧肿瘤细胞靶向性自杀基因治疗系统, 并观察该系统对胰腺癌放疗效果的增强效应, 为提高胰腺癌的临床治疗效果探索新途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养

人胚肾细胞系 293 细胞、人胰腺癌细胞系 MIA-PACA2 细胞均购自美国 ATCC 公司, 在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 中常规培养或传代。

### 1.2 主要试剂

Superfect 转染试剂盒为 QIAGEN 公司产品, 细胞增殖检测试剂盒购自 Promega 公司, 5-氟胞嘧啶( 5-fluorocytosine, 5-FC) 购自 Sigma 公司, 兔抗 c-myc 标签的多克隆抗体为 Santa Cruz 产品, 携带 c-myc 标签的真核表达载体 pEF/myc/cyto 购自 Invitrogen 公司, 腺病毒 Ad-CAG-LacZ 载体由日本京都大学医学部肝胆外科安田义博士惠赠, 携带 5 拷贝乏氧应答元件( hypoxia-responsive element, HRE) 的质粒载体 p5HRE/hCMVmp-Luc 由日本京都大学医学部放射线科柴田彻惠赠<sup>[3]</sup>, 其他分子生物学及免疫学试剂均为 Amersham Biosciences 或 Sigma 公司产品。

### 1.3 动物与照射

17~20 g 的 5 周龄雄性 BALB/c 裸鼠购于第四军医大学动物中心。X 线照射仪购自日本岛津公司。放射治疗时, 小鼠置于特制的有机玻璃盒中固定体位, 并用铅室屏蔽受照射肿瘤以外的躯体。

### 1.4 腺病毒载体 Ad-5HRE/hCMVmp-BCD 的构建及鉴定

为方便 BCD 的检测, 本实验在其 C-端融合入 c-myc 标签。以大肠杆菌的基因组 DNA 为模板, 通过聚合酶链反应扩增 BCD cDNA。聚合酶链反应产物经 1% 琼脂糖电泳分离后, 回收 1.2kb 的片段, 并将其克隆入 pEF/myc/cyto 载体使 BCD 与 c-myc 融合。用限制性内切酶 Kpn I 和 Nco I 酶切质粒 p5HRE/hCMVmpLuc, 酶切产物经琼脂糖电泳分离, 胶回收 3.4kb 的 p5HRE/hCMVmp 片段。用 Kpn I 和 Nco I 酶切将 BCD-myc 从重组 pEF/myc/cyto 载体释放出来, 并将其与线性化的 p5HRE/hCMVmp 连接, 用以构建 p5HRE/hCMVmpBCD 质粒。重组腺病毒载体 Ad-5HRE/hCMVmp-BCD 的构建按照黏粒穿梭法进行。

### 1.5 BCD 蛋白表达的检测

按  $2 \times 10^5/\text{ml}$  密度接种对数生长期 MIA-PACA2 细胞于 6 cm 玻璃平皿中, 常规条件下培养 24 h 后加入感染强度( multiplicity of infection, MOI) 分别为 2, 10, 20, 50 噬斑形成单位( plaque-forming units, pfu) 细胞的重组腺病毒 Ad-5HRE/hCMVmp-BCD, Ad-CAG-LacZ 用作对照病毒。将感染的细胞分别给予 24 h 的乏氧处理(  $\text{O}_2$  0.02%) 和 24 h 的常规有氧培养。参照文献[4]制备细胞总蛋白, 进行蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 以抗 c-myc 标签抗体为探针、用 Western blot 分析乏氧诱导的 BCD 蛋白表达。

### 1.6 细胞生长抑制实验

按照 Promega 公司细胞增殖检测试剂盒的说明书进行。收获对数生长中期的 MIA-PACA2 细胞, 调整细胞密度为  $1 \times 10^3/\text{ml}$ , 按照每孔  $100 \mu\text{l}$  接种入两块 96 孔板中, 置于细胞培养箱中按常规培养 24h 后, 加入 MOI 分别为 0, 1, 10, 100 pfu / 细胞的重组腺病毒 Ad-5HRE/hCMVmp-BCD, 37 °C、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度下培养 1 h, 而后加入不同浓度的 5-FC。每一种处理设 3 复孔。每一种细胞的两块培养板分别置于常规培养箱和乏氧培养箱中培养 24 h。更换新鲜的含有不同浓度的 5-FC 的培养液, 所有的细胞置于常规培养箱中培养 24 h。更换培养液为常规培养液, 继续培养 24 h。吸弃各孔内培养上清, 每孔加入  $150 \mu\text{l}$  噻唑蓝溶液, 37 °C、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度下培养 2 h。在酶联免疫检测仪上测定各孔的 490 nm 处的光吸收值, 以只加培养液不加细胞的空白对照孔调零; 以 5-FC 浓度为横坐标, 3 复孔的平均光吸收值为纵坐标, 绘制细胞生长曲线, 并计算细胞的半抑制浓度( inhibitory concentration of 50%,  $\text{IC}_{50}$ )。

### 1.7 肿瘤生长抑制实验

无菌条件下收获培养的 MIA-PACA2 细胞, 调整细胞数至  $1 \times 10^6/\text{ml}$ , 于小鼠右侧腿部皮下注射  $1 \times 10^6$  细胞( 0.1 ml ), 约 7d 后可长出皮下实体瘤, 成瘤率 100%。每日双盲法用卡钳测量肿瘤的大小。用如下公式计算肿瘤的体积:  $V = d^2 \times D/2$  (其中  $d$  为肿瘤的长径,  $D$  为肿瘤的短径)。当肿瘤的体积达到  $150 \sim 200 \text{ mm}^3$  时, 按照完全随机的方法将携带肿瘤的小鼠分配到各个实验组中, 每组 6 只。实验分组如下: ①Ad-5HRE/hCMVmp-BCD+5-FC+照射; ②Ad-5HRE/hCMVmp-BCD+5-FC; ③Ad-CAG-LacZ+5-FC+照射; ④5-FC+照射; ⑤磷酸盐缓冲液

(phosphate buffered saline, PBS) 对照组。将小鼠接受放射治疗的当日设为第1日,连续给予5d的放射治疗,每次照射剂量为3Gy。联合自杀基因治疗时,在第1次照射的24h前给予肿瘤内直接注射  $2 \times 10^9$  pfu 的 Ad-5HRE/hCMVmpBCD 或 Ad-CAG-LacZ,而后在每日照射前的12h腹腔内注射前体药物 5-FC(500 mg/kg, PBS 配制为 10 mg/ml 的储存液)或 PBS。当各实验组肿瘤的平均体积达到相对于其第1日治疗时肿瘤平均体积的4倍时,终止测量,处死小鼠。以治疗后的时间为横轴,相对肿瘤体积为纵轴绘制出肿瘤生长抑制曲线。

### 1.8 统计学处理

实验数据以平均数 $\pm$ 标准差表示,用 SPSS 统计软件包进行方差分析,结果以  $P < 0.05$  判断为有意义。

## 2 结果

### 2.1 基于 BCD 的乏氧靶向性自杀基因治疗载体的构建与鉴定

为了构建乏氧靶向性的自杀基因治疗系统,我们通过 DNA 重组技术将 BCD 基因置于 5 个拷贝的 HRE 下游;同时,为了便于检测,又在 BCD 的下游融合了 c-myc 标签;最后,将上述融合基因克隆入腺病毒载体,构建成了乏氧靶向性的腺病毒载体 Ad-5HREhCMVmp-BCD。DNA 序列测定表明,重组病毒构建成功。将重组腺病毒 Ad-5HRE/hCMVmp-BCD 感染 MIA-PACA2 细胞,并给予乏氧处理,Western blot 检测结果显示:BCD 在正常氧条件下呈低水平表达,乏氧处理后可显著上调其蛋白表达量;并且,随着感染所用腺病毒 MOI 的增加,乏氧诱导的 BCD 蛋白水平也显著升高,呈现为剂量依赖性(见图1)。结果提示,腺病毒 Ad-5HREhCMVmp-BCD 可引导 BCD 在细胞中的乏氧依赖性表达。

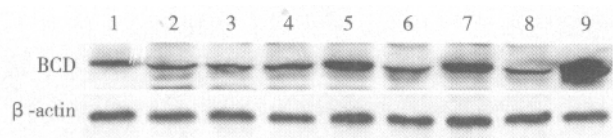


图1 腺病毒介导 BCD 蛋白在 MIA-PACA2 细胞中的乏氧依赖表达

- 1: 质粒 p5HRE/hCMVmp-BCD 转染 MIA-PACA2 细胞 + 乏氧 24h
- 2: Ad-5HRE/hCMVmpBCD(MOI 2)感染 MIA-PACA2 细胞 + 正常氧
- 3: Ad-5HRE/hCMVmpBCD(MOI 2)感染 MIA-PACA2 细胞 + 乏氧 24h

- 4: Ad-5HRE/hCMVmp-BCD(MOI 10)感染 MIA-PACA2 细胞 + 正常氧
- 5: Ad-5HRE/hCMVmpBCD(MOI 10)感染 MIA-PACA2 细胞 + 乏氧 24h
- 6: Ad-5HRE/hCMVmpBCD(MOI 20)感染 MIA-PACA2 细胞 + 正常氧
- 7: Ad-5HRE/hCMVmpBCD(MOI 20)感染 MIA-PACA2 细胞 + 乏氧 24h
- 8: Ad-5HRE/hCMVmpBCD(MOI 50)感染 MIA-PACA2 细胞 + 正常氧
- 9: Ad-5HRE/hCMVmpBCD(MOI 50)感染 MIA-PACA2 细胞 + 乏氧 24h

### 2.2 细胞生长抑制实验

我们采用细胞生长抑制实验评估 Ad-5HRE-hCMVmp-BCD 的离体治疗功效:用 Ad-5HRE-hCMVmp-BCD 感染 MIA-PACA2 细胞,感染后分别给予 24h 常规的有氧条件下培养和  $O_2$  为 0.02% 的乏氧培养,同时在培养液中加入不同剂量的前体药物 5-FC,结果,Ad-5HRE/hCMVmpBCD 感染的 MIA-PACA2 细胞在有氧和乏氧条件下对 5-FC 的生存曲线分别如图 2 和图 3 所示。由图可见:与正常氧条件相比,乏氧条件下细胞对 5-FC 的  $IC_{50}$  明显下降;并且,在每一个病毒 MOI 下,随着 5-FC 剂量的增加,细胞的生存数量呈剂量依赖性降低,当 MOI 为 100 时, MIA-PACA2 细胞在常氧和乏氧条件下对 5-FC 的  $IC_{50}$  分别为  $1.04 \pm 0.16$  和  $16.08 \pm 1.89$  ( $F=170.45$ ,  $P < 0.01$ )。由此提示,5-FC 对 Ad-5HREhCMVmp-BCD 感染细胞的抑制作用依赖于乏氧处理,Ad-5HRE/hCMVmp-BCD/5-FC 自杀基因系统具有乏氧靶向性。

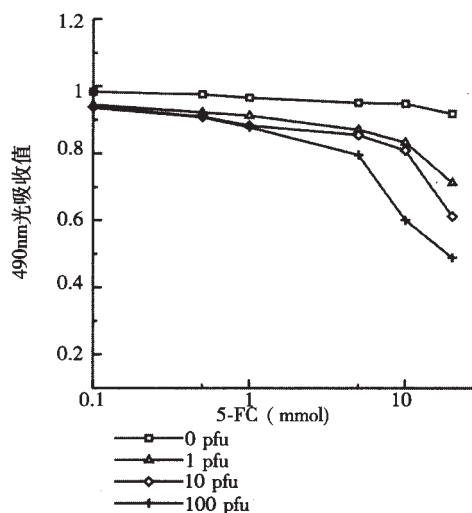


图2 MIA-PACA2 细胞感染 Ad-5HRE/hCMVmp-BCD 后对 5-FC 的抑制作用(常氧条件)

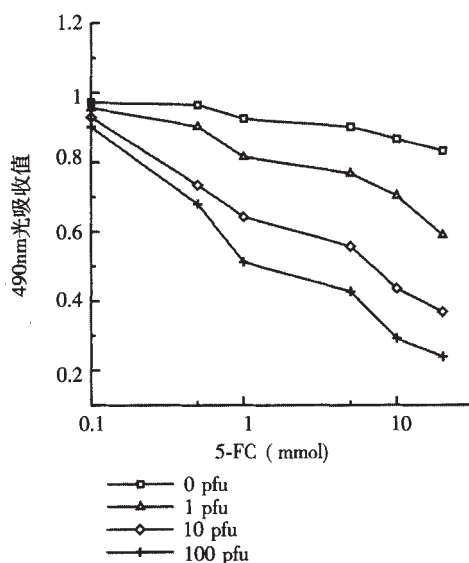


图3 MIA-PACA2 细胞感染 Ad-5HRE/hCMVmpBCD 后对 5-FC 的抑制作用( 乏氧条件 )

### 2.3 Ad-5HRE/hCMVmpBCD/5-FC 对胰腺癌放疗的增强效应

为了探讨 Ad-5HRE/hCMVmpBCD/5-FC 对胰腺癌放疗的增强效应, 我们制备了 MIA-PACA2 细胞的小鼠移植瘤, 并对移植瘤进行自杀基因治疗和放疗。在整个实验过程中, 没有一只小鼠因药物毒性而发生体质量减轻。Ad-5HRE/hCMVmpBCD/5-FC 自杀基因治疗系统联合放疗对移植瘤的抑制效应如图 4 所示。与 PBS 对照组相比, 自杀基因治疗系统 Ad-5HRE/hCMVmpBCD/5-FC 具有一定的抗肿瘤效应(  $F=9.423$ ,  $P<0.01$  ); 5-FC+ 放射治疗或 5-FC+ 对照病毒( Ad-CAG-LacZ ) + 放射治疗的抗肿瘤效应基本相似(  $F=2.606$ ,  $P>0.05$  ), 提示 5-FC 本身或 5-FC+ 对照病毒无明显抗肿瘤效应; 同时, 放射治疗的抗肿瘤效应明显强于 Ad-5HRE/hCMVmpBCD/5-FC 自杀基因疗法(  $F=5.441$ ,  $P<0.05$  ); 但将 Ad-5HRE/hCMVmpBCD/5-FC 与放射治疗联合后, 其抗肿瘤效应显著增强(  $F=5.382$ ,  $P<0.05$  ); PBS 对照组、Ad-5HRE/hCMVmpBCD/5-FC、5-FC+Ad-CAG-LacZ + 放射治疗、5-FC + 放射治疗、Ad-5HRE/hCMVmpBCD/5-FC + 放射治疗各组肿瘤的倍增时间依次为 7d、11d、15d、16d、44d。由此提示, 腺病毒介导的、乏氧依赖的自杀基因 + 前体药物对胰腺癌 MIA-PACA2 细胞具有一定的抗肿瘤效应, 同时, 该治疗方法可显著增强放射治疗对 MIA-PACA2 的抗肿瘤效应。

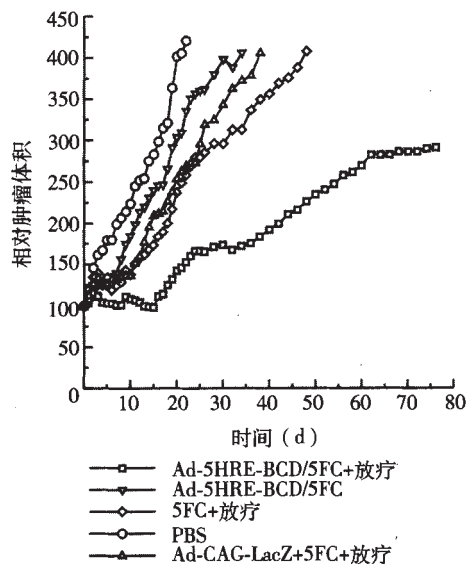


图4 Ad-5HRE/hCMVmpBCD/5-FC 联合放疗对胰腺癌移植瘤的抑制效应

### 3 讨论

自杀基因疗法也称药物敏感基因疗法, 用于该疗法的自杀基因通常是一些前药转换酶基因。将这些基因导入肿瘤细胞后, 它们编码产生的代谢酶可将本身对哺乳动物细胞无毒或低毒的前药在肿瘤细胞内转换为有毒或高毒的产物, 进而借助这些毒性代谢产物对肿瘤细胞产生杀伤作用。BCD就是这样一种前药转换酶, 它可将前药 5-FC 转换为 5-氟尿嘧啶( 5-fluorouracil 5-FU ), 5-FU 为细胞毒性化疗药物, 能够抑制 RNA 和 DNA 合成而杀伤肿瘤细胞。BCD 是细菌的一种代谢酶, 而哺乳动物细胞不含该酶<sup>[5]</sup>。目前, BCD/5-FC 作为一种有效的自杀基因治疗系统已经被广泛用于多种肿瘤细胞的实验研究<sup>[6]</sup>。

目前 5-FU 仍是胰腺癌首选的化疗药物, 但它的应用由于全身的不良反应而受到限制。自杀基因 BCD/5-FC 系统可在肿瘤细胞内将对机体相对无毒的 5-FC 转变成 5-FU, 在肿瘤局部产生高浓度毒性作用而减少全身不良反应, 因而受到了胰腺癌研究人员的广泛关注。Zhang 等<sup>[7]</sup>用携带胞苷脱氨酶( CD ) 基因的重组腺病毒感染人胰腺癌细胞系 SW1990, 并用 5-FC 处理细胞, 48h 后, 细胞出现了明显的凋亡, 总凋亡率高达 34.6%。Pan 等<sup>[8]</sup>发现, 以腺病毒为载体的 CD/5-FC 系统在体内外均能抑制人胰腺癌细胞系 Patu8988 和 SW1990 的生长。



他们还发现, CD/5-FC 系统用于胰腺癌荷瘤小鼠的治疗时, 可明显抑制移植瘤内微血管的形成。本实验也发现, 诱导 CD 基因在胰腺癌细胞 MIA-PACA2 内表达后, 5-FC 可显著抑制癌细胞的生长。由此提示, CD/5-FC 自杀基因治疗系统可有效地用于胰腺癌的治疗。

基因治疗目前面临的一个重要问题是目的基因的靶向性或特异性表达。将自杀基因控制在肿瘤细胞内表达是肿瘤自杀基因疗法成功应用于临床的关键。有学者对基因载体进行改造, 使载体表面携带肿瘤细胞特异性的识别分子, 从而借助这些分子引导载体到达特定的肿瘤细胞, 最终达到靶向性基因转导的目的。也有学者将肿瘤特异性的调控元件(启动子或增强子)装入基因治疗载体, 以调控目的基因在肿瘤细胞内的特异性表达, HRE 就是这样一个调控元件。HRE 存在于众多乏氧反应基因的上游调控区内, 在正常氧条件下, HRE 不能引导基因的表达, 而在乏氧环境下, HRE 可高效引导下游基因的表达<sup>[9, 10]</sup>。许多研究表明, 乏氧是实体肿瘤内特有的微环境<sup>[11]</sup>, 与正常组织相比, 乏氧肿瘤细胞抗放疗的能力提高了 3 倍<sup>[12]</sup>。肿瘤组织内部的氧分压越低, 肿瘤细胞发生转移的可能性就越大, 因此, 如何克服肿瘤对放疗和化疗的耐受性已成为临床治疗的一大难题。本研究选取 BCD 基因作为基因治疗系统的核心分子, 同时用乏氧依赖的启动子 5HRE/hCMVmp 引导 BCD 在乏氧肿瘤细胞中的特异性的表达。结果显示, 我们制备的乏氧靶向性腺病毒载体感染 MIA-PACA2 后, 5-FC 在正常氧条件下并不能抑制细胞生长, 而在乏氧条件下则显著抑制了 MIA-PACA2 细胞的生长, 提示这一自杀基因治疗系统具有良好的乏氧靶向性。

本实验还发现, 乏氧靶向性腺病毒载体引导的 BCD/5-FC 自杀基因治疗系统本身可抑制 MIA-PACA2 小鼠移植瘤的生长, 当把这一治疗系统与放射治疗联合应用时, 小鼠移植瘤的生长受到了强烈的抑制, 提示自杀基因治疗系统与放射治疗具有协同作用。我们推测, 放射治疗对正常氧状态的肿瘤细胞具有良好的杀伤效应, 但不能有效杀伤移植瘤中处于乏氧状态的肿瘤细胞, 而我们制备的自杀基因治疗系统特异性地针对乏氧肿瘤细胞进行杀

伤, 从而与放射治疗达到了协同、互补的效果。

综上所述, 我们成功制备了乏氧靶向性腺病毒载体引导的 BCD/5-FC 自杀基因治疗系统, 该系统可抑制胰腺癌细胞的体内外生长, 并显著增强放射治疗对胰腺癌的抗肿瘤效应, 是一种有临床应用前景的基因疗法。

## 参 考 文 献

- 1 Duffy JP, Eibl G, Reber HA, et al. Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer. *Mol Cancer*, 2003, 22 (1): 2-12.
- 2 Varlotto J, Stevenson MA. Anemia, tumor hypoxemia, and the cancer patient. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 63 (1): 25-36.
- 3 Shibata T, Giaccia AJ, Brown JM. Development of a hypoxia-responsive vector for tumor-specific gene therapy. *Gene Ther*, 2000, 7 (6): 493-498.
- 4 Shi Y, Zhai H, Fan D, et al. Ribosomal proteins S13 and L23 promote multidrug resistance in gastric cancer cells by suppressing drug-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, 2004, 296 (2): 337-346.
- 5 Smythe WR. Prodrug/drug sensitivity gene therapy: current status. *Curr Oncol Rep*, 2000, 2 (1): 17-22.
- 6 Liu J, Zou WG, Liu XY, et al. Cancer-specific killing by the CD suicide gene using the human telomerase reverse transcriptase promoter. *Int J Oncol*, 2002, 21 (3): 661-666.
- 7 Zhang SN, Yuan SZ, Zeng ZY, et al. Apoptosis induced by 5-fluorocytosine in human pancreatic cancer cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, 21 (7): 655-659.
- 8 Pan X, Li ZS, Tu ZX, et al. Adenovirus-mediated gene transfer in the treatment of pancreatic cancer. *Pancreas*, 2003, 26 (3): 274-278.
- 9 Chadderton N, Cowen RL, Williams KJ, et al. Dual responsive promoters to target therapeutic gene expression to radiation-resistant hypoxic tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 62 (1): 213-222.
- 10 Huang D, Desbois A, Hou ST. A novel adenoviral vector which mediates hypoxia-inducible gene expression selectively in neurons. *Gene Ther*, 2005, 12 (18): 1369-1376.
- 11 Belozorov VE, Van Meir EG. Hypoxia inducible factor-1: a novel target for cancer therapy. *Anticancer Drugs*, 2005, 16 (9): 901-909.
- 12 Harrison L, Blackwell K. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy?. *Oncologist*, 2004, 9(Suppl 5): 31-40.

(收稿日期: 2006-01-09)