

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202008020



TRAIL 与 kallistatin 联合表达载体的构建及抗肿瘤活性分析

王晓^{1,2}, 黄晓平^{1,2}, 刁勇^{1,2}

(1. 华侨大学 医学院, 福建 泉州 362021;
2. 华侨大学 生物医学学院, 福建 泉州 362021)

摘要: 为研究肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)与组织激肽释放酶结合蛋白(kallistatin)联合用药的抗肿瘤作用,构建 TRAIL 与 kallistatin 双表达的重组质粒 pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL,将重组质粒转染 A549, LO-2, NCI-H446 和 Hela 细胞,考察其抗肿瘤活性. 实验结果表明:构建的双表达载体能同时表达 TRAIL 与 kallistatin,且均能分泌至培养基中;TRAIL 与 kallistatin 联合表达对肿瘤细胞活力的抑制作用明显增强,诱导肿瘤凋亡的作用也明显增强,说明联合表达 TRAIL 与 kallistatin 能够增强抗肿瘤活性.

关键词: 抗肿瘤; 组织激肽释放酶结合蛋白; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; 细胞凋亡

中图分类号: R 730.54 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2021)03-0378-06

Construction of TRAIL and Kallistatin Combined Expression Vector and Its Antitumor Activity Analysis

WANG Xiao^{1,2}, HUANG Xiaoping^{1,2}, DIAO Yong^{1,2}

(1. School of Medical, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;
2. School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: In order to study the anti-tumor effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) combined with kallistatin, a dual-expression of TRAIL and kallistatin recombinant plasmid pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL was constructed and then transfected into A549, LO-2, NCI-H446 and Hela cells with liposome to investigate the anti-tumor activity of the dual expression vector. The experimental results show that the constructed dual expression vector can express TRAIL and kallistatin simultaneously, and both of these proteins can be secreted into the culture medium; the combination of TRAIL and kallistatin expression significantly enhances the inhibition of tumor cells viability and induces apoptosis of tumor cells, which indicates that the combined expression of TRAIL and kallistatin can enhance anti-tumor activity.

Keywords: antitumor; kallistatin; tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; apoptosis

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)是一种内源性分泌肽,在外源细胞凋亡途径中与跨膜死亡配体受体 DR4, DR5 结合,激活 DR4, DR5 分子胞浆的死亡结构域,并通过激活胱天蛋白酶(caspase)级联反应,引起细胞凋亡. 级联反应中的 FasL 和 TNF- α 都有促进细胞凋亡的作用,但 FasL 会导致致命的肝损伤,而 TNF- α 可能会导致炎症反应^[1-2]. TRAIL 特异性地诱导肺癌、乳腺癌等多种癌细胞凋亡,

收稿日期: 2020-08-16

通信作者: 刁勇(1967-),男,教授,博士,博士生导师,主要从事新药研发、基因药物的研究. E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81371669);福建省自然科学基金资助项目(2017J01548);福建省泉州市科技项目(2020C061, 2016N070);华侨大学科研基金资助项目(17BS501)

且不会诱导正常细胞凋亡. 临床数据显示, TRAIL 产生耐药性与蛋白激酶和受体有关^[3-4]. 联合用药既可以增强抗肿瘤活性又可以避免产生耐药性, 成为 TRAIL 用于肿瘤治疗的研究方向.

组织激肽释放酶结合蛋白(kallistatin)是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 具有抗肿瘤作用^[5-6]. 将 kallistatin 与 TRAIL 联合使用是否会增强 TRAIL 的抗肿瘤活性, 目前还未见相关报道. 因此, 本文设计 pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL 重组载体, 通过内部核糖体进入位点序列(IRES)同时表达 TRAIL 与 kallistatin, 经细胞活力和细胞凋亡实验验证 TRAIL 与 kallistatin 联合使用的抗肿瘤活性.

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

菌种、细胞株和质粒 *E. coli* DH5 α , pAM-CAG, pIRES-eGFP, pCDNA3. 1-Kal, pCDNA3. 1-TRAIL 为本实验室保存; A549, LO-2, NCI-H446 和 Hela 细胞株购自 ATCC 细胞库.

Hind III, *Eco*R I, *Spe* I, *Bam*H I 等限制性内切酶、T4 连接酶、Taq DNA 聚合酶(大连宝生物工程有限公司); 质粒提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒(北京天根生物科技有限公司); 兔抗 kallistatin、鼠抗 TRAIL 单克隆抗体, 羊抗兔、羊抗鼠二抗(英国 Abcam 公司); kallistatin, TRAIL 酶联免疫试剂盒(ELISA, 美国 R&D 公司); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司).

1.2 实验方法

表 1 扩增目的基因的 PCR 引物

1.2.1 目的基因的扩增 根据 GenBank 报道的 TRAIL, IRES, kallistatin 基因序列设计 PCR 引物(表 1), 分别从 pIRES-eGFP, pCDNA3. 1-TRAIL, pCDNA3. 1-Kal 质粒中扩增得到 IRES, TRAIL 和 kallistatin 目的基因.

Tab. 1 PCR primers for amplifying target gene		
名称	序列 5'-3'	
IRESF	TCAACTAGTGTCCCTCTCCCTCCC	
IRESR	TCAGAATTCTTGTGGCCATATTATC	
TRAILF	TCAGAATTCAAGTGTGAGCAAGGGC	
TRAILR	TCAAAGCCTTTAGGCAACTAAAAAG	
KalF	TCAGGATTCATGCATCTTATCGACTA	
KalR	TCAACTAGTCTATTGTTTCGTGGGGT	

1.2.2 重组表达载体的构建 1) pAM-CAG-TRAIL 的构建. 通过 PCR 方法从 pCDNA3. 1-TRAIL 中扩增 TRAIL 目的基因, 通过琼脂糖凝胶

电泳鉴定并对目的基因回收, 回收的目的基因通过 *Hind* III/*Eco*R I 双酶切回收, 利用 T4 DNA 连接酶将目的基因 TRAIL 定向克隆至 pAM-CAG 质粒的 *Hind* III/*Eco*R I 酶切位点.

2) pAM-CAG-Kal 的构建. 采用 PCR 方法从 pCDNA3. 1-Kal 中扩增 Kal 目的基因, 通过琼脂糖凝胶电泳鉴定并对目的基因回收, 目的基因通过 *Bam*H I/*Spe* I 双酶切回收, 利用 T4 DNA 连接酶将目的基因 Kal 定向克隆至 pAM-CAG 质粒的 *Bam*H I/*Spe* I 酶切位点.

3) pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL 的构建. 采用 PCR 方法从 pIRES-eGFP 质粒中扩增 IRES 目的基因, 将其克隆至 pAM-CAG-Kal 质粒的 *Spe* I/*Eco*R I 酶切位点之间, 构建成 pAM-CAG-Kal-IRES 重组质粒, 再将 TRAIL 目的基因克隆至 pAM-CAG-Kal-IRES 质粒的 *Hind* III/*Eco*R I 位点之间, 形成 pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL 重组质粒.

1.2.3 重组表达载体的表达与鉴定 构建的重组质粒 pAM-CAG-TRAIL, pAM-CAG-Kal, pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL 经过限制性内切酶鉴定, 再经过 DNA 测序分析正确后, 将提取的质粒与脂质体 2000 混合后转染至 Hela 细胞中, 培养一定时间后收集培养上清及细胞, 利用 ELISA 和 western blotting 方法鉴定 TRAIL 与 kallistatin 的表达情况.

1.2.4 TRAIL 与 kallistatin 联合表达对细胞活力的影响 A549, LO-2, NCI-H446, Hela 细胞分别以 5 000 个 \cdot 孔⁻¹的密度接种至 96 孔板, 37 $^{\circ}$ C, 体积分数为 5%的 CO₂ 培养 12 h, 待细胞贴壁后, 分别转染 pAM-CAG-eGFP, pAM-CAG-TRAIL, pAM-CAG-Kal, pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL 质粒, 转染后继续培养 24, 48, 72 h, 每孔加入 10 μ L 5 mg \cdot mL⁻¹ 噻唑蓝(MTT), 继续培养 2 h, 弃培养基, 加入 200 μ L 二甲基亚砷(DMSO)溶解, 用酶标仪检测波长为 490 nm 时的吸光值, 根据公式计算细胞活力.

1.2.5 TRAIL 与 kallistatin 对细胞凋亡的影响 取对数生长期的 A549, LO-2, NCI-H446, Hela 细胞, 6 孔板每孔接种 50 000 个细胞, 培养 12 h, 用脂质体 2000 将质粒转染至细胞内继续培养 36 h, 胰酶

消化并收集细胞, $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min , 磷酸盐缓冲液清洗 2 次; 去上清并用缓冲液调整细胞浓度为 1×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 细胞悬液至 5 mL 离心管中, 加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ 碘化丙啶(PD)染液和 $5\text{ }\mu\text{L}$ Annexin-FITC 染液, 混匀后避光, 室温染色 15 min , 加入 $400\text{ }\mu\text{L}$ 结合缓冲液混匀后, 进行流式细胞分析。

2 实验结果

2.1 重组表达载体的鉴定

pAM-CAG-TRAIL, pAM-CAG-Kal, pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL 的酶切鉴定结果, 如图 1 所示。pAM-CAG-TRAIL 通过 *Hind* III, *Eco*R I 单酶切未见特异性的条带, 但经 *Hind* III/*Eco*R I 双酶切后, 在 500 bp 处出现一条特异性条带(图 1(a)), 与目的基因 TRAIL 的大小相符(516 bp); pAM-CAG-Kal 通过 *Bam*H I/*Spe* I 双酶切后, 在 1 200 bp 左右出现特异性条带, 与目的基因 kallistatin 的大小一致(图 1(b)); pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL 分别经过 *Hind* III/*Eco*R I 双酶切和 *Bam*H I/*Spe* I 双酶切后, 在 500, 1 200 bp 处出现特异性条带(图 1(c)), 说明目的基因 kallistatin 与 TRAIL 已经克隆至 pAM-CAG 载体中。构建的 3 种重组质粒经 DNA 测序分析结果显示, 插入目的基因序列完全正确。

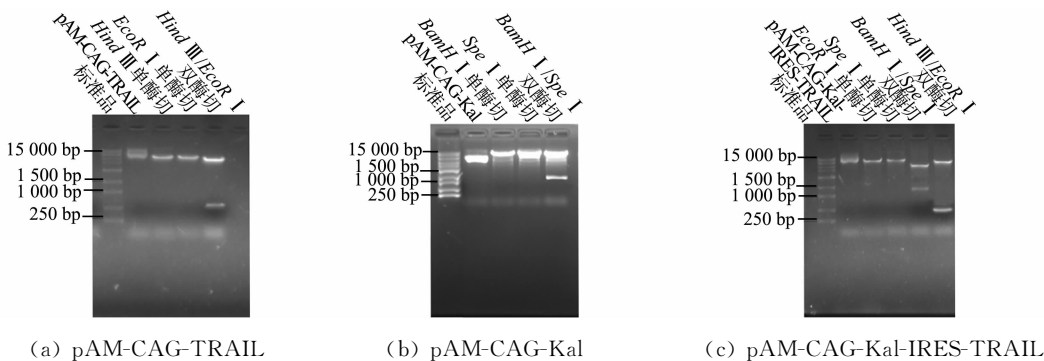


图 1 pAM-CAG-TRAIL, pAM-CAG-Kal, pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL 的酶切鉴定结果

Fig. 1 Identification of pAM-CAG-TRAIL, pAM-CAG-Kal, and pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL by restriction endonuclease

2.2 TRAIL 与 kallistatin 的表达与鉴定

TRAIL 诱导细胞凋亡需要与死亡受体结合才能启动凋亡信号,而可溶性的 TRAIL 位于胞外区,必须在细胞外才能与受体结合.采用 ELISA 方法检测培养基中 TRAIL 的质量浓度($\rho(\text{TRAIL})$),结果如图 2(a)所示.由图 2(a)可知:转染 pAM-CAG-TRAIL 质粒组的 TRAIL 的质量浓度为 $(1.85 \pm 0.18) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,转染 pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL 质粒组的 TRAIL 的质量浓度为 $(1.65 \pm 0.24) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,两组之间的差异无统计学意义,而转染 pAM-CAG-Kal, pAM-CAG-eGFP 质粒组没有检测到 TRAIL 的表达.

kallistatin 具有信号肽, 是一种分泌性蛋白, 培养基中 kallistatin 的质量浓度($\rho(\text{kallistatin})$), 如图 2(b)所示. 由图 2(b)可知: 转染 pAM-CAG-Kal 质粒组 kallistatin 的质量浓度为 $(12.08 \pm 0.21) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 转染 pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL 质粒组 kallistatin 的质量浓度为 $(11.73 \pm 0.37) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,

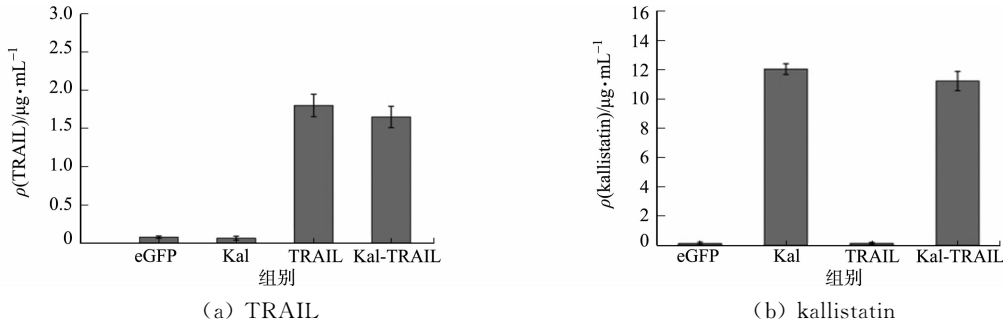


图 2 培养上清中 TRAIL 与 kallistatin 的表达量

Fig. 2 Expression of TRAIL and kallistatin in culture supernatant

两组之间的差异无统计学意义。

此外,利用 western blotting 方法检测细胞内 TRAIL 和 kallistatin 的表达,结果如图 3 所示. 由图 3 可知:转染 pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL 和 pAM-CAG-TRAIL 质粒组细胞内都有 TRAIL 的表达;转染 pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL 和 pAM-CAG-Kal 质粒组细胞内都有 kallistatin 的表达。

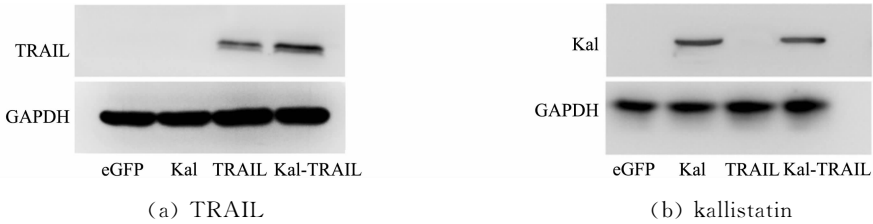


图 3 Western blotting 检测细胞内 TRAIL 与 kallistatin 表达

Fig. 3 Expression of trail and kalistatin in cells by western blotting

2.3 TRAIL 与 kallistatin 联合表达对细胞活力的影响

TRAIL 与 kallistatin 对细胞活力的影响,如图 4 所示. 图 4 中: η 为细胞存活率; * 表示差异有统计学意义. 由图 4 可知:分别转染 pAM-CAG-Kal,pAM-CAG-TRAIL,pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL 质粒后,LO-2 细胞存活率与对照组相比,差异无统计学意义;分别转染 pAM-CAG-Kal,pAM-CAG-TRAIL,pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL 质粒后,A549 细胞存活率为 $78.3\% \pm 4.3\%$, $67.4\% \pm 3.5\%$, $53.7\% \pm 4.1\%$,pAM-CAG-Kal,pAM-CAG-TRAIL 组与 pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL 组相比,差异具有统计学意义,说明联合表达 TRAIL 和 kallistatin 能够显著增强细胞的抗肿瘤活性;Hela 细胞的实验结果显示,pAM-CAG-Kal,pAM-CAG-TRAIL,pAM-CAG-Kal-IRES-TRAIL 组的细胞存活率明显下降,分别为 $76.4\% \pm 5.3\%$, $66.4\% \pm 4.3\%$, $52.7\% \pm 3.5\%$,与转染 pAM-CAG-eGFP 组相比,差异具有统计学意义,且 TRAIL,kallistatin 双表达组的细胞存活率与 pAM-CAG-TRAIL,pAM-CAG-Kal 组相比,差异具有统计学意义,说明联合表达促进 TRAIL 的抗肿瘤活性;NCI-H446 细胞实验结果也显示,联合表达 TRAIL 与 kallistatin 能够显著增强其抗肿瘤活性;Hela,A549 和 NCI-H446 细胞存活率实验结果显示,TRAIL 与 kallistatin 联合表达后肿瘤细胞活力接近半数抑制浓度 IC_{50} .

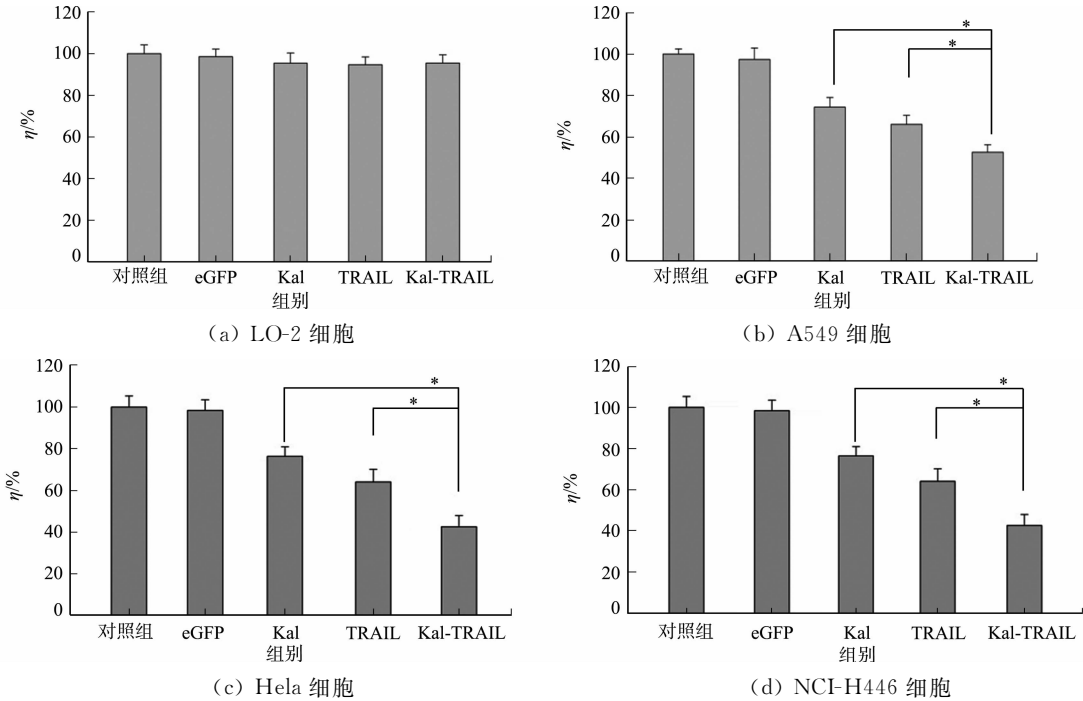


图 4 TRAIL 与 kallistatin 对细胞活力的影响

Fig. 4 Effects of TRAIL and kallistatin on cells activity

2.4 TRAIL 与 kallistatin 联合表达对肿瘤细胞凋亡的影响

TRAIL 与 kallistatin 对细胞凋亡的影响,如图 5 所示. 图 5 中: δ 为细胞凋亡率. 由图 5 可知:

TRAIL 与 kallistatin 对 LO-2 细胞凋亡没有影响,与对照组相比,差异无统计学意义;而 TRAIL 与 kallistatin 能诱导 A549 细胞凋亡,细胞凋亡率分别为 $5.22\% \pm 0.34\%$, $8.02\% \pm 0.45\%$,联合表达组的细胞凋亡率为 $10.98\% \pm 0.84\%$,与对照组相比,差异都具有统计学意义;Hela 细胞凋亡实验显示, pAM-CAG-Kal 与 pAM-CAG-TRAIL 组的细胞都有不同程度的凋亡,细胞凋亡率分别为 $5.81\% \pm 0.56\%$, $8.62\% \pm 0.49\%$,与对照组相比,差异具有统计学意义,联合用药组细胞凋亡率达为 $12.00\% \pm 0.65\%$; TRAIL 与 kallistatin 诱导 NCI-H446 细胞凋亡率分别为 $4.95\% \pm 0.43\%$, $7.95\% \pm 0.51\%$,联合用药组细胞凋亡率为 $11.24\% \pm 0.85\%$. 凋亡实验结果显示,TRAIL 与 kallistatin 能够诱导 A549, Hela 和 NCI-H446 细胞凋亡,联合用药组的细胞凋亡率与 TRAIL 和 kallistatin 组相比,差异具有统计学意义,说明 TRAIL 与 kallistatin 联合使用增强了诱导细胞凋亡的功能.

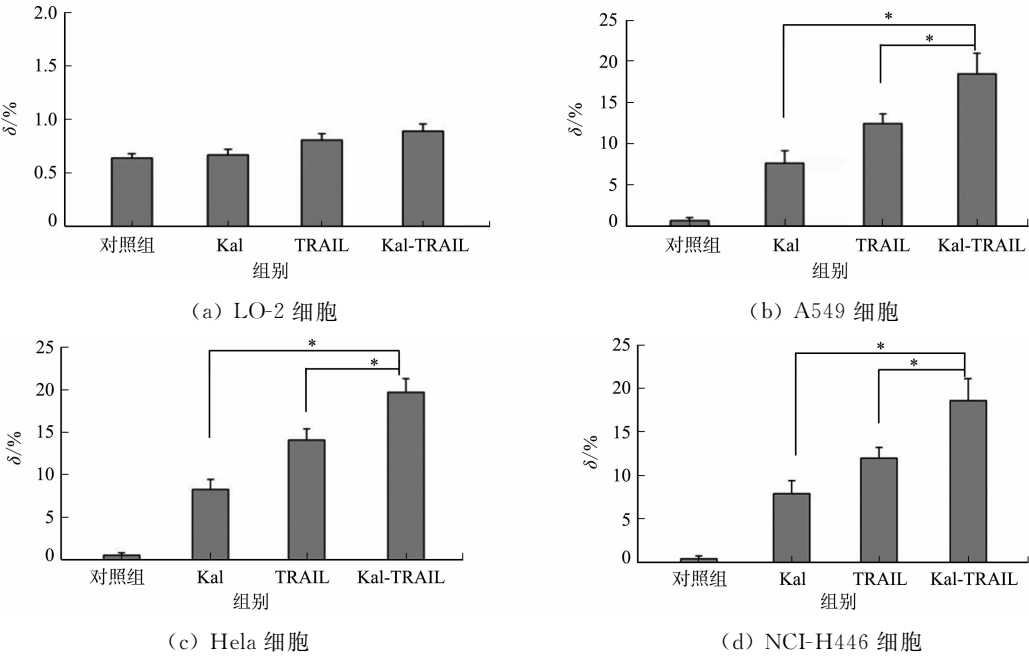


图 5 TRAIL 与 kallistatin 对细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effects of TRAIL and kallistatin on cells apoptosis

3 讨论

肿瘤形成及发展是由多基因、多因素参与的复杂过程,只进行单一的基因治疗容易忽略肿瘤变化过程中众多相对独立突变间的相互关系. 自从 1986 年 Seno 等^[7]成功地从大肠杆菌联合表达 IFN- γ /IL-2 后,越来越多基因联合治疗肿瘤的研究被报道. 肿瘤的多基因联合治疗可以是同一治疗方法的两种不同基因的联合,也可以是不同方案基因之间的联合,要求清楚明确各个基因的治疗作用机理,重点是两个甚至多个具有协同作用治疗基因的选择^[8]. 对于大多数来自骨髓、前列腺、乳腺的恶性肿瘤细胞, TRAIL 具有细胞毒性和抑制肿瘤细胞生长的作用,且 TRAIL 对正常细胞没有凋亡的诱导作用. 以往研究表明, TRAIL 可诱导人神经胶质瘤细胞株(CRT2MG, U872MG)凋亡^[9],消退乳腺癌组织,并且可以剂量依赖性地抑制肿瘤的生长和肿瘤的清除^[10]. 与 TRAIL 相关的 I 期、II 期临床试验已经进行,如 Geng 等^[11]将 TRAIL 应用于骨髓瘤的治疗. 当 TRAIL 与受体 TRAILR1 和 TRAILR2 结合后,诱发受体在细胞膜上发生三聚化并活化 caspase-8,启动两条信号通路传递凋亡信号,进而激活下游效应蛋白 caspase-3, caspase-6 或 caspase-7, caspase-9,最终导致细胞凋亡^[12]. kallistatin 是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂. 研究发现, kallistatin 可以抑制 NF- κ B, PI3K-AKT, nucleolin 等信号通路的激活^[13-15],这可能为 kallistatin 与 TRAIL 联合用药增强其抗肿瘤活性提供依据.

文中构建的双表达载体 pAG-CAG-Kal-IRES-TRAIL 在 Hela 细胞中检测到 TRAIL 与 kallistatin 的表达, IRES 串联的下游基因的翻译并没有受到影响, TRAIL 表达量与 pAG-CAG-TRAIL 相比,差异无统计学意义,研究结果与 Ponnazhagan 等^[16]一致. 细胞活力和细胞凋亡实验都证实, TRAIL 与 kal-

listatin 联合用药可以发挥各基因的特点,明显增强 TRAIL 和 kallistatin 的抗肿瘤活性,这预示着联合用药可能是 TRAIL 治疗肿瘤的一个方向.

参考文献:

- [1] LEMKE J, VON KARSTEDT S, ZINNGREBE J, *et al.* Getting TRAIL back on track for cancer therapy[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2014, 21(9): 1350-1364. DOI: 10. 1038/cdd. 2014. 81.
- [2] 张均平, 刘会杰, 杨洋, 等. (R)-Preconviction 诱导 Hela 细胞凋亡的分子机制[J]. *华侨大学学报(自然科学版)*, 2013, 34(4): 422-428. DOI: 10. 11830/ISSN. 1000-5013. 2013. 04. 0422.
- [3] DIMBERG L Y, ANDERSON C K, CAMIDGE R, *et al.* On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics[J]. *Oncogene*, 2013, 32(11): 1341-1350. DOI: 10. 1038/ONC. 2012. 164.
- [4] SO J, PASCULESCU A, DAI A, *et al.* Integrative analysis of kinase networks in TRAIL-induced apoptosis provides a source of potential targets for combination therapy[J]. *Science Signaling*, 2015, 8(371): 1-18. DOI: 10. 1126/SCISIGNAL. 2005700.
- [5] HUANG Kaifei, YANG Huiyong, XING Yongmei, *et al.* Recombinant human kallistatin inhibits angiogenesis by blocking VEGF signaling pathway[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2014, 115(3): 575-584. DOI: 10. 1002/JCB. 24693.
- [6] LI Pengfei, GUO Youming, BLEDSOE G, *et al.* Kallistatin induces breast cancer cell apoptosis and autophagy by modulating Wnt signaling and microRNA synthesis[J]. *Experimental Cell Research*, 2016, 340(2): 305-314. DOI: 10. 1016/J. YEXCR. 2016. 01. 004.
- [7] SENO M, HINUMA S, ONDA H, *et al.* A hybrid protein between IFN-gamma and IL-2[J]. *FEBS Letters*, 1986, 199(2): 187-192. DOI: 10. 1016/0014-5793(86)80477-X.
- [8] 王启钊, 吕颖慧, 费凌娜, 等. 肿瘤基因治疗的研究进展与思考[J]. *中国肿瘤临床*, 2020, 37(15): 893-896. DOI: 10. 3969/J. ISSN. 1000-8179. 2010. 15. 015.
- [9] CHOI C, KUTSCH O, PARK J, *et al.* Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces caspase-dependent interleukin-8 expression and apoptosis in human astrogloma cells[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22(3): 724-736. DOI: 10. 1128/MCB. 22. 3. 724-736. 2002.
- [10] WALCZAK H, HAAS T L. Biochemical analysis of the native TRAIL death-inducing signaling complex[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2008, 414: 221-239. DOI: 10. 1007/978-1-59745-339-4_16.
- [11] GENG Chuanying, HOU Jian, ZHAO Yaozhong, *et al.* A multicenter, open-label phase II study of recombinant CPT (Circularly Permuted TRAIL) plus thalidomide in patients with relapsed and refractory multiple myeloma [J]. *American Journal of Hematology*, 2014, 89(11): 1037-1042. DOI: 10. 1002/AJH. 23822.
- [12] 朱玲, 王祥喜, 李雪梅, 等. TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制及其在肿瘤生物治疗中的应用前景[J]. *生物物理学报*, 2012, 28(6): 448-456. DOI: 10. 3724/SP. J. 1260. 2012. 20047.
- [13] HUANG Kaifei, HUANG Xiaoping, DIAO Yong, *et al.* Kallistatin, a novel anti-angiogenesis agent, inhibits angiogenesis via inhibition of the NF- κ B signaling pathway[J]. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2014, 68(4): 455-461. DOI: 10. 1016/J. BIOPHA. 2014. 03. 005.
- [14] HUANG Xiaoping, WANG Xiao, XIE Xiaolan, *et al.* Cell surface expression of nucleolin mediates the antiangiogenic and antitumor activities of kallistatin[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(2): 2220-2235. DOI: 10. 18632/ONCOTARGET. 23346.
- [15] WANG Guoquan, WANG Xiao, HUANG Xiaoping, *et al.* Inhibition of integrin beta3, a binding partner of kallistatin, leads to reduced viability, invasion and proliferation in NCI-H446 cells[J]. *Cancer Cell International*, 2016, 16: 90. DOI: 10. 1186/S12935-016-0365-7.
- [16] PONNAZHAGAN S, MAHENDRA G, KUMAR S, *et al.* Adeno-associated virus 2-mediated antiangiogenic cancer gene therapy: Long-term efficacy of a vector encoding angiostatin and endostatin over vectors encoding a single factor[J]. *Cancer Research*, 2004, 64(5): 1781-1787. DOI: 10. 1158/0008-5472. can-03-1786.

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)