

PTL联合ZD55-TRAIL对肝癌细胞Hep3B 生长抑制的研究

李晓艳¹ 马 晖² 潘 强¹ 杨新燕¹ 吴丽琴¹ 陈 侃^{1*}

(¹浙江理工大学生命科学院, 新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018; ²陕西省汉中职业技术学院医学系, 汉中 723000)

摘要 联合运用NF- κ B小分子抑制剂小白菊内酯(parthenolide, PTL)和携带TRAIL的溶瘤腺病毒ZD55-TRAIL在体外杀伤人肝癌细胞株Hep3B, 以评估两者联用的实验疗效。首先用Adeasy系统包装ZD55-TRAIL病毒; 分别用MTT、结晶紫和Hoechst33342荧光染色实验检测ZD55-TRAIL、ZD55-TRAIL和PTL联合运用对肝癌细胞株Hep3B和正常肝细胞QSG-7701的增殖抑制作用。结果表明: 10 MOI ZD55-TRAIL联合PTL处理72 h后, Hep3B细胞的存活率仅为44%, 但对QSG-7701细胞无明显损伤; 而10 MOI的ZD55-TRAIL和PTL分别单独处理后细胞存活率为70%和66%; 结晶紫实验及Hoechst33342染色结果表明联合处理组的Hep3B细胞凋亡特征更加明显。溶瘤腺病毒ZD55-TRAIL联合PTL在体外对肝癌细胞Hep3B具有显著的杀伤性, 而对QSG-7701细胞无明显毒副作用。

关键词 小白菊内酯(PTL); ZD55-TRAIL; 肝癌

Enhancement of the Growth Inhibiting Effect to Liver Tumor Cell Hep3B by Combining Parthenolide with ZD55-TRAIL

Li Xiaoyan¹, Ma Hui², Pan Qiang¹, Yang Xinyan¹, Wu Liqin¹, Chen Kan^{1*}

(¹Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Science, College of Life Sciences Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; ²Department of Medicine, Hanzhong Vocational and Technical College, Shaanxi Province, Hanzhong 723000, China)

Abstract This study aimed at studying the anti-tumor effect in hepatocarcinoma cell Hep3B cells by combining parthenolide (PTL) with ZD55-TRAIL. The experiment was constructed oncolytic adenovirus ZD55-TRAIL by Adeasy system. Then MTT, crystal violet and Hoechst33342 staining assay were used to assess the growth inhibition effects of single or combination therapy on liver tumor cell Hep3B and human normal cell QSG-7701. The results showed that 10 MOI ZD55-TRAIL combining with PTL treated for 72 h, Hep3B cells' survival rate is only 44%, and no significant damage to the QSG-7701 cells, while in ZD55-TRAIL and PTL 10 MOI separately treated cells, the survival rate is 70% and 66%, respectively. The crystal violet and Hoechst33342 staining results showed that the combined treatment group Hep3B apoptotic features more obviously. Oncolytic adenovirus ZD55-TRAIL joint PTL had significant destruction *in vitro* on hepatoma cells Hep3B, but no significant side effects to QSG-7701 cells.

Key words parthenolide; ZD55-TRAIL; hepatoma carcinoma

收稿日期: 2012-12-19 接受日期: 2013-02-17

浙江省科技厅公益性技术应用研究计划(批准号: 2012C37069)和浙江理工大学科研启动基金(批准号: 0916819-Y)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86843186, E-mail: chenkan_xjtu@163.com

Received: December 19, 2012 Accepted: February 17, 2013

This work was supported by Nonprofit Applied Research Program of the Science and Technology and Department of Zhejiang Province (Grant No.2012C37069) and the Scientific Research Fund of Zhejiang Sci-Tech University (Grant No.0916819-Y)

*Corresponding author. Tel: +86-571-86843186, E-mail: chenkan_xjtu@163.com

网络出版时间: 2013-04-22 14:37

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130422.1437.004.html>

目前肿瘤治疗遇到了瓶颈,但肿瘤特异性增殖腺病毒(即溶瘤腺病毒)、癌症的靶向基因-病毒治疗(targeting gene-viro-therapy)策略及基因病毒制剂的出现给肿瘤治疗带来了新的希望。携带TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand)基因的溶瘤腺病毒ZD55-TRAIL就曾在肿瘤治疗中表现出良好的效能,但也有不少细胞对TRAIL基因天然耐受,尤其是一些高度恶性的肿瘤如胰腺癌会产生强烈的TRAIL耐受性^[1-4],因此如何增强肿瘤基因治疗的效果成为基因治疗研究的重要问题。

小白菊内酯(parthenolide, PTL)是一种纯天然的倍半萜烯内酯提取物,传统上主要用于治疗偏头痛^[5]、炎症^[6]及风湿性关节炎^[7]。有报道指出,PTL具备一定的抗癌活性,可以诱导肿瘤细胞凋亡、坏死^[8]。已有证据表明,PTL属于核转录因子NF- κ B(nuclear factor kappa B)抑制剂,可通过特异性抑制I κ B激酶复合物的活性^[9]而引发肿瘤细胞的凋亡。近年也有文献指出,PTL是通过抑制DNA与NF- κ B及信号转导与转录激活子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)结合,从而降低了有丝分裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的活性以及活性氧的产生^[10],并最终导致细胞凋亡。

肿瘤的多基因遗传特性使得单一药物的控制效果并不理想,且细胞信号网络纷繁复杂,某一信号通路的抑制或阻断可能会导致其他通路的代偿性激活,因此药物联用一直是肿瘤研究的热点^[11]。关于PTL联合化疗药物治疗肿瘤的报道已有很多^[12],但至今还未见PTL联合溶瘤腺病毒ZD55-TRAIL治疗肝癌的报道。为深度了解两者联用后肿瘤细胞发生的变化,本实验拟以人肝癌细胞株Hep3B为研究对象,观察作为NF- κ B小分子抑制剂的PTL联合携带TRAIL的溶瘤腺病毒ZD55-TRAIL对人肝癌细胞生长的影响,以期达到更显著抑制肿瘤细胞生长的目的。本实验将为癌症的靶向基因-病毒联合化疗药物的新策略提供更多的实验依据和理论基础,为肿瘤治疗带来新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞株Hep3B、质粒pCA13-TRAIL和

pSD55为本所保存。培养基DMEM、胰蛋白酶购自Gibco公司;胎牛血清购自PAA公司;二甲基亚砜(DMSO)、Hoechst33342凋亡试剂、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、小白菊内酯(PTL)均购自Sigma公司;结晶紫染料购自Amresco公司;Effectene转染试剂购自Qiagen公司;限制性内切酶购自Fermentas公司。SW-CJ-1FB超净台(苏州净化设备有限公司),DK-8D型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司),XDS-1B倒置生物显微镜(OLYMPAS公司),BCD-277冰箱(博西华家用电器有限公司),M-2800紫外分光光度计(HITACHI公司)。

引物设计采用Primer 5.0软件,引物合成及基因测序均由上海英骏生物技术有限公司负责。本实验鉴定采用的TRAIL引物序列为:Forward: 5'-CGT GGA TAG CGG TTT GAC TC-3'; Reverse: 5'-TGA ATG CCC ACT CCT TGA TG-3';野毒鉴定引物序列为:Forward: 5'-CAA AGG TGG CAC TTA GGC-3'; Reverse: 5'-AGG AAC AGC GGG TCA GTA-3'。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒pZD55-TRAIL的构建 Bgl II酶切质粒pCA13-TRAIL,割胶回收1 411 bp的目的条带,即TRAIL基因表达框;Bgl II酶切质粒pSD55,割胶回收开环的pSD55载体;用Ligation high ver.2将TRAIL表达框与pSD55载体连接;将连接产物转化到感受态DH5 α 中,筛选酶切鉴定得到的重组穿梭质粒pSD55-TRAIL;用Pme I酶切线性化pSD55-TRAIL,然后再将其转入感受态pAdEasy-BJ5183中,得到pZD55-TRAIL;用Mlu I酶切初步鉴定重组质粒pZD55-TRAIL, Mlu I鉴定后再挑取阳性克隆质粒转化到DH5 α 中送测序。

1.2.2 重组质粒pZD55-TRAIL转染HEK293细胞 用Pac I在37 °C水浴4 h酶切pZD55-TRAIL以实现其线性化,线性化的目的即切除重组子的原核表达元件,同时暴露其反向末端重复序列。乙醇沉淀纯化后即可转染HEK293细胞,细胞转染按照Effectene试剂说明书进行,12 h后换成2 mL新鲜培养液,转染后HEK293细胞继续培养于37 °C、5% CO₂条件下,直至出现病毒空斑。

1.2.3 MTT染色检测细胞增殖 取对数生长期的Hep3B、QSG-7701细胞,接种于96孔板,1 \times 10⁴/孔,12 h后加入1, 5, 10, 15 μ mol/L PTL以及5, 10, 20, 40 MOI ZD55-TRAIL,每个浓度设6个平行孔,放入培

养箱, 在37 °C、5% CO₂条件下分别培养24, 48, 72 h后弃上清, 每孔加入20 μL的MTT(5 mg/mL)溶液, 37 °C孵育4 h, 小心弃除上清, 加入150 μL DMSO/孔, 在摇床上低速震荡10 min后用酶标仪测490 nm处吸光值(*D*值)。实验重复3次, 按照以下公式计算细胞存活率: 细胞存活率=(加药组*D*值-空白对照组*D*值)/(对照组*D*值-空白对照组*D*值)×100%, 绘制细胞存活率曲线。

1.2.4 Hoechst33342染色荧光显微镜下观察细胞形态 取对数生长期的Hep3B细胞, 按1×10⁵/孔接种于24孔板。贴壁培养12 h后, 加入10 μmol/L PTL或/和10 MOI ZD55-TRAIL, 对照组中加入等体积PBS, 分别在培养12, 24, 36, 48 h后, 将Hoechst33342加入培养基中, 每孔加入Hoechst33342(1 mg/mL)染料5 μL, 37 °C避光孵育30 min, 荧光显微镜下观察细胞的形态变化。

1.2.5 结晶紫染色进行细胞毒性分析 取对数生长期的Hep3B细胞, 调整密度为1×10⁵/孔接种于24孔板。贴壁培养12 h后, 加入10 μmol/L PTL或/和ZD55-TRAIL(5, 10, 20, 40 MOI), 继续培养96 h后弃培养液, PBS洗一次, 每孔各加10%的甲醇500 μL固定30 s后, 吸去甲醇, 加入250 μL结晶紫染色液(2%结晶紫溶于20%甲醇), 室温染色30 min, 用自来水洗去多余染液, 拍照记录。

1.2.6 统计学处理 采用SigmaPlot 11.0数据统计软件, 所有定量实验均在同样条件下重复3次。各组

数据以“均值±标准差”表示。

2 结果

2.1 重组质粒pZD55-TRAIL的构建及鉴定

用*Bgl* II单酶切pCA13-TRAIL质粒, 割胶回收1 411 bp大小的条带, 即含HCMV启动子和SV40尾巴的TRAIL表达框(图1A), *Bgl* II单酶切pSD55, 切胶回收较慢条带, 即开环DNA(图1B)。将以上所得TRAIL表达框与pSD55经连接酶连接后转化DH5α, 得到重组质粒pSD55-TRAIL, 抽取质粒用*Bgl* II酶切, 可见1 411 bp和8 637 bp的条带(图1C), 鉴定正确的质粒经*Pme* I线性化, 在感受态pAdEasy-BJ5183中同源重组并*Mlu* I酶切鉴定, 电泳图显示pZD55-TRAIL重组子构建成功(图1D), 将鉴定正确的重组子转化到无RecA、EndA活性的DH5α菌株中扩增, *Mlu* I酶切鉴定正确(图1E)后测序。

2.2 病毒的包装、扩增及纯化

用*Pac* I线性化重组质粒pZD55-TRAIL后转染HEK293细胞, 待细胞出现空斑后, 挑取空斑少量扩增后抽提病毒基因组, PCR扩增后琼脂糖凝胶电泳显示: 样品1、2、3均含有目的基因TRAIL(图2A), 样品1、2中均无657 bp左右的条带(图2B), 说明病毒重组成功, 且*E1B55kDa*基因缺失, 为非野毒型。样品1、2是正确的重组腺病毒ZD55-TRAIL。病毒在HEK293细胞中大量扩增后, 依照CsCl密度梯度离心法纯化病毒, 采用TCID₅₀法测定病毒滴度。

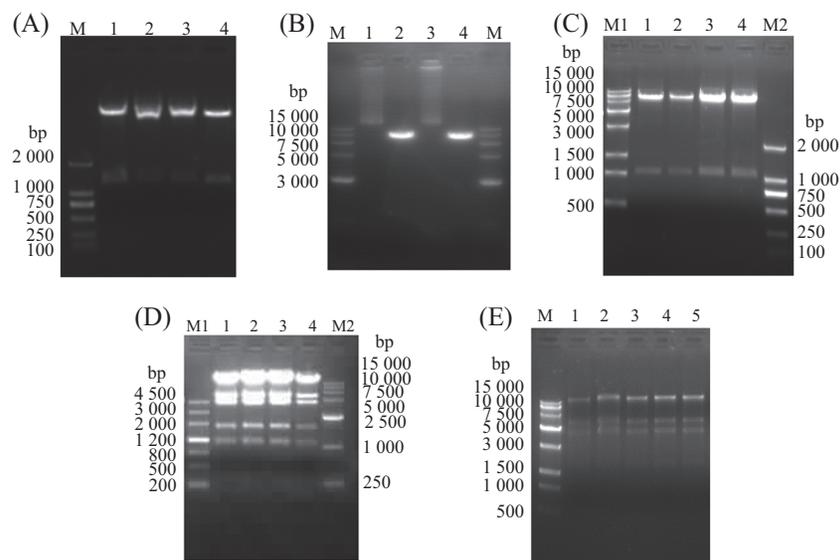


图1 重组质粒pZD55-TRAIL的构建及鉴定

Fig.1 The construction and identification of recombinant plasmid of pZD55-TRAIL

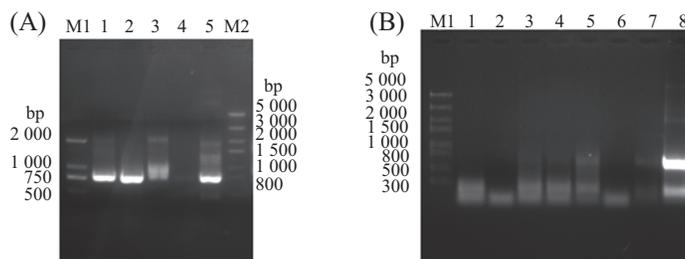
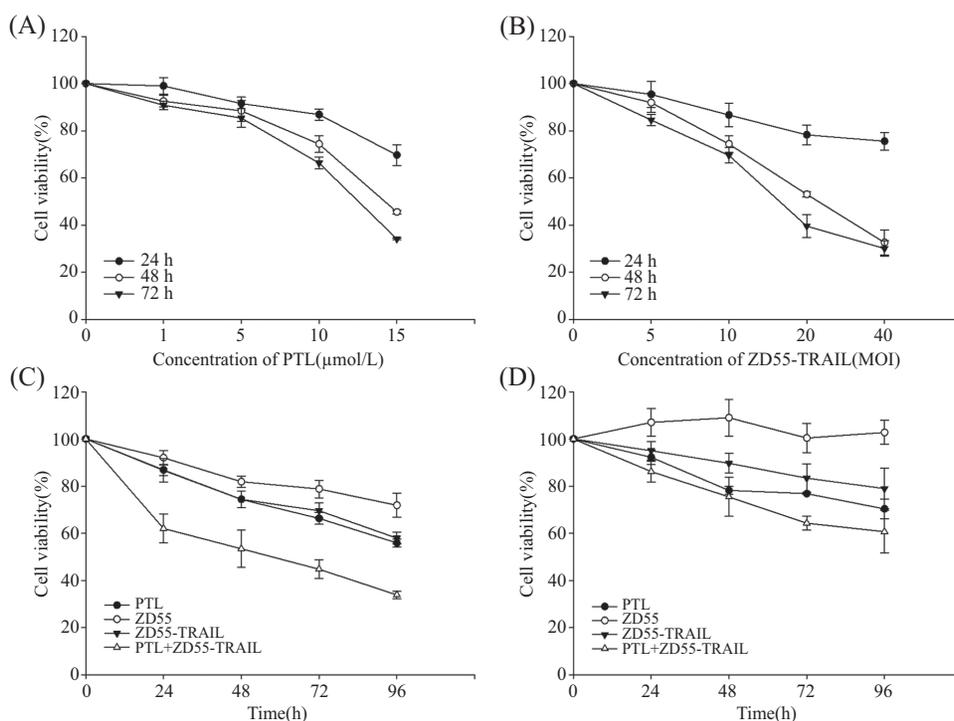


图2 重组病毒ZD55-TRAIL的PCR鉴定

Fig.2 Identification of recombinant adenovirus ZD55-TRAIL by PCR



A: 分别用浓度为1, 5, 10, 15 $\mu\text{mol/L}$ 的PTL处理24, 48, 72 h后Hep3B细胞的存活率曲线; B: 分别用滴度为5, 10, 20, 40 MOI的ZD55-TRAIL处理24, 48, 72 h后Hep3B细胞的存活率曲线; C: 10 $\mu\text{mol/L}$ PTL、10 MOI ZD55、10 MOI ZD55-TRAIL、10 $\mu\text{mol/L}$ PTL+10 MOI ZD55-TRAIL四种方法分别处理24, 48, 72, 96 h后Hep3B细胞的存活率曲线; D: 10 $\mu\text{mol/L}$ PTL、10 MOI ZD55、10 MOI ZD55-TRAIL、10 $\mu\text{mol/L}$ PTL+10 MOI ZD55-TRAIL四种方法分别处理24, 48, 72, 96 h后QSG-7701细胞的存活率曲线。

A: Hep3B cells were treated with PTL at concentrations of 1, 5, 10, 15 $\mu\text{mol/L}$ after 24, 48, 72 h; B: Hep3B cells were treated with ZD55-TRAIL at concentrations of 5, 10, 20, 40 MOI after 24, 48, 72 h; C: Hep3B cells were treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ PTL, 10 MOI ZD55, 10 MOI ZD55-TRAIL, 10 $\mu\text{mol/L}$ PTL+10 MOI ZD55-TRAIL respectively after 24, 48, 72, 96 h; D: QSG-7701 cells were treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ PTL, 10 MOI ZD55, 10 MOI ZD55-TRAIL, 10 $\mu\text{mol/L}$ PTL+10 MOI ZD55-TRAIL respectively after 24, 48, 72, 96 h.

图3 MTT分析细胞存活率

Fig.3 Cell viability tested by MTT assay

2.3 MTT分析检测各病毒药物处理组对Hep3B细胞的抑制作用

用浓度为1, 5, 10, 15 $\mu\text{mol/L}$ 的PTL和5, 10, 20, 40 MOI的ZD55-TRAIL分别处理Hep3B细胞24, 48, 72 h后, MTT实验检测细胞存活率, 结果发现当用10 $\mu\text{mol/L}$ 的PTL和10 MOI的ZD55-TRAIL分别处理细胞72 h后, 其存活率分别为66%和70%, 而二者联

合处理Hep3B细胞72 h, 存活率仅为44%, 即PTL联合ZD55-TRAIL对Hep3B细胞的杀伤力增强了26%。此外, 为了探究联合处理组的毒副作用, 笔者又用PTL和ZD55-TRAIL联合处理正常肝脏细胞QSG-7701 72 h, 结果证明其对正常肝脏细胞的毒性较小, 因此说明10 $\mu\text{mol/L}$ PTL和10 MOI ZD55-TRAIL能兼顾较好的有效性和安全性(图3)。

2.4 细胞形态学变化

倒置显微镜下观察Hep3B细胞分别用PTL、

ZD55-TRAIL及二者联合处理24, 48, 72 h后形态发生的变化, 发现相同处理时间段内, 以二者联合作

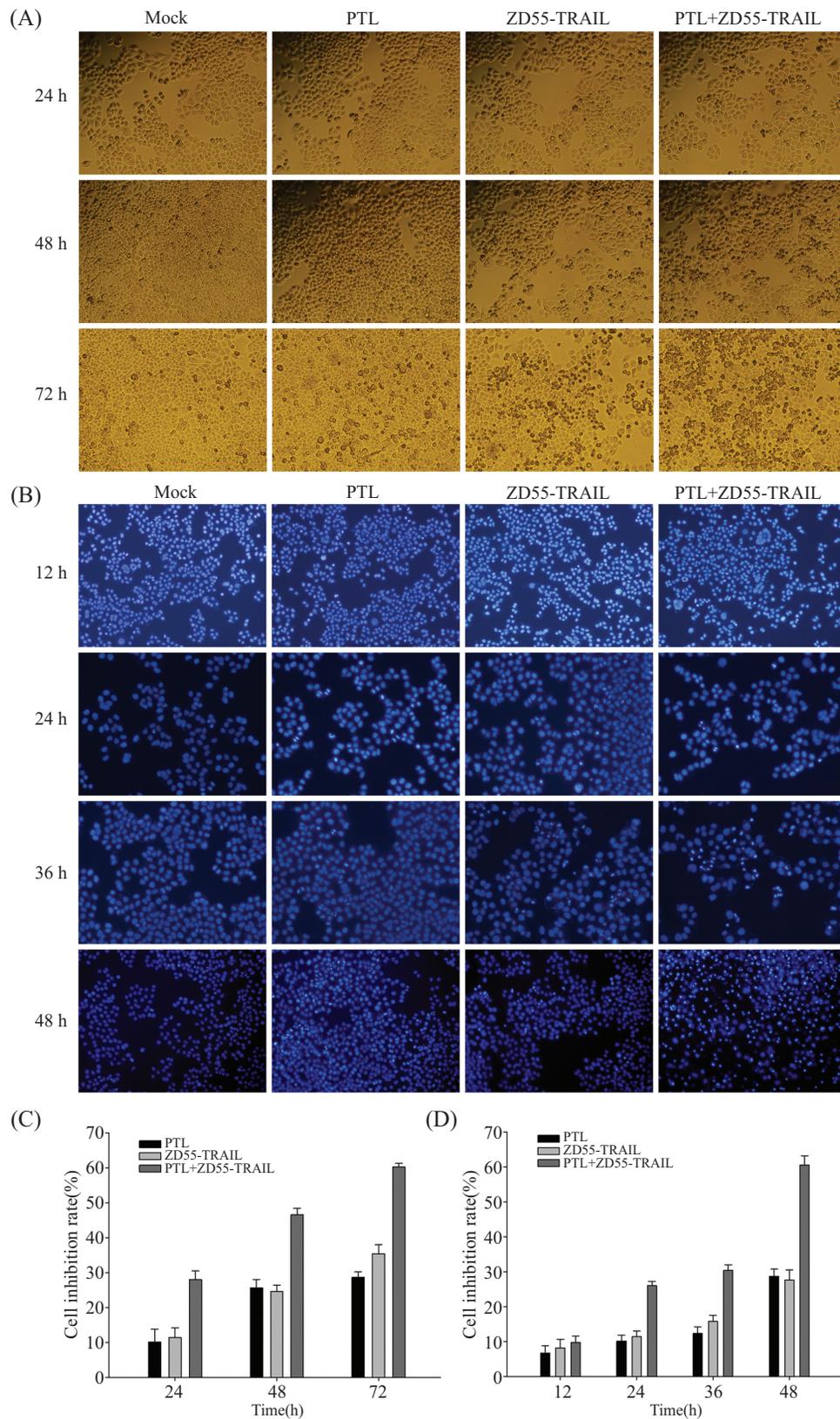


图4 荧光显微镜下细胞形态的变化

Fig.4 Morphological changes observed by fluorescence microscope

用后细胞形态的改变最为明显,尤其是联合处理48 h及72 h后,细胞抑制率分别为46.57%和60.25%,Hep3B胞膜虽尚完整,但出现了细胞体积缩小、胞核浓缩、胞浆内起泡等凋亡的典型形态改变(图4A和图4C)。

Hoechst33342染色荧光显微镜下观察PTL、ZD55-TRAIL及联合处理组分别作用于Hep3B细胞12, 24, 36, 48 h的细胞凋亡效应,对照组细胞核染色均匀,无核浓缩、边集等现象,而处理组均能观察到

核质固缩、凝聚现象,并有核碎片和凋亡小体出现,PTL和ZD55-TRAIL联合处理组在48 h时细胞的抑制率为60.54%,单独处理组PTL和ZD55-TRAIL的细胞抑制率分别为25.98%、30.4%,具有显著性差异($P<0.05$)(图4B和图4D)。

2.5 结晶紫染色法分析各病毒药物处理组对Hep3B细胞的毒性作用

分别用PTL、ZD55-TRAIL及联合组作用于Hep3B细胞96 h后,用结晶紫染色进行分析,发现联

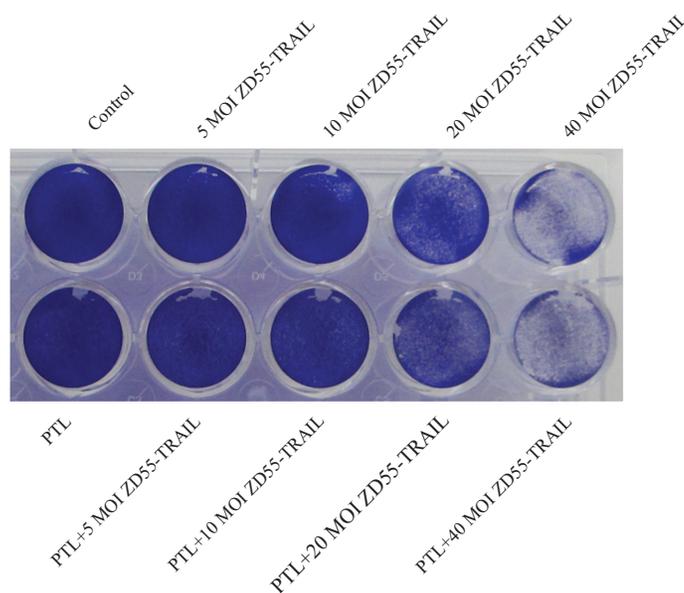


图5 结晶紫染色分析细胞毒性

Fig.5 Cytotoxicity detected by crystal violet staining

合组对肝癌Hep3B细胞的杀伤效果明显强于单独使用PTL或ZD55-TRAIL(图5)。

3 讨论

肿瘤基因治疗是利用转基因技术将外源的DNA片段或基因导入肿瘤细胞以达到诱导细胞凋亡、抑制肿瘤生长的目的,迄今已有多个腺病毒载体介导的肿瘤基因治疗正在进行临床试验^[13-14],其中关于促凋亡基因如肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体基因(*TRAIL*)的研究较为引人注目^[15],*TRAIL*属于TNF家族,以II型跨膜蛋白的形式表达于细胞表面,大量研究表明,不论是*TRAIL*的胞外段、还是胞内段可溶性结构域,都具有强大和特异性诱导肿瘤细胞凋亡的能力,但对正常细胞无此效应^[16]。腺病毒ZD55-TRAIL系删除5型腺病毒的*E1B55kDa*基因,并在该位置插入*TRAIL*表达框。一方面腺病毒选择性

地在肿瘤细胞内增殖,从而裂解肿瘤细胞,产生的子代腺病毒又不断感染周围的肿瘤细胞,重复其增殖、裂解肿瘤细胞的过程;另一方面其携带的*TRAIL*可发挥肿瘤基因治疗的优势,即刘新垣院士于2001年首次正式提出的“癌症的靶向基因-病毒”策略^[17-19]。然而,尽管许多肿瘤细胞都对*TRAIL*基因敏感,但还有不少细胞天然对*TRAIL*蛋白耐受,因此加深理解和研究肿瘤细胞抵抗促凋亡基因的机制成为肿瘤药物治疗的重要问题。

PTL是从菊科植物中提取的一种半萜烯内酯化合物(图6),研究发现小白菊内酯具有较强的抗肿瘤活性,可在体外抑制多种肿瘤细胞的生长增殖并诱导其凋亡^[20],包括前列腺癌、乳腺癌、胆管癌等。这种抗癌活性可能依赖于PTL引起的广泛的细胞内信号,例如NF- κ B和STAT3介导的信号抑制^[21]。另一方面是诱导内氧化应激,主要由活性氧ROS水平提

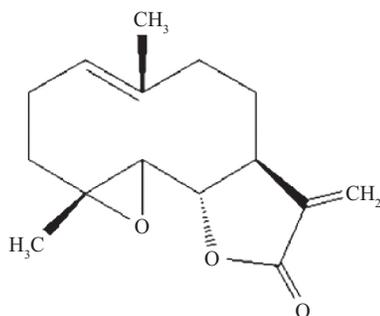


图6 小白菊内酯的结构

Fig.6 Structure of parthenolide

高和激活JNK活性引起^[22]。此外,PTL可通过增加p53的磷酸化来激活它的促凋亡功能,而关于PTL与“癌症的靶向基因-病毒”策略联合应用、治疗肝癌的研究目前尚无报道。

本实验探究联合运用PTL和肿瘤基因治疗药物ZD55-TRAIL对肝癌细胞株Hep3B的杀伤作用,实验结果表明,联合用药对肝癌Hep3B细胞株的杀伤力要强于PTL或ZD55-TRAIL单独用药,且对正常肝脏细胞损伤甚小,因此有理由认为PTL和ZD55-TRAIL的联合使用避免了PTL和ZD55-TRAIL单独使用时效果不佳的缺点,PTL可以显著增加肿瘤细胞对ZD55-TRAIL的敏感性,但是二者协同作用的具体机制还有待于进一步深入研究。

参考文献 (References)

- 1 Fulda S, Küfer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 2001; 20(41): 5865-77.
- 2 Fulda S, Meyer E, Debatin KM. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* 2002; 21(15): 2283-94.
- 3 Wirth T, Kühnel F, Fleischmann-Mundt B, Woller N, Djojotubroto M, Rudolph KL, *et al.* Telomerase-dependent virotherapy overcomes resistance of hepatocellular carcinomas against chemotherapy and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand by elimination of Mcl-1. *Cancer Res* 2005; 6 (16): 7393-402.
- 4 van Geelen CM, de Vries EG, de Jong S. Lessons from TRAIL-resistance mechanisms in colorectal cancer cells: Paving the road to patient-tailored therapy. *Drug Resist Updat* 2004; 7(6): 345-58.
- 5 Biggs MJ, Johnson ES, Persaud NP, Ratcliffe DM. Platelet aggregation in patients using feverfew for migraine. *Lancet* 1982; 2(8301): 776.
- 6 Hall IH, Lee KH, Starnes CO, Sumida Y, Wu RY, Waddell TG, *et al.* Anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones and related compounds. *J Pharm Sci* 1979; 68(5): 537-42.
- 7 Jain NK, Kulkarni SK. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of tanacetum parthenium. *Ethnopharmacol* 1999; 68(1/2/3): 251-9.
- 8 Zhou J, Zhang H, Gu P, Bai J, Margolick JB, Zhang Y. NF-kappaB pathway inhibitors preferentially inhibit breast cancer stem-like cells. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 111(3): 419-27.
- 9 Rosano L, Varmi M, Salani D. Endothelin-1 induces tumor proteinase activation and invasiveness of ovarian caecinoma cells. *Cancer Res* 2001; 61(22): 8340-6.
- 10 Cheng G, Xie L. Parthenolide induces apoptosis and cell cycle arrest of human 5637 bladder cancer cells *in vitro*. *Molecules* 2011; 16(8): 6758-68.
- 11 Nikolovska-Coleska Z, Xu L, Hu Z, Tomita Y, Li P, Roller PP, *et al.* Discovery of embelin as a cell-permeable, small-molecular weight inhibitor of XIAP through structure-based computational screening of a traditional herbal medicine three-dimensional structure database. *J Med Chem* 2004; 47(10): 2430-40.
- 12 Carlisi D, D'Anneo A, Angileri L, Lauricella M, Emanuele S, Santulli A, *et al.* Parthenolide sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL by inducing the expression of death receptors through inhibition of STAT3 activation. *J Cell Physiol* 2011; 226(6): 1632-41.
- 13 Alemany R, Balague C, Curiel DT. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 2000; 18(7): 723-7.
- 14 Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007—an update. *J Gene Med* 2007; 9(10): 833-42.
- 15 Kim Y, Seol DW. TRAIL, a mighty apoptosis inducer. *Mol Cells* 2003; 15(3): 283-93.
- 16 Shi J, Zheng D, Liu Y, Sham MH, Tam P, Farzaneh F, *et al.* Overexpression of soluble TRAIL induces apoptosis in human lung adenocarcinoma and inhibits growth of tumor xenografts in nude mice. *Cancer Res* 2005; 65(5): 1687-92.
- 17 Liu XY. Targeting gene-virotherapy of cancer and its prosperity. *Cell Res* 2006; 16(11): 879-86.
- 18 Liu X, Cao X, Wei R, Cai Y, Li H, Gui J, *et al.* Gene-viro-therapy targeting liver cancer by a dual-regulated oncolytic adenoviral vector harboring IL-24 and TRAIL. *Cancer Gene Therapy* 2012; 19(1): 49-57.
- 19 Liu XY, Li HG, Zhang KJ, Gu JF. Strategy of cancer targeting gene-viro-therapy (CTGVT) a trend in both cancer gene therapy and cancer virotherapy. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13(9): 1761-7.
- 20 Liu X, Cao X, Wei R, Cai Y, Li H, Gui J, *et al.* Susceptibility of cholangiocarcinoma cells to parthenolide-induced apoptosis. *Cancer Res* 2005; 65(14): 6312-20.
- 21 Sobota R, Szwed M, Kasza A, Bugno M, Kordula T. Parthenolide inhibits activation of signal transducers and activators of transcription (STATs) induced by cytokines of the IL-6 family. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267(1): 329-33.
- 22 Nakshatri H, Rice S, Bhat-Nakshatri P. Antitumor agent parthenolide reverses resistance of breast cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand through sustained activation of c-jun N-terminal kinase. *Oncogene* 2004; 23(44): 7330-44.