

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01284

· 论 著 ·

减毒沙门菌介导的 TRAIL 和 VP3 对胃癌细胞的生长抑制作用及其机制

曹红丹¹, 吕琳¹, 向廷秀^{2*}, 刘少宁¹, 王丽娟¹, 王丕龙¹

1. 重庆医科大学附属第一医院消化内科, 重庆 400016
2. 重庆医科大学附属第一医院实验研究中心, 重庆 400016

[摘要] **目的:**利用沙门菌作为真核质粒携带载体,在体内外观察肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)和鸡贫血病毒 VP3 基因对胃癌细胞的生长抑制作用。**方法:**将重组质粒 pBud-TRAIL、pBud-VP3、pBud-TRAIL-VP3 电转化减毒沙门菌 SL7207,经稳定性鉴定后直接转染胃癌细胞株 SGC-7901,24 h 后利用荧光显微镜观察有无融合绿色荧光蛋白表达,MTT 法检测表达载体对胃癌细胞的生长作用,流式细胞仪检测细胞凋亡率及周期变化,并用免疫组织化学方法检测该载体对胃癌细胞 Caspase-3、Caspase-9 表达的影响。荷瘤小鼠口服携带重组质粒的减毒沙门菌,8 周后通过 RT-PCR 检测肿瘤组织内真核载体的表达状况,并测量荷瘤瘤体大小。**结果:**重组质粒能够在减毒沙门菌中稳定存在,经减毒沙门菌介导转染胃癌细胞后能够较好的表达,转染 48 h 后可见到 TRAIL 和 VP3 对胃癌细胞生长有抑制作用,流式细胞仪观察到 pBud-TRAIL-VP3 能使胃癌细胞的凋亡率明显增高,TRAIL 和 VP3 能够协同促进胃癌细胞 Caspase-3、Caspase-9 的表达。体内实验提示 pBud-TRAIL-VP3 沙门菌载体能够在肿瘤组织中表达并能抑制肿瘤生长($P<0.05$)。**结论:**减毒沙门菌将外源基因 VP3 和 TRAIL 基因导入胃癌细胞后,体内外实验证实该载体对胃癌细胞的生长起明显抑制作用,TRAIL 和 VP3 联合作用机制与促进 Caspase-3、Caspase-9 的表达有关。

[关键词] 减毒沙门菌;细胞凋亡;TRAIL 基因;VP3 基因

[中图分类号] R 735.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)11-1284-05

Inhibitory effects of attenuated *Salmonella typhimurium*-mediated TRAIL and VP3 gene against gastric cancer cells

CAO Hong-dan¹, LÜ Lin¹, XIANG Ting-xiu^{2*}, LIU Shao-ning¹, WANG Li-juan¹, WANG Pi-long¹
1. Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
2. Experiment Research Center, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of eukaryotic expression vector (attenuated *salmonella typhimurium*) carrying tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and Chicken anemia virus VP3 gene on gastric cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** The cloning vectors pBud-TRAIL, pBud-VP3, and pBud-TRAIL-VP3 were transformed into attenuated *Salmonella typhimurium* by electric transformation technique. The *S. typhimurium*-based carriers were then transfected into gastric cancer cells, line SGC-7901 after stability assay. The expression of fusion green fluorescent protein was examined using fluorescent microscopy after 24 h. MTT assay was used to examine the inhibition of cell growth. Flow cytometry was used to detect cycle distribution and apoptosis rates of cells. The expression of caspase-3 and caspase-9 was assayed by immunohistochemistry method. *Salmonella typhimurium* carrying recombinant plasmid was administrated orally in sarcoma-bearing mice; 8 weeks later RT-PCR was used to detect the expression of cloning vectors in tumor tissue. Meanwhile, the sizes of tumors were also determined. **Results:** The recombinant plasmids were stably transformed into attenuated *Salmonella typhimurium*, and the plasmids was satisfactorily expressed in gastric cancer cells *via* attenuated *Salmonella typhimurium*. TRAIL and VP3 inhibited the proliferation of gastric cancer cells after 48 h. Flow cytometry analysis showed that the pBud-TRAIL-VP3 obviously enhanced apoptosis rates of gastric cancer cells. TRAIL and VP3 jointly increased the expression of caspase-3 and caspase-9. *In vivo* study showed that TRAIL and VP3 genes were expressed in tumor tissue and could inhibit the tumor growth($P<0.05$). **Conclusion:** Attenuated *Salmonella typhimurium*-mediated TRAIL and VP3 transfection of gastric cancer cells can inhibit cell growth *in vitro* and *in vivo*. The joint effect of TRAIL and VP3 is correlated with the increase of caspase-3 and caspase-9 expression.

[KEY WORDS] attenuated *Salmonella typhimurium*; apoptosis; TRAIL gene; VP3 gene

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(11):1284-1288]

[收稿日期] 2008-03-20 **[接受日期]** 2008-05-19
[基金项目] 国家自然科学基金(30500234). Supported by National Natural Science Foundation of China(30500234).
[作者简介] 曹红丹, 博士生.
* 通讯作者(Corresponding author). Tel:023-89012715, E-mail: beautifulgift@163.com

自从 1890 年发现癌症患者术后感染厌氧菌能够使这些人病情好转以来, 厌氧菌在肿瘤治疗中逐渐引起研究者的兴趣^[1-2]。沙门菌是一种较常见的肠道兼性厌氧菌, 它可以在人体组织内选择性地聚集在实体肿瘤中并对肿瘤细胞的生长起抑制作用, 据研究它在肿瘤组织中复制水平比正常组织高 1 000 至 10 000 倍^[3]。此外, 沙门菌作为一种细胞内寄生菌, 以其为载体可以直接将外源 DNA 运送至真核细胞并在其中表达^[4]。

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 是近年来发现的一个凋亡促进基因, 由于它可以特异性地作用于肿瘤细胞而对正常组织没有毒副作用, 在肿瘤的基因治疗方面备受研究者的关注^[5]。但研究发现, 并非所有肿瘤细胞对 TRAIL 敏感, 有的肿瘤细胞对 TRAIL 不敏感甚至不耐受^[6]。鸡贫血病毒 VP3 基因编码蛋白即凋亡素也可以特异性地作用于肿瘤细胞, 并且其作用方式有别于 TRAIL, 它主要通过线粒体途径促进细胞凋亡。如果在治疗肿瘤时联合应用 TRAIL 和 VP3 基因, 将会弥补单一应用 TRAIL 基因的缺点而对肿瘤细胞的凋亡起到联合作用。

本研究将带有促进凋亡的基因 TRAIL 和 VP3 真核表达质粒经减毒沙门菌携带进入胃癌细胞, 观察其对肿瘤细胞的影响作用, 为肿瘤的预防和治疗探索一条简便、有效的新途径。

1 材料和方法

1.1 材料 限制性内切酶 *Sal* I、*Sca* I、*Taq* DNA 聚合酶、逆转录酶、核酸相对分子质量 marker, 均购自大连宝生物公司。质粒提取试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。RPMI 1640 培养液、庆大霉素、Zeron 购自 Invitrogen, pBud-TRAIL^[7]、pBud-VP3、pBud-TRAIL-VP3 质粒 (含有 EGFP 基因) 均由本实验室构建^[8]。减毒沙门菌 SL7207 (*S. typhimurium* 2337-65 derivative hisG46, DEL407 [*aroA*:::Tn105Tc-s6]) 由美国 Scripps 研究中心向荣教授惠赠。Caspase3、Caspase9 免疫组织化学试剂盒购自北京中杉生物科技公司。BALB/c 小鼠购自重庆医科大学动物实验中心, 胃癌细胞株 SGC-7901 及其他常用试剂均由本室保存。

1.2 pBud-TRAIL-VP3 质粒载体电转化沙门菌及稳定性分析 采用电转化法将 pBud-TRAIL-VP3 转化减毒沙门菌体 SL7207, 利用碱裂解法从沙门菌中抽提质粒, 抽提的质粒分别用酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳及测序鉴定。按照以上方法培养细菌 20 代后重复鉴定。最后命名携带 VP3 和 TRAIL 基因的

沙门菌为 pBud-TRAIL-VP3/SL7207。pBud-TRAIL、pBud-VP3 分别经同样方法转化入减毒沙门菌, 分别命名为 pBud-TRAIL/SL7207 及 pBud-VP3/SL7207。

1.3 VP3 和 TRAIL 基因转染胃癌细胞 取对数生长期的 SGC7901 细胞, 传代接种于 6 孔板, 调整细胞密度, 使每孔的细胞数为 1×10^5 个, 培养 24 h 后, 将培养至对数生长中期的 SL7207 空菌液及 pBud-TRAIL-VP3/SL7207 以沙门菌数/细胞数 = 50/1 的比例侵袭胃癌细胞^[9], 40 min 后弃去菌液, PBS 洗涤 3 次, 并于倒置显微镜下观察细胞形态变化, 更换含有 100 μ g/ml 庆大霉素的 RPMI 1640 培养液 (不含血清), 2 h 后 PBS 洗涤 3 次, 改用含 10 mg/L 庆大霉素的 RPMI 1640 完全培养液培养。

1.4 沙门菌及其携带载体对胃癌细胞的生长作用 以上细胞培养 24 h 后, 于荧光显微镜下观察有无融合绿色荧光表达。以同样方法转染 pBud-TRAIL 和 pBud-VP3, 于 24、48、72 h 采用 MTT 法检测各组细胞在 490 nm 波长处的光密度值 (*D*), 并计算细胞抑制率。细胞抑制率 = $(1 - \text{实验组 } D \text{ 值} / \text{细胞对照组 } D \text{ 值}) \times 100\%$ 。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率及细胞周期 上述方法转染细胞, 48 h 后收集单细胞悬液, PBS 洗涤 2 次后用 70% 冰乙醇 4℃ 固定过夜, 离心除去乙醇, PBS 洗涤, 加入 10 mg/ml RNA 酶溶液 150 μ l, 37℃ 水浴 30 min, 加入碘化丙啶混匀, 4℃ 放置 30 min, 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率及周期的变化。

1.6 免疫组织化学检测胃癌细胞 Caspase-3、Caspase-9 的表达 SGC-7901 细胞爬片后, 按以上方法将沙门菌感染胃癌细胞, 48 h 后弃去培养液, PBS 洗涤细胞 3 次, 95% 乙醇固定 30 min, 取出盖玻片, 常规 SP 法免疫化学染色, DAB 显色后光镜下观察。结果分析: 排除爬片边缘细胞, 10×10 低倍镜下随机选取 10 个细胞均匀分布的视野, 10×20 中倍镜下每个视野随机选 50 个细胞。细胞质着色强弱分为 4 个等级: 无着色 0 分, 淡黄色 1 分, 棕黄色 2 分, 棕褐色 3 分。按公式 $HSCORE = \sum Pi(i+1)$ ($i = 0, 1, 2, 3$; Pi 表示评分为 i 的比例) 计算各组细胞 HSCORE 得分。

1.7 小鼠体内抑瘤实验 选择生长状态良好的 SGC-7901 胃癌细胞, 用胰酶消化瘤细胞, 调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml, 以每只小鼠 100 μ l 瘤细胞悬液移植于小鼠腋下皮下, 待肿瘤结节直径长到 0.3 cm³ 大小后, 将小鼠随机分成 6 组, 每组 8 只, 分别是对照组 (Blank)、SL7207 组、pBud-TRAIL/

SL7207 组、pBud-VP3/SL7207 组和 pBud-TRAIL-VP3/SL7207 组。将 SL7207 及携带质粒的 SL7207 接种于含 Zeron 的 LB 培养液中培养,至对数生长晚期时,收集菌体,生理盐水洗涤后,调整细菌数为 1×10^9 /ml。各实验组小鼠用 3% 碳酸氢钠中和胃酸后,利用胃管饲服相应细菌 0.1 ml,对照组饲服等量生理盐水,2 周 1 次,共服 3 次。口服治疗后 8 周,脱颈处死以上各组小鼠,剥离瘤块称量,并按以下公式计算抑瘤率:抑瘤率=(对照组平均瘤质量-治疗组平均瘤质量)/对照组平均瘤质量。提取肿瘤组织 RNA,分别以 TRAIL 和 VP3 引物进行 PCR 反应。

1.8 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 统计学软件对各组数据进行单因素方差分析。

2 结 果

2.1 pBud-TRAIL-VP3 质粒在沙门菌中的稳定性 pBud-TRAIL-VP3质粒转化沙门菌,提取质粒后经酶切及序列鉴定,证实为 pBud-TRAIL-VP3。重复上述步骤 20 次后,发现各组质粒经酶切后得到相应分子量大小的目的基因,说明它们能够在沙门菌中稳定存在(图 1)。

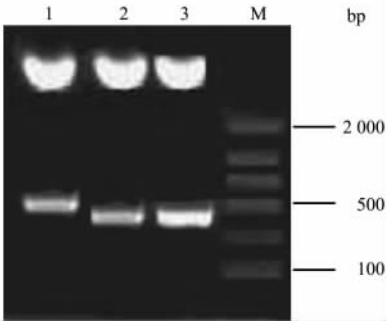


图 1 质粒在沙门菌中酶切鉴定

Fig 1 Enzyme digestion identification of plasmids in *Salmonella typhimurium*

1: pBud-TRAIL; 2: pBud-VP3; 3: pBud-TRAIL-VP3; M: DL2000 marker

2.2 沙门菌及 pBud-TRAIL-VP3 对胃癌细胞的生长作用 减毒沙门菌在侵袭胃癌细胞 1 h 后,发现胃癌细胞收缩变圆,胞膜增厚(图 2)。在沙门菌侵袭胃癌细胞 24 h,荧光镜下观察到 pBud-TRAIL-VP3 在胃癌细胞内有绿色荧光蛋白表达(图 3)。各转染组均对细胞生长有抑制作用。48 h 后 pBud-TRAIL-VP3/SL7207 组比其他各组对胃癌细胞的生长有明显抑制作用(图 4)。

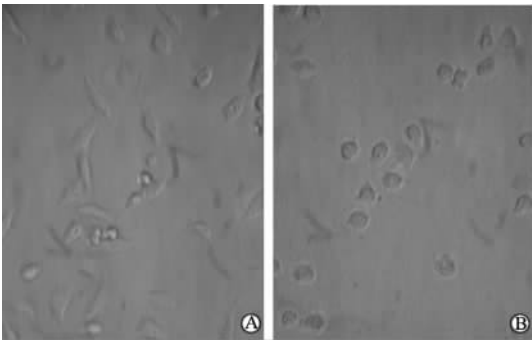


图 2 沙门菌的侵袭对胃癌细胞形态的影响

Fig 2 Morphology changes of gastric cancer cells caused by *S. typhimurium*

A: Gastric cancer cells; B: Gastric cancer cells invaded by *S. typhimurium*. Original magnification: $\times 100$

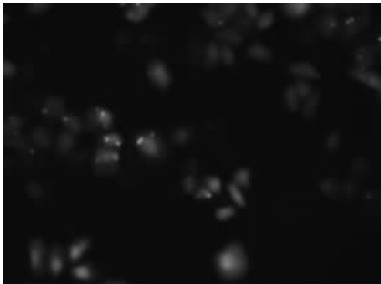


图 3 绿色荧光蛋白在胃癌细胞内的表达

Fig 3 Expression of green fluorescent protein in gastric cells

Original magnification: $\times 200$

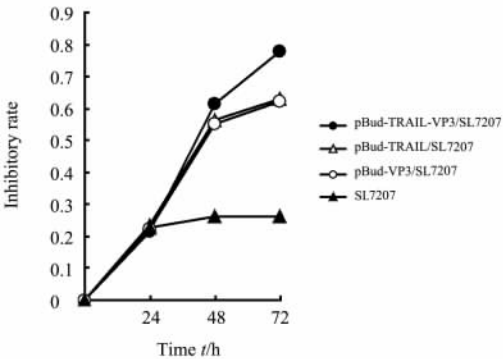


图 4 沙门菌载体对胃癌细胞生长抑制率的影响

Fig 4 Effect of *S. typhimurium* carriers on growth inhibition rates of gastric cancer cells

2.3 流式细胞仪观察 TRAIL 和 VP3 对胃癌细胞的作用 胃癌细胞转染 48 h 后,流式细胞仪分析各组细胞凋亡率及细胞周期分布,可见减毒沙门菌 SL7207 对胃癌细胞凋亡率及细胞周期没有影响,各质粒组胃癌细胞可见有凋亡峰出现,以 pBud-TRAIL-VP3/SL7207 最为明显。pBud-VP3/SL7207 组可见 S 期和 G₂-M 期细胞比率增加,pBud-TRAIL-VP3/SL7207 及其他组对细胞周期分

布没有影响(图 5)。

2. 4 VP3 和 TRAIL 对胃癌细胞 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达的影响 沙门菌介导 VP3 和

TRAIL 对胃癌细胞 SGC-7901 作用后 72 h,SGC-7901 细胞 Caspase-3、Caspase-9 蛋白的表达较对照组和其他各组明显增加(表 1)。

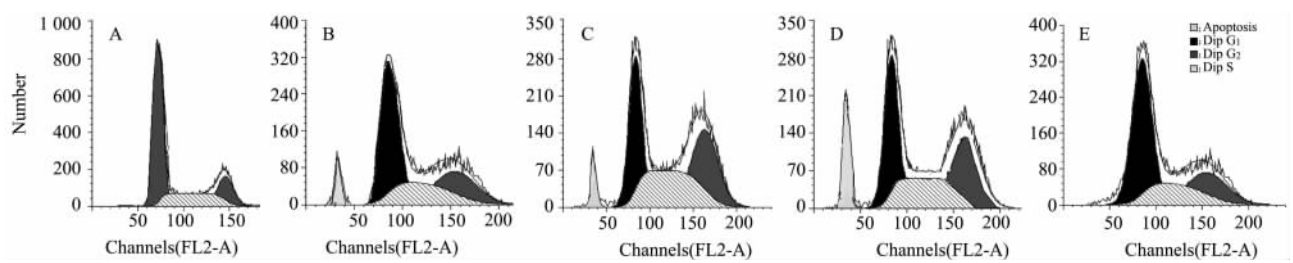


图 5 沙门菌载体对胃癌细胞细胞周期及凋亡率的影响

Fig 5 Effect of *S. typhimurium* carriers on cell cycle distribution and apoptosis rates of gastric cancer cells

A:SL7207;B:pBud-TRAIL/SL7207;C:pBud-VP3/SL7207;D:pBud-TRAIL-VP3/SL7207;E:Blank

表 1 胃癌细胞 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达的 HSCORE 得分

Tab 1 HSCORE scores of Caspase-3 and Caspase-9 expression in gastric cancer cells

(n=5, $\bar{x} \pm s$)

Protein	Blank	SL7207	pBud-TRAIL/ SL7207	pBud-VP3/ SL7207	pBud-TRAIL-VP3/ SL7207
Caspase-3	1.55±0.13	1.58±0.09	2.26±0.24	2.45±0.18	3.37±0.22 *
Caspase-9	1.43±0.11	1.41±0.11	2.19±0.2	2.35±0.21	3.29±0.18 *

* $P<0.05$ vs other groups

2. 5 沙门菌载体对肿瘤组织的生长抑制作用 提取肿瘤组织 RNA 进行 RT-PCR 后,可以扩增出 560 bp 或 363 bp 的目的条带,与 TRAIL 或 VP3 分子大小相符(图 6)。SL7207 组、pBud-VP3/SL7207 组、pBud-TRAIL/SL7207 组和 pBud-TRAIL-VP3/SL7207 组各载体菌液对肿瘤细胞的抑制率分别为 0.51 ± 0.02 、 0.69 ± 0.02 、 0.72 ± 0.019 、 0.82 ± 0.02 ,pBud-TRAIL-VP3/SL7207 组比其他各组的抑瘤率高($P<0.05$)。

3 讨 论

近年来减毒沙门菌被发现可将克隆有异源基因的真核表达质粒携带入细胞,使异源基因在真核环境中进行表达^[10],尽管目前其传递真核质粒的机制还不太明确,减毒沙门菌在核酸疫苗和基因治疗方面的有效性和安全性已被研究者所认可,并在临床上得到了试用^[11]。本实验中,我们应用减毒沙门菌作为携带载体将 TRAIL 和 VP3 导入胃癌细胞,24 h 后发现融合绿色荧光蛋白表达,体内实验也证实减毒沙门菌确实可以将外源基因携带进入小鼠体内,并进一步在肿瘤组织内表达。

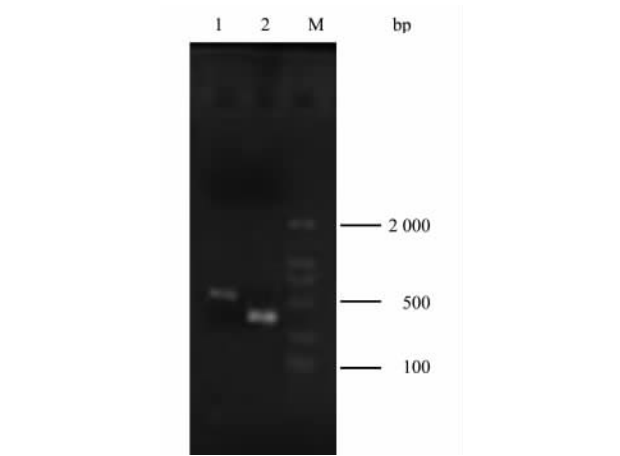


图 6 RT-PCR 检测 TRAIL 和 VP3

Fig 6 Analysis of TRAIL and VP3 genes by RT-PCR

1:TRAIL gene; 2:VP3 gene; M:DL2000 marker

减毒沙门菌载体侵袭胃癌细胞 24 h,胃癌细胞的生长受到抑制,但各组之间没有差别,说明对胃癌细胞的生长抑制现象是由减毒沙门菌的侵袭造成的。尽管应用的是减毒菌株,在体外培养的最初 24 h 内,细胞的生长还是受到细菌的干扰,随后细胞的生长趋近正常。48 h 后重组质粒组胃癌细胞的生长受到抑制,与 TRAIL 和 VP3 基因开始发挥作用有

关。流式细胞检测发现减毒沙门菌对胃癌细胞没有促进凋亡作用,TRAIL 和 VP3 联合作用于肿瘤细胞后凋亡率明显增加,细胞周期结果提示,VP3 主要作用于细胞的 G₂/M 和 S 期,而 TRAIL 对细胞周期没有影响,两者联合作用不是通过细胞周期调节来发挥作用的。关于 TRAIL 和 VP3 协同诱导细胞凋亡的机制,我们认为与共同促进 Caspase-3 及其上游的 Caspase-9 的表达有关。尽管 TRAIL 是通过膜受体而发挥凋亡作用,VP3 主要通过线粒体途径触发细胞色素 C 的释放而导致细胞凋亡^[12],但两者最终都能通过 Caspase 传导凋亡信号^[13-14],它们可能在信号通路中存在交叉点而共同发挥凋亡促进作用。

减毒沙门菌不但能将外源基因导入宿主肿瘤细胞表达,而且还可以将外源基因靶向传送到肿瘤细胞^[15]。Zhao 等^[16]利用减毒沙门菌口服或静脉注射后,发现它们能够优先富集到肿瘤组织中,并对肿瘤的生长起抑制作用。沙门菌是一种兼性厌氧菌,它既可以在需氧条件下生长也可以在微需氧或厌氧条件下生长,而肿瘤组织特有的环境恰恰可提供它生存的环境。把沙门菌应用到肿瘤基因治疗方面,可以克服以往传统治疗方法靶向性不强、副作用大的问题。实验中发现沙门菌可以将 TRAIL 和 VP3 传送到肿瘤组织并抑制肿瘤组织的生长。减毒沙门菌为什么能够抑制肿瘤生长?这可能与肿瘤组织内的缺氧环境能够为沙门菌提供生长定居而与肿瘤组织竞争营养有关,而 Bannerman 等^[17]认为减毒沙门菌在体内抑瘤效应与细菌脂多糖成分激发细胞免疫有关。有关沙门菌及其携带载体在体内发挥作用的机制及其安全性、有效性,我们下一步还将继续研究。

[参 考 文 献]

[1] Lee C H, Wu C L, Shiau A L. Systemic administration of attenuated *Salmonella choleraesuis* carrying thrombospondin-1 gene leads to tumor-specific transgene expression, delayed tumor growth and prolonged survival in the murine melanoma model [J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12: 175-184.

[2] Pawelek J, Low K, Bermudes D. Bacteria as tumour-targeting vectors[J]. *Lancet Oncol*, 2003, 4: 548-556.

[3] Rosenberg S A, Spiess P J, Kleiner D E. Antitumor effects in mice of the intravenous injection of attenuated *Salmonella typhimurium* [J]. *J Immunother*, 2002, 25: 218-225.

[4] 迪 卡,陈雪燕,帅江冰,陈 宁,方维焕. 减毒沙门氏菌作为原核表达宿主菌和真核表达载体的研究[J]. *浙江大学学报(农业*

与生命科学版), 2006, 32: 237-244.

[5] Lu M, Strohecker A, Chen F, Kwan T, Bosman J, Jordan V C. Aspirin sensitizes cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by reducing survivin levels [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 3168-3176.

[6] Papageorgiou A, Lashinger L, Millikan R, Grossman H B, Benedict W, Dinney C P, et al. Role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in interferon-induced apoptosis in human bladder cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 8973-8979.

[7] 李 彦,姜 政,向廷秀,曾 波,陶小红,王丕龙. 可溶性人 TRAIL 诱导胃癌细胞 BGC-823 凋亡的研究[J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30: 1066-1070.

[8] 曹红丹,吕 琳,向廷秀,刘少宁,王丽娟,王丕龙. VP3 和 TRAIL 基因共表达沙门氏菌载体对胃癌细胞的生长作用[J]. *肿瘤(待发表)*.

[9] Dietrich G, Bubert A, Gentschev I, Sokolovic Z, Simm A, Catic A, et al. Delivery of antigen encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes* [J]. *Nat Biotech*, 1998, 16: 181-185.

[10] Dietrich G, Spreng S, Favre D, Viret J F, Guzman C A. Live attenuated bacteria as vectors to deliver plasmid DNA vaccines [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2003, 5: 10-19.

[11] Toso J F, Gill V J, Hwu P, Marincola F M, Restifo N P, Schwartzentruber D J. Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma [J]. *Clin Oncol*, 2002, 20: 142-152.

[12] Maddika S, Booy E P, Johar D, Gibson S B, Ghavami S, Los M. Cancer-specific toxicity of apoptin is independent of death receptors but involves the loss of mitochondrial membrane potential and the release of mitochondrial cell-death mediators by a Nur77-dependent pathway [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118: 4485-4493.

[13] Lee J J, Chen P B, Yang S H, Cheng C H, Chueh L L, Pang V F, et al. Effect of the VP3 gene of chicken anemia virus on canine mammary tumor cells [J]. *Am J Vet Res*, 2007, 68: 411-422.

[14] Xu S Q, El-Deiry W S. p21^{WAF1/CIP1} inhibits initiator caspase cleavage by TRAIL death receptor DR4 [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2000, 269: 179-190.

[15] Jiang Z M, Zhao P, Zhou Z H, Liu J, Qin L Y, Wang H W. Using attenuated *Salmonella typhi* as tumor targeting vector for MDRI siRNA delivery: an experimental study [J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6: 555-560.

[16] Zhao M, Yang M, Ma H, Li X M, Tan XY, Li S K. Targeted therapy with a *Salmonella typhimurium* leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice [J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 7647-7652.

[17] Bannerman D D, Goldblum S E. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 284: 899-914.

[本文编辑] 孙 岩