

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00474

Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀-TRAIL 融合蛋白的克隆表达及其生物学双功能鉴定

任娜, 王梁华, 高云, 孙铭娟, 焦豫良, 郭爱云, 焦炳华*

第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:**克隆表达融合蛋白 Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀-TRAIL, 并观察其生物学功能。 **方法:**利用重组 PCR 技术扩增 Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀-TRAIL(Tu-T)的融合编码序列, 构建 pMAL-Tu-T 融合蛋白表达载体, 将其转化大肠杆菌 BL21(DE3), 经 IPTG 诱导表达, 得到 MBP-Tu-T 融合蛋白, 用 SDS-PAGE 鉴定纯化的表达产物。通过体外内皮细胞增殖抑制实验、肿瘤细胞杀伤实验、体外管腔形成抑制试验及电镜检测细胞凋亡情况对其生物学双功能进行鉴定。 **结果:**融合蛋白 MBP-Tu-T 在 BL21 中表达率约 20%, 可明显抑制内皮细胞增殖 (IC₅₀ 12.5 μg/ml), 杀伤、诱导胰腺癌细胞凋亡并抑制体外管腔形成。 **结论:**融合蛋白 MBP-Tu-T 具有双功能生物学活性, 为进一步研究其靶向性杀伤肿瘤奠定了基础。

[关键词] Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀; TRAIL; 融合蛋白; 生物学功能**[中图分类号]** Q 784 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)05-0474-05

Expression of Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀-TRAIL fusion protein and identification of its biological functions

REN Na, WANG Liang-hua, GAO Yun, SUN Ming-juan, JIAO Yu-liang, GUO Ai-yun, JIAO Bing-hua*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To express Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀-TRAIL fusion protein and to observe its biological functions. **Methods:** SOE-ing PCR was employed to amplify the recombinant sequence of Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀ and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL₁₁₄₋₂₈₁). An expression vector pMAL-Tu-T was constructed by inserting Tu-T sequence into pMAL-c₂; the vector was used to transfect *E. coli* BL21 (DE3) and expression of MBP-Tu-T fusion protein was induced by IPTG. Amylose Resin columns were employed to purify the fusion protein. The biological functions of MBP-Tu-T protein was examined by inhibitory test of endothelial cell proliferation, standard tumor cell cytotoxic assay, *in vitro* tube formation inhibition, and electron microscopic observation (apoptosis). **Results:** The expression rate of MBP-Tu-T fusion protein in *E. coli* was about 20%. Purified recombinant protein obviously inhibited endothelial cell proliferation (IC₅₀ 12.5 μg/ml), induced apoptosis of pancreatic cancer cells, and inhibited tube formation. **Conclusion:** Constructed MBP-Tu-T fusion protein is bifunctional, which lays a solid foundation for further investigation of antitumor effect of Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀-TRAIL *in vivo*.

[KEY WORDS] Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀; TRAIL; fusion protein; biology activity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(5):474-478]

肿瘤的生长和转移依赖于新生血管的生成, 如果能抑制新生血管形成, 肿瘤细胞将凋亡或坏死, 这为抗肿瘤治疗提供了一条新途径^[1]。目前临床上已有多种抑制新生血管形成的药物用于肿瘤治疗。肿瘤抑素(Tumstatin)是继血管抑素(angiotatin)和内皮抑素(endostatin)之后, 新发现的源于人基底膜胶原Ⅳ的肿瘤血管生成抑制因子^[2], 由Ⅳ型胶原 α3 链的中间 3 股螺旋区域 C-端 12 个氨基酸和非胶原区 1(NC1)232 个氨基酸, 共 244 个氨基酸组成^[3], 具有

抗肿瘤效果明显、毒副作用低、不产生耐药等特点^[4]。但是, 完整的 Tumstatin 并不能抑制肿瘤细胞增殖, 提示其完整结构状态影响到 NC1(Ⅳ)185-203 肽的空间结构, 掩盖了结合位点^[5]。此肽通过与 αvβ3 整合素受体结合, 依赖 PTEN/Akt 途径, 抑制肿瘤细胞增殖、迁移并直接抑制肿瘤生长^[6]。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)属于肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)超家族

[收稿日期] 2008-01-13 **[接受日期]** 2008-03-20**[基金项目]** 上海市科学技术发展基金(024319115), Supported by the Science and Technology Development Foundation of Shanghai (024319115).**[作者简介]** 任娜, 硕士生, E-mail: rennasmmu@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-65493936, E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

成员,为Ⅱ型跨膜蛋白,其能选择性诱导肿瘤细胞凋亡,而对正常组织细胞没有明显毒副作用,越来越备受人们关注^[7]。

本研究将 Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀ 与 TRAIL 基因序列进行融合,将其导入大肠杆菌诱导表达重组融合蛋白,并对融合蛋白的生物学功能进行鉴定,希望能够获得既具有 TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡又具有 Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀ 抑制肿瘤新生血管内皮细胞生长作用的双功能蛋白,为进一步的抗肿瘤研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 大肠杆菌 BL21,质粒载体 pMAL-c₂、pBV220、pBV-TRAIL、pBV-Tumstatin,人脐静脉内皮细胞 ECV304 细胞、人胰腺胆管癌上皮细胞 SW1990 为本室保存。小量质粒抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自华舜生物工程公司;PCR 试剂盒、各种限制酶及连接酶购自 TaKaRa 公司。亲和层析柱 MBP(麦芽糖结合蛋白)融合蛋白纯化柱直链淀粉树脂柱购自 New England Biolabs 公司。

1.2 引物设计 根据 GenBank 中肿瘤抑素和 TRAIL 的编码序列,应用 PrimePremier5.0 软件设计扩增全长编码基因的引物,序列如下:引物 1(P1):5'-GC GAA TTC ACA ATG CGA GCC AGC CCA TTT C-3',5'端引入经 *EcoR* I 酶切位点(下划线);引物 2(P2):5'-AGA TCC ACC TGA GCC ACC ACC TAA TTG CCC AGC TTT CAC-3',5'端引入氨基酸连接臂(下划线);引物 3(P3):5'-GGC GGC TCA GGT GGA TCT GGT GTG AGA GAA AGA GGT C-3',5'端引入与引物 2 互补的氨基酸连接臂(下划线);引物 4(P4):5'-CG GGA TCC TTA GCC AAC TTA-3',5'引入 *Bam*H I 酶切位点(下划线)。所有引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 pMAL-Tu-T 表达载体的构建 以 pBV220-Tumstatin 和 pBV220-TRAIL 质粒为模板,以 P1~P4 为引物,采用重组 PCR 技术扩增获得融合基因 Tu-T,将该融合基因和表达载体 pMAL-c₂ 分别经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切,回收相应片段后用 T4 连接酶连接各个片段,转化大肠杆菌 BL21,经酶切筛选,将重组质粒命名为 pMAL-Tu-T,送上海英骏生物技术公司测序。

1.4 pMAL-Tu-T 的诱导表达 将阳性克隆接种 LB 固体培养基(含氨苄青霉素 100 mg/L),于 37℃ 培养 24 h。挑取单个菌落接种于 LB 液体培养基

(含氨苄青霉素 100 mg/L),于 37℃ 振荡培养 12~14 h,然后按 1:100 的比例接种于同样培养基,37℃ 振荡培养 4~6 h。培养至 D_{600} 值为 0.5~0.8,以 0.3 mmol/L IPTG 诱导 4 h,以未诱导菌株作阴性对照,将培养上清及菌体各留取少量,SDS-PAGE 鉴定 Tu-T 的表达。

1.5 蛋白 MBP-Tu-T 的纯化 将-20℃ 保存的过夜菌体重悬于过柱缓冲液(20 mmol/L PBS Tris-HCl,200 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA) 超声破壁,12 000×g 离心 10 min,过柱缓冲液 15 倍体积平衡柱子,以 1 ml/min 的流速将上清过柱,待基线恢复后再用 5 倍柱床体积洗脱未结合蛋白,用洗脱液(过柱缓冲液+10 mmol/L 麦芽糖)洗脱,收集洗脱液,SDS-PAGE 鉴定。

1.6 MTT 法检测细胞增殖抑制率 96 孔培养板每孔加 4×10^3 ECV304 细胞(RPMI 1640 + 0.5% FCS),置 37℃、5% CO₂ 培养箱过夜,24 h 后弃去培养液,每孔加 100 μl 用培养基进行倍比稀释的纯化 MBP-Tu-T,以 MBP-TRAIL 为阳性对照,MBP 为阴性对照,每组平行 3 复孔,继续培养 24 h 后,将培养板中的培养液换成 0.5 mg/ml 的 MTT 溶液,继续在 37℃、5% CO₂ 的环境下培养 4 h 后弃上清,加 100 μl DMSO 至完全溶解后在 595 nm 酶标仪上检测并计算:抑制率(%) = $(D_{\text{空白对照}} - D_{\text{实验组}}) / D_{\text{空白对照}} \times 100\%$ 。以同样的方法观察融合蛋白对 SW1990 细胞的作用。

1.7 电镜检测 SW1990 细胞凋亡 将 MBP-Tu-T 加入生长良好的 SW1990 细胞中,作用 4 h 后,光镜下观察细胞有部分变圆,部分形态正常,弃去培养基和漂浮的死细胞,PBS 漂洗 2 次,用胰酶消化细胞,小心吹打细胞,600×g 10 min 离心收集细胞,再用 PBS 重悬漂洗细胞,然后再次离心收集细胞后用 4% 的多聚甲醛固定细胞。同样收集正常对照组细胞,在电镜下观察。

1.8 体外管腔形成抑制试验 50 μl 稀释的 EC-Matrix™ 加入 96 孔培养板,37℃ 孵育 1 h 待凝固,将不含抗生素的 ECV304 细胞接种到上述包被的培养板中,然后加入 1 μg/ml 的 MBP-Tu-T,对照加入相同量的 BSA。实验重复 3 次。细胞在 37℃、5% CO₂ 条件下继续培养,培养 4、6、8 h 后观察实验组和对照组之间内皮细胞管状排列情况。

1.9 统计学处理 数据用 SAS 6.0 软件进行处理。四组间比较用 Kruskal Wallis Test 方法。两组间比较用 Mann-Whitney U 方法。

2 结果

2.1 Tu-T 编码序列的获得 以 P1、P2 为引物,以 pBV-Tumstatin 为模板,获得了带有氨基酸连接臂的 Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀ 片段 A(180 bp);以 P3、P4 为引物,以 pBV-TRAIL 为模板,获得带有氨基酸连接臂的 TRAIL₁₁₄₋₂₈₁ 片段 B(540 bp),最后以 A、B 为模板,以 P1、P4 为引物,得到带有氨基酸连接臂的 Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀-TRAIL₁₁₄₋₂₈₁ 融合蛋白 Tu-T (720 bp) 编码序列。1% 琼脂糖电泳鉴定结果(图 1)与预期一致。

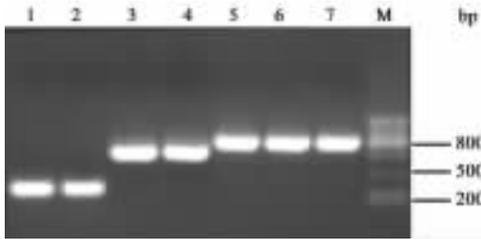


图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

1,2: Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀; 3,4: TRAIL; 5-7: Tu-T; M: Marker

2.2 Tu-T 表达载体的构建及鉴定 将 Tu-T 克隆至 pMAL-c₂ 表达载体,挑取阳性克隆经菌落 PCR(图 2)和酶切鉴定(图 3)。结果可见相应大小载体及目的基因片段的条带。测序结果表明 Tu-T 的序列与 GenBank 数据库中序列完全一致。

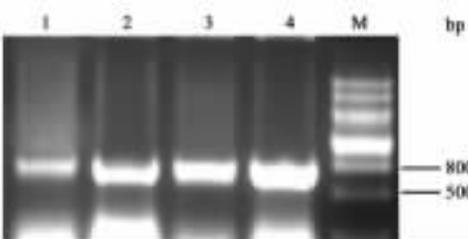


图 2 pMAL-Tu-T 重组子的菌落 PCR 鉴定

Fig 2 PCR analysis of pMAL-Tu-T

1-4: pMAL-c₂-Tu-T; M: Marker

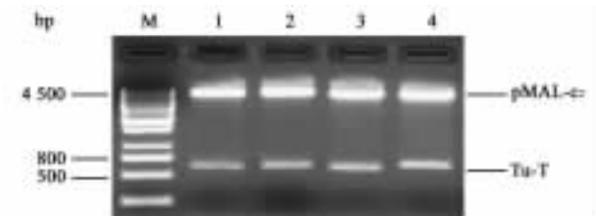


图 3 重组表达载体 pMAL-Tu-T 的酶切鉴定

Fig 3 Restriction enzyme digestion of recombinant expression plasmid pMAL-Tu-T

M: Marker; 1-4: pMAL-c₂-Tu-T (BamH I + EcoR I)

2.3 pMAL-Tu-T 融合蛋白的诱导表达及纯化 结果表明,在 66 000 处有一条新的蛋白带(图 4),与 MBP-Tu-T 理论值一致。经扫描分析,表达量约占菌总蛋白 20% 以上,超声裂解表达菌后收集上清,采用 A 亲和和层析柱纯化得到融合蛋白 MBP-Tu-T,相对分子质量约 66 000。

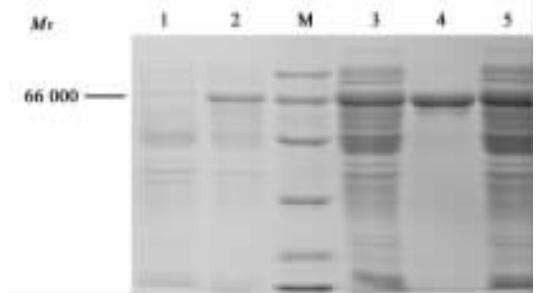


图 4 MBP-Tu-T 融合蛋白表达的 SDS-PAGE 鉴定

Fig 4 SDS-PAGE analysis of fusion protein pMAL-Tu-T

1: BL21 strain without plasmid; 2: Inclusion body of tumstatin expressing clone after ultrasonic treatment; M: Molecular marker; 3: Supernatant of tumstatin expressing clone after ultrasonic treatment; 4: Purified rh-MBP-Tu-T; 5: Clones of BL21 transformed with pMAL-c₂-tumstatin-TRAIL after induction

2.4 融合蛋白对内皮细胞的增殖抑制作用 结果(图 5)表明: MBP-Tu-T、MBP-Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀、MBP-TRAIL 和 MBP 对内皮细胞增殖抑制作用间的差异具有统计学意义($P < 0.000 1$)。其中 MBP-Tu-T 和 MBP-Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀ 具有较强的抑制作用,呈剂量依赖性;而 MBP-TRAIL 和 MBP 则没有明显的抑制作用。再将 MBP-Tu-T 与 MBP-Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀ 的作用差异进行分析:结果表明二者差异不具有统计学意义($P = 0.406 2 > 0.05$),提示 Tu-T 融合蛋白抑制内皮细胞增殖作用是由融合蛋白的 Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀ 部分引起的。

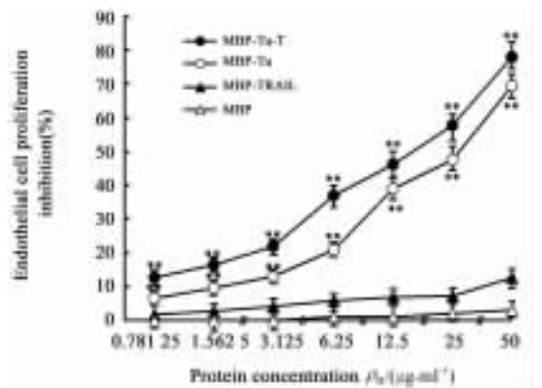


图 5 MBP-Tu-T 融合蛋白对 ECV304 细胞的增殖抑制作用

Fig 5 Inhibition of endothelial cell proliferation by MBP-Tu-T

* * $P < 0.01$ vs MBP; $n = 7, \bar{x} \pm s$

2.5 融合蛋白对 SW1990 细胞的杀伤作用 MTT 法测定细胞的相对存活率, 结果表明: 4 种蛋白对 SW1990 细胞杀伤作用间的差异具有统计学意义 ($P=0.000121 < 0.0001$)。其中 MBP-Tu-T 和 MBP-TRAIL 具有较强的杀伤作用并呈剂量依赖; 而 MBP-Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀ 和 MBP 组细胞则不明显。MBP-Tu-T 和 MBP-TRAIL 的作用差异无统计学意义 ($P=0.565 > 0.05$), 提示 Tu-T 融合蛋白对 SW1990 细胞的杀伤作用是由融合蛋白的 TRAIL 部分引起的(图 6)。倒置显微镜下观察结果发现, 对照组和 MBP-Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀ 药物组细胞生长较好, 形态饱满(图 7A); 而 MBP-Tu-T 药物组形态学发生明显改变, 可见细胞皱缩、变圆、折光率增强, 漂浮的细胞随时间延长逐渐增多, 贴壁生长的细胞变得稀疏、胞质中颗粒增多并可见细胞膜起泡(图 7B)。由此可以推测 Tu-T 融合蛋白较强的杀伤 SW1990 细胞作用是由 TRAIL 部分引起的。

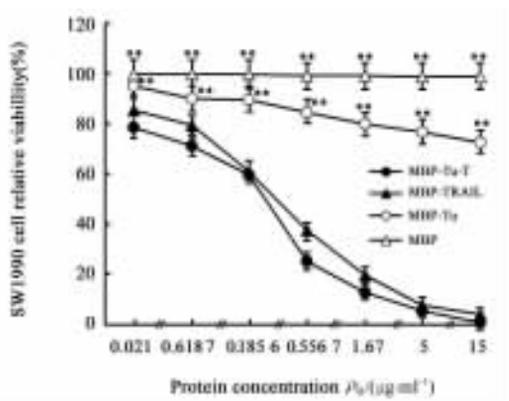


图 6 MBP-Tu-T 融合蛋白对 SW1990 的细胞杀伤作用
Fig 6 Cytotoxic effect against SW1990 cell by fusion proteins by MBP-Tu-T

** $P < 0.01$ vs MBP-Tu-T; $n=7$, $\bar{x} \pm s$

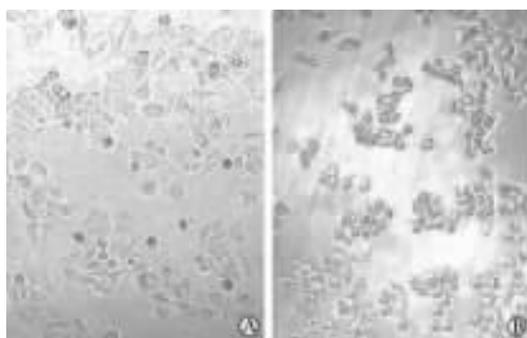


图 7 倒置显微镜下 SW1990 细胞的形态观察
Fig 7 SW1990 cells under microscope

A: Normal cell morphology; B: Cell apoptosis induced by MBP/Tu-T. Original magnification: $\times 250$

2.6 融合蛋白对 SW1990 细胞凋亡的影响 MBP-Tu-T 作用后的 SW1990 细胞, 经扫描电镜显示: 与正常 SW1990 细胞(图 8A)相比具有凋亡样改变, 可见凋亡 I 期明显的细胞核染色质凝集, 出现许多“气穴现象”的空泡结构(图 8B); 凋亡 II a 期细胞核的染色质高度凝聚、边缘化(图 8C); 凋亡晚期细胞皱缩, 细胞膜收缩内陷, 细胞核裂解为碎块出现凋亡小体(图 8D)。结果表明 MBP-Tu-T 能够诱导 SW1990 细胞凋亡。

2.7 体外管腔形成抑制试验 结果表明: 相同浓度的重组蛋白 MBP-Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀ 和 MBP-Tu-T 作用 4 h 时内皮细胞形态开始改变; 6 h 时 MBP-Tumstatin₁₈₃₋₂₃₀ 组管腔发生连续性破坏(图 9A), 而 MBP-Tu-T 组除了管腔连续性被破坏之外, 内皮细胞还发生了明显凋亡(图 9B); 8 h 时经二者作用的内皮细胞管腔几乎完全破坏, 而对照组管腔形成良好(图 9C)。

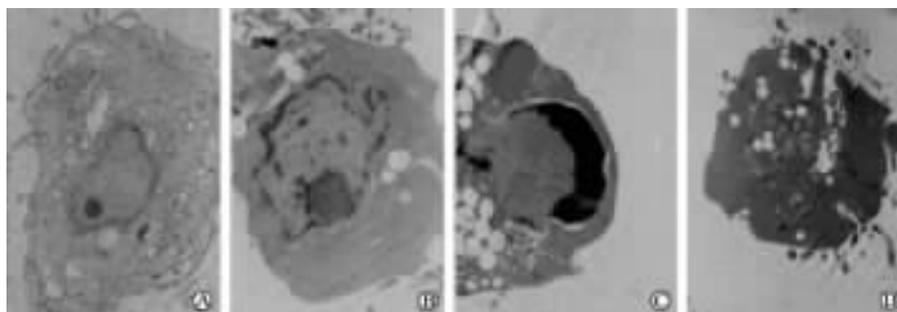


图 8 SW1990 细胞电镜观察结果

Fig 8 Scanning electron microscopic pictures of SW1990 cells

A: Normal SW1990 cell; B: Nuclear rippled; C: Chromatin margination; D: Apoptotic body. Original magnification: $\times 6000$

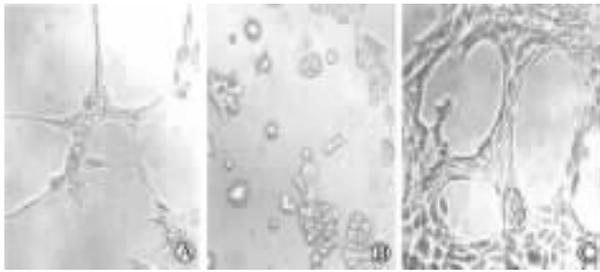


图9 内皮细胞管状形成抑制试验

Fig 9 Inhibition of ECV304 tube formation on ECM atricTM by recombinant protein

A: MBP-Tumstain₁₈₃₋₂₃₀ treated group (after 6 hours); B: MBP-Tu-T treated group (after 6 hours); C: Negative control. Original magnification: $\times 250$

3 讨论

目前, TRAIL 已进入临床试验阶段, 显示了良好的抗肿瘤活性, 但是有些肿瘤细胞对 TRAIL 并不敏感甚至耐药^[8]。目前认为肿瘤细胞耐受 TRAIL 诱导凋亡是由于其凋亡通路中抑制因子表达活性增加而促进因子失活、死亡受体低表达和诱骗受体高表达^[9]。因此, 研制和开发活性更强、靶向性更明确的 TRAIL 类似物对于完全发挥 TRAIL 的抗肿瘤潜能和克服临床耐药具有重要的实际意义^[10]。因此, 本研究将 Tumstain 和 TRAIL 的活性片段进行融合, 希望得到具有双功能作用的融合蛋白, 能够特异性杀伤肿瘤细胞(诱导凋亡)并抑制新生血管的形成。

本研究表达载体选用了原核表达系统即大肠杆菌作为宿主的 pMAL-c₂, 它具有相对分子质量约为 42 000 的表达标志 MBP, 有较强的可调控的 Ptac 启动子和强翻译起始信号, 有利于重组蛋白正确折叠, 因此表达的融合蛋白产量多为可溶蛋白。鉴定结果表明, 本研究成功地重组表达了可溶性融合蛋白 MBP-Tu-T, 表达的重组蛋白约占菌体总蛋白的 20% 以上。在进一步的实验研究发现选取对数生长期的细胞, 尽量减小血清因素的干扰是非常必要的。抑制内皮细胞增殖试验中, 用含 10% 血清的培养液使 ECV304 细胞恢复活性贴壁, 再改换 0.5% FBS 的培养基, 这样既能够维持细胞的存活又减小了血清的干扰, 使对照处于较低水平, 可以客观显示 MBP-Tu-T 抑制内皮细胞增殖的能力。当然不同细胞对低浓度血清的耐受力不同, 如 SW1990 细胞在低浓度下状态并不好, 因此需要根据具体细胞而定。

重组蛋白的表达和纯化是否成功, 最有力的方法是检测该蛋白是否具有特异的生物学活性。内皮细胞是体内分裂增殖速度较快的正常细胞, 并非肿

瘤细胞。本实验正是利用 TRAIL 对正常细胞没有明显的毒副作用, 而 Tumstain₁₈₃₋₂₃₀ 具有明显的抑制内皮细胞增殖作用的特点, 来验证 MBP-Tu-T 是否能够保持 Tumstain₁₈₃₋₂₃₀ 样活性; 同时利用 TRAIL 能够诱导 SW1990 细胞凋亡, 对其有很强的杀伤作用, 来验证 MBP/Tu-T 是否具有 TRAIL 样活性。电镜检测凋亡和管腔形成抑制试验进一步证实了该融合蛋白在保持二者活性的同时, 有着起效快、效应强的特点, 能够靶向作用于肿瘤的血管内皮细胞, 既诱导肿瘤细胞凋亡又抑制肿瘤组织新生血管形成, 发挥了双向的抗肿瘤作用, 为研究靶向性杀伤肿瘤奠定了基础。但是融合蛋白在体内的生物学活性能否保持及其在体内能否稳定表达, 仍需经进一步的研究探讨。

[参考文献]

- [1] Hlatky L, Habnfeldt P, Folkman J. Clinical application of anti-angiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us[J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94: 883-893.
- [2] Khoshnoodi J, Cartaille J P, Alvares K, Arthur V, Hudson B G. Molecular recognition in the assembly of collagens: terminal noncollagenous domains are key recognition modules in the formation of triple helical protomers[J]. J Biol Chem, 2006, 281: 38117-38121.
- [3] Pedchenko V, Zent R, Hudson B G. Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrins bind both the proximal RGD site and non-RGD motifs within noncollagenous (NC1) domain of the alpha3 chain of type IV collagen: implication for the mechanism of endothelial cell adhesion[J]. J Biol Chem, 2004, 279: 2772-2780.
- [4] Pasco S, Han J, Gillery P, Bellon G, Maquart F X, Borel J P, et al. A specific sequence of the noncollagenous domain of the alpha3 (IV) chain of type IV collagen inhibits expression and activation of matrix metalloproteinases by tumor cells[J]. Cancer Res, 2000, 60: 467-473.
- [5] Floquet N, Pasco S, Ramont L, Derreumaux P, Laronge J Y, Nuzillard J M, et al. The antitumor properties of the alpha 3 (IV)-(185-203) peptide from the NC1 domain of type IV collagen (tumstain) are conformation-dependent[J]. J Biol Chem, 2004, 279: 2091-2100.
- [6] Folkman J. Tumor suppression by p53 is mediated in part by the antiangiogenic activity of endostatin and tumstain[J]. Sci STKE, 2006, 2006: pe35.
- [7] Wiley S R, Schooley K, Smolak P J, Din W S, Huang C P, Nicholl J K, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis[J]. Immunity, 1995, 3: 673-682.
- [8] Ricci M S, Kim S H, Ogi K, Plastaras J P, Ling J, Wang W, et al. Reduction of TRAIL-induced Mcl-1 and cIAP2 by c-Myc or sorafenib sensitizes resistant human cancer cells to TRAIL-induced death[J]. Cancer Cell, 2007, 12: 66-80.
- [9] Bucur O, Ray S, Bucur M C, Almasan A. APO2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in prostate cancer therapy[J]. Front Biosci, 2006, 11: 1549-1568.
- [10] Kruyt F A. TRAIL and cancer therapy[J]. Cancer Lett, 2008, 263: 14-25.