

# 携带 *TRAIL* 的溶瘤腺病毒联合 LiCl 对癌细胞的生长抑制效应

杨新燕 张媛 赵瑞波 叶静 吴丽琴 段雪梅 周秀梅\*  
(浙江理工大学生命科学院, 新元医药与生物技术研究所, 杭州 310018)

**摘要** 研究糖原合成激酶3的抑制剂LiCl联合携带*TRAIL*基因的溶瘤腺病毒Ad.sp-E1A-E1B( $\Delta$ 55 kDa)-*TRAIL*-Flag(Ad.sp-*TRAIL*-Flag)对癌细胞的体外杀伤作用。采用MTT法检测癌症特异性病毒Ad.sp-*TRAIL*-Flag联合药物LiCl对三种癌症细胞株的生长抑制作用;通过结晶紫实验进一步检测联合用药的杀伤效果;进而通过Western blot实验检测联合作用对癌细胞中*TRAIL*蛋白表达的影响,最后通过流式细胞仪检测其对癌细胞的凋亡作用。结果显示, LiCl联合Ad.sp-*TRAIL*-Flag的处理对癌细胞的增殖抑制作用明显优于两者单独使用。Western blot实验证明, LiCl可提高溶瘤腺病毒Ad.sp-*TRAIL*-Flag处理后*TRAIL*蛋白的表达水平,从而增强了溶瘤腺病毒Ad.sp-*TRAIL*-Flag通过*TRAIL*的信号通路的杀伤效果。

**关键词** 溶瘤腺病毒; *TRAIL*; LiCl; 癌症细胞

## The Growth Inhibiting Effect of Oncolytic Adenovirus-Mediated *TRAIL* Combined with LiCl on Cancer Cells

Yang Xinyan, Zhang Yuan, Zhao Ruibo, Ye Jing, Wu Liqin, Duan Xuemei, Zhou Xiumei\*

(Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract** We investigated the killing effect of glycogen synthesis kinase 3 inhibitor LiCl combined with Ad.sp-E1A-E1B( $\Delta$ 55 kDa)*TRAIL*-Flag (also known as Ad.sp-*TRAIL*-Flag) *in vitro* that oncolytic adenovirus carries on human tumor cells. MTT assay is used to detect inhibition on tumor cells proliferation by drug LiCl combined with tumor-specific virus Ad.sp-*TRAIL*-Flag, and combination effect on medication cytotoxicity are further detected by crystal violet experiment; Moreover, Western blot assays are performed to test the expression change of *TRAIL*. In addition, the apoptosis of these cancer cells was inspected by flow cytometry. The result shows that the growth inhibiting effect of LiCl combined with Ad.sp-*TRAIL*-Flag treatment on cancer cells is better than using them separately, so as to enhance the express of *TRAIL* through the signal path killing effects.

**Key words** oncolytic adenovirus; *TRAIL*; LiCl; cancer cells

恶性肿瘤即癌症严重危害人类的生命健康。目前,恶性肿瘤正超过心脑血管疾病成为人类致死的第一位原因。恶性肿瘤的治疗手段包括传统的治疗

方法如手术、放疗、化疗等,已出现严重的瓶颈,为此刘新垣院士提出了一种癌症治疗新策略——癌症的靶向基因病毒治疗(targeting gene-virotherapy)

收稿日期: 2013-07-19 接受日期: 2013-09-30

浙江理工大学科研启动基金(批准号: 111618-Y)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-86843186, E-mail: zhouxiumei824@163.com

Received: July 19, 2013 Accepted: September 30, 2013

This work was supported by the Scientific Research Foundation of Zhejiang Sci-Tech University (Grant No.111618-Y)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-86843186, E-mail: zhouxiumei824@163.com

网络出版时间: 2013-11-22 10:49 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131122.1049.001.html>

of cancer)<sup>[1]</sup>。本实验使用的溶瘤腺病毒Ad.sp-E1A-E1B( $\Delta$ 55 kDa)-TRAIL-Flag(Ad.sp-TRAIL-Flag)是利用survivin启动子代替腺病毒启动子E1A, 使外源基因TRAIL仅在肿瘤细胞中表达, 同时由于删去E1B上与p53基因产物结合的55 kDa蛋白的基因, 所以使其无法在正常细胞中复制, 仅在癌细胞中复制<sup>[2]</sup>。构建病毒时在TRAIL基因后面增加24 bp的Flag的标签蛋白基因, 即用Flag的标签蛋白标记构建的病毒中的TRAIL蛋白。溶瘤腺病毒Ad.sp-TRAIL-Flag不仅对正常细胞无杀伤作用, 还具有溶瘤病毒载体的靶向性和复制性, 同时又利用了外源抗癌基因的强烈杀伤性, 可以更好的作用于肿瘤细胞。

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)是TNF家族的成员之一, 它可以通过线粒体途径和细胞表面受体途径触发肿瘤细胞发生快速、高效的凋亡反应, 而对正常细胞无毒性, 成为近年来治疗肿瘤的明星基因<sup>[3]</sup>。

LiCl是糖原合成激酶3(GSK-3)的抑制剂, GSK-3是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 参与细胞内多种信号通路中<sup>[4]</sup>。有些研究表明, LiCl参与与细胞增殖、细胞分化和凋亡等多种生理过程相关的信号通路。最近的研究表明, GSK-3作为一个负调控因子在肝癌细胞中参与TNF- $\alpha$ 信号通路<sup>[5]</sup>。LiCl作为GSK-3的抑制剂, 可以增强肝癌细胞对TNF- $\alpha$ 的敏感性。更值得关注的是, 在结肠癌和前列腺癌中, GSK-3的抑制剂可以促进TRAIL诱导的细胞凋亡<sup>[6]</sup>。本实验在以上理论的基础上, 研究糖原合成激酶3的抑制剂LiCl联合Ad.sp-TRAIL-Flag溶瘤腺病毒对癌细胞的生长抑制作用, 本实验选取了人正常肝细胞株QSG-7701、肝癌细胞株7721、结肠癌细胞株SW620和卵巢癌细胞株SKOV-3。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

溶瘤腺病毒Ad.sp-TRAIL-Flag由本实验室构建, 氯化锂(LiCl)购自国药集团化学试剂有限公司, 四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自Sigma公司, 二甲基亚砜(DMSO)、蛋白酶抑制剂(Protease inhibitor)、细胞裂解液均购买于碧云天公司, Actin、Flag、TRAIL和荧光二抗等抗体分别购自碧云天、Abmart生物医药有限公司、Santa Cruz Biotechnology和Licor公司。人正常的肝细胞株QSG-7701、肝癌细胞株7721、

结肠癌细胞株SW620、卵巢癌细胞株SKOV-3均购自中科院上海细胞库。

### 1.2 细胞培养

人正常的肝细胞株QSG-7701、肝癌细胞株7721、结肠癌细胞株SW620、卵巢癌细胞株SKOV-3均用含10%胎牛血清DMEM完全培养基于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养, 2~3 d传代, 取对数生长期细胞进行实验。

### 1.3 MTT检测不同细胞系的体外增殖抑制率

收集对数期的QSG-7701、7721、SW620和SKOV-3, 接种于96孔板,  $1 \times 10^4$ /孔, 每孔加入100  $\mu$ L细胞培养液培养, 8~16 h后加药或(和)病毒处理。单独病毒处理组为1 MOI的Ad.sp-TRAIL-Flag溶瘤腺病毒、单独LiCl药物处理组为不同浓度以及其与病毒的联合作用组, 分别是1 mmol/L LiCl、5 mmol/L LiCl、10 mmol/L LiCl、20 mmol/L LiCl、1 MOI Ad.sp-TRAIL-Flag、1 mmol/L LiCl+1 MOI Ad.sp-TRAIL-Flag、5 mmol/L LiCl+1 MOI Ad.sp-TRAIL-Flag、10 mmol/L LiCl+1 MOI Ad.sp-TRAIL-Flag、20 mmol/L LiCl+1 MOI Ad.sp-TRAIL-Flag, 每个处理组均设3~6个复孔, 实验中设单独细胞组为对照组与单独培养液的调零组。37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养24~96 h后, 每孔加入20  $\mu$ L的MTT(5 mg/mL)溶液, 37 °C培养4 h, 小心弃去上清, 加入150  $\mu$ L DMSO/孔, 置摇床上低速振荡10 min, 酶联免疫检测仪490 nm处的吸光值(D值)。将测得的D值代入以下公式, 计算细胞的存活率: 细胞存活率=(处理组D值-调零组D值)/(对照组D值-调零组D值) $\times 100\%$ , 绘制细胞生存曲线。

### 1.4 结晶紫染色进行细胞毒性的检测

取正常细胞和3种癌细胞按 $1 \times 10^5$ /孔的密度分别接种于24孔板中, 每孔加入500  $\mu$ L培养基, 待细胞贴壁后, 加入5 MOI的溶瘤腺病毒Ad.sp-TRAIL-Flag, 不同浓度的LiCl即1, 5, 10, 20 mmol/L, 不同浓度的LiCl联合5 MOI Ad.sp-TRAIL-Flag处理细胞, 继续培养72 h后弃培养液, PBS洗两次, 每孔加入250  $\mu$ L结晶紫染色液(2%结晶紫溶于20%甲醇)室温染色15 min, 流水洗净多余染色液, 37 °C烘干, 拍照记录。

### 1.5 Hoechst33342染色荧光显微镜下观察细胞形态

取对数生长期的正常细胞和3种癌细胞, 按 $1 \times 10^5$ /孔接种于24孔板。贴壁培养8~16 h后, 分别加入5 MOI的溶瘤腺病毒Ad.sp-TRAIL-Flag, 不同浓度的LiCl即1, 5, 10, 20 mmol/L, 及其联合5 MOI Ad.sp-

TRAIL-Flag处理细胞, 对照组中加入等体积PBS, 培养48 h后, 每孔加入5  $\mu$ L Hoechst33342 (1 mg/mL), 37  $^{\circ}$ C避光孵育30 min, 荧光显微镜下观察细胞的形态变化。

### 1.6 Western blot实验检测细胞内TRAIL的表达

将对数生长期的癌细胞以 $1 \times 10^6$ /孔的密度分别接种于6孔板中, 每孔2 mL培养液, 分别加入1 mmol/L LiCl、5 mmol/L LiCl、10 mmol/L LiCl、10 MOI Ad.sp-TRAIL-Flag、1 mmol/L LiCl+10 MOI Ad.sp-TRAIL-Flag、5 mmol/L LiCl+10 MOI Ad.sp-TRAIL-Flag、10 mmol/L LiCl+10 MOI Ad.sp-TRAIL-Flag, 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。48 h后, 用蛋白裂解液处理细胞, 收集蛋白样品。将蛋白样品用BCA蛋白定量试剂盒定量后, 每孔加入10  $\mu$ L的蛋白样品进行SDS-PAGE电泳, 电泳结束后, 将蛋白转到PVDF膜上。5%的脱脂奶粉封闭1 h, 加一抗Actin(1:5 000稀释)、GAPDH(1:1 000稀释)、Flag(1:1 000稀释)、TRAIL(1:1 000稀释), 4  $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST洗膜10 min $\times$ 3次后, 加荧光二抗(1:10 000)稀释, 室温1 h, TBST洗膜10 min $\times$ 3次, 红外扫描仪检测目的蛋白的表达。

### 1.7 流式细胞术检测细胞凋亡率

分别接种 $1 \times 10^6$ /孔的细胞于6孔板中, 每孔2 mL培养液, 贴壁培养8~16 h后, 分别加入5 MOI Ad.sp-TRAIL-Flag、5 mmol/L LiCl+5 MOI Ad.sp-TRAIL-Flag、10 mmol/L LiCl+5 MOI Ad.sp-TRAIL-Flag、20 mmol/L LiCl+5 MOI Ad.sp-TRAIL-Flag, 对照组中加入等量的PBS, 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养。48 h后, 吸去培养基, 参照Annexin V/PI细胞凋亡检测试剂盒操作说明: 收集细胞, 用预冷的PBS洗涤细胞两遍, 用100  $\mu$ L的1 $\times$ Binding buffer重悬细胞, 加入5  $\mu$ L的Annexin-V和5  $\mu$ L的PI, 冰上避光15 min后, 加入300  $\mu$ L 1 $\times$ Binding buffer, 采用流式细胞仪分析。

### 1.8 统计学处理

统计学软件采用SPSS 10.1, 常规进行方差齐性检验。计量材料实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示。

## 2 结果

### 2.1 MTT法检测联合用药对肿瘤细胞的生长抑制作用

采用MTT细胞毒性实验检测病毒Ad.sp-TRAIL-Flag联合LiCl对正常肝细胞和癌症细胞生长的抑制效果。以人正常的肝细胞QSG-7701作为对

照组, 7701、SW620、SKOV-3肿瘤细胞作为实验组。实验结果如图1所示, 联合用药对正常细胞的安全性较好; 对于癌细胞, 联合用药组对于细胞的生长抑制效果明显优于单独的病毒处理组和药物处理组( $P < 0.05$ )。1 MOI的Ad.sp-TRAIL-Flag单独处理对肿瘤细胞的杀伤效果远不及与LiCl药物联合作用的效果, 且呈现浓度和时间依赖性。相比较几株癌症细胞系, 病毒Ad.sp-TRAIL-Flag联合LiCl在SW620中的杀伤效果最为显著。

### 2.2 结晶紫实验分析LiCl联合Ad.sp-TRAIL-Flag对细胞凋亡的影响

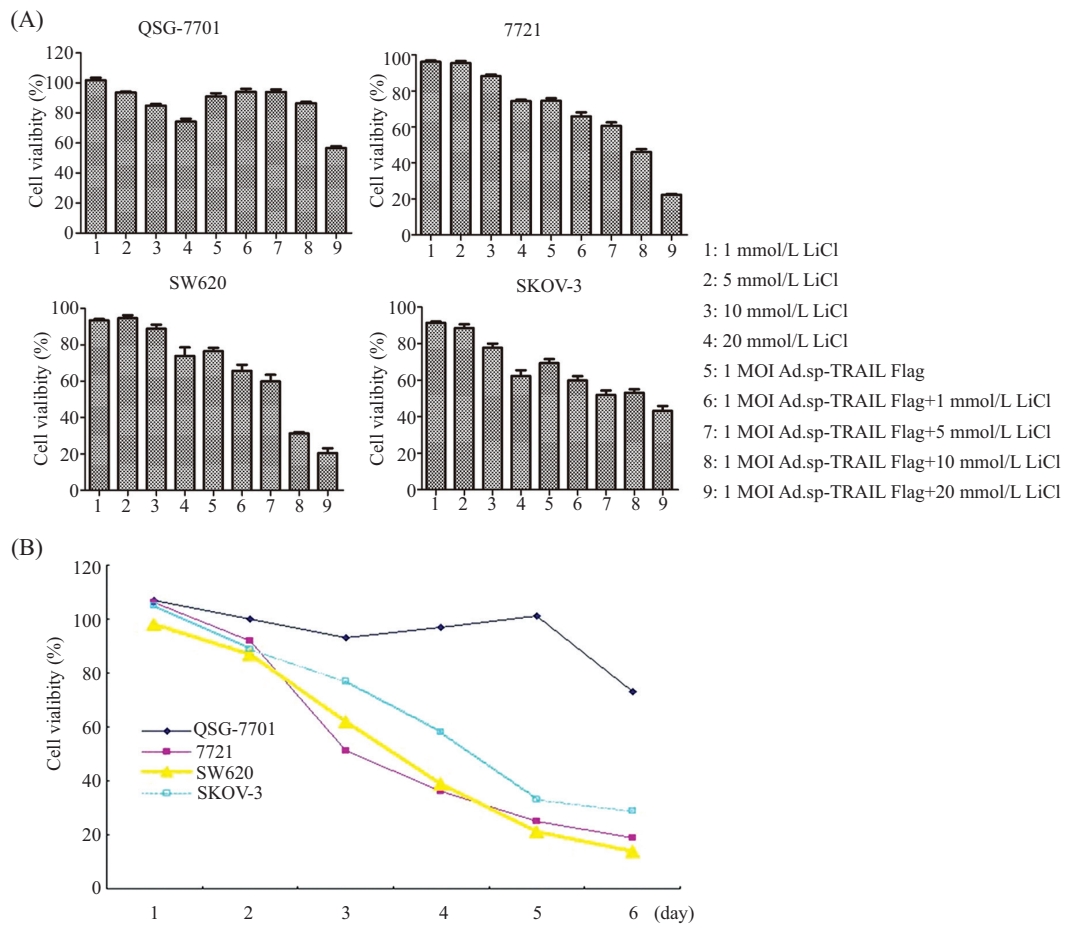
为了进一步检测病毒Ad.sp-TRAIL-Flag联合LiCl对癌细胞的杀伤作用, 本实验继续采用结晶紫实验进行拍照分析。单独的病毒处理组和单独的LiCl处理组对各株肿瘤细胞的杀伤作用不是很显著, 但是在联合实验处理组, 随着LiCl浓度的增加, 杀伤效果越来越显著。5 MOI的Ad.sp-TRAIL-Flag溶瘤腺病毒与20 mmol/L LiCl联合处理, 几乎可以完全杀死癌细胞。将联合处理的3种肿瘤细胞株比较, 发现溶瘤腺病毒Ad.sp-TRAIL-Flag联合LiCl处理对于结肠癌细胞SW620的杀伤效果最显著, 同时在低剂量的LiCl处理情况下, 随着LiCl浓度的增加, 联合杀伤效果越加显著(图2)。

### 2.3 Hoechst33342染色检测细胞凋亡

同时向正常细胞QSG-7701和肝癌细胞7721中加入10 MOI的病毒Ad.sp-E1A-E1B( $\Delta$ 55 kDa)-TRAIL-Flag, 以QSG-7701为对照, 48 h后用Hoechst33342染色, 在紫外光下观察细胞凋亡情况。结果如图3B显示, Ad.sp-E1A-E1B( $\Delta$ 55kDa)-TRAIL-Flag联合LiCl处理48 h后癌细胞中出现了凋亡小体, 并随LiCl浓度的升高而增多。重组病毒Ad.sp-E1A-E1B( $\Delta$ 55kDa)-TRAIL-Flag对7721的作用非常明显。而正常细胞QSG-7701中48 h后基本上没有出现凋亡小体, 说明此浓度的LiCl联合病毒对正常细胞的安全性较好。

### 2.4 Western blot实验检测肿瘤细胞内TRAIL的表达水平

为了研究癌细胞经过溶瘤腺病毒Ad.sp-TRAIL-Flag和不同浓度LiCl处理后, 细胞内TRAIL蛋白的表达量变化, 用Western blot检测细胞内TRAIL的表达水平。结果如图4所示, 正常细胞株和7721单独LiCl处理时, TRAIL不表达, 正常细胞株中TRAIL表达量不会随着LiCl浓度的升高而变化, 而癌细胞株中



A: MTT检测四种细胞溶瘤腺病毒Ad.sp-TRAIL-Flag和LiCl处理96 h的细胞存活率; B: 5 mmol/L LiCl+1 MOI Ad.sp-TRAIL-Flag不同时间的细胞存活率。

A: cell viability of four kinds of cancer cells handled with oncolytic adenovirus Ad.sp-TRAIL-Flag combined with LiCl after 96 h; B: cell viability of different times of 5 mmol/L LiCl+1 MOI Ad.sp-TRAIL-Flag.

图1 MTT检测经LiCl和溶瘤腺病毒Ad.sp-TRAIL-Flag处理细胞存活率

Fig.1 Cell viability of oncolytic adenovirus Ad.sp-TRAIL-Flag, combined with LiCl was detected by MTT viability assay

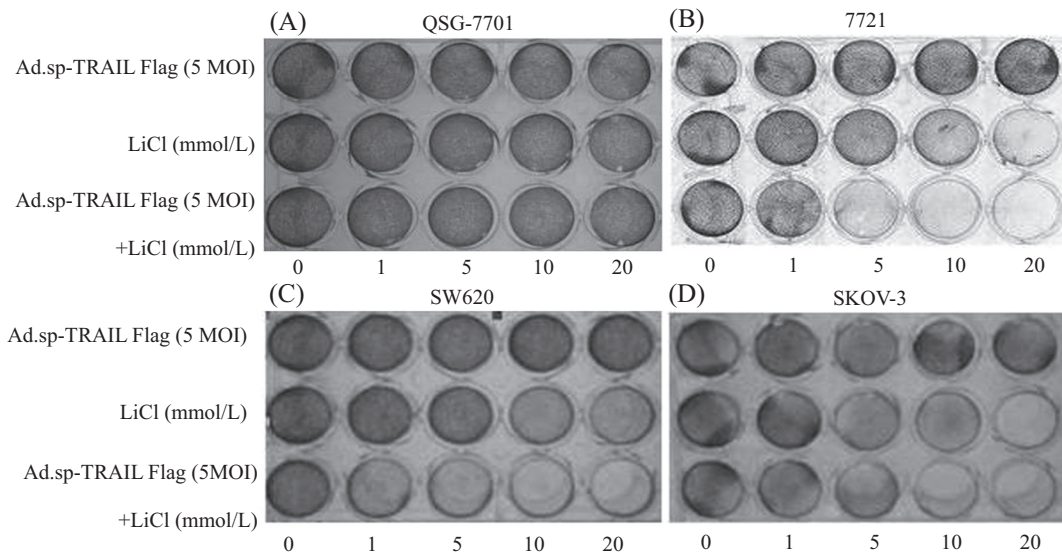
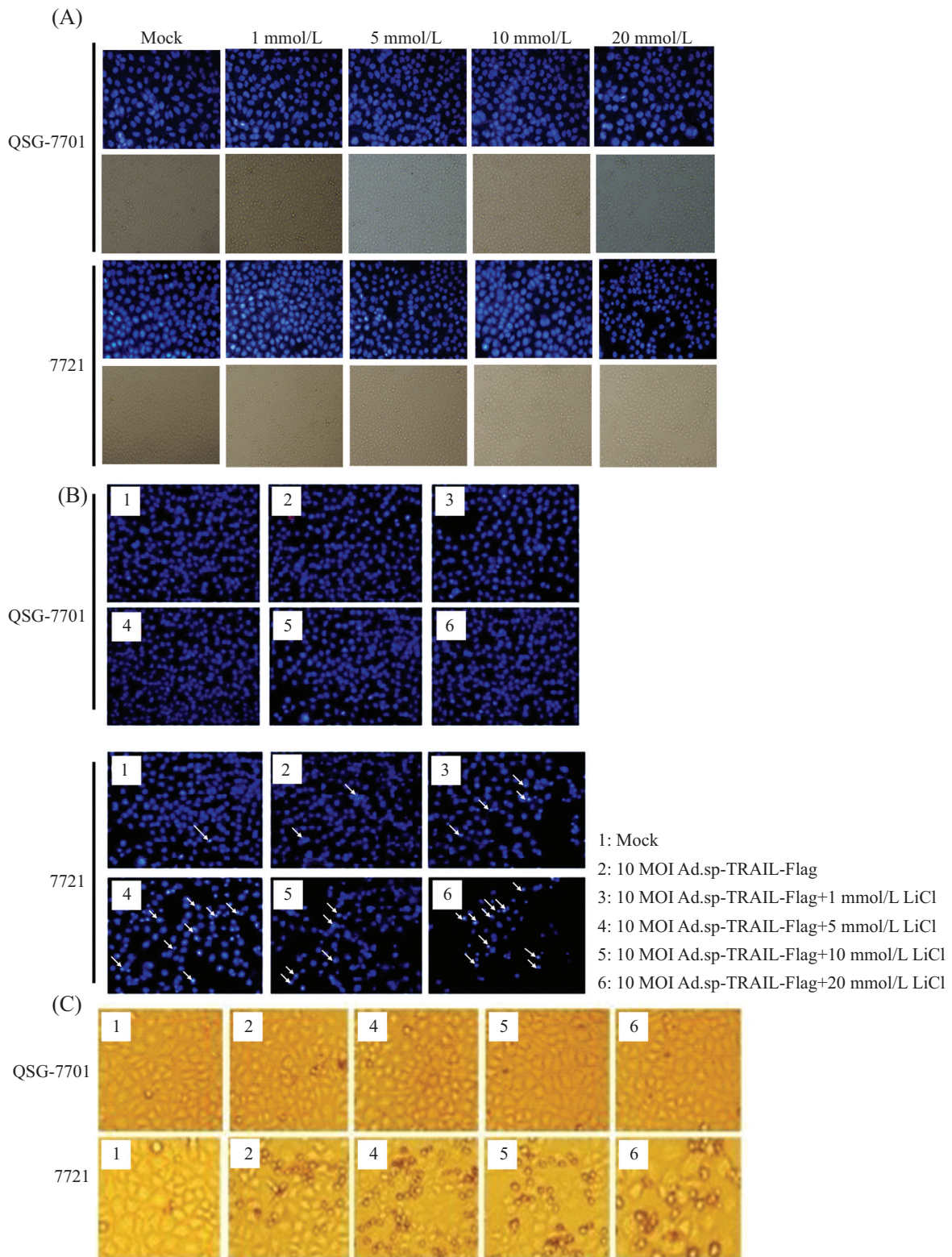


图2 LiCl联合Ad.sp-TRAIL-Flag对细胞毒性的影响

Fig.2 Cytopathic effect of LiCl combined with Ad.sp-TRAIL-Flag on cells



A、B: 分别是48 h后Hoechst33342染色观察QSG-7701和7721中凋亡小体的形成; A、C: 48 h后QSG-7701和7721的形态学观察。

A,B: cells were QSG-7701 and 7721 stained with Hoechst33342 after 48 h; A,C: cells morphology of QSG-7701 and 7721 observed under inverted microscope after 48 h.

图3 重组病毒联合LiCl处理细胞48 h后Hoechst33342染色检测的细胞凋亡情况和倒置显微镜观察细胞的形态学变化  
 Fig.3 Cells apoptosis detected by Hoechst33342 staining and cells morphology observed under inverted microscope after recombinant virus with LiCl treatment after 48 h

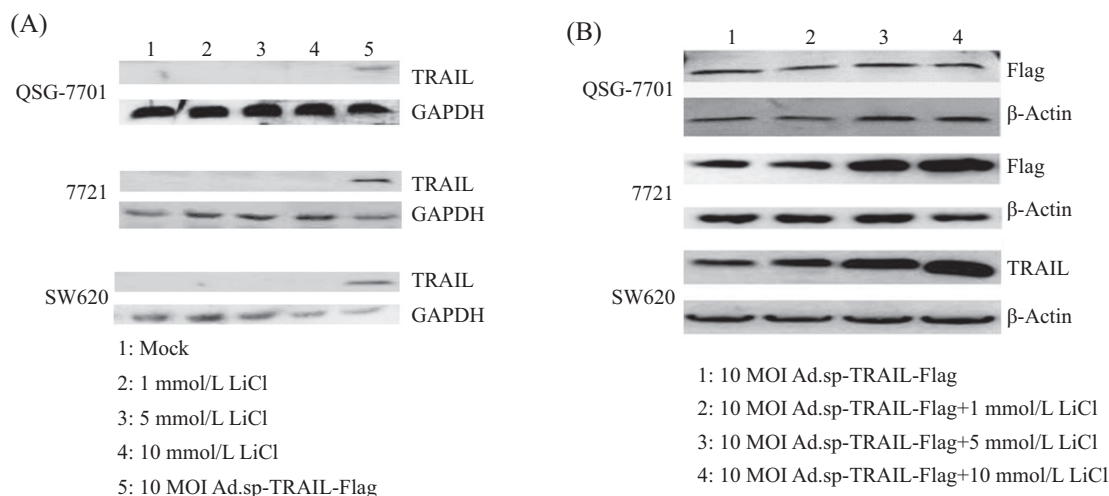


图4 Western blot实验检测细胞内TRAIL/Flag的表达水平

Fig.4 TRAIL or Flag protein levels were determined by Western blot analysis

病毒Ad.sp-TRAIL-Flag与LiCl联合作用时TRAIL蛋白的表达量明显升高,且随LiCl浓度的增加而增加。进一步说明Ad.sp-TRAIL-Flag联合LiCl具有更好的杀伤癌细胞的功能。

### 2.5 流式细胞术检测细胞凋亡率

溶瘤腺病毒Ad.sp-TRAIL-Flag和不同浓度LiCl处理7721细胞48 h,收集细胞,经Annexin V/PI双染后,流式细胞仪检测细胞凋亡。在Annexin V高染而PI低染区域的细胞为早期凋亡细胞,结果显示,联合处理组比单独处理组,细胞凋亡率增加,且随着LiCl浓度的增加,7721细胞的凋亡率明显升高,如图5所示,空白对照、Ad.sp-TRAIL-Flag(10 MOI)单独处理及联合1, 5, 10, 20 mmol/L LiCl的凋亡率分别是0.73%、5.91%、9.31%、10.93%、16.60%、38.45%。

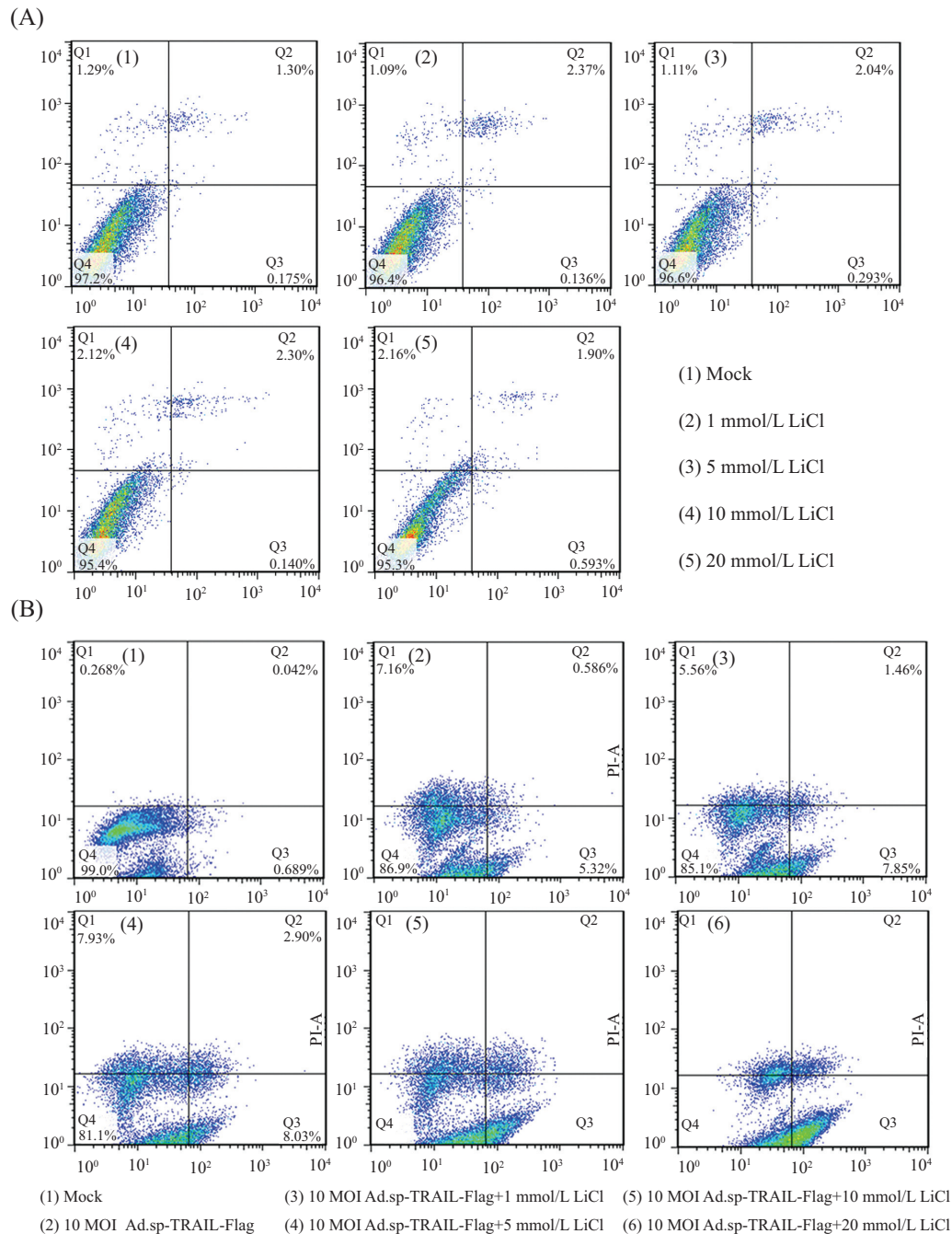
## 3 讨论

随着细胞分子生物学的发展,人们对传统的肿瘤治疗手段如手术、放疗、化疗有了不断的认识,越加发现传统的治疗手段对很多中晚期的恶性肿瘤收效甚微。ONYX-015病毒的构建基本原理是剔除腺病毒的E1B 55 kDa基因,使病毒只能在P53途径失活的肿瘤细胞中复制<sup>[6]</sup>。ONYX-015联合常规的化学疗法在临床上治疗头颈癌取得了63%的疗效,但单独使用ONYX-015(不与化疗结合),则疗效很差,只有15%~20%<sup>[7-8]</sup>。为了克服单独使用ONYX-015疗效不理想的缺点,刘新垣院士2000年提出一种癌症

治疗新策略——癌症的基因病毒治疗策略。在癌症特异性增殖病毒(溶瘤腺病毒)中加入抗癌基因,将癌症的基因治疗与病毒治疗结合起来,期待用癌症的基因治疗取代化疗,扩大ONYX-015的抑癌效果,成为癌症治疗的研究热点。本实验正是利用携带TRAIL的溶瘤腺病毒Ad.sp-TRAIL-Flag与药物LiCl联合作用于癌症细胞株进行体外杀伤研究。结果显示,两者的联合处理对杀伤癌症细胞有很好的协同作用。

近来的研究普遍证实了TRAIL对肿瘤细胞的靶向杀伤作用<sup>[9]</sup>。人们对其作用机制和治疗效果方面的研究也愈加成熟。但是对TRAIL耐受和不敏感的癌症细胞类型依然存在,极大地限制了TRAIL在治疗癌症方面的发展。研究表明,约60%的癌症细胞对TRAIL不敏感。所以,增强TRAIL诱导细胞的敏感性成为治疗癌症的关键。之前有文献报道顺铂能够明显地促进TRAIL诱导癌症细胞的凋亡,但是由于化疗药物毒性的非特异性和耐药性,所以无法在临床上应用<sup>[10]</sup>。

据文献报道,LiCl作为糖原合成激酶3(GSK-3)的抑制剂,可以增强肝癌细胞对TNF- $\alpha$ 的敏感性。由于低剂量的GSK-3抑制剂LiCl对正常的肝细胞几乎没有损伤<sup>[11]</sup>,所以本实验研究溶瘤腺病毒Ad.sp-TRAIL-Flag联合糖原合成激酶3的抑制剂LiCl对癌症细胞的杀伤是否有协同作用。结果显示,Ad.sp-TRAIL-Flag联合LiCl处理对癌症细胞的增殖抑制作用明显优于两者单独使用。Western blot实验证明,



A: 不同浓度LiCl处理7721细胞48 h后细胞凋亡情况; B: 10 MOI Ad.sp-TRAIL-Flag联合不同浓度LiCl 处理7721细胞48 h后细胞凋亡情况。

A: apoptosis of 7721 cells detected by Annexin V-binding assay after 48 h exposed to different concentration of LiCl; B: apoptosis of 7721 cells detected by Annexin V-binding assay after 48 h exposed to 10 MOI Ad.sp-TRAIL-Flag combined with LiCl.

图5 流式细胞术检测细胞凋亡

Fig.5 Apoptosis was determined by Annexin V-binding assay

在癌细胞中LiCl 可提高Ad.sp-TRAIL-Flag中TRAIL 表达, 且随着LiCl浓度的提高, TRAIL的表达量也随之增加, 进一步说明它们具有协同效应。

TRAIL通过两条不同的信号通路诱导凋亡: 一条是不依赖线粒体的, 通过细胞表面死亡受体直接激活Caspase-3的路线; 另一条是依赖线粒体的, 形成

线粒体蛋白(apoptosome), 从而激活Caspase-9。这两条路线最后都激活Caspase-3, 导致细胞凋亡<sup>[12]</sup>。本实验的Western blot实验证明, LiCl可提高溶瘤腺病毒Ad.sp-TRAIL的表达。但是GSK-3抑制剂与TRAIL协同促进肿瘤细胞凋亡的相互作用机制尚不完全清楚, 是否激活了Caspase-3和Caspase-9, 有待进一步探讨。

### 参考文献 (References)

- 1 Liu XY. An antitumor strategy-targeting gene-virotherapy for cancer. *Chin J Cancer Biother* 2001; 8(1): 1.
- 2 Wei RC, Cao X, Gui JH, Zhou XM, Zhong D, Yan QL, *et al.* Augmenting the antitumor effect of TRAIL by SOCS3 with Double-regulated replicating oncolytic adenovirus in hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther* 2001; 22(9): 1109-19.
- 3 Wang S. The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway. *Oncogene* 2008; 27(48): 6207-15.
- 4 Li X, Bijur GN, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 bate, moD stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar Disord* 2002; 4(2): 137-44.
- 5 Cross DA, Culbert AA, Chalmers KA, Facci L, Skaper SD, Reith AD. Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *J Neurochem* 2001; 77(1): 94-102.
- 6 Chiu CT, Chuang DM. Molecular actions and therapeutic potential of lithium in preclinical and clinical studies of CNS disorders. *Pharmacol Ther* 2010; 128(2): 281-304.
- 7 Schmitz V, Qian C, Ruiz J, Sangro B, Melero I, Mazzolini G, *et al.* Gene therapy for liver diseases: Recent strategies for treatment of viral hepatitis and liver malignancies. *Gut* 2002; 50(1): 130-5.
- 8 Zhang KJ, Qian J, Wang SB. Targeting Gene-Viro-Therapy with AFP driving Apoptin gene shows potent antitumor effect in hepatocarcinoma. *J Biomed Sci* 2012; 2(9): 19-20
- 9 Zhao L, Dong A, Gu J, Liu Z, Zhang W, Wang Y, *et al.* The antitumor activity of TRAIL and II-24 with replicating oncolytic adenovirus in colorectal cancer. *Cancer Gene Ther* 2006; 13(11): 1011-22.
- 10 Stump RJ, Lovicu FJ, Ang SL, Pandey SK, McAvoy JW. Lithium Stabilizes the polarized lens epithelial phenotype and inhibits proliferation, migration, and epithelial mesenchymal transition. *J Pathol* 2006; 210(2): 249-57.
- 11 Tondo L, Baldessarini RJ. Long-term Lithium treatment in the prevention of suicidal behavior in bipolar disorder patients. *Epidemiol Psychiatr Soc* 2009; 18(3): 179-83.
- 12 Secchiero P, Zerbinati C, Di Iasio MG, Melloni E, Tiribelli M, Grill V, *et al.* Synergistic cytotoxic activity of recombinant TRAIL plus the non-genotoxic activator of the p53 pathway nutlin-3 in acute myeloid leukemia cells. *Curr Drug Metab* 2007; 8(4): 395-403.