# 靶向Wnt/β-catenin通路的溶瘤腺病毒携带抑癌 基因*TSLC1*抑制肿瘤细胞增殖的研究

金 槿 赵雨佳 章 健 王彬蓉 王毅刚\* (浙江理工大学生命科学学院,杭州 310018)

摘要 溶瘤病毒(oncolytic viruses)可选择性地感染肿瘤细胞并在其中复制,使宿主细胞裂解 并在体内产生强烈的免疫应答反应,从而抑制或者杀死肿瘤细胞。因其特有的溶瘤性和靶向性, 溶瘤病毒成为肿瘤基因治疗的热门领域之一。基于Wnt信号的肿瘤特异性,本研究使用Wnt信号启 动子TCF/LEF结合位点序列,调控腺病毒早期基因E1A,并删除E1A基因序列上能与Rb蛋白结合的 24 bp片段。将抑癌基因TSLC1插入腺病毒的E3区,形成重组腺病毒Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1。通 过双荧光素酶报告系统、Western blot实验、MTT法、结晶紫染色法、Hoechst染色实验分别检测 Wnt信号活性、肿瘤细胞的存活率和凋亡的变化情况。结果发现,肿瘤细胞较正常肝细胞具有较 高的Wnt通路活性和病毒敏感性,其中重组病毒处理HepG2后杀伤效果显著,并可通过Caspase通 路诱导细胞凋亡,为肝癌的临床治疗提供参考。

关键词 基因治疗; Wnt/β-catenin通路; 溶瘤腺病毒; 细胞凋亡

## The Study on Inhibition of Tumor Cell Proliferation by Oncolytic Adenoviruses Targeting Wnt/β-catenin Pathway and Delivering Tumor Suppressor *TSLC1*

Jin Jin, Zhao Yujia, Zhang Jian, Wang Binrong, Wang Yigang\* (College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract** Oncolytic viruses are able to selectively infect and replicate in tumor cells, which further lyses tumor cells and produces immunological response to inhibit or kill tumor cells. Oncolytic viruses become one of the most promising fields for tumor gene therapy due to their special oncolysis and tumor targeting ability. Based on the tumor specificity of Wnt signal pathway, our study used the novel constructed oncolytic adenovirus Ad.wnt-E1A( $\Delta 24$ )-TSLC1 with a mutant E1A expression cassette driven by TCF/LEF binding site promoter and delivering a tumor suppressor gene *TSLC1*. The Wnt signalling activity, survival rate and apoptosis of tumor cells are detected by Dual-Luciferase reporter, Western blot, MTT, crystal violet and Hoechst staining assay, respectively. The results show that tumor cells have higher Wnt signal activity and stronger sensitivity to oncolytic viruses comparing with normal cells. Ad.wnt-E1A( $\Delta 24$ )-TSLC1 can effectively kill HepG2 cells and induce apoptosis through Caspase pathway activation, which provides the reference for the clinical treatment of hepatocellular carcinoma.

**Keywords** gene therapy; Wnt/β-catenin pathway; oncolytic adenoviruses; cell apoptosis

收稿日期: 2017-07-21 接受日期: 2017-09-01

国家自然科学基金(批准号: 81272687)、浙江省自然科学基金(批准号: LY16H160056)和浙江理工大学521骨干人才项目资助的课题

<sup>\*</sup>通讯作者。Tel: 0571-86843187, E-mail: wangyigang43@163.com

Received: July 21, 2017 Accepted: September 1, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81272687), the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (Grant No.LY16H160056) and the Grant for 521 Talent Project of Zhejiang Sci-Tech University

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-571-86843187, E-mail: wangyigang43@163.com

网络出版时间: 2017-10-30 11:58:20 URL: http://kns.enki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171030.1158.010.html

肿瘤的基因治疗(gene therapy)是指通过基因工 程手段将外源基因导入靶细胞来纠正缺陷或突变 基因,以达到抑制或杀死肿瘤细胞的目的<sup>[1]</sup>。溶瘤 病毒(oncolytic viruses)因其可选择性地在恶性肿瘤 中复制从而使宿主细胞裂解并在体内产生强烈的 免疫应答反应的特点,而成为基因治疗中的研究热 点<sup>[2-3]</sup>。以5型腺病毒为基础的溶瘤腺病毒(oncolytic adenoviruses)是肿瘤基因治疗临床研究中最常用的 载体之一<sup>[4]</sup>。

TSLC1(tumor suppressor in lung cancer 1)是免疫球蛋白超家族成员中的一个黏附分子<sup>[5]</sup>,定位于染色体*11q23.2*上,由Fukuhara在非小细胞肺癌中发现并确认为抑癌基因<sup>[6]</sup>。后续研究发现,在肺癌、肝癌、胰腺癌、前列腺癌中TSLC1均有不同程度的失活<sup>[7]</sup>,引起肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移。

本研究使用Wnt信号启动子TCF/LEF结合位点 序列<sup>[8]</sup>(简称为Wnt启动子),调控腺病毒早期复制基因 *E1A*,并删除*E1A*基因序列上能与Rb蛋白结合的24 bp 片段。将抑癌基因*TSLC1*插入腺病毒的E3区,形成重 组腺病毒Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1。研究重组腺病毒 Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1在体外对肝癌细胞HepG2增 殖的影响及作用机制,为优化腺病毒基因改造以及提 高腺病毒靶向性和安全性提供实验参考。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

重组腺病毒Ad.wnt-E1A(Δ24)-EGFP和Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1由本实验室构建并保存<sup>[9]</sup>; HEK 293a、L-02、HepG2、HCT-116、SW480细胞购自 中国科学院上海细胞库。

## 1.2 主要试剂

DMEM Basic培养基购自Gibco公司; 胎牛血清 购自Biowest公司; 胰蛋白酶细胞消化液、青霉素--链霉素溶液(100×)、蛋白酶抑制剂PMSF、IP裂解 液、5×蛋白质上样缓冲液、Hoechst 33342均购自 碧云天生物技术有限公司; 荧光素酶检测试剂盒购 自GeneCopoeia公司; 结晶紫购自Sigma公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自Thermo公司; β-actin抗体购 自华安生物技术有限公司; TSLC1抗体购自Abcam 公司; E1A抗体购自Santa Cruz Biotechnology公司; β-catenin、Non-p-β-catenin、Caspase-9、PARP、 XIAP购自Cell Signaling公司; 兔二抗、鼠二抗购自 Cell Signaling公司。

## 1.3 方法

1.3.1 细胞培养和腺病毒滴度测定 细胞培养于 10% FBS的DMEM培养基(含100 U/mL青霉素和 0.1 mg/mL链霉素)中,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱培 养。细胞汇合度至70%~80%时传代,保持3~4 d传一 代的速度培养。重组病毒的滴度采用TCID50方法测 定,将处于对数生长期的HEK293a细胞以5×10<sup>4</sup>/mL的 密度接种于96孔板中,每孔100 μL,待细胞贴壁,将 病毒液做连续10倍梯度稀释。稀释后的病毒液按 100 μL每孔接种到96孔板中,每一稀释度一纵排,控 制血清浓度在3%~5%,以正常细胞为对照,连续观 察10 d。按Reed-Muench两氏法计算结果并转换为 空斑形成单位PFU/mL<sup>[10]</sup>。

1.3.2 Western blot检测蛋白质水平 全细胞蛋白 用含1% PMSF蛋白酶抑制剂的IP裂解液冰上裂解 30 min后取上清, BCA分析试剂盒测定蛋白浓度。 蛋白样品加入上样缓冲液混匀并煮沸10 min, 于SDS 聚丙烯酰胺凝胶中电泳。上样时每孔加入25 μg做 不同处理的蛋白样品, 用PVDF膜转膜, 5%脱脂奶 粉封闭非特异性抗体, 一抗二抗孵育后用ECL显影。 以β-actin蛋白作为内参对照。

1.3.3 TOP/FOP Flash双荧光素酶报告基因检测 细胞中Wnt信号水平 取对数生长期的细胞,以 1×10<sup>5</sup>/mL的密度接种于24孔板中,每孔500 μL,培 养24 h使细胞贴壁;将TOP/FOP Flash与pRL-TK质 粒按50:1的浓度共转染入待测细胞中,培养48 h后 用Lysis Buffer裂解,室温孵育15 min收样;按试剂 盒配制FLuc和RLuc工作液,于超灵敏管式发光仪 检测荧光值。以TOP Flash/FOP Flash的比值作为 最后结果。

1.3.4 MTT法检测重组腺病毒对细胞的杀伤效果 取对数生长期的细胞,以3.0×10<sup>4</sup>/mL的密度接种于 96孔板中,每孔100 μL,待细胞贴壁后分别加入重组 腺病毒Ad.wnt-E1A(Δ24)-EGFP和Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1。用无血清的DMEM稀释病毒,使之终浓度分 别为1、5、10、20、40、80 MOI,对照组加入等体 积的DMEM培养基。病毒处理48、96 h后每孔加入 20 μL 5 mg/mL的MTT,继续培养4 h,吸去上清,每孔 加入150 μL DMSO,震荡溶解后于490 nm波长处测 吸光度值。

1.3.5 结晶紫检测重组病毒对细胞的杀伤效果

取对数生长期的细胞,以6×10<sup>4</sup>/mL的密度接种于24 孔板中,每孔500 μL,培养24 h。待细胞贴壁生长 后分别加入重组腺病毒Ad.wnt-E1A(Δ24)-EGFP和 Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1。用无血清的DMEM稀释 病毒,使之终浓度分别为1、5、10、20、40 MOI,对 照组加入等体积的DMEM培养基。病毒处理72 h后, 吸去上清,每孔加入200 μL的结晶紫溶液,室温静置 15 min后,洗去染液并拍照记录。

1.3.6 Hoechst 33342染色检测重组病毒诱导细胞凋 亡 取对数生长期的HepG2细胞,以1×10<sup>5</sup>/mL的密 度接种于24孔板中,每孔500 μL,待细胞贴壁后分别 加入重组腺病毒Ad.wnt-E1A(Δ24)-EGFP和Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1。用无血清的DMEM稀释病毒,使 之终浓度为0.5、1、5 MOI,对照组加入等体积的 DMEM培养基。病毒处理48 h后,吸去上清,每孔加 入200 μL的Hoechst染色液, 37 ℃避光静置30 min后 于荧光显微镜下拍照记录。

## 1.4 统计学分析

采用GraphPad Prism 6.0软件进行统计学分析。 样本数据采用独立样本非配对/配对双尾t检验。 P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 细胞中β-actenin蛋白质水平

通过Western blot检测肝正常细胞(WRL-68)和 癌细胞中β-catenin蛋白质水平(图1),初步筛选胞质 中Wnt信号转录因子β-catenin水平较高的细胞株。 由图1可得,与正常细胞WRL-68相比,除Hela细胞 外,其他受测癌细胞中的β-catenin蛋白均为上调表 达。其中结直肠癌细胞SW480、HCT-116和肝癌细 胞HepG2中β-catenin水平的上调尤其显著。

## **2.2** Wnt信号关键因子β-catenin在细胞中介导的 转录活性

采用TOP/FOP Flash荧光素酶报告质粒, 瞬时转 染筛选出的3株细胞株HepG2、HCT-116、SW480, 以 肝正常细胞L-02为对照, 根据TOP/FOP质粒Luciferase 活性比值来具体比较三种细胞内β-catenin介导的转录 活性。结果表明, 三株癌细胞都具有较高的β-catenin/ TCF活性, 其TOP/FOP Flash比值与对照细胞L-02有 显著性差异(图2)。HepG2和SW480的β-catenin/TCF



图2 β-catenin/TCF luciferase活性 Fig.2 β-catenin/TCF luciferase activity

\*\*P<0.01.

活性远高于对照细胞L-02,超过50倍以上。因此,后 续细胞实验采用此三株肿瘤细胞来比较重组病毒对 其杀伤效果。

#### 2.3 重组腺病毒对肿瘤细胞增殖的影响

将对照病毒Ad.wnt-E1A(Δ24)-EGFP和目的病 毒Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1分别以1、5、10、20、 40、80 MOI的浓度感染肝正常细胞L-02和癌细胞 HepG2、HCT-116、SW480,通过MTT法分别于48、 96 h后检测各组细胞的存活率(图3)。从正常细胞 组各个时间点细胞存活率的变化来看,携带TSLC1 抑癌基因病毒对正常细胞的生长抑制最小,安全 性更高,在高浓度病毒和长时间作用下,细胞存活 率仍接近100%。与对照细胞相比,癌细胞的生存 率随着病毒滴度的增加及作用时间的延长呈现下 降趋势。HepG2对两种重组病毒最为敏感,HCT-116次之,SW480敏感性最差。与对照病毒Ad.wnt-E1A(Δ24)EGFP相比,目的病毒Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1对HepG2的杀伤作用更大,特别是96 h后,目 的病毒Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1的杀伤效果尤其明 显。

为了进一步研究Ad.wnt-E1A(Δ24)-EGFP和 Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1两种病毒对细胞的毒性



A: 重组病毒结构; B: Ad.wnt-E1A(Δ24)-EGFP和Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1对细胞的杀伤作用; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001。 A: the structure of Ad.wnt-E1A(Δ24)-EGFP and Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1; B: killing effect of Ad.wnt-E1A(Δ24)-EGFP and Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

图3 重组病毒的结构及Ad.wnt-E1A(△24)-EGFP和Ad.wnt-E1A(△24)-TSLC1对细胞的杀伤作用

Fig.3 The structure and the killing effect of Ad.wnt-E1A( $\Delta 24$ )-EGFP and Ad.wnt-E1A( $\Delta 24$ )-TSLC1

作用,采用结晶紫染色法比较感染病毒72 h后L-02、 HepG2、HCT-116的细胞数变化(图4)。 L-02细胞 对两种病毒均具有良好的耐受能力,与空白对照相 比无差异。HCT-116和HepG2两株细胞加入病毒后 细胞数量均有不同程度的减少,目的病毒Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1的杀伤作用更加明显。并且,5 MOI 的Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1作用于HepG2后,细胞数 明显减少,与MTT结果一致。

## 2.4 重组腺病毒诱导HepG2凋亡

Hoechst 33342染色检测不同浓度的Ad.wnt-E1A(Δ24)-EGFP和Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1对HepG2 凋亡的影响(图5)。未加病毒的细胞经染色后,细胞 核呈蓝色圆形。受感染凋亡的HepG2细胞核固缩碎 裂, 呈亮蓝色, 随着病毒MOI的增加, 凋亡细胞的数 量增加, 总细胞数减小。图5显示, 目的病毒Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1对HepG2细胞的杀伤作用更强, 会 诱导更多的细胞发生凋亡。

## 2.5 重组腺病毒诱导HepG2细胞凋亡的分子机制

分别用1和5 MOI的Ad.wnt-E1A(Δ24)-EGFP和 Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1病毒感染HepG2细胞48 h 后,检测抑癌基因*TSLC1*和病毒早期蛋白E1A的蛋 白水平情况(图6)。以未经病毒感染的HepG2细胞 蛋白作为对照,Ad.wnt-E1A(Δ24)-EGFP组TSLC1的 水平与对照相比,Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1组抑癌 基因*TSLC1*的蛋白水平明显升高,且呈现病毒浓度 依赖性。E1A作为病毒复制所需的早期蛋白,检测



图4 结晶紫染色检测Ad.wnt-E1A(Δ24)-EGFP和Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1对细胞的杀伤作用 Fig.4 The killing effect of Ad.wnt-E1A(Δ24)-EGFP and Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1 on cells stained with crystal violet



图5 Ad.wnt-E1A(△24)-EGFP和Ad.wnt-E1A(△24)-TSLC1诱导HepG2凋亡 Fig.5 Ad.wnt-E1A(△24)-EGFP and Ad.wnt-E1A(△24)-TSLC1 induce apoptosis in HepG2



Control: 未经处理的HepG2细胞; EGFP: 感染Ad.wnt-E1A(Δ24)-EGFP病 毒的HepG2细胞; TSLC1: 感染Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1病毒的HepG2 细胞。

## 图6 病毒感染HepG2细胞48 h后TSLC1和E1A蛋白质水平 Fig.6 The protein levels of TSLC1 and E1A in cells after 48 h oncolytic viruses infection

E1A水平可间接表示病毒的复制能力,图6显示,两种重组病毒的复制能力一致,与对照病毒Ad.wnt-E1A(Δ24)-EGFP相比,携带*TSLC1*抑癌基因不会影响病毒的正常复制。

为进一步研究重组病毒Ad.wnt-E1A( $\Delta 24$ )-TSLC1诱导HepG2凋亡的机制,通过Western blot检 测未被磷酸化的有活性的β-catenin及Caspase通路 相关蛋白质水平。结果显示,随着病毒感染时间 的增加,非磷酸化的β-catenin蛋白质水平下降,感 染目的病毒Ad.wnt-E1A( $\Delta 24$ )-TSLC1组非磷酸化 的β-catenin蛋白质水平下降更为明显(图7)。这提 示,Ad.wnt-E1A( $\Delta 24$ )-TSLC1前期通过非磷酸化 的β-catenin蛋白质的转录活性与TCF启动子结合 而启动病毒的复制和表达,随着感染时间的延长, Ad.wnt-E1A( $\Delta 24$ )-TSLC1又可通过*TSLC1*基因来下 调Wnt通路的活性,因而抑制HepG2细胞的增殖。

此外,与对照病毒相比,目的病毒Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1组的Caspase-9、PARP前体蛋白均 明显下降,说明在Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1的作用 下,Caspase依赖性细胞凋亡通路被激活,Caspase-9 前体蛋白被切割而其水平减少,进而激活下游 Caspase级联反应,使PARP前体被切割产生效应,导 致细胞凋亡。XIAP为Caspase通路的强抑制子,感 染重组病毒后,XIAP的水平减少,间接反映Caspase 通路被激活。从蛋白质水平看,对照病毒Ad.wnt-E1A(Δ24)-EGFP和目的病毒Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1相比,目的病毒产生的凋亡效果更加明显,与 Hoechst 33342染色结果一致。



Control: 未经处理的 HepG2细胞; EGFP: 感染5 MOI Ad.wnt-E1A(Δ24)-EGFP病毒的 HepG2细胞; TSLC1: 感染5 MOI Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1病毒的HepG2细胞。

Control: untreated HepG2 cells; EGFP: HepG2 cells infected with 5 MOI Ad.wnt-E1A( $\Delta$ 24)-EGFP; TSLC1: HepG2 cells infected with 5 MOI Ad.wnt-E1A( $\Delta$ 24)-TSLC1.

## 图7 Ad.wnt-E1A(△24)-TSLC1通过Caspase 通路诱导细胞凋亡 Fig.7 Ad.wnt-E1A(△24)-TSLC1 induce apoptosis by Caspase pathways

## 3 讨论

溶瘤腺病毒转录靶向增强,可使病毒进入肿瘤 细胞后受特定的转录调控元件调控,选择性地在细 胞内高效复制,如利用肿瘤特异性的甲胎蛋白AFP 启动子<sup>[11]</sup>、端粒酶hTERT启动子<sup>[12]</sup>等。结肠癌<sup>[13]</sup>、 胰腺癌<sup>[14]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[15]</sup>、肝癌<sup>[16]</sup>等常见的肿瘤 细胞中,常伴随着Wnt信号通路的异常激活。利用 这一特性,Brunori将*E1B*基因和*E2*基因置于TCF4转 录因子结合的启动子之下,使重组腺病毒在SW480 细胞内的复制效率提高了5~100倍<sup>[17]</sup>。

Wnt信号通路是细胞信号转导中最常见的通路 之一,参与调控细胞增殖分化、胚胎发育等过程<sup>[18]</sup>。 β-catenin在经典Wnt信号通路和细胞间黏附系统中 发挥重要角色<sup>[19]</sup>。当Wnt通路受到活化时,非磷酸化 的β-catenin蛋白质从GSK3β胞质蛋白质复合物中解 离,游离转位到细胞核内,与核内转录因子TCF/LEF 结合,启动下游基因的表达<sup>[20]</sup>。此外,腺病毒本身早 期的基因产物可参与宿主细胞周期节点调控,对相 应基因结构进行改造可使病毒在特性条件下选择性 复制。*E1A*基因产物可与肿瘤抑制基因Rb蛋白结合 使其失活,删除或者突变*E1A* CR2区24 bp序列,使其 在Rb途径缺失的肿瘤细胞中选择性复制而不能在

Control: untreated HepG2 cells; EGFP: HepG2 cells infected with Ad.wnt-E1A( $\Delta$ 24)-EGFP; TSLC1: HepG2 cells infected with Ad.wnt-E1A( $\Delta$ 24)-TSLC1.



Fig.8 The mechanism and function of recombinant Oncolytic Adenoviruses

正常细胞中复制[21]。

本研究证实, Wnt启动子调控缺失CR2区24 bp 的*E1A*并携带抑癌基因*TSLC1*的Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1病毒,可特异性地在β-catenin/TCF高表达的 HepG2细胞中高效复制,具有良好的靶向性、安全 性(图8)。前期实验中还发现,重组病毒对MHCC-97H肝癌类干细胞具有良好的杀伤效果并能有效抑 制上皮-间质转化(EMT)的发生,阻止其发生迁移与 侵袭,显示了良好的临床应用前景<sup>(9)</sup>。为深入研究 重组腺病毒在肿瘤细胞中的作用机制,对样品进行 Hoechst染色及Western blot分析,结果表明,重组腺 病毒Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1初期病毒依赖Wnt通 路β-catenin/TCF高活性复制,后期由于*TSCL1*抑癌基 因及病毒本身的溶瘤作用而下调细胞内Wnt通路活 性,通过Caspase通路诱导细胞凋亡,从而有效地在 体外抑制肿瘤细胞的增殖。

2013年, Chen等<sup>[22]</sup>提出了肿瘤-免疫循环的概念, 溶瘤腺病毒的溶瘤特性可有效启动机体内的肿瘤-免疫循环。因此, 研究者们对溶瘤腺病毒的改造从使用抑癌基因武装转变为利用溶瘤病毒的抗原呈递作用放大体内免疫反应, 通过抗肿瘤免疫来提

高溶瘤腺病毒的后续疗效,发挥长期的作用,如加 入CD40配体CD40L<sup>[23]</sup>。本研究使用的重组腺病毒 Ad.wnt-E1A(Δ24)-TSLC1可有效地在Wnt通路异常 的肿瘤中高效复制,可为肿瘤-免疫循环提供良好的 免疫原信号,若联合PD1/PD-L1免疫检查点抑制剂, 通过二者的协同作用,可能会产生更好的疗效,为肝 癌临床治疗提供参考。

#### 参考文献 (References)

- Raty JK, Pikkarainen JT, Wirth T, Yla-Herttuala S. Gene therapy: the first approved gene-based medicines, molecular mechanisms and clinical indications. Curr Mol Pharmacol 2008; 1(1): 13-23.
- 2 Niemann J, Kuhnel F. Oncolytic viruses: adenoviruses. Virus Genes 2017; doi: 10.1007/s11262-017-1488-1.
- 3 Lichty BD, Breitbach CJ, Stojdl DF, Bell JC. Going viral with cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer 2014; 14(8): 559-67.
- 4 Rosewell SA, Suzuki M. Recent advances in oncolytic adenovirus therapies for cancer. Curr Opin Virol 2016; 21: 9-15.
- 5 Fukuhara H, Kuramochi M, Nobukuni T, Fukami T, Saino M, Maruyama T, *et al.* Isolation of the TSLL1 and TSLL2 genes, members of the tumor suppressor TSLC1 gene family encoding transmembrane proteins. Oncogene 2001; 20(38): 5401-7.
- 6 Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, et al. TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. Nat Genet 2001; 27(4): 427-30.

- 7 Murakami Y. Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/ IGSF4, in human oncogenesis. Cancer Science 2005; 96(9): 543-52.
- 8 Clevers H, van de Wetering M. TCF/LEF factor earn their wings. Trends Genet 1997; 13(12): 485-9.
- 9 章 健, 来维洁, 李 强, 金 槿, 肖伯端, 郭 婉, 等. 靶向Wnt信号 的溶瘤腺病毒抑制肝癌干细胞研究. 生物化学与生物物理进 展(Zhang Jian, Lai Weijie, Li Qiang, Jin Jin, Xiao Boduan, Guo Wan, *et al.* Inhibition of hepatocellular stem cells by oncolytic virus targeting Wnt signaling pathway. Progress in Biochemistry & Biophysics) 2017; 44(4): 326-37.
- 10 Rowe WP, Pugh WE, Hartley JW. Plaque assay techniques for murine leukemia viruses. Virology 1970; 42(4): 1136-9.
- 11 Ren X, Liang M, Meng X, Ye X, Ma H, Zhao Y, et al. A tumor-specific conditionally replicative adenovirus vector expressing TRAIL for gene therapy of hepatocellular carcinoma. Cancer Gene Ther 2006; 13(2): 159-68.
- 12 Fujiwara T, Urata Y, Tanaka N. Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human cancer with the hTERT promoter. Curr Cancer Drug Targets 2007; 7(2): 191-201.
- 13 Mir R, Pradhan SJ, Patil P, Mulherkar R, Galande S. Wnt/betacatenin signaling regulated SATB1 promotes colorectal cancer tumorigenesis and progression. Oncogene 2016; 35(13): 1679-91.
- 14 Yang HW, Liu GH, Liu YQ, Zhao HC, Yang Z, Zhao CL, et al. Over-expression of microRNA-940 promotes cell proliferation by targeting GSK3beta and sFRP1 in human pancreatic carcinoma. Biomed Pharmacother 2016; 83: 593-601.
- 15 Cai J, Fang L, Huang Y, Li R, Xu X, Hu Z, et al. Simultaneous

overactivation of Wnt/beta-catenin and TGFbeta signalling by miR-128-3p confers chemoresistance-associated metastasis in NSCLC. Nat Commun 2017; 8: 15870.

- 16 Debebe A, Medina V, Chen CY, Mahajan IM, Jia C, Fu D, et al. Wnt/beta-catenin activation and macrophage induction during liver cancer development following steatosis. Oncogene 2017; doi: 10.1038/onc.2017.207.
- 17 Brunori M, Malerba M, Kashiwazaki H, Iggo R. Replicating adenoviruses that target tumors with constitutive activation of the wnt signaling pathway. J Virol 2001; 75(6): 2857-65.
- 18 Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. Genes Dev 1997; 11(24): 3286-305.
- 19 Qin X, Zhang H, Zhou X, Wang C, Zhang H, Zhang X, *et al.* Proliferation and migration mediated by Dkk-1/Wnt/β-catenin cascade in a model of hepatocellular carcinoma cells. Transl Res 2007; 150(5): 281-94.
- 20 Polakis P. Wnt signaling in cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol 2012; 4(5): a8052.
- 21 Fukuda K, Abei M, Ugai H, Seo E, Wakayama M, Murata T, et al. E1A, E1B double-restricted adenovirus for oncolytic gene therapy of gallbladder cancer. Cancer Res 2003; 63(15): 4434-40.
- 22 Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancerimmunity cycle. Immunity 2013; 39(1): 1-10.
- 23 Diaconu I, Cerullo V, Hirvinen ML, Escutenaire S, Ugolini M, Pesonen SK, *et al.* Immune response is an important aspect of the antitumor effect produced by a CD40L-encoding oncolytic adenovirus. Cancer Res 2012; 72(9): 2327-38.