

膀胱癌细胞 CAR 的表达对 E1B 缺失腺病毒抗瘤活性的影响

袁中玉, 管忠震, 张 力, 徐瑞华

(中山大学肿瘤防治中心内科, 广东 广州 510060)

摘 要:【目的】观察不同组织类型膀胱癌细胞株表达柯萨奇病毒腺病毒受体 (coxsackie and adenovirus receptor, CAR) 与 E1B 缺失腺病毒(H101) 体外感染力及体内抗瘤活性的关系。【方法】体外通过流式细胞仪法 (FCM) 检测不同组织类型膀胱癌细胞株表面 CAR 表达, 用 MTT 法测定病毒对它们的抑制率, 以观察 CAR 表达与 H101 感染力的关系; 利用裸鼠移植瘤模型, 观察 H101 对不同移植瘤的抗瘤活性。【结果】膀胱癌细胞上 CAR 的表达量与 H101 的感染力呈正相关($r = 0.952$); 动物移植瘤实验结果显示, H101 对 CAR 表达高的 ScaBER 移植瘤的抑制率较高, 有效持续的时间也较长。【结论】膀胱癌细胞株上不同的 CAR 表达可直接影响 H101 的体内外抗瘤活性。

关键词: 膀胱癌细胞; E1B 缺失腺病毒; CAR 受体; 感染力

中文分类号: R730

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)05-0533-04

Effect of CAR Expression on Antitumoral Activity of E1B-Deleted Adenovirus in Bladder Cancer Cells

YUAN Zhong-yu, GUAN Zhong-zhen, ZHANG Li, XU Rui-hua

(Department of Medical Oncology, Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract:【Objective】To explore the relationship between the expression of Coxsackie and adenovirus receptor (CAR) in bladder cancer cells and the infectivity in vitro, as well as the antitumoral activity in vivo of E1B-deleted adenovirus (H101).【Methods】The amount of CAR in the different histological type of bladder cancer cells were detected by flow cytometry (FCM), and inhibitory rate of H101 on bladder cells were determined by MTT assay. The relationship between CAR expression and the infectivity of H101 was explored. Human bladder transitional cell carcinoma cell line T-24 and human bladder squamous carcinoma ScaBER were used to establish a model of transplanted tumors, after injection of H101, the growth of the transplanted tumor was observed.【Results】The amount of CAR in different bladder cancer cells was different and positively related to viral infectivity ($r = 0.952$). Meanwhile, the amount of CAR affects the antitumoral activity of H101 in vivo, not only in inhibitory rate, but also in time to progression.【Conclusion】The study showed the efficacy of H101 therapy were significantly affected by the expression of CAR in bladder cancer cells.

Key words: Bladder cancer cells; E1B deleted adenovirus; Coxsackie and adenovirus receptor (CAR); infectivity;

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005, 26(5):533-536]

腺病毒是研究最多的一种溶瘤病毒, 也是基因治疗最常用的一种载体, 但作为溶瘤病毒或载体治疗恶性肿瘤的疗效在很大程度上受到组织器官表达腺病毒特异性受体的影响。柯萨奇病毒腺病毒受体 (Coxsackie and adenovirus receptor, CAR) 是腺病毒入胞的主要受体, CAR 在不同细胞表面的丰度随细胞类型、发育阶段、细胞周期及生物学特性等的不同而存在很大差异, 也是导

致病毒产生不同生物学效应的主要原因之一^[1-5]。本研究通过流式细胞仪测定膀胱癌细胞的 CAR 表达量, MTT 法检测 H101 对不同类型膀胱癌细胞的抑制率, 以观察膀胱癌细胞 CAR 表达对 H101 体外感染力的影响; 同时, 利用不同类型膀胱癌细胞株建立动物模型, 观察 CAR 表达对 H101 体内抗瘤活性的影响。

收稿日期: 2005-01-17

基金项目: 国家“863”高科技项目(NO.2002AA2Z3304)

作者简介: 袁中玉(1966-), 男, 安徽合肥人, 博士, 主治医师. E-mail: oncologyzy2000@163.com

1 材料和方法

1.1 细胞和病毒

膀胱移行细胞癌细胞株 T24 及膀胱鳞癌细胞株 SCaBER 购于中科院细胞库(上海),在含 100 mL/L 小牛血清的 PRMI1640 培养液(为 Gibco 公司产品),37℃、体积分数 5%CO₂ 条件下培养。取对数生长期细胞进行实验。H101 病毒为 5 型腺病毒通过基因工程改造而成,主要是删除了 5 型腺病毒早期基因转录 1B 区(E1B 区)及 E3 区 78.3-85.8 mu 基因片段(由上海三维公司提供)。

1.2 实验动物

20 只 4-5 周龄的 BALB/C(nu/nu) 裸鼠,雌雄各半,由中山大学肿瘤防治中心动物实验室提供,卫生部医学实验动物质量合格证号:医动字第 26-2002A005 号,SPF 级;医学实验动物环境设施合格证号:医动字第 26-2002B002 号,SPF 级。实验动物随机分为 T-24 组和 SCaBER 组,每组 10 只。

1.3 体外噻唑蓝(MTT)实验

取对数生长期细胞制成 5×10⁴/ml 单细胞悬液,接种 96 孔培养板,每孔 0.2 mL(即每孔 1×10⁴ 细胞),37℃ 体积分数 5%CO₂ 培养箱培养,24 h 后,分别加入受试物,继续培养 72 h,实验终止前 4 h 加入 5 mg/mL MTT(购于 Sigma 公司)溶液 20 μL,继续孵育 4 h,除去每孔培养液,加 DMSO 200 μL,振荡至结晶溶解后(约 5 min),在分光光度计吸收波长 570 nm 条件下,测定各孔吸光度(A₅₇₀)值。实验设药物处理组、细胞对照组和空白对照组,每组均设 3 个复孔。处理组 H101 浓度为每孔 1×10⁸ 颗粒数,细胞对照为不加药物的细胞悬液,空白对照为 DMSO 液。按下列公式求出细胞增殖抑制率。

$$\text{肿瘤细胞相对抑制率} = \left(1 - \frac{\text{药物处理组 } A_{570} \text{ 值} - \text{空白对照组 } A_{570} \text{ 值}}{\text{细胞对照组 } A_{570} \text{ 值} - \text{空白对照组 } A_{570} \text{ 值}}\right) \times 100\%$$

1.4 FCM 法

1×10⁸ 颗粒数 H101 处理细胞 72 h 后用 700 mL/L 乙醇固定(固定时间超过 18 h),加一定浓度腺病毒受体单抗 RmcB(购于美国 Upatate 公司) 37℃ 1 h, PBS 缓冲液洗 2 次,加 FTIC-IgG(北京中山生物技术有限公司) 4℃ 1 h,用冷 PBS 缓冲液洗 2 次,用美国 Profil II 型流式细胞仪检测 CAR 蛋白的平均荧光强度,以 LYSIS 软件(Becton Dickinson 公司产品)分析结果。

1.5 裸鼠移植模型

将实验肿瘤细胞株配制成每毫升含 1×10⁷ 细胞的悬液。在裸鼠左右两侧腋皮下接种细胞悬液各 0.2 mL,继续饲养,严密观察肿瘤的生长情况,2 周后在无菌条件下,取右侧移植瘤行瘤内注射 H101,剂量按每只 1×10¹¹ 病毒颗粒数,容量按瘤体积的 30%计算,每天 1 次,连续 5 d。注射后严密观察肿瘤的生长情况,并测量注射前、注射后第 4、8、12、16、20 天移植瘤的长径(a)和短径(b),按下列公式计算肿瘤相对体积,以肿瘤相对体积绘制肿瘤生长曲线。注射结束后 21 d 处死小鼠,取肿瘤组织,测量体积,称重。按下列公式计算抑瘤率。

$$\text{活体肿瘤相对体积} = 1/2 \times ab^2$$

$$\text{抑瘤率} = (1 - \text{用药组平均瘤重} / \text{对照组平均瘤重}) \times 100\%$$

1.6 统计处理

用 SPSS10.0 软件包对结果进行统计学分析,采用相关性分析对 CAR 表达与 H101 感染力的相关性进行分析。两组均数的比较用 t 检验。

2 结果

2.1 CAR 表达与 H101 的感染力

FCM 法测定膀胱癌细胞 CAR 的表达结果显示,T-24 细胞株和 SCaBER 细胞株的平均荧光强度分别为 13.5 和 93.1,提示两种不同组织学类型的膀胱癌细胞表面 CAR 的表达量不同。MTT 结果显示,以同样剂量的 H101(1×10⁸ 颗粒数/mL)感染两肿瘤细胞株,H101 对 CAR 高表达的 SCaBER 细胞株的抑制率为 48.4%,而对 T-24 细胞株的抑制率为仅 11.7%(表 1, P<0.01)。

表 1 膀胱癌细胞 CAR 表达与 H101 抑制率的关系
Table 1 Relationship between CAR expression and the inhibitory rate of H101 in bladder cancer cells

Cells	Expression of CAR (fluorescent intensity)	A ₅₇₀ ($\bar{x} \pm s$)		Inhibitory rate(%)
		Experimental group	Control group	
T-24	13.5	1.33±0.32	1.62±0.16	11.7±0.6
SCaBER	93.1	0.42±0.16	1.09±0.25	48.4±1.6

2.2 治疗前各组裸鼠移植瘤体积的均衡性

SCaBER 组和 T-24 组均 10 只动物,T-24 组在饲养过程中互相搏斗致死 1 只。治疗前,4 组裸鼠体重和移植瘤体积见表 2。经统计学分析均无显著性差异(P>0.05),表明各组裸鼠体重和移植瘤体积在治疗前具有均衡性。

2.3 治疗后各组裸鼠移植瘤体积的变化

表 2 处理前裸鼠体重和移植瘤体积的均衡性

Table 2 Balance of nude mice weight and tumor volume before management

Group	n	Mass (g)	Tumor volume (mm ³)	t	P
T-24 treatment	9	21.3 ±1.2	177 ±66	0.511	0.748
T-24 control	9	21.7 ±1.4	158 ±42		
SCaBER treatment	10	21.6 ±1.5	153 ±44	0.773	0.497
SCaBER control	10	21.3 ±1.4	159 ±42		

治疗后, 两对照组移植瘤体积均逐渐增大, T-24 实验组移植瘤的生长在治疗前 1 周受到明显抑制, 继后又逐渐增大, 而 SCaBER 实验组移植瘤生长呈平台型。至 21 d 实验终止时, 两对照组移植瘤的体积无明显差异 (P > 0.05), T-24 实验组移植瘤体积与其对照移植瘤之间未见明显差异, SCaBER 实验组移植瘤的体积较其对照瘤的体积明显为小 (P < 0.05) (见表 3、图 1)。另外, 至 21 d 时, T-24 实验瘤较注射前缩小 50% 以上者 1 例 (1/9, 11%), SCaBER 实验瘤较注射前缩小 50% 以上者 3 例 (3/10, 30%)。可见, 两组因 CAR 表达不同使得 H101 的抑瘤率及有效持续的时间都有明显差异, 提示 CAR 表达量影响 H101 在体内的抗癌效果。

2.4 H101 对两种移植瘤的抑瘤率

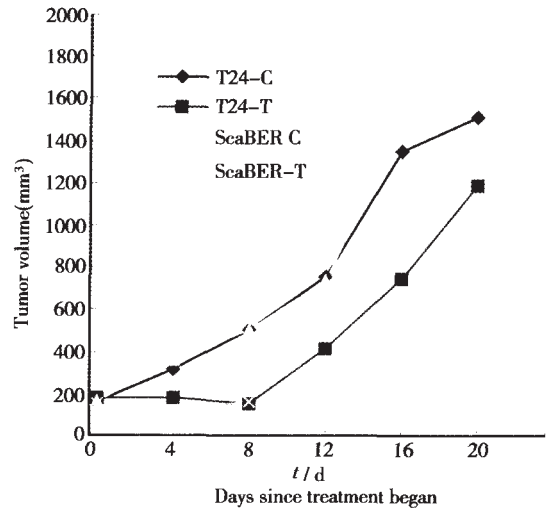


图 1 H101 对两株膀胱癌移植瘤生长曲线的影响
Fig.1 Effect of H101 on the growth curve of bladder cancer xenografts

在实验第 21 天处死裸小鼠后对肿瘤瘤重进行比较, SCaBER 实验组平均瘤重明显较对照瘤重为轻 (P < 0.05), 但对照瘤之间及 T-24 实验瘤与对照瘤之间的瘤重均未见明显差异 (表 4)。

3 讨论

表 3 H101 治疗后各组裸鼠移植瘤体积

Table 3 Tumor volume of nude mice after H101 treatment

Group	d 4	d 8	d 12	d 16	d 20
T-24 treatment	176 ±101 ¹⁾	157 ±119 ¹⁾	410 ±257 ²⁾	748 ±320 ²⁾	1 189 ±420
T-24 control	311 ±95	504 ±246	757 ±305	1 355 ±691	1 517 ±686
SCaBER treatment	120 ±55 ¹⁾	158 ±91 ¹⁾	187 ±11 ¹⁾	221 ±138 ¹⁾	315 ±219 ¹⁾
SCaBER control	362 ±69	502 ±201	735 ±482	1 497 ±969	1 781 ±910

Compared with control group 1) P < 0.05, 2) P < 0.01

表 4 H101 治疗后各组裸鼠移植瘤质量

Table 4 Average tumor weight after H101 treatment ($\bar{x} \pm s, g$)

Group	Mass(g)	Inhibitory rate(%)	t	P
T-24 control	1.0 ±0.2	-		
T-24 treatment	0.7 ±0.0	29.6 ±1.8	1.559	0.126
SCaBER control	1.1 ±0.2	-		
SCaBER treatment	0.3 ±0.0	70.3 ±2.2	8.436	0.001

为观察 CAR 表达与腺病毒感染力的关系, 我们对不同组织学类型的两株膀胱癌细胞株的 CAR 表达进行了检测, 结果显示, 两株肿瘤细胞的 CAR 表达存在明显差异, 提示 CAR 表达与瘤细胞的组织学类型有关, 这与国外的相关研究结果一致 [4-6]。H101 对 CAR 表达水平不同的细胞株抑制率与 CAR 的表达量存在着正相关现象, 要有效抑制 CAR 表达低的肿瘤细胞, 往往需要延长感染时间和增加病毒的感染量, 达到同等抑制效应所需的病

毒量较大 [7]。说明腺病毒对不同肿瘤细胞感染力的差异至少部分源于其表面的 CAR 表达的差异。这也解释了临床疗效不同及体外感染力差异的原因所在。

本研究以表达 CAR 不同的两株膀胱癌细胞为研究对象, 在裸鼠体内建立移植瘤模型, 模拟人体内 H101 用药方式对移植瘤进行瘤内注射实验, 结果发现, H101 在体内对 CAR 表达高的膀胱鳞癌移植瘤的有效率及有效持续的时间均较 CAR 表达低的膀胱移行细胞癌移植瘤为好, 提示肿瘤细胞表面 CAR 表达与腺病毒感染能力及体内的抗癌活性密切相关。为什么 CAR 高表达者不是全部有效呢? 这可能涉及到病毒是一种严格细胞内寄生的微生物, 在宿主细胞内受到很多因素的影响, 尤其是细胞内环境对腺病毒在胞内复制的影响为显 [8], 如

Seidman 等观察结果表明,即使为单克隆细胞,它们所处的细胞周期不同也影响腺病毒的感染力,M 期细胞较 G1 和 G2 期细胞感染力高 2~3 倍^[9]。

总之,CAR 作为腺病毒进入细胞的一个主要受体,它在不同细胞表面的表达水平直接影响了病毒入胞及其后所产生的一系列生物学效应,对不同肿瘤细胞表面受体丰度进行研究,可预测细胞对腺病毒的敏感性及其治疗效应,这对指导治疗、预测效果及副作用的预防等都具有重要价值。

(感谢上海三维生物技术公司为本研究提供了基因工程腺病毒及在实验过程中提供资助)

参考文献:

- [1] Nalbantoglu J, Larochelle N, Wdf E, et al. Muscle-specific overexpression of the adenovirus primary receptor CAR overcomes low efficiency of gene transfer to mature skeletal muscle [J]. *J Virol*, 2001, 75(9): 4276-82.
- [2] Seidman MA, Hogan SM, Wendland RL, et al. Variation in adenovirus receptor expression and adenovirus vector-mediated transgene expression at defined stages of the cell cycle [J]. *Mol Ther*, 2001, 4(1): 13-21.
- [3] Okegawa T, Pong RC, Li Y, et al. The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(17): 6592-600.
- [4] Li D, Duan L, Freimuth P, et al. Variability of adenovirus receptor density influences gene transfer efficiency and therapeutic response in head and neck cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(12): 4175-81.
- [5] Kim JS, Lee SH, Cho YS, et al. Ectopic expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor increases susceptibility to adenoviral infection in the human cervical cancer cell line, SiHa [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288(1): 240-4.
- [6] Yi SM, Lee JH, Graham S, et al. Adenovirus calcium phosphate coprecipitates enhance squamous cell carcinoma gene transfer [J]. *Laryngoscope*, 2001, 111(7): 1290-6.
- [7] McDonald D, Stockwin L, Matzow T, et al. Coxsackie and adenovirus receptor (CAR)-dependent and major histocompatibility complex (MHC) class I-independent uptake of recombinant adenoviruses into human tumor cells [J]. *Gene Ther*, 1999, 6(9): 1512-9.
- [8] Thoelen I, Keyaerts E, Lindberg M, et al. Characterization of a cDNA encoding the bovine coxsackie and adenovirus receptor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288(4): 805-8.
- [9] Nalbantoglu J, Pari G, Karpati G, et al. Expression of the primary coxsackie and adenovirus receptor is downregulated during skeletal muscle maturation and limits the efficacy of adenovirus-mediated gene delivery to muscle cells [J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(6): 1009-19.

(编辑 黄小延)