

[文章编号] 1007-385X(2006)06-0429-06

· 论 著 ·

肿瘤细胞 CAR 表达水平与 5 型腺病毒转导效率的关系

王海娟, 李云峰, 钱海利, 张雪燕, 付明, 梁萧, 詹启敏, 林晨(中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

[摘要] **目的:** 通过体外、体内实验探讨肿瘤细胞柯萨奇腺病毒受体(coxsackie adenovirus receptor, CAR)表达水平与腺病毒转导效率的关系,为腺病毒相关的生物制剂在临床个体化应用提供实验依据。**方法:** 将载有绿色荧光蛋白的 Ad5 型腺病毒(Ad-GFP)以 100 MOI、200 MOI 分别感染食管癌细胞系 KYSE510、KYSE150、EC9706、人宫颈癌细胞系 HeLa、人卵巢癌细胞系 SKOV3、人肝癌细胞系 HepG2 和人肺癌细胞系 A549,感染后 48 h 通过流式细胞术检测 Ad-GFP 对不同细胞系的转导效率。采用 Western blotting 方法检测这些细胞中 CAR 的表达水平。将 HeLa、A549、SKOV3、EC9706 细胞分别接种于裸鼠腋下,接种细胞数分别为 3×10^6 、 3×10^6 、 3×10^6 、 2×10^6 ,建立裸鼠移植瘤模型。待肿瘤长径达 5~7 mm 时,在裸鼠移植瘤内注射 Ad-GFP,每次 1×10^9 PFU,间隔 48 h 注射第 2 次。第 2 次注射后 48 h 处死裸鼠,剖取瘤组织,荧光显微镜观察冰冻切片中 GFP 的表达情况以判定腺病毒在瘤体内的转导效率,同时用免疫组化法检测瘤组织内的 CAR 表达水平。**结果:** 200 MOI Ad-GFP 感染 A549、HeLa、HepG2、KYSE150 细胞 48 h 后分别有 92.67%、89.31%、84.98%、74.59% 的细胞表达 GFP;而 SKOV3、KYSE510、EC9706 细胞中腺病毒的转导效率明显降低,GFP 阳性率分别为 30.06%、27.40%、18.93%;各种细胞的 CAR 蛋白表达水平与腺病毒的转导效率呈正相关。注射 Ad-GFP 的裸鼠移植瘤组织中可见 HeLa、A549 瘤组织内有明显的点状绿色荧光,而 SKOV3、EC9706 瘤组织内表达 GFP 的细胞数明显少于前两种瘤组织;HeLa、A549 裸鼠移植瘤组织内大多数瘤细胞高表达 CAR(+++),SKOV3、EC9706 移植瘤组织内 CAR 表达水平较低(+或-),表明瘤体内 CAR 表达水平与 Ad-GFP 的转导效率也呈正相关。**结论:** 体内外实验均显示肿瘤细胞的 CAR 表达水平与 5 型腺病毒转导效率密切相关。肿瘤患者治疗前检测组织中 CAR 表达水平有助于规范腺病毒载体的基因治疗药物的个体化使用。

[关键词] 肿瘤;腺病毒;柯萨奇腺病毒受体;基因治疗

[中图分类号] R730 **[文献标识码]** A

Relationship between coxsackie adenovirus receptor expression levels with ad5 transduction efficiency in tumor cells

WANG Hai-juan, LI Yun-feng, QIAN Hai-li, ZHANG Xue-yan, FU Ming, LIANG Xiao, ZHAN Qi-min, LIN Chen (State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Hospital & Institute, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the relationship between coxsackie adenovirus receptor (CAR) expression and the efficiency of adenovirus gene transfer, in an effort to provide evidence for the clinical application of adenovirus-related bio-preparations. **Methods:** The esophageal cancer cell lines (KYSE510, KYSE150, EC9706), cervical cancer cell line (HeLa), ovary cancer cell line (SKOV3), hepatoma cell line (HepG2), and lung cancer cell line (A549) were infected with Ad-GFP (100 MOI, 200 MOI) labeled by immunofluorescence; 48 h later we measured the Ad-GFP transduction efficiencies in the above cell lines by flow cytometric analysis. CAR expression levels *in vitro* were assayed by Western blotting. HeLa (3×10^6), A549 (3×10^6), SKOV3 (3×10^6), and EC9706 (2×10^6) cells were implanted subcutaneously into nude mice. When the tumor sizes reached 5-7 mm in diameter, the xenografts were injected with Ad-GFP (1×10^9 PFU) twice with a 48 h interval. After another 48 h the mice were killed and the GFP expression were observed by fluorescence microscopy to determine the transduction efficiency. CAR expression was detected by immunohistochemistry in

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30572150);北京市自然科学基金资助项目(No. 7062043)

[作者简介] 王海娟(1976-),女,汉族,黑龙江省嫩江县人,博士,主要从事肿瘤的生物治疗方面的研究, E-mail: whj@163.com

[通讯作者] 林晨, E-mail: clin@public.bta.net.cn

the xenograft tissues. **Results:** We found that Ad transduction efficiencies varied greatly in different tissues, even among the cells of the same tissue origin. The transduction efficiencies in A549 (92.67%), HeLa (89.31%), HepG2 (84.98%) and KYSE150 (74.59%) were higher than those in SKOV3 (30.06%), KYSE510 (27.40%), and EC9706 (18.93%). Consistently, GFP expression was much higher in exografts sections resulting from HeLa and A549 than those from SKOV3 and EC9706. Increased CAR expression was predictive for more efficient gene transfer *in vitro* and *in vivo*. **Conclusion:** CAR expression level is closely correlated to Ad transduction efficiency, which suggests that measurement of CAR expression in tumor tissues is useful for individualized adenovirus based gene therapy in clinic.

[**Key words**] neoplasm; adenovirus; coxsackie adenovirus receptor (CAR); gene therapy

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(5): 429-434]

虽然现代肿瘤治疗学的三大支柱疗法(手术、放疗、化疗)在近几十年来取得了长足的进展,但由于许多肿瘤发现时已为晚期,其治疗效果还很不理想,故亟需开展包括基因治疗、免疫治疗等在内的多种生物治疗来提高肿瘤的治疗效果。截至 2006 年 6 月,全世界被批准的基因治疗临床方案超过 1 000 项,其中 67% 用于肿瘤的治疗^[1]。在用于基因治疗的多种基因导入系统中,腺病毒以其不整合、不致癌、感染能力高等优点成为应用最广的载体之一,占全部肿瘤基因治疗临床试验方案的 28% 以上。在我国已有商品化腺病毒为载体的生物制剂用于肿瘤的临床治疗。

腺病毒对宿主细胞感染的第一步是其纤维蛋白 C 末端的顶球结构域黏附到细胞表面的特异性受体。腺病毒约有 50 个血清型,不同血清型腺病毒的受体有可能不同。用于基因治疗的腺病毒载体多来源于 C 亚属的 2 和 5 血清型(Ad2 和 Ad5)。研究发现腺病毒对不同的肿瘤细胞的转导效率差异较大。1997 年发现的柯萨奇腺病毒受体(coxsackie adenovirus receptor, CAR)^[2]是 Ad5 和 Ad2 的受体,由于 CAR 在不同组织来源肿瘤细胞中的表达水平很不相同,甚至在同一组织来源的肿瘤细胞中也差异极大^[3-6]。这种差异有可能影响了腺病毒的转导效率,从而影响以腺病毒为载体的基因治疗药物在不同肿瘤类型甚至同种肿瘤的不同个体中的疗效。本研究将通过体外、体内实验来探讨肿瘤细胞表面 CAR 表达水平与腺病毒转导效率的关系,为腺病毒相关的生物制剂在临床中合理的个体化应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 重组腺病毒

载有绿色荧光蛋白的 5 型复制缺陷型重组腺病毒 Ad-GFP 由王澜(军事医学科学院)构建,本实验室保存种子病毒液。病毒在转化有腺病毒 E1 片段的人胚肾 293 细胞(中国医学科学院分子肿瘤学国家重点实验室詹启敏教授惠赠)中扩增、氯化铯超速离心、纯化、滴

度测定后保存于 -80 °C 冰箱中。

1.2 细胞株

人食管癌细胞系 KYSE510、KYSE150 由日本京都大学 Shimada 教授惠赠,EC9706 由医科院分子肿瘤学国家重点实验室王明荣教授惠赠。人宫颈癌细胞系 HeLa、人卵巢癌细胞系 SKOV3、人肝癌细胞系 HepG2、人肺癌细胞系 A549 均由本实验室保存。细胞生长在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,均置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养。

1.3 实验动物

BALB/c 裸鼠,4~5 周龄,雌性,体重 14~16 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物合格证号: SCXK(京)2002-0003。

1.4 抗体

兔抗人 CAR 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自 Sigma 公司,HRP 标记羊抗兔 IgG 及 HRP 标记羊抗小鼠 IgG 均购自北京中杉金桥生物公司。

1.5 细胞处理及病毒转导效率的测定

将上述肿瘤细胞系细胞以 5×10^5 /皿接种于 35 mm² 培养皿,培养过夜。Ad-GFP 感染细胞前弃去原培养液,用 PBS 轻轻洗 2 遍,加入 500 μ l 含一定量 Ad-GFP 的无血清 RPMI 1640 培养液,使其感染复数(multiplicity of infection, MOI)分别达到 100、200。将培养皿放置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 90 min,期间每隔 15 min 十字型轻轻晃动培养皿 1 次,使病毒液分布均匀。病毒感染后 48 h 将各种细胞常规消化处理,转移入 1.5 ml EP 管中,1 000 r/min 离心 10 min 收集细胞,用冰预冷的 PBS 洗 2 次,加入 500 μ l PBS 将细胞轻轻吹匀,直接上流式细胞仪在 510 nm 波长检测 GFP 发出的绿色荧光,每次至少检测 2×10^4 细胞。

1.6 Western blotting 检测肿瘤细胞表面 CAR 的表达

参照《分子克隆实验指南》提取肿瘤细胞总蛋白,测定浓度后各取 100 μ g 蛋白,以 β -actin 为内参照,Western blotting 检测 CAR 表达。将蛋白经 SDS-PAGE

后转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶常温封闭 1 h, 加入兔抗人 CAR 多克隆抗体或鼠抗人 β -actin 单克隆抗体, 4 °C 孵育过夜, 二抗孵育后化学发光法进行 X 线胶片曝光显影。采用北京赛智创业科技有限公司 ChampGel™ 3.4 进行 Western blotting 图像定量分析, 计算 CAR 与内参照 Actin 的灰度值比值。

1.7 瘤体内腺病毒转导效率的测定

将对数生长期的 HeLa、A549、SKOV3、EC9706 细胞消化后离心去除消化液, 用含双抗的 Hank's 液洗 2 次, 离心、计数, 调整细胞密度。将细胞悬液分别接种于裸鼠左、右腋下, 每种细胞系接种 2 只裸鼠。HeLa、A549、SKOV3 分别接种 3×10^6 细胞, EC9706 接种 2×10^6 细胞。待肿瘤长径达 5 ~ 7 mm 时, 调整 Ad-GFP 滴度, 使其达 2×10^{10} PFU/ml, 瘤体内注射 50 μ l, 隔 48 h 注射第 2 次。第 2 次注射后 48 h 处死裸鼠, 剖取瘤组织, 每种移植瘤中随机取 2 个快速置于液氮中, 另外 2 个置于 10% 甲醛液中固定, 用于石蜡包埋。将上述置于液氮中的瘤组织取出, 经 OCT 包埋, 在冰冻切片机上将每块瘤组织进行 5 张连续切片, 置于荧光显微镜下观察 GFP 的表达, 拍照。

1.8 免疫组化法检测瘤组织内 CAR 的表达

将上述石蜡包埋组织进行免疫组化检测瘤组织内 CAR 的表达, 方法参照说明书, CAR 多克隆抗体 1:100 稀释。按如下标准^[7]对免疫组织化学结果进行评分: 肿瘤细胞阳性染色数 < 5%, 0 分; 6% ~ 25%, 1 分; 26% ~ 50%, 2 分; 51% ~ 75%, 3 分; > 75%, 4 分。染色强度的分级: 染色阴性, 0 分; 弱阳性, 1 分; 中等程度阳性, 2 分; 强阳性, 3 分。以阳性细胞数评分与染色程度评分的乘积为最终评分, 最终评分范围为 0 ~ 12 分。将最终评分 8 ~ 12 定义为 III, 4 ~ 7.9 为 II, 0.1 ~ 3.9 为 +, 0 为 -。

2 结果

2.1 各肿瘤细胞系腺病毒的转导效率

在所检测的细胞中: 肺、肝、宫颈来源的癌细胞在腺病毒 Ad-GFP 200 MOI 感染 48 h 时均有半数以上的细胞可见 GFP 表达, 表明腺病毒对这几类细胞有较高的转导效率。同时发现 Ad-GFP 对同一组织来源的细胞系转导效率相差悬殊。食管癌 KYSE150 细胞中腺病毒的转导效率较高, 而相同组织来源的 KYSE510、EC9706 细胞中腺病毒的转导效率明显降低(表 1)。

2.2 各肿瘤细胞系中 CAR 的表达水平

为探讨 CAR 表达水平与腺病毒转导效率之间的关系, 采用 Western blotting 方法对上述细胞进行 CAR 蛋白表达水平的检测, 并以腺病毒包装细胞 293 细胞

为阳性对照, 分别计算各样品 CAR 表达灰度值与内参照 Actin 表达灰度值的比值。结果如图 1、表 2 所示, 可见腺病毒转导效率较高的 HeLa、A549、KYSE150、HepG2 细胞中 CAR 蛋白表达水平(CAR 与 Actin 灰度比值分别为 5530/5586、3535/5439、3092/6560、4128/6860) 明显高于腺病毒转导效率低的 SKOV3、KYSE510、EC9706 细胞(CAR 与 Actin 灰度比值分别为 1970/5324、2180/6832、549/6100), 这表明 CAR 表达水平与腺病毒转导效率呈正相关。

表 1 流式细胞术检测 Ad-GFP 在各肿瘤细胞系中的转导效率(%)

Tab. 1 Ad-GFP transduction efficiency in cancer cell lines detected by flow cytometric analysis (%)

Cell lines	0 MOI	100 MOI	200 MOI
HeLa	0.62	57.80	89.31
A549	1.55	41.15	92.67
KYSE150	0.36	45.62	74.59
HepG2	0.74	44.73	84.98
KYSE510	0.36	18.76	30.06
SKOV3	0.81	17.61	27.40
EC9706	0.83	7.60	18.93

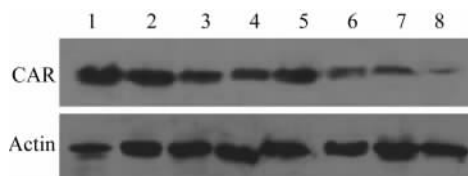


图 1 CAR 在各肿瘤细胞系中的表达
Fig. 1 Expression of coxsackie adenovirus receptor in tumor cell lines

1: 293; 2: HeLa; 3: A549; 4: KYSE150; 5: HepG2; 6: SKOV3; 7: KYE510; 8: EC9706

2.3 裸鼠移植瘤内注射 Ad-GFP 后的转导效率

选择腺病毒体外转导效率较高的 HeLa、A549 细胞及转导效率较低的 SKOV3、EC9706 细胞, 分别建立了相应的裸鼠移植瘤模型, 瘤内注射总量为 2×10^9 PFU 的 Ad-GFP, 处死裸鼠后剖取瘤组织, 冰冻切片后直接观察 GFP 在瘤体内的表达情况。结果如图 2 所示, HeLa、A549 裸鼠移植瘤组织内注射 Ad-GFP 后腺病毒可有效感染瘤细胞, 荧光显微镜下可见 GFP 发出的点状绿色荧光, 而由 SKOV3、EC9706 建立的瘤组织内虽然也可见到 GFP 的表达, 但表达的细胞数明显少于

前两种瘤组织。提示瘤内注射相同剂量的腺病毒后不同移植瘤中有效感染腺病毒的细胞数是不同的,而且

移植瘤内腺病毒转导效率的高低与其相应细胞系的体外检测结果是一致的。

表 2 肿瘤细胞 CAR 表达与腺病毒转导效率的关系

Tab.2 Relationship between CAR expression in tumor cells and adenovirus transduction efficiency

Cell lines	<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>	
	Transductive efficiency (%) (200 MOI Ad-GFP)	CAR expression	Transductive efficiency (Ad-GFP 2×10^9 PFU)	CAR expression
HeLa	89.31	0.99	+	+++
A549	92.67	0.65	+	+++
SKOV3	27.40	0.37	-	+
EC9706	18.93	0.09	-	-

2.4 裸鼠移植瘤组织中 CAR 的表达水平

将每种移植瘤中的 2 个标本石蜡包埋后进行切片,免疫组化法检测瘤组织内 CAR 的表达水平。表达 CAR 的瘤细胞膜呈黄褐色。由图 3、表 2 可见,加 PBS 的阴性对照切片中未见阳性细胞, HeLa、A549 裸鼠移植瘤组织内大多数瘤细胞高表达 CAR(+++),SKOV3 移植瘤组织内 CAR 表达水平较低(+),EC9706 相应瘤

组织的 CAR 表达水平最低(-)。该结果与荧光显微镜下观测到的瘤组织中 Ad-GFP 转导效率呈正相关,而且与其相应细胞系 Western blotting 检测到的 CAR 结果是一致的。这表明裸鼠移植瘤内 CAR 的表达水平与腺病毒的转导效率显著相关,并且细胞系的体外实验与体内移植瘤中的实验结果一致。

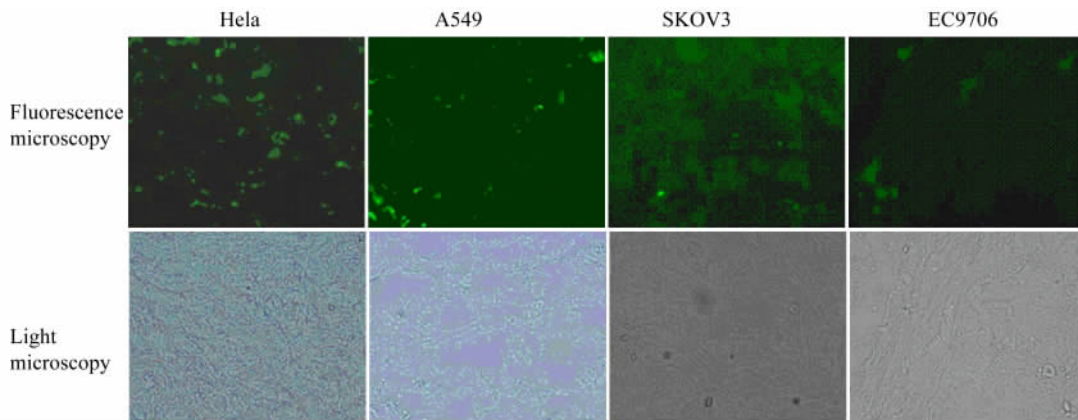


图 2 荧光显微镜及光镜观察冰冻切片的瘤组织内 Ad-GFP 的表达($\times 200$)

Fig. 2 Ad-GFP expression in ice sections of xenografts detected by fluorescence microscopy and light microscopy($\times 200$)

3 讨 论

基因治疗作为一种新的治疗手段,始于 20 世纪 80 年代末,它为人类肿瘤的治疗开辟了一条新途径,但作为一个正在探索中的新领域,基因治疗也面临着一系列的问题,其中如何安全有效地转移目的基因,即载体的问题,是一个最大的挑战。目前所用的转导基因的方法分为物理化学方法、病毒载体及两者相结合的方法。腺病毒因其有如下优点而倍受关注:(1)既可以

感染分裂期,又可以感染非分裂期细胞;(2)外源基因表达水平高;(3)病毒滴度高,制备纯化相对容易;(4)插入外源基因容量大;(5)病毒基因组较少发生重排。

腺病毒的感染起始于病毒与细胞表面特异性受体的结合,细胞表面存在 1 种以上的腺病毒受体,不同血清型病毒所结合的细胞受体可能有所不同,作为基因导入载体最常用的是 Ad2 和 Ad5。1997 年, Bergelson 和 Finberg^[2]发现了柯萨奇 B 病毒细胞表面受体,不久又证实该受体同样也介导了包括 Ad5 和 Ad2 在内的

几种腺病毒对细胞的感染,故命名为柯萨奇腺病毒受体(coxsackie adenovirus receptor, CAR)。CAR 是腺病毒在细胞表面的严格的锚定位点,与腺病毒具有很高的亲和性。但是 CAR 在不同组织中表达不尽相同,胆管癌^[8]、肺癌^[9]、胰腺癌^[6]、头颈癌^[10]、肝癌^[11]细胞中

CAR 表达水平差异很大。还有研究表明,CAR 在成熟的平滑肌细胞、淋巴细胞、纤维细胞、巨噬细胞和单核细胞源性的树突状细胞中几乎不表达^[4],这可能限制了腺病毒在这些细胞中应用,同时也减小了治疗中腺病毒载体对这些细胞的副作用。

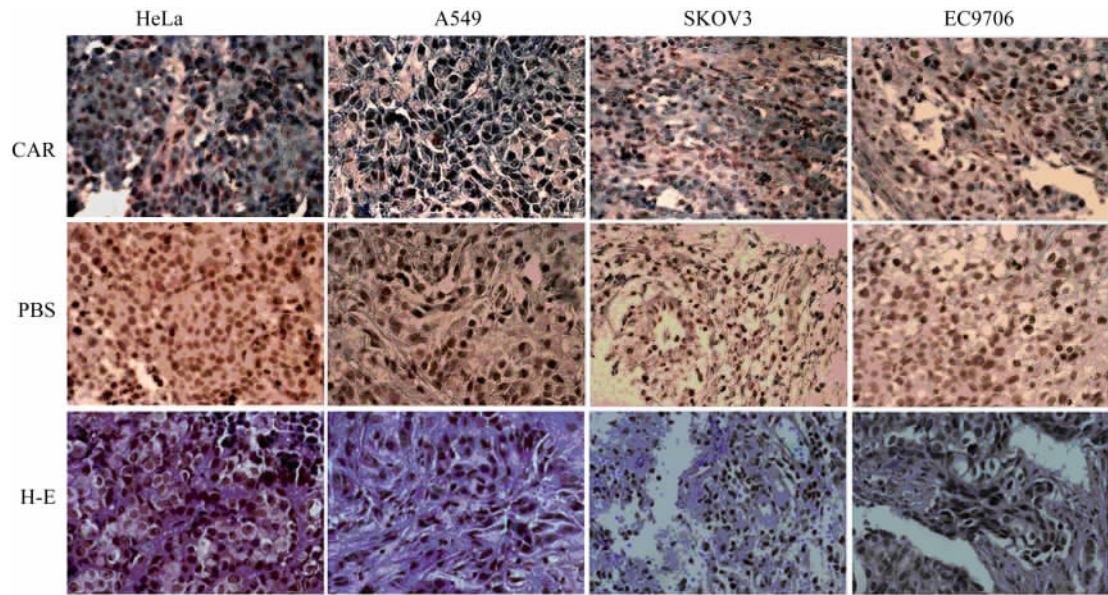


图3 CAR 在各移植瘤组织内的表达(×200)

Fig. 3 Expression of coxsackie adenovirus receptor in xenograft tissues(×200)

在本研究中采用流式细胞术方法检测载有绿色荧光蛋白的腺病毒 Ad-GFP 对多种上皮来源的恶性肿瘤细胞系的转导效率,结果表明腺病毒在不同细胞系中的转导效率是不同的(表1),并且检测结果与荧光显微镜下观察到的结果基本一致(结果未列出)。在所检测的细胞中:肺、肝、宫颈来源的癌细胞较易被腺病毒感染;而在所测的卵巢癌细胞和部分食管癌细胞中,Ad-GFP 对细胞的感染效率就不高。采用 Western blotting 检测 CAR 的表达水平,结果表明 CAR 表达水平与腺病毒转导效率呈正相关(图1)。

本研究发现在相同组织来源的不同细胞系中腺病毒的转导效率也很不同(表1),200 MOI Ad-GFP 感染食管癌细胞 KYSE150 后 48 h 通过流式细胞仪检测到 74.59% 的细胞表达绿色荧光蛋白,而相同感染强度的 Ad-GFP 感染食管癌细胞 KYSE510 和 EC9706 后 48 h 分别只有 30.06% 和 18.93% 的细胞表达 GFP。随后的 Western blotting 结果表明 KYSE150 细胞中 CAR 表达水平明显高于 KYSE510 和 EC9706(图1),这也再次肯定了 CAR 蛋白表达水平与腺病毒转导效率显著正相关。有人在其它细胞系中进行的实验也得出相似的结论,如 Hemmi 等^[3]对不同发病阶段黑色素瘤组织进

行原代培养,检测 CAR 表达,发现所检的 14 种原代细胞中有 4 种 CAR 表达水平较高,腺病毒在 50 MOI 时就有较高的转导效率,而在 CAR 表达水平较低或未检测到的黑色素瘤原代细胞中,若要达到相同的转导效率则需要 20 ~ 40 倍的腺病毒量。

目前,腺病毒介导的肿瘤基因治疗多采用瘤内注射的方式。为了证实瘤体内 CAR 的表达水平与腺病毒的转导效率的关系,本研究建立了裸鼠移植瘤模型对此进行深入探讨。将 Ad-GFP 注射于移植瘤内 2 次后,在荧光显微镜下观察到 HeLa、A549 移植瘤冰冻切片中的细胞发出点状绿色荧光,SKOV3、EC9706 瘤组织 GFP 表达的细胞数明显少于前两种瘤组织(图2)。通过对瘤组织的石蜡切片进行免疫组化检测 CAR 表达,HeLa、A549 瘤组织内大多数瘤细胞高表达 CAR,冰冻切片中表达 GFP 阳性细胞数较少的 SKOV3、EC9706 瘤组织内 CAR 表达水平也较低(图3)。这表明裸鼠移植瘤内 CAR 的表达水平与腺病毒的转导效率正相关,并且细胞系中的实验结果较准确地反映了移植瘤体内的情况。若细胞 CAR 的表达水平低于一定阈值时,腺病毒的转导能力就会受到限制。已有研究表明腺病毒的感染效率在 CAR 转基因鼠中明显高于亲本

小鼠^[12]。因此,在临床中应用 Ad2 或 Ad5 腺病毒相关生物制剂进行治疗前检测患者瘤内 CAR 的表达是非常有意义的。但也应看到 CAR 高表达并不是腺病毒携带的目的基因在细胞内有效表达的唯一条件。Pearson 等^[6]在肺癌和胰腺癌细胞系中的研究结果表明,除 CAR 外, α 、 β_5 、 β_3 、 β_1 的表达水平低到一定域值也会影响腺病毒有效地转移目的基因。

有研究者用组蛋白脱乙酰基酶抑制剂预处理膀胱癌细胞,可检测到 CAR 表达水平提高,进而提高腺病毒的转导效率及腺病毒制剂的治疗效果^[13-16];也有一些研究采用修饰或改变腺病毒原始亲嗜性的策略,对腺病毒外壳蛋白进行基因修饰,构建 CAR 非依赖的嵌合腺病毒基因转移载体^[17-19];还有人采用偶联双特异性分子的办法使腺病毒感染细胞的过程不依赖于 CAR 的表达^[20-21]。但对于原始亲嗜性未经改造的腺病毒为载体的基因治疗药物,鉴于 CAR 表达水平与腺病毒感染效率密切相关,在治疗前检测患者肿瘤组织中 CAR 表达水平,将有助于 Ad2 和 Ad5 相关的生物制剂在临床中个体化使用。

[参考文献]

- [1] Wiley J, Ltd S. Gene therapy clinical trials worldwide[EB/OL]. [2006 - 07 - 01]. [Http://www.wiley.co.uk/gene_therapy/clinical](http://www.wiley.co.uk/gene_therapy/clinical).
- [2] Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, *et al*. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5 [J]. *Science*, 1997, 275(5304): 1320-1323.
- [3] Hemmi S, Geertsen R, Mezzacasa A, *et al*. The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures[J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(16): 2363-2373.
- [4] Krasnykh VN, Douglas JT, van Beusechem VW. Genetic targeting of adenoviral vectors[J]. *Mol Ther*, 2000, 1(5 Pt 1): 391-405.
- [5] Persson A, Fan X, Widegren B, *et al*. Cell type- and region-dependent coxsackie adenovirus receptor expression in the central nervous system[J]. *J Neurooncol*, 2006, 78(1): 1-6.
- [6] Pearson AS, Koch PE, Atkinson N, *et al*. Factors limiting adenovirus-mediated gene transfer into human lung and pancreatic cancer cell lines[J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(12): 4208-4213.
- [7] Hao XP, Pretlow TG, Rao JS, *et al*. Beta-catenin expression is altered in human colonic aberrant crypt foci[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(22): 8085-8088.
- [8] Li Y, Pong RC, Bergelson JM, *et al*. Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: A potential impact on the efficacy of gene therapy[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(2): 325-330.
- [9] Wang Y, Wang S, Bao Y, *et al*. Coxsackievirus and adenovirus receptor expression in non-malignant lung tissues and clinical lung cancers[J]. *J Mol Histol*, 2006, 37(3-4): 153-160.
- [10] 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): 4175-4181.
- [11] Korn WM, Macal M, Christian C, *et al*. Expression of the coxsackievirus- and adenovirus receptor in gastrointestinal cancer correlates with tumor differentiation[J]. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13(8): 792-797.
- [12] Bao Y, Peng W, Verbitsky A, *et al*. Human coxsackie adenovirus receptor (CAR) expression in transgenic mouse prostate tumors enhances adenoviral delivery of genes[J]. *Prostate*, 2005, 64(4): 401-407.
- [13] Okegawa T, Nutahara K, Pong RC, *et al*. Enhanced transgene expression in urothelial cancer gene therapy with histone deacetylase inhibitor[J]. *J Urol*, 2005, 174(2): 747-752.
- [14] Watanabe T, Hioki M, Fujiwara T, *et al*. Histone deacetylase inhibitor FR901228 enhances the antitumor effect of telomerase-specific replication-selective adenoviral agent OBP-301 in human lung cancer cells[J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(3): 256-265.
- [15] Pong RC, Roark R, Ou JY, *et al*. Mechanism of increased coxsackie and adenovirus receptor gene expression and adenovirus uptake by phytoestrogen and histone deacetylase inhibitor in human bladder cancer cells and the potential clinical application[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(17): 8822-8828.
- [16] El-Zawahry A, Lu P, White SJ, *et al*. *In vitro* efficacy of AdTRAIL gene therapy of bladder cancer is enhanced by trichostatin a-mediated restoration of CAR expression and downregulation of cFLIP and Bcl-XL[J]. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13(3): 281-289.
- [17] Taki M, Kagawa S, Nishizaki M, *et al*. Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication-selective adenoviral agent OBP-405 ('Telomelysin-RGD') [J]. *Oncogene*, 2005, 24(19): 3130-3140.
- [18] Eto Y, Gao JQ, Sekiguchi F, *et al*. PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides on the tip of PEG show high transduction efficiency and antibody evasion ability[J]. *J Gene Med*, 2005, 7(5): 604-612.
- [19] Tyler MA, Ulasov IV, Borovjagin A, *et al*. Enhanced transduction of malignant glioma with a double targeted Ad5/3-RGD fiber-modified adenovirus[J]. *Mol Cancer Ther*. 2006, 5(9): 2408-2416.
- [20] Krasnykh V, Dmitriev I, Navarro JG, *et al*. Advanced generation adenoviral vectors possess augmented gene transfer efficiency based upon coxsackie adenovirus receptor-independent cellular entry capacity[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(24): 6784-6787.
- [21] Krom YD, Gras JC, Frants RR, *et al*. Efficient targeting of adenoviral vectors to integrin positive vascular cells utilizing a CAR-cyclic RGD linker protein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338(2): 847-854.

[收稿日期] 2006 - 10 - 27

[修回日期] 2006 - 11 - 14

[本文编辑] 韩 丹