

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.06.005

· 基础研究 ·

受体依赖性 TRAIL 重组腺病毒对人肺癌细胞凋亡的诱导作用

马玲娣^{1*}, 王 勇¹, 倪 诚¹, 王仕忠¹, 鲍永仪, 关乃富¹, 张 科¹, Leif G. Salford², 樊小龙²(1. 南京医科大学 附属常州市第二人民医院 中心实验室, 江苏 常州 213003; 2. The Rausing Laboratory, Lund University, SE-22184 Lund, Sweden)

[摘要] 目的: 观察重组 TRAIL 腺病毒(Ad5-TRAIL 及 Ad5F35-TRAIL)对人非小细胞肺癌(nonsmall-cell lung cancer, NSCLC)原代培养细胞和细胞株的凋亡诱导作用,探讨两种 Ad-TRAIL 用于肺癌基因治疗的价值。方法:采用流式细胞术检测人肺癌细胞系 A549、Z793、QG56 和 NCI-H520 及 10 例原代培养肺癌细胞中 CAR 和 CD46 的表达水平;分别以 Ad5-TRAIL 及 Ad5F35-TRAIL 重组腺病毒按 MOI 10 和 50 感染上述细胞,48 h 后 Annexin V-FITC 双标法流式细胞术检测细胞的早期凋亡。结果: A549、Z793、QG56 和 NCI-H520 4 株肺癌细胞中,CD46 的表达均明显高于 CAR 表达。Z793、QG56 细胞对 Ad5-TRAIL 和 Ad5F35-TRAIL 的作用较敏感, MOI = 10 感染后凋亡率分别为(11.76 ± 2.10)%、(15.96 ± 2.89)%和(6.05 ± 1.58)%、(10.11 ± 1.26)% ,显著高于对照组[(2.33 ± 0.37)%和(5.95 ± 1.89)% , $P < 0.05$]; MOI = 50 感染时 NCI-H520 细胞凋亡率分别为(12.89 ± 3.2)%和(9.08 ± 1.35)% ,与对照组(7.04 ± 2.17)% 相比差异无统计学意义($P > 0.05$); Ad5-TRAIL 和 Ad5F35-TRAIL 均不能诱导 A549 细胞凋亡。10 例原代肺癌细胞 CD46 表达也明显较 CAR 高; Ad5-TRAIL 或 Ad5F35-TRAIL 感染后,5 例的原代肺癌细胞检测到凋亡;与 Ad5-TRAIL 相比, Ad5F35-TRAIL 诱导的凋亡率更高。结论:两种 TRAIL 重组腺病毒对非小细胞肺癌细胞均有凋亡诱导作用, Ad5F35-TRAIL 的作用强于 Ad5-TRAIL,更适合于非小细胞肺癌的基因治疗。

[关键词] 非小细胞肺癌;肿瘤坏死因子受体相关凋亡诱导配体;腺病毒;凋亡;柯萨奇腺病毒受体(CAR);CD46

[中图分类号] R734.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)06-0577-06

CAR- or CD46-dependent TRAIL-adenoviral vector induced apoptosis in lung cancer cells

MA Ling-di^{1*}, WANG Yong¹, NI Cheng¹, WANG Shi-zhong¹, BAO Yong-yi¹, GUAN Nai-fu¹, ZHANG Ke¹, Leif G. Salford², FAN Xiao-long²(1. Laboratory Center, Second People's Hospital of Changzhou, Nanjing Medical University, Changzhou 213003, China; 2. The Rausing Laboratory, Lund University, SE-22184 Lund, Sweden)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of recombinant adenovirus TRAIL (Ad5-TRAIL & Ad5F35-TRAIL) on apoptosis of non-small cell lung (NSCLC) cells, so as to assess the value of Ad-TRAIL in gene therapy of NSCLC. **Methods:** CAR and CD46 expression levels in lung cancer cell lines (A549, Z793, QG56 and NCI-H520) and the primary lung cancer cells from samples of 10 NSCLC patients were assayed by flow cytometry analysis. The lung cancer cell lines and primary lung cancer cells were infected with Ad5-TRAIL & Ad5F35-TRAIL adenoviral vectors at MOI 10 or 50, respectively; the percentage of apoptosis cells labeled by Annexin V-FITC in different cells were measured by flow cytometry 48 h after transfection. **Results:** The expression of CD46 were higher than that of CAR in all the lung cancer lines (A549, Z793, QG56 and NCI-H520) and the primary lung cancer cells. Significant apoptosis was observed in Z793 and QG56 cells transfected with Ad5-TRAIL or Ad5F35-TRAIL at MOI 10, with the apoptosis rate being (11.76 ± 2.10)% (Ad5-TRAIL), (15.96 ± 2.89)% (Ad5F35-TRAIL) and (6.05 ± 1.58)% (Ad5-TRAIL), (10.11 ± 1.26)% (Ad5F35-TRAIL), respectively, compared to no adenovirus-transfected cells ([2.33 ± 0.37]% and [5.95 ± 1.89]%, respectively, $P < 0.05$). Less than 10% of apoptosis cells were detected in NCI-H520 cells transfected with Ad5- or Ad5F35-TRAIL at MOI 50 ([12.89 ± 3.2]% for Ad5-TRAIL and [9.08 ± 1.35]% for Ad5F35-TRAIL, respectively) compared to no adenovirus-transfected cells ([7.04 ± 2.17]%, $P > 0.05$). Moreover, apoptosis induced by Ad5- or

[基金项目] 江苏省社会发展基金资助项目(No. BS2007025)。Supported by the Society Development Program of Jiangsu Province (No. BS2007025)

[作者简介] 马玲娣(1973-),女,山东省烟台市人,博士,主管技师,主要从事肿瘤靶向治疗的研究。

* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: lindimalvsh@126.com

Ad5F35-TRAIL transfection in A549 cells was not detected both at MOI 10 and 50. About half of the primary lung cancer cells from 10 patients induced apoptosis after transfected with Ad5-TRAIL or Ad5F35-TRAIL vector. A higher percentage of apoptotic cells were found in Ad5F35-TRAIL group than those in Ad5-TRAIL and control groups. **Conclusion:** Ad5-TRAIL can induce apoptosis of NSCLC cells *in vitro*, and Ad5F35-TRAIL is more potent than Ad5-TRAIL, so Ad5F35-TRAIL is more suitable for gene therapy of NSCLC.

[**Key words**] TNF receptor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL); adenovirus; apoptosis; coxsackie adenovirus receptor(CAR); CD46; non-small cell lung cancer

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(6): 577-582]

肺癌是癌症导致死亡的主要原因之一。针对肺癌发生、发展的分子机制及特定的靶点诱导肺癌细胞凋亡是对肺癌进行基因治疗的有效途径^[1]。由于 TNF 受体相关的凋亡诱导配体(TNF receptor-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)能特异性诱导肿瘤细胞凋亡,对正常组织细胞无作用,因此 TRAIL 介导的细胞凋亡被认为是诱导肿瘤细胞凋亡的理想路径^[2]。但是全身应用大剂量的重组 TRAIL 蛋白会产生肝毒性,且价格昂贵,而通过腺病毒对靶细胞的高效转染,使得肿瘤组织局部表达高水平 TRAIL 分子无疑是对肺癌进行基因治疗的理想方法^[3,4]。然而目前对 TRAIL 重组腺病毒的诱导凋亡效应与腺病毒转移效率之间的关系还未见很多报道,对其在肺癌基因治疗中的作用及疗效评价还存在很多未知,为此本研究通过比较 Ad5 和 Ad5F35 介导的 TRAIL 诱导人非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)细胞的凋亡作用,探讨了 TRAIL 诱导凋亡的作用与腺病毒受体表达水平的关系,以期评价 TRAIL 腺病毒对肺癌基因治疗的疗效及其临床的应用前景提供有价值的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

RPMI 1640 培养液和胎牛血清分别为美国 Gibco 公司和 Hyclone 公司产品,胰酶、DNA 酶、透明质酸酶及胶原酶 IV 购自美国 Sigma 公司。肺鳞癌细胞株(QG56、NCI-H520)和肺腺癌细胞株(A549、Z793)购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。新鲜肺癌标本来自我院肺癌患者手术切除组织。所有患者的组织标本使用经本院伦理委员会批准,同时与患者签订外科手术切除物使用的知情同意书。携带 TRAIL 基因的重组腺病毒 Ad5-TRAIL (滴度为 1.05×10^{11} pfu/ml) 和 Ad5F5-TRAIL (滴度 6.3×10^9 pfu/ml) 由第二军医大学东方肝胆外科医院病毒与基因治疗实验室钱其军教授提供。PE 标记抗 CAR 及抗 CD46 单抗及同型对照分别为美国 Santa

Cruz 公司和 Ebioscience 公司产品,鼠抗人 EGFRv III 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 均购自福建迈新公司(Maxim Ltd.)。Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒为美国 Bipece Biopharma 公司产品。流式细胞仪(美国 BD 公司),荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司),CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司)。

1.2 人肺癌细胞的分离和原代培养

原代非小细胞肺癌标本来自新鲜的外科手术切除组织,根据 Walters 和 Duchesne^[5,6]方法制备得到。手术切除新鲜肺癌组织立即置于无菌组织保存液中,清洗后以手术刀剪剪碎,于 37 °C 以 DNA 酶(0.2 mg/ml)、透明质酸酶(0.1 mg/ml)和胶原酶(1.0 mg/ml)分别消化 30 min,过 200 目细胞筛得单细胞悬液,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基清洗 2 遍后重新悬浮,接种于 12 孔培养板中,以含 20% FBS 的 RPMI 1640 培养基(含 100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素)常规传代培养。

1.3 免疫组织化学法检测非小细胞肺癌组织中 EGFRv III 的表达

所分离的原代肺癌细胞内可能含有其他正常组织细胞,为了证实所培养细胞的恶性表型,检测了细胞中 EGFRv III 的表达。EGFRv III 是 EGFR 基因的一种突变体,目前发现其仅在肿瘤细胞中表达,据报道^[7-8],约有 50% ~ 70% 的恶性胶质瘤、40% 的乳腺癌、42% 的非小细胞肺癌和 60% 的肝癌有 EGFRv III 表达,因此可把 EGFRv III 作为一种鉴定肿瘤细胞的特异性标记。原代培养肺癌细胞调整密度为 $(1 \sim 5) \times 10^5$ /ml,接种于铺有预涂多聚赖氨酸盖玻片的 12 孔细胞培养板中,制备细胞爬片,培养条件与原代培养相同。待细胞达 80% 融合时取出细胞爬片,PBS 漂洗 2 次后 40 g/L 多聚甲醛室温固定 15 min,Envision 两步法检测 EGFRv III 表达。取出细胞爬片,分别加入鼠抗人 EGFRv III 单克隆抗体(1:5 000)及辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 37 °C 孵育后,DAB 显色,苏木精复染,中性树胶封片,镜下观察。阴性对照细胞加入一抗为非特异性鼠单

抗。EGFRv III 表达以阴性(-)、弱阳性(+)、阳性(++)和强阳性(+++)表示。

1.4 流式细胞术检测肺癌细胞中 CAR 和 CD46 的表达水平

对数生长期肺鳞癌细胞株(QG56、NCI-H520)、肺腺癌细胞株(A549、Z793)及原代培养肺癌细胞0.25%胰酶消化后离心收集,冷 PBS 清洗2次,调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,重悬于 $100 \mu\text{l}$ 缓冲液中,在细胞悬液中加入 PE 标记抗 CAR 或 CD46 抗体适量,轻轻混匀后 4°C 暗处孵育15 min,流式细胞术检测上述肺癌细胞中 CAR 和 CD46 的表达水平。

1.5 流式细胞术检测 TRAIL 重组腺病毒对不同肺癌细胞诱导凋亡的作用

对数生长期肺鳞癌细胞株(QG56、NCI-H520)、肺腺癌细胞株(A549、Z793)及原代培养肺癌细胞0.25%胰酶消化后离心收集,以含10% FCS 的 RPMI 1640 培养基调整细胞密度为 $(1 \sim 5) \times 10^5/\text{ml}$,接种于6孔板中,1 ml/孔,置于 37°C 、5% CO_2 孵箱培养24 h后,吸弃板中 RPMI 1640 完全培养基,加入无血清1640培养基1 ml,同时以无血清培养基稀释 Ad5-TRAIL 和 Ad5F35-TRAIL 为不同浓度病毒悬液,以 MOI 为10和50的感染浓度感染细胞。对照组细胞不加病毒,加入等体积病毒稀释液。感染后2 h 换用含5%血清的 RPMI 1640 培养基,1 ml/孔,于 37°C 、5% CO_2 孵育。病毒感染后48 h 消化、离心收集细胞, $100 \mu\text{l}$ 缓冲液重新悬浮,细胞悬液中分别加入 PI 及 FITC,室温暗处孵育15 min 后流式细胞仪检测凋亡细胞百分率。

1.6 统计学处理

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,数据分析采用 SPSS13.0 软件,实验组间比较采用单因素方差分析,实验组与对照组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代非小细胞肺癌细胞中 EGFRv III 的表达

所分离的原代肺癌细胞内可能含有其他正常组织细胞,为了证实所培养细胞的恶性表型,检测了细胞中 EGFRv III 的表达。EGFRv III 是 EGFR 基因的一种突变体,目前发现其仅在肿瘤细胞中表达,据报道,约有50%~70%的恶性胶质瘤、40%的乳腺癌、42%的非小细胞肺癌和60%的肝癌有 EGFRv III 表达,因此可把 EGFRv III 作为一种鉴定肿瘤细胞的特异性标记^[11-12]。检测结果发现,10 例肺癌组织标本中6例 EGFRv III 表达阳性(图1)。

2.2 肺癌细胞株 CAR 和 CD46 的表达水平

结果如图2所示,4株肺癌细胞都有 CD46 的高水平(99.08%~99.70%)表达。相对于 CD46 的高表达,CAR 的表达水平较低,但2株肺鳞癌细胞(QG56 和 NCI-H520)的 CAR 表达(84.97%,85.24%)水平明显较肺腺癌细胞(A549 和 Z793)(25.08%,35.45%)高。

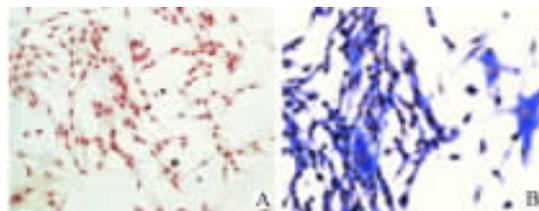


图1 免疫组织化学法检测原代肺癌细胞中 EGFRvIII 的表达($\times 200$)

Fig. 1 Expression of EGFRvIII protein in primary lung cancer cells as detected by immunohistochemical staining ($\times 200$)

A: Control; B: EGFRv III

2.3 原代培养肺癌细胞 CAR 和 CD46 的表达水平

10 例原代肺癌细胞中(均为肺腺癌),CAR 普遍低表达或不表达,CD46 的表达水平较高(表1)。

2.4 Ad5-TRAIL 和 Ad5F35-TRAIL 对肺癌细胞株的诱导凋亡作用

结果显示4株肺癌细胞中,Z793 和 QG56 细胞对 Ad5-TRAIL 和 Ad5F35-TRAIL 感染较敏感,两种 TRAIL 重组腺病毒低浓度(MOI = 10)感染时,Z793 细胞 Annexin V⁺ 细胞比例即细胞凋亡率分别为 $(11.76 \pm 2.10)\%$ 和 $(15.96 \pm 2.89)\%$,QG56 细胞凋亡率分别为 $(6.05 \pm 1.58)\%$ 和 $(10.11 \pm 1.26)\%$,显著高于对照组 $[(2.33 \pm 0.37)\%$ 和 $(5.95 \pm 1.89\%)]$ ($P < 0.05$);高浓度(MOI = 50)时,Ad5-TRAIL 和 Ad5F35-TRAIL 对 Z793 和 QG56 细胞的 Annexin V⁺/PI⁻(凋亡早期)和 Annexin V⁺/PI⁺(凋亡晚期)细胞比例较低 MOI 值时无明显变化。NCI-H520 细胞对 Ad5-TRAIL 和 Ad5F35-TRAIL 的诱导凋亡作用不太敏感,高浓度(MOI = 50)腺病毒感染后分别只有 $(12.89 \pm 3.2)\%$ 和 $(9.08 \pm 1.35)\%$ 的细胞发生凋亡,与对照组 $(7.04 \pm 2.17)\%$ 相比差异无统计学意义($P > 0.05$);此外,Ad5-TRAIL 和 Ad5F35-TRAIL 病毒感染均未能诱导 A549 细胞发生凋亡(图3)。

2.5 Ad-TRAIL 和 Ad5F35-TRAIL 对原代肺癌细胞凋亡的诱导作用

Ad5-TRAIL 或 Ad5F35-TRAIL 感染滴度为50

时(MOI = 50), 原代培养的肺癌细胞中 Annexin V⁺/PI⁻(凋亡早期)和 Annexin V⁺/PI⁺(凋亡晚期)细胞比例均较 MOI 为 10 时高, 约 50%(5/10) 的原代肺癌细胞可检测到细胞凋亡。与 Ad5-TRAIL

相比, Ad5F35-TRAIL 感染细胞 Annexin V⁺ 细胞检出率更高, 数据显示 6 例患者的原代肺癌细胞对 Ad5F35-TRAIL 诱导的细胞凋亡作用不敏感(表 1, 图 4)。

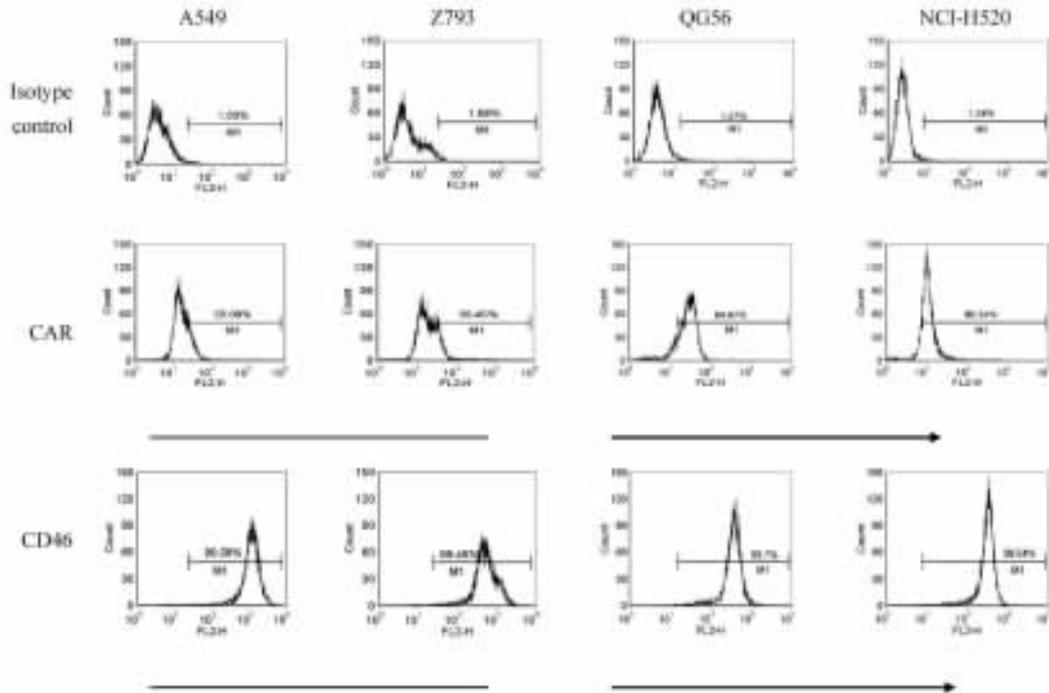


图 2 肺癌细胞株中 CAR 和 CD46 的表达

Fig. 2 CAR and CD46 expressions in lung cancer cell lines

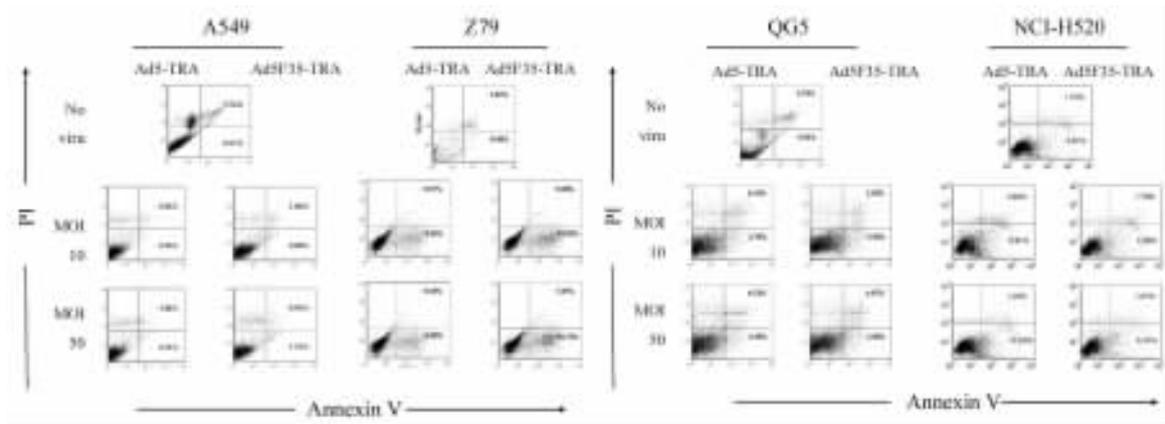


图 3 Ad5-TRAIL 和 Ad5F35-TRAIL 对肺癌细胞株凋亡的诱导作用

Fig. 3 Effects of Ad5-TRAIL and Ad5F35-TRAIL on apoptosis of lung cancer cell lines

3 讨论

已知的人类腺病毒家族共有 51 个已知血清型, 分属 6 个亚群(A 至 F), 大多数 B 组腺病毒如 35 型腺病毒(Ad35)以 CD46 分子作为受体, 其余的 5 组

腺病毒都与 CAR 分子结合^[9-10]。Ad5F35 是一种改良后的 5 型腺病毒, 分子结构中 5 型腺病毒纤突蛋白被 35 型腺病毒的纤突蛋白所替代, 其受体分子为 CD46, 同时又保留了 Ad5 对宿主细胞的高感染性^[11-12]。目前研究发现, CAR 在各种组织、细胞表

面的表达水平存在较大差异, CAR 的相对表达水平决定了一种特定细胞可否被 Ad5 转染^[13]; 但 B 组腺病毒的受体分子 CD46 是机体广泛存在的一种免疫调节分子, 肿瘤细胞中普遍存在 CD46 的表达上调^[14], 提示 CD46 受体依赖性腺病毒在肿瘤的基因治疗中可能具有更大的潜在应用价值。

表 1 肺癌原代培养细胞中 CAR 和 CD46 的表达及 Ad5-TRAIL 和 Ad5F35-TRAIL 对其凋亡的诱导作用
Tab. 1 Expressions of CAR and CD46 in primary lung adenocarcinoma cells and apoptosis inducing effects of Ad5-TRAIL and Ad5F35-TRAIL

Patient No.	CAR (%)	CD46 (%)	Apoptotic rate (%)					
			Control	Ad5-TRAIL		Ad5F35-TRAIL		
				MOI 10	MOI 50	MOI 10	MOI 50	
P1	9.62	62.19	2.94	6.13	6.65	10.51	22.67	
			7.54	17.02	19.5	34.31	49.5	
P2	3.73	84.49	1.53	11.75	11.20	10.58	16.42	
			6.53	21.54	24.14	26.52	46.31	
P3	10.05	99.12	1.28	4.74	4.59	8.13	8.98	
			5.84	11.62	12.91	15.01	17.51	
P4	19.35	99.78	7.34	9.68	13.15	12.45	14.96	
			7.66	11.81	14.93	14.27	17.56	
P5	6.21	98.36	7.51	1.93	5.62	5.68	7.34	
			7.83	10.68	10.46	19.49	24.47	
P6	29.83	99.87	5.90	4.68	5.45	6.89	7.90	
			9.19	8.04	9.65	13.76	12.7	
P7	20.45	99.51	9.25	4.85	5.32	4.81	4.50	
			10.54	5.21	5.85	5.01	4.98	
P8	17.78	98.52	4.84	2.25	1.84	2.79	2.58	
			14.01	6.3	5.74	7.14	7.19	
P9	17.31	99.87	0.90	1.50	1.16	1.31	1.39	
			2.77	4.28	5.44	4.19	4.92	
P10	10.24	99.74	4.26	1.29	2.73	1.87	3.61	
			9.37	4.01	8.99	5.76	11.71	

本研究中发现 4 株人 NSCLC 细胞株中, 2 株肺鳞癌细胞(QG56 和 NCI-H520)对 Ad5-TRAIL 和 Ad5F35-TRAIL 的诱导凋亡效应都表现出较高的敏感性; 对其受体表达情况分析发现, 该 2 株细胞 CAR 和 CD46 的表达水平均较高(分别为 85% 和 99% 以上)。2 株肺腺癌细胞中, Z793 对 Ad5-TRAIL 和 Ad5F35-TRAIL 的诱导凋亡作用在 4 株细胞中最为敏感, CAR 和 CD46 的表达水平分别为

35% 和 99% ; A549 细胞对两者均不敏感, 目前具体机制不明, 可能与实验条件或使用的细胞株的生物学特性差异有关。在 10 例原代培养的肺腺癌细胞中, 与 Ad5-TRAIL 相比, Ad5F35-TRAIL 感染的 Annexin V⁺ 细胞(早期和晚期凋亡细胞)检出率更高; 受体表达情况分析证实, 这 10 例原代肺腺癌细胞普遍有 CD46 的高表达(60% ~ 99%), 而 CAR 的表达水平则不到 30% , 提示 NSCLC 细胞 CAR 和 CD46 的表达水平是决定其对 TRAIL 作用是否敏感的重要影响因素。之前的研究^[15]显示, 大部分肺鳞癌中存在 CAR 的高水平表达; 而 CD46 在大部分腺癌中高表达, 在肺鳞癌中低表达或不表达。本实验室同期研究发现, 检测的 10 例原代肺腺癌细胞经 Ad5F35-GFP 腺病毒感染后, GFP 表达阳性细胞比率明显高于相同浓度下 Ad5-GFP 感染的阳性率, 显示 CD46 高表达的 NSCLC 细胞中, 依赖 CD46 受体的 Ad5F35 腺病毒具有更高的基因转移效率, 同时提示 NSCLC 细胞上腺病毒受体的表达水平的确是影响腺病毒基因转导效率的决定性因素, 腺病毒介导的基因转移中, 肺鳞癌可能优先选择 Ad5, 而肺腺癌则优先选择 Ad5F35(结果另文发表)。

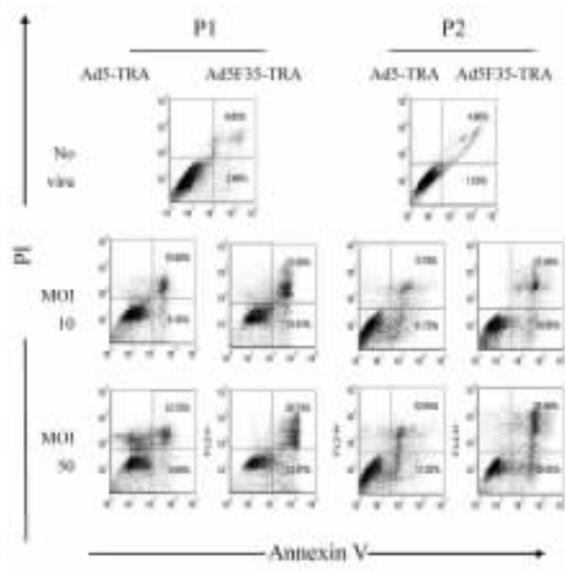


图 4 Ad5-TRAIL 和 Ad5F35-TRAIL 对原代肺癌细胞凋亡的诱导作用

Fig. 4 Effects of Ad5-TRAIL and Ad5F35-TRAIL on apoptosis of primary lung cancer cells

此外研究还发现, 10 例原代培养的肺腺癌细胞中 4 例有 CD46 的高水平表达, 但细胞对 Ad5F35-TRAIL 作用却表现为耐受或不敏感, 提示影响重组 TRAIL 腺病毒对 NSCLC 细胞的诱导

凋亡效应可能还存在有其他的因素,其原因可能并非基因转导的效率不高而是细胞对 TRAIL 的诱导凋亡作用存在抵抗。目前研究发现,肿瘤细胞在多种情况下存在对 TRAIL 的抵抗,可能的机制是:(1)没有死亡结构域的诱捕受体 DcR1 和 DcR2 与死亡受体竞争性地结合 TRAIL,从而导致 TRAIL 的作用被抵抗^[1];(2)某些抗凋亡分子,如 O-糖基转移酶和 myc 等可影响细胞对 TRAIL 作用的灵敏性^[16];(3)肿瘤细胞内 Akt 信号途径的激活也可介导细胞对 TRAIL 产生抗性^[17];(4)多种组织细胞中存在的凋亡抑制蛋白可通过抑制下游 caspase 分子(如 caspase3 和 caspase7)的活化介导细胞对 TRAIL 的抗性^[18]。

尽管腺病毒感染宿主细胞的过程是一个复杂和多因素影响的过程,但与细胞膜上特异性受体的结合是其感染的先决条件,故腺病毒受体的类型是决定其感染特异性及有效性的重要因素。本研究在明确人 NSCLC 细胞腺病毒受体 CD46 和 CAR 表达水平的基础上,通过比较 Ad5 和 Ad5F35 介导的 TRAIL 基因转导诱导人 NSCLC 细胞的凋亡作用,证实两者均可诱导人 NSCLC 细胞凋亡,而 CD46 依赖性的 Ad5F35-TRAIL 腺病毒较 CAR 依赖性的 Ad5-TRAIL 腺病毒更易诱导细胞发生凋亡,且没有明显的细胞毒性,故认为 Ad5F35-TRAIL 可能更适合人 NSCLC 的基因治疗。

[参 考 文 献]

- [1] Ashkenazi A, Herbst RS. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(6): 1979-1990.
- [2] Voortman J, Resende TP, Abou El Hassan MA, *et al.* TRAIL therapy in non-small cell lung cancer cells: sensitization to death receptor-mediated apoptosis by proteasome inhibitor bortezomib [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(3): 2103-2112.
- [3] Yang F, Shi P, Xi X, *et al.* Recombinant adenoviruses expressing TRAIL demonstrate antitumor effects on non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Med Oncol*, 2006, 23(2): 191-204.
- [4] Kim CY, Jeong M, Mushiaki H, *et al.* Cancer gene therapy using a novel secretable trimeric TRAIL [J]. *Gene Ther*, 2006, 13(4): 330-338.
- [5] Walters RW, Freimuth P, Moninger TO, *et al.* Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape [J]. *Cell*, 2002, 110(6): 789-799.
- [6] Duchesne GM, Eady JJ, Peacock JH, *et al.* A panel of human lung carcinoma lines: establishment, properties and common characteristics [J]. *Br J Cancer*, 1987, 56(3): 287-293.
- [7] Yu H, Gong X, Luo X, *et al.* Co-expression of EGFRv III with ErbB-2 enhances tumorigenesis: EGFRv III mediated constitutively activated and sustained signaling pathways, whereas EGF-induced a transient effect on EGFR-mediated signaling pathways [J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(11): 1818-1828.
- [8] 欧超, 吴飞翔, 罗元, 等. 表皮生长因子受体 III 型突变体在肝细胞癌中的表达及意义 [J]. *癌症*, 2005, 24(2): 166-169.
- [9] Mirza M, Raschperger E, Philipson L, *et al.* The cell surface protein coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) directly associates with the ligand-of-numb protein-X2 (LNX2) [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 309(1): 110-120.
- [10] Dorner AA, Wegmann F, Butz S, *et al.* Coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) is essential for early embryonic cardiac development [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt 15): 3509-3521.
- [11] Asher DR, Cerny AM, Weiler SR, *et al.* Coxsackievirus and adenovirus receptor is essential for cardiomyocyte development [J]. *Genesis*, 2005, 42(2): 77-85.
- [12] Fok PT, Huang KC, Holland PC, *et al.* The Coxsackie and adenovirus receptor binds microtubules and plays a role in cell migration [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(10): 7512-7521.
- [13] Chen JW, Zhou B, Yu QC, *et al.* Cardiomyocyte-specific deletion of the coxsackievirus and adenovirus receptor results in hyperplasia of the embryonic left ventricle and abnormalities of sinuatrial valves [J]. *Circ Res*, 2006, 98(7): 923-930.
- [14] Marttila M, Persson D, Gustafsson D, *et al.* CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7 [J]. *J Virol*, 2005, 79(22): 14429-14436.
- [15] Paez JG, Janne PA, Lee JC, *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy [J]. *Science*, 2004, 304(5676): 1497-1500.
- [16] Wagner KW, Punnoose EA, Januario T, *et al.* Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL [J]. *Nat Med*, 2007, 13(9): 1070-1077.
- [17] Ricci MS, Jin Z, Dews M, *et al.* Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(19): 8541-8555.
- [18] Meng XW, Lee SH, Dai H, *et al.* Mcl-1 as a buffer for proapoptotic Bel-2 family members during TRAIL-induced apoptosis: a mechanistic basis for sorafenib (Bay 43-9006)-induced TRAIL sensitization [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(41): 29831-29846.

[收稿日期] 2009-09-20

[修回日期] 2009-11-08

[本文编辑] 王莹