

• 实验研究 •

一氧化氮对组织特异性溶瘤腺病毒转染膀胱
肿瘤细胞的影响田俊强¹ 李仁举¹ 王志平¹ 卢建中¹ 付生军¹ 史庭凯¹ 马宝良¹ 熊彬² 陶燕¹

[摘要] 目的:研究一氧化氮(NO)对肿瘤组织特异性溶瘤病毒转染过程的影响及对外源基因表达的调节作用。方法:构建组织特异性溶瘤腺病毒,常规培养膀胱肿瘤 BIU-87 和 5637 细胞株,以硝普钠作为外源性 NO 的供体。应用 PTIO 和 L-NMMA 分别作为内源性 NO 的清除剂和诱导型一氧化氮合酶(NOS)的抑制剂。采用 Nitrate/Nitrite Assay Kit 检测 NO 和(或)病毒作用前后膀胱肿瘤细胞培养液中的 NO 水平。应用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测 NO 对重组病毒抗肿瘤细胞增殖的影响;透射电镜观察腺病毒颗粒进入细胞情况和亚细胞结构变化。结果:膀胱肿瘤细胞 BIU-87 和 5637 本身培养液中 NO 水平很低,给予外源性 NO 供体后 NO 水平随时间延长而升高。重组病毒 Ad-UP II-E₁A 能通过 E1A 基因发挥溶瘤作用。NO 能够促进该病毒转染入 BIU-87、5637 细胞。50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 NO 联合 Ad-UP II-E₁A 30 MOI 作用后能够促进肿瘤细胞的增殖,而 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 NO 联合重组腺病毒作用后则促进肿瘤细胞的死亡。NO 对 Ad-UP II-E₁A 的作用具有时间依赖性。透射电镜观察发现,重组病毒 Ad-UP II-E₁A 能够进入并在膀胱肿瘤细胞内复制,而 NO 能够提高病毒的转染效率并引起肿瘤细胞自吞噬和凋亡。结论:NO 能够促进溶瘤腺病毒 Ad-UP II-E₁A 转染膀胱肿瘤细胞的效率,但 NO 因其浓度不同对溶瘤腺病毒的溶瘤效果具有双向调节作用,低剂量的 NO 能够下调重组病毒 E1A 的表达从而促进肿瘤细胞增殖,而高剂量的 NO 通过上调 E1A 的表达因而发挥溶瘤效应。

[关键词] 膀胱肿瘤;一氧化氮;溶瘤腺病毒;基因治疗**[中图分类号]** R737.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-1420(2012)02-0150-04The effect of nitric oxide on the tissue-specific oncolytic adenovirus
transfection of bladder tumor cellsTIAN Junqiang¹ LI Renju¹ WANG Zhiping¹ LU Jianzhong¹FU Shengjun¹ SHI Tingkai¹ MA Baoliang¹ XIONG Bin² TAO Yan¹¹Department of Urology, Institute of Urology, the Second Hospital of Lanzhou University; the Key Laboratory of Urinary Diseases of Gansu Province, Lanzhou, 730030, China;²Department of Hematology, the Second Hospital of Lanzhou University)

Corresponding author: TIAN Junqiang, E-mail: tjq007263@sina.com

Abstract Objective: To study the effect of nitric oxide(NO) on tumor-specific oncolytic adenovirus transfection process and the impact of exogenous gene expression regulation. **Methods:** A tissue-specific oncolytic adenovirus was constructed previously. BIU-87 and 5637 bladder cancer cell lines were cultured. Sodium nitroprusside (SNP), Carboxy-PTIO (PTIO) and NG-Monomethyl-L-arginine (L-NMMA) were applied respectively as exogenous NO donor, endogenous NO scavenger and nitric oxide synthase(NOS) inhibitor. NO level in cell culture medium before and after SNP and/or virus intervention was detected by Nitrate/Nitrite Assay. The proliferation of bladder cancer cells before and after intervention by recombinant viruses and / or SNP detected by MTT assay. Transmission electron microscopy(TEM) was used to observe adenovirus particles within cells and the changes of subcellular structure. **Results:** Low levels of NO were detected in BIU-87 or 5637 cell culture medium itself, but NO concentration increased with time when cells exposed to exogenous NO donor SNP. Recombinant virus Ad-UP II-E₁A has high purity and titer, and plays the oncolytic effect through E1A gene. NO can promote the virus transfer into BIU-87, 5637 cells, 50 $\mu\text{mol/L}$ or 100 $\mu\text{mol/L}$ NO combined with Ad-UP II-E₁A 30 MOI can enhance tumor cells proliferation, while 200 $\mu\text{mol/L}$ NO combined with adenovirus can promote tumor cells death,

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 30800206/C050605);兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金资助(No. lzujbky-2009-103)

¹兰州大学第二医院泌尿外科;兰州大学第二医院泌尿外科研究所;甘肃省泌尿系疾病重点实验室(兰州, 730030)

²兰州大学第二医院血液科

通信作者:田俊强, E-mail: tjq007263@sina.com

and the role of NO on Ad-up II-E₁A is time-dependent. The recombinant virus Ad-UP II-E₁A can enter and replicate within bladder tumor cells. NO can increase the transfection efficiency of tissue-specific oncolytic adenovirus and also induce more tumor cell autophagy and apoptosis. **Conclusions:** Free radical nitric oxide can promote oncolytic adenovirus Ad-UP II-E₁A transfected into bladder cancer cells, but NO plays a bidirectional regulation (positive and negative) role in the gene therapy of oncolytic adenovirus for bladder cancer according to different NO concentrations. Low doses NO can reduce the E1A gene expression of recombinant virus so as to promote tumor cell proliferation, while high doses NO can upregulate E1A expression.

Key words bladder cancer; nitric oxide; oncolytic adenovirus; gene therapy

膀胱癌是我国泌尿外科最常见的肿瘤之一,且术后复发率高,严重威胁着人类的健康和生命。基因治疗被认为是非常有前景的治疗肿瘤的手段,为攻克困扰人类健康的重大疾病(如癌症)提供了治愈的可能^[1]。溶瘤病毒,特别是溶瘤腺病毒(oncolytic adenovirus)为这种可能提供了一种新型的治疗模式。但溶瘤腺病毒存在感染效率及目的基因表达较低而致其应用受到限制。有研究表明,外源性NO可显著提高JNK、c-myc的活性,从而影响基因的转录和翻译过程^[2-3]。本实验用我们早期构建的组织特异性溶瘤腺病毒^[4]感染膀胱肿瘤细胞,并用硝普钠作为NO的体外供体,研究NO对腺病毒感染膀胱肿瘤细胞的过程及目的基因表达的影响,旨在探讨提高膀胱肿瘤基因治疗的策略。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

一氧化氮供体 SNP(sodium nitroprusside)、一氧化氮清除剂 PTIO、一氧化氮合酶抑制剂 L-NMMA 及总一氧化氮检测试剂盒(total nitric oxide assay kit,即 nitrate/nitrite assay kit)均购于中国碧云天公司(Beyotime)。人膀胱癌细胞系 5637、BIU-87 均为兰州大学第二医院泌尿研究所保存。培养条件:RPMI-1640 培养基,10%小牛血清,5% CO₂、37℃恒温孵箱培养。我们先期制备的膀胱癌特异性重组人溶瘤腺病毒 Ad-UP II-E₁A 为兰州大学第二医院泌尿研究所实验室保存^[4]。

1.2 实验方法

硝普钠、腺病毒作用实验:取对数生长期 5637、BIU-87 细胞,调整细胞浓度为 5×10^5 /ml,接种到 96 孔板中,设置对照组、单独病毒干预组、单独 SNP 干预组、SNP 联合 Ad 干预组、PTIO 干预组及 L-NMMA 干预组,每组设 3 个平行复孔。实验组加入膀胱癌特异性重组人溶瘤腺病毒 Ad-UP II-E₁ 为 30 MOI,加入硝普钠至终浓度为 50 μ mol/L、100 μ mol/L、200 μ mol/L,一氧化氮清除剂 PTIO 或一氧化氮合酶抑制剂 L-NMMA 终浓度为 1 mmol/L。培养 72 h 后,取细胞悬液 40 μ l,用一氧化氮检测试剂盒说明书提供的方法测定 NO 含量^[5]。测定细胞的生存率,在培养 24 h、48 h、72 h、

96 h、120 h 后分别用 MTT 法检测光密度(optical density, OD)值,绘制细胞生长曲线。计算公式:细胞生存率 = 处理组 A₄₉₀/正常组 A₄₉₀ × 100%。

透射电镜观察:选取膀胱肿瘤细胞 BIU-87 为实验对象,分别予以单独重组溶瘤腺病毒 Ad-UP II-E₁A 30 mol、Ad30 MOI 联合 SNP100 μ mol/L 干预后,选取无干预的 BIU-87 细胞作为空白对照。置于培养箱中孵育 72 h,消化细胞, PBS 洗涤 2 次,离心获取细胞,添加适量戊二醛固定细胞 30 min,在 JEM-1230 透射电镜下进行腺病毒颗粒及超微结构观察^[6]。

NO 含量测定方法:原理是硝酸盐还原酶可以将硝酸盐还原为亚硝酸盐,然后通过经典的 Griess reagent 检测亚硝酸盐,从而测定出总 NO 量。NO 本身极不稳定,在细胞内很快代谢为硝酸盐和亚硝酸盐,通过该方法可以检测出所有的硝酸盐和亚硝酸盐的量,从而推算出总 NO 量。依次加入标准品、样品和检测试剂,反应避光进行,室温孵育 10 min 后测定 A₅₄₀。根据标准品曲线计算出样品中 NO 浓度。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SigmaPlot11.0 和 SPSS13.0 软件对数据分析处理。两独立样本组间均数比较采用 Student's *t* 检验,多组间均数比较采用方差分析(analysis of variance, ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

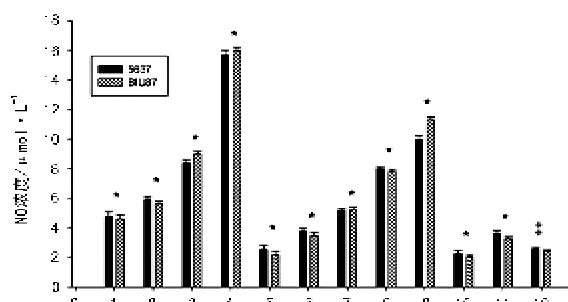
2.1 细胞培养液中 NO 水平

根据标准曲线方程($y = 1.342X^{-2.1005}$, *y* 为吸光度值, *X* 为 NO 浓度)计算,未予以 NO 和重组病毒干预时,5637 细胞培养液中 NO 浓度为 $(4.75 \pm 0.34) \mu$ mol/L。根据标准曲线方程计算,未予以 NO 和重组病毒干预时,BIU-87 细胞培养液中 NO 浓度为 $(4.58 \pm 0.29) \mu$ mol/L。

2.2 硝普钠、腺病毒作用后 NO 含量

给予外源性 SNP 高、中、低剂量(分别为 200 μ mol/L、100 μ mol/L、50 μ mol/L)后,培养液上清 NO 含量呈剂量依耐性增加($P < 0.05$),200 μ mol/L 的 SNP 作用后较正常对照组增加约 3 倍(图 1);给予重组腺病毒 Ad-UP II-E₁A 30 mol 作用 72 h

后,培养液中 NO 含量变化不明显($P>0.05$)(图 1);SNP 联合腺病毒作用后,培养液上清中 NO 含量较单纯腺病毒组略有增加($P<0.05$);同时在腺病毒作用基础上添加 NO 清除剂 PTIO 和内生性一氧化氮合酶(NOS)抑制剂 L-NMMA 后,两种肿瘤细胞培养液中 NO 含量较单纯细胞组均有所减少($P<0.05$),而与单纯病毒组比较则差异无统计学意义($P>0.05$)(图 1)。



1:空白对照;2:SNP(50 $\mu\text{mol/L}$);3:SNP(100 $\mu\text{mol/L}$);4:SNP(200 $\mu\text{mol/L}$);5:PTIO(1 mmol/L);6:L-NMMA(1 mmol/L);7:Ad+SNP(50 $\mu\text{mol/L}$);8:Ad+SNP(100 $\mu\text{mol/L}$);9:Ad+SNP(200 $\mu\text{mol/L}$);10:AD+PTIO;11:Ad+L-NMMA;12:Ad(30 MOD)。

*:与对照组比较 $P<0.05$;+:与对照组比较 $P>0.05$ 。

图 1 肿瘤细胞培养液中 NO 的浓度

2.3 腺病毒、硝普钠对膀胱肿瘤细胞增殖的影响

通过应用外源性 NO 供体硝普钠,以溶瘤腺病毒转染膀胱肿瘤细胞作为观察体系,发现 NO 能够促进 Ad-UP II-E₁A 转染入膀胱肿瘤细胞(5637、BIU-87),50 $\mu\text{mol/L}$ 或 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 NO 联合 Ad-UP II-E₁A 作用膀胱肿瘤细胞后能够促进细胞的增殖,而 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 NO 联合重组腺病毒作用后则存活的肿瘤细胞减少($P<0.05$),提示不同剂量 NO 对溶瘤腺病毒溶膀胱肿瘤细胞的效果不同,NO 对重组病毒 Ad-UP II-E₁A 的溶瘤作用的调节具有明显的剂量依赖性(图 2,3)。

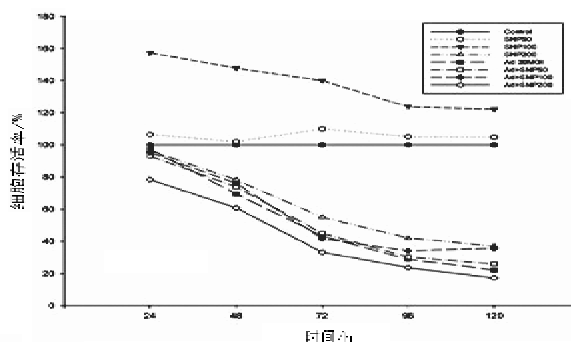


图 2 NO 及重组病毒对 5637 细胞干预不同时间后的抗增殖作用

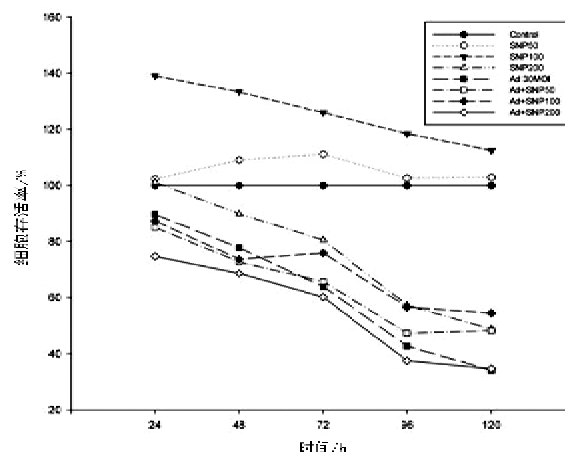
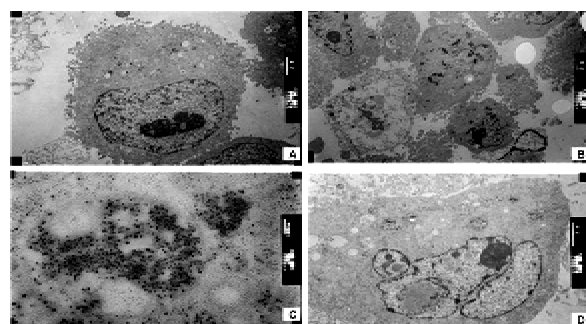


图 3 NO 及重组病毒对 BIU-87 细胞干预不同时间后的抗增殖作用

2.4 透射电镜检测病毒颗粒和细胞形态变化

为了直观地研究重组病毒 Ad-UP II-E₁A 是否能够进入膀胱肿瘤细胞,NO 作用后对进入细胞的病毒密度和量以及对亚细胞结构的影响,我们采用透射电镜进行了观察。观察发现重组病毒 Ad-UP II-E₁A 能够进入膀胱肿瘤细胞内,并进行复制进而引起肿瘤细胞的溶解。给予外源性 NO 作用后,进入肿瘤细胞的病毒数量增加,肿瘤细胞出现核边集,并发生坏死、凋亡(图 4)。



A:BIU-87 肿瘤细胞(空白对照),可见核分叶等恶性肿瘤细胞改变($\times 3\,000$);B:Ad-UP II-E₁A 30 MOI 作用 BIU-87 细胞后 72 h,见病毒进入胞质和胞核($\times 2\,000$);C、D:Ad30 MOI 及 SNP100 $\mu\text{mol/L}$ 作用 BIU-87 细胞后 72 h,见大量病毒进入细胞内,可见病毒包涵体、凋亡小体及典型的自噬体,有溶酶体包裹腺病毒颗粒现象(C 图 $\times 50\,000$,D 图 $\times 4\,000$)。

图 4 透射电镜观察 BIU-87 细胞内病毒颗粒及亚细胞结构变化

3 讨论

溶瘤腺病毒作为载体进行基因治疗是一种非常具有前景的治疗手段。2005 年,我国批准了溶瘤腺病毒制剂作为药物应用于临床治疗头颈部鳞状上皮细胞癌^[7]。但影响溶瘤腺病毒作用发挥的障碍仍然有几项,其中包括转染效率和病毒的特异性复制。为能提高腺病毒转染膀胱肿瘤细胞的效率已进行了诸多研究。NO 是一种重要的信息分子,可

通过影响基因的转录和翻译过程而调节腺病毒的转染及病毒复制过程,其对肿瘤细胞的作用及其过程尚未完全清楚^[8]。在有关 NO 的实验研究中,硝普钠是常用的供体之一。在巯基化合物作用下、或在细胞色素 P-450 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸发生系统催化下,被逐渐分解并释放 NO,常被用来模拟体内 NO 释放过程。溶瘤腺病毒 Ad-UP II-E₁A 是我们构建的一系列溶瘤腺病毒中作用过程最为明确的一种,其通过组织特异性启动子 UPII 来控制 E1A 基因的表达,实现其组织特异性。

本实验通过检测膀胱肿瘤细胞培养液中本身的 NO 水平,我们发现 BIU-87 和 5637 细胞本身能够释放少量的 NO。外源性 NO 供体 SNP 能够不断释放到培养液中并进入细胞发挥作用,给予 NO 清除剂和 NOS 抑制剂均能起到减少 NO 浓度的作用。重组人溶瘤腺病毒 Ad-UP II-E₁A 作用于肿瘤细胞后本身对 NO 水平影响较小,但在病毒作用基础上给予外源性 NO 后则肿瘤细胞培养液中 NO 的水平较单纯重组病毒作用后的 NO 水平明显增加。

我们的研究表明,50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 水平的 NO 能够促进瘤细胞的增殖,而 200 $\mu\text{mol/L}$ 水平的 NO 能够促进肿瘤细胞的溶解和凋亡,提示 NO 剂量不同可能对溶瘤腺病毒产生“正/负”双向调控的作用,低剂量的 NO 抑制重组人膀胱癌特异性溶瘤腺病毒对膀胱肿瘤的杀伤效应,而高剂量的 NO 则促进重组病毒对肿瘤细胞的溶解。细胞增殖的抑制程度随细胞培养液中 NO 浓度增加而增加。在 Wangsen Cao 等的研究中,将野生型 5 型腺病毒感染 Hela 细胞并用 mM 水平的 NO 供体 EDTA-NONOate(diethylenetriamine NONOate)作用 60 h 后,免疫细胞化学法检测腺病毒六邻体蛋白,发现 NO 可以抑制腺病毒复制^[9,10]。这些结果提示 NO 对溶瘤腺病毒的作用与其剂量有关,剂量的差异可能导致溶瘤腺病毒对膀胱癌细胞作用的差异。

组织特异性溶瘤腺病毒 Ad-UP II-E₁A 进入肿瘤细胞是其发挥抗肿瘤作用的必需步骤,我们通过透射电镜直接观察到 NO 对腺病毒进入细胞的影响,表明 NO 作用后能够促进重组病毒颗粒进入瘤细胞内,并进行大量复制和表达,最终引起细胞死亡和凋亡,可较好地解释 NO 影响病毒—肿瘤细胞间相互作用的一个侧面。

我们地实验结果表明:NO 供体硝普钠对组织特异性溶瘤腺病毒转染膀胱肿瘤细胞的过程具有促进作用,低剂量 NO 联合重组病毒 Ad-UP II-

E₁A 30MOI 作用后能够促进肿瘤细胞的增殖,而高剂量 NO 联合重组腺病毒作用可增加对肿瘤细胞的抑制作用;并且 NO 对 Ad-UP II-E₁A 的这种作用具有时间依赖性。为研究 NO 对其他肿瘤特异性腺病毒基因治疗的影响提供理论根据。

参考文献

- [1] TANG W, HE Y, ZHOU S, et al. A novel Bifidobacterium infantis-mediated TK/GCV suicide gene therapy system exhibits antitumor activity in a rat model of bladder cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28:155.
- [2] PARK S W, LI J, LOH H H, et al. A novel signaling pathway of nitric oxide on transcriptional regulation of mouse kappa opioid receptor gene[J]. J Neurosci, 2002,22:7941—7947.
- [3] KHALKHALI-ELLIS Z, HENDRIX M J. Nitric oxide regulation of maspin expression in normal mammary epithelial and breast cancer cells[J]. Am J Pathol, 2003,162:1411—1417.
- [4] HE X D, WANG Z P, WEI H Y, et al. Construction of urothelium-specific recombinant adenovirus and its inhibition in bladder cancer cell[J]. Urol Int, 2009, 82:209—213.
- [5] LI Q F, ZHU Y S, JIANG H, et al. Isoflurane preconditioning ameliorates endotoxin-induced acute lung injury and mortality in rats[J]. Anesth Analg, 2009,109:1591—1597.
- [6] LIU W, CAO Y, FERNANDEZ M I, et al. Additive antitumoral effect of interleukin-12 gene therapy and chemotherapy in the treatment of urothelial bladder cancer in vitro and in vivo[J]. Int Urol Nephrol, 2011, 43:721—727.
- [7] YAMAMOTO M, CURIEL D T. Current issues and future directions of oncolytic adenoviruses[J]. Mol Ther, 2010,18:243—250.
- [8] MOCELLIN S. Nitric oxide: cancer target or anticancer agent[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2009,9: 214—236.
- [9] CAO W, BAO C, LOWENSTEIN C J. Inducible nitric oxide synthase expression inhibition by adenovirus E1A[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003,100: 7773—7778.
- [10] CAO W, BANIECKI M L, MCGRATH W J, et al. Nitric oxide inhibits the adenovirus proteinase in vitro and viral infectivity in vivo[J]. FASEB J, 2003,17:2345—2346.

(收稿日期:2011-09-15)