

# 携带 $mK5$ 基因的重组腺病毒联合多西他赛对 LNCaP细胞的体外抗癌作用探究

胡云<sup>1</sup> 方先龙<sup>2</sup> 顾锦法<sup>2,3</sup> 杨圆圆<sup>2</sup> 李慧<sup>2</sup> 刘新垣<sup>1,2,3</sup> 章康健<sup>2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>浙江理工大学生命科学与医药学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018; <sup>2</sup>上海元宋生物技术有限公司, 上海 201401; <sup>3</sup>中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031;)

**摘要** 该文通过携带 $mK5$ 基因的溶瘤腺病毒Onco<sup>Ad</sup>- $mK5$ 联合多西他赛(docetaxel, DTX)处理前列腺癌细胞株LNCaP, 以探究两者联合作用的体外抗癌效果。采用CCK-8法分别检测Onco<sup>Ad</sup>- $mK5$ 、docetaxel以及两者联合用药对LNCaP增殖的抑制作用; 用显微镜分别观察Onco<sup>Ad</sup>- $mK5$ 、多西他赛单独作用及两者联合作用引起的细胞形态学变化; 利用Hoechst 33258染色、流式细胞术检测各处理组细胞的凋亡情况; Western blot检测E1A、 $mK5$ 以及凋亡相关蛋白Caspase-8、XIAP、PARP的蛋白质表达水平; 实时荧光定量PCR(Q-PCR)分析处理组细胞的血管内皮细胞生长因子(VEGF) mRNA水平变化。结果表明: 感染复数(multiplicity of infection, MOI)=4的溶瘤腺病毒Onco<sup>Ad</sup>- $mK5$ 与5 nmol/L的docetaxel能够协同抑制LNCaP的生长, 且两者联合处理组的细胞凋亡现象比单独作用的效果更明显, 这一新的药物组合为前列腺癌的临床治疗提供了参考。

**关键词** 多西他赛; Onco<sup>Ad</sup>- $mK5$ ; 前列腺癌; VEGF; 抗癌作用;

## Antitumor Research of Recombinant Adenovirus Carrying $mK5$ gene Combined with Docetaxel on LNCaP Cell *in vitro*

Hu Yun<sup>1</sup>, Fang Xianlong<sup>2</sup>, Gu Jinfa<sup>2,3</sup>, Yang Yuanyuan<sup>2</sup>, Li Hui<sup>2</sup>, Liu Xinyuan<sup>1,2,3</sup>, Zhang Kangjian<sup>2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; <sup>2</sup>Shanghai Yuan Song Biological Technology, Shanghai 201401, China; <sup>3</sup>Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** A recombinant adenovirus carrying the  $mK5$  gene (Onco<sup>Ad</sup>- $mK5$ ) was combined with docetaxel (DTX) for the evaluation of antitumor effect in prostatic cancer cell line LNCaP *in vitro*. CCK8 assay was used to respectively detect inhibitory effects of Onco<sup>Ad</sup>- $mK5$ , docetaxel, the combination of Onco<sup>Ad</sup>- $mK5$  and docetaxel on the growth of prostatic cancer cell lines. Morphological analysis was checked by microscope in prostatic cell line LNCaP treated by single Onco<sup>Ad</sup>- $mK5$  or docetaxel only, or by combination. Hoechst 33258 staining and flow cytometry assay were performed to determine the apoptosis effects of single and combinational therapy on prostatic cell line LNCaP, respectively. Besides, the protein levels of E1A,  $mK5$ , and apoptosis related protein Caspase-8, XIAP and PARP were determined by Western blot. In addition, real-time quantitative PCR was used to analyze changes in vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA levels in the treated cells. The results illustrated that 4 MOI oncolytic adenovirus Onco<sup>Ad</sup>- $mK5$  and 5 nmol/L docetaxel could synergistically inhibit the growth of prostate

收稿日期: 2018-12-06

接受日期: 2019-02-25

国家自然科学基金青年科学基金(批准号: 31701220)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-54921139, E-mail: zhangkangjian@sibcb.ac.cn

Received: December 6, 2018

Accepted: February 25, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China Youth Science Foundation Project (Grant No.31701220)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54921139, E-mail: zhangkangjian@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2019-06-14 14:38:24

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190614.1438.006.html>

cancer cell line LNCaP, and the apoptosis effect of the combination treated group was more obvious than that of the single treatment. This new drug combination strategy provides a reference for the treatment of prostate cancer in clinical situations.

**Keywords** docetaxel; Onco<sup>Ad</sup>-mK5; prostate cancer; *VEGF*; antitumor effect;

据全球癌症数据统计分析, 2018年全球将有近130万前列腺癌新增病例和35.9万例相关死亡病例<sup>[1]</sup>, 前列腺癌已成为欧美男性发病率最高, 死亡率居第二位的恶性肿瘤。在我国, 人们受工作压力、饮食结构和生活方式的影响, 前列腺癌的发病率呈逐年上升趋势。目前, 针对前列腺癌的疗法, 主要包括雄激素消融、前列腺切除术、放射疗法和化学疗法, 但对于晚期转移性的前列腺癌患者, 术后五年生存率并不理想。因此, 寻找更经济有效的前列腺癌治疗方案迫在眉睫。

前列腺癌的生长和转移是血管生成依赖性的。因此, 肿瘤募集的微血管内皮细胞已成为癌症治疗的重要靶点<sup>[2]</sup>。当前应用于抗肿瘤的血管新生抑制剂有一类属于大分子蛋白的水解产物, 比如已应用于临床的内皮抑素和血管抑素, 它们分别是Collagen XVIII和纤溶酶原的水解产物。K5(kringle 5)是纤溶酶原(plasminogen)的第五个三环结构域, 在抑制内皮细胞增殖、迁移, 诱导细胞凋亡和肿瘤血管生成方面有很大的优势<sup>[3-5]</sup>。2008年, Fan等<sup>[6]</sup>将K5赖氨酸结合位点处的71位亮氨酸定点诱变为精氨酸, 此外在K5的5'端加了19个氨基酸的信号肽序列, 他们将此突变体基因(mK5)插入到ZD55腺病毒载体内, 构建了重组溶瘤病毒ZD55-mK5, 在结肠癌体外及体内都达到了不错的抗癌效果。抗血管生成基因治疗可以克服重组蛋白药物靶向性的问题, 因此成为治疗癌症的有效策略<sup>[7]</sup>。

多西他赛(docetaxel)又名多西紫杉醇, 是一种作用于细胞周期M期的特异性紫杉烷类药物, 它通过加强微管蛋白聚合作用和抑制微管解聚作用, 形成稳定的非功能性维管束, 从而破坏肿瘤细胞的有丝分裂达到抗癌效果, 已成为激素类难治性前列腺癌的标准一线药物<sup>[8-9]</sup>。多西他赛已用于乳腺癌、非小细胞肺癌、前列腺癌、胃癌、头颈部肿瘤、食管癌、卵巢癌等多种肿瘤的临床治疗<sup>[10-11]</sup>。然而患者因个体差异、自身耐受性差、药物选择性弱等原因导致化疗失败或复发, 使其疗效欠佳。

肿瘤细胞由于其代谢信号纷繁复杂且具有多

基因遗传特性, 单一药物对其治疗效果有限, 药物联用可取得更好的治疗效果, 因此成为抗癌研究的热点。本课题组之前的研究表明, Onco<sup>Ad</sup>-mK5<sup>[12]</sup>有很好的安全性以及对前列腺癌不同细胞株有着很好的杀伤能力。基于docetaxel与单抗类药物、溶瘤病毒及其它化疗药物相结合治疗恶性肿瘤的体内外研究均取得的较好抗肿瘤效果<sup>[13-15]</sup>, 我们将两者联合通过降低化药的用量, 克服单独使用化疗药物的不足, 以期达到对LNCaP细胞更好的的杀伤作用, 为病毒基因治疗药物与化疗药物联合治疗前列腺癌的研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

重组腺病毒Onco<sup>Ad</sup>-mK5为刘新垣院士课题组保存, 人胚胎肾293A细胞株(HEK293A)、前列腺癌细胞株LNCaP来自中科院上海细胞库。多西他赛(docetaxel, DTX)购自上海皓元生物医药科技有限公司。

### 1.2 试剂与仪器

Hoechst 33258染色液、胰蛋白酶(不含EDTA)购自碧云天生物技术有限公司; DMEM培养基、胎牛血清购自Gibco公司; CCK-8试剂购自上海翊圣生物科技有限公司; TRIZON Reagent购自康为世纪生物科技有限公司; 高效逆转录试剂盒购自TOYOBO公司; Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、qPCR SYBR Green Master Mix购自南京诺唯赞生物科技有限公司; E1A抗体购自Santa Cruz公司、mK5抗体购自杭州华安生物技术有限公司、Caspase-8、XIAP、PARP抗体及二抗购自Cell Signaling Technology公司; GAPDH抗体购自碧云天生物技术有限公司; DMSO 购于上海百赛生物技术有限公司; 氯仿、75%乙醇、异丙醇等试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

使用的主要仪器有: CKX53型倒置荧光显微镜(Olympus公司)、Thermo1374型生物安全柜、NovoCyte 2070R型流式细胞仪(ACEA公司)、Multi-skan<sup>TM</sup> FC型酶标仪(Thermo公司)、CFX Connect<sup>TM</sup>

型Real-time PCR仪(Bio-Rad公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 细胞培养 HEK293A细胞用含10%胎牛血清的DMEM完全培养基于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中进行培养, LNCaP细胞用含10%胎牛血清的RPMI-1640完全培养基于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中进行培养, 一般3~4天传代, 取对数生长期细胞进行实验。

1.3.2 病毒扩增、纯化及Docetaxel母液的配制 重组腺病毒Onco<sup>Ad</sup>-mK5已经验证不含野生型病毒株<sup>[12]</sup>。病毒Onco<sup>Ad</sup>-mK5用HEK293A扩增, 用氯化铯梯度离心纯化, 病毒滴度用TCID<sub>50</sub>方法测定<sup>[16]</sup>。

docetaxel母液: 称取40.394 mg粉末, 溶于5 mL DMSO中, 使得终浓度为10 mmol/L, 分装于1.5 mL EP管中, 200 μL/管, 保存于-20 °C。

1.3.3 CCK-8法检测细胞活力并计算IC<sub>50</sub> 向96孔板中按照5×10<sup>3</sup>个/孔的密度接种前列腺癌细胞株LNCaP, 待其贴壁后分别加入不同浓度docetaxel(0、1、5、10、50、100 nmol/L), 每组设置3个复孔, 其中不加细胞组为空白调零组, 不加药物组为对照组, 按照上述培养条件分别培养24 h、48 h、72 h。向每孔中加入10 μL CCK-8溶液, 放置培养箱中培养2 h, 利用酶标仪测定450 nm下的吸光值(D<sub>450</sub>)。按照以下公式计算细胞存活率并计算IC<sub>50</sub>, 细胞存活率=[D<sub>s</sub>-D<sub>b</sub>]/[D<sub>c</sub>-D<sub>b</sub>]×100%(D<sub>s</sub>: 实验孔吸光值; D<sub>c</sub>: 对照孔吸光值; D<sub>b</sub>: 空白调零孔的吸光值), 该实验重复3次。

1.3.4 药物联用对LNCaP细胞活力的影响 选取对数生长期的LNCaP细胞, 以每孔5 000个细胞, 铺于96孔板中, 置于37 °C和含5% CO<sub>2</sub>的培养箱中, 24 h待细胞贴壁后, 开始实验。实验设LNCaP细胞对照组、Onco<sup>Ad</sup>-mK5组、docetaxel组、联合治疗组(Onco<sup>Ad</sup>-mK5+docetaxel)四组。Onco<sup>Ad</sup>-mK5组终浓度梯度为: 1 MOI、2 MOI、4 MOI、8 MOI, docetaxel终浓度梯度为: 5 nmol/L、10 nmol/L, 联合用药组按照1:1比例同时加入Onco<sup>Ad</sup>-mK5和docetaxel, 浓度均为单药时的终浓度, 并以只加培养液为调零组, 每组3个重复孔, 置于37 °C和含5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养, 48 h后, 向每孔中加入10 μL CCK-8溶液, 放置培养箱中培养1 h, 最后利用酶标仪测定450 nm下的吸光值(D<sub>450</sub>)。按照以下公式计算抑制率, 抑制率=[D<sub>c</sub>-D<sub>s</sub>]/[D<sub>c</sub>-D<sub>b</sub>]×100%(D<sub>s</sub>: 实验孔吸光值; D<sub>c</sub>: 对照孔吸光值; D<sub>b</sub>: 空白调零孔的吸光值), 并依据Chou-Talalay中效原理, 以CalcuSyn药效学分析软件计算协同作用指

数(CI)值, 评价联合作用效应(CI<1时, 两药为协同作用; CI=1时, 为相加作用; CI>1时, 为拮抗作用)<sup>[17]</sup>。

1.3.5 显微镜观察LNCaP细胞形态变化 将对数生长期的前列腺癌细胞LNCaP以2×10<sup>5</sup>个/孔的密度铺于24孔板, 每孔培养基体积1 mL, 于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养12 h。次日每孔分别加入PBS、5 nmol/L的docetaxel或/和4 MOI Onco<sup>Ad</sup>-mK5, 每个处理组分别设置3个复孔, 放回培养箱中培养48 h, 荧光显微镜下观察细胞的形态并拍照记录。

1.3.6 Hoechst 33258 荧光检测凋亡形态 向24孔板中按照2×10<sup>5</sup>个/孔的密度接种对数生长期的LNCaP细胞, 24 h待细胞贴壁后, 加入5 nmol/L的docetaxel或/和4 MOI Onco<sup>Ad</sup>-mK5, 对照组中加入等体积的无血清的培养基, 按照上述条件培养48 h后, 弃去旧的培养基, 并用PBS轻轻漂洗2次, 最后加入300 μL Hoechst 33258染料, 避光孵育15 min, 荧光显微镜下检测细胞核的形态变化。

1.3.7 流式细胞术检测细胞凋亡率 6孔板以1×10<sup>6</sup>个/孔的密度接种LNCaP细胞, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养24 h后, 加药组加入5 nmol/L的docetaxel或/和4 MOI病毒Onco<sup>Ad</sup>-mK5, 对照组中加入等体积的无血清的培养基, 继续培养24 h之后, 弃去旧的培养基, 用PBS洗细胞2次, 加入100 μL 1×Binding Buffer, 再依次加入5 μL AnnexinV-FITC和5 μL PI, 室温避光培养15 min, 加入400 μL 1×Binding Buffer, 1 h内用流式细胞仪进行凋亡分析。

1.3.8 Western blot检测蛋白质水平 取对数生长期的LNCaP细胞以8×10<sup>5</sup>个/孔的密度铺于6孔板, 过夜培养。加入PBS、5 nmol/L docetaxel、4 MOI Onco<sup>Ad</sup>-mK5、5 nmol/L docetaxel和4 MOI Onco<sup>Ad</sup>-mK5, 于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养48 h, 检测E1A、mK5、XIAP、PARP和Caspase-8蛋白质水平(以GAPDH或β-Tubulin为内参)。

1.3.9 实时荧光定量PCR检测VEGF的mRNA水平 取对数生长期的LNCaP细胞, 调整细胞密度为5×10<sup>5</sup>个/mL, 接种于6孔板中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养24 h后, 加药组加入5 nmol/L的docetaxel或/和4 MOI病毒Onco<sup>Ad</sup>-mK5, 对照组中加入等体积的无血清的培养基, 继续培养24 h之后, 收集细胞, TRIzol法提取细胞总RNA(按TRIzol抽提试剂说明书进行操作)。分光光度法检测RNA浓度, 取1 μg总RNA按照TOYOBO的高效逆转录试剂盒进行逆转录操

作得到cDNA。将cDNA样品进行10倍稀释后, 根据SYBR Green Master Mix试剂盒进行qPCR反应, 设计目的基因引物, 其中 $\beta$ -actin为内参。引物序列如下: qVEGF-F: 5'-AGT GTG TGC CCA CTG AGG A-3', qVEGF-R: 5'-GTG CTG TAG GAA GCT CAT CT-3';  $\beta$ -actin-F: 5'-GGC ACC ACA CCT TCT ACA ATG-3',  $\beta$ -actin-R: 5'-TAG CAC AGC CTG GAT AGC AAC-3'。

#### 1.4 统计学分析

所有实验重复3次, 实验统计数据用平均值 $\pm$ 标准偏差(S.D.)表示, 并用GraphPad Prism 7.0软件进行t检验分析, 当 $P < 0.05$ 时, 被认为有差异, 具有统计学意义,  $P < 0.01$ 为有显著统计学差异,  $P < 0.001$ 为有极其显著的统计学差异。

## 2 结果

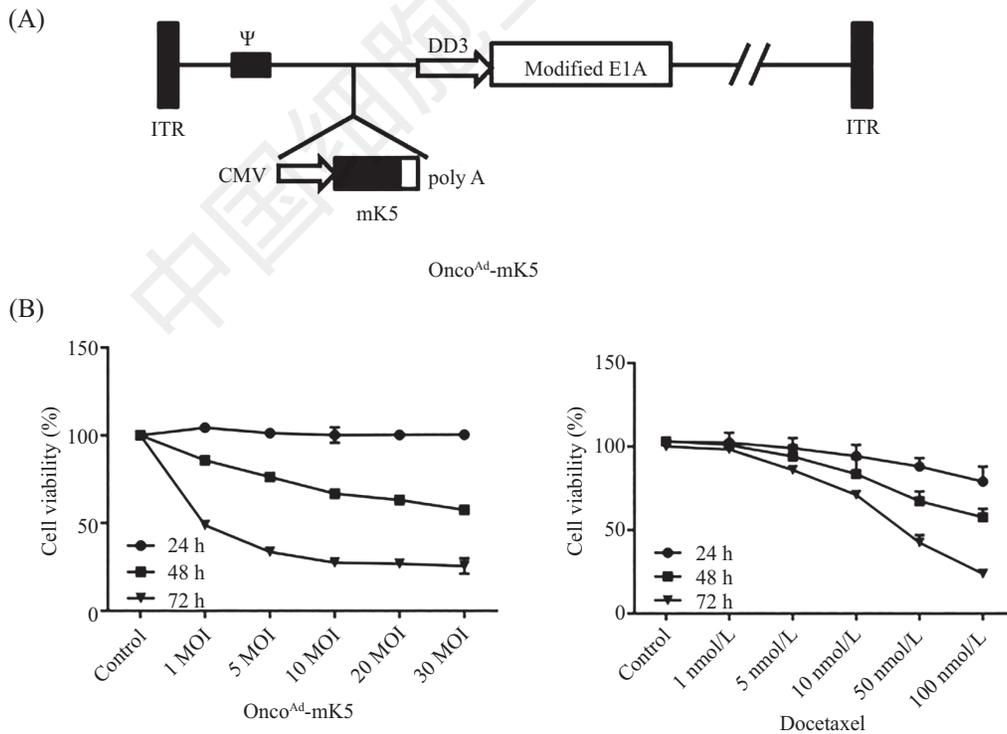
### 2.1 Onco<sup>Ad</sup>-mK5和docetaxel均能抑制LNCaP细胞的增殖

CCK-8法结果显示, Onco<sup>Ad</sup>-mK5(图1A)和docetaxel(图1B)对前列腺癌细胞株LNCaP均具有

生长抑制作用, 且呈时间和剂量依赖性。不同浓度梯度的重组病毒Onco<sup>Ad</sup>-mK5作用于前列腺细胞株LNCaP细胞48 h、72 h后, 细胞的存活率如图1B所示, 根据Graphpad prism 7.0软件进行预测, 得到IC<sub>50</sub>值分别为61.07 MOI, 0.7191 MOI; 同样地, 不同浓度梯度的docetaxel作用于前列腺细胞株LNCaP细胞48 h、72 h后, 细胞的存活率如图1B所示, 预测得到的IC<sub>50</sub>值分别为144.6 nmol/L、31.49 nmol/L(图1B)。

### 2.2 Onco<sup>Ad</sup>-mK5与docetaxel联用能协同抑制LNCaP细胞的活力

Onco<sup>Ad</sup>-mK5与docetaxel联合作用于LNCaP细胞后, 采用CCK-8法检测细胞增殖抑制率(图2)发现, 当病毒在4 MOI及8 MOI时, 与5 nmol/L的docetaxel联用时对LNCaP细胞抑制率较与2 MOI病毒联用组表现出差异( $P < 0.05$ )。随后, 运用CalcuSyn软件处理杀伤效果对应联合指数(Fa-CI)的定量数据(表1), 得出4 MOI的Onco<sup>Ad</sup>-mK5与5 nmol/L的docetaxel联合处理组的模拟联合指数(CI)值为0.851, 结果显示 $0 < CI < 1$ (表1), 表明此种方式的联合处理具有协同效应。

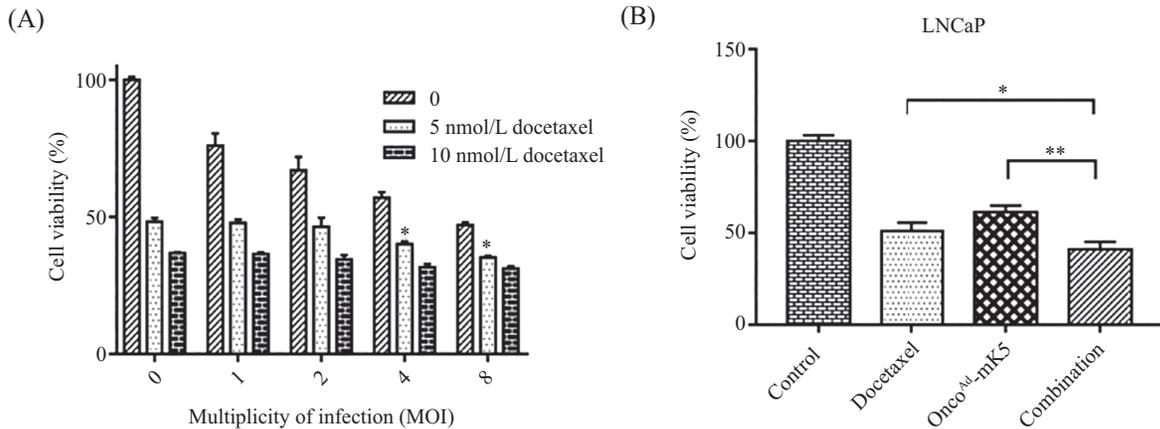


A: 重组病毒结构; B: LNCaP细胞经不同感染复数Onco<sup>Ad</sup>-mK5或不同浓度docetaxel处理下24 h、48 h、72 h的存活率。

A: the structure of Onco<sup>Ad</sup>-mK5; B: LNCaP's survival rates were treated with different MOIs of Onco<sup>Ad</sup>-mK5 and different concentrations of docetaxel for 24 h, 48 h and 72 h.

图1 重组病毒的结构及Onco<sup>Ad</sup>-mK5与Docetaxel对LNCaP细胞的杀伤作用

Fig.1 Structure of Onco<sup>Ad</sup>-mK5 and the killing effect of both Onco<sup>Ad</sup>-mK5 and Docetaxel on LNCaP cell



A: 不同感染复数Onco<sup>Ad</sup>-mK5或不同浓度docetaxel处理LNCaP48 h后的细胞活力; B: 此部分数据来源于2A, 即5 nmol/L的docetaxel和4 MOI的Onco<sup>Ad</sup>-mK5单独及联用处理LNCaP48 h后的细胞活力。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

A: cell viability of different dosages of Onco<sup>Ad</sup>-mK5 or docetaxel after treatment of LNCaP for 48h; B: cell viability of 5 nmol/L docetaxel and 4 MOI Onco<sup>Ad</sup>-mK5 after treatment of LNCaP for 48 h, and this part of the data is derived from 2A. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

图2 Docetaxel与Onco<sup>Ad</sup>-mK5联合抑制LNCaP细胞增殖效应

Fig.2 Anti-proliferative effects of LNCaP cells by Docetaxel and Onco<sup>Ad</sup>-mK5

表 1 不同剂量的docetaxel与Onco<sup>Ad</sup>-mK5处理LNCaP细胞的CI值

Table 1 Combination index (CI) of Onco<sup>Ad</sup>-mK5 and docetaxel in LNCaP cell

结肠癌细胞 PCa Cell line	多西他赛 (nmol/L) Docetaxel (nmol/L)	溶瘤病毒(MOI) Onco <sup>Ad</sup> -mK5 (MOI)	联合指数值 CI values
LNCaP	5	2	0.959
LNCaP	5	4	0.851
LNCaP	10	4	0.923
LNCaP	10	8	1.119

### 2.3 Onco<sup>Ad</sup>-mK5与docetaxel联用显著影响LNCaP细胞形态

LNCaP细胞经不同药物处理后出现典型凋亡变化。光学显微镜下观察, 对照组及docetaxel单药组细胞成片贴壁生长, 细胞饱满, 无明显变化(图3A和图3C); 而Onco<sup>Ad</sup>-mK5组及联合用药组处理48 h后, LNCaP细胞生长受到明显抑制, 出现典型的凋亡形态学变化; 悬浮细胞增多, 细胞折光性变差, 细胞核皱缩, 细胞膜出现发泡现象、活力差(图3B和图3D)。

### 2.4 Onco<sup>Ad</sup>-mK5与docetaxel联用能诱导LNCaP细胞凋亡

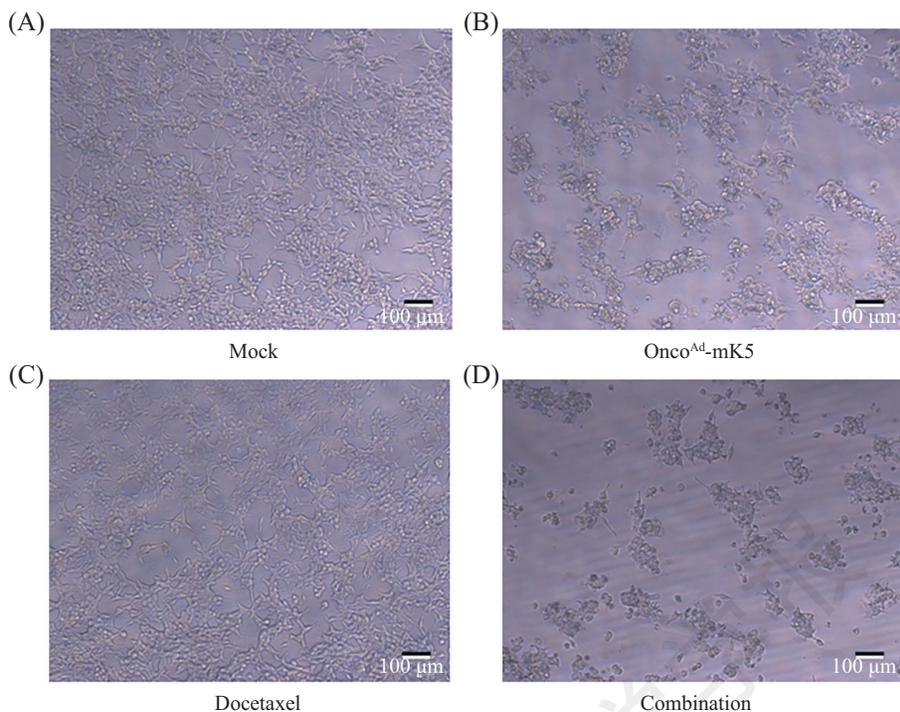
Hoechst 33258染色检测4 MOI Onco<sup>Ad</sup>-mK5与5 nmol/L docetaxel作用LNCaP细胞48 h后的凋亡效应: 对照组染色质均匀、无浓缩、边集现象, 荧光显微镜下观察, 细胞核染色均一, 无明显亮蓝色。而联合处理组细胞核染色质明显凝集、固缩, 并伴有核碎裂现象, 荧光显微镜下观察, 有亮蓝色碎片产

生(如图4中箭头所示)。

根据凋亡检测试剂盒说明, LNCaP细胞经不同处理后48 h的凋亡情况进行检测, 流式细胞术双参数散点图的右上象限与右下象限分别代表晚期凋亡与早期凋亡。将两象限显示的百分比加和即为发生凋亡的细胞比率, 结果显示, docetaxel或Onco<sup>Ad</sup>-mK5单独用药组凋亡率分别为19.5%和24.4%(图5A), 联合用药组凋亡率为32.1%, 与单独用药组相比有明显的提高( $P < 0.01$ )(图5B)。

### 2.5 Onco<sup>Ad</sup>-mK5与docetaxel联用能增强蛋白E1A及mK5的表达

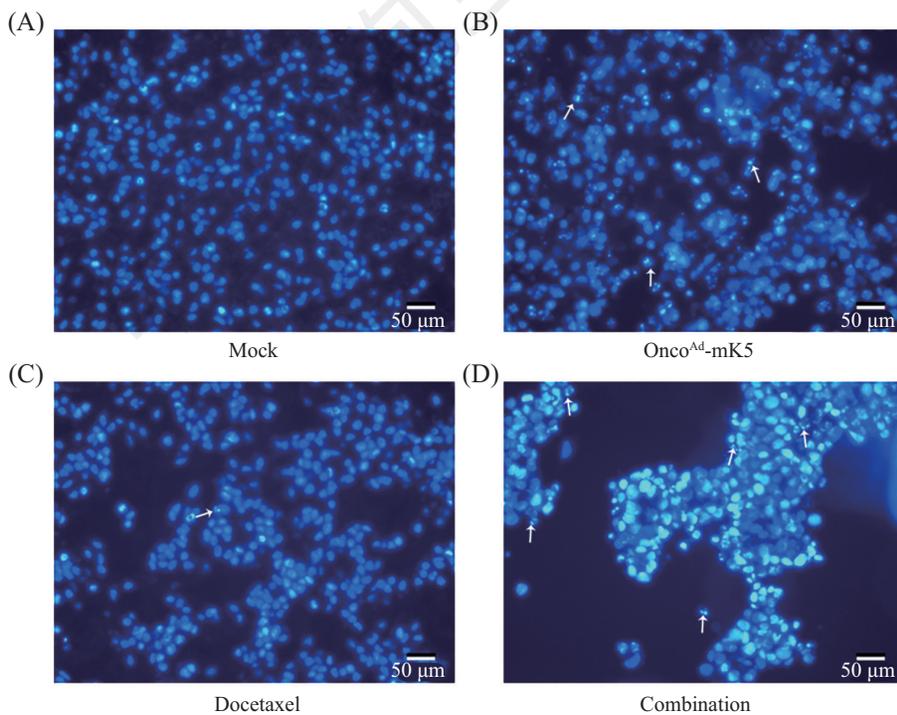
分别用4 MOI的Onco<sup>Ad</sup>-mK5和5 nmol/L的docetaxel感染LNCaP细胞48 h后, 用Western blot检测腺病毒早期复制必需蛋白E1A及抗血管生成基因mK5的表达。以未经病毒或药物处理的LNCaP细胞蛋白作为对照, Onco<sup>Ad</sup>-mK5组及Onco<sup>Ad</sup>-mK5与docetaxel联用组的蛋白均能有效表达, 且加入docetax-



A: 空白对照组; B: 4 MOI Onco<sup>Ad</sup>-mK5处理组; C: 5 nmol/L多西他赛处理组; D: 5 nmol/L多西他赛与4 MOI Onco<sup>Ad</sup>-mK5联合处理组, 标尺=100 μm。  
A: control group; B: 4 MOI Onco<sup>Ad</sup>-mK5 treated group; C: 5 nmol/L docetaxel treated group; D: 5 nmol/L docetaxel and 4 MOI Onco<sup>Ad</sup>-mK5 treated group. Scale bars=100 μm.

图3 Docetaxel和Onco<sup>Ad</sup>-mK5作用LNCaP细胞形态学分析

Fig.3 Cell morphological analysis of LNCaP treated with docetaxel and Onco<sup>Ad</sup>-mK5

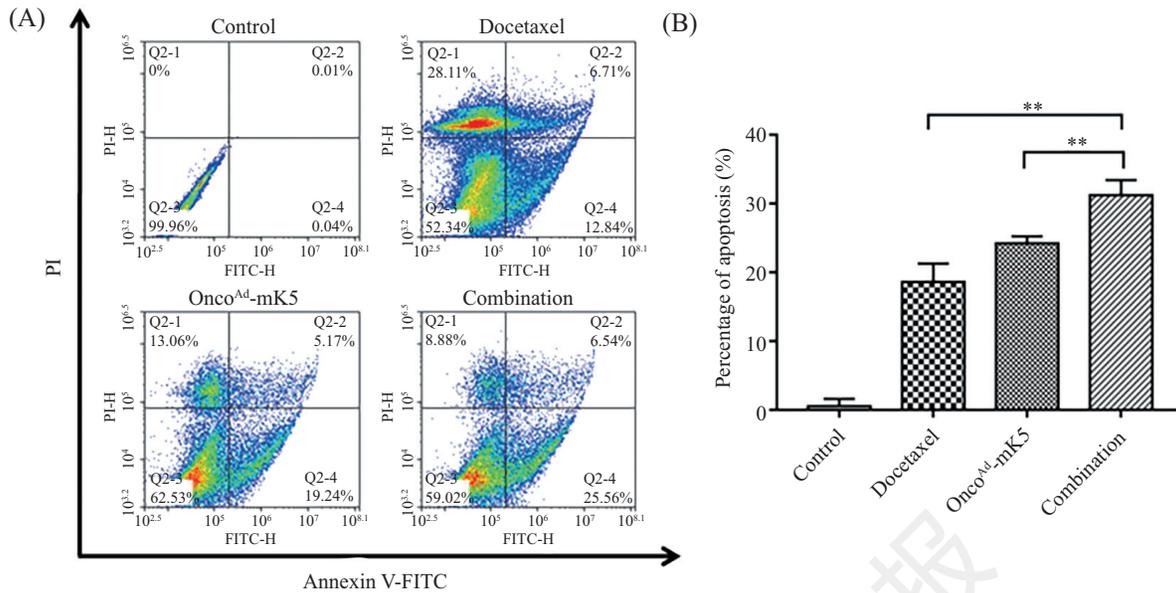


A: 空白对照组; B: 4 MOI Onco<sup>Ad</sup>-mK5处理组; C: 5 nmol/L多西他赛处理组; D: 5 nmol/L多西他赛与4 MOI Onco<sup>Ad</sup>-mK5处理组。图中箭头代表的是典型的凋亡小体, 标尺=50 μm。

A: control group; B: 4 MOI Onco<sup>Ad</sup>-mK5 treated group; C: 5 nmol/L docetaxel treated group; D: 5 nmol/L docetaxel and 4 MOI Onco<sup>Ad</sup>-mK5 treated group. The arrows in the figure represent typical apoptotic bodies, scale bars=50 μm.

图4 Hoechst 33258染色法检测细胞凋亡

Fig.4 Apoptosis detection by Hoechst 33258 staining

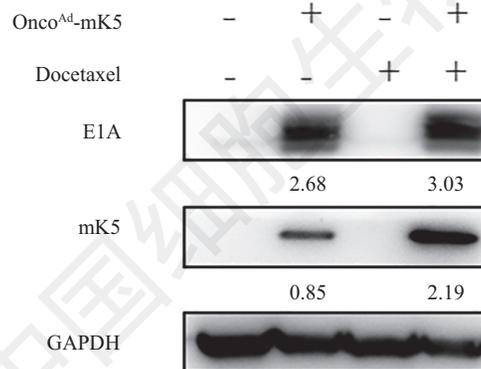


A: Control组、5 nmol/L多西他赛、4 MOI Onco<sup>Ad</sup>-mK5及5 nmol/L多西他赛与4 MOI Onco<sup>Ad</sup>-mK5不同处理组的流式散点图; B: 各组凋亡率分析。 \*\* $P < 0.01$ 。

A: flow scatter diagrams of control group, 5 nmol/L docetaxel group, 4 MOI Onco<sup>Ad</sup>-mK5 group, 5 nmol/L docetaxel and 4 MOI Onco<sup>Ad</sup>-mK5 treated group; B: cell apoptosis rate analysis by different treatments. \*\* $P < 0.01$ .

图5 流式细胞术检测细胞凋亡现象

Fig.5 Apoptosis detected by flow cytometry assay



图中数字代表该目的条带灰度值与内参灰度值的比值。

The numbers represent the ratio of the gray value of the target band to the gray value of internal reference.

图6 LNCaP细胞经不同处理后48 h后mK5和E1A蛋白质水平

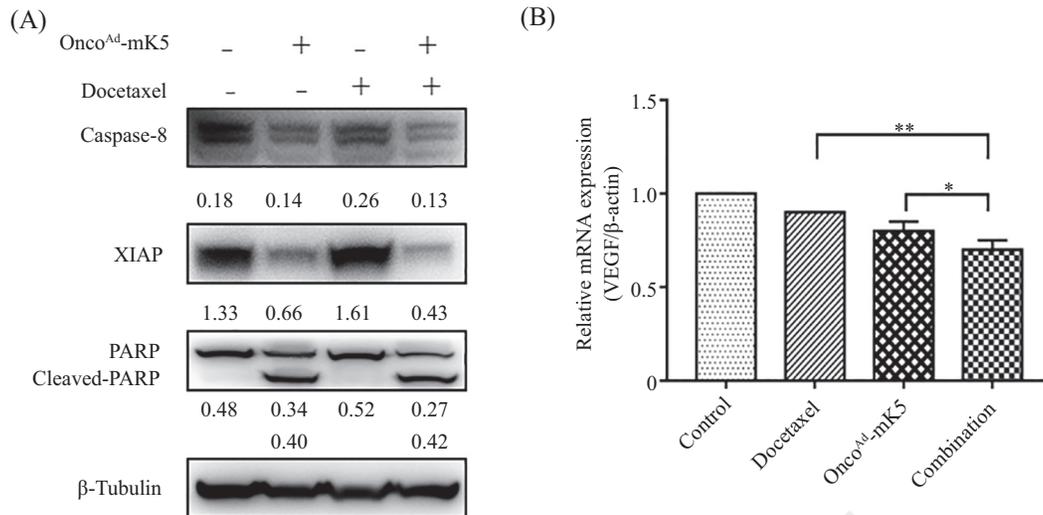
Fig.6 The level of mK5 and E1A protein on LNCaP cells treated with different treatments for 48 h

el的联合用药组较Onco<sup>Ad</sup>-mK5组水平高(图6)。因此,结果显示,加入docetaxel并不影响重组腺病毒Onco<sup>Ad</sup>-mK5的目的基因mK5及E1A在LNCaP细胞内表达,而且还观察到低剂量的docetaxel能够增加目的基因mK5及E1A的表达。这一结果提示我们联合用药有利于重组病毒Onco<sup>Ad</sup>-mK5的各种元件基因的高效表达,为两者联用产生协同效应提供了分子机制的参考。

## 2.6 重组腺病毒Onco<sup>Ad</sup>-mK5联合多西他赛诱导LNCaP细胞凋亡的可能分子机制

为进一步研究重组腺病毒Onco<sup>Ad</sup>-mK5联合多

西他赛诱导LNCaP细胞凋亡的机制,我们通过Western blot检测了Caspase通路相关的蛋白质表达水平(图7A)。结果显示,相比较对照组及药物单用组,Onco<sup>Ad</sup>-mK5与docetaxel联用组的Caspase-8、PARP前体蛋白均明显下降,说明在多西他赛与Onco<sup>Ad</sup>-mK5的联合作用下,Caspase依赖性细胞凋亡通路被激活,Caspase-8前体蛋白被切割而致其水平减少,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



A: LNCaP细胞经不同处理48 h后Caspase-8、XIAP、PARP蛋白质水平,其中条带下面的数字代表该目的条带的灰度与内参灰度的比值; B: Q-PCR检测各处理组48 h后VEGF的mRNA水平。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

A: the protein levels of Caspase-8, XIAP and PARP after LNCaP cells were treated for 48 h, and the numbers below the band represents the ratio of the gray value of the target band to the internal reference; B: Q-PCR was used to detect the mRNA levels of VEGF after 48 h in each treatment group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

图7 Western-blot及Q-PCR分析Docetaxel与Onco<sup>Ad</sup>-mK5联合诱导LNCaP凋亡的可能机制

Fig.7 Western blot and Q-PCR analysis of the possible mechanism of apoptosis induced by docetaxel and Onco<sup>Ad</sup>-mK5 in LNCaP

应Caspase通路被激活。从蛋白质水平看,加入多西他赛后,一方面病毒的早期基因及携带的*mK5*基因表达增强,由此导致病毒本身的溶瘤作用加强,致使部分细胞死亡;另一方面,联合作用后,激活Caspase依赖性通路,引起更强的凋亡信号,且联合用药组产生的凋亡效应更加明显,与Hoechst 33258染色结果一致。

与此同时,由于重组病毒中携带的是跟血管生成相关的抑制基因,VEGF是血管内皮生长的重要标志分子,我们检测了各处理组中VEGF mRNA的表达水平(图7B),结果发现,两药单用组及Onco<sup>Ad</sup>-mK5与docetaxel联用组的VEGF的mRNA水平均有所降低,且联合用药组相比单药组,出现了显著的差异( $P < 0.05$ ),进一步提示重组病毒Onco<sup>Ad</sup>-mK5可抑制肿瘤诱导的血管生成。

### 3 讨论

2001年,刘新垣院士提出的癌症的“靶向基因-病毒治疗”(cancer targeting gene-viro-therapy, CT-GVT)策略<sup>[18]</sup>是指通过基因工程手段改造病毒,在溶瘤病毒载体上插入外源抗癌基因,增强其在肿瘤细胞内的靶向复制能力,从而使肿瘤细胞裂解进而对其产生杀伤作用;且随着病毒的复制,其携带的抗癌

基因也在肿瘤细胞内成千上万倍的复制,从而数百倍乃至上万倍提高抗癌基因的表达量<sup>[19]</sup>。本文所用的Onco<sup>Ad</sup>-mK5是本课题组在ZD55的基础上,将其天然E1A的启动子改造成前列腺癌特异性启动子DD3,从而提高其对前列腺癌的靶向性和安全性,同时携带抗血管生成基因*mK5*,可引起肿瘤细胞凋亡,而不影响正常细胞。溶瘤病毒单独应用与联合其它药物抗癌是靶向基因病毒抗癌的一个重要综合优势,结合前列腺癌目前的治疗现状,溶瘤病毒联合多西他赛进一步体现了靶向基因-病毒联合用药的科学意义。

多西他赛是目前用于治疗前列腺癌的最重要的一线药物,而在常规治疗剂量下的临床疗效和效用通常由于诸如血液毒性的副作用而受到损害。为了增强对前列腺癌的治疗效果,我们选用了Onco<sup>Ad</sup>-mK5与多西他赛在体外对人前列腺癌细胞LNCaP的联合治疗策略。当体外一起给药时,Onco<sup>Ad</sup>-mK5和多西他赛能够协同抑制前列腺癌细胞的增殖。

根据CCK-8实验结果可以看出,Onco<sup>Ad</sup>-mK5和docetaxel对前列腺癌细胞LNCaP都具有一定的生长抑制作用,且它们作用的方式均呈时间和剂量依赖性(图1B)。另外经过联合用药实验我们发现,Onco<sup>Ad</sup>-mK5与docetaxel联合对抑制LNCaP细胞的

增殖具有协同作用(图2), 实验结果显示联合用药后细胞增殖抑制率明显升高, 且5 nmol/L的docetaxel与4 MOI的Onco<sup>Ad</sup>-mK5组的抑制率最高; 而细胞凋亡实验结果显示, 联合用药组的凋亡率与单独用药组相比均有所提高。通过Western blot实验检测腺病毒E1A蛋白及目的蛋白mK5的表达, 发现加入化疗药物docetaxel后, 增强了这些蛋白的表达(图6), 且联合用药加强了Caspase依赖的细胞凋亡效应(图7)。因此我们认为, Onco<sup>Ad</sup>-mK5与docetaxel的联合使用, 减少了化疗药物的用量, 更好地抑制了前列腺癌细胞的增殖。

综上所述, 我们认为重组腺病毒Onco<sup>Ad</sup>-mK5和多西他赛联合治疗前列腺癌产生的协同效应可用如下几种机制来解释: 首先加入少量化疗药物docetaxel后, 重组病毒携带的目的抗癌基因表达有所增加, 导致靶基因-病毒对肿瘤细胞的溶瘤作用进一步增强; 其次, docetaxel与Onco<sup>Ad</sup>-mK5联用能够引发细胞内更强的凋亡信号, 如Caspase-8蛋白量减少, PARP蛋白发生剪切, 以及抗凋亡蛋白XIAP量减少, 以上信号通路的增强进一步激发了更强的凋亡效应; 最后, 由于任一病毒在侵入机体后, 均能够通过诱导I型、III型IFNs刺激机体细胞产生成百上千种 ISGs发挥抗病毒作用<sup>[20]</sup>, 其中的IFN- $\alpha$ 能够通过抑制SP1和SP3转录因子的活性来降低VEGF的转录水平, 从而直接导致抗血管生成效应<sup>[21]</sup>。其次, Gao<sup>[22]</sup>等人研究表明, K5能够通过抑制MAPK激酶的活性和HIF-1 $\alpha$ 的核转位下调VEGF的分泌水平, 从而抑制肿瘤的血管生成; 且之前也有数据表明, mK5相比K5有更好的抑制肿瘤血管生成的能力<sup>[6]</sup>, 因此鉴于mK5基因与溶瘤病毒本身都具有下调VEGF的作用, 我们检测了各处理组细胞的VEGF mRNA表达情况, 结果发现, 当与化疗药多西他赛联用后, 其下调VEGF的作用更加显著。本文中, LNCaP作为早期前列腺癌且伴随着很强的促血管生成能力的细胞模型<sup>[23]</sup>, 我们利用携带人血纤溶酶原突变体基因的肿瘤特异复制型重组腺病毒, 与常规化学治疗剂组合形成新的联合疗法, 这种联合疗法会形成很强的抗肿瘤效应和抗血管生成作用, 这将为今后溶瘤病毒与多西他赛联用在临床上抗前列腺癌的应用提供基础。

### 参考文献 (References)

1 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal

- A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(6): 394-424.
- 2 Carmeliet P, Jain PK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407(6801): 249-7.
- 3 Ji WR, Barrientos LG, Llinas M, Gray H, Villarreal X, DeFord M E, *et al*. Selective inhibition by kringle 5 of human plasminogen on endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247(2): 414-9.
- 4 Lu H, Dhanabal M, Volk R, Waterman MJ, Ramchandran R, Knebelmann B, *et al*. Kringle 5 causes cell cycle arrest and apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 258(3): 668-73.
- 5 Yang X, Cheng R, Li C, Cai W, Ma JX, *et al*. Kringle 5 of human plasminogen suppresses hepatocellular carcinoma growth both in grafted and xenografted mice by anti-angiogenic activity. *Cancer Biol Ther* 2006; 5(4): 399-405.
- 6 Fan JK, Xiao T, Gu JF, Wei N, He LF, Ding M, *et al*. Increased suppression of oncolytic adenovirus carrying mutant k5 on colorectal tumor. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374(2): 198-203.
- 7 Feldman AL, Libutti SK. Progress in antiangiogenic gene therapy of cancer. *Cancer* 2000; 89(6): 1181-94.
- 8 Pienta KJ, Smith DC. Advances in prostate cancer chemotherapy: a new era begins. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(5): 300-18.
- 9 Montero A, Fossella F, Hortobagyi G, Valero V. Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *Lancet Oncol* 2005; 6(4): 229-39.
- 10 Weiss GJ, Vokes EE, Bunn PA Jr, Magree L, Rusk J, Albert D, *et al*. Docetaxel and exisulind in previously treated non-small cell lung cancer (NSCLC) patients: a multicenter, phase II clinical trial. *J Thorac Oncol* 2007; 2(10): 933-8.
- 11 Nadal R, Zhang Z, Rahman H, Schweizer MT, Denmeade SR, Paller CJ, *et al*. Clinical activity of enzalutamide in Docetaxel-naïve and Docetaxel-pretreated patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Prostate* 2014; 74(15): 1560-8.
- 12 Hao J, Xie W, Li H, Li R. Prostate Cancer-Specific of DD3-driven Oncolytic virus- harboring mK5 Gene. *Open Med (Wars)* 2019; 14: 1-9.
- 13 王蔚, 王秀美, 时艳艳, 刘圆圆, 隋爱华. 多西他赛联合恩度对前列腺癌PC-3细胞的体外作用. *齐鲁医学杂志*(Wang Wei, Wang Xiumei, Shi Yanyan, Liu Yuanyuan, Sui Aihua. Effect of docetaxel combined with Endostar on Prostate cancer PC-3 cells: an *in vitro* study. *Medical Journal of Qiulu*) 2012; 27(05): 403-6.
- 14 Yu DC, Chen Y, Dilley J, Li Y, Embry M, Zhang H, *et al*. Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer-specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel. *Cancer Res* 2001; 61(2): 517-25.
- 15 Zhao P, Luo R, Wu J, Xie F, Li H, Xiao X, *et al*. E10A, an adenovirus carrying human endostatin gene, in combination with docetaxel treatment inhibits prostate cancer growth and metastases. *J Cell Mol Med* 2010; 14(1-2): 381-91.
- 16 高凯, 毕华, 丁有学, 李永红, 韩春梅, 郭莹, 等. 重组复制型溶瘤腺病毒p53的质量控制方法. *药理学报*(Gao Kai, Bi Hua, Ding Youxue, Li Yonghong, Han Chunmei, Guo Ying, *et al*. Quality control of recombinant oncolytic adenovirus/p53. *Acta Pharmaceutica Sinica*) 2011; 46(12): 1476-82.

- 17 Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* 2010; 70(2): 440-6.
- 18 刘新垣. 一种抗癌新策略——肿瘤的基因病毒治疗. *中国肿瘤生物治疗杂志* (Liu XinYuan. A new anticancer strategy Gene-Viro-Therapy of cancer. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*) 2001; 8(1): 1.
- 19 Liu XY, Li HG, Zhang KJ, Gu JF. Strategy of Cancer Targeting Gene-Viro-Therapy (CTGVT) a trend in both cancer gene therapy and cancer virotherapy. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13(9): 1761-7.
- 20 白思宇, 杨倩, 仇华吉. 干扰素刺激基因的抗病毒机制. *微生物学报* (Bai Siyu, Yang Qian, Qiu Huaji. Antiviral mechanisms of interferon-stimulated genes. *Acta Microbiologica Sinica*) 2018; 58(03): 361-71.
- 21 Rosewicz S, Detjen K, Scholz A, von Marschall, Z. Interferon-alpha: regulatory effects on cell cycle and angiogenesis. *Neuroendocrinology* 2004; 80 Suppl1: 85-93.
- 22 Gao G, Li Y, Gee S, Dudley A, Fant J, Crosson C, *et al.* Down-regulation of vascular endothelial growth factor and up-regulation of pigment epithelium-derived factor: a possible mechanism for the anti-angiogenic activity of plasminogen kringle 5. *J Biol Chem.* 2002; 277(11): 9492-7.
- 23 林艳端, 申锸, 胡兵. 三种常见的前列腺癌细胞系LNCaP、PC3和DU145的生物学特性. *中华临床医师杂志(电子版)* (Lin Yanduan, Shen E, Hu Bing. Biological characteristics of three common prostate cancer cell lines LNCaP, PC3 and DU145. *Chinese Journal of Clinicians* (Electronic Edition) 2013; 7(11): 4980-2.

中国细胞生物学学报