

## 腺病毒介导 siCD44 实验性治疗人 CNE-2L2 鼻咽癌

鞠吉雨, 时 岩, 周异群, 田 云, 沈 濂, 刘 音, 朱立平

中国医学科学院 北京协和医学院 基础医学研究所免疫学系, 北京 100005

通信作者: 朱立平 电话/传真: 010-65296447, 电子邮件: zhulp@pumc.edu.cn

**摘要:** **目的** 探讨用 siCD44 治疗实体瘤的可能性。 **方法** 以高表达 CD44 的人鼻咽癌细胞 CNE-2L2 为研究对象, 用软琼脂集落形成实验和细胞接种裸鼠后成瘤性生长及肿瘤肺转移检测细胞恶性生物学行为。构建 Ad5-siCD44, 用 293 细胞包装产生病毒。接种 CNE-2L2 细胞于裸鼠皮下, 待肿瘤长到  $50 \sim 100 \text{ mm}^3$  大小, 瘤体内注射 Ad5-siCD44, 以注射 PBS 或 Ad5-egfp 为对照, 2 周后比较肿瘤的大小和重量。 **结果** CD44 表达抑制致细胞的恶性生物学行为明显受抑。瘤体内注射 PBS、Ad5-egfp 和 Ad5-siCD44 2 周后, 肿瘤的平均体积分别为  $(3.139 \pm 0.850)$ 、 $(3.612 \pm 0.888)$  和  $(1.512 \pm 0.742) \text{ cm}^3$ , 实验组与对照组相比差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。3 组的平均瘤重分别为  $(2.28 \pm 0.73)$ 、 $(1.83 \pm 0.26)$  和  $(1.20 \pm 0.64) \text{ g}$ , 实验组与对照组相比差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 瘤体内注射 Ad5-siCD44 对 CD44 高表达的鼻咽癌细胞 CNE-2L2 所生成的肿瘤有一定治疗作用。

**关键词:** siCD44; 鼻咽癌; 集落形成; 成瘤性生长; 转移; 基因治疗

**中图分类号:** Q78; R739.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-503X(2007)05-0626-05

## Experimental siCD44-targeted Therapy of Human Nasopharyngeal Carcinoma Mediated by Adenovirus

JÜ Ji-yu, SHI Yan, ZHOU Yi-qun, TIAN Yun, SHEN Lian, LIU Yin, ZHU Li-ping

Department of Immunology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China

Corresponding author: ZHU Li-ping Tel/Fax: 010-65296447, E-mail: zhulp@pumc.edu.cn

**ABSTRACT: Objective** To explore the possibility of treating solid tumor with siCD44. **Methods** Human nasopharyngeal carcinoma cell CNE-2L2 with high expression of CD44 was used in this study. The malignant activities of cells were examined by colony formation test, tumorigenesis, and lung metastasis of the tumor in nude mice. Ad5-siCD44 was constructed and adenoviruses were produced in 293 cells. CNE-2L2 cells were subcutaneously inoculated into nude mice. When tumors grew to  $50\text{-}100 \text{ mm}^3$ , Ad5-siCD44 was injected into tumors, and Ad5-egfp and PBS were also injected as controls. The size and weight of tumors were compared after 2 weeks. **Results** Suppression of CD44 expression profoundly inhibited the malignant activities of CNE-2L2 cell. The average sizes of the tumors were  $(3.139 \pm 0.850)$ ,  $(3.612 \pm 0.888)$ , and  $(1.512 \pm 0.742) \text{ cm}^3$  after the intra-tumor injection of PBS, Ad5-egfp, and Ad5-siCD44, respectively, after two weeks. Significant difference was found between Ad5-siCD44 group and control groups ( $P < 0.05$ ). The average weights were  $(2.28 \pm 0.73)$ ,  $(1.83 \pm 0.26)$ , and  $(1.20 \pm 0.64) \text{ g}$ , respectively, and significant difference was

also found between Ad5-siCD44 group and control groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Intra-tumor injection of Ad5-siCD44 can exhibit the therapeutic effect on the tumor inoculated with CNE-212 cells with high expression of CD44 in nude mice.

**Key words** : siCD44 ; nasopharyngeal carcinoma ; colony formation ; tumorigenesis ; metastasis ; gene therapy

*Acta Acad Med Sin* , 2007 29(5) 626 - 630

CD44 有多种功能, 涉及细胞的增殖与分化、细胞迁移、血管生成, 把细胞因子、趋化性细胞因子和生长因子递交给相应受体, 蛋白酶在胞膜的进坞及支持细胞存活的信号传导。CD44 的这些功能对于正常细胞的生理性活动十分重要, 也与肿瘤细胞的恶性生物学行为相关<sup>[1,2]</sup>。在动物实验中, 用 CD44 抗体<sup>[3,4]</sup>、可溶性 CD44 蛋白<sup>[5]</sup>或反义技术<sup>[6]</sup>处理动物或肿瘤细胞, 能明显抑制肿瘤生长和转移, 显示了 CD44 作为肿瘤治疗靶分子的可能性。但由于可能的副作用及不可操作性, 在人无法作相应临床检验。但 CD44 能否作为人类肿瘤治疗的靶分子一直是学者探索研究的问题<sup>[1]</sup>。近来研究发现, 给动物注射抗 CD44 单抗能抑制接种高表达 CD44 的人急性髓性白血病细胞在非肥胖性糖尿病免疫抑制小鼠扩增<sup>[7]</sup>。本研究组以往研究显示, 用 RNA 沉默技术抑制人鼻咽癌细胞 CNE-212 CD44 基因表达能抑制 CNE-212 细胞在培养中的生长<sup>[8]</sup>。本研究探讨了在裸鼠瘤体内注射 siRNA 抑制 CD44 基因表达, 以抑制 CD44 高表达人移植性肿瘤生长的可能性。

## 材料和方法

**细胞、质粒和动物** 人鼻咽癌细胞株 CNE-212 为高进教授所赠<sup>[9]</sup>, 在本文中称 W 细胞。用 RNA 沉默技术致 CD44 表达抑制的 CNE-212 细胞 (整合了 siCD44-3 或 siCD44-4 的细胞) 及整合了空载体的细胞 (本文中称 M 细胞) 为本实验室所制备<sup>[8]</sup>。W 细胞和 M 细胞作为对照组, 整合了 siCD44-3 或 siCD44-4 的细胞作为实验组。4 周龄 BALB/c 无胸腺雌性小鼠购自中国医学科学院实验动物研究所。

**Western blot 分析** 取  $5 \times 10^6$  对数生长期的细胞, 用 100  $\mu$ l 蛋白质提取缓冲液 [ 含 50 mmol/L HEPES (pH 7.5)、150 mmol/L 氯化钠、2 mmol/L EDTA (pH 8.0)、2 mmol/L EGTA、1% Triton X-100、500 mmol/L 氟化钠、5 mmol/L 焦磷酸钠、50 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠、1 mmol/L 原钒酸钠、1 mmol/L 二硫苏糖醇、1 mmol/L 苯基乙烷氟化物、10  $\mu$ g/ml

亮抑蛋白酶肽、10  $\mu$ g/ml 抑肽酶 ] 裂解。离心后用 BCA 法 (试剂盒购自 Pierce 公司) 定量上清中的蛋白质含量。行 Western blot 检测, 以单克隆抗体 CD44 (R&D) 为一抗, 以辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (Pharmingen) 为二抗, 以  $\beta$ -actin 为内对照。ECL (Pierce) 化学发光法检测 CD44 的表达。

**软琼脂集落形成实验** 参照文献 [10] 进行。每皿接种  $1 \times 10^4$  个细胞, 2 周后计数集落数, 并计算集落形成率。实验重复 3 次。

**细胞成瘤性生长与肿瘤肺转移** 于无胸腺小鼠腋窝皮下接种肿瘤细胞悬液, 细胞悬于无血清 DMEM 培养液中。每种细胞接种 8 只小鼠, 每只小鼠接种  $5 \times 10^5$  个细胞。每周测量肿瘤的长径 (a) 和短径 (b) 1 次, 按公式  $V = 1/2 \times a \times b^2$  计算肿瘤体积。实验第 8 周末处死小鼠, 剥取肿瘤, 称重。取肺组织, 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 作厚度为 5  $\mu$ m 的间断性连续切片, HE 染色, 显微镜下观察、计数肺肿瘤转移灶。

**重组腺病毒载体构建与病毒包装** 引物 5'-tcgagctc-tcagcctactgcaaatccaacgggatttgtaggtgaagcaaaa-3' 与 5'-ct-agttttgcttcagcctactgcaaatccggttgatttgtaggtgaagc-3' 经退火后, 插入穿梭质粒 pDC316-EGFP-U6 (Gene Technology) 的 BamH I /Hind III 位点, 制备 pDC316-EGFP-U6-siCD44。采用磷酸钙沉淀法将 pDC316-EGFP-U6-siCD44 与基因组质粒 pBHGlox\_E1、3Cre (Microbix Biosystems) 共转染入 293 细胞。经氯化铯梯度超速离心纯化 293 细胞产生的病毒 (Ad5-siCD44)。用 TCID50 终点稀释法测定病毒滴度, 为  $5.7 \times 10^9$  感染单位 (infection unit, IFU) /ml。对照病毒 Ad5-egfp 购自本元正阳公司。病毒经分装, 于  $-80^\circ\text{C}$  存储。

**腺病毒介导的实验性肿瘤治疗** 于无胸腺小鼠右侧腋窝皮下接种野生型 CNE-212 细胞, 每鼠  $2 \times 10^6$  个细胞。将小鼠分为 3 组, 每组 6 只。待接种细胞后第 10 d, 肿瘤长至  $50 \sim 100 \text{ mm}^3$ , 分别向 3 组小鼠瘤内注射 0.1 ml 磷酸盐缓冲生理盐水 (phosphate buffered saline, PBS)、0.1 ml Ad5-egfp ( $4 \times 10^8$  IFU) 和 0.1 ml Ad5-siCD44 ( $4 \times 10^8$  IFU)。1 周后重复注射

1 次。2 周后断颈处死小鼠，剥取肿瘤，按参考文献 [8] 的方法测量肿瘤体积并称重。

**免疫荧光染色** 细胞生长于置于 24 孔板孔中的灭菌盖玻片上，用 1 mmol/L PBS 漂洗，4% 多聚甲醛/PBS 冰浴固定 10 ~ 15 min，再用 1 mmol/L Tris 缓冲液- $\text{Ca}^{2+}$  漂洗。一抗为 E-cadherin 单克隆抗体 (Zymed)，二抗为异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) [羊抗小鼠 IgG (Sigma)]，染色后用激光共聚焦显微镜观察。

**统计学处理** 采用 SAS6.12 统计软件，组间比较采用 student's *t* 检验， $P < 0.05$  表示差异有显著性。

## 结 果

**CD44 表达减弱对 CNE-2L2 细胞集落形成的抑制** Western blot 显示，野生型 CNE-2L2 细胞高表达 CD44 (CD44S 与 CD44V11-15)，整合了 siCD44-3 或 siCD44-4 的细胞 CD44 表达明显降低 (图 1)。在软琼脂中孵育 10 d 后，整合了 siCD44-3 的细胞、整合了 siCD44-4 的细胞、W 细胞和 M 细胞的集落形成率分别为  $(7.3 \pm 0.5)\%$ 、 $(8.5 \pm 0.5)\%$ 、 $(21.3 \pm 0.7)\%$  和  $(22.1 \pm 0.7)\%$ ，实验组的两种细胞与对照组的两种细胞分别相比，差异均具有显著性 ( $P <$

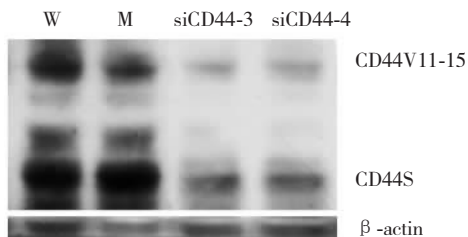


图 1 Western blot 检测 siCD44 对细胞表达 CD44 的抑制

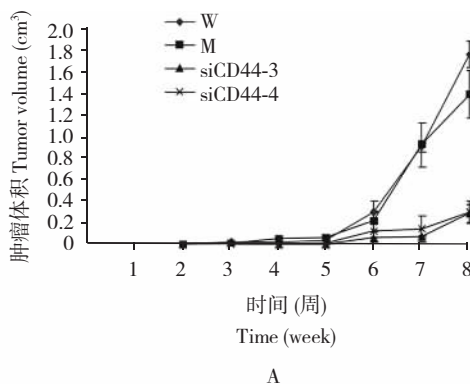
Fig 1 Western blot for detecting inhibition of CD44 expression by siCD44 in cells

用抗 CD44 单抗作为探针，W、M、siCD44-3 和 siCD44-4 分别代表野生型细胞、整合空载体的细胞及整合 siCD44-3 或 siCD44-4 的细胞，CD44s 为标准型 CD44，CD44v11-15 为 11-15 变异外显子编码的变异型 CD44

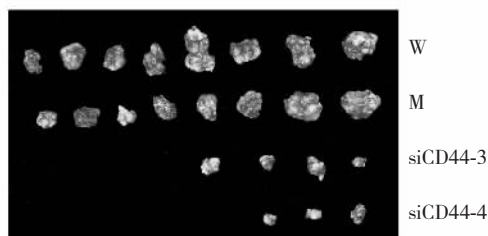
Antibody CD44 was used as a probe; W, M, siCD44-3, and siCD44-4 represent the wild type cell, cells integrated with Mock, cells integrated with siCD44-3, or cells integrated with siCD44-4, respectively; CD44s and CD44v11-15 indicate the standard form of CD44 and a variant form of CD44 encoded by standard exons and 11-15 variant exons

0.001)。而且，CD44 表达减弱细胞形成的集落明显比对照细胞者小。

**CD44 表达减弱对细胞成瘤性生长的抑制** 瘤细胞接种裸鼠腋窝后所生成肿瘤的平均生长曲线显示，在实验第 7 和 8 周末，整合了 siCD44-3 和整合了 siCD44-4 的细胞所生成肿瘤的体积明显小于对照的 W 细胞和 M 细胞 ( $P < 0.001$ ) (图 2A)。至实验第 8 周末，接种 2 种对照细胞的小鼠 (各 8 只) 均长出了肿瘤，但 8 只接种整合了 siCD44-3 细胞的小鼠中仅有 4 只长出了肿瘤，8 只接种整合了 siCD44-4 细胞的小鼠仅有 3 只长出了肿瘤，且肿瘤明显小于对照组 (图 2B)。第 8 周末，接种 W 细胞、M 细胞、整合了 siCD44-3 的细胞和整合了 siCD44-4 的细胞后所生成肿瘤的平均重量分别为  $(1.56 \pm 0.65)$ 、 $(1.24 \pm 0.86)$ 、 $(0.22 \pm 0.09)$  和  $(0.28 \pm 0.13)$  g，实验组和对对照组相比差异有显著性 ( $P < 0.001$ )。



A



B

图 2 CD44 表达减弱致 CNE-2L2 细胞接种裸鼠后的肿瘤性生长抑制

Fig 2 Reduced expression of CD44 results in inhibition of tumorigenesis of CNE-2L2 cells inoculated in nude mice

A. 肿瘤生长曲线; B. 肿瘤大小的比较

A. tumor growth curves; B. a comparison of tumor size

**CD44 表达减弱对细胞所生成肿瘤的肺转移的抑制** 6 只接种 W 细胞的小鼠发生肿瘤肺转移，其中 1 只有 6 个转移灶，2 只各有 3 个转移灶，另 2 只各有 2 个转移灶，1 只有 1 个转移灶。6 只接种 M 细胞的

小鼠发生肿瘤肺转移，其中 1 只有 4 个转移灶，2 只各有 3 个转移灶，另 2 只各有 2 个转移灶，1 只有 1 个转移灶。接种整合了 siCD44-3 或 siCD44-4 的细胞的小鼠中均只有 1 只发生肿瘤肺转移，前者有 4 个转移灶，后者有 1 个转移灶。

**瘤体内注射 Ad5-siCD44 对肿瘤生长的抑制** 向接种于无胸腺小鼠的 CNE-2L2 细胞所生长的肿瘤内分别注射 PBS、Ad5-egfp 和 Ad5-siCD44，2 周后肿瘤的平均体积分别为 ( 3.139 ± 0.850 )、( 3.612 ± 0.888 ) 和 ( 1.512 ± 0.742 ) cm<sup>3</sup> ( 图 3 )。PBS 组或 Ad5-egfp 组与 Ad5-siCD44 组相比差异有显著性 ( *P* < 0.05 )。3 组平均瘤重分别为 ( 2.28 ± 0.73 )、( 1.83 ± 0.26 ) 和 ( 1.20 ± 0.64 ) g，PBS 组或 Ad5-egfp 组与 Ad5-siCD44 组相比差异有显著性 ( *P* < 0.05 )。

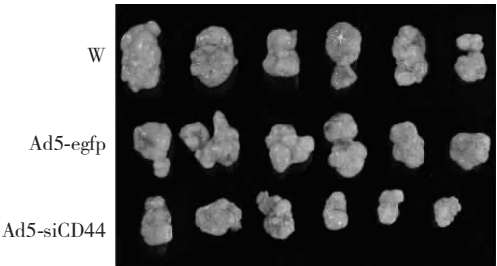


图 3 瘤体内注射 Ad5-siCD44 抑制肿瘤生长  
Fig 3 Inhibition of tumor growth caused by intra-tumor injection of Ad5-siCD44

**CD44 表达抑制对细胞 E-cadherin 表达的促进** 整合了 siCD44-3 和整合了 siCD44-4 的细胞较对照组的 W 细胞和 M 细胞，E-cadherin 表达明显增强 ( 图 4 )。

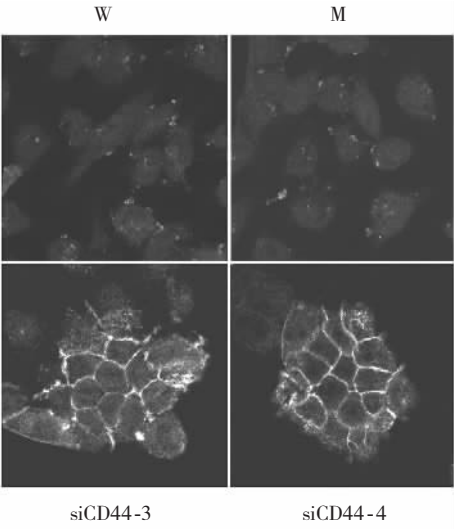


图 4 CD44 表达抑制致细胞 E-cadherin 表达增强  
Fig 4 Suppressed expression of CD44 results in enhanced expression of E-cadherin

讨 论

在以往的研究中，本研究组观察到 CNE-2L2 细胞高表达 CD44 分子，siCD44 能明显抑制 CNE-2L2 细胞 CD44 的表达，CD44 表达抑制明显减弱细胞在培养中的生长<sup>[8]</sup>。本研究选择了 CD44 表达抑制最明显的细胞，即整合了 siCD44-3 或 siCD44-4 的细胞作研究。CD44 表达抑制使 CNE-2L2 细胞的恶性生物学行为 ( 锚定非依赖性集落形成、体内成瘤性生长及肿瘤肺转移 ) 受抑，向接种于裸鼠的 CNE-2L2 细胞所生长的肿瘤瘤体内注射 Ad5-siCD44，肿瘤的生长也受抑。

以往的动物实验提示，CD44 可能是一种很有前景的肿瘤治疗靶分子<sup>[1-2]</sup>。尽管 CD44 抗体和可溶性 CD44-Ig 融合蛋白在动物实验中有效，但注入体内也可能作用于表达 CD44 的正常细胞，从而产生副作用，因而在人尚无相应的临床研究。迄今为止，有关人肿瘤 CD44 分子靶向治疗的报道还仅限于用实验动物研究 CD44 单抗的抗人急性髓性白血病作用<sup>[7]</sup>。人急性髓性白血病细胞高表达 CD44，CD44 单抗能诱导细胞发生终末分化，抑制细胞增殖，甚至诱导细胞凋亡<sup>[11]</sup>。但能否在临床上应用 CD44 单抗治疗急性髓性白血病，尚需深入研究。本研究提示了以 CD44 分子作为靶子治疗人肿瘤的另一种可能性。实验表明，向接种于裸鼠的 CNE-2L2 细胞所生长的肿瘤瘤体内注射能产生 siCD44 的腺病毒，抑制肿瘤的生长。尽管实验中的抑制作用还有限，但这与注射的病毒剂量及注射次数有关。重要的是该方法在临床上容易操作，特别是对体表的肿瘤和借助窥镜能触及的肿瘤，而且它不会作用于正常细胞。实际上经由瘤体内注射作基因治疗已被用于临床试验<sup>[12]</sup>。当然，若以 CD44 分子作靶子，首先要知道有待治疗的肿瘤是否为 CD44 高表达。另外，最好检测 CD44 高表达是否与肿瘤的恶性行为相关。

本研究组以往研究发现，CD44 表达抑制的 CNE-2L2 细胞从 G0 期进入 S 期受抑<sup>[8]</sup>。本研究显示，CD44 表达抑制致 CNE-2L2 细胞的 E-Cadherin 表达增强。E-Cadherin 在上皮细胞间的黏附中起着重要作用，其表达减弱与很多肿瘤的生长及去分化相关，被认为是一个抑癌基因<sup>[13,14]</sup>。因此可以认为，CD44 表达抑制致 CNE-2L2 细胞恶性生物学行为减弱及 siCD44 对 CNE-2L2 肿瘤的治疗作用与抑制细胞从 G0

期进入 S 期及增强 E-Cadherin 表达相关。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Naor D , Nedvetzki S , Golan I , *et al.* CD44 in cancer [ J ]. Crit Rev Clin Lab Sci , 2002 , 39( 6 ) : 527-579.
- [ 2 ] Marhaba R , Zoller M. CD44 in cancer progression : adhesion , migration and growth regulation [ J ]. J Mol Histol , 2004 , 35( 3 ) : 211-231.
- [ 3 ] Guo Y , Ma J , Wang J , *et al.* Inhibition of human melanoma growth and metastasis *in vivo* by anti-CD44 monoclonal antibody [ J ]. Cancer Res , 1994 , 54( 7 ) : 1561-1565.
- [ 4 ] Breyer R , Hussein S , Radu DL , *et al.* Disruption of intracerebral progression of C6 rat glioblastoma by *in vivo* treatment with anti-CD44 monoclonal antibody [ J ]. J Neurosurg , 2000 , 92( 1 ) : 140-149.
- [ 5 ] Sy MS , Guo YJ , Stamenkovic I. Inhibition of tumor growth *in vivo* with a soluble CD44 immunoglobulin fusion protein [ J ]. J Exp Med , 1992 , 176( 2 ) : 623-627.
- [ 6 ] Harada N , Mizoi T , Kinouchi M , *et al.* Introduction of antisense CD44s cDNA down-regulates expression of overall CD44 isoforms and inhibits tumor growth and metastasis in highly metastatic colon carcinoma cells [ J ]. Int J Cancer , 2001 , 91( 1 ) : 67-75.
- [ 7 ] Jin L , Hope KJ , Zhai Q , *et al.* Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells [ J ]. Nat Med , 2006 , 12( 10 ) : 1167-1174.
- [ 8 ] 时 岩 , 田 云 , 周异群 , 等 . CD44 表达减弱致人鼻咽癌细胞 CNE-212 体外生长抑制 [ J ]. 中国医学科学院学报 , 2007 , 29( 1 ) : 67-72.
- [ 9 ] 郁多男 , 高 进 . 应用体外器官培养研究人鼻咽癌不同克隆细胞株的侵袭特性 [ J ]. 中国医学科学院学报 , 1994 , 16( 4 ) : 317-322.
- [ 10 ] Yue W , Jin YL , Shi GX , *et al.* Suppression of 6A8  $\alpha$ -mannosidase gene expression reduced the potentiality of growth and metastasis of human nasopharyngeal carcinoma [ J ]. Int J Cancer , 2004 , 108( 2 ) : 189-195.
- [ 11 ] Gadhoom Z , Delaunay J , Maquarre E , *et al.* The effect of anti-CD44 monoclonal antibodies on differentiation and proliferation of human acute myeloid leukemia cells [ J ]. Leuk Lymphoma , 2004 , 45( 8 ) : 1501-1510.
- [ 12 ] Meng RD , El-Deiry WS. Tumor suppressor gene therapy for cancer : from the bench to the clinic [ J ]. Drug Resist Updat , 1998 , 1( 3 ) : 205-210.
- [ 13 ] Pecina-Slaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells [ J ]. Cancer Cell Int , 2003 , 3( 1 ) : 17-23.
- [ 14 ] Beavon IRG. The E-cadherin-catenin complex in tumor metastasis : structure , function and regulation [ J ]. Eur J Cancer , 2000 , 46( 2 ) : 247-256.

( 2006-12-06 收稿 )