

腺病毒介导 *hCTR1* 转染用于治疗顺铂耐受 宫颈癌的基础研究^{*}

吴秀丽^{1,2}, 郭涛³, 蔡华伟^{4△}

1. 四川大学华西第二医院 病理科(成都 610041); 2. 出生缺陷与相关妇科疾病
教育部重点实验室(四川大学)(成都 610041); 3. 四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041);
4. 四川大学华西医院 核医学科 四川省核医学重点实验室(成都 610041)

【摘要】 目的 诱导培养对顺铂耐药的人宫颈癌细胞株,并进一步研究针对宫颈癌细胞耐药的机制和相应的治疗方法。**方法** 采用浓度梯度递增法使用顺铂处理人宫颈癌细胞 C-33A,诱导出顺铂耐药细胞株 C-33A/cis 后,通过 Western blot 检测铜离子转运蛋白(copper transporter 1,CTR1)的表达改变,使用顺铂耐药细胞株 C-33A/cis 建立肿瘤皮下荷瘤模型,使用转染有 *hCTR1* 基因的腺病毒注射液(ad-*hCTR1*)并联合顺铂给药,观测肿瘤体积的改变,并在最后一次注射 10 d 后处死小鼠,通过免疫组化方法检测肿瘤组织中 CTR1 的表达。**结果** 浓度梯度递增法诱导出的耐药细胞株 C-33A/cis 较亲代细胞 C-33A 对顺铂引起的细胞毒性敏感性下降,顺铂的半致死剂量浓度(IC₅₀)由(1.86±0.08)μmol/L 提升至(8.11±0.21)μmol/L。Western blot 结果显示耐药细胞 C-33A/cis 中 CTR1 的表达降低。利用顺铂耐药细胞株 C-33A/cis 建立的皮下瘤模型,在给予 ad-*hCTR1* 后,肿瘤组织内可检测到 CTR1 表达增高;对荷瘤鼠给予腺病毒转染 CTR1 联合顺铂给药后,肿瘤体积增长受到抑制。**结论** 腺病毒转染 CTR1 联合顺铂给药可能提高耐药性宫颈癌的治疗效果。

【关键词】 宫颈癌 顺铂 铜离子转运蛋白 腺病毒转染

Basic Research of the Adenovirus-mediated *hCTR1* Transfection on the Treatment of Cisplatin Resistant Cervical Cancer
WU Xiu-li^{1,2}, GUO Tao³, CAI Hua-wei^{4△}. 1. Department of Pathology, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China; 3. Department of Gynecology and Obstetrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4. Department of Nuclear Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Sichuan Provincial Key Laboratory of Nuclear Medicine, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: hw.cai@yahoo.com

【Abstract】 Objective To induce cisplatin-resistant cervical squamous carcinoma cell line and investigate the drug resistant mechanisms and adenovirus trans-gene therapeutical treatment. **Methods** The cisplatin-resistant subline, designated C-33A/cis, was originated by growing parental C-33A cells with gradually increasing doses of cisplatin. The cytotoxicity of cisplatin was determined by CCK-8 assay, and the CTR1 expression was measured by Western blot. Subcutaneous xenograft cervical tumor model was established by cisplatin-resistant C-33A/cis cell line. Recombinant adenovirus ad-*hCTR1* was transfected into tumor by intratumoral injection and combined with cisplatin chemotherapy. The changes in the volume of tumor were observed and the mice were executed at 10th day after the last injection, and the expression of CTR1 in tumor tissues was detected by immunohistochemistry. **Results** Cisplatin-resistant cervical carcinoma C-33A/cis cells were successfully induced by gradually increased concentration of cisplatin. The cytotoxic IC₅₀ value of cisplatin on C-33A/cis had been upgraded from (1.86±0.08) to (8.11±0.21) μmol/L, while the CTR1 was found decreased by Western blot assay. Immunohistochemical analysis indicated that CTR1 expression was increased by intratumoral injection of adenovirus ad-*hCTR1*, and the tumor growth of C-33A/cis drug-resistant cervical carcinoma xenograft was inhibited by ad-*hCTR1* transfection combined with cisplatin. **Conclusion** The combination therapy of ad-*hCTR1* transfection and cisplatin was effective to inhibit the growth of drug-resistant C-33A/cis tumor.

【Key words】 Cervical cancer Cisplatin CTR1 Adenovirus transfection

^{*} 国家自然科学基金(No. 82301250)和四川省科技厅项目
(No. 2014KJT058-2014SZ0001)资助

△ 通信作者, E-mail: hw.cai@yahoo.com

子宫颈癌是女性生殖系统中最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和致死率在女性肿瘤疾病中位居第 2 位^[1-2]。目前临床上根治性手术仍是宫颈癌患者的首选治疗方案,且患者通常在手术前后会采用放

化疗等方法进行辅助治疗。化疗的效果主要取决于肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,在目前针对宫颈癌患者的化疗中,顺铂(cisplatin, cDPP)、卡铂(carboplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)等铂类药物(DPPs)在联合治疗方案或单药治疗方案中,均作为一线药物得到了广泛的应用,其中顺铂的联合用药治疗方案阳性反应率可达27%~36%,单药治疗阳性率也有13%~19%;然而,在接受化疗的过程中,宫颈癌细胞,尤其是复发性宫颈癌的癌细胞,容易对化疗药物产生耐药性,并最终导致化疗的失败^[3-4]。

近年来的多项研究表明,人类铜转运蛋白1(human copper transporter 1, hCTR1)不但是铜离子进入细胞的重要转运分子,对铂类药物在肿瘤细胞中的摄取也有重要影响^[5-6]。本研究通过浓度梯度递增法诱导对顺铂耐药的人宫颈癌细胞C-33A/cis后,观察重组人 *hCTR1* 腺病毒(ad-*hCTR1*)联合顺铂对C-33A/cis耐药细胞的治疗效果,期望能为宫颈癌铂类药物耐药性的机制研究提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI-1640培养基、胎牛血清、青-链霉素、磷酸盐缓冲液(PBS)、胰蛋白酶购自Hyclone;铜离子转运蛋白1(CTR1)抗体购自Novus;二抗、ECL发光试剂购自Thermo Scientific;RIPA细胞裂解液,Tris缓冲液(TBS, pH=7.4),Tween-20, DAB显色剂购于北京碧云天公司;CCK-8活性细胞检测试剂盒购自日本同仁化学(上海);顺铂注射液(有效质量浓度5 mg/mL)购自江苏豪森药业;ad-*hCTR1*注射液由上海吉凯基因公司生产。

1.2 细胞培养及耐药细胞株C-33A/cis的建立

人宫颈癌细胞C-33A购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心,按培养说明使用RPMI-1640培养基,添加10%胎牛血清、100 U/mL青-链霉素,于体积分数5% CO₂培养箱中培养。细胞培养至对数生长期时,使用体积分数0.25%胰蛋白酶-EDTA消化传代。浓度梯度递增法诱导耐药细胞株^[7]:C-33A细胞消化后接种于含有0.2 μmol/L顺铂的培养基中持续培养,每24 h洗去死亡细胞并更换新的含顺铂培养基,显微镜下观察活细胞的形态,细胞形态与亲代无明显变化,且培养基清澈无明显杂质,视为该代细胞诱导成功。待存活细胞稳定增殖传代后,每10代逐渐增加顺铂

剂量至0.5、1.0、2.0、5.0 μmol/L。检测诱导后C-33A/cis细胞在顺铂处理后的存活率来计算细胞对顺铂的耐药性,取不同顺铂浓度诱导后的对数生长期C-33A/cis细胞按照1×10⁴/孔接种于96孔板中,培养过夜后,加入0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100 μmol/L的顺铂孵育48 h。弃掉含药物培养基后,每孔加入100 μL新鲜RPMI-1640培养基及10 μL CCK-8试剂,继续培养4 h后,使用酶联免疫检测仪检测460 nm波长处吸光值(A₄₆₀)并使用Prism 5.0软件计算出顺铂药物对C-33A/cis细胞致死曲线及药物半致死剂量。最终得到的符合C-33A细胞形态学特征且可耐受最高浓度药物的细胞,命名为C-33A/cis并用于后续实验。

1.3 Western blot 检测 hCTR1 的表达

使用RIPA缓冲液分别裂解0、0.5、1.0、2.0、5.0 μmol/L顺铂诱导后稳定生长的C-33A细胞并提取总蛋白,4℃条件下10 000×g离心15 min后收集上清备用。SDS-PAGE电泳时每孔道按30 μg总蛋白量上样,电泳完毕后将蛋白湿法转膜印至醋酸纤维素膜,使用含5%脱脂牛奶的0.5% TBS-Tween 20(TBST)室温封闭2 h,CTR1一抗4℃孵育过夜,TBST洗涤3次后,加入二抗孵育1 h, TBST洗涤,加入ECL发光液孵育5 min后,进行显影定影并拍照记录。内参蛋白为GAPDH。

1.4 小鼠荷瘤动物模型的建立及给药

所有相关动物实验操作均符合四川大学动物伦理委员会要求。Balb/c雌性裸鼠20只,4~5周龄,体质量15~18 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于四川大学华西医院SPF级动物中心。取对数生长期的C-33A/cis细胞使用体积分数0.25%胰蛋白酶-EDTA消化后,使用PBS重悬至细胞密度为2×10⁷ mL⁻¹。每只裸鼠背部皮下接种0.1 mL C-33A/cis细胞悬液,待肿瘤生长至约5 mm×5 mm后开始给药。给药时将荷瘤小鼠随机分为4组(*n*=5):实验组给予瘤体内注射纯度为2×10¹⁰ pfu/mL的ad-*hCTR1*腺病毒液50 μL,24 h后按10 mg/m²剂量通过尾静脉给予顺铂注射液(5 mg/mL),每隔24 h给药一次,连续给予3次顺铂;1号对照组给予瘤内注射2×10¹⁰ pfu/mL ad-*hCTR1*液体50 μL;2号对照组尾静脉给予10 mg/m²剂量的顺铂注射液3次;3号空白对照组瘤内注射PBS 50 μL后,尾静脉给予等同顺铂注射液剂量的生理盐水3次。第一次注射前和注射后第2、4、6、8、10天时测量肿瘤体积,最后一次注射10 d后处

死小鼠收集肿瘤组织备后续检测。

1.5 免疫组化标本检测肿瘤组织中 hCTR1 的表达

CTR1 的免疫组化检测参考文献中的方法完成^[8]。肿瘤组织经体积分数 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,石蜡包埋,切片为 5 μm/片,60 ℃ 烘片 45 min,二甲苯脱蜡 3 次,切片经 100% ~ 70% 乙醇进行梯度脱水后,0.1% Triton-X 的 PBS 清洗 2 次;在 0.01 mol/L 的柠檬酸钠缓冲液 (pH=6.0) 进行微波热修复 2 次;0.3% H₂O₂ 封闭 30 min 去除内源性过氧化物酶;0.1% Triton-X 的 PBS 清洗 2 次后,按照抗体说明书进行染色操作及 DAB 显色步骤。染色完毕封片晾干后,由专业病理科人员在每张切片上随机选取 4 个区域进行观察。CTR1 阳性染色为棕黄色,视野内未见染色定义为阴性(-),可见细胞染色根据棕黄色细胞比例定义为弱阳性(+) (10%~25%),阳性(++) (25%~50%),强阳性(+++) (50%以上)。

1.6 统计学方法

各组小鼠肿瘤体积数据比较采用双尾 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 顺铂耐药细胞株 C-33A/cis 的建立

0.5~5.0 μmol/L 顺铂诱导的耐药细胞呈多边形上皮样生长,细胞形态与原亲代细胞没有明显区别;进一步提高顺铂药物浓度至 10.0 μmol/L 时,C-33A 存活细胞的形态发生了显著改变(图 1)。但 10.0 μmol/L 顺铂处理下存活的耐药细胞接种至裸鼠皮下后,不能成长为实体肿瘤;因此我们后续研究所使用的 C-33A/cis 细胞均为耐受 5.0 μmol/L 顺铂的细胞株。CCK-8 法测得 C-33A/cis 细胞经耐药诱导后,顺铂对细胞的半致死浓度 (IC₅₀) 由 (1.86±0.08) μmol/L 提升至 (8.11±0.21) μmol/L,相比亲代 C-33A 细胞出现了明显的顺铂耐受(图 2)。C-33A/cis 细胞在无顺铂培养基中培养 50 代以上,通过定期检测其对顺铂的 IC₅₀,我们发现该细胞稳定保持了对顺铂的耐药性。

2.2 C-33A 细胞耐药前后 CTR1 蛋白的表达

Western blot 结果显示(图 3),随着诱导药物顺铂的浓度增加,稳定传代的诱导后 C-33A 细胞中

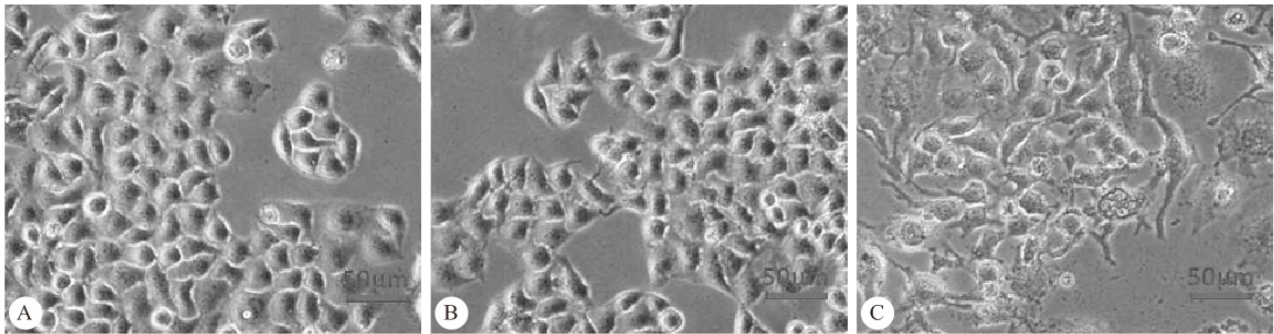


图 1 显微镜下观察 0(A)、5(B)、10 μmol/L(C) cDPP 处理后稳定生长的 C-33A 细胞形态

Fig 1 Morphological investigation of C-33A cells before (A) and after 5 (B) or 10 μmol/L (C) cDPP induction

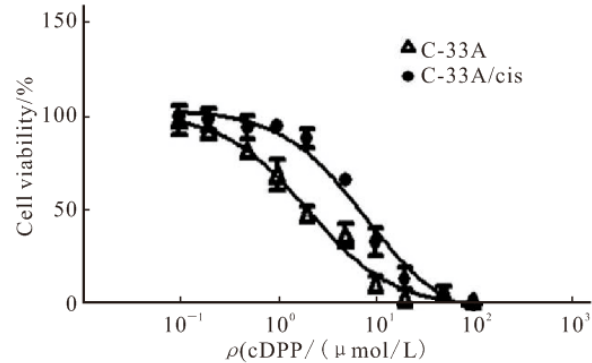


图 2 5 μmol/L cDPP 诱导的 C-33A/cis 细胞与亲代 C-33A 细胞的顺铂致死剂量曲线比较

Fig 2 cDPP dose response curves of C-33A and C-33A/cis cells

CTR1 的表达水平开始降低,2.0 μmol/L 和

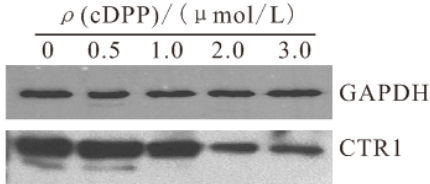


图 3 Western blot 检测不同浓度顺铂诱导的耐药细胞 C-33A/cis 中 CTR1 的表达

Fig 3 Expression of CTR1 in C-33A cells before and after cisplatin induction

5.0 μmol/L 诱导组的 C-33A/cis 细胞中的 CTR1 蛋白表达明显低于其亲代细胞。

2.3 ad-hCTR1 和顺铂对肿瘤生长的影响

CTR1 蛋白表达一般定位于细胞膜与细胞质,从免疫组化检测结果(图 4)中可以看到,接受 ad-

hCTR1 注射液的两组裸鼠(实验组和 1 号对照组)肿瘤组织中,CTR1 的染色为阳性或强阳性(++或+++),而未转染病毒组(2 号对照组和 3 号对照

组)的肿瘤组织中 CTR1 的染色为阴性(−)或弱阳性(+),表明腺病毒成功转染了 *CTR1* 基因进入 C-33A/cis 肿瘤细胞中并有蛋白表达。

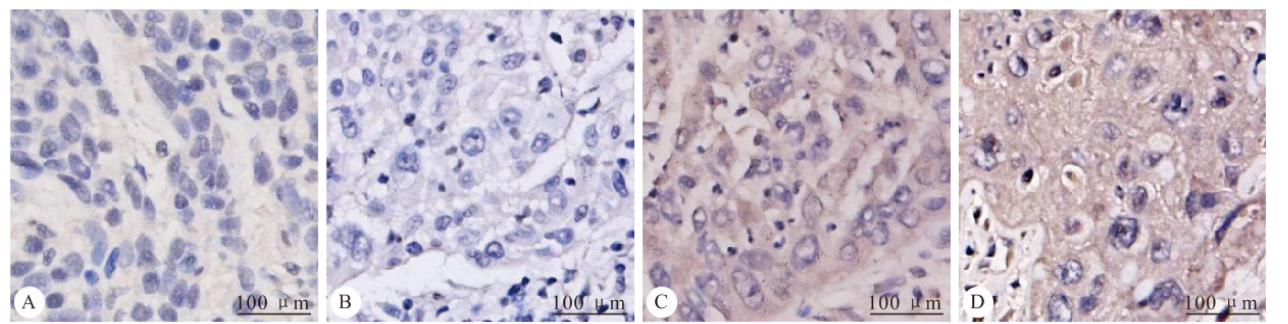


图 4 瘤内腺病毒转染 *ad-hCTR1* 对各组小鼠肿瘤组织中 CTR1 表达的影响
Fig 4 The intratumoral injection of *ad-hCTR1* improves effect of cisplatin treatment on C-33A/cis tumor
A: control group; B: cDPP treated group; C: *ad-hCTR1* transfected group; D: *ad-hCTR1* transfection plus cDPP treated C-33A/cis group

进一步的肿瘤抑制实验结果(图 5)表明,由顺铂耐药细胞株 C-33A/cis 建立的小鼠皮下移植肿瘤,对于 cDPP 具有较明显的耐受能力,单独给予顺铂组或单独给予 *ad-hCTR1* 组的肿瘤体积与对照组各时点肿瘤体积差异无统计学意义($P>0.05$);而 *ad-hCTR1* 联合顺铂给药 3 次后能有效抑制顺铂耐药 C-33A/cis 皮下肿瘤体积增长,给药 10 d 后实验组肿瘤体积与 3 个对照组之间差异有统计学意义($P<0.05$)。

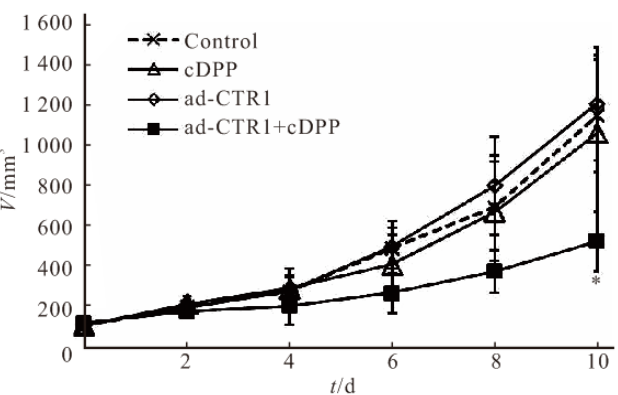


图 5 不同处理方式后 C-33A/cis 的肿瘤生长曲线
Fig 5 Growth curves of C-33A/cis subcutaneous tumors after treatment
* $P<0.05$, vs. other groups

3 讨论

肿瘤细胞耐药性的产生仍是目前临床肿瘤化疗的主要障碍和导致治疗失败的重要原因。顺铂是宫颈癌治疗的临床一线化疗药物,在宫颈癌的临床治疗中具有重要作用,然而肿瘤细胞耐药性的产生严

重限制了顺铂的抗肿瘤效果。建立体外肿瘤耐药细胞株,能为宫颈癌耐药性机制及抗药性逆转的研究提供重要的手段和模型。我们参考文献中的方法^[7],通过浓度梯度递增法处理人宫颈癌细胞 C-33A,成功诱导出了具有顺铂抗性的耐药细胞株 C-33A/cis,其对顺铂的耐药性是亲代细胞的 4 倍以上,可用于宫颈癌细胞铂类化疗药物耐药性产生的机制研究。

顺铂分子具有较高的极性,因此难以依靠自身直接扩散穿过脂质细胞膜,因此需要依靠一类特殊的药物转运载体来携带药物分子进入肿瘤细胞。体外实验证实,肿瘤细胞株对顺铂耐药的一个关键步骤,是通过调控顺铂药物在细胞中的摄取,来影响肿瘤细胞对顺铂的药物敏感性。随着对肿瘤药物运输分子机制研究的不断深入,研究者发现, *hCTR1* 不对铂类药物在肿瘤细胞中的摄取也有重要影响。Howell 小组的研究报道称,敲除 CTR1 基因后,体外细胞模型和动物体内模型上均可导致卵巢癌 SKOV3 细胞对顺铂产生耐药性^[9-11];余乐等^[7]诱导食管鳞状癌细胞 HKESC-1 /cis 产生顺铂耐药性后也发现,CTR1 的 mRNA 水平与蛋白表达水平较亲代细胞出现了明显降低。本研究结果也显示,在顺铂诱导的宫颈癌耐药 C-33A/cis 细胞中,CTR1 的基因表达出现了明显降低,与上述结果基本一致。但值得注意的是,我们在耐药诱导过程中,发现 C-33A 细胞对顺铂耐药存在阈值,这可能与细胞本身的特性有关,但其具体原因尚待进一步阐明。

而将 *hCTR1* 的基因功能性转染到肿瘤细胞后,细胞对顺铂的摄取率可出现明显提升。SONG

等^[12]报道,将 hCTR1 的 cDNA 功能性转染到小细胞肺癌细胞株 SCLC 和 SR2 后,细胞对顺铂的摄取率分别上升了 20% 和 50%。进一步利用 100 $\mu\text{mol/L}$ 铜螯合剂处理肿瘤细胞后,其顺铂吸收率可上升近 90%,顺铂引起的肿瘤细胞 IC₅₀ 从 10 $\mu\text{mol/L}$ 下降到 3.8 $\mu\text{mol/L}$ 。以此为基础的 I 期临床结果显示,利用铜螯合药物曲恩汀(trientine)与卡铂联合使用后用于 5 例恶性卵巢癌治疗,也取得了较好的疗效^[13-14]。本研究利用瞬时转染效率更高的腺病毒来将 hCTR1 基因转染进入宫颈癌耐药细胞株 C-33A/cis 形成的实体瘤组织细胞,经免疫组化证实该方法可确实有效地提高 CTR1 基因在瘤组织中的表达;而进一步联合顺铂治疗结果显示,肿瘤体积的生长受到了明显抑制。

本研究通过浓度梯度递增法诱导出了顺铂耐受的宫颈癌 C-33A/cis 细胞,其中的 CTR1 表达较亲代细胞出现明显降低;对该细胞株接种形成的皮下实体瘤,通过瘤内注射腺病毒转染 CTR1 基因联合顺铂给药,可提高针对此种耐药性宫颈癌的肿瘤抑制效果。

参 考 文 献

- [1] LOZANO R, NAGHAVI M, FOREMAN K, *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 2012, 380 (9859): 2095-2128.
- [2] CHEN W, ZHENG R, ZENG H, *et al.* Annual report on status of cancer in China, 2011. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27 (1): 2-12.
- [3] GO RS, ADJEI AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol*, 1999, 17(1): 409-422.
- [4] ROSA DD, MEDEIROS LR, EDELWEISS MI, *et al.* Adjuvant platinum-based chemotherapy for early stage cervical cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012, 13(6): CD005342.

- [5] ISHIDA S, MCCORMICK F, SMITH-MCCUNE K, *et al.* Enhancing tumor-specific uptake of the anticancer drug cisplatin with a copper chelator. *Cancer Cell*, 2010, 17(6): 574-583.
- [6] WU Z, LIU Q, LIANG X, *et al.* Reactivity of platinum-based antitumor drugs towards a Met- and His-rich 20 mer peptide corresponding to the N-terminal domain of human copper transporter 1. *J Biol Inorg Chem*, 2009, 14(8): 1313-1323.
- [7] 余 乐, 陈明辉, 古春萍, 等. 顺铂降低铜离子转运蛋白 1 表达诱导人食管鳞癌细胞耐药. *中国药理学通报*, 2011(7): 911-914.
- [8] HOLZER AK, VARKI NM, LE QT, *et al.* Expression of the human copper influx transporter 1 in normal and malignant human tissues. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54 (9): 1041-1049.
- [9] HOLZER AK, HOWELL SB. The internalization and degradation of human copper transporter 1 following cisplatin exposure. *Cancer Res*, 2006, 66(22): 10944-10952.
- [10] HOWELL SB, SAFAEI R, LARSON CA, *et al.* Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs. *Mol Pharmacol*, 2010, 77(6): 887-894.
- [11] LARSON CA, BLAIR BG, SAFAEI R, *et al.* The role of the mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of platinum-based drugs. *Mol Pharmacol*, 2009, 75(2): 324-330.
- [12] SONG IS, SAVARAJ N, SIDDIK ZH, *et al.* Role of human copper transporter Ctrl in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(12): 1543-1549.
- [13] KUO MT, FU S, SAVARAJ N, *et al.* Role of the human high-affinity copper transporter in copper homeostasis regulation and cisplatin sensitivity in cancer chemotherapy. *Cancer Res*, 2012, 72(18): 4616-4621.
- [14] LIANG ZD, STOCKTON D, SAVARAJ N, *et al.* Mechanistic comparison of human high-affinity copper transporter 1-mediated transport between copper ion and cisplatin. *Mol Pharmacol*, 2009, 76(4): 843-853.

(2017-07-05 收稿, 2017-11-10 修回)

编辑 汤 洁