

腺病毒介导的 uPAR 反义核酸 转移抑制肿瘤细胞的侵袭*

孙兴会 谭理 李平 张宇清 王霞 侯敏 宋后燕 朱运松**

(复旦大学上海医学院分子遗传教研室, 教育部分子医学重点实验室, 上海 200032)

摘要 为了观察尿激酶受体 (uPAR) 反义核酸对肿瘤细胞体外侵袭的抑制作用, 用 PCR 方法扩增 uPAR cDNA 5'端 -46 bp ~ +454 bp 一段长 500 bp 的序列, 利用 DNA 重组技术将其克隆到病毒载体 pAdeno-X 中, 构建出重组腺病毒载体 pAdeno-X-uPAR (-) 和 pAdeno-X-uPAR (+)。线性化后的重组腺病毒载体转染 HEK293 细胞 7 天后, 可以获得滴度分别为 1.5×10^8 pfu/ml 和 0.5×10^8 pfu/ml 的 uPAR 反义和正义核酸表达重组腺病毒, 分别命名为 Ad-uPAR (-) 和 Ad-uPAR (+)。以不同的病毒感染指数 (MOI) 感染人肺巨细胞癌高转移株 95D 肿瘤细胞, 3 天后用 RNA 印迹法可以检测肿瘤细胞 uPAR 正义和反义核酸表达水平, 随着 MOI 的升高, Ad-uPAR (-) 感染的肿瘤细胞 uPAR 蛋白水平逐渐下降, 肿瘤细胞的体外侵袭能力也明显下降, 而感染 Ad-uPAR (+) 的肿瘤细胞无明显变化。结果表明, 重组腺病毒可以表达 uPAR 正义和反义核酸, uPAR 反义核酸可以明显抑制人肺巨细胞癌高转移株 95D 肿瘤细胞在体外的侵袭能力。

关键词 尿激酶受体, 反义核酸, 侵袭, 肿瘤细胞, 腺病毒

学科分类号 Q556+.9

尿激酶 (urokinase, uPA) 是丝氨酸蛋白酶家族的成员之一, 在细胞外基质的降解过程中发挥着重要的作用。它可以激活纤溶酶原产生纤溶酶, 纤溶酶可以降解细胞外基质中的多种成分。尿激酶的这种作用可以被细胞表面尿激酶受体 (urokinase receptor, uPAR) 富集, 从而在细胞表面局部形成强大的基质降解活性^[1]。uPAR 是一种分子质量为 55 ~ 60 ku 的糖蛋白, 并通过磷脂酰肌醇 (glycosyl-phosphatidylinositol) 锚定在细胞表面, 参与血管生成、单核细胞迁移、伤口愈合以及肿瘤细胞的侵袭和转移等多种生理病理过程。众多的研究表明 uPA 与 uPAR 在肿瘤细胞侵袭转移中具有非常重要的作用^[2]。靶向 uPA 和 uPAR 的单克隆抗体、可溶性 uPAR、能阻断 uPA 和 uPAR 相互作用的 uPA 衍生肽, 都可以抑制肿瘤细胞的侵袭和转移, uPAR 反义核酸表达质粒对肿瘤细胞的侵袭和转移也有明显的抑制作用^[3]。另外, 对 uPAR 缺陷型小鼠的研究表明^[4,5], uPAR 缺失不影响小鼠生殖、发育和出血止血功能。因此, 通过反义技术抑制 uPAR 表达, 阻断 uPA 的作用, 将会在抑制肿瘤细胞侵袭转移的同时, 不影响人体正常的纤溶活性和其他生理功能。基于以上原因, 我们包装了复制缺陷型 uPAR 反义核酸表达腺病毒, 并对其抑制肿瘤细胞体外侵袭的能力进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

质粒 pURAS 由本教研室构建^[6], 含有 uPAR 的 -46 至 +454 位的核苷酸序列。Adeno-XTM expression system、CLONfectin 转染试剂和人胚肾 (human embryonic kidney) HEK293 细胞购自 CLOTECH 公司; 人肺巨细胞癌高转移株 95D 由北京解放军总医院细胞培养室克隆建株; DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit 1 和带正电荷的尼龙膜购自 Roche 公司; 兔抗人 uPAR 多克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体 (Anti-rabbit IgG-HRP) 购自上海华美生物工程公司; 硝酸纤维素膜和 RNAex Reagent 购自上海华舜生物工程有限公司; ECL Reagent 购自上海普飞生物技术有限公司; Boyden 小室 Transwell 购自 Costar 公司; 人工基底膜 Matrigel 购自 BD Bioscience 公司; 细胞培养基 RPMI 1640 和胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco BRL 公司; 小牛血清购自上海实生细胞生物技术有限

* 国家自然科学基金资助项目 (30170398)。

** 通讯联系人。

Tel: 021-54237278, E-mail: yszhu@shmu.edu.cn

收稿日期: 2003-02-24, 接受日期: 2003-04-24

公司; *PI-Sce* I, *I-Ceu* I, *Pac* I, *Swa* I 等核酸工具酶购自 NEB 公司; 引物由 Sangon 生物工程公司合成; 其他试剂均为国产分析纯; 图像分析系统 ImageMaster® VDS 购自 Pharmacia Biotech 公司; PE2000 PCR 扩增仪购自 PE 公司.

1.2 重组腺病毒载体的构建

以质粒 pURAS 为模板, 用引物 1: 5'-GGGGTACCTTATAGAAGACGTGCAGGG-3' 和引物 2: 5'-GCTCTAGAGTCACCTTCCTGGATCCAG-3' 进行 PCR, 扩增 uPAR 的 -46 至 +454 位的核苷酸序列. 用 *Xba* I 和 *Kpn* I 酶切 PCR 产物, 回收目的片段; pShuttle 经 *Xba* I 和 *Kpn* I 酶切, 回收载体片段 (4.1 kb); 两片段连接后构建出重组质粒 pShuttle-uPAR (-), pShuttle-uPAR (-) 经 *PI-Sce* I 和 *I-Ceu* I 双酶解后, 与 pAdeno-X 重组, 构建出重组腺病毒载体 pAdeno-X-uPAR (-). 用引物 3: 5'-GCTCTAGATTATAGAAGACGTGCAGGG-3' 和引物 4: 5'-GGGGTACCGTCACCTTCCTGGATCCAG-3' 进行 PCR, 扩增 uPAR 的 -46 至 +454 位的核苷酸序列, 按照上述步骤, 正向克隆到 pShuttle 和 pAdeno-X 中, 构建成 pShuttle-uPAR (+) 和 pAdeno-X-uPAR (+), 用于对照组实验.

1.3 重组腺病毒的包装

按 Adeno-X™ expression system user manual 的说明进行. HEK293 细胞在 10% FBS 的 DMEM 培养液, 37℃, 5% CO₂ 环境中培养至 50% ~ 70% 汇合时, 脂质体介导下将 *Pac* I 线性化的 pAdeno-X-uPAR (-) 和 pAdeno-X-uPAR (+) 转染 HEK293 细胞, 具体方法参照 CLOTECH 公司 CLONfectin 转染试剂说明书进行, 3 h 后换成含 5% FBS 的 DMEM 培养液, 培养 10 ~ 14 天, 出现细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE), 将出现病变的细胞吹下, 1 500 g 离心 5 min 收集细胞, 取沉淀, 加入 500 μl PBS, 反复冻融 3 次后, -70℃ 保存, 或再次感染 HEK293 细胞将病毒扩增.

1.4 重组腺病毒滴度检测和靶细胞感染

按 Adeno-X™ expression system user manual 的说明进行, 简要叙述如下. 将 100 μl HEK293 细胞悬液 (1 × 10⁴/孔) 加入 96 孔板, 37℃ 5% CO₂ 中培养 24 h, 去掉细胞培养液. 用细胞培养液将病毒先作 1: 100 稀释, 然后将其依次以 1: 10 稀释到 10⁻⁹, 将每个稀释度的病毒加入到 96 孔板的孔中, 每个稀释度同时做 10 个孔, 并有 2 个孔的细胞不用病毒感染, 作为阴性对照. 将 96 孔板放入 37℃

5% 的 CO₂ 培养箱中培养至少一周. 计数每个稀释度细胞发生 CPE 的孔数 x , 用公式 $\text{Titer}/(\text{pfu} \cdot \text{ml}^{-1}) = 10^{(1 + 1 + x1/10 + x2/10 + \dots + x8/10 + 0.8)}$ 计算病毒的滴度.

95D 细胞达到 60% 汇合后, 将不同病毒感染指数 (MOI) (0, 30, 100 MOI) 的 Ad-uPAR (-) 病毒加到不含血清 RPMI1640 细胞培养液中, 37℃ 5% CO₂ 条件下培养 24 h, 去掉细胞培养液, 加入含 10% 小牛血清的 RPMI1640 细胞培养液, 再培养 48 h, 收集细胞, 抽提细胞总 RNA, 裂解细胞作为蛋白质电泳样品, 并将部分细胞用于细胞体外侵袭实验, 同时将 100 MOI Ad-uPAR (+) 感染的 95D 细胞作对照.

1.5 RNA 印迹检测 uPAR 反义核酸表达

主要参考 Roche 公司 DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit 1 的操作手册, 略有改变. 在病毒感染细胞 3 天后, 用上海华舜生物工程有限公司的 RNAex Reagent 试剂抽提对照组 [Ad-uPAR (+)] 和实验组 [Ad-uPAR (-)] 细胞总 RNA. RNA 沉淀干燥后, 用 RNA 上样缓冲液溶解, 然后电泳、转膜、杂交. 我们在 45℃ 进行预杂交和杂交, 杂交后膜的严格洗涤温度用 55℃, 其他步骤均按操作手册进行.

1.6 蛋白质印迹检测细胞 uPAR 蛋白水平

病毒感染 3 天后, 收集实验组和对照组细胞, 用 1 × SDS 上样缓冲液裂解, 作为蛋白质电泳样品. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和转膜参见文献 [7]. 增强型化学发光法显影参见上海普飞生物技术有限公司 ECL reagent 的说明书.

1.7 细胞体外侵袭实验

采用改良的 Boyden 小室方法. 24 孔板的细胞培养孔中加入 Transwell 小室, 它的底部有一层直径 6.5 mm 的滤膜, 滤膜上分布着许多 8 μm 直径的微孔. 将人工重建基底膜 (Matrigel) 1: 4 稀释, 取 100 μl 加在上层小室微孔滤膜上, 37℃ 放置 2 h 使 Matrigel 形成凝胶状备用. 将处理好的 100 μl 细胞悬液 (1 × 10⁶/ml) 加入上层小室, 下层加入 800 μl 含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基, 37℃ 5% CO₂ 条件下培养 24 h, 然后取出上层小室, 用棉签仔细拭去小室内的细胞和 Matrigel, 中性福尔马林固定后进行苏木素染色, 显微镜下观察 (400 ×) 处于微孔滤膜外侧面上的细胞, 细胞的多少反映了细胞侵袭能力的高低^[8].

2 结 果

2.1 重组腺病毒载体的构建

将引物 1 和引物 2 扩增的 PCR 产物回收后, 用 *Kpn* I 和 *Xba* I 酶切, 反向克隆到 pShuttle 质粒的 *Kpn* I 和 *Xba* I 酶切位点之间, 构建成 pShuttle-uPAR (-). 用 *PI-Sce* I 和 *I-Ceu* I 酶切 pShuttle-

uPAR (-), 回收小片段, 并克隆到 pAdeno-X 载体的 *PI-Sce* I 和 *I-Ceu* I 酶切位点之间, 构建成重组腺病毒载体, 分别命名为 pAdeno-X-uPAR (-), 构建过程见图 1. 将引物 3 和引物 4 的 PCR 产物, 正向克隆到 pShuttle 中, 其他步骤完全一样, 构建成 pShuttle-uPAR (+) 和 pAdeno-X -uPAR (+), 各重组质粒经酶切和测序鉴定正确.

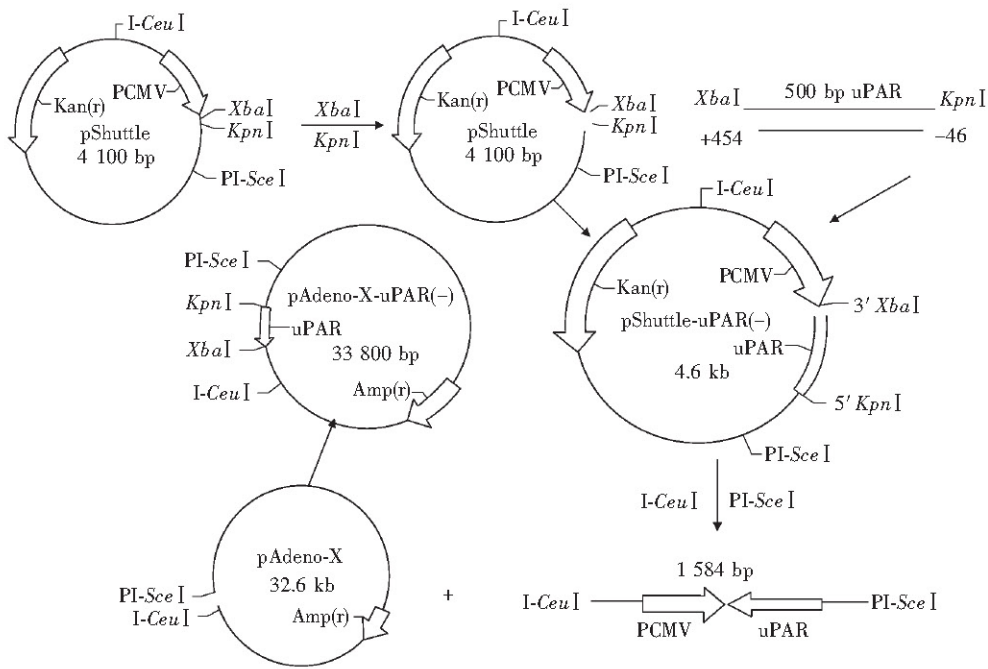


Fig. 1 Construction of recombinant adenovirus vector containing uPAR gene which was inserted reversely

2.2 重组腺病毒滴度的检测结果

将重组腺病毒按 1:100, 1:1000 至 1:1 × 10⁹ 稀释, 然后加入 96 板 293 细胞培养孔中, 每个稀

释度 10 孔, 7 天后计数出现 CPE 的孔数, 数据见表 1.

Table 1 Adenovirus-mediated gene transfer for uPAR inhibited the invasive ability of 95D cancer cells

Fold of dilution	number of wells	CPE positive wells		control wells	CPE positive wells/10	
		Ad-uPAR (+)	Ad-uPAR (-)		Ad-uPAR (+)	Ad-uPAR (-)
10 ⁻⁹	10	0	0	2	0	0
10 ⁻⁸	10	1	2	2	0.1	0.2
10 ⁻⁷	10	3	4	2	0.3	0.4
10 ⁻⁶	10	6	8	2	0.6	0.4
10 ⁻⁵	10	9	10	2	0.9	1
10 ⁻⁴	10	10	10	2	1	1
10 ⁻³	10	10	10	2	1	1
10 ⁻²	10	10	10	2	1	1

根据表 1 数据计算, Ad-uPAR (-) 的滴度 = $10^{(1+1+1+1+1+0+0.2+0.4+0.8+0.8)} = 10^{8.2} = 1.5 \times 10^8$, 而 Ad-uPAR (+) 的滴度 = $10^{(1+1+1+1+1+0+0.1+0.3+0.6+0.9+0.8)} = 10^{7.7} = 0.5 \times 10^8$.

2.3 重组腺病毒在 95D 细胞中的表达

用 100 MOI Ad-uPAR (-) 和 Ad-uPAR (+) 重组腺病毒分别感染 95D 肿瘤细胞 3 天后, 抽提总 RNA, 然后依次进行电泳、转膜、预杂交、预交、洗涤、封闭以及显色. 显色后, 尼龙膜上出现 uPAR 反义 RNA 和正义 RNA 的杂交条带, 结果见图 2.

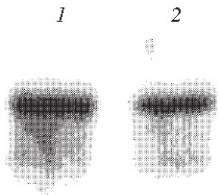


Fig. 2 Northern blot analysis of expression of antisense and sense uPAR RNA in 95D cells infected with recombinant adenovirus
Total RNA isolated from cells were run on gel, transferred onto nylon membrane, and probed with digoxin - labeled uPAR gene. 1 : uPAR antisense RNA; 2: uPAR sense RNA.

2.4 重组腺病毒抑制 95D 细胞的 uPAR 表达

用 0, 30, 100 MOI Ad-uPAR (-) 和 100 MOI Ad-uPAR (+) 感染 95D 细胞 3 天后, 收集细胞并裂解, 蛋白质电泳后转膜, 化学发光法检测 uPAR 蛋白质水平. 结果发现, 随着 Ad-uPAR (-) MOI 的升高, 细胞的 uPAR 水平下降, 而对对照组 [100 MOI Ad-uPAR (+) 感染] 细胞的 uPAR 水平没有明显下降 (图 3).

2.5 重组腺病毒显著抑制 95D 细胞的体外侵袭能力

用无病毒感染、100 MOI Ad-uPAR (-) 感染、100MOI Ad-uPAR (+) 感染的 95D 肿瘤细胞做体外侵袭试验, 结果发现 100 MOI Ad-uPAR (-) 感染细胞穿过 Matrigel 的数目明显减少, 而无病毒感染组和 100MOI Ad-uPAR (+) 感染组之间没有明显的区别 (图 4).

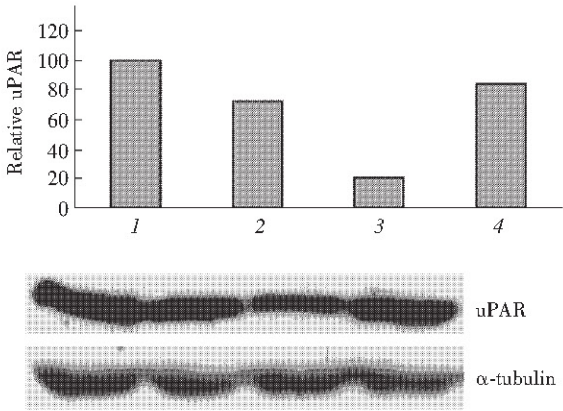


Fig. 3 Western blot analysis of uPAR protein in 95D cancer cells after infection with Ad-uPAR (-) and AduPAR (+)
95D cancer cells infected with Ad-uPAR (-) at different MOIs for 3 days and analyzed for uPAR protein on SDS-PAGE. 95D cancer cells infected with 100 MOI Ad-uPAR (+) for 3 days and used for control. α -tubulin antibodies were used to test whether similar amounts of protein were loaded in each lane. 1: 0 MOI, 2: 30 MOI, 3: 100 MOI, 4: control.

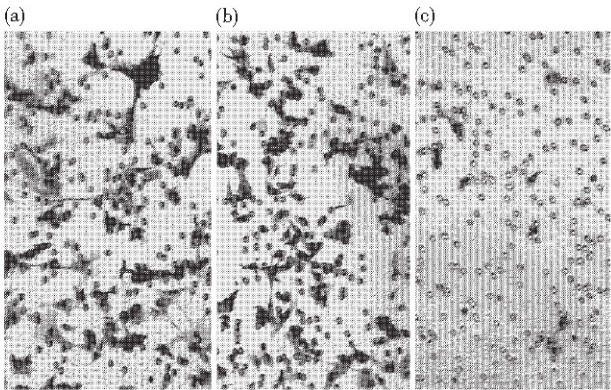


Fig. 4 The invasive ability of 95D cancer cells
(a) 95D cancer cells without adenovirus infection; (b) 95D cancer cells infected with 100MOI Ad-uPAR (+); (c) 95D cancer cells infected with 100MOI Ad-uPAR (-). (Hematein staining, 400 $\times$)

3 讨 论

uPAR 是一种单链糖蛋白, 除了有在细胞表面富集 uPA 的作用以外, 还参与细胞黏附、细胞信号转导、肿瘤细胞的侵袭和转移等生理和病理过程^[9]. 随着对肿瘤血管生成、肿瘤侵袭和转移分子机制研究的深入, uPAR 已成为抑制肿瘤细胞侵袭和转移的主要靶点之一^[10]. uPAR 反义核酸表达

质粒可以降低人表皮瘤细胞株 HEp3^[11]、人成胶质细胞瘤株 SNB19^[12] 以及人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231^[8] 中 uPAR mRNA、细胞表面 uPAR 和细胞体外侵袭转移能力。

由于腺病毒可感染非分裂期细胞,对靶细胞的高感染性和低病源性,能高效介导基因转移及表达,感染细胞后基因组不整合至宿主细胞基因组中,致癌、致突变几率小等优点^[13],我们用 E1 缺失的腺病毒载体,构建出了表达 uPAR 正义和反义核酸的重组病毒表达载体 pAdeno-X-uPAR (+) 和 pAdeno-X-uPAR (-),并包装出能表达 uPAR 正义和反义核酸的重组腺病毒 Ad-uPAR (+) 和 Ad-uPAR (-)。重组腺病毒感染人肺巨细胞癌高转移株 95D 肿瘤细胞后,可以检测到 uPAR 正义和反义核酸的表达。随着 Ad-uPAR (-) MOI 的升高,细胞总 uPAR 水平以及细胞体外侵袭能力都下降,而用 100 MOI 的 Ad-uPAR (+) 感染的细胞组,细胞 uPAR 水平和细胞体外侵袭和转移能力都没有明显下降。文献也有类似的报道,有人用 uPAR 反义核酸表达腺病毒,感染人肺癌细胞株 A549 和 H1299 以及人成胶质细胞瘤株 SNB19 后,发现表达 uPAR 反义核酸的重组腺病毒可以明显抑制它们的侵袭和转移^[14,15]。

腺病毒介导的基因转移效率与靶细胞表面的柯萨奇和腺病毒受体 (Coxsackievirus and adenovirus receptor, CAR) 以及整合素密切相关^[16]。为了提高基因转移效率,重组腺病毒在感染 CAR 和整合素表达水平低的细胞时,要使用较高的 MOI。肺组织中有较高的 CAR 表达水平^[17],肺癌细胞 H1299、H460、H266b、H266br 中也有一定的 CAR 和整合素表达^[16]。有学者选用 100MOI uPAR 反义核酸表达重组腺病毒感染 H1299 细胞,发现 uPAR mRNA 水平和蛋白质水平都明显下降^[14]。因此,实验中我们选用重组腺病毒的最高 MOI 为 100。结果表明,100 MOI 的 Ad-uPAR (-) 可以明显降低细胞 uPAR mRNA 和蛋白质水平,使 95D 肿瘤细胞的体外侵袭能力明显降低。

参 考 文 献

- Andreasen P A, Kjoller L, Christensen L, *et al.* The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer*, 1997, **72** (1): 1~22
- Andreasen P A, Egelund R, Petersen H H. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci*, 2000, **57** (1): 25~40
- Schmitt M, Wilhelm O G, Reuning U, *et al.* The urokinase plasminogen activator system as a novel target for tumor therapy. *Fibrinolysis and Proteolysis*, 2000, **14** (2/3): 114~132
- Bugge T H, Suh T T, Flick M J, *et al.* The receptor for urokinase-type plasminogen activator is not essential for mouse development or fertility. *J Biol Chem*, 1995, **270** (28): 16886~16894
- Dewerchin M, Nuffelen A V, Wallays G, *et al.* Generation and characterization of urokinase receptor-deficient mice. *J Clin Invest*, 1996, **97** (3): 870~878
- 廖劲晖, 连福治, 朱运松. 尿激酶受体反义 RNA 表达质粒的构建. *上海医科大学学报*, 1998, **25**: 276~279
- Liao J H, Lian F Z, Zhu Y S. *J Shanghai Med Univ*, 1998, **25**: 276~279
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 888~898
- 徐韶华, 廖劲晖, 朱运松. 尿激酶受体反义 RNA 抑制人乳腺癌细胞的侵袭作用. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, **16** (6): 814~819
- Xu S H, Liao J H, Zhu Y S. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2000, **16** (6): 814~819
- Wang Y. The role and regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor gene expression in cancer invasion and metastasis. *Med Res Rev*, 2001, **21** (2): 146~170
- Mazar A P. The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) as a target for the diagnosis and therapy of cancer. *Anti-Cancer Drugs*, 2001, **12**: 387~400
- Kook Y H, Adamski J, Zelent A, *et al.* The effect of antisense inhibition of urokinase receptor in human squamous cell carcinoma on malignancy. *EMBO J*, 1994, **13** (17): 3983~3991
- Mohanam S, Chintala S K, Go Y, *et al.* *In vitro* inhibition of human glioblastoma cell line invasiveness by antisense uPA receptor. *Oncogene*, 1997, **14** (11): 1351~1359
- Barnett B G, Crews C J, Douglas J T. Targeted adenoviral vectors. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1575** (1~3): 1~14
- Mohan P M, Chintala S K, Mohanam S, *et al.* Adenovirus-mediated delivery of antisense gene to urokinase-type plasminogen activator receptor suppresses glioma invasion and tumor growth. *Cancer Res*, 1999, **59** (14): 3369~3373
- Lakka S S, Rajagopal R, Rajan M K, *et al.* Adenovirus-mediated antisense urokinase-type plasminogen activator receptor gene transfer reduces tumor cell invasion and metastasis in Non-small cell lung cancer cell lines. *Clinical Cancer Res*, 2001, **7** (4): 1087~1093
- Pearson A S, Koch P E, Atkinson N, *et al.* Factors limiting adenovirus-mediated gene transfer into human lung and pancreatic cancer cell lines. *Clinical Cancer Res*, 1999, **5** (12): 4208~4213
- Tomko R P, Xu R L, Philipson L. HCAR and MCAR: The human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (7): 3352~3356

Inhibition of Invasiveness of Human Lung Cancer Cells by Adenovirus-mediated Gene Transfer of Antisense RNA for Urokinase Receptor^{*}

SUN Xing-Hui, TAN Li, LI Ping, ZHANG Yu-Qing,
WANG Xia, HOU min, SONG Hou-Yan, ZHU Yun-Song^{**}

(Department of Molecular Genetics, School of Medicine of Shanghai, The Key Laboratory of Molecular Medicine,
Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract The effect of antisense RNA for urokinase receptor (uPAR) on inhibition of invasiveness of human lung giant cancer cell lines 95D was observed. 500bp fragment of uPAR cDNA between -46bp ~ +454bp was amplified, and recombined into plasmid pAdeno-X. The recombinant vector was named pAdeno-X-uPAR (-) and pAdeno-X-uPAR (+) respectively. 7 days after transfecting HEK293 cell with linearized pAdeno-X-uPAR (-) and pAdeno-X-uPAR (+), the recombinant adenovirus can be obtained, which were named Ad-uPAR (-) and Ad-uPAR (+) respectively. The virus titre (pfu/ml) of Ad-uPAR (-) was 1.5×10^8 , and the virus titre of Ad-uPAR (+) was 0.5×10^8 . 95D cells were infected with Ad-uPAR (-) and Ad-uPAR (+) in different multiplicity of infection (MOI). Northern blot analysis could detect the expression of antisense and sense RNA for 500 bp fragment of uPAR gene. With the increase of MOI, Western blot analysis indicated that with Ad-uPAR (-) infection the protein level of uPAR of 95D cells decreased, and modified Boyden's Chamber assay suggested that the invasive ability of 95D cells also decreased obviously. In 95D cells infected with Ad-uPAR (+), both the mRNA and protein level of uPAR did not decrease, and cells still had high invasive ability. The results indicated that adenovirus is an efficient vector for transferring antisense RNA for uPAR into cells, and antisense RNA for uPAR could obviously inhibit the invasive ability of 95D human lung cancer cells.

Key words urokinase receptor, antisense gene, invasiveness, cancer cells, adenovirus

^{*} This work was supported by grants from The National Science Foundation of China (30170398).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-21-54237278, E-mail: yszhu@shmu.edu.cn

Received: February 24, 2003 Accepted: April 24, 2003