

[文章编号] 1007-385X(2003)01-0005-04

癌胚抗原启动子控制胞嘧啶脱氨酶基因体外对结肠癌细胞专一性杀伤

吴文溪¹, 沈历宗¹, 刘新垣², 许德华², 丁强¹, 华一兵¹(1. 南京医科大学第一附属医院普外科, 南京 210029; 2. 中国科学院上海生物化学和细胞生物学研究所, 上海 200031)

[摘要] **目的:** 研究癌胚抗原(CEA)启动子是否能控制大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶(EC-CD)基因在CEA阳性结肠癌细胞中专一性表达和杀伤结肠癌细胞。**方法:** 构建由CEA启动子驱动的含EC-CD基因的重组腺病毒载体AdCEACD与由巨细胞病毒(CMV)启动子驱动的含EC-CD基因的腺病毒载体AdCMVCD, 分别感染CEA阳性的人结肠癌细胞株Lovo细胞和CEA阴性的Hela细胞, 用RT-PCR法检测受染细胞中EC-CD基因的表达, 并用MTT法检测感染后细胞对5-氟胞嘧啶(5-FC)的敏感性。**结果:** Lovo细胞在AdCMVCD及AdCEACD感染后均有EC-CD mRNA表达, 且对5-FC的敏感性明显增强, Hela细胞在AdCMVCD感染后有EC-CD mRNA表达, 对5-FC的敏感性增强, 而在AdCEACD感染后则没有EC-CD mRNA表达, 5-FC对其亦无杀伤作用。**结论:** CEA启动子能够控制EC-CD基因专一性地在CEA阳性的结肠癌细胞中表达, 从而实现EC-CD基因的靶向性作用。

[关键词] 癌胚抗原; 胞嘧啶脱氨酶; 自杀基因; 基因治疗; 结肠癌

[中图分类号] R730.5; Q782 [文献标识码] A

Carcino-Embryonic Antigen Promotor Controls the Specific Cytotoxicity of *E. coli* Cytosine Deaminase Gene in Colorectal Carcinoma Cells *in vitro*

WU Wen-xi¹, SHEN Li-zong¹, LIU Xin-yuan², XU De-hua², DING Qiang¹, HUA Yi-bing¹(1. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 2. Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether carcino-embryonic antigen(CEA) promotor determines the specific expression of *E. coli* cytosine deaminase(EC-CD) gene and the specific cytotoxicity in CEA-producing colorectal carcinoma cells. **Methods:** Two recombinant adenovirus vectors, AdCEACD containing EC-CD gene controlled under CEA promotor and AdCMVCD containing cytomegalovirus(CMV) promotor and EC-CD gene, were constructed. The expression of EC-CD gene in cells was tested with RT-PCR and cytotoxic effects were assayed with MTT method. **Results:** The CEA-producing cells(human colorectal carcinoma cell line Lovo cell) showed EC-CD mRNA expression and became sensitive to 5-fluorocytosine(5-FC) after infection with AdCEACD and AdCMVCD respectively, The CEA-nonproducing cells(Hela cell) expressed EC-CD mRNA and were sensitive to 5-FC after infection with AdCMVCD, but had no expression of EC-CD mRNA and no cytotoxic effect after infection with AdCEACD. **Conclusion:** CEA promotor could control the expression of EC-CD gene in CEA-positive colorectal carcinoma cells specifically *in vitro*.

[Key words] carcino-embryonic antigen; cytosine deaminase; suicide gene; gene therapy; colorectal carcinoma

* 肿瘤自杀基因的治疗已经成为极富希望的肿瘤治疗新方法。目前研究常选用腺病毒载体作为自杀基因的转移途径,但是传统的腺病毒载体进入机体后因缺乏靶向性,自杀基因可以在正常细胞中表达,在前药存在的情况下,可对正常细胞或组织造成损害。运用某些肿瘤特异性或组织特异性调控元件控制自杀基因的表达,可以达到靶向治疗的目的。我们在建立由巨细

胞病毒(CMV)启动子驱动的含大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶(*E. coli* cytosine deaminase, EC-CD)基因的重组腺病

[基金项目] 南京医科大学创新基金资助课题(Cx9905)

[作者简介] 吴文溪(1947-),男,江苏无锡人,主任医师,教授,主要从事大肠癌基础及临床研究。

E-mail: wuwenxi@yahoo.com

毒载体 AdCMVCD^[1]的基础上,在国内首先构建了由癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)启动子驱动的含 EC-CD 基因的重组腺病毒载体 AdCEACD^[2],体外研究证实 CEA 启动子可以使得 EC-CD 基因在 CEA 阳性的结肠癌细胞中专一性表达并发挥专一性杀伤作用。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

抽提 RNA 用 TRIzol、细胞培养用胎牛血清(FBS)及 DMEM 培养基均为 Gibco 公司产品。逆转录 RT 试剂盒及 PCR 用 pfu DNA 聚合酶购自上海 Sangon 公司。5-氟胞嘧啶(5-FC)购自 Sigma 公司;噻唑蓝(MTT)购自华美公司。

1.2 毒株、细胞株及引物

AdCMVCD, AdCEACD 毒株均保存在含 10% 丙三醇的 PBS 中,保存于 -80℃,用前融化。转化人胚肾细胞株 293, CEA 阳性的人结肠癌细胞株 Lovo, CEA 阴性的人宫颈癌细胞株 Hela 均由本科保存。EC-CD 基因引物序列为:上游 3'-TATGGATCCTCAACGTTTGTA-ATCGATGGCTT-5', 下游 3'-ATAGAATTAAGGCTAA-CAATGTCGAATAACGCTT-5', 扩增片段约 1 300 bp。由中国科学院上海生物化学和细胞生物学研究所 DNA 合成室合成。

1.3 病毒的扩增、纯化与滴度测定^[3]

293 细胞培养至近 100% 融合时,用含 2% FBS 的 DMEM 病毒稀释液 1.5 ml 先感染 1 h(MOI 为 0.01),每 15 分钟轻轻晃动 1 次。1 h 后再加入含 2% FBS 的 DMEM 8.5 ml 继续培养至 90% 以上细胞发生病变。病毒纯化采用 CsCL 密度梯度超离心法。以空斑形成试验测定病毒滴度。

1.4 病毒受染细胞 CD 基因表达的检测——RT-PCR 法。

Lovo 或 Hela 细胞先用 AdCEACD 或 AdCMVCD 感染(MOI 均为 500)1 h 后用含 2% FBS 的 DMEM 洗去病毒(3 次),再换新鲜培养基继续培养 24 h。采用 TRIzol 一步法提取细胞总 RNA。以 Oligo dT 为引物合成第一链,基本按试剂盒说明书进行。再以第一链为模板进行 PCR 扩增,50 μl 的反应体系中含有 10 μmol/L 的上下游引物各 1.5 μl, DMSO 3 μl, 100 mmol/L 的 dNTPs 1.5 μl, pfu 酶 4 U(94℃ 变性 7 min 后再加), 10 × Buffer 5 μl, 模板 DNA 2 μl。循环参数为 94℃ 变性 1 min, 60℃ 退火 1.5 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 共 35 个循环。以质粒 pAdCEACD 为模板作为阳性参照,以质粒 pBluscript 为模板作为阴性对照。

1.5 病毒受染细胞对 5-FC 敏感性测定

96 孔板中铺细胞每孔铺 2 000 细胞,12 h 后用不同 MOI 的病毒感染,12 h 后加不同浓度的 5-FC,培养 48 h 后用 MTT 法测定细胞存活率。

2 结 果

2.1 病毒纯化后滴度

经 CsCL 密度梯度超离心纯化后, AdCEACD 及 AdCMVCD 的滴度分别为 5.0×10^{14} pfu/L, 1.0×10^{15} pfu/L。

2.2 Lovo 细胞感染 AdCEACD 及 AdCMVCD 后 EC-CD 基因的表达(图 1)

Lovo 细胞感染 AdCEACD 及 AdCMVCD 后均可检测到 EC-CD mRNA 表达。

图 1 Lovo 细胞感染病毒后 EC-CD 表达

Fig. 1 EC-CD gene expression of Lovo cells infected with virus

M: DNA 2 000 marker; 1: Positive control, using pAdCEACD as templet; 2: Negative control, using pBluscript as templet; 3: RT-PCR product of non-infected Lovo cells; 4: RT-PCR product of Lovo cells infected with AdCMVCD; 5: RT-PCR product of Lovo cells infected with AdCEACD

2.3 Hela 细胞感染 AdCMVCD 及 AdCEACD 后 EC-CD 基因的表达(图 2)

Hela 细胞感染 AdCMVCD 后可以检测到 EC-CD mRNA 表达,但在 AdCEACD 感染后则没有 EC-CD mRNA 表达。

2.4 AdCMVCD 病毒受染细胞对 5-FC 敏感性增强(图 3)

CMV 启动子基本无组织特异性,在多种细胞和组织中均有活性。如图 3 所示,CEA 阴性的 Hela 细胞和 CEA 阳性的 Lovo 细胞感染 AdCMVCD 后,表现出对 5-FC 相似的敏感性增强($P < 0.01$),且随着病毒感染幅

度的增加 5-FC 的杀伤效应相应增加($P < 0.05$)。

2.5 AdCEACD 感染细胞对 5-FC 的敏感性有细胞专一性(图 4)

图 2 HelA 细胞感染病毒后 EC-CD 表达
Fig. 2 EC-CD gene expression of Hela cells
after infected with virus

M:DNA 2 000 marker; 1:Positive control, using pAdCEACD as templet; 2: RT-PCR product of non-infected Hela cells; 3: RT-PCR product of Hela cells infected with AdCMVCD; 4: RT-PCR product of Hela cells infected with AdCEACD

图 4 AdCEACD 感染细胞对 5-FC 的敏感性

Fig. 4 Sensitivity of cells infected with AdCEACD to 5-FC

CEA 启动子具有细胞专一性,驱动 EC-CD 基因只能在 CEA 阳性的细胞中表达。如图 4 所示,CEA 阳性的结肠癌细胞株 Lovo 细胞感染 AdCEACD 后对 5-FC 的敏感性明显增强($P < 0.05$),并随着病毒感染幅度的增加,5-FC 的杀伤作用逐渐增强($P < 0.05$);而 CEA 阴性的 Hela 细胞感染 AdCEACD 后对 5-FC 的敏感性无明显变化($P > 0.05$),表明利用 AdCEACD/5-FC 系统可以实现对 CEA 阳性结肠癌细胞的专一性杀伤。

3 讨论

基因治疗已经成为当今医学生物学的研究热点,自杀基因治疗作为肿瘤基因治疗的主要方法之一,已经显现出潜在的临床应用前景和价值。EC-CD 基因因为大肠杆菌来源的自杀基因,导入细胞后能表达出胞嘧啶脱氨酶,后者可以将无毒的 5-氟胞嘧啶代谢成细胞毒性 5-氟尿嘧啶(5-FU)而达到治疗肿瘤的目的^[4]。本研究拟应用 EC-CD 自杀基因治疗结肠癌。基因治疗的一个重要环节是选择合适的载体实现目的基因的转移。腺病毒载体具有致病性小、宿主范围广、能感染

图 3 细胞感染 AdCMVCD 后对 5-FC 的敏感性

Fig. 3 Sensitivity of cells infected with AdCMVCD to 5-FC

非分裂期细胞、繁殖滴度高、装载容量大等优点,因而腺病毒载体的研究最多、应用最广^[5,6]。腺病毒载体所携带的外源基因在靶细胞中的表达时间较短,但表达水平却较高,自杀基因治疗的最终目的是使转染自杀基因的细胞死亡,因而腺病毒载体的这一特性在肿瘤的自杀基因治疗方面十分有益,因为高水平的基因表达可在杀死肿瘤细胞后迅速消退,从而减少自杀基因可能产生的副作用。

目前基因治疗亟待解决的问题是如何实现目的基因在特定部位的靶向表达,提高基因治疗的靶向性一方面可以提高基因治疗的效率,另一方面可以减少其毒副作用。理想的基因治疗载体进入体内后,应仅仅转染某些特定细胞,而无损于正常组织和细胞。为了解决这一问题,人们设计了很多方法,靶向性转录技术便是其中之一^[6,7]。靶向性转录技术是利用组织和细胞特异性启动子控制基因的转录,从而使治疗基因在特定的细胞中表达达到靶向治疗的目的^[8,9]。癌胚抗原(CEA)是结肠癌等恶性肿瘤相对特异性标志物,在结肠癌中的阳性率为60%~80%,在结肠癌肝转移及复发病例其阳性率更高,因此本研究设想运用CEA启动子作为结肠癌特异性调控元件,构建由CEA启动子驱动的含EC-CD自杀基因的腺病毒载体,使EC-CD基因只能在CEA阳性的肿瘤细胞中表达而不能在正常细胞和组织中表达从而达到靶向治疗的目的。肿瘤特异性调控元件之所以能驱动自杀基因特异性地杀伤肿瘤细胞,表面上好象是因为肿瘤细胞表面表达某种特异的蛋白,其他细胞则不表达,而实质上是因为其他细胞没有特定的转录激活因子,因而不能转录出特定的mRNA,也就不能表达相应的蛋白,而肿瘤细胞中具有该转录活性,所以能激活特定蛋白的表达。在正常细胞和肿瘤都被转染的情况下,当用该调控元件驱动自杀基因时,肿瘤细胞自然会特异性地表达出自杀基因

的活性,而正常细胞则不能。

本研究结果证实运用CEA启动子可以实现EC-CD基因的专一性表达,应用该策略有望实现自杀基因的靶向性治疗。但是建立靶向性载体的目的是为了在体内应用时保护正常组织和细胞免受CD/5-FC系统的杀伤作用,对结肠癌而言主要是保护消化道黏膜、骨髓等组织免受影响。我们正在进行裸鼠及小鼠研究,拟在体内试验中研究AdCEACD或AdCMVCD感染后对结肠癌及骨髓的影响,检验AdCEACD的靶向性。

[参考文献]

[1] 许德华, 戈凯, 蒋琼, 等. 含CD自杀基因腺病毒载体的构建及其应用[J]. 生物化学与生物物理学报, 1998, 30(2): 164-168.

[2] 吴文溪, 沈历宗, 丁强, 等. 癌胚抗原启动子驱动的含大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶自杀基因腺病毒载体的构建及初步鉴定[J]. 南京医科大学学报, 2001, 21(4): 356-357.

[3] Graham FL, Prevec L. Methods for construction of adenovirus vectors[J]. Mol Biotechnol, 1995, 3(3): 207-220.

[4] Block A, Freund CTF, Chen SH, et al. Gene therapy of metastatic colon carcinoma: Regression of multiple hepatic metastases by adenoviral expression of bacterial cytosine deaminase[J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7(3): 438-445.

[5] Bentires-Alj M, Hellin AC, Lechanteur C, et al. Cytosine deaminase suicide gene therapy for peritoneal carcinomatosis[J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7(1): 20-26.

[6] Wickham TJ. Targeting adenovirus[J]. Gene Therapy, 2000, 7(2): 110-114.

[7] Russell SJ, Cosset FL. Modifying the host range properties of retroviral vectors[J]. J Gene Med, 1999, 1(5): 300-311.

[8] Nagayama Y, Nishihara E, Iitaka M, et al. Enhanced efficacy of transcriptionally targeted suicide gene/prodrug therapy for thyroid carcinoma with the Cre-lox-P system[J]. Cancer Res, 1999, 59(13): 3049-3052.

[9] Morimoto E, Inase N, Mlyake S, et al. Adenovirus-mediated suicide gene transfer to small cell lung carcinoma using a tumor-specific promoter[J]. Anticancer Res, 2001, 21(1A): 329-331.

[收稿日期] 2002-08-27

[修回日期] 2002-11-10

第5届上海国际肝癌肝炎会议征文启事

为了强加国际及沪港学术交流,进一步提高肝癌和肝炎防治研究水平,由上海国际肝癌肝炎会议组织委员会(复旦大学、上海第二医科大学、第二军医大学、中国科学院上海分院、上海市卫生局)和程思远国际肝炎研究基金会(香港)联合主办,定于2004年2月14~17日在香港召开“2004年港沪国际肝病会议——第5届上海国际肝癌肝炎会议、第3届程思远肝炎研究基金会国际学术会议”,会议规范定为1200人,大会主席为中国工程院院士、复旦大学汤钊猷教授和香港大学医学院林兆鑫教授,大会邀请程思远、吴阶平两位副委员长为名誉主席,并由国内吴孟超等与美、英、法、德、日等国和香港地区的著名教授担任共同主席。会议邀请国内外著名学者80余人作专题报告。欢迎国内外从事肝炎和肝癌基础与临床研究的专家、学者参加大会。投稿(请撰写中英文摘要)及联系事项寄:上海市医学院路136号(200032)复旦大学肝癌研究所国际会议秘书处收。电话:(021)64041990-2436,传真:(021)64037181;电子信箱:qiusj68@zshospital.net。有关会议的详情及注册,请查询www.hepa2004.org网址。