

[文章编号] 1007-385X(2003)01- 0013- 04

蜂毒素基因重组腺病毒对肝癌细胞的杀伤作用

李 柏, 张 晨, 李绍祥, 万旭英, 顾 伟, 凌昌全 (第二军医大学长海医院中医科, 上海 20433)

[摘 要] 目的: 构建携蜂毒素基因及甲胎蛋白(AFP)启动子(rAFP)的重组腺病毒载体, 探讨 rAFP 驱动的蜂毒素基因在体外对肝癌细胞的特异性杀伤作用。方法: 人工合成蜂毒素基因, 置于 rAFP 之后, 用细菌内高效同源重组法将目的基因重组入腺病毒质粒中, 转染人胚肾 293 细胞进行腺病毒包装; 采用 MTT 法测定蜂毒素基因转染对 AFP 阳性、阴性肝癌细胞及正常肝细胞增殖的影响。结果: 携蜂毒素基因重组腺病毒载体构建成功, MTT 实验证明携蜂毒素基因重组腺病毒转染后, AFP 阳性肝癌细胞的增殖受到明显抑制, 而对 AFP 阴性肝癌细胞及正常肝细胞无明显影响; 无蜂毒素基因的重组腺病毒转染, 则对各种细胞增殖均无抑制作用。结论: 表达 rAFP 驱动的蜂毒素基因的重组腺病毒在体外可特异性地杀伤 AFP 阳性肝癌细胞。

[关键词] 蜂毒素基因; 甲胎蛋白; 腺病毒载体; 肝癌; 基因治疗

[中图分类号] R735.7 [文献标识码] A

Specific Inhibition of Hepatocarcinoma Cells by Recombinant Adenovirus Expressing Melittin

LI Bai, ZHANG Chen, LI Shao-xiang, WAN Xu-ying, GU Wei, LING Chang-quan (Department of the Traditional Chinese medicine, Changhai Hospital, Shanghai 200433)

[Abstract] Objective: To evaluate the inhibitory effects of the recombinant adenovirus vector expressing melittin gene under the control of human α -fetoprotein (AFP). Methods: The melittin gene was inserted into adenoviral vector through a bacterial homologous recombinant system, then the recombinant adenoviral vector was transfected to 293 cells to generate the desired recombinant adenoviruses. AFP-positive or AFP-negative hepatocarcinoma cells or hepatic cells were infected respectively with the recombinant adenoviruses and the proliferative inhibition was evaluated by MTT method. Results: Recombinant adenovirus containing melittin gene and AFP promoter was constructed successfully. When infected with the recombinant adenoviruses the inhibition of proliferative was observed in AFP-positive hepatocarcinoma cells, but not in AFP-negative hepatocarcinoma cells. Conclusions: Recombinant adenovirus expressing melittin gene under the control of human AFP promoter could specifically inhibit the proliferation of AFP-positive hepatocarcinoma cells.

[Key words] melittin gene; α -fetoprotein; adenovirus vector; hepatocarcinoma; gene therapy

* 肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 积极探索有效的抗癌药物和途径是肝癌治疗研究的重要方向, 基因治疗是目前的一个研究热点。肝癌基因治疗方法有多种, 其中利用 AFP 转录调控序列驱动治疗基因表达是肝癌靶向基因治疗的主要手段^[1-3], 目的基因则常采用自杀基因、免疫基因、抑癌基因等^[4]。将生物毒素基因作为目的基因插入载体, 转染肿瘤细胞, 也可起到抗肿瘤作用^[5]。蜂毒素(melittin, Mel)是蜜蜂毒主要的活性成分, 近年来体外研究发现其具有很强的抗肿瘤作用^[6-8], 但溶血等毒副作用限制了临床应用。如采用

基因工程的方法, 使其特异性地在靶细胞中表达, 则可达到减毒增效的目的。本实验通过人工合成蜂毒素基因, 将其置于 rAFP 驱动下, 以缺陷型腺病毒作为载体, 观察其对肝癌细胞的杀伤效应。

[基金项目] 军队“九五”重点课题(98JD3269); 上海市科技发展基金(98XD14020); 上海市“百人计划”(97BR044)

[作者简介] 李 柏(1964-), 男, 江苏高邮人, 副主任医师, 主要从事中西医结合防治肝癌方面的研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

质粒抽提试剂盒、MTT(四氮唑蓝)购自上海华舜公司; DMEM、RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,小牛血清购自杭州四季青公司。PCR 试剂盒购自大连宝生物公司,引物由上海生工公司合成。

1.2 质粒、菌株和细胞

质粒 pAdrAFPTK 由中国科学院上海生物化学研究所构建; AdEasyTM Adenoviral Vector System Kit 购自 Stratagene 公司; 蜂毒素基因由博彩公司合成并克隆入质粒 pUC^{GT}中; DH5 α 菌,人胚肾 293 细胞,AFP 阳性人肝癌细胞 BEL-7402, HepG2; AFP 阴性人肝癌细胞 SMMC-7721 及正常人肝细胞 L-02 由长海医院中医科实验室保存。

1.3 携蜂毒素基因重组腺病毒的构建、扩增及滴度测定

先按照试剂盒说明书标明的方法将 rAFP 和蜂毒素基因酶切重组入穿梭质粒 pShuttle-rAFP-Mel 中,再构建腺病毒质粒 pAd-rAFP-Mel,用细菌内同源重组法构建能表达蜂毒素的重组腺病毒 Ad-rAFP-Mel。将构建好的 Ad-rAFP-Mel 感染 293 细胞,48 h 后细胞出现完全病变时,收集细胞、离心、弃上清,磷酸盐缓冲液(PBS)重悬,反复冻融 3 次,再离心,取上清,加入 10% 甘油,0.25 μ m 滤器过滤、分装后 -70℃ 保存。用有限稀释法进行滴度测定。

分别构建含蜂毒素基因的腺病毒载体(Ad-rAFP-Mel)及不含蜂毒素基因的腺病毒载体(Ad-rAFP)。

1.4 重组腺病毒质粒 pAd-rAFP-Mel 中插入片段的酶切鉴定

以腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 为对照,用 Xba I 和 Hind III 双酶切鉴定 pAd-rAFP-Mel 和 pShuttle-rAFP-Mel,制胶电泳。从含有重组腺病毒质粒的 DH5 α 菌中抽提 pAd-rAFP-Mel,PCR 扩增 34 轮,一对引物为 5'-ATCGATGTTCTAGTGTACC-3' 和 5'-GTGGTATGGCTGATTATGATCAG-3',将扩增片段进行测序。

1.5 RT-PCR 分析蜂毒素基因的转录

将 HepG2 细胞以 5×10^5 /孔接种于 6 孔板,24 h 细胞贴壁后,吸弃上清,分别用 Ad-rAFP-Mel 和 Ad-rAFP 以感染复数(MOI)为 250 吸附细胞,37℃ 1 h,换成 DMEM + 10% 胎牛血清培养基继续培养,48 h 后抽提 RNA,进行逆转录反应得到 cDNA,PCR 扩增 35 轮,一对引物为 5'-GGTCTATATAAGCAGAGCTG-3' 和 5'-GTGGTATGGCTGATTATGATCAG-3',制胶电泳。

1.6 病毒感染率的测定

将 BEL-7402 肝癌细胞以 5×10^5 /孔接种于 6 孔板中,24 h 细胞贴壁后,吸弃上清,用带有 LacZ 报告基因的重组腺病毒 Ad-CMV-LacZ(MOI = 10,5,1,0.5,0.1)吸附细胞,37℃ 1 h,换成 RPMI-1640 + 10% 小牛血清培养基继续培养,24 h 后 1.25% 戊二醛固定细胞,X-gal 染液染色 3 h 后,置于显微镜下计数 4 个独立区域各 100 个细胞,计算蓝染细胞百分率,确定重组腺病毒的感染效率。

1.7 MTT 法测定蜂毒素基因转染对肝癌细胞的抑制率

BEL-7402, SMMC-7721 及 L-02 细胞常规培养于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基中,在 5% CO₂, 37℃ 完全饱和湿度条件下培养。

分别取上述指数生长期细胞,以 1×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板,常规培养 24 h 细胞贴壁后,吸弃上清。分 Ad-rAFP-Mel 及 Ad-rAFP 2 组,每组以 MOI = 100 分别转染上述各种细胞,每个滴度设 3 个复孔,37℃ 转染 1 h 后,吸弃病毒液,换成 RPMI-1640 完全培养液;另设不加腺病毒转染的各种细胞对照组各 6 个复孔。转染后分别继续培养 72 h 和 96 h,每孔加入 20 μ l 质量浓度为 5 mg/ml 的 MTT,37℃ 避光培养 4 h。将 96 孔板以平板离心机离心 5 min(450 g),去上清,每孔加二甲亚砜 150 μ l,震荡混匀,使沉淀充分溶解,10 min 后置于酶标仪上以波长 490 nm 测定吸光度 A 值,按下列公式计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(\text{对照组 A 值} - \text{实验组 A 值})}{\text{对照组 A 值}} \times 100\%$$

1.8 统计学处理

采用 F 检验。

2 结果

2.1 重组腺病毒质粒 pAd-rAFP-Mel 的鉴定

电泳图见图 1。泳道 1 和 2 均可见 1.3 kb 的 rAFP 和蜂毒素基因融合片段,泳道 3 则无。测序结果序列正确无误。

2.3 重组腺病毒感染效率

MOI 为 0.1,0.5,1,5 时,重组腺病毒对 BEL-7402 肝癌细胞的感染效率分别为 16.5%,44.0%,84.3% 和 96.3%,而 MOI 为 10 时,感染效率为 100%。

2.4 蜂毒素基因转染对肝癌细胞的抑制率

MTT 结果显示,经含蜂毒素基因重组腺病毒转染后 72 h,AFP 阳性人肝癌细胞 BEL-7402 的增殖受到抑制,96 h 后抑制率较为明显;而对 AFP 阴性人肝癌细胞 SMMC-7721 抑制率较低;对正常人肝细胞 L-02 的

增殖无明显抑制;不含蜂毒素基因的重组腺病毒转染后,对以上各种细胞的增殖均无明显抑制作用(见附表)。

2.2 RT-PCR 结果

RT-PCR 反应物电泳(1.2% 胶),可见 1 条清晰条带位于约 230 bp 处(蜂毒素基因侧翼序列加两端引物序列),片段大小符合预期长度(见图 2)。

图 1 质粒 pAd-rAFP-Mel 酶切电泳结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis results of pAd-rAFP-Mel

1: pShuttle-rAFP-Mel Xba I and Hind III restriction enzyme digestion; 2: pAd-rAFP-Mel Xba I and Hind III restriction enzyme digestion; 3: pAdEasy-1 Xba I and Hind III restriction enzyme digestion; 4: DNA marker DL2 000(bp):100,250, 500, 750, 1000, 2 000

图 2 蜂毒素基因 RT-PCR 结果

Fig.2 RT-PCR of melittin gene

1: DNA marker DL2 000(bp):100,250,500,750, 1 000,2 000; 2: Ad-rAFP-Mel; 3: Ad-rAFP

附表 重组腺病毒转染后对不同细胞的增殖抑制率					
Tab The proliferative inhibition rate of cells infected by recombinant adenovirus					
Time(h)	Adenovirus	n	Inhibition rate(%)		
			BEL-7402	SMMC-7721	L-02
72	Ad-rAFP-Mel	3	35.7 ± 3.6 * △	15.2 ± 4.0 △	-1.8 ± 0.4
	Ad-rAFP	3	2.9 ± 2.3	-1.9 ± 3.8	3.3 ± 1.9
96	Ad-rAFP-Mel	3	66.2 ± 2.7 * △	16.1 ± 6.6	7.4 ± 3.2
	Ad-rAFP	3	-7.9 ± 6.9	-4.6 ± 3.4	-6.5 ± 4.0

* P < 0.01 vs SMMC-7721 group; △ : P < 0.01 vs L-02 group

3 讨 论

生物毒素是生物体所产生的一类具有自身防御作用的天然物质,包括植物毒素、动物毒素、海洋毒素和微生物毒素等,是中西药新药开发研究十分活跃的领域。蜂毒素是由 26 个氨基酸组成的、具有广泛生物活性的抗菌肽,其抗肿瘤作用强、起效快,在肿瘤治疗领域日益受到重视。由于昆虫抗菌肽抗肿瘤作用不依赖于机体细胞和体液免疫系统^[9],因而蜂毒素在多有免疫功能低下的肿瘤患者中更具有应用前景。虽然简便易行的提取纯化工艺已基本稳定^[10],但其溶血副作用限制了临床使用。为克服其溶血毒副作用,人们尝试通过改变蜂毒素分子构像、将蜂毒素分子与肿瘤特异性抗体偶联成免疫毒素或制成缓释剂等方法^[11-13]来达到减轻其不良反应、增强抗肿瘤活性的目的。

基因治疗肝癌目前已由动物实验向临床试验过渡,并取得了一定的疗效。由于基因治疗载体比较容易到达肝脏,所以肝脏是最有希望用来进行体内基因治疗的器官之一,复制缺陷型腺病毒是近年肝癌基因治疗中报告最多的一种病毒载体^[1-3]。由于 70% 左右的肝癌患者呈 AFP 阳性,因此有望利用 AFP 转录调控序列驱动治疗基因在肝癌细胞中特异表达来达到靶向基因治疗大多数肝癌的目的。

本研究基于以上理论基础,人工合成蜂毒素基因,并置于 AFP 转录调控序列后,以缺陷型腺病毒为载体转染肝癌细胞。在细胞选择上,我们分别选用了 3 种类型的肝癌研究中常用的细胞株,即 AFP 阳性人肝癌细胞株 BEL-7402^[14],AFP 阴性人肝癌细胞株 SMMC-7721^[15],正常人肝细胞株 L-02,期望通过观察携 AFP 启动子和蜂毒素基因腺病毒转染对不同特性细胞的影

响来验证其特异性杀伤作用。实验结果表明,携蜂毒素基因重组腺病毒转染细胞后,AFP 阳性肝癌细胞被选择性地杀伤,而 AFP 阴性肝癌细胞及不分泌 AFP 的正常肝细胞的增殖未受到明显抑制。结果间接说明在 AFP 转录调控序列的驱动下,蜂毒素可能在 AFP 阳性肝癌细胞中得到有效表达,而在 AFP 阴性肝癌细胞及正常肝细胞中表达量很少或无表达,发挥了特异性杀伤作用,因而达到了靶向治疗的目的。

〔参考文献〕

- [1] Kim J, Lee B, Kim JS, *et al.* Antitumoral effects of recombinant adenovirus YKL-1001, conditionally replicating in alpha-fetoprotein-producing human liver cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2002, 180(1): 23-32.
- [2] Takahashi M, Sato T, Sagawa T, *et al.* E1B-55K-deleted adenovirus expressing E1A-13S by AFP-enhancer/promoter is capable of highly specific replication in AFP-producing hepatocellular carcinoma and eradication of established tumor[J]. *Mol Ther*, 2002, 5(5 Pt 1): 627-634.
- [3] Sa Cunha A, Bonte E, Dubois S, *et al.* Inhibition of rat hepatocellular carcinoma tumor growth after multiple infusions of recombinant Ad. AFPtk followed by ganciclovir treatment[J]. *J Hepatol*, 2002, 37(2): 222-230.
- [4] Schmitz V, Qian C, Ruiz J, *et al.* Gene therapy for liver disease: Recent strategies for treatment of viral hepatitis and liver malignancies[J]. *Gut*, 2002, 50(1): 130-135.
- [5] Kunitomi M, Takayama E, Suzuki S, *et al.* Selective inhibition of hepatoma cells using diphtheria toxin: A under the control of the promoter/enhancer region of the human alpha-fetoprotein gene[J]. *Jpn J Cancer Res*, 2000, 91(3): 343-350.

- [6] Saini SS, Chopra AK, Peterson JW. Melittin activates endogenous phospholipase D during cytolysis of human monocytic leukemia cells[J]. *Toxicon*, 1999, 37(11): 1605-1619.
- [7] 凌昌全, 黄雪强, 刘 岭, 等. 蜂毒素体外抑瘤作用的实验研究[J]. *第二军医大学学报*, 2001, 22(7): 612-614.
- [8] 黄雪强, 凌昌全, 陈 哲, 等. 蜂毒素诱导人 T 淋巴细胞白血病细胞株 6T-CEM 的凋亡作用[J]. *安徽中医学院学报*, 2001, 20(5): 39-41.
- [9] 卢晓风, 杨星勇, 程惊秋. 昆虫抗菌肽及其研究进展[J]. *药学报*, 1999, 34(2): 156-160.
- [10] 刘 岭, 凌昌全, 胡晋红, 等. 蜜蜂毒中蜂毒素的分离纯化方法及含量测定[J]. *第二军医大学学报*, 2001, 22(7): 609-611.
- [11] Shin SY, Lee MK, Kim KL, *et al.* Structure-antitumor and hemolytic activity relationships of synthetic peptides derived from cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides[J]. *J Pept Res*, 1997, 50(4): 279-285.
- [12] Dunn RD, Weston KM, Longhurst TJ, *et al.* Antigen binding and cytotoxic properties of a recombinant immunotoxin incorporating the lytic peptide, melittin[J]. *Immunotechnology*, 1996, 2(3): 229-240.
- [13] 凌昌全, 黄雪强, 刘 岭, 等. 蜂毒素缓释剂瘤内注射减毒增效作用的实验研究[J]. *第二军医大学学报*, 2001, 22(7): 615-617.
- [14] 茆灿泉, 黄常志, 杨树德, 等. AFP 启动子对绿色荧光蛋白在人肝癌细胞中表达的影响[J]. *中国医学科学院学报*. 2001, 23(5): 495-498.
- [15] 李玉富, 张俊萍, 孙声桃, 等. 人肝癌特异性 EB 病毒载体-PEBAF 介导 hGM-CSF 基因的转移及表达[J]. *中国现代医学杂志*, 2001, 11(3): 17-19.

〔收稿日期〕 2002-11-27

〔修回日期〕 2002-12-10

《中国肿瘤生物治疗杂志》征稿、征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办,中国科协主管,现为“中国科技论文统计源期刊”、《中国科学引文数据库》来源期刊、《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊、《中国医学文摘·肿瘤学》医学核心期刊、2002 年被《中国学术期刊文摘》收录为首批源期刊、《中国核心期刊(遴选)数据库》收录期刊、《中文生物医学期刊文献数据库》收录期刊。本刊旨在交流学术、促进科研、面向应用,主要栏目有述评、论著、综述、短篇报道、研究简报和科技信息等。欢迎广大从事肿瘤生物治疗的科研工作者及相关临床医师踊跃投稿,本刊将公平公正、择优录取。

本刊为季刊,每期定价:8.00 元,全年定价:32.00 元,邮发代号:4-576。欢迎广大读者到当地邮局订阅。若错过,可从本刊编辑部补订,请将 40.00 元(含邮资)寄本刊编辑部并注明详细通讯地址及邮政编码。

联系地址:上海市翔殷路 800 号第二军医大学免疫楼

《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部

联系人:厉永建

联系电话:021-55620605×22; 25070316×22。