

[文章编号] 1007-385X(2004)01-0042-04

携带 TIP30 与人 IFN- γ 基因的重组减毒鼠伤寒沙门氏菌的构建及抗腺样囊性癌的初步研究

江中明¹, 赵平², 高军², 湛先保³, 吕春堂¹(1. 第二军医大学长海医院口腔科, 上海 200433; 2. 第二军医大学微生物教研室, 上海 200433; 3. 第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433)

[摘要] 目的: 构建含有 TIP30 与人 IFN- γ 基因的真核共表达质粒的减毒伤寒沙门氏菌, 观察以减毒伤寒沙门氏菌为载体的, 联合 TIP30 与 IFN- γ 的基因治疗对腺样囊性癌的疗效。方法: PCR 扩增 TIP30 和人 IFN- γ 基因, 分别插入真核表达载体 pCI-neo, 构建成重组表达质粒 pCI-TIP30、pCI-IFN 和 TIP30、IFN- γ 基因共表达质粒 pCI-TIP30/IFN。分别将重组表达质粒转化到减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207, 体外感染小鼠巨噬细胞株, 用免疫印迹和 ELISA 对表达产物进行鉴定, 将重组菌口服给腺样囊性癌荷瘤裸鼠, 观察其疗效。结果: 免疫印迹试验表明质粒 pCI-TIP30 和 pCI-TIP30/IFN 转化菌感染的小鼠巨噬细胞能表达 TIP30 蛋白, ELISA 检测则显示 pCI-IFN 和 pCI-TIP30/IFN 转化菌感染的小鼠巨噬细胞能分泌性表达人 IFN- γ , 减毒沙门氏菌本身和 3 种表达质粒转化的重组沙门氏菌对腺样囊性癌均有治疗作用, 且 TIP30 与 IFN- γ 具有明显的协同作用。结论: 成功构建了分别携带真核表达质粒 pCI-TIP30、pCI-IFN、pCI-TIP30/IFN 的减毒鼠伤寒沙门氏菌, 对腺样囊性癌荷瘤裸鼠有显著的治疗作用。

[关键词] TIP30; 干扰素- γ ; 减毒伤寒沙门氏菌; 基因治疗

[中图分类号] R730.59 [文献标识码] A

Recombinant Attenuated *salmonella typhimurium* Harboring TIP30 and Human IFN- γ Genes Inhibits the Growth of Adenoid Cystic Carcinoma *in vivo*

JIANG Zhong-ming¹, ZHAO Ping², GAO Jun², ZHAN Xian-bao³, LU Chun-tang¹(1. Department of Stomatology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Gastroenterology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To construct attenuated *salmonella typhimurium* harboring an eukaryotic co-expression plasmid encoding TIP30 and human IFN- γ gene and observing its effect on the growth of adenoid cystic carcinoma. **Methods:** The TIP30 and human IFN- γ genes were amplified by PCR and inserted into eukaryotic expression vector pCI-neo for the construction of expression plasmids pCI-TIP30 and pCI-IFN, respectively. A co-expression plasmid pCI-TIP30/IFN was constructed by linking TIP30 and human IFN- γ gene using the sequence of internal ribosome binding sequence (IRES). Three recombinant expression plasmids were transformed into an attenuated *AroA* autotrophic mutant of *salmonella typhimurium* SL7207, the resultant bacteria were used to infected murine macrophage *in vitro* and the expressed products were detected by Western blot and ELISA, respectively. Tumor growth was observed by oral administration of the recombinant *salmonella typhimurium*s to the nude mouse with adenoid cystic carcinoma. **Results:** Murine macrophage infected with recombinant *salmonella* transformed with both plasmids pCI-TIP30 and pCI-TIP30/IFN could express TIP30 protein, and murine macrophage infected with recombinant *salmonella* transformed with pCI-IFN or pCI-TIP30/IFN could secrete human IFN- γ in the culture supernatant. Attenuated *salmonella typhimurium* and three constructed recombinant *salmonella typhimurium*s all had evident inhibition on the tumor growth in nude mouse with adenoid cystic carcinoma. **Conclusion:** The recombinant attenuated *salmonella typhimurium*s harboring plasmid pCI-TIP30, plasmid pCI-IFN and co-expressing plasmid pCI-TIP30/IFN were successfully constructed, which could inhibit the growth of adenoid cystic carcinoma in nude mouse.

[Key words] TIP30; interferon- γ ; attenuated salmonella; gene therapy

* TIP30 是能增强 I 型人类免疫缺陷病毒 (HIV-1) 转录调节蛋白 Tat 转录的一种抑癌基因, 与人类肿瘤转

[基金项目] 国家自然科学基金资助 (30171055)

[作者简介] 江中明 (1966-), 男, 安徽怀宁人, 主治医师, 讲师, 博士研究生, 主要从事口腔颌面部肿瘤的治疗及研究

移抑制基因 CC3 同源,能上调一系列与细胞凋亡有关分子的表达及血管生成抑制基因的表达,同时下调血管生成刺激因子的表达,从而抑制肿瘤生长和转移,在肿瘤基因治疗中有潜在的应用前景^[1-3]。

IFN- γ 主要是由 T 细胞和 NK 细胞分泌的多功能细胞因子,能直接抑制肿瘤细胞 DNA 合成和细胞分裂,还能通过抑制癌基因的表达来阻止或减慢正常细胞向肿瘤细胞的恶性转化。此外,还能激活巨噬细胞、NK 细胞等直接杀伤肿瘤细胞。目前临床已广泛应用于多种恶性肿瘤的治疗^[4-5],包括舌癌、腺样囊性癌、黏液表皮样癌、牙龈癌,取得了良好的效果^[6-7]。

本研究构建了 TIP30 与人 IFN- γ 共表达质粒,转化到减毒鼠伤寒沙门氏菌,在体外检测并分析了其感染性和作为基因治疗载体的可行性,并观察其体内抗腺样囊性癌的治疗作用,为腺样囊性癌的基因治疗提供了新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

克隆有 TIP30 基因的质粒 pcDNA-TIP30 及抗 TIP30 单克隆抗体由美国 Nebraska 大学肖华教授馈赠;编码脑心肌炎病毒内部核糖体进入位点(IRES)序列的质粒 pIRES-neo 为 Clontech 产品;pMD18-T 载体为 TaKaRa 产品;真核表达质粒载体 pCI-neo 为 Promega 产品;鼠伤寒沙门氏菌 LB5000 和减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 为美国 Stanford 大学 Bruce Stocker 教授馈赠;BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞株 M(J774 A.1 购自中科院上海细胞生物研究所;HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为 Sigma 产品;人 IFN- γ ELISA 试剂购于深圳晶美生物工程有限公司。4 周龄 BALB/c 雄性裸鼠购自中科院上海实验动物中心。低转移腺样囊性癌细胞(ACC-2)购于上海市第九人民医院。

1.2 人 IFN- γ 真核表达质粒的构建

根据人 IFN- γ 的 cDNA 序列(包括信号肽)设计并合成引物,上游引物:5'-GCGGCCGTCGACACCAT-GAAATATACAAGTTATATCTTGG-3',引入 Not I 和 Sal I 酶切位点,下游引物:5'-GCGGCCGCTTACTGGGAT-GCTCTTCGACC-3',引入 Not I 酶切位点。以含有人 IFN- γ 基因的质粒 pSK-IFN- γ 为模板,PCR 扩增 IFN- γ cDNA,PCR 产物与 pMD18-T 载体连接,得到的重组质粒以 Not I 酶切,切出的 IFN- γ 基因与经 Not I 酶切线性化并用碱性磷酸酶去磷酸化处理的 pCI-neo 连接,得到的重组质粒以 Sal I 酶切,鉴定出 IFN- γ 基因正向插入的重组质粒 pCI-IFN。

1.3 TIP30 真核表达质粒的构建

根据 TIP30 的 cDNA 序列设计、合成引物,上游引物:5'-GCTAGCACCATGGCCGAAACAGAAGCC-3',下游引物:5'-GAATTCTCATGGCTTGAGAGAGCCATG-3'。上、下游引物中分别引入 Nhe I, Eco R I 酶切位点。以质粒 pcDNA-TIP30 为模板,PCR 扩增 TIP30 基因,PCR 产物与 pMD18-T 载体连接,再以 Nhe I, Eco R I 酶切出 TIP30 基因,插入 pCI-neo 的 Nhe I, Eco R I 酶切位点之间,得到重组表达质粒 pCI-TIP30。

1.4 TIP30 与人 IFN- γ 共表达质粒的构建

质粒 pCI-IFN 以 Nhe I, Eco R I 酶切后,与经 Nhe I, Eco R I 酶切的 TIP30 基因连接,得到质粒 pCI-TIP30-IFN。以 EcoR I, Sma I 酶切质粒 pIRES-neo,切出的 IRES 基因插入用相同酶切的质粒 pCI-TIP30-IFN,即得到编码 TIP30 与人 IFN- γ 的质粒 pCI-TIP30-IRES-IFN,简称为 pCI-TIP30/IFN。

1.5 重组表达质粒转化减毒鼠伤寒沙门氏菌^[8]

将质粒 pCI-IFN, pCI-TIP30, pCI-TIP30/IFN 和空载体 pCI-neo 分别转化氯化钙处理的鼠沙门氏菌 LB5000,提取质粒,用 Gene Pulser[®](Bio Rad)电穿孔仪转化减毒鼠沙门氏菌 SL7207,分别得到重组沙门氏菌 SL7207/pCI-IFN, SL7207/pCI-TIP30, SL7207/pCI-TIP30/IFN 和 SL7207/pCI-neo。

1.6 重组沙门氏菌感染小鼠巨噬细胞

小鼠腹腔巨噬细胞株 M(J774 A.1 接种于 60 mm 细胞培养皿,80% 融合以后,以 PBS 洗 4 遍,再分别加重重组沙门氏菌 SL7207/pCI-IFN, SL7207/pCI-TIP30, SL7207/pCI-TIP30/IFN 和 SL7207/pCI-neo(1×10^5 /ml 细菌),室温放置 1 h 后以含 50 μ g/ml 庆大霉素的 DMEM 洗 2 遍,再加同样培养基放置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养,4 h 后改为以含 50 μ g/ml 庆大霉素和 10 μ g/ml 四环素的 DMEM 培养,48 h 后检测目的蛋白表达。

1.7 小鼠巨噬细胞表达产物的检测

收集细胞培养上清,再将细胞培养皿置于冰上,加 200 μ l 细胞裂解液[1% NP-40, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris(pH 7.6)],20 min 后将细胞裂解液转移至 1.5 ml 离心管。用 ELISA 检测细胞培养上清中人 IFN- γ 。用 Western blot 检测细胞裂解液中 TIP30 的表达,一抗为 1:200 稀释的小鼠抗 TIP30 单克隆抗体,二抗为 1:500 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体,抗体稀释液为含 12% 山羊血清和 0.5% Tween 20 的 PBS(pH 7.4)。

1.8 腺样囊性癌荷瘤裸鼠模型的建立

低转移腺样囊性癌(ACC-2)细胞复苏,常规传代培养,以每只裸鼠 2×10^6 细胞接种于裸鼠腹部皮下,20

d 后,断颈处死荷瘤裸鼠,无菌取出瘤组织块,剔除包膜及出血坏死组织后,将瘤组织剪成小块制成细胞悬液,调整细胞数为 1.5×10^7 /ml,每只裸鼠右侧颌下区皮下接种 0.2 ml 细胞悬液,共 25 只,随机分成 5 组,每组 5 只。

1.9 荷瘤裸鼠口服重组沙门氏菌

接种后第 10 天待肿瘤长至 4 mm × 5 mm 大小时,每只裸鼠给予 5% NaHCO₃ 0.2 ml 口服灌胃,30 min 后,4 组裸鼠分别给予口服灌胃沙门氏菌 SL7207, SL7207/pCI-IFN, SL7207/pCI-TIP30 及 SL7207/pCI-TIP30/IFN,剂量为 1×10^8 cfu/只,另一组裸鼠予口服 0.2 ml PBS 作为对照。共 3 次,每周 1 次。肿瘤模型接种后第 7 天起,隔日用游标卡尺测量肿瘤的最长径 a 和最短径 b,以公式 $V = a \times b^2/2$ 计算肿瘤体积并绘制生长曲线。

1.10 统计学处理

采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析判断组间差异,所有统计均用 SPSS10.0 统计软件处理完成。 $P = 0.05$, $P < 0.05$ 认为有显著差异。

2 结果

2.1 重组表达质粒的结构

构建的 3 种表达质粒 pCI-IFN, pCI-TIP30 和 pCI-TIP30/IFN 均以人巨细胞病毒早期启动子/增强子和 SV40 病毒的 polyA 序列调控目的基因的转录。在质粒 pCI-TIP30/IFN 中, TIP30 与人 IFN- γ 基因之间以脑心肌炎病毒内部核糖体进入位点序列(IRES)连接。

2.2 小鼠巨噬细胞表达 TIP30 的 Western blot 分析

小鼠巨噬细胞的 Western blot 检测表明,SL7207/pCI-TIP30, SL7207/pCI-TIP30/IFN 感染的 J774 A. 1 细胞均能表达 TIP30,分子量与预期 30 kD 相符合,而 SL7207/pCI-neo 感染的 J774 A. 1 细胞裂解液中未检测出该蛋白条带(图 1)。

2.3 小鼠巨噬细胞分泌表达人 IFN- γ 的 ELISA 检测

细胞培养上清的 ELISA 检测表明,SL7207/pCI-IFN 和 SL7207/pCI-TIP30/IFN 感染的 J774 A. 1 细胞均能分泌性表达人 IFN- γ ,其含量约为(36 ± 3) pg/ml,而空载体组未见明显的 IFN- γ 表达。

2.4 重组菌对肿瘤生长的影响(图 2)

PBS 对照组荷瘤裸鼠的肿瘤组织呈持续进行性生长,单纯口服 SL7207 也有一定疗效($P < 0.05$ vs PBS group);IFN 基因重组沙门氏菌和 TIP30 基因重组沙门氏菌治疗组(SL7207/pCI-IFN, SL7207/pCI-TIP30)有显著疗效($P < 0.01$ vs PBS group, respectively),与非重组菌治疗组也有明显差异($P < 0.05$ vs SL7207 group, re-

spectively),而 SL7207/pCI-IFN、SL7207/pCI-TIP30 两组之间无显著差异;TIP30 和 IFN- γ 联合基因重组沙门氏菌治疗组(SL7207/pCI-TIP30/IFN)有显著疗效($P < 0.01$ vs PBS group),与 IFN- γ 基因重组沙门氏菌治疗组、TIP30 基因重组沙门氏菌治疗组均有显著性差异($P < 0.05$ vs SL7207/pCI-IFN group, $P < 0.05$ vs SL7207/pCI-TIP30 group),表明联合治疗有协同作用。

图 1 Western blot 检测 TIP30 的表达

Fig. 1 Western blot analysis of TIP30 protein

- 1: J774 A. 1 cells infected with SL7207/pCI-neo;
- 2: J774 A. 1 cells infected with SL7207/pCI-TIP30;
- 3: J774 A. 1 cells infected with SL7207/pCI-TIP30/IFN

图 2 携带 TIP30 和或 IFN- γ 基因的重组菌在体内抑制 ACC-2 肿瘤的生长

Fig. 2 Growth inhibition of ACC-2 tumor by recombinant attenuated salmonella typhimurium bacterial harboring HIV TIP30 and human IFN- γ genes *in vivo*

3 讨论

涎腺腺样囊性癌是发病率位居第二位的涎腺恶性肿瘤,具有浸润生长特性,早期远处转移率高,预后较差,对放疗、化疗不敏感,目前尚无理想的治疗方法。

基因治疗目前已被认为治疗恶性肿瘤最有力的方法之一,为那些手术后仍旧发展为进展期和转移癌的患者治疗带来了新的策略。

联合基因治疗是基因治疗的一个发展方向,目前研究较多的是不同目的基因之间的联合应用,寻找更佳的肿瘤治疗模式。鉴于临床上用 IFN- γ 治疗涎腺腺样囊性癌的疗效及 TIP30 的分子功能,本研究联合 TIP30 与 IFN- γ 进行基因治疗,试图从不同途径诱导、促使肿瘤细胞凋亡/死亡,以取得对腺样囊性癌的良好治疗作用。

伤寒沙门氏菌通过肠道黏膜侵入体内,并选择性感染、定植于肿瘤组织,是肿瘤靶向基因治疗的新的理想载体^[9-10]。本研究使用的减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 为编码分枝酸合成酶的 *AroA* 基因缺陷,不能在哺乳动物细胞内增殖,在侵入肿瘤细胞以后,沙门氏菌本身因营养缺陷而死亡,而其携带的质粒被释放到肿瘤细胞的胞浆并被转移至细胞核,表达抗原蛋白^[11]。体外以重组表达质粒转化的减毒沙门氏菌 SL7207 感染小鼠腹腔巨噬细胞后发现,小鼠腹腔巨噬细胞能表达 TIP30 和人 IFN- γ 。表明沙门氏菌能输送重组质粒到细胞内表达其编码的目的基因,作为基因治疗的载体是可行的。

对低转移腺样囊性癌(ACC-2)荷瘤裸鼠模型口服接种转化有 TIP30 和人 IFN- γ 表达质粒的重组减毒伤寒沙门氏菌进行体内基因治疗的试验表明,TIP30 与 IFN- γ 在肿瘤细胞组织内表达均能有效抑制肿瘤组织生长,且二者具有明显的协同作用。有报道发现,伤寒沙门氏菌本身可通过免疫刺激作用抑制肿瘤组织生长^[12],本研究也发现单纯接种沙门氏菌组的肿瘤生长明显延缓,但由于动物模型为 T 细胞免疫缺陷的荷瘤裸鼠,因此,其机制有待进一步探讨。

本研究初步表明,联合 TIP30 和 IFN- γ 基因,用减毒沙门氏菌作为基因转移载体,对于腺样囊性癌具有明显的治疗作用,作为一种新的基因治疗方法有较好

的发展前景。

[参考文献]

- [1] Xiao H, Tao Y, Greenblatt J, et al. A cofactor, TIP30, specifically enhances HIV-1 Tat-activated transcription[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(5): 2146-2151.
- [2] Xiao H, Palhan V, Yang Y, et al. TIP30 has an intrinsic kinase activity required for up-regulation of a subset of apoptotic genes[J]. EMBO J, 2000, 19(5): 956-963.
- [3] Baker ME, Yan L, Pear MR. Three-dimensional model of human TIP30, a coactivator for HIV-1 Tat-activated transcription, and CC3, a protein associated with metastasis suppression[J]. Cell Mol Life Sci, 2000, 57(5): 851-858.
- [4] Schendel DJ, Falk CS, Nossner E, et al. Gene transfer of human interferon gamma complementary DNA into a renal cell carcinoma line enhances MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition but suppresses non-MHC-restricted effector cell activity[J]. Gene Ther, 2000, 7(11): 950-959.
- [5] 李岩, 邵念鹏, 彭玉麟. γ -干扰素的研究与临床应用[J]. 河北省科学院学报, 2001, 18(3): 174-178.
- [6] 高振南, 李声伟, 高家让, 等. 人肿瘤坏死因子- γ 基因转染与干扰素- γ 联合应用对舌癌细胞生长的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2002, 20(1): 55-57.
- [7] 司徒镇强, 吴军正, 陈建元, 等. γ -干扰素对体外培养口腔颌面部恶性肿瘤细胞系的抑制作用[J]. 癌症, 1995, 14(1): 49-50.
- [8] 赵平, 王宏卫, 卢洋, 等. 携带 HBV 包膜大蛋白 DNA 疫苗的减毒沙门氏菌在小鼠诱导免疫应答[J]. 生物工程学报, 2002, 18(5): 601-604.
- [9] Bermudes D, Zheng LM, King IC. Live bacteria as anticancer agents and tumor-selective protein delivery vectors[J]. Curr Opin Drug Discov Devel, 2002, 5(2): 194-199.
- [10] Darji A, Guzman CA, Gerstel B, et al. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*[J]. Cell, 1997, 91(6): 765-775.
- [11] Brown A, Hormaeche CE, Demarco R, et al. An attenuated *aroA* *salmonella typhimurium* vaccine elicits humoral and cellular immunity to cloned γ -galactosidase in mice[J]. J Infect Dis, 1987, 155: 86-91.
- [12] Sznol M, Lin SL, Bermudes D, et al. Use of preferentially replicating bacteria for the treatment of cancer[J]. J Clin Invest, 2000, 105(8): 1027-1030.

[收稿日期] 2003-10-19

[修回日期] 2004-01-10

第三届中国肿瘤学术大会将在广州召开

为进一步促进国内外学术交流,提高医疗科研水平并加强继续教育,中国抗癌协会及中华医学会肿瘤学会决定于今年 11 月 11~14 日召开第三届中国肿瘤学术大会。此次大会由中山大学肿瘤防治中心承办,会议地点定于广州最具现代性的会展中心——琶洲国际会议展览中心。

本次会议将邀请国内外知名学者与会,包括诺贝尔医学奖获得者及美国临床肿瘤学会(ASCO)专家,传播肿瘤学最前沿的发展动态;大会报告面向广大医学科技工作者,安排了丰富的继续教育内容;会议还安排了 30 个分会场,供各个肿瘤专业委员会充分交流探讨。

欢迎广大医学科技工作者踊跃投稿、与会,详情请登陆我们的网站:<http://www.cco.org.cn>;联系电话:020-87343268。

第三届中国肿瘤学术大会组委会