

[文章编号] 1007-385X(2008)02-0176-03

· 短篇论著 ·

## 肿瘤特异增殖腺病毒 CNHK200-hEndo 的构建及其抗裸鼠肺癌移植瘤疗效 Establishment of tumor-selective replicative adenovirus CNHK200-hEndo and its inhibitory effect against transplanted lung cancer in nude mice

施军霞, 苏长青, 李林芳, 钱其军\* (第二军医大学 东方肝胆外科医院 病毒与基因治疗实验室, 上海 200438)

**[摘要]** 目的: 构建一种携带抗肿瘤血管生成基因 Endostatin 的新型肿瘤基因-病毒治疗系统 CNHK200-hEndo, 观察其对人类肺癌细胞裸鼠移植瘤的治疗效果。方法: 克隆人抗血管生成基因 Endostatin, 利用病毒重组技术将该基因插入肿瘤特异性增殖腺病毒 CNHK200 的基因组中, 扩增并纯化 CNHK200-hEndo 病毒。建立裸鼠肺癌细胞移植瘤模型, 观察 CNHK200-hEndo 抗肿瘤的效果, 并与非增殖病毒 Ad-hEndo 对照。结果: 成功构建一种新型的基因-病毒治疗系统 CNHK200-hEndo, 其 E1b55kDa 蛋白表达缺失。CNHK200-hEndo 能在肿瘤细胞内大量增殖并高效表达 Endostatin 蛋白, 表达量明显高于非增殖病毒 Ad-hEndo ( $P < 0.05$ )。动物实验证实, CNHK200-hEndo 对人类肺癌细胞的裸鼠移植瘤模型具有抑制肿瘤生长的疗效, 与 Ad-hEndo 和空白对照组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 构建的基因-病毒治疗系统 CNHK200-hEndo 能在肺癌细胞中增殖复制, 提高 Endostatin 蛋白的表达, 明显抑制肺癌细胞移植瘤的生长。

**[关键词]** 腺病毒; 肺癌; 基因治疗; 内皮抑素基因; 血管生成

**[中图分类号]** R734.2; R730.54 **[文献标志码]** A

肿瘤的生长和转移依赖于新生血管生成<sup>[1]</sup>, 因此抗肿瘤血管生成已成为肿瘤治疗主要策略之一。在众多的血管抑制剂当中, 内皮抑素 (Endostatin) 最受关注, 它具有高效、无免疫原性的特点, 并且克服了肿瘤治疗中最棘手的耐药性和组织毒性问题<sup>[2]</sup>。

国产内皮抑素产品“重组人血管内皮抑素注射液”已被国家 SFDA 批准上市。但目前最大的障碍是不能大规模生产血管内皮抑素。基因治疗能够让内皮抑素在体内自我合成, 是解决这个障碍的办法之一。为此, 本实验构建一种能特异性靶向肿瘤细胞并高效表达治疗基因的载体系统, 使其携带内皮抑素基因进行动物的抗肿瘤治疗。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料来源

腺病毒载体 pCA13、pBGHE3 及腺病毒 E1 区转化的人胚胎肾细胞株 (HEK) 293 购自加拿大 Microbix Biosystems 公司。pcDNA3.1-hEndo 载体购于 Invitrogen 公司。人肺癌细胞株 A549 购于美国 American Type Culture Collection (ATCC)。所有内切酶及胎牛血清购于 GIBCO BRL 公司。缺失 E1b55kDa 腺病毒载体 pXC7C 由本室构建<sup>[3]</sup>。PCR 引物 (P1: 5'-AGCGAATTCCAAAATGGAACATAAGG-3', 含 EcoR I 酶切位点); P2: 5'-GCGGGATCCTCAT-TAACACTGAGGGACATCACAGTA-3', 含 BamH I 酶切位点) 由上海生工生物公司合成。

#### 1.2 载体 pCA13-hEndo 及 pXC7C-hEndo 的构建

以 pcDNA3.1-hEndo 为模板, 引物 P1/P2 扩增人 Endostatin 基因, PCR 反应产物用 EcoR I 和 BamH I 双酶切, 回收 648 bp 目的片段, 插入 pUC19。经酶切鉴定及测序证实 Endostatin 序列正确后命名为 pUC19-hEndo。pUC19-hEndo 用 EcoR I 和 BamH I 双酶切, 回收片段与 pCA13 载体连接, 构建 E1 区缺失的腺病毒载体质粒 pCA13-hEndo。将 pCA13-hEndo 用 Bgl II 酶切, 得到含有 CMV 启动子 + hEndo 基因 + SV40 polyA 加尾信号的表达盒, 插入 pXC7C 的 Bgl II 位点, PCR 鉴定, 正确者命名为 pXC7C-hEndo。

#### 1.3 病毒重组与鉴定

质粒 pXC7C-hEndo、pCA13-hEndo 分别与含有 5 型腺病毒右臂的质粒 pBGHE3 通过 Lipofectamine 共转染至 HEK293 细胞 (方法参见 GIBCO BRL 公司的试剂盒操作说明书), 第 9~14 天后出现病毒空斑, 经过 3 次病毒空斑纯化, 应用 QIAamp DNA blood mini kit 提取病毒 DNA, 应用 Endostatin 基因的引物进行 PCR 鉴定, 正确者命名为 CNHK200-hEndo、Ad-hEndo。

**[基金项目]** 国家高技术研究发展“863”计划资助项目 (No. 2001AA217031)。Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (No. 2001AA217031)

**[作者简介]** 施军霞 (1976-), 女, 上海市人, 学士, 主管技师, 主要从事病毒纯化的研究, E-mail: sjx7681@sohu.com

\* Corresponding author. E-mail: qianqj@163.com

### 1.4 病毒的扩增、纯化及滴度测定

腺病毒的扩增采用 HEK293 细胞;病毒纯化采用常规氯化铯梯度离心纯化法;采用 Qbiogene 公司的 TCID<sub>50</sub> 试剂盒测定病毒滴度。

### 1.5 体外病毒增殖与基因表达

24 孔板培养 A549 细胞,每孔  $1 \times 10^5$  个细胞数,24 h 后以 1 MOI 加入病毒 Ad-hEndo 或 CNHK200-hEndo。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中继续培养 24、48、72、96 h,收集细胞,用 TCID<sub>50</sub> 方法检测病毒滴度,收集培养液用 ELISA 法测基因表达水平。

### 1.6 动物抑瘤实验

取 15 只 BALB/c 裸鼠,皮下注射 A549 细胞  $1 \times 10^7$  个/只,观察瘤体生长情况。瘤体最大径生长至 0.5 cm 左右时,根据治疗病毒随机分成 3 组:CNHK200-hEndo 组,  $2 \times 10^8$  pfu/次,5 次治疗;Ad-hEndo 组,  $2 \times 10^8$  pfu/次,5 次治疗;对照组 Ad Buffer 100  $\mu$ l,5 次;瘤体内多点注射<sup>[3]</sup>,隔日 1 次。定期观察测量瘤体体积变化,计算瘤体体积。公式:  $V = a \times b^2 \times 0.5$  ( $a$  为最大径, $b$  为最小径)。

### 1.7 统计学处理

采用 SPSS11.0 统计数据软件包,数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,以方差分析进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 携带 Endostatin 基因的载体构建

PCR 扩增 pcDNA3.1-hEndo 中的人 Endostatin 基因,得到 648 bp 片段,经测序完全正确。进一步插入腺病毒载体,分别得到 pCA13-hEndo 和 pXC7C-hEndo。pCA13-hEndo 经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定得到 648 bp 和 6 936 bp 片段;pXC7C-hEndo 经 *Bgl* II 酶切鉴定得到 1 217 bp 和 9 388 bp 片段,证明重组质粒载体 pCA13-hEndo 和 pXC7C-hEndo 均构建成功(图 1)。

### 2.2 基因-病毒治疗系统的重组和鉴定

将腺病毒载体质粒 pCA13-hEndo 和 pXC7C-hEndo 分别与含有 5 型腺病毒右臂的质粒 pBHGE3 在 HEK293 细胞中同源重组,第 9 ~ 14 天开始可观察到空斑形成,PCR 鉴定正确,命名为 Ad-hEndo 和 CNHK200-hEndo。经过扩增纯化,滴度分别达到  $2.5 \times 10^9$  pfu/ml 和  $1.2 \times 10^{10}$  pfu/ml。

### 2.3 体外病毒增殖与基因表达

CNHK200-hEndo 在肺癌细胞株 A549 中增殖,随着时间延长,其增殖倍数增加,至 72 h 时达高峰,而在正常成纤维细胞 IMR-90 中的增殖能力很弱(图 2A)。随病毒的增殖,CNHK200-hEndo 表达

Endostatin 的水平也呈现时间效应关系,表达水平明显高于 Ad-hEndo(图 2B)。

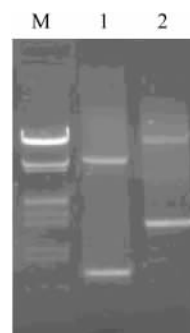


图 1 腺病毒载体 pCA13-hEndo 和 pXC7C-hEndo 酶切鉴定

M:分子量标志 Lambda/*EcoR* I + *Hind* III;

1: pCA13-hEndo/*EcoR* I + *Bam*H I, 648 + 6 936 bp;

2: pXC7C-hEndo/*EcoR* I + *Bam*H I, 1 217 + 9 388 bp

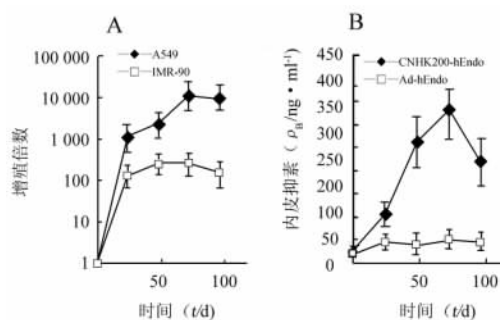


图 2 重组腺病毒 CNHK200-hEndo 在肿瘤细胞中的增殖及其内皮抑素的表达

A: CNHK200-hEndo 在肿瘤细胞和正常细胞中的增殖倍数; B: CNHK200-hEndo 和 Ad-hEndo 在

A549 细胞中内皮抑素的表达

### 2.4 重组腺病毒裸鼠体内抗肿瘤作用

BALB/c 裸鼠皮下移植人肺癌细胞 A549 成瘤后,以重组腺病毒进行治疗。结果显示:对照组裸鼠 A549 移植瘤体生长迅速,而两个腺病毒治疗组瘤体生长缓慢,以 CNHK200-hEndo 最为明显。第 24 天 Ad-hEndo 组移植瘤虽然生长加速,但肿瘤体积仍明显小于对照组 ( $P < 0.05$ );CNHK200-hEndo 组治疗效果明显好于 Ad-hEndo,差异有统计学意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ,图 3)。

## 3 讨论

肿瘤特异性增殖病毒在肿瘤的基因治疗中,越来越受到关注,其显著的特点就是能够特异性地在肿瘤细胞中增殖并杀灭肿瘤细胞。美国 ONYX 制药公司研究的 E1b55kDa 缺失的腺病毒 ONYX-015 联合常规化疗治疗 30 例难治性复发性头颈部肿瘤

患者,其中 8 例完全缓解,11 例肿瘤缩小一半以上,总有效率达 63% [3]。ONYX-015 不但能在 P53 异常的肿瘤细胞中特异增殖,也能在 P53 功能正常的某些肿瘤细胞内有效增殖 [4]。在治疗基因选择方面,内皮抑素在肺癌的治疗上优势明显。国外一项动物实验 [5,6] 证实,内皮抑素能够明显减少肿瘤区新生血管数量,从而抑制肿瘤细胞生长。国内已上市的“重组人血管内皮抑素注射液”被国家 SFDA 批准的适应证即为 III/IV 期非小细胞肺癌患者。其单药治疗或联合 NP 化疗方案治疗 NSCLC,在有效率及 1 年生存率评价方面均取得显著效果 [7]。

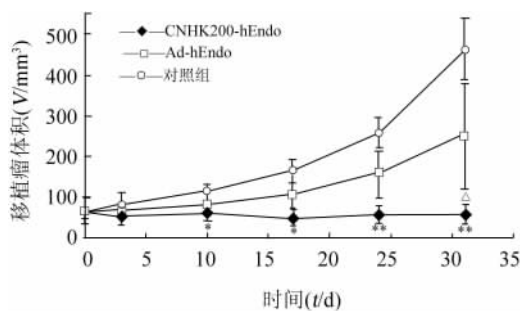


图 3 重组腺病毒 CNHK200-hEndo 治疗裸鼠 A549 移植瘤的疗效

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 对照组;  $\Delta P < 0.05$  vs Ad-hEndo 组

本实验在构建一种类似于 ONYX-015 的腺病毒的基础上,使其携带抗肿瘤基因 Endostatin,研究其对肿瘤的治疗作用。其携带的治疗基因能随病毒的增殖在肿瘤细胞内高效表达,在肿瘤局部形成高浓度的活性因子,使疗效进一步增强 [8-10]。肿瘤生长依赖于新生血管的形成,如阻止肿瘤组织内的新生血管的生成,即可达到肿瘤治疗的目的,这就是抗肿瘤新生血管生成治疗 [11]。结果显示,所构建的 CNHK200-hEndo 能在肺癌细胞 A549 中有效地增殖,而在正常细胞中的增殖力很弱,两者之间相差几千倍,证明该病毒载体系统和 ONYX-015 一样具有良好的肿瘤靶向性。通过检测基因表达,结果显示, CNHK200-hEndo 携带的基因可随病毒的增殖在肿瘤细胞内高效表达,其表达量明显高于非增殖腺病

毒载体 Ad-hEndo 的表达量。进一步进行动物实验,证实该病毒具有良好的抗肿瘤移植瘤生长的疗效。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications [ J ]. N Engl J Med, 1971, 285( 21 ): 1182-1186.

[ 2 ] Boehm T, Folkman J, Browder T, et al. Anti-angiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance [ J ]. Nature, 1997, 390( 6658 ): 404-407.

[ 3 ] Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, et al. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer [ J ]. Nat Med, 2000, 6( 8 ): 879-885.

[ 4 ] Rothmann T, Hengsternann A, Whitaker NJ, et al. Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells [ J ]. J Virol, 1998, 72( 12 ): 9470-9478.

[ 5 ] Cui R, Takahashi K, Takahashi F, et al. Endostatin gene transfer in murine lung carcinoma cells induces vascular endothelial growth factor secretion resulting in up-regulation of *in vivo* tumorigenicity [ J ]. Cancer Lett, 2006, 232( 2 ): 262-271.

[ 6 ] Zamboni L, Honma HN, Lourenço GJ, et al. A polymorphism in the angiogenesis inhibitor, endostatin, in lung cancer susceptibility [ J ]. Lung Cancer, 2007, Dec 2 [ Epub ahead of print ].

[ 7 ] Ling Y, Yang Y, Lu N, et al. Endostar, a novel recombinant human endostatin, exerts antiangiogenic effect via blocking VEGF-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1 of endothelial cells [ J ]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 361( 1 ): 79-84.

[ 8 ] QIAN Qijun, Jonathan SHAM, CHE Xiaoyan, et al. Gene-viral vectors: a promising way to target tumor cells and express anticancer genes simultaneously [ J ]. Chin Med J, 2002, 115( 8 ): 1213-1217.

[ 9 ] 李月敏, 宋三敏, 江泽飞, 等. 肿瘤选择性增殖腺病毒 CNHK300 联合紫杉醇对 HER-2 高表达乳腺癌细胞的杀伤作用 [ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006, 13( 2 ): 98-102.

[ 10 ] 钱其军, 张 琪. 肿瘤靶向治疗的现状和展望 [ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006, 13( 4 ): 239-242.

[ 11 ] O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma [ J ]. Cell, 1994, 79( 2 ): 315-328.

[ 收稿日期 ] 2007 - 10 - 29 [ 修回日期 ] 2008 - 01 - 10  
[ 本文编辑 ] 郁晓路

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358 - 93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:( 1 )样本的算术平均数用英文小写  $\bar{x}$ , 不用大写 X, 也不用 Mean 或 M;( 2 )标准差用英文小写  $s$ , 不用 SD;( 3 )标准误用英文小写  $s_x$ , 不用 SE;( 4 )  $t$  检验用英文小写  $t$ ;( 5 )  $F$  检验用英文大写  $F$ ;( 6 )卡方检验用希腊小写  $\chi^2$ ;( 7 )相关系数用英文小写  $r$ ;( 8 )自由度用希腊小写  $\nu$ ;( 9 )样本数用英文小写  $n$ ;( 10 )概率用英文大写  $P$ ;( 11 )以上符号  $\bar{x}$ 、 $s$ 、 $s_x$ 、 $t$ 、 $F$ 、 $\chi^2$ 、 $r$ 、 $\nu$ 、 $n$ 、 $P$  均为斜体。请作者注意遵照执行。  
( 本刊编辑部 )