

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.02.003

· 基础研究 ·

肝癌选择性溶瘤腺病毒的构建及其体外抑瘤作用

傅强, 王慧萍, 韦芳, 李慧明, 陈霞芳, 王煜非, 黄倩* (上海交通大学医学院附属上海市第一人民医院中心实验室, 上海 200080)

[摘要] 目的: 构建由 AFP 基因增强子-启动子调控, 并携带自杀基因 TK 的新型条件复制型腺病毒载体, 观察该载体的选择复制能力、溶瘤作用及其与前药 GCV 联合处理对肝癌细胞的杀伤作用。方法: 以 HepG2 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 AFP 基因启动子 (AFPp) 和增强子 (AFPe), 构建表达质粒 pAFPp-EGFP_{luc} 和 pAFPep-EGFP_{luc}, 再构建由 AFPep 调控 E1A 表达、并携带 TK 基因的穿梭质粒 pDC311-AFPep-E1A/CMV-TK, 利用 Ad^{Max} 系统包装腺病毒 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK; 利用 Western blotting、病毒增殖测试、细胞病变效应实验、病毒联合前药 GCV 对肝癌细胞的杀伤实验等鉴定病毒的复制能力、溶瘤作用和对肝癌细胞的杀伤作用。结果: 成功构建的腺病毒载体 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK 在 AFP 阳性细胞中选择性复制, 病毒自身具有一定的溶瘤作用; 该病毒载体联合 GCV 前药系统处理肝癌细胞后, AFP 阳性肝癌 HepG2 细胞和 Hep3B 细胞的存活率分别为 (10.35 ± 1.07)%、(15.49 ± 5.80)%, AFP 阴性的张氏肝细胞和人肺癌 NCIH460 细胞的存活率分别为 (73.55 ± 4.36)%、(74.54 ± 9.89)% ($P < 0.01$)。结论: 构建的新型溶瘤腺病毒载体具有选择性杀伤肝癌细胞的能力, 在肝癌治疗方面有良好的应用前景。

[关键词] 肝肿瘤; 条件复制型腺病毒载体; HSV-1 TK 基因; 甲胎蛋白基因启动子; 甲胎蛋白基因增强子; 病毒-基因治疗

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)02-0113-07

Construction of conditionally replication-competent adenoviral vectors targeting hepatocarcinoma and their *in vitro* anti-tumor effect

FU Qiang, WANG Hui-ping, WEI Fang, LI Hui-ming, CHEN Xia-fang, WANG Yi-fei, HUANG Qian* (Central Lab, The First People's Hospital of Shanghai, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a novel conditional duplicate adenovirus (CRA) regulated by AFP enhancer, AFP promoter and TK suicide gene, and to observe its duplicate abilities, cytopathic effects and cytotoxicity against hepatocarcinoma cells when combined with pre-drug GCV. **Methods:** AFP gene promoter and enhancer were amplified using PCR from the genome DNA of HepG2 cells; pAFPp-EGFP_{luc} and pAFPep-EGFP_{luc} plasmids were constructed; pDC311-AFPep-E1A/CMV-TK shuttle plasmid expression E1A gene was then constructed under the control of AFP promoter, AFP enhancer (AFPep) and TK gene. Ad. AFPep-E1A/CMV-TK vector was constructed by Ad^{Max} system. E1A expression, cytopathic effects and cytotoxicity against hepatocarcinoma cells of Ad. AFPep-E1A/CMV-TK were evaluated by Western blotting, flow cytometry, CCK-8 assay, respectively. **Results:** Ad. AFPep-E1A/CMV-TK was successfully constructed, which could selectively replicate in AFP positive HepG2 cells and specifically inhibit proliferation of AFP positive cells. Survival rates of AFP positive HepG2 and Hep3B cells after treated with combination of Ad. AFPep-E1A/CMV-TK and pre-drug GCV were (10.35 ± 1.07)% and (15.49 ± 5.80)%, respectively, which were significantly lower than those of AFP negative Chang liver cells and lung cancer NCIH460 cells ([73.55 ± 4.36]% and [74.54 ± 9.89]%, respectively, $P < 0.01$). **Conclusion:** The constructed Ad. AFPep-E1A/CMV-TK, when combines with TK/GCV suicide gene system, can specifically kill AFP positive hepatocarcinoma cells, which may have a future in gene-based therapy against hepatocarcinoma.

[基金项目] 国家重点基础研究计划(973)资助项目(No. 2004CB518804); 国家自然科学基金杰出青年项目(No. 30325043)。Supported by the Key Basic Research Program (973) of China (No. 2004CB518804); the National Natural Science Funds for Distinguished Young Scholar (No. 30325043)

[作者简介] 傅强(1982-)女, 满族, 河北省承德市人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤基因治疗方面的研究。E-mail: graceyusi@yahoo.cn

* 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: Qhuang2007@gmail.com

[**Key words**] liver neoplasms; conditional duplicate adenoviral vector; HSV-1/TK gene; AFP promoter; AFP enhancer; gene-viral therapy

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(2): 113-119]

肝癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,传统放化疗以及外科手术的治疗效果均不理想,其病死率很高。近些年兴起的借助载体将治疗基因导入靶细胞给肿瘤治疗带来了新的希望。目前,条件复制性腺病毒载体可以选择型地在肿瘤细胞中复制,已经成为肿瘤基因治疗的重要载体^[1-2]。构建条件复制型腺病毒的一个重要手段是采用肿瘤特异性启动子调控与腺病毒复制有关的早期基因如 E1A 的表达,而对于肝癌,甲胎蛋白启动子目前已广泛应用于肝癌的靶向性基因治疗中^[3]。但有学者认为组织特异性启动子活性都较低,单独使用不能很好地达到基因治疗的要求,因此开始利用增强子来增强启动子的活性,以取得良好效果^[4-5]。但是由于肿瘤的复杂性,单一病毒疗法很难达到理想效果,近些年兴起的病毒-基因疗法治疗肝癌^[6-7]取得了很大的突破。

为了建立更好的肝癌基因治疗方法,本研究根据肝癌细胞高水平表达甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)的特征,采用甲胎蛋白基因增强子-启动子顺序调控腺病毒复制必须基因 E1A 的表达,构建携带自杀基因 TK 的新型条件复制型腺病毒载体,并探讨该病毒载体对肝癌细胞的选择性杀伤作用。

1 材料与方 法

1.1 质粒和病毒

表达质粒 pDC311-hTERTp-E1A、pDC311-hTERTp-E1A-CMV-TK-HAtag 由本实验室构建并保存。腺病毒包装系统 Ad^{Max} 及其中的 pBHGlox ΔE1, 3cre 购自加拿大 MICROBIX BIOSYSTEMS INC。表达质粒 pCMV-EGFPLuc、复制缺陷型腺病毒 Ad. GFP、野生型腺病毒 dl309 由本实验室保存。

1.2 细胞株及其培养

人胚肾细胞 HEK293、人肝癌细胞 Hep3B、人肺癌细胞 NCIH460 由本实验室保存,用含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液,于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱内培养。正常张氏肝细胞(Chang liver)和人肝癌细胞 HepG2 购自中国科学院细胞库,分别用含 10% 新生牛血清的 1640 培养液和含 12% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养。

1.3 主要试剂

限制性内切酶、T4 连接酶、高保真 pfu 酶均购自 TaKaRa 公司。Lipofectamine2000 转染试剂购盒

购自 Invitrogen 公司。Luciferase Assay System 购自 Promega 公司。Cell Counting Kit-8 购自 DOJINDO 公司。抗体购自 Santa Cruz 公司。前药 GCV 购自 Sigma 公司。

1.4 质粒的构建

1.4.1 AFP 基因启动子(AFPp)和增强子(AFPe)的分离 根据人 AFP 基因顺序设计引物。AFP 基因启动子上游引物顺序为 5'-GATATTAATAGATCTGATGATGGTACCATTCTGTAGTTGAGGAGAAT-3', 其 5' 端引入 *Ase* I、*Bgl* II、*Kpn* I 酶切位点;下游引物顺序为 5'-GATGCTAGC TGTTATTGGCAGTGGT-GGAAG-3', 其 5' 端引入 *Nhe* I 酶切位点。AFP 基因增强子上游引物为 5'-GATAGATCTTCAGATTGAATTATTTGCTG-3', 其 5' 端引入 *Bgl* II 酶切位点;下游引物为 5'-GGTACCTGAACTGTCTCTTTT-GTTTC-3', 其 5' 端引入 *Kpn* I 酶切位点。以 HepG2 细胞基因组 DNA 为模板,用 pfu 酶进行 PCR 扩增。其中扩增启动子 PCR 的退火温度为 56 °C,扩增增强子 PCR 的退火温度为 52 °C。

1.4.2 质粒 pAFPp-EGFPLuc、pAFPep-EGFPLuc 的构建 用 *Ase* I 和 *Nhe* I 双酶切载体质粒 pCMV-EGFPLuc 和 AFPp 的 PCR 产物,并用 T4 连接酶将 AFPp 置于报告基因 EGFPu 上游,挑取阳性克隆命名为 pAFPp-EGFPLuc。而后用 *Bgl* II 和 *Kpn* I 双酶切 pAFPp-EGFPLuc 以及 AFPe 的 PCR 产物,将 AFPe 插入到 AFPp 的上游,挑取阳性克隆命名为 pAFPep-EGFPLuc。

1.4.3 AFP 基因启动子(AFPp)和增强子(AFPe)活性的鉴定 利用脂质体 Lipofectamine2000 将 pAFPp-EGFPLuc、pAFPep-EGFPLuc 以及对照质粒 pCMV-EGFPLuc 转染入 AFP 阳性细胞 HepG2 和 Hep3B 以及 AFP 阴性细胞 NCIH460 和张氏肝细胞(Chang liver),48 h 后荧光倒置显微镜观察拍照,并通过流式细胞仪以及荧光素酶检测系统检测 EGFP 和 Luciferase 的表达,分析 AFPp 和 AFPe 的活性。

1.4.4 质粒 pDC311-AFPep-E1A 的构建 用 *Bam*H I 单酶切 pDC311-hTERTp-E1A 并用 pfu 酶补齐,纯化后再用 *Bgl* II 单酶切,回收去除 hTERT 启动子后的大片段;用 *Nhe* I 单酶切质粒 pAFPep-EGFPLuc 并补齐后再用 *Bgl* II 单酶切,回收小片段 AFPep;大片段与小片段连接后构建 pDC311-AFPep

-E1A。

1.4.5 质粒 pDC311-AFPep-E1A/CMV-TK 的构建

用 *Ase* I 和 *Afl* II 双酶切 pDC311-hTERTp-E1A-CMV-TK-HAtag,并用 *pfu* 酶补齐,回收片断 CMV-TK-HAtag;用 *Stu* I 单酶切 pDC311-AFPep-E1A 并去磷酸化。连接目的片段构建 pDC311-AFPep-E1A/CMV-TK。

1.5 重组腺病毒的包装、鉴定、扩增及滴度测定

参考 Ad^{Max}腺病毒系统包装腺病毒 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK 后,利用病毒 DNA-QIAamp Blood Mini Kit 提取其病毒 DNA,并分别用 AFPp、AFPe 以及 TK 基因的引物经 PCR 鉴定重组病毒中是否含有目的基因片段。其中 TK 基因上游引物的顺序为:5'-CCGGAATCACCATGGCTTCGTACCC-3',下游引物的顺序为:5'-CGCGGATCCGTAGCCTCCCCATCTC-3',PCR 反应的退火温度为 52 ℃。而后在 293 细胞中大量扩增上述病毒,利用病毒空斑形成实验(plaque forming unit, PFU)测定病毒滴度。

1.6 流式细胞术检测 Ad. GFP 对 Hep3B、HepG2、NCIH460 和 Chang liver 细胞的感染效率

用 Ad. GFP(20 MOI)分别感染 Hep3B、HepG2、NCIH460 和 Chang liver 细胞,48 h 后收集细胞,用流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞比率,从而检验上述 4 株细胞病毒感染效率是否无明显差异。

1.7 Western blotting 检测病毒感染细胞的 E1A 表达情况

用 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK(30 MOI)分别感染 HepG2、Hep3B 以及 NCIH460、Chang liver 细胞,48 h 后收集细胞,提取细胞总蛋白,SDS-PAGE 电泳后 Western blotting 检测 E1A 蛋白的表达情况。

1.8 空斑形成实验检测病毒在肿瘤细胞中的条件复制能力

将 Hep3B、HepG2、NCIH460 和 Chang liver 细胞按每孔 5×10^5 个接种于 6 孔板中,24 h 后分别加入 20 MOI 的 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK 和 d1309,4 h 后换液,PBS 洗 2 次去除残留的病毒,而后加入新鲜培养液,5 d 后收集细胞及上清液,反复冻融 3 次后,12 000 × *g* 离心 10 min 取上清。PFU 法测定细胞裂解物中病毒滴度。

1.9 细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)实验检测病毒溶瘤作用

将 HepG2、Hep3B、NCIH460 和 Chang liver 细胞按每孔 5×10^4 个接种于 24 孔板中,每株细胞均设不加病毒的对照组和加病毒组。每组设 6 个复孔,24 h 后分别用 20 MOI 的 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK

和 Ad. GFP 两种病毒感染加病毒组,5 d 后用显微镜观察并拍照细胞病变情况。

1.10 CCK-8 法检测重组腺病毒联合前药 GCV 对肝癌细胞的杀伤作用

Hep3B、HepG2、NCIH460 和 Chang liver 细胞按每孔 3 000 个接种于 96 孔板,每株细胞均设以下 3 组:不加病毒的对照组、仅加病毒组、病毒 + 前药组,每组设 8 个复孔,24 h 后除对照组外,分别用 20 MOI 的 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK 和 Ad. GFP 两种病毒感染,感染 24 h 后,病毒 + 前药组换成含 GCV 0.5 μg/ml 的培养液。5 d 后加入 CCK-8 试剂,用酶标仪测定光密度值(D_{450})。根据公式计算细胞生长存活率。各组细胞生长存活率(%)=(病毒/前药处理组 D 值 - 空白对照组 D 值)/(细胞对照组 D 值 - 空白对照组 D 值) × 100%

1.11 统计学处理

应用 SPSS 软件处理数据,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较用 t 检验。

2 结果

2.1 AFP 基因启动子(AFPp)和增强子(AFPe)及重组质粒的酶切鉴定

PCR 反应扩增出的 AFPp 和 AFPe 分别为 300 bp 和 800 bp。质粒 pAFPp-EGFPLuc 经 *Nhe* I、*Ase* I 双酶切后,得到 300 bp 和 6 000 bp 两个片段。质粒 pAFPep-EGFPLuc 经 *Bgl* II、*Kpn* I 双酶切后,得到 800 bp、1 200 bp、5 000 bp 3 个片段。质粒 pDC311-AFPep-E1A 经 *Bgl* II、*Bam*H I 酶切后,得到 1 200 bp、5 000 bp 两个片段。质粒 pDC311-AFPep-E1A/CMV-TK 经 *Bam*H I 酶切后,得到 3 000 bp、5 000 bp 两个片段(图 1)。

2.2 AFP 基因启动子(AFPp)和 AFP 基因增强子-启动子(AFPep)活性的鉴定

pCMV-EGFPLuc、pAFPp-EGFPLuc 及 pAFPep-EGFPLuc 分别转染 HepG2 和 NCIH460 细胞后,荧光显微镜下观察 EGFP 表达情况(图 2)。结果显示,HepG2 细胞转染 pCMV-EGFPLuc、pAFPp-EGFPLuc、pAFPep-EGFPLuc 后检测 EFGP 阳性细胞表达率分别为 21.8%、3.06%、10.48%;NCIH460 细胞分别为 42.4%、0.83%、0.72%。HepG2 细胞转染 pCMV-EGFPLuc、pAFPp-EGFPLuc、pAFPep-EGFPLuc 后检测 luciferase 荧光强度分别为 17 725 838、2 823 300、7 415 084。NCIH460 细胞分别为 4 139 851、4 887、7072。



图1 PCR 扩增 AFPp、AFPe 和重组质粒的酶切鉴定

Fig.1 AFPp and AFPe gene detected by PCR and identification of recombinant plasmid by endonuclease

1: AFP promoter; 2:AFP enhancer; 4:Identification of pAFPp-EGFPluc by *Nhe* I and *Ase* I ; 6:Identification of pAFPep-EGFPluc by *Bgl* II and *Kpn* I ; 8:Identification of pDC 311-AFPep-E1A by *Bgl* II and *Bam*H I ; 10:Identification of pDC311-AFPep-E1A/CMV-TK by *Bam*H I ; 3,5,7,9:Corresponding negative results; M1:100 bp marker; M2:1 000 bp marker

假定 CMV 启动子调控的 EGFP 的表达量为 1, 即设 CMV 启动子的活性为 1, 那么在 HepG2 细胞中, AFPp 以及 AFPep 相对于强启动子 CMV 的相对

活性分别为(14. 01 ± 0. 778)%、(48. 07 ± 5. 3)% ; 在 NCIH460 细胞中 AFPp 以及 AFPep 相对于强启动子 CMV 的相对活性分别为(1. 96 ± 2)%、(1. 698 ± 0. 07)% 。假定 CMV 启动子调控的 Luciferase 的表达量为 1, 那么在 HepG2 细胞中, AFPp 以及 AFPep 相对于强启动子 CMV 的相对活性分别为(15. 93 ± 2. 3)%、(42. 83 ± 6. 1)% ; 在 NCIH460 细胞中 AFPp 以及 AFPep 相对于强启动子 CMV 的相对活性分别为(1. 18 ± 1. 2)%、(1. 71 ± 1)% (图 3)。由此可见 AFPp 以及 AFPep 均具有一定的活性和特异性, 其中 AFPep 的活性和特异性更为明显。

2.3 重组腺病毒 Ad. AFPep-E1A -TK 的包装、鉴定及其滴度

pDC311-AFPep-E1A/CMV-TK 与腺病毒骨架质粒 pBHGlox Δ E1, 3cre 共转染 HEK 293 细胞后约 12 d 后包装出病毒, 提取病毒基因组后进行 PCR 鉴定, 可扩增出 300 bp AFPp、800 bp AFPe、1 100 bp 的 TK 基因(图 4)。病毒经大量扩增后, PFU 法测 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK 的滴度为 3×10^9 pfu/ml。

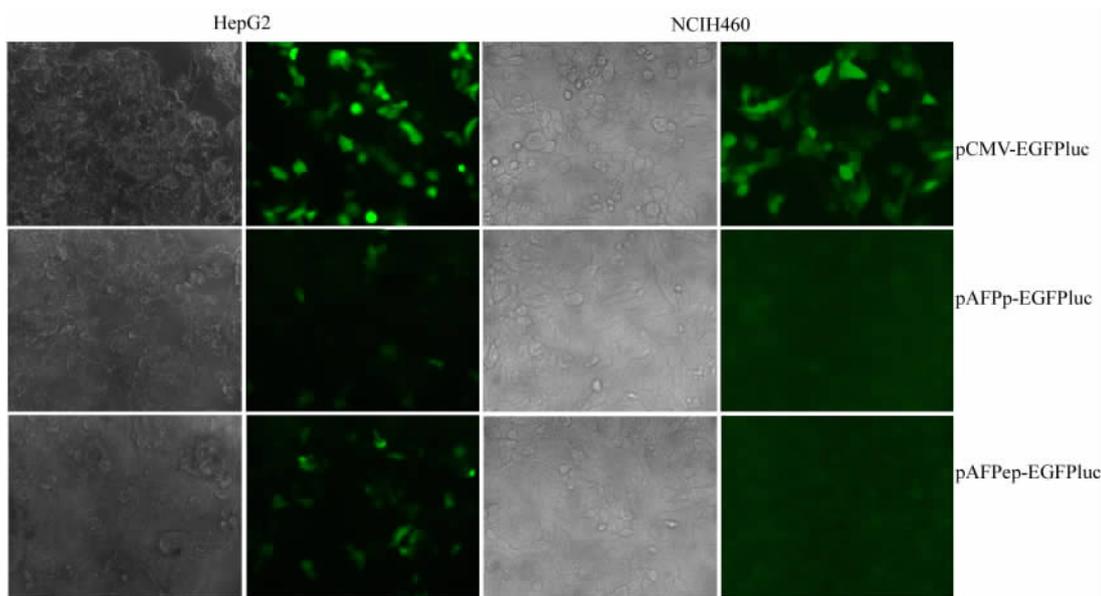


图2 通过 EGFP 表达鉴定 AFP 启动子和增强子的表达活性(× 40)

Fig.2 Activities of AFP promoter and enhancer detected by expression of EGFP (× 40)

2.4 Ad. GFP 对细胞的感染效率

流式分析显示, Ad. GFP 对 HepG2、Hep3B、Chang liver 和 NCIH460 细胞的感染效率分别为 (56. 2 ± 5. 3)%、(62. 6 ± 9. 8)%、(79. 3 ± 2. 4)% 和 (67. 6 ± 4. 1)% , 可见腺病毒对 4 株实验细胞的感

染效率无明显差异。

2.5 病毒感染细胞的 EIA 表达情况

用 Western blotting 检测 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK 感染的 HepG2、Hep3B、NCIH460 以及 Chang liver 细胞中 EIA 基因表达情况。在 AFP 阳性肿瘤细胞

HepG2 和 Hep3B 细胞中均可检测到 E1A 蛋白,而在 AFP 阴性的 NCIH460 和 Chang liver 细胞中,没有检测到 E1A 蛋白(图 5)。

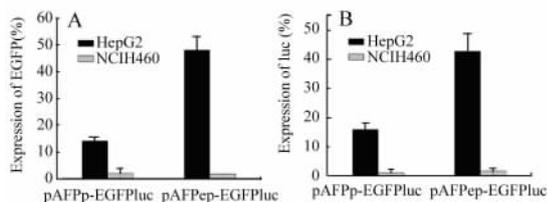


图 3 AFPp、AFPep 相对于 CMV 启动子的活性

Fig.3 Relative activities of AFPp and AFPep to CMV promoter

A: Relative activity of AFPp and AFPep to CMV detected by expression of EGFP; B: Relative activity of AFPp and AFPep to CMV detected by the expression of luciferase

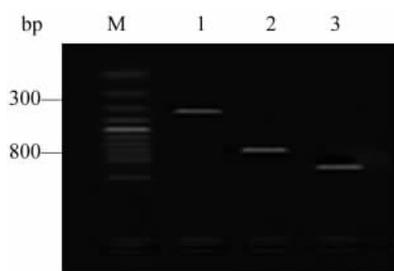


图 4 重组腺病毒 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK 的 PCR 鉴定

Fig.4 Identification of recombinant adenovirus Ad. AFPep-E1A/CMV-TK by PCR

1: AFP promoter; 2: AFP enhancer; 3: TK gene; M: 100 bp marker

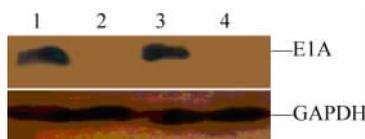


图 5 Western blotting 检测病毒感染后细胞 E1A 的表达情况

Fig.5 E1A expression after transfection as detected by Western blotting

1: HepG2 cells; 2: Chang liver cells; 3: Hep3B cells; 4: NCIH460 cells

2.6 不同细胞中 dl309 和 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK 病毒的复制能力

dl309 和 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK 分别感染 HepG2, 增殖实验检测实验中 PFU, 结果分别为 3×10^6 pfu/ml、 4×10^5 pfu/ml; 感染 Hep3B 后分别为 2×10^7 pfu/ml、 3×10^6 pfu/ml; 感染 Chang liver 后分别为 5×10^6 pfu/ml、 5×10^3 pfu/ml; 感染 NCIH460 后分别为 9×10^6 pfu/ml、 1×10^4 pfu/ml。

Ad. AFPep-E1A/CMV-TK 在 AFP 阳性细胞中的

复制能力与 dl309 的复制能力相比无明显差异(小于 10 倍),而在 AFP 阴性细胞中 dl309 的复制能力大约是 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK 复制能力的 1 000 倍(图 6)。

可见 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK 在 HepG2、Hep3B 细胞中的复制能力明显高于在 Chang liver 和 NCIH460 细胞中的复制能力($P < 0.01$)。

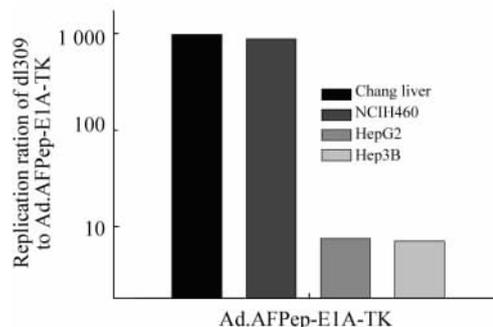


图 6 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK 与 dl309 在各种细胞中复制能力的比较

Fig.6 Comparison of replication abilities between Ad. AFPep-E1A/CMV-TK and dl309 in different cells

2.7 重组腺病毒感染后不同肿瘤细胞的病变效应

AFP 阳性肿瘤细胞 HepG2、Hep3B 被 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK 病毒感染后,可见明显的细胞病变,而被复制缺陷型腺病毒 Ad. GFP 感染后,未见细胞病变。AFP 阴性的肿瘤细胞 NCIH460 以及正常肝细胞 Chang liver 被 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK 和 Ad. GFP 感染后均未观察到明显病变(图 7)。说明 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK 对 AFP 阳性肝癌细胞有选择性溶瘤作用。

2.8 重组腺病毒联合前药 GCV 对肝癌细胞的杀伤作用

HepG2 细胞感染 Ad. GFP、Ad. AFPep-E1A/CMV-TK、Ad. AFPep-E1A/CMV-TK + GCV 后,存活率分别为 $(99.11 \pm 5.94)\%$ 、 $(25.56 \pm 1.23)\%$ 、 $(10.35 \pm 1.07)\%$; Hep3B 细胞存活率分别为 $(97.29 \pm 5.32)\%$ 、 $(24.54 \pm 7.30)\%$ 、 $(15.49 \pm 5.80)\%$; Chang liver 细胞存活率分别为 $(99.38 \pm 6.97)\%$ 、 $(81.43 \pm 3.27)\%$ 、 $(73.55 \pm 4.36)\%$; NCIH460 细胞存活率分别为 $(96.74 \pm 5.86)\%$ 、 $(90.93 \pm 3.73)\%$ 、 $(74.54 \pm 9.89)\%$ (图 8)。

与正常对照细胞相比,感染 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK 并加前药 GCV 后,AFP 阳性细胞 HepG2 以及 Hep3B 的生长明显受到抑制($P < 0.01$),而 AFP 阴性的 NCIH460 及 Chang liver 细胞生长影响不大。

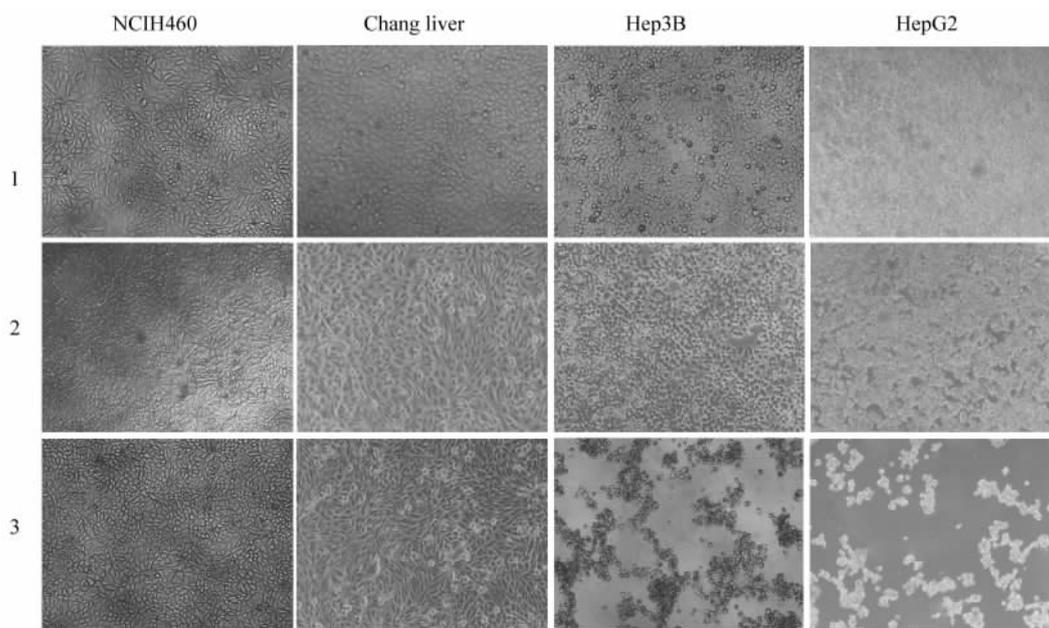


图 7 重组腺病毒感染后不同肿瘤细胞的病变效应(× 40)
Fig. 7 Cytopathic effects of different tumor cells after infected with adenoviruses(× 40)
 1 : Control; 2 : Infected by Ad. GFP; 3 : Infected by Ad. AFPep-E1A/CMV-TK

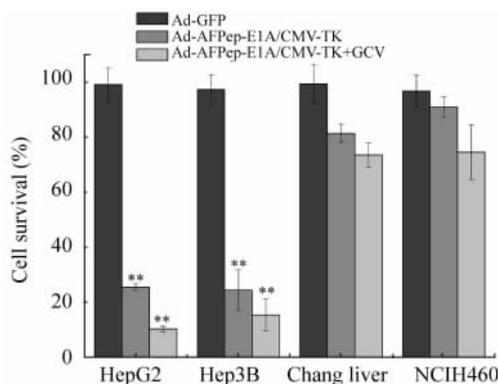


图 8 CCK-8 检测肿瘤细胞感染重组腺病毒后的存活率
Fig. 8 Survival rates of different infected tumor cells as measured by CCK-8
 ** $P < 0.01$ vs Ad-GFP infected cells

3 讨论

腺病毒是目前肿瘤基因治疗研究中应用最多的一种病毒载体,其中条件复制型腺病毒(CRAd)可以选择性地在肿瘤细胞中复制而被广泛应用。本实验将肝癌特异性启动子和增强子(AFPp 和 AFPe)置于腺病毒 E1A 之前,通过调控腺病毒早期基因 E1A 的表达来实现该病毒的选择性复制。Western blotting 以及病毒增殖实验证实,该病毒在 AFP 阳性

的肿瘤细胞中可以选择性复制,而在 AFP 阴性细胞中不复制或极少复制。

甲胎蛋白基因被认为是肝癌特异性的。以往研究证明甲胎蛋白基因 300 bp 核心启动子足以启动下游基因^[8],Mohr 等^[9]利用它来调控 HSV-TK 基因的逆转录病毒载体靶向性治疗 AFP 阳性肝癌,取得了预期的结果。但也有研究者^[10]认为甲胎蛋白基因 300 bp 核心启动子活性有限,并不能很好的达到启动下游基因的作用。很多研究者开始利用增强子来增强启动子的活性^[11-13]。Kanai 等^[14]将 AFP 基因的启动子和增强子串连,调控自杀基因胞嘧啶脱氨酶(CD)表达,使 CD 基因在肝癌组织特异性高效表达,取得了很好的治疗效果。但是,全长 AFP 增强子序列为 2 kb,由于腺病毒包装能力有限,较长的 AFP 增强子序列将限制治疗基因的长度,并影响腺病毒包装^[15]。本实验试图寻找既能够保持增强子活性,又不影响病毒包装的小片段顺式调控元件来调控腺病毒 E1A 的表达。本实验选取了 300 bp 核心启动子的同时,又在其上游添加截短的但具有两个亚区的 800 bp 增强子,并通过检测报告基因 EGFP 和 Luciferase 的表达鉴定 AFPp 和 AFPep 的活性和特异性,证明本实验中选取的小片段顺式调控元件 AFPep 能够有效地启动下游 E1A 基因,同时又便于分子克隆操作,而且为腺病毒包装入更多的治疗基因提供了空间。

由于肿瘤的复杂性,单一病毒疗法很难达到理想效果,因此有必要结合另外的治疗策略,从而达到提高单位剂量的治疗效率,减少病毒的使用量、提高安全性、降低免疫反应的要求。CRAds 与基因治疗的结合,即病毒-基因疗法^[16-21],可以更好的达到这个要求。基于这个目的,本实验把自杀基因 HSV-TK 构建到甲胎蛋白增强子-启动子调控的复制型腺病毒基因组中,利用病毒选择性复制,实现基因治疗的靶向性。此外,在病毒 Ad. AFPep-E1A/CMV-TK 复制过程中,治疗基因 TK 的拷贝数和表达量也大大增加,在使用低剂量病毒的同时,满足更好地选择性杀伤 AFP 阳性肝癌细胞的需要,明显提高了基因治疗的效率。

综上,本研究首次选取了截短的 AFP 增强子 800 bp 片段与 300 bp 核心启动子串联调控 E1A 区域,在构建了条件复制性腺病毒的同时加入了自杀基因 TK,使腺病毒的溶瘤作用与自杀基因的基因治疗作用有机结合,使该重组腺病毒具有更好的肝癌特异性杀伤作用,为肝癌的基因治疗提供了一个良好的方法,具有良好的应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Toyoda E, Doi R, Kami K, *et al.* Midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus therapy for midkine-expressing human pancreatic cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2008, 27: 30.
- [2] Huang Q, Zhang X, Wang H, *et al.* A novel conditionally replicative adenovirus vector targeting telomerase-positive tumor cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(4): 1439-1445.
- [3] Li X, Fan R, Zou X, *et al.* Inhibitory effect of recombinant adenovirus carrying immunocaspase-3 on hepatocellular carcinoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358(2): 489-494.
- [4] Si S, Sun Y, Li Z, *et al.* Gene therapy by membrane-expressed superantigen for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma [J]. *Gene Ther*, 2006, 13(22): 1603-1610.
- [5] 司少艳, 胡沛臻, 黄 杨, 等. 腺病毒介导的肝癌靶向 SEA/CD80 基因治疗及免疫学机制的初步研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(3): 278-281.
- [6] Ren XW, Liang M, Meng X, *et al.* A tumor-specific conditionally replicative adenovirus vector expressing TRAIL for gene therapy of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13(2): 159-168.
- [7] Rein DT, Breidenbach M, Kirby TO, *et al.* A fiber-modified, secretory leukoprotease inhibitor promoter-based conditionally replicating adenovirus for treatment of ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3): 1327-1335.
- [8] Ido A, Nakata K, Kato Y, *et al.* Gene therapy for hepatoma cells using a retrovirus vector carrying herpes simplex virus thymidine kinase gene under the control of human alpha-fetoprotein gene promoter [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(14): 3105-3109.
- [9] Mohr L, Shankara S, Yoon SK, *et al.* Gene therapy of hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* in nude mice by adenoviral transfer of the Escherichia coli purine nucleoside phosphorylase gene [J]. *Hepatology*, 2000, 31(3): 606-614.
- [10] Bilbao R, Gérolami R, Bralet MP, *et al.* Transduction efficacy, antitumoral effect, and toxicity of adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ ganciclovir therapy of hepatocellular carcinoma: the woodchuck animal model [J]. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7(5): 657-662.
- [11] Tan EH, Hooi SC, Laban M, *et al.* CCAAT/enhancer binding protein alpha knock-in mice exhibit early liver glycogen storage and reduced susceptibility to hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(22): 10330-10337.
- [12] Pin RH, Reinblatt M, Fong Y. Utilizing alpha-fetoprotein expression to enhance oncolytic viral therapy in hepatocellular carcinoma [J]. *Ann Surg*, 2004, 240(4): 659-665.
- [13] Gao P, Wang R, Shen JJ, *et al.* Hypoxia-inducible enhancer/alpha-fetoprotein promoter-driven RNA interference targeting STK15 suppresses proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(11): 2209-2217.
- [14] Kanai F. Transcriptional targeted gene therapy for hepatocellular carcinoma by adenovirus vector [J]. *Mol Biotechnol*, 2001, 18(3): 243-250.
- [15] Watanabe K, Saito A, Tamaoki T. Cell-specific enhancer activity in a far upstream region of the human alpha-fetoprotein gene [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(10): 4812-4818.
- [16] Li GC, Yang JM, Nie MM, *et al.* Potent antitumoral effects of a novel gene-viral therapeutic system CNHK300-mEndostatin in hepatocellular carcinoma [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2005, 118(3): 179-185.
- [17] Zhang ZL, Zou WG, Luo CX, *et al.* An armed oncolytic adenovirus system, ZD55-gene, demonstrating potent antitumoral efficacy [J]. *Cell Res*, 2003, 13(6): 481-489.
- [18] 周丽君, 李秋香, 李冬田, 等. 重组腺病毒 rAd-E1A-CDglgTK 对人卵巢癌 SKOV3 细胞的抑制作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(3): 223-227.
- [19] 施军霞, 苏长春, 李林芳, 等. 肿瘤特异增殖腺病毒 CNHK200-hEndo 的构建及其抗裸鼠肝癌移植瘤疗效 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(2): 176-178.
- [20] Freytag SO, Barton KN, Brown SL, *et al.* Replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy with radiation in a pre-clinical model of pancreatic cancer [J]. *Mol Ther*, 2007, 15(9): 1600-1606.
- [21] King GD, Muhammad AK, Xiong W, *et al.* High-capacity adenovirus vector-mediated anti-glioma gene therapy in the presence of systemic antiadenovirus immunity [J]. *J Virol*, 2008, 82(9): 4680-4684.

[收稿日期] 2009 - 02 - 24

[修回日期] 2009 - 03 - 17

[本文编辑] 王 莹