

肿瘤特异性溶瘤腺病毒载体的构建及其在肿瘤细胞中特异性的表达

浦颖艳, 方琳, 沈权, 孙丽君, 胡小翠, 王艳, 曹祥荣, 苏长青

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子医学重点实验室, 江苏 南京 210046)

[摘要] 为构建一种由人端粒酶逆转录酶启动子(hTERT_p)调控的能够在肿瘤细胞中特异性增殖的新型肿瘤基因治疗溶瘤腺病毒载体系统, 利用基因重组技术将 hTERT_p 插入 5 型腺病毒 E1A 基因上游, 构建肿瘤特异性增殖腺病毒 AdSU, 使其携带绿色荧光蛋白报告基因. 同时构建增殖缺陷型腺病毒 Ad-EGFP 作为对照. 通过 Western blot 分析表明该特异性增殖腺病毒 AdSU-EGFP 在肿瘤细胞中特异性表达 E1A. 而通过荧光显微镜观察两者增殖实验发现, AdSU-EGFP 在正常成纤维细胞株 BJ 及原代子宫成纤维细胞中无增殖, 在肝癌细胞株 MH-CC 和肺癌细胞株 A549 中, 则可见病毒增殖并裂解细胞的现象. 由此可认为成功构建了肿瘤基因治疗的特异性溶瘤腺病毒载体系统 AdSU, 该系统能够在肿瘤细胞中特异性增殖并表达所携带的外源基因, 这对肿瘤的定向基因治疗有着重要意义.

[关键词] 基因治疗, 溶瘤腺病毒, 肿瘤, 端粒酶启动子

[中图分类号] R730.54 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008)02-0092-05

Construction of Tumor-specific Oncolytic Adenovirus Vector and its Primary Study on Selective Expression in Tumor Cells

Pu Yingyan, Fang Lin, Shen Quan, Sun Lijun, Hu Xiaocui, Wang Yan,
Cao Xiangrong, Su Changqing

(School of Life Science, Nanjing Normal University, The Jiangsu Key Laboratory of Molecular
and Medical Biotechnology, Nanjing 210046 China)

Abstract To develop a novel gene therapeutic oncolytic adenovirus in which the hTERT promoter was introduced and used to regulate adenoviral E1A gene. A novel cancer-specific replication-competent adenovirus named AdSU was constructed by employing the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter to drive the expression of adenovirus E1A gene and by cloning the EGFP reporter gene into the adenovirus genome. The non-replicative adenovirus named Ad-EGFP was constructed as the control at the same time. The selective replication of AdSU-EGFP in tumor cells was investigated by virus proliferative test and Western blot assay. By western blot assay, E1A protein was positive in cancer cells (MH-CC, A549) infected with AdSU-EGFP, but negative in normal cells (BJ, uterine fibroblast). Under the fluorescent microscope, a few normal cells expressed EGFP and emitted fluorescence, and no phagocytic plaques appeared from 3-10 days after infected with AdSU-EGFP. However, when a few cancer cells were infected with AdSU-EGFP and emitted fluorescence after 3 days, the fluorescence emission cells spread within a large area after 7 days. So we can make a conclusion that a novel cancer-selective gene therapeutic oncolytic adenovirus vector system named AdSU, which can selective replicate and express therapeutic genes in cancer cells, was constructed. It is a promising system for targeted cancer gene therapy.

Key words gene therapy, oncolytic adenovirus, tumor, telomerase promoter

目前治疗肿瘤的传统方案主要是手术、放疗和化疗等, 在攻击肿瘤细胞的同时也给人体正常细胞带来

收稿日期: 2007-10-31

通讯联系人: 曹祥荣, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤发生与基因治疗分子机制、动物染色体进化与基因组学等. E-mail: cao63@126.com

了严重的损伤,因此有必要探索新的治疗方法.定向基因治疗的溶瘤腺病毒载体系统就是一种新型的肿瘤治疗系统,通过基因重组技术改造腺病毒基因,使其在肿瘤细胞中特异性增殖,实现溶解肿瘤细胞的目的,同时腺病毒对肿瘤细胞还具有增敏作用,可增强肿瘤细胞对放、化疗药物的敏感性.而当其它治疗方案无效时,溶瘤腺病毒仍能杀伤肿瘤细胞,表明其抗肿瘤机制与经典治疗方案是互补或截然不同的,因此受到越来越多的关注.

端粒酶阳性表达是人类实体瘤的重要特性之一,在 83% 以上的肿瘤细胞中端粒酶表达阳性,而在绝大多数的正常体细胞中为阴性^[1,2].利用这一特性,我们构建了一种肿瘤选择性增殖型腺病毒 AdSU,用人端粒酶逆转录酶启动子(hTERTp)调控腺病毒的 E1A 基因,为肿瘤的基因治疗提供了一种新的策略.

1 材料和方法

1.1 实验材料

腺病毒 E1区转化的人胚胎肾细胞株 HEK 293、人肺癌细胞株 A549、人肝癌细胞株 MHCC、正常成纤维细胞株 BJ 购于中国科学院上海细胞研究所,人原代子宫成纤维细胞由本室培养保存.胎牛血清购自 Gibco BRL 公司,各种细胞株培养液、培养血清及抗生素参照供应商推荐,质粒 pDC312、pDC315、pXC1、pUC19 携带 EGFP 报告基因的腺病毒载体质粒 pAd-EGFP 含有 5 型腺病毒右臂并缺失 E1/E3 区的腺病毒骨架质粒 pBHGE3 由本室保存.反转录试剂盒购自 Promega 公司,转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司,限制性内切酶、T4 连接酶购自 TAKARA 公司, E1A 抗体购自 Upstate 公司.

1.2 hTERT mRNA 表达检测

取对数生长期 HEK 293 细胞株(阳性对照)、人肺癌细胞株 A549、人肝癌细胞株 MHCC、正常成纤维细胞株 BJ、人原代子宫成纤维细胞,提取细胞总 RNA 后采用 hTERT 上游引物(5' CTGCCGTCTTCACTTC-CCCAC3')和 hTERT 下游引物(5' TTA CTCCCA CAGCA CCTCCCC3')进行 RT-PCR 检测 hTERT mRNA 表达,扩增产物(283 bp)进行琼脂糖凝胶电泳.

1.3 腺病毒载体的构建

全基因合成 hTERTp 启动子 TP352 克隆到 pMD18T 中,得到质粒 pMD18T-hTERTp 以 pXC1 为模板进行 E1A 基因 PCR 扩增,引物为 P1 5'-GCTCTAGA ACCATGAGACATATTATC-3' (含 XbaI 酶切位点), P2 5'-GCGTCGACTTATGGCCTGGGCG-3' (含 SalI 酶切位点). NheI+XhoI 双酶切 pMD18T-hTERTp 得到含 hTERTp 的片段; PCR 扩增的 E1A 产物经 XbaI+SalI 酶切后回收;分别插入穿梭质粒 pDC315 相应位点,鉴定正确后命名为 pAdSU (图 1).

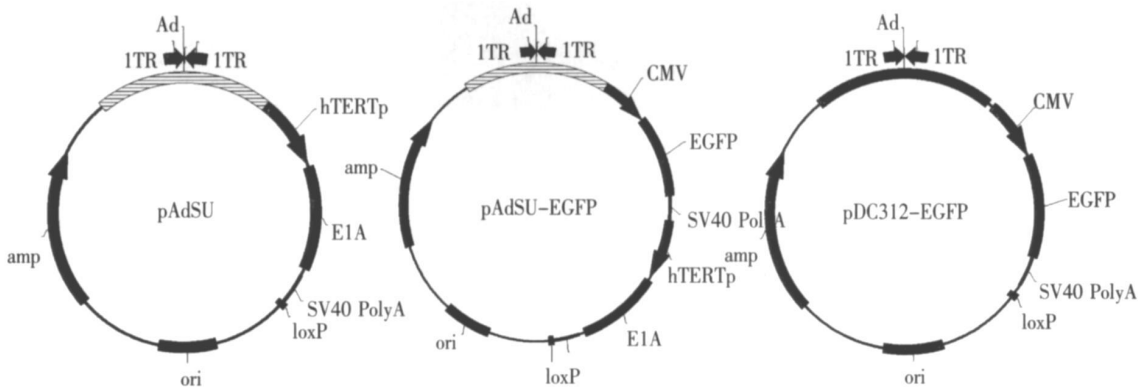


图 1 腺病毒穿梭质粒的构建

Fig.1 Construction of the adenoviral shuttle vector

1.4 携带 EGFP 报告基因的腺病毒载体

pAd-EGFP 经 BglIII 酶切,得到含有 CMV 启动子+EGFP 基因+SV40polyA 加尾信号的片段,插入 pAdSU,鉴定正确后命名为 pAdSU-EGFP (图 1).同时,pAd-EGFP 的 BglIII 酶切片段插入穿梭质粒 pDC312,鉴定正确后命名为 pDC312-EGFP (图 1).

1. 5 重组腺病毒的获得及其鉴定

将质粒 pDC312- EGFR pAdSU - EGFP 分别与含有 5 型腺病毒右臂的骨架质粒 pBHGE3 共转染 HEK293 细胞, 通过同源重组的方法获得重组病毒. 约 8 d 开始出现噬斑, 吸取单个噬斑进行小量扩增后将培养液及细胞收起, 37℃ ~ - 80℃ 反复冻融 3 次后, 即可用于重组腺病毒的鉴定及大量扩增. 取反复冻融后的细胞培养液 10 uL 加等量蛋白酶 K (20mg / mL), 55℃ 处理 1 h 后 100℃ 灭活 5 m i n 取 2 uL 作为模板用于 PCR 进行鉴定 (分别用引物 P1 / P2 鉴定 E1A, 用 EGFP 基因引物 P3 5' - GCTCTAGAGAATTCA CCATG - GTGAGCAAGGCC - 3', P4 5' - CGGGATCCGTCGACTTATTACCTAGATCCGGTGG - 3' 鉴定 EGFP), 正确者分别命名为 Ad - EGFR AdSU - EGFP. 重组腺病毒采用 HEK293 细胞扩增, 病毒纯化采用氯化铯梯度离心纯化法, 滴度测定采用 TCID₅₀ 方法.

1. 6 W estern印迹分析及病毒增殖的荧光观察

将肿瘤细胞和正常细胞置 6 孔板中培养, 2 × 10⁵ 个细胞 / 孔, 第二天去除培养基, 每孔加入 1 mL 无血清 DMEM 和 MOI = 3 的病毒 Ad - EGFP 或 AdSU - EGFP, 37℃ 5% CO₂ 孵育箱中孵育 90 m i n (45 m i n 时摇匀一次), 吸去无血清培养液, 加入 5% 胎牛血清培养液 2 mL, 继续培养. 在病毒感染细胞后 3 7 d 时裂解细胞用于 E1A 表达的 W estern B lot 检测. 同时在病毒感染后 3 7 10 d 荧光显微镜下观察细胞内荧光反应的强度并照相.

2 结果

2. 1 hTERT mRNA 表达检测

检测结果显示 HEK293, MHCC, A549 细胞株 hTERT mRNA 表达均为阳性, 而 BJ 正常成纤维细胞株及人原代子宫成纤维细胞为阴性 (图 2)

2. 2 重组腺病毒的鉴定及扩增

挑取噬斑, 扩增后用 PCR 引物 P1 / P2 扩增 E1A 基因鉴定重组病毒 (图 3). AdSU - EGFP 扩增出约 740 bp 和 860 bp 的目的片段, 证实重组病毒中携带 E1A243 和 E1A289 剪接体, 而 Ad - EGFP 无 E1A 基因扩增条带. 用引物 P3 / P4 扩增 Ad - EGFP 及 AdSU - EGFP 的 EGFP 基因 (图 4), 两者均有 760 bp 目的条带, 证实重组腺病毒 AdSU - EGFP、Ad - EGFP 构建成功. 对重组病毒进行扩增、纯化, TCID₅₀ 方法测定病毒 Ad - EGFP 及 AdSU - EGFP 滴度分别为 1. 5 × 10¹⁰ pfu / mL、1. 0 × 10⁹ pfu / mL.

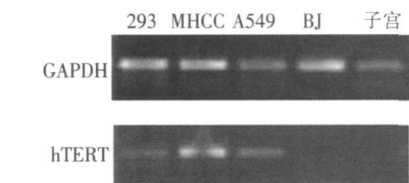


图 2 hTERT mRNA 在细胞中的表达
Fig.2 The expression of the hTERTp mRNA in cells

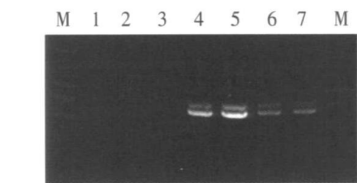


图 3 重组腺病毒 E1A 鉴定
Fig.3 Identification of adenoviral E1A gene
M: 2 000 bp Marker; 1~3: Ad-EGFP 噬斑;
4: 质粒阳性对照; 5~7: AdSU-EGFP 噬斑

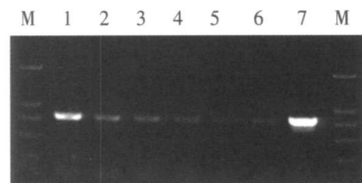


图 4 重组腺病毒 EGFP 鉴定
Fig.4 Identification of EGFP gene
M: 2 000 bp Marker; 1~3: Ad-EGFP 噬斑; 4:
质粒阳性对照; 5~7: AdSU-EGFP 噬斑

2. 3 W estern blot检测

增殖型病毒 AdSU - EGFP 感染肿瘤细胞 MHCC、A549 后, 其细胞裂解样品含有相对分子质量为 36 000 - 50 000 的 E1A 蛋白, 感染正常成纤维细胞株 BJ 及子宫成纤维细胞后则没有 E1A 表达. 增殖缺陷型病毒 Ad - EGFP 感染肿瘤细胞及正常细胞后都没有 E1A 蛋白表达 (图 5).

2. 4 病毒增殖的荧光观察

荧光显微镜下可直接观察 Ad - EGFP 及 AdSU - EGFP 病毒在肿瘤细胞和正常细胞中的增殖情

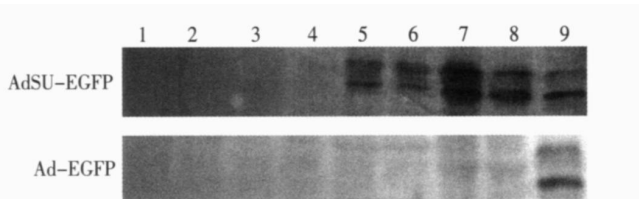


图 5 W estern B lot 检测病毒 E1A 的表达
Fig.5 E1A expression in cell lines identified by Western blot
1, 2: BJ 细胞 (3, 7 d); 3, 4: 子宫成纤维细胞 (3, 7 d); 5, 6: MHCC 细胞 (3, 7 d); 7, 8: A549 细胞 (3, 7 d); 9: HEK293 细胞阳性对照

况. AdSU-EGFP在正常成纤维细胞株 BJ及原代子宫成纤维细胞中没有增殖, 在感染后第 7 10 d仍只可见孤立的发荧光细胞, 无病毒裂解细胞的现象. 在肝癌细胞株 MHCC 及肺癌细胞株 A549中, 感染后 3 d可见孤立的荧光细胞, 而在第 7 d则已经形成成片的荧光阳性细胞, 说明病毒增殖明显, 裂解细胞后可继续感染邻近的肿瘤细胞, 至第 10 d可见噬斑中央多数细胞已经死亡, 甚至出现荧光强度减弱的现象(图 6). 而 Ad-EGFP在正常细胞及肿瘤细胞中均无荧光增多现象, 说明无明显的病毒增殖发生(图 7).

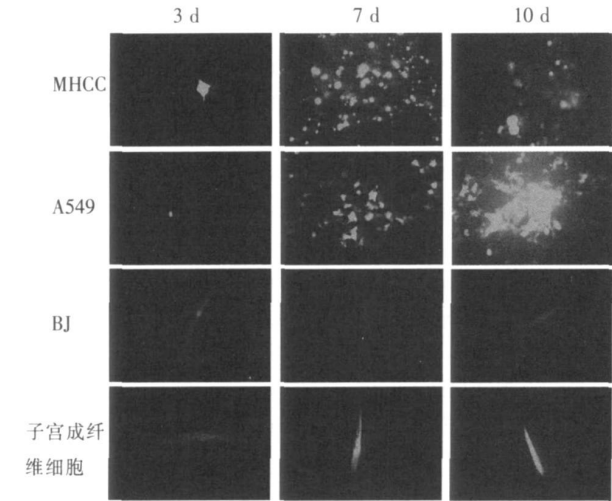


图 6 荧光显微镜观察 AdSU-EGFP 在 MHCC、A549 癌细胞和 BJ、原代子宫成纤维细胞内的增殖情况

Fig.6 The replication of AdSU-EGFP in normal and cancer cells under the fluorescent microscope

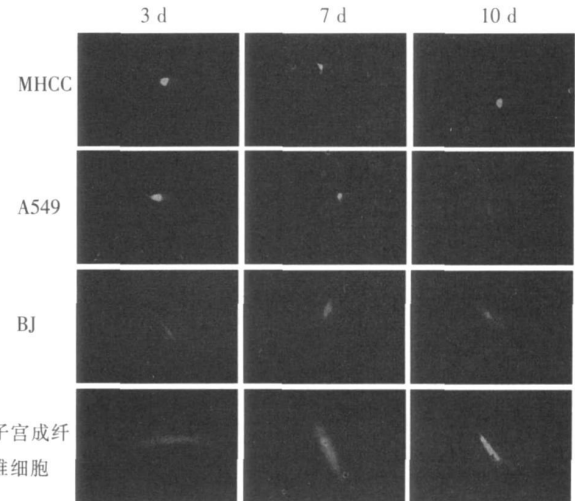


图 7 荧光显微镜观察 Ad-EGFP 在 MHCC、A549 癌细胞和 BJ、原代子宫成纤维细胞内的增殖情况

Fig.7 The replication of Ad-EGFP in normal and cancer cells under the fluorescent microscope

3 讨论

癌症已经成为威胁人类健康的重大疾病之一, 传统的治疗方法主要是手术、放疗和化疗等, 在攻击肿瘤细胞的同时也给人体正常细胞带来了严重的损伤, 具有肿瘤特异性定向能力的溶瘤病毒载体作为一种新的肿瘤治疗手段受到了愈来愈多的关注. 目前国内外已有多种溶瘤病毒进入临床试验^[3-6]. 同传统的肿瘤治疗方案相比, 利用溶瘤腺病毒治疗肿瘤具有以下优势^[7]: 第一, 溶瘤腺病毒具有在肿瘤细胞中特异性增殖的特性, 它的复制、增殖仅限于肿瘤细胞, 避免了对正常宿主细胞的影响, 从而提高了安全性; 第二, 溶瘤腺病毒可利用病毒本身的特性裂解细胞, 同时释放出来的病毒可以进一步感染周围的肿瘤细胞, 再次复制、增殖、溶解周围的肿瘤细胞, 疗效进一步放大; 第三, 病毒蛋白尤其是 E1A 蛋白, 可引起免疫反应, 达到提高机体抗肿瘤的目的.

缺失 E1B55K 的腺病毒 ONYX-015(dll520)是最成功的肿瘤增殖腺病毒之一, 它能够在 p53 异常的肿瘤细胞中特异性增殖^[8]. 但是有研究者发现, ONYX-015 能在某些 p53 功能正常的肿瘤细胞中增殖, 而在某些 p53 功能缺陷的细胞中却不能增殖^[9], 因此需要对腺病毒做进一步改造, 增强其肿瘤靶向性.

目前有许多研究者选择肿瘤特异性启动子来调控腺病毒靶向性. 例如, 增殖型腺病毒 CN706 是利用前列腺特异性抗原 (PSA) 启动子 增强子调控 E1A 的表达, 使其在 PSA 阳性的细胞内特异性增殖^[10]. 另外还有 AFP 启动子用于肝癌^[11], MUC1 启动子用于乳腺癌等^[12]的治疗方案. 但是这些启动子均存在肿瘤类型的局限性, 只能在特定组织来源的肿瘤中起作用, 因此选择一个广泛的肿瘤特异性启动子将是更好的选择. 人端粒酶逆转录酶 (hTERT) 启动子正符合了这个条件.

近年研究表明, 在 85% 以上的人肿瘤细胞中 hTERT 活性很高^[1-2], 而在除造血细胞和胚胎干细胞以外的正常细胞中却没有活性, 提示 hTERT 启动子可以作为广泛性的肿瘤特异性启动子来调控腺病毒必需基因, 使腺病毒在端粒酶阳性的肿瘤细胞中特异性复制、增殖, 从而裂解肿瘤细胞^[13-15]. 利用 5 型腺病毒对造血细胞和胚胎干细胞感染能力差的特点, 同时避免了病毒对端粒酶弱阳性的造血细胞和胚胎干细胞的影响.

本研究将腺病毒 E1A 基因置于 hTERT 启动子的控制之下, 同时缺失腺病毒 E1B55K 功能, 构建成一

种新的基因治疗病毒载体系统 AdSU. 实验结果显示, 我们所构建的 AdSU 能在肿瘤细胞中有效增殖, 而在正常细胞中不增殖, 证明该病毒载体系统具有良好的肿瘤靶向性. 同时该病毒载体携带外源报告基因, 可以在肿瘤细胞中特异性高表达, 为临床肿瘤的基因治疗提供了一种新的载体和新的策略.

[参考文献]

- [1] Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer[J]. *Eur J Cancer* 1997, 33(5): 787-791.
- [2] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. *Science* 1994, 266(5193): 2011-2015.
- [3] Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, et al. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial[J]. *Cancer Res* 2000, 60(22): 6359-6366.
- [4] DeWeese TL, Poel H, Li S, et al. A phase I trial of CV706, a replication-competent PSA-selective oncolytic adenovirus for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy[J]. *Cancer Res* 2001, 61(20): 7464-7472.
- [5] 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.
- [6] Hecht JR, Bedford R, Abbruzzese JL, et al. A Phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma[J]. *Clin Cancer Res* 2003, 9(2): 555-561.
- [7] Kim D, Martuza RL, Zwiebel J. Replication-selective virotherapy for cancer: biological principles, risk management and future directions[J]. *Nat Med* 2001, 7(7): 781-787.
- [8] Bischoff JR, Kim DH, Williams A, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells[J]. *Science* 1996, 274(5286): 373-376.
- [9] 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.
- [10] Rodriguez R, Schuur ER, Lin HR, et al. Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells[J]. *Cancer Res* 1997, 57(13): 2559-2563.
- [11] 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.
- [12] Kurihara T, Brough DE, Kovacs I, et al. Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen[J]. *J Clin Invest* 2000, 106(6): 763-771.
- [13] Su CQ, Shan J, Xue HB, et al. Potent antitumoral efficacy of a novel replicative adenovirus CNHK300 targeting telomerase-positive cancer cells[J]. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004, 130(10): 591-603.
- [14] Kawashima T, Kagawa S, Naoya K, et al. Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer[J]. *Clin Cancer Res* 2004, 10(Pt1): 285-292.
- [15] Su CQ, Wang XH, Chen J, et al. Antitumor activity of an hTERT promoter-regulated tumor-selective oncolytic adenovirus in human hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol* 2006, 12(47): 7613-7620.

[责任编辑: 孙德泉]