

腺病毒载体介导 CEA 基因元件调控自杀基因治疗

许德华 戈 凯 蒋 琼 郑仲承 刘新垣

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 构建以 CEA 启动子控制 HSV-*TK* 基因表达的复制缺陷型腺病毒载体 (AdCEATK). 纯化的重组腺病毒滴度达 1×10^{12} pfu/ml. CEA 阴性的 HeLa 细胞感染 AdCMVTK 后对丙氧鸟苷 (GCV) 很敏感, 而感染了 AdCEATK 后不被 GCV 杀伤. 与此相反 CEA 阳性的 LoVo 细胞中 AdCMVTK 和 AdCEATK 都有很好的表达活性, 说明 CEA 启动子有良好的细胞专一性. AdCEATK/GCV 系统还有明显的旁杀伤效应. 此载体将有助于实现对 CEA 阳性肿瘤的专一性自杀基因治疗.

关键词 腺病毒载体, 癌胚抗原基因启动子, 单纯疱疹病毒胸苷激酶 (HSV-*TK*) 基因, 基因治疗

学科分类号 R456

肿瘤自杀基因治疗是一种富有希望的肿瘤治疗新方法^[1]. 但是导入细胞的基因的表达产物都能将原药代谢成毒性产物, 于是导入基因的正常细胞也将被杀伤. 因此实现自杀基因在肿瘤细胞中的专一表达成为这种治疗方法能否应用的一大关键, 癌胚抗原 (CEA) 是一种肿瘤标志, 在多种消化系统肿瘤中 CEA 含量明显增加^[2], 我们利用这一特点, 使 HSV-*TK* 自杀基因受组织特异性的 CEA 启动子控制. 在原药丙氧鸟苷 (GCV) 存在时, 它能专一性杀伤分泌 CEA 的肿瘤细胞, 而对正常组织无影响. 还利用高效转染细胞的重组腺病毒为载体, 提高了转基因效率.

1 材料与方法

1.1 主要试剂

限制性内切酶, T4DNA 连接酶, TaqDNA 聚合酶购自 Promega 公司. 转染用试剂 LipofectAMINE, 2×MEM 培养基购自 Life Technologies 公司, 噻唑蓝 (thiazolyl blue, MTT) 购自华美公司, 丙氧鸟苷 (ganciclovir, GCV) 由 Syntex 公司惠赠.

1.2 质粒、毒种、细胞株

含全长 HSV-*TK* 基因的质粒 pHSV106 购自 Life Technologies 公司. 质粒 pCEATK 由本

组构建^[3], 腺病毒穿梭质粒 pAdE1CMV 由上海医科大学宋后燕教授惠赠. 表达 β-半乳糖苷酶的重组腺病毒 AdCMVLacZ 由 Gerard 教授惠赠, 重组腺病毒 AdCMVTK 由本组重组, 人胚肾细胞株 293、HeLa 细胞、人结直肠癌细胞株 LoVo 由本组传代.

1.3 *TK* 基因的 PCR 引物

由中国科学院上海生物化学研究所 DNA 合成室合成.

1.4 方法

1.4.1 腺病毒穿梭质粒 pAdCEATK 的构建: 用 *Bam*H I + *Hind* III 从 pCEATK 中切出含 400 bp CEA 启动子及 1.15 kb HSV-*TK* 基因的片段, Klenow 酶补平, 装入 pUC19, 再用 *Xba*I + *Hind* III 将该片段亚克隆入 pAdE1CMV 构成 CEA 启动子控制下特异性表达 HSV-*TK* 基因的腺病毒穿梭质粒 pAdCEATK, 由 SV40 polyA 信号控制转录终止.

1.4.2 腺病毒 DNA 右臂的制备: AdCMVLacZ 病毒在 293 细胞中大量增殖, 制备病毒 DNA, 用 *Xba*I, *Cla*I 酶切回收 33 kb 的缺损腺病毒 DNA 右臂.

1.4.3 AdCEATK 腺病毒的重组^[4]: 将腺病毒“右臂”DNA 与 pAdCEATK 以 1:10 比例混

收稿日期: 1997-07-17, 修回日期: 1997-11-20

合, 用 LipofectAMINE 共转染 293 细胞, 16 h 后在细胞层上覆盖 MEM + 0.6% NOBEL 琼脂, 经同源重组产生出腺病毒。7~10 d 后挑取空斑。用 1.15 kb 的 HSV-TK 基因作探针, 点杂交筛选出阳性空斑, 再经一到两次空斑纯化, 得到重组腺病毒 AdCEATK, 在 293 细胞中大量增殖。

1.4.4 重组腺病毒的鉴定: a. PCR 鉴定: 以病毒 DNA 为模板, 以 HSV-TK 基因 5' 及 3' 引物进行 PCR, PCR 反应条件: 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 30 个循环, 每个循环中 72℃ 延伸 3 s, 反应混合物中加 4% 的二甲亚砷 (DMSO)。

HSV-TK 基因 5' 端引物 5' GCG CGT ATG GCT TCG TAC CC 3'

HSV-TK 基因 3' 端引物 5' TCC TTA CGT GTT TCA GTT TCA GTT AGC CTC 3'

b. DNA 印迹鉴定 AdCEATK 病毒结构: 用 *EcoR* I + *Xba* I 及 *Hind* III + *Xba* I 两种组合酶切 AdCEATK 病毒 DNA, 以 ³²P-dATP 标记的 424 bp 长 CEA 启动子作探针。

1.4.5 重组腺病毒 AdCEATK 的纯化和滴度测定: 大量增殖的 AdCEATK 病毒用 CsCl 密度梯度超离心法进行纯化 (60 000 g, 20℃, 2 h)。纯化的病毒用含 10% 甘油的 PBS 透析, 收获的

病毒分装后置 -80℃ 保存。纯化的病毒经一系列稀释后, 用空斑形成试验测定病毒滴度^[4]。

1.4.6 腺病毒转基因效率的观察: HeLa 细胞铺于六孔板中, 2×10⁵ 个细胞/孔, 分别用 0.1~100 感染复数 (multiplicity of infection, M. O. I.) 的 AdCMVLacZ 病毒感染, 48 h 后, 加 X-gal, 显微镜下计数蓝色细胞数。

1.4.7 病毒受染细胞对 GCV 敏感性测定: 96 孔板每孔铺 2 000 个细胞, 次日分别用 0、1、10、100、1 000 M. O. I. 的病毒感染, 12 h 后加不同浓度的 GCV, 培养 48 h 后以 MTT 法测定细胞存活率。

1.4.8 旁杀伤效应测定: LoVo 细胞用 1 000 M. O. I. 的 AdCEATK 病毒感染, 24 h 后, 将 LoVo 细胞与 AdCEATK 感染过的 LoVo 细胞按不同比例混合重铺于六孔板中, 2×10⁵ 个/孔, 24 h 后, 加 50 μmol/L 的 GCV。每天换含 50 μmol/L 的 GCV 的培养液, 5 d 后苔酚蓝法计数活细胞。对照组则不加 GCV, 同样操作。

2 结 果

2.1 穿梭质粒 pAdCEATK 的构建

穿梭质粒 pAdCEATK 结构如图 1。

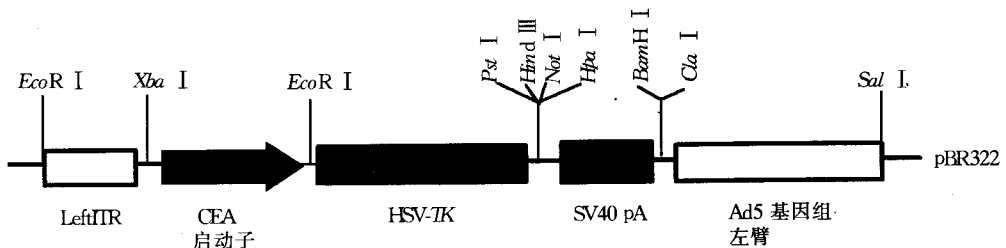


图 1 腺病毒穿梭质粒 pAdCEATK 结构示意图

2.2 重组腺病毒的鉴定

2.2.1 以 AdCMVTK 病毒 DNA 或 AdCEATK 病毒 DNA 为模板, 用 HSV-TK 基因 5' 及 3' 引物进行 PCR 反应, 均扩增出 1.15 kb 的片段 (图 2), 证明 HSV-TK 基因已成功重组入这两种病毒。

2.2.2 以 CEA 启动子片段为探针的 DNA 印迹表明: AdCEATK 病毒 DNA 经 *EcoR* I + *Xba* I 酶切, 可切出 424 bp 的 CEA 启动子区; 而 *Hind* III + *Xba* I 可切出含 CEA 启动子和 HSV-TK 基因的 1.55 kb 片段 (图 3), 这与穿梭质粒 pAdCEATK (图 1) 的结构一致, 证明

重组腺病毒 AdCEATK 结构正确.

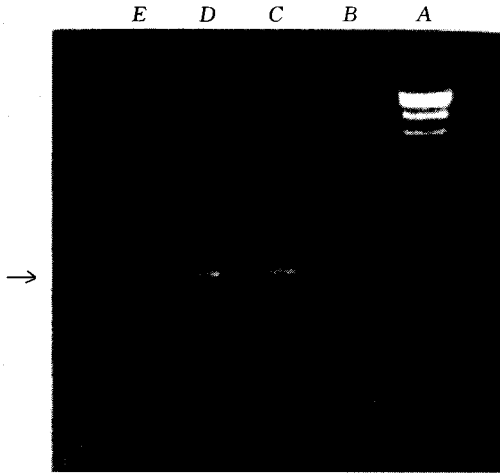


图2 HSV-TK 基因重组入腺病毒的 PCR 鉴定

A: 分子质量标准: λ /HindIII; B: 阴性对照: AdCMV Gal 病毒 DNA 为模板; C: 阳性对照: AdCMVTK 质粒 DNA 为模板; D: AdCMVTK 病毒 DNA 为模板; E: AdCEATK 病毒 DNA 为模板.

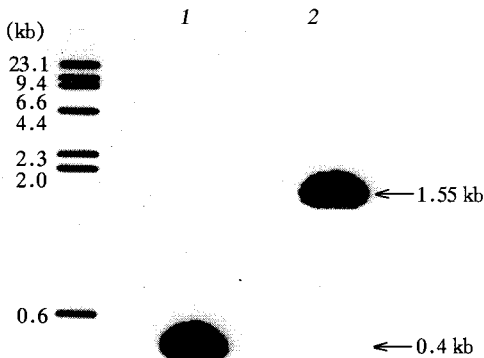


图3 DNA 印迹鉴定 AdCEATK 结构

1: AdCEATK 病毒 DNA 经 EcoRI + XbaI 酶切; 2: AdCEATK 病毒 DNA 经 HindIII + XbaI 酶切.

2.3 腺病毒 AdCEATK 的滴度

经氯化铯密度梯度离心法纯化的 AdCEATK 用空斑形成试验测得其滴度为 1×10^{12} pfu/ml.

2.4 腺病毒转基因效率观察

当感染 HeLa 细胞的 AdCMVLacZ 病毒 M. O. I. 为 0.1 时, 极少数细胞呈蓝色, (β -半乳糖苷酶基因有表达). 而在 M. O. I. 为 10 时, 90% 以上的细胞呈蓝色 (图 4 见图版

I), 表明腺病毒载体具有较高的转基因效率.

2.5 AdCMVTK 病毒受染细胞对 GCV 敏感

CMV 启动子基本无组织特异性, 在多种细胞和组织中均有很强活性, 如图 5 所示, CEA 阴性的 HeLa 细胞及 CEA 阳性的结直肠癌细胞株 LoVo 感染了 AdCMVTK 后对 GCV 的敏感性均明显提高. M. O. I. 为 10 时, $10 \mu\text{mol/L}$ GCV 处理 48 h, 一半以上 HeLa 细胞被杀死; M. O. I. 为 100 时, $100 \mu\text{mol/L}$

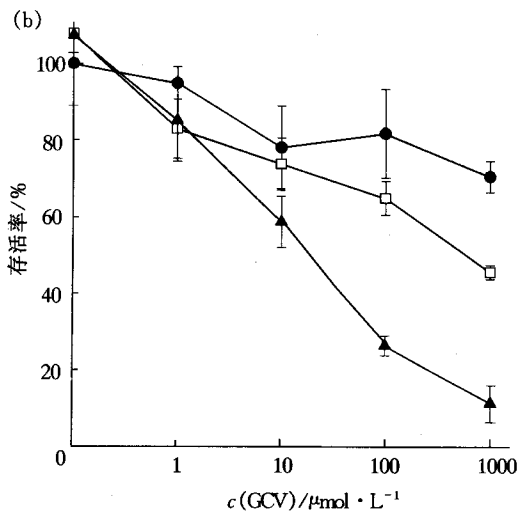
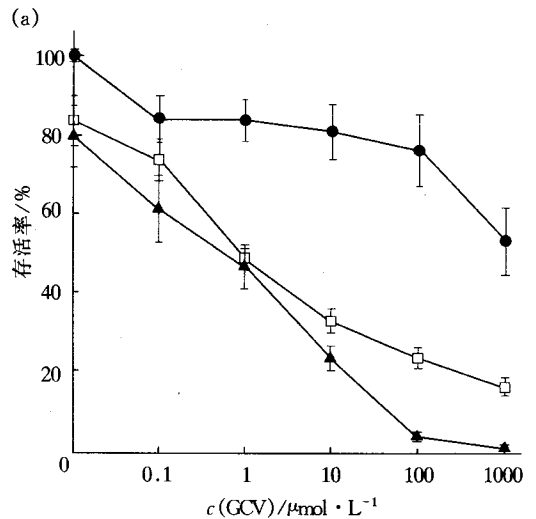


图5 细胞感染 AdCMVTK 后对 GCV 的敏感性

(a) HeLa/AdCMVTK; (b) LoVo/AdCMVTK. ●—●: M. O. I. 为 0; □—□: M. O. I. 为 10; ▲—▲: M. O. I. 为 100.

GCV 处理 48 h 可杀死 95% 以上的细胞 (图 5a). 在 LoVo 细胞中亦观察到类似的现象 (图 5b). 未感染病毒的对照细胞则对 GCV 基本不敏感.

2.6 AdCEATK 受染细胞对 GCV 有细胞专一性

CEA 启动子具有细胞专一活性, 它驱动自杀基因在 CEA 阳性的结直肠癌细胞株 LoVo 中专一表达并使 LoVo 细胞获得对原药的高度

敏感性. 装入腺病毒载体的 CEA 启动子仍具有较好的专一活性, 如图 6 所示, 感染了 Ad-CEATK 的 HeLa 细胞对 GCV 不敏感, 而同样条件下, AdCEATK 病毒的感染使 LoVo 细胞对 GCV 敏感性明显提高, 半杀伤浓度 (IC_{50}) 随病毒量的增加迅速降低, 提示利用 AdCEATK/GCV 系统可实现对 CEA 阳性结直肠细胞的专一性杀伤.

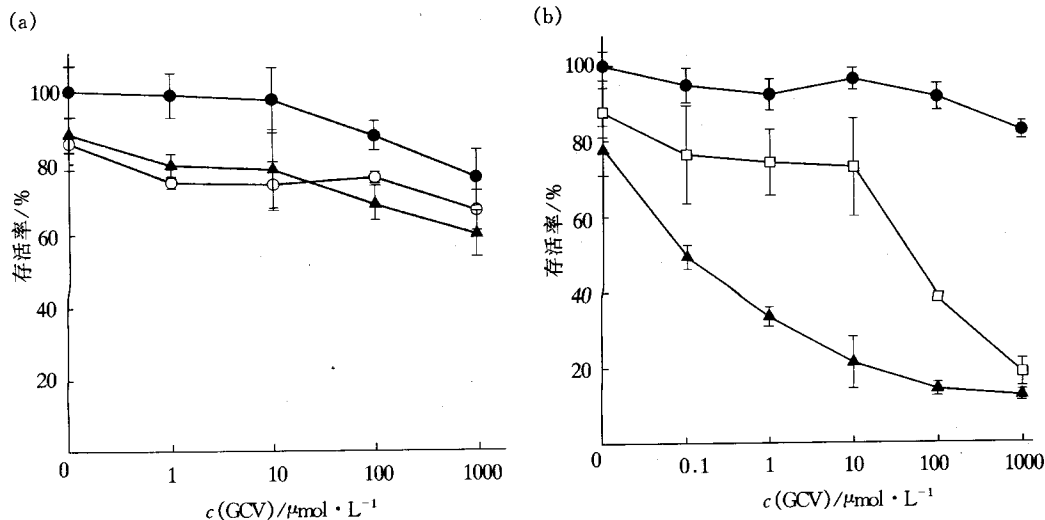


图 6 AdCEATK 受染细胞对 GCV 的敏感性

(a) HeLa/AdCEATK. ●—●: M. O. I. 为 0; ○—○: M. O. I. 为 10; ▲—▲: M. O. I. 为 100.
(b) LoVo/AdCEATK. ●—●: M. O. I. 为 0; □—□: M. O. I. 为 10; ▲—▲: M. O. I. 为 100.

2.7 AdCEATK/GCV 系统具有旁杀伤效应

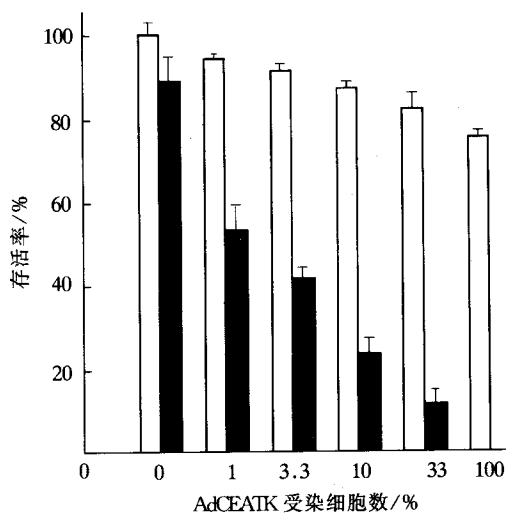


图 7 AdCEATK/GCV 系统的旁杀伤效应

□: 无 GCV; ■: 50 $\mu\text{mol/L}$ GCV.

感染了 AdCEATK 的 LoVo 细胞与野生型 LoVo 细胞按不同比例混合培养. 在 50 $\mu\text{mol/L}$ GCV 存在下, 随着感染 AdCEATK 的 LoVo 细胞所占比例逐渐升高, 细胞存活率则明显下降, 这种旁杀伤效应是十分强的, 在 Ad-CEATK-LoVo 细胞的比例仅为 3.3% 时就可见到, 细胞存活率约为 40% (图 7).

3 讨 论

HSV-TK 基因是目前研究和试验中用得较多的自杀基因. 我们用 HSV-TK/GCV 系统进行了人脑瘤、结直肠癌、肝癌及肺癌的实验性基因治疗研究^[3,5,6], 取得良好结果.

基因治疗研究主要面临两大难题, 一是转基因效率, 一是基因的受控表达. 逆转录病毒载体是目前用得最多的. 但是, 由于逆转录病

毒稳定性差,滴度低,转基因效率不高,整合入细胞基因组后可能引起宿主基因突变等原因,实际应用受到很大限制.而腺病毒载体稳定性好,滴度高,转基因效率高,宿主范围广,分裂或不分裂细胞均可被转染,不整合入宿主基因组而极少致突变危险,尤其适合于肿瘤的基因治疗^[7].因此,我们建立了高效转基因的腺病毒载体系统,腺病毒的滴度可达 1×10^{12} pfu/ml,是逆转录病毒的 10^6 倍.

我们选用结直肠肿瘤的癌胚抗原 (CEA) 启动子元件驱动 HSV-*TK* 基因成功构建了重组腺病毒 AdCEATK.以专一杀伤 CEA 阳性肿瘤.结果表明,CEA 启动子在腺病毒中仍保持较好的专一性.而且 AdCEATK/GCV 系统有明显旁杀伤作用,腺病毒高效转基因作用和 CEA 的细胞专一性作用的结合有助于实现对结直肠癌的高效、专一性自杀基因治疗.

腺病毒载体有它自身的缺点,尤其是它的免疫原性问题,加强对它的研究与应用将为基因治疗研究提供更有效、更安全的转基因系统.我们正在进行这方面的工作,在动物模型上利用本系统的实验也在进行中.

参 考 文 献

- 1 Madtrangelo M J, Berd D, Nathan F E *et al.* Gene therapy for human cancer: an essay for clinicians. *Semin Oncol*, 1996, **23** (1): 4~ 21
- 2 汤钊猷 (Tang Z Y) 主编.现代肿瘤学 (Modern oncology). 上海: 上海医科大学出版社 (Shanghai: Shanghai Medical University Press), 1993. 521~ 551
- 3 蒋 琼, 戈 凯, 许德华等 (Jiang Q, Ge K, Xu D H *et al.*). 组织专一性表达自杀基因治疗人结肠癌的研究. *生物化学与生物物理进展* (Progress in Biochemistry and Biophysics), 1996, **23** (4): 376~ 378
- 4 Graham F L, Prevec L. Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol Biotechnol*, 1995, **3** (3): 207~ 220

- 5 Ge K, Xu L F, Zheng Z C *et al.* Transduction of cytosine deaminase gene makes rat glioma cells highly sensitive to 5-fluorocytosine. *Int J Cancer*, 1997, **71** (4): 675~ 679
- 6 戈 凯, 郑仲承, 冯学胜等 (Ge K, Zheng Z C, Feng X S *et al.*). 单纯疱疹病毒胸苷激酶在肝癌基因治疗实验中的初步应用. *中华医学杂志* (Metl Med J China), 1996, **76** (3): 226~ 227
- 7 Brsmson J L, Graham F L, Gauldie J. The use of adenoviral vector for gene therapy and gene transfer *in vivo*. *Curr Opin Biotech*, 1995, **6** (5): 590~ 595

CEA Gene Element Control Suicide Gene Therapy Mediated by the Adenovirus Vector.

XU De-hua, GE Kai, JIANG Qiong, ZHENG Zhong-cheng, LIU Xin-yuan (Shanghai Institute of Biochemistry, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract A replication-defective recombinant adenovirus vector containing HSV-*TK* gene under the control of CEA promoter was constructed (AdCEATK). Titer of the purified recombinant adenovirus is about 10^{12} pfu/ml. HeLa cell (CEA-negative cell) infected with Ad-CMVTK became sensitive to GCV, while HeLa cell infected with AdCEATK was not. On the contrary, the LoVo cell infected with both Ad-CMVTK and AdCEATK were sensitive to GCV. It was shown that CEA promoter has a good tumor-specificity. Significant bystander effect was observed in the AdCEATK/GCV system too. This system should be useful for tumor-specificity suicide gene therapy of CEA-positive tumors.

Key words adenovirus vector, CEA promoter, herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-*TK*) gene, gene therapy

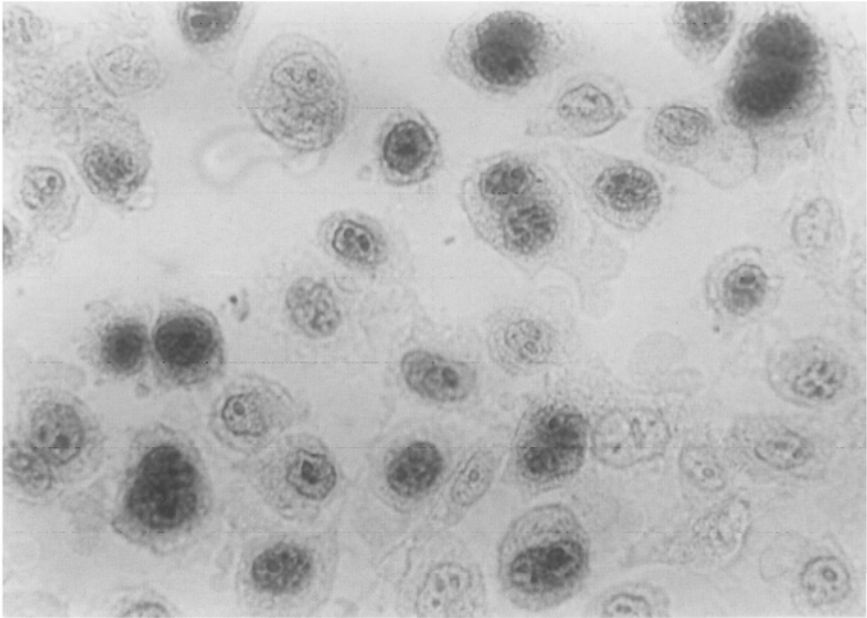


图 4 AdCMVLacZ 病毒感染 HeLa 细胞(M.O.I. = 10, × 66)

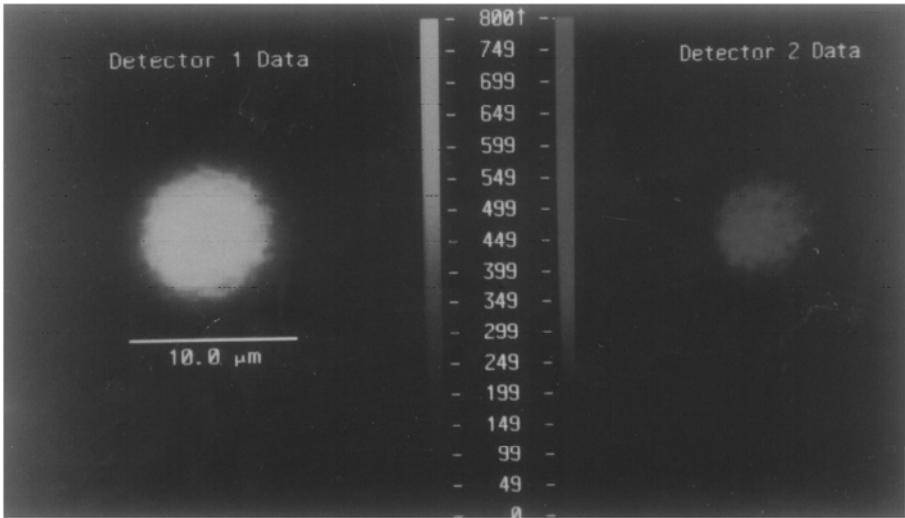


图 2 BODIPY FL-LDL、DiI-AcLDL 在单细胞内的分布