

# 重组腺病毒 Ad-CD/ TK 对人肝癌细胞的作用

王昌俊<sup>1</sup>, 李建军<sup>2</sup>, 文小敏<sup>3</sup>, 邓力<sup>1</sup>

(1. 广州市中医医院肿瘤科, 广东 广州 510130; 2. 中山大学附属第二医院中西医结合科, 广东 广州 510120; 3. 第一军医大学中医系, 广东 广州 510515)

[摘要] 目的:通过构建含 CD/TK 双自杀基因的重组腺病毒,探讨治疗肝细胞癌的途径。方法:目的基因 CD/TK,自真核载体 pCEA-CD/TK 中切出,亚克隆至腺病毒穿梭质粒中,构建成转移质粒 pAdtrack-CMV-CD/TK,经 Pme 酶切后与 pAdeasy-1 质粒混匀共转化细菌 BJ5183,挑选克隆 pAd-CD/TK,经 Pac 酶切后转染 293 细胞,PCR 鉴定后,在人肝癌细胞中测定其感染效率并观察其体外对人肝癌细胞的作用。结果:pAdtrack-CMV-CD/TK 和 pAd-CD/TK 经酶切鉴定正确,pAd-CD/TK 转染 293 细胞,制备腺病毒后,发现其对人肝癌细胞有较高的感染效率,给予氟胞嘧啶后,发现被感染细胞能够被杀死,并具有很高的旁观者效应。结论:构建的含 CD/TK 双自杀基因的重组腺病毒对人肝癌细胞有较高的感染效率,在体外观察到对人肝癌细胞有较好的杀灭作用。

[关键词] 腺病毒载体; 基因疗法; 双自杀基因; 癌,肝细胞

[中图分类号] R735.7;R349.65 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2004)01-0042-04

## Effect of recombinant adenoviruses with CD/TK fusion suicide gene on human hepatocellular carcinoma cells

WANG Chang-Jun<sup>1</sup>, LI Jian-Jun<sup>2</sup>, WEN Xiao-Min<sup>3</sup>, DENG Li<sup>1</sup>

(1. Department of Oncology, Guangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong Province 510130, China; 2. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong Province 510120, China; 3. Department of Traditional Chinese Medicine, First Military Medical University, Guangzhou, Guangdong Province 510515, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate gene-therapy for human hepatocellular carcinoma with adenovirus vectors by double suicide gene CD/TK. **Methods:** Double suicide gene CD/TK was liberated from eukaryotic vectors pCEA-CD/TK and subcloned into shuttle vectors, and the transfer plasmid pAdtrack-CMV-CD/TK was formed after linearizing with Pac 1. It was recombinated with pAdeasy-1 in bacteria BJ5183. The identified adenovirus plasmid was digested by Pac1 and was transfected into 293 cells to pack the adenoviruses. After PCR determination, its titre was measured, and the infection rate and efficacy were tested in human hepatocellular carcinoma cells. **Results:** pAdtrack-CMV-CD/TK and pAd-CD/TK were tested by endonuclease digestion. Ad-CD/TK was produced in 293 cells, and the human hepatocellular carcinoma cells (SMMC7721) infected by Ad-CD/TK were killed after 5-FC was used, and bystander effects were observed. **Conclusion:** Recombinant adenoviruses with CD/TK fusion suicide gene have a high infection rate and efficacy for human hepatocellular carcinoma cells.

**KEY WORDS** adenovirus vector; gene therapy; double suicide gene; carcinoma, hepatocellular

J Chin Integr Med, 2004, 2(1): 42-45

原发性肝癌是最为难治的恶性肿瘤之一,手术后复发和转移是治疗失败的主要原因。目前尚缺乏有效的解决手段。我们探索用中药联合双自杀基因胞嘧啶脱氨酶/单纯疱疹病毒 1 型胸腺嘧啶激酶基因(CD/TK),并以缺陷型病毒为载体治疗原发性肝癌。本实验进行重组腺病毒 Ad-CD/TK 的构建,并观察其体外对人肝癌细胞的杀灭作用。

### 1 材料与方

1.1 材料 293 细胞引自 ATCC 中心;人肝癌细胞 SMMC7721 引自上海细胞生物研究所细胞库;

BJ5183 菌株、穿梭质粒 pAdtrack-CMV 及腺病毒基因组 pAdeasy-1 由 John Hopkins 肿瘤研究中心 Bert Vogelstein 教授惠赠;含 CD/TK 双自杀基因的真核表达载体 pCEA-CD/TK 引自中山大学医学院法医学系;Pac、Pme 购于 NEB 公司;氟胞嘧啶(5-FC)、氯化铯购于 Sigma 公司;Hind 和 EcoR 为 Boehringer Mannheim 公司产品;Lipofect A-

[基金项目] 广州市卫生局科研基金资助项目(No.200221)  
[作者简介] 王昌俊(1966-),男,博士,副主任医师,现为广州中医药大学第一临床医学院博士后(510405).  
Correspondence to: Wang Chang-Jun, MD, Associate Professor. E-mail: wangchj66@hotmail.com

MINE、DMEM 培养基为 Gibco 产品;小牛血清、胎牛血清购于四季青公司。

## 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 293 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。人肝癌 SMMC7721 细胞用含 10% 小牛血清的 PR-BI1640 培养基培养。

1.2.2 转移质粒 pAdtrack-CMV-CD/TK 的构建 目的基因 CD/TK 自真核载体双酶切后,回收 2.5 kb 片段,与经同样酶切的穿梭质粒 pAdtrack-CMV 加 T4 连接酶连接后,再加入 Klenow 大片段补齐末端,加入 T4 连接酶连接后转化感受态细菌,挑选克隆,酶切鉴定后抽提质粒备用。

1.2.3 重组腺病毒质粒 pAd-CD/TK 质粒的构建及鉴定 取 0.1 μg 左右的 pAdtrack-CMV-CD/TK 质粒, Pme 酶切后与 0.1 μg 的 pAdeasy-1 质粒混匀加入化学法制作的感受态细菌 BJ5183 中混合。挑选克隆,根据琼脂糖电泳来比较质粒大小,选择合适大小的重组腺病毒质粒 DNA,经 Pac 酶切鉴定正确后,再经 PCR 鉴定后,抽提 pAd-CD/TK 质粒 DNA 备用。

1.2.4 重组腺病毒 Ad-CD/TK 的包装、扩增和纯化 重组腺病毒质粒载体 pAd-CD/TK 质粒 DNA 经酶切后采用脂质体 Lipofect AMINE 介导 293 细胞。于转染后不同时间在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)表达状况,了解腺病毒包装过程。待广泛的病毒蚀斑形成后,将 293 细胞从培养瓶刮下, -20℃ 及 37℃ 反复冻融 3 次裂解细胞,离心后将含病毒的上清液重新感染 293 细胞,大量扩增病毒。

1.2.5 PCR 对重组腺病毒 Ad-CD/TK 的鉴定 从高滴度病毒原液中提取重组腺病毒 Ad-CD/TK 基因组 DNA 作为模板,用可扩增目的基因 CD 的引物进行 PCR 反应,对腺病毒进行鉴定,扩增 CD 基因的引物。上游引物: GGAAGCTTACCAT-GTCGAATAACGCTTTAC; 下游引物: GGGG-GATCCTCCACGTTTGTAAATCGATGGC。

1.2.6 重组腺病毒 Ad-CD/TK 滴度测定 将病毒原液按不同比例稀释,取 400 μl 稀释液加至 293 细胞培养液中感染 4~6 h,更换培养液后继续培养 18~24 h,于荧光显微镜下观察计数 GFP 阳性细胞数,按下列公式计算病毒滴度:病毒滴度 = (GFP 阳性细胞数 × 病毒上清稀释倍数) / 0.4。

1.2.7 重组腺病毒感染效率测定及体外对人肝癌细胞的作用 人肝癌细胞按 2 × 10<sup>6</sup> 接种于 6 孔板,用感染强度为 0、1、10、50、100 pfu/细胞来感染人肝

癌细胞,24 h 后加入 100 μg/ml 的 5-FC,以不加前药为空白对照,观察 GFP 阳性细胞数,4 h 后台盼蓝染色,观察活细胞数目。

## 2 结果

2.1 转移质粒 pAdtrack-CMV-CD/TK 的构建 目的基因 CD/TK 自真核载体 Hind III 和 EcoR I 双酶切后,回收 2.5 kb 的片段,克隆到 pAdtrack-CMV 的多克隆位点,经酶切鉴定正确。见图 1。

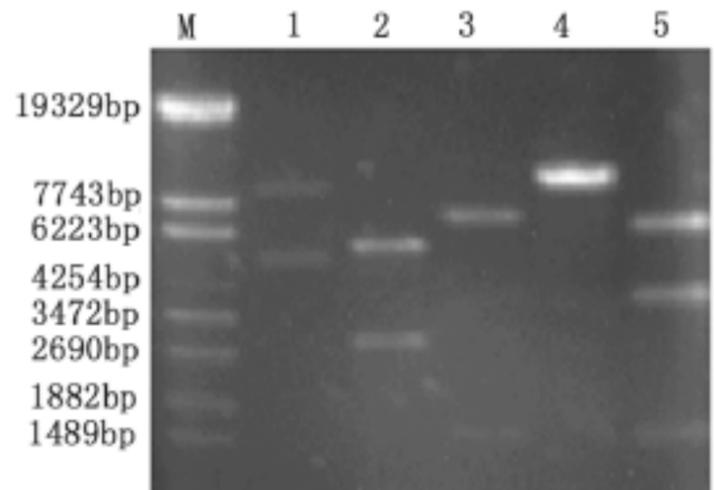


图 1 穿梭质粒 pAdtrack-CMV-CD/TK 酶切电泳图

Fig 1 Electrophoresis identification of shuttle plasmid pAdtrack-CMV-CD/TK

1: pCEA-CD/TK; 2: pCEA-CD/TK Hind III / EcoR I double digestion (including 2.5 kb fragment of aimed genes and 5.4 kb fragment of carrier); 3: pCEA-CD/TK Hind III / BamH I double digestion (including about 1.3 kb fragment of CD and 6.6 kb fragment); 4: pAdtrack-CMV-CD/TK BamH I digestion (12 kb); 5: pAdtrack-CMV-CD/TK Hind III / BamH I double digestion (6 kb, 5 kb, 1.3 kb); M: DNA marker

2.2 重组腺病毒质粒载体 pAd-CD/TK 质粒的构建和鉴定 转移质粒 pAdtrack-CMV-CD/TK 经 Pme 酶切后与 pAdeasy-1 质粒共转化细菌 BJ5183。挑选克隆,根据琼脂糖电泳来比较质粒大小,选择合适大小质粒经 Pac 酶切出 1 个约 30 kb 的大片段和 4.5 kb 片段得以鉴定,再经 CD 基因引物 PCR 鉴定。见图 2。

2.3 重组腺病毒 Ad-CD/TK 的包装、扩增和纯化 重组腺病毒质粒载体 pAd-CD/TK 经脂质体 Lipofect AMINE 介导转染 293 细胞。24 h 后一些细胞发出绿色荧光,随着时间的延长,周围的细胞也发出绿色荧光,形成集落。7~10 d 后大部分细胞都发出绿色荧光,并变圆脱落。收集病毒,反复冻融 3 次,取含病毒的上清液重新感染 293 细胞,大量扩增病毒,最后经氯化铯超速离心纯化病毒。见图 3、图 4。

2.4 重组腺病毒 Ad-CD/TK 滴度测定 根据 GFP 计数测得的腺病毒滴度为 1 × 10<sup>12</sup> pfu/L。

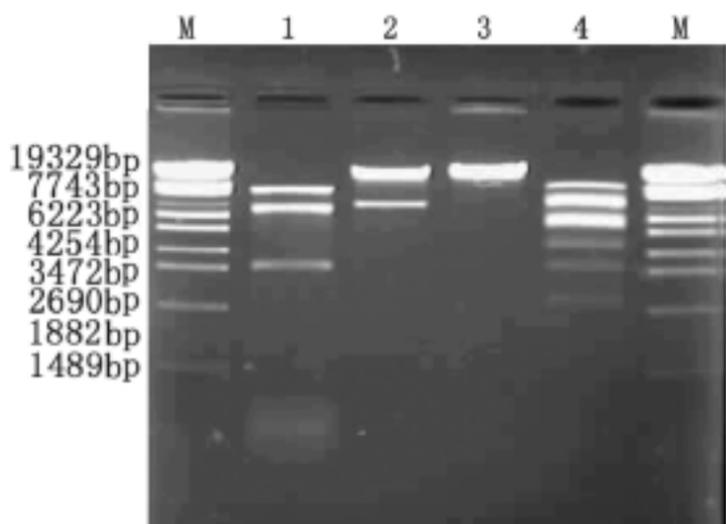


图 2 重组腺病毒质粒 pAd-CD/TK 酶切电泳图

Fig 2 Electrophoresis identification of rAd plasmid pAd-CD/TK

1: pAdtrack-CMV-CD/TK Hind / BamH double digestion (6 kb, 5 kb, 1.3 kb); 2: pAd-CD/TK Pac digestion (30 kb and 4.5 kb); 3: pAdeasy-1 Pac digestion (33 kb); 4: pAd-CD/TK Hind / BamH double digestion (including 1.3 kb fragment of CD); M: DNA marker

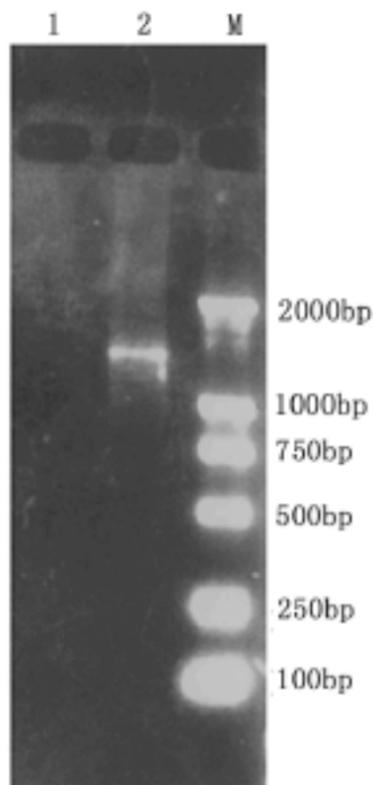


图 3 重组腺病毒质粒 Ad-CD/TK 的 PCR 鉴定图

Fig 3 PCR identification of rAd plasmid Ad-CD/TK

1: negative control; 2: rAd (1.3 kb); M: DNA marker

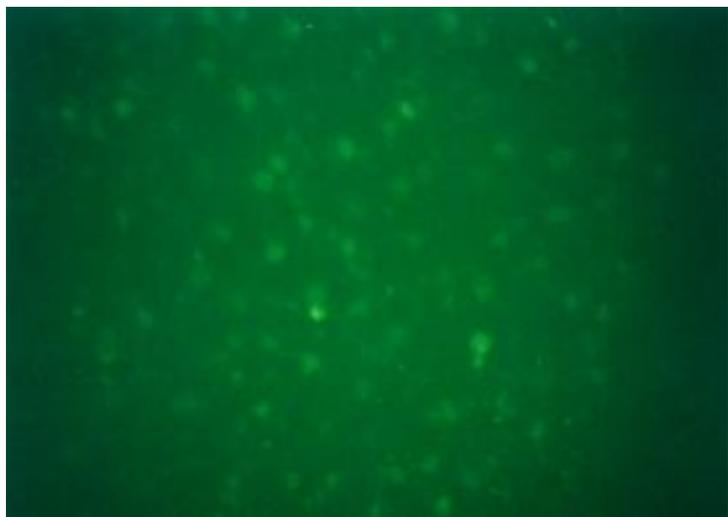


图 4 重组腺病毒 Ad-CD/TK 转染 293 细胞后的荧光相片

Fig 4 Fluorescence photo of 293 cells after Ad-CD/TK infection

2.5 重组腺病毒感染效率的测定及体外对人肝癌细胞的杀灭作用 Ad-CD/TK (感染强度为 50) 感染人肝癌 SMMC7721 细胞 24 h 后, 60% 的人肝癌细胞表达绿色荧光, 加入 5-FC (100 μg/ml), 6 h 后可见表达绿色荧光的人肝癌细胞被杀死。未加 5-FC 组及未转染加 5-FC 组细胞未见杀死。将转染 CD/TK 基因的人肝癌细胞与亲代细胞按 5:5 的比例混合培养, 不仅转染了 CD/TK 基因的细胞被杀死, 而且亲代细胞也全部被杀死。

### 3 讨论

1997 年 Freytag 等<sup>[1]</sup> 首先进行了 TK/CD 融合基因治疗脑胶质瘤的研究。体外实验产生了 3 倍的协同效应, 体内应用则治愈了 40% 的动物, 残余肿瘤的体积也大大缩小。Uckert 等<sup>[2]</sup> 采用联合转染 HSK-TK 和 CD 基因的方法治疗肿瘤, 产生全身性免疫反应, 说明 HSK-TK 和 CD 基因联合转染也能产生协同效应。利用 TK/CD 融合基因和放射治疗大肠癌可取得满意疗效。黑色素瘤、小细胞肺癌、转移性肝癌、脑胶质瘤等的研究证实双自杀基因的作用, 并发现双自杀基因对肿瘤细胞的有效杀伤作用对于激活 T 细胞免疫至关重要。双自杀基因治疗的放射增敏作用更强, CD/TK 基因治疗联合放疗可选择性地增强对脑胶质瘤的杀伤作用。许道松等<sup>[3]</sup> 构建了由 HSK-TK 和 CD 基因组成的融合基因表达载体 pCEA-CD/TK, 体外实验显示由 CEA 启动子驱动 CD/TK 基因表达可特异性杀死 CEA 阳性肿瘤细胞, 其作用比单一自杀基因更强烈, 并且产生明显的旁观者效应。在本实验中, 将转染 CD/TK 基因的人肝癌细胞与亲代细胞按 5:5 的比例混合培养, 不仅转染了 CD/TK 基因的细胞被杀死, 而且亲代细胞也全部被杀死, 显示了很强的旁观者效应。

腺病毒载体通常由转移载体和腺病毒基因组载体经同源重组产生, 转移载体较小, 可克隆入目的基因, 腺病毒基因组载体较大, 依同源重组的方式不同, 腺病毒制备方法多种多样。传统的制备方法是在 293 细胞内发生同源重组而产生病毒, 重组效率低, 包装形成病毒克隆须经多轮筛选、鉴定和纯化, 费时费力。以后有许多改进方法。He 等<sup>[4]</sup> 的方法是同源基因在细菌 BJ5183 内进行, 使同源重组效率提高, 时间缩短, 并且在病毒基因组中引入 GFP 报告基因, 方便病毒包装过程、病毒滴度及感染效率的检测。Danthinne 等<sup>[5,6]</sup> 则利用质粒非常适合克隆 36 kb 长的腺病毒基因组的特性, 而使产生病毒的速度大大提高, 但成功率不高。Graham 等<sup>[7]</sup> 最新

的方法中,同源重组仍是在 293 细胞内进行,但引入了重组蛋白 Cre-lox 体系,极大地提高了效率。

我们运用 He 等<sup>[4]</sup>的方法,3 d 左右在荧光显微镜下就能够知道病毒是否包装成功,病毒滴度的测定仅需 1 d 时间,但也有缺点,因为同源重组是随机进行的,所以克隆的挑选较费时。我们发现腺病毒对人肝癌细胞有较高感染率,感染强度为 50 的情况下可以感染 60% 的人肝癌细胞,这就为以腺病毒为载体治疗肝癌奠定了基础。

载体和基因是基因治疗的两根支柱。基因治疗成功的前提是要有一种定向载体,能特异地通过其受体与肿瘤细胞结合而感染肿瘤细胞。在完善的定向载体出现之前,需要寻找更有效的策略弥补载体转染效率不高的不足,如将几个基因构建在一个载体里转染细胞以产生协同效应。为此我们以腺病毒为载体,将 CD TK 联合转染,体外对人肝癌细胞显示出较好的杀瘤作用,且表现出很强的旁观者效应。重组腺病毒 Ad-CD TK 值得进一步研究。

[参考文献]

- 1 Freytag SO, Rogulski KR, Paielli DL, *et al* . A novel three-pronged approach to kill cancer cells selectively: concomitant viral, double suicide gene, and radiotherapy[J] .Hum Gene Ther, 1998,9(9):1323-1333 .
- 2 Uckert W, Kammertons T, Haack K, *et al* . Double suicide gene (cytosine deaminase and herpes simplex virus thymidine kinase) but not single gene transfer allows reliable elimination of tumor cells *in vivo*[J] .Hum Gene Ther,1998,9(6):855-865 .
- 3 许道松,伍新尧,钟女奇,等 . 用融合自杀基因“靶向治疗”CEA 阳性肿瘤[J] .中山医科大学学报,1998,19(1):79-80 .
- 4 He TC, Zhou S, da Costa LT, *et al* . A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J] .Proc Natl Acad Sci USA,1998,95(5):2509-2514 .
- 5 Danthinne X, Werth E . New tools for the generation of E1- and/or E3-substituted adenoviral vectors[J] .Gene Ther,2000,7(1):80-87 .
- 6 Danthinne X . New vectors for the construction of double recombinant adenoviruses[J] J Virol Methods,1999,81(1-2):11-20 .
- 7 Graham FL, Prevec L . Methods for construction of adenovirus vectors[J] .Mol Biotechnol,1995,3(3):207-220 .

[收稿日期] 2003-06-18 [本文编辑] 黄文华 周庆辉

## 第五次全国中西医结合中青年学术研讨会征文通知

培养和造就中医、中西医结合科技人才,促进优秀青年科技人员成长是关系到我国中西医结合事业长远发展的重大战略任务。为此中国中西医结合学会青年工作委员会定于 2004 年 7 月中旬在贵阳举办第五次全国中西医结合中青年学术研讨会暨青年工作委员会工作会议。会议将安排特邀报告、大会报告和专题讨论,并进行优秀论文评奖。现将会议征文有关事宜通知如下。

1 征文内容 (1)中西医结合理论研究;(2)中西医结合临床研究及进展;(3)中西医结合基础及实验研究;(4)中西医结合临床、基础研究思路与方法;(5)中药新药研究与开发;(6)其他与中西医结合相关的内容;(7)全国中西医结合临床与药学研究学术研讨会征文仍然有效,并继续征文。

2 征文要求 (1)来稿寄全文(3 000 字以内)和摘要(800~1 000 字)各 1 份。摘要应包括“目的、方法、结果、结论”四部分,如属于综述、总结报告、理论探讨等方面的文章,其摘要应将主要内容表达清楚。无摘要的论文恕不受理。(2)来稿请打印,并附软盘。如手抄,须字迹工整。稿件须加盖单位公章,并请自留底稿,会议不负责退稿。(3)来稿请注明作者姓名、单位、邮编,如属国家或省部级课题者请注明。(4)来稿请寄北京市海淀区西苑医院宋军收,邮政编码:100091。信封请注明“中青年学术会议征文”。也可发送电子邮件, E-mai: junsong86@sohu .com

3 截稿日期 2004 年 5 月 30 日(以邮戳为准)。本次会议可授予国家级继续教育学分,会议具体时间及地点另行通知。

中国中西医结合学会  
2003 年 10 月 28 日