

[文章编号] 1000-4718(2005)01-0159-04

靶向腺病毒载体介导的 EGFP 基因在甲胎蛋白阳性肝癌细胞的特异表达*

石毓君^{1,2}, 刘长安¹, 龚建平¹, 李旭宏¹, 彭勇¹, 梅英¹, 米黎², 霍艳英³¹重庆医科大学附属第二医院肝胆外科, 重庆 400010; ²重庆医科大学病理学教研室, 重庆 400016;³解放军军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

[摘要] 目的: 建立一种在甲胎蛋白(AFP)阳性的肝癌细胞中靶向表达目的基因的重组腺病毒载体。方法: 基于腺病毒载体 Adeno-X™ Expression system, 以 300 bp AFP 特异启动子替换穿梭质粒 Pshuttle 中 CMV 启动子, 将增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因作为报告基因亚克隆至 Pshuttle, HEK293 细胞包装腺病毒, 收集病毒后分别转染人正常肝脏 LO2 细胞, 人肝癌 HepG2 细胞及 HeLa 细胞; 通过 Northern 杂交检测 EGFP 基因在 3 种细胞中的转录水平, 荧光显微镜下观察 3 种细胞中绿色荧光蛋白的表达。结果: Northern 杂交显示, HepG2 细胞中有大量 EGFP 基因的转录, 而正常肝细胞 LO2 和 HeLa 细胞中仅能检测到微量基因的转录; 荧光显微镜检测发现 HepG2 细胞内有强绿色荧光表达, 而在 LO2 以及 HeLa 细胞内见极弱绿色荧光。结论: 在 AFP 特异启动子作用下, 腺病毒携带的目的基因在 AFP 阳性的肝癌细胞中得到显著转录和表达, 而在非 AFP 阳性细胞仅微量转录, 蛋白表达极弱。该腺病毒载体可作为 AFP 阳性的肝癌基因靶向治疗的适宜载体。

[关键词] 甲胎蛋白类; 启动区(遗传学); 腺病毒载体; HepG2 细胞**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

随着肿瘤基因治疗的研究进展及其在临床应用的迫切需要, 构建在肿瘤细胞特异表达目的基因的载体成为关键。重组复制缺陷型腺病毒作为极具发展前途的载体, 已经成为研究基因治疗的重要载体。我们在此构建一种在甲胎蛋白(a-fetoprotein, AFP)阳性的肝癌 HepG2 细胞特异表达目的基因的腺病毒载体。

材 料 和 方 法

1 细胞培养

肝癌细胞 HepG2 及 HeLa 细胞由重庆医科大学病理生理学教研室汤为学教授惠赠。正常肝细胞 LO2 及低传代人胚肾 HEK293 细胞购于中国科学院上海细胞生物研究所。所有细胞均培养于含 10% 胎牛血清(Hyclone, 美国)的 DMEM 培养基, 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度中。约 3 d 传代 1 次。

2 PCR 扩增人 AFP 启动子

人 AFP 启动子序列用 PCR 从人基因组中扩增, 上游引物为 5' GCGCTAGCATTCTGTAGTTTGAGGAG, 下游引物为 5' ATCGGCCCATTTGGCAGTGGTGGAA, 分

别于上下游引物中引入 *Nhe* I 和 *Apa* I 酶切位点。

3 重组腺病毒的制备及转染细胞

腺病毒载体 Adeno-X™ Expression system(Clontech, 美国)穿梭质粒 Pshuttle 的 CMV 启动子位于 744-921 位点, 以 PCR 扩增其 99-744 区间, 其间在 256 处为 *Mlu* I 位点, 同时在下流引物中引入 *Nhe* I 酶切位点。然后以 *Mlu* I 和 *Nhe* I(921 位点)对该片段和 Pshuttle 进行双酶切, 这样酶切产物经连接后, Pshuttle 中 256-921 区间即被 256-744 区间代替, 即去除了 CMV 启动子, 见图 1。AFP 启动子 PCR 产物经 *Nhe* I 和 *Apa* I 酶切后接入去除了 CMV 的 Pshuttle, 即在原 CMV 启动子部位插入了 AFP 启动子, 命名为 P^{AFP}。

以 pEGFP-C1(Clontech, 美国)作为模板, PCR 扩增增强型绿色荧光蛋白基因(enhanced green fluorescent protein, EGFP), 引物为上游 5' AAGGGCCCTT-TAGTGAACCGTCAGAT; 下游 5' GCCITTAAGTTATCTA-GATCCGGTGGAT。分别在上下游引物中引入 *Apa* I 及 *Afl* II 位点。P^{AFP}与 PCR 产物以上述两酶进行双酶切, T4 连接酶连接, EGFP 基因即被亚克隆至 P^{AFP}, 构建为质粒 P^{AFP-G}。

进而 P^{AFP-G}以 *PI*-*Sce* I/*I*-*Ceu* I 双酶切后与 Adeno-X™基因组连接, 重组质粒在感受态大肠杆菌 *E. coli* DH5α 中扩增。以上所有 PCR 产物及重组结果均经酶切或测序证实。

[收稿日期] 2003-06-24 [修回日期] 2003-09-17

* [基金项目] 重庆市卫生局科研基金重点资助项目[2001]01-1-018

Tel: 023-63848842; E-mail: shiyujun 1128@hotmail.com

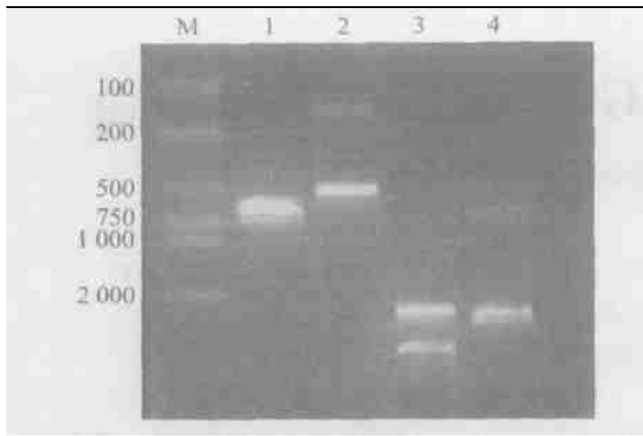


Fig 1 Pshuttle and PCR product double-digested with *Mlu* I/*Nhe* I.

M: marker (DGL2000); 1: the PCR product of 99-744 region of the Pshuttle; 2: the product of PCR double-digested with *Mlu* I/*Nhe* I; 3: Pshuttle; 4: Pshuttle double-digested with *Mlu* I/*Nhe* I, a 670 segment was released from Pshuttle.

图 1 Pshuttle 和 Pshuttle 99-744 区间 PCR 产物经 *Mlu* I/*Nhe* I 双酶切结果

以内切酶 Pac I 使重组质粒线性化。脂质体法 (Lipofectamin™ reagent, Invitrogen, 美国) 转染 HEK293 细胞。收获病毒。病毒滴度按照试剂盒说明用终点稀释法 (end-point dilution assay) 测定, 为 1×10^{10} pfu/L。

转染靶细胞前先将细胞培养于 6 孔培养板, 24 h 后吸尽培养液, 以感染指数 (multiplicity of infection, MOI) 100 pfu/细胞浓度滴入病毒, 培养 4 h 后加入完全培养基, 再常规培养 24 h 后进行相关指标检测。

4 EGFP 基因、蛋白表达分析

在激发波长 488 nm、发射波长 507 nm 的荧光显微镜 (Nikon-TE300) 下观察细胞内绿色荧光表达。收集细胞, 提取总 RNA, 进行 Northern 印迹反应。以 Bio-Image Analysis System (Bio-Rad Doc Gel 2000, USA) 软件对 Northern 结果半定量分析。

结 果

1 从人基因组克隆的 AFP 启动子

PCR 产物电泳结果见图 2。序列如下:

```
gcgctagcat tctgtagttt gaggagaata ttgttatat ttgcaaaata aaataagttt
Nhe I- 229
gcaagttttt ttitttdgcc ccaaagagct ctgtgtcctt gaacataaaa tacaataaac
GRE
cgctctgctg ttaattattg gcaaatgtcc cattttcaac ctaaggaaat accataaagt aacat
HNF- 1
gatata ccaacaaaag gttactagtt aacaggcatt gctgaaaag ag[tata] aaag
HNF- 1
aatfcagca tgattttcca tattgtgttc caccactgcc aatgggcccct
+ 25 Apa I
```

斜体部分为 AFP 启动子-229 至+25 区间; GRE: glucocorticoid

response element; HNF-1 hepatocyte nuclear factor 1; [tata]: TATA Box。

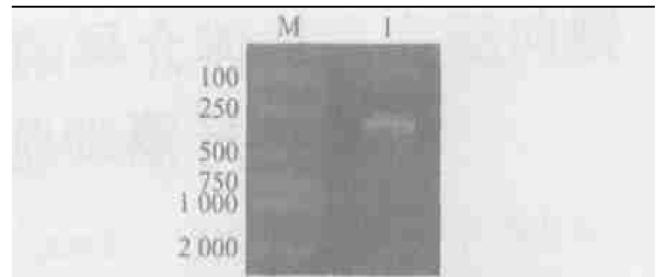


Fig 2 The human 300 bp AFP promoter.

M: DNA marker (DGL2000); 1: the 300 bp AFP promoter.

图 2 PCR 扩增人 AFP 启动子, 约 300 bp

2 EGFP 基因、蛋白在各种细胞的表达

Northern 印迹杂交结果如图 3A 所示, EGFP 基因的转录水平在 HepG2 细胞、LO2 及 HeLa 中存在明显差异。半定量分析显示, 若以 EGFP 基因在 HepG2 细胞内的转录水平为 1, 在 LO2 和 HeLa 细胞中分别仅约为 HepG2 细胞中的 38% 和 17%, 见图 3B。荧光显微镜下见 HepG2 细胞胞浆、胞核均有较强绿色荧光蛋白表达, 阳性表达细胞密集。而在 LO2 细胞仅有极弱的可见荧光, 且阳性细胞数稀少, 见图 4A 和 4B。在 HeLa 细胞中则几乎无可见荧光。

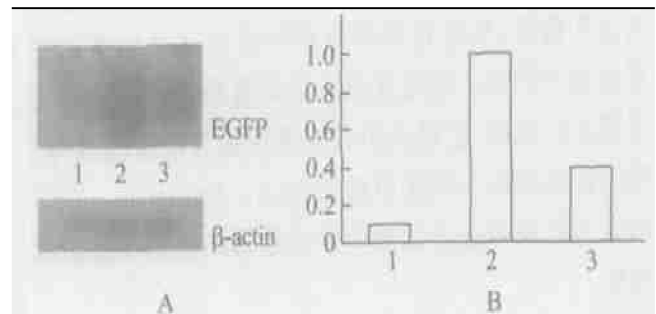


Fig 3 Northern blotting shows the different transcription levels of EGFP gene in three cell lines.

A: the hybridization outcome; B: the semi-quantitative analysis of the different transcription level of EGFP gene in three cell lines. 1: HeLa cells; 2: HepG2 cells; 3: LO2 cells.

图 3 Northern 杂交显示 EGFP 基因在各细胞内的转录水平

讨 论

肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 在全世界范围内为最常见的恶性疾病之一, 目前所有的治疗方法预后均不甚理想^[1,2], 基因治疗可能是较有希望的一种方法。基因治疗中面临着的关键问题是如何使目的基因仅仅在特殊组织或细胞类型中得到

表达。组织特异性启动子在研究基因功能及基因治疗方面具有较大的运用价值^[3,4],可使细胞毒性或其他治疗性基因特异地在靶细胞内表达。在大多数

HCC, AFP 获得重新表达,因此,可以运用 AFP 启动子作为 HCC 特异基因治疗的工具^[5,6]。

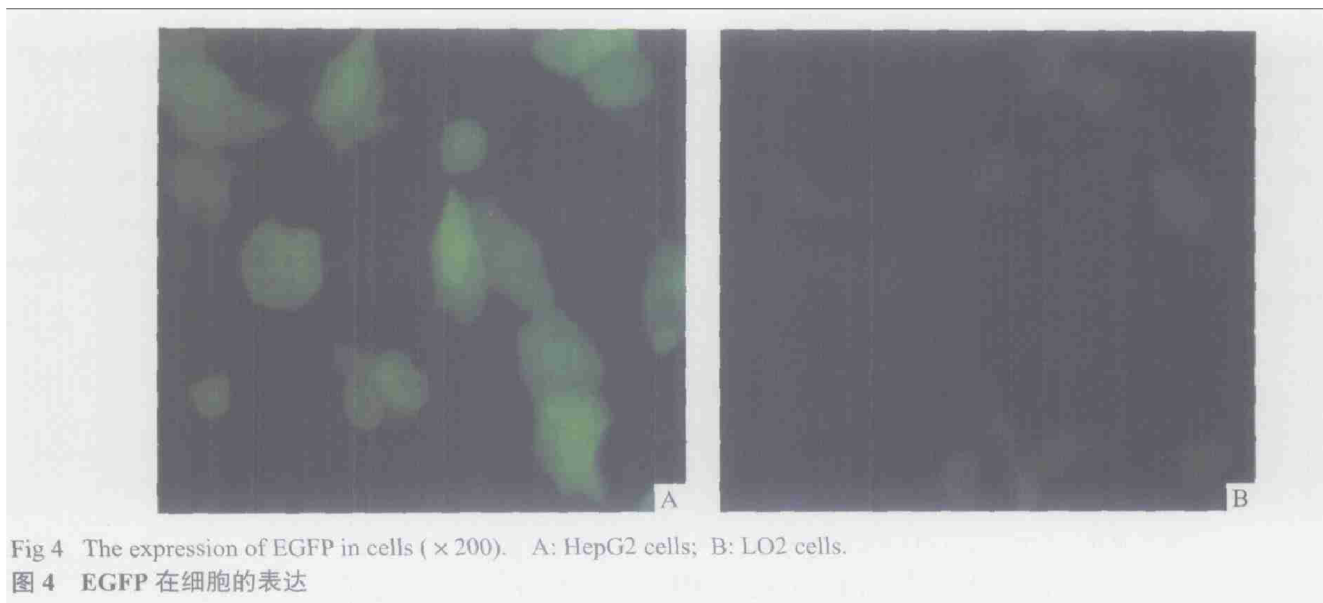


Fig 4 The expression of EGFP in cells (×200). A: HepG2 cells; B: LO2 cells.

图4 EGFP 在细胞的表达

选择性在肿瘤细胞内表达目的基因的重组缺陷型腺病毒可能是肿瘤基因治疗的有效载体^[7]。这里,我们构建了一个仅仅在 AFP 阳性的 HCC 中特异复制表达目的基因的腺病毒载体,以期达到肝癌基因治疗的靶向性。AFP 调控序列全长为 5.1 kb^[8],以往的研究认为,临近转录起始点处约 300 bp 长度的序列即可达到启动下游基因转录的作用。该序列含有一个糖皮质激素反应元件(GRE)、两个肝细胞核因子(HNF-1)结合位点,并具有一个 TATA 盒子,没有通常的 CCAAT 顺序^[9]。

本实验中,我们用 PCR 的办法从人基因组中扩增了 300 bp 大小的 AFP 启动子序列,以替换 Pshuttle 中的 CMV 启动子。EGFP 基因作为目的基因被插入到了 AFP 启动子下游。携 AFP 启动子和 EGFP 基因的腺病毒载体分别转染 AFP 阳性的 HepG2 细胞、AFP 阴性的 LO2 细胞和 HeLa 细胞, Northern blotting 结果显示 EGFP 基因可在 HepG2 细胞得到明显的转录,而在其余两种细胞内,转录水平很低;同样,荧光显微镜下也证实 HepG2 细胞内绿色荧光的表达较强,而在其他两种细胞内表达极微弱。

Bilbao 等^[10]认为该 300 bp 大小的启动子活性有限,并不能很好地达到启动下游基因转录的作用。许多作者将各种增强子序列插入到该启动子上游以提高其转录活性^[11,12]。在本实验中,我们保留了 Pshuttle 原来的增强子,在一定程度上可能有助于提高启动子活性。实验结果也显示了该 300 bp 启动子

可满意地达到启动下游基因转录的作用。正常肝细胞也有微量 AFP 分泌,EGFP 基因在 LO2 细胞内仍然存在较低水平的转录和翻译,尽管远远较在 AFP 阳性的 HepG2 细胞中的水平低,但这在一定程度上对其靶向性有所影响,需要进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Di Maio M, De Maio E, Perrone F, et al. Hepatocellular carcinoma: systemic treatments[J]. J Clin Gastroenterol, 2002, 35(5 Suppl 2): S109- S114.
- [2] Lin DY, Lin SM, Liaw YF. Non- surgical treatment of hepatocellular carcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1997, 12(9- 10): S319- S328.
- [3] Igarashi T, Suzuki S, Takahashi M, et al. A novel strategy of cell targeting based on tissue- specific expression of the ecotropic retrovirus receptor gene[J]. Hum Gene Ther, 1998, 9(18): 2691- 2698.
- [4] Dachs GU, Dougherty GJ, Stratford IJ, et al. Targeting gene therapy to cancer: a review[J]. Oncol Res, 1997, 9(6- 7): 313- 325.
- [5] Hanke P, Serwe M, Dombrowski F, et al. DNA vaccination with AFP- encoding plasmid DNA prevents growth of subcutaneous AFP- expressing tumors and does not interfere with liver regeneration in mice[J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9(4): 346- 355.
- [6] Johnson PJ. Role of alpha- fetoprotein in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1999, 14(Suppl): S32- S36.

- [7] Kaneko S, Hallenbeck P, Kotani T, et al. Adenovirus- mediated gene therapy of hepatocellular carcinoma using cancer- specific gene expression[J] . *Cancer Res*, 1995, 55(22) : 5283 - 5287.
- [8] Kaneko S, Tamaoki T. Gene therapy vectors harboring AFP regulatory sequences. Preparation of an adenoviral vector[J] . *Mol Biotechnol*, 2001, 19(3) : 323- 330.
- [9] 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.
- [10] Bilbao R, Gerolami 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] Cao G, Kuriyama S, Tsujinoue H, et al. A novel approach for inducing enhanced and selective transgene expression in hepatocellular- carcinoma cells[J] . *Int J Cancer*, 2000, 87 (2) : 247- 252.
- [12] Ido A, Uto H, Moriuchi A, et al. Gene therapy targeting for hepatocellular carcinoma: selective and enhanced suicide gene expression regulated by a hypoxia- inducible enhancer linked to a human alpha- fetoprotein promoter[J] . *Cancer Res*, 2001, 61(7) : 3016- 3021.

Construction of recombinant adenovirus vector expressing EGFP gene specifically in AFP producing liver cancer cells

SHI Yu- jun^{1,2}, LIU Chang- an¹, GONG Jian- ping¹, LI Xu- hong¹,
PENG Yong¹, MEI Ying¹, MI Can², HUO Yan- ying³

(¹Department of Hepato- biliary Surgery, The Second Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China; ²Department of Pathology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China; ³The Institute for Radiology, The Military Academy of Medical Science, Beijing 100850, China)

[**ABSTRACT**] **AIM:** To construct a recombinant adenovirus vector carrying AFP promoter to specifically express a targeting gene in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **METHODS:** Based on the Adeno- XTM Expression system, the CMV promoter was replaced by a 300 bp a- fetoprotein promoter. The EGFP(enhanced green fluorescent protein) gene as a report gene was inserted to the multiple- cloning site(MCS). The normal liver LO2 cells, hepatocellular carcinoma HepG2 cells and HeLa cells were infected by the recombinant adenovirus, respectively. Northern blotting and fluorescence microscope were used to detect the transcription level of EGFP gene and its protein expression, respectively. **RESULTS:** Northern blotting showed that the target gene was markedly transcribed in HepG2 cells, but slightly in LO2 and HeLa cells. Under the fluorescence microscope, strong EGFP expression was seen in HepG2 cells but very weakly in HeLa and LO2 cells. **CONCLUSION:** Under the control of the 300 bp human AFP promoter, the target gene carried by the recombinant adenovirus was expressed in the AFP- producing HepG2 cells at a very high level, but not or very weakly in AFP negative cells. This adenovirus system can be used as a new, potent and specific approach for the gene- targeting therapy for the AFP producing primary hepatoma.

[**KEY WORDS**] Alpha- fetoproteins; Promoter regions(genetics); Adenovirus vector; HepG2 cells