

KDR 启动子介导 CD/TK 双自杀基因重组腺病毒的高效构建

苏国强¹, 黄宗海¹, 俞金龙¹, 厉周¹, 范应方¹, 宋慧娟¹, 张进华²

关键词: 肿瘤; 自杀基因; 腺病毒载体
中图分类号: R73-36 文献标识码: B
文章编号: 1000-8578(2005)10-0667-01

0 引言

新近以肿瘤血管为靶点的基因治疗逐渐成为肿瘤治疗的热点,其缘由为破坏供养肿瘤的毛细血管可导致其灌注区大量肿瘤细胞缺血坏死。研究表明:血管内皮细胞生长因子受体(KDR)高表达于肿瘤血管内皮细胞,而在正常组织内不表达,故KDR可作为肿瘤治疗的理想靶点。本研究从肿瘤的血管治疗出发,探讨KDR启动子驱动的双自杀基因腺病毒载体的高效构建方法,为肿瘤基因治疗的进一步深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

穿梭质粒 pAtrack 由 Belt Vogelstein 博士惠赠;质粒 pREP8-TK 由 Jay Kolls 博士惠赠; AdEasy-1 由全军休克微循环重点实验室提供; pMD18-K 载体购自大连宝生物公司; pcDNA3、JM109 细菌由第一军医大学细胞生物教研室提供, 293 细胞及 ECV304 细胞引自美国 ATCC 全球生物资源中心; 转染试剂 Polyfect 为 QIA GEN 公司提供。

1.2 方法

1.2.1 转移质粒 pcDNA3-CDglyTK 的构建 分别以 Genbank X89776、Genbank S56903、Genbank V00470 中 KDR 启动子、CD 及 TK 序列设计引物,并在加入相应酶切位点。分别以正常人外周血基因组 DNA、JM109 细菌基因组及 pREP8-TK 为模板,扩增出 KDR 启动子、CD 及 TK 基因片段。参照 Rogulski

等^[1]介绍的方法,将所扩增的 CD 及 TK 片段亚克隆入 pcDNA3 载体构建质粒 pcDNA3-CDglyTK。构成 pMD-18 KDR 质粒。再将 KDR 片段,经与相同酶切的 pcDNA3-CDglyTK 连接构成 pcDNA3-KDR-CDglyTK,将 KDR-CDglyTK 片段,酶切后与连接 pAtrack 质粒连接构成 pAtrack-KDR-CDglyTK 质粒,将其转化 DH5 菌。每步均酶切鉴定。

1.2.2 pAdEasy-KDR-CDglyTK 的构建 抽提 DH5 菌中转移质粒 pAtrack-KDR-CDglyTK,以 *Pme* 线性化后,直接转化鉴定正确的 AdEasy-1 感受态,扩增后抽体质粒,选择与 AdEasy-1 大小相近的重组体以 *Pac* 酶切鉴定。

1.2.3 重组腺病毒的包装、扩增、纯化、滴度测定及鉴定 参照文献^[2],所得病毒命名为 Ad-KDR-CDglyTK。以重组腺病毒 DNA 为模板,PCR 扩增鉴定 CDglyTK 融合基因及 KDR 启动子。

1.2.4 重组腺病毒的体外表达 取对数生长期的 ECV304 细胞,以 MOI=50 的 AdEasy-KDR-CDglyTK 感染之,72 小时后提取细胞总 RNA,行 RT-PCR 鉴定 CDglyTK 的表达。

2 结果

2.1 目的基因、转移质粒及重组腺病毒载体的鉴定

所得 KDR 启动子、CD 及 TK 序列均与预期大小一致,分别为 580bp、1.3kb1 及 1kb; 测序无误; 转移质粒

pAtrack-KDR-CDglyTK 酶切出 2.4kb CDglyTK 片段;重组腺病毒质粒 pAdEasy-KDR-CDglyTK 被 *Pac* 酶切出 4.5kb 的特征性片段。

2.2 重组腺病毒的包装与鉴定

以 pAdEasy-KDR-CDglyTK 转染 293 细胞,24h 后通过荧光显微镜即可见 GFP 荧光表达,3~5d 表达达到高峰。所得病毒纯化后滴度达 2×10^{12} pfu/mL。PCR 扩增出的 CDglyTK 及 KDR 启动子片段分别为 2.4kb 和 580bp,与预期一致。

2.3 重组腺病毒介导目的基因的体外表达

RT-PCR 结果提示:重组腺病毒能在 ECV304 细胞中表达目的基因。

3 讨论

肿瘤基因治疗的关键主要有:选择合适目的基因及高效载体表达系统。目前 CD、TK 基因联合治疗的优势已有诸多报道。腺病毒载体介导的基因转移系统效率高、感染细胞谱广、病毒滴度高、易于浓缩和贮存等特点已使其成为较常用的选择目标^[3]。恶性肿瘤的生物学特性,使以肿瘤细胞为靶点的自杀基因治疗受到不同程度地局限,为适应多种肿瘤的治疗,自 Folkman 提出肿瘤的生长具有血管形成依赖以来,学者们将治疗靶点转移到肿瘤血管上,对实体瘤的血管形成及其相关微循环的研究及抗肿瘤血管生成已成为当今肿瘤研究的热点之一^[4,5]。本研究即从上述影响肿瘤基因治疗的诸多因素着手,构建了血管内皮细胞生长因子受体 KDR 启动子介导的 CD/TK 融合基因腺病毒重组体, KDR 靶向表达于肿瘤新生血管及大部分实体瘤组织,故而避免了诸如 CEA、AFP 等启动子的局限性,又摒弃了 CMV、SV40 等启动子作用的广泛毒性,其作用在于既靶向破坏肿瘤新生血管,使其灌注区瘤组织缺血坏死,又靶向作用于大部分实体肿瘤细胞,因而放大了基因治疗的效果,且避免了肿瘤耐受以及对正常组织的毒副作用。

自 Chartier 等提出细菌内同源重组法构建腺病毒载体以来,该方法已作了一些改进,但仍不尽人意。为了提高效率和进一步简化实验步骤,本实验对 (下转第 669 页)

收稿日期:2004-11-01;修回日期:2005-04-08
基金项目:广东省自然科学基金资助项目(013072);国家 863 计划项目(2001AA217171)
作者单位:1. 510282 广州,南方医科大学珠江医院普外科;2. 南方医科大学病理生理教研室

PET 判断鼻咽癌放疗后鼻咽病灶残留的临床价值[J]. 癌症, 2002, 21(6): 651-653.

[5] Chaiken L, Rege SD, Hob CK, et al. Positron emission tomography with fluorodeoxyglucose to evaluate tumor response and control after radiation therapy [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1993, 27(2): 455-464.

[6] Rege SD, Chaiken L, Hob CK, et al. Change induced by radiation therapy in FDG uptake in normal and malignant structures of the head and evaluation with PET [J]. Radiology, 1993, 189(5): 807-812.

[7] 刘丽娟, 吴金陵, 仇道, 等. CT 与 MRI 诊断鼻咽癌的临床应用价值对比分析[J]. 中国医学影像技术, 2002, 18(2): 126-127.

[8] 杜欣, 李群华, 翁建宇, 等. ¹⁸F-FDG PET 技术在恶性淋巴瘤诊治中的临床研究[J]. 肿瘤防治研究, 2004, 31(6): 365-366.

[9] 赵军, 林祥通, 刘永昌, 等. ¹⁸氟-脱氧葡萄糖 PET 全身显像在探索肿瘤原发灶中的应用[J]. 上海医学, 2000, 23(9): 518-521.

[10] Kole AC, Nieweg OE, Pruijm J, et al. Detection of unknown occult primary tumor using positron emission tomography [J]. Cancer, 1998, 82(10): 1160-1166.

[编辑: 刘红武]

(上接第 667 页)

AdEasy 系统进行了如下改进: (1) 先将 AdEasy-1 质粒转化入 BJ5183 菌, 用氯化钙法制备感受态, 并分成小部分 -70 保存。(2) *Pme* 酶线性化的转移质粒直接转化 AdEasier-1 细菌, 不需要分离纯化。(3) 可直接根据琼脂糖电泳初定性重组质粒, 与 AdEasy-1 质粒大小相近者即为阳性重组体。因此改进后的 AdEasy 系统, 仅用简便的氯化钙法转化即可使获得重组体阳性的效率大大提高, 有报道成功率在 60% ~ 90%, 本实验随机调取 4 个小克隆, 均为阳性克隆。出现如此高的重组率可能与 BJ5183 菌中 AdEasier-1 “质粒池”有关^[2], 因为 AdEasy-1 如此大的质粒在操作过程中, 极易断裂、开环导致其与细菌复制体系连接率降低, 如此少量拷贝的 AdEasy-1 质粒与转移质粒的重组效率必然难以提高。改进后的 AdEasy 体系事先在 BJ5183 内形成比较大的“质粒

池”, 因此与线性化的转移质粒细菌内同源重组的效率大大提高。

本实验将制备的重组腺病毒行 PCR 鉴定, 表明重组体内含有 KDR 及 CDglyTK 片段; 再将其体外感染 ECV304 细胞, 荧光显微镜下可见 GFP 绿色荧光表达, 3d 后, 行 RT-PCR 扩增出目的基因 CDglyTK, 证实其 mRNA 水平的表达。

综上所述, 改进的“两步法”细菌内同源重组制备重组腺病毒简便、快捷、成功率高。文献查新表明, 我们首次构建了 KDR 启动子介导的双自杀基因重组腺病毒, 为以肿瘤血管为靶向的基因治疗提供了有价值的手段。

参考文献:

[1] Rogulski KR, Kim JH, Kim SH, et al. Glioma cells transduced with an Escherichia coli CD/HSV-1 TK fusion gene exhibit enhanced metabolic suicide and

radiosensitivity [J]. Hum Gene Ther, 1997, 8(1): 73-85.

[2] 陈平, 陈志琳, 徐立春, 等. 5-FC/CD 自杀基因疗法结合热休克蛋白-多肽复合物瘤苗治疗小鼠黑色素瘤的研究[J]. 肿瘤防治研究, 2001, 28(3): 164-166.

[3] 施明, 王福生, 刘明旭, 等. 重组腺病毒介导的人野生型 p53、GM-CSF 和 B71 基因在肝癌细胞中的表达[J]. 肿瘤防治研究, 2002, 9(2): 123-125.

[4] Stevens A, Soden J, Brenchley PE, et al. Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter [J]. Cancer Res, 2003, 63(4): 812-816.

[5] Tsai PW, Shiah SG, Lin MT, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor C in breast cancer cells by heregulin-beta 1. A critical role of p38/nuclear factor-kappa B signaling pathway [J]. J Biol Chem, 2003, 278(8): 5750-5759.

[编辑: 刘红武]