

重组腺病毒驱动KDR-CDglyTK融合基因系统对MCF-7细胞及血管内皮细胞的靶向杀伤作用

乳腺癌是威胁女性健康的主要恶性肿瘤之一，其发病率呈逐年上升趋势，且发病年龄逐渐下降[1]，传统的治疗方法有其自身的局限性，因此，乳腺癌的基因治疗逐渐成为近几年研究热点，其中自杀基因治疗即是一颇具临床应用潜力的治疗策略。同时针对肿瘤细胞及肿瘤血管的联合基因治疗，既克服了肿瘤细胞耐药性又放大了基因治疗的效果。文献报道[2][3]血管内皮生长因子受体(kinase domain-containing receptor, KDR)特异地高表达于肿瘤新生血管内皮细胞及部分恶性程度较高的实体瘤细胞，本研究即探讨KDR启动子介导的CD、TK融合双自杀基因对表达KDR的乳腺癌细胞系MCF-7的体外抑制作用，并结合其对血管内皮细胞系ECV304的杀伤作用，阐述其在乳腺肿瘤治疗中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

质粒pAdEasy-KDR-CDglyTK为珠江医院普外科构建[4]，293细胞引自美国ATCC全球生物资源中心，MCF-7细胞引自中山大学细胞库，ECV304细胞由全军休克微循环重点实验室提供，LS174T来源于中科院上海细胞库。DMEM、1640、小牛血清为Gibco公司产品；转染试剂PolyFect购自QIAGEN公司；GCV为Roche Pharma(Switzerland)公司产品，5-FC购于Sigma公司；KDR启动子、CD及TK基因引物合成以及DNA测序由上海申友生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒的制备

1.2.1.1 重组腺病毒的包装、扩增与纯化 鉴定正确的重组腺病毒质粒pAdEasy-KDR-CDglyTK经Pac I酶切后用PolyFect Reagent介导转染293细胞，于转染后不同时期在荧光显微镜下观察细胞GFP的表达状况，待有较明显的病毒克隆斑或蚀斑形成后，将293细胞自培养瓶中刮下， $-70\text{ }^{\circ}\text{C}/+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融3次裂解细胞。10 000 r/min离心后取含病毒上清液，重新感染293细胞大量扩增之，3 d后收集细胞，PBS重悬，反复冻融3次。为得到滴度更高的腺病毒，重复“感染-收集-冻融”3次，最后以CsCl密度梯度离心法进行病毒的纯化。所得病毒命名为Ad-KDR-CDglyTK。

1.2.1.2 重组腺病毒滴度测定 将浓缩后的病毒储存液作不同比例的稀释。取400 μl 稀释液加至293细胞培养瓶中，于37 $^{\circ}\text{C}$ 吸附30 min，更换新鲜培养基继续培养24 h，于荧光显微镜下计数绿色荧光蛋白(GFP)阳性细胞数(同一视野将荧光与可见光切换，即可方便地计数阳性细胞)，按以下公式计算病毒滴度：病毒滴度(pfu/ml)=GFP阳性细胞数 \times 病毒上清稀释倍数/0.4 ml [5]。

1.2.1.3 重组腺病毒的鉴定 通过PCR方法，以病毒基因组DNA为模板，应用CD基因的上游引物和TK基因的下游引物扩增CDglyTK融合基因；以KDR启动子的上下游引物进行PCR反应，鉴定KDR启动子。

1.2.2 重组腺病毒对MCF-7、ECV304和LS174T细胞感染率的测定 MCF-7细胞以含10%小牛血清的1640培养，ECV304细胞及LS174T细胞以含10%胎牛血清的DMEM培养。取对数生长期的上述细胞，以 2×10^5 个细胞数接种于6孔培养板，待细胞丰度达约90%，加入不同感染复数(multiplicity of infection, MOI)的目的腺病毒，加少许培养基振荡2~3 h后，补足培养基继续在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱内培养，3 d后在荧光显微镜下计数GFP阳性细胞百分比。

1.2.3 不同浓度的前药对细胞的杀伤效应 将MCF-7、ECV304和LS174T细胞以 1×10^4 个细胞/孔接种于96孔培养板中，次日丰度达约80%，用100MOI的重组腺病毒感染之，培养24 h后弃去培养液，分别加入以5%血清培养基稀释的不同浓度的前药GCV和5-FC，设GCV组、5-FC组、GCV+5-FC组、阴性对照及空白对照组，加药72 h后加入四甲基偶

氮唑盐(MTT), 4 h后弃去MTT液, 用酶联免疫检测仪在570 nm波长下测定吸光度值(D值)。计算方法为: 细胞生长抑制率=[1-(实验组D值/阴性对照组D值)]×100%。

1.2.4 旁观者效应(bystander effect, BSE) 分别取对数生长期的转基因和未转基因细胞, 以不同比例进行混合, 以 1×10^4 个细胞/孔接种于96孔培养板中, 24~48 h后, 于不同组分别加入GCV、5-FC以及二者的混合液, GCV浓度为100 mg/L, 5-FC浓度为2.0 g/L, 联合组前药浓度同上。72 h以后以MTT法检测细胞存活率(同上)。

1.2.5 前药对MCF-7细胞周期的影响 将转基因MCF-7细胞在培养瓶中培养至对数生长期, 以每孔 5×10^5 个细胞接种于24孔培养板中, 设未加药对照组和治疗组, 加药24 h后收集细胞。PBS洗2次, 加冷无水乙醇至终浓度为70%, 4 °C固定过夜, 离心去乙醇, PBS洗2次; 加入RNase 200 μ l (1 g/L), 37 °C 1 h, 离心去RNase; 加入碘化丙啶(PI) 800 μ l, 染色30 min; 流式细胞仪(Counter公司)检测。

1.3 统计学处理

应用SPSS10.0软件进行数据处理, 采用配对样本t检验和单向方差分析(组间多重比较应用LSD法)。

2 结果

2.1 重组腺病毒的包装、扩增、纯化以及滴度测定

重组腺病毒质粒经Pac I酶切后用PolyFect转染试剂转染293细胞, 24 h后可见GFP表达, 3~5 d表达到高峰, 7~10 d可收集细胞, 反复扩增后CsCl密度梯度离心后所得重组腺病毒滴度为 2×10^{12} pfu/ml。重组腺病毒的PCR鉴定扩增出目的片段(图1)。

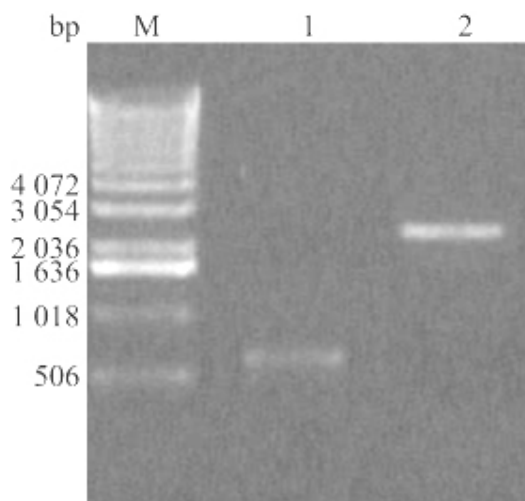


图1 PCR鉴定重组腺病毒电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified CDglyTK and KDR promoter gene from adenovirus DNA

M: 1 kb DNA marker; Lane 1: PCR product of CDglyTK gene in recombinant adenovirus DNA; Lane 2: PCR product of KDR promoter from recombinant adenovirus DNA

2.2 重组腺病毒的感染效率

采用不同MOI的重组腺病毒分别感染MCF-7、ECV304及LS174T细胞, 96 h后观察发现: 细胞的感染率随腺病毒滴度的增加而递增, 当MOI=1时, 仅少数细胞有荧光; 当MOI=100时, 95%以上的GFP表达; MOI=200时, 几乎所有的细胞均被感染, 重组腺病毒对3种细胞具有相似的感染效率(图2、3)。

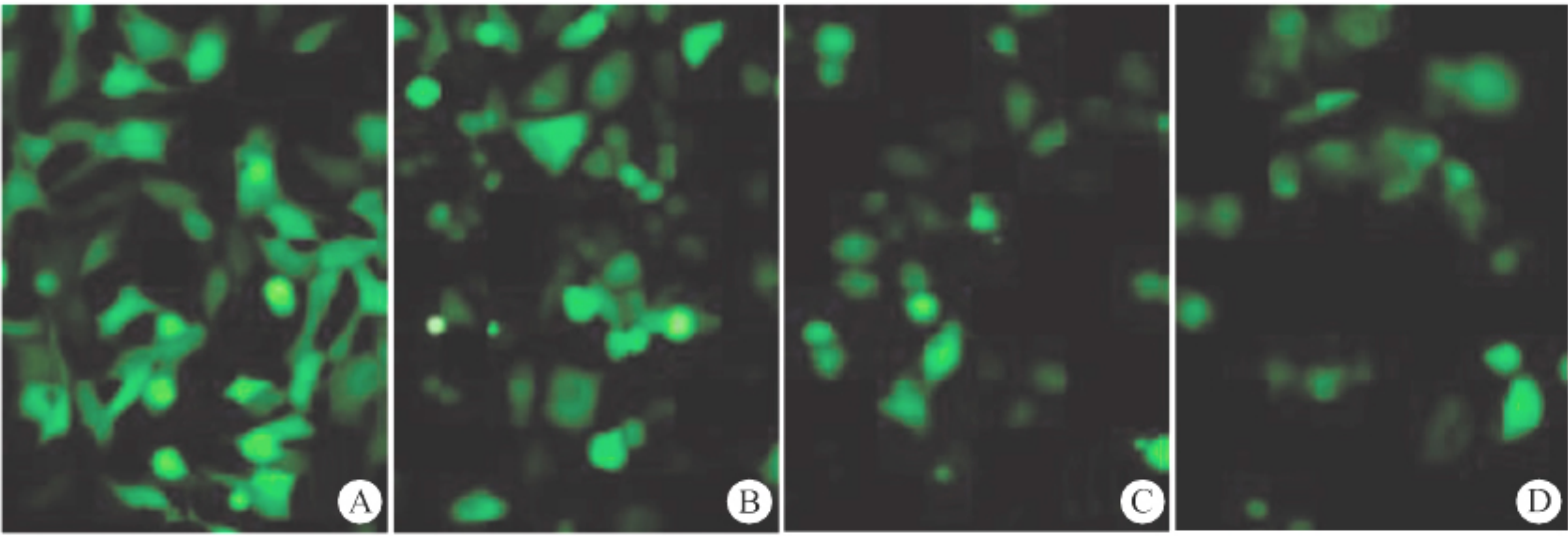


图2 重组腺病毒感染细胞表达GFP

Fig.2 Green fluorescence protein (GFP) expression of cells visualized 2 d after infection by the recombinant adenovirus

A: 293 cells; B: ECV304 cells; C: MCF-7 cells; D: LS174T cells

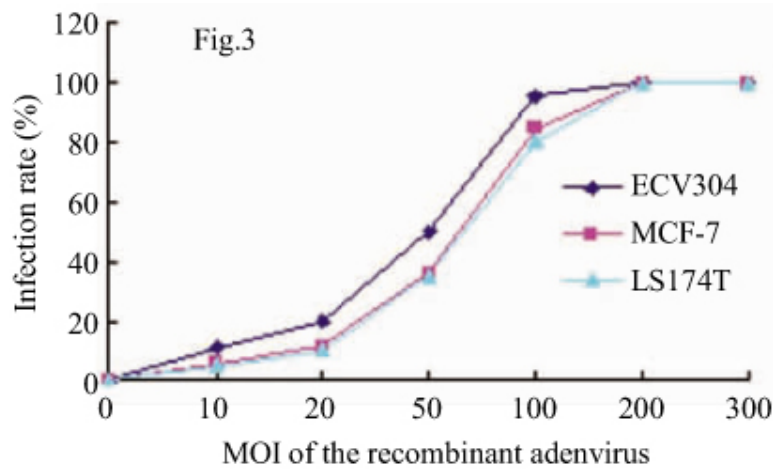


图3 重组腺病毒对各细胞的感染率

Fig.3 Infection rate of the recombinant Ad-KDR-CDglyTK in different cells

2.3 重组腺病毒对各细胞的体外抑制效应

以MOI=100的重组腺病毒Ad-KDR-CDglyTK感染各细胞株，加入不同浓度的前药培养96 h后MTT法检测细胞生长抑制率。结果：感染腺病毒的MCF-7及ECV304细胞对前药的具有较高的敏感性，且其敏感性无明显差异(P=1.00)；而感染腺病毒的LS174T细胞对前药不敏感，前药浓度为GCV =100 mg/L，5-FC=2.0 g/L时，其存活率仍有95%，与前两种细胞相比差异有显著性意义(P<0.001)。单用浓度100 mg/L的GCV时，各细胞生存率在25%~32%，单用浓度为2.0 g/L的5-FC，生存率为20%~31%，二者联合时，各细胞生存率皆在5%左右(P<0.001) (图4、5)。

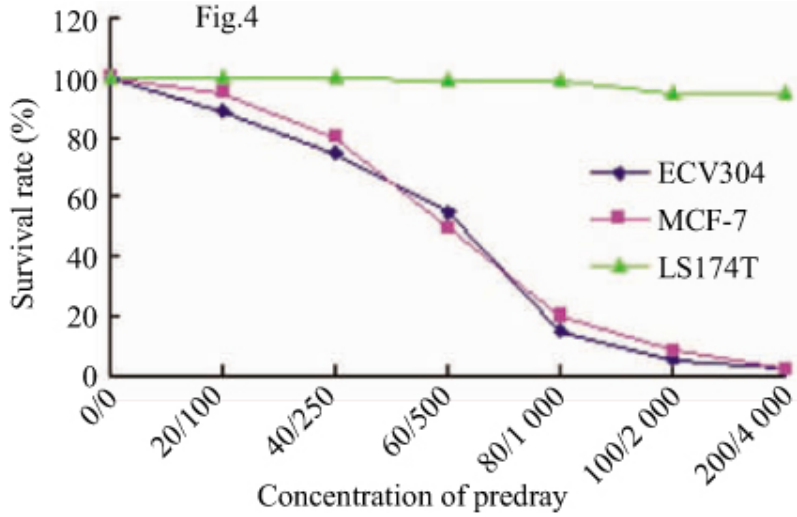


图4 AdKDR-CDglyTK体系对转基因细胞的杀伤效应
Fig.4 Survival rate of the transgenic cells after prodrug treatment

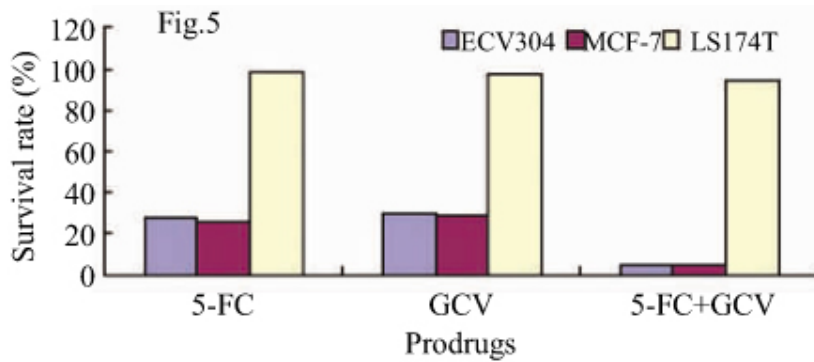


图5 不同疗法对转基因细胞的作用
Fig.5 Effect of different treatments on the infected cells
The concentration was 100 mg/L for GCV and 2 000 mg/L for 5-FC.

2.4 BSE

将感染腺病毒的细胞与未感染细胞以不同混合培养，观察到该体系明显的旁观者效应(图6)。当转基因细胞的比率为40%时，MCF-7和ECV304细胞分别有11%、10%的存活(P=0.075)，而LS174T细胞存活率仍在99%，与前2者比较差异均有显著性意义(P<0.001)。

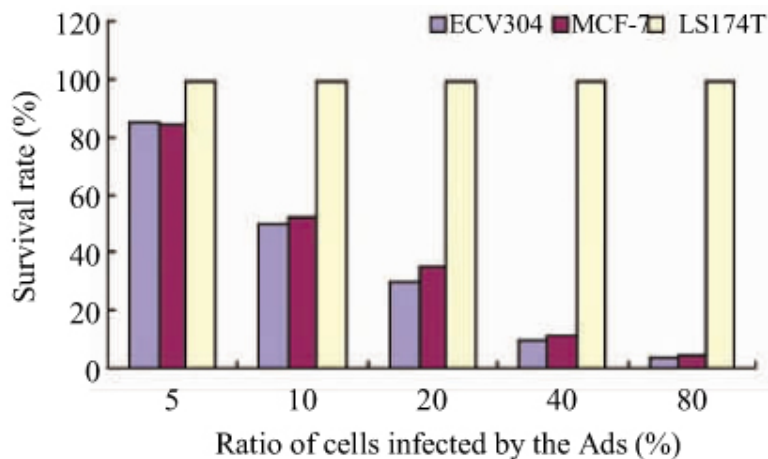


图6 AdKDR-CDglyTK体系对细胞杀伤的旁观者效应
Fig.6 Bystander effect of AdKDR-CDglyTK/prodrugs in the cells
GCV+5-FC: 100 mg/L+ 2 000 mg/L

2.5 重组腺病毒对MCF-7细胞周期的影响

转基因MCF-7细胞给以前药(GCV: 40 mg/L; 5-FU: 250 mg/L)处理24 h后, 流式细胞仪检测发现: 未加药对照组和治疗组处于G₁期比率分别为60.0%、76.3%(P<0.001), 处于S期比率分别为30.4%、23.7%(P<0.001)。

基于腺病毒载体滴度高, 且对上皮来源的细胞具有特殊的亲和力的特性[6][7][8]。本实验利用He等[9]设计pAdEasy系统, 构建了含KDR启动子介导的CD/TK融合双自杀基因的重组腺病毒(其携带的GFP可以直接观察转染与感染的效率, 含抗菌素的平板筛选含重组子BJ5183细菌而大大简化了筛选过程, 无须传统的空斑纯化)[10]。将该自杀基因体系作用于高表达KDR的乳腺癌细胞系MCF-7及血管内皮细胞系ECV304和不表达KDR的大肠癌细胞株LS174T, 结果发现: 重组腺病毒对各细胞株具有较强的感染率, 其感染率随病毒MOI的递增而增高。将转基因细胞给以不同浓度的前药5-FU和/或GCV, 发现MCF-7及ECV304细胞的存活率随前药浓度的递增而显著下降, 且CDglyTK基因的疗效优于任一单自杀基因。而LS174T对前药不敏感, 表明KDR基因启动子调控的自杀基因体系的细胞特异性。

该治疗体系的具体作用机制为: TK基因通过编码产生胸苷激酶特异地将核苷类似药物前体(GCV)磷酸化, 进而在细胞内代谢成三磷酸丙氧鸟苷, 后者抑制细胞DNA聚合酶的功能或竞争性的渗入细胞DNA, 使其合成终止, 导致细胞死亡。CD基因通过编码胞嘧啶脱氨酶将无毒的前体药物5-FU代谢成抗DNA合成的药物5-FU, 达到杀死肿瘤细胞的作用。我们将对数期生长良好的细胞转基因后给以前药治疗, 通过流式细胞仪检测, 发现转基因细胞DNA被阻止于G₁期, 提示细胞DNA的合成被抑制。同时, 该体系具有的旁观者效应大大提到了其对肿瘤细胞的杀伤效果, 其可能的机制为GCV的磷酸化产物通过细胞间的缝隙连接(gap junction)从TK⁺细胞传递到TK⁻细胞, 导致后者死亡, 也有认为“凋谢小体”(apoptotic vesicle)的转移引起, 凋谢小体由TK⁺细胞传递到TK⁻细胞, 导致后者死亡。而CD自杀基因系统所诱导的旁观者效应在机理上则较为明确, 为其产物5-氟尿嘧啶(5-FU)的易化扩散, 从CD⁺细胞传递到CD⁻细胞, 造成后者死亡, 旁观者效应的发生并不要求CD⁻细胞与CD⁺细胞相接触。自杀基因对靶细胞杀伤的旁观者效应是该治疗策略所特有的优势, 本实验进一步证实了其这一作用, 该作用特点正好可以弥补体内转基因不足的缺点, 以保证该基因治疗的效果。

本研究实验过程中, 发现转基因细胞随传代次数的增多, 细胞内荧光强度有减弱现象, 并且状态不好及分裂慢的细胞内绿色荧光较强, 提示腺病毒由于未整合到细胞染色体上而随细胞传代有滴度减低的现象。这虽不利于体外多次传代, 但其在体内治疗应用中基因表达的时间已可以满足基因治疗的需要, 同时又可避免病毒长期表达所致的不测后果。

可见, 本研究构建的双自杀基因重组腺病毒可高效感染目的细胞并能杀伤目的细胞, CDglyTK基因的应用避免了单自杀基因的不足[11], KDR基因启动子的引入保证了该治疗的靶向性。因此, 该实验为自杀基因靶向治疗策略的进一步应用提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Sakorafas GH, Tsiotou AG. Genetic predisposition to breast cancer: a surgical perspective[J]. Br J Surg, 2000, 87(2): 149-62.
- [2] Beierle EA, Dai W, Langham MR, et al. Expression of VEGF receptors in cocultured neuroblastoma cells[J]. J Surg Res, 2004, 119(1): 56-65.
- [3] Qi L, Robinson WA, Brady BM, et al. Migration and invasion of human prostate cancer cells is related to expression of VEGF and its receptors[J]. Anticancer Res, 2003, 23(5A): 3917-22.
- [4] 黄宗海, 杨文字, 龚小卫, 等. 靶向双自杀基因系统对脐静脉内皮细胞的杀伤作用[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(2): 139-43.
Huang ZH, Yang WY, Gong XW, et al. Killing effect of suicide gene system under control by KDR promoter on human umbilical vein endothelial cells[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Bao, 2004, 24(2): 139-43.
- [5] 汤福祥, 郑 权, 黄宗海, 等. 应用改进的AdEasy 系统制备重组腺病毒[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(5): 501-3.
Tang TX, Zheng Q, Huang ZH, et al. Construction of recombinant adenovirus using modified AdEasy system[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Bao, 2003, 23(5): 501-3.
- [6] 陈建发, 黄宗海, 俞金龙, 等. 含血管内皮生长因子启动子驱动 TK 自杀基因重组腺病毒的制备及其体外杀伤作用观察[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(6): 623-7.
Chen JF, Huang ZH, Yu JL, et al. Construction of recombinant adenoviruses containing cytosine deaminase gene driven by the vascular endothelial growth factor promoter using an

AdEsier-1 system[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2004, 24(6):623-7.

[7] Lillo R, Ramirez M, Alvarez A, et al. Efficient and nontoxic adeno- viral purging method for autologous transplantation in breast cancer patients[J]. Cancer Res, 2002, 62(17): 5013-8.

[8] Veldwijk MR, Fruehauf S, Schiedlmeier B, et al. Differential expression of a recombinant adeno-associated virus 2 vector in human CD34+ cells and breast cancer cells[J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7(4): 597-604.

[9] 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): 2509-14.

[10] 王晓侠, 李胜利, 姚小宝, 等. 携带反义热休克蛋白70的重组腺病毒载体的构建[J]. 第三军医大学学报 (Acta Acad Med Mil Tertiae), 2004, 26(16): 1481

[11] 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.

参考文献:

[1] Sakorafas GH, Tsiotou AG. Genetic predisposition to breast cancer: a surgical perspective[J]. Br J Surg, 2000, 87(2): 149-62.

[2] Beierle EA, Dai W, Langham MR, et al. Expression of VEGF receptors in cocultured neuroblastoma cells[J]. J Surg Res, 2004, 119(1): 56-65.

[3] Qi L, Robinson WA, Brady BM, et al. Migration and invasion of human prostate cancer cells is related to expression of VEGF and its receptors[J]. Anticancer Res, 2003, 23(5A): 3917-22.

[4] 黄宗海, 杨文字, 龚小卫, 等. 靶向双自杀基因系统对脐静脉内皮细胞的杀伤作用[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(2): 139-43.

Huang ZH, Yang WY, Gong XW, et al. Killing effect of suicide gene system under control by KDR promoter on human umbilical vein endothelial cells[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Bao, 2004, 24(2): 139-43.

[5] 汤福祥, 郑 权, 黄宗海, 等. 应用改进的AdEasy 系统制备重组腺病毒[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(5):501-3.

Tang TX, Zheng Q ,Huang ZH, et al. Construction of recombinant adenovirus using modified AdEasy system[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(5): 501-3.

[6] 陈建发, 黄宗海, 俞金龙, 等. 含血管内皮生长因子启动子驱动 TK 自杀基因重组腺病毒的制备及其体外杀伤作用观察[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(6): 623-7.

Chen JF, Huang ZH, Yu JL, et al. Construction of recombinant adenoviruses containing cytosine deaminase gene driven by the vascular endothelial growth factor promoter using an AdEsier-1 system[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2004, 24(6): 623-7.

[7] Lillo R, Ramirez M, Alvarez A, et al. Efficient and nontoxic adeno- viral purging method for autologous transplantation in breast cancer patients[J]. Cancer Res, 2002, 62(17): 5013-8.

[8] Veldwijk MR, Fruehauf S, Schiedlmeier B, et al. Differential expression of a recombinant adeno-associated virus 2 vector in human CD34+ cells and breast cancer cells[J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7(4): 597-604.

[9] 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): 2509-14.

[10] 王晓侠, 李胜利, 姚小宝, 等. 携带反义热休克蛋白70的重组腺病毒载体的构建[J]. 第三军医大学学报 (Acta Acad Med Mil Tertiae), 2004, 26(16): 1481

[11] 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.

[回结果列表](#)