

腺病毒介导的 CD 基因在人胰腺癌细胞中的靶向性表达

张世能, 袁世珍

(中山医科大学孙逸仙纪念医院消化内科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨腺病毒介导的大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶(*E. coli* CD)基因在胰腺癌细胞中靶向性表达的可能性及其作用。【方法】将含癌胚抗原(carcinoembryonic antigen CEA)启动子的重组腺病毒感染人胰腺癌 SW1990 细胞(CEA⁺)、Capan-2 细胞(CEA⁻)和人宫颈癌 Hela 细胞, 观察 CD 基因在 3 种细胞中的表达及细胞对 5-FU 的敏感性差异。【结果】腺病毒介导 CD 基因仅在 SW1990 细胞中呈专一性表达, 转导 CD 基因的 SW1990 细胞对 5-FU 的敏感性明显提高。【结论】含 CEA 启动子的 CD 基因疗法可能是胰腺癌靶向性基因治疗的可行途径。

关键词: 胰腺肿瘤; 腺病毒, 人; 胞嘧啶脱氨酶/基因疗法; 癌胚抗原

中图分类号: R 735.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2000)03-0176-03

Targeting Expression of Cytosine Deaminase Gene by Adenovirus-mediated Transfer in Human Pancreatic Carcinoma Cells

ZHANG Shi-neng, YUAN Shi-zhen

(Department of Gastroenterology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To explore the possibility of the targeting expression of *Escherichia coli* cytosine deaminase (CD) gene by adenovirus-mediated transfer in human pancreatic carcinoma cells. 【Methods】Recombinant adenoviruses containing a *carcinoembryonic antigen* (CEA) promoter were transiently introduced into SW1990, Capan-2 and Hela cells respectively. These cells were analyzed for gene expression and sensitivity to 5-fluorocytosine (5-FU). 【Results】A specific expression of cytosine deaminase gene by adenovirus-mediated transfer exhibited only in SW1990 cells. Transduction of the vector containing CEA promoter cytosine deaminase gene resulted in significant increase of sensitivity of SW1990 cells (CEA-producing) to 5-FU. 【Conclusion】These results demonstrate that utilization of the CEA promoter in an adenoviral vector may be a potential approach for targeting gene therapy of pancreatic carcinoma.

Key words: pancreatic neoplasms; adenoviruses, human; cytosine deaminase/gene therapy; carcinoembryonic antigen

现有的化疗、手术和放疗措施未能改变胰腺癌预后恶劣的状况^[1], 因而探索胰腺癌的基因疗法具有重要的意义。胞嘧啶脱氨酶(CD)是真菌、大肠杆菌代谢旁路中的一种酶, 哺乳类动物细胞中不含该酶。此酶可以将抗真菌药 5-FU 脱氨基后转化为 5-FU 而发挥细胞毒效应^[2]。CD 基因的转导多以病毒为载体。与逆转录病毒载体不同, 腺病毒载体具有宿主范围广、转导效率高和遗传毒性较低等独特

优势^[3~5], 然而感染无选择性又为腺病毒不足之处。如何将 CD 基因选择性表达于肿瘤细胞, 达到既可消除肿瘤又能保护正常组织和最大限度减低毒副作用的目的是颇值得探讨的问题。

本研究选择人胰腺癌 SW1990 细胞(CEA⁺)、Capan-2 细胞(CEA⁻)和非胰腺肿瘤的宫颈癌 Hela 细胞(CEA⁻)为实验对象, 以含 CEA(癌胚抗原)启动子表达 CD 基因的重组腺病毒为载体, 研究 CD 基

收稿日期: 1999-11-28

基金项目: 中山医科大学科研基金资助课题(97112)

作者简介: 张世能(1966-), 男, 安徽庐江人, 博士生, 主治医师。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

因在胰腺癌细胞中靶向性表达的可能性及其作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

5-FC(Sigma公司),参照已发表的CD基因序列,设计引物1:5'-TCGCTGCATAAAACCTTCG-3',引物2:5'-TTGGCGACAAAGTAATACCG-3',由GIBCO/BRL公司合成。抗CD单克隆抗体(16D8F2)由德国Heidelberg大学分子医学中心Knebel教授惠赠。

1.2 细胞系和细胞培养

人胰腺癌SW1990、Capan-2细胞和人宫颈癌Hela细胞由本科常规传代,培养于含100 ml/L FBS的RPMI1640中。293细胞由上海第二医科大学人类基因治疗中心陈诗书教授惠赠,培养于含100 ml/L FBS的MEM中。细胞培养液上清CEA检测用酶联免疫分析法。

1.3 重组腺病毒的构建、扩增及滴度测定

含CEA启动子携带CD基因的重组腺病毒载体Adex1CEAprCD和对照病毒载体Adex1CEAprZ由日本东京癌症化疗中心Hamada博士构建并惠赠。重组腺病毒感染293细胞,2~3d收获细胞,反复冻融后离心,收集上清置-80℃保存备用。病毒感染滴度以空斑计数法测定。

1.4 细胞CD基因mRNA表达的检测

常规提取细胞RNA,以下游引物合成cDNA,以其为模板,进行RT-PCR,若阳性表达者预期可扩增出239 bp的片段。

1.5 细胞CD基因蛋白表达的检测

选用16D8F2单克隆抗体,以Western blot技术检测CD基因表达的蛋白质,方法按文献[6]进行。

1.6 细胞体外生长抑制试验

SW1990、Capan-2和Hela细胞分别铺96孔板,每孔约 2×10^3 个细胞,37℃、5%(v/v)CO₂孵箱中培养24 h,用感染倍数MOI为100的比例分别加入重组腺病毒Adex1CEAprZ或Adex1CEAprCD,12 h后分别加入不含或含 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-FC的培养液继续培养,每一浓度设4个复孔,MTT法检测每孔于570 nm的A值,然后按下列公式计算细胞生长抑制率:

$$1 - \frac{\text{实验孔} A \text{ 值}}{\text{对照孔} A \text{ 值}} \times 100, \text{实验重复3次。}$$

2 结果

2.1 细胞培养液上清CEA检测及病毒滴度

SW1990细胞CEA检测呈阳性,Capan-2和Hela细胞者均呈阴性。Adex1CEAprZ和Adex1CEAprCD感染滴度为 1.0×10^{12} PFU/L。

2.2 受染细胞CD基因表达的检测

提取腺病毒感染后的细胞RNA,进行RT-PCR,Adex1CEAprCD感染的细胞中,仅在SW1990细胞可扩增出239 bp的片段,而Capan-2和Hela细胞则未扩增出该片段。对照的SW1990、Capan-2和Hela细胞亦未扩增出该片段(图1)。Western blot结果显示Adex1CEAprCD感染的细胞中,仅SW1990细胞表达相对分子质量约52 ku的CD蛋白。对照的SW1990、Capan-2和Hela细胞均不表达CD蛋白(图2)。



图1 受染细胞CD基因mRNA的表达

Fig. 1 Expression of CD gene mRNA in transduced cells (RT-PCR)

M. DNA ladder marker; 1. Positive control; 2. SW1990/CD; 3. SW1990; 4. Capan-2/CD; 5. Capan-2; 6. Hela/CD; 7. Hela; 8. Negative control

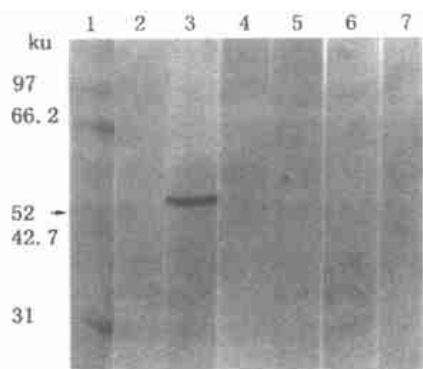


图2 受染细胞CD基因蛋白的表达

Fig. 2 Expression of CD gene protein in transduced cells (Western blot)

1. Protein molecular weight marker; 2. SW1990; 3. SW1990/CD; 4. Capan-2; 5. Capan-2/CD; 6. Hela; 7. Hela/CD

2.3 受染细胞体外对5-FC的敏感性

以Adex1CEAprCD感染组中,SW1990细胞对5-FC的敏感性明显提高,5-FC对其生长具有明显

的抑制作用, IC_{50} 低于 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而 Capan-2 和 HeLa 细胞对 5-FC 的敏感性并未改变, 5-FC 对二者亦无生长抑制作用(表 1)。而以对照病毒 Adex1CEA-prZ 感染组, 仅在较高浓度 5-FC 时观察到甚弱的生长抑制作用, $IC_{50} > 1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 2)。

表 1 5-FC 对 Adex1CEA-prCD 转染的细胞生长的抑制作用

Table 1 Growth inhibiting effect of 5-FC on cell lines infected with Adex1CEA-prCD

Cell lines	Inhibiting rate(%)				
	$c(5\text{-FC})/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$				
	0	1	10	100	1 000
SW1990	0	6.9	22.6	52.8	68.1
Capan-2	0	2.8	3.1	5.3	8.2
Hela	0	3.4	3.9	4.6	6.6

Note: Capan-2 HeLa vs SW1990, $P < 0.01$; HeLa vs Capan-2, $P > 0.05$

表 2 5-FC 对 Adex1CEA-prZ 转染的细胞生长的抑制作用

Table 2 Growth inhibiting effect of 5-FC on cell lines infected with Adex1CEA-prZ

Cell lines	Inhibiting rate(%)				
	$c(5\text{-FC})/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$				
	0	1	10	100	1 000
SW1990	0	2.9	4.5	5.5	9.1
Capan-2	0	3.2	3.9	4.3	6.2
Hela	0	2.6	3.0	3.5	7.7

Note: Capan-2 HeLa vs SW1990, Capan-2 vs HeLa, $P > 0.05$

3 讨论

近年来的研究表明选用肿瘤特异性调控元件(启动子或增强子)可以驱动目的基因表达于特定的靶细胞^[7,8]。针对临床上大多数胰腺癌分泌 CEA, 化疗药物仍首选 5-FU 的实际状况, 我们以含 CEA 启动子的重组腺病毒作为载体, 将 CD 基因靶向性地转导分泌 CEA 的胰腺癌 SW1990 细胞。SW1990 细胞在重组腺病毒感染后, 外源 CD 基因在 mRNA 转录及蛋白水平均呈阳性表达, 而外源 CD 基因在 CEA⁻ 的 Capan-2 和 HeLa 细胞中则不表达, 这一结果支持用组织特异性调控元件可以实现目的基因的靶向性转导。其机制可能为: SW1990 细胞

具有特定的转录激活因子, 因而能够转录特定的 mRNA, 表达出相应的蛋白(CEA), 通过 CEA 启动子的转录激活作用驱动 CD 基因在 SW1990 细胞中呈现特异性表达, 而在非分泌 CEA 的细胞则不表达。

我们以重组腺病毒 Adex1CEA-prCD 感染肿瘤细胞后, 受染细胞 SW1990、Capan-2 和 HeLa 细胞体外对 5-FC 的敏感性存在显著差异, 缘于经基因修饰后, 表达 CD 蛋白的 SW1990 细胞被赋予了酶解 5-FC 为 5-FU 的新的生物学活性, 导致 SW1990 细胞对 5-FC 的敏感性提高, 生长受抑, 呈现细胞自杀现象。重组腺病毒 Adex1CEA-prZ 虽然在较高浓度 5-FC 时可观察到一定的细胞抑制效应, 但与前者相比作用甚微。

参考文献:

- [1] Hahn S A, Schmiegel W H. Recent discoveries in cancer genetics of exocrine pancreatic neoplasia[J]. Digestion, 1998, 59(5): 493.
- [2] Austin E A, Huber B E. A first step in development of gene therapy for colorectal carcinoma cloning sequencing and expression of *Escherichia coli* cytosine deaminase[J]. Mol Pharmacol, 1992, 43(3): 380.
- [3] Ohwada A, Hirschowitz E A, Crystal R G. Regional delivery of an adenovirus vector containing the *Escherichia coli* cytosine deaminase gene to provide local activation of 5-fluorocytosine to suppress the growth of colon carcinoma metastatic to liver[J]. Hum Gene Ther, 1996, 7(5): 1567.
- [4] 张世能, 袁世珍. 胞嘧啶脱氨酶基因治疗消化道肿瘤研究进展[J]. 国外医学内科学分册, 1999, 26(6): 249.
- [5] Graham F L, Prevec L. Methods for construction of adenovirus vectors[J]. Mol Biotechnol, 1995, 3(3): 207.
- [6] Haack K, Moebius U, Knebel D, et al. Detective of cytosine deaminase in genetically modified tumor cells by specific antibodies[J]. Hum Gene Ther, 1997, 8(11): 1395.
- [7] Richards C A, Austin E A, Huber B E. Transcriptional regulatory sequences of carcinoembryonic antigen: identification and use with cytosine deaminase for tumor specific gene therapy[J]. Hum Gene Ther, 1995, 6(7): 881.
- [8] Kanai F, Lan K H, Shiratori Y, et al. *in vivo* gene therapy for α -fetoprotein producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene[J]. Cancer Res, 1997, 57(1): 461.

(编辑 黄小延)