

③ 30A-309

第14卷第4期  
1999年12月中国病毒学  
VIROLOGICA SINICAVol. 14 No. 4  
Dec. 1999

## 一种新的重组腺病毒的构建及其对人肿瘤细胞的影响\*

苏 霏 齐 兵<sup>✓</sup> 齐义鹏<sup>\*\*</sup>R730.59  
R394

(武汉大学病毒学研究所, 武汉 430072)

**摘 要** 腺病毒 E1A 基因诱导细胞凋亡, E1B19K 基因及 E1B55K 基因抑制细胞凋亡, 前者被克隆到腺病毒转移载体 pCAI3 的 HCMV IE 启动子下游, 构建成转移载体 pCAE1A。采用 lipofectin 法将 pCAE1A 和含腺病毒基因组(E1 区、E3 区缺失)的质粒 pBHG11 共转染 293 细胞, 7~10 d 后得到重组病毒 v5Ad4。用 v5Ad4 感染人肺腺癌细胞系 A549, 结果表明 v5Ad4 有明显杀伤和裂解肿瘤细胞功能。在人胚肺正常二倍体细胞中, v5Ad4 没有表现出可见的细胞毒效应。

**关键词** 肿瘤基因治疗, 腺病毒, E1A 基因, E1B 基因

迄今为止, 恶性肿瘤治疗的主要策略仍然是手术、放疗和化疗。然而基于对肿瘤分子生物学的深入研究, 近年来癌症的基因治疗作为一种新的治疗手段得到迅速发展。腺病毒(Adenovirus)载体由于基因组结构简单, 遗传背景比较清楚, 易于改造和操作, 而且转染率高, 又有较好的靶细胞特异性, 因而作为向癌细胞导入外源基因的工具而备受瞩目。

腺病毒属 DNA 肿瘤病毒, 基因组为线状双链 DNA, 长约 36 kb。位于腺病毒 5 型 194~358 bp 处的  $\Psi$  因子为 cis-元件, 是包装病毒 DNA 必需的信号, 它的缺失造成病毒基因组不能被包装, 但不影响病毒基因组在被感染细胞中复制的可能性<sup>[1]</sup>。早期基因 E1A、E1B 是复制必须基因, 它们的缺失造成流产感染, 但在 293 细胞(整合有腺病毒的 E1 区)中可以复制并形成病毒粒子。E3 为病毒复制非必须区, 常被缺失以提高腺病毒载体的克隆容量。目前, 腺病毒主要被用作外源基因如抑癌基因 Rb、p53, 细胞毒性基因 HSVtk<sup>[2]</sup>, 各种免疫刺激因子 IL-2<sup>[3]</sup>、IL-4<sup>[4]</sup>、IL-6<sup>[5]</sup>、GM-CSF<sup>[5,6]</sup>、TNF、核酶等的瞬时表达载体。最近研究发现, 缺失 E1B55K 基因的腺病毒能在 p53 基因突变的肿瘤细胞中选择性繁殖并裂解杀死肿瘤细胞, 而在正常细胞中只能发生流产感染<sup>[7]</sup>。为选择性杀死肿瘤细胞的腺病毒基因治疗载体的研究开辟了一条全新的途径。

研究表明, 腺病毒 E1A 一方面具有转化功能, 另一方面它的表达会延长抑癌基因 p53 的半衰期等, 提高 p53 的表达量, 引发 p53 依赖或不依赖的癌细胞凋亡<sup>[8]</sup>, 并显著降低多种人恶性肿瘤细胞系的致瘤性<sup>[9]</sup>。近来研究证明, E1A 的表达能下调在卵巢癌、乳腺癌、肺癌等常伴有的原癌基因 HER-2/neu 的过量表达, 并抑制肿瘤及其转移, 增加肿瘤对化疗的敏感性<sup>[10]</sup>。E1B 的两个表达产物 19 k 和 55 k 蛋白均可抑制 p53 依赖的凋亡, 前者还可抑制 p53 非依赖的凋亡, 并具有与 bcl-2 等同的凋亡抑制功效<sup>[11]</sup>。E1B55k<sup>-</sup>19k<sup>+</sup> 的重组腺病毒 12 型引起 p53 表

收稿日期: 1998-07-02, 收回日期: 1998-11-27

\* 国家自然科学基金高技术新探索项目资助课题(39880031)

\*\* 联系与负责作者

达量增高,半衰期延长,但不能引起人肺腺癌细胞系 A549 的凋亡<sup>[8]</sup>。因而我们假设 E1B 的完全缺失可以使 E1A 的凋亡诱导效应不被抵消反而更显著,构建了仅缺失 E1B 和 E3 区的重组腺病毒 v5Ad4,其中 E1A 的表达被增强,就其在癌细胞表达 E1A,研究其对正常细胞与肿瘤细胞的影响。

## 1 材料与方 法

**1.1 菌株、细胞、病毒与质粒** *E. coli* TG1, DH5 $\alpha$  为本室保存。人胚肾 293 细胞购自武汉大学典型培养物保藏中心,DMEM 培养基加 10% 小牛血清常规培养。人肺腺癌细胞系 A549 购自上海细胞所细胞库,RPMI 1640 培养基加 10% 小牛血清常规培养。正常人胚肺细胞由湖北医科大学董长垣教授惠赠,DMEM 培养基加 10% 马血清常规培养。野生型腺病毒 5 型由南京军事医学科学研究所邓小昭教授惠赠。含 E1A 基因的质粒 pCMVE1A 由美国 Pcutgers 大学 Eileen White 博士惠赠。质粒 pBHG11 [E1<sup>-</sup>E3<sup>-</sup> $\Psi$ <sup>-</sup>。腺病毒 5 型基因组 E1 区的核苷酸序列 188~1 339 bp(0.5~3.7 mu)被缺失,一个氨卞抗性基因(Ap<sup>r</sup>)和一个细菌的复制起始位点(Ori)取代了这区域,同时缺失了病毒 DNA 必需的包装信号顺式元件  $\Psi$  因子,因而在单独感染 293 细胞时没有感染性。另外,此质粒中腺病毒 5 型 E3 区亦被缺失],pCA13[E1-E3- $\Psi$ <sup>+</sup>。含有腺病毒 5 型基因组 22~5 790 bp(0~16.1 mu)核苷酸序列,但其中包含一个 342~3 523 bp(1.0~9.8 mu)的序列缺失。缺失区内是一个用于外源片段插入的置于 HCMV IE 启动子(-299~+72 bp)控制下的多克隆位点,并跟随有 SV40 poly(A) 信号],购自加拿大 Microbix Biosystems INC。

**1.2 酶和化学试剂** lipofectin、T4 连接酶、IPTG、X-gal 购自 GIBCO 公司。限制性内切酶、马血清、RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基购自华美生物制品公司。一般化学试剂均为国产分析纯。

**1.3 质粒 DNA 的提取、酶切、DNA 片段的回收与连接** 按分子克隆的常规程序,稍作改动。

**1.4 重组 DNA 的转化和阳性重组子的筛选** 连接产物 CaCl<sub>2</sub> 法转化大肠杆菌 TG1。通过限制性酶切消化鉴定插入片段大小来筛选阳性重组体。

**1.5 共转染** 通过 lipofectin 介导,将含有 E1A 表达盒的转移载体 pCAE1A 和 pBHG11 共转染 293 细胞。具体操作为:将 lipofectin 17  $\mu$ L 与 pCAE1A 20  $\mu$ g 及 pBHG11 20  $\mu$ g 分别用 200  $\mu$ L 无血清无双抗(青霉素、链霉素)DMEM 培养基稀释,室温静置 15~30 min 后,将 lipofectin 逐滴加入稀释好的质粒中并轻轻混合均匀。室温静置 30~45 min 使 lipofectin 包裹 DNA。补加 1.3 mL DMEM 培养基,使转染混合液体积能均匀覆盖细胞层,混匀。将此 lipofectin-DNA 转染混合液缓慢加入经无血清无双抗 DMEM 培养基轻洗过的 293 细胞。温浴 6~8 h,弃去旧培养基,换为含 5% 马血清的 DMEM 培养基继续培养 2~4 d,观察细胞致病效应(CPE)。7 d 后,取上清再次感染 293 细胞以扩增重组病毒。

**1.6 重组腺病毒和野生型腺病毒的感染** 分别取收获的上清 3 mL 加入 A549 细胞及正常人胚肺细胞中,37  $^{\circ}$ C 吸附 1 h 后,弃去旧培养基,加入新鲜的培养基,继续培养。

**1.7 电镜观察** 取 pBHG11 和 pCAE1A 共转染 7 d 后的 293 细胞上清,2 000 r/min 离心,取上清制样。用 2% pH6.2 的磷钨酸溶液以滴染法对样品进行负染,220 000 倍电镜观察。

## 2 结果与讨论

**2.1 重组转移载体 pCAE1A 的构建与鉴定** 将 pCMVE1A 中含 E1A 基因编码区的 EcoRI/BamHI 1.3 kb 片段切下插入 pCA13 相应的多克隆位点,得到重组转移载体 pCAE1A。pCAE1A 经 EcoRI/BamHI 限制性酶切消化,释放出一条 1.3 kb 的小带,载体片段与 pCA13/EcoRI 和 pCA13/BamHI 单酶切所呈带形相等,证明是所需阳性重组体。酶切鉴定结果如图 1 所示;转移载体 pCAE1A 的构建过程如图 3 所示。

**2.2 重组病毒 v5Ad4 的构建与病毒颗粒的包装** 质粒 pBHG11 由于腺病毒 5 型基因组 E1

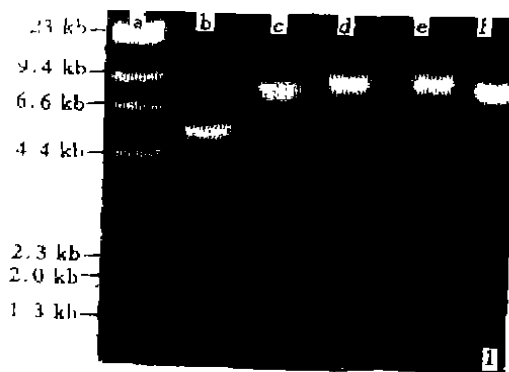


图1 重组转移载体 pCAE1A 的酶切鉴定

Fig.1 Restricted enzyme digestion of recombinant transfer vector pCAE1A

b and c: one 1.3 kb small fragment was released.



图2 重组病毒 v5Ad4 的电镜观察

Fig.2 Electron microscopy of the recombinant virus v5Ad4 icosahedron virus particle (arrow indicated) can be seen in supernatant of 293 cells cotransfected with pCAE1A and pBHG11 by the 220 000 × electron microscope.

区的核苷酸序列 188~1 339 bp(0.5~3.7 mu)缺失,一个氨苄抗性基因(Ap<sup>r</sup>)和一个细菌的复制起始位点(Ori)取代了该区域,即同时缺失了病毒 DNA 必需的包装信号顺式元件 Ψ 因子,因而在单独感染 293 细胞时没有感染性。另外,此质粒中腺病毒 5 型 E3 区亦缺失。pBHG11 必须与左臂带有腺病毒包装信号序列的穿梭载体共转染,才能产生有感染性的重组载体。质粒 pCAE1A 含有腺病毒 5 型基因组 22~5 790 bp(0~16.1 mu)核苷酸序列,但其中包含一个 342~3 523 bp(1.0~9.8 mu)的序列缺失;E1 区内有一个置于 HCMV IE 启动子(-299~+72 bp)控制下的多克隆位点中的 E1A 表达盒,并有 SV40 poly(A)信号。pBHG11-Ap<sup>r</sup>-ori 的左臂为腺病毒 5 型基因组 0~188 bp,其右臂为腺病毒 5 型基因组 1 337~27 865 bp,pCAE1A 中 E1A 表达盒左臂为腺病毒 5 型基因组 22~342 bp,右臂为腺病毒 5 型基因组 3 523~5 790 bp。两者的左右臂具有足够的同源区域,可以在共转染的 293 细胞内发生同源重组。由于 pBHG11 无 Ψ 因子,pCAE1A 虽然有 Ψ 因子,但仅有极短的腺病毒 5 型基因组序列,所以 pBHG11 不能被包装,pCAE1A 不能形成病毒粒子,只有带 Ψ 因子和大部分腺病毒 5 型基因组的重组病毒才可能被包装。重组病毒 v5Ad4 的构建如图 3 所示。

经 pCAE1A 和 pBHG11 共转染的 293 细胞 6 d 后开始变圆肿胀,部分裂解死亡,有明显 CPE 症状。透射电镜观察,在共转染 7 d 后的 293 细胞上清可见球状(二十面体)病毒粒子(图 2),命名为 v5Ad4。

**2.3 重组病毒 v5Ad4 对人肿瘤细胞的影响** v5Ad4 感染人肺腺癌细胞系 A549,19 h 后 80% 细胞变圆悬浮,有明显 CPE 症状,5% 裂解,3 d 后,100% 细胞变圆悬浮,60% 裂解(图 4A)。而经等量 v5Ad4 感染的正常人胚肺细胞中,3 d 至两周,存活细胞比率一直保持 100%(图 4B),表现了对 v5Ad4 诱导的细胞裂解的高度抗性。

野生型腺病毒感染人肺腺癌细胞系 A549,36 h 后 2% 细胞变圆;3 d 后 40% 细胞变圆悬浮;7 d 后,90% 细胞变圆悬浮,并可见细胞裂解(图 4A)。经等量野生型腺病毒感染的正常人

胚肺细胞中,3 d 后 60% 细胞变圆并聚集成团,4 d 后解聚,圆形细胞悬浮在培养基中(图 4B)。

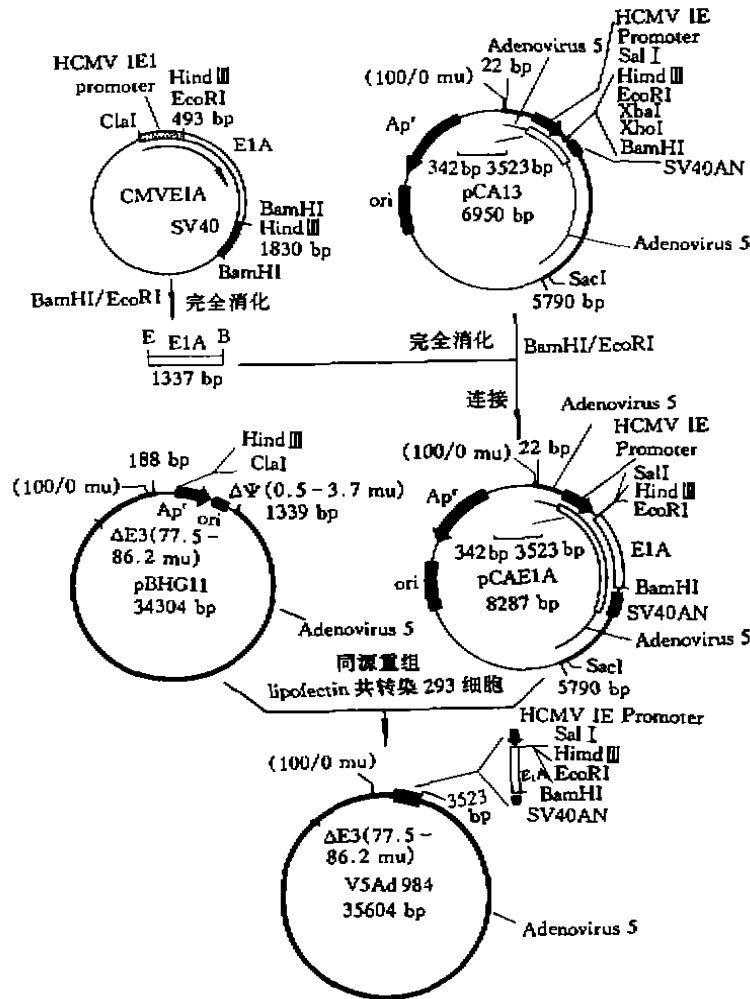


图 3 重组转移载体 pCAE1A 及重组病毒 v5Ad4 的构建

Fig.3 Construction of recombinant transfer vector pCAE1A and recombinant virus v5Ad4

E: EcoRI, B: BamHI, 1.3 kb open reading frame of E1A gene digested from pCMVE1A was inserted into EcoRI/BamHI site of vector pCA13, which resulted into recombinant transfer vector pCAE1A. 293 cells were cotransfected with pCAE1A and pBHG11, homologous recombination between pCAE1A and pBHG11 in 293 cells resulted into recombinant virus v5Ad4.

以上实验说明,作为对照的野生型腺病毒对人肺腺癌细胞和正常人胚肺细胞均有一定毒害作用,我们构建的重组腺病毒 v5Ad4 对人肺腺癌细胞的存活率有明显影响,而对正常人胚肺细胞几乎毫无影响(图 4B)。这可能是由于 E1A 的引入及超强表达,诱发了肿瘤细胞对凋亡的强烈敏感性。我们认为缺失了 E1B 19k 与 E1B 55k 的重组缺陷型腺病毒 v5Ad4 可能对人类恶性肿瘤的治疗有重要意义,并且可以作为有价值的肿瘤基因治疗载体。



图 4A 重组病毒 v5Ad4 对人肿瘤细胞 A549 的感染

Fig. 4A The infection of recombinant virus v5Ad4 in human tumor cell line A549

(a) A549 cell without the infection of v5Ad4 or wide type adenovirus (200 $\times$ ) (b) A549 cell with the infection of v5Ad4 (400 $\times$ ) (c) A549 cell with the infection of wt-Ad (400 $\times$ )

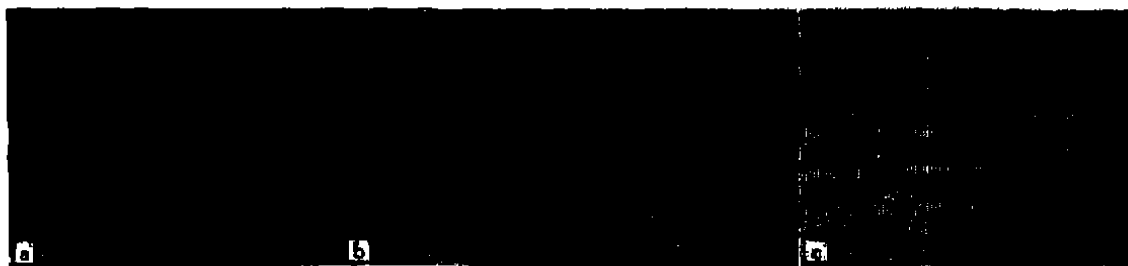


图 4B 重组病毒 v5Ad4 对人胚肺正常二倍体细胞的感染

Fig. 4B The infection of recombinant virus v5Ad4 in human normal cells

(a) HL cell without the infection of v5Ad4 or wt-Ad (400 $\times$ ) (b) HL cell with the infection of v5Ad4 (400 $\times$ ) (c) HL cell with the infection of wt-Ad (400 $\times$ )

### 参 考 文 献

- 1 Andrew J Bett, Wael Haddara, Ludvik Prevec *et al.* An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early region 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:8802~8806
- 2 Torao Tanaka, Fahnihikikanai Satoein Okabe, Yoco Y *et al.* Adenovirus-mediated prodrug gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human gastric carcinoma cells *in vitro*. *Cancer Reserch*, 1996, 56(6):1341~1345
- 3 Leimig T, Brenner M, Ramsey J *et al.* High-efficiency transduction of freshly isolated human tumor cells using adenoviral interleukin-2 vectors. *Hum Gene Ther*, 1996, 7(10):1233~1239
- 4 Addison C L, Gauldie J, Muller W J *et al.* An adenoviral vector expressing interleukin-4 modulates tumorigenicity and induces regression in a murine breast cancer model. *Int J Oncol*, 1995, 7(6):1253~1260
- 5 Foley R, Ellis R, Walker I *et al.* Intramarrow cytokine gene transfer by adenoviral vectors in dogs. *Hum Gene Ther*, 1997, 8(2):545~553
- 6 Lee Choo Taek, Wu Shan, Ciernik I F *et al.* Genetic immunotherapy of established tumors with adenovirus-murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Hum Gene Ther*, 1997, 8(2):187~193
- 7 James R Bischoff, David H Kim, Angelica Williams *et al.* An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*, 1996, 274:371~378
- 8 Roger J A Grand, Darcera Owen, Susan M Rookes *et al.* Control of p53 expression by adenovirus 12 early region 1A and early

- region 1B 54k proteins. *Virology*, 1996, 218:23~24
- 9 Martin Duque P, Sanchez-Prieto R, Quintanilla M *et al.* Antitumoral effect of E1B defective adenoviruses in human malignant cells. *Gene Therapy*, 1998, 5:286~287
- 10 陆浩钧. E1A 对 HER-2/neu 过度表达肿瘤治疗作用的研究进展. *国外医学·肿瘤学分册*, 1997, 24(6):321~322
- 11 Chang JY, Xia W, Shao R *et al.* The tumor suppression activity of E1A in HER-2/neu-overexpressing breast cancer. *Oncogene*, 1997, 14(5):561~568

## Construction of a New Kind of Recombinant Adenovirus and Its effect on Tumor Cells

Su Fei    Qi Bing    Qi Yipeng

(*Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072*)

**Abstract** E1A gene of adenovirus is an apoptosis-inducing gene and E1B gene of adenovirus is an apoptosis-inhibiting gene. The former one was cloned into adenovirus transfer vector pCA13 under the control of HCMV IE1 promoter, which resulted into transfer vector pCAE1A. Plasmid pCAE1A and pBHG11, which includes almost all the adenovirus genome but E1 region and E3 region were deleted, were cotransfected into 293 cell line. After 7 - 10 days, recombinant virus v5Ad4(E1B<sup>-</sup>E3<sup>-</sup>) was obtained. v5Ad4 was used to infect A549 cell line. The results showed that v5Ad4 can kill and lysis tumor cells. In the normal cells, v5Ad4 didn't show visible cytotoxicity effect.

**Key words** Gene therapy for tumor, Adenovirus, E1A gene, E1B gene