文章编号:1000-5404(2013)24-2659-06

论著

rPB-DR(6)调控的溶瘤腺病毒对前列腺癌细胞的杀伤作用

付成伟,王洛夫,江 军,孙中义,兰卫华,张克勤 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科)

[摘要] **目的** 构建含rPB-DR(6)启动子和CD自杀基因的重组溶瘤腺病毒,观测其对雄激素依赖性和非依赖性前列腺癌细胞的杀伤作用,探索雄激素非依赖性前列腺癌治疗的新方法。**方法** 应用分子生物学技术,构建并包装出重组溶瘤腺病毒Ad5-rPC,纯化并扩增,测定滴度。采用PCR方法对重组溶瘤腺病毒颗粒进行鉴定并测序,Western blot检测E1A、CD蛋白表达,$TCID_{50}$法检测重组腺病毒感染癌细胞后的复制能力,应用CCK-8法检测重组病毒特异性杀伤能力。**结果** 经PCR及测序鉴定证实成功构建了包含rPB-DR(6)启动子和CD基因的重组溶瘤腺病毒Ad5-rPC,测滴度为1.1×10^{11}pfu/mL。Western blot检测到E1A和CD蛋白阳性表达。Ad5-rPC病毒感染前列腺癌细胞系细胞产生的子代病毒滴度均大于3.0×10^{6}pfu/mL,CCK-8法证实重组腺病毒对雄激素依赖性和非依赖性前列腺癌细胞均具有特异性杀伤能力,杀伤能力均大于65%。**结论** 前列腺特异性启动子调控的溶瘤腺病毒能在前列腺癌细胞内靶向复制,并对雄激素依赖性和非依赖性前列腺癌细胞均有特异性杀伤作用。

[关键词] 溶瘤腺病毒;rPB-DR(6)启动子;CD基因;前列腺癌;基因治疗
[中图法分类号] R394-33;R73-362;R737.25 [文献标志码] A

Antitumor effect of rPB-DR(6) promoter-regulated oncolytic adenovirus on prostate cancer cells

Fu Chengwei, Wang Luofu, Jiang Jun, Sun Zhongyi, Lan Weihua, Zhang Keqin (Department of Urology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct conditionally replicating oncolytic adenovirus regulated by prostate specific promotor rPB-DR(6) with an insertion of cytosine deaminase (CD) gene driven by mCMV promoter, to observe its antitumor effect, and to explore a new method for the treatment of androgen-independent prostate cancer. **Methods** Recombinant oncolytic adenovirus Ad5-rPC was constructed and packaged using molecular biotechniques, identified by PCR and sequencing, purified by CSCI gradient centrifugation, and tested for PFU titer detection. Expression of E1A and CD proteins in the adenovirus-transfected prostate cancer cells was detected by Western blotting. Antitumor effect of the recombinant adenovirus on prostate cancer cells was tested by CCK-8 assay. **Results** By PCR and restriction endonuclease assay, rPB-DR(6) promoter and CD gene driven by mCMV promoter were inserted into recombinant adenovirus successfully. The titer of the purified recombinant adenovirus Ad5-rPC was 1.1×10^{11} pfu/mL. Western blot results showed positive expression of E1A and CD proteins in transfected prostate cancer cells. The titer of the progeny viruses produced by prostate cancer cells which were transfected by Ad5-rPC was greater than 3.0×10^{6} pfu/mL. CCK-8 assay and cell counting method confirmed that Ad5-rPC had antitumor effects on both androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. **Conclusion** Recombinant oncolytic adenovirus regulated by prostate specific promoter has the ability of reproduction in prostate cancer cells uniquely, and can specifically kill prostate cancer cells.

[**Key words**] oncolytic adenovirus; rPB-DR(6) promoter; cytosine deaminase; prostate cancer; gene therapy

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2010BB5164). Corresponding author: Wang Luofu, Tel:86-23-68757647, E-mail: wangluofu@aliyun.com.cn

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5164)
[通信作者] 王洛夫,电话:(023)68757647,E-mail: wangluofu@aliyun.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130914.1457.013(2013-09-14)

前列腺癌在男性恶性肿瘤中位于第2位,其癌症死亡率已上升到第6位[1],并且前列腺癌在我国的发病率有明显增高的趋势。大多数患者发现时已到达晚期,经过抗雄激素治疗6~18个月后,80%进展为雄激素非依赖性前列腺癌[2](androgen independent prostate cancer,AIPC),对放化疗不敏感,目前还没有能治愈AIPC的方法[3-4]。我们试图建立一种病毒-基因治疗方法,该方法对包括AIPC在内的所有前列腺癌有效,为此我们在rPB启动子基础上改建了一个前列腺特异性启动子rPB-DR(6),前期工作已证实其前列腺特异性和高效调控能力[5]。本研究拟以rPB-DR(6)为主要调控元件,采用自杀基因CD(cytosine deaminase,胞嘧啶脱氨酶)进一步增强抗肿瘤作用,构建出含rPB-DR(6)启动子和CD自杀基因的重组溶瘤腺病毒,观察其对雄激素依赖性和非依赖性前列腺癌细胞的杀伤作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 主要试剂(盒)包括限制性内切酶(NEB公司),*Taq*酶(申能博彩公司),Lipofectamine 2000试剂盒(GIBCO BRL公司),胶回收试剂盒、PCR产物回收试剂盒、质粒DNA制备试剂盒、病毒DNA提取试剂盒(QIAGEN公司),7Sea-CCK-8试剂盒(上海七海生物),E1A一抗(小鼠单克隆IgG1)由圣克鲁斯生物技术公司提供,CD一抗(羊多克隆IgG的胞嘧啶脱氨酶)由Abcam公司提供,相关PCR引物由上海生工生物技术公司合成。

1.1.2 质粒、菌株、细胞株 pPE3(腺病毒骨架质粒)、pDC315-EGFP(含mCMV)、p55-EF1-hIL24(含E1A和E1B19K)、穿梭质粒p55-tp(含E1A和E1B19K)质粒、对照质粒pXC20(含E1A)以及Ad5-EGFP、Ad5(wt)腺病毒由上海白泽生物公司提供,pUC119-rPB-DR(6)[含rPB-DR(6)启动子]、pCD2(含CD基因)由我院泌尿外科实验室保存,DH5α感受态大肠杆菌、293细胞均由西南医院重点实验室提供。LNCaP(雄激素依赖性前列腺癌)、DU145、C4-2(雄激素非依赖性前列腺癌)、MKN45(胃癌对照)细胞为我院泌尿外科实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 Ad5-rPB-DR(6)-mCMV-CD病毒构建及鉴定 ①携带腺病毒E1区和rPB-DR(6)启动子的p55-rPB-DR(6)重组质粒的构建。以pUC119-rPB-DR(6)为模板,扩增rPB-DR(6)启动子,引物P1(上游):5′-CGACCGGTACAAGTGCATTTAGCCTCTC-3′,P2(下游):5′-CCGCTCGAGGCTCTGTAGGTATCTGG-3′,分别含有*Age*Ⅰ、*Xho*Ⅰ酶切位点,用*Age*Ⅰ、*Xho*Ⅰ分别双酶切PCR扩增后的rPB-DR(6)启动子和穿梭质粒p55-tp,回收495 bp的rPB-DR(6)启动子片段和8 957 bp的线性化的E1A+E1B19K片段,应用Solution Ⅰ连接酶连接。将连接产物转化DH5α感受态大肠杆菌,涂布于含AMP^+ LB平板上培养过夜,挑取生长的细菌单克隆,应用质粒DNA制备试剂盒,抽提阳性克隆的质粒DNA,酶切鉴定正确后命名为p55-rPB-DR(6)。②p55-mCMV-CD重组质粒的构建。以pCD2为模板,扩增自杀基因CD,引物P3(上游):5′-CCGGAATTCATTCAGGCTAGCAATGTCG-3′,P4(下游):5′-ACGCGTCGACGCATTTTTGCACATGGC-3′,引物分别含有*Eco*RⅠ、*Sal*Ⅰ酶切位点,长度为1 499 bp,用*Eco*RⅠ、*Sal*Ⅰ分别双酶切PCR扩增后的CD基因和pDC315-EGFP,回收、连接,将CD基因插入到mCMV启动子之后,酶切鉴定正确后命名为pDC315-CD。③同理,依次构建出p55-mCMV-CD、p55-rPB-DR(6)-mCMV-CD(简写为p55-rPC)质粒,并鉴定正确。④质粒p55-rPC与腺病毒骨架质粒pPE3在293细胞共转染并包装。将质粒p55-rPC与腺病毒骨架质粒pPE3通过Lipofectamine 2000共转染至293细胞,包装出重组溶瘤腺病毒Ad5-rPB-DR(6)-mCMV-CD,简称Ad5-rPC。培养10~15 d后显微镜下观察80%细胞脱壁,收集细胞,在-80~37 ℃冻融3次。离心后收集上清。得到种子病毒上清,冻存在-80 ℃备用。⑤重组溶瘤腺病毒的扩增、纯化、滴度测定。取种子病毒液感染融合度80%的293细胞,感染3~6 d后出现细胞病变效应,收集病毒液,用该病毒液再次感染293细胞,如此重复4次,收集含病毒上清液,并用CsCⅠ梯度法纯化病毒,半数组织培养感染剂量法($TCID_{50}$)测定病毒滴度。⑥重组溶瘤腺病毒的提取及鉴定。提取溶瘤腺病毒DNA,具体方法参考QIAamp DNA Blood Mini Kit试剂盒说明书。以提取的重组病毒DNA作PCR模板,用rPB-DR(6)、CD、E1A,mCMV(540 bp)特异引物行PCR,rPB-DR(6)、CD引物同1.2.1,E1A引物:P5(上游):5′-GGGCGTAACCGAGTAAGATTTG-3′,P6(下游):5′-TGGAAGATTATCAGCCAGTAC-3′,扩增产物长度在野生型病毒为455 bp,在有rPB-DR(6)插入的重组病毒为783 bp;mCMV引物:P7(上游):5′-GAGTCATTAGGGACTTTCCAA-3′,P8(下游):5′-CTGCGTTCTACGGTGGTCAGAC-3′,扩增产物长度为540 bp。产物采用1%琼脂糖凝胶电泳。

1.2.2 重组溶瘤腺病毒对2种亚型的前列腺癌细胞靶向复制能力的检测 将对数生长期的LNCaP、DU145、C4-2和MKN45细胞消化,计数并稀释为5×10^5/mL,接种于24孔板,次日以MOI=1 pfu/细胞的Ad5-rPC、Ad5(wt)病毒感染细胞,每孔加入200 μL病毒稀释液。在感染48 h后,吸取培养液,每孔加入含有5 μmol/L维甲酸培养基继续培养5 d,先将上清收获在EP管中,再将细胞刮下并入上清中,-80~37 ℃反复冻融3次释放病毒,10 000 r/min离心5 min去细胞碎片得到含病毒的上清液,用$TCID_{50}$法测定病毒滴度。

1.2.3 Western blot检测E1A、CD蛋白表达 以MOI=1 pfu/细胞的Ad5-rPC、Ad5(wt)病毒感染前列腺癌细胞系LNCaP、DU145、C4-2和MKN45。48 h后收集细胞,RIPA提取核蛋白,用BCA法定量蛋白,变性后60 μg/孔行SDS-PAGE电泳,湿转法转膜,210 mA恒流,2 h,一抗二抗杂交反应后,ECL显影。

1.2.4 重组溶瘤腺病毒对前列腺癌细胞特异性杀伤效应的检测 前列腺癌细胞LNCaP、DU145、C4-2和胃癌细胞MKN45融合度80%~90%时分别铺96孔板:5×10^3/孔,100 μL含10% FBS的DMEM培养基/孔;4种细胞分别感染病毒Ad5-rPC、Ad5(wt),按MOI=0.1、1、10、50加病毒稀释液100 μL/孔,分成不同的感染复数组,设空白组和不感染细胞作对照组,每

个条件设置 8 个复孔，继续在 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养 48 h，每个不同的感染复数组中选择 4 个复孔，更换含有 5 μmol/L 维甲酸、10 μmol/L 5-FC 的培养基继续培养 5 d，每孔加入 20 μL 7Sea-CCK-8 溶液，继续在培养箱内培养 2 h 后，用酶标仪测定在 450 nm 处的光密度值[D(450)]，根据公式计算每孔细胞活性，计算各组细胞的存活率：细胞的存活率 =[病毒组 D(450)值 − 空白组 D(450)值]/[对照组 D(450)值 − 空白组 D(450)值]×100%。

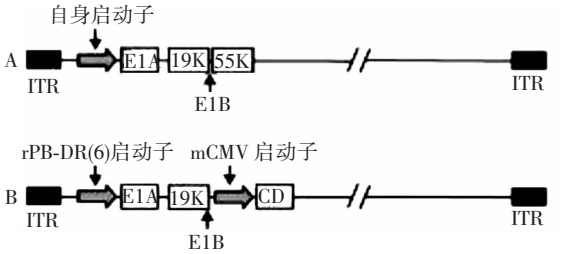
1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，2 组间均数比较用 t 检验。

2 结果

2.1 重组溶瘤腺病毒 Ad5-rPC 的构建

图 1 为 Ad5-rPC 结构示意图。



A：Ad5(wt)；B：Ad5-rPC

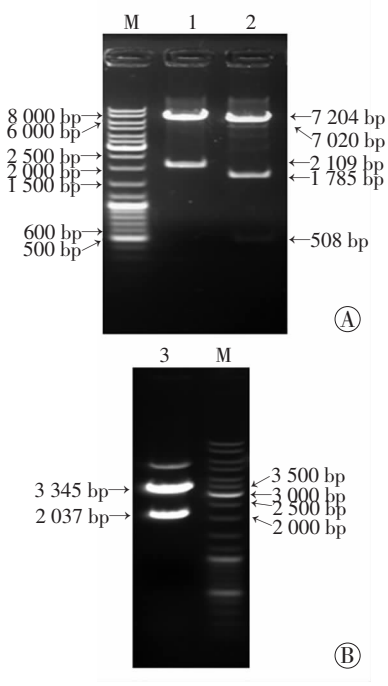
图 1 重组溶瘤腺病毒 Ad5-rPC 的构建示意图

2.1.1 重组质粒 p55-rPB-DR(6)酶切鉴定 重组质粒 p55-rPB-DR(6)经 *Xba*Ⅰ + *Eco*RⅠ双切酶应得到 7 204 bp 和 2 109 bp 2 条条带，经 *Nco* Ⅰ 酶切应得到 7 020 bp + 1 785 bp + 508 bp 3 条条带，电泳结果(图 2A)与预期值一致，将质粒送北京奥科公司测序，经测序正确，表明成功构建了 p55-rPB-DR(6)重组质粒。

2.1.2 质粒 pDC315-CD 鉴定 质粒 pDC315-CD 经 *Xba* Ⅰ + *Sal* Ⅰ 双切酶应得到 3 345 bp 和 2 037 bp 2 条条带，电泳结果(图 2B)与预期大小一致，经测序正确，命名为 pDC315-CD。

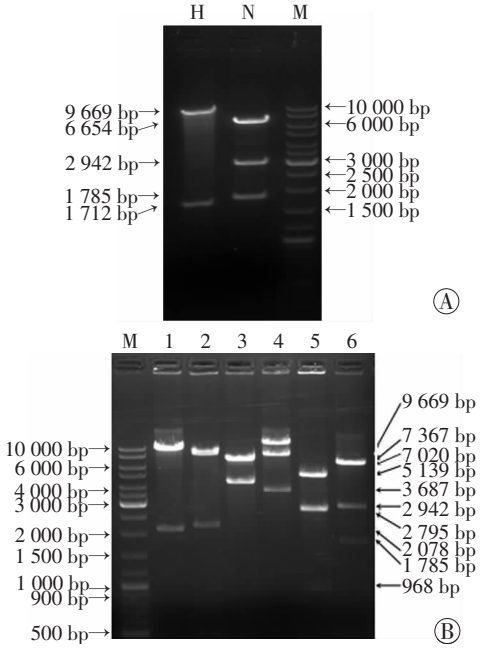
2.1.3 p55-mCMV-CD 的酶切鉴定 构建的 p55-mCMV-CD 经 *Hind*Ⅲ + *Xba* Ⅰ 双切酶应得到 9 669 bp 和 1 712 bp 2 条条带，经 *Nco* Ⅰ 酶切应得到大小 6 654、2 942、1 785 bp 的 3 条条带，产物电泳显示条带位置与预期一致(图 3A)。表明 p55-mCMV-CD 构建正确。

2.1.4 质粒 p55-rPC 构建和鉴定 重组质粒 p55-rPC 相对分子质量为 11 747 bp，经 *Xba* Ⅰ 和 *Hind*Ⅲ 双酶切后可得到 9 669 bp和 2 078 bp 2 个片段，经 *Age* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切后可得到 9 053、2 199 bp 和 495 bp 3 个片段，经 *Age* Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 双酶切后可得到 7 367 bp 和 4 380 bp 2 个片段，经 *Eco*R Ⅰ 酶切后可得到 8 060 bp 和 3 687 bp 2 个片段，经 *Hinc* Ⅱ 酶切后可得到 5 139、2 844、2 795 bp 和 968 bp 4 个片段，经 *Nco* Ⅰ 酶切后可得到 7 020、2 942 bp 和 1 785 bp 3 个片段，图 3B 显示酶切电泳结果与预期大小相符，表明成功构建了含 rPB-DR(6)启动子及 mCMV 启动子驱动的 CD 基因的重组腺病毒质粒 p55-rPC。



M：Mix DNA Ladder；1：*Xba*Ⅰ + *Eco*RⅠ酶切 p55-rPB-DR(6)；2：*Nco*Ⅰ酶切 p55-rPB-DR(6)；3：*Xba*Ⅰ + *Sal*Ⅰ酶切 pDC315-CD

图 2 重组质粒 p55-rPB-DR(6)(A)及 pDC315-CD(B)酶切鉴定

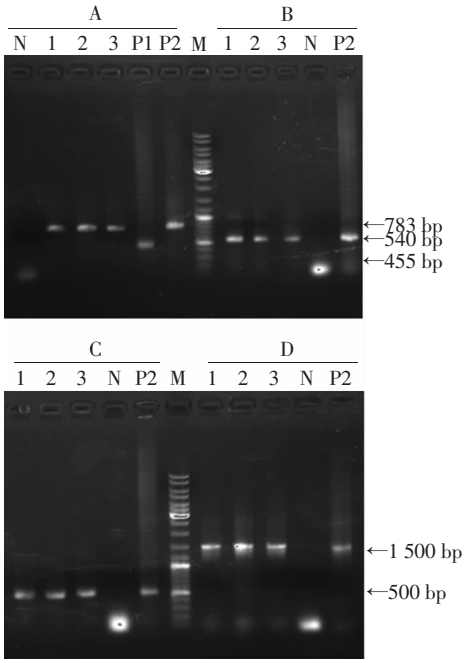


M：Mix DNA Ladder；H：*Hind*Ⅲ + *Xba* Ⅰ 双切酶 p55-mCMV-CD；N：*Nco*Ⅰ 酶切 p55-mCMV-CD；1：*Xba* Ⅰ + *Hind*Ⅲ 酶切 p55-rPC；2：*Age* Ⅰ + *Xho* Ⅰ 酶切 p55-rPC；3：*Age* Ⅰ + *Sal* Ⅰ 酶切 p55-rPC；4：*Eco*R Ⅰ 酶切 p55-rPC；5：*Hinc* Ⅱ 酶切 p55-rPC；6：*Nco* Ⅰ 酶切 p55-rPC

图 3 重组质粒 p55-mCMV-CD(A)及 p55-rPC(B)酶切鉴定

2.1.5 重组溶瘤腺病毒的鉴定及滴度测定 将质粒 p55-rPC 与 pPE3 通过 Lipofectamine2000 共转染至 293 细胞。10 d 后包装出病毒，提取溶瘤腺病毒 DNA，并行 PCR 鉴定(图 4)。①鉴定 E1A：引物 P5、P6 以 p55-rPC 质粒质粒为模板，扩增产物长度为 783 bp，包含全长的 rPB-DR(6)，而对无 rPB-DR(6)插入的质粒 pXC20(pXC1 经过改造)，扩增片段长度为 455 bp，如

图4A所示,1~3号均存在与p55-rPC质粒相同的783 bp条带,而pXC20则存在约455 bp的条带,说明病毒重组成功。②鉴定mCMV启动子:如图4B,采用引物P7、P8,以重组溶瘤腺病毒1~3 DNA为模板,扩增产物均存在与阳性对照(p55-rPC)相同的条带,说明病毒中均存在mCMV启动子。③鉴定病毒中rPB-DR(6)启动子:如图4C,采用rPB-DR(6)启动子引物P1、P2,以重组溶瘤腺病毒1~3 DNA为模板,均扩增出与p55-rPC质粒相同的条带(495 bp),说明rPB-DR(6)启动子成功插入重组病毒。④鉴定CD基因:如图4D,采用CD基因引物P3、P4,扩增产物均存在1 499 bp产物条带,说明重组病毒中均存在CD基因。经大量扩增用$TCID_{50}$法测定病毒滴度为1.1×10^{11} pfu/mL。

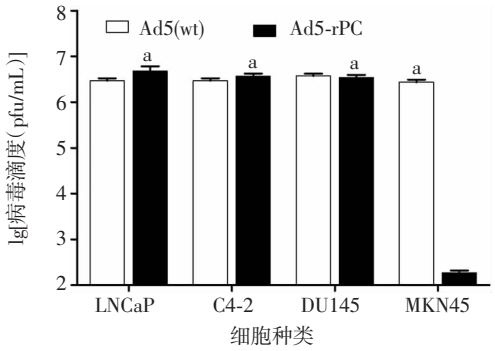


N:阴性对照;M:DNA ladder mix;P1:pXC20质粒;P2:p55- rPC质粒;1~3:Ad5-rPC病毒DNA的3个克隆;A:E1A引物;B:mCMV启动子引物;C:rPB-DR(6)启动子引物;D:CD基因引物

图4 重组溶瘤腺病毒Ad5-rPC鉴定

2.2 重组溶瘤腺病毒选择性复制能力测定

Ad5(wt)和Ad5-rPC病毒感染前列腺癌细胞系细胞产生子代病毒滴度均大于3.0×10^{6} pfu/mL,而Ad5(wt)感染MKN45产生子代病毒的滴度与Ad5-rPC病毒转染MKN45细胞具有显著性差异($P<0.01$)。提示Ad5-rPC病毒感染2种前列腺癌细胞均具有靶向复制能力,而感染非前列腺癌细胞基本无复制能力(图5)。



a:$P<0.01$,与Ad5-rPC感染MKN45细胞比较

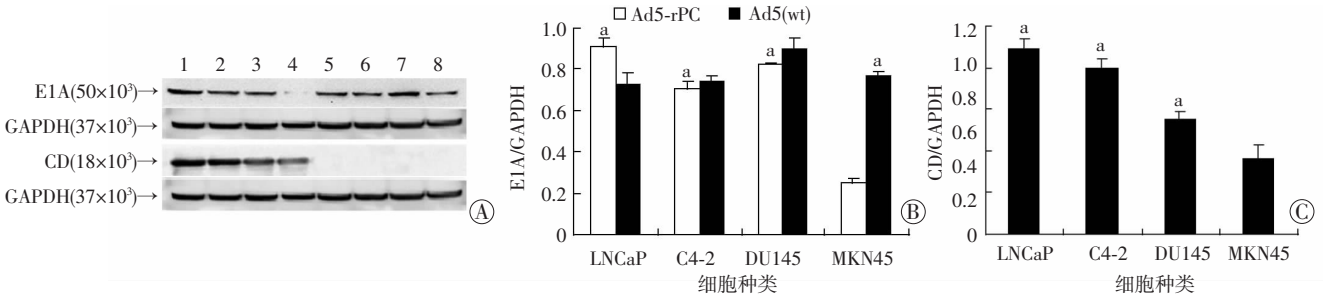
图5 $TCID_{50}$法检测重组腺病毒感染癌细胞后的复制能力

2.3 Western blot检测重组溶瘤腺病毒感染的癌细胞E1A和CD蛋白表达

采用Western blot法检测病毒Ad5-rPC感染不同细胞后早期基因E1A和自杀基因CD蛋白表达水平,如图6所示,在前列腺癌细胞系细胞,病毒E1A的蛋白表达水平明显高于MKN45($P<0.05$),而Ad5(wt)感染的所有类型的癌细胞中早期E1A蛋白表达没有显著差别。自杀基因CD蛋白在病毒Ad5-rPC感染的癌细胞中均有表达,且LNCaP、DU145、C4-2和胃癌MKN45之间有明显差异($P<0.05$),而在Ad5(wt)感染的癌细胞中自杀基因CD蛋白均无表达。

2.4 重组溶瘤腺病毒细胞毒性测定

从表1中看出Ad5(wt)感染癌细胞,随着MOI值的增加,细胞毒性也逐渐增加。当MOI=1或10时,无论是否添加5-FC,Ad5-rPC病毒感染前列腺癌细胞系时细胞毒性远大于感染MKN45细胞毒性。且当MOI=1时,在5-FC存在的情况下,Ad5-rPC病毒细胞毒性比不添加5-FC时毒性显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。而在MOI=10,无论是否添加5-FC,该病毒杀伤前列腺癌细胞系细胞的能力没有显著性差异。而Ad5-rPC病毒对非前列腺癌细胞(MKN45)毒性远小于Ad5(wt)对该细胞的毒性(MOI=1或10),且具有统计学意义($P<0.05$)。



A:Western blot检测结果;1:Ad5-rPC感染LNCaP;2:Ad5-rPC感染C4-2;3:Ad5-rPC感染DU145;4:Ad5-rPC感染MKN45;5:Ad5(wt)感染LNCaP;6:Ad5(wt)感染C4-2;7:Ad5(wt)感染DU145;8:Ad5(wt)感染MKN45;B:E1A蛋白半定量分析;C:CD蛋白半定量分析;a:$P<0.05$,与Ad5-rPC感染MKN45比较

图6 Western blot检测重组腺病毒感染癌细胞后E1A和CD蛋白表达

表1 CCK-8检测重组腺病毒感染癌细胞后的存活率（%，$n=4$，$\bar{x}\pm s$）

细胞类型	Ad5(wt)		Ad5-rPC(加维甲酸)		Ad5-rPC(加维甲酸、5-FC)	
	MOI=1	MOI=10	MOI=1	MOI=10	MOI=1	MOI=10
LNCaP	0.60±0.02[a]	0.26±0.03	0.73±0.02[a]	0.26±0.04	0.26±0.03	0.25±0.03
DU145	0.55±0.03[a]	0.25±0.02	0.64±0.03[a]	0.30±0.04	0.28±0.03	0.27±0.04
C4-2	0.60±0.02[a]	0.35±0.04	0.70±0.02[a]	0.31±0.01	0.33±0.03	0.30±0.04
MKN45	0.56±0.02[c]	0.23±0.02[c]	0.97±0.01[b]	0.93±0.01[b]	0.96±0.02[b]	0.94±0.04[b]

a：$P<0.05$，与Ad5-rPC(维甲酸、5-FC)比较；b：$P<0.05$，与Ad5-rPC 3种前列腺癌细胞比较；c：$P<0.05$，与Ad5-rPC比较

3 讨论

AIPC是前列腺癌治疗的难点，现有的治疗手段，如化疗、放疗等，尽管可以缓解病情，但不能提高生存率。至今还没有能治愈AIPC的疗法[3-4]。目前针对AIPC治疗的实验研究也进展缓慢，尚无明显突破。阻断雄激素受体(AR)基因的表达可在一定程度上抑制前列腺癌细胞的增殖分化，但不能完全杀灭癌细胞，而且对于不表达AR的前列腺癌细胞无效[6]。采用自杀基因、反义c-myc等进行的一些实验研究尽管取得了可喜进展[7-8]，但由于受载体的限制、特异性不高或目的基因的表达水平低而难以向临床过渡。因此，探索新的治疗方法以走出目前AIPC治疗的困境是非常必要的。以溶瘤腺病毒为载体的基因-病毒治疗[9](gene-virotherapy)为雄激素非依赖性前列腺癌的治疗提供了一种新的方法。溶瘤腺病毒又称条件性增殖型腺病毒，有别于目前常用的复制缺陷型腺病毒，它可以特异性地在组织/肿瘤细胞内增殖，从而溶解、杀伤肿瘤细胞；子代病毒从溶解的细胞中释放出来，可以继续感染周围其他细胞，疗效可以逐渐放大，最终消灭肿瘤。目前构建溶瘤腺病毒主要有2种方法：第一种方法是删除腺病毒在肿瘤细胞中复制不必需的基因，而这些基因对于腺病毒在正常细胞复制却必不可少。如代表作之一是有ONYX公司生产的ONYX-015病毒[10]，该病毒是删除了5型野生型腺病毒的早期基因E1B-55k，使该病毒只能在缺失p53功能的肿瘤细胞内复制，而不能在正常细胞内复制。第二个方法是用肿瘤或组织特异性启动子代替天然的病毒启动子来控制病毒的必需集团的表达，如用肿瘤特异性启动子替代腺病毒E1A或E1B的天然启动子[11]，当启动子被激活，启动特异性复制。

在前列腺癌的基因-病毒治疗中，前列腺特异性启动子的克隆和改建为前列腺癌的靶向特异性基因——病毒治疗奠定了基础。目前根据前列腺组织的特异性已克隆出许多不同的启动子或增强子，来调控溶瘤腺病毒对前列腺癌的靶向复制能力[12-13]。而rPB启动子已证实可驱动外源基因在体外培养的前列腺癌细胞中特异的表达，受雄激素调节，通过雄激素结合位点与AR结合而发挥作用。故只在AR阳性前列腺癌细胞中起作用，而对AR阴性的AIPC则不起作用，故rPB启动子的应用受限。为了使前列腺特异的启动子能在雄激素依赖性和非依赖的前列腺癌细胞中发挥作用，必须对该启动子进行改建。在我们之前的研究中已经成功地对rPB启动子进行了改建，我们用维甲酸反应元件(RARE)替换雄激素反应元件(ARE)，构建了rPB-DR(6)启动子。该启动子保持了前列腺组织特异性，同时可以对维甲酸-维甲酸受体复合物起反应。由于所有的前列腺癌均表达维甲酸受体，在维甲酸存在时，rPB-DR(6)启动子可特异性地在前列腺癌细胞(包括所有类型的AIPC)中起作用，驱动下游基因表达，故该启动子可用于构建针对AIPC的溶瘤腺病毒；实验证实该启动子驱动的报告基因可在雄激素依赖和非依赖性前列腺癌中高表达，而在非前列腺癌细胞中不表达[5]。同时为了获得最大程度的肿瘤杀伤作用，研究者还构建了携带肿瘤治疗基因的溶瘤腺病毒进行基因-病毒治疗。这些肿瘤治疗基因包括自杀基因(CD、TK)[14]、IL-12[15]、IL-24[16]、PTEN[13]、PNP[17]等。这种治疗方法的优势在于抗癌基因随溶瘤腺病毒在肿瘤细胞中增殖而被复制，溶瘤腺病毒可特异性地在肿瘤细胞中增殖数百至数千倍，抗癌基因也就被复制数百至数千倍，从而极大地增强了溶瘤腺病毒的抗肿瘤作用。Liu等[18]采用溶瘤腺病毒携带胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase，CD)基因用于黑素瘤的治疗研究，发现其抗肿瘤作用较单纯的溶瘤腺病毒有显著的提高。

本研究中，我们采用rPB-DR(6)启动子调控腺病毒复制的必需基因E1A，可特异性地在雄激素依赖性与非依赖性前列腺癌细胞内增殖，并且删除腺病毒E1B-55 kd插入mCMV启动子以及其调控的自杀基因

CD,并能进一步增强重组溶瘤腺病毒对肿瘤细胞的杀伤作用,因此本实验在此基础上,成功构建了 Ad5-rPC 重组溶瘤腺病毒。本研究构建的溶瘤腺病毒感染前列腺癌细胞系细胞(LNCaP、DU145、C4-2)以及胃癌 MKN45 细胞的结果提示:在 MOI = 1 时,在维甲酸、5-FC的诱导下 Ad5-rPB-DR(6)-mCMV-CD 感染前列腺癌细胞系细胞(LNCaP、DU145、C4-2)杀伤作用明显大于只加维甲酸的情况,且具有统计学意义($P < 0.05$),且在 MOI = 10 时,无论 5-FC 是否存在,Ad5-rPC 对前列腺癌细胞系所有细胞杀伤作用无显著差异($P > 0.05$),而 Ad5-rPC 病毒对非前列腺癌细胞的杀伤作用却很弱[在 MOI = 10,Ad5(wt)对 MKN45 的杀伤作用是该病毒的 5 倍多],提示在高浓度的感染复数条件下,病毒直接复制导致对细胞的杀伤作用足够杀伤大部分前列腺癌细胞。而在较低感染复数条件下,Ad5-rPC 对前列腺癌细胞杀伤主要通过 rPB-DR(6)启动子调控病毒靶向性复制和自杀基因 CD 引起的细胞毒性的双重作用而达到的。由于高浓度病毒会增加潜在并发症的危险性,限制了其在临床上的应用,因此低浓度病毒对体内治疗前列腺癌具有明显优势。

综上所述,本研究成功构建了能特异性杀伤雄激素依赖性与非依赖性前列腺癌细胞的溶瘤腺病毒,为攻克 AIPC 这一治疗难题提供了一种新方法。

参考文献:

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al*. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69 - 90.

[2] 徐威业, 曹凤宏, 景中民, 等. 雄激素受体及相关通道在激素非依赖性前列腺癌中的研究进展[J]. 华北煤炭医学院学报, 2010, 12(5): 635 - 637.

[3] Devlin H L, Mudryj M. Progression of prostate cancer: multiple pathways to androgen independence[J]. Cancer Lett, 2009, 274(2): 177 - 186.

[4] McPhaul M J. Mechanisms of prostate cancer progression to androgen independence[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2008, 22(2): 373 - 388.

[5] 张尧, 江军, 王洛夫. 前列腺特异性启动子 rPB 的改造及其载体质粒的构建和活性测定[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(10): 981 - 984.

[6] Singh P, Uzgare A, Litvinov I, *et al*. Combinatorial androgen receptor targeted therapy for prostate cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2006, 13(3): 653 - 666.

[7] Yang G, Timme T L, Frolov A, *et al*. Combined c-Myc and caveolin-1 expression in human prostate carcinoma predicts prostate carcinoma progression[J]. Cancer, 2005, 103(6): 1186 - 1194.

[8] Yu C, Wu G, Dang N, *et al*. Inhibition of N-myc downstream-regulated gene 2 in prostatic carcinoma[J]. Cancer Biol Ther, 2011, 12(4): 304 - 313.

[9] de-Vrij J, Willemsen R A, Lindholm L, *et al*. Adenovirus-derived vectors for prostate cancer gene therapy[J]. Hum Gene Ther, 2010, 21(7): 795 - 805.

[10] Zhang Z L, Zou W G, Luo C X, *et al*. An armed oncolytic adenovirus system, ZD55-gene, demonstrating potent antitumoral efficacy[J]. Cell Res, 2003, 13(6): 481 - 489.

[11] Zhang K J, Wang Y G, Cao X, *et al*. Potent antitumor effect of interleukin-24 gene in the survivin promoter and retinoblastoma double-regulated oncolytic adenovirus[J]. Hum Gene Ther, 2009, 20(8): 818 - 830.

[12] Ding M, Cao X, Xu H N, *et al*. Prostate cancer-specific and potent antitumor effect of a DD3-controlled oncolytic virus harboring the PTEN gene[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35153.

[13] Zhang M, Wang J, Li C, *et al*. Potent growth-inhibitory effect of a dual cancer-specific oncolytic adenovirus expressing apoptin on prostate carcinoma[J]. Int J Oncol, 2013, 42(3): 1052 - 1060.

[14] Portsmouth D, Hlavaty J, Renner M. Suicide genes for cancer therapy[J]. Mol Aspects Med, 2007, 28(1): 4 - 41.

[15] Choi K J, Zhang S N, Choi I K, *et al*. Strengthening of antitumor immune memory and prevention of thymic atrophy mediated by adenovirus expressing IL-12 and GM-CSF[J]. Gene Ther, 2012, 19(7): 711 - 723.

[16] Fan J K, Wei N, Ding M, *et al*. Targeting Gene-ViroTherapy for prostate cancer by DD3-driven oncolytic virus-harboring interleukin-24 gene[J]. Int J Cancer, 2010, 127(3): 707 - 717.

[17] Xie X, Guo J, Kong Y, *et al*. Targeted expression of Escherichia coli purine nucleoside phosphorylase and Fludara? for prostate cancer therapy[J]. J Gene Med, 2011, 13(12): 680 - 691.

[18] Liu Y, Deisseroth A. Oncolytic adenoviral vector carrying the cytosine deaminase gene for melanoma gene therapy[J]. Cancer Gene Ther, 2006, 13(9): 845 - 855.

(**收稿**:2013-06-18;**修回**:2013-08-02)

(编辑 龙 亮)