基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1471-04

携带 GALV.fus 基因的重组单纯疱疹病毒的组装、扩增及鉴定

朱 冰[1],杨建茹[2],江跃全[1],陈诗奉[1],付新平[1],张力平[1],汪天虎[1],程 波[1]
(1. 重庆医科大学附属第二医院心胸外科,重庆 400010;2. 邯郸第六医院中心实验室,邯郸 056000)

【摘 要】目的:包装已成功构建的受Ⅰ型单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus Ⅰ,HSV-Ⅰ)晚期表达基因-UL38启动子调控的、嗜肿瘤单纯疱疹病毒介导的,长臂猿白血病病毒致融性外膜糖蛋白(Gibbon ape leukemia virus membrance fusion glycopratein,GALV.fus)基因质粒(HSV-UL38P- GALV.fus),无肿瘤特异性巨细胞病毒启动子(Cytomegalovirus promoter,CMVP)GALV.fus 质粒(HSV-CMVP- GALV.fus),GALV.fus 基因片段被增强型绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein,EGFP)基因片段所取代的治疗对照质粒(HSV-CMVP-EGFP),分别命名为 Synco-2、Synco-1、Baco-1。方法:扩增已成功构建的 HSV-UL38P- GALV.fus、HSV-CMVP- GALV.fus、HSV-CMVP-EGFP 质粒,然后分别在 Vero 细胞用脂质体转染、包装成重组嗜肿瘤单纯疱疹病毒。重组单纯疱疹病毒的扩增及纯化采用 Vero 细胞及氯化铯纯化常规方法,病毒滴度测定采用 TCID50 法。Synco-1、Synco-2 病毒感染肝癌细胞株 HepG2,分别提取受染肝癌细胞 HepG2 的总 RNA,以 RT-PCR 的方法鉴定 GALV.fus 基因的表达。结果:成功包装了 3 种重组单纯疱疹病毒 Baco-1、Synco-1 和 Synco-2,按需要在 Vero 细胞内扩增后以氯化铯密度梯度离心法进行纯化,TCID50 法测得病毒滴度分别为 3×10^{10} pfu/ml,1×10^{11} pfu/ml 和 4×10^{10} pfu/ml。受染肝癌细胞株 HepG2 中以 RT-PCR 法检测到GALV.fus 基因的表达。结论:成功包装、扩增及纯化 3 种重组单纯疱疹病毒,受染肝癌细胞株 HepG2 中以 RT-PCR 法检测到 GALV.fus 基因的表达。

【关键词】I 型单纯疱疹病毒;长臂猿白血病病毒致融性外膜糖蛋白;基因重组
【中国图书分类法分类号】R373.1;R73-36 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-28

Packaging, amplification and identification of recombinant tumor-selective type I herpes simplex virus vector containing GALV.fus gene

ZHU Bing, et al
(*Department of Cardiothoracic Suegery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Package of constructed recombinant tumor-selective type I Herpes simplex virus vector plasmid containing UL38 and CMV promoter and GALV.fus gene (HSV-UL38P- GALV.fus、HSV-CMVP- GALV.fus),GALV.fus gene was replaced by EGFP in control plasmid(HSV-CMVP-EGFP). The three recombinant viruses were named Synco-2、Synco-1 and Baco-1 respectively。*Methods*: At first the three constructed plasmids were amplificated in coliform bacterium and transfected into Vero cells by using lipofectamine respectively. Then, these three recombinant type I Herpes simplex viruses were propagated in Vero cells and purified by cesium chloride density purification, titrated by TCID50 method. In the end, Total RNA was extracted from the HepG2 cells which were transfected by Synco-1 and Synco-2 and GALV.fus mRNA was detected by RT-PCR. *Results*:The three recombinant HSV-1 vectors were packaged successfully,which were propagated in Vero cells and purified by cesium chloride density purification,titrated by TCID50 method. The titre of Baco-1、Synco-1 and Synco-2 were 3×10^{10} pfu/ml, 1×10^{11} pfu/ml and 4×10^{10} pfu/ml respectively.GALV.fus gene were identified in the infected HepG2 cells. *Conclusion*:We packed,amplificated and purified Recombinant HSV-I virus successfully and the expression of GALV.fus gene was identified in the infected HepG2 cells by RT-PCR.

【Key words】Type I Herpes simplex virus;Gibbon ape leukemia virus membrane fusion glycoprotein;Gene recombination

肺癌是最常见导致人类死亡的病因之一,常用治疗方法包括手术治疗、化学和放射治疗,疗效不乐观,因而肺癌的基因治疗越来越倍受世人的关注,其中部分肿瘤基因治疗方案已在一些临床治疗实验中取得了肯定疗效。肺癌基因治疗中最常用的基因转移途径是目的基因及载体的瘤内注射,用于肺癌基因治疗的载体主要分为病毒载体和非病毒载体两类[1]。

单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus,HSV)是一个高容量、高效表达的载体,改造后的 HSV 能感染肿瘤细胞,而不感染正常细胞[2]。UL-38P 是Ⅰ型单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus

作者介绍:朱 冰(1974-),男,主治医师,博士,
研究方向:胸部肿瘤基因治疗的基础及临床研究。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30471984);重庆市卫生局资助项目(编号:06-2-001,07-2-116,2010-2-127)。

Ⅰ,HSV-Ⅰ)绝对晚期基因表达启动子,由于嗜肿瘤 HSV-I 载体具有仅在肿瘤细胞复制的特异性,受 UL-38P 调控的目的基因仅在肿瘤细胞的表达,使目的基因仅对肿瘤组织有破坏作用,而对正常细胞无损害作用,确保其应用的安全性[3]。在前期研究中,长臂猿白血病病毒致融性外膜糖蛋白(Gibbon ape leukemia virus membrance fusion glycopratein,GALV.fus)基因对肝癌细胞的强效杀伤作用已被证实[4],本实验拟包装已成功构建的携带 GALV.fus 基因分别受 UL-38 启动子和无肿瘤特异性巨细胞病毒启动子(Cytomegalovirus promoter,CMVP)调控的 HSV-Ⅰ Synco-2、Synco-1、Baco-1,并对 Synco-1、Synco-2 在肝癌细胞内的特异性表达进行检测,为肺部肿瘤的靶向性基因治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

(1)羊抗 GALV.fus 多克隆抗体(美国 R&D),胎牛血清(Fetal bovine serum,FBS)、生物素化兔抗羊二抗、抗原修复液(北京北方同正公司),DAB 试剂盒(武汉博士德)。质粒小量提取试剂盒(美国 Promega),DEPC、RNA 抽提试剂盒(德国 QIAGEN)、Access RT-PCR inductory system(美国 Promega)。转染试剂盒 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen)。GALV.fus 扩增引物(上海生物工程有限公司合成)F 5'-AAGAATTCT-TAACATGCACTTATCCTATCATT-3',R 5'-AAGAATTCATG GTATTGCTGCCTGGGTC-3'。扩增 GALV.fus 片段为 220 bp。

(2)质粒:重组嗜肿瘤 HSV-I 载体质粒及对照质粒[3]均由本室构建、保存。无肿瘤特异性巨细胞病毒启动子 HSV-CMVP-GALV.fus 质粒作为对照(Synco-1)。HSV-I 晚期表达基因 -UL38 启动子 HSV-UL38P-GALV.fus 质粒(Synco-2),UL-38 启动子在Ⅰ型嗜肿瘤 HSV 载体具有肿瘤特异性。GALV.fus 基因实验对照质粒,为 GALV.fus 基因片段被增强型绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein,EGFP)基因片段所取代,插入 fHSV-delta-pac 载体内,由 CMVP 驱动,构建成不具有细胞膜融合作用的病毒载体 HSV-CMVP-EGFP 作为治疗对照(Baco-1)。

(3)非洲绿猴肾细胞(African green monkey kidney cell,Vero)及人肝癌细胞株 HepG2 购于中科院上海细胞所,DH5α 大肠杆菌 GIBCO 公司,由重庆医科大学病毒性肝炎研究所保存,惠赠。

1.2 实验方法

1.2.1 DH5α 大肠杆菌感受态制备并质粒转化、提取过程[5]

1.2.1.1 制备感受态细菌 用接种环挑取 -70℃保存的 DH5α 接种于 2 ml LB 培养基中,37℃ 250 r/min 振摇过夜。1 ml 过夜菌加入含有 100 ml LB 培养基的 500 ml 烧瓶,37℃,200~300 r/min剧烈振摇 2~3 h,待 OD_{600} 值达到0.3~0.4。无菌条件下倒入 50 ml 冰预冷的无菌离心管内,冰浴 10~15 min。4℃离心,4 000 g×8 min,弃上清,10 ml 预冷的 100 mmol/L $CaCl_2$ 重悬菌体,冰浴 30 min。4℃离心,4 000 g× 8 min,弃上清。4 ml 预冷的 100 mmol/L $CaCl_2$ 重悬菌体,混匀分装置 4℃冷箱置 12~24 h,即可应用于转化。

1.2.1.2 质粒转化大肠杆菌 新鲜感受态细菌 200 μl 置于 1 ml 无菌 Ep 管中,分别将 HSV-UL-38P-GALV.fus、HSV-CMVP-GALV.fus 及 HSV-CMVP-EGFP 质粒 50~100 ng 加入以上 3 只含感受态细菌 Eppendorf 管冰浴 30 min,42℃热休克 90 s,0℃,2 min,每管加入无抗菌素的 37℃预热的普通 LB 培养基 1 ml,混匀,37℃,250 r/min 摇动震荡培养 1 h。分别取 3 种混悬液各 100 μl 在含氨苄青霉素(Ampicillin sodium,AP)的固体 LB 培养基平皿上划线涂布,室温干燥,然后倒置于 37℃温箱中培养过夜,次日转化菌平板出现菌落。

1.2.1.3 小量提取质粒 HSV-UL-38P-GALV.fus、HSV-CMVP-GALV.fus、HSV-CMVP-EGFP(按试剂盒流程操作) 从琼脂平板上挑取单个转化菌落,转至含 3 ml LB 选择培养基的试管内,37℃,250 r/min 振摇过夜,混浊时取 1 ml 加入 200 ml LB 选择培养基锥形瓶中 250 r/min, 37℃振摇过夜。用 30% 甘油冻存部分菌液于 -70℃。取其余菌液 1.5 ml 加入 EP 管中。12 000 r/min 离心 5 min,沉淀细菌。在细菌沉淀中加入 250 μl P1 液,反复吹打至彻底悬浮。加入 250 μl P2 混匀,室温静置 4 m。加入 350 μl P3 液,混匀。4℃ 12 000 r/min 离心 10 min,将上清液移入吸附柱,12 000 r/min 离心 15 s,倒掉液体;在吸附柱中加入 300 μl W1 液,12 000 r/min 离心 15 s,倒掉液体;在吸附柱中加入 600 μl W1 液,静置 1 min 后,12 000 r/min 离心 15 s,倒掉液体。12 000 r/min 离心 1 min;将吸附柱放入 1.5 ml EP 管中,在吸附膜中央小心加入 50 μl T1 液,室温静置 1 min,12 000 r/min 离心 1 min。将 1.5 ml EP 管中的质粒溶液置 -20℃冰箱保存。

1.2.2 细胞培养 将冻存细胞解冻,DMEM 培养基离心去上清, 制成细胞悬液, 细胞浓度以 5×10^5 个/ml 为宜,37℃和 5%CO_2 的培养箱内培养、传代。

1.2.3 HSV-Ⅰ在 Vero 细胞中的包装

1.2.3.1 GALV 质粒转染流程 Vero 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养及传代。转染前将 Vero 细胞按 2×10^5 个/ml 接种于 6 孔板,10%FBS 培养基 2 ml 培养过夜,80%~90%汇片时进行转染。先用 *Pac* Ⅰ 酶切 HSV-Ⅰ质粒,酒精沉淀,再重新悬浮于 20 μl 无菌水中。20 μl GALV 质粒及对照质粒 DNA+200 μl DMEM(无血清),加入 1.5 ml EP 管。轻柔手动打散,孵育 5 m。另一 1.5 ml EP 管准备 200 μl 无血清 DMEM,再加入 15 μl Lipofectamine^{2000}(与 DNA 之比约为 2∶1~3∶1),震荡混匀, 孵育 5 min。将孵育好的 Lipofectamine^{2000} 混悬液 200 μl 加入无血清 DMEM 及 GALV 质粒 DNA200 μl 中,总计 400 μl,轻柔震荡 1 min,室温下孵育 20~30 min。吸除 6 孔板 DMEM 培养液,2 ml 无血清 DMEM 清洗 2 次,加入 1 ml 无血清 DMEM,再逐滴加入 400 μl 混悬液,轻柔晃动 6 孔板混匀,37℃ 5% CO_2 孵箱孵育 4 h。吸除 1 ml 混悬液,加入 10% FBS 培养基 2 ml,37℃ 5% CO_2 孵箱孵育 24 h,吸除培养液,加入 1% FBS 培养基 2 ml 及 1%青链霉素,同时加入 24 μl HMBA

1.2.3.2 HSV-Ⅰ的获得 孵育 48~72 h 后,80%左右的Vero 细胞出现肿胀、变圆、脱落、凝聚成团等典型的细胞病变效应(Cytopathic effect,CPE)时,将细胞连同上清液刮至离心管中收获细胞,干冰及 37℃水浴箱反复冻融 4 次,破坏细胞,

10 000 r/min 离心 2 min,收取病毒上清。保留上清,用 50 ~ 100 μl 上清液再次感染 6 孔板 1 孔。

1.2.3.3 对照质粒病毒包装同上 对照质粒病毒转染 24 h 后荧光显微镜下观察为绿色荧光蛋白表达。

1.2.3.4 病毒的扩增 Vero 细胞培养瓶培养至生长密度达到 90%,用无血清 DMEM 稀释 HSV-Ⅰ上清,采用 0.01 空斑形成单位(pfu)/ 细胞感染 Vero 细胞,37℃ 5% CO_2 孵箱中孵育 2 h,加入 DMEM 完全培养液继续培养 2 ~ 3 d。待 80%左右的细胞出现细胞病变效应时收集细胞,1 000 g 离心 5 min 沉淀细胞。病毒保存溶液重悬细胞,-80℃/37℃反复冻融 4 次;20 000 r/min 离心 20 min 收集上清,反复扩增至需要病毒量。

1.2.3.5 氯化铯密度梯度离心法纯化 HSV-Ⅰ 离心机转头预冷至 4℃,取 Vero 细胞培养冻融液转入 50 ml 离心管,12 000 g × 10 min,取上清;加入等体积 20% PEG8000/2.5 mol/L NaCl,混匀,冰浴 60 min;4℃,12 500 g × 30 min,弃上清,重悬沉淀于 5 ml 1.1 g/ml 的 CsCl 溶液,4℃,8 000 g × 5 min,取上清;超速离心管中缓慢加入 1 层 2 ml 1.4 g/ml 的 CsCl;顺管壁小心轻轻加入另一层 3 ml 1.3 g/ml 的 CsCl;沿管壁加入 1.1 g/ml CsCl 重悬的病毒颗粒,约 5 ml,4℃,30 000 g 离心 3 h;取出离心管,在 1.3 g/ml 的 CsCl 和 1.4 g/ml 的 CsCl 交界处即为病毒颗粒层;用注射器收集病毒层溶液转移至无菌容器;4℃,透析 12 h,期间换液 3 次;提纯后病毒采用 PBS 液稀释,储存于 -80℃冰箱备用。

1.2.3.6 HSV-Ⅰ的滴度测定 50%组织培养感染剂量法(TCID50)[13]测定病毒滴度。收集 Vero 细胞,计数,20 ml 2% FBS/DMEM 重悬细胞,浓度为 10^5 个 /ml;于 2 块 96 孔板中每孔加入 100 μl 细胞悬液;准备病毒稀释液,各 10 个 Eppendorf 管;第 1 管中加入 0.9 ml 2% FBS/DMEM,其余加入 1.8 ml;第 1 管中再加入 0.1 ml 病毒保存液;反复吹打混匀,从第 1 管中吸取 0.2 ml 加入第 2 管中;依次反复稀释至最高稀释度;用同一管病毒保存液进行第 2 轮稀释;最后 8 个稀释液加入 96 孔板,每孔 0.1 ml,每个稀释度 10 孔,2 孔为阴性对照,37℃培养 5 d;3 d 后倒置显微镜下观察记录每一排中出现 CPE 的孔数;Karbers 公式计算病毒滴度。

1.2.4 HSV-Ⅰ携带的 GALV.fus 基因在真核细胞中的表达—RT-PCR 法

1.2.4.1 实验材料的处理 所有耗材以含 0.1%焦碳酸二乙酯(Diethypyrocarbonate,DEPC)的水浸泡 24 h,高压灭菌除去残留的 DEPC,烤干;无 RNA 酶纯水以 0.1% DEPC 处理 24 h,高压灭菌除去残留的 DEPC;人肝癌细胞株 HepG2,细胞培养同上,2 × 10^5 个/ml 接种于 6 孔板,10% FBS/RPMI1640 培养基 2 ml 培养过夜,80% ~ 90%汇片后,无血清培养液将细胞洗 2 遍,0.1 pfu 病毒单位的 HSV-Ⅰ Synco-1、Synco-2 分别感染 HepG2 细胞,设 PBS 处理的 HepG2 细胞作为对照组。

1.2.4.2 总 RNA 提取 待 HepG2 细胞转染 48 h 后,以 PBS 洗去死细胞,分别取 Synco-1、Synco-2 转染 HepG2 细胞及未转染 HepG2 细胞各 1 孔,将 600 μl 裂解缓冲液 RLT 轻轻加到细胞表面,吹打并将裂解物吸入离心管;高速离心 3 min,加入 600 μl 70%的乙醇,吹打混匀;将样品加到 RNA 吸附柱上,离心 10 000 r/min,15 s,以 700 μl RW1 洗涤液洗涤吸附柱,离心 10 000 r/min,15 s;以 500 μl RPE 洗涤液洗涤,离心 10 000 r/min,15 s;以 500 μl RPE 洗涤液洗涤,离心 10 000 r/min,15 s,将吸附柱放入新的收集管再离心 10 000 r/min,2 min;将吸附柱放入 1.5 ml 的离心管中,在吸附膜中央加入 30 ~ 50 μl 无 RNA 酶纯水洗脱,离心 10 000 r/min,1 min;将 RNA 分装为 2 μl 一管,冻存于 -70℃。

1.2.4.3 RT-PCR 50 μl 反应体系循环参数为 48℃ 45 min;94℃ 2 min;94℃ 30 s,52℃ 60 s,68℃ 120 s,30 个循环;68℃ 7 min;4℃ soak;扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测目的基因 GALV.fus mRNA 的表达。

2 结 果

2.1 HSV-Ⅰ在 Vero 细胞中的包装

荧光显微镜观察 HSV-CMVP-EGFP 包装结果。通过荧光显微镜,于第 2 d 可见单独的被感染细胞,第 4 d 可见大量细胞表达绿色荧光蛋白,同时细胞形态出现变圆、聚集的现象,转染率为 60%。倒置显微镜观察 HSV-UL38P-GALV.fus 和 HSV-CMVP-GALV.fus 包装结果,转染后 48 ~ 72 h,70%左右的 Vero 细胞出现肿胀、变圆、脱落、凝聚成团等典型的病变效应。

2.2 HSV-Ⅰ的扩增和纯化

HSV-CMVP-EGFP、HSV-CMVP-GALV.fus 和HSV-UL38P-GALV.fus 按需要在 Vero 细胞内扩增后以氯化铯密度梯度离心法进行纯化,TCID50 法测得病毒滴度分别为 3 × 10^{10} pfu/ml,1 × 10^{11} pfu/ml 和 4 × 10^{10} pfu/ml。

2.3 HSV-Ⅰ携带的 GALV.fus 基因在真核细胞中的表达

获得的病毒子感染 HepG2 细胞 48 h 后,收集细胞抽提总 RNA,用 RT-PCR 法检测目的基因的转录情况。结果显示 Synco-1、Synco-2 病毒在感染 HepG2 细胞中目的基因能进行有效转录,RT-PCR 产物经电泳后可出现 220 bp 的阳性条带;对照组 HepG2 细胞中未出现阳性条带(图 1、2)。

2.3.1 HepG2 细胞总 RNA 提取结果 电泳结果显示 28 s 和 18 s 条带清晰,其间有明显的 smear 影。提示总 RNA 质量好,可以作为 RT-PCR 的模板(图 1)。

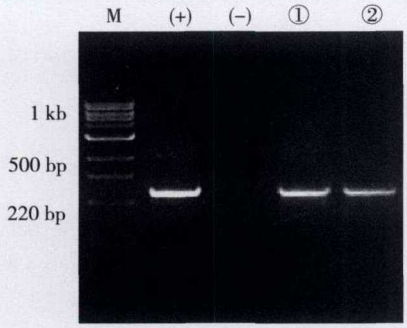
2.3.2 RT-PCR 证实 HepG2 细胞中有 GALV.fus 的表达 见图 2。

3 讨 论

人们在早期研究中发现部分肿瘤病人在感染病毒或接受疫苗接种后发生肿瘤消退的现象,提出了利用病毒来治疗人类肿瘤的病毒治疗概念[6]。HSV 是基因工程上的一种常用病毒,目前用于生物治疗的 HSV 主要来源于 HSV-Ⅰ,在基因治疗上也常被用作载体。HSV-Ⅰ基因组长为 152 kb,由 2 个相互连接的长节段(L)和短节段(S)线性双链 DNA 分子组成,由于它具有可在神经元细胞内建立潜伏感染、插入外源片段大、感染效率高、宿主细胞范围广、可感染静息期及非静息期细胞等优点,其应用已成为治疗神经系统疾病、肿瘤等



图 1 提取的总 RNA 电泳



HepG2 细胞 M. 100 bp DNA Ladder;(+)positive control; (-) negative control;①Synco-1;②Synco-2

图 2 RT-PCR 扩增 GALV.fus 编码基因电泳图

领域的研究热点。我们所应用的 HSV 为可复制性单纯疱疹病毒(Replication competent herpes simplex virus),即剔除了非必需基因、保留了复制相关基因,因其具有裂解细胞的特性,可作为溶瘤病毒 (Oncolytic virus)来选择性杀伤肿瘤细胞[7]。

本实验选用嗜肿瘤 HSV-Ⅰ(去掉神经毒性因子 r34.5基因)载体与其它嗜肿瘤病毒相比,具有以下独特的优点[8]:①HSV 载体对人类比较安全,HSV-I 病毒在美国已有多年的临床试验,如应用过程中即使出现病毒感染,临床也具有较为有效的抗病毒药物治疗。②病毒杀伤靶细胞效应明显强和快于其他病毒,体外实验表明,采用 0.01 空斑形成单位/细胞的剂量,疱疹病毒在 2 d 内可 100%杀死培养的癌细胞,而腺病毒要达到同样的治疗效果则需要较大的剂量和较长的时间,可较好避免机体免疫机制对生长较慢的病毒在靶细胞内快速的复制传播的限制。③动物实验表明,即使在机体内存在抗 HSV-I 免疫力时,其仍具有一定的复制能力和杀伤肿瘤作用。④HSV-I 嗜细胞谱广,能感染几乎至今所有已试验的人体肿瘤细胞。⑤由于 HSV-I 一般不整合入体细胞 DNA 内,所以应用其抗肿瘤治疗时,造成体细胞 DNA 插入性突变的危险性极小。⑥HSV-I 载体易于制备、纯化和浓缩,病毒滴度可以高达 10^{11} pfu/ml,可采用体内直接注射的方式进行基因治疗。

扩增的 HSV-Ⅰ需进行纯化和浓缩,其目的在于:①去除杂质蛋白以免引起严重的免疫反应;②区分观察到的效应是目的基因产生的蛋白引起而非 Vero 细胞增殖产生的蛋白引起;③体内注射需要高浓度的病毒。HSV-Ⅰ纯化的方法有多种,本研究应用氯化铯密度梯度离心法纯化,利用该法可很好保持 HSV-Ⅰ的感染力,并可 10 倍浓缩病毒,去除 99.9%以上的杂质蛋白[9,10]。本实验采用 TCID50 法进行 HSV 滴度的测定,3 种重组腺病毒纯化后的滴度均高达 3×10^{10} pfu/ml 以上,可有效应用于实验研究。

大量研究表明,GALV.fus 对人类许多肿瘤如脑、肝、乳腺、前列腺和卵巢癌都有致融性。GALV.fus 转化入许多人类肿瘤细胞后,可通过多细胞融合机制有效地杀死这些肿瘤细胞,并且通过旁杀伤效应破坏临近周围的肿瘤细胞。为了检测所获 HSV-Ⅰ GALV.fus 基因的的表达情况,本实验用 HSV-Ⅰ Synco-1 及 Synco-2 分别转染受染 HepG2 肝癌细胞,提取受染 HepG2 细胞的总 RNA,经 RT-PCR 法证实受染细胞均有 220 bp 电泳条带,而对照细胞为阴性表达,表明本实验成功包装、获得了 HSV-Ⅰ HSV-UL38P-GALV.fus、HSV-CMVP-GALV.fus 和 HSV-Ⅰ CMVP-EGFP,可成功转染、表达于真核细胞,为下一步体外及体内实验评估 HSV-Ⅰ抗肺癌细胞疗效做好了准备。

参 考 文 献

[1] McNeish I A, Bell S J ,Lemoine N R. Gene Therapy Progress and Prospects: cancer gene therapy using tumour suppressor genes [J].Gene Therapy ,2004,11(6):497-503.

[2] Faifh S A,Sweet T J,Bailey E,et al.Resveratrol suppresses nuclear factor-kappaB in herpes simplex virus infected cells[J].Antiviral Res,2006,72(3):242-251.

[3] Fu X P,Feng M,Tao L H,et al. A strict late viral promoter is a strong tumor-specific promoter in the context of an oncolytic herpes simplex virus [J].Gene Ther,2003,10(17):1458-1466.

[4] Higuchi H,Bronk S F,Bateman A,et al. Viral fusogenic membrane glycoprotein expression causes syncytia formation with bioenergetic cell death:*implications for gene therapy[J].Cancer* Res,2000,60(22):6396-6402.

[5] 斯佩克特 D L,戈德曼 R D,莱因万德 L A.细胞试验指南[M].北京:科学出版社,2001.830-831.

[6] Greenstone H L,Nieland J D,Visser K E,et al. Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumormodel[J].Medical Sci,1998,95(4):1800-1805.

[7] Boviatsis E J,Scharf J M,Chase M,et al.Antitumor activity and reporter gene transfer into rat brain neoplasms inoculated with herpes simplex virus vectors defective in thymidine kinase or ribonucleotide reduc*tase[J].Gene Ther,1994,1(5):323-331.*

[8] Toda M, Martuza R L,Kojima H,et al.In Situ Cancer Vaccination: An IL-12 Defective Vector/Replication-Competent Herpes Simplex Virus Combination Induces Local and Systemic Antitumor Activity[J].J Immunol,1998,5(160): 4457-4464.

[9] Jr Sainz B, Halford W P.Alpha/Beta Interferon and Gamma Interferon Synergize To Inhibit the Replication of Herpes Simplex Virus Type 1 [J].J Virol,2002,76(22):11541-11550.

[10] Guyader F L,Loisy F,Atmar R L,et al.Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues[J].Emerg Infect Dis,2006,12(6):931-936.

(责任编辑:张学颖)