维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)03-0314-04

肿瘤特异增殖型腺病毒穿梭质粒 pAd-delE1b55kD 的构建

王春毅,傅仲学

(重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建一种对肿瘤细胞有特异靶向性的高效载体 - 肿瘤特异增殖型腺病毒的穿梭质粒 pAd-delE1b55kD。方法:利用二步法 PCR 等基因重组技术,将质粒 pXC1 编码 E1B-55kD 蛋白的基因区域缺失,并保留一个 Bgl II 酶切位点,以便插入外源性基因;利用凝胶图像分析和基因测序验证所构建质粒的正确性。结果:质粒 pXC1 的基因序列中,编码 E1B-55kD 蛋白的基因区中的 2279 ~ 3326bp 区域缺失,该区域上游的序列中第 2024 位碱基 C 点突变为 T,第 2252 位碱基 C 点突变为 T 及第 2261 位碱基 G 点突变为 T,从而在该区域上游插入了终止密码子 TGA、TAG 和 TAA。在终止密码子下游,保留了一个 Bgl II 酶切位点。结论:成功构建了肿瘤特异增殖型腺病毒穿梭质粒载体 pAd-delE1b55kD,为肿瘤的基因治疗提供了一种对肿瘤细胞有特异靶向性的高效载体的穿梭质粒。

【关键词】肿瘤;基因治疗;肿瘤特异增殖型腺病毒;穿梭质粒

【中国图书分类法分类号】R656.9;Q782 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-10-14

Construction of replication-competent adenovirus shuttle plasmids pAd-delE1b55kD

WANG Chunyi, et al

(*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct a replication-competent adenovirus shuttle plasmids named pAd-delE1b55kD, which can transfect the cell of tumor targeted. *Methods*: delete the E1B55 region of pXC1 and retain a site for Bgl II by such technique of gene recombination as nested PCR; verify the correctness of pAd-delE1b55kD by gel image analysis and sequencing the gene order. *Results*: The 2279~3326 region of E1B in pXC1 was deleted. The 2024 basic radical C was mutated to T, the 2252 basic radical C to T and the 2261 basic radical G to T. Stop codon TGA、TAG and TAA were inserted. A site for Bgl II was retained in downstream of the stop codon. *Conclusion*: The replication-competent adenovirus shuttle plasmids named pAd-delE1b55kD is constructed, which provided a carrier for the gene therapy of tumor targeted.

【Key words】tumor; gene therapy; replication-competent adenovirus; shuttle plasmids

近年来,肿瘤的基因治疗在实验阶段取得了很大的进展,但其临床应用仍然存在许多问题,其中,缺乏能特异性转染肿瘤细胞的载体是其中一个重要因素。在肿瘤细胞中,P53 肿瘤抑制蛋白常为失活或变异,而正常细胞的 P53 没有这种改变。利用这一点,美国 ONYX 药物公司研制了肿瘤特异型病毒 ONYX - 015(又名 dl1520,CI1042),在已结束的 II 期临床试验中,用 ONYX-015 联合常规化疗治疗头颈部肿瘤,显示出良好的肿瘤靶向性和抗肿瘤能力(总有效率 63%,为迄今最有效的肿瘤生物治疗的临床报告之一)[1-4]。但是 ONYX-015 不能携带外源性基因片断,不能用做肿瘤基因的载体。为此,我们用两步法 PCR 敲除掉腺病毒穿梭质粒中编码的 E1B - 55kD 蛋白的序列,构建了肿瘤特异增殖性腺病毒的穿梭质粒载体 pAd-delE1b55kD。

1 材料与方法

1.1 材料

腺病毒穿梭质粒 pXC1 购自加拿大 Microbix Biosystems 公司。Taq DNA 聚合酶及缓冲系统购自美国 Promega 公司。脱氧核苷三磷酸(dNTP)购自美国 Gibco 公司。内切酶 Xba I

作者介绍:王春毅(1977-),男,住院医师,博士,主要研究方向:胃肠道肿瘤的基因治疗。

基金项目:本课题为重庆市自然科学基金项目(编号:2005BB5225)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

和 Bgl II 以及 100bp DNA Ladder Marker、T4 DNA 连接酶均购自宝生物工程（大连）有限公司。Lambda DNA/EcoR I+Hind III Marker 购自上海生工。DNA 胶回收试剂盒购自 Omega 公司。感受态细菌 DH5α 由本实验室保有。

设计引物两对，均由上海生工合成：

1）上游 P1：5′- ACG CCC GAC ATC ACC TGT GTC TAG AGA ATG CAA TAG -3′

下游 P2：5′ - CGC TCA GAT GGG TTT CTT CAC TCC ATT TAT CCT TTA-3′

2）上游 P3：5′ -TAA AGG ATA AAT GGA GTG AAG AAA CCC ATC TGA GCG -3′

下游 P4：5′ -GAA GAT CTA TAC AGT TAA GCC ACC TAT ACA ACA TTC -3′

（下划线处为酶切位点，加粗碱基为引入的突变碱基）

1.2 方法

(1) 第一次 PCR 及阳性条带回收：以 P1 及 P2 为引物，pXC1 为模板进行 PCR 扩增，反应条件：94℃ 3min→94℃ 30s→55℃ 30s→72℃ 60s, 30 Cycles→72℃ 5min。将反应产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，凝胶图像分析仪上观察结果，以出现约 725bp 条带为阳性条带，回收阳性条带，命名为 PCR1。通过第一次 PCR，将 pXC1 基因序列中第 2024 位碱基 C 点突变为 T，从而引入了终止密码子 TGA。

(2) 第二次 PCR 及阳性条带回收：以 P3 及 P4 为引物，pXC1 为模板进行 PCR 扩增，反应条件同第一次 PCR。将反应产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，凝胶图像分析仪上观察结果，以出现约 270bp 条带为阳性条带，回收阳性条带，命名为 PCR2。通过第一次 PCR，将 pXC1 基因序列中第 2252 位碱基 C 点突变为 T，第 2261 位碱基 G 点突变为 T，从而在该区域插入了终止密码子 TAG 和 TAA，并引入了 BglII 的酶切位点。

(3) 第三次 PCR 及阳性条带回收：将上述两次 PCR 产物混合，作为第三次 PCR 模板，引物采用 P1 和 P4。PCR 反应体系和反应条件同上。反应产物为 959bp。割胶回收，回收的产物命名为 PCR3。通过第三次 PCR，得到了 pXC1 基因序列中的 1319～2268 区域序列，其上游有一个 XbaI 酶切位点，下游有一个 BglII 酶切位点，便于下一步的酶切和连接。在编码 E1B-55kD 蛋白的基因序列起始位置引入了三个终止密码子，使 E1B-55kD 蛋白不能有效翻译，并使插入的外源性基因的表达不受其上游序列的影响。

(4) 将 PCR3 用 XbaI + BglII 酶切（共用 T buffer+BSA），直接过柱回收，命名为 PCR3 / XbaI + BglII；将对质粒 pXC1 进行 XbaI + BglII 酶切，1%琼脂糖凝胶电泳，凝胶图像分析仪上观察，出现约 1989+7916bp 左右的条带为正确。割胶回收 7916bp 的片段，回收的产物命名为 pXC1 / XbaI + BglII。

(5) 连接、提取及鉴定质粒：将 PCR3 / XbaI + BglII 与 pXC1 / XbaI + BglII 进行连接，16℃放置过夜。取其中 10μl，转化感受态细菌 DH5α，铺板（氨苄抗性）培养过夜。将培养板上长出的菌落挑取 4 个克隆，入 5ml LB 振荡培养过夜（10h），扩增质粒，手工提取质粒，编号 E1-4。将提取的 E1-4 号质粒用 XbaI + BglII 双酶切，1%琼脂糖凝胶电泳，凝胶图像分析仪上观察，出现约 933+7916bp 左右的条带为正确。以 P3 为引物测序 500bp，以证实编码 E1B-55kD 蛋白的基因区中的 2279～3326bp 区域缺失，并在编码 E1B-55kD 蛋白的基因序列起始位置引入了三个终止密码子，构建成 pAd-delE1b55kD(技术路线如图 1)。

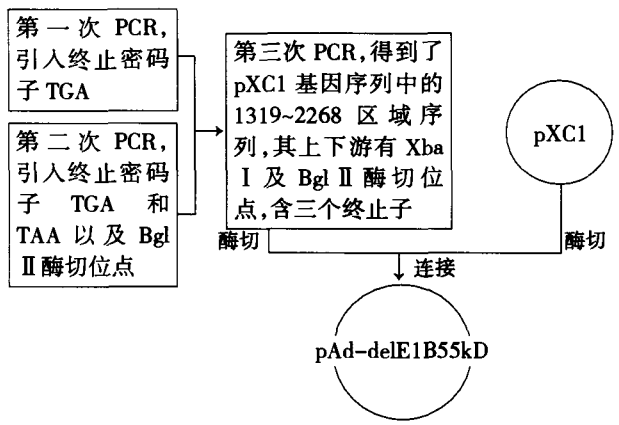
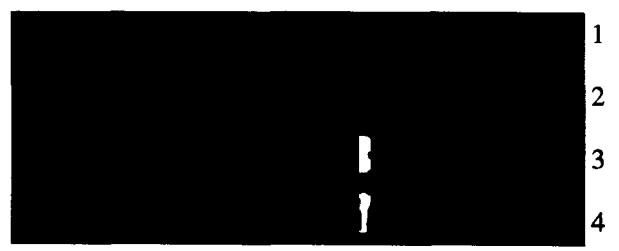


图 1 技术路线图

2 结 果

2.1 第一次 PCR 及阳性条带回收

凝胶图像分析仪上观察结果，出现约 725bp 阳性条带（图 2）。



1. 阴性对照
2. 100bp DNA ladder Marker
3-4. pXC1 PCR1 / P1+P2

图 2 第一次 PCR 后的阳性条带

2.2 第二次 PCR 及阳性条带回收

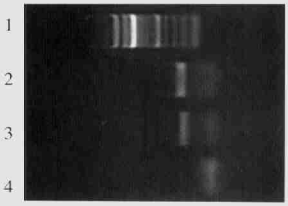
凝胶图像分析仪上观察结果，出现约 270bp 阳性条带（图 3）。

2.3 第三次 PCR 及阳性条带回收

凝胶图像分析仪上观察结果，出现约 959bp 阳性条带（图 4）。

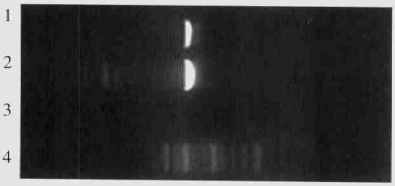
2.4 将对质粒 pXC1 进行 XbaI + BglII 酶切，1%琼脂糖凝胶电泳，凝胶图像分析仪上观察，出现约

维普资讯 http://www.cqvip.com



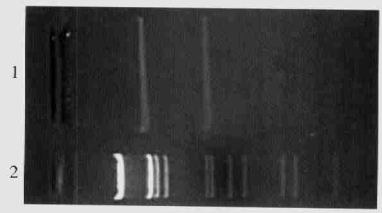
1. 100bp DNA ladder Marker
2–3. pXC1 PCR2 / P3+P4
4. 阴性对照

图 3 第二次 PCR 后的阳性条带



1 – 2. PCR3
3. 阴性对照
4. 100bp DNA ladder Marker

图 4 第三次 PCR 后的阳性条带



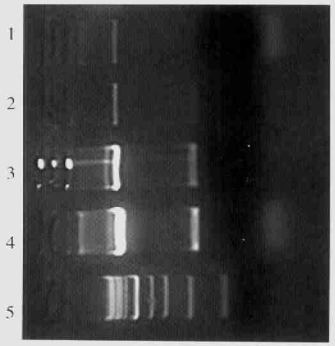
1. pXC1 / XbaI+BglII
2. λDNA / EcoRI+HindIII Marker

图 5 PCR3 用 XbaI+BglII 酶切后产物

1989+7916bp左右的条带(图 5)。

2.5 连接、提取及鉴定质粒

将提取的 E1–4 号质粒用 XbaI + BglII 双酶切，1%琼脂糖凝胶电泳，凝胶图像分析仪上观察，出现约 933+7916bp 左右的条带(图 6)。以 P3 为引物测序 500bp，结果显示缺失了 pXC1 载体的 2270 – 3327bp，且第 2024 位碱基 C 点突变为 T，第 2252 位碱基 C 点突变为 T 及第 2261 位碱基 G 点突变为 T，证实 pAd–delE1b55Kd 构建成功。



1–4. E 1–4 / XbaI + BglII
5. Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker

图 6 E1–4 号质粒 XbaI + BglII 双酶切鉴定结果

3 讨 论

在肿瘤的基因治疗中，以腺病毒为载体的方法较好，腺病毒的基因结构、功能清楚；易于制备、纯化、浓缩；宿主范围广；感染率高；理化性质稳定；腺病毒的 DNA 不整合到宿主细胞的染色体上去，而是单独存在于细胞核中，这样既避免了插入突变，又保证了转入基因的正常表达；既可以转染分裂期细胞又能转染静止期细胞。

P53 是宿主细胞抗腺病毒病毒的主要蛋白，正常细胞受腺病毒感染后即激活 P53，导致细胞凋亡，使病毒复制终止。然而，在极大多数情况下，正常细胞感染腺病毒后并没有立即出现凋亡，主要原因是野生型腺病毒尚存在着能抑制 P53 激活的蛋白，即 E1B 55kD 蛋白，因此野生型腺病毒能在正常细胞内增殖。当腺病毒缺失 E1B 55kD 蛋白时，正常细胞中的 P53 即被激活，使细胞很快凋亡，腺病毒不能再增殖，从而使感染终止。而 50%以上的肿瘤细胞中，P53 已突变或失活，病毒感染后，P53 不能被激活，因此缺乏 E1B 55kD 蛋白的腺病毒，仍能复制及增殖，使病毒在肿瘤细胞内大量复制，最终导致肿瘤细胞溶解死亡，并释放新的病毒感染其它肿瘤细胞。

鉴于此，美国 ONYX 药物公司研制了肿瘤特异型腺病毒 ONYX – 015。这是一种通过点突变和缺失突变导致 E1B 55kD 蛋白的 2 型与 5 型嵌合的腺

维普资讯 http://www.cqvip.com

病毒。其联合常规化疗治疗 30 例难治性头颈部肿瘤病人，19 例病人肿瘤缩小一半以上，其中 8 例完全缓解[4]。然而，单独使用 ONYX－015，对肿瘤的疗效仍较差[5]，且不能在该病毒的基因序列中插入外源治疗基因。

如在肿瘤治疗方面以这种缺乏 E1B 55kD 蛋白的肿瘤增殖型腺病毒为载体，则可具有以下优点：1.使外源性目的基因选择性地在肿瘤细胞内高效复制，可使治疗剂量大大减少；2.病毒在肿瘤细胞内复制，最终溶解肿瘤细胞；3.由于病毒只选择性地在肿瘤细胞中复制，减少了对正常细胞的细胞毒反应和对宿主的免疫反应。因此，可使外源基因特异性转染进入肿瘤细胞，可结合病毒治疗和基因治疗两者的优势，增强抗肿瘤效果。

在本研究中，我们通过基因重组将编码 E1B-55kD 蛋白的基因区中的 2279～3326bp 区域缺失，并通过二步法 PCR 将 pXC1 基因序列中第 2024 位碱基 C 点突变为 T，第 2252 位碱基 C 点突变为 T 及第 2261 位碱基 G 点突变为 T，从而在该区域插入了终止密码子 TGA、TAG 和 TAA，使 E1B-55kD 蛋白不能有效翻译，并使插入的外源性基因的表达不受其上游序列的影响[6]。在终止密码子下游，保留了一个 Bgl II 酶切位点，以便插入外源性基因。这样，我们构建了肿瘤特异增殖型腺病毒穿梭质粒载体 pAd-delE1b55kD，通过与骨架质粒共转染 293 细胞包装成毒，能携带外源性治疗基因特异性感染肿瘤细胞（大多数肿瘤细胞的 P53 基因突变或缺失），并使外源性基因在肿瘤细胞中高效表达，为肿瘤的基因治疗提供了一种对肿瘤细胞有特异靶向性的高效载体。

（通讯作者 傅仲学 Tel:(023)89012302
E-MAIL:fzx990521@sina.com）

参 考 文 献

[1] Bischof JR, Kirn DH, Williams A, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells [J]. Science, 1996;274:373-376.

[2] Heise CC, Williams AM, Xue S, et al. Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy[J].Cancer Res,1999;59(11):2623-2628.

[3] Goodrum FD, Ornelles DA. The early region IB 55-kilodalton oncoprotein of adenovirus relieves growth restrictions imposed on viral replication by the cell cycle[J]. J Virol, 1997;71:548-561.

[4] Fhuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, et al. A controlled trial of intratumral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer[J]. Nature Medicine, 2000;6:879-885.

[5] Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, et al. Selective Replication and Oncolysis in p53 Mutant Tumors with ONYX-015, an E1B-55kD Gene-deleted Adenovirus, in Patients with Advanced Head and Neck Cancer: A Phase II Trial[J]. Cancer Res,2000;60: 6359-6366.

[6] Zilai Z, Weiguo Z, Chunxia L, et al. An armed oncolytic adenovirus system, ZD55-gene, demonstrating potent antitumoral efficacy[J]. Cell research, 2003;13(6):481-489.

（上接第 313 页）

[5] Zeimet-A-G, Dellavalle, Patrick Walsh, et al. CUSP/p63 expression in basal cell carcinoma[J]. Experimental Dermatology, 2002;11(3):203.

[6] Bum-Joon Park, Seung-Jae Lee, Jin Il Kim, et al. Frequent Alteration of p63 Expression in Human Primary Bladder Carcinomas [J]. Cancer Research, 2000;60:3370-3374.

[7] Karin Nylander, OhiliP J, Coates, et a1. Chracterization of the expression Pattern if P63 α and ΔNP63 α in being and malignant oral epithelial lesions [J]. Int, J Cancer, 2000;87:368-372.

[8] Yamaguchi K, Wu L, Caballero OL, et al. Frequent gain of the p40/p51/p63 gene locus in primary head and neck squamous cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2000;86:684-689.

[9] Marshall J. Urist, Charles J. Di Como, Ming-Lan Lu, et al. Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer [J]. Am-J-Pathol, 2002;161(4):1199-1206.

[10] F Koga, S Kawakami, J Kumagai, et al. Impaired ΔN p63 expression associates with reduced β-catenin and aggressive phenotypes of urothelial neoplasms[J]. British Journal of Cancer, 2003;88:740-747.