

可诱导肿瘤靶向性IFN- α 2a重组腺病毒的构建及其表达

李祥[#] 璩津生[#] 康帅 何哲耘 杨纪峰 高基民*

(温州医学院生命与检验学院, 温州 325035)

摘要 腺病毒载体广泛应用于恶性肿瘤的靶向性基因治疗的研究, 但这些肿瘤靶向载体缺乏可控性, 其疗效和安全性受到很大的影响, 因此开发新型可诱导的生物肿瘤靶向载体是当今抗肿瘤靶向药物研究的当务之急。该研究构建了可诱导肿瘤靶向性IFN- α 2a重组腺病毒。重组腺病毒能够有效感染人肝癌细胞株HepG2等多种肿瘤细胞株, RT-PCR和Western blot结果表明肿瘤细胞能高效表达IFN- α 2a, 而其非肿瘤细胞株L02几乎没有表达。诱导试验表明重组腺病毒Ad MT-II-hTERT/IFN- α 2a能被ZnSO₄诱导表达。可诱导肿瘤靶向性重组腺病毒Ad MT-II-hTERT/IFN- α 2a成功构建为下一步体内外抑癌实验研究打下了基础。

关键词 肿瘤靶向性; 腺病毒; hTERT启动子; MT-II启动子

肿瘤靶向治疗具有特异性杀伤肿瘤细胞、对正常组织影响小以及见效迅速等传统疗法不具备的优点, 因此该疗法已成为具有巨大潜力和应用前景的肿瘤疗法之一^[1], 但这些抗肿瘤靶向载体缺乏可控性, 其疗效和安全性受到很大的影响, 因此开发新型可诱导的生物肿瘤靶向载体是当今抗肿瘤靶向药物研究的当务之急。

金属硫蛋白基因(Metallothionein, *MT*)启动子是诱导性启动子, 受二价金属离子如铬、锌等诱导^[2], 广泛用于构建真核生物诱导性表达载体。含MT-II启动子的可诱导型载体, 在适量的Zn²⁺诱导时能启动下游基因的大量转录, 有研究报道此类载体进行转染可获得良好效果^[3-4]。人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)是端粒酶的催化亚基, 它在85%左右的肿瘤细胞中活性升高, 且其活性与肿瘤恶性程度密切相关。已有研究证实hTERT基因启动子在肿瘤细胞内完全开启, 是肿瘤特异性启动子, 而且在肝癌细胞中端粒酶活性高表达。故根据hTERT的特性设计重组腺病毒使其选择性的在hTERT阳性的肿瘤细胞中复制表达, 达到靶向效果, 对端粒酶逆转录酶阳性的肿瘤细胞具有广谱的抗肿瘤作用^[5]。

腺病毒载体是目前基因治疗中广泛使用的病毒载体之一, 已被美国批准应用于临床研究, 是理想的基因转移载体^[6]。IFN- α 2a是一种具有抗病毒、免

疫调节和抗肿瘤活性等多种生物功能的细胞因子, 已用于多种病毒性疾病和恶性肿瘤的治疗。本实验将IFN- α 2a基因置于可诱导金属硫蛋白基因(*MT*)启动子和肿瘤特异性启动子hTERT顺式调控元件之下, 成功构建了可诱导肿瘤表达特异性的重组腺病毒; 检测了重组病毒在肝癌细胞株HepG2、结肠癌细胞株HCT116、人乳腺癌MDA-MB231和人肝正常细胞L02中的表达特异性; 初步观察了不同浓度的ZnSO₄对重组病毒的诱导表达, 旨在为研究可诱导肿瘤靶向性腺病毒基因治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

重组腺病毒Ad MT-II-hTERT/IFN- α 2a由本课题组构建; 人肝癌细胞株HepG2、结肠癌细胞株HCT116、人乳腺癌MDA-MB231、人肝正常细胞L02和人胚肾293细胞(HEK293)由本实验室保存。高保真酶Pfu、DNA Marker、胶回收试剂盒、T4 DNA连接酶购自TaKaRa公司; RT-PCR试剂盒、RNA提取试剂盒等均购自Invitrogen公司; IFN- α 2a抗体和DyLight 680

收稿日期: 2011-10-11 修回日期: 2011-12-21

国家自然科学基金(No.30900344)、浙江省自然科学基金(No.Y2080676)和温州医学院本专科学生科研立项基金(No.wyx201001005)资助项目
*共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0577-86689748, E-mail: jimingao@yahoo.com

标记的羊抗兔IgG二抗购自Invitrogen公司。

1.2 重组腺病毒质粒pAd MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP的构建及其鉴定

首先,用Hind III和Pst I分别酶切pBluescript II SK-MT-II-hTERT/IFN- α 2a和pEGFP-N1,将MT-II-hTERT/IFN- α 2a片段克隆到pEGFP-N1上,构建成pEGFP-N1-MT-II-hTERT/IFN- α 2a。在此基础上,用Hind III酶切pEGFP-N1-MT-II-hTERT/IFN- α 2a,经Klenow平端化后再用Not I进行酶切;同时pShuttle2载体用Nhe I和Not I进行同样的处理,这样将MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP连接到pShuttle2载体上,构建成pShuttle2-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP。然后,按照BD Adeno-X™ Expression System 1手册,用PI-Sce I和I-Ceu I双酶切pShuttle2-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP,将目的片段插入BD Adeno-X Viral DNA骨架中,获得重组腺病毒载体pAd MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP。

1.3 重组腺病毒的包装及鉴定

(1)HEK293细胞的培养:用10%胎牛血清的DMEM培养基,在37℃、5% CO₂培养箱中培养,至转染前HEK293细胞的融合达到90%~95%;(2)重组腺病毒质粒转染HEK293细胞:重组腺病毒质粒Ad MT-II-hTERT/IFN- α 2a经Pac I酶切线性化(大片段电泳回收)后,用脂质体Lipofectamine 2000介导转染HEK293细胞,继续在37℃、5% CO₂培养箱中培养。培养过程中光镜观察细胞形态以及倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达及变化情况;(3)包装的重组腺病毒鉴定:将转染重组腺病毒质粒Ad MT-II-hTERT/IFN- α 2a并表达绿色荧光蛋白的HEK293细胞用SDS-PAGE上样缓冲液裂解。将裂解后的蛋白样品通过SDS-PAGE进行分离,并电转到硝基纤维素膜上,用IFN- α 2a抗体和DyLight 680标记的羊抗兔IgG分别作为一抗和二抗。用Odyssey成像系统(LICOR Bioscience, Lincoln, NE, USA)检测杂交信号;(4)重组腺病毒的滴度测定:用氯化铯密度梯度离心纯化腺病毒颗粒。按 1×10^5 /孔将HEK293细胞接种于24孔板,待细胞融合至80%左右,参照江千里等^[7]的方法进行病毒滴度测定。将病毒做倍比稀释,分别取100 μ L病毒液感染细胞,1 h后换液,继续培养。在荧光显微镜下计数,1个呈现绿色荧光的细胞视为1个表达单位(expression forming units, efu),计算病毒滴度。病毒滴度(efu/mL)=发荧光的细胞数 \times 病毒稀释倍数/0.1。

1.4 MT-II-hTERT/IFN- α 2a腺病毒载体在肿瘤细胞中的表达及其靶向性检测

将人肝癌细胞株HepG2、结肠癌细胞株HCT116、人乳腺癌MDA-MB231和人肝正常细胞L02分别接种至6孔板中,待细胞融合度约为80%时,用重组腺病毒vAd hTERT/IFN- α 2a进行感染(MOI=100)。重组腺病毒感染24 h后提取细胞总RNA,进行PCR扩增IFN- α 2a基因。以 β -actin作为内参,观察IFN- α 2a基因在上述4株细胞中的转录水平,每组设未感染的正常细胞作为对照。同时通过Western blot检测IFN- α 2a在4株细胞中的表达水平。

1.5 MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP腺病毒载体在肿瘤细胞中的诱导表达

将人肝癌细胞株HepG2用10%胎牛血清的DMEM培养基,在37℃、5% CO₂培养箱中培养。当90%~95%细胞发生融合时,用重组腺病毒vAd hTERT/IFN- α 2a感染HepG2细胞(MOI=100)。重组腺病毒感染2 h后,分别在细胞培养液中添加不同浓度的ZnSO₄进行诱导。诱导24 h后提取细胞总RNA,进行PCR扩增IFN- α 2a基因,观察IFN- α 2a基因在不同诱导浓度的细胞中的转录水平。以未感染、未诱导的HepG2细胞作为对照,以 β -actin作为RT-PCR内参。同时通过Western blot检测IFN- α 2a在不同浓度ZnSO₄诱导细胞中的表达水平。

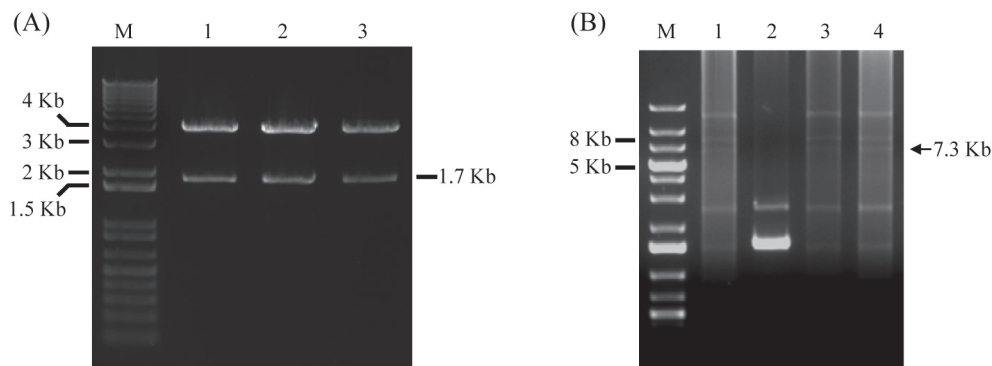
2 结果

2.1 pAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP的鉴定

用Kpn I和Xba I对重组穿梭质粒pShuttle2-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP进行鉴定,得到大小约4.0 Kb和1.7 Kb的2个片段,与预期片段大小一致(图1A)。用Xho I对重组腺病毒质粒pAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP进行酶切鉴定,有7.3 Kb左右的重组片段存在(图1B),表明重组腺病毒质粒pAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP构建正确。

2.2 IFN- α 2a基因重组腺病毒的包装

首先,用Pac I将重组腺病毒质粒pAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP线性化,然后转染HEK293细胞,培养约10 d后观察到细胞病变效应(细胞出现空泡样病变)。同时在倒置荧光显微镜下看到大量绿色荧光细胞(图2A),并且贴壁的HEK293细胞逐渐呈悬浮生长。收集细胞进行Western blot检测,结果显示有47 kDa的条带存在(图2B),与预期大小相符。重组腺病毒

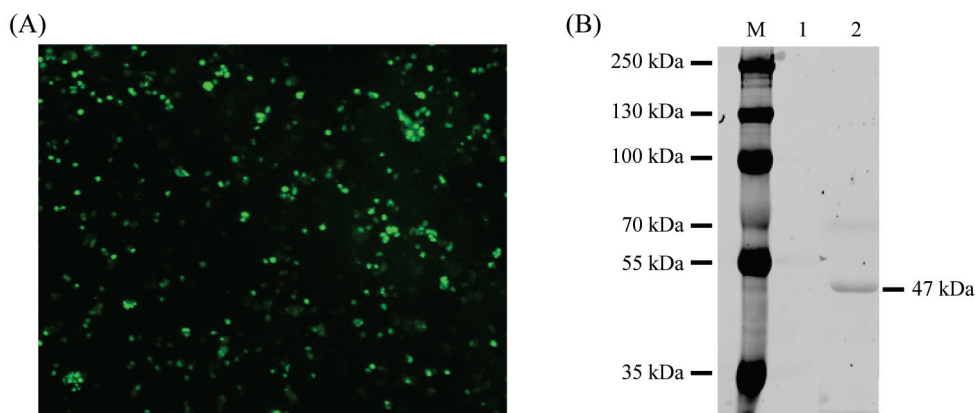


A: 穿梭载体pshuttle2-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP酶切鉴定; M: O'Gene Ruler 1 Kb DNA ladder; 1~3: 用*Kpn* I和*Xba* I酶切穿梭质粒pShuttle2-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP结果; B: 重组腺病毒质粒pAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP酶切鉴定; M: O'Gene Ruler 1 Kb DNA ladder; 1~4: 用*Xho* I对重组腺病毒质粒pAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP酶切结果, 1、3、4号样品正确(箭头所示为重组带)。

A: identification of pshuttle2-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP; M: O'Gene Ruler 1 Kb DNA ladder; 1~3: pShuttle2-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP samples were digested by *Kpn* I and *Xba* I; B: identification of pAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP; M: O'Gene Ruler 1 Kb DNA ladder; 1~4: pAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP samples were digested by *Xho* I. Line 1, line 3, and line 4 samples are right (Arrow indicate recombinant band).

图1 重组腺病毒质粒pAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP的构建

Fig.1 Construction of pAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP



A: 重组腺病毒质粒pAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP转染HEK293细胞后荧光显微镜观察GFP表达(100 \times); B: Western blot检测IFN- α 2a-GFP在HEK293细胞中的表达。M: 蛋白marker; 1: 正常的HEK293细胞; 2: 用重组腺病毒质粒pAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP转染的HEK293细胞。

A: GFP expression in HEK293 cells transfected by pAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP(100 \times); B: Western blot result of IFN- α 2a-GFP expression in HEK293 cells transfected by pAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP. M: protein marker; 1: normal HEK293 cells; 2: HEK293 cells transfected by pAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP.

图2 重组腺病毒Ad-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP的鉴定

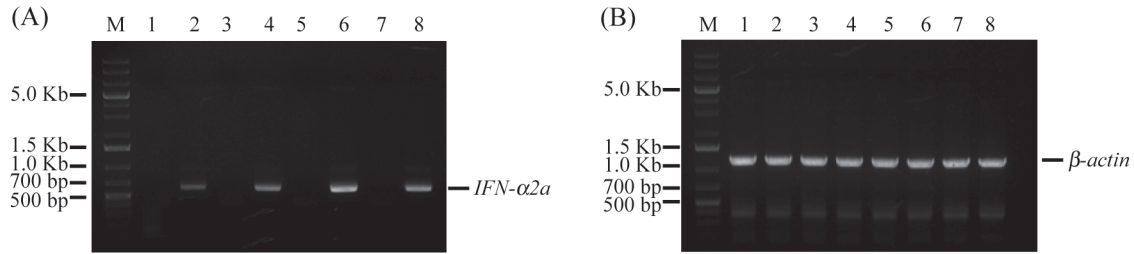
Fig.2 Identification of recombinant adenovirus Ad-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP

在HEK293细胞大量扩增后, $-20^{\circ}\text{C}/37^{\circ}\text{C}$ 反复冻融, 离心收集病毒培养上清后分装, -70°C 保存备用。经过3轮反复感染后测定病毒滴度为 3.2×10^8 efu/mL。

2.3 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP中目的基因的表达及靶向性检测

用重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP分别感染人结肠癌细胞株HCT116、肝癌细胞株HepG2、人乳腺癌MDA-MB231和人肝正常细胞

L02。感染24 h后提取RNA进行RT-PCR检测, 结果显示, HCT116、HepG2和MDA-MB231中IFN- α 2a的转录水平较高, 其中HepG2的转录水平最高, 而L02的转录水平相对来说极低(图3A)。同时, Western blot结果表明, 经重组腺病毒感染后, 目的基因IFN- α 2a在肿瘤细胞中表达量高于正常细胞, 其中在肝癌细胞株HepG2中表达最高(图4A), 表达是正常细胞L02的3.5倍(图4C)。这些结果表明, 携hTERT肿瘤特

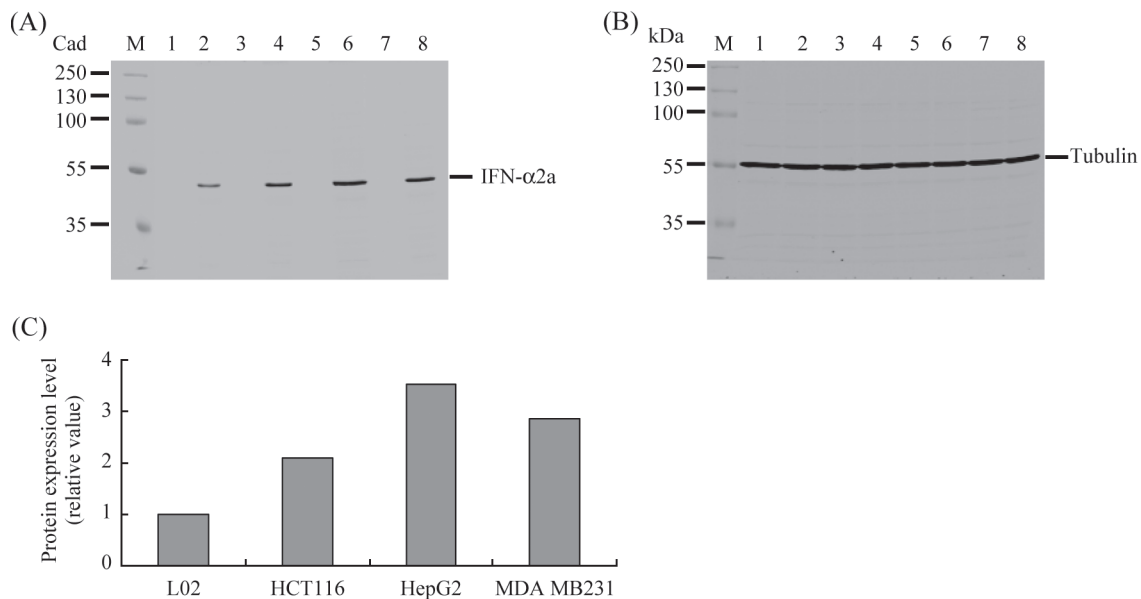


A: *IFN-α2a*在不同细胞中RT-PCR结果; B: *β-actin*在不同细胞中RT-PCR结果. M: O'Gene Ruler 1 Kb DNA ladder; 1: 正常L02细胞; 2: 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP感染后的L02; 3: 正常HCT116; 4: 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP感染后的HCT116; 5: 正常HepG2; 6: 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP感染后的HepG2; 7: 正常MDA-MB231; 8: 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP感染后的MDA-MB231。

A: RT-PCR result of *IFN-α2a* gene in different cells; B: RT-PCR result of *β-actin* in different cells; M: O'Gene Ruler 1 Kb DNA ladder; 1: L02; 2: L02 infected by vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP; 3: HCT116; 4: HCT116 infected by vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP; 5: HepG2; 6: HepG2 infected by vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP; 7: MDA-MB231; 8: MDA-MB231 infected by vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP.

图3 *IFN-α2a*在vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP感染细胞中的RT-PCR结果

Fig.3 RT-PCR amplification of *IFN-α2a* gene in different cells infected by vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP



A: *IFN-α2a* Western blot检测结果; B: tubulin Western blot检测结果; C: 不同细胞中*IFN-α2a*相对表达水平。相对值=(不同细胞的*IFN-α2a*表达量/tubulin表达量)/(L02细胞的*IFN-α2a*表达量/L02细胞的tubulin表达量)。M: 预染蛋白Marker(page Ruler plus); 1: 正常L02细胞; 2: 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP感染后的L02; 3: 正常HCT116; 4: 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP感染后的HCT116; 5: 正常HepG2; 6: 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP感染后的HepG2; 7: 正常MDA-MB231; 8: 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP感染后的MDA-MB231。

A: Western blot result of *IFN-α2a* by *IFN-α2a* antibody; B: Western blot result of *IFN-α2a* by tubulin antibody; C: protein expression level (relative value) in different cells. Relative value=(different cells *IFN-α2a* value/tubulin value)/(L02 *IFN-α2a* value/L02 tubulin value). M: protein marker (page Ruler plus prestained protein ladder); 1: L02; 2: L02 infected by vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP; 3: HCT116; 4: HCT116 infected by vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP; 5: HepG2; 6: HepG2 infected by vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP; 7: MDA-MB231; 8: MDA-MB231 infected by vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP.

图4 *IFN-α2a*在vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP感染细胞中的表达

Fig.4 Expression level of *IFN-α2a* in different cells infected by vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP

异性启动子的重组腺病毒能够靶向肿瘤细胞高效表达*IFN-α2a*基因。

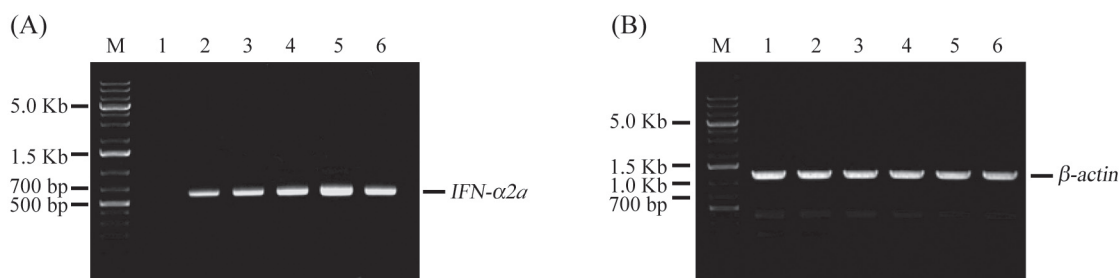
2.4 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*-GFP在肿瘤细胞中的诱导表达

图4的结果显示,当重组病毒感染HepG2后,*IFN-*

*α2a*表达量在4组细胞中最高,因此我们选择HepG2细胞进行诱导表达试验。将重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/*IFN-α2a*感染人肝癌细胞株HepG2(MOI=100),2 h后分别以0, 25, 50, 75, 100 mmol/L ZnSO₄进行诱导。诱导24 h后提取细胞总RNA,经RT-PCR检

测IFN- α 2a转录水平; 同时用Western blot检测IFN- α 2a的表达。如图5所示: 当用ZnSO₄进行诱导表达时, 随着浓度的增加转录水平不断升高; 当ZnSO₄的浓度为75 mmol/L时, IFN- α 2a转录水平达到最高, 当ZnSO₄的浓度增加到100 mmol/L时, IFN- α 2a转录水

平低于75 mmol/L, 可能是高浓度的ZnSO₄会抑制IFN- α 2a的转录。Western blot结果也证实75 mmol/L的ZnSO₄诱导表达的效果最佳, 是诱导前的1.7倍(图6C), 与RT-PCR结果一致(图6A)。表明含有诱导型启动子MT-II的重组腺病毒能被ZnSO₄诱导高表达。



A: *IFN- α 2a*在不同细胞中RT-PCR结果; B: *β -actin*在不同细胞中RT-PCR结果。M: O'Gene Ruler 1 Kb DNA ladder; 1: 正常HepG2; 2: 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP感染后, 再用0 mmol/L ZnSO₄处理的HepG2; 3: 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP感染后, 再用25 mmol/L ZnSO₄处理的HepG2; 4: 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP感染后, 再用50 mmol/L ZnSO₄处理的HepG2; 5: 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP感染后, 再用75 mmol/L ZnSO₄处理的HepG2; 6: 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP感染后, 再用100 mmol/L ZnSO₄处理的HepG2。

A: RT-PCR result of *IFN- α 2a* gene in different cells; B: RT-PCR result of *β -actin* in different cells. M: O'Gene Ruler 1 Kb DNA ladder; 1: HepG2 don't infected by vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a; 2: HepG2 infected by vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a and add 0 mmol/L ZnSO₄; 3: HepG2 infected by vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a and add 25 mmol/L ZnSO₄; 4: HepG2 infected by vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a and add 50 mmol/L ZnSO₄; 5: HepG2 infected by vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a and add 75 mmol/L ZnSO₄; 6: HepG2 infected by vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a and add 100 mmol/L ZnSO₄.

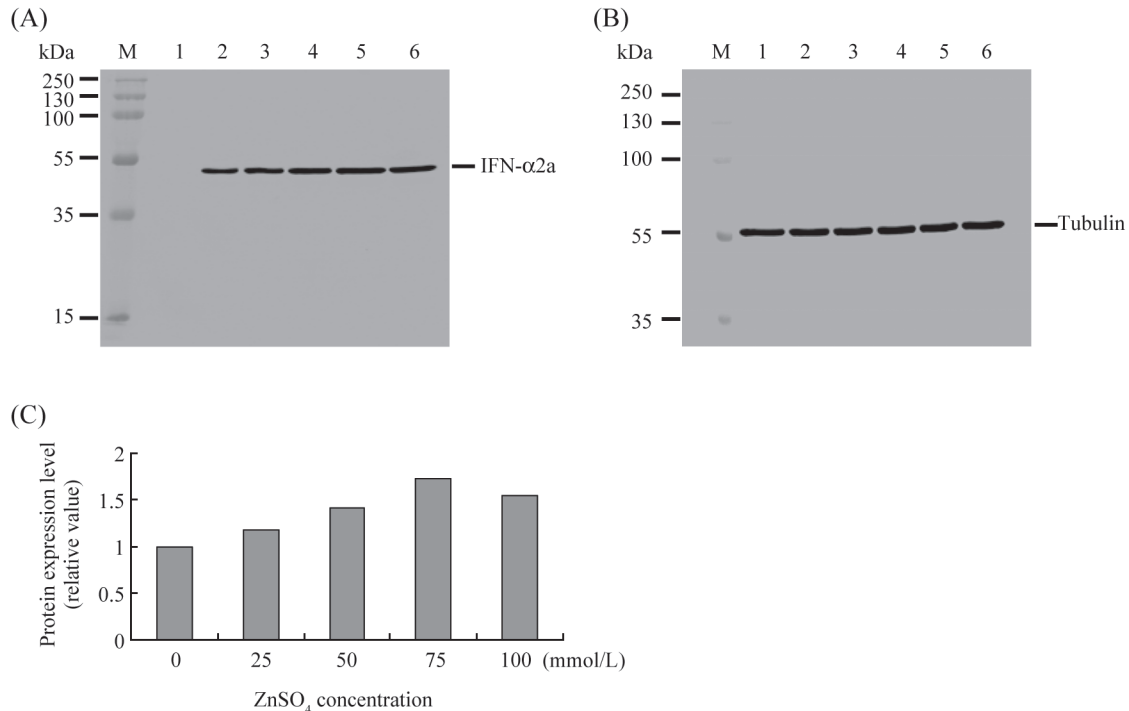
图5 RT-PCR检测不同浓度ZnSO₄诱导IFN- α 2a转录结果

Fig.5 RT-PCR amplification of *IFN- α 2a* gene in HepG2 cells induced by different concentration ZnSO₄

3 讨论

针对肿瘤的特异性分子靶点设计肿瘤治疗方案进行靶向治疗, 已成为现阶段研究的热点和趋势^[8]。腺病毒具有宿主范围广泛、免疫途径简便、腺病毒基因组的结构和功能研究深入、安全稳定、插入外源基因后不影响病毒复制但能使外源基因良好表达等特点^[9]。此外, 腺病毒载体生产工艺简便、制备纯化相对容易、产毒滴度高、外源基因容量大(7~8 Kb), 能有效地将外源基因转染到各种靶细胞或组织中, 这使得腺病毒成为表达和传递治疗基因的主要候选者^[10]。孔彦平等^[11]利用AFP基因启动子调控治疗基因*Mn-SOD*, 构建的重组腺病毒能引起特异性的肝癌细胞凋亡, 所携带治疗基因*Mn-SOD*能通过促进肿瘤细胞的凋亡达到抑制肿瘤细胞生长的效果。Susan等^[12]研究发现, L4-22K和L4-33K作为启动子来控制HAd5V的晚期阶段的感染, 这为腺病毒载体的应用提供了新的表达模式。刘新垣等^[13]在“靶向基因-病毒治疗”的基础上将hTERT-E1A-AFP-E1B-HCCS1(或LFIRE)与一个杀伤功能很强的hTERT-E1A-AFP-E1B-IL-24联

合成构成癌症的双靶向病毒-双基因治疗, 双基因有更好的杀伤性、双靶向有更好的安全性。除此以外, 研究发现一些促凋亡基因和细胞因子的表达也可增强腺病毒的溶瘤效应, 如IL-12和B7-1、TNF- α 、干扰素等, 将它们插入有特异性启动子调控*E1A*基因的重组腺病毒中, 可进一步增强其杀伤效果^[14]。但这些载体在靶向性肿瘤基因治疗中都存在一个最主要的问题就是目的基因表达的有效性^[15-16]。目的基因表达的有效性受基因表达调节系统的控制^[17]。最理想的基因表达调节系统, 在时间上, 不仅要控制目的基因在需要时即对患者实施治疗才表达、不需要治疗时就关闭, 而且要控制治疗基因持续表达的时间跨度, 即不同的疾病表达的时间不同。因此开发可调控的靶向肿瘤载体势在必行。陈洁等^[18]构建了具有三重调节控制的溶瘤腺病毒载体SG600, 在hTERT启动子和HRE缺氧调控元件精确调控腺病毒增殖基因*E1a*和*E1b*基因。在胃癌移植瘤裸鼠模型中, 经4周治疗, 重组SG600-p53抑瘤率达75.59%。韦芳等^[19]构建了受热休克蛋白70(heat shock protein



A: IFN- α 2a Western blot检测结果; B: tubulin Western blot检测结果; C: 不同细胞中IFN- α 2a相对表达水平。相对值=(不同浓度ZnSO₄诱导产生的IFN- α 2a表达量/tubulin表达量)/(0 mmol/L ZnSO₄时IFN- α 2a的表达量/tubulin表达量)。M: 预染蛋白Marker(page Ruler plus); 1: 正常HepG2; 2: 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP感染后,再用0 mmol/L ZnSO₄处理的HepG2; 3: 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP感染后,再用25 mmol/L ZnSO₄处理的HepG2; 4: 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP感染后,再用50 mmol/L ZnSO₄处理的HepG2; 5: 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP感染后,再用75 mmol/L ZnSO₄处理的HepG2; 6: 重组腺病毒vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP感染后,再用100 mmol/L ZnSO₄处理的HepG2。

A: Western blot result of IFN- α 2a by IFN- α 2a antibody; B: Western blot result of IFN- α 2a by tubulin antibody; C: protein expression level (relative value). Relative value=(IFN- α 2a value of different concentration ZnSO₄/tubulin value)/(IFN- α 2a value of 0 mmol/L ZnSO₄/tubulin value). M: protein marker (page Ruler plus prestained protein ladder); 1: HepG2 don't infected by vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP; 2: HepG2 infected by vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP and add 0 mM ZnSO₄; 3: HepG2 infected by vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP and add 25 mmol/L ZnSO₄; 4: HepG2 infected by vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP and add 50 mmol/L ZnSO₄; 5: HepG2 infected by vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a-GFP and add 75 mmol/L ZnSO₄; 6: HepG2 infected by vAd-MT-II-hTERT/IFN- α 2a and add 100 mmol/L ZnSO₄.

图6 Western blot检测不同浓度ZnSO₄诱导IFN- α 2a表达

Fig.6 Expression level of IFN- α 2a in HepG2 cells induced by different concentration ZnSO₄

70, *HSP70*)基因启动子调控的溶瘤腺病毒载体Ad-HSP70p-E1A。体外实验结果表明,在联合热疗后,Ad-HSP70p-E1A的自身复制能力和溶瘤效果分别增强了2~10倍和5倍以上。

本实验根据金属硫蛋白基因启动子和hTERT启动子的可诱导、肿瘤特异性的特点,构建了可诱导肿瘤表达特异性的重组腺病毒。结果初步证实了携肿瘤特异性启动子的重组腺病毒能够靶肿瘤细胞高效表达IFN- α 2a基因,同时诱导试验表明含有诱导型启动子MT-II的重组腺病毒能被ZnSO₄诱导表达,为下一步体内外抑癌实验的研究打下基础。与其他载体相比,MT-II启动子有基因表达可调控的重要优势:

当我们构建的载体进入细胞或人体后,可以通过添加、注射或口服Zn²⁺制剂即可实现基因表达的调控,且对细胞或人体不会有任何危害,操作也非常简便;为建立安全、有效的肿瘤靶向给药系统及可调控生物靶向抗肿瘤载体在肿瘤临床治疗中的应用提供理论与实验基础。

参考文献 (References)

- 1 傅青岭,刘厚奇.端粒酶与癌症靶向治疗.生命科学 2010; 22(12): 1254-8.
- 2 Devaux S, Maupoil V, Berthelot A. Effects of cadmium on cardiac metallothionein induction and ischemia-reperfusion injury in rats. Can J Physiol Pharmacol 2009; 87(8): 617-23.

- 3 Liu J, Cheng ML, Yang Q, Shan KR, Shen J, Zhou Y, *et al.* Blood metallothionein transcript as a biomarker for metal sensitivity: Low blood metallothionein transcripts in arsenicosis patients from Guizhou, China. *Environ Health Perspect* 2007; 115(7): 1101-6.
- 4 Hwang YP, Kim HG, Han EH, Jeong HG. Metallo thionein-III protects against 6-hydroxy dopamine-induced o-xidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a PI3K and ERK/Nr f2-dependent manner. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 231(3): 318-27.
- 5 刘 旭, 张东亮, 刘 文. 溶瘤腺病毒在肿瘤靶向治疗中的研究进展. *现代生物医学进展* 2011; 7(11): 1382-4.
- 6 刘思景, 郭伟韬, 王 辉. 腺病毒载体的研究新进展. *现代中西医结合杂志* 2010; 19(13): 1669-70.
- 7 江千里, 王健民, 温丽敏, 江 汕, 周 虹. 批量快速测定法测定标志基因为GFP的重组病毒滴度. *第二军医大学学报* 2002; 23(9): 1034-5.
- 8 Sawyers C. Targeted cancer therapy. *Nature* 2004; 432(7015): 294-7.
- 9 刘根梅, 陈瑞爱, 罗满林. 腺病毒载体的研究进展. *广东农业学* 2010; 4: 188-90.
- 10 Kim JS, Lee SH, Cho YS, Park K, Kim YH, Lee JH. Oral adeno-associated virus-TRAIL gene therapy suppresses human hepatocellular carcinoma growth in mice. *Hepatology* 2005; 42(6): 1355-63.
- 11 孔彦平, 张 静, 肖睿娟, 郭国英, 王毅刚. AFP调控的携带Mn-SOD基因的腺病毒对肝癌细胞的杀伤作用. *浙江理工大学学报* 2011; 28(5): 804-8.
- 12 Susan JM, Gillian E S, Keith N. Adenovirus late-phase infection is controlled by a novel L4 promoter. *J Virol* 2010; 84(14): 7096-104.
- 13 刘新垣, 顾锦法. 癌症的靶向基因一病毒治疗新进展及抗癌策略. *癌症* 2006; 25(10): 1320-2.
- 14 Salako MA, Kulbe H, Ingemarsdotter CK, Pirlo KJ, Williams SL, France ML, *et al.* Inhibition of the inflammatory cytokine TNF- α increases adenovirus activity in ovarian cancer via modulation of cIAP1/2 expression. *Mol Ther* 2010; 19: 490-9.
- 15 El-Aneed A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release* 2004; 94: 1-14.
- 16 邓洪新, 田 聆, 魏于全. 基因治疗的发展现状、问题和展望. *生命科学* 2005; 17(3): 196-9.
- 17 黄 芳, 王毅刚, 蔡 荣, 杨光华, 钱 程. 可诱导慢病毒载体的优化策略及应用. *细胞生物学杂志* 2007; 29(6): 809-15.
- 18 陈 洁, 苏长青, 李林芳, 顾坚忠. 溶瘤腺病毒SG600-p53对裸鼠胃癌移植瘤的抑制作用. *临床肿瘤学杂志* 2009; 14(3): 193-5.
- 19 韦 芳, 王慧萍, 陈霞芳, 李川源, 黄 倩. 加热调控的溶瘤腺病毒载体构建及其特征研究. *生物化学与生物物理进展* 2009; 36(12): 1536-43.

Construction and Expression of the Recombinant Inducible Tumor-targeted Adenovirus Containing IFN- α 2a

Li Xiang[#], Qu Jinsheng[#], Kang Shuai, He Zheyun, Yang Jifeng, Gao Jimin*
(School of Life and Medical Lab Sciences, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract Adenovirus-based vector, which is one of the widely used gene transfer tools, especially applied in metastatic tumor gene therapy, shows a very promising prospect. However, these tumor-targeted vectors lack of controllability, and their efficacy and safety are greatly affected. Therefore, the development of new inducible tumor-targeted recombinant vectors has attracted much attention in recent years. Here, we construct the inducible tumor-targeted recombinant adenovirus containing IFN- α 2a. The recombinant adenovirus can infect many tumor cell strains such as HepG2 cells efficiently. RT-PCR and Western blot results showed that the *IFN- α 2a* gene expressed specifically in tumor cells, while hardly expressed in non-tumor cells such as L02. After induction with ZnSO₄, the expression levels of IFN- α 2a are higher than those no induced. The inducible tumor-targeted recombinant adenovirus containing IFN- α 2a can be further studied for inhibition effect on cancer *in vitro* and *in vivo*.

Key words tumor-targeted; adenovirus; hTERT promoter; MT-II promoter

Received: October 11, 2011 Accepted: December 21, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30900344), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y2080676) and the College Student Research Project of Wenzhou Medical College (No.wyx201001005)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: 86-577-86689748, E-mail: jimingao@yahoo.com