

# OX-M-AdmCLB1 重组腺病毒制备及其诱导的体内抗肿瘤效应

张 伶 魏于全<sup>1</sup> 蒋 磊 李继承\*

(浙江大学细胞生物学研究所, 杭州 310031;

<sup>1</sup>四川大学华西医院肿瘤生物治疗国家重点实验室, 成都 610041)

**摘要** 构建小鼠细胞周期蛋白 B1(mcyclin B1)重组腺病毒(AdmCLB1), 将氧化型甘露聚糖(OX-M)与 AdmCLB1 偶联, 制备 OX-M-AdmCLB1, 研究 OX-M-AdmCLB1 诱导的抗肿瘤效应。利用 AdEasy 系统构建携带靶基因小鼠细胞周期蛋白 B1 的复制缺陷型重组腺病毒 AdmCLB1, 抽提 AdmCLB1 基因组 DNA, 进行 PCR 扩增。重组病毒经扩增、纯化后与 OX-M 混合, 制备 OX-M-AdmCLB1; OX-M-AdmCLB1 体外感染小鼠树突状细胞(DC), RT-PCR 扩增分析靶基因表达; OX-M-AdmCLB1 处理 BALB/C 小鼠, 处理后再荷瘤, 观察小鼠肿瘤生长及生存情况。重组病毒 AdmCLB1 终滴度为  $2.1 \times 10^{11}$  pfu/ml; DC 内靶基因的表达量在 OX-M-AdmCLB1 组较 AdmCLB1 组高; 体内研究提示 OX-M-AdmCLB1 可明显抑制 CT26 肿瘤增殖(抑瘤率 44%)、延长动物生存期( $P < 0.01$ )。实验制备的新型重组腺病毒 OX-M-AdmCLB1 体内能够诱导明显的抗肿瘤效应, 估计此效应的产生与 DC 特异识别 OX-M-AdmCLB1, 进而激活机体抗肿瘤免疫有关。

**关键词** 细胞周期蛋白 B1; 氧化型甘露聚糖; 重组腺病毒; 肿瘤; 树突状细胞

细胞周期蛋白 B1 是有丝分裂期(M 期)细胞周期蛋白, 可促进细胞越过 G<sub>2</sub>/M 限制点, 启动有丝分裂<sup>[1]</sup>; 研究证实细胞周期蛋白 B1 在肿瘤组织中普遍高表达<sup>[2]</sup>。通过某种途径诱导机体产生针对细胞周期蛋白 B1 的细胞毒 T 细胞(CTL)反应, 打破机体对该蛋白质的免疫耐受, 将可能激活肿瘤免疫。树突状细胞(DC)是体内功能最强的专职抗原递呈细胞(APC), 能促进 CTL 和 T 辅助细胞的生成, 在体内发挥强大的免疫监视功能<sup>[3]</sup>。DC 表面高表达甘露糖受体(mannose receptor, MR)<sup>[4]</sup>, 有学者用氧化型甘露聚糖(OX-M)与肿瘤相关抗原偶联, 使该抗原在体内被 DC 特异识别, 诱导了强烈的抗原特异性 CTL 反应, 有效激活了抗肿瘤免疫<sup>[5]</sup>。同上述抗原一样, 腺病毒的衣壳蛋白也可与甘露聚糖偶联<sup>[6]</sup>; 而复制缺陷型重组腺病毒作为基因治疗的主要载体, 能高效传递基因并介导基因表达<sup>[6]</sup>。由此我们设想以腺病毒为细胞周期蛋白 B1 基因的载体, 用 OX-M 修饰复制缺陷性重组细胞周期蛋白 B1 腺病毒(AdmCLB1)以制备 OX-M-AdmCLB1, 希望其能够被 DC 特异识别, 进而诱导机体产生针对细胞周期蛋白 B1 蛋白的 CTL 反应, 产生抗肿瘤效应。本研究利用 AdEasy

系统<sup>[7]</sup>构建重组腺病毒 AdmCLB1, 在此基础上制备 OX-M-AdmCLB1, 用 OX-M-AdmCLB1 体外感染小鼠 DC, 检测感染细胞靶基因表达, 另用 OX-M-AdmCLB1 处理动物, 观察处理后再荷瘤动物的肿瘤生长及生存情况, 分析其在动物体内诱导的抗肿瘤效应, 以探求一种有效的肿瘤基因治疗新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

穿梭质粒 pShuttle-CMV 及大肠杆菌 BJ5183 购自 Qbiogene 公司, 腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 由美国 Bert Vogelstein 教授(Johns Hopkins 肿瘤中心)惠赠, pTZ57R-mcyclin B1(pTZ57R-mCLB1)质粒由作者构建(经上海博亚生物技术有限公司测序, 证实其内插入了小鼠细胞周期蛋白 B1 全长 cDNA 片段, 1.3 kb)<sup>[8]</sup>; 对照重组腺病毒 Adnull(复制缺陷性空腺病毒; 其内未插入任何外源目的基因片段)由魏于全教授惠赠。小鼠结肠癌(CT26)及 HEK293 细胞系(后者传代数不

收稿日期: 2006-03-31 接受日期: 2006-07-27

\* 通讯作者。Tel: 0571-87217451; Fax: 0571-87217453, E-mail: lijichen@zju.edu.cn

超过30代,为腺病毒E1区转化的人胚肾细胞)来源于美国细胞、菌种库(ATCC);*E.coli* XL1-blue由本实验室保存;6~8周龄BALB/c雌性小鼠购于浙江大学实验动物中心;脂质体(Lipofectamine)购自Life Technology公司;分子克隆工具酶及DNA Marker(GeneRulerTMLadder Mix)购自MBI Fermentas公司;小量质粒抽取试剂盒及凝胶抽取试剂盒购于Qiagen公司;DMEM、RPMI21640、胎牛血清(FBS)等购自Gibco公司。

## 1.2 重组腺病毒质粒 pAdmCLB1 的构建

将*E.coli* XL1-blue和BJ5183置于37℃生长至 $A_{600}$ 为0.5左右,收集细菌,分别用15%的冷甘油悬浮细菌,制成感受态细胞悬液,分装后置液氮保存。取1~2 $\mu$ l重组质粒pTZ57R-mCLB1转化感受态细菌XL1-blue,选择阳性克隆,扩增后用少量质粒抽取试剂盒抽提、纯化并经酶切鉴定。用限制性内切酶*KpnI*,*XbaI*酶切5 $\mu$ g pTZ57R-mCLB1,将酶切后的小鼠细胞周期蛋白B1片段用凝胶抽取试剂盒回收纯化,再与经同样酶切后的质粒pShuttle-CMV于22℃连接过夜。取10 $\mu$ l连接物转化感受态细菌XL1-blue,筛选重组穿梭质粒pShuttle-CMV-mycyclin B1(pSh-C-mCLB1)阳性克隆,扩增后小抽质粒,作酶切鉴定,并送上海博亚生物技术有限公司测序。将测序正确的pSh-C-mCLB1抽提、纯化,用限制性内切酶*PmeI*酶切线性化、CIP去磷酸化后回收。取线性化pSh-C-mCLB1质粒与超螺旋pAdEasy-1质粒(二者摩尔比约为1:1)进行电穿孔共转化BJ5183感受态细菌。37℃摇床温育30~45 min.,卡那霉素LB培养基平板涂板,于37℃培养16~20 h后挑选平板中较小的细菌克隆,小抽质粒,作酶切鉴定。选择阳性重组腺病毒质粒pAdmCLB1,转化感受态细菌XL1-blue进行扩增。

## 1.3 包装重组腺病毒 AdmCLB1

将pAdmCLB1用限制性内切酶*PacI*酶切线性化并回收,接种 $2 \times 10^6$ 个293细胞至25 mm培养皿,待细胞密度生长至50%~70%时,取4 $\mu$ g线性化pAdmCLB1与20 $\mu$ l脂质体混合后转染293细胞,6 h后更换完全培养基(含10% FBS的DMEM),以后每2~3天更换完全培养基一次,当90%~100%细胞出现细胞病变效应(CPE;大约在转染后第10~14天出现;镜下表现为细胞变圆、聚集、呈葡萄串样改变等),10%~20%细胞脱落时收集细胞及上清液(可能含有重组腺病毒AdmCLB1)<sup>[7]</sup>。

## 1.4 PCR 鉴定 AdmCLB1

取200 $\mu$ l上述上清液,根据UNIQ-10柱式基因组DNA抽提试剂盒(上海生工生物技术有限公司)操作指南抽提病毒基因组DNA。以抽提物为模板进行PCR扩增。用于扩增的上、下游引物参照文献<sup>[8]</sup>。另用Adnull、pAdEasy-1为模板及不加模板(阴性对照)分别进行PCR扩增。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,鉴定构建的重组腺病毒是否含靶基因小鼠细胞周期蛋白B1。

## 1.5 AdmCLB1 的扩增及纯化

重组腺病毒AdmCLB1反复感染293细胞以扩增病毒。在细胞出现CPE(多于感染后3~5天)后收集细胞反复冻融3次(释放病毒),冻存细胞裂解液于-80℃。重复感染、收集、冻融等步骤。最终用CsCl超速密度梯度离心提取细胞裂解液中的AdmCLB1,进行透析纯化<sup>[9]</sup>;后用组织培养半数感染剂量(TCID<sub>50</sub>)法测定病毒滴度(T)<sup>[10]</sup>;分光光度计(SmartSpec 3000, Bio-Rad公司)测定病毒的 $A_{260}/A_{280}$ 值,确定病毒纯度<sup>[9]</sup>。以同样方法扩增及纯化Adnull并测定其滴度及纯度。

## 1.6 氧化型甘露聚糖 - 重组小鼠细胞周期蛋白 B1 腺病毒(OX-M-AdmCLB1)的制备

将甘露聚糖(Sigma公司)溶于0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液(pH 6.0)中,终浓度为14 mg/ml;将0.01 mol/L的高碘酸钠溶液(Sigma公司)与甘露聚糖混合氧化60 min;加入10 l乙二醇,4℃温育30 min;重碳酸盐缓冲液(pH 6.0~9.0)平衡Sephadex-G25层析柱;将上述高碘酸钠-甘露聚糖化合物(氧化型甘露聚糖;OX-M)倒入层析柱层析分离,使OX-M被洗入一个2 ml的空容器;OX-M分别与900 $\mu$ g AdmCLB1及Adnull腺病毒混合,室温过夜(OX-M的醛基与腺病毒衣壳蛋白赖氨酸残基的氨基发生共价连接,即偶联),制备出OX-M-AdmCLB1及OX-M-Adnull<sup>[5]</sup>。将二者分别保存于-80℃备用,不再纯化。

## 1.7 RT-PCR 检测 OX-M-AdmCLB1 体外感染小鼠 DC 后细胞小鼠细胞周期蛋白 B1 表达

1.7.1 小鼠DC及其前体的分离纯化、诱导及体外扩增 参照文献<sup>[11,12]</sup>进行;DC用含10% FBS的RPMI21640培养,以重组鼠GM-CSF(rmGM-CSF; Gibco公司)和鼠白细胞介素4(mIL-4; Pepro Tech公司)刺激培养使DC前体转化为DC。

1.7.2 DC的处理 分别用OX-M-Adnull、OX-

M-AdmCLB1 及 AdmCLB1 感染处于对数生长期的小鼠 DC, 感染强度均为 50 MOI (感染复数); 另一组用 OX-M (14 mg/ml) 处理细胞, 终浓度为 0.14 mg/ml。

**1.7.3 细胞总 RNA 提取** 上述处理 24 h 后, 各组  $5 \times 10^6$  个小鼠 DC 用于总 RNA 提取。提取方法根据 Trizol™ RNA 抽提试剂盒(Gibco 公司)提供的操作手册进行。

**1.7.4 一步法 RT-PCR** 按 One Step RNA PCR Kit (TaKaRa 公司) 操作说明进行; 扩增靶基因小鼠细胞周期蛋白 B1 所用引物同 1.2.3。以小鼠  $\beta$  肌动蛋白为内参照评估靶基因在不同 DC 组中的表达差异。小鼠  $\beta$  肌动蛋白基因扩增产物片段长约 1.1 kb; 其上、下游引物序列分别为 5'-ATGATGATTGATGATGATATCGCCGCGCT-3' 和 5'-CGGACTCGTCATCCTCCTGCTTG-3'。

## 1.8 OX-M-AdmCLB1 处理 BALB/C 小鼠

将 OX-M-AdmCLB1 及 OX-M-Adnull 用 PBS 稀释到滴度为  $1 \times 10^9$  pfu/100  $\mu$ l; 6~8 周龄雌性 BALB/C 小鼠随机分为 3 组, 每组 10 只, 分别尾静脉注射 OX-M-AdmCLB1, OX-M-Adnull 及生理盐水, 每只 100  $\mu$ l, 一周一次, 共 4 周, 第四次注射后 7 天, 各组小鼠在右肋部皮下接种处于对数生长期的 CT26 细胞,  $1 \times 10^6$  个/只。观察小鼠肿瘤生长及生存情况。根据公式: 体积 (V) = 宽<sup>2</sup> × 长 × 0.52 计算肿瘤体积<sup>[13]</sup>。

## 1.9 统计学方法

所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。方差分析法用于分析各组间的差异; 生命表法用于构建生存曲线, 并用 Gehan 法分析其统计学意义。P < 0.05 视为有统计学意义。

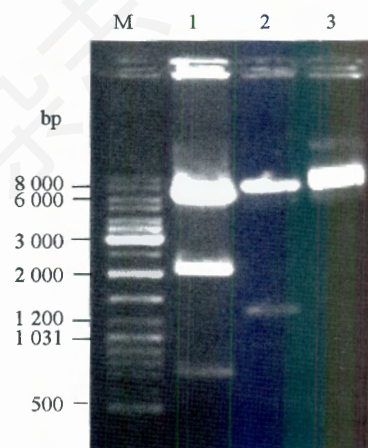
## 2 结果

### 2.1 重组穿梭质粒 pSh-C-mCLB1 酶切鉴定

用限制性内切酶 *SacI* 单酶切及 *KpnI*、*XbaI* 双酶切 pSh-C-mCLB1, 分别获得与预期一致的 6.7、2.0 和 0.7 kb 三条片段及 7.0 和 1.3 kb 两条片段。其中, 双酶切产生的为 1.3 kb 的靶基因片段(小鼠细胞周期蛋白 B1 全长 cDNA 片段)及 7.0 kb 的 pShuttle-CMV 空质粒片段(图 1)。

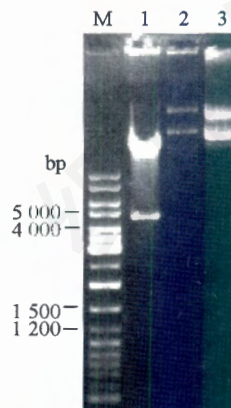
### 2.2 重组腺病毒质粒 pAdmCLB1 的酶切鉴定

将线性化的 pSh-C-mCLB1 (*PmeI* 酶切产生)与 pAdEasy-1 质粒共转化 BJ5183 感受态细菌, 筛选获



**Fig.1 Identification of pSh-C-mCLB1 by restriction endonuclease**

M: DNA marker; 1: pSh-C-mCLB1+*SacI*; 2: pSh-C-mCLB1+*KpnI* and *XbaI*; 3: pSh-C-mCLB1.



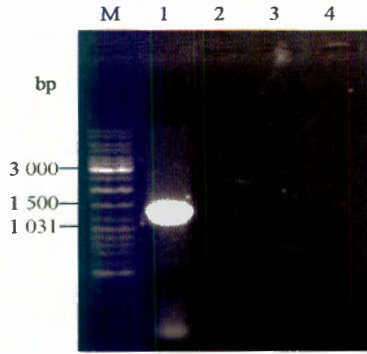
**Fig.2 Identification of pAdmCLB1 by restriction endonuclease**

M: DNA marker; 1: pAdmCLB1+*PacI*; 2: pAdmCLB1; 3: pAdEasy-1.

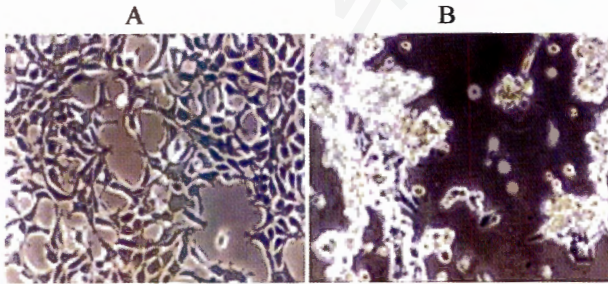
得 pAdmCLB1, pAdmCLB1 用 *PacI* 酶切后获得约 30 kb 大小的腺病毒基因组片段和 4.5 kb 的 *ori* 及卡那霉素抗性编码基因片段(图 2)。

### 2.3 AdmCLB1 的鉴定及 AdmCLB1、Adnull 滴度、纯度测定

图 3 为以 AdmCLB1 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增的鉴定结果。扩增产物为 1.3 kb 的小鼠细胞周期蛋白 B1 cDNA 片段, 提示 293 细胞成功包装出了含靶基因的重组腺病毒。用该病毒反复感染 293 细胞进行病毒扩增, 在细胞发生 CPE(图 4B)后收集细胞反复冻融, CsCl 超速密度梯度离心法纯化, TCID<sub>50</sub> 法测定 AdmCLB1 的滴度 (T)。结果  $T_{CLB1} = 2.1 \times 10^{11}$  pfu/ml。以同样方法获得对照病毒 Adnull,  $T_{null} = 2.9 \times 10^{11}$  pfu/ml。两种病毒的  $A_{260}/A_{280}$  均大于 1.3, 表明其纯度较高<sup>[9]</sup>。两种病毒的滴度及纯度均可满



**Fig.3** PCR product band of mcyclin B1 cDNA in 1% agarose gel  
M: DNA marker; 1: Using the genomic DNA of AdmCLB1 as template; 2: Using the genomic DNA of Adnull; 3: Using pAdEasy-1; 4: Negative control.



**Fig.4** HEK-293 cell morphologic features before and after being infected by AdmCLB1 (200×)  
A: before being infected; B: being infected 3 days later.

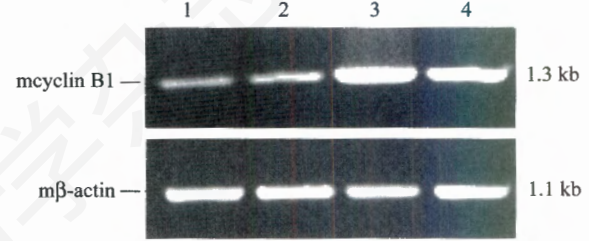
足后续实验需要。

#### 2.4 OX-M-AdmCLB1 感染组 DC 靶基因表达增加

用 OX-M-Adnull、OX-M-AdmCLB1、AdmCLB1 及 OX-M 分别处理 DC 24 h 后提取细胞总 RNA，以此为模板进行 RT-PCR 扩增靶基因小鼠细胞周期蛋白 B1。OX-M-AdmCLB1 组靶基因表达量 (RT-PCR 产物量) 较 AdmCLB1 组增高；上述两组的产物量明显高于 OX-M-Adnull 及 OX-M 组，而后两组 (对照组) 之间小鼠细胞周期蛋白 B1 基因表达无明显差异 (图 5)。

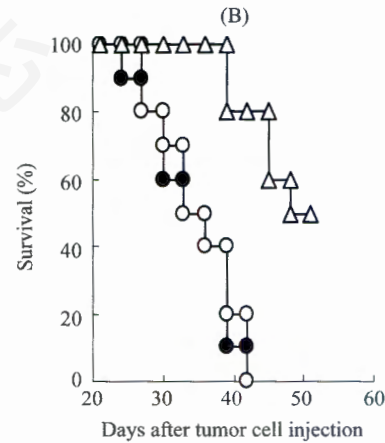
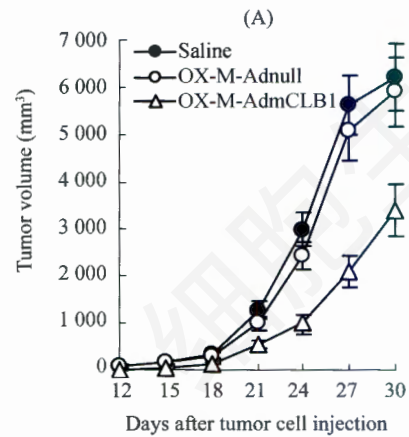
#### 2.5 OX-M-AdmCLB1 诱导的体内抗肿瘤效应

接种肿瘤细胞 30 天后处死动物，剥离肿瘤组织，OX-M-AdmCLB1 处理的 BALB/C 小鼠 ( $\Delta$ ) 肿瘤生长明显比生理盐水 (saline;  $\bullet$ ) 及 OX-M-Adnull 组 ( $\circ$ ) 为慢 ( $P < 0.05$ ; 图 6A)，其生存期也明显延长 ( $P < 0.01$ ; Gehan 法; 图 6B)。生理盐水及 OX-M-Adnull 组之间在肿瘤生长及生存期方面差异均不显著 (图 6;  $P > 0.05$ )。OX-M-AdmCLB1 组小鼠第 30 天的肿瘤体积均数为  $(3.41 \pm 0.54) \text{ cm}^3$ ，生理盐水组为  $(6.08 \pm$



**Fig.5** RT-PCR analysis of the mcyclin B1 expression in dendritic cell (DC)

M: DNA marker; cyclin B1 gene was amplified using total RNA from DC being treated with OX-M-Adnull (1), oxidative mannan (2), OX-M-AdmCLB1(3) and AdmCLB1(4).



**Fig.6** Induction of anti-tumor activity and increase of survival by OX-M-AdmCLB1

A: the growth curve of the tumors in CT26-bearing mice; B: the survival curve of the mice.  $\bullet$ : saline;  $\circ$ : OX-M-Adnull;  $\Delta$ : OX-M-AdmCLB1.

$0.72) \text{ cm}^3$ ，肿瘤生长抑制率约 44%。

### 3 讨论

随着人口老龄化和环境污染日益严重，恶性肿瘤对人类的威胁日益增大。肿瘤生物治疗 (如: 基

因治疗)具有严格的靶向性和病因指向性,是继手术、化疗和放疗之后的第4种肿瘤支柱疗法<sup>[14]</sup>。

细胞周期蛋白B1是Cdc2丝氨酸/苏氨酸激酶即成熟促进因子(MPF)的调节亚单位,其与MPF的催化亚单位CDK1结合后,在G<sub>2</sub>/M期交接处发挥作用,驱动细胞周期时相转换,促进细胞越过G<sub>2</sub>/M限制点,启动有丝分裂<sup>[1]</sup>。细胞周期蛋白B1为一种肿瘤抗原,其表达及功能异常与肿瘤关系密切,许多肿瘤细胞系均高表达细胞周期蛋白B1,且细胞的MPF磷酸化调节机制存在缺陷,在DNA损伤的情况下,MPF仍可激活且高表达,使细胞虽携带损伤DNA却仍然可以进入有丝分裂,从而获得无限增殖的能力,最终出现恶性转化<sup>[1,2]</sup>。因此,将细胞周期蛋白B1基因有效导入机体内,经APC识别、内吞、胞内表达并最终呈递其抗原肽片段给CD8<sup>+</sup>T细胞,诱导机体产生特异性CTL反应杀伤肿瘤细胞,为肿瘤生物治疗的一种有潜力的策略。DC是体内功能最强的专职APC,其表面高表达MR<sup>[4]</sup>,有研究表明OX-M与蛋白质(抗原)能在适当条件下发生偶联,形成OX-M-蛋白质化合物(OX-M-P);该研究者将肿瘤抗原MUC1融合蛋白偶联OX-M,得到OX-M-FP,免疫动物后,OX-M-FP被DC特异识别,最终激活了DC相应的免疫功能<sup>[5]</sup>。

但OX-M-P被DC识别和摄取是被动的,不具备主动感染DC的能力,而复制缺陷性腺病毒是基因治疗中高效表达和传递治疗基因的主要载体,能主动、高效感染多种细胞,且病毒复制缺陷,不整合入宿主基因组,安全性高<sup>[6]</sup>,由此我们选择其作为靶基因载体,再将该载体偶联甘露聚糖。本研究利用AdEasy系统构建了重组腺病毒AdmCLB1,AdmCLB1经扩增、纯化后滴度达到 $2.1 \times 10^{11}$  pfu/ml,然后将之与OX-M偶联制备了OX-M-AdmCLB1这一新型病毒载体,用该载体感染体外培养的DC,同时用其处理动物。体外实验提示OX-M-AdmCLB1组细胞周期蛋白B1基因表达较AdmCLB1组高;与两对照组相比,OX-M-AdmCLB1和AdmCLB1感染DC后,细胞周期蛋白B1基因在DC内表达明显升高。由此可见,OX-M-AdmCLB1及AdmCLB1体外感染DC后,其携带的小鼠细胞周期

蛋白B1基因均能在DC内有效表达,而OX-M-AdmCLB1因偶联有甘露聚糖,能够被DC特异识别和摄取,故较AdmCLB1更易感染DC,基因转导效率提高,导致细胞周期蛋白B1基因表达较AdmCLB1组进一步升高。体内实验结果显示肿瘤生长在OX-M-AdmCLB1处理组受到明显抑制(抑瘤率44%),生存分析提示处理组生存期延长,即OX-M-AdmCLB1能够诱导明显的抗肿瘤效应。推测可能的抗癌机制为OX-M-AdmCLB1在动物体内亦能被DC特异识别和摄取,其携带的细胞周期蛋白B1基因在DC内高效表达并通过“交叉呈递”方式呈递相应的抗原肽片段给CD8<sup>+</sup>T细胞,打破机体对小鼠细胞周期蛋白B1的免疫耐受,激发了针对肿瘤组织的特异性CTL反应,诱导并激活了机体抗肿瘤免疫<sup>[4,5]</sup>。

总之,本研究构建了偶联有OX-M的新型重组腺病毒OX-M-AdmCLB1;体外研究提示OX-M-AdmCLB1可被DC特异识别;体内实验显示了OX-M-AdmCLB1明显的抗肿瘤作用,估计此作用与OX-M-AdmCLB1诱导并激活机体抗肿瘤免疫有关;作为一种高效、特异的方法,OX-M-AdmCLB1为肿瘤基因治疗提供了一个极有潜力的新途径。我们今后的工作是进一步阐明OX-M-AdmCLB1的抗癌机制,为临床应用OX-M-AdmCLB1进行抗肿瘤治疗提供理论基础和实验依据。

### 参考文献 (References)

- [1] O'Connor PM *et al. Cell Growth Differ*, 1992, **3**: 43
- [2] Soria JC *et al. Cancer Res*, 2000, **60**: 4000
- [3] 杨维华等. *中国肿瘤*, 2003, **12**: 45
- [4] Chieppa M *et al. J Immunol*, 2003, **171**: 4552
- [5] Apostolopoulos V *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 10128
- [6] Breyer B *et al. Curr Gene Ther*, 2001, **1**: 149
- [7] He TC *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 2509
- [8] 张 伶等. *华西口腔医学杂志*, 2005, **23**(增刊): 98
- [9] Wu QM *et al. World J Gastroenterol*, 2003, **9**: 2404
- [10] Sandig V *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 1002
- [11] Winzler C *et al. J Exp Med*, 1997, **185**: 317
- [12] 李湘新等. *肿瘤学杂志*, 2004, **10**: 378
- [13] Anderson IC *et al. Cancer Res*, 1996, **56**: 715
- [14] Kopen GC *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 10711

## Construction of Oxidative Mannan-conjugated Adenovirus-mcyclin B1 and Induction of Anti-tumor Effect *in Vivo*

Ling Zhang, Yu-Quan Wei<sup>1</sup>, Lei Jiang, Ji-Cheng Li\*

(Institute of Cell Biology, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China; <sup>1</sup>State Key Laboratory of Biotherapy and Cancer Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract** To construct the replication-deficient recombinant adenoviruses inserted mouse cyclin B1 (mcyclin B1) cDNA driven by CMV promoter using homologous recombination in bacteria provided by AdEasy system. Then to synthesize oxidative mannan-conjugated adenovirus-mcyclin B1 (OX-M-AdmCLB1) and further elucidate its anti-tumor activity. The shuttle plasmid pShuttle-CMV-mcyclin B1 (pSh-C-mCLB1) in which mcyclin B1 cDNA was inserted into the downstream of CMV promoter was established by ligation. Then the linearized pSh-C-mCLB1 was co-transformed with backbone vector pAdEasy-1 to obtain the recombinant adenoviral plasmids pAdmCLB1 by homologous recombination. After packed in HEK-293 cells, the recombinant adenovirus AdmCLB1 was obtained. To further confirm AdmCLB1, its genomic DNA was isolated and used as template to gain mcyclin B1 cDNA by PCR amplification. AdmCLB1 was expanded and purified. To synthesize OX-M-AdmCLB1, OX-M was mixed with AdmCLB1. Dendritic cells (DCs) were infected with OX-M-AdmCLB1 *in vitro* and the expression of mcyclin B1 in DCs was evaluated through RT-PCR amplification. Being treated with OX-M-AdmCLB1 one week later, BALB/C mice were challenged with CT26 colon carcinoma (CT26) cells. Then the tumor growth and survival of mice were observed. The virus titer of AdmCLB1 was  $2.1 \times 10^{11}$  pfu/ml. The expression of mcyclin B1 in DCs infected with OX-M-AdmCLB1 was higher than AdmCLB1 group. The potential for attenuating tumor growth and sustaining survival benefits in mice treated with OX-M-AdmCLB1 has been displayed. OX-M-AdmCLB1 we constructed could induce the anti-tumor activity *in vivo* successfully, which might be connected tightly with the activation of immune system through the target recognition between DCs and OX-M-AdmCLB1.

**Key words** cyclin B1; oxidative mannan; recombinant adenovirus; tumor; dendritic cells

Received: March 31, 2006 Accepted: July 27, 2006

\*Corresponding author. Tel: 86-571-87217145, Fax: 86-571-87217453, E-mail: lijichen@zju.edu.cn