

文章编号:1005-6947(2007)02-0141-04

· 基础研究 ·

KDR 启动子介导胸苷激酶体外靶向杀伤血管内皮细胞

李宝金^{1,2}, 张超¹, 宁长青³, 伊远学¹, 郝颖¹, 刘晓平¹, 区庆嘉²

(1. 北京大学深圳医院 肝胆腔镜外科, 广东 深圳 518036; 2. 中山大学附属第二医院 肝胆外科, 广东 广州 510120; 3. 安徽省阜阳市人民医院 外科, 安徽 阜阳 236004)

摘要:目的 构建含以 KDR 为启动子的 HSV-tk 重组腺病毒, 体外评估其对血管内皮细胞的特异性杀伤效能。方法 采用 pAdeasy 系统, 构建受 KDR 启动子或巨细胞病毒 (CMV) 启动子调控并可表达 HSV-tk 基因的 AdKDR-tk 和 AdCMV-tk, 在 293 细胞中包装、扩增后, 体外分别感染表达 KDR 的人脐静脉血管内皮细胞系 (HUVEC) 和不表达 KDR 的肝癌细胞系 HepG2, 用丙氧鸟苷 (GCV) 处理感染细胞, 并以 MTT 法检测其细胞增殖情况。结果 病毒滴度均为 1×10^{10} pfu/mL。在感染复数 (MOI) 为 100 的条件下, 当细胞培养液中加入的 GCV 浓度由 0 增至 $50 \mu\text{g/mL}$ 时, 感染含 AdKDR-tk 的 HUVEC 细胞和 HepG2 细胞其存活率由 100% 分别下降至 $(28.94 \pm 5.67)\%$ 和 $(75.45 \pm 2.91)\%$ ($P < 0.01$), 而感染含 AdCMV-tk 的 HUVEC 细胞和 HepG2 细胞其存活率分别下降至 $(17.56 \pm 2.48)\%$ 和 $(23.15 \pm 5.72)\%$ ($P > 0.05$)。结论 KDR 启动子介导的 HSV-tk 具有特异性杀伤血管内皮细胞的作用。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(2):141-144]

关键词: 内皮, 血管; KDR 启动子; 胸苷激酶

中图分类号: R324; R654

文献标识码: A

KDR promoter transcriptionally target thymidine kinase suicide gene to kill vascular endothelial cells in vitro

LI Bao-jin^{1,2}, ZHANG Chao¹, NING Chang-qin³, Yi Yuan-xue¹, HAO Ying¹,
LIU Xiao-ping¹, OU Qing-jia²

(1. Department of Hepatobiliary and Laparoscopic Surgery, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China; 3. Department of General Surgery, Fuyang People's Hospital, Anhui Fuyang 236004, China)

Abstract: Objective To construction of recombinant adenovirus containing KDR promoter-HSV-tk suicide gene by using a pAdeasy system and evaluate its specific killing effect on vascular endothelial cells. **Methods**

By using pAdeasy system, recombinant adenoviral plasmid containing KDR or cytomegalovirus (CMV) promoter-controlled HSV-tk gene (AdKDR-tk and AdCMV-tk) was constructed. After packaging and amplification in 293 cells, the virus was used to infect KDR-expressed human umbilical venous endothelial cells (HUVEC) and KDR-unexpressed HepG2. Following administration of ganciclovir (GCV), the survival rate of gene-transfected HUVEC and HepG2 was evaluated by using MTT method. **Results** The pAdeasy System produced a higher titer of the recombinant adenovirus (1×10^{10} pfu/ml). Under infection index of 100, with increasing GCV concentration from 0 up to $50 \mu\text{g/ml}$, the survival rate of AdKDR-tk-transfected HUVEC and HepG2 decreased from 100% to $(28.94 \pm 5.67)\%$ and $(75.45 \pm 2.91)\%$, respectively ($P < 0.01$), while the survival rate of AdCMV-tk-transfected HUVEC and HepG2 declined from 100% to $(17.56 \pm 2.48)\%$ and $(23.15 \pm 5.72)\%$, respectively ($P > 0.05$). **Conclusions** KDR promoter-HSV-tk gene possess a specific killing effect on vascular endothelial cells treated with GCV.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(2):141-144]

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371386);广东省自然科学基金资助项目(31010);深圳市科技计划项目(200204093)。

收稿日期:2006-08-22; **修订日期:**2007-01-20。

作者简介:李宝金,男,江西九江人,北京大学深圳医院博士后,主要从事肝胆肿瘤的基础与临床方面研究。

通讯作者:刘晓平, E-mail: ninliu@163.com。

Key words: Endothelium, Vascular; KDR promoter; Thymidine Kinase

CLC number: R324; R654

Document code: A

直接向肿瘤细胞引入药物敏感基因而使前体药物对肿瘤细胞产生毒性作用的自杀基因治疗,以其作用直接、合理、有效而成为肿瘤基因治疗中的研究热点;其中胸昔激酶系统(herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir, HSV-tk/GCV)被证明更为高效、广谱和安全,且不易产生耐药性^[1-2]。组织特异性启动子由于其在不同组织细胞中的活性相差很大,因此可驱动目的基因在靶器官组织中的特异性表达,实现基因治疗的靶向性^[3]。与普通的病毒启动子相比,组织特异性表达可降低免疫反应,同时又可避免对其他器官的副作用。KDR(kinase domain insert containing receptor)是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的4种受体之一,其在肿瘤血管内皮细胞能高效表达,而在正常组织中呈低表达^[4]。笔者采用pAdeasy系统构建含以KDR为启动子的HSV-tk自杀基因重组腺病毒,体外观察其对血管内皮细胞的特异性杀伤效能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 限制性内切酶、T4 DNA连接酶购自TaKaRa公司及NEC公司。DMEM,胎牛血清,OptiMEM,琼脂糖和lipofectamine2000转染试剂盒购自Gibco公司。丙氧鸟苷(ganciclovir, GCV)购自Roche公司。

1.1.2 载体、菌株和细胞系 含KDR-tk基因的质粒pBluescript II KDR-tk来自第二军医大学东方肝胆医院殷正丰教授实验室。腺病毒系统pAdeasy穿梭质粒ptrack和ptrackCMV由John Hopkins肿瘤中心Bert Vogelstein教授惠赠。含质粒pAdeasy-1细菌BJ5183-AD-1由中山大学分子中心银巍博士赠送。人胚胎肾细胞系HEK293细胞、表达KDR的人脐静脉血管内皮细胞系(human umbilical venous endothelial cells, HUVEC)、不表达KDR的肝癌细胞系HepG2由本实验室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 pBluescript II KDR-tk鉴定 进行质粒的扩增、酶切、凝胶电泳,并送上海博亚生物技术有限公司进行测序。

1.2.2 穿梭载体ptrackKDR-tk和ptrackCMV-tk的构建 用Xho I/Sal I酶切pBluescript II KDR-tk,获得一含KDR基因启动子及tk序列的片段,经琼脂糖凝胶回收纯化。另用Xho I/Hind III酶切pBluescript II KDR-tk,获得一大约为1.85kb的tk片段,其中包含完整tkcDNA及其poly(A)信号位点,回收纯化。从中取下KDR-tk完整表达盒,并将其以相同克隆位点插入穿梭载体ptrack中,构建成ptrackKDR-tk。将上述1.85kb的tk片段以Xho I/Hind III位点插入ptrackCMV中,即构建成穿梭载体ptrackCMV-tk。

1.2.3 穿梭载体ptrackKDR-tk和ptrackCMV-tk在细菌内同源重组与纯化 用Pme I酶切使穿梭载体ptrackKDR-tk和ptrackCMV-tk线性化,然后用氯化钙法将其转化大肠杆菌BJ5183-AD-1,与其中腺病毒载体pAdeasy-1进行同源重组,筛选卡那霉素抗性重组体。重组结果经内切酶Pac I分析证实后,分别称pAdKDR-tk和pAdCMV-tk。再将其转化DH5 α 菌,大量扩增,保存备用。

1.2.4 重组腺病毒载体AdKDR-tk和AdCMV-tk的包装与扩增 HEK293细胞在T25培养瓶中培养至汇合度为50%~70%时,分别用线性化(经Pac I酶切)重组腺病毒AdKDR-tk和AdCMV-tk质粒分别转染。操作步骤按lipofectamine2000产品说明书进行。转染后第10天,收集细胞,反复冻融3次。取1/3病毒上清液再感染HEK293细胞进行大量扩增,3d后收集细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)重悬,反复冻融3次。最后,CsCl梯度离心纯化。

1.2.5 病毒滴度测定^[5] 测定前1d,在24孔板中接种293细胞(2×10^5 个/孔),第2天依次加入按10倍倍比稀释的待检病毒悬液400 μ L。37 $^{\circ}$ C感染60min后,吸去400 μ L上清;加入1mL完全培养液继续培养,48h后观察绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)阳性细胞数。按下式计算病毒滴度:病毒滴度(pfu/mL) = (GFP阳性细胞数 \times 病毒上清稀释倍数)/0.4mL。

1.2.6 细胞培养 HUVEC和HepG2置于DMEM培养液(含10%胎牛血清)于37 $^{\circ}$ C,含5%CO₂的孵箱中培养。

1.2.7 体外 GCV 敏感实验 在 96 孔板中分别接种 HUVEC 或 HepG2 细胞(2×10^3 个/孔),次日加入不同感染复数 (multiplicity of infection, MOI) (0, 1, 10, 100, 1 000) 的 AdKDR-tk 或 AdCMV-tk 病毒系列稀释溶液。培养 16h 后,吸尽培养液,实验孔换之以含 0, 1, 10 或 $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ GCV 的新鲜培养液,而对照孔换之以不含 GCV 的新鲜培养液, 37°C 继续培养 5d。采用 MTT 法 (四甲基偶氮唑盐比色法) 检测细胞增殖指数。

1.3 统计学处理

结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用方差分析比较组间均数差异。双侧 $P < 0.05$ 为有统

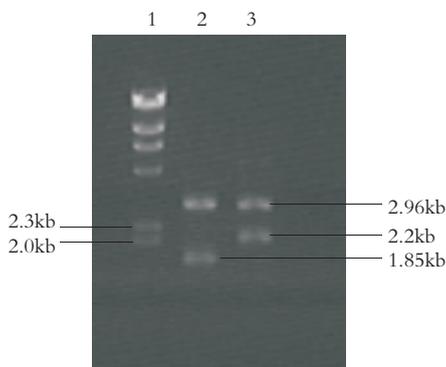


图1 pBluescript II KS-KDR-tk 的酶切鉴定图 1: λ DNA HindIII 酶切; 2: pBluescript II KS-KDR-tk 质粒 XhoI 与 HindIII 双酶切; 3: pBluescript II KS-KDR-tk 质粒 XhoI 与 SalI 双酶切

2.3 重组腺病毒的产生及其滴度

重组腺病毒质粒转染 HEK293 细胞后荧光显微镜下可见细胞有 GFP 表达。经 3 次 293 细胞内的扩增、CsCl 梯度离心后,测定病毒滴度为 1×10^{10} pfu/mL (图 3)。

2.4 体外 GCV 敏感试验

以不同 MOI 的 AdKDR-tk 分别转染的 HUVEC 和 HepG2 细胞,其对 GCV 有不同的敏感性,以 MOI=100 时最为敏感。GCV 浓度由 0 增至 $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ 时,感染的 HUVEC 细胞和 HepG2 细胞存活率由



图3 AdKDR-tk 感染 293 细胞 GFP 的表达 ($\times 100$)

计学意义。

2 结果

2.1 pBluescript II KDR-tk 的鉴定

经 XhoI/SalI, Hind III/XhoI 二组酶切后,各显两条片段,分别为 2.2kb 和 2.96kb; 1.85kb 和 2.96kb。其大小及测序结果与提供资料相符 (图 1)。

2.2 重组腺病毒载体 AdKDR-tk 和 AdCMV-TK 的鉴定

重组 pAdKDR-tk 和 pAdCMV-tk 经 PacI 酶切,显示的 2 个片段大小与预期值 (4.5kb 和 37kb) 一致 (图 2)。



图2 重组腺病毒质粒 pAdKDR-tk 及 pAdCMV-tk 的酶切鉴定图 1: λ DNA HindIII 酶切; 2: pAdCMV-tk 质粒 PacI 酶切; 3: pAdKDR-tk 质粒 PacI

100% 分别下降至 (28.94 ± 5.67)% 和 (75.45 ± 2.91)%。两种细胞的存活率有显著性差异 (图 4) ($P < 0.01$)。

以不同 MOI 的 pAdCMV-tk 感染的 HUVEC 和 HepG2 细胞对 GCV 均有相似的敏感性。随着 MOI 和 GCV 浓度增加,细胞存活率均呈现明显下降趋势。当 MOI 为 100, GCV 浓度由 0 增至 $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ 时, HUVEC 和 HepG2 细胞存活率分别变为 (17.56 ± 2.48)% 和 (23.15 ± 5.72)% 两种细胞的存活率差异无显著性 (图 4) ($P > 0.05$)。

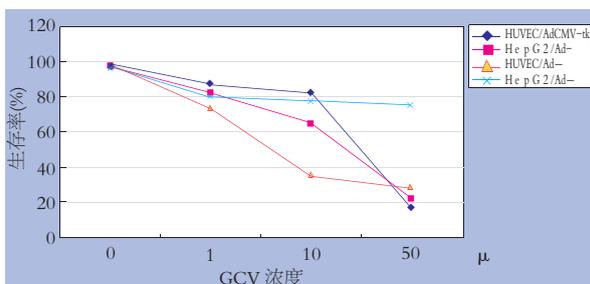


图4 转基因细胞体外杀伤曲线

3 讨论

血管生成是肿瘤生长和转移的先决条件之一。瘤组织内血管内皮细胞和肿瘤细胞的比例约为1:100,破坏相对少量的血管内皮细胞即可使供血区内大量的肿瘤细胞发生缺血坏死。这是肿瘤治疗的一个新策略,比直接针对肿瘤细胞的治疗具有更确切的效果^[6]。已有不少研究表明,利用重组腺病毒介导的自杀基因系统 HSV-tk/GCV 可在体外有效地杀伤血管内皮细胞^[7]。由于腺病毒可广泛感染肿瘤细胞与正常细胞,目前所采用自杀基因系统一般以 CMV 作为启动子。但由于它缺乏特异性杀伤肿瘤血管内皮细胞的能力,故探讨基因治疗的靶向性调控已成为决定基因治疗效果及可行性的关键因素。

业已明了 KDR 特异性地表达于血管内皮细胞,其表达水平与血管内皮细胞更新速度呈正相关。生理情况下正常组织血管内皮细胞更新速度缓慢,KDR 表达很低,肿瘤组织中的血管内皮细胞处于活跃的增殖状态,增殖速度比正常组织血管内皮细胞快 500 倍,KDR 表达很高^[8]。故认为 KDR 是一个具有高度特异性的肿瘤治疗靶点。Szary 等^[4]利用 KDR 表达具有血管内皮细胞特异性这一特点,构建了 KDR 启动子介导的病毒载体,结果表明该载体可在血管内皮细胞中靶向表达。

本研究利用肿瘤与正常组织中血管内皮间 KDR 表达的差异性,设计了以 KDR 启动子调控由腺病毒介导的自杀基因 HSV-tk 转移系统 (AdKDR-tk),使其仅在肿瘤血管内皮细胞中靶向表达,进而特异性杀伤肿瘤血管内皮细胞。采用腺病毒作为目的基因的载体具有滴度高、稳定性好、转基因效率高的优点。传统制备腺病毒的方法则细胞内同源重组效率低,且费时费力。pAdeasy 系统采用特定的大肠杆菌完成同源重组不仅缩短实验周期,且提高其效率。本实验采用一种新型的 pAdeasy 系统,它与目前常用的 pAdeasy 系统相比具有以下优点:(1) AdKDR-tk 和 AdCMV-tk 质粒中带有 GFP 报告基因,利用其可以直接在荧光显微镜下观察转染和感染效率及监测重组病毒的滴度,解决了传统方法不能在早期了解和证实腺病毒产生这一难点。(2) 利用 BJ5183-AD-1 进行细菌内

同源重组,重组效率高,阳性克隆 90% 以上;氯化钙法简单可行,节省贵重仪器开支(如电穿孔装置),便于开展。

将重组腺病毒 AdKDR-tk 和 AdCMV-tk 分别感染表达 KDR 的 HUVEC 和不表达 KDR 的 HepG2,结果显示感染 AdKDR-tk 的 HUVEC 细胞生存率随着 GCV 的浓度增加而显著下降,而感染 AdKDR-tk 的 HepG2 细胞存活率下降幅度显著低于前者。不同的是,感染 AdCMV-tk 的 HUVEC 和 HepG2 细胞存活率均随着 GCV 浓度增加而显著下降,两者下降幅度无明显差异。上述结果表明,KDR 基因启动子可调控 HSV-tk 在血管内皮细胞中的特异性表达,从而实现了自杀基因 HSV-tk 对 HUVEC 的特异性杀伤作用。

参考文献:

- [1] 董涇青,马道新,刘茂玲,等. 双自杀基因系统对体外胆管癌抑制作用的实验研究[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(11): 843-846.
- [2] Iwasaki Y, Ueda M, Yamada T, *et al.* Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticles [J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(1): 74-81
- [3] Liu XP, Li BJ, Zhang C. Construction and identification of recombinant vectors carrying herpes simplex virus thymidine kinase genes expressed in vascular endothelial cells [J]. *Ai Zheng*, 2006, 25(2): 179-184.
- [4] Szary J, Kalita K, Przybyszewska M, *et al.* KDR promoter can transcriptionally target cytosine deaminase suicide gene to cancer cells of nonendothelial origin [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(5): 3471-3475.
- [5] He TC, Zhou S, DaCosta LT, *et al.* A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(5): 2509-2514.
- [6] Dutour A, Monteil J, Paraf F, *et al.* Endostatin cDNA/Cationic liposome complexes as a promising therapy to prevent lung metastases in osteosarcoma: study in a human-like rat orthotopic tumor [J]. *Mol Ther*, 2005, 11(2): 311-319.
- [7] Mavria G, Harrington KJ, Marshall CJ, *et al.* In vivo efficacy of HSV-TK transcriptionally targeted to the tumour vasculature is augmented by combination with cytotoxic chemotherapy [J]. *J Gene Med*, 2005, 7(3): 263-275.
- [8] Labrecque L, Lamy S, Chapus A, *et al.* Combined inhibition of PDGF and VEGF receptors by ellagic acid, a dietary-derived phenolic compound [J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(4): 821-826.