

## 携带 p53 基因的重组腺病毒的构建及 对肿瘤细胞抑制的研究\*

肖庚富 齐义鹏\*\* 程璇纭 李凌云 李志达

(武汉大学病毒学及分子生物学系 武汉 430072)

**关键词** 腺病毒载体, p53 基因, 肿瘤基因治疗

**分类号** Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0517-21

恢复和增强抑癌基因的功能是肿瘤基因治疗的策略之一。p53 基因是重要的抑癌基因<sup>[1,2]</sup>, 人类肿瘤中的 50% 与其突变有关<sup>[3]</sup>。p53 基因突变也是影响化疗、放疗效果的重要因素<sup>[4]</sup>。向肿瘤细胞中引入野生型 p53 基因, 不仅可以直接逆转肿瘤细胞恶性表型, 也可以提高化疗及放疗效果, 改善患者预后。

腺病毒对人的致病性较小, 宿主范围广泛, 滴度高, 转染率高, 不整合而避免致癌危险, 适用于体内肿瘤局部基因转染。腺病毒载体成为继逆转录病毒载体之后发展最快的基因转移系统。

本研究构建了携带野生型 p53 基因的腺病毒, 研究了其对几种肿瘤细胞生长的抑制作用。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 质粒

pCMV-p53-BAM 由美国约翰·霍普金斯肿瘤中心 Bert Vogelstein 教授赠送<sup>[5]</sup>; pRSetA 购于 Invitrogen 公司; pCA13 和 pBHG11 为 Microbix Biosystem Inc. 产品。

pBHG11 包含腺病毒 Ad5 基因组 36 kb 中的约 34 kb 序列, 但 Ad5E1 区 188bp 至 1339 bp 缺失, 代之以氨苄青霉素抗性基因和复制起始位点。pBHG11 缺少包装信号  $\phi$  (22bp 至 342bp) 和 Ad5E3 区 (27865bp 至 30995bp 序列)。

pCA13 质粒包含腺病毒 Ad5 从 22bp 至 5790 bp 的序列, 有包装信号, 但缺失 E1 区从 342bp 至 3523bp 的序列, 代之以上游有 HCMV 启动子、下游有 SV40 polyA 序列的多克隆位点。

#### 1.2 细胞

腺病毒包装细胞 293 细胞、正常人胚肺 MRC-5 细胞由中国典型培养物保藏中心 (CCTCC, 武汉) 提供; 肺腺癌 A549 细胞、皮肤癌 A431 细胞购于中国科学院细胞生物学研究所; 膀胱癌 EJ 细胞、乳腺癌原代培养细胞取自同济医科大学。

293 细胞用 DMEM (8% 马血清) 塑料瓶培养; MRC-5 细胞、A549 细胞、EJ 细胞用 RPMI 1640 (10% 小牛血清) 培养; A431 细胞用 F12 (10% 小牛血清) 培养; 乳腺癌细胞用 RPMI 1640 (10% 胎牛血清) 塑料瓶培养。

#### 1.3 pCAp53 转移载体的构建

pCMV-p53-BAM 的 *Bam*HI 片段即 p53 基因, 与经 CIAP 去磷酸化的载体 pRSetABgl II 片段连接

\* 国家自然科学基金高技术新探索项目 (No. 39880031)。

\*\* 联系与负责作者。

收稿日期: 1998-10-26, 修回日期: 1999-04-09。

(*Bam*HI 与 *Bgl* II 末端互补), 构建成中间载体 pRSetp53, 用 *Pvu* II 鉴定 p53 插入方向(从 *Xho* I 到 *Hind* III 的方向为正方向); pRSetp53 的 *Xho*I/*Hind* III 片段与载体 pCA13 的 *Sal*I/*Hind* III 片段连接(*Xho*I 与 *Sal*I 末端互补), 即为 pCAp53。具体方法参见《基因及其操作原理》<sup>[6]</sup>。

#### 1.4 携带 p53 的重组腺病毒的构建

大量提取 pCAp53 和 pHBG11 质粒 DNA, 各取 20 $\mu$ g, 用 lipofectin(Gibco 公司)包裹, 共转染 70%~80% 成片的 293 细胞, 37 $^{\circ}$ C 温育 5 h, 倒掉转染液, 换正常培养液, 继续培养, 观察细胞状况, 出现明显的 CPE 后, 收获病毒, 电镜(日立 H8100)观察病毒粒子。在 293 细胞上增殖重组腺病毒并滴定其滴度。

#### 1.5 肿瘤细胞抑制效应检测

**1.5.1 结晶紫染色:** 待细胞生长接近致密单层时, 3 瓶接病毒, 换维持液, 为实验组; 3 瓶不接病毒作对照组。观察 CPE, 24、48、72h 各取 1 瓶, 甲醛固定, 结晶紫染色。

**1.5.2 MTT 染色:** 在 96 孔培养板(12 孔 $\times$ 8 排)上接种细胞, 每孔 200 $\mu$ L(约  $10^3$ ~ $10^4$  个细胞), 培养 2~3 d 后, 3 排接病毒 20 $\mu$ L, 换维持液, 为实验组; 3 排仅换维持液, 为对照组。继续培养 24、48、72h, 每组分别取 1 排, 加 MTT 溶液(5mg/mL)20 $\mu$ L/孔, 温育 4 h, 弃培养液, 每孔加 DMSO 150 $\mu$ L 溶解。选择 490 nm 波长, 用酶联免疫检测仪测吸光度。实验组每排 12 孔吸光度平均值为 A, 对照组为 A', 病毒对肿瘤细胞生长的抑制率 =  $(1 - A/A') \times 100\%$ 。病毒对每种肿瘤细胞生长的抑制率均用 MTT 法检测 4 次, 报道其平均值。

#### 1.6 流式细胞计数<sup>[7,8]</sup>

取感染病毒 48、72 h 的细胞及未感染细胞, 乙醇固定, PBS 清洗, RNase 消化, Annexin-V-fluorescein 和碘化丙啶(PI)染色, 用 FACScan 流式细胞仪检测。

## 2 结 果

### 2.1 pRSetp53 的构建及酶切分析

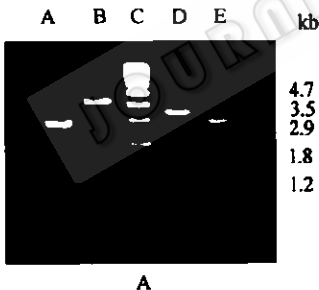
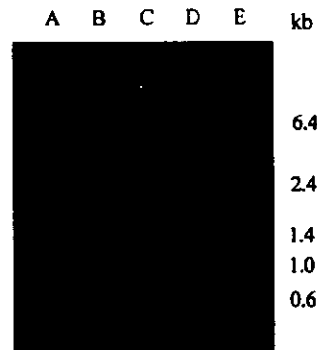


图 1A pRSetp53 的酶切鉴定

- A. pRSetA *Eco*R I 酶切  
 B. pRSetp53 *Eco*R I 酶切  
 C. 1 kb DNA ladder(由下至上 1.0、1.6、2.0、3.1、4.1、5.1、6.1 kb)  
 D. pRSetp53 *Pvu* II 酶切  
 E. pRSetp53 *Xho*I/*Hind* III 酶切



B

- 图 1B pCAp53 的酶切鉴定  
 A. pCA13 *Pvu* II/*Bgl* II 的酶切  
 B. pCAp53 *Pvu* II/*Bgl* II 酶切  
 C. 1 kb DNA ladder  
 D. pCA13 *Bgl* II 酶切  
 E. pCAp53 *Bgl* II 酶切

为方便地鉴定野生型 p53 基因插入方向, 先构建了中间转移载体 pRSetp53。将 pCMV-p53-BAM 和 pRSetA 质粒分别用 *Bgl* II 和 *Bam*HI 单酶切, 连接构建成 pRSetp53。pRSetp53 经 *Xho*I 和 *Hind* III 双酶切, 释放出 1.8 kb 野生型 p53 基因片段和 2.9 kb 载体片段。由于野生型 p53 基因距离 3' 端 1.2 kb 处有单一 *Pvu* II 位点, pRSetA 多克隆位点近 *Hind* III 处也有单一 *Pvu* II 位点, 用 *Pvu* II 单酶切 pRSetp53, 可

放出此 1.2kb 片段。酶切鉴定表明 pRSetp53 构建成功,方向正确(图 1A)。

### 2.2 pCAp53 的构建及酶切分析

将 pRSetp53 质粒 DNA 用 *Xho*I/*Hind*III 酶切,回收野生型 p53 基因片段,插在 pCA13 的 *Sal*I/*Hind*III 位点,构建 pCAp53。经 *Bgl*II 酶切,释放 2.4 kb 片段,其为 p53 基因加上 pCA13 的 CMV 启动子和 SV40 AN 区组成,6.4kb 片段为酶切后载体。为进一步鉴定 p53 基因插入方向,用 *Pvu*II 和 *Bgl*II 酶切重组子,与 pCA13 经 *Pvu*II/*Bgl*II 酶切的结果相比,多一条 1.4 kb 和 1.0 kb 片段。这是因为 p53 基因上的 *Pvu*II 位点距离下游端 *Hind*III 位点为 1.2 kb,*Hind*III 位点距其下游端的 *Bgl*II 位点 187bp,二者相加约 1.4 kb。酶切分析鉴定表明 pCAp53 构建成功(图 1B)。

### 2.3 重组腺病毒的构建、电镜观察及滴定

pCAp53 和 pBHG11 质粒共转染 293 细胞,24 h 观察,少数细胞变圆脱落。48 h 后,脱落细胞继续增加,6 d 后细胞完全脱落。取上清,电镜观察,1.1×10<sup>4</sup> 倍放大后可见 0.8 μm 球形病毒颗粒(图 2)。用此病毒液感染新的 293 细胞,增殖病毒并纯化。将重组腺病毒稀释至 1×10<sup>-8</sup>,取 0.3 mL 感染 293 细胞单层,有 2 个 PFU,因而其滴度约为 6.7×10<sup>8</sup> PFU/mL。

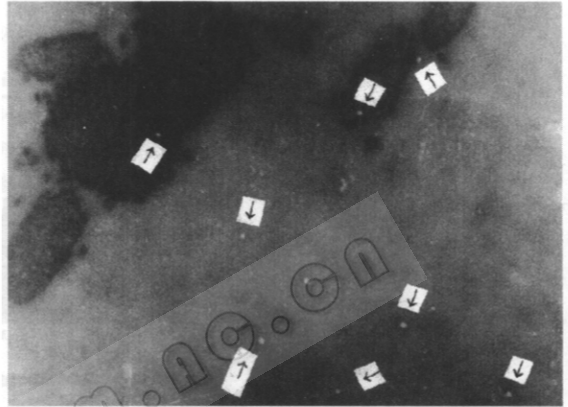


图 2 重组腺病毒电镜观察(箭头所指为重组腺病毒)

### 2.4 肿瘤细胞生长的抑制作用

重组腺病毒感染乳腺癌细胞、膀胱癌 EJ 细胞,引起肿瘤细胞死亡,死亡细胞从瓶壁脱落下来,最后和培养基一起弃去,不能被甲醛固定,不能被结晶紫染色,而贴壁细胞可被着色。因此结晶紫染色实验可以定性地观察重组腺病毒对肿瘤细胞生长的抑制作用。结果显示:重组腺病毒明显抑制原代乳腺癌细胞和 EJ 细胞的生长,死亡细胞脱落,随着时间延长,贴壁细胞(结晶紫染色)逐渐减少,而两种细胞未加病毒的对照组生长正常(图略)。

活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能将噻唑蓝(MTT)还原为蓝紫色结晶物 Formazan 并沉积于细胞中,而死细胞无此功能,所以 MTT 法是一种较好的检测细胞存活和生长的方法。MTT 染色法测得肿瘤细胞生长抑制率结果如表 1。表 1 显示:重组腺病毒 Adp53 显著地抑制了膀胱癌 EJ 细胞的生长,72h 抑制率达 86.7%;Adp53 也抑制了皮肤癌 A431 细胞的生长,72h 抑制率达 78.4%;重组腺病毒对肺腺癌 A549 细胞的抑制作用不显著。

表 1 重组腺病毒对肿瘤细胞生长的抑制率

培养时间/h	抑制率/%		
	A549	EJ	A431
24	4.7	38.9	20.8
48	19.3	77.7	72.3
72	17.1	86.7	78.4

### 2.5 重组腺病毒对正常细胞安全

选用对野生型腺病毒敏感的正常人胚肺二倍体细胞 MRC-5 为材料,比较重组腺病毒与野生型腺病毒感染人胚肺细胞的区别,对重组腺病毒的安全性进行初步探讨。野生型腺病毒感染 MRC-5,24 h 即可出现明显的致细胞病变效应(CPE),即细胞变圆、膨大、聚集,部分细胞死亡,从细胞培养瓶壁脱落下来。而野生型腺病毒感染 MRC-5,24、48、72h 均未出现 CPE,细胞生长正常。图 3 给出了野生型腺病毒

(图 3A)和重组腺病毒(图 3B)感染 MRC-5 细胞 24h 时的显微照片。MTT 染色法也提示:感染重组腺病毒的 MRC-5 细胞与未感染的对照细胞吸光度值差异无显著性意义。结果表明重组腺病毒较为安全。

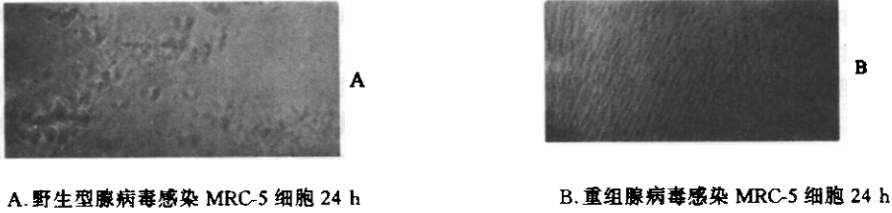


图 3 重组腺病毒与野生型腺病毒感染人胚肺细胞的显微摄影

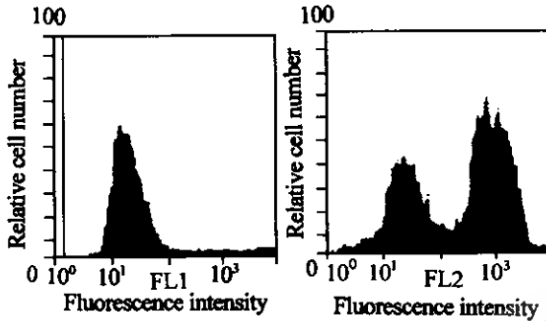


图 4 重组腺病毒感染 EJ 细胞的流式分析

FL1. EJ 细胞, 未感染病毒, 48h

FL2. EJ 细胞, 感染重组腺病毒, 48 h

## 2.6 重组腺病毒诱发肿瘤细胞凋亡

流式细胞仪为荧光激活细胞分类仪, 可用于检测细胞凋亡。EJ 细胞流式细胞仪检测结果如图 4。FL1 为未感染病毒的细胞, FL2 为重组腺病毒感染 48 h 的细胞。和 FL1 相比, FL2 在正常细胞峰侧边出现明显的亚二倍体细胞峰, 提示重组腺病毒诱导了肿瘤细胞凋亡<sup>[7]</sup>。在细胞凋亡的早期, 磷脂酰丝氨酸(PS)即从细胞膜的内部转移到外层。Annexin-V 是一种与 PS 有高度亲和力的蛋白, 因而能作为外露 PS 的敏感探针, 细胞坏死也有 PS 外露, 因而 Annex-

in-V-fluorescein 将凋亡和坏死细胞都染色。PI 为核酸嵌入型染料, 可嵌入双螺旋多核苷酸结构。PI 能穿过坏死细胞的细胞膜使之着色, 但不能穿过活细胞或凋亡早期细胞的细胞膜, 不能着色, 即 PI 只将坏死细胞染色。Annexin-V-fluorescein 和 PI 两者结合能区分凋亡和坏死<sup>[8]</sup>。本实验中主要为 Annexin-V-fluorescein 着色细胞, 罕见 PI 着色细胞, 提示肿瘤细胞的死亡为凋亡。计数结果在死亡细胞中凋亡细胞约占 92%。

## 3 讨 论

本研究使用的腺病毒载体是较好的基因治疗载体。在 pBHG11 质粒中, Ad5 的复制非必需区 E3 区缺失, 扩大了包装容量, 也降低了机体的免疫反应, 而免疫反应正是腺病毒载体用于临床的主要障碍<sup>[9]</sup>。pCA13 质粒 E1 区缺损, 需与 pBHG11 共转染包装细胞才能产生感染性病毒粒子。E1 区缺损的腺病毒不能在其他细胞中独立复制, 保证其安全性。

p53 基因编码一个由 393 个氨基酸组成的含磷蛋白。p53 蛋白的 102 至 292 位氨基酸区域为序列特异性 DNA 结合区, 90% 以上的 p53 突变发生于该区, 而该区的突变又多发于 R175、G245、R248、R249、R273 和 R282, 尤其是 R248、R273 突变频率更高<sup>[10]</sup>。

膀胱癌 EJ 细胞、皮肤癌 A431 细胞中 p53 基因突变, 用携带野生型 p53 基因的重组腺病毒 Adp53 感染 EJ、A431 细胞后, 人巨细胞病毒强启动子启动 p53 基因的表达, Adp53 使肿瘤细胞恶性增殖的状况得到有效控制, 大量肿瘤细胞凋亡, 3 日死亡率分别达到 86.7% 和 78.4%。肺腺癌 A549 细胞肿瘤形成机制不同, 含有正常的 p53 基因, 用 Adp53 感染 A549 细胞, 发现病毒对其生长有一定抑制作用, 但效果不显著。结果表明 Adp53 对 p53 突变的肿瘤细胞有显著的抑制作用。由于腺病毒可以感染多种细胞, 半

数以上人类肿瘤中存在 p53 突变,所以,进一步改造 Adp53,可望用于多种肿瘤的基因治疗,在临床上单独使用或配合放疗、化疗治疗肿瘤,发挥重要作用。

原代细胞较之于传代细胞更接近于体内状况,本研究考察了 Adp53 对原代乳腺癌细胞的抑瘤效应。结果显示,Adp53 抑制了乳腺癌细胞的生长。提示:本例乳腺癌很可能存在 p53 突变,通过诱导依赖 p53 的细胞凋亡而起作用的化疗药物可能不易发挥作用,在临床上需要考虑联合使用化疗药物,以控制肿瘤转移、改善患者预后。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] K. Polyak, T. Waldman, B. Vogelstein *et al.* *Genes Dev.*, 1996, **10**:1945~1952.
- [ 2 ] A. G. Paulovich. *Cell*, 1997, **88**:315~321.
- [ 3 ] M. Hollstein, K. Rice, M. S. Greenblatt *et al.* *Nucleic Acids Research*, 1994, **22**(17):3551~3555.
- [ 4 ] S. Lutzker, A. J. Levine. *Nature Med.*, 1996, **2**:804~810.
- [ 5 ] S. J. Baker, S. Markowitz, B. Vogelstein. *Science*, 1990, **249**:913~915.
- [ 6 ] 齐义鹏著. 基因及其操作原理, 武汉:武汉大学出版社, 1998.
- [ 7 ] M. A. Hotz, J. P. Gong, F. Traganos *et al.* *Cytometry*, 1994, **15**:237~242.
- [ 8 ] R. M. Pitti, S. A. Marsters, S. Ruppert *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**(22):12687~12690.
- [ 9 ] M. Bouret, B. Fang, S. Ekmekcioglu *et al.* *Gene Therapy*, 1998, **5**:189~195.
- [ 10 ] A. J. Levine. *Cell*, 1997, **88**:323~331.

## Construction of Recombinant p53 Adenovirus and Its Role in Inhibition of Growth of Tumor Cells\*

Xiao Gengfu Qi Yipeng Cheng Xuanhong Li Lingyun Li Zhida

(Dept. of virology and molecular biology, Wuhan University, Wuhan 430072)

**Abstract** p53 gene is a tumor suppressor gene and is involved in cell growth control. Wild-type p53 gene was inserted into pCA13 and got recombinant plasmid pCAp53. 293 cells(a kind of adenovirus packing cells) was co-transfected with pCAp53 and pBHG11, recombinant p53 adenovirus was obtained. Virus particle can be seen under electric microscopy and its diameter is about 80 nm. Virus titer is  $6.7 \times 10^8$  PFU/mL. Recombinant p53 adenovirus have no influence on growth of normal lung cells, but it can cause death of bladder tumor cell (EJ) and primary culture breast cancer cell. MTT assay results showed that recombinant p53 adenovirus inhibited growth of p53-deficient tumor cell, such as bladder tumor cell(EJ) and epidermis cancer cell(A431) and inhibiting rate in 72 hours may be 86.7% and 78.4%. Flow cytometry test showed that recombinant p53 adenovirus induced apoptosis of tumor cell. Wild-type p53 gene mediated by adenovirus vector may be used in the treatment for cancer.

**Key words** p53 gene, adenovirus vector, cancer gene therapy

\* Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 39880031).