

重组 Ad-CRM8-survivin-EHV4 TK 腺病毒的构建及对肝癌移植瘤的抑制作用

朱含章, 杨祺俊, 陆 贝, 万亚峰, 徐孙兵, 陆 军, 殷俊杰, 蔡 阳, 贾长库*

杭州市第一人民医院, 南京医科大学附属杭州医院肝胆胰外科, 浙江 杭州 310006

[摘要] 目的: 构建含有肝癌特异性的HS-CRM8增强子、survivin启动子及EHV4 TK自杀基因的腺病毒, 探讨该重组病毒对裸鼠肝癌移植瘤的抑制作用。方法: 构建重组 Ad-CRM8-survivin-EHV4 TK 腺病毒, 获取重组腺病毒。构建裸鼠肝癌皮下移植瘤模型, 给予重组腺病毒结合更昔洛韦(GCV)治疗, 2周后观察肿瘤大小。对肿瘤组织切片使用HE染色, 观察瘤内细胞坏死情况。结果: 裸鼠肝癌移植瘤经腺病毒治疗后, EHV4 TK 和 GCV+EHV4 TK 组肿瘤体积分别为 $(108.5 \pm 18.3) \text{mm}^3$ 和 $(37.6 \pm 8.7) \text{mm}^3$ 。GCV+EHV4 TK 组与 EHV4 TK 相比, 裸鼠的肿瘤重量减少, 生存率提高。HE染色结果显示, GCV+EHV4 TK 组肿瘤内出现大量细胞的坏死, 而 EHV4 TK 组肿瘤内仅有少量细胞的坏死。结论: 重组肝脏特异性腺病毒 Ad-CRM8-survivin-EHV4 TK 结合 GCV 能够有效地在体内促进肝癌细胞的坏死从而抑制裸鼠移植瘤的生长, 对肝癌的治疗有良好的效果。

[关键词] 自杀基因; 溶瘤腺病毒; HS-CRM8; EHV4 TK

[中图分类号] R730.59

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)06-765-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20180609

Construction of adenovirus carrying HS-CRM8, surviving promoter and EHV4 TK and its inhibitory effect on the xenograft tumor of HCC in nude mice

Zhu Hanzhang, Yang Qijun, Lu Bei, Wan Yafeng, Xu Sunbing, Lu Jun, Yin Junjie, Cai Yang, Jia Changku*

Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, Hangzhou First People's Hospital, Affiliated Hangzhou Hospital of NMU, Hangzhou 310006, China

[Abstract] **Objective:** To evaluate the inhibitory effect of adenovirus-mediated HS-CRM8-survivin-EHV4 TK suicide gene on the xenograft tumor of hepatocellular carcinoma (HCC) in nude mice. **Methods:** A liver-specific adenovirus vector, Ad-CRM8-survivin-EHV4 TK (EHV4 TK), was constructed by molecular cloning and recombination. In nude mice bearing human hepatocellular carcinoma, the recombinant adenovirus was injected directly into the tumor followed by intraperitoneal injection of the prodrugs GCV and the inhibition effect on tumor xenografts was observed. The tumor section was stained with hematoxylin and eosin. **Results:** After adenovirus treatment, the volume of the tumors in EHV4 TK and GCV+EHV4 TK groups were (108.5 ± 18.3) and $(37.6 \pm 8.7) \text{mm}^3$. GCV+EHV4 TK represented much stronger anti-tumor effect on tumor growth than EHV4 TK only. GCV+EHV4 TK also showed much more tumor necrosis than EHV4 TK only. **Conclusion:** The adenovirus-mediated HS-CRM8-survivin-EHV4 TK suicide gene combined with GCV treatment may provide us a more effective, specific and convenient gene therapy method.

[Key words] suicide gene; oncolytic adenovirus; HS-CRM8; EHV4 TK

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(06): 765-768]

肝癌具有极高的病死率, 是威胁我国居民健康的一种常见恶性肿瘤。目前临床上除早期小肝癌切除后5年生存率较高外, 其余肝癌5年生存率均

[基金项目] 浙江省医药卫生科技项目(2018KY569)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jiachk@126.com

较低^[1]。随着分子生物学技术的发展, 基因治疗研究取得了很大进展, 其中肿瘤组织特异性自杀基因疗法成功应用在体内外的研究中, 显示出良好的应用前景^[2]。肿瘤特异性启动子可以增强自杀基因特异性表达于肿瘤细胞。Survivin基因在绝大多数肿

瘤组织中高表达, survivin基因启动子广泛被应用于肿瘤治疗^[3]。马疱疹病毒4型胸苷激酶(equine herpesvirus type-4 thymidine kinase, EHV4 TK)是比人疱疹病毒1型胸苷激酶更好的自杀基因^[4]。肝细胞特异性顺式调节模块(hepatocyte-specific cis-regulatory module, HS-CRM8)是一个肝细胞特异性的顺式调节元件,可特异性增强肝脏特异性基因表达^[5]。本研究旨在探讨重组Ad-CRM8-survivin-EHV4 TK腺病毒系统在肝癌靶向治疗中的价值。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌细胞株 HepG2(中国科学院上海细胞库);DMEM、胎牛血清和胰蛋白酶(Gibco公司,美国);更昔洛韦(ganciclovir, GCV, Sigma公司,美国);重组4型腺病毒(adenovirus 4, Adv4)为上海吉玛制药技术有限公司构建及制备;其余试剂为国产市售试剂。清洁级BALB/c裸鼠45只,6周龄,体重16~18 g,由南京医科大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人肝癌细胞系 HepG2 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,置于 37 °C 饱和湿度及 5% CO₂ 的培养箱内培养,待生长细胞达到 80% 以上的汇合度时进行传代培养。

1.2.2 Ad-CRM8-survivin-EHV4 TK 载体构建及病毒包装

根据 GenBank 的人 survivin 基因启动子序列(GeneID: 332)、EHV4 TK 基因序列(Accession: A21059.1)和 HS-CRM8 序列构建新的自杀基因系统。HS-CRM8-survivin-EHV4 TK 序列合成、Pac I 和 BamH I 双酶切亚克隆至 Adv4 腺病毒载体以及腺病毒包装均由上海吉玛制药技术有限公司完成。

1.2.3 动物实验

将密度为 1×10^5 个/100 μ L 的 HepG2 肝癌细胞注射到裸鼠的前肢腋下,2 周后形成稳定的肝癌移植瘤。选取肿瘤体积相近(± 10 mm³)的裸鼠,分为 NC 组(成瘤后无处理)、Vec 组(病毒空载体)、GCV 组、EHV4 TK 组和 GCV+EHV4 TK 组,每组各 9 只。EHV4 TK 组和 GCV+EHV4 TK 组每组以 2×10^8 pfu/100 μ L 的重组腺病毒瘤内多点注射,每 2 d 注射 1 次,共 5 次;GCV 组于裸鼠腹腔内注射 GCV [50 mg/(kg·d)],连续用药 2 周。GCV+EHV4 TK 组第 1 次病毒注射 1 d 后于裸鼠腹腔内注射 GCV 50 mg/(kg·d),

连续用药 2 周;EHV4 TK 组给予 PBS 作为对照。测量瘤体重量和体积,计算瘤体体积的公式为长 \times 宽 \times 宽 $\times 0.5$ 。

2 周后,每组取 4 只小鼠,断颈处死,取瘤体标本并拍照,以 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,行苏木精和伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色并在显微镜下观察。剩余 5 只小鼠持续观察至 7 周,记录死亡情况。

1.3 统计学方法

应用 Prism GraphPad 5 软件进行统计分析,实验结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,利用单因素方差分析(one-way ANOVA)和多重比较分析比较多组数据之间以及多组中两两之间的差异, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

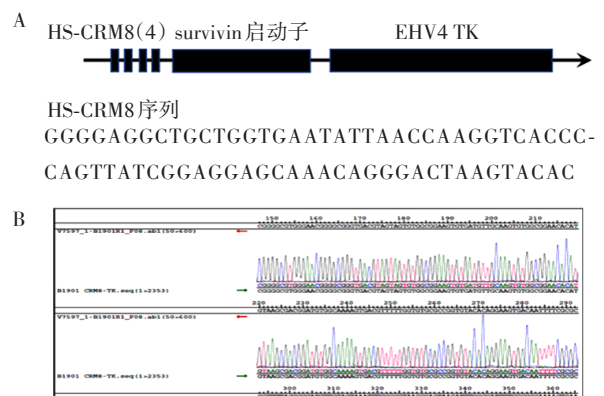
2 结果

2.1 Ad-CRM8(4)-survivin-EHV4 TK 重组腺病毒构建

将 4 次重复的 HS-CRM8 序列作为增强子,人 survivin 基因的启动子序列作为启动子, EHV4 TK 序列作为自杀基因,按图 1 所示方式进行组合。序列合成后,通过 Pac I 和 BamH I 双酶切亚克隆至 Adv4 质粒中,获得重组腺病毒载体。然后包装带有 EHV4 TK 自杀基因的腺病毒,经纯化和浓缩,最终获取滴度为 10^9 的腺病毒。

2.2 裸鼠肝癌移植瘤治疗结果

NC 组、GCV 组和 Vec 组之间, HepG2 肝癌细胞裸鼠移植瘤大小在 2 周后未见明显差异。与 NC 组、GCV 组和 Vec 组相比, EHV4 TK 组和 GCV + EHV4 TK 组裸鼠移植瘤体积重量及裸鼠生存率在经治疗



A: HS-CRM8(4)-survivin-EHV4 TK 组合序列示意图; B: 组合序列亚克隆至 Adv4 腺病毒质粒测序验证结果。

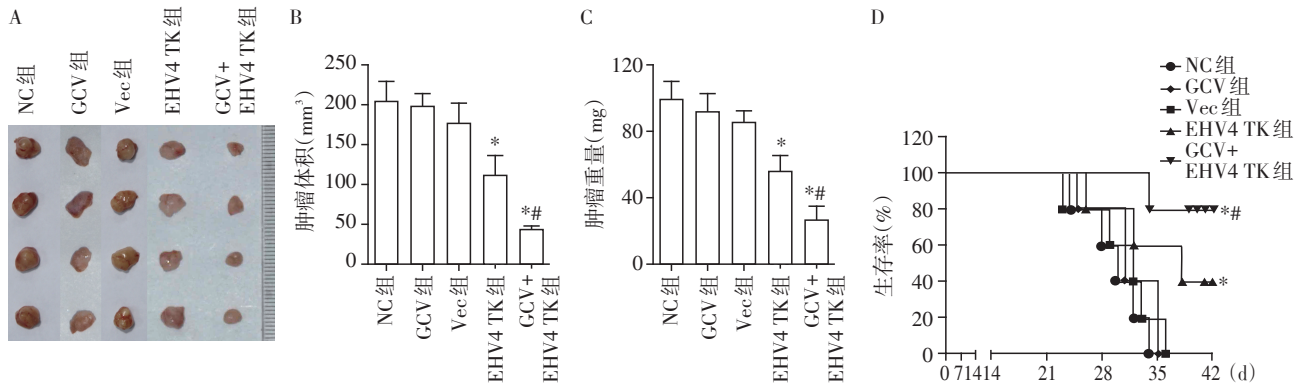
图1 EHV4 TK 自杀基因重组腺病毒载体构建
Figure 1 The construction of HS - CRM8 (4) - survivin - EHV4 TK recombinant adenovirus

2周后均出现明显差异(图2)。GCV + EHV4 TK组与EHV4 TK组相比也具有显著性差异($P < 0.05$)。

2.3 病理学分析

NC组、GCV组、Vec组、EHV4 TK组和GCV +

EHV4 TK组肝癌移植瘤治疗后,取移植瘤标本后经石蜡包埋切片,进行HE染色。结果显示,相对于NC组、GCV组和Vec组,GCV + EHV4 TK组肿瘤内大量细胞坏死,而EHV4 TK组肿瘤内仅有少量细胞



A: 肝癌移植瘤裸鼠经治疗2周后移植瘤,右侧直尺1小格为1 mm;B: 移植瘤体积统计图($n=4$);C: 移植瘤重量统计图($n=4$);D: 肝癌移植瘤裸鼠经治疗后的生存率统计图($n=5$)。与NC组、GCV组和Vec组比较,* $P < 0.05$;与EHV4 TK组比较,* $P < 0.05$ 。

图2 裸鼠肝癌移植瘤的治疗结果

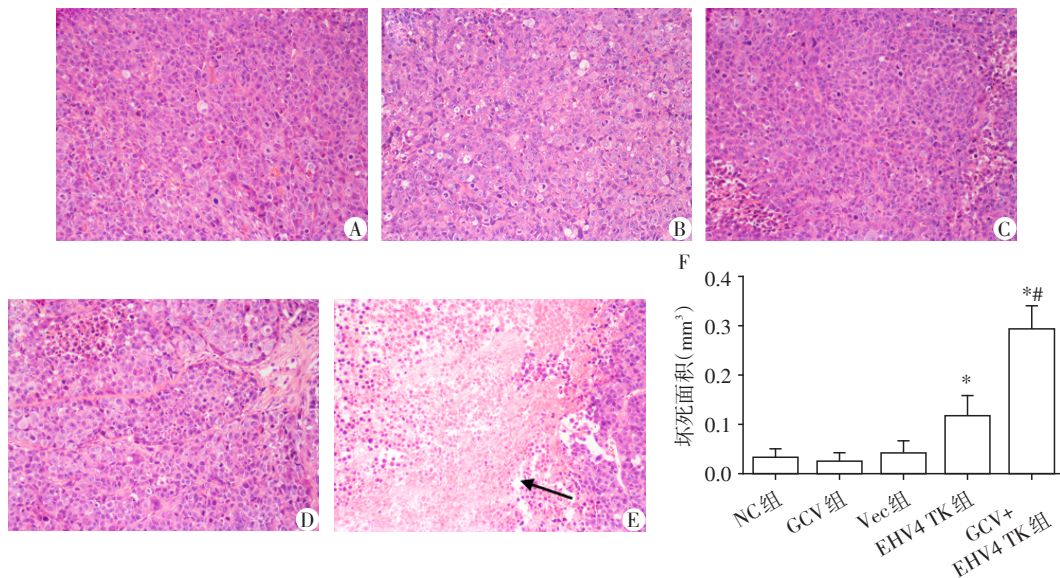
Figure 2 The outcome of the treatment on the xenograft tumor of HCC in nude mice

坏死(图3)。

3 讨论

自杀基因表达的产物能将无细胞毒性的药物前体转化为对细胞有毒性的药物,导致细胞DNA损伤及错配,复制停止,从而引发细胞死亡。通过病毒介导的外源性自杀基因在肿瘤细胞中表达来治

疗肿瘤的方法被称为药物敏感基因疗法或自杀基因疗法^[6]。目前应用较多的自杀基因有单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶(herpes simplex virus-thymidine kinase, HSVTK)基因和大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶(*E.coli* cytosine deonase, CD)基因^[7]。但是,寻找更加有效并具有特异性杀伤作用的自杀基因仍然是一个重要的研究方向。在最近的文献中提到,



A: NC组;B: GCV组;C: Vec组;D: EHV4 TK组;E: GCV + EHV4 TK组(箭头所指为细胞坏死区域);F: 细胞坏死区域的定量分析;与NC组、GCV组和Vec组比较,* $P < 0.05$;与EHV4 TK组比较,* $P < 0.05$, $n=5$ 。

图3 肝癌裸鼠移植瘤HE染色($\times 200$)

Figure 3 The results of HE staining for the xenograft tumor of HCC in nude mice ($\times 200$)

EHV4 TK 是比人疱疹病毒 1 型胸苷激酶更好的自杀基因。在实验设置和临床试验中单纯疱疹病毒 1 型胸苷激酶基因(HSV1 TK)是最广泛使用的自杀基因,TK 基因的表达使肿瘤细胞对抗病毒药 GCV 敏感。但表达 EHV4 TK 基因的肿瘤细胞对 GCV 的敏感度比表达 HSV1 TK 基因的肿瘤细胞最多高出 12 倍,同时表达 EHV4 TK 基因的肿瘤细胞产生的具有细胞毒性的三磷酸 GCV 数量比表达 HSV1 TK 基因的肿瘤细胞最多高出 5 倍^[8]。因此,本研究选用了 EHV4 TK 基因作为自杀基因。结果表明,EHV4 TK 基因作为自杀基因能够明显抑制肝癌异位移植瘤在小鼠体内的生长,并延长荷瘤小鼠的生存期。EHV4 TK 自杀基因的表达能够促进肝癌异位移植瘤的坏死,从而实现抑制肝癌异位移植瘤生长的作用。

但是,虽然自杀基因治疗在许多体外和体内的研究中得到成功应用,其在治疗癌症患者方面的临床效果还不够理想。例如,外源基因的转染仍然缺乏有效的靶向性和特异性;使用较差的病毒载体特异性受体导致肿瘤细胞中病毒载体的低表达。其中,增强自杀基因在肿瘤细胞中表达特异性的方法是利用肿瘤组织特异性的启动子来调节自杀基因的表达^[9]。由于 survivin 基因具有肿瘤特异性表达的特点,因此 survivin 基因的启动子已经被用于肿瘤治疗^[10]。但是针对肝癌组织特异性表达的调控序列仍有待进一步探索发现。近期,有研究组通过使用一种计算策略来鉴定具有肝细胞特异性的转录调控模块(cis-regulatory modules, CRMs),结果发现 CRM8 能够使 FIX 基因的表达最多增强 15 倍。这个 72 bp 的 HS-CRM8 元件来自人类的 SERPINA1 基因,并且包含了几个经典的转录因子结合位点,包括 FOXA1、CEBP、HNF1、MyoD、LEF-1、LEF-1/TCF,它们与体内的肝脏强特异性表达基因的转录密切相关^[11]。因此,本研究选用了 4 次重复的 HS-CRM8 序列作为增强子以及人 survivin 基因的启动子序列作为启动子来联合实现 EHV4 TK 自杀基因在肝癌细胞中特异并且高效率的表达。结果表明,GCV 处理联合 HS-CRM8 序列作为增强子显著提高了 EHV4 TK 自杀基因对肝癌异位移植瘤的抑制作用,并显著延长了荷瘤小鼠的生存期。同时,GCV 处理联合 HS-CRM8 序列作为增强子显著促进小鼠肝癌异位移植瘤的坏死。

[参考文献]

- [1] Hernaez R, El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma surveillance: The road ahead [J]. *Hepatology*, 2017, 65(3): 771-773
- [2] Chen ZH, Yan PY, Zuo ZH, et al. Targeting genomic rearrangements in tumor cells through Cas9-mediated insertion of a suicide gene [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(6): 543-550
- [3] Ciceri F, Bonini C, Labopin M, et al. Safety and efficacy of donor T cells Engineered with herpes simplex virus thymidine-kinase suicide gene (TK Cells) given after T-Cell depleted (TCD) haploidentical hematopoietic transplantation (Haplo-HSCT): Results of a 14-year follow-up in 45 patients [J]. *Biol Blood Marrow Tr*, 2017, 23(3): S54-S55
- [4] Loubiere L, Tiraby M, Cazaux C, et al. The equine herpes virus 4 thymidine kinase is a better suicide gene than the human herpes virus 1 thymidine kinase [J]. *Gene Ther*, 1999, 6(9): 1638-1642
- [5] Chuah MK, Petrus I, De Bleser P, et al. Liver-specific transcriptional modules identified by genome-wide in silico analysis enable efficient gene therapy in mice and non-human primates [J]. *Mol Ther*, 2014, 22(9): 1605-1613
- [6] Castillo-Rodríguez RA, Arango-Rodríguez ML, Escobedo L, et al. Suicide HSVtk gene delivery by neurotensin-polyplex nanoparticles via the bloodstream and GCV Treatment specifically inhibit the growth of human MDA-MB-231 triple negative breast cancer tumors xenografted in athymic mice [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97151
- [7] Navarro SA, Carrillo E, Griñán-Lisón C, et al. Cancer suicide gene therapy: a patent review [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2016, 26(9): 1095-1104
- [8] McSorley T, Ort S, Monnerjahn C, et al. A designed equine herpes thymidine kinase (EHV4 TK) variant improves ganciclovir-induced cell-killing [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 87(3): 435-444
- [9] Xiao J, Zhang G, Li B, et al. Dioscin augments HSV-tk-mediated suicide gene therapy for melanoma by promoting connexin-based intercellular communication [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 798
- [10] Mobahat M, Narendran A, Riabowol K. Survivin as a preferential target for cancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(2): 2494-2516
- [11] Di Matteo M, Samara-Kuko E, Ward NJ, et al. Hyperactive piggyBac transposons for sustained and robust liver-targeted gene therapy [J]. *Mol Ther*, 2014, 22(9): 1614-1624

[收稿日期] 2017-12-09