

双靶向溶瘤腺病毒 MD55 对肿瘤细胞与正常细胞的杀伤作用比较

王卫芸^{1,2} 顾锦法² 戴平¹ 肖田² 曹欣² 刘新垣^{2*}

(¹华东师范大学生命科学学院, 上海 200062; ²中国科学院上海生命科学研究院
生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 应用分子克隆和同源重组技术构建双靶向溶瘤腺病毒 MD55。分析 MD55 病毒在细胞中的复制能力, 并用 MTT 和结晶紫方法检测 MD55 对肿瘤细胞和正常细胞生长的影响, Western 印迹检测病毒感染后细胞中 E1A 蛋白和多聚 ADP 核糖聚合酶(PARP)片断的表达。结果显示, MD55 能在 MN/CA9 阳性的肿瘤细胞 SW620 和 OSRC-2 中特异性表达 E1A 蛋白, 并且在这些细胞中的复制能力和对这些细胞的杀伤性与对照病毒 ZD55 基本相同, 而其在正常细胞中的复制能力很弱, 对正常细胞的伤害很小; 同时 MD55 可诱导肿瘤细胞 SW620 和 OSRC-2 的凋亡, 而对正常细胞的凋亡无影响。实验结果表明双靶向溶瘤腺病毒 MD55 靶向性和安全性比单靶向病毒 ZD55 更高, 有望成为一种很好的肿瘤靶向基因-病毒治疗载体。

关键词 溶瘤腺病毒; MN/CA9 启动子; MD55; 病毒复制

肿瘤特异性增殖腺病毒(条件复制型腺病毒 CRAd)是一类很有前景的候选抗肿瘤药物。与传统的病毒载体相比, 这些病毒能在肿瘤细胞中特异性地复制和增殖, 从而杀死肿瘤细胞, 且释放出来的大量的子代病毒在肿瘤组织中扩散, 进一步消灭肿瘤, 而对正常细胞毒性很小^[1-3]。目前构建肿瘤特异性增殖病毒主要有两种方法: 一种方法是将病毒在正常细胞中复制所必需, 而在肿瘤细胞中复制不需要的基因进行剔除, 如单靶向溶瘤腺病毒 ZD55 的构建就是基于此策略, 该病毒缺失腺病毒 E1B 55kDa, 从而能够在 p53 功能缺失的肿瘤细胞中特异性复制; 另一种方法是用肿瘤特异性启动子控制病毒复制必需的基因, 如腺病毒的 E1A 及 E1B 基因等^[4, 5], E1A 基因是腺病毒最早表达的基因, 为腺病毒所必需, 因此使用肿瘤特异性启动子控制 E1A 基因, 就能达到控制病毒复制的目的。

MN/CA9 是碳酸酐酶家族的一种同工酶, 最早在人宫颈癌 HeLa 细胞中发现^[6, 7]。越来越多的研究表明, MN/CA9 广泛存在于肾癌、膀胱癌、乳腺癌、肺癌、头颈癌和宫颈癌等多种肿瘤组织中, 而在相应的正常细胞中没有表达^[8-10]。MN/CA9 被认为是一种肿瘤相关蛋白, 且 MN/CA9 启动子的活性是肿瘤特异性的, 这使 MN/CA9 启动子成为构建溶瘤腺病毒的一种很好的工具。

本研究在单靶向溶瘤腺病毒 ZD55 缺失 E1B

55kDa 的基础上^[11, 12], 用 MN/CA9 启动子替换野生型腺病毒 E1A 区启动子, 构建了一种双靶向溶瘤腺病毒 MD55, 并观察了该病毒对肿瘤细胞和正常细胞生长和凋亡的影响, 以检测其抗肿瘤能力和安全性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、工具酶及试剂 *Escherichia coli* 菌株 DH5 α 为本实验室所保存。常规限制性内切酶及 T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和碱性磷酸酶为 TaKaRa 公司产品。Taq 酶购自 Life Technologies 公司。DNA 凝胶回收试剂盒购自上海申能博彩公司。Dulbecco 改进的 Eagle 培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM)、RPMI 1640 (RPMI Medium 1640)、FBS (胎牛血清)、LipofectAMINE 购自 Gibco BRL 公司。QIAamp DNA Blood Mini Kit、Transfection Reagent Selector Kit 购自 Qiagen 公司。醋酸纤维膜购自 Amersham Life Science 公司。TRI

收稿日期: 2008-04-15 接受日期: 2008-06-05

缩写: MN/CA9: 碳酸酐酶家族的一种同工酶; MD55: MN/CA9 控制腺病毒 E1A 基因, 并缺失 E1B 55kDa 的双靶向溶瘤腺病毒; ZD55: 缺失 E1B 55kDa 的单靶向溶瘤腺病毒

中国科学院重点方向项目资助(No.KSCX2-YW-R-09)

* 通讯作者。Tel: 021-54921127, Fax: 021-54921126, E-mail: xyliu@sibs.ac.cn

Reagent 购自 Molecular Research Center Inc. RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司。其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.2 细胞株 腺病毒包装用 HEK293 细胞株购自 Microbix 公司。人胚正常肺细胞株 HFL-1、人胰腺癌细株 BxPC3、人结肠癌细胞株 SW620、人宫颈癌细胞株 HeLa 及人肾癌细胞株 OSRC-2 均购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞库。SW620、HeLa 和 BxPC3 培养液为含 10% FBS 的 DMEM, HFL-1 培养液为含 20% FBS 的 DMEM, OSRC-2 培养液为含 10% FBS 的 1640。

1.1.3 质粒、病毒 腺病毒包装所用质粒 pBHGE3 载体购于加拿大 Microbix Biosystem Inc. (Toronto)。pZD55 和 pZXC2 为本实验室在 pXC1 质粒基础上构建^[11,12], 质粒 pGEM-MN 为本实验室保存。病毒 ZD55 为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 检测 MN/CA9 mRNA 的表达 用 TRI Reagent (MRC) 裂解细胞, 细胞总 RNA 经乙醇沉淀后溶解在 DEPC 化的水中。取 1 μ g RNA 按照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 中的步骤合成单链 cDNA。根据 MN/CA9 cDNA 序列设计一对引物, 以合成的 cDNA 为模板, PCR 扩增出 386 bp 的片段。引物序列和 PCR 条件如下: 正向引物: 5'-GGGACAA-AGAAGGGGATGAC-3'; 反向引物: 5'-AAAGGCGG-TGCTGAGGTGAA-3'。95 $^{\circ}$ C \times 1 min, 60 $^{\circ}$ C \times 1 min, 72 $^{\circ}$ C \times 1 min (30 个循环)。同时 560 bp 的 β -肌动蛋白片段在相同条件下被扩增, 做为内参。

1.2.2 报告基因分析启动子活性 将 554 bp 的 MN/CA9 启动子克隆入 pGL3-Basic 质粒, 命名为 pGL3-MNP。在该质粒中, MN/CA9 启动子启动萤火虫荧光素酶(luciferase)基因的表达。细胞接种于 24 孔培养板, 24 h 后, 取 1 μ g pGL3-MNP 质粒与 0.1 μ g β -半乳糖苷酶报告基因质粒 pCMV- β Gal 混合后转染单孔细胞。pGL3-Basic 质粒(无启动子启动萤火虫荧光素酶基因), pGL3-Control 质粒(含 SV40 增强子)以相同条件转染细胞作为对照组。48 h 后, 收集细胞, PBS 洗两次, 裂解于 Reporter Lysis Buffer (Promega 公司), 离心后收集上清液。一部分上清液与萤火虫荧光素酶底物(luciferase assay system 试剂盒, Promega 公司)反应, 在荧光计(BG-P 公司)上测定 10 s 发光光子计数(RLU); 另一部分与 β -半乳糖苷酶检测试剂(Beyotime 公司)反应, 酶标仪上测定 420 nm 波长附

近吸光度。计算荧光素酶 RLU/半乳糖苷酶 A_{420} 即得相对荧光素酶活性。

1.2.3 质粒 pMD55 的构建 用 *Xho*I 和 *Sna*BI 双酶切质粒 pGEM-MN, 切出的小片段含有 MN/CA9 启动子, 进行琼脂糖凝胶电泳, 回收 554 bp 的片段。同样方法, 用 *Xho*I 和 *Sna*BI 双酶切质粒 pZXC2 (E1A 启动子缺失), 回收大片段, 两次凝胶电泳回收的片段用 T4 DNA 连接酶在 20 $^{\circ}$ C 连接过夜, 取连接产物 20 μ l 转化感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养过夜。提取质粒 DNA, 用 *Xho*I 和 *Sna*BI 双酶切进行鉴定, 经鉴定 MN/CA9 启动子正确插入 pZXC2 中的克隆命名为 pZXC2-MN。用 *Eco*RI 和 *Xba*I 双酶切质粒 pZXC2-MN 和质粒 pZD55 (E1B 55kDa 基因缺失), 进行琼脂糖凝胶电泳, 分别回收 2 090 bp 和 7 110 bp 的片段。把这两个片段连接并转化, 步骤同上。提取质粒 DNA, *Eco*RI 和 *Xba*I 双酶切鉴定, 经鉴定含 MN/CA9 启动子且缺失 E1B 55kDa 的正确克隆命名为 pMD55。为进一步确定克隆 pMD55 的正确性, 以质粒 DNA 为模板, 分别以 277 (5'-CGC GGG AAA ACT GAA TAA GAG-3', 与质粒 pXC1 277~297 bp 配对)、759 (5'-ACC GCC AAC ATT ACA GAG TCG-3', 与质粒 pXC1 779~759 bp 配对)和与 E1B 55kDa 两端互补的 DNA 小片段 ZD55 有义链(5'-AGA GCC CAT GGA ACC CGA GA-3', 野生型病毒 2 200~2 219 bp 配对)、ZD55 反义链(5'-CAT CGT ACC TCA GCA CCT TCC A-3', 野生型病毒 3 353~3 332 bp 配对), 为引物做 PCR 检测。

1.2.4 腺病毒 MD55 的构建及 PCR 鉴定 将质粒 pMD55 (含有腺病毒同源重组的左臂序列)与含有腺病毒右臂的质粒 pBHGE3, 通过 Effectene 将二者共转染至 293 细胞株, 具体步骤按照转染试剂盒(Transfection Reagent Selector Kit)说明书进行操作。9~14 天出现病毒空斑, 挑取病毒空斑感染 24 孔板的 293 细胞进行少量扩增。提取病毒 DNA, 并进行 PCR 鉴定。

1.2.5 病毒的大量扩增、纯化及滴度测定 将 293 细胞铺于 30~40 个 10 cm 培养皿, 至细胞长满, 每块培养皿中加入 10 μ l 合适滴度的病毒(约 10^7 ~ 10^8 pfu/ml) 感染细胞。待细胞全部病变后(4~7 天), 每块板中加入约 500 μ l 10% NP40 以裂解细胞, 收集整个细胞裂解物, 离心, 收集上清液。PEG8000 (20% PEG8000, 2.5 mol/L NaCl)沉淀病毒后 CsCl 梯度离心。收集密度在 1.30~1.40 g/ml 之间的病毒条带至透析袋中, 4 $^{\circ}$ C 透析过夜。收集病毒于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

空斑形成单位 (pfu) 的测定: 293 细胞铺于 24 孔板, 24 h 后细胞接近长满, 加入含不同稀释度的病毒, 37 °C 感染 2 h 后, 铺 8 ml 低熔点胶(5% FBS, 1.25% 琼脂糖)。9 天左右记数。

1.2.6 Western 印迹检测 E1A 蛋白表达 10 MOI (一个细胞中感染一个活的病毒颗粒为 1 MOI) 的 ZD55, MD55 病毒感染细胞一定时间后, 收集细胞, PBS 洗细胞, 加 1×SDS 凝胶加样缓冲液(62.5 mmol/L Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10 mmol/L 甘油, 1.55% DTT)裂解细胞, 沸水浴中煮 10 min。-20 °C 保存或立即用于 PAGE 凝胶电泳。

每孔加入 40 μg 蛋白质(Bradford 法测定蛋白质量)样品进行 SDS-PAGE, 100 V 电泳 2 h, 然后转至 PVDF 膜。用相应的抗体检测蛋白质的表达。

1.2.7 病毒复制能力分析 细胞铺于 6 孔板, 24 h 后, 加入 1 MOI ZD55, MD55 病毒感染细胞。48 h 后, 收集细胞上清液与细胞, 在 -20 °C 与 37 °C 反复冻融 3 次以释放病毒。将病毒稀释, 检测病毒滴度。293 细胞铺于 24 孔板, 24 h 后细胞接近长满, 加入含不同稀释度的病毒, 37 °C 感染 2 h 后, 铺 1 ml 低熔点胶(5% FBS, 1.25% 琼脂糖)。9 天左右记数。计算每 PFU 病毒产生的病毒数目。

1.2.8 结晶紫染色观察腺病毒细胞毒性 将细胞铺于 24 孔板, 24 h 后用一定 MOI 的病毒感染细胞, 37 °C 继续培养。7 天后, 吸净培养基, 每孔加入 500 μl 结晶紫染色液(2% 结晶紫溶于 20% 甲醇溶液)染色 15 min, 在净水中将多余的染液洗净, 拍照。

1.2.9 MTT 法测定细胞存活率 细胞接种于 96 孔板, 24 h 后分别用 0.01、0.1、1、10、100 MOI 的病毒感染细胞。感染 4 天后, 每孔加入 20 μl MTT (50 μg/ml, 配制于 PBS 缓冲液中), 37 °C 继续培养 4 h,

将含 MTT 的培液移去, 加入 100 μl 酸化异丙醇, 充分溶解后, 在酶标仪上测定 595 nm 处吸光度值(A 值)。细胞存活率 = $A_{595}(\text{样品})/A_{595}(\text{对照}) \times 100\%$ 。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 MN/CA9 表达

按照材料和方法中的步骤从 HeLa、SW620、OSRC-2、BxPC3 及 HFL-1 细胞中提取总 RNA。已有文献报道指出 HeLa 细胞表达 MN/CA9, 而 BxPC3 细胞不表达该蛋白质。在本研究中, RT-PCR 结果显示, 在 β-肌动蛋白 mRNA 表达量基本相同时, HeLa、SW620 和 OSRC-2 细胞中均可扩增出与 MN/CA9 cDNA 相对应的 386 bp 片段, 而 BxPC3 及 HFL-1 细胞中没有 MN/CA9 的转录(图 1)。

2.2 MN/CA9 启动子在不同细胞内的活性检测

检测了 MN/CA9 启动子在 5 种不同来源的人肿瘤细胞或正常细胞中的活性。结果表明, MN/CA9 启动子在 HeLa、SW620 及 OSRC-2 细胞均显示较高活性, 而在 BxPC3 及 HFL-1 细胞中活性很低, 与 RT-PCR 检测的 MN/CA9 mRNA 在这几种细胞中的表达情况相符。其中该启动子在 SW620 细胞中的活性最高, 比在 BxPC3 及正常细胞 HFL-1 中的活性要高出几十倍(图 2)。提示 MN/CA9 启动子能使外源基因在相关肿瘤细胞中特异性地表达。

2.3 质粒 pMD55 的鉴定

EcoRI 和 XbaI 双酶切 pMD55, 得到 2 091 bp 和 7 110 bp 两条带(图 3); 利用 277 及 759 做引物 PCR 扩增出长度为 840 bp 的片段(图 4A), 可确认 MN/CA9 启动子替换了 E1A 野生型启动子; ZD55 有义链和 ZD55 反义链作引物, 扩增出长度为 254 bp 的片段(图 4B), 可确认 pMD55 缺失了 E1B 55kDa 基因。酶切

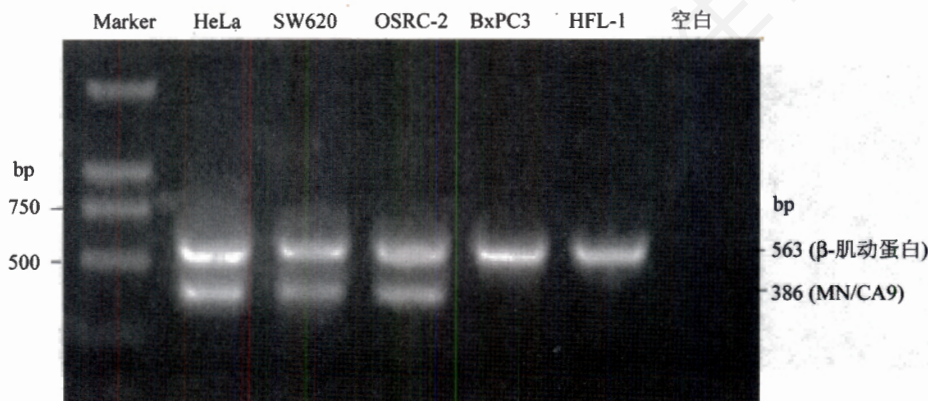


图 1 RT-PCR 检测 HeLa、SW620、OSRC-2、BxPC3 及 HFL-1 细胞中 MN/CA9 mRNA 的表达

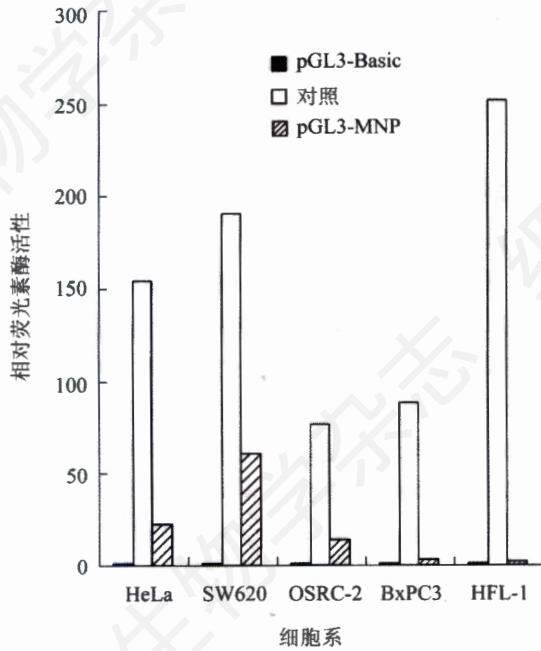


图2 MN/CA9 启动子在几种细胞中的转录活性

计算各细胞系中 pGL3-MNP 的荧光素酶活性 / pGL3-Basic 质粒的荧光素酶活性, 即反映 MN/CA9 启动子的在该细胞系中的相对转录活性。

鉴定和 PCR 鉴定结果均可证明 pMD55 克隆正确。

2.4 双靶向溶瘤腺病毒 MD55 的构建和鉴定

提取病毒 DNA 作为模板, 引物序列如前所示, 进行聚合酶链式反应。277 和 759 做引物扩增出 840 bp 的片段(野生型扩增出 500 bp 片段)(图 4A); 以 ZD55 有义链, ZD55 反义链作引物, 扩增出 254 bp 的片段(野生型扩增出 1 150 bp 片段)(图 4B)。PCR 结果说明病毒 MD55 构建正确, 且病毒中没有野生型病毒污染。

2.5 Western 印迹检测腺病毒 E1A 蛋白表达

用 10 MOI 的病毒感染 SW620、OSRC-2、

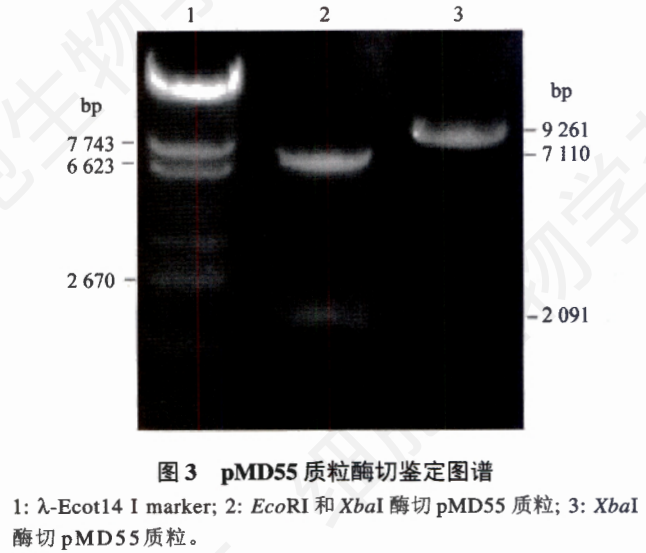


图3 pMD55 质粒酶切鉴定图谱

1: λ -Eco14 I marker; 2: EcoRI 和 XbaI 酶切 pMD55 质粒; 3: XbaI 酶切 pMD55 质粒。

BxPC3 和 HFL-1 细胞, 48 h 后 Western 印迹检测 E1A 蛋白表达。结果如图 5 所示, MD55 感染细胞后, 在 SW620 及 OSRC-2 中检测到大量 E1A 蛋白, 与对照病毒 ZD5 感染后 E1A 蛋白的表达量基本相同; 但在 BxPC3 及 HFL-1 细胞中没有或仅有少量 E1A 蛋白的表达, 比相同条件下 ZD55 感染后 E1A 蛋白的表达量要少得多。所有细胞加 PBS 后都没有 E1A 蛋白的表达。这些结果说明, 在双靶向溶瘤腺病毒 MD55 中, MN/CA9 启动子调控 E1A 基因, 使其在 MN/CA9 表达阳性的肿瘤细胞中特异性表达。

2.6 MD55 选择性在 MN/CA9 表达阳性的肿瘤细胞中复制

为了考察 MD55 病毒的靶向性, 我们做了病毒复制能力分析实验。结果如图 6 所示, 在 SW620 中 MD55 的复制能力比 ZD55 的低了 3 倍, 在 OSRC-2 细胞中 MD55 的复制能力比 ZD55 要稍高一些, 但在 MN/CA9 表达阴性的 BxPC3 及正常细胞 HFL-1 中,

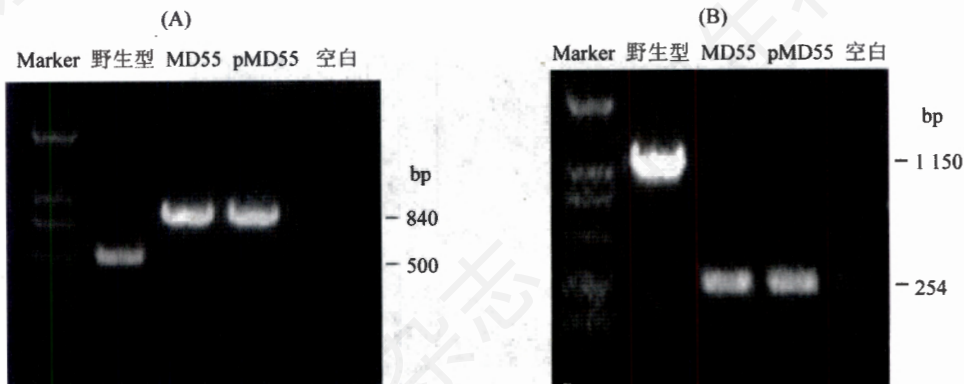


图4 病毒 MD55 的 PCR 鉴定

A: E1A 启动区的 PCR 鉴定; B: E1B 55kDa 区的 PCR 鉴定。

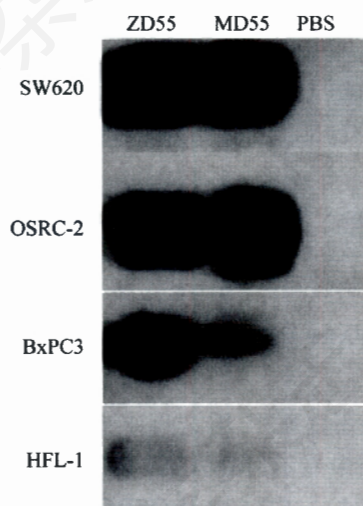


图5 Western 印迹检测病毒感染不同细胞 48 h 后 E1A 蛋白的表达

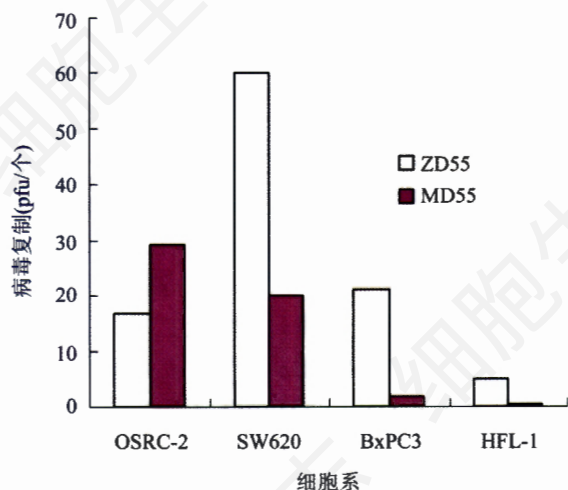


图6 病毒 MD55 和 ZD55 在不同细胞中的复制能力分析

MD55 的复制能力要比 ZD55 的低了十几到二十倍。

2.7 MD55 对正常细胞的毒性较小、安全性好

用不同滴度的病毒感染细胞, 7 天后, 结晶紫染色法检测细胞毒性。由图 7 可知, 对于 SW620 细胞和 OSRC-2 细胞, MD55 的细胞毒性与 ZD55 相近甚至更高。而 MD55 对正常细胞 HFL-1 的细胞毒性很弱, 与 ZD55 相比, 要下降 10 倍左右。

MTT 法检测细胞的存活率, 结果显示, 随着病毒剂量的增加, 肿瘤细胞 SW620 及 OSRC-2 的存活率明显下降, 而两种病毒对正常细胞 HFL-1 的作用都很弱。当用 100 MOI 的 MD55 或 ZD55 病毒感染后, 正常 HFL-1 细胞的存活率分别为 120% 和 60%; 而两种 MN/CA9 阳性的肿瘤细胞的存活率已接近零(图 8)。

以上实验结果表明双靶向溶瘤腺病毒 MD55 与

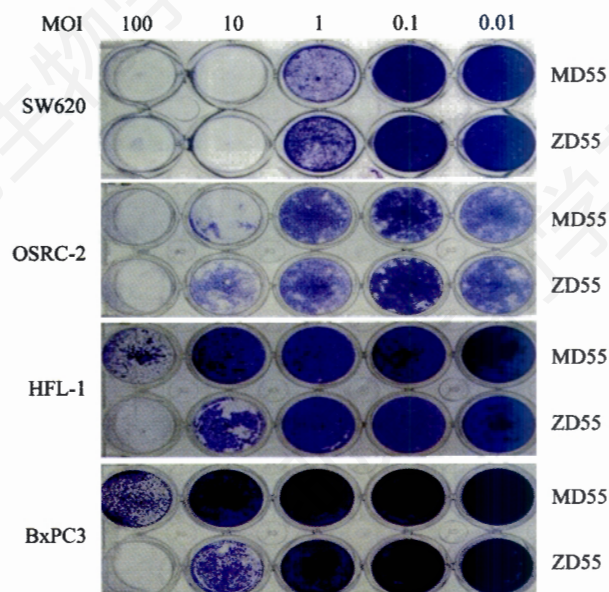


图7 结晶紫染色观察腺病毒的细胞毒性

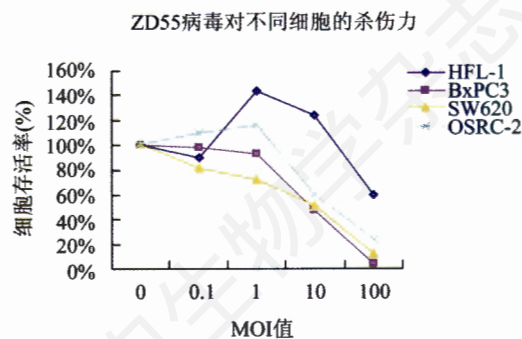
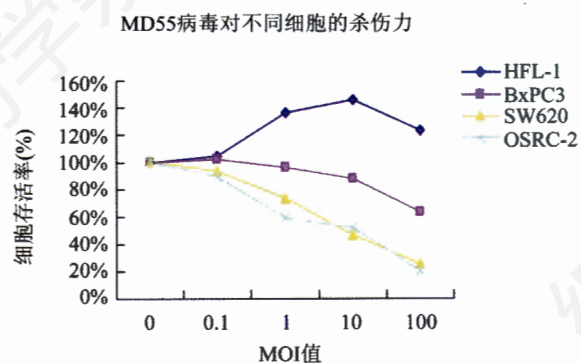


图8 MTT 检测细胞存活率

单靶向溶瘤腺病毒 ZD55 相比, 对肿瘤细胞的杀伤作用相近, 但降低了对正常细胞的毒性, 靶向性和安全性更高。

2.8 多聚 ADP 核糖聚合酶(PARP)片断检测

10 MOI 的病毒感染 SW620、OSRC-2、BxPC3 以及 HFL-1 细胞, 48 h 后 Western 印迹检测蛋白表达。检测显示 MD55 和 ZD55 感染后在 SW620 和

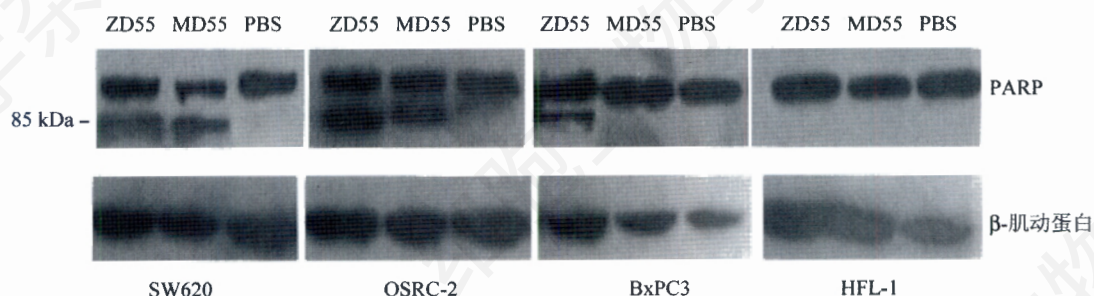


图9 病毒感染细胞后 Western 印迹检测 PARP 片段

OSRC-2 两种细胞中都能检测到 85 kDa 大小的 PARP 切割片段, 在 HFL-1 没有检测到切割条带, 所有细胞加 PBS 后都没有 85 kDa 大小 PARP 切割片段的产生 (图 9)。

3 讨论

MN/CA9 是碳酸酐酶家族的一种同工酶, 该蛋白质广泛参与调控肿瘤细胞内的 pH 值, 影响细胞微环境以促进细胞的增殖、侵染和转移^[6]。MN/CA9 在肿瘤细胞中的高表达与肿瘤的组织缺氧密切相关, 在肿瘤组织缺氧条件下, 缺氧诱导因子(HIF-1) 与 MN/CA9 基因转录起始点附近的缺氧反应元件(HRE)结合, 诱导基因的转录^[10,13]。肿瘤细胞中 p53 基因的突变, 也是 MN/CA9 高表达的一个原因。MN/CA9 启动子中存在两个 p53 结合位点, 有报告指出, 野生型 p53 抑制 MN/CA9 的表达, 而突变的 p53 可以活化 MN/CA9 基因的转录^[8,9,14,15]。另外一种广泛参与肿瘤相关基因的调控机制——启动子的甲基化, 同样也参与 MN/CA9 的调控^[15,16]。这些都表明 MN/CA9 启动子的活性是肿瘤特异性的, 它是构建溶瘤腺病毒的一种很好的选择。E1B 55kDa 是腺病毒在正常细胞中复制所必需, 而在 p53 失活的肿瘤细胞中复制不需要的蛋白质^[17]。所以, 当腺病毒缺失 E1B 55kDa 后, 不能在正常细胞中复制, 而在 p53 失活的肿瘤细胞中能够大量复制、增殖。ONYX-015 和 ZD55 正是遵循这个原则构建的。本文综合利用两种构建溶瘤腺病毒的策略, 构建了一种用 MN/CA9 启动子控制 E1A 基因同时缺失 E1B 55kDa 基因的肿瘤增殖腺病毒, 使其在 MN/CA9 表达阳性的肿瘤细胞中特异性复制, 与单靶向腺病毒相比, 它能更好的靶向肿瘤细胞, 称之为双靶向溶瘤腺病毒。

本研究首先检测了几种细胞中 MN/CA9 mRNA 的表达和 MN/CA9 启动子的活性。因为已有文献报道指出 HeLa 细胞中表达 MN/CA9^[6], 而 BxPC3 细胞

中不表达该蛋白质^[18], 用这两种细胞做阳性对照和阴性对照。结果显示, MN/CA9 启动子在 MN/CA9 表达阳性的 HeLa、SW620 及 OSRC-2 细胞中均显示较高活性, 而在 MN/CA9 表达阴性的 BxPC3 和 HFL-1 细胞中活性很低(图 2)。用 MN/CA9 启动子控制 E1A 基因并缺失 E1B 55kDa 基因构建了双靶向溶瘤腺病毒 MD55, 它可以在 MN/CA9 表达阳性的肿瘤细胞中特性表达 E1A 蛋白(图 3)。对 MD55 在不同细胞中的复制能力和杀伤性分析表明, MD55 病毒比 ZD55 有更高的靶向性, 能够选择性地在 MN/CA9 表达阳性的肿瘤细胞中复制, 对这些细胞的杀伤力与 ZD55 基本相同, 而在正常细胞 HFL-1 中的增殖能力很弱, 即对正常细胞的伤害很小(图 5, 图 6, 图 7)。PARP 是一种为 116 kDa 的蛋白酶。细胞凋亡早期, PARP 被切割为约 31 kDa 和 85 kDa 两个片段大小的片段, 使其降解而丧失其 DNA 修复功能, 促进细胞凋亡的发生。因此 85 kDa 大小 PARP 酶切片段的检测也常用于早期细胞凋亡的鉴定。PARP 片段检测实验也证明 MD55 可能诱导 MN/CA9 阳性肿瘤细胞的凋亡, 而对正常细胞没有影响(图 8), 由此推断我们构建的 MD55 病毒是一个安全性很好的抗肿瘤双靶向载体。

综上所述, 本工作构建的双靶向溶瘤腺病毒 MD55 能够特异性在 MN/CA9 表达阳性的肿瘤细胞中大量复制、增殖, 从而杀死肿瘤细胞。与 ZD55 相比, MD55 对这些肿瘤细胞的杀伤性没有减弱, 而靶向性和安全性有很大提高。另外 MD55 的病毒基因组中加入了相应的克隆位点, 可以方便地插入肿瘤治疗基因, 以实现肿瘤的基因-病毒治疗, 发挥更好的抗癌效果。

参考文献(References)

- [1] Jounaidi Y et al. *Curr Cancer Drug Targ*, 2007, 7: 285
- [2] Ries SJ et al. *Drug Discov Today*, 2004, 9: 759
- [3] Alemany R. *Mol Aspects Med*, 2007, 28: 42
- [4] Liu XY et al. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2005, 37: 581

- [5] 顾锦法等. *自然杂志*, 2005, **27**: 85
- [6] Winum JY *et al. Med Res Rev*, 2007, Epub ahead of print
- [7] Lim HY *et al. Cancer Gene Ther*, 2004, **11**: 532
- [8] Kaluz S *et al. J Biol Chem*, 1999, **274**: 32588
- [9] Kaluzová M *et al. Biochim Biophys Acta*, 2000, **1491**: 20
- [10] Said HM *et al. J Neurooncol*, 2007, **81**: 27
- [11] Zhang ZL *et al. Cell Res*, 2003, **13**: 481
- [12] Pei Z *et al. Hepatology*, 2004, **39**: 1371
- [13] Thiry A *et al. Trends Pharmacol Sci*, 2006, **27**: 566
- [14] Kaluzová M *et al. Biochem J*, 2001, **359**: 669
- [15] Opavský R *et al. Genomics*, 1996, **33**: 480
- [16] Grabmaier K *et al. Urology*, 2002, **60**: 357
- [17] Kim J *et al. Cancer Gene Ther*, 2002, **9**: 725
- [18] Ou YC *et al. Anticancer Res*, 2005, **25**: 881

Selective Cytotoxic Effect of Dual Tumor-targeting Oncolytic Adenovirus MD55 on Tumor and Normal Cells *in Vitro*

Wei-Yun Wang^{1,2}, Jin-Fa Gu², Pin Dai¹, Tian Xiao², Xin Cao², Xin-Yuan Liu^{2*}

(¹*School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China;* ²*Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)*

Abstract A dual tumor-targeting oncolytic adenovirus (MD55) was constructed by molecular cloning and homologous recombination. The replication ability of MD55 virus in different cell lines was analyzed. Cytotoxic effects of the MD55 virus on tumor and normal cell lines were detected by crystal violet staining and MTT assay. After infected by virus, the expressions of E1A and PARP proteins in different cell lines were analyzed by Western blot. Results showed that MD55 displayed specific E1A expression in MN/CA9- positive cancer cell lines SW620 and OSRC-2. The proliferation ability and cytotoxic effect of MD55 virus became very low in normal cells, but almost equal to that of ZD55 in MN/CA9-positive cells. MD55 might induce apoptosis in SW620 and OSRC-2 cells but not in normal cells. The results suggest that MD55 has specific cytotoxicity in MN/CA9-positive cancer cells and more safety for normal cells in comparison with ZD55. It may be a good vector for cancer gene-virus therapy.

Key words oncolytic adenovirus; MN/CA9 promoter; MD55; virus replication

Received: April 15, 2008 Accepted: June 5, 2008

Abbreviation: MN/CA9: a CA isozyme of carbonic anhydrases family; MD55: dual tumor-targeting oncolytic adenovirus, in which E1A gene was under the control of MN/CA9 promoter and E1B 55kDa gene was deleted; ZD55: tumor-targeting oncolytic adenovirus, in which E1B 55kDa gene was deleted

This work was supported by the Key Project of Chinese Academic of Sciences (No.KSCX2-YW-R-09)

*Correspondence author. Tel: 86-21-54921127, Fax: 86-21-54921126, E-mail: xyliu@sibs.ac.cn