

# 携带 11R 穿膜肽-p53 融合蛋白基因的 溶瘤腺病毒的抗肿瘤作用

冯志华<sup>1</sup>, 苏长青<sup>2</sup>, 钱其军<sup>1,2</sup>

(1. 浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018; 2. 第二军医大学东方肝胆医院基因与病毒治疗实验室, 上海 200438)

**摘 要:** *p53* 是研究较为广泛的抑癌基因, 可通过不同的途径来抑制或杀伤肿瘤细胞。为增强 *p53* 的抗肿瘤活性, 将穿膜肽 11R 与 *p53* 的融合蛋白基因插入增殖型腺病毒载体中, 在 293 细胞中经同源重组筛选获得重组溶瘤病毒 SG7605-11R-*p53*; 利用 Western blot 检测 11R-*p53* 的表达情况, TCID<sub>50</sub> 方法测定病毒滴度; 应用细胞活力检测实验(MTT)比较病毒杀伤肿瘤及正常细胞的效果。结果显示: SG7605-11R-*p53* 所携带的 11R-*p53* 基因在所选细胞株中都能正确表达, 与 SG7605-*p53*、AD5-*p53* 相比具有更好的杀伤肿瘤细胞的效果, 显示了较强的抗肿瘤效应。说明 SG7605-11R-*p53* 是一种有潜力的治疗肿瘤的新型基因-病毒治疗系统。

**关键词:** 溶瘤腺病毒; *p53*; 细胞穿膜肽; 病毒基因治疗

**中图分类号:** Q291      **文献标识码:** A

## 0 引 言

增殖型腺病毒系统又被称为肿瘤特异性增殖型腺病毒, 可被应用于肿瘤的基因治疗。它们利用肿瘤与正常组织细胞间代谢途径及组织结构的差异, 只在肿瘤细胞内进行复制增殖, 到达一定的增殖水平后最终裂解癌细胞, 同时还可以使抗肿瘤的外源基因表达时间增长。*p53* 基因产物是一种主要集中于核仁区、能与 DNA 特异结合、其活性受磷酸化调控且很容易降解<sup>[1-3]</sup>, 很容易因突变而丧失功能的蛋白, 在 393 个氨基酸残基中突变率高达 50%<sup>[4]</sup>。有学者发现 *p53* 可以加强几种具有生长抑制功能的 miRNA 转录后的成熟<sup>[5-7]</sup>, 而且 *p53* 基因会弱化一些 miRNA 的功能<sup>[8-9]</sup>。此外, 我们的体系中另一个主要元件-细胞穿膜肽(CPP)是一类可以不借助其他物质而穿透细胞膜进入细胞质甚至细胞核, 且不损坏细胞膜结构的小分子肽, 它可以有效携带比其分子质量大百倍以上的大分子物质进入细胞或细胞核, 如紫杉醇<sup>[10]</sup>、环孢素 A<sup>[11]</sup>、甲氨蝶呤<sup>[12]</sup>等都可以通过与 CPP 连接后使其以活性形式进入细胞内部。一些 siRNA<sup>[13]</sup> 也可以通过 CPP 进入细胞内。所以, CPP 在癌症的治疗方面也用途颇广, 例如携带化学治疗药物<sup>[14-15]</sup>, 单抗抗体<sup>[16]</sup>进入瘤体等。

曾有学者将穿膜肽与 *p53* 连接后对口腔癌<sup>[17]</sup>及膀胱癌<sup>[18]</sup>, 胶质瘤<sup>[19]</sup>等进行治疗, 但是其运用的都是将蛋白在病毒或者细菌中表达后纯化, 再加入细胞, 观察使用结果, 无法使其增殖以提高效果。本文将溶瘤腺病毒, 抑癌基因 *p53* 及穿膜肽 11R 基因融合于一体, 集合其三者的优势, 希望可以增强治疗效果, 为肿瘤的生物治疗提供一种新的策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

质粒 pENTER12-*p53*、pENTER17、pPE3-RC、T74-Tp-122/142 和腺病毒 Ad5-*p53* 由本实验室构建; 各

种限制性内切酶均购自 NEB 公司;人肝癌细胞株 Hep3B、人正常成纤维细胞株 BJ 购于 ATCC,人胚肾细胞株 293 细胞购于加拿大 Microbix Biosystem 公司;胎牛血清、H-DMEM、MEM 为 Gibco 公司产品;四甲基偶氮唑蓝(MTT)为 Sigma 公司产品;所用抗体均购自 BD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 携带 11R-p53 融合蛋白基因的溶瘤腺病毒的载体构建 以 pENTER12-p53 为模板,利用 PCR 的方法将穿膜肽 11R 引入 p53 之前,并将此 PCR 产物与 pENTER17 载体同时进行 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切后连接获得载体 pENTER17-11R-p53。随后再将 pENTER17-11R-p53 与 pPE3-RC 在 BJ5183 细菌内同源重组获得骨架质粒 pPE3-11R-p53。质粒 pPE3-11R-p53 与质粒 T74-Tp-122/142 在 HEK293 细胞内重组得到重组的溶瘤腺病毒病毒,命名为 SG7605-11R-p53。

1.2.2 蛋白表达情况 用含 10%FBS 的相应培养液培养细胞至细胞长满培养瓶的 80%,将细胞消化、计数,接种至 6 孔板,每孔  $5\times10^5$  个细胞,10%FBS 培养液培养过夜,用含 5%FBS 的培养液稀释病毒,并按  $MOI=5$  加入各种病毒,在 5%  $CO_2$  孵箱中 37℃培养 48 h 后移去上清,直接往细胞培养皿内加入动物蛋白提取液 200  $\mu$ L,轻轻用枪吹打使细胞脱落裂解。上样时取 40  $\mu$ L 样品加入 10  $\mu$ L loading Buffer,混匀后 100℃变性 3 min,电泳完成后转膜、封闭、一抗(用 TBS+5%BSA 以 1:400 倍稀释)4℃哺育过夜,二抗(用 TBS+5%BSA 以 1:2000 倍稀释)室温哺育 1 h,拍照。随后洗去 p53 一抗,加入  $\beta$ -Actin 的一抗和二抗,检测其表达  $\beta$ -Actin 的情况。

1.2.3 SG7605-11R-p53 的扩增及滴度测定 腺病毒的扩增及纯化采用 HEK293 细胞及常规氯化铯梯度纯化方法,滴度测定采用 Qibogene 公司的 TCID50 方法。

1.2.4 细胞杀伤实验 收集对数生长期的人肝癌细胞株 Hep3B、人正常成纤维细胞 BJ,计数后以  $10^4$  cells/孔的密度铺于 96 孔板,每孔 100  $\mu$ L,置于 37℃、5% $CO_2$  细胞培养箱内培养至 8~10 h 后细胞完全贴壁,用无血清培养液稀释病毒 SG7605-11R-p53,按  $MOI$  值=0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、50、100 分别加入病毒 100  $\mu$ L/孔,每个梯度设置 4 个复孔,并以病毒 SG7605-p53、Ad5-p53 为对照。继续置于 37℃、5% $CO_2$  培养箱培养 7 d,然后弃去培养液,加入无血清培养液 100  $\mu$ L/孔,加入 MTT 10  $\mu$ L/孔,置于 37℃、5% $CO_2$  细胞培养箱内培养 4~6 h 后加入 10%SDS+0.01 M HCL 100  $\mu$ L/孔,置于 37℃、5% $CO_2$  细胞培养箱内培养过夜,酶联免疫检测仪测定 570 nm 波长光吸收值。观测 SG7605-11R-p53 对肿瘤细胞及正常细胞的杀伤效果。

1.2.5 统计分析 数据以平均值±标准差表示,细胞生存率=(实验孔  $OD_{570}$  值-本底  $OD_{570}$  值)/(对照孔  $OD_{570}$  值-本底  $OD_{570}$  值) $\times 100\%$ ,结果进行 *t* 检验, $p<0.01$  代表差异极显著, $p<0.05$  代表差异显著。

2 实验结果

2.1 携带 11R-p53 融合蛋白基因的溶瘤腺病毒的载体鉴定

经 PCR 获得的 11R-p53 基因条带大小为 1 236 bp,且测序正确,如图 1 所示。骨架载体 pPE3-11R-p53 构建完成选取了多组酶切对其进行了鉴定,且鉴定正确。溶瘤腺病毒重组成功后对病毒的 DNA 进行抽提,并对其主要元件进行了一系列的鉴定,如图 2 所示是对抽提的 2 个样品的 11R-p53 基因的鉴定。

2.2 蛋白表达情况

重组病毒 SG7605-11R-p53 经扩增、纯化,TCI D50 方法测定病毒为  $2\times10^{10}$  pfu/mL。依次将感染过病毒 Ad5-p53、SG7605-p53 及 SG7605-11R-p53 的细胞进行 Western blot 的检测,结果如图 3 所示,SG7605-11R-p53 感染肿瘤细胞后,肿瘤细胞及正常细胞都能较好地表达 p53 及 11R-p53 蛋白,且条带大小正确(11R-p53 大概为 55kD,p53 为 53kD)。

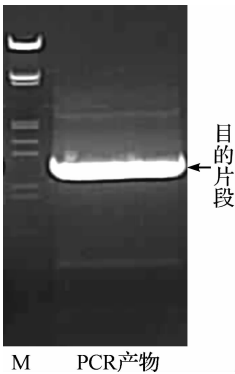
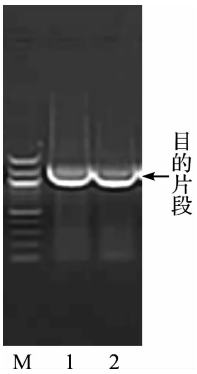


图 1 经 PCR 获得的 11R-p53 基因



1~2 为抽提的 2 个样品  
图 2 溶瘤腺病毒 DNA 的 PCR 鉴定

2.3 病毒对肿瘤细胞的杀伤效果

在肝癌细胞 Hep3B 细胞中,与对照病毒 Ad5-p53、SG7605-p53 相比,SG7605-11R-p53 有显著的杀伤作用( $p<0.05$ ),在 MOI 值等于 0.01 的时候杀伤达到了 60%(见图 4),而对于正常细胞 BJ 则杀伤效果较差(见图 5),即 SG7605-11R-p53 加大了对肿瘤细胞和正常细胞之间杀伤能力的差异。说明带有穿膜肽的溶瘤腺病毒相对来说有更好的效果。

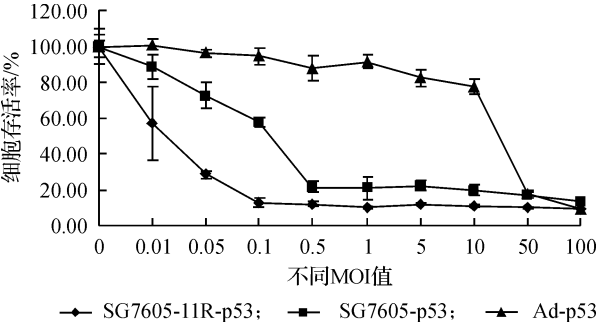


图 4 不同病毒对肝癌细胞 Hep3B 的杀伤情况

3 讨论

随着恶性肿瘤的发生率越来越高,人们一直在寻求一种有效的治疗手段。与此同时,基因-病毒治疗以其与众不同的优势而受到愈来愈多的关注。肿瘤的基因治疗策略是将具有治疗或者缓解恶性肿瘤的基因或基因片段通过载体转入病人体内,去纠正基因的缺陷或者发挥治疗作用,从而达到预防和治疗疾病的目的,因此基因治疗针对的是疾病的根源——异常的基因本身。

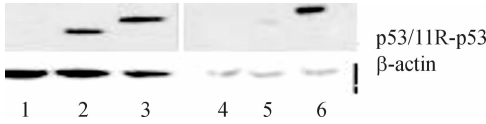
肿瘤的基因治疗,最重要的问题是解决基因表达的效率,提高抗肿瘤蛋白在肿瘤局部的浓度。溶瘤腺病毒虽然可以提高其携带的抗肿瘤基因的拷贝数,但载体表达的蛋白因受局部环境的影响无法穿透组织或细胞而加强其旁观者效应。穿膜肽的应用,为解决此类问题带来转机。本课题旨在利用溶瘤腺病毒,治疗基因 *p53* 及穿膜肽 11R 的优势,使溶瘤腺病毒表达穿膜肽和 *p53* 融合蛋白,并在其不断增殖的同时释放更多的具有穿膜功能的抑癌基因产物 *p53*,这样在 SG7605-11R-*p53* 裂解肿瘤细胞后可以释放更多的溶瘤腺病毒来杀伤临近的肿瘤细胞,此外,其释放的 11R-*p53* 融合蛋白也会在 11R 的穿膜作用的作用下进入其他肿瘤细胞,从而加强旁观者杀伤效应,提高对肿瘤细胞的杀伤作用。而另一方面,由于加入了穿膜肽,拓宽了腺病毒的趋向性,不影响腺病毒原始感染细胞途径的前提下,又增加了一种不通过 CAR 的感染途径。

本实验构建完成载体质粒 SG7605-11R-*p53*,并在 HEK293 细胞中大量扩增并纯化得到滴度达  $2 \times 10^{10}$  pfu/mL 的病毒。通过 Western blot 检测病毒在不同细胞的表达情况,对照病毒为 SG7605-*p53* 及 Ad-*p53*,结果显示其表达的蛋白分子量正确,且 Ad-*p53* 未出现或微量出现目的条带。而在其后的 MTT 实验中,与对照病毒比较,SG7605-11R-*p53* 能更好地杀伤肿瘤细胞。

总之,携带 11R 穿膜肽-*p53* 融合蛋白基因的溶瘤腺病毒对肿瘤细胞的杀伤能力和目的基因的表达明显优于传统的非增殖型腺病毒载体,效果显著,却对正常细胞无明显毒性,为进一步的验证及动物实验提供了依据,为癌症的生物治疗提供了一种新思路与策略。笔者预期这种新型的溶瘤腺病毒会在不断的改进下,发挥更为理想的治疗功效,给人们的抗癌斗争增添力量。

参考文献:

[1] Lowe S, Cepero W, Evan G. Intrinsic tumour suppression[J]. Nature, 2004, 432: 307-315.  
[2] Vousden K H, Lane D P. p53 in health and disease[J]. Nature Rev Mol Cell Biol, 2007, 8: 275-283.  
[3] Vogelstein B, Lane D, Levine A J. Surfing the p53 network[J]. Nature, 2000, 408: 307-310.  
[4] Tomasini R, Mak T W, Melino G. The impact of p53 and p73 on aneuploidy and cancer[J]. Trends Cell Biol, 2008, 18



1~3 为肝癌细胞 Hep3B,4~6 为正常细胞 BJ  
图 3 Western Blot 检测蛋白表达结果

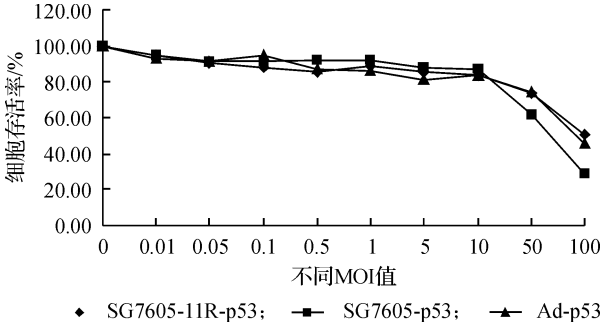


图 5 不同病毒对正常细胞 BJ 的杀伤情况

- (5): 244-252.
- [5] Hiroshi I, Suzuki, Kaoru Yamagata, et al. Modulation of microRNA processing by p53[J]. Nature, 2009, 460: 529-533.
- [6] Mudhasani R, Zhu Z, Hutvagner G. et al. Loss of miRNA biogenesis induces p19Arf-p53 signaling and senescence in primary cells[J]. Cell Biol, 2008, 181: 1055-1063.
- [7] Soussi T. p53 alterations in human cancer; more questions than answers[J]. Oncogene, 2007, 26(15): 2145-2156.
- [8] Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, et al. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest[J]. Cell Cycle, 2007, 6(13): 1586-1593.
- [9] He L, He X, Lim L P, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network[J]. Nature, 2007, 447: 1130-1134.
- [10] Dubikovskaya E A, Thorne S H, Pillow T H, et al. Overcoming multidrug resistance of small-molecule therapeutics through conjugation with releasable octaarginine transporters[J]. Proc Natl Acad Sci, 2008, 105(34): 12128-12133.
- [11] Rothbard J B, Garlington S, Lin Q, et al. Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation[J]. Nat Med, 2000, 6: 1253-1257.
- [12] Lindgren M, Rosenthal-Aizman K, Saar K, et al. Overcoming methotrexate resistance in breast cancer tumour cells by the use of a new cell-penetrating peptide[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 71(4): 416-425.
- [13] McManus M T, Sharp P A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs[J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(10): 737-747.
- [14] Laakkonen P, Porkka K, Hoffman J A, et al. A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels[J]. Nat Med, 2002, 8(7): 751-755.
- [15] Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model [J]. Science, 1998, 279(5349): 377-380.
- [16] Jain M, Chauhan S C, Singh A P, et al. Penetratin improves tumor retention of single-chain antibodies: a novel step toward optimization of radioimmunotherapy of solid tumors[J]. Cancer Res, 2005, 65(17): 7840-7846.
- [17] Toshihiko Takenobu, Kazuhito Tomizawa. Development of p53 protein transduction therapy using membrane-permeable peptides and the application to oral cancer cells[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2002, 1(12): 1043-1049.
- [18] Inoue M, Tomizawa K, Matsushita M, et al. p53 protein transduction therapy: successful targeting and inhibition of the growth of the bladder cancer cells[J]. Eur Urol, 2006, 49(1): 161-168.
- [19] Michiue H, Tomizawa K, Matsushita M. Ubiquitination-resistant p53 protein transduction therapy facilitates anti-cancer effect on the growth of human malignant glioma cells[J]. FEBS Letters, 2005, 579(18): 3965-3969.

## Anti-tumor Efficacy of Oncolytic Adenovirus with 11R-p53 Fusion Protein Gene

FENG Zhi-hua<sup>1</sup>, SU Chang-qing<sup>2</sup>, QIAN Qi-jun<sup>1,2</sup>

(1. School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Laboratory of Viral and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, Shanghai 200438, China)

**Abstract:** p53, as a most important tumor-associated gene, is studied extensively, it can kill the cancer cells through several different ways. Here, the fusion gene of 11R-p53 is cloned into the oncolytic adenovirus vector, then generates a recombinant adenovirus SG7605-11R-p53 in HEK293 cells. The authors measure the expression of the fusion protein 11R-p53 by Western blot. The virus titer was measured by TCID<sub>50</sub> method. With the cell viability test(MTT), the authors compare the inhibition effect of SG7605-11R-p53 on cancer and normal cell lines. The results show that the expression of 11R-p53 carried by SG7605-11R-p53 can be detected in different cancer cells. SG7605-11R-p53 can kill the cancer cells more effectively than SG7605-p53 or Ad5-p53. It is demonstrated that the novel gene-viral therapeutic system SG7605-11R-p53 holds potential for the treatment of cancer.

**Key words:** oncolytic adenovirus; p53; cell-penetrating peptides; gene-viral therapy

(责任编辑: 许惠儿)