同等学力申请硕士学位



**硕** 士 学 位 论 文

**论文题目：NV-lipocalin 2 抗大肠癌的体外实验研究作者姓名：张永为**

**指导教师：丁志山**

**学科专业：中西医结合基础所在学院：生命科学学院**

提交日期 2012 年 5 月

**浙江中医药大学研究Th学位论文原创性声明**

本人郑重声明：本人所提交的学位论文《NV-lipocalin 2 抗大肠癌的体外实验研究》是本人在导师的指导下，进行的研究工作及取得的研究成果。除文中已经加以标注引用的内容外，本论文不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明和致谢。

本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名： 签字日期： 年 月 日

**学位论文版权使用授权书**

本学位论文作者完全了解浙江中医药大学有关保留、使用学位论文的规定，同意浙江中医药大学保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权浙江中医药大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于

1、保密□，在 年解密后适用本授权书。

2、不保密□。

（请在以上相应方框内打“√”）

学位论文作者签名： 指导教师签名：

签字日期：年 月 日 签字日期： 年 月 日

目 录

[Abstract](#_Toc686124106) 3

[前 言](#_Toc686124107) 5

[第一部分 携带Lipocalin 2基因溶瘤腺病毒的构建及鉴定](#_Toc686124108) 5

[一 、实验材料](#_Toc686124109) 5

[5 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0 ) 170mmo1/L NaCI](#_Toc686124110) 6

[1 μg/ml Aprotinin](#_Toc686124111) 6

[5 mol/L乙酸钾60ml](#_Toc686124112) 6

[二 、实验方法步骤](#_Toc686124113) 8

[1）把上述试管中的菌液倒入1.5ml EP管中，4ºC离心1分钟，10000rpm。](#_Toc686124114) 9

[2 基因的DNA片段和pcDNA3.1/Myc-his(+) A酶切的大片段于16℃下T4 DNA连接酶进行连接反应，将连接的产物转化DH5α感受态细菌后划线涂板并挑取单克隆菌落。](#_Toc686124115) 11

[三 、实验结果](#_Toc686124116) 20

[四 、分析与讨论](#_Toc686124117) 23

[五 、小结](#_Toc686124118) 23

[第二部分 NV-lipocalin 2诱导细胞凋亡抑制大肠癌Th长的体外实验研究](#_Toc686124119) 24

[一、 实验材料](#_Toc686124120) 24

[（二） 病毒及细胞株](#_Toc686124121) 24

[（三） 实验主要仪器](#_Toc686124122) 24

[二、 实验方法步骤](#_Toc686124123) 24

[三、 实验结果](#_Toc686124124) 25

[四、 分析与讨论](#_Toc686124125) 28

[五、 小结](#_Toc686124126) 28

[结](#_Toc686124127)[论](#_Toc686124127) 29

[参考文献](#_Toc686124128) 29

[附 ：](#_Toc686124129) 32

[参考文献](#_Toc686124130) 33

**中文摘要**

**NV-lipocalin 2抗大肠癌的体外实验研究**

**目的**构建携带Lipocalin 2基因的条件增殖型溶瘤腺病毒NV-lipocalin 2，并应用体外细胞学实验方法研究NV-lipocalin 2抗大肠癌的作用及其机制。

**方法** 利用RT-PCR技术获取目的基因Lipocalin 2并将其克隆至pCA13质粒， 构建重

组的质粒pCA13-lipocalin 2. 使用BglⅡ酶从pCA13-lipocalin 2质粒中酶切出包含lipocalin

2基因及CMV启动子的表达框， 把该表达框再亚克隆入质粒pZD55， 获得重组质粒

pZD55-lipocalin 2. 之后分别将pCA13-lipocalin 2和pZD55-lipocalin 2与pBHGE3共转染到

293细胞，经过同源重组产生携带lipocalin 2基因的靶向性溶瘤腺病毒（NV-lipocalin 2）。并用PCR方法和wester-blot方法对新构建的病毒从基因和蛋白水平进行鉴定。把获得的NV-lipocalin 2病毒按不同浓度加入到大肠癌细胞SW480中，采用四甲基偶氮哩盐叮

（MTT）法检测其对肿瘤的增殖抑制效应，以及其分别与中药姜黄素和化疗药物5-FU的协同抗肿瘤作用，采用Annexin V/PI染色流式检测细胞凋亡，采用透射电镜观察肿瘤细胞的凋亡，最后采用wester-blot法，检测凋亡相关基因Caspase-3，9的蛋白表达，以研究NV-lipocalin 2诱导大肠癌细胞凋亡的机制。

**结果**通过PCR鉴定病毒DNA序列显示：NV-lipocalin 2保留了E1A区缺失了E1B55

序列。借助lipocalin 2的CDS区设计的引物能从构建的病毒中扩增出相应的目的基因条带；同时采用wester-blot法可检测到被腺病毒感染的SW480细胞强表达Lipocalin 2蛋白。重组的靶向性增殖型腺病毒抗大肠癌SW480细胞的作用优于单存的病毒载体（ZD55），其抗癌作用呈时间依赖性和浓度依赖性，其与中药姜黄素和化疗药物5-FU都有很好的协同治疗作用并呈浓度依赖性。NV-lipocalin 2可通过活化Caspase-3, 9从而引起大肠癌细胞的凋亡，其对Caspase-3, 9的活化能力也具有浓度和时间依赖性。这为研究其抗大肠癌作用提供了依据。

**结论**成功构建了携带人lipocalin 2基因的靶向性溶瘤腺病毒NV-lipocalin 2， 重组的

腺病毒具有明显的病毒和基因协同抗大肠癌的作用，具有与中药姜黄素和化疗药物5-FU的协同抗肿瘤作用。它能通过Caspase依赖的凋亡通路启动大肠癌细胞的凋亡。

**主题词**大肠癌；靶向性溶瘤腺病毒；脂质转运蛋白2；姜黄素

I

Abstract

**Study on the therapeutic effect of NV-lipocalin 2 for Colorectal cancer**

**Objective** To reconstruct replication-selective oncolytic adenovirus NV-lipocalin 2,

Which can express lipocalin 2 gene. Study the anti- Colorectal cancer effects and mechanisms of NV-lipocalin 2.

**Methods** Lipocalin 2 gene was cloned into pCA13 plasmid to reconstruct pCA13-lipocalin 2. PCA13-lipocalin 2 was digested with Bgl II restriction enzyme to obtain the expression cassette including Lipocalin 2'CDS and CMV promoter. This cassette was subcloned into pZD55 plasmid to produce pZD55-lipocalin 2. PZD55-lipocalin 2 and pBHGE3 plasmids were cotransfected and recombinated in 293 cells to obtain oncolytic adenovirus ZD55-lipocalin 2. PCA13-lipocalin 2 and pBHGE3 plasmids were cotransfected and recombinated in 293 cells to obtain replication adenovirus NV-lipocalin 2. Human Colorectal cancer cell line SW480 cells were treated with the different virus of different titer compared by curcumin and 5-FU. The proliferation inhibition was examined by MTT assay. Morphological examination, Annexin V/PI staining with flow cytometry were used to detect the apoptosis,. The wester-blot method was used to detect the expression of apoptosis-related gene caspase-3 and 9to study the mechanisms of NV-lipocalin2 induced apoptosis in Colorectal cancer.

**Results** NV**-**lipocalin 2 retains the E1A gene sequence with E1B55 missing. Lipocalin 2 gene was amplificated by PCR from the corresponding viral DNA. The novel adenovirus can express Lipocalin 2 proteins in SW480 cells by wester blot. The anti-cancer effects of NV-lipocalin 2 are better than that of the single virus(ZD55), which can Coordinated with curcumin and 5-FU, whose anti-cancer effects are time-dependent and dose-dependent. NV-lipocalin 2 can induce apoptosis of Colorectal cancer cells by activating Caspase-3,9.

Caspase ＇ s activation induced by NV-lipocalin 2 was also time-dependent and

dose-dependent.

**Conclusions** NV-lipocalin 2 had been successfully constructed. NV-lipocalin 2 have

II

Obvious virus and gene synergy cancer role, which had Synergistic anti tumor effects of curcumin and drugs 5-FU. The anti-cancer effects of NV-lipocalin 2 were performed through caspase-dependent apoptosis pathway in Colorectal cancer cells.

**Subject words** Colorectal Cancer; Conditions of value-added oncolytic adenovirus；

Lipocalin 2; curcumin

III

**缩略词表**

缩略词 英文全称 中文全称

Ad Adenovirus 腺病毒

Amp Ampicillin 氨苄青霉素

BSA Bovine Serum Albumin 牛血清白蛋白 CRAd Conditionally replicative adenovirus 条件复制型腺病毒 CPE Cytopathic Effect 细胞病变效应

CsCl Cesium Chloride 氯化铯

DNA Deoxyribonucleic acid 脱氧核糖核酸 DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM 培养基 DMSO Dimethyl Sulfoxide 二甲基亚砜 EDTA Ethylene Diamine Tetraacetic Acid 乙二胺四乙酸 EB Ethidium Bromide 溴化乙锭

FBS Fetal Bovine Serum 胎牛血清

kDa KiloDaltons 千道尔顿LB Luria-Bertani culture medium LB培养基MOI Multiplicity of Infection 感染复数

PBS Phosphate Buffered Saline 磷酸盐缓冲液PCR Polymerase chain reaction 多聚酶链式反应PFU Plaque Forming Unit 空斑形成单位

IV

前 言

大肠癌在我国居恶性肿瘤发病率第3位，是一种高发病、恶性率高的肿瘤。目前临床治疗以根治性手术为主，但术后发生转移的概率高达30%～50%，另有约20%～40%的大肠患者在临床确诊时已有转移[1-2]，成为大肠癌患者死亡率高的主要因素。目前现有的临床治疗方案对大肠癌引起的死亡作用甚微，因此迫切需要寻找新的有效的治疗手段。

大肠癌的基因病毒靶向治疗是一种全新的治疗方法，即把基因治疗和病毒治疗两者的优势结合起来[3-5]，对进行肿瘤治疗的新策略。理论上它能克服传统肿瘤基因治疗中转染效率不高、治疗基因表达量差、杀伤力不足等缺点，改造后的溶瘤病毒载体能特异性靶向癌细胞，但对正常生长的细胞没有明显的毒性。其基本的方法是将肿瘤特异性增殖病毒（也称溶瘤病毒）作为载体插入抗癌基因。溶瘤病毒本身就有治疗作用，能特异性的在癌细胞中复制，同时其所携带的基因亦能特异性在肿瘤细胞中大量增殖；裂解的肿瘤细胞能释放出子代溶瘤病毒又能不断的靶向临近肿瘤细胞达到杀伤作用。

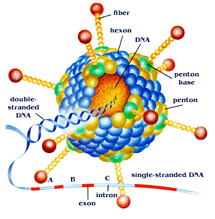


图1 溶瘤腺病毒模型图

文献资料显示具有靶向基因-病毒治疗作用的溶瘤病毒已在结肠癌裸鼠移植瘤模型中显示出良好的疗效，已有文献报道能使部分荷瘤小鼠肿瘤完全消失。部分溶瘤病毒（如

CG0070等）目前已经进入临床试验阶段，初步的实验结果显示出了良好的有效性和安全性[9-11]. ONYX-015是删除了E1B55KD的溶瘤病毒，临床的试验已发现经过静脉途径给药后可以找到被ONYX-015感染的癌细胞，前期以小鼠为动物模型发现鼠静脉注射溶瘤性病毒治疗大肠癌肝转移性肿瘤是安全和有效的，以溶瘤性病毒为载体加入治疗基因后，治疗效果增强了近100倍[12-15]. McCormick等研究认为机体对于1×1013的病毒数量甚

1

至更高剂量的腺病毒颗粒对机体是非常安全的[16]。肿瘤治疗最困难的是能否将肿瘤细胞全部杀死，具有靶向基因-病毒治疗作用的溶瘤病毒已经在鼠的肿瘤模型中显出了其强大的优势，证实了溶瘤性基因病毒治疗优越性。

腺病毒毒基因组中最早转录的基因是E1A基因片段，是病毒复制关键区域。已知腺病毒E1A表达蛋白具有促凋亡作用，正常细胞被感染后，E1A蛋白发挥细胞保护机制作用是通过启动细胞凋亡通路实现的。而在癌细胞中，E1B19K的表达可以有效的抑制E1A诱导的凋亡，在绝大多数肿瘤细胞中E1A诱导的凋亡不能阻止E1B-55kD蛋白缺失的溶瘤腺病毒的复制[17]，E1A蛋白在肿瘤细胞中还能与HRE和p300结合，进而抑制HIF-1α界导的基因转录及VEGF的合成，发挥抗肿瘤血管形成作用[18-21]。腺病毒感染正常细胞后细胞并没有出现凋亡，是因为在正常的细胞中具有p53肿瘤抑制蛋白，但是腺病毒E1B-55kD蛋白能与p53肿瘤抑制蛋白结合并使后者失活，从而使病毒的复制能继续进行，而在很多肿瘤细胞中p53肿瘤抑制蛋白是失活的。因此腺病毒在正常细胞中复制E1B55kd蛋白是必需的，相反在肿瘤细胞中它是不需要的，缺失E1B-55kD蛋白同时保留E1A蛋白就能构建成功靶向肿瘤细胞的溶瘤病毒。本实验所构建的溶瘤腺病毒NV-lipocalin 2是删除了

E1B55kd蛋白保留E1A蛋白的。因此，理论上它不会在正常细胞中复制，但能够选择性地在p53突变的大肠癌细胞中增殖并杀伤肿瘤细胞。

Lipocalin 2（24p3）蛋白是lipocalin家族的成员，最初是作为脂质转运蛋白被发现，近年的研究发现其功能较复杂，有促凋亡、参与细胞生长分化和炎症反应[11, 12]的作用。Ken-ichi Miharada等认为红系祖细胞能大量表达lipocalin 2蛋白，而lipocalin 2可以通过活化Caspase3, 7最终引起红系祖细胞的凋亡[22-25]. Devireddy等[26]研究揭示IL-3的减低，会引起24p3的转录，24p3蛋白合成和分泌，导致细胞凋亡的发生。目前初步认为lipocalin

2是一个与凋亡相关的基因，但确切的作用机制有待进一步深入研究。

理想的基因功能表达产物应在对正常组织细胞无明显毒副作用的同时具有诱导癌细胞发生凋亡，抑制肿瘤的生长、转移或肿瘤血管形成。Lipocalin 2具有诱导细胞凋亡，抑制肿瘤细胞生长[27-30]的作用。Shivalingappa等[31]在研究Lipocalin 2的时发现其具有抑制肿瘤血管形成的作用。但迄今为止Lipocalin 2在大肠癌中的功能尚未见系统报道。

我们根据溶瘤病毒具有肿瘤靶向性的基础上，将Lipocalin 2基因同源重组到溶瘤腺病毒中，成功构建了携带Lipocalin 2治疗基因的溶瘤腺病毒NV-lipocalin 2，并准备进一步探讨其抗大肠癌作用。

2

# 第一部分 携带Lipocalin 2基因溶瘤腺病毒的构建及鉴定

## 一 、实验材料

**（一）实验主要试剂**

DMEM购自杭州科隆公司

E. coli菌株DH5α为本实验室组保存

293细胞人胚肾细胞株（含Ad5E1区），由同济大学徐彬博士惠赠，培养条件DMEM

+5%FBS

人大肠癌细胞株SW480为本实验室收藏

λ-HindⅢDigest Marker购自TaKaRa公司

DL2000 Marker购自TaKaRa公司

Taq酶、限制性内切酶Xho I、BglⅡ、HindⅢ及T4 DNA连接酶、EcoRⅠ、碱性磷酸酶，均为MBI Fermentas公司产品

PVDF膜购自Sangon公司

蛋白酶K，溴化乙锭购自Amersham life science公司胎肝cDNA文库（Clonetch）

DNA凝胶回收试剂盒购自杭州申能公司

琼脂粉、胰蛋白胨、酵母提取物购自GIBCO BRL公司胎牛血清、小牛血清购自Sangon公司

氨苄青霉素（杭州海正股份有限公司）

Dpn I、KOD－Plus试剂盒购自Toyobo Co. RT-PCR试剂盒购自上海海生生物工程公司

QIAamp DNA Blood Mini Kit、Effectene kit、QIAGEN Plasmid Midi Kit购自Microbix

Biosystems公司

pBHGE3(加拿大Microbix Biosystems公司)

pCA13质粒(加拿大Microbix Biosystems公司)

pZD55：由同济大学徐彬博士惠赠

3

**（二）试剂处理**

### 1. 氨苄青霉素（ampicillin）（100mg/ml）

于10ml的水中溶解1g氨苄青霉素钠盐，分装成10小份于-4℃贮存。以100μg/ml的终浓度添加于生长培养基。

### 2. 细胞裂解液:

0.5%去氧胆酸钠(w/v)

0.02%叠氮钠(w/v)

0.1%SDS (w/v)

## 5 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 170mmo1/L NaCI

1% NP-40 (v/v)

## 1 μg/ml Aprotinin

蛋白酶抑制剂100ug/ml PMSF

### 3. LB平板

蛋白胨20 g/L琼脂糖20g/L氯化钠9 g/ L

酵母提取物5 g/L

上述配方加水至250ml，120℃高压蒸汽灭菌，冷却至37℃左右，加入100μg/ml的氨苄青霉素，混匀后倒置无菌的10cm玻璃平皿中，冷却后放置4℃冰箱备用。

### 4. LB培养基

蛋白胨20g

酵母提取物5g

氯化钠10g

溶于1L水中，高压蒸汽灭菌后分装备用。

### 5. PBS液

NaCl 8g

KCl 0.25g Na2HPO4 1.45g

4

KH2PO4 0.268g

溶于1000ml蒸馏水，120℃高压灭菌，4℃冰箱保存。

### 6. 质粒抽提试剂

Solution I

10Mmol/L EDTA (PH=8.0)

45mmol/L 葡萄糖

20Mmol/L TRis-cl (PH=8.0)

Solution II

ddH2O 880μl 10mmol/L NaOH 20μl 10% SDS 100μl

Solution III

H2O 28.5ml

## 5 mol/L乙酸钾60ml

冰醋酸 11.5ml

### 7. 胰酶溶液:

0.25g牛胰蛋白酶加入到100m1D-Hank's液中，过滤后分装保存于-20℃备用

8. D-Hank's配制Na2HPO4·H20 0.06g KH2PO4 0.06 g KCl 0.4 g

NaCl 8g

NaHCO3 0.35g

上述加1000m1三蒸水，高压灭菌，4℃冰箱保存。

9. 1×蛋白电转缓冲液：

Tris 3g

甘氨酸14.5g

甲醇200m1，加1000m1蒸馏水定容

10. TBS-T (pH 8.0)

5

0.5 M NaCl,25 mM Tris. HCl, 加入0.05%－0.1%的Tween-20

11. SDS-PAGE Loading Buffer 62.5mM Tris. Cl, pH6.8 2% SDS 10%甘油

1.55%DTT

溴酚兰0.001%(W/V)

### 12. 5%积层胶（5ml）0.006ml TEMED 3.1ml H2O

1.0ml 30%丙烯酰胺溶液

0.06Ml 10% SDS

0.75ml 1.0M Tris·HCl pH6.8 0.06ml 10%过硫酸铵

### 13. 蛋白封闭液(临用前配制)

脱脂奶粉1.5g，加TBST30m1

### 14. 考马斯亮兰染色液甲醇80ml

考马斯亮兰0.2g

乙酸2ml ddH2O 118 ml

### 15. 10×丽春红S染液

三氯乙酸30g磺基水杨酸30g丽春红S 2g

加蒸馏水定容至100m1

### 16. 显影液

按顺序在800m1约50℃的蒸馏水中加入下列试剂，要求在前一试剂溶解后再加下一试剂：硫酸对甲胺基苯酚2.2g，无水亚硫酸钠96g，对苯二酚8.8g，无水碳酸钠

6

48g, 溴化钾5g，加三蒸馏水定容到1000ml

### 17. 定影液

将偏重亚硫酸钠20g和硫代硫酸钠250g，加1000m1蒸馏水中溶解备用。

**（三）实验主要仪器**

XW80-A蜗旋混合器上海琪特分析仪器公司

电子天平AL104梅特勒-托利多（上海）仪器有限公司

微量移液枪美国SCOTSMAN公司

恒温水浴锅德国EPPENDORF公司

制冰机上海精宏实验设备有限公司

LRH-150B生化培养箱广东医疗器械厂

EPS-500电泳仪BIORAD公司

PCR仪美国Lightcycle公司

低温超速离心机美国Beckman公司

TGL-16D离心机美国Beckman公司

HZ9211K恒温振荡器 太仓市科教仪器厂L185Z-2型台式高速冷冻离心机 上海科特科学仪器厂XDS-1B倒置相差显微镜 重庆光电仪器有限公司

Napc05420二氧化碳培养箱丹麦JOAVN公司

血球计数板上海普光医疗器械厂

## 二 、实验方法步骤

### 1. NV-Lipocalin 2溶瘤腺病毒的构建流程示意(见图1-1-1)。

7



图1 -1-1 病毒构建流程图

### 2. 获取Lipocalin 2基因

2.1从网络Genebank获取Lipocalin 2基因序列并克隆至载体

2.1.1 Lipocalin 2基因序列的引物合成

进入Pubmed Genebank查阅人Lipocalin 2（38455401|NM\_005564.2）基因mRNA基因序列，采用primer3.0基因设计软件（[http: //www. gene. wi. mit. edu/cgi-bin/primer3. cgi](http://www.gene.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3.cgi)）进行引物设计，经PCR扩增后克隆至T载体中。Lipocalin 2基因克隆引物的扩增片段含有目的基因Lipocalin 2的整个CDS区，产物全长680BP, 引物送北京赛百盛基因科技有限公司合成。

T-AAntisense: CCTCAATGGTGTTCGGGCTGGT T-ASense: AGCCACCACAGCGCCTGCTT

2.1.2 PCR对Lipocalin 2基因扩增

PCR扩增目的基因条件：94ºC 1min; 94ºC 30S, 72ºC 4min, 5 cycles; 94ºC 30S, 70ºC 4min, 5 cycles; 94ºC 30S, 68ºC 4min, 27 cycles。

8

表1 -1-1 PCR反应体系组成

Component. Volume cDNA 0.5µl

T-AAntisense(10µM) 1µl

T-ASense(10µM) 1µl

DNTP Mix(containing 10mM of each dNTP) 1µl TAQase 0.5µl

10×Buffer 2.5µl

DMSO 1µl

H2O 17.5µl

总体积25µl

2.1.3收集PCR产物（电泳胶回收法）

1）使用1%的琼脂糖凝胶，在1×TAE缓冲液中电泳（120V电泳30分钟）分离PCR产物，紫外线下观察，用刀片将700bp处的PCR产物条带切下，放入1.5ml离心管中。

2）加入500µl的Solution SN, 60ºC水浴5分钟，将胶混匀溶解。最后加入100µl

的Solution B,混匀。

3）把3S柱子放在2ml的收集管中，将上述配置的溶液转移至3S柱中，室温放置2分钟，低温离心1分钟，10000rpm。

4）取下3S柱，将收集管中的废液倒掉，再3S柱放入同一个收集管，加入600µl Wash solution, 4ºC离心1分钟，10000rpm。

5）重复4的步骤。

6）将3S柱放入新的1.5ml EP管中，将30ulTE加在3S柱膜中央，室温放置5分钟，离心4ºC1分钟，10000rpm，离心管中的液体即为回收的目的DNA片断。

7）取5µl回收产物电泳定量后备用。

2.1.4 Lipocalin 2扩增产物与pGEM®-T Easy Vector连接反应

9

在0.5µl pGEM®-T Easy Vector载体中加入3.5µl回收纯化的PCR产物，0.5µl 10×缓冲液，0.5µl T4 DNA连接酶，混匀，离心10秒，使混合物集中于管底，16ºC过夜后−20ºC保存备用。

2.1.5 DH5α感受态细菌制备

1）划线法把DH5α菌种于LB琼脂板上，37℃过夜。

2）次日挑取单各菌落接种于5m1 LB培养基中，37℃振荡过夜。

3）第三天取菌液10u1接种至含有2-3m1 LB培养基的试管中，37℃剧烈振荡培养约2-3h，待OD值达到0.5时将试管置于冰浴10-15分钟。5000g，4℃离心

10分钟，把管倒置于滤纸流尽最后的残留液体。

4)加入0.1M的CaCl2 6m1重悬菌体，冰浴30min.4000g,4℃离心10min，弃上清。

5）再加500µl的0.1M CaCl2，再次重悬菌体，分装成5管，-80℃保存。

2.1.6 pGEM®-T Easy Vector与Lipocalin 2连接产物转化DH5α感受态细菌及X-gal

筛选

1）-80℃取100µl DH5α感受态细菌一管，冰上放置。

2）待完全融开化后加2.5µl的连接反应产物，震荡混匀。

3) 42ºC热休克60秒后冰上放置3min。

4)加入250µl LB，于37ºC条件下振荡60min。

5）4000rpm离心3min后保留约100µl的培养液，再将菌体小心重悬并涂布含

X-gal的IPTG平板。37ºC过夜培养，取出放置4ºC 6h，使蓝斑充分显色。

6）菌落及鉴定： 挑取白色的菌落，放到含有氨苄青霉素的LB培养液3ml中，37ºC振荡过夜培养，次日行小量质粒抽提。

2.1.7小量质粒抽提（碱裂解法）

## 1）把上述试管中的菌液倒入1.5ml EP管中，4ºC离心1分钟，10000rpm。

3）吸去上清，沉淀干燥，加入100µl的SolutionⅠ，剧烈震荡2分钟。

4）加入SolutionⅡ液200µl，混匀。

10

5）加入150µl SolutionⅢ，轻轻温和混匀并冰上放置5分钟。

6）4ºC离心1分钟，10000rpm，把上清移入另一个Ep管中。

7）苯酚：异戊醇：氯仿（25: 1:24 PH=8.0）400µl,混匀，4ºC离心1分钟，10000rpm。

8）将上清移入另一个相同编号的Ep管中，加入无水乙醇800µl，放置2分钟，

4ºC离心1分钟，10000rpm。

9）去上清，再用70％乙醇洗涤一次，充分干燥后使DNA沉淀透明，加入50µg/ml

的RNase20µl，放置37ºC下30分钟后-20ºC保存。

2.1.8小量抽提质粒的鉴定

1）酶切鉴定

表1-1-2 酶切鉴定体系

Component Volume

10×M Buffer 2µl

ECOR I酶1µl

小量抽提质粒10µl

H2O 9µl

总量20µl

混匀后轻微离心，37℃水浴2-3h进行酶切反应。

2）PCR鉴定

表1 -1-3 PCR鉴定体系

Component Volume

T-AAntisense(10µM) 2µl

T-ASense(10µM) 2µl

TAQ DNA聚合酶1µl

Mgcl(20mM) 1.5µl

dNTP Mix(containing 2.5mM of each dNTP) 1.5µl 10×Buffer 2µl

小量抽提质粒1µl

H2O 9µl

11

总量20µl

反应条件：94ºC 3min; 94ºC 30S, 55ºC 45 S, 72ºC 1min, 30 cycles; 72ºC 10min, 10ºC 99min结束。

3）送上海英骏公司测序

2.2 pcDNA3.1/Myc-his(+) A-lipocalin 2质粒构建

1）操作流程（图1-1-2）



图1-1-2 pcDNA3.1/Myc-his(+) A-lipocalin 2质粒构建图注：LCN2即lipocalin 2基因

12

**2**）PCR扩增

采用Primer Premier 5.03设计引物，在目的基因两端分别加入酶切位点使其能与真核表达载体pcDNA3.1/Myc-his(+) A质粒中的多克隆位点相对应的。同时为了使目的基因在真核细胞中能高表达，我们将Lipocalin 2的CDS区第4个碱基C改为G（绿色标记），构建Kozak（ATCATGG）序列。引物具体拷贝如下：

上游引物：含有Hind III酶切位点（红色下划线标出）

Lsense 5-'CTATAAGCTTATCATGGCCCTAGGTCTCCT-3'

下游引物：包含ECOR I酶切位点（红色下划线标出）

Lantisense 5-' TCTAGAATTCAGCTCCCTCAATGGTGTTC-3'

表1 -1-4 PCR扩增体系

Component Volume

dNTP Mix(2 mM of each dNTP) 2µl KOD -Plus- (1 U/μl) 1µl

LAntisense(10µM) 2µl pGEM®-T Easy Vector-Lipocalin2 1µl 10×KOD -Plus-缓冲液 2µl

LSense(10µM) 2µl

H2O 8.5µl

MgSO4 (25 mM) 1.5µl

总量 20µl

反应条件：94ºC 3min; 94ºC 30S, 53 ºC 45 S, 72ºC 1min, 30 cycles; 72ºC 10min, 10 ºC 99min结束。

3）pcDNA3.1/Myc-his(+) A和PCR产物双酶切

表1-1-5 酶切反应体系

Component Volume

10×M buffer 2µl

Hind III酶1ul

13

ECOR I酶1µl

PCR产物10µl

H2O 6µl

总量20µl

表1-1-6 酶切反应体系

Component Volume

10×M buffer 2µl

ECOR I酶 1µl

Hind III酶 1ul

pcDNA3.1/Myc-his(+) A 10µl H2O 6µl

总量 20µl

混匀后轻微离心，37℃水浴2-3h行酶切反应。

4）连接，转化，涂板后挑取单克隆菌落

酶切反应的产物经琼脂糖凝胶电泳后，对目的条带切取后用3S柱琼脂糖离心式DNA小量快速纯化试剂盒进行DNA片段的回收，并将回收的含Lipocalin

## 2 基因的DNA片段和pcDNA3.1/Myc-his(+) A酶切的大片段于16℃下T4 DNA连接酶进行连接反应，将连接的产物转化DH5α感受态细菌后划线涂板并挑取单克隆菌落。

5）酶切和PCR鉴定pcDNA3.1/Myc-his(+) A-lipocalin 2质粒：步骤同前。

6）鉴定正确后送英骏公司测序。

### 3. pCA13-lipocalin 2的构建

1）构建分析

pcDNA3.1/Myc-his(+) A-lipocalin 2质粒和pCA13质粒（如下图）均含有Xho I和Hind III多克隆位点，因此经过Xho I和Hind III酶切后可以将pcDNA3.1/Myc-his(+) A-lipocalin 2质粒中的Lipocalin 2基因片段定向克隆入

PCA13载体。

14



图1 -1-3 PCA13 plasmid

2）Xho I和Hind III双酶zh切i kPuCqAu1a3n和20p1cD50N8A037.1/Myc-his(+) A- lipocalin 2质粒

表1 -1-7 酶切反应体系

Component Volume

Hind III酶 1ul

Xho I酶 1µl

PCA13质粒10µl

H2O 6µl

10×M buffer 2µl

总量 20µl

混匀后轻微离心，37℃水浴2-3h行酶切反应。表1-1-8酶切反应体系

Component Volume

10×M buffer 2µl

PcDNA3.1/Myc-his(+) A-lipocalin 2 10µl Hind III酶1ul

Xho I酶1µl

15

H2O 6µl

总量20µl

混匀后轻微离心，37℃水浴2-3h行酶切反应。

凝胶电泳后回收pcDNA3.1/Myc-his(+) A-lipocalin 2酶切的小片断产物和PCA13质粒酶切的大片断产物。

3）连接反应（Hind III和Xho I双酶切产物的连接反应体系）

表1-1-9 连接反应体系

Component Volume

PCA13双酶切大片段产物4ul DDH2O 3ul

T4 ligase 1ul

pcDNA3.1/Myc-his(+) A-LCN2酶切的小片断产物10ul

10×Buffer 2ul

总量20µl

zhi混ku匀q后ua于n 2106℃15条08件07过夜。

4）转化、涂板后挑取单克隆菌落

用10ul上述连接产物转化DH5α感受态细菌，涂板后24小时挑取阳性克隆的菌落3个，摇菌。分别编号1、2、3，行小量抽提质粒步骤。

5）PCA13-Lipocalin 2的鉴定酶切鉴定：

表1-1-10 酶切反应体系

Component Volume

10×H buffer 2µl

H2O 6µl

对应编号的待鉴定PCA13-lipocalin 2质粒10µl Bgl II酶1µl

总量20µl

混匀后500rpm离心30s，37℃水浴2-3h行酶切反应。

16

PCR鉴定：

表1 -1-11 PCR扩增体系

Component Volume

TAQ DNA聚合酶1µl

LAntisense(10µM) 2µl dNTP Mix(containing 2.5mM of each dNTP) 1.5µl

Mgcl(20mM) 1.5µl

LSense(10µM) 2µl

10×Buffer 2µl

对应编号的待鉴定PCA13-Lipocalin 2质粒1µl H2O 9µl

总量20µl

反应条件：初始94ºC 3min; 94ºC 30S, 53ºC 45 S, 72ºC 1min, 30 cycles; 72ºC 10min, 10ºC 99min。

### 4. 载体质粒pZD55构建

Zhi ku quan 20150807

拟用定点突变双次PCR技术，构建E1B-55kD片段缺失的新型腺病毒载体。引物合成在上海生工公司合成（注：序列右侧为pXC1质粒和引物配对的序列。）

Bgl I引物：5> ATA AAG GAT AAA TGG AGT GAA GAA ACC CAT CTG AG<3 bp2007-2041

Bgl II引物: 5> GA AGA TCT ATA CAG TTA AGC CAC CTA TAC AAC A<3

bp2244-2268

Xba I引物：5> GCC GAC ATC ACC TGT G TCT AGA GAA TG <3 bp 1321-1348

Xba II引物：5> TCA GAT GGG TTT CTT CAC TCC ATT TAT CCT <3 bp 2040-2011

已pXC1质粒作为PCR反应的模板，引物Xba I和Xba II进行第一次PCR反应，电泳后回收719 bp处条带片段。用引物Bgl I和Bgl II进行第二次PCR反应，电泳回收270 bp条带。两次PCR扩增的产物有34bp的配对序列，把两次PCR产物混合作为模板，以引物Xba I和Bgl II进行第三次PCR反应，电泳并回收955bp片段条带。以Xba I+Bgl II酶切

955bp的PCR产物，克隆进Bgl II +Xba I酶切过的pXC1质粒，命名为pXC1-ZD55. pCA13

质粒有SV40 poly A加尾信号，以BamH I+Bgl II酶切pCA13载体，电泳并回收160 bp片

17

段条带，回收SV40 polyA尾巴，最后将片段克隆进Bgl II酶切过的pXC1-ZD55B并酶切鉴定，并命名为pZD55。



图1-1-4 构建E1B-55kD片段缺失的质粒载体pZD55图

### 5. pZD55-lipocalin 2质粒的构建1）pZD55-lipocalin 2质粒的构建

采用Bgl II酶切pCA13-lipocalin 2质粒，获得含CMV启动子、Lipocalin 2基因和SV40 poly A信号的基因序列，并把Lipocalin 2基因序列再次亚克隆入前面构建好的pZD55质粒中，构建pZD55-lipocalin 2质粒。



图1-1-5 pZD55-lipocalin 2质粒构建示意图

18

2）Bgl II 单酶切pCA13-lipocalin 2质粒和pZD55质粒

表1-1-12 酶切反应体系

Component Volume

鉴定正确的PCA13-Lipocalin 2质粒10µl H2O 6µl

10×H buffer 2µl

Bgl II酶1µl

Total volume 20µl

混匀后稍离心，于37℃水浴反应2-3h

表1-1-13 酶切反应体系

Component Volume

pZD55质粒10µl

10×H buffer 2µl

H2O 6µl

Bgl II酶1µl

Total volume 20µl

混匀后稍离心，37℃水浴中酶切反应3h后加入CIAP 1ul去磷，继续37℃水浴

30S。对上述酶切产物电泳并回收pZD55质粒酶切的大片断产物和PCA13-Lipocalin

2质粒的小片断产物。

3）连接反应

表1-1-14 连接反应体系

Component Volume

PCA13-Lipocalin 2酶切的小片断产物10ul T4 ligase 1ul

19

pZD55质粒酶切的大片断产物4ul DDH2O 3ul

10×Buffer 2ul

Total volume 20ul

充分混匀后16℃过夜。

4）转化，涂板后挑取单克隆

取10ul连接产物转化DH5α感受态细菌，涂板，于24h后挑取阳性菌落，分别编号并接种于LB培养基中并于次日小量抽提质粒。

5）pZD55-lipocalin 2鉴定酶切鉴定：

表1-1-15 酶切反应体系

Component Volume

对应编号的待鉴定pZD55-Lipocalin 2质粒10µl H2O 6µl

Bgl II酶1µl

10×H buffer 2µl

Total volume 20µl

混匀后稍离心，37℃水浴酶切反应2-3h

PCR鉴定：

表1 -1-16 PCR扩增体系

Component Volume

对应编号的待鉴定pZD55-Lipocalin 2质粒1µl dNTP Mix(containing 2.5mM of each dNTP) 1.5µl

LSense(10µM) 2µl

H2O 9µl

LAntisense(10µM) 2µl

20

TAQ DNA聚合酶1µl

Mgcl(20mM) 1.5µl

10×Buffer 2µl

Total volume 20µl

反应条件：起始94ºC 3min, 94ºC 30S, 55ºC 45S, 72ºC 1min, 30 cycles; 72ºC 10min; 10ºC 99min结束

### 6. PBHGE3质粒的抽提

1）收集100ml PBHGE3菌液，4℃条件下6000rpm离心15min。

2) Buffer P1重悬菌体至4ml, Vortex充分振匀。

3)再加入Buffer P2 4ml，颠倒混匀3-5次室温放置5min。

4)加入Buffer P3 4ml，颠倒混匀3-5次，冰上放置15min。

5) 4℃条件下13000 rpm离心30min。

6)取上清液，再次4℃条件下13000 rpm离心15min。

7)平衡QIAGEN-TIP 100, Buffer QBT 4ml润湿柱子。

8）将步骤6中的上清液加入柱子内。

9) 20ml buffer QC洗脱柱子。

10）用5ml Buffer QF洗脱DNA，柱子下端接无菌EP管。

11）加入异丙醇3.5ml，混匀后12000rpm，4℃条件下离心30min。

12）弃上清，加入70％酒精2ml, 12000rpm，4℃条件下离心10min，再次弃上清。

13）放置5-10分钟后用适量TE重新溶解DNA. .

14）DNA浓度的测定：取1ul抽提的质粒按1: 400稀释，在GeneQuant DNA/RNA

calculater上测定DNA的纯度和浓度，包装病毒所需的纯度最好大于90％。

### 7. 质粒pCA13-lipocalin 2和pZD55-lipocalin 2的大量抽提

1）把含有质粒DNA的新鲜大肠杆菌单个菌落挑到3ml含有抗生素的LB培养基中，

37°C 220rpm条件振荡培养过夜。次日，取适量的菌液接种到100ml含相应抗菌素的LB

培养基中，再次37°C 220 rpm振荡培养过夜。

2）将细菌培养产物分装在50ml离心管中，5000rpm离心10min，弃上清后倒置于

21

纸巾上，待干燥后置冰上。

3）每管加入2ml Solution I，振荡器振荡，使菌体完全混匀，冰浴10min。

4）每管加入新配制4ml Solution II，缓慢颠倒离心管3-5次，混匀，室温下静置10min。

5）加入预冷的Solution III 3ml，颠倒混匀至出现絮状沉淀，冰浴10min。

6）4°C条件下12,000rpm离心10min。

7）用滤纸制成漏斗将上清过滤至另一灭菌的50ml离心管中，上清中加入约5.4 ml

的异丙醇，充分混匀，室温静置10min。

8）4°C，12, 000rpm条件下离心10min，小心倒去上清，倒置10min，加入70%乙醇轻轻地洗涤沉淀和管壁，再小心吸尽上清，若有沉淀冲起要再次离心，室温干燥至乙醇挥发殆尽。

9）沉淀中加入pH8.0的TE 400μl，充分溶解后转入到1.5ml的EP管中。加入5M LiCl

400μl，充分振荡。

10）4°C 12,000 rpm离心10 min，将上清吸至另一新的EP管中，用800μl异丙醇充分混匀，静置沉淀15 min。

11）于4°C，12, 000 rpm离心10 min，弃上清并用70%乙醇洗涤，室温干燥至乙醇完全挥发。

12）先加入TE450μl溶解沉淀，再加入1mg/ml的RNase10μl，37°C水浴消化30 min，中间敲打几次，振荡促溶。

13）加入含13%(W/V) PEG8000的1.6M NaCl 500μl，振荡混匀，冰上放置1小时后

4°C，12000rpm，离心15分钟（回收质粒，通常看不见）。

14）弃去上清，加入TE (pH 8.0) 400μl溶解沉淀，用加样枪反复吹吸十几次，37°C水浴1 h，在水浴过程中振荡促溶。

15）加入等量的400μl酚抽提，再于4°C，12,000 rpm离心10 min。

16）将上清吸入到另一新的1.5ml EP管中，加入酚：氯仿：异戊醇（25: 24: 1）

400μl抽提，再于4°C，12,000 rpm离心10 min。

17）把上清吸入到新的1.5mlEP管中，加入等量的氯仿400μl抽提，再于4°C，12, 000

rpm离心10 min。

18）上层水相转入到新的1.5ml Eppendorf管中，加入1/10体积（45μl）3M pH5.2 的

NaAc充分混匀，再加2倍体积（1ml）无水乙醇，室温放置10分钟。

22

19）4°C，12,000 rpm离心15 min. 回收质粒DNA，再以200μl 70%乙醇洗涤。

20）4°C，12, 000 rpm离心2 min，去上清，充分干燥至管壁无液珠。

21）10-20μl双蒸水或者TE溶解沉淀。

22）测量该质粒的浓度。最后保存在-20°C冰箱中备用。

### 8. pCA13-lipocalin 2和pZD55-lipocalin 2分别和PBHGE3在293细胞中同源重组1）取6孔板一块，铺293细胞，至293细胞达80％融合时进行转染。2）取3ug PBHGE3和6ug pZD55-lipocalin 2（或PCA13-lipocalin 2）混合。3）加450ul EC Buffer和24ul Enhancer混合，室温放置5min

4）再加入75ul Effectence混匀，室温放置10min. 5）更换细胞培养液，加入3ml 10％FBS的DMEM

6）将1-3的混合物平均加入每孔中，轻轻晃动分散之。

7）6h后更换培养液

8）转染后第4-5天换培养液一次。

9）9-14天可见病毒空斑形成

10）收集含有空斑的孔内的培养液和细胞，反复冻融3次以上，即刚重组出的腺病毒原液。

### 9. 病毒的空斑纯化

1）将293细胞铺于6或者是12孔板中，当细胞长至80%融合时，可用于实验。

2）配制5%的低溶点胶，称取0.25g和0.5g的低溶点胶分别放入25cm2和50cm2玻璃培养瓶中，后分别加入pH7.4 PBS 5ml和10ml, 1.05Kg/cm2灭菌20min，室温放置备用。用时将其加热溶化，温度降为45°C时，按胶与培养液为1: 3的比例加入含10%FBS的DMEM，混匀。

3）将病毒用含2%FBS的DMEM培养液按107-106-105稀释后，加入六孔板中，放入CO2培养箱中2个小时。

4）吸掉原来的细胞培养液，每孔加入2ml稀释好的低溶点胶，每三天补加一次低溶点胶。

5）大约在3-5天之间在显微镜下观察病毒空斑形成，并用无菌枪头挑取单独的

空斑，再用24孔板小量扩增所挑取的病毒病鉴定之。

23

### 10. 病毒DNA的抽提

1）取病毒悬液200ul，不足者可用缓冲液GA补足。

2）加入20ul蛋白酶K(20mg/ML)溶液，混匀。

3）加220ul缓冲液GB，充分颠倒混匀，70℃放置10min，溶液应变清凉，简短离心以去除管盖内壁的水珠。

4）加220ul无水乙醇，充分振匀15秒，此时可能会出现絮状沉淀，简短离心以去除管盖内壁的水珠。

5）将上步所得溶液和絮状沉淀均加入一个吸附柱CB3中，12000rpm离心1分钟，倒掉废液，吸附柱CB3放入收集管中。

6）向吸附柱CB3中500ul去蛋白液GD，12000rpm离心1分钟，倒掉废液，吸附柱CB3放入收集管中。

7）向吸附柱CB3中700ul漂洗液GW，12000rpm离心1分钟，倒掉废液，吸附柱

CB3放入收集管中。

8）向吸附柱CB3中500ul漂洗液GW，12000rpm离心1分钟，倒掉废液，吸附柱

CB3放入收集管中。

9）12000rpm离心2分钟，吸附柱CB3室温放置数分钟。

10）将吸附柱CB3转入一个干净的1.5ml EP管内，向吸附膜的中间部位滴加

50-200ul经65℃-70℃预热的TE，室温放置2分钟，12000rpm离心30秒。

11）离心得到溶液再次加入吸附柱CB3，室温放置2分钟，12000 rpm离心2分钟。

### 11. 病毒的鉴定

11.1 PCR鉴定目的基因：

利用PCR技术可以鉴定重组病毒所带的基因及Lipocalin 2基因插入的位置，以及是否存在野生型病毒的污染。

鉴定所用引物由上海生工合成（注：序列右侧注明引物与pXC1质粒配对的序列）。

ZD55 sense引物：5> AGA GCC CAT GGA ACC CGA GA <3 bp2200-2219 ZD55 antisense引物：5> CAT CGT ACC TCA GCA CCT TCC A<3 bp353-3332

以抽提所得的病毒DNA作为模板， 同时以野生型病毒DNA作为对照，

ZD55sense引物与ZD55 antisense引物进行PCR反应。PCR条件：94°C 5

24

min, 30 个循环（94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 2min15s），72°C 7min。

11.2 Wester blot鉴定目的蛋白的表达

11.2.1样品的制备:

（1）将一定MOI的NV-lipocalin 2病毒加入到六孔板中感染细胞SW480细胞，

48h后收取细胞。

（2）将六孔板中的上层陪养液放入离心管中，4000rpm，3min，去掉上清后，将胰酶加入到六孔板中消化分离细胞，将消化分离好的细胞吹起吸入到离心管中，用PBS洗六孔板同样加入到离心管中，4000rpm，3min。

（3）去掉上清，加入200µl细胞裂解液，吹匀后放置于冰上20min后，离心

4000rpm，3min。

（4）将上清转入另一个离心管中，放入-20℃冰箱中备用。

（5）用BioRad总蛋白测定试剂盒（Bradford法测定蛋白量）测量蛋白质的浓度，在595nm处测定吸光值。

（6）使用时要加入4×上样缓冲液及10×DTT混合蛋白量为20µg的样品，混匀煮沸10min后可上样。

11.2.2 SDS-PAGE:

a）预先配置SDS-PAGE分离胶和积沉胶

b）每孔加入20μg的蛋白（以Bradford法测定蛋白量）样品及5ul预染Marker进行SDS-PAGE，浓缩胶电压80V，分离胶电压100V。（参照“分子克隆手册”）。

11.2.3转膜：

在电泳结束后，切下分离胶。剪下和凝胶相同大小的PVDF膜一张和滤纸片两张，并将其浸入缓冲液中，注意PVDF膜需预先使用甲醇通透。做成滤纸、凝胶、PVDF膜、滤纸的夹心，放入电转装置中，要注意凝胶蛋白的转移方向为负极转向正极。在电转槽中加入电转缓冲液（14.5g甘氨酸，3.03g Tris碱，甲醇200 ml，双蒸水定容至1,000ml），200mA电流电转约1hr30min。电转完成后，取下PVDF膜，先观察预染Marker是否已转移到PVDF膜上，同时用剪刀剪去右上角进行标记。

11.2.4杂交:

25

1）用封闭液（20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5%的脱脂奶粉, 0.05 % Tween 20和150 mM NaCl）封闭PVDF膜2hr（摇床轻摇）。

2）用适当比例稀释一级抗体于封闭液中，轻摇2hr. TBST洗3次，每次摇床轻摇10min。

3）再加入辣根过氧化物酶偶联的二级抗体IgG稀释液，摇床轻摇1hr30min. TBST洗4次，每次摇床轻摇10min。

4）用PBS洗脱一次以去除TBST中的TWeen。

11.2.5显色与压片曝光：

用Pierce公司的SuperSignal试剂作为HRP发光反应，曝光于X-光片（Kodak

公司）

加入pierce super signal®Western pico Trail Kit中的：

Pico luininoil/Enhancer solution 800ul pico stable peroxiclose solution 800ul

等量混匀后，在每张膜上均匀铺800ul，作HRP发光反应反应2分钟，然后

倒置膜，贴于保鲜膜上，折叠封好后贴于增感屏，在暗室中压片，曝光于 X-光片，分别曝光5分钟和1分钟。

### 12. 病毒的大量制备与滴度测定

NV-lipocalin 2病毒大量制备和CsCl梯度离心纯化：

12.1对鉴定正确的病毒的大量扩增：

（1）把293细胞铺于40个10cm dish，直至细胞长满。

（2）每块板加入10µl约107-108pfu/ml滴度的病毒（对CsCl纯化好的要稀释至合适的滴度后再加）。

（3）细胞长满后，将原来的培养液倒掉大部分，留一点能覆盖住细胞即可，加入10µl

的病毒（并每盘做标记），在2hr后用无菌移液管补加8-10ml含2%FBS的DMEM。

（4）过4-7天待细胞全部病变后，每块板中加入10% Nonidet P 40(NP40，用PBS配制) 500µl以裂解细胞。收集全部细胞裂解物，放入到50ml的离心管中。置于-70°C超低温冰箱中保存。

12.2 CsCl梯度离心纯化病毒：

26

（1）将充分裂解的病变细胞悬液于12000 rpm条件离心10 min，弃去细胞碎片并收集上清。

（2）在每100ml上清加入PEG8000(20% PEG8000(100g) 50 ml, 2.5M NaCl(73.125g)定溶至450ml，放于4℃冰箱中过夜溶解，最后定溶至500ml)，冰上过夜沉淀病毒。

（3）12000 rpm条件离心上述混合物20 min，弃上清，将沉淀物悬浮于10 ml的密度为

1.10g/ml的CsCl溶液中（溶剂为20 mM Tris-Hcl, pH 8.0），4℃下7000rpm离心

5分钟，收集病毒悬浮液。

（4）CsCl梯度的制备，加入CsCl 2.0 ml （密度1.40g/ml，溶剂同上），再加入密度为

1.30 g/ml的CsCl溶液3.0 ml，再加入5 ml的病毒悬浮液。

（5）4oC条件20000 rpm，离心2小时。将密度在1.30-1.40g/ml之间的病毒条带收集至透析袋中，透析袋使用前要用10 mM的EDTA Na2煮沸10 min. 添加透析缓冲液（将50g蔗糖，10ml 1M pH为8.0的Tris-HCl液，2ml 1M MgCl2溶液定容至

1000ml)。

（6）4 oC下透析过夜，中间更换一次透析液。收集病毒，分装后放置于-80oC超低温冰箱中长期保存。

三种密度的CsCl溶液的配制（溶于灭菌20 mM Tris, pH8.0），4oC保存。

1-1-17 CsCl溶液配制

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 密度(g/ml)(20oC) | 浓度(W/V) | CsCl 量(g) | 终体积(ml) |
| 1．40 | 57% | 7.84 | 10 |
| 1．30 | 32% | 4.03 | 10 |
| 1．10 | 15% | 1.32 | 10 |

12.3病毒滴度测定：

空斑形成试验(pfu)的测定

（1）病毒的稀释

27

吸出5µl纯化好的病毒加入到DMEM495µl中，其浓度为10-2，再从10-2的稀释病毒液中吸出100µl加入到900µl的DMEM中，浓度变为10-3，从10-3的病毒液中吸取100µl加到900µlDMEM中，浓度变为10-4，同样方法一直稀释到10-11。注意每个梯度只能用一个枪头。

（2）按病毒浓度从10-6-10-11各取200ul量依次加到24孔板中，每个浓度重复2孔，感染2hr后，铺低溶点胶。

（3）低溶点胶每3天补加一次。直到9-10天就可以计算出病毒滴度。

其公式为：PFU/ml（CsCl 纯化好的病毒）=每孔空斑数量×5×每孔的稀释倍数。

（计算孔要求下一个稀释梯度的孔中没有空斑）。

病毒颗粒（OPU）的测定：把CsCl离心纯化好的病毒以适当倍数（OD值在0.1-1.0之间）稀释，260nm处测OD值，估算病毒的颗粒数(OPU): OPU/ml=OD260×1.1×1012×稀释倍数。纯化得到的病毒的PFU同OPU的关系为：

PFU/ml≈OPU/50.

### 13. 实验所涉及的细胞培养

1）细胞培养的条件

SW480细胞和293细胞：均为贴壁细胞，需完全培养基DMEM＋10％

FBS。

2）细胞复苏

（1）将细胞冻存管迅速的从液氮转入到37℃水浴中，放在水中摇动使其快速融化。

（2）约1-2分钟后，在细胞完全解冻后，用75%的乙醇擦拭冻存管壁，消毒后拿入超净工作台。

（3）将解冻的细胞用1毫升加样枪吸入到5毫升的尖底无菌的离心管中，轻轻吹洗。

（4）800g离心5min。

（5）弃上清，向离心管中加入10%的DMEM5毫升，吹打制成细胞悬液。

（6）将其吸入到培养瓶中。

（7）放入37℃，5%二氧化碳培养箱中过夜，48小时后如细胞贴壁，可更换培养液。培养液使用前一定要先温浴。293细胞约6-7个小时后就可贴壁。

3）细胞传代

28

（1）当细胞长至80%-90%时就要进行细胞传代。

（2）首先要将培养瓶中原来的细胞培养液弃去。

（3）向其加入0.25%胰酶少许，沿侧壁缓慢加入，镜下观察细胞形态，待细胞角回缩或变圆后，吸掉胰酶。

（4）加入新鲜含10%FBS的DMEM，将其吹打均匀。

（5）将悬液吸到无菌的离心管中，1500g离心5min。

（6）弃上清，再次用培养基重悬细胞，并依1: 4的比例传至新的培养瓶中。

（7）37℃，5%二氧化碳培养箱中继续培养。

5）细胞培养过程中的换液

更换培养液的时间要根据营养物的消耗或细胞的生长状态而定

（1）瓶口消毒后倒去原来的培养液。

（2）用酒精棉吸去瓶口残留的液滴（应注意瓶口处液滴不能流回瓶内）。

（3）从培养瓶侧面加入新鲜培养液，翻转培养瓶，使培养液覆盖细胞面，瓶口消毒加盖后37℃，5%二氧化碳培养箱中继续培养。

## 三 、实验结果

### 1. Lipocalin 2基因的获取

1）从Genebank获取Lipocalin 2基因并合成后，克隆至载体形成Lipocalin 2- pGEM-T Easy Vector,使用ECOR I酶酶切所得质粒，获得约700Bp的条带（图1-1-6）。



图1-1-6 Lipocalin 2- pGEM-T Easy Vector酶切结果Lane M ：DL 2000（DNA Marker）

Lane 1: Lipocalin 2- pGEM-T Easy Vector

29

2）酶切鉴定后，送上海博亚公司进行基因测序。

与[http: //www. ncbi. nlm. nih. gov/blast/bl2seq/wblast2. cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi)比较，发现同源性100

％。



图1-1-7 Lipocalin 2- pGEM-T基因测序图谱

30

2. pcDNA3.1/Myc-his(+) A-lipocalin 2质粒鉴定

PCR方法鉴定：对有可能含有重组子pcDNA3.1/Myc-his(+) A-lipocalin 2质粒的单克隆菌落，先抽提获得质粒，再以其作为相应模板，使用PCR方法获得正确的单克隆。 最后结果显示获得的4个单克隆菌都含有pcDNA3.1/Myc-his(+) A-lipocalin 2质粒，如下图（图1-1-8）。



图1-1-8 pcDNA3.1/Myc-his(+) A-lipocalin 2质粒克隆的PCR鉴定

1）：DL 2000(DNA Marker) 2)：DNA Marker DLλ-HindⅢDigest

3）：pcDNA3.1/Myc-his(+) A- lipocalin 2重组子P-LCN1 4)：pcDNA3.1/Myc-his(+) A- lipocalin 2重组子P-LCN2 5)：pcDNA3.1/Myc-his(+) A- lipocalin 2重组子P-LCN3 6)：pcDNA3.1/Myc-his(+) A- lipocalin 2重组子P-LCN4

进一步酶切鉴定：

从平板上挑选单个白色菌落，接种于3ml的含有氨苄青霉素抗性LB培养液中，37ºC下振荡培养过夜，碱裂解法小量质粒抽提，取8ul用Hind III和ECOR I双酶切于1%琼脂糖电泳，如（图1-1-9）图。



图1 -1-9 酶切鉴定

1）：pcDNA3.1/Myc-his(+) A- lipocalin 2重组子P-LCN1

31

2）：pcDNA3.1/Myc-his(+) A- lipocalin 2重组子P-LCN2 3)：pcDNA3.1/Myc-his(+) A- lipocalin 2重组子P-LCN3 4)：pcDNA3.1/Myc-his(+) A- lipocalin 2重组子P-LCN4 5)：pcDNA3.1/Myc-his(-) A- lipocalin 2重组子P-LCN1

基因测序鉴定：

挑选PCR与酶切均正确的克隆P-LCN1和P-LCN3测序，采用T7启动子引物进行测序。测序图如下，经比对P-LCN1为正确克隆。



图1-1-10 P-LCN1测序图

### 3. pCA13-lipocalin 2质粒鉴定

正确重组后的pCA13-lipocalin 2质粒，经过Bgl II酶切可以产生1300bp的含有Lipocalin 2基因的片段，以Lipocalin 2的目的基因为引物可扩增出约700bp的片段，其鉴定结果如（图1-1-11）图：

**1** 2 3



32

图1 -1-11 pCA13-lipocalin 2质粒鉴定图

Lane 1: DL2000

Lane 2: PCA13- lipocalin 2酶切结果

Lane 3: PCA13- lipocalin 2 PCR扩增结果

### 4. pZD55-lipocalin 2穿梭质粒的鉴定

质粒pCA13-lipocalin 2经Bgl II单酶切后，获得带有治疗基因lipocalin 2、CMV启动子及SV40 polyA尾巴的表达框，将表达框再次克隆进经Bgl II单酶切并去磷的pZD55质粒，即可构建成穿梭质粒pZD55- lipocalin 2。对构建正确的重组子经Bgl II单酶切鉴定可获得

1300bp的基因片段；用Lipocalin 2的目的基因引物可扩增出约700bp大小的片段，其鉴定结果如（图1-1-12, 图1-1-13）图：

1 2



图1 -1-12 pZD55-lipocalin 2质粒Bgl II酶切结果

### Lane 1：DL2000 Lane 2: pZD55-lipocalin 2 Bgl II酶切

**1** 2 3



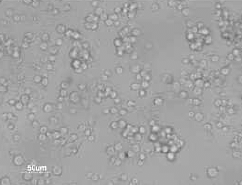
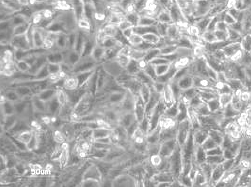
图1-1-13 pZD55-lipocalin 2的PCR扩增结果

33

### Lane 1：DL2000 Lane 2: 空白对照Lane 3：待鉴定质粒为模板的扩增产物

### 5. 病毒包装

质粒pCA13-lipocalin 2和pZD55-lipocalin 2分别和PBHGE3在293细胞中同源重组，约9日左右产生（图1-1-14）病毒空斑。



**病毒空斑**

图1-1-14 同源重组前后293细胞的形态变化比较

①质粒转染6h后的293细胞形态②同源重组第9天病毒空斑形成

### 6. 同源重组的病毒鉴定

1）PCR扩增鉴定目的基因

为鉴定病毒的正确性，用PCR扩增是一个比较快速的方法。用NV- lipocalin 2病毒基因组中与某基因配对的引物来行PCR扩增，能初步判断目的基因是否已被同源重组入病毒，以及重组的位置是否正确（图1-1-15）。E1A区是腺病毒最早被转录的基因，是病毒复制所必须的。而病毒E1B55KD区的缺失使其成功的靶向癌细胞。我们所重组构建的NV-lipocalin 2病毒是保留了E1A区的，所以具有增殖能力。 为进一步鉴定腺病毒的

E1A区的存在，我们设计了一对引物：Reverse: 5'-ACC GCC AAC ATT ACA GAG TCG-3'

与Forward: 5'-CGC GGG AAA ACT GAA TAA GAG-3'，分别对应E1A ORF (nt759-779)

和Ad5 LITR (nt277-297). ZD55-lipocalin 2保留了E1A区，因此引物PCR能扩增出约500bp大小的条带（图1-1-16）。在腺病毒同源重组和扩增中，野生型病毒的污染是一个关键问题，为此设计了2 条引物：ZD55 sense引物和野生型腺病毒bp2200-2219配对，ZD55

antisense引物和野生型病毒bp3353-3332来配对，用以鉴定NV- lipocalin 2中是否存在野生型病毒污染。以病毒DNA作为模板，野生型能生成1153 bp的片段，而含目的基因的病

34

毒NV-lipocalin 2的PCR产物与基因的表达框的长度有关。能在1450bp左右产生产物，因此能够将野生型病毒产生的片段分离出来（图1-1-16）。

1 2 3 4



图1-1-15 NV-lipocalin 2目的基因鉴定结果Lane 1）：DL2000（MARKER）

Lane 2）: 空白阴性对照

Lane 3）：含lipocalin 2基因的阳性质粒对照

Lane 4）：NV-lipocalin 2病毒DNA为模板的扩增产物



图1-1-16 NV-lipocalin 2病毒E1A区、E1B 55KD区基因鉴定结果Lane 1：DL2000

Lane 2: 空白对照

Lane 3: WT E1A区

Lane 4: NV-lipocalin 2病毒E1A区

35

Lane 5: WT E1B55KD区

Lane 6: NV-lipocalin 2病毒E1B55KD 区

2）对目的基因蛋白表达的鉴定

NV-lipocalin 2和Ad-lipocalin 2病毒感染SW480细胞后，经过Western blot可检测到有Lipocalin 2蛋白的表达，而SW480细胞本身不表达Lipocalin 2蛋白，证明了Lipocalin 2基因已正确的重组入腺病毒并能在大肠癌细胞中表达（图1-1-17）。

1 2 3

Lipocalin 2蛋白

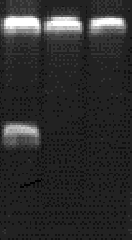


图1-1-17 Western blot检测Lipocalin 2蛋白的表达

Lane 1: 感染NV-lipocalin 2的SW480细胞Lane 2: 感染ZD55的SW480细胞

Lane 3: SW480细胞

## 四 、分析与讨论

大肠癌能否有效的实施肿瘤基因治疗的关键在于治疗基因和其所表达的产物能不能有效的到达所有的肿瘤细胞。我们的溶瘤病毒所特有的一点就是能够选择性的在肿瘤细胞中复制、增殖并杀死肿瘤细胞，细胞破碎后释放出来的子代病毒又能扩散感染临近的肿瘤细胞，这有可能是克服上述肿瘤治疗障碍的有效方法[32-35]。我们把Lipocalin 2目的基因克隆入pZD55载体中，并与PBHGE3在293细胞中同源重组，包装出溶瘤腺病毒NV-lipocalin 2,空斑实验结果说明我们构建的携带人Lipocalin 2基因的溶瘤腺病毒是成功的。

NV- lipocalin 2删除了E1B55基因片段但保留了E1A区。相关资料显示E1A是病毒基

36

因组中最早转录的基因，是病毒能否复制的关键，NV- lipocalin 2保留了E1A从而保留了病毒复制能力。由于E1B-55kD蛋白在腺病毒感染正常细胞时能调节腺病毒mRNA从细胞核转出[36]，同时还可以抑制p53诱导的细胞凋亡[8]，因此E1B-55kD区是病毒在正常细胞中复制必需的。而在大肠癌细胞中p53肿瘤抑制蛋白是失活的，因此E1B-55kD基因的缺失不会妨碍病毒进行复制。故理论上ZD55和以ZD55为基础的溶瘤腺病毒NV- lipocalin 2均能在p53缺陷的大肠癌细胞中复制增殖[1]，而在正常细胞中无法增殖。这为我们下一步研究其抗癌作用提供了理论支持。

## 五 、小结

第一：通过同源重组方法成功构建了条件增殖型溶瘤腺病毒NV-lipocalin 2。

第二：新的NV-lipocalin 2病毒能感染SW480大肠癌细胞并表达Lipocalin 2蛋白。

37

# 第二部分 NV-lipocalin 2诱导细胞凋亡抑制大肠癌Th长的体外实验研究

## 一、 实验材料

**（一）实验主要试剂**

结晶紫（三博远志）

Annexin V和PI染色试剂盒（南京碧波生物）

DMEM培养基（Invitrogen）

Anti-caspase-3的一抗和Anti-Parp的一抗（Santa Cruz）

# （二） 病毒及细胞株

ZD55病毒为同济大学徐彬博士惠赠，缺失E1B55KD. ZD55-IL24为同济大学徐彬博士惠赠，缺失E1B55KD。

SW480人结肠癌细胞株来源本实验室培养条件：DMEM +5% FBS

NHFL人胚肺细胞株来源中科院上海细胞库培养条件：DMEM + 10%FBS

# （三） 实验主要仪器

细胞培养板（Corning）

X-21光学显微镜（olympus）

IX71-F22FL/PH荧光显微镜（olympus）

H9500透射电镜（日立）

## 二、 实验方法步骤

### 1. 溶瘤病毒NV-lipocalin 2增殖能力的实验研究

1）分别将2×105 个正常细胞NHFL、SW480铺于6孔板中。

38

2）24h后用1×105PFU的病毒NV-lipocalin 2分别感染正常细胞NHFL及SW480.

3）分别在病毒感染48小时和96小时后分别收集相应的细胞上清，在反复冻融3次后轻轻离心收集上清。

4）再次测定上清液中的病毒滴度。

### 2. NV-lipocalin 2对肿瘤细胞杀伤作用的实验研究

将SW480细胞分别在24孔板培养，24h后用一定MOI的ZD55、NV-lipocalin 2、NV-lipocalin 2+低剂量10μmol/L姜黄素、NV-lipocalin 2+低剂量15μg/ml5-FU进行细胞感染，37℃继续培养3天后，弃去培养液，每孔加入500μl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去并拍照保存。

### 3. 溶瘤病毒NV-lipocalin 2对SW480肿瘤细胞毒性作用的形态学观察

将SW480细胞在24孔板培养，在24h后用不同MOI的NV-lipocalin 2感染细胞，37℃培养箱中继续培养，用倒置显微镜在相同的倍数下观察病毒滴度的变化和病毒作用时间对SW480细胞形态变化的影响。

### 4. MTT试验

1）取SW480细胞，稀释到合适浓度后取200μL，接种于96孔板中，重复接种8块。要求每孔的细胞数目为8×103/孔，37℃、5%CO2孵箱中培养24 h至细胞贴壁，再分别加入不同MIO的ZD55、NV-lipocalin 2，每一浓度重复5孔 。

1）分别在24、48、72和96h时各取1块96孔板，每孔加MTT 20μl，37℃继续培养4h后，弃上清，每孔加入MTT溶解液DMSO 100μl。摇床震荡15min，使紫色结晶物充分溶解。

2）在酶标仪上510nm处测量吸光度值。

3）根据吸光值的测定结果，计算存活率，并绘制图表。

### 5. Annexin V和PI染色流式检测细胞凋亡

1）用1MOI、5MOI、10MOI ZD55病毒、NV- lipocalin 2感染SW480大肠癌细胞。取6孔板1块，培养3×105/孔的SW480细胞，分别感染病毒12、24、48小时

39

后，用胰酶消化，用含血清培养基洗涤一次，3000rpm离心5min，收集各组细胞。

2）将各组细胞重悬于500ul Binding Buffer，加入5ul Annexin V-FITC和5ul PI，轻轻混匀，避光室温反应10min. （设置1管阳性PI对照，1管空白（无染色）对照，1管阳性Annexin V-FITC对照，）

3）通过流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

### 6. 电镜观察细胞凋亡现象

### 1）铺6孔板SW480细胞一块5×105 /孔

### 2）24h后用10MOI NV-lipocalin 2病毒感染癌细胞，感染48h后, 用胰酶消化，

800-1000 rpm离心5 min后，用PBS漂洗，重复离心，漂洗后离心浓缩。

### 3）用2.5%戊二醛固定液固定过夜后送电镜室进行脱水、浸透、包埋聚合、超薄切片，最后进行电镜观察、拍片、记录。

### 7. 蛋白印迹反应检测细胞凋亡

SW480大肠癌细胞以5×105的密度接种于6孔板中，24小时后用10MOI NV-lipocalin 2、10MOI ZD55、40MOI NV-lipocalin 2、40MOI ZD55感染细胞。都在48小时后裂解细胞并收集蛋白，定量测定蛋白浓度后，取等量的蛋白用12

％SDS-PAGE电泳，分别用anti-caspase-3的一抗和anti-Parp的一抗进行免疫反应，并进一步检测caspase-3和Parp的表达量。在病毒感染细胞一定时间后加1×SDS凝胶加样缓冲液(2% SDS, 10 mmol/L glycerol, 62.5 mmol/L Tris-HCl pH 6.8,1.55%

DTT)裂解细胞，沸水浴煮10 min. 立即用于PAGE凝胶电泳。每孔中加入蛋白20μg (Bradford法测定)样品进行SDS-PAGE电泳，以100V电压进行电泳2 h. 然后用PVDF膜湿法(Amersham)进行转膜。再用封闭液（20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 5%脱脂奶粉, 150 mol/L NaCl和0.05% Tween 20）摇床轻摇封闭1 h. 以1:

5比例将一级抗体稀释于封闭液中，4°C过夜。TBST洗涤缓冲液洗3次（每次

5-10 min）。再加入有辣根过氧化物酶偶联的IgG二级抗体稀释液，摇床轻摇1 h。用TBST洗3次（每次10 min）。最后采用SuperSignal试剂作HRP的发光反应，曝光后拍片并分析统计。

40

## 三、 实验结果

### 1. 溶瘤病毒NV-lipocalin 2在SW480细胞中的增殖能力

对肿瘤细胞的靶向特异性是我们构建的溶瘤病毒特点之一，即在肿瘤细胞中具有高增殖能力，而在正常细胞中没有增殖能力。我们将NV-lipocalin 2分别感染SW480癌细胞和正常细胞NHFL，经过相同的时间后复测病毒滴度，发现感染SW480癌细胞组的病毒滴度明显高于NHFL组，并且随着感染时间的延长，病毒在两组之间的滴度差距越来越明显（图1-2-1）。



图1 -2-1 NV-lipocalin 2在SW480细胞中的增殖能力

### 2. 结晶紫染色观察细胞毒性实验结果

我们选用了大肠癌细胞SW480来观察NV-lipocalin 2对肿瘤细胞的毒性作用。结果显示NV-lipocalin 2对大肠癌细胞SW480敏感，以ZD55作为对照发现，虽然载体本身对肿瘤细胞有杀伤作用，但是当加入治疗基因后病毒的杀伤作用明显强于载体本身，随着病毒浓度的增加，这种杀伤力的优势愈发明显。我们同时在将取用NV-lipocalin 2浓度减半的同时加入低剂量抗癌药物姜黄素和5-FU，结果发现姜黄素和5-FU对NV-lipocalin都有协同杀伤作用，这值得我们进一步具体研究（图1-2-2）。

41



图1 -2-2 NV-lipocalin 2对SW480细胞的毒性作用

注：在NV+姜黄素和NV+5-FU组中NV-lipocalin浓度为上标值的50%

### 3. NV-lipocalin 2对SW480肿瘤细胞毒力作用的形态学改变

NV-lipocalin 2感染SW480肿瘤细胞72h后，20MOI的病毒组可见到明显的细胞病变形态，从图可见大量细胞浮起变圆，带有折光性。而0MOI病毒感染组与1MOI细胞生长组之间形态学上无明显差异，细胞生长仍呈（图1-2-3）贴壁状态。同时分别于感染0、48、72h后同一视野下观察10MOI的NV-lipocalin 2对SW480肿瘤细胞毒力作用的形态学改变，也可以发现随病毒作用时间的延长，SW480 细胞病变形态越来越明显，同时也可见到越来越多的肿瘤细胞发生图1-2-4所示的凋亡和坏死。因此，NV -lipocalin

2对SW480肿瘤细胞毒力作用能随作用时间的延长而增强，在相同的感染时间内，高滴度的NV-lipocalin 2作用强度高于低滴度的病毒，具有剂量依赖性。

42



图1 -2-3 NV-lipocalin 2感染SW480肿瘤细胞72h后不同滴度病毒的毒力作用(×100)

①0 MOI②1 MOI③5 MOI④10 MOI⑤20 MOI



图 1 -2-4 10 MOI的NV-lipocalin 2对SW480肿瘤细胞毒力作用的时间依赖性(×100) 1: 0h 2: 24h 3:48h 4:72h

### 4. MTT试验

43

病毒感染SW480细胞48、72h后，不同的病毒滴度对肿瘤细胞的生长抑制存在着显著的差异。无论是NV-lipocalin 2组还是ZD55组，高滴度组的细胞存活率明显低于低滴度组，其中NV-lipocalin 2组中，在感染相同的时间内，20MIO时，细胞存活率为20.27

％，而1 MIO时，细胞存活率为72.40％。通过NV-lipocalin 2组与ZD55组比较可以发现，相同滴度的ZD55对细胞生长的抑制效果明显低于NV-lipocalin 2（图1-2-5）。同时病毒对肿瘤细胞生长抑制作用能随时间的延长而不断的增强，5MOI NV-lipocalin 2感染

48小时后，肿瘤细胞存活率为51.217％，而96小时后，细胞存活率可降至为12.23％（图

1-2-6)。

ZD55 NV-Lp2

不同滴度NV-lipocalin 2对大肠癌SW480细胞生长抑制作用

1.2

1

0.8

0.6

0.4

0.2

0

0MOI 0.5MOI 1MOI 5MOI 10MOI 20MOI

病毒滴度

图1 -2-5病毒感染72小时时的SW480细胞存活率.

ZD55 NV-Lp2

不同滴度NV-lipocalin 2对大肠癌SW480细胞生长抑制的时间依赖性

1.2

1

0.8

0.6

0.4

0.2

0

0h

24h

48h

病毒作用时间

72h

96h

图1 -2-6 5MOI滴度时的不同病毒对SW480的毒力随时间的变化趋势

### 5. Annexin V-FITC/ PI染色

44

标记FITC的AnnexinⅤ是一种分子量为35-36kD的Ca2+依赖性磷脂结合蛋白，能与细胞凋亡过程中的翻转到膜外的磷脂酰丝氨酸（Phosphatidylserine, PS）高亲和力特异性结合。以AnnexinⅤ-FITC作为荧光探针，利用流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。Propidium iodide（PI）是一种常用的核酸染料，能够透过细胞膜而使凋亡中晚期的细胞和死细胞的细胞核红染。通过AnnexinⅤ与PI配合使用，可以将凋亡早期的细胞和晚期的细胞以及死细胞区分开来。NV-lipocalin 2能诱导SW480细胞发生早期凋亡，和空载体组相比较，随着浓度和作用时间的增加，早期凋亡的比例明显增多，但两者着在诱导晚期凋亡上无明显差异（图1-2-7）。



图1 -2-7 不同浓度病毒感染24小时时的SW480细胞凋亡流式检测结果

45



图1 -2-8 5MOI浓度病毒感染SW480细胞随时间变化凋亡变化结果

### 6. 透射电镜检测细胞形态变化

对凋亡细胞的研究有多种方法，其中以电镜观察形态变化来判断是否发生凋亡的方法最为可信。大肠癌SW480细胞经NV-lipocalin 2作用后，图1-2-9中电镜下可见到典型的核染色质边移的凋亡细胞形态特征，如细胞体积小，胞深，核染色质凝聚，明显边移，凝聚于核膜下，双层核膜和胞质膜完整，线粒体细胞器结构完好，胞质内有空泡形成等。

46



图1 -2-9 SW480细胞透射电镜检测凋亡

### 7. NV-lipocalin 2可通过Caspase途径启动大肠癌细胞凋亡

相关资料证明，细胞凋亡后期的共同途径是Caspases途径的激活，Caspase3是该家族中最重要的成员之一，是细胞凋亡过程中需要激活的关键酶，也是细胞凋亡的最主要效应因子。在多种途径触发细胞凋亡的因素中，最终均需要通过Caspase3介导的信号传导途径来导致细胞凋亡。PARP（聚腺苷二磷酸核糖基聚合酶）是Caspase-3的特异作用底物，在细胞凋亡的早期，即有PARP发生切割，把完整的116kd切割成85kd的“凋亡带”。通过western blot检测PARP单抗，我们发现NV-lipocalin 2组可见到明显的PARP的切割条带，并且40MOI浓度要比10MOI NV-lipocalin 2组产生的切割条带更明显，而在其它组则未见到明显的PARP被活化的Caspase-3切割的条带（图1-2-9）。

将10MOI浓度NV-lipocalin 2感染SW480大肠癌细胞后分别在24、48、72h后收集蛋白，western blot检测Caspase-3前体，可见到其量的表达随时间的延长而减少（图1-2-10）。

1 2 3 4 5



图1 -2-10 PARP切割检测

47

1. Control（无病毒感染）组

2. 10MOI NV-lipocalin 2 组

3. 10MOI ZD55 组

4. 40MOI NV-lipocalin 2 组

5. 40MOI ZD55 组



图1 -2-10 Caspase-3前体

1. Control（无病毒感染）组

2. NV-lipocalin 2感染24h 组

3. NV-lipocalin 2感染48h 组

4. NV-lipocalin 2感染72h 组

## 四、 分析与讨论

NV-lipocalin 2是一个保留E1A但删除了E1B-55kD蛋白，同时携带lipocalin 2基因的溶瘤腺病毒。E1B-55kD蛋白的缺失能使NV-lipocalin 2在p53缺陷的大肠癌细胞中复制增殖。我们采用报告基因方法首先观察E1B-55kD蛋白缺失的腺病毒载体ZD55在大肠癌细胞中的增殖复制情况，报告基因检测结果显示ZD55介导的基因能在大肠癌细胞SW480中高表达，我们所构建的NV-lipocalin 2在SW480中增殖并高表达lipocalin 2。通过Westblot检测，我们也检测到了被NV-lipocalin 2感染的SW480细胞高表达lipocalin 2。为了进一步观察N-Vlipocalin 2在SW480和正常细胞中的增殖能力的差别，我们将NV-lipocalin 2分别感染SW480细胞和正常细胞NHFL，经过相同的时间复测病毒滴度发现，感染SW480细胞组的病毒滴度明显高于NHFL组，并且随着时间的延长病毒滴度之间的差距越来越明显。溶瘤病毒的一个特点就是具有一定的特异性，即在肿瘤细胞中具有高增殖能力，而在正常细胞中增殖能力极弱，我们的结果也证实了NV-lipocalin 2病毒具有上述特点。

结晶紫染色实验结果显示：NV-lipocalin 2对大肠癌细胞SW480有明显的细胞毒性

48

作用。这种细胞毒性作用均随病毒滴度的增加而不断增强，并且NV-lipocalin 2的细胞毒性作用要强于载体病毒ZD55，同时我们发现姜黄素和5-FU对NV-lipocalin都有协同杀伤作用，这是值得我们下进一步研究的方向。进一步的MTT试验更加精确的观察到：溶瘤病毒感染的大肠癌细胞，高滴度组的细胞存活率明显低于低滴度组，横向对比NV-lipocalin 2组与ZD55组，相同滴度的ZD55对细胞生长的抑制作用明显低于NV-lipocalin 2。同时病毒对肿瘤细胞生长抑制作用是随时间的延长而不断的加强的。从上述试验中，我们可以综合得出：NV-lipocalin 2病毒对肿瘤细胞的生长具有明显的抑制作用，这种抑制作用具有时间和浓度依赖性，即随病毒感染的时间延长和病毒滴度的增高，其抑制作用增加，且这种抑制作用均明显强于ZD55本身的裂解细胞作用。

我们的实验进一步探讨了NV-lipocalin 2病毒对肿瘤细胞的生长抑制作用的机制。所谓细胞凋亡是指在一定的生理或病理条件下，细胞遵循自身的程序，结束自己生命的过程。最后，凋亡细胞往往脱落离体抑或裂解为若干凋亡小体(apoptoticbodies)，而被其它细胞吞噬[37]。细胞凋亡(apoptosis)是细胞死亡的一种最主要形式[38-42]。细胞凋亡在癌的发生过程中起着重要作用[43-44]。肿瘤细胞能通过高表达凋亡抑制蛋白如XIAP、Survivin等产生凋亡抵抗。大肠癌中也存在凋亡抵抗现象[45-47]。如大肠癌细胞SW480可高表达凋亡抑制分子Bcl-2、Bcl-xL，并且通过维持线粒体膜通透性而发挥抗凋亡的作用[48]。诱导肿瘤细胞凋亡可成为治疗大肠癌的一种策略[49]。通过我们的进一步研究发现溶瘤病毒NV-lipocalin 2之所以对大肠癌SW480肿瘤细胞的生长具有明显的抑制作用，是与该病毒诱导SW480细胞凋亡密切相关的。

本研究中所用的病毒ZD55-lipocalin 2经过AnnexinⅤ与PI染色流式细胞检测证实具有明显的促进SW480肿瘤细胞凋亡的作用。NV-lipocalin 2能诱导SW480细胞发生早期凋亡，与ZD55空载体组相比在诱导晚期凋亡上无明显差异。在高倍电镜下可见碎裂细胞核，核内染色质凝聚，明显边移，且凝聚于核膜下，胞质内有空泡形成等典型的形态学的凋亡变化，从形态学角度证明了NV-lipocalin 2能诱导SW480细胞发生细胞早期凋亡。

为了进一步了解NV-lipocalin 2引起凋亡的机制，我们从相关蛋白的表达上进行了更深入的研究。目前普遍认为，在caspase依赖的细胞凋亡信号通路[50-51]中，无论是死亡受体途径还是线粒体途径，最终都是通过活化Caspase-3，切割PARP而引起细胞凋亡。PARP（聚腺苷二磷酸核糖基聚合酶）是 Caspase-3 的特异作用底物，在凋亡的早期，

49

活化的Caspase-3可以切割PARP，使其由完整的116kd切割成85kd的“凋亡带”，其切割的条带越多，说明活化的Caspase-3的浓度越高，凋亡越明显。应用PARP单抗通过western blot检测，我们发现：NV-lipocalin 2组可见到明显的PARP的切割条带，并且

40MOI浓度要比10MOI的NV-lipocalin 2组产生的切割条带更明显，而与之对照的是其它组未见到明显的PARP被切割的条带。我们将10MOI NV-lipocalin 2感染SW480大肠癌细胞后分别在24、48、720小时收集蛋白，western blot方法检测Caspase-3前体，可见到pro-caspase-3量的表达随时间的延长而减少，即随感染时间的延长，活化的Caspase-3的量也越来越多。因此我们得出结论：NV5-lipocalin 2活化Caspase-3的能力具有浓度和时间的依赖性，Caspase家族的凋亡通路是NV-lipocalin 2诱导SW480细胞凋亡的机制之一。

## 五、 小结

1. NV-lipocalin 2能在大肠癌细胞SW480中复制增殖并随作用时间延长而不断增加。

2. NV-lipocalin 2对大肠癌细胞SW480有明显的细胞毒性和生长抑制作用。这种作用具有时间和浓度依赖性，并且NV-lipocalin 2的作用要明显强于载体病毒ZD55。

3. NV-lipocalin 2能诱导SW480细胞发生早期凋亡，高于空载体组，与ZD55空载体组相比在诱导晚期凋亡上无明显差异。

4. NV-lipocalin 2活化Caspase-3的能力具有时间和浓度依赖性，Caspase途径是

NV-lipocalin 2诱导SW480细胞凋亡的途径之一。

50

结 **论**

lipocalin 2(又称NGAL, 24p3)是lipocalin家族的成员之一,文献报道能参与细胞生长分化和炎症反应[31-35]，有促凋亡作用，也有文献报道在部分肿瘤细胞中有抗凋亡的作用，但在大肠癌细胞中的作用有待研究。我们应用基因重组技术在溶瘤性腺病毒载体中加入具有细胞凋亡促进作用的lipocalin 2基因，构建新型溶瘤腺病毒NV- lipocalin 2。从理论上我们可以推测该病毒具有病毒和基因治疗两者的协同功效，病毒载体本身就有治疗作用，它可特异性在肿瘤细胞中复制，使其所携带的lipocalin 2基因也能特异性在肿瘤细胞内表达数十至数百倍，然后通过高表达ipocalin 2蛋白诱导肿瘤细胞凋亡来增强抗肿瘤作用；从裂解的肿瘤细胞中释放出的子代病毒又能不断的感染临近肿瘤细胞。经改造的溶瘤病毒载体可特异性靶向肿瘤细胞，而对正常细胞无明显的毒性作用。该治疗策略可克服传统肿瘤基因治疗中转染效率低、靶向性差、治疗基因表达量低、杀伤力不足等缺点，是肿瘤生物治疗的新希望，现将实验成果总结如下：

第一，重组成功条件复制型溶瘤腺病毒NV-lipocalin 2。

第二，新的NV-lipocalin 2病毒能感染SW480大肠癌细胞并表达Lipocalin 2蛋白。

第三，NV-lipocalin 2能在大肠癌细胞SW480中复制增殖并随作用时间延长而不断增强。第四，NV-lipocalin 2对大肠癌细胞SW480有明显的细胞毒性和生长抑制作用。这种作用具有时间和浓度依赖性，并且NV-lipocalin 2的作用要明显强于载体病毒ZD55。

第五，NV-lipocalin 2能诱导SW480细胞发生早期凋亡，高于空载体组，与ZD55空载体组相比在诱导晚期凋亡上无明显差异。

第六，NV-lipocalin 2活化Caspase-3的能力具有浓度和时间依赖性，NV-lipocalin 2可通过Caspase途径启动大肠癌细胞凋亡。

51

参考文献

[1]. Otchy D, Hyman NH, Simmang C, et al. Practice parameters for colon cancer[J]. Dis Colon Rectum, 2004, 47( 8): 1269- 1284.

[2]. Liu XY. Targeting gene-virotherapy of cancer and its prosperity[Ｊ]. Cell Res, 2006.16(11): 879-886.

[3]. Motoi F, Sunamura M, Ding L, et al. Effective gene therapy for Colorectal cancer by cytokines mediated by restricted replication-competent adenovirus[Ｊ]. Hum Gene Ther, 2000. 11(2): 223-235.

[4]. Kasuya H, Takeda S, Nomoto S, et al. The potential of oncolytic virus therapy for Colorectal cancer[Ｊ]. Cancer Gene Ther, 2005. 12(9): 725-736.

[5]. Bischoff JR, Kirn, DH, Williams A, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells [Ｊ]. Science, 1996. 274(5286): 373-376.

[6]. Himeno Y, Etoh T, Matsumoto T, et al. Efficacy of oncolytic reovirus against liver metastasis from Colorectal cancer in immunocompetent models [Ｊ]. Int J Oncol, 2005. 27(4): 901-906.

[7]. Liu XY. A Mini-review of Targeting Gene-Virotherapy of Cancer [Ｊ]. Chinese Journal of Cancer, 2006. 25(10): 1320-1322.

[8]. Rao XM, Tseng MT, Zheng X, et al. E1A-induced apoptosis does not prevent replication of adenoviruses with deletion of E1b in majority of infected cancer cells[Ｊ]. Cancer Gene Ther, 2004. 11(9): 585-593.

[9]. Saito Y, Sunamura M, Motoi F, et al. Oncolytic replication-competent adenovirus suppresses tumor angiogenesis through preserved E1A region[Ｊ]. Cancer Gene Ther, 2006. 13(3): 242-252.

[10]. Gonzalez R, Huang W, Finnen R, et al. Adenovirus E1B 55-kilodalton protein is required for both regulation of mRNA export and efficient entry into the late phase ofinfection in normal human fibroblasts[Ｊ]. J Virol, 2006. 80(2): 964-974.

[11]. Akerstrom B, Flower DR, Salier JP. Lipocalins: unity in diversity[Ｊ]. Biochim Biophys Acta, 2000. 1482(1-2): 1-8.52

[12]. Flower DR. Beyond the superfamily: the lipocalin receptors[Ｊ]. Biochim Biophys Acta, 2000. 1482(1-2): 327-336.

[13]. Yew PR, Berk AJ. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein[Ｊ]. Nature, 1992. 357(6373): 82-85.

[14]. Elkhalil AO, Nilsen-Hamilton M, Yoshizawa F, et al. Expression of SIP24 in the peripartum and postpartum rat uterus [Ｊ]. Connect Tissue Res, 2005. 46(4-5): 235-241.

[15]. Lee HJ, Lee EK, Lee KJ, et al. Ectopic expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin suppresses the invasion and liver metastasis of colon cancer cells[Ｊ]. Int J Cancer, 2006. 118(10): 2490-2497.

[16]. Venkatesha S, Hanai J, Seth P, et al. Lipocalin 2 antagonizes the proangiogenic action of ras in transformed cells[Ｊ]. Mol Cancer Res, 2006. 4(11): 821-829.

[17]. Lebedeva IV, Sarkar D, Su ZZ, et al. Molecular target-based therapy of Colorectal cancer[Ｊ]. Cancer Res, 2006. 66(4): 2403-2413.

[18]. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics, 2000[Ｊ]. CA Cancer J Clin, 2000. 50(1): 7-33.

[19]. Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiology and prevention of Colorectal cancer[Ｊ]. Jpn J Clin Oncol, 2004. 34(5): 238-244.

[20]. Alemany R, Balague C, Curiel DT. Replicative adenoviruses for cancer therapy[Ｊ]. Nat Biotechnol, 2000. 18(7): 723-727.

[21]. Kanerva A, Hemminki A. Modified adenoviruses for cancer gene therapy[Ｊ]. Int JCancer, 2004. 110(4): 475-480.

[22]. Jounaidi Y, Doloff JC, Waxman DJ. Conditionally replicating adenoviruses for cancer treatment[Ｊ]. Curr Cancer Drug Targets, 2007. 7(3): 285-301.

[23]. Danthinne X, Imperiale MJ. Production of first generation adenovirus vectors: a review[Ｊ]. Gene Ther, 2000. 7(20): 1707-1714.

[24]. Hitt MM, Addison, CL, Graham, FL. Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells[Ｊ]. Adv Pharmacol, 1997. 40: 137-206.

[25]. Nielsen LL, Gurnani M, Syed J, et al., Recombinant E1-deleted adenovirus-mediated

53

Gene therapy for cancer: efficacy studies with p53 tumor suppressor gene and liver histology in tumor xenograft models[Ｊ]. Hum Gene Ther, 1998. 9(5): 681-694.

[26]. Kamezaki K, Shimoda K, Numata A, et al., The lipocalin 24p3, which is an essential molecule in IL-3 withdrawal-induced apoptosis, is not involved in the G-CSFwithdrawal-induced apoptosis[Ｊ]. Eur J Haematol, 2003. 71(6): 412-417.

[27]. Gukovskaya AS, Pandol SJ. Cell death pathways in pancreatitis and Colorectal cancer[Ｊ]. Pancreatology, 2004. 4(6): 567-586.

[28]. Letai AG.. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis[Ｊ]. Nat Rev Cancer, 2008. 8(2): 121-132.

[29]. Trauzold A, Schmiedel S, Roder C, et al. Multiple and synergistic deregulations of apoptosis-controlling genes in Colorectal carcinoma cells [Ｊ]. Br J Cancer, 2003. 89(9): 1714-1721.

[30]. Hinz S, Trauzold A, Boenicke L, et al. Bcl-XL protects Colorectal adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis[Ｊ]. Oncogene, 2000. 19(48): 5477-5486.

[31]. Westphal S, Kalthoff H. Apoptosis: targets in Colorectal cancer[Ｊ]. Mol Cancer, 2003. 2: 6.

[32]. Devireddy LR, Teodoro JG, Richard FA, et al., Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation[Ｊ]. Science, 2001. 293(5531): 829-834.

[33]. Tong Z, Wu X, Kehrer JP. Increased expression of the lipocalin 24p3 as an apoptotic mechanism for MK886[Ｊ]. Biochem J, 2003. 372(Pt 1): 203-210.

[34]. Miharada K, Hiroyama T, Sudo K, et al. Lipocalin 2 functions as a negative regulator of red blood cell production in an autocrine fashion [Ｊ]. Faseb J, 2005. 19(13): 1881-1883.

[35]. Adrian TE. Inhibition of Colorectal cancer cell growth[Ｊ]. Cell Mol Life Sci, 2007. 64(19-20): 2512-2521.

[36]. Schmidt PM, Lehmann C, Matthes E, et al. Detection of activity of telomerase in tumor cells using fiber optical biosensors. Biosens Bioelectron. 2002; 17(11-12): 1081-1087.54

[37]. Beger HG, Rau B, Gansauge F, et al. Treatment of pancreatic cancer: challenge of the facts[Ｊ]. World J Surg, 2003. 27(10): 1075-1084.

[38]. Wang JT, Peng DY, Chen M, et al. Gene delivery for lung cancer using nonviral gene vectors[Ｊ]. Pharmazie, 2007. 62(10): 723-726.

[39]. Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors [Ｊ]. Gene Ther, 2002. 9(24): 1647-1652.

[40]. Liu XY. Targeting gene-virotherapy of cancer and its prosperity[Ｊ]. Cell Res, 2006.16(11): 879-886.

[41]. Lichtenstein DL, Toth K, Doronin K, et al. Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins[Ｊ]. Int Rev Immunol, 2004. 23(1-2): 75-111.

[42]. Aihua Zou, Isabella Atencio, Whei-Mei Huang, et al. Overexpression of adenovirus E3-11.6K protein induces cell killing by both caspase-dependent andcaspase-independent mechanisms[Ｊ]. Virology, 2004. 326(2): 240-249.

[43]. Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, et al. a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer[Ｊ]. Nat Med, 2000. 6(8): 879-885.

[44]. Rao XM, Tseng MT, Zheng X, et al. E1A-induced apoptosis does not prevent replication of adenoviruses with deletion of E1b in majority of infected cancer cells[Ｊ]. Cancer Gene Ther, 2004. 11(9): 585-593.

[45]. Saito Y, Sunamura M, Motoi F, et al. Oncolytic replication-competent adenovirus suppresses tumor angiogenesis through preserved E1A region[Ｊ]. Cancer Gene Ther, 2006. 13(3): 242-252.

[46]. Bria E, Gralla RJ, Raftopoulos H, et al. Magnitude of benefit of adjuvant chemotherapy for non-small cell lung cancer: meta-analysis of randomized clinical trials. Lung Cancer. 2009; 63(1): 50-57.

[47]. Ishikawa H, Nakao K, Matsumoto K, et al. Antiangiogenic gene therapy for hepatocellular carcinoma using angiostatin gene[J]. Hepatology, 2004, 37: 696-704.

[48]. Bischoff JR, Kirn, DH, Williams A, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells [Ｊ]. Science, 1996. 274(5286):

55

373-376.

[49]. Chiocca EA. Oncolytic viruses[Ｊ]. Nat Rev Cancer, 2002. 2(12): 938-950.

[50]. Branton PE, Bayley ST, Graham FL. Transformation by human adenoviruses [Ｊ]. Biochim Biophys Acta, 1985. 780(1): 67-94.

[51]. Liu guo ling. Viral vectors and gene transfer method of arthritis deformans threw gene therapy on review[J]. Chin J Cell Mol hnmunol, 2007, 23(2): 187-189.

56

致 谢

在论文即将完成之际，我怀着最诚挚的心情向我的导师丁志ft教授表示由衷的感谢，导师渊博的专业知识，严谨的治学态度，精益求精的工作作风，诲人不倦的高尚师德，朴实无华、平易近人的人格魅力对我影响深远。本论文从选题到完成，几易其稿， 每一步都是在导师的指导下完成的，倾注了导师大量的心血。

论文的完成同时也离不开其他各位老师、同学和朋友的关心与帮助。在此我感谢我的同学同济大学徐彬博士在分子生物学实验中给于的帮助，感谢生科院蒋福升老师在细胞学实验过程中给于的帮助，感谢我同门的师兄妹们，在实验过程中给我以许多建议和帮助。回想整个论文的写作过程，虽有不易，却让我除却浮躁，经历了思考和启示，也更加深切地体会了法学的精髓和意义，因此倍感珍惜。

最后还要感谢我的家人，他们总是一如既往地支持我、鼓励我。中医药大学以其优良的学习风气、严谨的科研氛围教我求学，以其博大包容的情怀胸襟、浪漫充实的校园生活育我成人。值此毕业论文完成之际，我谨向所有关心、爱护、帮助我的人们表示最诚挚的感谢与最美好的祝愿。

师恩难报，友谊长存！

57

附 ：

**文献综述**

**大肠癌病毒基因治疗的方法与策略**

大肠癌发病率高，已跃居恶性肿瘤发病率第三。临床治疗以根治性手术为主，但术后肝转移的发生率高达30%～50%，另外20%～40%的患者在临床确诊时已有肝转移，成为结直肠癌患者死亡率高的主要因素[1-3]，因此迫切需要寻找新的有效的治疗方法[4-5]。大肠癌的发生与发展是一个多步骤，多基因参与的复杂过程，包括了原癌基因的活化以及抑癌基因的失活等许多相关基因的改变，它们导致了肿瘤的启动，促进，发展和转移等各个阶段的发生。随着对大肠癌的认识逐步加深及现代分子生物学技术的发展，基因治疗作为一种具有很强的针对性的全新治疗模式，正在逐步深入研究，现将目前的一些大肠癌基因治疗方面的进展简单综述如下。

1.大肠癌病毒基因治疗的常用方法

1.1增加表达抑癌基因

把肿瘤抑制基因通过一定途径导入靶细胞，替代失活的抑癌基因，从而恢复细胞的正常基因表型，抑或能通过表达来诱导肿瘤细胞凋亡，达到治疗肿瘤的目的。P53基因是大肠癌发生突变最广泛的基因[6-9]. P53基因具有诱导细胞凋亡的功能[10-12]，导入该基因可以促进细胞凋亡。我们可针对此理论将野生型P53引入到肿瘤细胞，替代因突变导致功能发生改变的抑癌基因。此策略的前提是肿瘤细胞中存在P53基因的缺陷，对无

P53基因突变的癌细胞则效果欠佳。IL-24是另一个热点研究的抑癌基因[13-16]. IL-24是一个新的肿瘤抑制基因，目前认为其具有诱导肿瘤细胞凋亡和促进机体免疫反应的双重作用[15]，目前研究发现腺病毒介导的IL-24异位表达可诱导多种人类肿瘤细胞的凋亡，如Lebedeva等[16]将IL-24转入黑色素瘤细胞并得以表达，结果肿瘤生长明显受抑制，且凋亡指数显著增高。对IL-24的研究目前已进入了临床实验阶段[17-18]。

1.2阻止癌基因表达

癌基因的突变在大肠癌的发生中起着重要作用。目前研究的较多的是K-ras基因

[19-22]。文献中目前主要采取的策略是通过抑制原癌基因的转录、翻译及干扰其转运等阻

止肿瘤的生长。有研究[23-25]用抗K-ras核糖酶搭载腺病毒载体，成功地抑制了异体移植

58

瘤的生长。

1.3引导入自杀基因

即向肿瘤细胞内导入一个基因表达片段，该基因编码的酶可将正常情况下无毒性的因子转化成为有细胞毒性的因子，从而造成肿瘤细胞的杀伤。胞苷脱氨酶基因/5-氟胞嘧啶( CD/5-FC系统)和单纯疱疹病毒胸腺嘧啶激酶/丙氧鸟苷系统(HSV-TK/GCV)是最常用的自杀基因。有文献表明[26-29]将上述两种自杀基因联合表达构成HSV-TK/CD双自杀基因体系，可增加药物对肿瘤细胞的抑制作用，增加对前药GCV及5-FC的敏感性，减少抗癌药物用量及耐药性。在带有HSV-TK/CD双自杀基因的重组质粒中用肿瘤特异性启动子如survivin启动子[30-32]，驱动自杀基因只在survivin表达的细胞中有效持续表达，在正常细胞中不表达，从而具有了特异靶向性。

1.4抑制肿瘤血管的长

抗肿瘤血管生成治疗是防止肿瘤转移的有效方法之一。同大多数肿瘤一样，大肠癌是血管依赖性肿瘤，肿瘤的生长需要血管提供能量。肿瘤血管往往缺乏平滑肌，基底膜上伴有不规则漏孔，这有助于肿瘤往远处转移。抗血管生成治疗一方面能减少肿瘤生长所需的养料[33-36]，同时又能阻断肿瘤的转移途径。目前该研究主要包括血管内皮生长因子VEGF与其受体(VEGFR)基因治疗[36-39]，血管抑素基因治疗及内皮抑素基因治疗。目前吉非替尼、厄罗替尼已应用十肺癌临床治疗。

1.5增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性

肿瘤化疗治疗中所面临的最大的问题是肿瘤细胞的耐药性，多耐药基因(MDR)转移造血干细胞能提高正常细胞对化疗药物的耐受，进而能提高化疗的剂量，从而相对提高了肿瘤的化疗敏感性。MDR基因可分为MDR3和MDR1两个高度同源的基因[40]，其中

MDR1能诱导产生耐药表型，但骨髓细胞中MDR1水平较低，对药物也较敏感，容易引起骨髓的抑制作用，若能把MDR1基因转移至骨髓造血干细胞，理论上可减少化疗抑制，从而提高正常造血细胞对化疗药物的耐受力，目前这种策略已在白血病和一些恶性肿瘤的基因治疗中应用于临床[41-44]。此外，还可以把耐药基因的RNAi的SiRNA或反义RNA转到肿瘤细胞中，抑制肿瘤细胞的耐药基因的强表达。通过降低耐药性，从而提高了肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。

2. 大肠癌病毒基因治疗策略

溶瘤病毒治疗大肠癌是一种新的可行的治疗方法[45]。AxE1Adb是E1B55KD片段缺

59

失的溶瘤病毒，文献报道该病毒能特异性在大肠癌细胞中复制并在鼠的体内观察到明显抗肿瘤效应[46]。目前已有溶瘤病毒应用于临床治疗大肠癌的研究，如ONYX-015及H101等已成功用于EUS引导局部注射来治疗晚期大肠癌的临床试验性研究。通过对22例局部进展期的大肠癌病人通过CT引导ONYX-015瘤内注射治疗的Ⅰ期临床试验中，ONYX-015显示了较好的安全性，未出现与病毒感染相关的显著的毒性反应，有6例患者出现了肿瘤轻度缩小(MR)的情况[47]。溶瘤腺病毒与其它治疗手段（如化疗）相结合[48]，可明显提高治疗疗效。Hecht等[16]对21例已无法行手术切除的晚期大肠癌病人进行EUS引导ONYX-015瘤内注射治疗的Ⅰ/Ⅱ期临床试验，结果显示当联合吉西他滨行全身化疗时其疗效优于单存的病毒治疗。文献报道在已完成的两项ONYX-015治疗大肠癌的临床试验中，分别有80％[48]和50％[49]的病人症状得到缓解，肿瘤出现坏死。ONYX-015 及

H101均是删除E1B55KD的溶瘤腺病毒，且均不携带有外源性抗癌基因，病毒内部也没有可插入外源基因的克隆位点。H101目前已用于体表的实体肿瘤、肺癌、头颈部及食管鳞癌等各期临床试验，初步结果显示了优良的抗肿瘤效应和安全性。以上溶瘤病毒在临床试验中显示了较好的治疗价值，而携带外源基因的溶瘤病毒疗效应该更佳。肿瘤的靶向基因-病毒治疗策略(targeting gene-virotherapy of cancer)是将基因治疗与病毒治疗各自的优势结合起来进行肿瘤治疗的新策略[18]。其基本的方法是：在肿瘤特异性增殖病毒载体中插入某个抗癌基因。在这个策略中所用的载体有别于其他载体， 它是一种溶瘤病毒。经改造的溶瘤病毒载体本身可特异性靶向肿瘤组织，由于载体本身就具有治疗作用，故能特异性的在肿瘤中复制并使所携带的目的基因也能特异性在肿瘤细胞内部增殖数十至数百倍。在癌症的靶向性基因-病毒治疗策略中，抗癌基因的运转载体明显优于以往基因治疗中常用的载体，故能克服传统的肿瘤基因治疗中靶向性差、转染的效率低、抗癌基因的表达量低、杀伤力低下等缺点。肿瘤的靶向基因-病毒治疗策略比单独的基因治疗或者病毒治疗效果都更好，最主要基于以下几个原因：（1）能特异性利用肿瘤细胞中突变基因而靶向性地感染肿瘤细胞，并能在肿瘤细胞内大量复制进一步裂解肿瘤细胞，肿瘤细胞裂解后释放出的子代病毒还可以继续不断地感染邻近的肿瘤细胞；（2）病毒本身在复制过程中能产生的某些具有细胞毒性作用的蛋白如E311.6KDa[50]；（3）病毒感染和裂解肿瘤细胞后能引起全身性的抗肿瘤免疫效应。

肿瘤是一种多环节、多因素、多阶段的复杂性疾病，在后基因组时代各种肿瘤的基因治疗都有各自的相应策略。在大肠癌中，约90%的病人存在p53基因突变， 这为靶向

60

基因-病毒治疗的实施提供了理论基础，在保留E1A蛋白的同时缺失E1B-55kD蛋白的手段可以构建携带抗癌基因的靶向性溶瘤腺病毒。我们有理由相信大肠癌的病毒基因治疗策略具有广阔的应用前景，但距离成为一种常规的治疗方法还需进行大量的研究和探索。

参考文献

[1]. Otchy D, Hyman NH, Simmang C, et al. Practice parameters for colon cancer[J]. Dis Colon Rectum, 2004, 47( 8): 1269- 1284.

[2]. Huang X, Lin T, Gu J, et a 1. Combined TRAIL and Bax gene therapy probnged survival in mice with ovarian cancer xenograft[J]. Gene Ther, 2002, 9: 1379-1386.

[3]. Zhang Y A, Nemunaitis J, Scanlon K J, et al. Anti-tumorigenic effect of a K-ras ribozyme against human lung cancer cell line heterotransplants in nude mice[J]. GeneNTher, 2000, 7: 2041-2050.

[4]. Smitt PS, Driesse M, Wolbers J, et al. Treatment of relapsed malignant glioma with anadenoviral vector containing the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir[J]. Mol Ther, 2003, 7(6): 851一858

[5]. Beger HG, Rau B, Gansauge F, et al. Treatment of Colorectal cancer: challenge of the facts[Ｊ]. World J Surg, 2003. 27(10): 1075-1084.

[6]. Wang JT, Peng DY, Chen M, et al. Gene delivery for lung cancer using nonviral gene vectors[Ｊ]. Pharmazie, 2007. 62(10): 723-726.

[7]. Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors[Ｊ]. Gene Ther, 2002. 9(24): 1647-1652.

[8]. Liu XY. Targeting gene-virotherapy of cancer and its prosperity [JJ]. Cell Res, 2006.16(11): 879-886.

[9]. Marnix Jansen, Philip C, De Witt Hamer, et a1. Current perspectives on antiangiogenesis strategies in the treatment of malignant gliomas [J]. Brain Research Reviews, 2004, 45: 143-163.

[10]. Trudel S, Trachtenberg J, Toi A, et al. A phase I trial of adenovector-mediated delivery of

61

Interleukin-2 (Ad. IL-2) in high-risk localized prostate cancer[J]. Cancer Gene Ther, 2003,10(10):755-763.

[11]. Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, et al. a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil inpatients with recurrent head and neck cancer[Ｊ]. Nat Med, 2000. 6(8): 879-885.

[12]. Kazhdan I, Long L, Montellano R, et al. Targeted gene therapy for breast cancer with truncated Bid[Ｊ]. Cancer Gene Ther, 2006. 13(2): 141-149.

[13]. Motoi F, Sunamura M, Ding L, et al. Effective gene therapy for Colorectal cancer by cytokines mediated by restricted replication-competent adenovirus[Ｊ]. Hum Gene Ther, 2000. 11(2): 223-235.

[14]. Mulvihill S, Warren R, Venook A, et al. Safety and feasibility of injection with an E1B-55 kDa gene-deleted, replication-selective adenovirus (ONYX-015) into primarycarcinomas of the pancreas: a phase I trial[Ｊ]. Gene Ther, 2001. 8(4): 308-315.

[15]. Watanabe I, Kasuya H, Nomura N, et al. Effects of tumor selective replication-competent herpes viruses in combination with gemcitabine on Colorectal cancer [Ｊ]. Cancer Chemother Pharmacol, 2008. 61(5): 875-882.

[16]. Bischoff JR, Kirn, DH, Williams A, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells[Ｊ]. Science, 1996. 274(5286): 373-376.

[17]. Chiocca EA. Oncolytic viruses[Ｊ]. Nat Rev Cancer, 2002. 2(12): 938-950.

[18]. Branton PE, Bayley ST, Graham FL. Transformation by human adenoviruses [Ｊ]. Biochim Biophys Acta, 1985. 780(1): 67-94.

[19]. Kurihara T, Brough DE, Kovesdi I, et al. Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen[Ｊ]. J Clin Invest, 2000. 106(6): 763-771.

[20]. Ramirez PJ, Vickers SM. Current status of gene therapy for Colorectal cancer[Ｊ]. Curr Surg, 2004. 61(1): 84-92.

[21]. Liu guo ling. Viral vectors and gene transfer method of arthritis deformans threw gene therapy on review[J]. Chin J Cell Mol hnmunol, 2007, 23(2): 187-189.

[22]. Ishikawa H, Nakao K, Matsumoto K, et al. Antiangiogenic gene therapy for hepatocellular

62

Carcinoma using angiostatin gene[J]. Hepatology, 2004,37: 696-704.

[23]. Mullen, Tanabe ICK. Viral oncolysis[J]. Oncologist, 2002, 7(2): 106-119.

[24]. Kim J, Kim PH, Yoo JY, et a1. Double E1B 191cDa- and E1B 551cDa-deleted oncolytic adenovirus in combination with radiotherapy elicits an enhanced anti-tumor effect. Gene Ther, 2009, 16(9): 1111-1121.

[25]. Yoshida K, Venkatesh L, Kuppuswamy M, et al. Adenovirus transforming 19-1cD T antigen has an enhancer-dependent traps-activation function and relieves enhancer repression mediated by viral and cellular genes. Genes Dev, 1987, I(7): 645-58.

[26]. Schmidt PM, Lehmann C, Matthes E, et al. Detection of activity of telomerase in tumor cells using fiber optical biosensors. Biosens Bioelectron. 2002; 17(11-12): 1081-1087.

[27]. Yazawa K, Fisher WE, Brunicardi FC. Current progress in suicide gene therapy for cancer. World J Surg. 2002; 26(7): 783-789.

[28]. Luo C, Mori I, Goshima F, et al. Replication-competent, oncolytic herpes simplex virus type 1 mutants induce a bystander effect following ganciclovir treatment. J Gene Med. 2007; 9(10): 875-883.

[29]. Bria E, Gralla RJ, Raftopoulos H, et al. Magnitude of benefit of adjuvant chemotherapy for non-small cell lung cancer: meta-analysis of randomized clinical trials. Lung Cancer. 2009; 63(1): 50-57.

[30]. Jiang H, Gomez-Manzano C, Lang FF, Alemany R, Fueyo J. Oncolytic adenovirus: preclinical and clinical studies in patients with human malignant gliomas. Curr Gene Ther. 2009; 9(5): 422-427.

[31]. Yu W, Fang H. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. Curr Cancer Drug Targets. 2007; 7(2): 141-148.

[32]. Bauzon M, Hermiston TW. Exploiting diversity: genetic approaches to creating highly potent and efficacious oncolytic viruses. Curr Opin Mol Ther. 2008; 10(4): 350-5.

[33]. V h -Koskela MJ, Heikkil JE, Hinkkanen AE. Oncolytic viruses in cancer therapy. Cancer Lett. 2007, 25(2): 178-216.

[34]. Jounaidi Y, Doloff JC, Waxman DJ. Conditionally replicating adenoviruses for cancer treatment. Curr Cancer Drug Targets. 2007, 7(3): 285-301.63

[35]. Tai CK, Kasahara N. Replication-competent retrovirus vectors for cancer gene therapy. Front Biosci. 2008, 13: 3083-3095.

[36]. Kasuya H, Takeda S, Nomoto S, et al. The potential of oncolytic virus therapy for pancreatic cancer[Ｊ]. Cancer Gene Ther, 2005. 12(9): 725-736.

[37]. Dwyer RM, Bergert ER, O'Connor MK, et al. Adenovirus-mediated and targeted expression of the sodium-iodide symporter permits in vivo radioiodide imaging andtherapy of pancreatic tumors[Ｊ]. Hum Gene Ther, 2006. 17(6): 661-668.

[38]. Kazhdan I, Long L, Montellano R, et al. Targeted gene therapy for breast cancer with truncated Bid[Ｊ]. Cancer Gene Ther, 2006. 13(2): 141-149.

[39]. Motoi F, Sunamura M, Ding L, et al. Effective gene therapy for pancreatic cancer by cytokines mediated by restricted replication-competent adenovirus[Ｊ]. Hum Gene Ther, 2000. 11(2): 223-235.

[40]. Mulvihill S, Warren R, Venook A, et al. Safety and feasibility of injection with an E1B-55 kDa gene-deleted, replication-selective adenovirus (ONYX-015) into primarycarcinomas of the pancreas: a phase I trial[Ｊ]. Gene Ther, 2001. 8(4): 308-315.

[41]. Watanabe I, Kasuya H, Nomura N, et al. Effects of tumor selective replication-competent herpes viruses in combination with gemcitabine on pancreatic cancer [Ｊ]. Cancer Chemother Pharmacol, 2008. 61(5): 875-882.

[42]. Hecht JR, Bedford R, Abbruzzese JL, et al. A phase I/II trial of intratumoral endoscopicultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma[Ｊ]. Clin Cancer Res, 2003. 9(2): 555-561.

[43]. Li Y, Idamakanti N, Arroyo T, et al. Dual promoter-controlled oncolytic adenovirus CG5757 has strong tumor selectivity and significant antitumor efficacy in preclinicalmodels[Ｊ]. Clin Cancer Res, 2005. 11(24 Pt 1): 8845-8855.

[44]. Zhao L, Gu J, Dong A, et al. Potent antitumor activity of oncolytic adenovirus expressing mda-7/IL-24 for colorectal cancer[Ｊ]. Hum Gene Ther, 2005. 16(7): 845-858.

[45]. Zhao L, Dong A, Gu J, et al. The antitumor activity of TRAIL and IL-24 with replicating oncolytic adenovirus in colorectal cancer [Ｊ]. Cancer Gene Ther, 2006. 13(11): 1011-1022.64

[46]. Zhang Y, Gu J, Zhao L, et al. Complete elimination of colorectal tumor xenograft by combined manganese superoxide dismutase with tumor necrosis factor-relatedapoptosis-inducing ligand gene virotherapy[Ｊ]. Cancer Res, 2006. 66(8): 4291-4298.

[47]. McCormick F. Future prospects for oncolytic therapy [Ｊ]. Oncogene, 2005. 24(52): 7817-7819.

[48]. Sakamoto H, Kitano M, Dote K, et al., In situ carcinoma of pancreas diagnosed by EUS-FNA[Ｊ]. Endoscopy, 2008.

[49]. Himeno Y, Etoh T, Matsumoto T, et al. Efficacy of oncolytic reovirus against liver metastasis from pancreatic cancer in immunocompetent models[Ｊ]. Int J Oncol, 2005. 27(4): 901-906.

[50]. Tseng JC, Levin B. Systemic tumor targeting and killing by Sindbis viral vector[s Biotechnol, 2004. 22(1): 70-77. Ｊ]. Nat

65