

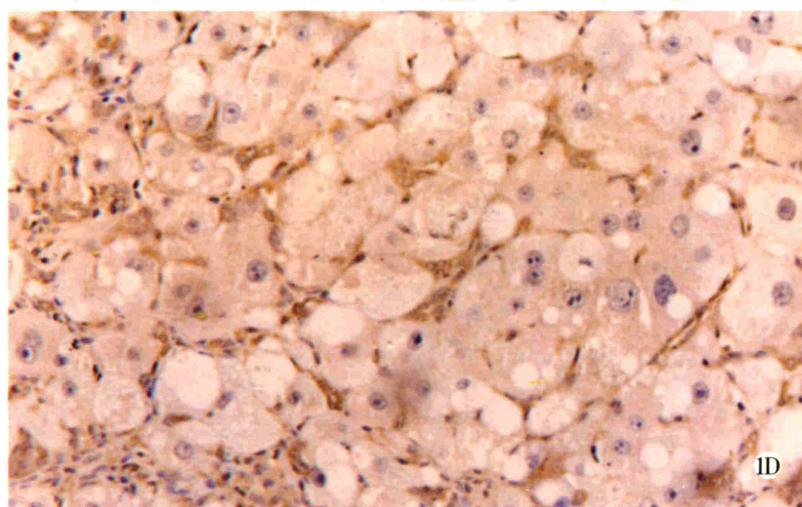
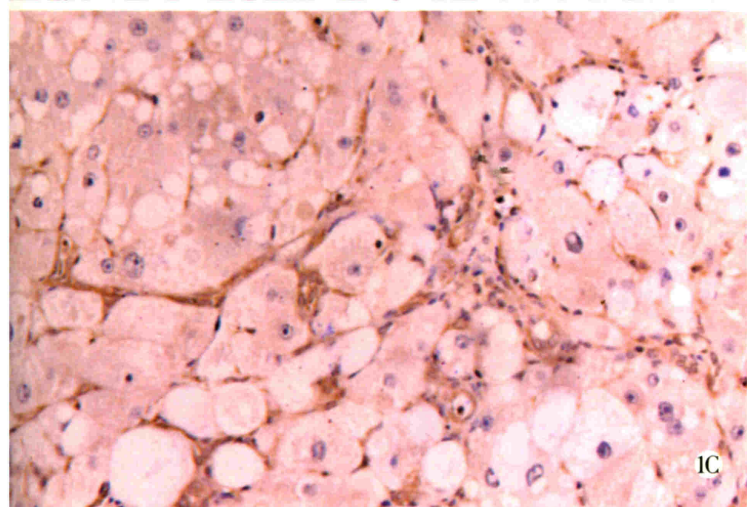
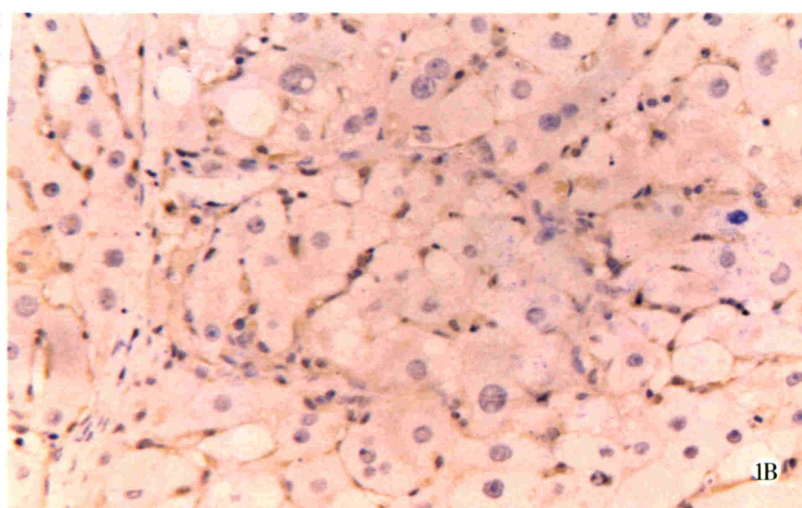
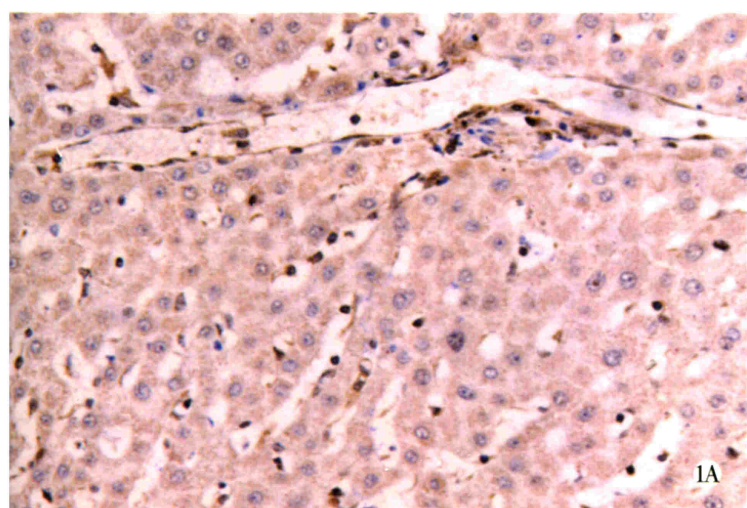
# 世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 6 月 15 日 第 11 卷 第 6 期

(Volume 11 Number 6)



**6/2003**

ISSN 1009-3079



名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports® Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 1.445. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.



# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

## ● 目 次 ●

2003 年 6 月 15 日 第 11 卷 第 6 期 (总第 110 期)

### 述 评

689 肝脏胶原蛋白检测进展与评析 刘成海

### 病毒性肝炎

693 甲型肝炎减毒活疫苗(LA-1 株)大规模免疫长期效果观察 龚健,李荣成,徐志一,江世平,罗东,杨进业,李艳萍,陈修荣,黄贵彪,凌文武,韦光武,汪莹怡

697 HCV-Fc 融合基因疫苗真核表达载体的构建及表达 冯志华,王全楚,周永兴,郝春秋,聂青和

701 胸腺肽  $\alpha 1$  对慢性乙型肝炎患者免疫系统的影响 段国荣,聂青和,周永兴,王全楚,田长印,刘拉羊,薛红安

705 蛋白激酶 C 对肾小球前小动脉平滑肌细胞 I 型  $IP_3$  受体表达影响 王静艳,刘沛,韩峰

### 肝 癌

708 抗肝癌单链免疫毒素基因修饰的 PBMCs 在动物体内的抑瘤作用 程虹,刘彦仿,张惠中,沈万安,张菊,张静

712 经皮穿刺氩氦刀冷冻治疗肝癌 31 例 钱国军,陈汉,吴孟超

716 大鼠肝细胞癌形成过程中 MMP-2mRNA 的表达及应用 BB-94 的影响 张志,方石岗,高毅,蒋泽生,孙尔维

### 基 础 研 究

719 西安酒精性肝病流行病学 鲁晓岚,陶明,罗金燕,耿燕,赵平,赵红莉

723 蛋白激酶 C 在肝细胞缺氧预处理中的作用 单毓强,高毅,王瑜,潘明新

726 肝硬化不同病期 ET-1, NO 对离体肝脏血流动力学的调节作用 姚冬梅,姚希贤,杨川杰,冯志杰,房红梅,高军萍

730 大鼠肝纤维化中细胞外信号调节激酶的作用 梁增文,张国,王天才

733 环氧合酶-2 反义核酸对人胆管癌细胞增生的影响 吴高松,武小勇,邹声泉,裘法祖

737 ONO-3403 对胆囊收缩素刺激的大鼠胰腺外分泌的影响 陈少夫,刘维新,山本光胜,大槻真

741 内皮抑素-可溶性血管内皮细胞生长抑制因子融合基因重组腺病毒的包装与鉴定 李喆,潘欣,潘卫,曹贵松,闻兆章,方国恩,戚中田,毕建威,华积德

745 激活素 A 对肝星状细胞细胞外基质合成的影响 刘清华,李定国,黄新,尤汉宁,潘勤,徐雷鸣,徐芹芳,陆汉明

749 脾静脉结扎诱导继发性脾功能亢进犬动物模型的评价 刘全达,马宽生,何振平,丁钧,董家鸿

753 IL-6 与整合素家族细胞黏附分子在大鼠急性坏死性胰腺炎合并多器官损伤模型中的表达 孙威,张俊东,赵滢,赵宇,王强

### 临 床 研 究

756 老年消化道多原发癌的早期诊断及综合治疗 蔡昌豪,吴本伊,吴道宏,邵勇,王孟薇

### 焦 点 论 坛

760 进一步深化慢性乙型肝炎诊断治疗的实用性研究 李梦东,聂青和

762 慢性乙型肝炎临床分度、诊断的一些问题 周永兴

766 慢性乙型肝炎的鉴别诊断及常见并发症 聂青和

768 特殊人群乙型肝炎的临床特点及处理 罗新栋,聂青和

772 病理学检测在慢性乙型肝炎诊断治疗中的价值 郎振为

775 经皮肝脏活体穿刺活检技巧及研究进展 滕光菊,聂青和

776 乙型肝炎的实验检查及其临床意义 郝春秋,聂青和

780 慢性乙型肝炎的抗病毒治疗 程明亮,吴亚云

783 慢性乙型肝炎的免疫治疗 施光峰

785 慢性乙型肝炎的中医药治疗 申德林,王全楚,焦栓林

787 乙型肝炎病毒携带者的诊断与治疗 江家骥,朱琪

789 慢性乙型肝炎肝纤维化的诊断与治疗 蔡卫民,张彬彬

791 乙型肝炎病毒慢性感染和肝癌发生 苏勤

795 治疗性疫苗-慢性乙型肝炎患者的希望 王全楚,聂青和

### 文 献 综 述

799 抗乙型肝炎病毒肝靶向药物制剂的研究进展 王九平,白雪帆

803 腺病毒载体的特点及其在 HCV 研究中的应用 郝春秋,冯志华,聂青和

806 HCVC 区 DNA 疫苗的研究现状 孙利,周永兴

810 病毒性肝炎基因治疗的研究和面临的挑战 贾战生,冯志华,周永兴



文献综述	815 抗 HCV 树突状细胞疫苗的制备及功能研究 王全楚,冯志华,周永兴 819 疫苗新概念及新型疫苗的研制 冯志华,王全楚 823 特殊状态下的逆行胰胆管造影检查术 智发朝 824 胃肠道出血的内镜诊治 陈村龙,宋于刚,周殿元 827 介入内镜学在胆胰疾病中的应用 刘思德 829 老年期消化性溃疡与恶性肿瘤溃疡、应激性溃疡的鉴别 吴保平,肖冰 831 老年人消化道急症 黄纯炽
研究快报	834 肠癌细胞 BAI1 基因表达的检测及其抗肿瘤作用 王志华,康熙雄,张智清,申宝忠,李莹 836 三氧化二砷对鸡胚移植胆管癌生长的抑制作用 喻智勇,王曙光,郑秀海,李昆 838 小鼠实验性肝损伤中 NO 的动态检测及意义 陈会松,柳利明,黄华,杨晋辉
临床经验	841 结肠黑变病 25 例 孙军,李岩 842 保留胰腺的脾动脉干及脾切除术在胃癌根治术中的意义 陈志新,胡建昆,张波,陈佳平,周总光 844 萎缩性胃炎临床证型分类研究 朱方石,姒健敏,王良静 846 叶酸对胃癌前细胞凋亡的影响 曹大中,刘顺英,赵建学 848 短肠综合征的远期并发症 4 例 周伟,江志伟,姜军,朱维铭,张佃良,李宁,黎介寿 851 幽门螺杆菌感染与慢性肝病的临床关系 焦建中,聂青和,赵春林,吴永胜,文绍先,吴群 853 内支架术与腔内近距离放射治疗联合应用治疗晚期食管癌 8 例 申宝忠,于友涛 855 组织黏合剂 Histoacryl 治疗胃静脉曲张活动性出血的疗效 曾黎明,陈村龙,智发朝 856 肝病患者血清肿瘤坏死因子 $\alpha$ 水平变化 徐学刚,张美稀,董惠芳,杨协珍,金树根,陈建杰,王灵台 859 尼美舒利引起肝脏损害 14 例 关英,徐峰,胡莲,周甘平 861 脾脏体积、脾静脉血流及血细胞计数在门静脉高压症分期中的意义 王秀艳,游晓功,施宝民,穆庆岭,吴泰璜 863 大连地区糖尿病患者与健康成年人肠内菌群的比较 孙艳,刘波,赵静玫,王海岩,徐和利,李雪松 865 影像学检查对肝门部胆管癌进展范围评价的临床价值 张国梁,韦斌,朱春兰,任旭 867 分离培养在 Hp 感染诊断中的重要地位 史济经,闵海阳,王青,杨慧芳,王洪涛,张振华 870 HBV 感染者 HBV DNA 与抗原抗体标志物的关系 陈雪娟,李刚,刘淑芳,陈文思,李桂侠 871 乙型肝炎肝组织中细胞间黏附分子-1 及 Fas 的表达及意义 张闯峰,郑瑞丹,孟家榕,郭以河,林福地 873 轮状病毒全身感染对肝胆胰的影响 姚英氏,李宁,欧巧群 877 良性肝病患者血清 AFP 升高的临床意义 程天霞 875 胆源性胰腺炎手术治疗 58 例 黄建勇,马清涌,马建新 879 经皮肝穿刺胆道引流治疗外伤后胆瘘 汪邵平,霍枫,张玉新,裴世强
病例报告	840 以肠梗阻为首表现的原发性小肠肿瘤 4 例 赵永玲,魏芳
编委来信	707 711 江学良
投稿细则	附 1-4 世界华人消化杂志投稿细则
封面故事	730 大鼠肝纤维化中细胞外信号调节激酶的作用 梁增文,张国,王天才

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名  
陈可冀 题写版权刊名

创 刊 1993-01-15  
改 刊 1998-01-25  
出 版 2003-06-15  
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀  
黄象谦  
黄志强  
黎介寿  
刘耕陶  
裘法祖  
汤钊猷  
王宝恩  
危北海  
吴孟超  
吴咸中

张金哲  
张学庸  
赵东海  
周殿元  
社长总编辑 马连生  
中文编辑 潘伯荣  
王瑾晖  
英文编辑 张建中  
排 版 李少华  
校 对 李天华

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会  
030001, 山西省太原市双塔西街 77 号  
E-mail:wcjd@wjgnet.com  
出版 世界胃肠病学杂志社  
100023, 北京市 2345 信箱  
E-mail: wcjd @ wjgnet.com  
http://www.wjgnet.com  
电话 (010)85381892  
传真 (010)85381893  
印刷 北京科信印刷厂  
发行 国内 北京报刊发行局  
国外 中国国际图书贸易总公司  
(100044, 北京 399 信箱)  
订购 全国各地邮电局  
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部  
(100023, 北京市 2345 信箱)  
电话:(010)85381892  
传真:(010)85381893  
2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

## 本刊已被国内外 检索系统收录

美国《化学文摘(CA)》  
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》  
俄罗斯《文摘杂志(PJ)》  
中国科技论文统计与分析  
中国学术期刊文摘  
中国中医药信息服务网  
中国生物医学文献光盘数据库  
《中文科技资料目录(医药卫生)》  
中国生物医学期刊目录数据库  
中国医学文摘外科学分册(英文版)  
中国医学文摘内科学分册(英文版)

## 特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点,除非特别声明.本刊如有印装质量问题,请向本刊编辑部调换.

ISSN 1009-3079  
CN 14-1260/R

邮发代号  
82-262

国外代号  
M 4481

国内定价  
每期 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营许可证  
1401004000050

# 内皮抑素 - 可溶性血管内皮细胞生长抑制因子融合基因重组腺病毒的包装与鉴定

李 喆, 潘 欣, 潘 卫, 曹贵松, 闻兆章, 方国恩, 戚中田, 毕建威, 华积德

李喆, 曹贵松, 闻兆章, 方国恩, 毕建威, 华积德, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院普通外科 上海市 200433  
潘欣, 潘卫, 戚中田, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室 上海市 200433  
李喆, 男, 1974-07-29 生, 天津市人, 汉族. 1998 年第二军医大学军医系本科毕业, 2000 年第二军医大学博士生.  
国家自然科学基金资助项目, No.30171055  
项目负责人: 潘欣, 200433, 上海市翔殷路 800 号, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室. panxinx@yahoo.com  
电话: 021-25070314 传真: 021-25070312  
收稿日期: 2002-09-13 接受日期: 2002-10-03

## Packaging and identification of recombinant adenovirus carrying endostatin-soluble vascular endothelial growth inhibitor gene

Zhe Li, Xin Pan, Wei Pan, Gui-Song Cao, Zhao-Zhang Wen, Guo-En Fang, Zhong-Tian Qi, Jian-Wei Bi, Ji-De Hua

Zhe Li, Gui-Song Cao, Zhao-Zhang Wen, Guo-En Fang, Jian-Wei Bi, Ji-De Hua, Department of Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China  
Xin Pan, Wei Pan, Zhong-Tian Qi, Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30171055.  
Correspondence to: Dr. Xin Pan, Department of Microbiology, Second Military Medical University, 800 Xiangyin Road, Shanghai 200433, China. panxinx@yahoo.com  
Received: 2002-09-13 Accepted: 2002-10-03

## Abstract

AIM: To acquire recombinant adenovirus carrying endostatin-soluble vascular endothelial growth inhibitor gene.

METHODS: IL-3 signal sequence and human endostatin gene (hENDO) and gene of an elastin peptide motif (Val-Pro-Gly-Val-Gly) were amplified with PCR and then ligated with soluble vascular endothelial growth inhibitor gene (sVEGI). The fusion gene was cloned into adenovirus vector pCA13. The recombinant adenovirus were packaged by means of lipofectamine-mediated gene transfer procedure and identified by PCR.

RESULTS: The fusion gene, about 1 114 bp, which included IL-3 signal sequence, entire human endostatin gene, elastin peptide linker gene and soluble vascular endothelial growth inhibitor gene, was successfully cloned into the adenovirus vector pCA13 downstream from the CMV promoter. The map of restriction enzyme digestion and nucleotide sequence determination showed that the fusion gene sequence was the same as reported sequence, and in one ORF. The recombinant adenovirus could be packaged and the titer

of the rough recombinant adenovirus was about  $2 \times 10^{11}$  TCID<sub>50</sub>/L.

CONCLUSION: The recombinant adenovirus containing fusion gene of hENDO-sVEGI can express the fusion protein in mammalian cells and secrete to extracellular matrix from cells. The success of packaging and identification this recombinant adenovirus lays the foundation for studying tumor gene therapy by the fusion gene.

Li Z, Pan X, Pan W, Cao GS, Wen ZZ, Fang GE, Qi ZT, Bi JW, Hua JD. Packaging and identification of recombinant adenovirus carrying endostatin-soluble vascular endothelial growth inhibitor gene. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(6):741-744

## 摘要

目的: 构建内皮抑素 - 可溶性血管内皮细胞生长抑制因子融合基因重组腺病毒载体并包装成重组腺病毒, 为下一步基因治疗打下基础.

方法: 用 PCR 方法在 hENDO 基因的 5' 端引入 IL<sub>3</sub> 信号肽、3' 端引入弹性蛋白连接肽序列(linker), 再与 sVEGI 基因连接, 插入到 pCA13 腺病毒载体中. 用脂质体介导包装出重组腺病毒, PCR 法对重组腺病毒进行鉴定.

结果: 构建完成 hENDO-sVEGI 融合基因重组腺病毒载体, 融合基因包括 IL<sub>3</sub> 信号肽、hENDO 全长基因、弹性蛋白连接肽序列和 sVEGI 基因, 总长度约 1 114 bp, 经酶切鉴定、序列分析证实克隆序列、插入方向和读码框架均正确. 可包装出携带融合基因的重组腺病毒, 用 TCID<sub>50</sub> 法测定粗制重组腺病毒滴度为  $2 \times 10^{11}$  TCID<sub>50</sub>/L.

结论: 成功构建了 hENDO-sVEGI 融合基因, 连接肽序列使两蛋白空间构象不受影响, IL<sub>3</sub> 信号肽保证蛋白可被分泌至胞外. 完成携带融合基因的重组腺病毒的包装与鉴定, 为进一步开展肿瘤基因治疗研究奠定了基础.

李喆, 潘欣, 潘卫, 曹贵松, 闻兆章, 方国恩, 戚中田, 毕建威, 华积德. 内皮抑素 - 可溶性血管内皮细胞生长抑制因子融合基因重组腺病毒的包装与鉴定. 世界华人消化杂志 2003;11(6):741-744

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/741.asp>

## 0 引言

目前肿瘤的抗血管生成疗法已成为国内外研究的焦点<sup>[1-5]</sup>. 有 24 种血管生成抑制剂正在进行着不同阶段的临床验证. 由于肿瘤血管生成是一个多步骤的复杂调控过程,

不同阶段有不同调控因素发挥主导作用,因而单一针对某一治疗环节的药物疗效有限.不同机制的血管生成抑制剂有协同治疗作用,如IFN  $\alpha$ 和TNP470<sup>[6]</sup>.联合应用鼠内皮抑素(mEndostatin)和血管抑素(mAngiosatin)能彻底根除小鼠体内的移植瘤<sup>[7]</sup>,mEndostatin和mAngiosatin联合基因和融合基因治疗都在动物实验中取得了很好的治疗效果<sup>[8,9]</sup>.我们将两种血管生成抑制剂基因进行融合,表达出具有两种药物活性的融合蛋白,从不同环节阻断肿瘤血管生成,达到事半功倍的效果.我们构建了携带hENDO-sVEGI融合基因的重组腺病毒载体,以期为肿瘤的抗血管生成基因治疗提供实验基础.

## 1 材料和方法

1.1 材料 pCA13、pJM17质粒、293细胞由第二军医大学微生物教研室保存并提供;内皮抑素和可溶性血管内皮细胞生长抑制因子基因的克隆及鉴定由微生物教研室完成;PCR产物克隆载体pMD-18-T为大连TaKaRa公司产品;大肠杆菌DH5  $\alpha$ 为微生物教研室保存.Taq DNA多聚酶、各种限制性内切酶、T<sub>4</sub>DNA连接酶、 $\lambda$  DNA/EcoR I +Hind III marker均购于华美生物工程公司;DMEM, lipofectAMINETM为Gibco产品;PCR引物由上海生工公司合成:引物1为5'-GCAAGCTTGCCACCATGAGCCGCTGCCGCTCTGCTCCTGCTCAACTCCTGGTCCGCCCGGACTCCAACACAGCCACCGCGAC-3';引物2为5'-CACCGAATTTCGTACTCTCTGCTGCTTGGAGGCAGTCATGAAG-3';引物3为5'-ACGAATTCGGTGCCAGTTGTGAGAC-3';引物4为5'-GCGGATCCCTATAGTAAGAAGGCTCC-3'.

1.2 方法 用PCR方法,以hENDO基因为模板用引物1和引物2扩增IL<sub>3</sub>/hENDO-linker片段,在5'端引入Hind III酶切位点和IL<sub>3</sub>信号肽序列,3'端引入弹性蛋白连接肽序列和EcoR I酶切位点;以sVEGI基因为模板用引物3'和引物4扩增sVEGI片段,在5'端引入EcoR I酶切位点,3'端引BamH I酶切位点.PCR反应进程为:94℃变性5 min;94℃45 s,50℃45 s,72℃120 s,共循环30次;最后,72℃延伸10 min.产物经纯化后,分别克隆到pMD-18-T载体,送上海生工公司用M13引物进行DNA自动测序.腺病毒载体pCA13用Hind III和BamH I双酶切线性化,用Hind III/EcoR I将IL<sub>3</sub>/hENDO-linker片段从携带目的基因的pMD18-T载体上游离下来,用EcoR I/BamH I将sVEGI片段从携带目的基因的pMD18-T载体上游离下来,在T<sub>4</sub>DNA连接酶作用下,将线性化的pCA13与Hind III-EcoR I IL<sub>3</sub>/hENDO-linker片段和EcoR I-BamH I sVEGI片段进行连接,转化DH5  $\alpha$ 钙化菌,分别挑取克隆进行质粒的小量制备;以Hind III+BamH I, Hind III+EcoR I, EcoR I+BamH I酶切鉴定

阳性克隆,分别以载体上的Bgl II或Sac I位点酶切鉴定融合基因被正确克隆在CMV启动子的下游以确认读框正确.将质粒pJM17与重组腺病毒载体以1:5比例混合,用lipofectAMINE共转染24孔板中(用板中间的孔)的293细胞.约4 d,可见细胞病变(CPE)出现.收集细胞及上清,-70-37℃反复冻融3次,用上清液(含Ad)50  $\mu$ L加完全培养液200  $\mu$ L感染293细胞,约2 d(48 h)收集呈CPE表现的细胞及上清,制备Ad粗提液(混合克隆),同法大量扩增病毒,-70℃保存.包装好的腺病毒命名为:AdCA13-hENDO-sVEGI.收集293细胞,计数,调整细胞浓度为10<sup>8</sup>/L,接种96孔板每孔细胞悬液100  $\mu$ L.第2天当细胞铺满时,吸去上清,加入各稀释度的粗制重组腺病毒.混合收集到的Ad粗提液10 mL,-70-37℃反复冻融3次,4 000 r/min 10 min,用完全培养液将病毒作连续10倍稀释,从10<sup>-1</sup>-10<sup>-10</sup>作为滴定的稀释度.用最后8个稀释液加入96孔板,每孔加0.1 mL,每个稀释度10孔;纵行#11和12用做阴性对照,每孔加0.1 mL完全培养液,5%CO<sub>2</sub>孵箱培养10d,倒置显微镜读板,确定每行阳性孔的比率.按Karber's的统计方法计算病毒滴度.

## 2 结果

2.1 融合基因腺病毒载体的构建和酶切鉴定 扩增的IL<sub>3</sub>/hENDO-linker片段约为647 bp,sVEGI片段为476 bp(图1).将PCR扩增的目的基因分别直接亚克隆于pMD18-T载体上,然后将目的基因取下,与经相应酶切的pCA13载体连接构建携带融合基因的腺病毒载体(图2).以Hind III+BamH I,Hind III+EcoR I,EcoR I+BamH I酶切pCA13-hENDO-sVEGI分别得到1 114 bp hENDO-sVEGI片段,647 bp IL<sub>3</sub>/hENDO-linker片段和467 bp的sVEGI片段,证明融合基因被正确克隆到pCA13载体(图3).Bgl II、Sac I位点酶切鉴定融合基因被正确克隆在CMV启动子的下游以确认读框正确(图4).

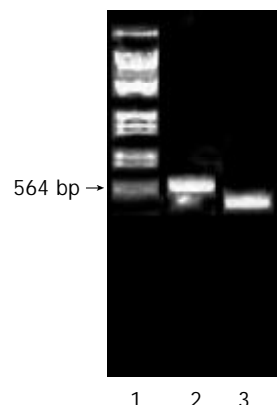


图1 IL<sub>3</sub>/hENDO-linker和sVEGI基因PCR扩增电泳图.  
1: $\lambda$  DNA/EcoR I +Hind III marker(21227 bp, 5 148 bp, 4 269 bp, 3 530 bp, 2 027 bp, 1 904 bp, 1 587 bp, 1 375 bp, 941 bp, 831 bp, 564 bp);  
2:647 bp的IL<sub>3</sub>/hENDO-linker片段; 3: 476 bp的VEGI片段.

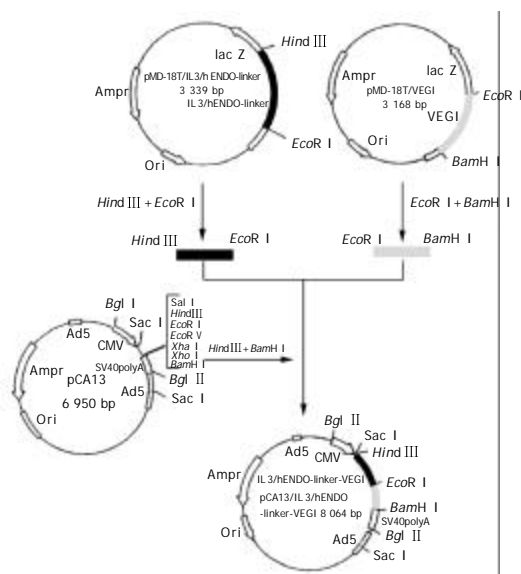
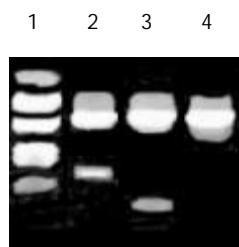
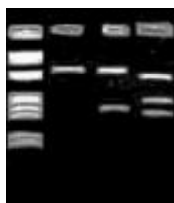


图2 pCA13 -hENDO-sVEGI 质粒的构建流程示意图.



1:  $\lambda$  DNA/ EcoR I +Hind III marker(21 227 bp,5 148 bp,4 269 bp,3 530 bp,2 027 bp,1 904 bp,1 587 bp,1 375 bp,941 bp,831 bp,564 bp)  
 2: Digesting with Hind III and BamH I (1 114 bp,6.95 kb)  
 3: Digesting with Bgl II (1 707 bp,6.3 kb)  
 4: Digesting with EcoR I and BamH I (476 bp, 7.69 kb).  
 图3 pCA13 -hENDO-sVEGI 质粒的目的基因酶切鉴定

1 2 3 4



1:  $\lambda$  DNA/ EcoR I +Hind III marker (21 227 bp,5 148 bp, 4 269 bp,3 530 bp,2 027 bp,1 904 bp,1 587 bp,1 375 bp,941 bp,831 bp,564 bp)  
 2: Digesting with Hind III and BamH I (1 114 bp,6.95 kb)  
 3: Digesting with Bgl II (1 707 bp,6.3 kb)  
 4: Digesting with Sac I (1 535 bp,2.0 kb,4.5 kb).  
 图4 pCA13 -hENDO-sVEGI 质粒目的基因插入部位的酶切鉴定

1 2 3 4

2.2 携带融合基因的重组腺病毒 质粒 pCA13-hENDO-sVEGI 与 pJM17 用 lipofectAMINETM 共转染 293 细胞进行同源重组, 约 4 d 可见 CPE 出现. 收集细胞及上清, -70-37 °C 反复冻融 3 次, 4 000 r/min, 4 °C 10 min, 用引物 3 和引物 4 对病毒裂解液行 PCR, 扩增出 sVEGI 片段, 说明重组腺病毒包装成功. 用上清液(含 Ad)50  $\mu$ L 加完全培养液 200  $\mu$ L 接种 293 细胞, 48-72 h 收集呈 CPE 表现的细胞, 制备 Ad 粗提液(混合克隆). 同法大量扩增病毒, 制备 Ad hENDO-sVEGI 粗提液, 并进行效价滴定, 病毒滴度为  $2 \times 10^{11}$  TCID<sub>50</sub>/L.

### 3 讨论

抗血管生成疗法作为一种新兴疗法, 还存在不少缺点有待改进. 内源性血管生成抑制剂的基因治疗被认为是最有前途的治疗策略<sup>[10-19]</sup>. 我们选择两个强效的内源性血管生成抑制基因, 将其融合并成功构建携带融合基因的重组腺病毒载体, 期望融合蛋白分子能发挥两种分子的活性, 既对血管生成产生协同抑制作用, 又通过 sVEGI 的直接细胞毒、诱导凋亡、免疫调节作用杀伤肿瘤细胞, 产生最理想的协同抑瘤效应.

内皮抑素是迄今所发现的最有效的血管生成抑制剂之一, 没有耐药性, 不需进一步给药就能延长肿瘤的休眠期<sup>[7]</sup>, 未见毒副作用<sup>[20,21]</sup>, 在美国已进入了 II 期临床试验. 内皮抑素基因是一个很好的治疗基因<sup>[22-31]</sup>. VEGI 是从人脐静脉内皮细胞 cDNA 文库中筛选得到的一个 TNF 家族的新成员<sup>[32]</sup>. VEGI 属于 II 型跨膜蛋白, 基因定位于人染色体 9q32, 在部分内皮细胞中大量表达, 其氨基酸序列与肿瘤坏死因子(TNF)家族成员有 20-30 % 的同源性. 其可溶性的胞外分子(sVEGI)能特异性显著抑制牛肺动脉内皮细胞(BPAEC)和人脐静脉内皮细胞(HUVEC)增生<sup>[33]</sup>, 体外血管生成模型中显著抑制牛主动脉内皮细胞在胶原纤维中形成管样结构<sup>[33]</sup>, 体内鸡胚尿囊膜新生血管实验中可剂量依赖性抑制 FGF 或 VEGF 诱导的毛细血管生成. 基因转移可溶性分子可降低鼠源性 MC-38 结肠癌细胞的成瘤性, 抑制肿瘤生长; 组织学检测发现肿瘤中的微血管密度明显降低, 内皮细胞增生受抑显著, 凋亡数量增加<sup>[34]</sup>. Zhai et al<sup>[35]</sup>将表达可溶性 VEGI 的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞与人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 混合注射裸鼠体内, 发现异种移植的肿瘤生长明显受到抑制. 以上结果说明分泌到肿瘤局部的 VEGI 通过抑制新生血管生成抑制肿瘤生长. 除抑制内皮细胞增生外, Harids et al<sup>[36]</sup>发现 sVEGI 对乳腺癌细胞 MCF-7、Hela 细胞、髓样细胞 U-937 和 ML-1a 四种肿瘤细胞均有抑制作用, 加入合成抑制剂环己酮亚胺时, 细胞毒作用更加明显, 因此推测是通过抑制蛋白合成而发挥作用的.

内皮抑素与 VEGI 这两种血管生成抑制因子的作用机制目前尚不明确, 但并不妨碍对其进行研究利用. 我们参照 Invivogen 基因公司的作法, 两基因之间采用缬氨酸-脯氨酸-甘氨酸-缬氨酸-甘氨酸(Val-Pro-Gly-Val-Gly)五个氨基酸的弹性蛋白酶连接肽, 保证翻译后两蛋白空间构象不受影响, IL3 信号肽保证蛋白可被分泌至胞外.

### 4 参考文献

- 1 Saphir A. Angiogenesis: the unifying concept in cancer? *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1658-1659
- 2 Oehler MK, Bicknell R. The promise of anti-angiogenic cancer therapy. *Br J Cancer* 2000;82:749-752
- 3 Tomanek RJ, Schattman GC. Angiogenesis: new insights and therapeutic potential. *Anat Rec* 2000;261:126-135
- 4 Thompson WD, Li WW, Maragoudakis M. The clinical manipulation of angiogenesis: pathology, side-effects, surprises,



- and opportunities with novel human therapies. *J Pathol* 2000; 190:330-337
- 5 Vacca A, Ribatti D, Pellegrino A, Dammacco F. Angiogenesis and anti-angiogenesis in human neoplasms. Recent developments and the therapeutic prospects. *Ann Ital Med Int* 2000;15:7-19
  - 6 Parangi S, O'Reilly M, Christofori G, Holmgren L, Grosfeld J, Folkman J, Hanahan D. Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de-novo tumor-growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2002-2007
  - 7 Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Anti-angiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997;390:404-407
  - 8 Scappaticci FA, Smith R, Pathak A, Schloss D, Lum B, Cao Y, Johnson F, Engleman EG, Nolan GP. Combination angiostatin and endostatin gene transfer induces synergistic antiangiogenic activity in vitro and antitumor efficacy in leukemia and solid tumors in mice. *Mol Ther* 2001;3:186-196
  - 9 Scappaticci FA, Contreras A, Smith R, Bonhoure L, Lum B, Cao Y, Engleman EG, Nolan GP. Statin-AE: a novel angiostatin-endostatin fusion protein with enhanced antiangiogenic and antitumor activity. *Angiogenesis* 2001;4:263-268
  - 10 Folkman J. Antiangiogenic gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9064-9066
  - 11 Tanaka T, Cao Y, Folkman J, Fine HA. Viral vector-targeted antiangiogenic gene therapy utilizing an angiostatin complementary DNA. *Cancer Res* 1998;58:3362-3369
  - 12 Cao Y, O'Reilly MS, Marshall B, Flynn E, Ji RW, Folkman J. Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. *J Clin Invest* 1998;101:1055-1063
  - 13 Nguyen JT, Wu P, Clouse ME, Hlatky L, Terwilliger EF. Adeno-associated virus-mediated delivery of antiangiogenic factors as an antitumor strategy. *Cancer Res* 1998;58:5673-5677
  - 14 Machein MR, Risau W, Plate KH. Antiangiogenic gene therapy in a rat glioma model using a dominant-negative vascular endothelial growth factor receptor2. *Hum Gene Ther* 1999;10:1117-1128
  - 15 Indraccolo S, Minuzzo S, Gola E, Habeler W, Carrozzino F, Noonan D, Albini A, Santi L, Amadori A, Chieco-Bianchi L. Generation of expression plasmids for angiostatin, endostatin and TIMP-2 for cancer gene therapy. *Int J Biol Markers* 1999;14:251-256
  - 16 Chen QR, Kumar D, Stass SA, Mixson AJ. Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice. *Cancer Res* 1999;59:3308-3312
  - 17 Matsuda KM, Madoiwa S, Hasumi Y, Kanazawa T, Saga Y, Kume A, Mano H, Ozawa K, Matsuda M. A novel strategy for the tumor angiogenesis-targeted gene therapy: generation of angiostatin from endogenous plasminogen by protease gene transfer. *Cancer Gene Ther* 2000;7:589-596
  - 18 Bergers G, Hanahan D. Cell factories for fighting cancer. *Nat Biotechnol* 2001;19:20-21
  - 19 Regulier E, Paul S, Marigliano M, Kintz J, Poitevin Y, Ledoux C, Roecklin D, Cauet G, Calenda V, Homann HE. Adenovirus-mediated delivery of antiangiogenic genes as an antitumor approach. *Cancer Gene Ther* 2001;8:45-54
  - 20 Berger AC, Feldman AL, Gnant MF, Kruger EA, Sim BK, Hewitt S, Figg WD, Alexander HR, Libutti SK. The angiogenesis inhibitor, endostatin, does not affect murine cutaneous wound healing. *J Surg Res* 2000;91:26-31
  - 21 Bloch W, Huggel K, Sasaki T, Grose R, Bugnon P, Addicks K, Timpl R, Werner S. The angiogenesis inhibitor endostatin impairs blood vessel maturation during wound healing. *FASEB J* 2000;14:2373-2376
  - 22 Yoon SS, Eto H, Lin CM, Nakamura H, Pawlik TM, Song SU, Tanabe KK. Mouse endostatin inhibits the formation of lung and liver metastases. *Cancer Res* 1999;59:6251-6256
  - 23 Szary J, Szala S. Intra-tumoral administration of naked plasmid DNA encoding mouse endostatin inhibits renal carcinoma growth. *Int J Cancer* 2001;91:835-839
  - 24 Ding I, Sun JZ, Fenton B, Liu WM, Kimsely P, Okunieff P, Min W. Intratumoral administration of endostatin plasmid inhibits vascular growth and perfusion in MCa-4 murine mammary carcinomas. *Cancer Res* 2001;61:526-531
  - 25 Blezinger P, Wang J, Gondo M, Quezada A, Mehrens D, French M, Singhal A, Sullivan S, Rolland A, Ralston R, Min W. Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene. *Nat Biotechnol* 1999;17:343-348
  - 26 Sauter BV, Martinet O, Zhang WJ, Mandeli J, Woo SL. Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4802-4807
  - 27 Read TA, Sorensen DR, Mahesparan R, Enger PO, Timpl R, Olsen BR, Hjelstuen MH, Haraldseth O, Bjerkvig R. Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. *Nat Biotechnol* 2001;19:29-34
  - 28 Joki T, Machluf M, Atala A, Zhu J, Seyfried NT, Dunn IF, Abe T, Carroll RS, Black PM. Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. *Nat Biotechnol* 2001;19:35-39
  - 29 Feldman AL, Restifo NP, Alexander HR, Bartlett DL, Hwu P, Seth P, Libutti SK. Antiangiogenic gene therapy of cancer utilizing a recombinant adenovirus to elevate systemic endostatin levels in mice. *Cancer Res* 2000;60:1503-1506
  - 30 Chen CT, Lin J, Li Q, Phipps SS, Jakubczak JL, Stewart DA, Skripchenko Y, Forry-Schaudies S, Wood J, Schnell C, Hallenbeck PL. Antiangiogenic gene therapy for cancer via systemic administration of adenoviral vectors expressing secreted endostatin. *Hum Gene Ther* 2000;11:1983-1996
  - 31 Wen XY, Bai Y, Stewart AK. Adenovirus-mediated human endostatin gene delivery demonstrates strain-specific antitumor activity and acute dose-dependent toxicity in mice. *Hum Gene Ther* 2001;12:347-358
  - 32 Tan KB, Harrop J, Reddy M, Young P, Terrst J, Emery J, Moore G, Truneh A. Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene* 1997;204:35-46
  - 33 Yue TL, Ni J, Romanic AM, Gu JL, Keller P, Wang C, Kumar S, Yu GL, Hart TK, Wang XK, Xia ZG, DeWolf WE Jr, Feuerstein GZ. TL1, a novel tumor necrosis factor-like cytokine, induces apoptosis in endothelial cells. Involvement of activation of stress protein kinases (stress-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase) and caspase-3-like protease. *J Biol Chem* 1999;274:1479-1486
  - 34 Zhai Y, Yu J, Iruela AL, Huang WQ, Wang Z, Hayes AJ, Lu J, Jiang G, Rojas L, Lippman ME, Ni J, Yu GL, Li LY. Inhibition of angiogenesis and breast cancer xenograft tumor growth by VEG1, a novel cytokine of the TNF superfamily. *Int J Cancer* 1999;82:131-136
  - 35 Zhai Y, Ni J, Jiang GW, Lu JM, Xing L, Lincoln C, Carter KC, Janat F, Kozak D, Xu SM, Rojas L, Aggarwal BB, Ruben S, Li LY, Gentz R, Yu GL. VEG1, a novel cytokine of the tumor necrosis factor family, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of colon carcinomas in vivo. *FASEB J* 1999;13:181-189
  - 36 Harids V, Shrivastava A, Su J, Yu GL, Ni J, Liu D, Chen SF, Ni Y, Ruben SM, Gentz R, Aggarwal BB. VEG1, a new member of the TNF family activates nuclear factor-kappaB and c-jun n-terminal kinase and modulates cell growth. *Oncogene* 1999;18:6496-6504



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**  
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,  
CA 94588, USA  
Fax: +1-925-223-8242  
Telephone: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

