

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.05.006

· 基础研究 ·

hMAM-EP 调控 *HSV-TK* 腺病毒载体的构建及其对乳腺癌细胞的靶向杀伤

于建刚¹, 吴金香², 庞春秀¹, 林德馨¹ (1. 福建医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 福建福州 350108; 2. 福建医科大学附属第二医院检验科, 福建泉州 362000)

[摘要] **目的:** 分别构建人乳铁蛋白(human mamaglobin, *hMAM*)基因增强子和启动子(enhancer and promoter of *hMAM*, *hMAM-EP*)调控的增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, *EGFP*)报告基因和单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simple virus thymidine kinase, *HSV-TK*)自杀基因两种重组腺病毒载体, 探讨 *hMAM-EP* 调控的 *HSV-TK* 在乳腺癌细胞特异性表达及其对乳腺癌的靶向治疗作用。 **方法:** 构建 *hMAM-EP-EGFP* 和 *hMAM-EP-TK* 重组质粒载体, 将重组质粒目的基因转移到腺病毒骨架黏粒载体 pAxcwt2, 并转染 HEK 293 细胞获得重组腺病毒载体 Ad-EP-EGFP 和 Ad-EP-TK。将 Ad-EP-EGFP 感染乳腺癌细胞 T-47D、ZR-75-30 和鼻咽癌细胞 5-8F, 荧光显微镜观察 EGFP 的表达。将 Ad-EP-TK 感染 T-47D 细胞, 给予 1、10、20、50 $\mu\text{g/ml}$ 前药更昔洛韦(ganciclovir, GCV), 观察 *TK* 基因对乳腺癌细胞的特异杀伤作用。 **结果:** 成功构建 *hMAM-EP* 调控的重组腺病毒载体 Ad-EP-EGFP 和 Ad-EP-TK。Ad-EP-EGFP 感染后, 乳腺癌 T-47D 细胞可见 EGFP 表达, 但 ZR-75-30 细胞和 5-8F 细胞无表达。与未感染组或感染 Ad-EP-EGFP 组相比, Ad-EP-TK 重组腺病毒联合 GCV (50 $\mu\text{g/ml}$) 组 T-47D 细胞存活率显著降低[(35.69 \pm 0.07)% vs (91.74 \pm 0.02)%, (87.69 \pm 0.11)%; $P < 0.05$], 且随 GCV 质量浓度的增加, T-47D 细胞存活率逐渐下降, 在 MOI = 100、GCV 质量浓度分别为 1、10、20、50 $\mu\text{g/ml}$ 条件下, 细胞存活率分别为(94.34 \pm 0.04)%、(86.26 \pm 0.02)%、(66.51 \pm 0.09)%、(35.69 \pm 0.07)%。 **结论:** *hMAM-EP* 调控的 *HSV-TK* 自杀基因在乳腺癌 T-47D 细胞中特异性表达, Ad-EP-TK 联合 GCV 可靶向杀伤乳腺癌 T-47D 细胞。

[关键词] 乳腺癌; 人乳铁蛋白基因; 单纯疱疹病毒胸苷激酶基因; 更昔洛韦; 重组腺病毒; 基因治疗

[中图分类号] R737.9; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)04-0496-06

Construction of recombinant adenovirus carrying *HSV-TK* controlled by *hMAM* enhancer and promoter and its targeted killing effect on human breast cancer cells

YU Jian-gang¹, WU Jin-xiang², PANG Chun-xiu¹, LIN De-xin¹ (1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Basic Medical College, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Second Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To construct two recombinant adenovirus vectors carrying reporter gene enhanced green fluorescent protein (*EGFP*) or suicide gene herpes simple virus thymidine kinase (*HSV-TK*) at the downstream of enhancer and promoter of human mamaglobin (*hMAM-EP*). To explore breast-cancer-cell-specific regulation effect of *hMAM-EP* and new methods of targeted therapy for breast cancer. **Methods:** Two recombinant plasmid vectors, *hMAM-EP-EGFP* and *hMAM-EP-TK*, were constructed, which respectively carried reporter gene *EGFP* and suicide gene *HSV-TK* at the downstream of *hMAM-EP*. Recombinant adenovirus vectors Ad-EP-EGFP and Ad-EP-TK were obtained after the target genes from the recombinant plasmids were transferred into adenovirus skeleton cosmid pAxcwt2; recombinant adenovirus vectors Ad-EP-EGFP and Ad-EP-TK were then transfected into breast cancer T-47D cells, ZR-75-30 cells and nasopharyngeal cancer 5-8F cells. The expression of EGFP was observed under a fluorescence microscope. Recombinant adenovirus Ad-

[基金项目] 福建省自然科学基金资助项目(No. 2008j0088)。Project supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2008j0088)

[作者简介] 于建刚(1982-), 男, 山东省章丘市人, 硕士, 主要从事乳腺癌生物治疗研究。E-mail: mjk234@yahoo.com.cn

[通信作者] 林德馨(LIN De-xin, corresponding author), E-mail: dexin100@yahoo.com.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120926.0850.001.html>

EP-TK-infected T-47D cells were cultured with 1, 10, 20 and 50 $\mu\text{g/ml}$ prodrug GCV to observe specific cell-killing effect on breast cancer cells. **Results:** The recombinant plasmid vectors Ad-EP-EGFP and Ad-EP-TK controlled by *hMAM-EP* were successfully constructed. EGFP could be observed in human breast cancer T-47D cells infected with Ad-EP-EGFP recombinant adenovirus, and could not be detected in ZR-75-30 and 5-8F cells. Compared with un-infected and Ad-EP-EGFP-infected groups, the survival rate of T-47D cells in Ad-EP-EGFP-infection combined with GCV (50 $\mu\text{g/ml}$) group was significantly decreased ($[35.69 \pm 0.07]\%$ vs $[91.74 \pm 0.02]\%$, $[87.69 \pm 0.11]\%$, $P < 0.05$). With an increase in mass concentration of GCV, the survival rate decreased. Cell survival rates were $(94.34 \pm 0.04)\%$, $(86.26 \pm 0.02)\%$, $(66.51 \pm 0.09)\%$ and $(35.69 \pm 0.07)\%$ when T-47D cells were infected with *hMAM-EP-TK* in a MOI of 100 and cultured with 1, 10, 20, and 50 $\mu\text{g/ml}$ GCV. **Conclusion:** *HSV-TK* suicide gene controlled by *hMAM-EP* is specifically expressed in breast cancer T-47D cells, and T-47D cells can be killed by Ad-EP-TK combined with GCV.

[**Key words**] breast cancer; human mammaglobin gene; herpes simple virus thymidine kinase gene; ganciclovir; recombinant adenovirus; gene therapy

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(5): 496-501]

人乳腺珠蛋白(human mammaglobin, hMAM)是1996年Watson等在乳腺癌组织中发现的一种分泌性球蛋白^[1-3]。hMAM仅在乳腺组织表达,且在乳腺癌组织高表达^[4-6]。Watson和Shi等^[7-9]的研究表明, *hMAM* 基因上游-1~-385 bp和-4.5~-5.5 kb区域存在增强子和启动子调控序列,在乳腺组织*hMAM*基因特异性表达中起调控作用。单纯疱疹病毒胸苷激酶基因/丙氧鸟苷(herpes simple virus thymidine kinase/ganciclovir, *HSV-TK/GCV*)是常用的自杀基因系统。在哺乳动物细胞中, *HSV-TK* 可使前药更昔洛韦(ganciclovir, GCV)转化为细胞毒性物质三磷酸GCV,从而杀伤肿瘤细胞^[10-11]。本研究利用*hMAM*基因增强子和启动子(enhancer and promoter of human mammaglobin, *hMAM-EP*)的乳腺癌特异调控作用,构建*hMAM-EP*调控的自杀基因*HSV-TK*腺病毒载体,探讨*hMAM-EP*调控的乳腺组织中*HSV-TK*基因特异性表达及其对乳腺癌细胞的靶向杀伤作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株、菌株和质粒

人乳腺癌细胞株T-47D、人胚肾细胞株HEK 293购自中科院细胞库,人乳腺癌细胞株ZR-75-30、鼻咽癌细胞株5-8F由福建医科大学附属协和医院肿瘤实验室赠送, *E. coli* DH5 α 菌株由福建医科大学感染与肿瘤重点实验室赠送,质粒载体pMD19-T simple、黏粒载体pAxcwit2购自TaKaRa公司。

1.2 主要试剂

Nhe I、*Hind* III、*Xba* I等限制性内切酶购自美国Promega公司, *Pac*I限制性内切酶购自美国NEB

公司,质粒抽提试剂盒购自德国Qiagen公司, T4 DNA连接酶、DNA Blunting、 λ -Package试剂盒购自日本TaKaRa公司,脂质体转染试剂LipofectamineTM 2000购自美国Invitrogen公司,腺病毒滴度测定试剂盒购自深圳依诺金生物公司, GCV购自美国Sigma公司, DMEM培养液购自美国Gibco公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司。

1.3 *hMAM*增强子和启动子调控的EGFP和TK重组腺病毒载体的构建

腺病毒载体的构建示意图见图1(部分图片引自TaKaRa公司的载体说明书)。

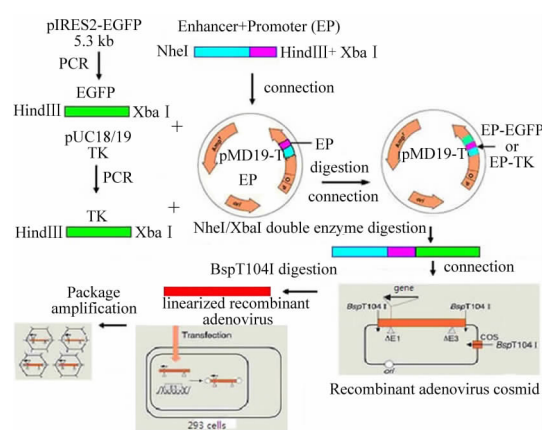


图1 腺病毒载体的构建

Fig. 1 Construction of recombinant adenovirus

1.3.1 *hMAM*增强子和启动子DNA序列合成和载体pMD19-EP的构建 根据文献[7-9]和GeneBank提供的*hMAM*基因DNA序列(基因编号AP003306),合成转录起始点上游-1~-385 bp启动子序列和

转录起始点上游 -4 429 ~ -5 653 bp 增强子序列, 并在 5' 端添加 *Nhe* I 酶切位点, 3' 端依次添加 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切位点。由 TaKaRa 公司将 *hMAM* 基因启动子序列和增强子序列连接至 pMD19-T simple 载体, 重组载体命名为 pMD19-EP。

1.3.2 含 EGFP 及 HSV-TK 片段的 pMD19-EP-EGFP 和 pMD19-EP-TK 载体的构建 应用 PCR 方法, 从 pIRES2-EGFP 和 pUC19-TK 载体扩增 EGFP 和 HSV-TK 的 DNA 片段, 并在上游端添加 *Hind* III 酶切位点, 下游端添加 *Xba* I 酶切位点。HSV-TK 基因上游引物: 5'-CCCAAGCTTGGGTATGGCTTCGTAC-CC-3', 下游引物: 5'-GCTCTAGAGCTCAGTTAGC-CTCCCCCA-3', 产物长度: 1 131 bp, T_m : 60 °C; EGFP 基因上游引物: 5'-CCCAAGCTTGGGCACAACCATG-GTG-3', 下游引物: 5'-GCTCTAGAGCTTTACTTGTA-CAGCTCG-3', 产物长度: 720 bp, T_m : 60 °C。引物由上海生工生物工程公司合成。

PCR 扩增 EGFP 及 HSV-TK 的条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物。Hind III/Xba I 双酶切 PCR 产物和 pMD19-EP 重组质粒, T4 DNA 连接酶连接后, 转化 DH5 α , 构建含 EGFP 及 HSV-TK 片段的重组载体, 命名为 pMD19-EP-EGFP 和 pMD19-EP-TK。

1.3.3 含 EP-EGFP 和 EP-TK 的重组腺病毒载体构建和鉴定 *Nhe* I/Xba I 双酶切 pMD19-EP-EGFP 和 pMD19-EP-TK, 获得 EP-EGFP 和 EP-TK, 末端经平端化处理(采用 TaKaRa 公司 DNA Blunting 试剂盒)。用 T4 DNA 连接酶将平端 EP-TK 和 EP-EGFP 片段分别插入 *Smi* I 单酶切后的 pAxcw12 黏粒。采用 λ -Package 试剂盒(TaKaRa 公司)包装重组黏粒。*Pac* I 酶切使重组黏粒线性化。LipofectamineTM 2000 介导黏粒(4 μ g/孔)转染 HEK 293 细胞(6 孔板, 2×10^6 细胞/孔)。转染 10 d 后, 出现细胞病毒感染现象, 收获细胞, -20 °C/37 °C 反复冻融细胞 3 次, 收集病毒。鉴定后的重组腺病毒命名为 Ad-EP-EGFP 和 Ad-EP-TK。

1.3.4 重组腺病毒滴度测定 采用依诺金腺病毒滴度测定试剂盒测定病毒滴度: 将 HEK 293 细胞按 5×10^5 /ml 的密度接种至 24 孔板, 用无血清培养液将待测病毒样品从 1×10^{-2} 到 1×10^{-6} 做 10 倍系列稀释, 每孔细胞滴加 100 μ l 稀释后的待测病毒样品。5% CO₂、37 °C 培养箱培养 48 h 后, 固定细胞, 并分别用兔抗腺病毒抗体和辣根过氧化物酶标记的

羊抗兔抗体孵育, 二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)染色, 倒置显微镜下观察计数阳性细胞数, 按下列公式计算每孔感染单位: 每孔感染单位(PFU/ml) = (阳性细胞数/视野 \times 视野数/孔)/病毒体积(ml) \times 稀释倍数; 其中, 视野数/孔 = 视野面积/孔板面积。

1.4 重组腺病毒感染靶细胞

以不同滴度的 Ad-EP-EGFP 感染乳腺癌细胞 T47D、ZR-75-30 和鼻咽癌细胞 5-8F(12 孔板, 3×10^5 /孔)。病毒感染复数 MOI 分别为 10、50、100、200。感染后 24 ~ 72 h, 荧光显微镜下观察 EGFP 表达情况。Ad-EP-TK 和 Ad-EP-EGFP 分别感染乳腺癌 T47D 细胞, 另设无病毒感染的 T47D 细胞为阴性对照组(12 孔板, 3×10^5 /孔)。病毒感染复数 MOI = 100, 感染 48 h 后, 每组分别加入 1、10、20、50 μ g/ml 前药 GCV, 3 d 后 0.4% 锥虫蓝染色, 计算细胞存活率。

1.5 统计学处理

应用 SPSS13.0 软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数的比较采用两样本 *t* 检验; 多组均数的总体比较采用方差分析(ANOVA), 两两比较采用 SNK 检验。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差别有统计学意义。

2 结果

2.1 pMD19-EP、pMD19-EP-EGFP 和 pMD19-EP-TK 重组载体的鉴定

pMD19-EP、pMD19-EP-TK 及 pMD19-EP-EGFP 重组载体以 *Nhe* I/*Hind* III 和/或 *Hind* III/*Xba* I 双酶切鉴定, 酶切产物片段大小和预期相符(图 2)。重组载体经测序, 载体中的 *hMAM* 基因增强子和启动子序列与预期序列一致。

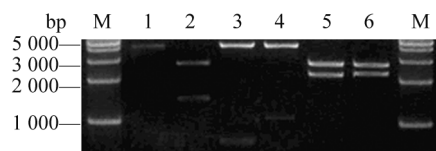


图 2 pMD19-EP、pMD19-EP-EGFP 和 pMD19-EP-TK 载体的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction endonuclease digestion of pMD19-EP, pMD19-EP-EGFP and pMD19-EP-TK vectors

M: Marker; 1: *Hind* III/*Xba* I digestion of pMD19-EP; 2: *Nhe* I/*Hind* III digestion of pMD19-EP; 3: *Hind* III/*Xba* I digestion of pMD19-EP-EGFP; 4: *Hind* III/*Xba* I digestion of pMD19-EP-TK; 5: *Nhe* I/*Xba* I digestion of pMD19-EP-EGFP; 6: *Nhe* I/*Xba* I digestion of pMD19-EP-TK

2.2 重组腺病毒的鉴定和滴度的测定

用 *Cla* I 和 *Bsp*T104 I 分别酶切鉴定 pAxcwit2-EP-EGFP 和 pAxcwit2-EP-TK 重组腺病毒黏粒载体,酶切产物片段大小和预期相符(图 3)。重组黏粒送 TaKaRa 公司测序,结果与预期一致。重组腺病毒黏粒 pAxcwit2-EP-TK 转染 HEK 293 细胞 1 周后,细胞变圆,彼此分离(图 4)。采用依诺金腺病毒滴度测定试剂盒测定病毒滴度(图 5),初步扩增的病毒滴度为 1×10^9 PFU/ml,大量扩增滴度为 1×10^{10} PFU/ml。

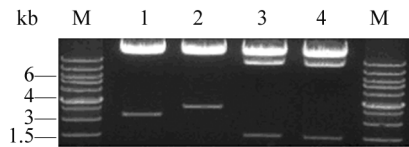


图 3 黏粒 pAxcwit2-EP-EGFP 和 pAxcwit2-EP-TK 酶切鉴定
Fig. 3 Restriction endonuclease digestion of pAxcwit2-EP-EGFP and pAxcwit2-EP-TK cosmids

M: Maker; 1: *Cla* I digestion of pAxcwit2-EP-EGFP;
2: *Cla*I digestion of pAxcwit2-EP-TK; 3: *Bsp*T104 I digestion of pAxcwit2-EP-TK; 4: *Bsp*T104 I digestion of pAxcwit2-EP-EGFP

2.3 Ad-EP-EGFP 在乳腺癌细胞中的表达

荧光显微镜下显示,Ad-EP-EGFP 感染后,乳腺癌细胞 ZR-75-30 和鼻咽癌细胞 5-8F 均无 EGFP 表

达,乳腺癌细胞 T-47D 有 EGFP 表达,随 MOI 的增高,荧光强度逐渐增强(图 6)。结果表明,Ad-EP-EGFP 只在乳腺癌 T-47D 细胞中特异表达。

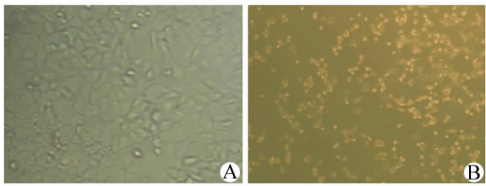


图 4 黏粒 pAxcwit2-EP-TK 感染 HEK 293 细胞($\times 100$)
Fig. 4 Cosmid pAxcwit2-EP-TK infection HEK 293 cells($\times 100$)
A: Control; B: pAxcwit2-EP-TK

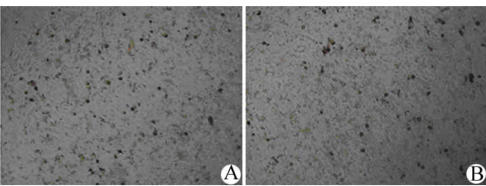


图 5 Ad-EP-TK 重组腺病毒 10^{-4} 稀释后 DAB 染色测定病毒滴度($\times 100$)
Fig. 5 Recombinant adenovirus Ad-EP-TK titer detected by DAB staining after 10^{-4} dilution($\times 100$)
A: Ad-EP-EGFP; B: Ad-EP-TK

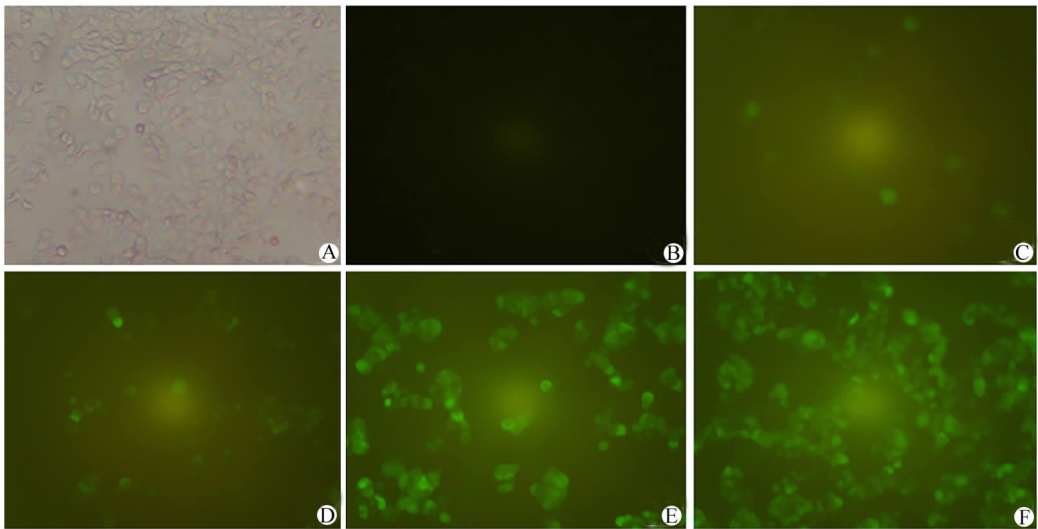


图 6 Ad-EP-EGFP 感染靶细胞 36 h 后 EGFP 的表达($\times 100$)
Fig. 6 EGFP expression in target cells 36 h after infection of Ad-EP-EGFP($\times 100$)

A: T-47D cells; B: ZR-75-30 cells infected with Ad-EP-EGFP, MOI = 200; C: T-47D cells infected with Ad-EP-EGFP, MOI = 10; D: T-47D cells infected with Ad-EP-EGFP, MOI = 50; E: T-47D cells infected with Ad-EP-EGFP, MOI = 100; F: T-47D cells infected with Ad-EP-EGFP, MOI = 200

2.4 Ad-EP-TK 重组腺病毒对 T-47D 细胞的杀伤

未感染病毒的 T-47D 细胞和感染 Ad-EP-EGFP 病毒的 T-47D 细胞对 GCV 处理不敏感,即使高浓度也不表现杀伤作用(数据未提供)。感染 Ad-EP-TK 病毒的 T-47D 细胞对 GCV 处理敏感,与未感染病毒或感染 Ad-EP-EGFP 载体的 T-47D 细胞间差别有统计学意义。Ad-EP-TK 联合 GCV 对乳腺癌 T-47D 细

胞具有显著杀伤作用[50 μg/ml 时的存活率:(35.69 ± 0.07)% vs (91.74 ± 0.02)%, (87.69 ± 0.11)% ; $P < 0.05$],随 GCV 质量浓度的增加,杀伤作用逐渐增强,在 MOI = 100、GCV 质量浓度分别为 1、10、20、50 μg/ml 条件下,细胞存活率分别为 (94.34 ± 0.04)%、(86.26 ± 0.02)%、(66.51 ± 0.09)%、(35.69 ± 0.07)% (表 1、图 7)。

表 1 Ad-EP-TK 联合 GCV 处理后 T-47D 细胞的存活率($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Tab.1 Survival rate of T-47D cells after Ad-EP-TK combined with GCV treatment ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Group	1 μg/ml GCV	10 μg/ml GCV	20 μg/ml GCV	50 μg/ml GCV
GCV	98.64 ± 0.03	96.32 ± 0.04	94.21 ± 0.06	91.74 ± 0.02
GCV + Ad-EP-EGFP	96.86 ± 0.05	93.75 ± 0.07	91.36 ± 0.10	87.69 ± 0.11
GCV + Ad-EP-TK	94.34 ± 0.04	86.26 ± 0.02	66.51 ± 0.09*	35.69 ± 0.07*

* $P < 0.05$ vs GCV + Ad-EP-EGFP or GCV group

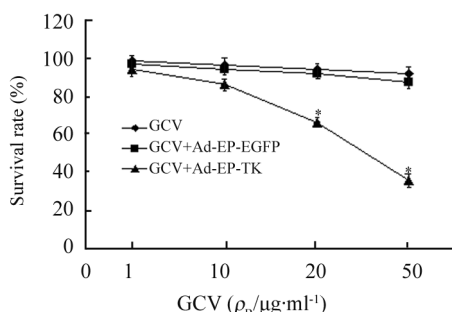


图 7 Ad-EP-TK 对乳腺癌 T-47D 细胞的杀伤作用(MOI = 100)

Fig.7 Cytotoxicity of Ad-EP-TK on breast cancer T-47D cells (MOI = 100)

* $P < 0.05$ vs GCV + Ad-EP-EGFP or GCV

3 讨论

人乳腺珠蛋白 hMAM 分子量大小约 10 000,属子宫珠蛋白超家族^[1-2]。hMAM 基因位于染色体 11q12.3 的一个密集基因簇中,该簇中许多基因都与人类乳腺癌相关^[3]。许多研究^[4-5]表明,hMAM 仅在乳腺组织表达,在 80% 以上的乳腺癌患者中高表达。Sasaki 等^[6]采用 RT-PCR 等技术检测不同来源癌组织中 hMAMA 的表达,表明 hMAM 基因是一种乳腺癌相关基因。许多临床研究^[12-18]表明,hMAM 是乳腺癌诊断、良恶性乳腺癌鉴别、乳腺癌早期筛查和乳腺癌转移检测的良好指标,也是辅助乳腺癌临床分期分级和预后判断的良好指标。hMAM 基因的

乳腺癌特异性表达表明 hMAM 基因表达存在特异的调控机制,虽然 hMAM 的表达调控机制尚未完全明确,但现有研究已发现了 hMAM 增强子和启动子元件的 DNA 序列。Watson 等^[7]研究表明 hMAM 基因启动子位于基因上游 350 bp 的片段内。Shi 等^[8-9]发现 hMAM 基因上游 -4.4 kb ~ -5.5 kb 之间的 DNA 序列有增强子的作用。进一步实验^[7-9]证实,上述增强子和启动子序列具有乳腺癌细胞的特异性调控作用。因此可利用 hMAM 特异性表达调控元件进行乳腺癌的靶向基因治疗。

利用 hMAM-EP 调控自杀基因靶向治疗乳腺癌,可以将 hMAM 基因调控序列的乳腺组织特异性与自杀基因的杀伤作用结合起来,实现乳腺癌靶向治疗。本实验构建了 hMAM-EP 调控的重组腺病毒,分别感染 hMAM 阳性的乳腺癌 T-47D 细胞、hMAM 阴性的乳腺癌 ZR-75-30 细胞和鼻咽癌 5-8F 细胞,荧光显微镜下显示,EGFP 在 T-47D 细胞中表达,在其他细胞中不表达,初步验证了 hMAM-EP 调控的 EGFP 乳腺癌特异性表达。但由于未在更广泛的细胞株中进行实验,故本实验结果仍有待于进一步验证。

本实验构建了 hMAM-EP 调控的自杀基因 HSV-TK 的重组腺病毒,感染体外培养的乳腺癌 T-47D 细胞,并给于不同浓度的前药 GCV,结果显示,感染重组 Ad-EP-TK 腺病毒的乳腺癌 T-47D 细胞对 GCV 治疗高度敏感。因此,hMAM-EP 调控的自杀基因 HSV-TK 具有乳腺癌细胞的靶向杀伤作用。

乳腺癌是严重威胁女性生命的恶性疾病,目前的综合治疗显著提高了患者生存率,但对进展期和

复发性乳腺癌患者的疗效仍不理想^[19]。乳腺癌基因治疗显示出了良好的应用价值和较大的潜力^[20-21]。在各种基因治疗方法中,基因转导及表达的靶向性和可控性不但影响治疗的效果,而且关系到对机体正常组织是否造成损伤,如癌基因敲除对正常细胞增殖的影响等。将目的基因置于乳腺癌特异性转录调控序列之下可以实现基因治疗的靶向性,而自杀基因疗法则保证了对靶细胞即乳腺癌细胞的强力杀伤作用。因此,本研究构建的重组腺病毒 Ad-EP-TK 在乳腺癌治疗领域具有重要意义和实用价值。当然,目前的研究仍局限于体外实验,研究结果尚待动物模型验证,而距离实际临床应用则需更长期的探索与努力。但相信随着分子生物学及乳腺癌基因治疗技术的进一步发展,*hMAM-EP* 调控 HSV-TK 靶向杀伤乳腺癌细胞的疗法会有更为广阔的应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary specific member of the uteroglobin gene family is overexpressed in human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(4): 860-865.
- [2] Becker RM, Darrow C, Zimonjie DB, et al. Identification of mammaglobin B, a novel member of the uteroglobin gene family [J]. *Genomics*, 1998, 54(1): 70-78.
- [3] Ni J, Kalf-Suske M, Gentz R, et al. All human genes of the uteroglobin family are localized on chromosome 11q12.2 and form a dense cluster [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 9(23): 25-42.
- [4] Zehentner BK, Deme A, Toure P, et al. Mammaglobin as a novel breast cancer biomarker: Multigene reverse transcription PCR assay and sandwich ELISA [J]. *Clin Chem*, 2004, 50(11): 2069-2076.
- [5] Mikhitarian K, Martin RH, Ruppel MB, et al. Detection of mammaglobin mRNA in peripheral blood is associated with high grade breast cancer: Interim results of a prospective cohort study [J]. *BMC Cancer*, 2008, 20(8): 55.
- [6] Eiichi S, Nobuyuki T, Yutaka H, et al. Breast-specific expression of MGB1/mammaglobin: An examination of 480 tumors from various organs and clinicopathological analysis of MGB1-positive breast cancers [J]. *Modern Pathol*, 2007, 20(2): 208-214.
- [7] Watson MA, Darrow C, Zimonjie DB, et al. Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13 [J]. *Oncogene*, 1998, 16(6): 817-824.
- [8] Shi CX, Long MA, Liu L, et al. The human SCGB2A2 (mammaglobin-1) promoter/enhancer in a helper-dependent adenovirus vector directs high levels of transgene expression in mammary carcinoma cells but not in normal nonmammary cells [J]. *Mol Ther*, 2004, 10(4): 758-767.
- [9] Shi CX, Graham FL, Hitt MM. A convenient plasmid system for construction of helper-dependent adenoviral vectors and its application for analysis of the breast-cancer-specific mammaglobin promoter [J]. *J Gene Med*, 2006, 8(4): 442-451.
- [10] Portsmouth D, Hlavaty J, Renner M. Suicide genes for cancer therapy [J]. *Mol Aspects Med*, 2007, 28(1): 4-41.
- [11] Fillat C, Carrio M, Cascante A, et al. Suicide gene therapy mediated by the herpes simplex virus thymidine kinase gene/ganciclovir system: Fifteen years of application [J]. *Curr Gene Ther*, 2003, 3(1): 13-26.
- [12] Roncella S, Ferro P, Bacigalupo B, et al. Assessment of RT-PCR detection of human mammaglobin for the diagnosis of breast cancer derived pleural effusions [J]. *Diagn Mol Pathol*, 2008, 17(1): 28-33.
- [13] Marques AR, Teixeira E, Diamond J, et al. Detection of human mammaglobin mRNA in serial peripheral blood samples from patients with non-metastatic breast cancer is not predictive of disease recurrence [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 114(2): 223-232.
- [14] Ferro P, Franceschini MC, Bacigalupo B, et al. Detection of circulating tumour cells in breast cancer patients using human mammaglobin RT-PCR: Association with clinical prognostic factors [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(6): 2377-2382.
- [15] Tjensvoll K, Olteidal S, Farnen RK, et al. Disseminated tumor cells in bone marrow assessed by TWIST1, cytokeratin 19, and mammaglobin A mRNA predict clinical outcome in operable breast cancer patients [J]. *Clin Breast Cancer*, 2010, 10(5): 378-384.
- [16] Dono M, Ferro P, Franceschini MC, et al. Human mammaglobin transcript amplification for differential diagnosis in a breast cancer metastatic to dura mater [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(3): 1061-1064.
- [17] Roncella S, Ferro P, Franceschini MC, et al. Diagnosis and origin determination of malignant pleural effusions through the use of the breast cancer marker human mammaglobin [J]. *Diagn Mol Pathol*, 2010, 19(2): 92-98.
- [18] Canessa PA, Manta C, Ferro P, et al. Clinical relevance of human mammaglobin mRNA in pleural effusion from patients undergoing thoracoscopy: A pilot study [J]. *Int J Biol Markers*, 2012, 27(2): e99-e104.
- [19] Semiglazov VF. Strategic and practical approaches to solving the problem of breast cancer [J]. *Vopr Onkol*, 2012, 58(2): 148-152.
- [20] Pellegrini I, Rapti M, Extra JM, et al. Targeted chemotherapy for breast cancer: Patients perception of the use of tumor gene profiling approaches to better adapt treatments [J]. *Med Sci (Paris)*, 2012, Spec No 1: 24-27.
- [21] Bertucci F, Birnbaum D. Genomics and clinical research for breast cancer [J]. *Med Sci*, 2012, 1: 14-18.

[收稿日期] 2012 - 05 - 15

[修回日期] 2012 - 08 - 11

[本文编辑] 韩丹,周琳玲