

核子醫學分子造影圖譜肝癌基因治療之技術發展（II） — 正子斷層掃描儀（PET）動物模式之建立

Development of Non-Invasive PET Imaging Animal Model for Studying
Hepatoma Gene Therapeutic Approaches

（NSC 92-NU-7-038-001）

鄧文炳* 丁幹** 楊文光***

*台北醫學大學生物醫學材料研究所

**行政院原子能委員會核能研究所

***中央研究院生物醫學科學研究所

一、緣起與目的

由於基因工程、分子生物技術與遺傳學技術的蓬勃發展，使人類對於生命的奧秘與疾病的治療有更進一步的了解。近年來，科學家們將一些具有特殊功能的基因，用來治療人類疾病，這種由基因的層次來治療疾病的方式稱為基因治療[1,2,3]。基因療法近十幾年來所發展出最具革命性的醫療技術。從遺傳性疾病、癌症，到感染性疾病、心血管疾病，以至於風濕性關節炎均可用基因治療的概念。其原理是利用基因重組技術將能產生治療疾病機制的基因，以病毒或非病毒載體方式，攜帶此外源性DNA，感染標的細胞(Target cell)或組織，來改正或修補基因的缺陷，關閉或抑制表現異常的基因，而達到治療目的。然而，基因治療的最初候選者是應用於遺傳病，但由於腫瘤的基因治療基本上不需要考慮社會倫理問題，選株的治療基因較多，動物模型易做，病人和家屬的可接受性以及臨床治療的迫切需要，其發展是可能遠大於遺傳病之基因治療。

目前應用在癌症的基因治療主要可以分為幾個領域：(1)免疫基因治療 (immunogene therapy)：應用細胞激素(cytokines)具促進身體產生免疫反應的原理，把cytokines的基因注入特殊的細胞內，使之不斷分泌cytokines，以增加身體免疫力如干擾素(interleukin-2、4；IL-2、4)，腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor- α ；TNF- α)，干擾素(interferon- γ ；INF- γ)，granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF)，腫瘤相關性抗(tumor-associated antigen)...等[3~9]。(2)送入抑癌基因：p53、retinoblastoma gene (RB)、BCL-Xs[10,11]。(3)抑制致癌基因的表現：致癌基因反核酸序列(anti-sense oncogene DNA)，以人工合成短的核苷酸鏈與致癌基因轉譯的mRNA相互結合，以干擾致癌基因蛋白質的合成，使致癌基因的表現受到抑制[12]。(4)引起細胞凋亡(apoptosis)：如將TNF- α 與FasL基因送入癌細胞中可造成計劃性細胞死亡(programmed cell death)[13~15]。(5)抑制血管生成(anti-angiogenesis)：利用血管新生抑制因子來阻斷腫瘤養份的源，便能阻止腫瘤的生長如angiostatin(AST)、thrombospondin-1(TSP-1)、interferon α/β ...等[16]。(6)抗藥性的基因(drug resistance gene)如將multidrug resistance(MDR)送入造血細胞(haematopoietic cells)，以增加血球細胞在化學療法時，對骨髓抑制劑的抗性[17,18]。(7)自殺基因治療(suicide gene therapy)：將一種可增加癌細胞藥物敏感度的基因 HSV-tk送入癌細胞中，再將

抗病毒藥物注射到生物體內，可選擇性地殺死正在分裂的癌細胞，而對於正常細胞則沒有影響。 HSV-tk之所以能殺死癌細胞，在於它會讓後者分泌一種激素，使原無毒性的抗病毒藥物轉為有毒，殺死腫瘤細胞[19~23]。之後介紹的自殺基因治療機制就屬於此類。

胎兒蛋白(α -Fetoprotein)是一種 α -1 球蛋白，通常只大量表現在胎兒及孕婦中，一般正常人表現甚少。但也會大量出現在患有肝癌的病人身上。因此利用 AFP promoter 接上 HSV-tk 自殺基因，利用載體，將此基因送入病人體內，這樣當我們加入前藥物 GCV 時，藥物就只能在能表現 AFP-tk 的肝癌細胞而被磷酸化聚積在細胞中，最後導致肝癌細胞計畫性的死亡(apoptosis)，而正常細胞並不會表現 AFP-tk 基因，自然就不會導致正常細胞的死亡，而達到組織專一性(tissue-specific)的治療目的[28~32]。

基因傳遞系統亦即所謂的載體系統(vector system)。基因治療除了需要一段具有療效的基因外，還需要一個好的載體能將外界的正常基因或治療基因有效的傳送到人體的標的細胞，進行基因修飾與表現。而載體系統所執行的基因傳遞可在活體外(ex vivo)或體內(in vivo)進行。載體系統一般可分為病毒載體與非病毒載體，病毒載體主要有反轉錄病毒(Retrovirus, RV)、慢病毒(Lentivirus)、腺病毒(Adenovirus, AV)、腺相關病毒(Adeno-Associated Virus, AAV)、疱疹病毒(Herpes Simplex Virus, HSV)[49,50]；非病毒載體則有脂質體(Liposome)、裸DNA(Naked DNA)、細菌及物理方式(Physical means)。不過目前大部分的基因治療所用的載體以病毒為主，因為可以藉由病毒感染細胞的特性將所帶的基因送到標的細胞中(target cells)。

Lentiviruses為一帶有套膜(envelope)的正向單股RNA病毒，全長約9.7Kb，主要基因結構包括病毒包裝信號(packaging signal, ψ)、族特異抗原(group specific antigen, gag)、聚合酶(polymerase, pol)、外套膜(envelope, env)、調控蛋白(regulatory protein, Tat、Rev與表現病毒RNA的效率有關)、其他蛋白(accessory proteins, Vif、Vpr、Vpu、Nef，與病毒接合RNA及包埋成新顆粒有關)；gag基因表現產生病毒基質(viral matrix)、外殼蛋白(capsid)和核蛋白(nucleoproteins)；pol基因表達反轉錄酶(reverse transcriptase)、嵌入酶(integrase)蛋白水解酶(protease)等酵素；envelope基因表現產生病毒表面糖蛋白(surface glycoprotein, SU)和穿膜蛋白(transmembrane polyprotein, TM)合稱為外套膜；LTR(long terminal repeat)啟動前述基因表現的，LTR結構啟動轉錄起始及多腺核苷尾(Poly A tail)所需的信號，牠又可細分為三個部分，按序依次為5'-U₃-R-U₅-3'。U₃(unique)區包含增強子(enhancer)和病毒的促進者(promoter)，R(repeat)包含trans-acting response(TAR) element及polyA訊號，5'長端重複邊界處是轉錄起始者結合區(primer binding site, PBS)，其主要作用是與細胞的tRNA互補而為反轉錄做準備。U₅的下游還包含一小段編碼的gag基因的序列- ψ (psi)，其作用為允許完成病毒RNA被包埋成新的感染性顆粒[51,52]。

在本實驗另一部份我們運用了兩個不同的報導基因

(一)、HSV1-tk 請參考本論文第一部份

(二)、EGFP (Enhanced green fluorescent protein)

本實驗所採用的是基因是突變加強型的 EGFP(enhanced GFP)，EGFP 是利用基因工程技術將原始 GFP 的 Ser65→Thr，Tyr66→His；並將基因密碼加以

humanize[68]，使其在哺乳動物細胞中更容易表現。其出現最大吸收峰之激發波長發生在 488nm，放射波長為 509nm，故會產生綠色螢光。其優點為基因不受細胞種類影響，不需額外添加受質即能觀察其基因表現，而且基因產物不具毒性，同時能在活細胞或經固定過後的細胞中均可偵測得到。

綜合以上的介紹我們想建立穩定而有效率基因轉植平台，以便以後能製造出更多獨特的新細胞株。先以慢病毒為載體攜帶HSV-tk標記基因，植入人類肝癌細胞，而建立本土性人類肝癌含HSV-tk的新細胞株。將來可配合核醫造影技術作為測試抗肝癌新藥與開發新種核醫藥物。

二、研究方法與過程

一、建構 pTY-EFeGFP-AFPtk 之表現載體

為了利用慢病毒將 AFPtk gene(insert)放入肝癌細胞內，使其過量表現(overexpress)AFPtk gene，利用基因轉植技術，另外建構了 pTY-EFeGFP -AFPtk 表現載體。

方法:

(一)、pSK II -AFPtk 質體選殖

a. DNA 片段回收法(Recovery of DNA fragment from agarose gel)

利用 Gel DNA Extraction Kit (Roche)純化 DNA 片段，DNA 樣品經電泳分析與 EtBr 染色後，於 UV 燈下觀察，並以滅菌刀片小心將 DNA 色帶片段切下，放置於 1.5ml eppendorf tube 中，秤重後，依照 protocol 加入一定比例的 agarose solubilisation buffer 及 silica suspension，劇烈震盪混和後，在 60℃ 下作用 10 分鐘，每 2~3 分鐘用手拍打混合一下，使膠體完全溶解，一般而言，膠體濃度越高，溶解時間越長，須確定膠體是否完全溶解。在 12000 rpm 下離心 1 分鐘，倒掉濾液，再加入 nucleic acid binding buffer 並混和均勻，在 12000 rpm 下離心 1 分鐘，倒掉濾液，加入 washing buffer 震盪混合後，再次以 12000 rpm 離心 1 分鐘，離心後倒掉濾液，沈澱物在 45 °C 蒸乾，加入適量的 TE buffer，vortex 後，37 °C 下反應 2~3 分鐘，離心後收集至新的 1.5ml eppendroff，-20 °C 保存。

b. 接合反應(Ligation)

將準備好的嵌入體 DNA 與質體做接合反應，以 1: 2 的比例混合，加入 1 µl 10×接合反應緩衝液(ligation buffer)，1 µ T₄ DNA 接合酵素(DNA ligase)，最後加入三次水使總反應體積為 10 µl，於 23°C 作用 2~3 小時，利用轉形作用送入菌中複製。

c. 細菌轉型(Transformation)

--轉化質體 DNA 於大腸桿菌體內

將已接合反應完成的質體(plasmid) 10 µl 加入 150 µl XL-1 Blue competent cell (可減半) 混和均勻，靜置於冰上 30 分鐘後，轉置於 42°C heat shock 90 秒，立刻置於冰上 1 分鐘，然後加入 100 µl 不含 ampicillin 的 LB 培養液中，於 37°C 培養 1 小時，並偶而混合一下，使菌體恢復活性，於室溫下取菌液 150µl 以塗抹法(spreading)接種於含適當濃度的 ampicillin / X-gal / IPTG 之篩選培養基(selection medium)上，於 37°C 培養 12~16 小時，即可得到轉型的菌落。

d. 勝任細胞的製備(preparation of competent cell)

本實驗所用的菌種為 XL-1 Blue E.coli strain，此對四環黴素(tetracycline)有抗藥性。挑選單一菌落接種在 5ml LB 培養液中(含 5µl 12.5mg/ml tetracycline)，

在 37°C 隔夜震盪培養後，取出 200 μ l 培養好的菌液到 50ml LB 培養液中(含 50 μ l 12.5mg/ml tetracycline)，37°C 隔夜震盪培養至 OD₆₀₀ 為 0.3-0.6 時至於冰上，將菌液離心下來 (5000rpm for 4 min at 4°C)，倒掉上清液後，加入 10 ml transformation buffer，混和均勻後，再離心一次(5000rpm for 5 min at 4°C)，去除上清液後，加入 4ml transformation buffer，混和均勻後，置於冰上一小時，此極為具有轉化質體能力的勝任細胞。小量分裝於 1.5ml 離心管中，快速冷凍於-80 中保存。

e. 轉形株之篩選

重組 DNA 轉形後的第二天可依藍白菌落的出現來判定 DNA 是否有接到載體上。挑選此單一菌落即含有 pSK II -AFPtk 質體的細株(XL1-Blue)，在 37°C 5ml LB 含 ampicillin 培養液中生長約 16 小時後，即得到小量轉型成功的菌體 XL1-Blue。

(二)、載體的建構(Expression vector construction)

AFPtk 基因原本構築於 Retroviral vector 中(由 Akio Ido 所提供)。經由 DNA 重新定序後，^a設計出 primer，利用 PCR(polymerase chain reaction)的方法夾出 AFPtk gene 並大量複製。在 PCR 過程中，我們使用 Pfu polymerase 來增加複製的正確性，並在其 N 端及 C 端分別加上一個限制酶的位置，KpnI。然後再將 PCR 放大的 DNA 片段大小約為 1.5Kb，選殖到 ^b4blunt TOPO cloning vector，在 subcloning 之前，先做 DNA 定序析，以確定 PCR 所得到的 DNA 片段正確無誤。利用限制酶 KpnI 將 AFPtk 從 TOPO plasmid 切下後，跑電泳分離，並用 Gel DNA Extraction Kit (Roche)將 1.5Kb 的 AFPtk gene(insert) 純化；另外，將 pTY-EFeGFP 載體同樣用限制酶 KpnI 切其兩端，再加入 calf intestinal alkaline phosphatase(CIP)於 37°C 下反應 1 小時，以去除 5'端磷酸根，避免其自行接合(self-ligation)，進行 0.9% gel 的電泳確定切出的片段約 9.6Kb DNA，再利用 Gel DNA Extraction Kit (Roche) 取下後，將不同莫耳比例之 vector 和 insert DNA 以 T4-DNA ligase 於 12°C overnight 連接之後，將此 DNA ligation mixture transform 至勝任細胞 E.coli / XL1-Blue 進行轉型反應，再塗在含有 50 μ g / ml ampicillin 的 agar plate 上，經 37°C 16 小時培養後，挑出 colonies 養在 LB 中，做 miniprep 抽出 plasmid DNA。(方法如前)

為了確定我們外接的 DNA 接合在載體的方向，因此以 miniprep 抽出 plasmid 後，進行定序。

二、大量質體的製備(Maxi-plasmid preparation)

(1) 菌體培養及收集

取少量的保存菌株，接種於 5ml 含抗生素的 LB 培養液中，以 37°C 振盪培養 12~16 小時，隔天取 500 μ l 菌液至 500ml LB 培養液中，在相同的條件下培養約 5~8 小時，即培養至 O.D.600 等於 1 時，加入 2.5ml 的 chloramphenicol (stock conc. : 34 mg/ml)，抑制菌體生長卻不阻止菌體內的質體複製，經 37°C 振盪培養 16 小時之後，以 6000 rpm 4°C 離心 15 分鐘，取得菌體沈澱物。

(2) 質體 DNA 的取得，利用 QIAGEN 公司所發展出來的 QIAGEN plasmid purification Handbook(500) Kit，抽取質體 DNA。加入 10ml 的 Buffer P1 號溶液，混和後形成菌體懸浮液，再加入 10ml Buffer P2 號溶液，輕輕上下翻轉使均勻

混和至溶液呈黏稠狀，置於室溫中 5 分鐘後，接著加入 10ml Buffer P2 號溶液，小心搖晃混和後，可看見白色棉絮沈澱物產生，置於冰上 20 分鐘後，於 4℃ 12000rpm (Beckman, JA-17 rotor) 離心 30 分鐘後，將上清液移至事先以 Buffer QBT 10ml 潤濕過的篩管(QIAGEN tip)中，利用重力的方式將濾過的液體流掉，再加入 Buffer QC 30ml wash 兩次，接著加入 Elute Buffer QF 15ml，將液體收集後，以 10.5ml 異丙醇(isopropanol)進行 DNA 沈澱，於 4℃ 9500rpm (Beckman, JS-13 rotor) 離心 30 分鐘，將質體沈降後，利用 5ml 70%酒精清洗沈澱，經離心後，留下沈澱物，乾燥 5~10 分鐘，最後將 DNA 溶於 TE Buffer。此為高濃度的質體 DNA。

(3)DNA 濃度的測定

取 5 μ l DNA 稀釋 500 倍，以光度比色器(spectro-photometer)測定 OD.260/280 吸光度，以 OD.260/280 之比例>1.8 為標準界定所抽 DNA 之純度，1 O.D.定義為 50 μ g/ml。

三、細胞培養(Cell culture)

(一)、HepG2 和 Hep3B

為人類的肝癌細胞株(human hepatocellular carcinoma cells line)，分化良好，會分泌許多血清蛋白質，培養液中可測出 B 行肝炎表面抗原(HbsAg)，及甲型胎兒蛋白(α -fetoprotein: AFP)，由中研院生醫所楊文光老師實驗室許登美老師提供，培養於 37℃，5% CO₂ 的培養箱，以 Modified Eagle medium(MEM)培養液，外加 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum) 及 1 % penicillin/streptomycin/amphotericin B /來培養。

(二)、TE671

為人類的 neuroblastoma 細胞株，具有高度的分裂能力，適合用來作為病毒的包裝細胞株，生產病毒。原本由美國 Univ.Florida 張隆基教授經中研院生醫所楊文光老師提供，培養於 37℃，5% CO₂ 的培養箱，以 DMEM 培養液，外加 10%胎牛血清(fetal bovine serum)及 1%penicillin/streptomycin /amphotericin B /來培養。

四、重組慢病毒轉染分析(Transfection assay)

利用質體共同感染(Co-transfection)的方式製造出重組的慢病毒。

pTY-EFeGFP-ptk/AFPtk 質體中的慢病毒基因並不完整，是一種複製缺陷的病毒，所以必須藉由另一個載體 pHP (Helper construct)來提供其他的結構基因，以包裝出完整的病毒顆粒。由於此載體中含有加強型綠螢光蛋白可被流式細胞儀(FACalibur)的 FL-1 信號接受器偵測，可藉由被感染細胞的程度，觀察轉染效率。

五、訂定重組慢病毒感染的效價(infection titer)

將 TE671 細胞種在 24well plate 上，平均每個 well 有 6 $\times$ 10⁴ 細胞，置於 37℃ 5% CO₂ 培養至貼盤後 2~4 小時，此時應有約 90~100% 滿的細胞，將之前做好具有一次感染力的重組慢病毒進行感染實驗。分別感染 10 μ l、20 μ l 及 30 μ l 之不同劑量濃縮五十倍的重組慢病毒，利用流式細胞儀，偵測具有綠螢光蛋白的細胞，計算出病毒效價。

六、濃縮之重組病毒感染 HepG2 的肝癌細胞(infection)

為了證明我們所建構的重組慢病毒基因(Ptk 及 AFPtk)能否表現，並且 AFPtk 基因能特異性的表現在肝癌細胞中，將來可以運用於肝癌的基因治療及

核醫分子造影上，我們將病毒轉植至肝癌細胞中，將 HepG2 細胞種在 24well plate 上，平均每個 well 有 6×10^4 細胞，置於 37°C 5% CO₂ 隔夜培養，此時應有約 90~100% 滿的細胞，將之前做好具有一次感染力的重組慢病毒進行感染實驗。以濃縮五十倍 20 μ l 的重組慢病毒感染 HepG2 人類肝細胞，利用流式細胞儀，偵測具有綠螢光蛋白的細胞，將此細胞收下來，即為基因轉植成功的肝癌細胞株。並利用 ¹³¹I-FIAU 進行細胞聚積測試，並且觀察其隨著時間點聚積情形。

三、主要發現與結論

(一)、pLNAF0.3-TK 以 BanH I / Cla I 限制酶切割之洋菜膠電泳分析

由圖洋菜膠電泳顯示，經由限制酶酵素 BanH I / Cla I 切割，pLNAF0.3TK 質體後，發現結果與 Akio Ido 所提供的 insert DNA 片段長度與圖譜不完全相同(如圖一，1.5kbp 左右)，相較於原本序列少了約 0.5kbp，對於這樣的結果，我們所採取的策略是重新定序。

(二)、定出 AFP-tk gene 的序列

經由定序後，我們將 AFP promoter 部分，與 Genebank 上的 human AFP promoter 及 Akio Ido 博士所提供的基因序列做比對，發現三者全然相同，在 promoter 部分沒問題，也證實了 AFP promoter 部分確實存在。但在 TK 部分我們發現 Akio Ido 博士所提供的基因圖譜限制酶切點並不完全正確，HindIII 與 EcoRV 位置相反，此結果對基因往後的表現影響不大。不過值得注意的是，在 1509bp 之後的序列，與 Akio Ido 博士所提供的基因序列我們無法正確的比對出，也就是說定序後的 TK 部分比原始資料整整少了 0.5kb 左右(如序列四)，關於此，我們也比對了 AFP-TK 的 ORF(open reading frame)部分，發現雖然少了此 0.5kbp，但是其完整的起使密碼與終止密碼尚在其中，也就是說此 AFP-tk 基因，應該能完整的表現出蛋白質。

(三)、pTY-EFeGFP-AFPtk 質體之確定

經定序後的 AFPtk 基因，經由 PCR 將 N 端及 C 端分別加上一個限制酶的位置，KpnI，最後接入 pTY-EFeGFP 載體，而形成重組的慢病毒質體，為了確認 pTY-EFeGFP-AFPtk 接合後是否正確，故以限制酵素確定其所切下的片段是否與我們所預期的相同，如圖二所示，pTY-EFeGFP-AFPtk 以 Kpn I 於 37°C 反應 1 小時，跑 0.9%DNA 膠體電泳後的結果，分別切出約 9.6kbp 的 pTY-EFeGFP 載體及 1.5kb 左右的 AFPtk 基因。之後利用正反兩方向的 primer 篩選後，確認 AFPtk 基因接入表現載體的方向，進行基因轉植。

(四)、重組慢病毒轉染分析(Transfection assay)

具複製缺陷的正反方向 pTY-EFeGFP-Ptk/AFPtk 病毒，必須要利用 pHP(helper construct)及 pHEF-VSV-G(envelope expression construct)經由共同轉染 TE671 細胞的方式得到重組的病毒，製造出具有有一次感染能力卻不能在宿主細胞中複製、繁殖及傳播的重組慢病毒，經由流式細胞儀(FACalibur)的 FL-1 信號接受器偵測含有綠色螢光蛋白的 TE671 細胞，可藉由被感染細胞的程度，觀察轉染效率，如圖三所示，含 pTY-EFeGFP-Ptk forward、pTY-EFeGFP-Ptk reverse、pTY-EFeGFP-AFPtk forward、pTY-EFeGFP-AFPtk reverse 感染效率分別為 42.06%、50.61%、28.38%及 37.29%。

(五)、慢病毒感染人類肝癌細胞

將 HepG2 細胞種在 24well plate 上，平均每個 well 有 6×10^4 細胞，置於 37°C

5% CO₂ 隔夜培養培養後，此時應有約 90~100% 滿的細胞，將之前做好具有一次感染力的重組慢病毒進行感染實驗，含不同基因的慢病毒載體：

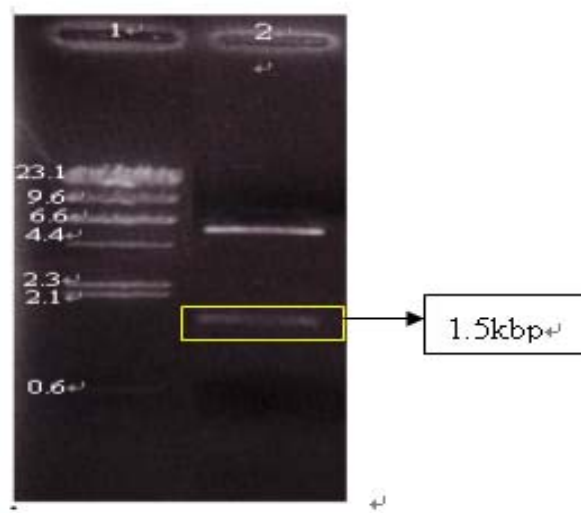
pTY-EFeGFP-Ptk forward(MOI=0.36)，pTY-EFeGFP -Ptk reverse (MOI=0.37)，

pTY-EFeGFP -AFPtk forward (MOI=0.02)，pTY-EFeGFP-AFPtk reverse

(MOI=0.04)，分別感染 HepG2 細胞，經由螢光顯微鏡觀察到螢光的反應，表示基因轉植成功(如圖五、六顯示)，可進一步利用流式細胞儀將含有螢光基因的細胞收下來，進行放大培養，及一系列的分析實驗。

(六)、HSV1-tk 基因轉植及基因未轉植之人類肝癌細胞對於 ¹³¹I-FIAU 攝取評估

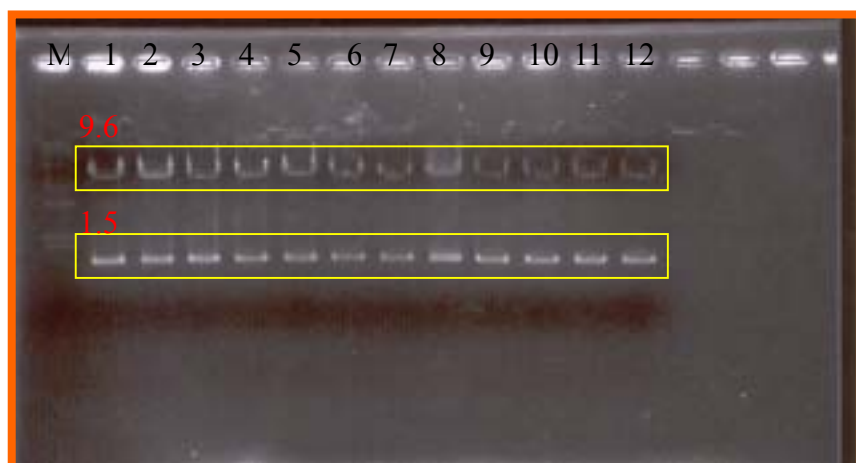
HSV1-tk 基因轉植之人類肝癌細胞 HepG2，初次利用 ¹³¹I-FIAU 進行細胞測試(如圖七及八)，我們並沒有得到預期的細胞累積情形，從過去的文獻瞭解，肝臟組織細胞本身及具有大量的 TK 表現及活性，因此對於其他組織而言，肝臟在 ¹³¹I-FIAU 或者 ¹⁸F-FHBG 應用上是較為 critical organ。對於這樣的結果，我們經由楊文光老師的建議，在細胞培養過程中加入 HAT medium 培養細胞，由於 HAT medium 可阻斷細胞 de novo pathway，應該可以阻止細胞利用本身的 cellular thymidine kinase，但細胞必須要有 TK 才能生存，故這時外源性 TK 酵素(viral thymidine kinase)就必須發揮功能，所以吸收的 ¹³¹I-FIAU 就較多同時這些 trasferred TK 基因就可大量表現。如圖九及十，經 HAT medium 培養兩週後，進行細胞吸收 ¹³¹I FIAU 測試，在有 TK 基因轉植的肝癌細胞株，明顯的比沒有基因轉植的細胞株有較高的累積。另外我們也發現，HSV-tk 的表現程度，由泡疹病毒本身的促進者(promoter)所啟動的基因比 AFP 啟動子所啟動的基因表現的更好；與 5'長端重複(LTR)中的促進者方向相反(revrese orientation)的 HSV-tk 基因(內部基因)，比正向(forward orientation)的表現更好。這是由於 5'-LTR 的 CMV promoter 功能較強因相互干擾而降低 TK construct 之 promoter 的效率,另外,revverse promoter 因反向故比較不受牽引。



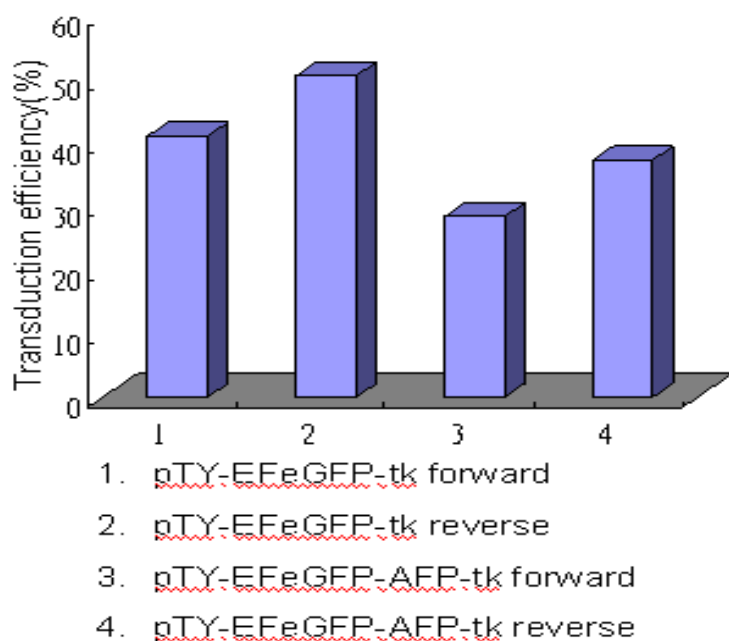
Lane 1 : marker

Lane 2 : BanH I / Cla I

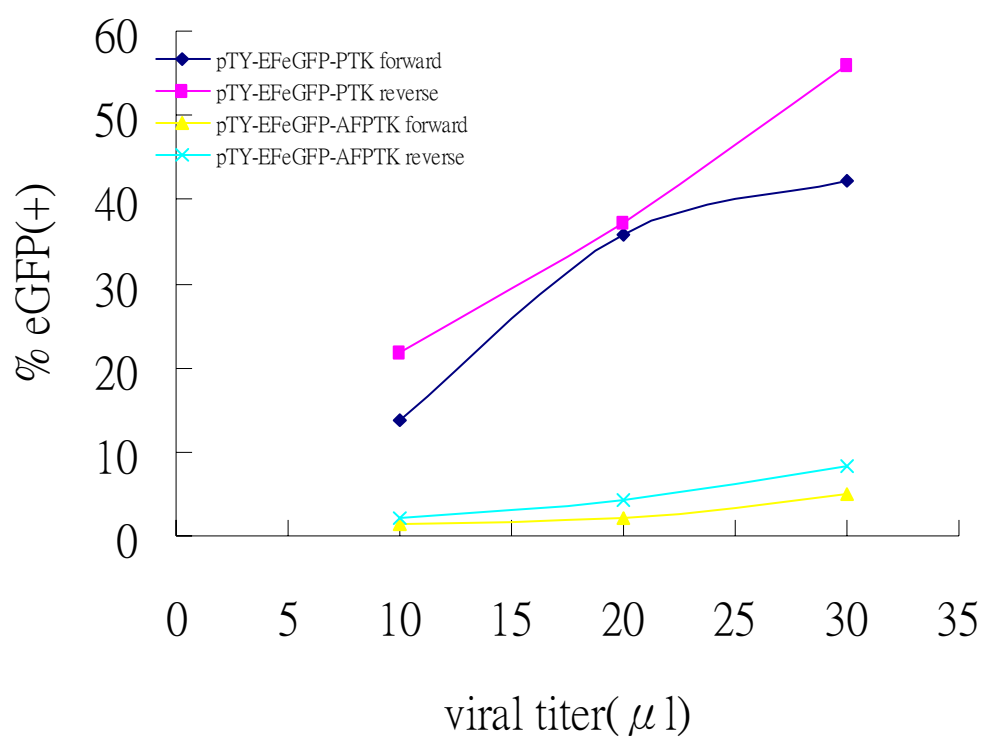
圖一：pLNAF0.3AFP-tK 以 BanH I / Cla I 限制酶切割之洋菜膠電泳分析圖



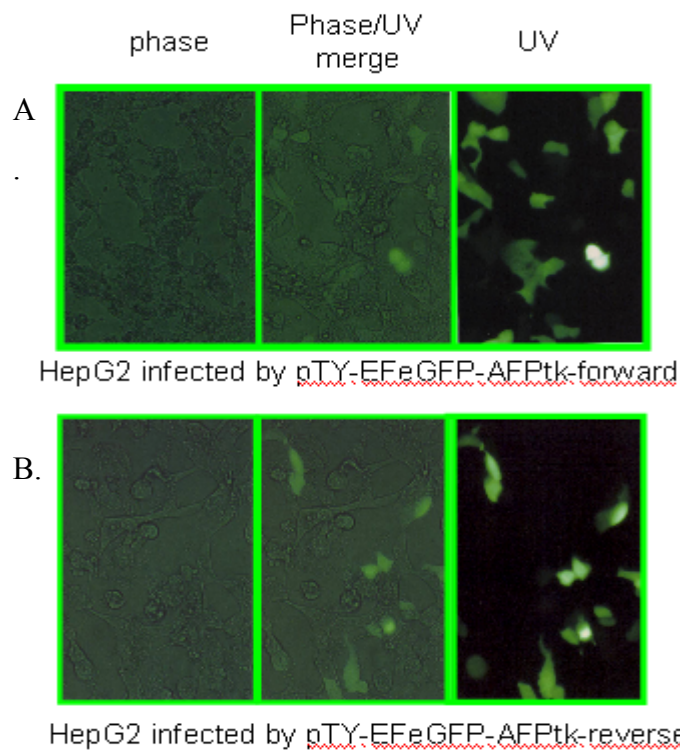
圖二：經限制酶 Kpn I 作用後之重組質體 pTY-EFeGFP-AFPtk 的洋菜膠體電泳分析圖



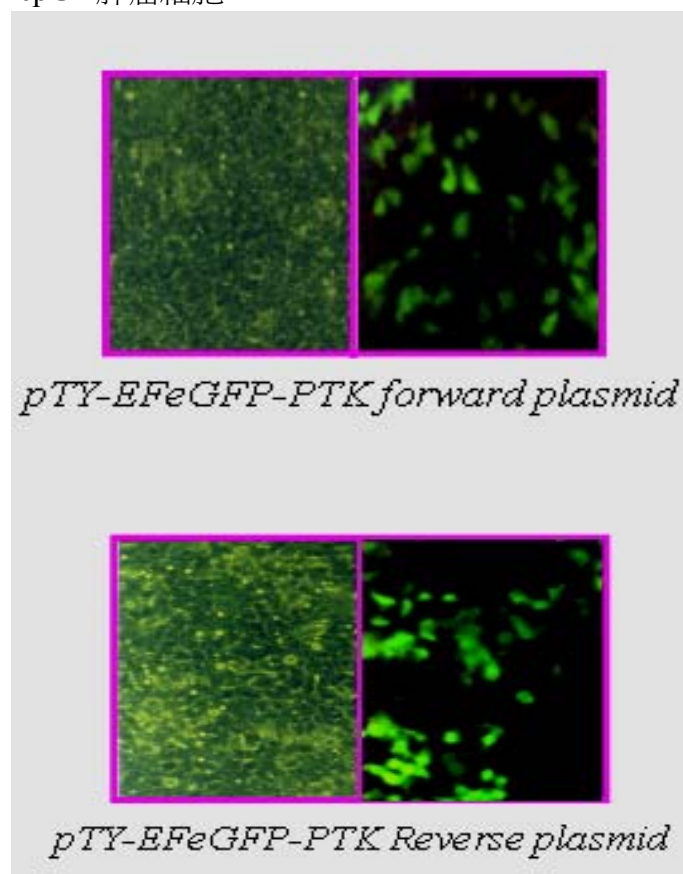
圖三：不同的重組慢病毒轉染 TE671 之轉染分析(Transfection assay)



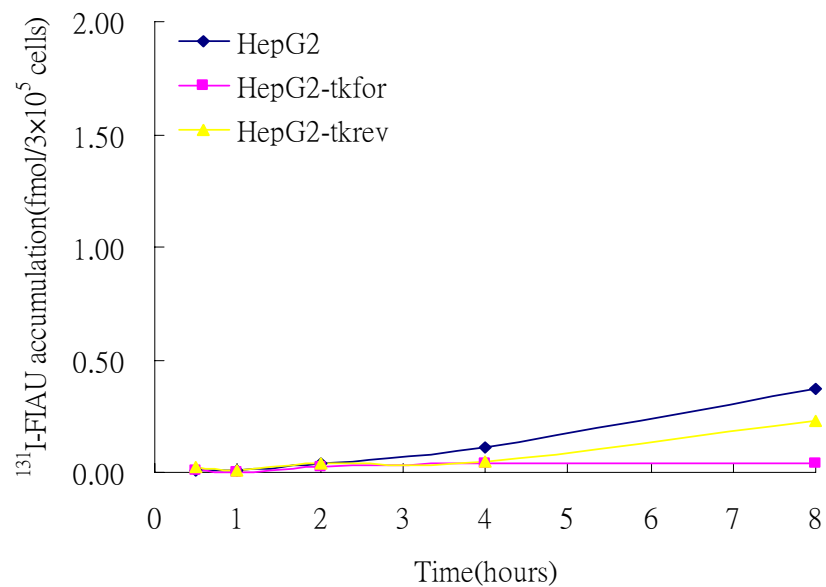
圖四：訂定重組慢病毒的效價(titer)



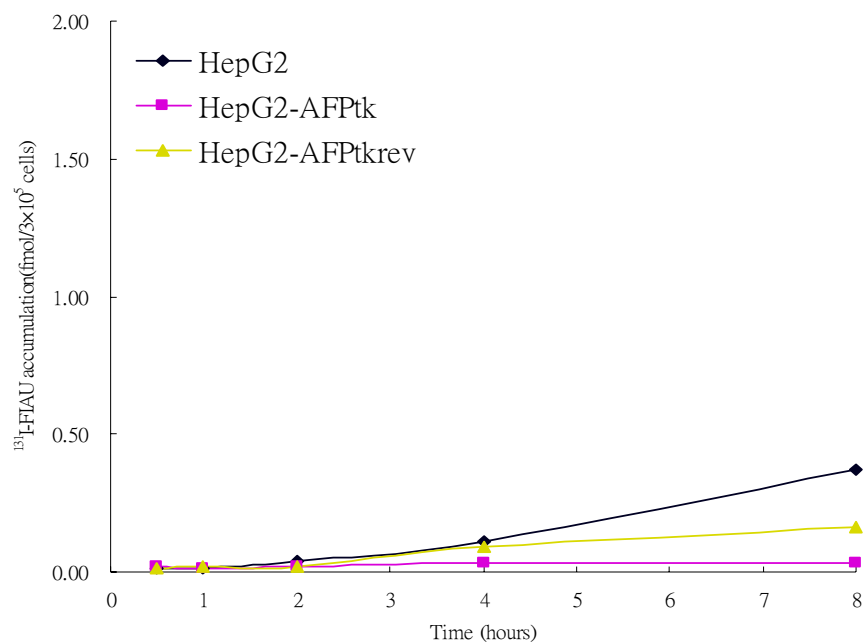
圖五：重組病毒 pTY-EFeGFP-AFPtk forward/reverse 感染人類 HepG2 肝癌細胞



圖六：重組病毒 pTY-EFeGFP-Ptk forward/reverse 感染人類 HepG2 肝癌細胞



圖七：HSV-tk 基因轉植及基因未轉植之人類肝癌細胞對於 ^{131}I -FIAU 攝取評估



圖八：HSV-tk 基因轉植及基因未轉植之人類肝癌細胞對於 ^{131}I -FIAU 攝取評估

四、參考文獻

1. Kwong,Y.L. Gene therapy---perspectives and promises. Hong. Kong. Med. J. 3, 163-172 (1997).
2. Verma,I.M. & Somia,N. Gene therapy -- promises, problems and prospects. Nature 389, 239-242 (1997).
3. Kitamura,M. & Fine,L.G. Gene transfer into the kidney: promises and limitations. Kidney Int. Suppl 60, S86-S90 (1997).
4. Chao,Y. et al. Gene therapy with tumor vaccine increases the survival of hepatoma-bearing mice. Zhonghua Yi. Xue. Za Zhi. (Taipei) 62, 682-689 (1999).
5. Chen,Y.M., Yang,W.K., Whang-Peng,J., Tsai,C.M. & Perng,R.P. An analysis of cytokine status in the serum and effusions of patients with tuberculous and lung cancer. Lung Cancer 31, 25-30 (2001).
6. Wang,J. et al. Paradoxical effect of GM-CSF gene transfer on the tumorigenicity and immunogenicity of murine tumors. Int. J. Cancer 75, 459-466 (1998).
7. Watanabe,Y. [Cancer gene therapy by IFN gene transfer]. Tanpakushitsu Kakusan Koso 40, 2700-2708 (1995).
8. Sato,Y. & Niitsu,Y. [Gene therapy of cancer using TNF gene]. Tanpakushitsu Kakusan Koso 40, 2694-2699 (1995).
9. Boon,T., Coulie,P.G. & Van den,E.B. Tumor antigens recognized by T cells. Immunol. Today 18, 267-268 (1997).
10. Huang,T.S., Kuo,M.L., Shew,J.Y., Chou,Y.W. & Yang,W.K. Distinct p53-mediated G1/S checkpoint responses in two NIH3T3 subclone cells following treatment with DNA-damaging agents. Oncogene 13, 625-632 (1996).
11. Nielsen,L.L. & Maneval,D.C. P53 tumor suppressor gene therapy for cancer. Cancer Gene Ther. 5, 52-63 (1998).
12. Agrawal,S. Antisense oligonucleotides: towards clinical trials. Trends Biotechnol. 14, 376-387 (1996).
13. Paillot,R. et al. Activation-dependent lymphocyte apoptosis induced by methotrexate. Transplant. Proc. 30, 2348-2350 (1998).
14. Revillard,J.P., Adorini,L., Goldman,M., Kabelitz,D. & Waldmann,H. Apoptosis: potential for disease therapies. Immunol. Today 19, 291-293 (1998).
15. Genestier,L. et al. Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells. J. Clin. Invest 102, 322-328 (1998).
16. Kiselev,S.M., Lutsenko,S.V., Severin,S.E. & Severin,E.S. Tumor angiogenesis inhibitors. Biochemistry (Mosc.) 68, 497-513 (2003).
17. Davis,B.M., Koc,O.N., Lee,K. & Gerson,S.L. Current progress in the gene therapy of cancer. Curr. Opin. Oncol. 8, 499-508 (1996).
18. Yang,X., Jia,L., Wei,L., Zuo,W. & Song,S. [Correlation of expression levels of multidrug resistance gene 1 (mdr1) mRNA, multidrug resistance-associated protein (MRP), and P-glycoprotein (P-gp) with chemotherapy efficacy in malignant lymphomas]. Zhonghua Yi. Xue. Za Zhi. 82, 1177-1179 (2002).
19. Moolten,F.L. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine

- kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.* 46, 5276-5281 (1986).
20. Moolten, F.L. Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther.* 1, 279-287 (1994).
 21. Miller, W.H. & Miller, R.L. Phosphorylation of acyclovir (acycloguanosine) monophosphate by GMP kinase. *J. Biol. Chem.* 255, 7204-7207 (1980).
 22. Wei, S.J. et al. Involvement of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand in apoptosis induced by ganciclovir treatment of tumor cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase. *Gene Ther.* 6, 420-431 (1999).
 23. Wei, S.J. et al. S- and G2-phase cell cycle arrests and apoptosis induced by ganciclovir in murine melanoma cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase. *Exp. Cell Res.* 241, 66-75 (1998).
 24. Mullen, C.A. Metabolic suicide genes in gene therapy. *Pharmacol. Ther.* 63, 199-207 (1994).
 25. Ilsley, D.D., Lee, S.H., Miller, W.H. & Kuchta, R.D. Acyclic guanosine analogs inhibit DNA polymerases alpha, delta, and epsilon with very different potencies and have unique mechanisms of action. *Biochemistry* 34, 2504-2510 (1995).
 26. Mar, E.C., Chiou, J.F., Cheng, Y.C. & Huang, E.S. Human cytomegalovirus-induced DNA polymerase and its interaction with the triphosphates of 1-(2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranosyl)-5-methyluracil, -5-iodocytosine, and -5-methylcytosine. *J. Virol.* 56, 846-851 (1985).
 27. Mar, E.C., Chiou, J.F., Cheng, Y.C. & Huang, E.S. Inhibition of cellular DNA polymerase alpha and human cytomegalovirus-induced DNA polymerase by the triphosphates of 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine. *J. Virol.* 53, 776-780 (1985).
 28. Ishikawa, H. et al. Retrovirus-mediated gene therapy for hepatocellular carcinoma with reversely oriented therapeutic gene expression regulated by alpha-fetoprotein enhancer/promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 1034-1040 (2001).
 29. Ishikawa, H. et al. Utilization of variant-type of human alpha-fetoprotein promoter in gene therapy targeting for hepatocellular carcinoma. *Gene Ther.* 6, 465-470 (1999).
 30. Xu, D.H., Ge, K., Zheng, Z.C. & Liu, X.Y. Specific Expression of Suicide Gene in Liver Cancer Cells Mediated by Adenovirus. *Sheng Wu Hua Xue. Yu Sheng Wu Wu Li Xue. Bao. (Shanghai)* 30, 335-338 (1998).
 31. Engelmann, C. et al. Importance, mechanisms and limitations of the distant bystander effect in cancer gene therapy of experimental liver tumors. *Cancer Lett.* 179, 59-69 (2002).
 32. Uto, H. et al. Hepatoma-specific gene therapy through retrovirus-mediated and targeted gene transfer using an adenovirus carrying the ecotropic receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 550-555 (1999).
 33. Anderson, W.F. Gene therapy. *Sci. Am.* 273, 124-128 (1995).
 34. Wiebe, L.I., Morin, K.W. & Knaus, E.E. Radiopharmaceuticals to monitor gene transfer. *Q. J. Nucl. Med.* 41, 79-89 (1997).
 35. Larson, S.M., Tjuvajev, J. & Blasberg, R. Triumph over mischance: a role for nuclear medicine in gene therapy. *J. Nucl. Med.* 38, 1230-1233 (1997).
 36. Service, R.F. New probes open windows on gene expression, and more.

- Science 280, 1010-1011 (1998).
37. Gambhir, S.S. et al. Imaging transgene expression with radionuclide imaging technologies. *Neoplasia*. 2, 118-138 (2000).
 38. Kassis, A.I., Adelstein, S.J. & Mariani, G. Radiolabeled nucleoside analogs in cancer diagnosis and therapy. *Q. J. Nucl. Med.* 40, 301-319 (1996).
 39. Tjuvajev, J.G. et al. Noninvasive imaging of herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression: a potential method for monitoring clinical gene therapy. *Cancer Res.* 56, 4087-4095 (1996).
 40. Deng WP, Chang, J.S., Lai, W.F., Wang, S.E., Ting, G. & Yang, W.K., Lin, R.S. Non-invasive mapping of gene expression for gene therapy with molecular medicine imaging. *Ann Nucl Med Sci*, 14:237-246 (2001)
 41. Tjuvajev, J.G. et al. Imaging herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression by positron emission tomography. *Cancer Res.* 58, 4333-4341 (1998).
 42. Tjuvajev, J.G. et al. Imaging the expression of transfected genes in vivo. *Cancer Res.* 55, 6126-6132 (1995).
 43. MacLaren, D.C. et al. Repetitive, non-invasive imaging of the dopamine D2 receptor as a reporter gene in living animals. *Gene Ther.* 6, 785-791 (1999).
 44. Neve, K.A., Cox, B.A., Henningsen, R.A., Spanoyannis, A. & Neve, R.L. Pivotal role for aspartate-80 in the regulation of dopamine D2 receptor affinity for drugs and inhibition of adenylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* 39, 733-739 (1991).
 45. Funk, C., Ponelle, C., Scheuermann, G. & Pantze, M. Cholestatic potential of troglitazone as a possible factor contributing to troglitazone-induced hepatotoxicity: in vivo and in vitro interaction at the canalicular bile salt export pump (Bsep) in the rat. *Mol. Pharmacol.* 59, 627-635 (2001).
 46. Morin, K.W., Atrazheva, E.D., Knaus, E.E. & Wiebe, L.I. Synthesis and cellular uptake of 2'-substituted analogues of (E)-5-(2-[125I]iodovinyl)-2'-deoxyuridine in tumor cells transduced with the herpes simplex type-1 thymidine kinase gene. Evaluation as probes for monitoring gene therapy. *J. Med. Chem.* 40, 2184-2190 (1997).
 47. Robbins, P.D., Tahara, H. & Ghivizzani, S.C. Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol.* 16, 35-40 (1998).
 48. Wang, H.E., Deng, W.P., Peng, C.J., Wu, T.W., Chang, C.W., Yu, H.Y., Liu, R.S. & Lin, W.J. Non-invasive gene probe in a HSV-1 tk gene therapy model. *J. of Nucl Med* 42:276 (2001)
 48. Deng, W.P., Yang, W.K., Lai, W.F., Liu, R.S., Hwang, J.J., Yang D.M., Wu C.W., Fu, Y.K. & Wang, H.E.. Non-invasive in vivo imaging with radiolabeled FIAU for monitoring cancer gene therapy using herpes simplex virus type 1 thymidine and ganciclovir. *Eur. J. Nucl. Med*(2003)(in press)
 49. Wang, H.E., Deng, W.P., Chang, P.F., Chang, C.W., Liu, R.S., Lin, W.J., & Ting, G. Evaluation and comparison of ¹⁸F-FHBG and ¹³¹I-FIAU as gene probes in gene therapy. *J. of Nucl Med* 43:276 (2002)
 50. Gottesman, M.M. Cancer gene therapy: an awkward adolescence. *Cancer Gene Ther.* 10, 501-508 (2003).
 51. Hansen, A.C. & Pedersen, F.S. Safety features of retroviral vectors. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4, 324-333 (2002).