

[文章编号] 1000-1182(2006)03-0261-04

携带细胞周期调控基因p14^{ARF}的重组腺病毒的构建

鲜均明¹, 周光耀², 梁传余², 刘世喜²

(1.四川大学基础与法医学院 人体解剖学教研室; 2.四川大学华西医院 耳鼻咽喉科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 构建携带参与细胞周期调控的p14^{ARF}基因的重组腺病毒载体。方法 将野生型p14^{ARF}全长cDNA基因片段插入腺病毒载体质粒pAdTrack-CMV, 与骨架质粒在大肠杆菌BJ5183胞内进行同源重组, 经293细胞包装、扩增后得到携带p14^{ARF}的重组腺病毒AdEasy-GFP-p14^{ARF}。结果 成功构建了AdEasy-GFP-p14^{ARF}的重组腺病毒载体系统, 经测定腺病毒载体滴度达 2.3×10^9 efu/mL。结论 构建的重组腺病毒AdEasy-GFP-p14^{ARF}可望有效地将p14^{ARF}基因导入喉癌细胞株/组织内, 为进一步研究喉癌细胞信号转导干预治疗机制提供实验基础。

[关键词] 细胞信号转导; 重组腺病毒; 基因治疗; 喉癌

[中图分类号] Q782 **[文献标识码]** A

Construction of Recombinant Adenovirus Vector Carrying Cell Cycle Controlling Gene-p14^{ARF} XIAN Jun-ming¹, ZHOU Guang-yao², LIANG Chuan-yu², LIU Shi-xi². (1. Dept. of Human Anatomy, Institute of Predclinical Medicine and Forensic Medicine, Schuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Otolaryngology, West China Hospital, Schuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective The recombinant adenovirus vector carrying p14^{ARF} gene was constructed for using in the interference therapy in signal transduction of laryngeal squamous cell carcinoma. Methods The total cDNA fragment of p14^{ARF} was cloned into the shuttle plasmid pAdTrack-CMV, with the resultant plasmid and the backbone plasmid pAdEasy-1, the homologous recombination took place in the E.Coli BJ5183 and the recombinant adenoviral plasmid was generated. The adenoviruses were packaged and amplified in the 293 cells. Then the viral titer was checked by GFP. Results The recombinant adenovirus vector carrying p14^{ARF} was constructed successfully. The viral titer was 2.3×10^9 . Conclusion The recombinant adenovirus vector could introduce p14^{ARF} gene into the laryngeal squamous cell carcinoma line or tumor tissue effectively, which would provide experimental basis for the mechanisms and further study of the interference therapy in signal transduction of laryngeal squamous cell carcinoma.

[Key words] cell signal transduction; recombinant adenovirus; gene therapy; laryngeal squamous cell carcinoma

细胞的功能活动受细胞信号转导通路的调控, P16是细胞增殖信号转导通路中重要的蛋白质, p14^{ARF} (p16) 基因在信号转导中起重要作用, 参与细胞周期调控。喉癌细胞呈现高频率的p14^{ARF}基因突变或纯合子缺失。本研究采用重组腺病毒AdEasy-1系统^[1], 构建携带p14^{ARF}基因片段的重组腺病毒, 为进一步研究喉癌细胞信号转导干预治疗机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 腺病毒载体系统、菌种和主要试剂

腺病毒载体 AdEasy Vector System 购自美国

Stratagen公司, 其中骨架质粒pAdEasy-1(氨苄青霉素抗性)为缺失E1区、E3区的5型野生型腺病毒基因组质粒, 穿梭质粒pAdTrack-CMV(卡那霉素抗性)带有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因。

大肠杆菌BJ5183(链霉素抗性)购自美国Stratagen公司; 大肠杆菌JM109、DH5 为成都地奥制药集团有限公司新药研究所保存。腺病毒E1基因转化的人胚肾细胞(293细胞)由成都地奥制药集团有限公司药物研究所传代保存。

限制性内切酶Bgl^{II}、Hind^{III}购自大连Takara生物工程有限公司; Pme^I、Pac^I内切酶以及快速连接试剂盒(quick ligation TM kit)购自美国NEB公司; RT-PCR试剂盒、去磷酸化试剂盒、DNA提取试剂盒及小规模质粒提取试剂盒购自美国Takara公司。

含p14^{ARF}基因全长cDNA的重组质粒pBluescript SK⁺ (+/-)-p14^{ARF}由美国Johns Hopkins大学肿瘤中心

[收稿日期] 2005-09-21; [修回日期] 2005-12-23

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(0040205401078); 四川省青年科技基金资助项目(04ZQ026-024)

[作者简介] 鲜均明(1968-), 男, 四川人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 刘世喜, Tel: 13982063567

惠赠。

1.2 细胞培养

293细胞于含10%小牛血清、青霉素100 IU/mL、链霉素100 IU/mL的DMEM完全培养基中在37℃、5%CO₂条件下培养,备用。

1.3 重组腺病毒AdEasy- GFP- p14^{ARF}的构建

本研究采用同源重组法^[2]构建携带p14^{ARF}基因片段的重组腺病毒AdEasy- GFP- p14^{ARF}。

1.3.1 目的基因片段的获得及扩增 将携带p14^{ARF}全长cDNA的p14^{ARF}质粒转化大肠杆菌JM109,提取质粒。用BamH I +Xho I 内切酶消化质粒DNA,分离、切取、纯化630 bp的p14^{ARF}DNA片段,并鉴定、定量。使用载体质粒pAdTrack- CMV、pAdEasy- 1分别转化大肠杆菌DH5⁺后,提取质粒DNA,然后分别使用Hind III、Bgl II、BamH I 内切酶鉴定、定量。用Bgl II +Xho I 内切酶消化pAdTrack- CMV质粒,鉴定、纯化后,对线性化载体作去磷酸化处理,纯化载体DNA,完成载体的准备。将p14^{ARF} 630 bp片段与去磷酸化线性载体按分子比约为5:1、总量约100 ng混合,以T4DNA连接酶进行连接及转化。挑取单克隆以p14^{ARF}cDNA引物进行重组载体PCR筛选,同时设阴性和阳性对照。PCR引物序列为: Sense: 5'-GGTCTTGGTGACCCCTCCG-3'; Antisense: 5'-GCATGGTTACTGCCTCTGG-3'。将PCR筛选阳性的菌液取1 μL加入5 mL培养基中再过夜培养,以质粒提取试剂盒小量提取质粒DNA,以Sac I 酶切确认重组质粒并测序。

1.3.2 重组腺病毒质粒pAdEasy- GFP- p14^{ARF}的生成

参照文献[3]的方法制备大肠杆菌BJ5183感受态细胞。取约100 ng用细胞培养液稀释至10 μL,常规方法转化包含pAdEasy- 1的大肠杆菌BJ5183感受态细胞。转化细胞涂布于LB/Kana培养基平板,培养16—20 h后挑取10—20个最小的单克隆菌落,于2 mL LB/Kana液体培养基中培养15—20 h,取少量菌液作PCR筛选;同时碱裂解法小量制备质粒DNA,通过凝胶电泳与pAdEasy- 1空质粒比较大小,初步筛选重组腺病毒质粒。将筛选出的重组腺病毒质粒DNA纯化,以Pac I 酶切,若产生一大片段及约3.0或4.5 kb的小片段,即确认为重组腺病毒质粒。取1—2 μL质粒转化DH5⁺或JM109感受态细胞,并挑取单克隆菌落大量培养后用于大量提取质粒DNA。

1.3.3 重组腺病毒AdEasy- GFP- p14^{ARF}的包装、扩增

293细胞培养于25 cm²的培养瓶中,达50%—70%融合时进行转染。转染方法参照参考文献[2],定期用荧光显微镜监测GFP表达。转染后7—10 d收集病毒上清,取上清的30%—50%再次转染约50%—70%

融合的293细胞,荧光显微镜监测GFP表达。转染后3—5 d同法收集重组腺病毒上清,可反复于293细胞中扩增病毒至所需滴度。另设未装载p14^{ARF}基因片段的重组腺病毒AdEasy- GFP作为阴性对照。

1.3.4 重组腺病毒AdEasy- GFP- p14^{ARF}的鉴定 经检测GFP表达确认重组腺病毒包装成功后,取1 μL病毒上清,加入5 μL蛋白酶K,55℃反应1 h后,水浴煮沸5 min。取1 μL为模板,以p14^{ARF}cDNA引物作PCR反应,PCR反应条件同前。取10 μL PCR产物行琼脂糖凝胶电泳。同法处理阴性对照腺病毒。

1.3.5 重组腺病毒AdEasy- GFP- p14^{ARF}滴度测定 接种293细胞于24孔板,按不同稀释倍数稀释病毒液,每一稀释倍数设3个复孔,分别取250 μL病毒液加入293细胞中。于CO₂孵箱中37℃孵育30 min后,弃旧培养基,加入新鲜的DMEM低糖完全培养基,继续培养18—24 h后弃培养液,倒置培养板于荧光显微镜下计数发绿色荧光的细胞,通过观察24 h后带绿色荧光细胞的数量以确定病毒滴度。1个发光的细胞即为1个表达单位(expression-forming units, efu)。病毒滴度计算公式如下:病毒滴度(efu/mL)=发绿色荧光的细胞数×病毒稀释倍数^{-0.25}。

1.3.6 病毒纯化浓缩 用病毒纯化试剂盒从收获的病毒上清液及细胞培养上清液收集纯化病毒颗粒,按上述方法确定病毒滴度。

2 结果

2.1 含p14^{ARF}基因全长cDNA- pAdTrack- CMV重组质粒的构建

以BamH I 和Xho I 酶切质粒pBluescript SK⁺ (+/-)-p14^{ARF},得630 bp的p14^{ARF}片段(图1)和3.1 kb的载体片段,与预期结果一致,并经测序证实。

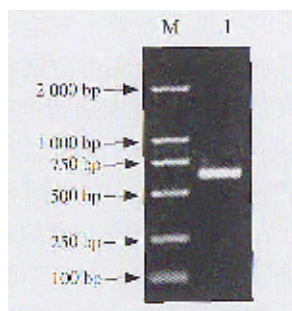
2.2 p14^{ARF}- AdTrack- CMV重组质粒的筛选鉴定

用限制性内切酶Sac I 酶切重组质粒及空质粒,重组质粒产生6.5 kb、2.7 kb和630 bp大小的3个片段;空质粒载体产生6.5 kb和2.7 kb大小的2个片段。将筛选出的重组质粒以Pme I 酶切线性化,电泳结果如图2所示。Pme I 酶切线性化的重组质粒经去磷酸化处理后纯化,经电泳检查DNA完整。

2.3 大肠杆菌BJ5183内同源重组产生pAdEasy- p14^{ARF}重组腺病毒质粒筛选和鉴定

pAdTrack- CMV- p14^{ARF}重组质粒转化包含腺病毒骨架质粒pAdEasy- 1的大肠杆菌BJ5183后,挑取6个菌落培养后提取质粒,与pAdEasy- 1空质粒对照电泳,结果如图3所示。由图3可见,挑取的菌落可能均为重组菌株。选择2个质粒以Pac I 酶切,电泳结果表明2个质粒均为重组腺病毒质粒,产生大小

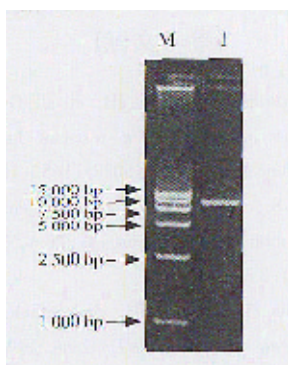
分别约为34 kb和4.5 kb的片段。



M: DL 2 000 DNA Marker; 1: p14^{ARF}

图 1 胶回收纯化的p14^{ARF} 630 bp片段

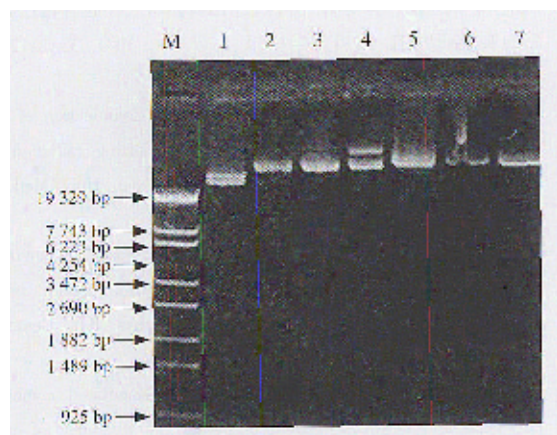
Fig 1 Reclaiming and clearing p14^{ARF} 630 bp fragment



M: DL 15 000 DNA Marker; 1: pAdTrack-CMV-p14^{ARF}重组质粒

图 2 Pme 酶切线性化pAdTrack-CMV-p14^{ARF}重组质粒

Fig 2 Pme digests and linearizes p14^{ARF}-AdTrack-CMV recombinant plasmid



M: -EcoT14 digested DNA Marker;

1: pAdEasy-1空质粒对照; 2—7: 从6个克隆菌落中提取的质粒

图 3 重组AdEasy-p14^{ARF}质粒的筛选

Fig 3 Bolting AdEasy-p14^{ARF} recombinant plasmid

2.4 重组腺病毒AdEasy-p14^{ARF}的包装和扩增

Pac 酶切AdEasy-p14^{ARF}重组腺病毒质粒，线性化后转染293细胞，观察细胞病变并用荧光显微镜监测293细胞中GFP的表达。转染后3 d可见少量细胞变圆脱落，约10%的细胞有GFP表达，7 d后大量细胞变圆脱落或收缩成团块并成片脱落，GFP表达明显增加，此时收集细胞，反复冻融裂解细胞后收集病毒上清。用病毒上清再感染50%—70%融合

的293细胞进行扩增，感染3代后即可达到较高的病毒滴度，荧光显微镜下见大多数细胞内均有GFP表达(图4)。

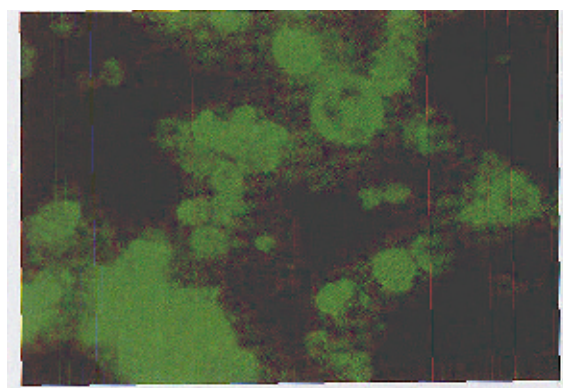
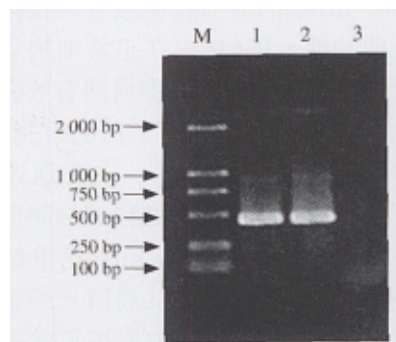


图 4 AdEasy-p14^{ARF}重组腺病毒感染293细胞后多数细胞有GFP表达 荧光显微镜 ×40

Fig 4 GFP expression was observed when AdEasy-p14^{ARF} recombinant adenovirus infected 293 cells fluorescence microscope ×40

2.5 AdEasy-p14^{ARF}重组腺病毒的鉴定

以蛋白酶K处理过的重组腺病毒上清为模板，p14^{ARF}cDNA引物作PCR，经凝胶电泳可见凝胶上有很强的p14^{ARF}cDNA扩增带(图5)。



M: DL 2000 DNA marker; 1, 2: 重组腺病毒上清; 3: 阴性对照

图 5 PCR鉴定AdEasy-p14^{ARF}重组腺病毒上清

Fig 5 Identifying AdEasy-p14^{ARF} recombinant adenovirus with PCR

2.6 重组腺病毒AdEasy-p14^{ARF}的滴度测定

经荧光计数法测得纯化前重组腺病毒上清的滴度为 1.28×10^8 efu/mL，经腺病毒纯化试剂盒纯化浓缩后的滴度为 2.3×10^9 efu/mL。

3 讨论

基因治疗的关键在于将目的基因转载入靶细胞或组织内。目前，基因转移载体技术不断进步，腺病毒载体以其转导目的基因的高效性而被认为是最有应用前景的载体系统之一，其优势体现在以下几个方面^[4]：宿主细胞广泛，对分裂与不分裂的细胞都能感染，能达到很高的转导效率。本研究中，重组腺病毒DNA电泳条带及PCR结果证实了腺病毒

重组的正确性,而且当感染复数达到600时,培养细胞的转导效率即可达到100%。以附加体形式存在于宿主细胞的细胞核内,其基因的表达比许多其他载体如质粒,甚至比逆转录病毒都高。易繁殖,所产生的病毒粒子主要积聚在细胞内,有可能收集到高滴度的病毒。本实验重组腺病毒滴度为 2.3×10^9 efu/mL,不仅可使生产重组腺病毒较为经济,也易使治疗量病毒的体积适合于在体内使用。

对人体只有轻微的致病性,不整合到宿主细胞基因组中,无引起插入突变的危险。本实验构建的携带有p14^{ARF}全长cDNA(E1、E3区缺失)的复制缺陷性腺病毒,由于腺病毒复制所必须的E1、E3区缺失,此种腺病毒在人体内不能繁殖,增加了其应用的安全性^[9]。基因组较大。

p16基因与多种肿瘤有关,又称为多肿瘤抑制基因^[6],该基因产物对CDK4的活性具有抑制作用,因而也称为P16INK4 inhibitor of CDK4)。p16基因位点存在另一个转录子p14^{ARF}(p16,鼠p19^{ARF})。在蛋白质结构上,P16及P14ARF均具有锚蛋白样重复序列(ankyrin-like repeats),借此重复序列形成凹形结构,可与CDK4、CDK6的非催化侧结合,发挥细胞增殖周期调控的功能。P16蛋白在正常细胞周期调节中起负反馈调节作用,既是细胞周期有效调控者,又是抑制肿瘤生长的关键成分^[7]。P16蛋白作用于细胞周期的G1—S期的转移过程,主要通过CDK4和CDK6介导的Rb蛋白磷酸化过程的抑制而参与细胞周期的调控。P16蛋白与cyclinD1竞争结合CDK4而特异地抑制CDK4的活性,从而阻止细胞从G1期进入S期,抑制细胞增殖,使细胞按正常程序周期分裂、生长和死亡,防止细胞周期失控变成无限制扩增、分裂、生长、最终向肿瘤发展和转化。当p16基因失活不能正常表达时,cyclinD1过表达与CDK4结合,从而使Rb蛋白磷酸化,Rb蛋白与转录因子E2F解离,游离状态的E2F激活一系列促使细胞进入S期并进行DNA复制的蛋白质表达,细胞进入S期。因此p16基因失活则CDK4过表达,过度刺激细胞分裂,促使细胞周期失控,向恶性发展^[8-9]。

在本研究中笔者正确构建了携带p14^{ARF}全长cDNA的复制缺陷性重组腺病毒载体,并制备了高滴度的重组腺病毒颗粒。这种重组腺病毒能够有效地将p14^{ARF}全长cDNA带入293细胞中^[10]。由于腺病毒的易繁殖性和宿主细胞的广泛性使重组构建的腺病毒不仅可以把p14^{ARF}基因带入每一个靶细胞中,而且可以达到很高的滴度,且具有较高的安全性,因此,

携带p16基因的复制缺陷性重组腺病毒就为p16基因对肿瘤抑制的研究提供了高效、安全、操作性强的载体模式,具有较好的临床应用前景和基础理论研究价值。本研究使用的重组腺病毒同时带有GFP基因,且与p14^{ARF}共同处于CMV启动子控制之下,因此可以方便地观察病毒的存在,估计病毒的活性,计算其滴度,乃至估计目的基因p14^{ARF}的表达量。本研究构建的重组腺病毒AdEasy-p14^{ARF}可望有效地将p14^{ARF}基因导入入喉癌组织细胞中,为进一步研究喉癌的发病机制和在基因治疗基础上对喉癌细胞信号转导进行干预治疗提供实验基础。

[参考文献]

- [1] Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line[J]. Science, 1992, 258(5088): 1650-1654.
- [2] He TC, Zhou S, da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(5): 2509-2514.
- [3] Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids[J]. Gene, 1990, 96(1): 23-28.
- [4] Adachi Y, Chandrasekar N, Kin Y, et al. Suppression of glioma invasion and growth by adenovirus-mediated delivery of a bicistronic construct containing antisense uPAR and sense p16 gene sequences[J]. Oncogene, 2002, 21(1): 87-95.
- [5] 付艳军,刘世喜,鲜均明. 外源性p16基因与放疗联合治疗喉鳞癌的实验研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2004, 35(2): 209-211.
(FU Yan-jun, LIU Shi-xi, XIAN Jun-ming. Combination of adenovirus p16(INK4A) gene therapy and ionizing radiation for laryngeal squamous cell carcinoma[J]. J Sichuan Univ(Med Sci Ed), 2004, 35(2): 209-211.)
- [6] Deng X, Kim M, Vandier D, et al. Recombinant adenovirus-mediated p14(ARF) overexpression sensitizes human breast cancer cells to cisplatin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 296(4): 792-798.
- [7] Wang L, Qi X, Sun Y, et al. Adenovirus-mediated combined p16 gene and GM-CSF gene therapy for the treatment of established tumor and induction of antitumor immunity[J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9(10): 819-824.
- [8] Liggett WH Jr, Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer[J]. J Clin Oncol, 1998, 16(3): 1197-1206.
- [9] Igaki H, Sasaki H, Tachimori Y, et al. Mutation frequency of the p16/CDKN2 gene in primary cancers in the upper digestive tract[J]. Cancer Res, 1995, 55(15): 3421-3423.
- [10] Weber HO, Samuel T, Rauch P, et al. Human p14(ARF)-mediated cell cycle arrest strictly depends on intact p53 signaling pathways[J]. Oncogene, 2002, 21(20): 3207-3212.

(本文编辑 吴爱华)