

重组腺病毒介导自杀基因 *HSV1-tk* 转染内皮祖细胞的实验研究

张国鹏, 沈艳霞, 朱小华

(华中科技大学同济医学院附属同济医院, 湖北 武汉 430030)

摘要: [目的] 构建含有自杀基因单纯疱疹病毒胸腺激酶基因 (*HSV1-tk*) 的重组腺病毒载体, 并感染大鼠骨髓来源的内皮祖细胞 (EPCs), 以期用于抗肿瘤血管生成的基因治疗及核素报告基因显像。[方法] 从大鼠骨髓中分离、培养 EPCs, 利用流式细胞术进行鉴定。构建重组腺病毒载体 Ad5-*HSV1-tk*-EGFP, 并感染 EPCs, 以腺病毒 Ad5-EGFP 为对照。利用 RT-PCR 法、Western blot 免疫印迹法检测 *HSV1-tk* 的表达, 利用 MTT 法检测更昔洛韦 (GCV) 对病毒感染后 EPCs 的杀伤作用。[结果] 流式细胞术结果显示从大鼠骨髓中分离出的 EPCs 阳性表达 CD34 (80.09%) 和 CD133 (81.75%), RT-PCR 及 Western blot 免疫印迹结果显示 *HSV1-tk* 基因在转录及蛋白水平可以正确表达, MTT 结果显示 *HSV1-tk*/GCV 自杀基因系统对 EPCs 细胞具有明显的杀伤作用。[结论] 重组腺病毒 Ad5-*HSV1-tk*-EGFP 感染 EPCs 后可以在细胞中成功表达, 并且感染后自杀基因具有生物学活性, 从而为利用 EPCs 作为载体进行肿瘤靶向基因治疗、报告基因显像提供实验依据。

关键词: 肿瘤血管生成; 内皮祖细胞; 基因治疗; 单纯疱疹病毒胸腺激酶; 腺病毒; 载体

中图分类号: R730 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X (2012) 10-0724-05

Experimental Study on Recombinant Adenovirus Vector-mediated Herpes Simplex Virus Type 1 Thymidine Kinase (*HSV1-tk*) Gene Transfecting to Endothelial Progenitor Cells

ZHANG Guo-peng, SHEN Yan-xia, ZHU Xiao-hua

(Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: [Purpose] To construct the recombinant adenovirus vector containing *herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1-tk)* gene and to transfect rat bone marrow derived endothelial progenitor cells (EPCs), which will be used in antiangiogenic therapy and report gene imaging. [Methods] EPCs were isolated from rat bone marrow, cultured and then identified by flow cytometry. The recombinant adenovirus vector Ad5-*HSV1-tk*-EGFP containing *HSV1-tk* was constructed, purified, and characterized by the gene technique. A replication-defective adenovirus carrying the enhanced green fluorescent protein gene (Ad5-EGFP) was used as a control. EPCs were infected with the recombinant adenovirus vector Ad5-*HSV1-tk*-EGFP, the expression of *HSV1-tk* was detected by RT-PCR and Western blot. The cytotoxicity of GCV (Ganciclovir) on EPCs after infection with adenovirus vector was observed by MTT assay. [Results] Flow cytometry results showed that 80.09% cells expressed CD34 and 81.75% cells expressed CD133. RT-PCR and Western blot results displayed that the *HSV1-tk* gene expressed both at transcription and protein level after EPCs were infected by Ad5-*HSV1-tk*-EGFP. The MTT assay demonstrated an obvious lethal effect of ganciclovir (GCV) on EPCs expressed *HSV1-tk*. [Conclusions] Recombinant adenovirus Ad5-*HSV1-tk*-EGFP can infect EPCs successfully and the *HSV1-tk* gene can kill the EPCs after infection. This provides a possibility for target gene therapy and reporter gene imaging of carcinoma using EPCs transfected by *HSV1-tk* gene.

Subject words: tumor angiogenesis; endothelial progenitor cells; gene therapy; *herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1-tk)*; adenovirus; vector

内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs)

基金项目: 中国教育部博士点新教师基金 (20070487139); 华中科技大学自主创新研究基金 (2011JC060)

通讯作者: 朱小华, 副教授, 硕士生导师, 博士; 华中科技大学同济医学院附属同济医院核医学科, 湖北省武汉市解放大道 1095 号 (430030); E-mail: evazhu@vip.sina.com。

收稿日期: 2012-09-03

作为一类具有趋化性、自我增殖特性, 并能分化为血管内皮细胞的前体细胞, 不仅参与胚胎时期的血管生成, 而且参与出生后的生理性和病理性血管生成。在肿瘤形成过程中, 骨髓中 EPCs 可被多种细胞因子及趋化因子动员并募集至外周血循环, 进而迁移、

归巢并参与肿瘤的血管生成^[1,2],有望作为肿瘤治疗的新靶点。

由于传统治疗方式的局限,肿瘤基因治疗利用载体将遗传物质导入细胞以产生生物学的治疗策略极具潜力^[3]。其中单纯疱疹病毒胸苷激酶(herpes simplex virus type 1 thymidine kinase,HSV1-tk)/更昔洛韦(Ganciclovir,GCV)自杀基因系统(HSV1-tk/GCV)因其具备杀伤效应及旁观者效应而备受关注^[4]。此外,HSV1-tk 还是一种最为常用的报告基因,其编码的单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV1-tk)可以磷酸化多种核苷衍生物,利用核素标记的特异性底物,可以进行活体的核素报告基因显像^[5]。因而有可能利用 EPCs 作为生物载体携带 HSV1-tk 基因进行靶向肿瘤基因治疗及核素报告基因显像监测 EPCs 的生物学行为与治疗效果。

在本研究中,分离、培养、鉴定大鼠骨髓来源的 EPCs,构建包含 HSV1-tk 编码基因的重组腺病毒载体 Ad5-HSV1-tk-EGFP(enhanced green fluoresce protein),将其转染至 EPCs,检测 HSV1-tk 基因表达及自杀基因系统(HSV1-tk/GCV)的杀伤效应,为进一步肿瘤靶向基因治疗及核素报告基因显像监测提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物:SD 大鼠(SPF 级,雄性,150~200g)由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

试剂:Percoll 细胞分离液(美国 Pharmacia),EGM-2MV 培养基(Lonza 公司),兔抗人 CD34、CD133 抗体、兔抗人 TK 单克隆抗体(Abcam 公司),Opti-MEM 无血清培养基、Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),增强型化学发光剂(enhanced chemoluminescence,ECL)自显影试剂盒(杭州碧云天生物技术有限公司),更昔洛韦(湖南五洲通制药有限公司),其余试剂均为国产分析纯。

病毒构建:重组腺病毒 Ad5-HSV1-tk-EGFP,对照病毒 Ad5-EGFP 由北京本元正阳基因技术有限公司构建及鉴定。Ad5-HSV1-tk-EGFP 感染滴度为 5.4×10^6 IU/ml(TCID₅₀ 法),对照组病毒 Ad5-EGFP 感染滴度为 6.9×10^6 IU/ml。

1.2 方法

1.2.1 EPCs 分离、培养及鉴定

SD 大鼠乙醚吸入麻醉后处死,75%乙醇浸泡 20min,剪取股骨和胫骨,用 0.01mol/L PBS 反复冲洗骨髓腔。之后将充分混匀的冲洗液缓慢加入预装 Percoll 细胞分离液的离心管(冲洗液/分离液体积比=2:1),2 500r/min 离心 20min,吸取乳白色云雾状单个核细胞层到新的离心管中,PBS 洗涤细胞 2 次,1 000r/min 离心 5min。以含 20%胎牛血清的 EBM-2MV 培养液重悬,反复轻柔吹打制成单细胞悬液,将细胞悬液按 5×10^6 /ml 的密度接种到 T75 的培养瓶,37℃、5%CO₂ 孵育。3d 后换液,细胞长至 80%融合时用 0.25%的胰蛋白酶消化,1:2 传代继续培养。收集第 7d 细胞用 CD34、CD133 抗体进行流式细胞术鉴定。

1.2.2 重组腺病毒转染 EPCs

将长至 80%融合的 EPCs 细胞经胰酶消化后接种于培养板,根据感染复数(multiplicity of infection, MOI) 计算每孔需要病毒量。病毒感染时吸去培养基,PBS 洗涤细胞 2 遍,每孔加入无血清培养基 Opti-MEM(盖满细胞表面),将病毒按照计算量加入培养孔中,每 15min 摇动 1 次,感染 2h 后,补足完全培养基至需求量,继续培养 48h。

1.2.3 RT-PCR 鉴定 HSV1-tk 基因 mRNA 转录

重组腺病毒以 MOI 为 100IU/每孔细胞来感染 EPCs,48h 后收集每孔细胞用 Trizol 试剂分别提取总 RNA,以 Oligo dT 为引物逆转录合成 cDNA 第一链。之后分别加入 TK、GAPDH 引物扩增,以 GAPDH 作为内参。HSV1-tk 上游引物为 5'-CTCACCCT-CATCTTCGACCG-3',下游引物为 5'-CCTGCAGAT-ACCGCACCCTA-3',扩增片段为 282bp;GAPDH 上游引物为 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3',下游引物为 5'-CAAAGTTGTCATGGATGAC-3',扩增片段为 195bp。反应条件为 94℃ 30s,58℃ 30s,72℃ 30s。

1.2.4 Western blot 法检测重组腺病毒转染后 HSV1-tk 蛋白表达

收集病毒感染 48h 后(MOI=100IU/每孔细胞)的 EPCs 细胞,PBS 漂洗细胞 3 次,加入细胞裂解液,提取胞浆蛋白,SDS-PAGE 电转法将蛋白转入 PVDF 膜,用 5%脱脂奶粉 TBST 4℃封闭 1h,加入兔抗人 TK 单克隆抗体(1:1 000)抗体工作液(含 5%

BSA), 以免抗 β -actin 多克隆抗体作内参对照。洗膜, 加入碱性磷酸酶标记的二抗 (1:5 000), ECL 试剂暗室自显影。用凝胶图像成像系统进行扫描。

1.2.5 MTT 检测 GCV 作用后细胞存活率

将 EPCs 细胞按 1×10^4 /孔接种于 96 孔板, 设腺病毒感染组 (MOI=100IU/每孔细胞) 及未感染组。感染步骤同上, 感染 48h 后, GCV 浓度按照 0、10、25、50、75 和 100mg/L 依次加入细胞中, 每个浓度设 3 个复孔。每天更换加药培养基。作用 72h 后, 吸去培养基, PBS 漂洗 3 遍, 每孔内加入 MTT 溶液 (5g/L) 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4h, 小心弃去上清, 每孔加入 DMSO 150 μ l, 振荡 10min 后, 酶联免疫检测仪测定 490nm 波长处吸光度值 A, 细胞存活率 (%) = $A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}} \times 100\%$ (以 GCV 浓度 0mg/L 为对照组)。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

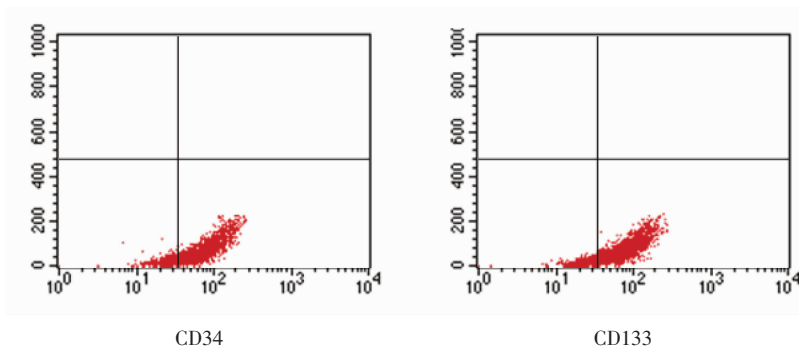
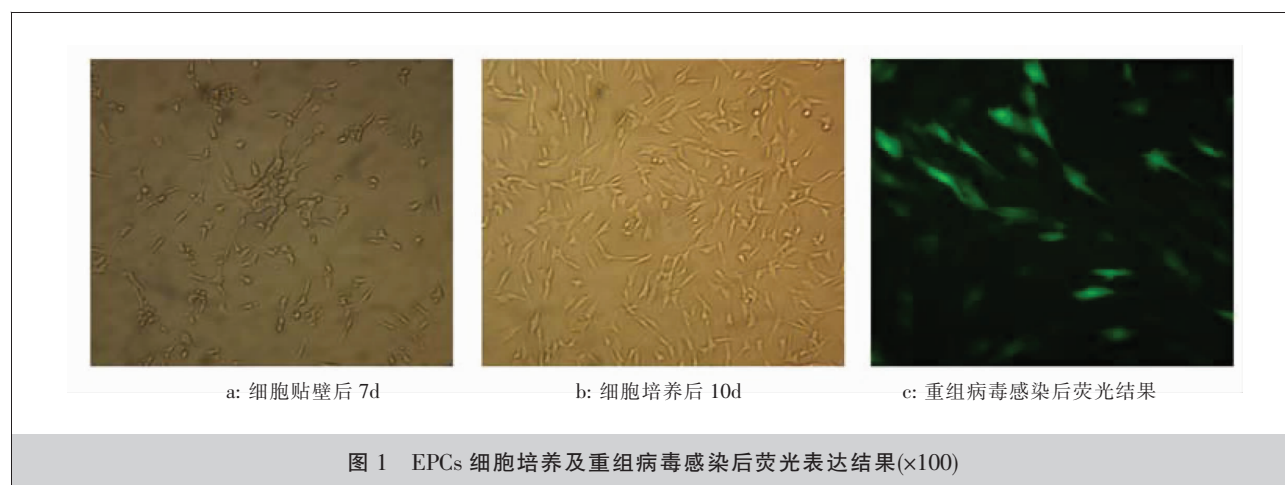
2.1 EPCs 培养及鉴定

接种 24h 后部分细胞开始贴壁, 培养至 7d 左右贴壁细胞增殖, 呈“集落”样生长, 周边出现梭形细胞 (图 1a)。10~14d 时梭形细胞明显增多 (图 1b)。培养至 10d 的 EPCs 进行重组腺病毒感染, Ad5-HSV1-tk-EGFP 病毒感染组可见绿色荧光蛋白表达 (图 1c), 而未感染组无荧光表达。

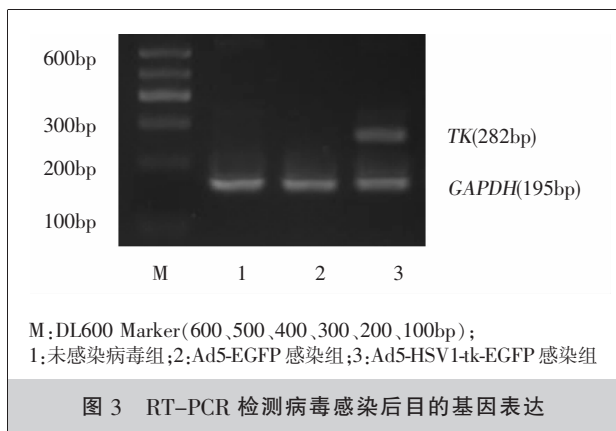
培养 7d 细胞采用流式细胞术检测 CD34、CD133 细胞表面抗原阳性表达率, 如图 2 所示, CD34 阳性率为 80.09%, CD133 阳性率为 81.75%。

2.2 HSV1-tk mRNA 的表达

Ad5-HSV1-tk-EGFP 感染 EPCs 48h 后, 通过 RT-PCR 技术检测 HSV1-tk 基因的表达情况。结果可见, Ad5-HSV1-tk-EGFP 感染组在 282bp 处出现特异性条带, 证实有 TK 编码基因表达, 对照病毒组及未感染组无 TK 基因表达, 仅于 195bp 处出现条带

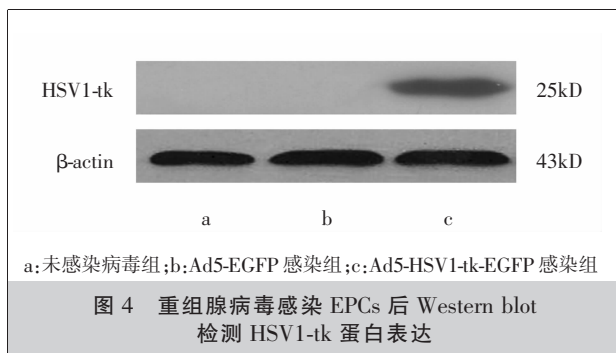


为内参 *GAPDH* 表达(图 3)。



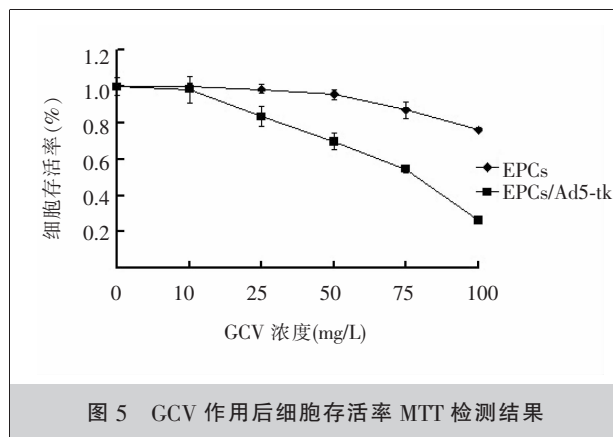
2.3 HSV1-tk 蛋白的表达

感染 Ad5-HSV1-tk-EGFP 48h 后, 提取胞浆蛋白, Western blot 印迹分析显示感染 Ad5-HSV1-tk-EGFP 组在 25kD 处出现特异性条带, 即为 HSV1-tk 产物, 而感染对照病毒 Ad5-EGFP 组及未感染组在 25kD 处未出现特异性条带, 仅于 43kD 处见特异性条带为内参表达(图 4)。



2.4 GCV 作用后 EPCs 存活率

MTT 结果(图 5)显示, 随着 GCV 剂量加大, 感染目的病毒组 EPCs 细胞存活率呈下降趋势, 且呈剂量依赖性。而在对照组中, GCV 剂量达到 25mg/L 时对细胞存活率仍然没有明显的影响, 此时 Ad5-HSV1-tk-EGFP 感染组 EPCs 抑制率已达 85.5%, 与未感染组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。对照组中, 浓度为 75mg/L 时表现出较明显的细胞抑制效应, 此时 Ad5-HSV1-tk-EGFP 感染组细胞存活率为 54.7%, 与对照组之间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。



3 讨论

肿瘤基因治疗作为一种新的治疗方式日益受到重视^[1]。HSV1-tk/GCV 自杀基因系统因具有显著的旁观者效应而备受关注。所谓旁观者效应只需少量肿瘤细胞被感染自杀基因, 就会对邻近的肿瘤细胞产生广泛的杀伤作用, 它明显扩大了自杀基因的杀伤作用。目前在体外及动物实验中取得了良好的实验结果, 但是临床实验结果不容乐观, 其主要原因为目前的基因治疗缺乏有效的载体^[6]。

恶性肿瘤的形成、侵袭以及转移有赖于新生血管的形成^[7]。目前的研究表明, 骨髓来源的 EPCs 在肿瘤血管的形成过程中起重要作用。EPCs 在一定条件下被动员至外周血中, 进而归巢至恶性肿瘤组织新生血管生成部位^[8]。随后, EPCs 主要通过两方面参与肿瘤的血管生成。一方面, EPCs 可以整合至肿瘤血管壁; 另一方面, 通过旁分泌促血管生成因子如 VEGF、G-CSF 和 GM-CSF 等加速肿瘤血管的成熟, 提高肿瘤血管壁的完整性, 使其不易发生微出血、血管破裂及肿瘤组织坏死^[9]。因此利用 EPCs 向肿瘤血管新生位点定向迁移的特性, 以 EPCs 为载体, 携带自杀基因、抗血管生成基因以及肿瘤抑制基因至肿瘤部位成为一种有效的肿瘤治疗策略。

本研究中所采用的 *HSV1-tk* 自杀基因又是一种报告基因, 其编码产物可以磷酸化多种核素标记的核苷衍生物, 进而使其内陷于细胞内, 从而导致局部放射性聚集。该酶/底物报告基因系统因其具备放大效应、显像灵敏度高而成为一种最为常用的报告基因系统^[3]。在本研究中, 使用 EPCs 作为载体, 经转导

HSV1-tk 基因后,理论上不仅仅可以实现肿瘤靶向基因治疗,同时还可以进行肿瘤基因治疗的监测。

本研究中利用密度梯度离心法分离大鼠骨髓内皮祖细胞,并且通过免疫组织化学及流式细胞术鉴定其表达抗原,结果显示通过该方法成功地培养出 EPCs。该方法较流式细胞仪分选法及免疫磁珠分离法简单易行,尽管筛选细胞纯度及特异度稍低,但细胞活力较好,有利于其未来作为生物载体的使用^[10]。

本研究中,荧光显微镜下可以观察到 Ad5-*HSV1-tk-EGFP* 感染后有绿色荧光表达,即为 EGFP 表达,证实 Ad5-*HSV1-tk-EGFP* 腺病毒载体具备感染大鼠骨髓来源 EPCs 的能力。通过 PCR、Western blot 免疫印迹实验可以看到,重组腺病毒感染大鼠骨髓来源 EPCs 后,*HSV1-tk* 基因在转录水平及蛋白水平上均可以成功表达。由此可以推论,利用腺病毒载体可以成功将 *HSV1-tk* 基因转导入骨髓来源 EPCs。

此外,为了验证载体的功能,我们进行了 GCV 干预实验。本研究中利用 MTT 法检测不同浓度 GCV 作用感染目的病毒后 EPCs 和未感染病毒 EPCs 的细胞存活率。结果表明,目的病毒转染 EPCs 细胞后,可以看到 GCV 对转染有 *HSV1-tk* 基因的 EPCs 细胞有明显的生长抑制作用,且呈剂量依赖性。而未转染基因的细胞,只有 GCV 浓度达到 50mg/L 时才开始出现对细胞生长的抑制。这表明腺病毒介导 *HSV1-tk* 基因感染 EPCs 后,*HSV1-tk* 基因不仅仅可以表达成 *HSV1-tk* 酶蛋白,而且该酶蛋白具有硫酸化底物 GCV 的生物学活性。

本研究中所使用的腺病毒载体制备简易,可以感染分裂期及非分裂期细胞,亲核性高,转染效率高,携带 DNA 容量较大^[11],因而其在基因治疗中具有广泛的适用性。但其不能整合入宿主基因组中,不能稳定长期表达,从而使基因治疗效果可能会受影响。因而在后续实验中,可以采用慢病毒载体及腺相关病毒载体等可以在体内稳定表达的载体进行进一步的研究。

本研究成功构建了重组腺病毒系统 Ad5-*HSV1-tk-EGFP*,通过体外研究证实可以成功转染大鼠骨髓 EPCs 细胞,并且感染后具有生物学活性,从而为利用 EPCs 作为细胞载体进行肿瘤靶向基因治疗,核素报告基因显像监测 EPCs 生物学行为及治疗效果

提供了可行的体外研究依据。

参考文献:

- [1] Arbab AS. Activation of alternative pathways of angiogenesis and involvement of stem cells following anti-angiogenesis treatment in glioma[J]. *Histol Histopathol*, 2012, 27(5): 549–557.
- [2] Penack O, Henke E, Suh D, et al. Inhibition of neovascularization to simultaneously ameliorate graft-vs-host disease and decrease tumor growth[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102 (12):894–908.
- [3] Cao S, Cripps A, Wei MQ. New strategies for cancer gene therapy: progress and opportunities[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37(1):108–114.
- [4] Likar Y, Dobrenkov K, Olszewska M, et al. A new acycloguanosine-specific supermutant of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase suitable for PET imaging and suicide gene therapy for potential use in patients treated with pyrimidine-based cytotoxic drugs[J]. *J Nucl Med*, 2008, 49(5):713–720.
- [5] Johnson M, Karanikolas BD, Priceman SJ, et al. Titration of variant *HSV1-tk* gene expression to determine the sensitivity of 18F-FHBG PET imaging in a prostate tumor[J]. *J Nucl Med*, 2009, 50(5): 757–764.
- [6] Parker JN, Zheng X, Luckett W, et al. Strategies for the rapid construction of conditionally-replicating HSV-1 vectors expressing foreign genes as anticancer therapeutic agents[J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(1):44–49.
- [7] Hamanishi J, Mandai M, Matsumura N, et al. Activated local immunity by CC chemokine ligand 19-transduced embryonic endothelial progenitor cells suppresses metastasis of murine ovarian cancer[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(1):164–173.
- [8] Arbab AS, Janic B, Knight RA, et al. Detection of migration of locally implanted AC133+ stem cells by cellular magnetic resonance imaging with histological findings[J]. *FASEB J*, 2008, 22 (9):3234–3246.
- [9] Janic B, Arbab AS. The role and therapeutic potential of endothelial progenitor cells in tumor neovascularization[J]. *Sci World J*, 2010, 10:1088–1099.
- [10] 吴波, 卢正秀, 王尧, 等. 兔骨髓源性血管内皮祖细胞的分离、培养及鉴定[J]. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18(2): 454–457.
- [11] Chen R, Parry JJ, Akers WJ, et al. Multimodality imaging of gene transfer with a receptor-based reporter gene [J]. *J Nucl Med*, 2010, 51 (9):1456–1463.