

携带凋亡素基因重组腺病毒的制备及诱导结肠癌细胞凋亡的实验研究

邓守恒, 陈 萍, 蔡晓军, 李林均, 曹风军

(湖北医药学院附属人民医院, 湖北 十堰 442000)

摘 要: [目的] 利用细菌内同源重组法构建携带凋亡素 VP3 基因的重组腺病毒并观察其体外诱导结肠癌细胞凋亡的作用。[方法] 设计 VP3 cDNA 扩增引物, 从 PET15b-VP3 质粒中扩增 VP3 的 DNA 序列, 与线性 pShuttle-IRES-hrGFP 连接构建 pShuttle-VP3-hrGFP 重组穿梭质粒, PCR 和 EcoR V 酶切电泳鉴定; 重组穿梭质粒经 PmeI 酶切线性化后, 转化含 pAdeasy-1 的超感受态 BJ5183 大肠杆菌, 细菌内同源重组法构建重组腺病毒质粒 pAd-VP3-hrGFP, PCR、PacI 酶切电泳及测序鉴定; 线性化重组腺病毒质粒经脂质体转染 AD293 细胞进行 pAd-VP3-hrGFP 重组腺病毒的包装和扩增, CsCl 密度梯度离心法进行病毒浓缩和纯化并将其作用人结肠癌 SW480 细胞, 观察其对细胞凋亡及周期分布的影响。[结果] pShuttle-VP3-hrGFP 重组穿梭质粒构建成功; pAd-VP3-hrGFP 重组腺病毒质粒经酶切获得一大于 23kb 的大片段和 4.5kb 的片段, PCR 反应扩增出 402bp 的片段, 测序证实 VP3-hrGFP 编码区成功克隆入腺病毒 pAd 中, 且其序列与 GeneBank 中 VP3 序列完全一致; 成功包装出携带 VP3 基因的腺病毒, 滴度为 1.738×10^{12} opu/ml, 重组腺病毒可阻滞结肠癌细胞周期于 G₀/G₁ 期, 诱导细胞凋亡, MOI 值越大作用效应越显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。[结论] 细菌内同源重组法可快速、高效制备携带凋亡素基因的重组腺病毒, 并具有较强的抗肿瘤作用, 为深入研究 VP3 基因功能提供了选择。

主题词: 同源重组; 腺病毒; 凋亡素; 结肠肿瘤

中图分类号: R73-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)07-0572-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.07.B009

Construction of Recombinant Adenovirus Containing Apoptin(VP3) Gene and Its inducing Apoptosis Effect on Human Colonic Carcinoma Cells *in vitro*

DENG Shou-heng, CHEN Ping, CAI Xiao-jun, et al.

(RenMing Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

Abstract: [Purpose] To construct recombinant adenovirus containing Apoptin (VP3) gene by using the method of homologous recombination in bacteria, and to observe its inducing apoptosis effect on human colonic carcinoma cells *in vitro*. [Methods] The VP3 DNA sequence was amplified from PET15b-VP3 and ligated into pShuttle-IRES-hrGFP to construct pShuttle-VP3-hrGFP recombinant shuttle plasmid, and it was identified with PCR and EcoR V digestion; pShuttle-VP3-hrGFP was linearized and transformed into ultracompetent BJ5183 containing pAdeasy-1, then pAd-VP3-hrGFP recombinant adenovirus plasmid was constructed and was identified by PCR, digestion and DNA sequencing. subsequently linearized recombinant adenovirus vector pAd-VP3-hrGFP was transfected into AD293 cells by liposome to generate recombinant adenovirus particles which were purified and concentrated by CsCl density gradient centrifugation. Recombinant adenovirus carrying VP3 gene was used to infect the human colonic carcinoma cells SW480, apoptosis rate and cell phase were observed by flow-cytometry. [Results] Recombined adenovirus plasmid pShuttle-VP3-hrGFP was generated successfully. Linearized pShuttle-VP3-hrGFP transformed into ultra competent colibacillus BJ5183, There were two bands 4.5kb and larger than 23kb when pAd-VP3-hrGFP was digested with PacI. A 402bp VP3 cDNA fragment was amplified by PCR. The target gene VP3-hrGFP was successfully cloned into adenovirus. The sequence of VP3 segment was identical with that published in GeneBank. Recombinant adenovirus containing VP3 gene was successfully constructed and it was generated with titers of about 1.738×10^{12} opu/L, and it could arrest human colonic carcinoma cell cycle in G₀/G₁ phase and induce cell apoptosis in dose-dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$). [Conclusion] Homologous recombination in bacteria can efficiently and conveniently construct high quality recombinant adenovirus containing VP3 gene, which provides a basis for the further research of VP3 gene.

Subject words: homologous recombination; adenovirus; apoptin(VP3); colon neoplasms

基金项目: 湖北省教育厅基金(B20122413); 湖北省卫生厅基金(QJX2008-42);

湖北医药学院创新团队基金(2014CXZ01)

通讯作者: 曹风军, 主任医师, 教授, 硕士; 湖北医药学院附属人民医院肿瘤中心,

湖北省十堰市朝阳中路 39 号(442000); E-mail: yychenping@163.com

收稿日期: 2014-07-04; **修回日期:** 2014-09-30

凋亡素 (Apoptin, VP3) 基因来源于鸡贫血病毒, 其编码产生的 VP3 蛋白具有广谱抗肿瘤特性。研究发现, VP3 蛋白可特异性诱导肿瘤细胞或转化细胞凋亡, 而对正常细胞或二倍体细胞不起作用, 因此, 其被认为是第一个真正意义上可选择性杀伤肿瘤细胞的凋亡蛋白^[1,2]。

VP3 诱导肿瘤细胞凋亡的能力与其在细胞中的定位密切相关, 研究显示, VP3 可定位于肿瘤细胞核内, 通过磷酸化反应与细胞 DNA 结合诱导肿瘤细胞凋亡, 而在正常细胞中, VP3 则定位于细胞质中不能发生磷酸化反应, 因此, 增加 VP3 蛋白的跨膜能力无疑可增强其诱导肿瘤细胞凋亡的能力, 且不会改变其对正常细胞无杀伤的特性^[3,4]。

本课题组前期通过原核表达获得的 Pep-1-VP3 融合蛋白, 理论上具有增强 VP3 蛋白的跨膜能力, 然而, 由于存在工程菌表达量低, 表达产物有包涵体需变性复性, 以及分离和纯化蛋白技术受限等原因, 使得制备的产物在后续的抗肿瘤实验中结果并不令人满意^[5]。为解决上述难题, 笔者选用腺病毒作为载体构建携带 VP3 基因的重组腺病毒并体外观察其诱导结肠癌细胞凋亡的作用, 为进一步深入研究 VP3 功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

重组质粒 PET15b-VP3、超感受态大肠杆菌 BJ5183、腺病毒穿梭质粒 pShuttle-IRES-hrGFP 和 XL10-Gold、DH5 α 、pfuDNA 聚合酶、EcoR V、PmeI、PacI、牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP)、人胚肾 AD293 和结肠癌 SW480 细胞株均由湖北医药学院临床医学研究所提供。实验仪器包括 PCR 仪 (Biometra, 德国)、高速冷冻离心机 (Hettich Universal 32R, 德国)、超速冷冻离心机 (HCP80MX, 日本)、恒温水浴摇床 (SHY-2, 江苏)、凝胶图像分析系统 (Touching 995gel document system, 上海)。

1.2 方法

1.2.1 pShuttle-VP3-hrGFP 重组穿梭质粒的构建及鉴定

以 1 μ l PET15b-VP3 为模板, 加入 20mmol/L 的上下游引物各 10 μ l, 10 $\times$ buffer 10 μ l, 50 $\times$ dNTP 2 μ l, pfuD-

NA 聚合酶 1 μ l 加蒸馏水至总体积 65 μ l。上游引物 P1: 5'-GCTAGCACTAGTCATATCATGAACGCTCTCC-AAGAA-3'; 下游引物 P2: 5'-GTCGACCGATCG-GATATCTTACAGTCTTATACGCCT-3', 划线部分为 EcoR V 酶切位点, 斜体部分与线性化穿梭质粒 pShuttle-IRES-hrGFP 切口两端序列同源, 扩增产物 402bp, PCR 反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 3min, 变性 95 $^{\circ}$ C 30s, 退火 68 $^{\circ}$ C 1min, 延伸 68 $^{\circ}$ C 30s, 35 次循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。1.5% 普通琼脂糖凝胶电泳鉴定获得 PCR 产物, 0.8% 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收 VP3 目的基因。将 EcoR V 酶切线性化的穿梭质粒 pShuttle-IRES-hrGFP 和目的基因 VP3 采用 PCR 产物定向同源重组方式连接, 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 取单克隆菌落 PCR 鉴定, PCR 反应体系: 10 $\times$ buffer 5 μ l, 50 $\times$ dNTP (10mmol/L) 1 μ l, 10 $\times$ 上游引物 P1 5 μ l, 10 $\times$ 下游引物 P2 5 μ l, pfuDNA 聚合酶 1 μ l, 含重组质粒的菌落 1 μ l、加去离子水至 50 μ l, 鉴定正确后大量培养细菌, 抽提质粒 EcoR V 酶切电泳鉴定。

1.2.2 pAd-VP3-hrGFP 重组腺病毒质粒的构建及鉴定

取上述鉴定正确的 pShuttle-VP3-hrGFP 重组穿梭质粒经 Pme I 酶切 24h 后, 3mol/L NaAc 和无水乙醇沉淀 DNA, 70% 的乙醇漂洗沉淀, 离心弃上清后用牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP) 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴中温育 1h 后放置 50 $^{\circ}$ C 恒温烤箱中去磷酸化 2h, 经酚、氯仿抽提后转化含腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 的超感受态大肠杆菌 BJ5183, 选择含卡那霉素的 TB 固体培养基铺板对含有重组质粒的 BJ5183 进行初筛, 挑取 2 个单克隆菌落, 少量培养, 碱裂解法少量提取质粒, Pac I 酶切, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 若出现一大于 23kb 和 45kb 或 30kb 的特征性条带, 即为阳性质粒, 将阳性质粒在 XL10-Gold 中大量扩增并抽提质粒进行 DNA 测序。

1.2.3 重组腺病毒 pAd-VP3-hrGFP 制备

Pme I 酶切线性化 pAd-VP3-hrGFP 重组腺病毒质粒, 脂质体包裹后转染 AD293 细胞, 荧光显微镜下观测细胞内有绿色荧光蛋白表达后, 取第一代病毒上清再转染 293 细胞, 依此重复感染数次后, 裂解细胞并收集上清, 氯化铯密度梯度离心法纯化病毒, 紫外分光光度计检测病毒 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值, 代入公式计算病毒滴度, 病毒滴度 = OD₂₆₀ $\times$ 病毒稀释倍数 $\times$

1.1×10^{12} 。

1.2.4 重组腺病毒 pAd-VP3-hrGFP 对 SW480 细胞凋亡的影响

取 1×10^4 ml SW480 细胞接种至 75cm 培养瓶,待细胞长至 80% 融合时,分为 4 组,每组复种 4 瓶,分别取 MOI 值(重复感染度)为 0、50、100、200 的病毒剂量进行感染,感染 48h 后,收集细胞,加 70% 乙醇 1ml, -20°C 固定 24h,加入 PI (终浓度为 $50 \mu\text{l/ml}$) 和 RNA 酶 (终浓度为 0.25mg/ml), 室温下避光孵育 30min,用流式细胞仪作 DNA 分析,以 ModFit LT 软件分析,拟合计算各时相细胞的百分比。

1.3 统计学处理

全部数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

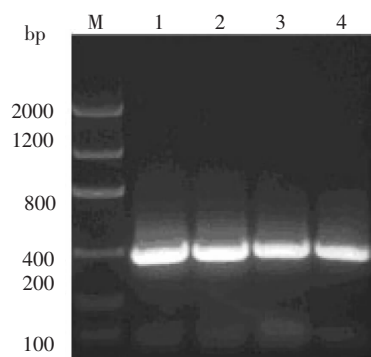
2.1 pShuttle-VP3-hrGFP 重组穿梭质粒的构建及鉴定

以 PET15b-VP3 为模板,PCR 扩增后电泳可见特征性 402bp VP3 基因扩增片断。由于 VP3 cDNA 含 *EcoR* V 酶切位点,且末端序列与线性化 pShuttle-IRES-hrGFP 相同,与经 *EcoR* V 酶切后的线性化 pShuttle-IRES-hrGFP 混合,在同源重组酶作用下发生同源重组,形成 pShuttle-VP3-hrGFP 重组穿梭质粒,将其转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,取转化菌液在 TB 琼脂糖上铺板,次日分别取多个单克隆菌落进行 PCR 扩增后电泳可见到特征性的 402bp 条带(Figure 1),大量培养阳性克隆菌落,抽提质粒 DNA 经 *EcoR* V 酶切后电泳获得 8.9kb 和 402bp 两条带(Figure 2),说明 VP3 目的基因已成功插入到 pShuttle-IRES-hrGFP 穿梭质粒中,pShuttle-VP3-hrGFP 重组穿梭质粒构建成功。

2.2 pAd-VP3-hrGFP 重组腺病毒质粒的构建及鉴定

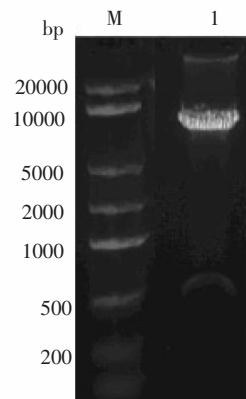
pShuttle-VP3-hrGFP 重组穿梭质粒转化含 pAdeasy-1 的超感受态大肠杆菌 BJ5183 后,含有重组质粒的细菌可在含卡那霉素的培养基中生长形成克隆菌落,挑取转化克隆菌落,小量提取质粒 DNA, *Pac* I 酶切后电泳出现一大于 23kb 和 45kb 的片段(Figure 3),说明 pAdeasy-1 与 pShuttle-VP3-hrGFP 在复制起始位点与右臂之间发生了同源重组。pAd-VP3-hrGFP 目的基因测序结果显示与 GeneBank 报

道的 VP3 CDNA 序列相一致,说明 VP3 目的基因已经成功插入到骨架质粒 pAdeasy-1 中,pAd-VP3-hrGFP 重组腺病毒质粒构建成功。



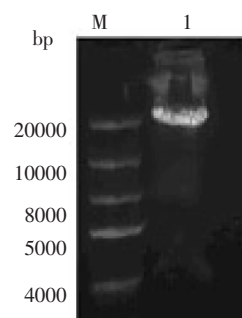
M: DNA Marker; 1, 2, 3, 4: PCR amplification products with pShuttle-VP3-hrGFP monoclonal colony (402bp)

Figure 1 PCR amplification of VP3 gene in pShuttle-VP3-hrGFP



M: DNA Marker; 1: pShuttle-VP3-hrGFP after *EcoR* V digestion (8.9kb, 402bp)

Figure 2 Identification of recombinant shuttle plasmid pShuttle-VP3-hrGFP by *EcoR* I digestion



M: DNA Marker; 1: pAd-VP3-hrGFP after *Pac* I digestion (>23kb, >45kb)

Figure 3 Identification of pAd-VP3-hrGFP by *Pac* I digestion

2.3 pAd-VP3-hrGFP 重组腺病毒的制备及滴度测定

将线性化的 pAd-VP3-hrGFP 质粒转染 AD293 细胞,培养 1 周后可见绿色荧光蛋白 GFP 表达,此后细胞逐渐呈悬浮生长,出现病变效应,待病变效应达到 80%~90%时,收集细胞,反复冻融后离心,获得病毒上清液,纯化病毒后检测病毒 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值分别为 0.158 和 0.119,OD₂₆₀/OD₂₈₀=1.33>1.3,病毒滴度为 1.738×10¹²opu/ml。

2.4 pAd-VP3-hrGFP 重组腺病毒对 SW480 细胞周期及凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示,未经处理的对照组 SW480 细胞凋亡率很低,仅为 1.21%±0.3%,经 50、100、200MOI pAd-VP3-hrGFP 重组腺病毒感染 48h 后,细胞凋亡率上升为 10.4%±1.1% ($P<0.05$)、44.1%±7.6% ($P<0.01$)、73.3%±9.8% ($P<0.01$),均有显著统计学意义。细胞周期分析结果显示,经不同 MOI 值重组腺病毒作用后,G₀~G₁ 期细胞数量逐渐增加,而 S 期细胞数量逐渐减少,细胞周期被阻滞于 G₀~G₁ 期(Table 1)。

Table 1 Influence of pAd-VP3-hrGFP on cell cycle and apoptosis of SW480 cells($\bar{x}\pm s$,n=4)

MOI	Apoptotic rate (%)	Cell cycle(%)		
		G ₀ ~G ₁	S	G ₂ ~M
0	1.2±0.3	48.5±2.6	44.0±1.9	7.5±1.6
50	10.4±1.1*	62.0±3.8	34.5±1.3	3.5±1.2
100	44.1±7.6**	65.4±1.6*	26.7±2.3*	7.9±2.5
200	73.3±9.8**	70.5±5.9**	21.9±1.4**	7.6±1.9

Note: Compared with control group(MOI=0),*: $P<0.05$, **: $P<0.01$.

3 讨论

腺病毒既可以感染分裂期细胞,也可以感染增殖期细胞,且可在感染的细胞内获得高效的基因表达,具有转染率高和靶向性好等优点,是当前构建真核表达质粒最常用的运载工具^[6,7]。本研究首先通过设计 5'端带有 pShuttle-IRES-hrGFP 穿梭质粒 EcoR V 酶切线性化末端 18 个碱基的上下游引物对 VP3 目的基因进行扩增,使扩增产物与 EcoR V 酶切后的线性化 pShuttle-IRES-hrGFP 穿梭质粒具有相同的粘性末端,在同源重组酶的催化下易发生同源重组,然后在 He 等^[8]研究的基础上,用腺病毒骨架质粒转化感受态大肠杆菌 BJ5183,再用 Pme I 酶切线

性化携带目的基因 VP3 的重组穿梭质粒 pShuttle-VP3-hrGFP,转化含腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 的超感受态大肠杆菌 BJ5183,制备 pAd-VP3-hrGFP 重组腺病毒质粒,通过抗性基因初筛,再经 PCR 和质粒抽提酶切及测序等方法对构建的重组腺病毒质粒作进一步鉴定以证实质粒构建成功。上述两次同源重组过程均在细菌内进行,与以往在细胞内进行同源重组相比较,具有明显的优势,一是重组效率高,由于细菌繁殖能力强,对周围环境要求不高,且同源重组能力强,故可大大提高重组的成功率。二是细菌内质粒抽提、酶切及 PCR 扩增等技术均较在哺乳动物细胞内进行 DNA 操作更加简单易行,故使得整个操作过程变得更加简便快捷^[9]。

本实验中还使用了 XL10-Gold,因其具有 RecA 和 EndA1 缺陷,可确保成功重组的腺病毒质粒 pAd-VP3-hrGFP 在其内扩增时可大大提高提取质粒的质量和插入外源基因 VP3 的稳定性。后续操作中笔者选用 Pac I 酶切线性化 pAd-VP3-hrGFP 重组腺病毒质粒,通过脂质体包裹转染入人胚肾 AD293 细胞内包装和扩增重组腺病毒,通过在荧光显微镜下观察 AD293 细胞内有无绿色荧光蛋白表达来判断质粒是否转染成功,取第一代病毒上清再转染 AD293 细胞,如果细胞内出现了绿色荧光,即说明包装的重组腺病毒具有一定的感染性,然后,依上述方法重复操作数次后,裂解细胞并收集上清以纯化病毒,通过检测证实获得了高滴度的 pAd-VP3-hrGFP 重组腺病毒,将其按不同 MOI 值感染体外培养人结肠癌 SW480 细胞,发现其可通过阻滞细胞周期于 G₀~G₁ 期,诱导肿瘤细胞出现凋亡,说明本方法制备的 pAd-VP3-hrGFP 重组腺病毒在体外具有较强的抗肿瘤作用,这为进一步深入研究 VP3 基因功能提供了一个新的选择。

参考文献:

- [1] Backendorf C, Visser AE, de Boer AG, et al. Apoptin: therapeutic potential of an early sensor of carcinogenic transformation [J]. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 2008, 48 (2): 143-163.
- [2] Los M, Panigrahi S, Rashedi I, et al. Apoptin, a tumor-selective killer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793 (8): 1335-1342.
- [3] Liu XM, Cui J, Hou WJ, et al. Construction of prokaryotic

- secretory expression vector of TAT-Apoptin and expression in *E. coli* [J]. Journal of China Medical University, 2013, 42 (1):45-48.[刘雪梅, 崔剑, 侯伟健, 等. TAT-Apoptin 融合蛋白分泌表达载体的构建及其活性检测 [J]. 中国医科大学学报, 2013, 42(1):45-48.]
- [4] Wang JS, Zhan H, Luo QQ, et al. The in vitro anti-bladder cancer effect of Apoptin accompanied with different chemotherapy drugs [J]. Journal of Contemporary Urologic and Reproductive Oncology, 2010, 2(5):216-219.[王剑松, 詹辉, 罗群强, 等. 凋亡素联合不同化疗药物体外抗膀胱癌效应观察[J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2010, 2(5):216-219.]
- [5] Deng SH, Ke XZ, Shi XY, et al. Construction of PET15b-VP3 gene prokaryotic expression vector by LP recco PCR cloning [J]. Journal of Chengdu Medical College, 2012, 7 (3):393-395.[邓守恒, 柯贤柱, 石小燕, 等. 靶向克隆法构建 PEP15b-VP3 原核表达载体 [J]. 成都医学院学报, 2012, 7(3):393-395.]
- [6] Wang N, Zhu HM, Yang JW, et al. Gene Apoptin transduced by retroviral vectors in induction of apoptosis in human colonic carcinoma cell line Lovo [J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2010, 37 (2):146-149.[王娜, 朱慧明, 杨俊文, 等. 逆转录病毒介导的凋亡素基因诱导人结肠癌细胞 Lovo 的凋亡[J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(2):146-149.]
- [7] Huang QJ, Zhu HM, Wang N, et al. The effect of adenovirus vector carrying Apoptin and Endostatin genes on the esophageal cancer [J]. Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2012, 21 (5):423-426.[黄庆娟, 朱慧明, 王娜, 等. 腺病毒介导的凋亡素、内皮抑素双基因对食管癌的实验研究 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2012, 21(5):423-426.]
- [8] He TC, Zhou S, da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. Proc Natl Acad USA, 1998, 95(5):2509-2514.
- [9] Zhang YL, Xu SY, Wang JN, et al. Construction and identification of recombinant adenovirus vector containing NY-ESO-1 gene [J]. Journal of Yunyang Medical College, 2008, 27(6):486-489.[张又莉, 徐少勇, 王家宁, 等. pAd-NY-ESO-1-EGFP 的构建及鉴定 [J]. 邵阳医学院学报, 2008, 27(6):486-489.]

**第七届中国乳腺癌治疗理念论坛暨国家级继续医学教育项目、
第九届中西医结合乳腺病新进展国家级中医药继续教育项目
中国医药教育协会乳腺疾病精准诊疗杭州共识会
第八届乳房重建西子论坛
2015 中国医师协会乳腺癌手术视频大赛浙闽赣赛区赛**

会议地点: 杭州

会议时间: 2015 年 8 月 21 日至 23 日

会议主题: 最小有效治疗理念与乳腺疾病精准诊疗杭州共识

大会主席: 毛伟敏教授、王建东教授、程向东教授

大会执行主席: 杨红健教授、王蓓教授、邹德宏教授

主办单位: 中国医药教育协会/浙江省肿瘤医院/浙江省中医院/浙江省抗癌协会

承办单位: 肿瘤学杂志社