

NDV-HN 致人肺腺癌 A549 细胞凋亡的实验研究

田雯钰, 林宇宁, 梁莹, 黄娟娟, 李瑞, 樊晓晖

(广西医科大学基础医学院微生物学教研室, 广西南宁 530021)

摘要: [目的] 探讨 NDV-HN 诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡的相关机制。[方法] (1) 构建包含绿色荧光素蛋白(GFP)及 NDV-HN 的慢病毒 sfGFP-HN 载体, 用 293V 细胞包装慢病毒 Lv-sfGFP-HN, 用 293V 细胞进行空载质粒转染组(空载组)慢病毒包装, 命名为 Lv-sfGFP; (2) 以空载组 A549-sfGFP 细胞和空白组 A549 为对照, 用慢病毒转染方法建立稳定表达 NDV-HN 蛋白的 A549 细胞株, 即 A549-sfGFP-HN 细胞株, RT-PCR、Western blot 检测 A549 细胞 NDV-HN 蛋白的表达; (3) 分别在 A549-sfGFP-HN 和 A549 两组细胞中加入顺铂, 流式细胞术检测细胞凋亡; (4) 在基因水平和蛋白水平上分别用 RT-PCR 和 Western blot 检测各组细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达。[结果] (1) Lv-sfGFP-HN 和 Lv-sfGFP 慢病毒分别转染 A549 细胞后, 只在转染组 A549-sfGFP-HN 细胞检测到 NDV-HN 蛋白。(2) 转染组 A549-sfGFP-HN 细胞凋亡率明显高于空白组 A549 细胞 ($P < 0.01$), 转染组 A549-sfGFP-HN 细胞加入顺铂后, 其细胞凋亡率明显增加。(3) 转染组 A549-sfGFP-HN 细胞与空载质粒转染组 A549 细胞和空白组 A549 细胞相比, 凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达量明显下调 ($P < 0.01$)。[结论] 慢病毒转染 NDV-HN 到 A549 细胞后导致 A549-sfGFP-HN 细胞出现凋亡, 且与 Bcl-2 下调有关。转染 NDV-HN 的肺癌细胞联合使用抗癌药物顺铂, 增加了肺癌细胞凋亡率。

关键词: 新城疫病毒; A549 细胞; 血凝素神经氨酸酶; Bcl-2; 细胞凋亡

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)03-0198-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.03.B007

NDV-HN Induces Apoptosis of Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells

TIAN Wen-yu, LIN Yu-ning, LIANG Ying, HUANG Juan-juan, LI Rui, FAN Xiao-hui
(Department of Microbiology, College of Preclinical Medicine, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of Newcastle disease virus (NDV) -hemagglutinin neuraminidase (HN) on the apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells. [Methods] The lentiviral sfGFP-HN vector containing green luciferin protein(GFP) and NDV-HN was constructed and packaged into lentiviral Lv-sfGFP-HN in 293V cells. The same method was used to package the empty plasmid into 293V cells to get Lv-sfGFP. Lv-sfGFP-HN and Lv-sfGFP were transfected into A549 cells to form the A549-sfGFP-HN cell line and A549-sfGFP cell line. The A549-sfGFP and A549 cell lines were used as controls. NDV-HN protein was detected by RT-PCR and Western blot in three cell lines. Cisplatin was added to A549-sfGFP-HN and A549 cells, and the apoptosis was detected by flow cytometry. The expression of Bcl-2 mRNA and protein was detected by RT-PCR and Western blot, respectively. [Results] After Lv-sfGFP-HN and Lv-sfGFP lentivirus were transfected into A549 cells, NDV-HN protein was detected only in A549-sfGFP-HN cells. The apoptosis rate of A549-sfGFP-HN cells was significantly higher than that in A549 cells ($P < 0.01$). Apoptosis rate increased after A549-sfGFP-HN cells were combined with cisplatin. Expression of Bcl-2 was significantly down-regulated in A549-sfGFP-HN cells, compared with A549 cells and A549-sfGFP A549 cells ($P < 0.01$). [Conclusions] Newcastle disease virus- hemagglutinin neuraminidase can induce apoptosis of human lung adenocarcinoma cells, the effect is enhanced by cisplatin.

Subject words: Newcastle disease virus; A549 cells; hemagglutinin neuraminidase; Bcl-2; apoptosis

新城疫病毒 (newcastle disease virus, NDV) 属

基金项目: 国家自然科学基金 (81460437); 广西自然科学基金 (2018GXNSFDA281043)

通信作者: 樊晓晖, 教授, 博士; 广西医科大学基础医学院微生物学教研室, 广西南宁市双拥路 22 号 (530021); E-mail: fanxiaohui63 @163.com

收稿日期: 2019-07-15; 修回日期: 2019-08-16

于溶瘤病毒, 该病毒能特异地杀伤肿瘤细胞, 而对正常细胞没有损伤或损伤较小。NDV 应用于临床将是一种极具潜力的肿瘤治疗新方法^[1]。血凝素神经氨酸酶 (hemagglutinin-neuraminidase, HN) 位于 NDV

包膜上,是主要的抗肿瘤蛋白^[2],NDV 很多抗肿瘤基础研究都是基于 HN 进行的。本文拟通过构建稳定表达 HN 蛋白的人肺腺癌 A549 细胞株,初步探索 NDV-HN 蛋白诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡的相关机制。

1 材料与方法

1.1 主要细胞株、试剂及耗材

人肺腺癌 A549 细胞株(简称 A549 细胞),由本实验室保存,293V 细胞购自英茂盛业有限公司;pcDNA3.1-HN 质粒,由本课题组前期保存;DNA Marker 购自生物工程(上海)股份有限公司;嘌呤霉素购自索莱宝公司;Bcl-2 一抗购自 Abcam 公司;Tubulin 内参一抗购自天津三剑生物公司;凋亡检测试剂盒购自 BD 公司;各种规格细胞板购自康宁公司;F-12K 完全培养基购自 Gibco 生物有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒构建及慢病毒包装^[3]

由本实验室保存的带有 NDV-HN 基因全长的质粒 pcDNA3.1-HN,送公司构建 sfGFP-HN 质粒载体。将 sfGFP-HN 质粒和辅助质粒 PH1、PH2 共转染 293V 细胞进行慢病毒包装,得到慢病毒 Lv-sfGFP-HN,空载质粒(sfGFP)转染细胞得到的慢病毒 Lv-sfGFP 为对照。

1.2.2 A549-sfGFP-HN 稳定转染细胞株的建立

A549 细胞复苏和传代培养:从液氮中取出 A549 细胞,迅速解冻后加入 F-12K 完全培养基,离心弃上清,重悬细胞沉淀,将重悬的细胞加入到 25cm² 培养瓶中,补充 5ml 培养基,置 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱,培养至对数期进行细胞传代,待细胞长至 70%~80%后用胰蛋白酶消化,于显微镜下进行细胞计数,根据计算得到细胞浓度,在六孔细胞培养板内每孔铺 2×10⁵ 个 A549 细胞,37℃、5%CO₂ 培养过夜。

慢病毒感染 A549 细胞:取方法 2.1 制备的 Lv-sfGFP-HN 和 Lv-sfGFP 慢病毒浓缩颗粒各 200μl,分别加入 2ml F-12K 完全培养基,再加入 20μl 浓度为 600mg/ml Polybrene,配制成“感染混合液”。吸掉 A549 细胞 6 孔板中旧的培养基,将上述配制的两种“感染混合液”分别加入到细胞板中,各设置 3 个复孔,做好标记,即 A549-sfGFP-HN 细胞和 A549-sfGFP 细胞,置 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱培养。

1.2.3 稳定转染细胞株的筛选

Lv-sfGFP-HN 和 Lv-sfGFP 慢病毒感染后的 A549 细胞在培养箱中培养 48h 后,在荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况。用胰蛋白酶将细胞消化下来,1000rpm 离心 3min,弃去上清液,用含 3μg/ml 嘌呤霉素的 F12-K 筛选培养基重悬,将各组细胞分别平均分到 24 孔板中,每孔用筛选培养基补至 500μl,做好标记,置 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱培养。

1.2.4 流式细胞仪检测 A549-sfGFP-HN 细胞和 A549-sfGFP 细胞转染率

用胰酶消化不低于 1×10⁷ 个细胞,取 600μl PBS 重悬,设置 3 个复孔,通过一次性流式细胞仪专用滤膜,然后上样至流式细胞仪检测转染率。

1.2.5 A549-sfGFP-HN 细胞内 HN 蛋白检测

RT-PCR 检测 HN mRNA:采用 Takara 有限公司生产的柱式法 RNA 提取试剂盒提取,用紫外分光光度计对提取的总 RNA 进行浓度和质量的检测。将总 RNA 按照逆转录试剂盒说明书逆转录成 cDNA,取 cDNA 采用荧光定量 PCR 仪进行 RT-PCR 检测,每个样本设置 3 个复孔,所得结果用 2^{-ΔΔC_t} 法计算得到。

引物序列如下:NDV7793-HN-F':GGTGTGGGG-CACCTAATCA。NDV7793-HN-R':TTGGAACGCAGAGGGATAGAA。预计产物片段大小 107bp。Homo-ACTB-F':TGGCAGCCAGCACAATGAA。Homo-ACTB-R':CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA。预计产物片段大小 186 bp。

1.2.6 Western blot 检测 HN 蛋白表达

各组转染细胞培养 48h,胰酶消化收集各组的细胞,蛋白裂解液处理并制备蛋白样品。检测蛋白浓度,根据蛋白定量结果调整每孔上样量,每组样本设置 3 个复孔,将蛋白样品在 10% SDS-PAGE 胶中进行电泳,电泳结束后用湿转法将蛋白转到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温震荡封闭 2h,TBST 洗膜后分别加入一抗,4℃冰箱孵育过夜。TBST 洗膜后,加入二抗室温孵育 1h,用 TBST 快速先洗 3 次,再在摇床上摇荡洗 2 次 (5min×2),注意尽量避光进行。最后,Odyssey 扫描仪进行扫膜。

1.2.7 流式细胞仪检测 A549-sfGFP-HN 和 A549 细胞凋亡

取适量 A549 细胞和 A549-sfGFP-HN 细胞分别

均匀铺到 25cm² 细胞培养瓶中,待细胞生长至融合度 70%~80%左右,用胰酶消化细胞,按照凋亡试剂盒说明书进行后续的染色实验,实验全程注意避光进行。同时设置阳性对照组 A549+20mg/L 顺铂,以及 A549-sfGFP-HN+20mg/L 顺铂,观察顺铂单独作用于 A549 和 NDV-HN、顺铂联合作用于 A549 细胞 24h 和 48h 细胞凋亡率的差异。

1.2.8 Bcl-2 检测

RT-PCR 检测 Bcl-2 蛋白的 mRNA 步骤同 1.2.5。引物序列如下:Bcl-2-F': TGGACAACCATGAC-CTTGGAC。Bcl-2-R': GTGCTCAGCTTGGTATGCAGAA。预计产物片段大小 170 bp。Homo-β-actin-F': TGGCACCACAGCACAATGAA。Homo-β-actin-R': CTAAGTCATAGTCCGCCTA-GAAGCA。预计产物片段大小 186bp。

Western blot 检测 Bcl-2 蛋白表达步骤同 1.2.6。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 16.0 对数据进行分析。实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较采用独立样本 *t* 检验,三组比较采用方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 A549-sfGFP-HN 和 A549-sfGFP 细胞荧光显微镜下观察结果

通过显微镜分别在荧光和白光视野下对细胞进行观察,可以发现 A549-sfGFP-HN 细胞和 A549-sfGFP 细胞中可见绿色荧光蛋白 GFP 表达,而 A549 细胞则无 GFP 表达(Figure 1),说明稳定转染细胞株构建成功。

2.2 流式细胞仪检测转染效率

A549-sfGFP-HN 的转染率达到 97%,且平均荧光强度达到 358.17(Figure 2)。A549-sfGFP 细胞的转染率达到 98%(Figure 3),且平均荧光强度达到 1170.28。转染效率高,荧光表达强度好,有利于后续实验的进行。

2.3 RT-PCR 检测细胞中 HN mRNA 表达

在 A549-sfGFP-HN 实验组细胞中有 HN 基因的 mRNA 表达,而空载组 A549-sfGFP 组中无表达(Figure 4)。

2.4 Western blot 检测细胞 HN 蛋白表达

A549-sfGFP-HN 细胞中有 HN 蛋白表达,而 A549-sfGFP 细胞中无表达(Figure 5)。

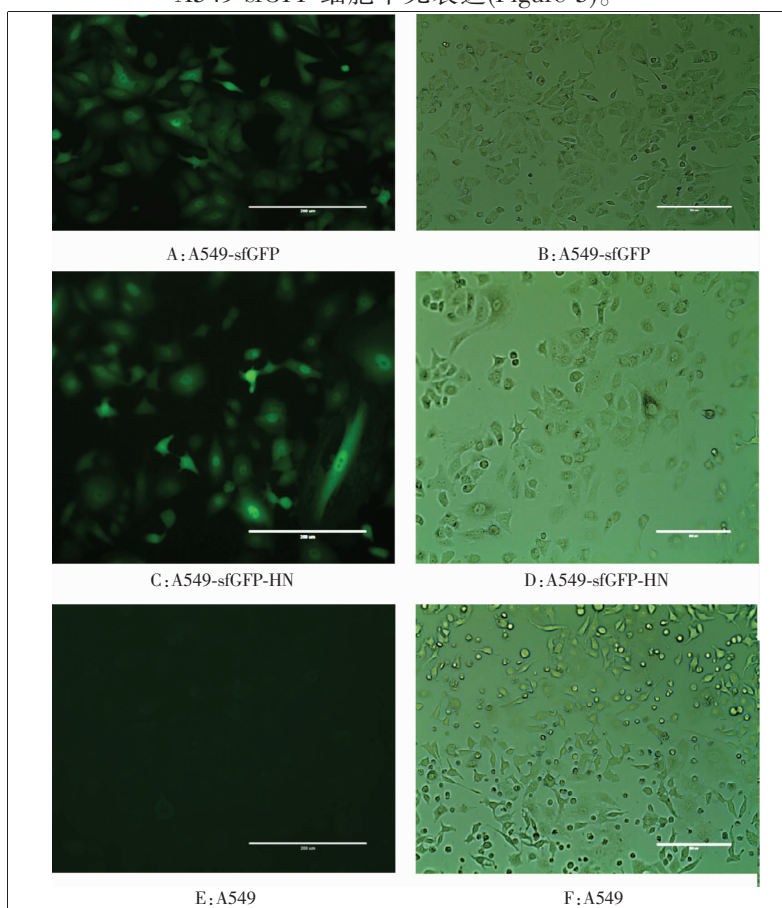


Figure 1 Microscopic observations of A549-sfGFP-HN, A549-sfGFP and A549 cells

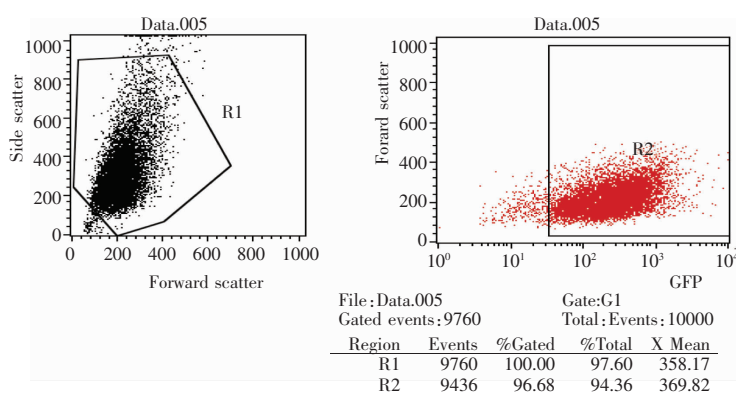


Figure 2 Transfection rate of A549-sfGFP-HN cells

2.5 流式细胞仪检测 A549-sfGFP-HN 细胞和 A549 细胞凋亡

A549-sfGFP-HN 细胞凋亡率大于 A549 细胞,差异有统计学意义($P=0.004$),与阳性对照 A549+20mg/L 顺铂(DDP)组的趋势一致,并且发现,A549-sfGFP-HN 细胞组在加入顺铂后 24h 和 48h,细胞凋亡率更高($P<0.010$)(Figure 6)。

2.6 RT-PCR 检测细胞 Bcl-2mRNA 表达

A549-sfGFP-HN 细胞中的 Bcl-2 mRNA 相对表达量与对照组 A549 相比下调,差异有统计学意义($P=0.009$);A549-sfGFP-HN 细胞中的 Bcl-2 mRNA 相对表达量与空载对照组 A549-sfGFP 相比下调,差异有统计学意义($P=0.012$)(Figure 7)。

2.7 Western blot 检测细胞 Bcl-2 蛋白表达

A549-sfGFP-HN 细胞中的 Bcl-2 蛋白表达明显低于对照 A549 组,差异有统计学意义($P=0.022$);与空载对照组 A549-sfGFP 相比,A549-sfGFP-HN 显著性下调($P<0.01$)(Figure 8)。

3 讨论

NDV 抗瘤特性决定于病毒包膜表面的血凝素—神经氨酸酶(HN),其抗瘤作用与 HN 密切相关。孙迎春等^[4]研究发现,转染有 NDV-HN 基因的肝癌细胞能发生凋亡,表明 HN 具有促进癌细胞凋亡的作用;李雪梅等^[5]发现重组有 HN 的鸡痘病毒在体外能有效杀伤人肝癌 SMMC7721 细胞,并对 C57BL/6 小鼠肝癌移植瘤有一定抑制作用;季慧范等^[6]研究发现,通过构建表达 NDV-HN 的溶瘤腺病毒 Ad-HN,可以诱导人胃癌 SGC7901 细胞发生凋亡,表明 NDV-HN 能有效延缓肿瘤的生长速度,并且能延长模型动物平均生存时间。HN 蛋白抗肿瘤的基础研究,不但为研制有效的新型药物提供必要的科学依据,而且促进了 NDV 作为溶瘤病毒的临床应用研究。

我们课题组 2006 年开始 NDV 溶瘤病毒的基础

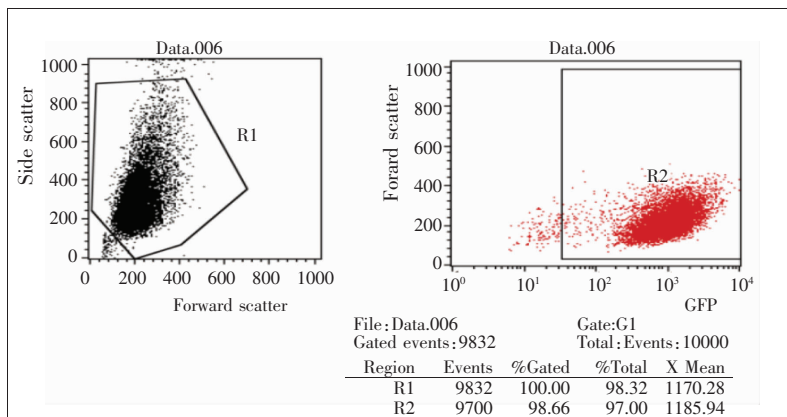


Figure 3 Transfection rate of A549-sfGFP cells

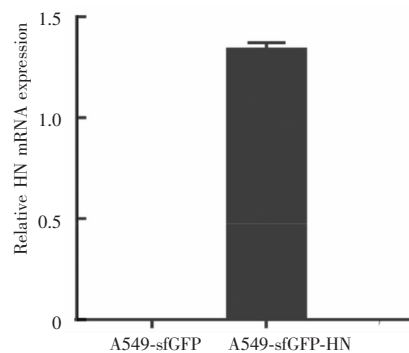


Figure 4 Relative mRNA expression of HN gene in cells

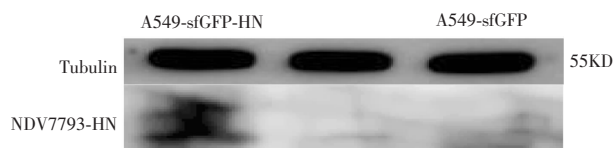


Figure 5 HN protein expression

研究,对 NDV 体内外杀伤肺癌、肝癌细胞及体内抑瘤机制进行研究^[7-8],并且用原核细胞表达系统和昆虫细胞表达系统表达 HN 蛋白^[9-10],然后用纯化的 HN 蛋白进行 NK 细胞激活及杀伤肿瘤细胞的研究^[11]。本文通过构建稳定表达 HN 蛋白的人肺腺癌 A549 细胞,初步探索 NDV-HN 蛋白诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡的相关机制,Lv-sfGFP-HN 慢病毒转染 A549 细胞后,在 A549-sfGFP-HN 细胞内检测到 NDV-HN 蛋白,而且 A549-sfGFP-HN 细胞的凋亡率明显高于未转染 NDV-HN 的 A549 细胞。

顺铂是经典的铂类制剂,是临床常用的化疗药物之一,主要通过促进肿瘤细胞凋亡和抑制增殖来达到抗肿瘤效果^[12-13]。顺铂是肺癌治疗的主要化疗

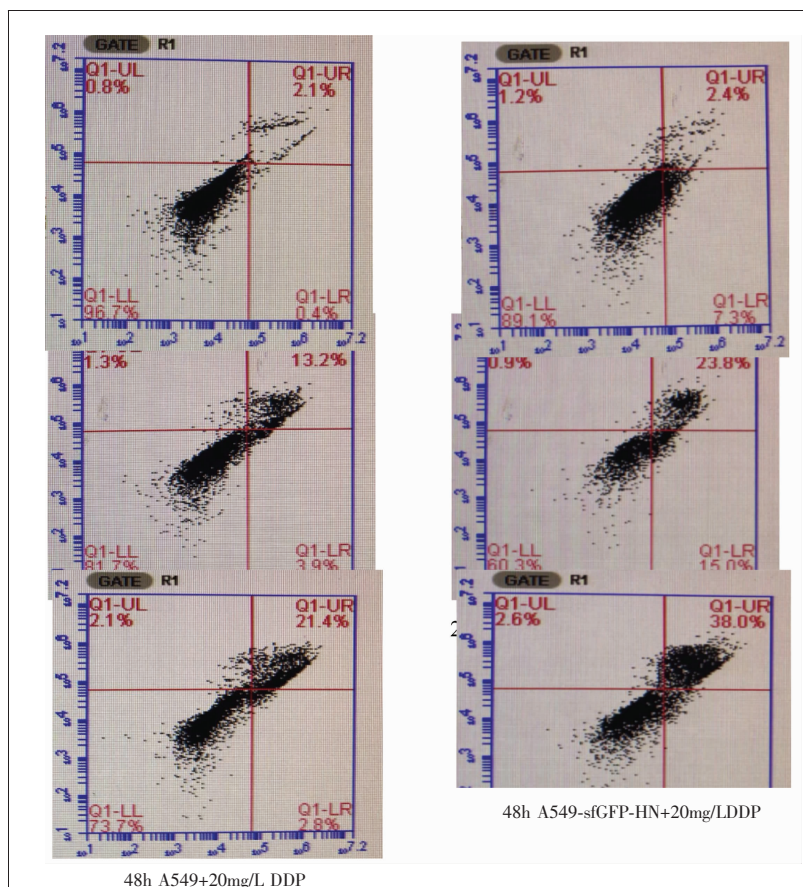


Figure 6 Cell apoptosis rate by flow cytometry

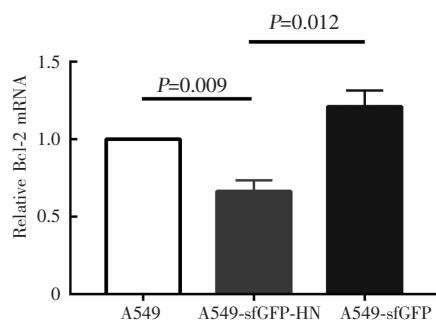


Figure 7 Relative mRNA expression of Bcl-2 in cells

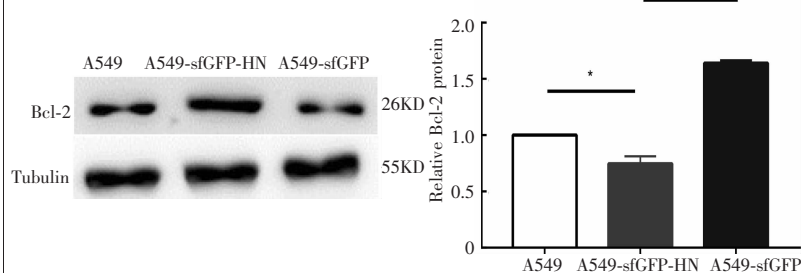


Figure 8 Bcl-2 protein expression in cells by Western blot

药物,但在临床应用过程中,临床发现顺铂耐药现象频发,削弱了治疗效果,制约了化疗方案的开展^[14],而且研究发现,联合用药或者与溶瘤病毒联合使用能达到更好的抗癌效果^[15]。本研究发现,体外实验在 A549-sfGFP-HN 细胞中加入顺铂后,细胞凋亡率得到明显提高,支持了临床上联合使用化疗药物和生物治疗能提高抗癌效果这一观点,但体内实验有待进一步研究证实。

Bcl-2 为最早发现的抑制细胞凋亡的基因,该基因的表达与细胞抵抗力密切相关,通过抑制细胞凋亡实现延长细胞存活时间。Li 等^[16]在结肠癌中发现高表达的 Bcl-2 能发挥抑制癌细胞凋亡的作用。本文通过检测 Bcl-2 表达来验证 NDV-HN 蛋白对肺腺癌 A549 细胞凋亡的影响,结果表明 A549-sfGFP-HN 细胞与空载质粒转染组和空白组 A549 细胞相比,凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达量明显下调,结合转染 HN 的 A549-sfGFP-HN 细胞的凋亡实验,说明肺癌细胞凋亡与 Bcl-2 有关,提示 HN 可能通过下调 Bcl-2 的表达来促进癌细胞的凋亡。

综上所述,NDV-HN 能通过下调 Bcl-2 表达,诱导 A549 细胞凋亡,并且加入顺铂后凋亡率增高,说明转染 NDV-HN 的肺癌细胞联合使用抗癌药物顺铂,可以增加肺癌细胞的凋亡率。研究对临床上使用化疗联合溶瘤病毒生物治疗肺癌有一定的指导作用。

参考文献:

- [1] Schirmacher V. Fifty years of clinical application of Newcastle disease virus: time to celebrate[J]. Biomedicines,2016, 4 (3):pii:E16.
- [2] Liu YC,Cheng XC,Zhang CJ,et al. Research progress of the antitumour mech-

- anism of NDV-HN protein [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(32): 14102, 14134. [刘一尘, 程相朝, 张春杰, 等. 新城疫病毒 HN 抗肿瘤机制研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(32): 14102, 14134.]
- [3] Lin YN, Tian WY, Zhang L, et al. Construction of NDV7793-HN lentiviral overexpression vector and virus packaging[J]. Medical and Health (Full Text), 2019, 5(2): 4-5. [林宇宁, 田雯钰, 张磊, 等. NDV7793-HN 慢病毒过表达载体构建及病毒包装[J]. 医药卫生(全文版), 2019, 5(2): 4-5.]
- [4] Sun YC, Jin NY, Mi ZQ, et al. Cytotoxicity of Newcastle disease virus HN gene on human hepatoma cells SMMC7721 [J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy, 2005, 12(3): 193-196. [孙迎春, 金宁一, 米志强, 等. 新城疫病毒 HN 基因对肝癌细胞 SMMC7721 的细胞毒性研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2005, 12(3): 193-196.]
- [5] Li XM, Jin NY, Li X, et al. Construction of recombinant fowl poxvirus harboring HN gene of Newcastle disease virus and its anti-tumor effect[J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy, 2006, 13(2): 112-115. [李雪梅, 金宁一, 李霄, 等. 表达新城疫病毒 HN 基因重组鸡痘病毒的构建及其抑瘤作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006, 13(2): 112-115.]
- [6] Ji HF. Antitumor effects of Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase used as a molecular adjuvant [D]. Changchun: Jilin University, 2013. [季慧范. 新城疫病毒血凝素-神经氨酸酶基因作为分子佐剂的抗肿瘤作用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013.]
- [7] Song DZ, Fan XH, Huang C, et al. Inhibitory effect of Newcastle disease virus on the growth of human small cell lung cancer xenografts[J]. Tumour, 2009, 29(6): 544-549. [宋德志, 樊晓晖, 黄川, 等. 新城疫病毒对小细胞肺癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用[J]. 肿瘤, 2009, 29(6): 544-549.]
- [8] Song DZ, Liang Y, Fan XH, et al. Newcastle disease virus enhances tumoricidal activity of mouse NK cells against mouse Novikoff hepatoma cells via up-regulating expression of TRAIL on the NK cells [J]. Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2015, 31(5): 599-604. [宋德志, 梁莹, 樊晓晖, 等. 新城疫病毒通过上调小鼠 NK 细胞 TRAIL 表达杀伤 Novikoff 小鼠肝癌细胞[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(5): 599-604.]
- [9] Liu JY, Gong JL, Fan XH, et al. Killing effect on liver cancers by mouse macrophages stimulated by Newcastle disease virus 7793 strain in vitro and its mechanism[J]. Cancer Prevention Research, 2012, 39(5): 502-505. [刘金颖, 宫金伶, 樊晓晖, 等. NDV7793 体外激活的小鼠单核巨噬细胞对小鼠肝癌细胞的杀伤作用及其机制[J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(5): 502-505.]
- [10] Zhang L. Expression of NDV-7793 HN protein in SF9 cells [D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2017. [张磊. NDV7793-HN 蛋白在 SF9 细胞中的表达[D]. 南宁: 广西医科大学, 2017.]
- [11] Ying L, De-Zhi S, Shuang L, et al. The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus upregulates expression of the TRAIL gene in murine natural killer cells through the activation of Syk and NF- κ B [J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0178746.
- [12] Liu H, Li W, Yu X, et al. EZH2-mediated pumagene repression regulates non-small cell lung cancer cell proliferation and cisplatin-induced apoptosis[J]. Oncotarget, 2016, 7(35): 56338-56354.
- [13] Zheng X, Lv J, Shen Q, et al. Synergistic effect of pyrrolidine dithiocarbamate and cisplatin in human cervical carcinoma[J]. Reproductive Sciences, 2014, 21(10): 1319-1325.
- [14] Akhtari M, Bernicker EH, Teh BS. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: opportunities for advancement[J]. Chinese Journal of Cancer, 2016, 35(1): 438-440.
- [15] Meng S, Zhou Z, Chen F, et al. Newcastle disease virus induces apoptosis in cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma A549 cells in vitro and in vivo[J]. Cancer Letters, 2012, 317(1): 56-64.
- [16] Li C, Peng W, Song X, et al. Anticancer effect of icaritin inhibits cell growth of colon cancer through reactive oxygen species, Bcl-2 and cyclin D1/E signaling[J]. Oncology Letters, 2016, 12(5): 3537-3542.