

携带 EGFP 报告系统的五型腺病毒对 肝癌干细胞的感染效率

胡 贲, 苏 虹, 徐 科, 姚 超, 何 倩, 钱 程, 刘 立

(浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018)

摘 要: 利用携带 EGFP 报告系统的五型腺病毒(Ad5-EGFP)作为工具,以发生上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)前后的肝癌细胞系 Huh7 为研究对象,采用流式细胞仪、荧光定量 PCR 等技术开展腺病毒对发生 EMT 前后的肝癌细胞系 Huh7 的感染效率的对比研究。实验结果表明:Ad5-EGFP 对上皮生产因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)处理前的 Huh7 细胞系感染率比 TGF- $\beta 1$ 处理后的细胞系感染率更高。同时 Ad5-EGFP 的主要受体-CAR 在肝癌细胞系 Huh7 发生 EMT 后表达有所降低。证实了肿瘤干细胞更难被腺病毒侵染,为了适应临床治疗的需要,腺病毒作为基因治疗的载体需要进一步被改造。

关键词: 五型腺病毒; 肝癌干细胞; EMT; CAR 受体

中图分类号: Q786

文献标识码: A

0 引 言

腺病毒是基因治疗的传统载体,人腺病毒已发现有 51 种血清型,分别为 A、B、C、D、E、F 等 6 个亚群。目前广泛应用于各种重大疾病临床前研究治疗和临床治疗的是五型腺病毒(Ad5)和二型腺病毒(Ad2),两者都属于 C 亚群,而且都是以柯萨奇腺病毒受体(Coxsackie and adenovirus receptor, CAR)为主要受体。由于它们普遍存在着对靶细胞感染效率较低的问题,因而导致在肿瘤的基因治疗中疗效不理想。

肿瘤干细胞(CSCs)是一类既具有肿瘤细胞性质又具有干细胞性质的细胞^[1]。这类细胞由于具有更强的自我更新性^[2-5]和致瘤性^[6-7],使得肿瘤的发生发展变得更为迅速。同时,在肿瘤的化疗中也是由于它们具有更强的耐药性^[8-9],使得肿瘤的化疗效果变得不理想。而关于肿瘤干细胞是否对腺病毒也具有很强的耐受性,从而影响了以腺病毒为载体的基因治疗效果,目前还未见报道。本文拟通过 Ad5-

EGFP 对肝癌细胞 Huh7 和发生上皮间质转化(EMT)后具有干细胞性质的 Huh7 感染率的比较分析,来探究肿瘤干细胞对腺病毒的影响作用。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 药物及试剂

腺病毒 Ad5-EGFP 由本实验室保存, TGF- $\beta 1$ 购自 Peprotech 公司, DMEM 培养粉及胎牛血清(FBS)为美国 Gibco 公司产品, 胰蛋白酶(trypsin, 1:250)为 Sigma 公司产品, SYBR Green I 定量试剂盒购自 Takara 公司, CAR 受体的一抗和二抗购自艾必康公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.1.2 人肝癌细胞株及培养条件

人肝癌细胞株 Huh 7 购自上海生命科学院细胞生物研究所。细胞培养在含 10% FBS 的 DMEM 培养液中, 在 37℃, 5% CO₂ 条件下恒温培养, 每 2~3 d 传代 1 次。

1.1.3 引物设计及合成

引物均由南京金斯特公司合成,详见表1。

表1 qRT-PCR 所用到的引物

GAPDH-5	ACCCAGAAGACTGTGGATGG
GAPDH-3	TCTAGACGGCAGGTCAGGTC
Foxc2-5	GCCTAAGGACCTGGTGAAGC
Foxc2-3	TTGACGAAGCACTCGTTGAG
E-cadherin-5	TGCCCAGAAAATGAAAAAGG
E-cadherin-3	GTGTATGTGGCAATGCGTTC
N-cadherin-5	ACAGTGGCCACCTACAAAGG
N-cadherin-3	CCGAGATGGGGTTGATAATG
Fibronectin-1-5	CAGTGGGAGACCTCGAGAAG
Fibronectin-1-3	TCCCTCGGAACATCAGAAAC
Vimentin-5	GAGAACTTTGCCGTTGAAGC
Vimentin-3	GCTTCCTGTAGGTGGCAATC
Snail-5	CCTCCCTGTCTAGATGAGGAC
Snail-3	CCAGGCTGAGGTATTCCTTG
Twist-5	GGAGTCCGCAGTCTTACGAG
Twist-3	TCTGGAGGACCTGGTAGAGG
Slug-5	GGGGAGAAGCCTTTTTTCTTG
Slug-3	TCCTCATGTTTGTGCAGGAG

1.2 方 法

1.2.1 Huh7 细胞培养

Huh7 的培养基为 10% FBS 的 DMEM, 在 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。添加 10% FBS 的 DMEM 6~8 mL, 6 孔板每孔培液 2 mL, 96 孔板每孔 100 μL 培液, 细胞长至约 80% 聚合时传代。

1.2.2 TGF-β1 浓缩液的配置

取 TGF-β1 粉末 5 μg 用 50 μL 的 10 mmol 的柠檬酸溶解至 0.1 μg/mL, 再用 0.1% 的 BSA 溶解至 5 μg/mL, 分装后-20°保存。用时常温融化后加至培液即可。

1.2.3 TGF-β1 诱导肝癌细胞系 Huh7 发生 EMT

将处于对数生长期的 Huh7 细胞接种于六孔板, 每孔接种密度为 1×10⁵ 个细胞, 其中一孔正常培养, 添加 2 mL 10% FBS 的 DMEM 培液, 另一孔添加 2 mL 含 10 ng/mL TGF-β1 的 10% FBS 的 DMEM 培液, 每日换培养液, 并在光学显微镜下观察待细胞长至 80% 聚合时传代。

1.2.4 荧光定量 PCR 检测 TGF-β1 对肝癌细胞系 Huh7 基因表达的影响

按 1.2.3 的方法诱导肝癌细胞系 Huh7。6 d 后 Trizol 法提取总 RNA, 反转录后进行 Real-Time PCR, 检测处理前后 EMT 相关基因表达情况变化。

所用引物见表 1。

1.2.5 流式细胞仪检测 Ad5-EGFP 对肝癌细胞系 Huh7 进行 TGF-β1 处理前后的感染率

制备 Huh7 单细胞悬浮液并铺六孔培养板中培养, 在 EMT 处理组和正常细胞组中都加入无血清 DMEM 培养液稀释的 Ad5-EGFP, 使其病毒感染复数为 5MOI, 2 h 后加入与 2 mL 的含 10% FBS 的 DMEM (EMT 处理组和正常处理组都分别设置不加病毒组做对照), 48 h 后用流式细胞仪检测感染过 Ad5-EGFP 的细胞的 EGFP 表达情况。

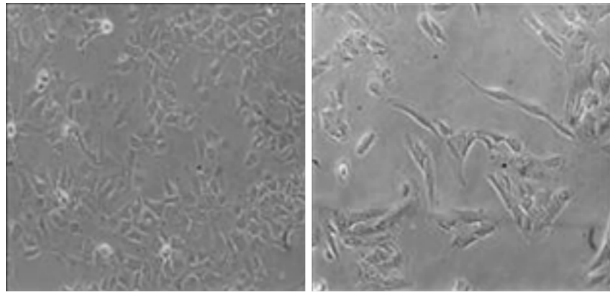
1.2.6 流式细胞仪检测 TGF-β1 对肝癌细胞系 Huh7 表面 CAR 受体表达的影响

按 1.2.3 的方法诱导肝癌细胞系 Huh7 6 d 后, 流式细胞仪检测 TGF-β1 处理前后 Huh7 表面 CAR 受体的表达。

2 实验结果

2.1 TGF-β1 对肝癌细胞系 Huh7 形态的影响

通过对 Huh7 细胞形态的观察, 可以明显地发现在含 10 ng/mL TGF-β1 的培养液的环境下培养 6 d, TGF-β1 处理的细胞与对照组相比, 变得狭长, 见图 1。这与文献中报道的细胞发生 EMT 之后形态的变化情况一致^[1]。



(A) 正常培养环境下的形态 (B) 10 ng/mL TGF-β1 的培养液培养 6 d

图1 光镜观察 huh7 的形态变化(200×)

2.2 荧光定量 PCR 技术检测肝癌细胞株 huh7 在 TGF-β1 处理后的基因表达变化

为了确认 Huh7 细胞系是否发生了 EMT, 检测了 TGF-β1 处理前后 EMT 相关基因的影响。使用荧光定量 PCR 技术检测肝癌细胞株 Huh7 和 Hep3B 中的 8 个基因即 *E-cadhe**n* (*E-cad*), *N-cadhe**n* (*N-cad*), *vim**tin*, *Fibronectin-1* (*FN-1*), *snail*, *twist*, *slug*, *fox-2*, 结果显示 (如图 2): 以对照组的表达水平为参照, *GAPDH* 为内参基因, Huh7 细胞系在经过 TGF-β1 处理 7 d 之后上皮细胞基因 *E-cadhe**n* 有明显下降, 而间质细胞相关基因 *vimen-*

tin, *FN-1*, *snail*, *twist*, *slug*, *fox-2* 都有明显的上调,说明在含 10 ng/ml 的 TGF- β 1 培养液的环境中 Huh7 细胞系可以成功的发生 EMT。

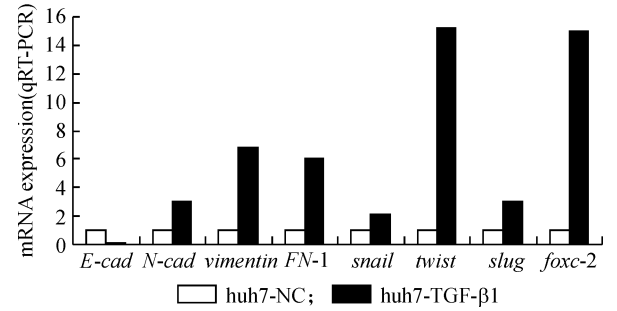


图2 qRT-PCR 检测 Huh7 在含 10ng/mL TGF- β 1 的培养液的环境下培养 7 d 后 EMT 相关基因的变化

2.3 腺病毒 Ad5-EGFP 对发生 EMT 以后的肝癌细胞系 Huh7 的感染率影响

通过流式细胞仪检测 EGFP 的阳性率来比较 5MOI Ad5-EGFP 对发生 EMT 以后的 Huh7 细胞系和 5MOI Ad5-EGFP 对未处理的 Huh7 细胞系的感染率变化(图 3)。结果显示,对正常 Huh7 细胞系的感染率为 41.2%,而对发生 EMT 之后的 Huh7 细胞系的感染率下降到 27.3%。说明发生 EMT 之后的 Huh7 细胞系更不容易被五型腺病毒感染。

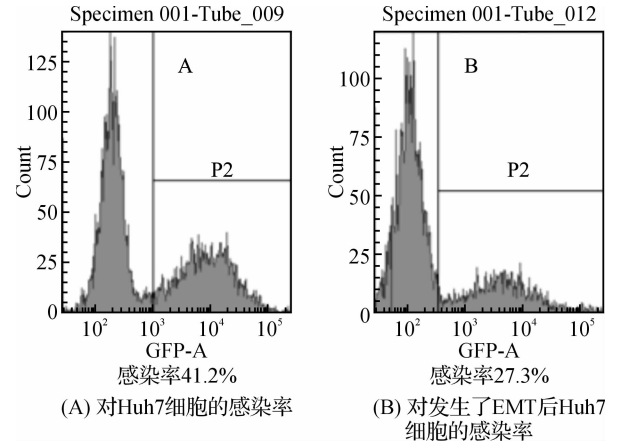


图3 Ad5-EGFP 对发生 EMT 前后的 Huh7 细胞系的感染率变化

2.4 肝癌细胞系 Huh7 发生 EMT 之后表面受体 CAR 的表达变化

通过流式细胞仪检测 Huh7 细胞以及发生 EMT 之后的 Huh7 细胞的 CAR 受体的表达情况。结果显示:Huh7 细胞在发生 EMT 之前,CAR 受体的阳性率约为 91.3%,发生 EMT 之后,阳性率降到 73.6%。说明发生 EMT 之后,表面受体 CAR 的表达与对照组比较会降低 20%左右(图 4)。

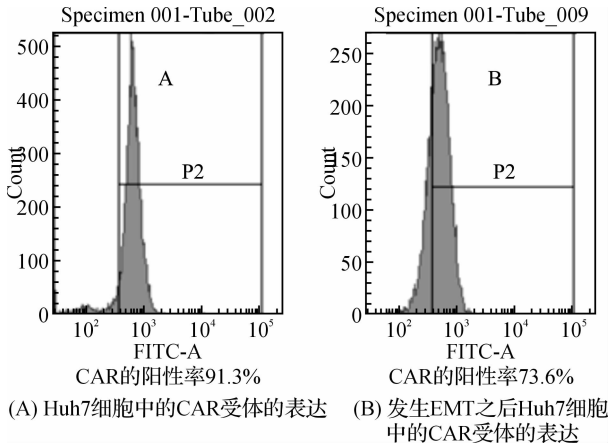


图4 Huh7 发生 EMT 前后 CAR 受体的表达变化

3 结 论

TGF- β 1 是一种最常用的 EMT 诱导剂,本文用 10 ng/mL 的 TGF- β 1 对肝癌细胞系 Huh7 进行 7 d 的诱导。显微镜观察和 qRT-PCR 的结果显示:无论是从形态变化上,还是从发生 EMT 后干性相关基因的变化上都证明已成功地使 Huh7 细胞发生了 EMT。

4 讨 论

为了探索传统的五型腺病毒对普通肝癌细胞和具有干细胞性质的肝癌细胞的感染能力的对比。笔者采用传统的 Ad5-EGFP 作为工具分别感染普通的肝癌细胞系 Huh7 和经过 TGF- β 1 诱导后发生 EMT 的 Huh7 细胞。同时根据五型腺病毒侵染细胞主要是通过细胞表面表达的 CAR 受体,因此采用流式细胞仪检测 CAR 受体的表达。结果显示,发生过 EMT 之后的 Huh7 细胞的表面受体 CAR 的表达与对照组相比出现明显减少,与此对应的是 Ad5 对发生过 EMT 之后的 Huh7 细胞的感染率要高于对照组 14%左右,这说明具有干细胞性质的细胞更难被传统的腺病毒感染。因此肿瘤干细胞对腺病毒载体也具有更强的耐受性。

上述研究结果给以腺病毒为载体的基因治疗通常没有理想的疗效从另一个角度提供了这样的解释:因为肿瘤干细胞在肿瘤的发生发展过程中起的作用要强于普通肿瘤细胞,导致肿瘤干细胞在以腺病毒为载体的基因治疗中更难以被腺病毒侵染。所以,这可能也是以腺病毒为载体的基因治疗疗效不理想的原因之一。如何提高腺病毒的侵袭能力,尤其是对肿瘤干细胞的侵袭能力,是腺病毒成为基因治疗有效载体的关键之一,本研究为其改造提供了一种新的思路。

参考文献:

- [1] Sendurai A, Guo Wenjun, Weinberg, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells[J]. Cell, 2008, 133: 704-715.
- [2] Beier D, Hau P, Proescholdt M, et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles [J]. Cancer Res, 2007, 67(9): 4010-4015.
- [3] Espada J, Calvo M B, Dfaz-Prado S, et al. Wnt signaling and cancer stem cells[J]. Clin Transl Oncol, 2009, 11(7): 411-427.
- [4] Liu S, Dontu G, Mantle I D, et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(12): 6063-6071.
- [5] Molofsky A V, Pardoll R, Washita T, et al. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation[J]. Nature, 2003, 425(6961): 962-967.
- [6] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties [J]. Cancer Res, 2005, 65(13): 5506-5512.
- [7] Borovski T, Vermeulen L, Spriek M R, et al. One rene-gade cancer stem cell[J]. Cell Cycle, 2009, 8(6): 803-812.
- [8] Robey R W, To K K, Polgar O, et al. ABCG2: perspective[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(1): 3-13.
- [9] Burger H, van Tol H, Boersma A W, et al. Imatinib mesylate(STI57 1) is a substrate for the breast cancer resistance protein(BcRP)/ABCG2 drug pump[J]. Blood, 2004, 104(9): 2940-2950.

Study on the Efficiency of 5-type Adenovirus Which Carrying a EGFP Report System Infection with Liver Stem Cells

HU Ben, SU Hong, XU Ke, YAO Chao, HE Qian, QIAN Cheng, LIU Li

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The 5-type adenovirus (Ad5-EGFP) infection efficiency in Hepatoma cell line Huh7 between before and after happening EMT is studied by Flow cytometry and qRT-PCR. The results show that the infection of Ad5-EGFP in normal Huh7 cells is higher than that in Huh7 cells after treated with TGF- β 1. In addition, CAR receptor, which is the primary receptor of Ad5, is expressed in lower level after EMT happening Huh7. It suggests that cell stem cell is harder to be infected by adenovirus, and adenovirus should be improved better in order to be applied in clinical treatment.

Key words: 5-type adenovirus; liver stem cell; EMT; CAR receptor

(责任编辑: 许惠儿)