

文章编号: 1673-3851 (2011) 05-0804-05

AFP 调控的携带 *Mn-SOD* 基因的腺病毒对肝癌细胞的杀伤作用

孔彦平, 张 静, 肖睿娟, 郭国英, 王毅刚

(浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018)

摘 要: 利用改造后的溶瘤腺病毒 Ad.enAFP-E1A- Δ E1B55Kd 作为载体携带治疗基因 *Mn-SOD*, 得到目的病毒 Ad.enAFP-E1A- Δ E1B55Kd-*MnSOD*; 通过 PCR 方法鉴定病毒构建正确; MTT 法检测病毒对肝癌细胞的特异杀伤能力和对肝正常细胞的安全性; Hoechst33342 染色实验观察细胞凋亡的现象。结果显示: 经目的病毒感染后肝癌细胞出现明显的病变现象和生长抑制, 而肝正常细胞基本无病变现象出现, 表明构建的目的病毒具有较高的安全性和很好的靶向性。此外目的病毒处理能引起特异性的肝癌细胞凋亡, 所携带治疗基因 *Mn-SOD* 能通过促进肿瘤细胞的凋亡达到抑制肿瘤细胞生长的效果。

关键词: 锰超氧化物歧化酶 (*Mn-SOD*); 腺病毒; 肝癌细胞

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A

0 引 言

恶性肿瘤的治疗已经成为目前世界医学界较为热门的研究课题。20 世纪 70 年代后期有学者提出自由基致癌的观点, 之后有大量的研究证明活性氧 (ROS) 与肿瘤细胞的产生和发展有关^[1]。失衡、高浓度的 ROS 的产生可以对细胞产生一系列的损伤, 最终可能会导致细胞的变异包括癌变和细胞的死亡。为保护细胞免受过氧化损伤, 机体内存在着一系列抗氧化防御系统。超氧化物歧化酶 (SOD) 家族是唯一将超氧阴离子转化为过氧化氢的抗氧化酶, 它有三种异构体^[2], 其中锰超氧化物歧化酶 (*Mn-SOD*) 主要存在于需氧细胞的线粒体中, 是线粒体中主要的酶性自由基的清除剂, 对维持胞内氧化还原平衡至关重要。研究提示, *Mn-SOD* 是一种新型肿瘤抑制因子^[3], 将其 DNA 转染进入胰腺癌细胞 MIAPaCa₂, 肝癌细胞 BEL7404 以及 SW620, Bcap-37 等细胞均有明显的抑制肿瘤细胞生长的作用^[4-7]。

通过基因工程技术将目的基因导入细胞研究基因功能正被广泛应用, 其中载体的选择非常重要。自 2001 年 Kim 等提出肿瘤病毒治疗概念后^[8], 数十种病毒已经或正在应用于临床实验中。经过改造的腺病毒是本实验室常用的病毒载体, 删除 E1B55Kd 区域后腺病毒能特异性在癌细胞中增殖, 为进一步提高病毒复制和 *Mn-SOD* 表达的特异性, 本实验中还将腺病毒 E1A 的启动子替换为肝癌细胞特异性启动子 AFP, 可使腺病毒在肝癌细胞中特异性复制, 使目的基因在肝癌细胞中特异性表达, 提高靶向性。同时病毒本身具有杀伤肿瘤细胞的能力, 能与所携带的目的基因联合作用起到病毒和基因双重抑制肿瘤的作用。

本实验将抑癌基因 *Mn-SOD* 亚克隆入腺病毒载体, 同时改造腺病毒启动子, 使 AFP 启动子特异性调控与腺病毒复制有关的 E1A 区域, 从而使携带 *Mn-SOD* 基因的腺病毒能特异地肝癌细胞中表达, MTT 检测结果显示, 该病毒对肝癌细胞有明显的杀伤效果。从而为研究不同启动子调控的 *Mn-SOD* 特异地作用于不同细胞系提供了新方法和方向。

收稿日期: 2010-10-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30800093); 浙江省自然科学基金项目 (Y2090935)

作者简介: 孔彦平 (1981-), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤的靶向基因病毒治疗研究。

通讯作者: 王毅刚, 电子邮箱: ygwang@zstu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

腺病毒质粒载体 pBHGE3 由本实验室保存,四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司,人肝癌细胞 Huh-7、肝正常细胞 L02 由本实验室细胞库保存,肝细胞在 37℃,5%CO₂ 培养条件下培养,培养液为含 10% FBS 的 DMEM(Dulhecco's modified eagle's medium),Hoechst33342 购自 Amresco 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 重组腺病毒的包装

a) 细胞铺板

按约每孔 3×10^5 个细胞将 1 mL 细胞均匀地铺在 6 孔板上,等到细胞约长到 70%~80% 时可以进行质粒转染。

b) 质粒的转染和病毒的包装

转染按试剂盒(Effectene)说明书进行操作。具体操作如下:将包装小质粒 pAd-AFP-MnSOD, pZD-AFP-MnSOD 分别和包装大质粒 pBHGE3 按摩尔比 3:1 的比例混合,共约 1 μg 总量的质粒补加 EC buffer 至 150 μL,再加入 8 μL Enhancer buffer,振荡 1 s,室温静置 5 min 后加入 25 μL Effectene,颠倒混匀 5 次,室温温育 10 min。如上述方法,将 6 孔板中 HEK293 细胞用 2 mL PBS 洗细胞 1 次,然后加入 3 mL 新鲜培养液,同时加 1 mL 新鲜培养液于上述混合物中,上下颠倒 2 次后加到细胞培养皿中,于 37℃,5%CO₂ 培养 6~18 h 后吸去培养基,PBS 洗 1 次,加入 4 mL 新鲜生长培养基,培养过夜。次日吸去培养基,加入 6 mL 低熔点胶(5%FBS,1.25%Agarose)培养。中间可加盖营养 1~2 次,9~14 d 出现病毒空斑。

c) 病毒的纯化

当大小质粒在细胞中发生基因重组时很容易产生野生病毒。因此需要经过反复的鉴定和稀释来去除野病毒,获取高纯度的目的病毒。

1.2.2 重组病毒的鉴定

a) 病毒 DNA 的抽取

取 200 μL 病毒上清液,加入 300 μL ddH₂O 后混匀,加入 4 μL 蛋白酶 K,56℃ 消化 3 h。加入等体积的酚:氯仿:异戊醇混匀后,4℃,12 000 r/min,离心 10 min。取上清,加入 1/10 体积的 3M NaAc 和 2 倍体积的无水乙醇混匀,-20℃ 静置 10~20 min 后,4℃,12 000 r/min,离心 10 min。弃上清,用 70% 乙醇洗后风干,用 20 μL RNA 酶 37℃ 消化 30 min。

b) 病毒元件的鉴定

以抽提的病毒 DNA 为模板,按照腺病毒 E1B55Kd 中间一段 657 bp 的序列设计引物,上游引物序列为 5' CAA AGG TGG CAC TTA GGC3',下游引物 5'AGG AAC AGC GGG TCA GTA3' 来鉴定野生病毒是否存在;以抽提的病毒 DNA 为模板,按照 *Mn-SOD* 的编码全序列设计引物,进行 PCR 扩增,上游序列 5' TTC ATG AAG CAC AGC CTC3',下游序列 5'GAG GCA TAA CGA TCG TGG3';以抽提的病毒 DNA 为模板,按照启动子 AFP 的全序列设计引物,进行 PCR 扩增,上游序列 5'GAG GAA CTT GGT TAG GTAC3',下游序列 5'CGT AGT GTT ATT GGC AGTG3'。反应条件为 95℃ 30 s,51℃ 40 s,72℃ 1 min,30 个循环,72℃ 10 min,PCR 结果经 1% 的琼脂糖凝胶后,用凝胶成像系统分析。

1.2.3 病毒的扩增和纯化

a) 病毒的小量扩增

将 HEK293 细胞铺于 2 个 10 cm 的培养皿中,细胞约长 70%~80% 时加病毒感染细胞,细胞病变后收集上清,反复冻融获取少量的病毒。

b) 病毒的大量扩增

将 HEK293 细胞铺于 60~70 个 10 cm 的培养皿中,细胞约长 70%~80% 时加病毒感染细胞,细胞全部病变后(4~7d),加 NP40 裂解细胞,收集上清液,用 CsCl 梯度离心方法纯化病毒。收集纯化的病毒,-80℃ 储存备用。

1.2.4 病毒滴度的测定

将 HEK293 细胞按每孔 1×10^4 个铺到 96 孔板中,第二天将病毒稀释到 $10^{-7} \sim 10^{-12}$,加入到 96 孔板

中,10天后观察细胞的病变数,按照 TCID₅₀ 法计算病毒滴度。

1.2.5 MTT 检测病毒对几种不同肝癌细胞的杀伤能力

将肿瘤细胞按 1×10^4 /孔铺于 96 孔板中,待细胞贴壁后,分别加入浓度为 1、5、10 MOI 的 Ad. enAFP-E1A- Δ E1B55Kd-EGFP, Ad. enAFP-MnSOD, Ad. enAFP-E1A- Δ E1B55Kd-MnSOD $10 \mu\text{L}$ 于每列孔中,以不加病毒的作为对照,每组各做 6 个重复,剩余的边缘区域只加培养液作为空白对照,病毒感染 4 d 后,每孔加入 $20 \mu\text{L}$ MTT 溶液 (5 mg/mL)。加入 MTT 后于 37°C 继续培养 4 h,小心弃掉孔内培养液,每孔加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO,摇床振荡 15 min,使结晶物充分溶解。用酶标仪检测 595 nm 处每孔的光密度吸收值(OD 值)。将测得的 OD₅₉₅ 值代入公式:细胞存活率 = (OD 病毒感染孔 - OD 调零孔) / (OD 对照孔 - OD 调零孔) \times 100%。以浓度为横坐标轴,细胞存活率为纵坐标轴绘制细胞生长活力曲线。同时用 10 MOI 各种病毒处理肿瘤细胞后分别处理 1、2、3、4 d 做时间梯度的细胞存活率检测。

1.2.6 Hoechst 33342 染色观察细胞凋亡

将对数生长期的肿瘤细胞 Huh-7 按 3×10^5 /孔接种至 6 孔板中,培养过夜。分别用 5 MOI 的各种病毒和无血清培养液处理细胞,5%CO₂, 37°C 培养箱培养 36 h 后,加入 1 mg/mL 的 Hoechst 33342 染料 $5 \mu\text{L}$ 至每个孔中。 37°C 染色 30 min 后,荧光倒置显微镜观察并拍照。

2 实验结果

2.1 包装的腺病毒鉴定结果

a) PCR 鉴定包装后的病毒

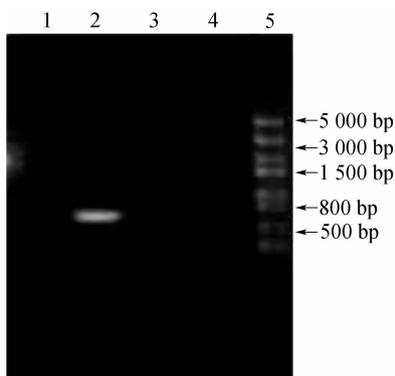
引物 55kd-1 和 55kd-2 是以腺病毒 E1B55Kd 中的一段为模板,由于目的病毒的 E1B55Kd 缺失,所以 PCR 后电泳根本没有条带。结果显示,纯化的病毒不含有野生病毒。鉴定结果见图 1。

b) 目的基因 MnSOD 鉴定

以 Ad. enAFP-E1A- Δ E1B55Kd-MnSOD 为模板,用 MnSOD-1, MnSOD-2 上下游引物 PCR 后跑电泳,结果与预期一样,说明 MnSOD 基因已经整合到腺病毒中。其中的阳性对照是大抽质粒。结果见图 2。

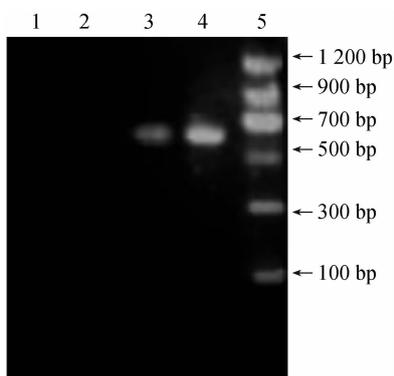
c) 特异性启动子 AFP 的鉴定

以目的病毒 Ad. enAFP-E1A- Δ E1B55Kd-MnSOD 为模板,用 AFP 上下游引物进行 PCR,电泳,其结果与预期一样,说明 AFP 已经整合到了目的病毒中。结果见图 3。



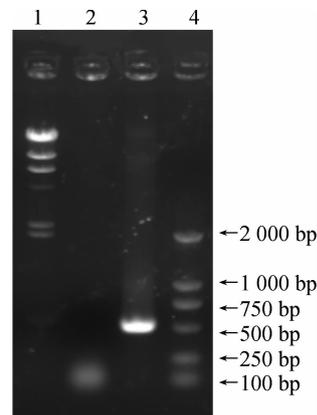
1. 阴性对照, 2. 野生病毒, 3. 目的病毒 ZD55-AFP-MnSOD, 4. 阳性对照, 5. Marker III

图 1 野生病毒的鉴定



1. 阴性对照, 2. 野生病毒, 3. 目的病毒 ZD55-AFP-MnSOD, 4. 阳性对照, 5. Marker III

图 2 MnSOD 基因的鉴定

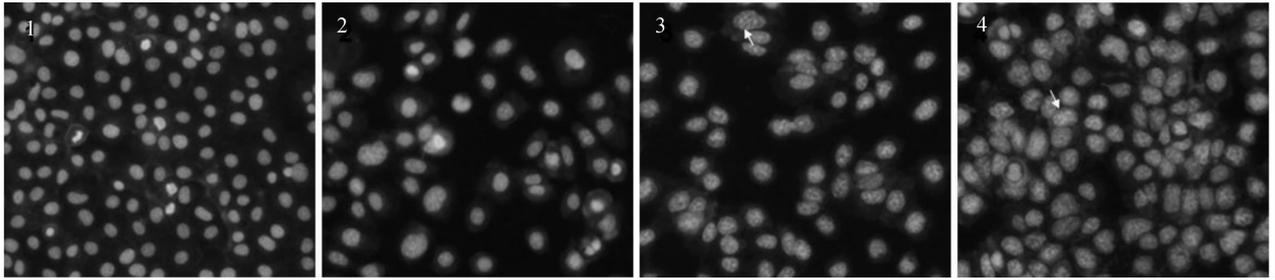


1. λ /Hind III marker, 2. 阴性对照, 3. AFP 的扩增结果, 4. DL 2000 Marker

图 3 AFP 的扩增结果

2.2 目的病毒处理细胞凋亡

发生凋亡的细胞其细胞核染色质明显凝集,固缩,并有核碎裂出现凋亡小体,荧光倒置显微镜下观察,呈现致密浓缩或者碎块状致密浓缩。用 Hoechst33342 染色后呈现明显的亮蓝色,如图 4 所示。结果表明,与对照组相比目的病毒能明显提高细胞的凋亡能力。



1. Ad.enAFP-E1A- Δ E1B55Kd-MnSOD, 2. Ad.enAFP-MnSOD, 3. Ad.enAFP-E1A- Δ E1B55Kd-EGFP, 4. 对照

图 4 Hoechst33342 染色结果

2.3 目的病毒降低细胞存活率

分别用 1、5、10 MOI 的病毒处理正常肝细胞系 L02 和肝癌细胞 Huh-7, 4 d 后发现, 随着浓度的增加病毒对细胞的杀伤率增加。同时与对照病毒 Ad.enAFP-MnSOD 和 Ad.enAFP-E1A- Δ E1B55Kd-EGFP 相比, 目的病毒 Ad.enAFP-E1A- Δ E1B55Kd-MnSOD 对肝正常细胞的安全性较高, 在 10 MOI, 4 d 时的细胞杀伤率不足 30%。而对肝癌细胞的杀伤性较强, 10 MOI, 4 d 时的细胞杀伤率可高达 91%, 见图 5。用 10 MOI 的病毒对 Huh-7 细胞处理不同的时间, 发现病毒对细胞的杀伤率随着时间的延长而增加, 见图 6。

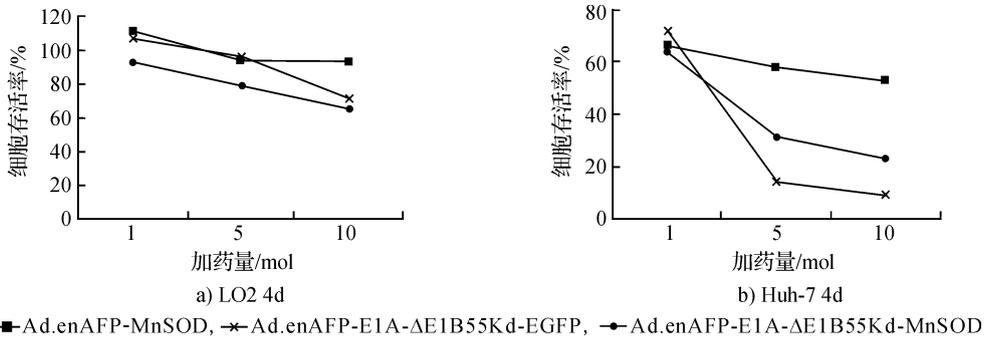


图 5 MTT 检测病毒对细胞杀伤作用的浓度依赖性

3 讨论

Mn-SOD 是一种新型肿瘤抑制因子^[3], 能在一定程度上预防衰老和肿瘤的发生^[9]。临床研究结果显示, *Mn-SOD* 在肿瘤组织中的表达量并不一致, 有些肿瘤组织中 *Mn-SOD* 基因的表达较周围组织低, 而有些较周围组织高^[10-13]。因此实验之前应首先确定所选用的细胞株中 *Mn-SOD* 的表达量情况。

本实验所用的肝癌细胞 Huh-7 中 *Mn-SOD* 本底表达量较周围组织低, 通过导入构建的 Ad.enAFP-E1A- Δ E1B55Kd-MnSOD 使基因 *Mn-SOD* 在肝癌细胞 Huh-7 中特异性表达, 结果显示该病毒对肝癌细胞有较强的杀伤能力, 并能促进细胞凋亡。但 *Mn-SOD* 编码的蛋白质的相对分子量较大, 半衰期短, 在细胞中的表达量受到一定的影响, 不易透过细胞膜, 在临床研究中可能会引起机体的免疫反应, 而且导入细胞后是否对本底 *Mn-SOD* 的表达有影响及如何影响, 目前的技术平台很难解决。因此用 SOD 模拟物替代 *Mn-SOD* 基因, 该基因对肿瘤细胞的杀伤作用和作用原理将是一个新的研究方向。

总之, 将 *Mn-SOD* 作为一种抑制肿瘤生长的基因的研究刚刚开始, 其对不同肿瘤细胞的作用效果没有规律可循, 但随着人们对它的重视, 以及研究的不断深入, 也许它将成为肿瘤治疗中新的“明星基因”, 为广大癌症患者带来福音。

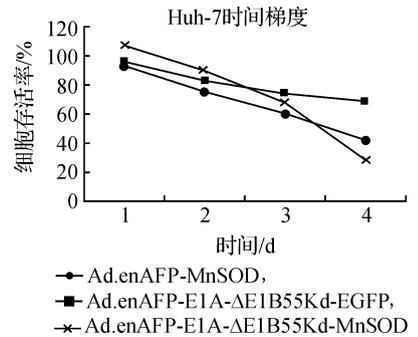


图 6 MTT 检测病毒对 Huh-7 细胞杀伤作用

参考文献:

- [1] 操敏, 李琦. 锰超氧化物歧化酶抑癌作用的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2008, 28(18): 72-79.
- [2] Zelko I N, Mariani T J, Folz R J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD(SOD1), Mn-SOD(SOD2), and EC-SOD(SOD3) gene structures, evolution, and expression[J]. Free Radic Biol Med, 2002, 33(3): 337-349.
- [3] Bravard A, Sabatier L, Hoffschir F, et al. SOD: a new type of tumor-suppressor gene? [J]. Int J Cancer, 1992, 51(3): 476-480.
- [4] Kinnula V L, Crapo J D. Superoxide dismutase in the lung and human lung diseases[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167(12): 1600-1619.
- [5] Oberley T D, Zhong W, Szweda L I, et al. Localization of antioxidant enzymes and oxidative damage products in normal and malignant prostate epithelium[J]. Prostate, 2000, 44(8): 144-145.
- [6] Hur G C, Cho S J, Kim C H, et al. Manganese superoxide dismutase expression correlates with chemosensitivity in human gastric cancer cell lines[J]. Clin Cancer Res, 2003, 15(4): 5768-5775.
- [7] Hwang T S, Choi H K, Han H S. Differential expression of manganese superoxide dismutase, copper/zinc superoxide dismutase, and catalase in gastric adenocarcinoma and normal gastric mucosa[J]. Eur J Surg Oncol, 2007, 33(4): 474-479.
- [8] Kirn D, Martuza R L, Zwiebel J. Replication-selective virotherapy for cancer: biological principles, risk management and future directions[J]. Nat Med, 2001, 7(7): 781-787.
- [9] Epperly M W, Defilippi S, Sikora C, et al. Intratracheal injection of manganese superoxide dismutase(MnSOD) plasmid/liposomes protects normal lung but not orthotopic tumors from irradiation[J]. Gene Ther, 2000, 7(12): 1011-1018.
- [10] Oberley L W, Buettner G R. Role of superoxide dismutase in cancer: a review[J]. Cancer Research, 1979, 39(4): 1141-1149.
- [11] Stefam L M, Erik L, Westmttn N G, et al. Copper-and zinc-containing superoxide dismutase and manganese-containing superoxide dismutase in human tissue and human malignant tumors[J]. Cancer Research, 1981, 41(11): 2959-2962.
- [12] Markiund S L, Westman N G, Lundgren E, et al. Copper-and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase catalase[J]. Cancer Research, 1982, 42(12): 1995-2005.
- [13] Hoffman C E, Webster N R, Wiggins P A, et al. Free radical detoxifying system in human colorectal cancer[J]. Cancer, 1985, 51(2): 127-136.

Killing-Effect on Hepatocellular Carcinoma by AFP-Regulated Oncolytic Adenovirus Carrying Manganese Superoxide Dismutase Gene

KONG Yan-ping, ZHANG Jing, XIAO Rui-juan, GUO Guo-ying, WANG Yi-gang

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

Abstract: In this study, the therapeutic virus Ad. enAFP-E1A- Δ E1B55Kd-MnSOD is constructed by the modified oncolytic adenovirus Ad. enAFP-E1A- Δ E1B55Kd as vectors to carry therapeutic genes *Mn-SOD*. Subsequently, the identification of correct virus construction by PCR, cell morphology changes and cell apoptosis after infected the tumor-specific killing effect and the evaluation of live normal cell security by MTT assay, and the detection of apoptosis by Hoechst assay are performed. The results indicate the obvious pathological changes and growth inhibition of hepatoma cells after infection of therapeutic viruses, while little impact on the liver normal cells with high security. Moreover, the treatment of therapeutic virus Ad. enAFP-E1A- Δ E1B55Kd-MnSOD significantly induces apoptosis of hepatoma cells through carrying the *Mn-SOD* gene, indicating the good targeting ability and the effect of inhibition of tumor cell growth.

Key words: superoxide dismutase(*Mn-SOD*); adenovirus; hepatocellular cell

(责任编辑: 许惠儿)