

复制缺陷型腺病毒 PCA 的构建及其对结肠癌细胞生长的影响

黄越, 陈文铎, 周炜, 董森, 高永, 许韶威, 徐涛, 唐斌

(浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018)

摘要: 通过同源重组方式,利用 Adeasy 系统成功构建携带 p14ARF 基因的复制缺陷型腺病毒,命名为 Ad-pShuttle-CMV-p14ARF(PCA),并研究其对结肠癌细胞株 SW480 及 HT-29 的杀伤作用。PCR 方法鉴定阳性重组子病毒;MTT 法检测 PCA 对细胞增殖的影响;Hoechst33258 荧光染色法检测细胞凋亡形态学变化;结晶紫染色法定性分析 PCA 对两种结肠癌细胞的杀伤作用。结果显示:经目的病毒 PCA 作用,SW480 及 HT-29 出现明显病变和生长抑制现象,并呈现出时间和浓度依赖性;Hoechst 染色后观察到细胞内出现凋亡小体,并且数目随药物处理浓度的升高而增多。

关键词: Ad-p14-ARF; 结肠癌; MTT; 结晶紫染色; 细胞凋亡

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A

0 引言

结肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,在西方国家它是癌症引发死亡的“第三大杀手”,在我国发病率也呈逐年增长的趋势^[1-2]。目前主要的治疗方法是手术和化疗。但是对于晚期结肠癌,无法进行手术且化疗疗效欠佳,因此寻求高效、低毒的治疗方法迫在眉睫。基因治疗^[3]通过载体携带基因来治疗疾病,此概念一经提出,很快受到重视,并开始应用于肿瘤治疗。

p14ARF^[4]是 1995 年发现的一种重要的细胞周期负调控基因,主要将细胞阻滞于 G₁ 期和 G₂/M 期。p14ARF 定位于染色体 9p21 的 INK4A-ARF 基因位点,其 cDNA 长度为 399 bp,编码 132 个氨基酸,分子量约 14 000 Da。分子病理学和分子流行病学研究发现,p14ARF 蛋白表达的异常与多种恶性肿瘤的发生、发展有密切关系^[5-7]。动物实验也表明,敲除 p14ARF 的小鼠肿瘤患病率明显上升^[8]。

p14ARF 基因具有以下特点:(1) cDNA 长度较短,便于基因克隆的操作;(2) 在多种人类肿瘤中缺失表达;(3) 是目前发现最为重要的抑癌基因 p53 的上游调节基因,因此符合抑癌基因治疗对目的基因片段的要求,有望在恶性肿瘤的基因治疗中发挥重要作用。

本实验在以上理论的基础上,利用 AdEasy 系统^[9]构建并扩增了复制缺陷型腺病毒 Ad-pShuttle-CMV-p14ARF,并研究其对结肠癌细胞 SW480 及 HT-29 的生长抑制效应。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、菌株和质粒

质粒 pShuttle-CMV 由中国科学院生物化学与细胞生物研究所提供;质粒 pMD18-T-p14, *E. coli* strain DH5 α 和 *E. coli* strain BJ5183 由本实验室保存;DMEM 购自 GIBCO 公司;MTT 和 Ho-

收稿日期: 2012-12-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30721712)

作者简介: 黄越(1986-),女,吉林四平人,硕士研究生,主要从事天然药物抗肿瘤活性研究。

通信作者: 徐涛,电子邮箱: pkuxt@yahoo.com.cn

echst 33258 购自 Sigma 公司。

1.1.2 试剂

DNA 小量抽提试剂(捷瑞公司);DNA 提取凝胶试剂盒(爱思进公司);PCR 产物纯化试剂盒(爱思进公司);DNA ligation kit 及 DNA Ladder Marker(全式金、天根公司);四甲基偶氮唑蓝(MTT)(Sigma 公司);限制性内切酶(NEB 公司);DMEM 培养基及胎牛血清(Gibco 公司)。

1.1.3 细胞株及培养条件:腺病毒转化的人胚肾细胞株 293A,人结肠癌细胞株 SW480 及 HT-29 由本实验室提供。细胞培养条件为 5% CO₂, 37℃ 培养箱中培养,培养液为含 10% FBS 的 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)。

1.2 方法

1.2.1 p14ARF 基因的克隆

以本实验室构建的 pMD18-T-p14 为模板,分别以 5'-CCGCTCGAGTCAGCCAGGTCCACGGG-3'(下划线为 *Xho* I 酶切位点)和 5'-GGAAGATCTATGGTGCGCAGGTTCTTG-3'(下划线为 *Bgl* II 酶切位点)为上下游引物,通过 PCR 扩增得到 p14ARF 基因(反应参数为:95℃ 5 min, 95℃ 45 s, 55℃ 30 s, 68℃ 45 s, 30 个循环),扩增产物纯化后分别经 *Xho* I / *Bgl* II 双酶切后回收。

1.2.2 含 p14ARF 基因的质粒 pShuttle-CMV-p14ARF 的构建

质粒 pShuttle-CMV 经 *Xho* I / *Bgl* II 双酶切后回收载体大片段,并将其与 1.2.1 酶切回收得到的 p14ARF 基因混合,经 T4 连接酶连接后转化 *E. coli* DH5 α ,并涂布于 LB 抗性平板。37℃ 培养 12 h 后挑取单个克隆于 LB 液体培养基,培养 12 h 后抽取质粒,PCR 和双酶切鉴定重组子并测序。将构建含有 p14ARF 基因的 pShuttle-CMV 质粒命名为 pShuttle-CMV-p14ARF。

1.2.3 重组腺病毒质粒 pAdEasy-pShuttle-CMV-p14ARF 的构建

构建得到的 pShuttle-CMV-p14ARF 载体经 *Pme* I 线性化后,与 pAdEasy-1 通过电转法共转染到 BJ5183 感受态细胞中进行同源重组得到腺病毒质粒 pAdEasy-pShuttle-CMV-p14ARF。酶切及测序鉴定该重组腺病毒质粒。

1.2.4 重组腺病毒的包装、鉴定、扩增以及滴度的测定

将构建的 pAdEasy-pShuttle-CMV-p14ARF 质粒转染到 293A 细胞,挑取空斑,抽提病毒基因组,

利用 PCR 进行鉴定,筛选获得携带 p14ARF 基因的重组腺病毒。病毒的体外扩增选用 293A 细胞,并采用 TCID₅₀ 法测定病毒滴度。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖

收集对数生长期细胞,调整细胞悬液浓度,将细胞以 100 μ L/孔接种于 96 孔板,使待测细胞密度为 1×10^4 /孔。5% CO₂, 37℃ 孵育 12 h 后加药。病毒处理组加入 0.01、0.1、1、10、100 MOI 的 PCA,对照组加等体积 PBS,并设置不加细胞为空白组,每个处理均设 6 个复孔,分别培养 24、48、72、96 h 后,每孔加入 1 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μ L,继续培养 4 h 后,小心吸去孔内培养液,每孔加入 150 μ L DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。用酶联免疫检测仪于 490 nm 处测量各孔的吸光值。

细胞存活率 = (处理组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) $\times 100\%$

1.2.6 细胞形态学观察

将 3.5×10^5 个/mL SW480 和 HT-29 细胞分别接种于 6 孔板中,贴壁培养 12 h 后加药,病毒处理组加入 0.01、0.1、1、10、100 MOI 的 PCA,对照组加等体积 PBS,37℃, 5% CO₂ 培养 48 h 后,倒置光学显微镜下观察细胞形态学变化并拍照。

1.2.7 结晶紫染色分析杀伤作用

收集对数生长期结肠癌细胞 SW480 和 HT-29,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基调整细胞悬液浓度,将细胞以 500 μ L/孔接种于 24 孔板,使待测细胞密度为 $(4.0 \sim 5.0) \times 10^4$ /孔,37℃, 5% CO₂ 条件下培养。待细胞贴壁后,加入 0.01、0.1、1、10、100 MOI 的 PCA。对照组加等体积 PBS,每组做 3 个重复。作用 96 h 后,吸去上清液,用 PBS 小心洗涤 2 次,每孔加 0.25 mL 10% 甲醇溶液,固定细胞 30 s 后,小心吸尽甲醇溶液,每孔加 0.25 mL 结晶紫染色液(2% 结晶紫溶于 20% 甲醇),室温放置 20 min 后,轻轻甩去染色液,用蒸馏水洗涤各孔,将培养板倒置于吸水纸上吸干水分,37℃ 烘干后拍照记录。

1.2.8 Hoechst33258 染色观察肿瘤细胞的凋亡

对数期肿瘤细胞 SW480 和 HT-29 按 3.5×10^5 个/mL 接种至 6 孔板中,过夜培养。分别用 0.1、10、100 MOI 的 PCA 处理细胞,5% CO₂, 37℃ 培养 48 h 后,每个孔中加入 1 mg/mL 的 Hoechst33258 染料 5 μ L。37℃ 染色 30 min 后荧光倒置显微镜观察并拍照。

1.3 统计学处理

实验数据用 Origin8.0 软件分析。

2 结果与分析

2.1 pShuttle-CMV-p14ARF 质粒双酶切鉴定

p14 用 *Bgl* II、*Xho* I 双酶切胶回收 402 bp 大小的目的片段,同时 *Bgl* II 和 *Xho* I 双酶切 pShuttle-cmv 质粒,割胶回收得到 6400 bp 大小的目的片段。成功得到 p14 基因片段与 pShuttle-cmv 载体片段,用 T4 连接酶连接两个片段,转化到 DH5 α 感受态细胞。成功的长出单菌落,挑选 4 管,摇床培养。提取质粒用 *Bgl* II、*Xho* I 双酶切鉴定,得到目的片段大小与预期相符(图 1)。测序结果与酶切鉴定结果一致,成功构建 pShuttle-cmv-p14ARF 质粒。

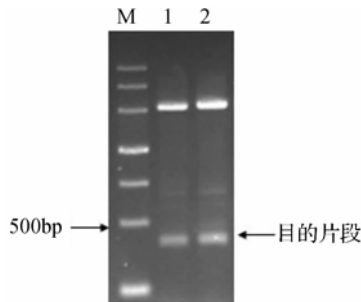


图 1 pShuttle-cmv-p14ARF 经 *Xho* I / *Bgl* II 双酶切鉴定
M: DNA Marker; 1,2: pShuttle-cmv-p14ARF

2.2 重组病毒 Ad-pShuttle-CMV-p14ARF 的鉴定

用重组腺病毒质粒 pAdEasy-pShuttle-CMV-p14ARF 转染 293A 细胞,包装病毒并进行小量扩增,抽提病毒 DNA,进行 PCR 扩增鉴定,以确定是否为重组目的病毒。PCR 结果表明病毒重组成功(图 2)。

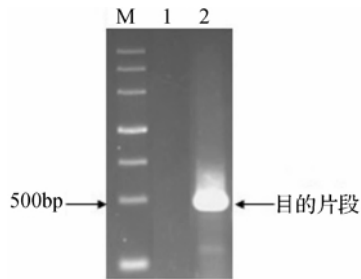
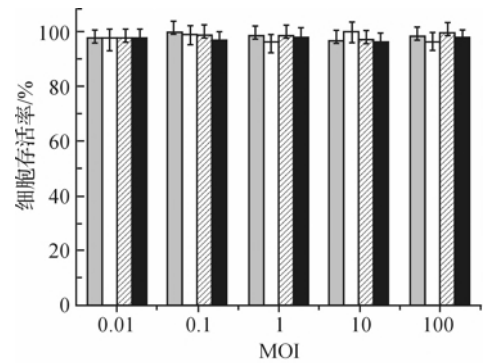


图 2 重组病毒 AdEasy-pShuttle-CMV-p14ARF 鉴定
M: DNA Marker; 1: 空白对照; 2: 目的病毒

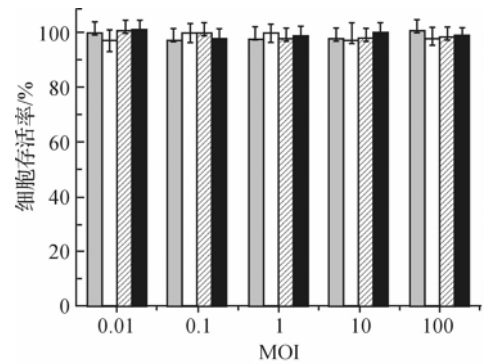
2.3 复制缺陷型腺病毒 PCA 对结肠癌细胞株的生长抑制作用

以不同 MOI 的复制缺陷型腺病毒 PCA 分别感染细胞,不同时间处理后检测其对结肠癌细胞株存活率的影响,结果如图 2、图 3 所示。PCA 对结肠癌细胞株 SW480 与 HT-29 的抑制作用存在剂量与时间依赖性。100 MOI 病毒作用 96 h 后 SW480 与 HT-29 细胞存活率

分别为 51.5%和 36.4%,说明 PCA 对这两株结肠癌细胞都有较强的抑制作用,但抑制作用差异明显($P < 0.05$)。



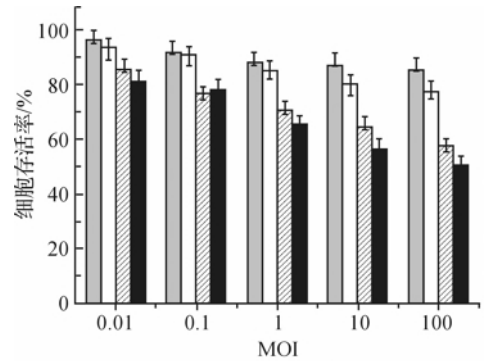
a) SW480



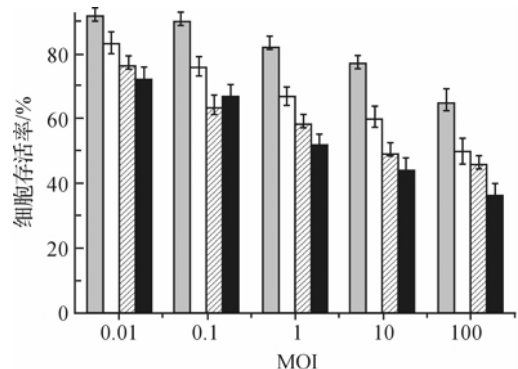
b) HT-29

■ 24 h, □ 48 h, ▨ 72 h, ■ 96 h

图 3 对照病毒 Ad 对结肠癌细胞株的杀伤作用



a) SW480



b) HT-29

■ 24 h, □ 48 h, ▨ 72 h, ■ 96 h

图 4 PCA 对结肠癌细胞株的杀伤作用

2.4 细胞形态学观察

结肠癌细胞 SW480 和 HT-29 经 PCA 处理后出现典型凋亡变化,结果如图 5、图 6 所示。0.01、0.1、1、10、100 MOI 的 PCA 处理 48 h 后,光学显微镜下观察细胞生长状态。SW480 和 HT-29 细胞生长均受到明显抑制,出现典型的凋亡形态学变化:细胞皱缩,细胞膜出现发泡现象,细胞核浓缩。

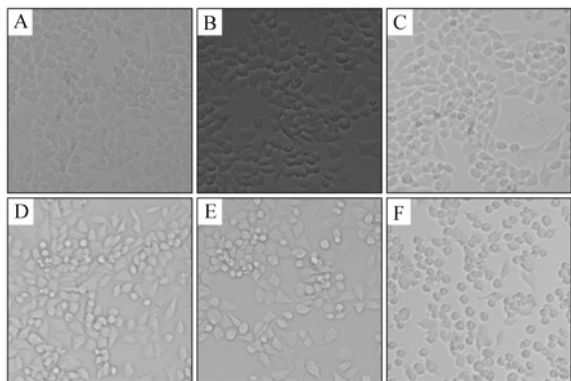


图 5 经不同浓度 PCA 处理后 SW480 细胞形态学观察
A: 对照组(加 PBS); B: 0.01 MOI; C: 0.1 MOI;
D: 1 MOI; E: 10 MOI; F: 100 MOI

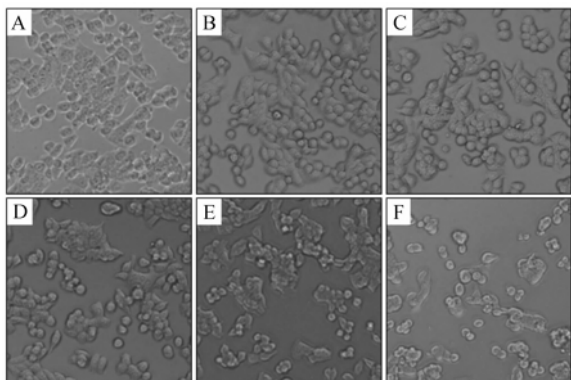


图 6 经不同浓度 PCA 处理后 HT-29 细胞形态学观察
A: 对照组(加 PBS); B: 0.01 MOI; C: 0.1 MOI;
D: 1 MOI; E: 10 MOI; F: 100 MOI

2.5 结晶紫实验分析 PCA 对结肠癌细胞 SW480、HT-29 的杀伤能力

结晶紫实验用于观察比较不同浓度的 PCA 对结肠癌细胞 SW480 和 HT-29 杀伤效果。图 7 所示,随着 PCA 浓度的增加,对 SW480 和 HT-29 的杀伤作用均显著提高。

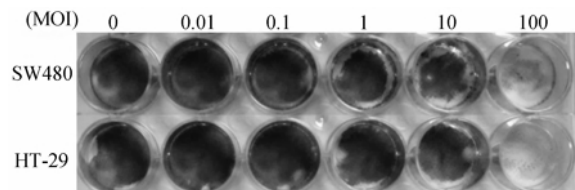


图 7 结晶紫染色检测肿瘤细胞的病变效应

2.6 Hoechst33258 染色观察细胞凋亡

为进一步检测 PCA 处理细胞后细胞核的形态学变化以及凋亡情况,用 Hoechst33258 染色法在荧光显微镜下观察各处理组的细胞形态变化。图 8、图 9 显示,对照组细胞核形状规则,染色质分布均匀,细胞所发荧光较弱且均匀。而病毒处理组中,由于发生凋亡的细胞中细胞核染色质会发生明显凝集、固缩,并伴有核碎裂及凋亡小体出现,因此荧光显微镜下观察到呈亮蓝色的固缩的染色质,且随着病毒浓度增加,颗粒状或碎片状致密浓染逐渐增多。

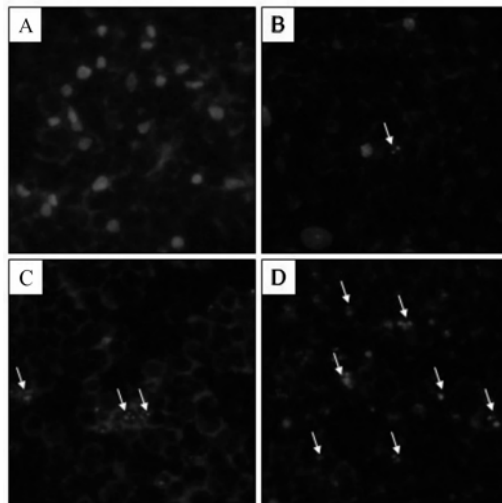


图 8 Hoechst33258 染色检测 SW480 细胞凋亡
A: 对照组(加 PBS); B: 0.1 MOI;
C: 10 MOI; D: 100 MOI

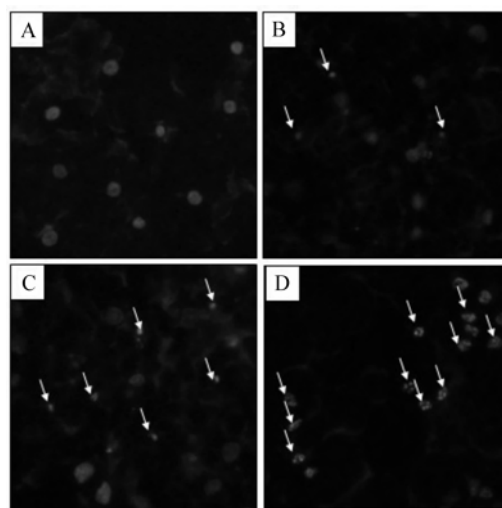


图 9 Hoechst33258 染色检测 HT-29 细胞凋亡
A: 对照组(加 PBS); B: 0.1 MOI;
C: 10 MOI; D: 100 MOI

3 讨论

结肠癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一,

而化疗作为结肠癌综合治疗的重要组成部分,对人体有一定的副作用。因此,临床上迫切需要将放化疗与其他更好的治疗方式相结合,以延长患者的生存期和改善患者的生存质量。在诸多治疗方式中,基因治疗逐渐受到全世界的关注并被广泛研究。本研究利用 Adeasy 系统成功构建携带 p14ARF 基因的复制缺陷型腺病毒,命名为 Ad-pShuttle-CMV-p14ARF(PCA)。

近年来研究发现,在人类恶性肿瘤中,p14ARF 基因所在的 INK4a/ARF 染色体位点基因异常的频率仅次于 p53 基因的突变频率。Kamijio 等^[10]报道 p14ARF 基因缺失的小鼠能够自发形成肿瘤,并在 1 年内死亡,同时发现肿瘤的形成常伴随着残留的 ARF 等位基因的丢失和 ARF mRNA 表达的缺乏。由此看出,p14ARF 基因在肿瘤发生过程中可能起到一定作用。Burri 等^[11]报道,在原发性结肠癌的 p14ARF 基因的甲基化频率约 33%,而且 p14ARF 的甲基化与 p53 的表达呈负相关。Esteller 等^[12]进一步证明含有未甲基化启动子的 p14ARF 细胞显现出强阳性的 HDM2 的核表达,而在 p14ARF 高度甲基化的细胞,用去甲基化试剂处理能使 MDM2 重新定位于核,而且 p53 表达恢复正常。这些研究提示 ARF 基因可能通 ARF-MDM2-p53 途径参与了细胞周期的调节。由于 p14ARF 蛋白的表达缺失在人类肿瘤中发生频率高,使 p14ARF 成为基因治疗中一个很好的候选基因。

本实验将构建的重组腺病毒感染结肠癌细胞株 SW480 和 HT-29,通过检测细胞的存活率来分析腺病毒 PCA 对结肠癌细胞的杀伤能力。实验结果显示重组腺病毒 PCA 能够有效地杀伤结肠癌细胞。对细胞进行形态学观察,发现结肠癌细胞 SW480 和 HT-29 用 PCA 处理后出现典型凋亡变化。用来进一步验证的结晶紫实验更直观地显示,病毒对结肠癌细胞 SW480 和 HT-29 的杀伤作用呈浓度依赖性。Hoechst33258 染色发现发生凋亡的细胞中细胞核染色质会发生明显凝集、固缩,并伴有核碎裂及凋亡小体出现,且随着病毒浓度增加,颗粒状或碎片状致密浓染逐渐增多。综上所述,重组腺病毒 PCA 对两株结肠癌细胞的生长抑制作用显著,说明 p14ARF 基因确实能发挥抑制肿瘤的作用。本研究为 p14ARF 基因的靶向基因-病毒治疗提供参考,同时也为进一步研究 p14ARF 基因的抗肿瘤机理奠定了基础。随着对 p14ARF 基因的深入研究,p14ARF 基因在肿瘤基因治疗中的应用会更加广泛。

参考文献:

- [1] 马爱姐,杨春欣,董颖,等. 结肠癌药物治疗的新进展 [J]. 中国药房, 2003, 14(1): 48.
- [2] Millan A, Huerta S. Apoptosis-inducing factor and colon cancer [J]. Journal of Surgical Research, 2009, 151(1): 163-170.
- [3] Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Development of safe and effective nonviral gene therapy by eliminating CpG motifs from plasmid DNA vector [J]. Front Biosci; Schol Ed, 2012(4): 133-141.
- [4] Lavorato-Rocha A M, de Melo Maia B, Rodrigues I S, et al. Prognostication of vulvar cancer based on p14ARF status: molecular assessment of transcript and protein [J]. Annals of Surgical Oncology, 2012(20): 31-39.
- [5] LutfulKabir F M, Agarwal P, DeInnocentes P, et al. Novel frameshift mutation in the p16/INK4A tumor suppressor gene in canine breast cancer alters expression from the p16/INK4A/p14ARF locus [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2012, 114(1): 56-66.
- [6] Saggini A, Bastian B. Molecular Pathology of cutaneous melanoma and nonmelanoma skin cancer [J]. Molecular Surgical Pathology, 2013, 269-306.
- [7] Hew H C, Liu H, Miki Y, et al. PKC δ regulates Mdm2 independently of p53 in the apoptotic response to DNA damage [J]. Molecular Carcinogenesis, 2011, 50(9): 719-731.
- [8] Herranz S, Través P G, Luque A, et al. Role of the tumor suppressor ARF in macrophage polarization: Enhancement of the M2 phenotype in ARF-deficient mice [J]. Onco Immunology, 2012, 1(8): 1.
- [9] Stec D E, Morimoto S, Sigmund C D. AdEasy system made easier by selecting the viral backbone plasmid preceding homologous recombination [J]. Biotechniques, 2001, 31(2): 260-262.
- [10] Kamijo T, Bodner S, van de Kamp E, et al. Tumor spectrum in ARF-deficient mice [J]. Cancer Research, 1999, 59(9): 2217-2222.
- [11] Burri N, Shaw P, Bouzourene H, et al. Methylation silencing and mutations of the p14ARF and p16INK4a genes in colon cancer [J]. Laboratory Investigation, 2001, 81(2): 217-229.
- [12] Esteller M, Cordon-Cardo C, Corn P G, et al. p14ARF silencing by promoter hypermethylation mediates abnormal intracellular localization of MDM2 [J]. Cancer Research, 2001, 61(7): 2816-2821.

(下转第 918 页)

Effect of Deverbalization on Elimination of Language Transformation Disorder in Interpretation

——Take Interpretation in Premier Wen's Press Conference in 2012 for Example

JIN Yi-tong

(School of Foreign Languages, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: This paper discusses the effect of deverbalization on elimination of language transformation disorder in interpretation through theoretical analysis on core content deverbalization of interpretive theory with consecutive interpreting in Premier Wen Jiabao's press conference in 2012 as research text. Language transformation disorder can be classified into semantic conversion disorder, sentence pattern reorganization disorder and cultural connotation transmission disorder. A conclusion is made through specific analysis on examples related to these three aspects that appropriate use of deverbalization can effectively eliminate language form disorder and cultural difference disorder in English-Chinese transformation process.

Key words: deverbalization; language transformation disorder; cognition of interpretation; cognitive integration

(责任编辑: 马春晓)

(上接第 905 页)

Establishment of Replication-deficient Recombinant Adenovirus PCA and Its Influence on Cell Growth of Colon Cancer

HUANG Yue, CHEN Wen-duo, ZHOU Wei, GAO Yong, DONG Miao, XU Shao-wei, XU Tao, TANG Bin

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

Abstract: This paper successfully establishes replication-deficient recombinant adenovirus called Ad-pShuttle-CMV-p14ARF (PCA) which carries p14ARF gene using Adeasy system through homologous recombination; studies its lethal effect on colon cancer cell strains SW480 and HT-29; identifies positive recombinant subvirus with PCR method; detects the influence of PCA on cell proliferation with MTT method; detects morphological change of cell apoptosis with Hoechst33258 fluorescent staining method; and conducts qualitative analysis on the lethal effect of PCA on two colon cancer cells with crystal violet staining. The result shows that SW480 and HT-29 have obvious lesion and growth inhibition phenomena and present time and concentration dependence under the action of target virus PCA; apoptotic body occurs in cells after Hoechst staining and its number increases with the increase of medication concentration.

Key words: Ad-p14-ARF; colon cancer; MTT; crystal violet staining; apoptosis

(责任编辑: 许惠儿)