

携带 Kallistatin 的溶瘤腺病毒载体构建及其对肝癌细胞的体外杀伤效应

夏玉龙, 马步云, 肖睿娟, 雷 文, 杨远勤, 王毅刚

(浙江理工大学生命科学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

摘 要: 采用靶向基因一病毒治疗策略,通过同源重组的方式构建了携带 Kallistatin(KAL)的重组溶瘤腺病毒 ZD55-KAL,并研究其对肝癌细胞的杀伤作用。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杀伤能力和对正常细胞的安全性;结晶紫染色观察细胞凋亡现象。结果显示:经目的病毒 ZD55-KAL 感染后肝癌细胞出现明显的病变和生长抑制,而正常细胞未出现病变现象,表明目的病毒具有较高的安全性和对肿瘤细胞的特异性杀伤能力。此外 ZD55-KAL 感染肝癌细胞后引起凋亡,所携带的治疗基因 KAL 能通过促进肿瘤的凋亡达到抑制肿瘤细胞生长的效果。

关键词: ZD55-KAL; MTT; 结晶紫染色; 靶向基因一病毒治疗

中图分类号: Q789

文献标识码: A

目前癌症的治疗主要依赖于手术治疗以及放化疗,但对中晚期的肿瘤,这些传统方法束手无策。基因治疗通过载体携带基因来治疗疾病,此概念一经提出,很快得到全世界的重视,并被应用于肿瘤治疗。临床研究的结果显示肿瘤的基因治疗是非常安全的,但其抗肿瘤效应不能充分满足临床治愈肿瘤患者的需要。刘新垣院士于 2001 年首次提出肿瘤的靶向基因一病毒治疗策略^[1],此策略是在基因治疗的基础上发展起来的,它联合了基因治疗和病毒治疗的优势并且能使病毒只特异性地在肿瘤中复制而在正常细胞中不复制,安全性和疗效都有很大的提高。本研究通过同源重组的手段构建携带 Kallistatin(KAL)的重组溶瘤腺病毒。

Kallistatin 是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂,可以与 Kallikrein(血管舒缓素)特异性的结合并抑制其功能的发挥^[2]。近年研究发现,它还具有抑制血管生成、抗高血压、抗炎和抗肿瘤活性,并且这些功能的发挥并不依赖其与 Kallikrein 的结合^[3]。Kal-

listatin 通过与 VEGF 和 bFGF 等生长因子竞争结合硫酸肝素糖蛋白(HSPGs)受体,因此可阻断这些生长因子引发的血管生成,产生抗肿瘤活性^[4]。在 Kallistatin 的作用下,肿瘤细胞中作为细胞增殖的标志物 Ki-67 染色降低,显示 Kallistatin 可以直接抑制肿瘤细胞增殖^[5]。

本实验利用 KAL 具有的抗肿瘤能力,将其构建到溶瘤腺病毒载体 ZD55,得到 ZD55-KAL。该溶瘤腺病毒由于删除 E1B55Kd 区域后能特异性地在肿瘤细胞中增殖从而具有靶向性,既能利用腺病毒杀伤肿瘤细胞的特性,又因为腺病毒能大量扩增使得 KAL 基因在肿瘤细胞中大量表达,发挥双重抑制肿瘤的效果^[1]。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞,菌株,质粒

大肠杆菌 DH5 α (TRANS), 质粒 pCA13,

收稿日期: 2011-11-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(30800093);浙江省大学生科技创新计划课题(2010R406036);浙江理工大学科研启动基金项目(1016845-Y,1016834-Y)

作者简介: 夏玉龙(1986-),男,安徽合肥人,硕士研究生,主要从事肿瘤的靶向基因一病毒治疗的研究。

通讯作者: 王毅刚,电子邮箱: wangyigang43@163.com

pZD55, pBHGE3(中国科学院生物化学与细胞生物学研究所提供), 肝癌细胞 SMMC-7721 和人胚肺纤维细胞 MRC5 由本实验室细胞库保存。

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);DNA PCR 纯化试剂盒(爱思进公司);DNA ligation kit;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 仪器

5415R centrifuge (Eppendorf), 酶标仪 (Bio-Tek), CO₂ 培养箱 (Thermo), 荧光显微镜 (OLYMPUS)。

1.2 方法

1.2.1 KAL 基因的克隆

根据 GeneBank(NM_006215.2)公布的 KAL 基因序列设计引物, 上游引物为 5'-GGAATTCATGCATCTTATCGACTAC-3'(下划线为 *Eco*R I 酶切位点); 下游引物为 5'-GCTCTAGACTATGGTTTCGTGGGGTC-3'(下划线为 *Xba* I 酶切位点)。用引物从 cDNA 文库中通过 PCR 扩增得到 KAL 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 *Eco*R I / *Xba* I 双酶切后回收。

1.2.2 含 KAL 基因的质粒 pCA13-KAL 的构建

将质粒 pCA13 用 *Eco*R I / *Xba* I 双酶切后回收载体大片段, 将其与 1.2.1 酶切回收得到的 KAL 基因经 DNA 连接酶连接并转化, 37℃ 培养 12 h 后挑取阳性克隆于 LB 液体培养基摇床培养 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 KAL 基因的 pCA13 质粒命名为 pCA13-KAL。

1.2.3 腺病毒穿梭质粒 pZD55-KAL 的构建

将构建得到的 pCA13-KAL 载体, 再利用 *Bgl* II 单酶切, 获得携带 KAL 基因的表达框, 将其连接到另一经过 *Bgl* II 酶切的穿梭质粒 pZD55 中, 构建得到 pZD55-KAL, 并经酶切和测序鉴定均正确, 至此, 载体构建全部完成。

1.2.4 重组腺病毒的包装、鉴定、扩增以及滴度的测定

将构建的穿梭质粒 pZD55-KAL 与腺病毒的骨架质粒 pBHGE3 共转染 HEK293 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 KAL 基因的重组溶瘤腺病毒。病毒的体外扩增选用 HEK293 细胞, 并用分光光度计测定病毒的滴度。

1.2.5 MTT 法检测 ZD55-KAL 病毒对肿瘤细胞的杀伤能力

加病毒前一天分别将生长状态良好的 SMMC-7721 和 MRC5 细胞消化后计数, 按 1.0×10^4 /孔接种到 96 孔板中, 放至 37℃, 5%CO₂ 条件下培养。待细胞贴壁后, 加入浓度分别为 5、10、20、40 MOI 的 ZD55-KAL 10 μL 于每列孔中, 以不加病毒作为对照, 每组各设 6 个重复, 剩余的边缘区域只加培养基作为空白对照, 病毒感染 4 d 后, 每孔加入 20 μL / MTT 溶液(浓度为 5 mg/mL)。加入 MTT 后继续放至培养箱中培养 4 h, 小心倒掉 96 孔板中的液体, 每孔加 150 μL 的 DMSO, 摇床上振荡 15 min, 使结晶物充分溶解。用酶标仪检测 595nm 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) × 100%。以病毒浓度为横轴, 细胞存活率为纵坐标轴绘制细胞生长活力曲线。

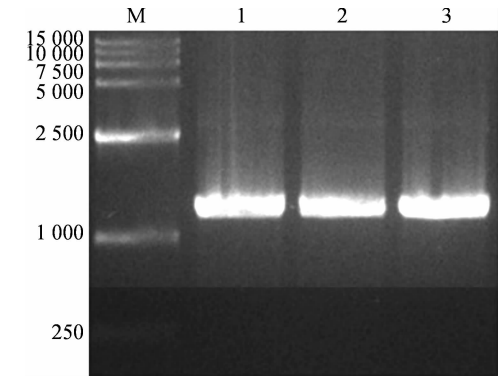
1.2.6 结晶紫染色检测细胞数

将生长状态良好的 SMMC-7721 细胞消化后计数, 按 $(5.0 \sim 4.0) \times 10^5$ /孔接种到 24 孔板中, 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 37℃, 5% CO₂ 条件下培养。等细胞贴壁后, 加入浓度分别为 0、1、5、10、20、40 MOI 的 ZD55-KAL 和 ONYX015 100 μL 于每列孔中。其中, 浓度为 0 的为对照组, 每组做两个重复。病毒感染 4 d 后, 倒掉上清液, 用 PBS 小心洗涤 1 次, 每孔加 0.25 mL 10% 甲醇溶液固定细胞 30 s, 然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。

2 实验结果

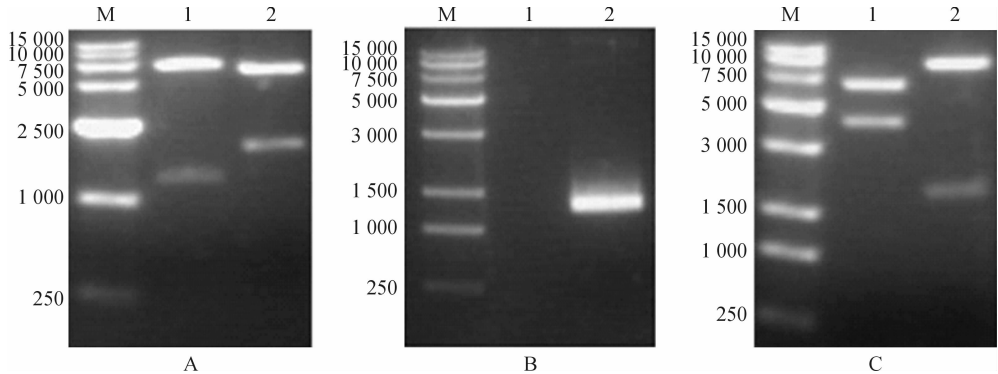
2.1 Kallistatin 基因的克隆

利用 PCR 技术, 设计 KAL 基因上下游引物, 以人 cDNA 为模板在 Marker1000 bp 条带出有明显的目的基因片段条带。该片段有 *Eco*R I 和 *Xba* I 酶切位点, 见图 1。



M: D15 000 Marker, 泳道 1~3 为 3 个重复的 PCR 产物

图 1 PCR 产物 KAL 的电泳分析

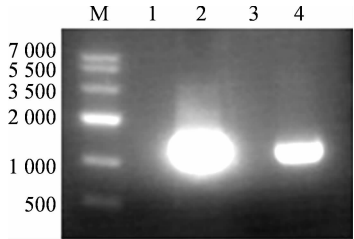


A) pCA13-KAL 酶切鉴定结果。M: DNA marker D15 000;1:质粒 pCA13-KAL 经 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切;2:pCA13-KAL 经 *Bgl* II 单酶切。B)pCA13-KAL 经 PCR 鉴定的结果。M: Trans15K DNA marker;1:不加模板 pCA13-KAL 质粒的对照组;2:加模板 pCA13-KAL 质粒的 PCR 结果。C)pZD55-KAL 分别经 *Bgl* II 和 *Bam* H I 单酶切鉴定的结果。M: Trans15K DNA marker;1:质粒 pZD55-KAL 经 *Bam* H I 酶切;2:质粒 pZD55-KAL 经 *Bgl* II 单酶切

图 2 重组腺病毒质粒 pCA13-KAL 和 pZD55-KAL 的鉴定结果

2.3 包装的重组腺病毒鉴定结果

提取溶瘤腺病毒 ONYX015 和重组腺病毒 ZD55-KAL 病毒基因组并作为模板,以 KAL 基因设计的引物进行 PCR,结果如图 3。



M:DNA Maker VI;1:不加模板的对照组;
2:添加 pZD55-KAL 质粒作为模板的 PCR 结果;
3:ONYX015 病毒基因组作为模板;
4:ZD55-KAL 病毒基因组作为模板的 PCR 结果

图 3 重组腺病毒 ZD55-KAL 的 PCR 鉴定结果

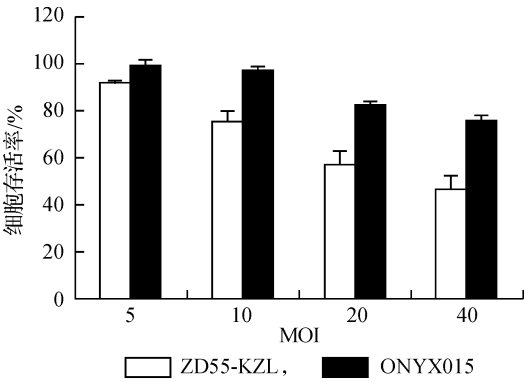
2.4 目的病毒对肝癌细胞增殖的影响

为确定目的病毒 ZD55-KAL 对肝癌细胞增殖的影响,以不同 MOI 的病毒 ZD55-KAL 与 ONYX015 处理肝癌细胞 SMMC-7721 和正常细胞

2.2 携带 KAL 基因的重组腺病毒质粒 pCA13-KAL 和 pZD55-KAL 的鉴定

重组质粒 pCA13-KAL 经 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定得到大小相符的目的片段,经 *Bgl* II 单酶切鉴定,结果与预期一样。重组腺病毒质粒 pCA13-KAL 经 PCR 鉴定也获得与目的片段大小相同电泳结果。重组质粒 pZD55-KAL 经 *Bgl* II 单酶切鉴定得到两个大小相符的目的片段,经 *Bam* H I 单酶切鉴定也获得预期的目的片段。结果如图 2。

MRC5,MTT 法检测 72 h 后细胞存活率的变化,结果如图 4 所示。ZD55-KAL 对肝癌细胞的杀伤率随 MOI 的增加而增加,存在剂量依赖性,40 MOI 时细胞存活率为 46%,杀伤效果较好,与对照病毒 ONYX-015 相比存在显著性差异($P<0.05$),且在 5、10 MOI 时差异极显著($P<0.01$)(见图 4A)。同时与肝癌细胞相比,目的病毒对正常细胞 MRC5 的杀伤率显著降低($P<0.05$),说明其安全性较好(见图 4B)。



(A) SMMC-7721 4d

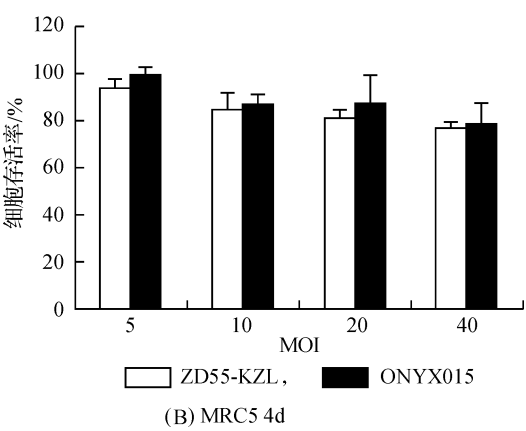


图 4 MTT 法检测目的病毒对肝癌细胞增殖的影响

2.5 结晶紫实验分析 ZD55-KAL 对肝癌细胞 SMMC-7721 的杀伤能力

为了观察比较不同滴度的 ZD55-KAL 作用肝癌细胞 SMMC-7721 后的不同效果,进行了结晶紫实验。结果如图 5 所示,随着 ZD55-KAL 浓度的增加,对 SMMC-7721 杀伤效果显著提高。与对照组相比,其杀伤能力也明显高于没有携带 KAL 基因的 ONYX015 病毒。该实验结果证明 ZD55-KAL 处理对 SMMC-7721 细胞的杀伤效果随着浓度的增加明显强于 ONYX015 的杀伤效果。

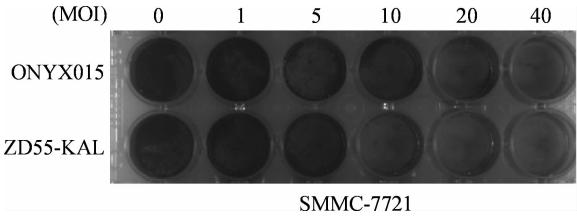


图 5 不同病毒浓度组对细胞产生的毒性效果

3 讨论

肝癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一,而化疗作为肝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。在众多的治疗方式中,基因治疗逐渐受到全世界的关注并被广泛研究,其中癌症的靶向基因—病毒治疗作为近年来新兴的肿瘤新疗法,备受关注,其理念就是利用病毒在细胞中无限复制能力与一些抑癌基因的肿瘤杀伤力联合治疗肿瘤。而本实验中构建了重组溶瘤腺病毒 ZD55-KAL 对肝癌细胞进行研究,从而特异性地靶向杀伤肝癌细胞。

ZD55-KAL 的载体是溶瘤腺病毒 ZD55,该溶瘤腺病毒由于删除 E1B55Kd 区域后能特异性在肿瘤细胞中增殖从而具有靶向性,其所携带的治疗基

因 KAL 是一种肿瘤抑制基因,其表达的蛋白 Kallikreins 是一类丝氨酸蛋白酶,至今已发现 178 种人类丝氨酸蛋白酶,占人类基因组编码总蛋白水解酶的 32%^[6]。可将 Kallikreins 分成两大类:基质型 Kallikreins 和组织型 Kallikreins。基质型 Kallikreins 是由一个基因编码的,位于人染色体的 4q35。基质型 Kallikreins 仅专一性地在肝脏中表达并编码一种能促进缓激肽释放的酶,进而参与血液的凝固和纤维蛋白的水解。组织型 Kallikreins 是丝氨酸蛋白酶家族的一个亚群,由 15 个成员组成。所有成员在基因和蛋白质结构上高度保守,不仅序列同源性高,且同定位在人染色体 19q3.4 上^[7-8]。最近的研究表明,Kallikreins 可以从不同途径抑制血管生成,是肿瘤抗血管生成治疗的良好候选者,又可以直接作用于肿瘤细胞,抑制肿瘤细胞增殖,是一种广谱的抗肿瘤内源性因子^[9]。其抗血管生成作用与已上市药物内皮抑素(Endostatin)类似,可以与 VEGF 和 bFGF 等生长因子竞争结合硫酸肝素糖蛋白(HSPGs)受体,因此可阻断这些生长因子引发的血管生成^[10-11]。由于以上特殊功能使得 KAL 基因成为肿瘤治疗基因的一个重要成员。

本实验将 KAL 基因克隆到溶瘤腺病毒载体 ZD55 上得到重组病毒 ZD55-KAL,并且将其感染肝癌细胞和人胚肺纤维正常细胞,检测细胞的存活率来分析溶瘤腺病毒 ZD55-KAL 的安全性和对肝癌细胞的杀伤能力。实验结果显示重组溶瘤腺病毒 ZD55-KAL 有效地杀伤肝癌细胞和诱导凋亡,而不影响正常细胞的生长(如图 4)。进一步验证的结晶紫实验显示,携带 KAL 基因的重组溶瘤腺病毒比溶瘤腺病毒 ONYX015 对肝癌细胞更具杀伤性(如图 5)。总而言之,ZD55-KAL 同时具备了病毒治疗和基因治疗两者的优势,在试验过程中 KAL 基因确实能发挥抑制肿瘤的作用,增强了溶瘤腺病毒抑制肿瘤增殖效果,为更好地利用 KAL 基因用于靶向肝癌的基因—病毒治疗提供参考,同时也为进一步研究 KAL 基因的抗肿瘤机理奠定了基础。但是肝癌是由多基因异常改变导致的,肝癌发病机理相对复杂,因此单一的治疗基因难以有效弥补其基因缺陷,需要多方面进行调控,基因—基因协同就是很有效的方面之一。所以 KAL 协同其他基因的多基因靶向肝癌细胞值得更进一步探讨和研究。

参考文献:

[1] Zhang Z L, Liu X Y, Zou W G, et al. An armed onco-

lytic adenovirus system, ZD55-gene, demonstrating potent antitumoral efficacy[J]. *Cell Res*, 2003, 13(6): 481-489.

[2] Shen B, Gao L, Hsu Y T, et al. Kallistatin attenuates endothelial apoptosis through inhibition of oxidative stress and activation of Akt-eNOS signaling[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(5): 1419-1427.

[3] Chao J. Novel roles of kallistatin, a specific tissue kallikrein inhibitor, in vascular remodeling[J]. *Biol Chem*, 2001, 382(1): 15-21.

[4] Miao R Q, Agata J, Chao L, et al. Kallistatin is a new inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. *Blood*, 2002, 100(9): 3245-3252.

[5] Jeschke U, Schiessl B, Mylonas I, et al. Expression of the proliferation marker Ki-67 and of p53 tumor protein in trophoblastic tissue of preeclamptic, HELLP, and intrauterine growth-restricted pregnancies[J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2006, 25(4): 354-360.

[6] Diamandis E P, Yousef G M. Human tissue kallikreins: a family of new cancer biomarkers [J]. *Clin Chem*, 2002, 48(8): 1198-1205.

[7] Su Z Z, Goldstein N I, Jiang H, et al. PEG-3, a non-transforming cancer progression gene, is a positive regulator of cancer aggressiveness and angiogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(26): 15115-15120.

[8] Metheny-Barlow, Linda J, Li L Y. Vascular endothelial growth inhibitor (VEGI), an endogenous negative regulator of angiogenesis[J]. *Semin Ophthalmol*, 2006, 21(1): 49-58.

[9] Chow T F, Earle T, El-Said H, et al. Kallikreins as microRNA targets: an in silico and experimental-based analysis[J]. *Biol Chem*, 2008, 389(6): 731-738.

[10] Talieri M L. The 2nd International Symposium on Kallikreins and Kallikrein-Related Peptidases (ISK 2007) and the Commemorative Gold Medal of the E. K. Frey-E. Werle Foundation of the Henning L. Voigt Family [J]. *Biol Chem*, 2008, 389(6): 621-622.

[11] Rabien A. Human kallikreins as tumor markers: Validation of potential marker of prostate cancer in serum and tissue[J]. *Urologe A*, 2007, 46(9): 1070-1071.

Construction of Oncolytic Adenovirus Vector Carrying Kallistatin and Its Killing-Effect to Liver Cancer Cells in Vitro

XIA Yu-long, MA Bu-yun, XIAO Rui-juan, LEI Wen, YANG Yuan-qin, WANG Yi-gang
(Xinyuan Institute of Medicine and Biochnology, School of Life Sciences, Zhejiang
Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Here the authors use targeting gene-virotherapy strategy to construct recombinant oncolytic adenovirus ZD55-KAL harboring Kallistatin(KAL) gene by homologous recombination method, and investigate its antitumor effect to liver cancer cells. Subsequently, PCR for identification of recombinant virus, MTT assay and crystal violet staining for detection of tumor killing-effect and safe to normal cells is performed. The results show that the hepatoma cells have apparent lesions and growth inhibition effect after infection by ZD55-KAL, while no impact on the normal cells showing its high security. In addition, infection by the therapeutic viruses causes apoptosis of hepatoma cells by carrying the KAL gene, indicating the perfect security ability and the effect of inhibition of tumor cell growth.

Key words: ZD55-KAL; MTT; crystal violet staining; targeted gene-virus therapy
(责任编辑: 许惠儿)