

人肿瘤抑素基因真核表达载体的构建及其活性研究*

李子博,付祖娇,周江,罗洁(长沙医学院医学检验系,长沙 410219)

【摘要】 目的 构建携带人肿瘤抑素(Tumstatin)基因的重组腺相关病毒载体,研究其对入脐静脉内皮细胞(HUVECs)增殖的影响。**方法** 构建重组载体 pAAV-Tum 质粒,并建立一株稳定表达 Tumstatin 基因的 HUVECs 细胞株。用逆转录聚合酶链反应检测该细胞系中 Tumstatin 基因的表达,四甲基唑蓝法检测该细胞增殖情况。**结果** 构建的 pAAV-Tum 重组腺相关病毒载体能在 HUVECs 细胞中表达,其表达产物能抑制该细胞增殖(0.335 ± 0.011)。**结论** 成功构建了 pAAV-Tum 重组载体,构建的重组载体能有效表达,为其后的抗肿瘤血管生成治疗研究奠定了基础。

【关键词】 肿瘤抑素; 腺相关病毒; 基因治疗

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.24.005 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)24-2954-02

Study on the construction of recombinant AAV vector mediated tumstatin gene and its activity* LI Zi-Bo, FU Zu-Jiao, ZHOU Jiang, LUO Jie (Department of Medical Laboratory, Changsha Medical College, Changsha, 410219, China)

【Abstract】 Objective To construct the recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector containing tumstatin gene and to detect its effect on the proliferation ability of HUVECs cells. **Methods** The pAAV-Tum recombinant plasmid was obtained, and HUVECs cell line stably expressing Tumstatin gene was established. Then the mRNA level of pAAV-Tum was detected by RT-PCR and the proliferation ability of transfected cell line was measured by MTT assay. **Results** The pAAV-Tum recombinant plasmid could express in HUVECs cell and its expression product could suppress the proliferation of HUVECs cell. **Conclusion** Recombinant AAV vector, which contained Tumstatin gene, was constructed successfully, and can express efficiently.

【Key words】 tumstatin; adeno-associated virus; gene therapy

有研究证明,肿瘤的新生血管能为肿瘤提供营养、排泄及代谢产物,促进肿瘤生长,并为肿瘤细胞的转移提供途径^[1]。如果能抑制肿瘤新生血管的生成,肿瘤细胞将发生凋亡或坏死^[2]。与传统的肿瘤治疗方法相比,抑制新生血管生成疗法由于作用于遗传稳定、不易变异的血管内皮细胞,不易产生耐药性;而且内源性血管生成抑制因子具有抑制肿瘤内皮细胞增殖的高度选择性^[3],因而成为肿瘤治疗领域很有前途的治疗方法之一。肿瘤抑素(Tumstatin)是新近发现的一种活性最强的内源性肿瘤血管生成抑制因子,抑制血管内皮细胞蛋白的合成、诱导内皮细胞凋亡,进而抑制血管生成,同时还可以抑制肿瘤细胞增殖并促进其凋亡,从而抑制肿瘤生长,但不影响生理性血管的生成^[4]。

本研究通过构建人 Tumstatin 基因真核表达载体,初步研究其在体外对血管内皮细胞生长的影响,为探讨 Tumstatin 基因治疗肿瘤的可行性奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、菌株和质粒 人胚肾细胞 HEK293 与人脐静脉内皮细胞(HUVECs)来自中南大学湘雅医学院细胞中心,在 37℃ 下,在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养。DH5 α 感受态细菌与质粒 pAAV-MCS 均来自中南大学生命科学与

技术学院分子生物学研究中心。

1.1.2 主要试剂 高保真 Taq DNA 聚合酶、逆转录试剂盒购自 Roche 公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、质粒 DNA 提取试剂盒购自 TaKaRa 公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒与四甲基唑蓝粉剂购自 Sigma 公司;DMEM、新生胎牛血清、胰蛋白酶、脂质体转染试剂盒、RNA-TRIzol 试剂盒均购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 引物 根据 GenBank 中 Tumstatin 编码序列,设计两条引物,序列为 T1:5'-GCT CTA GAC CAG GTT TGA AA GGA AAA CGT-3'; T2:5'-CCG AAG CTT TCA GTG TCT TTT CTT CAT-3',由大连宝生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 人 Tumstatin 基因的克隆 利用 RNA 提取试剂盒提取人胚肾细胞 HEK293 总 RNA,利用逆转录试剂盒进行逆转录聚合酶链反应(RT-PCR),首先以 Oligo(dT)15 为引物合成 cDNA 第一链,然后利用引物 T1 与 T2 进行常规 PCR。反应条件:反应体积为 50 μ L,94℃ 2 min,94℃ 40 s,56℃ 45 s,72℃ 50 s,共 35 个循环;72℃ 10 min,于 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察试验结果。

1.2.2 重组载体 pAAV-Tum 的构建与鉴定 将 PCR 产物经琼脂糖凝胶回收试剂盒回收,纯化,然后用 Xba I 酶和 Hind III

* 基金项目:湖南省教育厅基金资助项目(09C153)。

酶双酶切,然后与经同样酶部分酶切处理的 pAAV-MCS 载体进行连接,T4 DNA 连接酶连接。取 5 μL 转化 DH5α 大肠埃希菌,筛选阳性克隆,得到质粒 pAAV-Tum。提取重组质粒 DNA,进行双酶切和测序鉴定^[5]。

1.2.3 细胞转染实验 提取质粒 pAAV-Tum,利用脂质体(Lipofectamine2000)转染试剂盒,按操作说明书转染 HUVECs,用 400 μg/mL 的 HygromycinB 进行筛选,隔 2~3 d 更换培养液,至第 10~12 天出现明显抗 HygromycinB 细胞克隆,继续用浓度为 200 μg/mL 的 HygromycinB 维持并扩大培养,获得转染细胞株 HUVECs/AAV-Tum。

1.2.4 RT-PCR 检测转染 HUVECs 细胞中 Tumstatin 基因表达 提取转染细胞株 HUVECs/AAV-Tum 总 RNA,利用逆转录试剂盒进行 RT-PCR 试验,反应条件同上,反应结束,在 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,用凝胶成像分析仪进行图像分析。

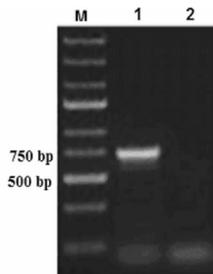
1.2.5 MTT 法检测细胞增殖能力 将未转染质粒细胞株 HUVECs(未转染质粒组)、转染质粒 pAAV-MCS 细胞株 HUVECs(转染质粒 pAAV-MCS 组)以及转染细胞株 HUVECs/AAV-Tum(转染重组质粒 pAAV-Tum 组)分别调整细胞浓度为 1×10⁴ 个/毫升,接种于 24 孔板内,每孔 1 mL,3 组细胞各接种 4 孔。培养 72 h 后,弃上清液,于每孔中加入不含血清的培养基 100 μL 及浓度为 5 g/L 的 MTT 20 μL,于 37 °C 培养箱中继续培养 4 h,弃上清液后,每孔加二甲亚砜(DMSO)100 μL,轻轻振荡 5 min,于自动酶标仪比色(波长 490 nm),测定各孔吸光度(A)值。

1.3 统计学处理 测定数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果比较采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 重组载体 pAAV-Tum 的构建与鉴定 将 Tumstatin 基因定向克隆入 pAAV-MCS 载体,经双酶切和测序鉴定,得到重组质粒 pAAV-Tum。

2.2 转染 HUVECs 细胞中 Tumstatin 基因表达情况 将转染细胞株 HUVECs/AAV-Tum 与未转染细胞株 HUVECs 提取 RNA 进行 RT-PCR,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,转染细胞株可获得约 750 bp 的 DNA 片段,与预期基因表达片段大小一致,而未转染细胞组无阳性片段出现(图 1)。



注: M:相对分子质量标准;1:转染细胞株 HUVECs/AAV-Tum 组;2:未转染细胞组。

图 1 RT-PCR 检测两组 HUVECs 细胞中 Tumstatin 基因的表达

2.3 3 组细胞增殖情况 培养 72 h 后,MTT 法检测可见,转染细胞株 HUVECs/AAV-Tum 组细胞增殖能力明显低于未转染质粒组细胞 HUVECs 和转染质粒 pAAV-MCS 组细胞,差异有统计学意义($P < 0.05$),而未转染质粒组细胞 HUVECs

和转染质粒 pAAV-MCS 组细胞增殖活性差异无统计学意义($P > 0.05$),结果见表 1。

表 1 三组细胞增殖情况

组别	例数	A 值($\bar{x} \pm s$)
未转染质粒组	4	0.562 ± 0.017 ^a
转染质粒 pAAV-MCS 组	4	0.577 ± 0.020 ^a
转染重组质粒 pAAV-Tum 组	4	0.335 ± 0.011

注:与转染重组质粒 pAAV-Tum 组比较,^a $P < 0.05$ 。

3 讨 论

大量实验研究表明,实体瘤以及血液系统肿瘤的生长和转移都具有血管依赖性。Tumstatin 是一种高效内源性血管生成抑制因子,可通过多种途径特异地诱导内皮细胞凋亡,抑制肿瘤的血管生成作用,具有抗肿瘤和抗内皮细胞增殖的双重作用,因而成为目前研究较为广泛的一种潜在的抗肿瘤生长转移的药物^[5-7],并在多种肿瘤的治疗中开展了相关研究。

肿瘤基因治疗中,高效的基因导入系统对治疗效果与安全有着至关重要的影响。目前用于基因治疗研究的载体有多种,总的来说以改进的病毒载体效果最佳。AAV 病毒载体由于具有无明显致病性、点特异性整合、宿主范围广等优点,成为人类疾病基因治疗研究中的一种理想载体^[8],从而得到广泛应用。

本实验使用的 AAV 载体购自美国 Stratagene 公司,其中的 pAAV-MCS 质粒包含一个用于目的基因插入的多克隆位点(multiplecloning site,MCS)插入外源性基因,且载体本身带有一个强启动子 PCMV,具有很强的表达效果,可激发插入的外源基因高效表达。因此本次研究在表达载体的构建中,选用这种能在多种哺乳动物细胞中高效表达的真核表达载体 pAAV-MCS,以使外源基因在真核细胞中高效表达。

作者应用 RT-PCR 技术获得人 Tumstatin 基因,并将获得的目的基因通过双酶切定向插入腺相关病毒载体 pAAV-MCS 质粒中,经鉴定成功构建了人 Tumstatin 基因表达载体。通过转染技术将该重组载体导入 HUVECs 中,建立稳定转染的细胞株,经 RT-PCR 检测表明,所构建的重组人 Tumstatin 基因表达载体能在 HUVECs 细胞中稳定表达,并通过 MTT 检测表明,Tumstatin 基因表达产物能抑制 HUVECs 细胞增殖,为进一步研究 Tumstatin 治疗肿瘤奠定了良好的基础。

参考文献

[1] 黄煌,黄英. 肿瘤抑素:一种内源性的肿瘤血管生成抑制因子[J]. 华西医学,2007,22(4):941-942.
 [2] Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us[J]. J Nad Cancer Inst,2002,94(12):883-893.
 [3] 贺欣,赵启仁. 肿瘤抑素 T7 肽及其衍生物 T7-NGR 载体构建及表达[J]. 生物医学工程与临床,2008,12(3):240-244.
 [4] Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, et al. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha 3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alpha V beta 3 integrin(下转第 2958 页)

影响到细胞的运动,细胞与细胞间的信号传导及相互作用和细胞的增殖与分化^[13]。由此可以推测,不同浓度的 ATO 在患者体内有可能会出现不同的生物学作用,而这些不同作用在患者体内可产生不同的生物学效应。

综上所述,ATO 对 BMSCs 整合素-β₁ 的表达具有明显干预作用,而整合素-β₁ 及其相关的细胞信号传导对细胞的增殖分化具有重要调节作用,与肿瘤等恶性疾病的发生、发展有着一定的联系。因此,对整合素-β₁ 表达变化的干预有可能成为该类疾病治疗的靶点,ATO 对 BMSCs 整合素-β₁ 表达水平的影响是否可用于临床相关疾病的治疗等尚有待于临床进一步研究。

参考文献

[1] 许文荣,张锡然,钱晖,等. 人骨髓间质干细胞分离纯化及基本生物学特性研究[J]. 临床检验杂志,2003,21(2):193-195.

[2] Francis J,Giles H,Armsnd K,et al. Acute myeloid leukemia[J]. Hematology,2002,20(1):73-110.

[3] Moore S,McDiarmid LA,Hughes TP,et al. Stem cell factor and chronic myeloid leukemia CD34⁺ cells[J]. Leuk Lymphoma. 2000,38(3-4):211-220.

[4] Moore S,Haylock DN,Levesque JP,et al. Stem cell factor as a single agent induces selective proliferation of the Philadelphia chromosome positive fraction of chronic myeloid leukemia CD34(+) cells[J]. Blood,1998,92(7):2461-2470.

[5] 余先球,陆益龙,巴荣,等. CML 患者骨髓间质干细胞的干细胞因子 mRNA 表达水平检测[J]. 临床检验杂志,2008,26(1):16-19.

[6] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines [J]. Cell,2002,110(6):673-687.

[7] Brooks PC. Cell adhesion molecules in angiogenesis[J]. Cancer Met Rev,1996,15(2):187-194.

[8] 陆益龙,余先球,朱彦,等. 慢性髓系白血病骨髓间充质干细胞整联蛋白表达变化研究[J]. 中国实验血液学杂志,2008,16(4):755-758.

[9] Jiang Y,Zhao RC,Verfaillie CM,et al. Abnormal integrin-mediated regulation of chronic myelogenous leukemia CD34⁺ cell proliferation;BCR/ABL up-regulates the cyclin-dependent kinase inhibitor, p27Kip, which is relocated to the cell cytoplasm and incapable of regulating cdk2 activity[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2000,97(19):10538-10543.

[10] Dylla SJ,Deyle DR,Theunissen K,et al. Integrin engagement-induced inhibition of human myelopoiesis is mediated by proline-rich tyrosine kinase 2 gene products[J]. Exp Hematol,2004,32(4):365-374.

[11] Eguchi R,Fujimori Y,Takeda H,et al. Arsenic trioxide induces apoptosis through JNK and ERK in human mesothelioma cells[J]. J Cell Physiol,2011,226(3):762-768.

[12] Li YC,Qin XJ,Qian JL,et al. E3 ubiquitin ligase Cbl-b potentiates the apoptotic action of arsenic trioxide by inhibiting the PI3K/Akt pathway[J]. Braz J Med Biol Res,2011,44(2):105-111.

[13] Ren J,Jin P,Sabatino M,et al. Global transcriptome analysis of human bone marrow stromal cells (BMSC) reveals proliferative, mobile and interactive cells that produce abundant extracellular matrix proteins, some of which may affect BMSC potency[J]. Cytotherapy,2011,13(6):661-674.

(收稿日期:2011-09-16)

(上接第 2955 页)

[J]. Cancer Cell,2003,3(6):589-601.

[5] 李子博,周江,周琳,等. 携带人肿瘤抑素 Tumstatin 基因的重组腺相关病毒载体的构建及其在乳腺癌细胞中的表达研究[J]. 实用预防医学,2010,17(12):2362-2364.

[6] Boosani CS,Mannam AP,Cosgrove D,et al. Regulation of COX-2 mediated signaling by alpha 3 type IV noncollagenous domain in tumor angiogenesis[J]. Blood,2007,110(4):1168-1177.

[7] Pedchenko V,Zent R,Hudson BG. Alpha(V) and alpha(V) beta5 integrins bind both the proximal RGD site and

non-RGD motifs within noncollagenous(NCI) domain of the alpha3 chain of type IV collagen; implication for the mechanism of endothelia cell adhesion[J]. J Biol Chem,2004,279(4):2772-2780.

[8] Wright JF,Qu G,Tang C,et al. Recombinant adeno-associated virus: formulation challenges and strategies for a gene therapy vector[J]. Curt Opin Drug Discov Devel,2003,6(2):174-178.

(收稿日期:2011-08-25)

