

裂解型腺病毒 Ad-E1A 对人脐静脉内皮细胞的影响 The Effect of Oncolytic Adenovirus on Human Umbilical Vein Endothelial Cell

叶震敏¹, 汪小华¹, 钟江², 缪竞诚¹, 盛伟华¹, 谢宇锋¹, 王金志¹, 杨吉成^{1*}

YE Zhen-Min¹, WANG Xiao-Hua¹, ZHONG Jiang², MIAO Jing-Cheng¹, SHENG Wei-Hua¹, XIE Yu-Feng¹, WANG Jin-Zhi¹ and YANG Ji-Cheng^{1*}

1 苏州大学医学院细胞与分子生物学教研室, 苏州 215123

2 复旦大学生命科学院微生物系, 上海 210003

1 Cell and Molecular Biology Institute, College of Medicine, Soochow University, Suzhou 215123, China

2 Microbiology Department, College of Life Science, Fudan University, Shanghai 210003, China

摘 要 以 QBI-293A 细胞基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 E1A 基因, 酶切连接到 pAdTrack-CMV 转移质粒上, pAdTrack-CMV-E1A 经 PmeI 线性化后, 与 pAdEasy-1 共转化大肠杆菌 BJ5183, 筛选重组腺病毒质粒 pAdEasy-1-pAdTrack-CMV-E1A, 经 PacI 线性化, 脂质体转染 QBI-293A 细胞, 获得裂解型腺病毒 Ad-E1A。裂解型腺病毒 Ad-E1A 在 ECV304 细胞内复制裂解, 抑制细胞的生长, 可以降低 VEGF 的表达, 探讨了 Ad-E1A 可能通过抑制 ECV304 细胞 NF- κ B 的激活而引起细胞生长抑制的机制, 说明 Ad-E1A 具有抑制肿瘤转移的功能。

关键词 裂解型腺病毒, Ad-E1A, 人脐静脉内皮细胞

中图分类号 R739 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)03-0397-06

Abstract The E1A gene was obtained by PCR with QBI-293A cell genome DNA as template. After enzyme digestion, the E1A gene was ligated to transfer vector pAdTrack-CMV. The positive clone pAdTrack-CMV-E1A were lineared by PmeI and co-transformed with pAdEasy-1 in BJ5183 *E. coli*. The recombinant adenovirus vector pAdEasy-1-pAdTrack-CMV-E1A were digested by PacI and transfected into QBI-293A cells with liposomes. The oncolytic recombinant adenovirus Ad-E1A was obtained after 7 days. The results showed that this oncolytic adenovirus Ad-E1A can replicate in ECV304 cells and inhibit growth of ECV304 cell. In addition, it also decreased the secretion of VEGF and expression of NF- κ B of ECV304 cells, indicating that Ad-E1A have potential of inhibition of tumor metastasis.

Key words oncolytic adenovirus, Ad-E1A, human umbilical vein endothelial cell

E1A 基因作为腺病毒的极早期基因, 具有抑癌基因的特性, 可通过激活 P53 基因的表达诱导细胞凋亡^[1]。能抑制肿瘤生长及抑制肿瘤侵袭及转移, 同时还可以提高 NK 细胞, CTL 细胞, 巨噬细胞的杀

伤效应^[2]。仅携带 E1A 基因, 而 E1B 和 E3 基因缺陷的腺病毒具有靶向性可在肿瘤细胞内增殖, 扩大肿瘤杀伤效应^[3]。但 E1A 基因对正常细胞是否有细胞毒性, 是否影响正常细胞的生长, 至今还没有

Received: November 28, 2005; Accepted: February 17, 2006.

The work was supported by a grant from medical developing fund of Soochow University (No. EE134517).

* Corresponding author: Tel: 86-512-65880107; E-mail: jcyang@suda.edu.cn

苏州大学医学发展基金资助项目(No. EE134517)。

完整的报道,本课题在缺陷型腺病毒载体上重新装上 E1A 基因(腺病毒的极早期基因)形成可在肿瘤细胞内复制的裂解型腺病毒基因治疗载体,研究其对入脐静脉内皮细胞 ECV304 生长和功能的影响,并初步探究机理。

1 材料与方 法

1.1 材 料

BJ5183 大肠杆菌为本科室保存, Pac I 和 Pme I 购自 New England Biolab 公司, Hind III、EcoRV 和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, Taq DNA 聚合酶购自上海申能博彩生物技术有限公司, pAdTrack-CMV 转移载体、pAdEasy-1 腺病毒载体和 QBI-293A 细胞为复旦大学钟江教授惠赠。Lipofectamine Reagent 为 Invitrogen 公司产品,鼠抗 Ad5 E1A-Ab-1 为 Neomarkers 公司,兔抗 NF- κ B 抗体,山羊抗鼠 IgG-AP 和山羊抗兔 IgG-AP 购自鼎国公司,NBT/BCIP、卡那霉素和氨基青霉素均购自上海华舜公司,引物合成由上海 sangon 完成,测序由上海博亚生物公司完成, RNA 抽提试剂盒购自上海 Sangon 公司, MMLV 逆转录酶购自 TaKaRa 公司, ECV304 细胞购自上海细胞所, VEGF 的 ELISA 试剂盒购自晶美公司。

1.2 方 法

1.2.1 E1A 转移质粒的构建:根据 E1A 序列合成引物,上游: 5'-GATAAGCTTCTTTGACCGT-TTACGTGGA GA-3'(含 Hind III 酶切位点),下游: 5'-ACGATATCAG GTTTACACCTTATGGCCTG-3'(含 EcoRV 酶切位点),以试剂盒抽提 QBI-293A 细胞的基因组 DNA 为模板,用上述特异引物进行 PCR 扩增的 E1A 基因和带有 GFP 标记的 pAdTrack-CMV 分别经 Hind III、EcoRV 双酶切后,用胶回收试剂盒回收目的片段,再由 T4DNA 连接酶连接过夜,氯化钙法转化 DH5 α 感受态细胞,筛选 pAdTrack-CMV-E1A 阳性克隆,测序鉴定。

1.2.2 重组腺病毒质粒构建:将 E1A 测序正确的 pAdTrack-CMV-E1A 质粒用 PmeI 单酶切线性化,胶回收后与 pAdEasy-1 腺病毒载体用氯化钙法共转化 BJ5183 感受态,挑选阳性克隆,提取质粒,将 pAdEasy-1-pAdTrack-CMV-E1A 同源重组腺病毒质粒进行酶切鉴定,并转化 DH5 α 感受态细胞,将转化子大量扩增。同时构建 pAdEasy-1-pAdTrack-CMV 重组的腺病毒空质粒。

1.2.3 重组病毒子的获得:碱裂解法从扩增的 DH5 α 菌体中抽提重组腺病毒质粒,经 PacI 线性化后,按 Lipofectamine Reagent 操作说明转染 70% 贴壁的 QBI-

293A 细胞。3~5d 在荧光显微镜下观察荧光,7~10d 收集细胞悬液,2000r/min 离心 5min,细胞沉淀用无菌 PBS 洗涤 2~3 次后,将细胞悬液反复冻融 3 次。2000r/min 离心 5min,取上清,经多轮感染后获得高滴度的 E1A 重组病毒子 pAdEasy-1-pAdTrack-CMV-E1A (Ad-E1A) 和空载体重组病毒子 pAdEasy-1-pAdTrack-CMV(Ad),于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 病毒效价的测定:将培养生长状况良好的 QBI-293A 细胞,胰酶消化后,细胞计数器计数,稀释细胞浓度为 10⁵ 个/mL 后,在 96 孔板上按每孔 100 μ L 接种细胞,培养 24h 后,将收获的重组病毒子按 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 稀释后,每个稀释度按每孔 100 μ L 接种,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 细胞培养箱里培养 18h 后,荧光显微镜下,进行荧光计数,按公式:(荧光数 \times 10)/相应稀释度,计算病毒效价。

1.2.5 重组病毒子在 ECV304 细胞中的表达鉴定:用 10MOI 的 Ad-E1A 和 Ad 病毒分别感染 ECV304 细胞 48h 后,1500r/min 离心收集细胞,PBS 洗涤 2~3 次,按 RNA 抽提试剂盒说明书操作提取 RNA,分别用 β -actin、E1A 的特异引物进行 RT-PCR 鉴定,PCR 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 4min,94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 45s,72 $^{\circ}$ C 1min,30cycle,72 $^{\circ}$ C 10min。另一部分细胞用 SDS 上样缓冲液煮沸裂解后,经 SDS-PAGE 电泳后,用抗 E1A 抗体的 Western-blotting 法鉴定 E1A 蛋白的表达。

1.2.6 裂解型腺病毒对 ECV304 细胞生长的影响:将呈指数生长期的 ECV304 细胞,胰酶消化后,制成细胞悬液,计数后按每孔 5 \times 10³ 个/100 μ L 接种 96 孔板,细胞贴壁 4~6h 后,每孔按 10MOI 接种病毒,以此为 0 时相,37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中培养 1~5d,在不同时间观察细胞形态变化和生长繁殖状况,同时设有空载体 Ad 组、PBS 组和 5-Fu 组。在每隔 24h 加 10 μ L MTT (5mg/mL),37 $^{\circ}$ C 下继续培养 4h 后再加入 10% SDS-HCl 终止液 100 μ L/孔。于 37 $^{\circ}$ C 充分溶解 12h 后,在酶标仪上测定 570nm 下的 A 值,以 A 值为纵坐标,时间(D)为横坐标绘制生长曲线。按以下公式计算抑制率,并根据抑制率变化趋向,可得到抑制率变化函数。统计学分析用 SAS 软件进行方差检验。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{空白对照组 A 值} - \text{实验组 A 值}}{\text{空白对照组 A 值}} \times 100\%$$

1.2.7 裂解型腺病毒对 VEGF 表达的影响:将呈指数生长期的 ECV304 细胞,胰酶消化后,制成细胞悬液,计数后按每孔 1 \times 10⁷ 个/mL 置于 6 孔板中培养过夜,设置实验组(4 组)与对照组(1 组),实验 1 组中按 0.1MOI 加入 Ad-E1A 病毒,实验 2 组按 10MOI 加入

Ad-E1A 病毒,实验 3 组中按 0.1MOI 加入 Ad 病毒,实验 4 组按 10MOI 加入 Ad 病毒,对照组加入 PBS。根据生长曲线结果,分别在培养 24h、48h 取上清,按 ELISA 检测试剂盒说明书进行 VEGF 的检测,在酶标仪下测定 490nm 吸光值。

1.2.8 裂解型腺病毒对 NF-κB 的影响:用 10MOI 的 Ad-E1A 和 Ad 病毒分别感染 ECV304 细胞 48h 后,1500r/min 离心收集细胞,PBS 洗涤 2~3 次,细胞沉淀用 SDS 上样缓冲液煮沸裂解后,经 SDS-PAGE 电泳后,用兔抗 NF-κB 抗体的 Western-blotting 法检测 NF-κB 的变化。

1.2.9 统计学分析:数据用 SPSS 统计软件进行独立样本的方差分析。

2 结果

2.1 E1A 转移载体的构建

用获得的 pAdTrack-CMV-E1A 阳性克隆抽提质粒,经 *Hind* III、*Eco* RV 双酶切鉴定和琼脂糖电泳,在 1200bp 附近有 E1A 基因的目的条带。(图 1)目的条带的测序结果与 GenBank 报道的序列完全一致。

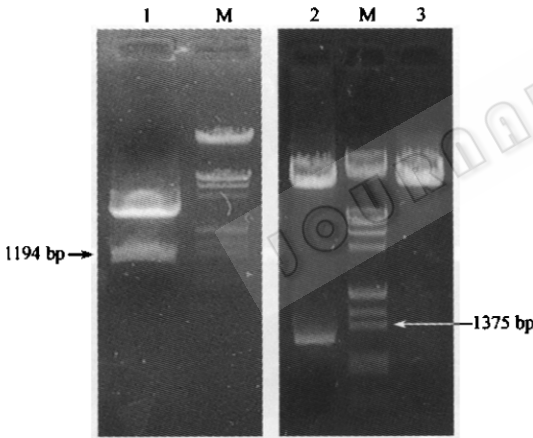


图 1 pAdTrack-CMV-E1A 重组质粒的鉴定
Fig.1 Identification of recombinant expression plasmid pAdTrack-CMV-E1A

1: pUCm-T-E1A digested by *Hind* III、*Eco* RV; 2: pAdTrack-CMV-E1A digested by *Hind* III、*Eco* RV; 3: pAdTrack-CMV digested by *Hind* III、*Eco* RV; M: λDNA / *Hind* III + *Eco* RI Marker.

2.2 重组腺病毒载体构建

测序正确的 pAdTrack-CMV-E1A 和 pAdTrack-CMV 质粒经 *Pme* I 线性化后,与 pAdEasy-1 质粒共转化 BJ5183 大肠杆菌,卡那霉素筛选阳性克隆,抽提质粒进行酶切鉴定。结果重组腺病毒质粒经 *Pac* I 酶切会产生一条 3kd 或 4.5kd 左右的片段,经 *Hind* III 酶切与 pAdEasy-1 相比会在 19kd 左右出现片段。表明重组腺病毒质粒载体已成功构建(见图 2)。

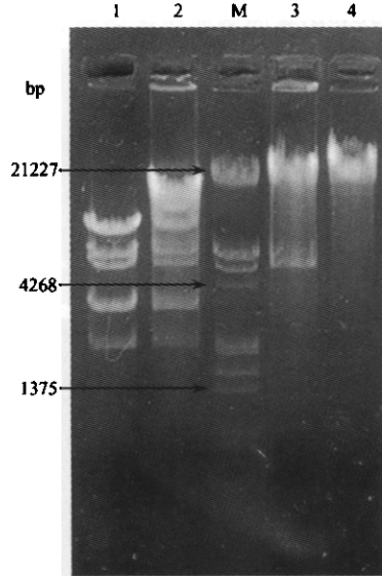


图 2 pAdEasy-1-pAdTrack-CMV-E1A 重组质粒的酶切鉴定
Fig.2 Identification of recombinant expression plasmid pAdEasy-1-pAdTrack-CMV-E1A by enzyme digestion
1: *Hind* III digest pAdEasy-1; 2: *Hind* III digest pAdEasy-1-pAdTrack-CMV-E1A; M: λDNA / *Hind* III + *Eco* RI marker; 3: *Pac* I digest pAdEasy-1-pAdTrack-CMV-E1A; 4: *Pac* I digest pAdEasy-1.

2.3 重组病毒子的获得

鉴定正确的重组 Ad 和 Ad-E1A 质粒,经 *Pac* I 酶切后,用 Lipofectamine 转染 QBI-293A 细胞,5d 在倒置荧光显微镜下可观察到的荧光,7~10d 后,收集细胞,反复冻融的重组病毒子经多轮感染后,检测效价达到 $10^8 \sim 10^9$ pfu/mL 的重组病毒子于 -80°C 冻存储用,见图 3。

2.4 重组病毒子在 ECV304 细胞中的表达

获得的病毒再感染 ECV304 细胞 48h,收集细胞抽提总 RNA,进行 RT-PCR 鉴定,结果 Ad-E1A 病毒的 E1A 和 β -actin 均出现阳性条带(图 4: lane 3,6);Ad 病毒和 ECV304 细胞的 β -actin 出现阳性条带(图 4: lane 1,2),而没有 E1A 条带出现(图 4: lane 4,5),与预期结果一致。用鼠抗 Ad-5 E1A 的多克隆抗体进行 Western-blotting 检测,结果感染 Ad-E1A 病毒后的 ECV304 细胞中 E1A 蛋白高表达。由于 E1A 基因可转录形成三种不同的 mRNA 并翻译成不同大小的蛋白质,故检测时会出现多条蛋白带(图 4B)。

2.5 裂解型腺病毒对 ECV304 细胞生长的影响

2.5.1 Ad-E1A 对 ECV304 细胞的裂解作用:用 10MOI 的 Ad-E1A 和 Ad 病毒分别感染 ECV304 细胞,72h 时在荧光显微镜下观察病毒感染后的细胞病变情况,结果被 Ad-E1A 重组病毒感染的细胞出现明显崩解(图 5E,5F),而被 Ad 病毒感染的细胞没有出现明显的细

胞病变(图 5C,5D)。

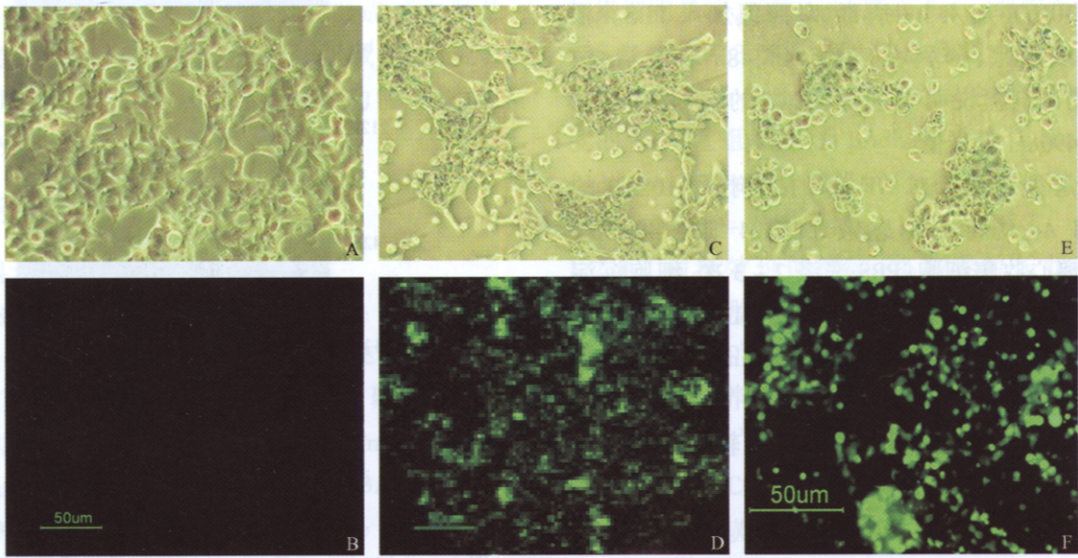


图 3 重组腺病毒子在 QBI-293A 细胞中的包装

Fig.3 The package of recombinant adenovirus in QBI-293A cells

A、B: The normal QBI-293A cells; C、D: Ad infection of QBI-293A cells; E、F: Ad-E1A infection of QBI-293A cells

A	C	E	A、C、E: microscope picture;
B	D	F	B、D、F: fluorescence microscope picture.

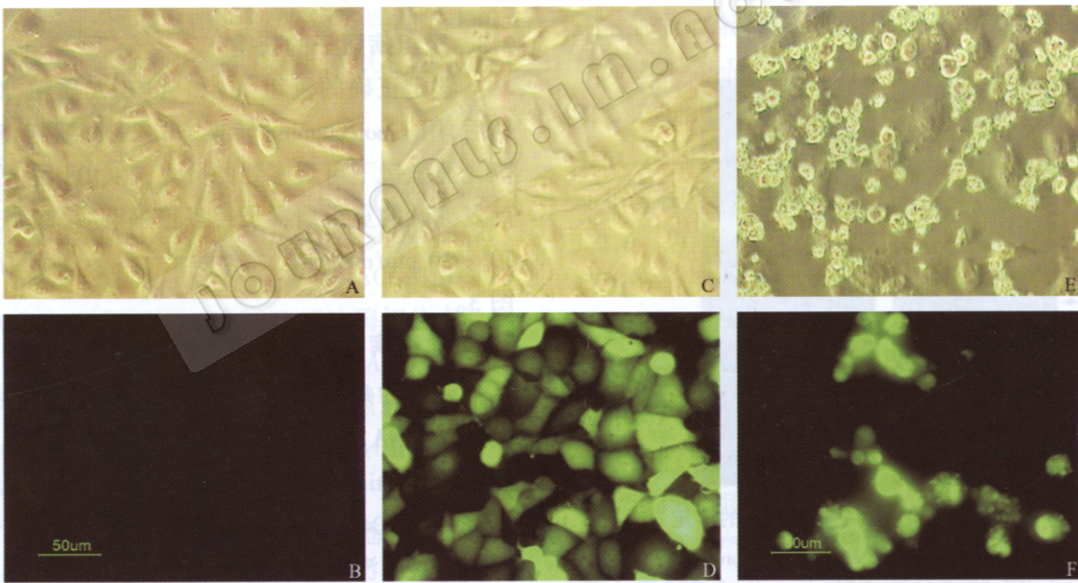


图 5 Ad-E1A 腺病毒对 ECV304 的细胞毒作用

Fig.5 The cytotoxic effect of Ad-E1A on ECV304 cells

A、B: The normal ECV304; C、D: Ad infection of ECV304 (72h); E、F: Ad-E1A infection of ECV304 (72h).

A	C	E	A、C、E: microscope picture;
B	D	F	B、D、F: fluorescence microscope picture.

2.5.2 Ad-E1A 对 ECV-304 细胞生长的抑制作用:
Ad-E1A 病毒可抑制 ECV304 细胞的生长,并呈时间依赖性,48h 后抑制效果明显,实验组与对照组之间差异显著($P < 0.05$)(图 6A)。按公式计算生长抑制率,绘制抑制率趋向函数(图 6B)。

2.6 裂解型腺病毒对 ECV-304 细胞 VEGF 表达的影响

用 Ad-E1A 和 Ad 病毒分别感染 ECV304 细胞,ELISA 试剂盒检测 ECV304 细胞上清中 VEGF 浓度,结果 0.1MOI 感染复数剂量各组间变化不明显;10 MOI 感染复数剂量感染 ECV304 细胞时,Ad-E1A 在

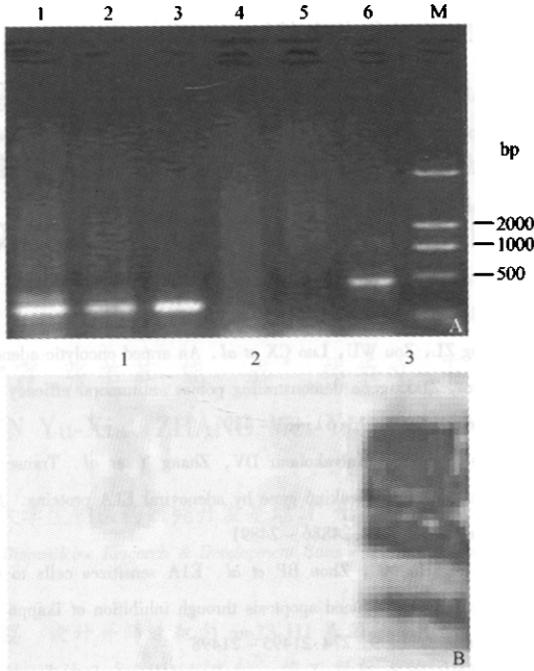


图4 RT-PCR 和 Western-blotting 鉴定重组腺病毒中 E1A 表达
Fig.4 The identification of Ad-E1A by RT-PCR and Western-blotting

A: RT-PCR identification (1,4: ECV304 cell; 2,5: Ad; 3,6: Ad-E1A; M: Marker); B: Western-blotting identification (1: ECV304 cell; 2: Ad; 3: Ad-E1A).

24h 就表现出可明显抑制 VEGF 的分泌,差异显著 ($P < 0.05$),48h 时抑制作用极显著 ($P < 0.01$)(如图 7, * 表示差异显著; ** 表示差异极显著)。

2.7 裂解型腺病毒对 NF-κB 的影响

用 10MOI 的 Ad-E1A 和 Ad 病毒分别感染 ECV304 细胞,48h 收集细胞样品,经 SDS-PAGE 电泳后,用兔抗 NF-κB 抗体的 Western-blotting 法检测 NF-κB 表达的变化,结果发现被 Ad-E1A 感染的 ECV304 细胞中,NF-κB 的表达被抑制(见图 8)。

3 讨论

E1A 作为一种近年来发现的抑癌基因受到广泛

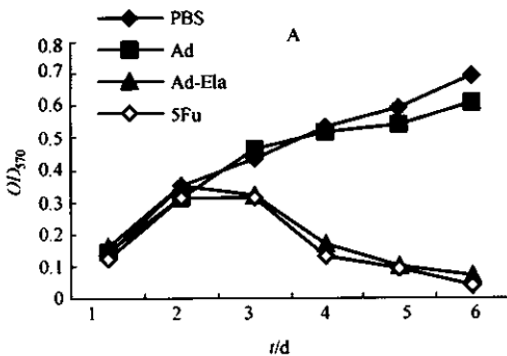


图6 裂解型腺病毒 Ad-E1A 对 ECV304 细胞生长的影响

Fig.6 The effect of oncolytic adenovirus Ad-E1A on ECV304 cells growth

研究。它通过调控多种细胞的基因表达而影响它们的功能。E1A 与肿瘤的发生、发展的关系及其抗肿瘤特性已被广泛研究。在抑制肿瘤生长浸润,肿瘤血管形成和肿瘤转移的过程中发挥了重要作用。而

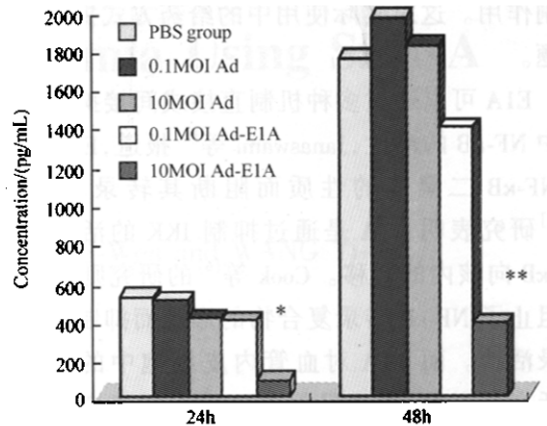


图7 裂解型腺病毒 Ad-E1A 对 ECV304 细胞分泌 VEGF 的影响

Fig.7 The effect of oncolytic adenovirus Ad-E1A on ECV304 secreting VEGF

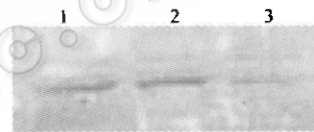
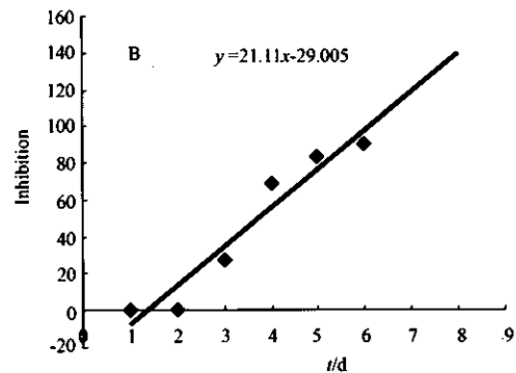


图8 裂解型腺病毒 Ad-E1A 对 ECV304 细胞 NF-κB 的影响

Fig.8 The effect of oncolytic adenovirus Ad-E1A on NF-κB of ECV304
1: PBS; 2: Ad; 3: Ad-E1A.

对内皮细胞与 E1A 的关系研究甚少。以人脐静脉内皮细胞 ECV304 为对象研究 E1A 对其生长和功能的影响,以证明 E1A 不仅可以抑制肿瘤细胞的生长,诱导肿瘤细胞凋亡,同时对与肿瘤发生发展密切相关的内皮细胞也有影响。我们构建的可在肝癌细胞中复制的裂解型腺病毒 Ad-E1A(另文发表)也可以裂解 ECV304 细胞,而且可显著降低 ECV304 细胞



的 VEGF 表达。这说明裂解型腺病毒一方面可以通过降低 VEGF 的表达,抑制内皮的生长,从而达到抑制肿瘤生长、浸润、转移的效果;另一方面也有可能是在肿瘤基因治疗过程中对机体的血管内皮细胞有毒副作用。这对实际使用中的给药方式提出了一个难题。

E1A 可以通过多种机制直接或间接抑制肿瘤细胞中 NF- κ B 的活性,Janaswami 等^[4]报道,E1A 改变核内 NF- κ B 二聚体的性质而阻断其转录活性;Shao 等^[5]研究表明 E1A 是通过抑制 IKK 的活性而抑制 NF- κ B 向核内的转移。Cook 等^[6]的研究则认为,E1A 是阻止了 NF- κ B 转录复合物的形成而抑制 NF- κ B 的转录活性。而 E1A 对血管内皮细胞中的 NF- κ B 的激活有何影响,尚未见报道。我们的研究说明 E1A 可以下调 ECV304 细胞中 NF- κ B 的激活,通过抑制 NF- κ B 的激活的转录活性,达到抑制血管内皮细胞生长。对于 E1A 通过哪条信号通路来抑制血管内皮细胞中 NF- κ B 的激活还有待进一步研究。

REFERENCES(参考文献)

- [1] ZHANG Qi, WU Mengchao, LI Yueming *et al.* A novel replication-competent adenovirus CNHK500 in the treatment of hepatocellular carcinoma *In Vitro*. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 2004, 3(2):70 - 73
- [2] Nikita Avvakumov, Joe S. Mymryk. New tools for the construction of replication-competent adenoviral vectors with altered E1A regulation. *J Virol Methods*, 2002, 103(1): 41 - 49
- [3] Zhang ZL, Zou WU, Luo CX *et al.* An armed oncolytic adenovirus system, ZD55-gene demonstrating potent antitumoral efficacy. *Cell Research*, 2003, 13(6):481 - 489
- [4] Janaswami PM, Kalvakolanu DV, Zhang Y *et al.* Transcription repression of interleukin6 gene by adenoviral E1A proteins. *J Biol Chem*, 1992, 267:24886 - 24891
- [5] Shao R, Hu MC, Zhou BP *et al.* E1A sensitizes cells to tumor necrosis factor induced apoptosis through inhibition of I κ B. *J Biol Chem*, 1999, 274:21495 - 21498
- [6] Cook JL, Walker TA, Worthen GS *et al.* Role of the E1A Rb-binding domain in repression of the NF κ B dependent defense against tumor necrosis factor. *PNAS USA*, 2002, 99:9966 - 9971