

[文章编号 1000-1182(2005)06-0534-03

## 表达人 CD40 配体的重组腺病毒载体的构建

吴红兵<sup>1</sup>, 田 聆<sup>2</sup>, 文艳君<sup>2</sup>, 刘玉梅<sup>3</sup>, 阚 兵<sup>2</sup>, 杜小波<sup>2</sup>, 徐健蓉<sup>2</sup>, 魏于全<sup>2</sup>

(1. 四川大学华西口腔医院 放射科; 2. 四川大学华西医院 生物治疗国家重点实验室与肿瘤中心;  
3. 四川大学华西附二院 产科, 四川 成都 610041)

**[摘要]** 目的 构建含有 hCD40L 基因的重组腺病毒载体, 为在动物模型体内表达和肿瘤基因治疗提供基础。方法 用 *Xho*、*Swa* 双酶切质粒 pORF-hCD40L, 回收 1 900 bp 基因片段并定向克隆插入穿梭质粒 pShuttle 中 *Xho*、*EcoR* 双酶切位点, 得到重组质粒 pShuttle-hCD40L。经 *PmeI* 酶切与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 共转化 BJ5183 细菌, 同源重组后用选择培养基筛选阳性克隆, 提取质粒 *PacI* 酶切线性化后用脂质体介导转染 293 细胞。酶切分析和 PCR 鉴定重组的腺病毒。结果 酶切分析、PCR 验证表明, hCD40L 基因成功克隆到腺病毒 pAdEasy-1 载体中。结论 成功构建表达 hCD40L 基因的重组腺病毒载体, 为进一步研究其在哺乳动物内表达及基因治疗提供了基础。

**[关键词]** hCD40L 基因; 腺病毒载体; DNA 同源重组; 基因治疗

**[中图分类号]** R 739.8 **[文献标识码]** A

**Construction of the Recombinant Adenovirus Vector Expressing Human CD40 Ligand Gene** WU Hong-bing<sup>1</sup>, TIAN Ling<sup>2</sup>, WEN Yan-jun<sup>2</sup>, LIU Yu-mei<sup>3</sup>, KAN Bing<sup>2</sup>, DU Xiao-bo<sup>2</sup>, XU Jian-rong<sup>2</sup>, WEI Yu-quan<sup>2</sup>. (1. Dept. of Radiology, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. State Key Laboratory of Biotherapy and Cancer Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Dept. of Obstetrics and Gynecology, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[Abstract]** **Objective** To construct a recombinant adenovirus vector expressing hCD40L gene and explore it in the use of anti-tumor gene therapy. **Methods** 1 900 bp gene fragment was obtained from plasmid pORF-hCD40L by *Xho*/*Swa* cutting and then cloned directionally into the pShuttle plasmid, finally, the resultant plasmid was digested by restriction endonuclease *PmeI* and subsequently cotransformation into BJ5183 cells with the adenoviral backbone pAdEasy-1 to obtain the homologous recombinant and then the recombinant was packaged in the 293 cells. Some methods such as PCR and endonuclease digestion were employed to identify the recombinant adenovirus. **Results** The evidences of endonuclease digestion and PCR analysis confirmed that recombinant hCD40L gene was correctly inserted into adenovirus vector. **Conclusion** The adenoviral vector which expressed hCD40L gene was constructed. It provides an experimental basis for studies on its expression in the mammalian cells and in tumor gene therapy.

**[Key words]** hCD40L gene; adenovirus vector; DNA homologous recombination; gene therapy

CD40 配体 (CD40 ligand, CD40L), 也称 gp39, CD154。与其受体 CD40 抗原均属于肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 家族, 分别主要在 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 B 淋巴细胞上表达<sup>1</sup>。目前, 许多研究者将 CD40L 基因导入靶向肿瘤细胞抑制肿瘤生长并取得了良好的结果。基因治疗的载体系统种类繁多, 病毒易与细胞表面受体结合并将其基因组导入宿主细胞, 而腺病毒载体基因组结构简单, 宿主范围广, 转染率高, 有较好的靶向性及副作用小等特点<sup>2-4</sup>, 是使用

较多的病毒载体之一。本实验构建 E1、E3 区缺失的重组腺病毒载体来表达目的基因 hCD40L, 拟在 293 细胞中包装、复制扩增, 然后纯化病毒, 用于肿瘤的体内、体外基因治疗实验。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 质粒 pORF-hCD40L、大肠杆菌 XL1-blue、BJ5183 细菌均为四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室与肿瘤中心保存; 穿梭质粒载体 pShuttle (Qbiogene 公司, 美国); 腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 购自 (InvivoGen 公司, 美国)。

1.1.2 试剂 快速质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒 (MBI 公司, 美国); DNA 连接试剂盒 (TAKARA 公司,

[收稿日期 2005-03-10; 修回日期 2005-07-18]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (3013026)

[作者简介] 吴红兵 (1966-), 男, 四川人, 讲师, 现为四川大学华西临床医学院肿瘤专业博士研究生

[通讯作者] 魏于全, Tel: 028-85422564

日本);PCR试剂盒(TAKARA公司,日本);氨苄青霉素、卡那霉素(Sigma公司,美国)。Lipofectamine™ Reagent 细胞转染试剂盒(Invitrogen公司,美国)。

1.1.3 各种限制性核酸内切酶 *Xho*、*Swa*、*EcoR*、*Pme* (MBI公司,立陶宛), *Pac*、*Hind*、*Not*、*Bgl* (NEB公司,英国)。

1.1.4 细菌培养基 普通LB培养基以及选择性LB液体、固体培养基配制好灭菌置于4℃冰箱保存。后两者在临用前均分别加入50 g/L卡那霉素、100 g/L氨苄青霉素储存液,使其终浓度分别为50 mg/L、100 mg/L。

1.1.5 细胞和细胞培养基 人胚肾293细胞(四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室与肿瘤中心保种);无血清DMEM培养基和完全DMEM培养基(10%胎牛血清,丁胺卡那霉素100 IU/ml)于37℃,5%CO<sub>2</sub>条件下保存备用。

## 1.2 方法

1.2.1 获取hCD40L基因1900 bp片段 质粒pORFhCD40L转化大肠杆菌感受态细胞(XL-blue),涂片后,挑取单菌落,加入2 ml LB中,振摇过夜。按快速质粒提取试剂盒说明书操作抽提质粒,取40 μl酶切。Buffer O<sup>+</sup> 5 μl, *Xho* 2.5 μl, *Swa* 2.5 μl, pORF-hCD40L 40 μl, 37℃温浴3 h,琼脂糖凝胶电泳回收1900 bp基因片段(此片段含有hEFl-HILV prom启动子和hCD40L基因)。

1.2.2 获取穿梭质粒载体pShuttle 质粒提取方法同上。Buffer R<sup>+</sup> 5 μl, *Xho* 2.5 μl, *EcoR* 2.5 μl, pShuttle 40 μl, 37℃,温浴3 h,电泳回收pShuttle载体片段。

1.2.3 构建重组穿梭质粒pShuttle-hCD40L 10 × T<sub>4</sub>连接 Buffer 2 μl, T<sub>4</sub>DNA连接酶1 μl, hCD40L片段12.5 μl, pShuttle片段4.5 μl,混匀,22℃水浴4 h进行连接反应。将连接产物重新用XL-blue感受态细胞转化,卡那霉素(50 mg/L)筛选重组穿梭质粒,分别用限制性核酸内切酶 *Pme*、*Hind* 单酶切和 *Not*、*Bgl* 双酶切鉴定。

1.2.4 细菌内同源重组法构建重组腺病毒质粒pAd-hCD40L 按文献<sup>5</sup>和QUANTUM公司指南稍加改动操作。将克隆成功的穿梭质粒pShuttle-hCD40L 2 ng用 *Pme*I酶切线性化,酚-氯仿抽提,乙醇沉淀,溶于5 μl ddH<sub>2</sub>O中。取94 μl电转化感受态BJ5183细菌(已提前制备,存于-80℃冰柜备用),加入预冷的1 mm电转化杯中,同时加入前述5 μl的穿梭质粒和1 μl pAdEasy-1质粒(已制备备用),用电穿孔仪行电击共转化,电击完成后,用卡那霉素(50 mg/L)平板筛选。第2天,挑选约8个最小的单克隆于LB液体培

养基中,37℃振摇过夜并制备质粒,将可疑重组质粒作酶切鉴定,以腺病毒pAdEasy-1质粒为阴性对照组。

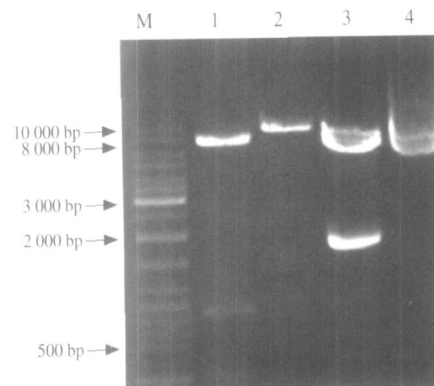
1.2.5 重组腺病毒质粒pAd-hCD40L的包装 重组体用 *Pac* 酶切线性化后,经Lipofectamine脂质体介导转染6孔培养板中达60%~80%的融合的293细胞,10~14 d后观察细胞病变效应,绝大多数细胞变圆,脱壁时,收集细胞,2000 r/min离心3 min,离心后收集感染的上清液并将细胞沉淀重悬于2 ml PBS, -80℃~37℃反复冻融3次,离心,分别取1 μl感染上清液和裂解上清液进行PCR鉴定,其余加入293细胞中继续感染。

1.2.6 鉴定引物设计及PCR反应 根据hCD40L基因cDNA序列,采用四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室与肿瘤中心已设计的引物(CD40L基因胞外段)用于PCR检测和重组质粒验证。引物由上海博亚基因公司合成。上游引物:5'-ATACTCGAGAAAGAGAGCTTCATAGAAGGTTGACAA-3';下游引物:5'-GCTCTAGACCGAGTTTGAGTAAAGCCAAAGG-3'。分别以上述1 μl上清液为模板作PCR反应,反应条件为变性95℃30 s,退火50℃30 s,延伸72℃1.5 min,重复30个循环,得到PCR产物进行凝胶电泳。

## 2 结果

### 2.1 携带hCD40L基因片段的重组穿梭质粒重组克隆的酶切鉴定

重组体pShuttle-hCD40L分别用 *Pme* 和 *Hind* 单酶切,用 *Not*、*Bgl* 双酶切,分别出现8510 bp和7015 bp、980 bp、518 bp片段以及6500 bp、2010 bp基因片段,与预期条带一致(图1)。确定重组穿梭质粒中插入的片段为目的片段后,取其中少量交由上海博亚基因公司测序,序列测定结果通过互联网上的PubMed中的BLAST程序序列比较,完全一致。



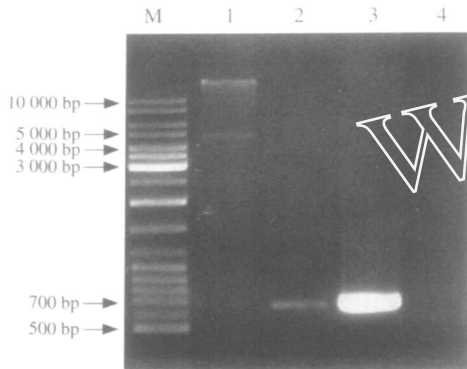
M:Marker; 1: *Hind* 单酶切; 2: *Pme* 单酶切; 3: *Not* 和 *Bgl* 双酶切; 4:质粒pShuttle-hCD40L

图1 质粒pShuttle-hCD40L的限制性内切酶酶切分析

Fig 1 Plasmid pShuttle-hCD40L digested by *Hind*、*Pme*、*Not* and *Bgl*

## 2.2 大肠杆菌 BJ5183 内同源重组腺病毒质粒 pAd-hCD40L 表达载体鉴定

限制性核酸内切酶 *Pac* 酶切重组腺病毒质粒 pAd-hCD40L,产生大小分别为 35 kb 和 4.5 kb 两个片段。通过合成的引物行 PCR 反应,凝胶电泳得到 645 bp 条带,符合 hCD40L 基因胞外段碱基对数,而作为阴性对照的腺病毒 pAdEasy-1 上清液无此片段。表明重组成功(图 2)。



M:Marker; 1: *Pac* 酶切 pAd-hCD40L; 2,3:重组体 pAd-hCD40L PCR 产物; 4:阴性对照

图2 重组子 pAd-hCD40L 的鉴定

Fig 2 Identification of recombinant pAd-hCD40L

## 3 讨论

CD40/CD40L 相互作用是 T 细胞与抗原呈递细胞间的一条重要的共刺激信号通路。在细胞免疫中,抗原呈递细胞将抗原递呈给未成熟 T 淋巴细胞,使 CD40L 在 T 细胞表达增加,且与抗原呈递细胞上的 CD40 结合,进一步激活抗原呈递细胞,共刺激分子 CD80/CD86 上调,促进白介-12 等因子分泌表达,诱导 CTL 细胞增殖,发挥抗肿瘤作用<sup>6-8</sup>。在共刺激分子和抗原信号的作用下,增加抗原呈递细胞成熟和呈递能力,使 T 细胞进一步活化,促进 CD4<sup>+</sup> T 细胞表达更多的 CD40L,反过来作用于抗原呈递细胞,形成良性循环<sup>8,9</sup>。CD40/CD40L 在体液和细胞免疫反应中发挥重要的作用,是沟通细胞间免疫的重要途径。将 CD40L 基因导入靶细胞获得高表达以及选择一种合适的载体是本研究的目的。

目前,将 CD40L 基因导入靶向肿瘤使其生长抑制取得了满意的成效。例如:Sun 等<sup>10</sup> 将 CD40L 通过腺病毒载体转入小鼠结肠癌,使肿瘤消退;重组人的 CD40L 对表达 CD40 阳性卵巢癌、肝癌、膀胱癌均有细胞毒作用<sup>11</sup>。另外,Kikuchi 等<sup>9</sup> 转入 CD40L 于 B16 黑色素瘤,肿瘤生长受到抑制。本实验所用 pAdEasy-1 骨架质粒带有病毒的大部分基因组,有 ori 细菌和氨基青霉素抗性基因与克隆重组的 pShuttle-hCD40L

穿梭质粒具有左右臂同源区(后者质粒上含有 ori、hEFl-HLV prom 启动子、卡那霉素抗性基因),根据 BJ5183 细菌内高效的同源重组机制,通过卡那霉素抗性筛选,短时间可得到 pAd-hCD40L 重组腺病毒载体,用 *Pac* 酶切线性化后用于转染 293 细胞,包装产生的腺病毒经复制扩增,纯化,鉴定,病毒滴度高,可达  $10^{11-12}$  PFU/ml<sup>5</sup>,且易浓缩收集保存。这种在细菌内完成的重组成功率高,方法简便快速且实验周期短,是目前制备腺病毒较常用的方法。2004 年,首次重组腺病毒基因治疗药物(中国深圳)在治疗人类鼻咽癌等头颈部鳞癌取得的成效,为腺病毒作为基因治疗载体研究开辟了全新的途径。本实验成功构建了携带 hCD40L 基因的重组腺病毒载体,下一步工作将大量复制、扩增纯化病毒,以便获得较高的病毒滴度,用于转染 CD40 表达阳性的细胞株和肿瘤组织,观察肿瘤细胞生长和抑制指标。

## [参考文献]

- 1] Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad J. Cell Mol Life Sci, 2001, 58(1): 4-43.
- 2] Pandori M, Hobson D, Sano T. Adenovirus-microbead conjugates possess enhanced infectivity: A new strategy for localized gene delivery J. Virology, 2002, 299(2): 204-212.
- 3] Nasz I, Adam E. Recombinant adenovirus vectors for gene therapy and clinical trials J. Acta Microbiol Immunol Hung, 2001, 48(3-4): 323-348.
- 4] Adam E, Nasz I. Adenovirus vectors and their clinical application in gene therapy J. Orv Hetil, 2001, 142(38): 2061-2070.
- 5] Tong-chuan HE, Shibin Z, Luis T. A simplified system for generating recombinant adenoviruses J. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(5): 2059-2514.
- 6] Briones J, Timmerman J, Levy R. In vivo antitumor effect of CD40L-transduced tumor cells as a vaccine for B-cell lymphoma J. Cancer Res, 2002, 62(11): 3195-3199.
- 7] Loskog A, Totterman TH, Bohle A. In vitro activation of cancer patient-derived dendritic cells by tumor cells genetically modified to express CD154 J. Cancer Gene Ther, 2002, 9(10): 846-853.
- 8] 崔巍,樊英,李龙芸. CD40/CD40L 与肿瘤的关系 J. 中华医学全科杂志, 2003, 2(6): 55-57. (Cui W, Fan Y, Li LY. The relation between CD40/CD40L and tumor J. J Chinese General Practice, 2003, 2(6): 55-57.)
- 9] Kikuchi T, Crystal RG. Anti-tumor immunity induced by in vivo adenovirus vector-mediated expression of CD40 ligand in tumor cells J. Hum Gene Ther, 1999, 10(8): 1375-1387.
- 10] Sun Y, Pend D, Lecanda J. In vivo gene transfer of CD40 ligand into colon cancer cells induces local production of cytokines and chemokines. Tumor eradication and protective antitumor immunity J. Gene Ther, 2000, 7(17): 1467-1476.
- 11] Schmitz V, Barajas M, Wang L, et al. Adenovirus-mediated CD40 ligand gene therapy in a rat model of orthotopic hepatocellular carcinoma J. Hepatology, 2001, 34(1): 207-209.