

重组腺病毒介导的人野生型 p53、GM-CSF 和 B7-1 基因在肝癌细胞中的表达

施明¹, 王福生¹, 刘明旭¹, 金磊¹,
雷周云¹, 邱兆华², 高兰兴³, 吴祖泽²

摘要:目的 观察腺病毒载体对肝癌细胞的转染效率及其介导的人野生型 p53、GM-CSF 和 B7-1 基因在肝癌细胞中的表达。方法 不同 MOI 的 Ad-GFP 感染肝癌细胞, 48h 后计算感染效率; BB-102 以 50MOI 感染肝癌细胞, 48h 后免疫组化法及 western blot 检测 p53 表达, ELISA 检测 GM-CSF 的含量, FACS 测定 B7-1 的表达。结果 MOI 为 50pfu/细胞时对肝癌细胞的转染效率达 80% 以上, 目的基因均可在肝癌细胞中高效表达。结论 腺病毒载体对肝癌细胞具有较高的转染效率, 目的基因均可在肝癌细胞中高效表达, 为进一步研究 BB-102 在肝癌治疗中的应用奠定了基础。

关键词:重组腺病毒; 肝癌细胞; p53; GM-CSF; B7-1

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578 (2002) 02-0123-03

Wild-type p53, GM-CSF, B7-1 genes transduced with recombinant adenovirus expression in hepatocellular carcinoma cells in vitro

SHI Ming, WANG Fu-sheng, LIU Ming-xu, et al

Division of Biological Engineering,

Institute of Infectious Disease, the 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Abstract: Objective To evaluate the transfection efficiency of recombinant adenoviral vector (BB-102) expressing the human wild-type p53, GM-CSF and B7-1 genes into the hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines in vitro. **Methods** HCC cell lines were retransferred with mock adenoviral vector expressing green fluorescent protein (Ad-GFP) at a series of concentrations of MOI. p53, GM-CSF, and B7-1 expression in HCC cells were determined by western blot, ELISA method and flow cytometry respectively. **Results** When 50 MOI of recombinant adenoviral vector was used, over 80% of target tumor cells could be efficiently transfected. High levels of p53, GM-CSF, and B7-1 expression in HCC cells transfected with BB-102. **Conclusion** Adenoviral vectors expressing human wild-type p53, GM-CSF and B7-1 genes could be used as an efficient vector to express genes of interest in HCC cell lines. Our study provides an experimental evidence that the BB-102 might be applicable in clinical gene therapy against HCC.

Keywords: Recombinant adenovirus; Hepatocellular carcinoma; p53; GM-CSF; B7-1

腺病毒是目前基因治疗中最常用的载体之一^[1,2]。本实验用的腺病毒载体为 E1、E3 区和包装信号缺失的复制缺陷型 5 型腺病毒载体, 携带人野生

型 p53、GM-CSF 和 B7-1 基因(简称 BB-102)^[3]。构建方式为首先构建以串联方式携带人野生型 p53、GM-CSF 和 B7-1 基因的重组质粒 pBB-102, 同时克隆 5 型腺病毒基因组(E1、E3 区和包装信号缺失)的质粒 GT4050, 通过共转染 293 细胞获得较高滴度的 BB-102。评价基因治疗中载体有效性包括载体的转染效率、目的基因表达的持续时间和表达水平等方面, 它直接影响基因治疗的效果^[4]。BB-102 在肺癌^[5]和喉癌^[6]的实验性治疗中已取得较好的效果, 本实验目的是观察 BB-102 对肝癌细胞的转染效率

收稿日期: 2001-03-14; 修回日期: 2001-04-27

作者单位: 1. 100039 北京, 解放军 302 医院生物工程研究室; 2. 军事医学科学院放射医学研究所; 3. 卫生学环境医学研究所

及目的基因的表达,为进一步研究利用此载体治疗肝癌提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 Ad-GFP

由美国百特医疗用品公司基因治疗部提供, BB-102 由邱兆华博士构建。p53 基因野生型肝癌细胞系 BEL-7402 由军事医学科学院放射医学研究所提供, p53 基因突变肝癌细胞系 HLE 及 HuH-7 由日本 Okayama 大学 Masayoshi Namba 博士惠赠。细胞培养条件为高糖 DMEM, 10% 胎牛血清; 细胞消化条件为 0.2% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA。主要试剂: 免疫组织化学检测试剂盒 (Ultrasensitive™ S-PKit) (Maxim Biotech, Inc), 鼠抗人 p53 单克隆抗体 PAb1801 (Labvision), Western blot detections system ECL+ plus 试剂盒 (Amersham), GM-CSF ELISA 试剂盒 (Endogen)。

1.2 实验方法

1.2.1 Ad-GFP 感染肝癌细胞系的效率

分别将 BEL-7402、HLE 及 HuH-7 三株肝癌细胞接种于 12 孔板, 1×10^5 细胞/孔; 12h 后将培养液吸出, 各孔分别加入不同 MOI 的 Ad-GFP, MOI 分别为 0、12.5、25、50、100 和 200 pfu/细胞; 感染后 48h 计数 GFP 表达阳性的细胞数占该视野内的全部细胞数的百分比。每种细胞的不同 MOI 做 4 个复孔, 计算其平均转染率。

1.2.2 BB-102 中的 p53 基因在肝癌细胞中的表达

免疫组化法: 三种肝癌细胞各以 1×10^5 的量接种于 6 孔培养板, 底部加一盖玻片; 12h 后分别以 Ad-GFP 或 BB-102 感染细胞, MOI 均为 50 pfu/细胞, 以 DMEM 为对照; 感染病毒后 48h 取出玻片, 用 PAb1801 试剂盒检测 p53 基因的表达。

蛋白印迹杂交 (western blot): 相同数量 (1×10^6) 的三种肝癌细胞分别感染 Ad-GFP 或 BB-102, MOI 均为 50 pfu/细胞, 以 DMEM 为对照; 48h 后收集细胞制成蛋白样品。参照分子克隆实验指南方法进行蛋白印迹杂交^[7], ECL 试剂盒进行显色, 曝光 10min, 显影 5min, 定影 5min。

1.2.3 GM-CSF 基因在肝癌细胞中的表达

细胞以 3×10^4 /孔接种于 6 孔板中, 以 BB-102 感染细胞, MOI 为 50 pfu/细胞, 以 DMEM 为对照。2h 后吸去病毒液, 加入新鲜培养液 2ml。此后每 24h 收集上清液, 更换新鲜培养液, 连续收集 12d, 用 ELISA 试剂盒测定样品中 GM-CSF 的含量。

1.2.4 B7-1 在肝癌细胞中的表达

细胞以 1×10^6 接种于 50ml 的培养瓶中, 用 BB-102 感染细胞, MOI 为 50 pfu/细胞, 以 DMEM 为对

照。48h 后消化、离心细胞, 加入 15 μ FITC 标记的 B7-1 单抗, 4 $^{\circ}$ C 温育 30min, 1% 多聚甲醛固定, FACS 测定。

2 结果

2.1 腺病毒载体对三株肝癌细胞系的转染效率

腺病毒对肝癌细胞系具有较高的感染效率, 存在量效关系。当 MOI 为 50 pfu/细胞时, 对 BEL-7402 及 HLE 的转染效率达 90% 以上, 对 HuH-7 细胞的转染率也达 80% 以上; 当 MOI 为 100 pfu/细胞时, 转染率几乎均达 100%。本实验选择 MOI 为 50 pfu/细胞作为病毒的最佳感染强度。

2.2 p53 基因在三个肝癌细胞中高效表达

免疫组化结果, BEL-7402 细胞的对照组 p53 蛋白微量表达, 转染 Ad-GFP 后结果相似; 而转染 BB-102 后, p53 蛋白表达量明显增多, 细胞核出现深浅不一的棕黄色。HLE 和 HuH-7 的对照组及 Ad-GFP 组, 可测出 p53 弱的表达, 转染 BB-102 后, p53 蛋白表达明显增强, 细胞核染成深棕色。Western blot 结果与免疫组化的结果相似, 转染 BB-102 后 p53 蛋白明显增多, 而对照组及 Ad-GFP 组 p53 蛋白表达极少, 见图 1。



图 1 western blot 法检测 BB-102 中 p53 基因在肝癌细胞中的表达

(1: BEL-7402 细胞对照组; 2: HLE 细胞对照组; 3: HuH-7 细胞对照组; 4: BEL-7402 细胞转染 Ad-GFP; 5: HLE 细胞转染 Ad-GFP; 6: HuH-7 细胞转染 Ad-GFP; 7: BEL-7402 细胞转染 BB-102; 8: HLE 细胞转染 BB-102; 9: HuH-7 细胞转染 BB-102)

2.3 GM-CSF 在肝癌细胞中的表达

GM-CSF 的标准曲线的回归方程为 $Y = 1033820 + 0.004602X$, 相关系数 $r = 0.999376$, 接近 1, 说明用 ELISA 法测定 GM-CSF 的表达量与 OD 值的线性关系较好。BEL-7402 和 HLE 细胞染毒后 2 天 GM-CSF 表达量达最高水平, 分别为 137.1 和 213.2 pg/ml, 以后逐渐下降。对于 HuH-7 细胞感染病毒后第 3 天 GM-CSF 表达量达最高水平, 为 318.3 pg/ml, 以后又逐渐下降。说明不同细胞系, 感染 BB-102 后 GM-CSF 表达的最高水平及到达最高水平的时间也不尽相同, 见图 2。

2.4 B7-1 在肝癌细胞中的表达

FACS 测定结果:细胞表面 B7-1 表达水平在染毒后 2 天有显著提高。BEL-7402 细胞 B7-1 表达的阳性百分率由未转染 BB-102 的 6.9% 提高到转染后的 99.8%, 荧光强度由 22.5 提高到 95;HLE 细胞的阳性百分率由未转染 BB-102 的 12.3% 提高到转染后的 34.1%, 荧光强度由 14.8 提高到 31.7;HuH-7 细胞的阳性百分率由未转染 BB-102 的 17.1% 提高到转染 BB-102 后的 64.6%, 荧光强度由 17.5 提高到 52.9。

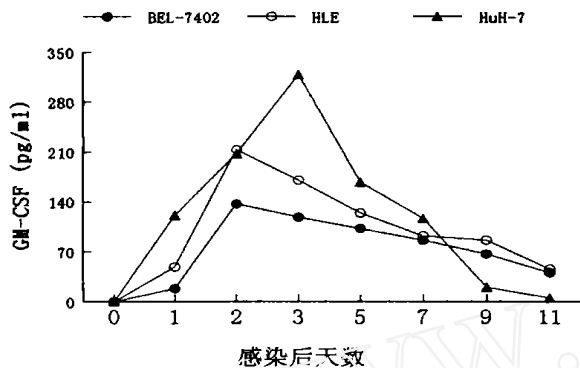


图 2 BB-102 中 GM-CSF 基因在肝癌细胞中的表达

3 讨论

腺病毒的宿主细胞广泛,对除血细胞外的多种细胞均具有较高的转染率。用人类腺病毒制备的载体有许多优点:如容易复制、可获得较高的滴度、安全性好、基因毒性低、载体容量大、宿主范围广等特点,已广泛应用于各种肿瘤的基因治疗。我们实验以 GFP 为报告基因,观察到了腺病毒对肝癌细胞 BEL-7402、HLE 及 HuH-7 均有很高的转染率,这为以腺病毒为载体将目的基因导入肝癌细胞提供了前提。已知腺病毒无需整合进宿主细胞基因组中,目的基因在宿主细胞基因组外游离状态下瞬时表达,表达高峰期为转染后 2~4d,因此选择腺病毒感染后 48h 作为检测 p53 基因表达的时间。结果表明,腺病毒能有效地将目的基因导入肝癌细胞中并高效表达。

BEL-7402 细胞 p53 基因为野生型,HLE 及 HuH-7 p53 基因为突变型^[8],野生型 p53 基因产物 p53 蛋白半衰期较短,为 20~30min,难以检测,突变型 p53 基因的产物 p53 蛋白由于空间构象的改变,使其半衰期延长而易于检测。因此 BEL-7402 细胞的对照组及 Ad-GFP 组难以检测出 p53 蛋白的表达;转染 BB-102 后,由于 p53 蛋白表达的增多,通过免疫组化或蛋白印迹杂交能检测出 p53 蛋白的表达。HLE

及 HuH-7 细胞的对照组及 GFP 组通过免疫组化检测可见细胞核被染成棕色,转染 BB-102 后,随着外源野生型 p53 基因的表达,p53 蛋白增多,细胞核被染成深棕色,westernblot 检测结果与此相似。细胞株本身的不同,腺病毒对其转染效率也可能存在一定差别,如 MOI 为 50pfu/细胞时,对 BE-7402 及 HLE 的转染效率可达 90%,而对 HuH-7 只为 80%;此种不同还表现在 GM-CSF 和 B7-1 的表达状态方面,如 HuH-7 细胞表达 GM-CSF 的最高水平为 318.3 pg/ml,大大高于 BEL-7402 细胞 (137.1 pg/ml) 和 HLE 细胞 (213.2 pg/ml) 表达水平;达最高水平时间 BEL-7402 细胞及 HLE 细胞均为染毒后 2 天,而 HuH-7 细胞却为染毒后 3 天;B7-1 表达的阳性率及强度亦不一致,这与三种细胞不同的生长状态及调控三基因表达的启动子不同有关,可能是多种因素综合影响的结果。总之,腺病毒载体对肝癌细胞较高的感染效率及目的基因的高效表达,为进一步探讨 BB-102 在肝癌基因治疗中的应用奠定了基础。

参考文献:

- [1] ZhangWW.Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer[J].Cancer Gene Ther,1999,6 (2):113-138.
- [2] GrahamFL,PrevecL.Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines[J].Biotechnology,1992,20:363-390.
- [3] 邱兆华,劳妙芬,吴祖泽.共表达人野生 p53、GM-CSF 和 B7-1 基因的重组腺病毒的构建[J].中国生物化学与分子生物学报,2001,17 (3):33-38.
- [4] 施明,王福生,高兰兴.腺病毒载体的研究进展[J].世界华人消化杂志,2000,8 (11):76-80.
- [5] 邱兆华,劳妙芬,王艳飞等.腺病毒介导多基因在肺癌细胞中的表达及致凋亡效应[J].中国肿瘤生物治疗杂志,1999,6 (2):83-86.
- [6] QIUZH,LaoMF,WUZZ,etal.Co-transfection of human wild-type p53 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genes via recombinant adenovirus induces apoptosis and enhances immunogenicity in lung cancer cells.Cancer Lett,2001,167:25-32.
- [7] J. 萨姆布鲁克,E.F. 弗里奇,T. 曼尼阿蒂斯著.金冬雁,黎孟枫等译.分子克隆实验指南[M].北京:科学出版社,1998.870-898.
- [8] MiharaK,MiyazakiM,KondoT,etal.Yeast functional assay of the p53 gene status in human cell lines maintained in our laboratory[J].Acta Med Oka Yama,1997,51 (5):261-265.

(周永红校对)