



IP-10重组腺病毒载体的构建及其病毒制备

干扰素诱导蛋白10 (IP-10) 是趋化因子家族成员, 具有抗肿瘤作用[1][2], 不但可以抑制新生血管分化为毛细血管, 抑制血管内皮细胞增殖[3], 而且可以募集T淋巴细胞、单核细胞、自然杀伤(NK)细胞, 引起肿瘤内淋巴细胞、单核细胞浸润, 显示出强大的抗肿瘤潜力。经IP-10处理的小鼠接种肿瘤细胞后成瘤率降低, 瘤内注射IP-10可使肿瘤消退[4][5]。腺病毒介导的IP-10和IL-18、IL-12表达可协同作用, 抑制实体瘤的生长和转移[6]。腺病毒载体是重要转基因病毒载体, 具有转染效率高, 感染细胞范围广, 病毒滴度高, 可感染细胞周期中静止期和分裂期细胞, 同时可高效介导基因的体内外转移等优点[7][8][9]。本实验构建了带增强型绿色荧光蛋白(EGFP)示踪的IP-10复制缺陷型腺病毒表达载体, 并在HEK293细胞成功地包装成为腺病毒。

1 材料和方法

1.1 试剂和主要仪器

各种限制性内切酶、 T_4 连接酶、Pyrobest高保真DNA聚合酶分别为TaKaRa和New England Biolab公司产品, 质粒提取试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒为优品公司产品, 脂质体转染试剂Polyfect购自Qia-gen公司, DMEM培养基购自Gibco-BRL公司, 胎牛血清购自HyClone公司。其他试剂均为进口或国产分析纯。主要仪器包括凝胶图象分析仪(法国Vilber Lourmat公司); 高速离心机(美国Beckman公司); ABI310全自动DNA测序仪(美国Perkin-Elmer公司); 荧光显微镜(日本Olympus公司); 显微荧光摄像/照相系统(日本Nikon公司)。PCR引物由上海博亚生物技术公司合成。

1.2 菌株、质粒和细胞株

质粒pMD-18T购自TaKaRa, 腺病毒骨架质粒pAdEasy-1购自Stratagene公司, 大肠杆菌BJ5183、DH5菌、HEK293细胞株、穿梭质粒pAdTrack-CMV/p38为本实验室保存。

1.3 IP-10基因克隆入pMD-18T质粒

根据IP-10的cDNA序列(包括信号肽)设计一对特异性寡核苷酸引物, 上游引物P5的序列: 5'-CTGAGCACATATGATGAATCAAACCTGCGATTCTGAT-3', 下游引物的序列为P3: 5'-GAGGATCCT-TAAGGAGATCTTTTAGACATTTTC-3'。以噬菌体人肺cDNA文库为模板, 使用上述上、下游引物, 用Py-robest高保真DNA聚合酶扩增目的基因IP-10。PCR参数是94 °C, 30 s; 53 °C, 1 min; 72 °C, 1 min, 30个循环。1%琼脂糖凝胶电泳回收PCR产物。用 T_4 连接酶在合适的缓冲液中连接pMD-18T与回收片段16 °C、1 h。连接产物转化DH5, 在Amp⁺ LB平板上37 °C培养12 h。挑取阳性克隆, 经Hind III和Xba I双酶切鉴定。正确克隆命名为pMD-18T/IP-10。

1.4 将IP-10基因亚克隆入穿梭载体

将质粒pMD-18T/IP-10和pAdTrack-CMV-p38分别经Hind III和Xba I双酶切, 1%琼脂糖凝胶电泳分离后, 切胶回收, 回收产物用 T_4 DNA连接酶于16 °C过夜连接后再转化感受态DH5菌。在Kana⁺ LB平板上37 °C培养20 h, 挑取较小的阳性克隆。经Hind III和Xba I双酶切鉴定正确后命名为pAdTrack-CMV/IP-10。

1.5 BJ5183大肠杆菌感受态细胞的制备

取冻存的大肠杆菌BJ5183菌液1 μ l分别稀释到1mlLB中，再从中取10 μ l，铺AMP+的LB平板，置37 $^{\circ}$ C温育过夜。取出LB平板，分别挑取单克隆于5mlLB中，37 $^{\circ}$ C，220r/min，震荡培养4h。分别取菌液1ml加入100mlLB细菌培养液中，37 $^{\circ}$ C震荡培养至D₆₀₀=0.3时，将细菌分装到无菌的、冰预冷的50ml聚丙烯管中，在冰上放置10min，使培养物冷却至0 $^{\circ}$ C。4 $^{\circ}$ C，4000r/min，离心10min；弃上清。分别加入4 $^{\circ}$ C预冷的0.1mol/LCaCl₂10 ml，混匀，冰上放置约30min。4 $^{\circ}$ C，4000r/min，离心10min，弃上清。分别加入4 $^{\circ}$ C预冷的0.1 mol/LCaCl₂2ml，混匀，置4 $^{\circ}$ C过夜。加入10%无菌甘油，混匀，置冰上分装于EP管中，-80 $^{\circ}$ C冻存备用。

1.6 细菌内同源重组产生重组腺病毒质粒

取1 μ g pAdTrack-CMV/IP-10用PmeI线性化后，1%琼脂糖凝胶电泳分离，切胶回收目的片断。挑取冻存的已含pAdEasy-1的BJ5183菌，用CaCl₂法制备高效感受态，再将1 μ g线性化pAdTrack-CMV/IP-10转入含有pAdEasy-1的BJ5183菌；取适量的细胞在Kana+的平板中，37 $^{\circ}$ C培养16~20h；挑取阳性克隆，抽提质粒鉴定后再转入DH5菌中。重组病毒质粒命名为pAd/IP-10。用PacI对pAd/IP-10重组病毒质粒进行酶切鉴定。

1.7 重组病毒载体在HEK293细胞的包装和扩增

从转化入pAd/IP-10重组质粒的DH5菌中提取质粒DNA10 μ g，用PacI酶切使之线性化，同时切去Kan和Ori等载体构件，暴露反转录末端重复序列。酶切产物加入1/10体积的3mol/L冷NH₄Ac与2.5倍体积的无水乙醇，-20 $^{\circ}$ C沉淀DNA，4 $^{\circ}$ C进行11000r/min离心20min，弃上清；加入75%冷乙醇溶液，离心洗涤2次，每次5min，弃上清；空气干燥，加入ddH₂O溶解DNA并定量。培养HEK293细胞，按照厂家说明用Polyfect进行细胞转染，2d后用荧光显微镜进行观察。7~10 d后收集细胞，离心沉淀后在37 $^{\circ}$ C/-80 $^{\circ}$ C条件下反复冻融4次，4 $^{\circ}$ C、7000g离心5min，取部分病毒上清再次感染HEK293细胞以扩增重组病毒。重组腺病毒的制备过程见图1。

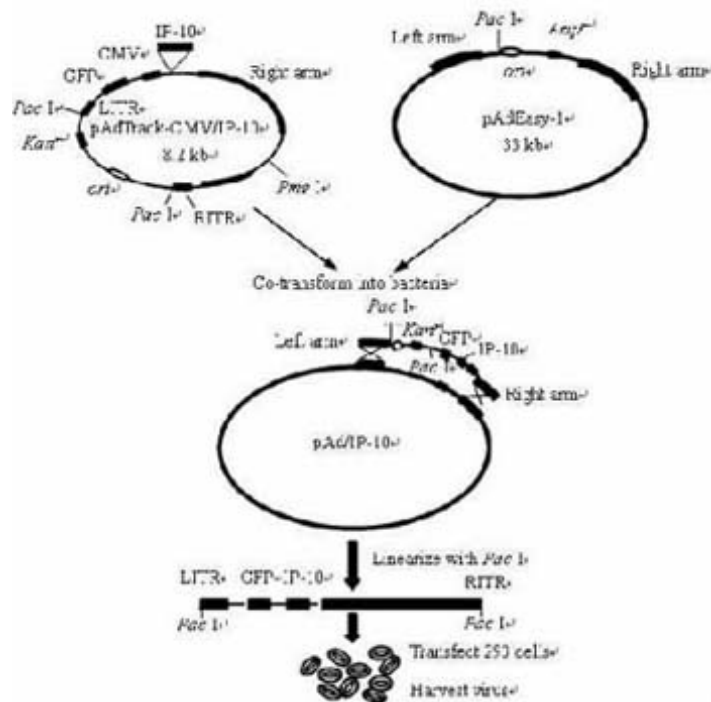


图1 pAd/IP-10重组腺病毒的载体构建及病毒制备过程

Fig.1 Construction of recombinant adenovirus pAd/IP-10 and virus preparation

1.8 重组病毒Ad/IP-10的鉴定

取病毒上清2 μ l，煮沸10min以制备病毒基因组DNA。以重组病毒基因组DNA为模板，以扩增IP-10的上、下游引物按前述条件进行PCR反应。

2.1 pMD-18T/IP-10的构建及鉴定

编码IP-10的基因来源于噬菌体cDNA文库，PCR产物用1%琼脂糖电泳，可见有一特异性条带，与预期大小相符。重组质粒pMD-18T/IP-10经Hind III和Xba I双酶切，可切出1条340bp大小条带(图2)，与预期大小一致，测序分析与人IP-10cDNA全序列一致。

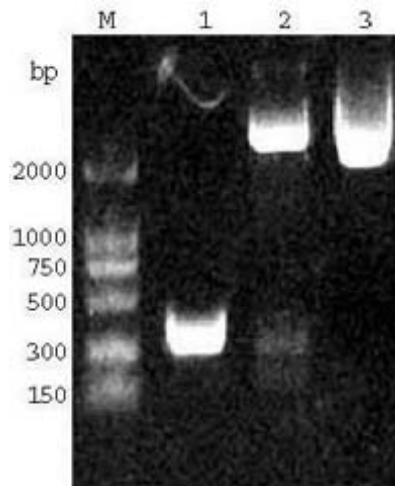


图2 pMD-18T/IP-10载体的构建和酶切鉴定

Fig.2 Construction and identification of pMD-18T/IP-10

M: DNA ladder; Lane 1: IP-10 amplified by PCR; Lane 2: pMD-18T/IP-10 digested by Hind III and Xba I; Lane 3: pMD-18T/IP-10 vector

2.2 穿梭载体pAdTrack-CMV-IP-10的构建及鉴定

目的基因IP-10自载体pMD-18T/IP-10切下后亚克隆至pAdTrack-CMV中，形成pAdTrack-CMV/IP-10，经Hind III和Xba I双酶切鉴定，可见有约340 bp的插入片段(图3)。

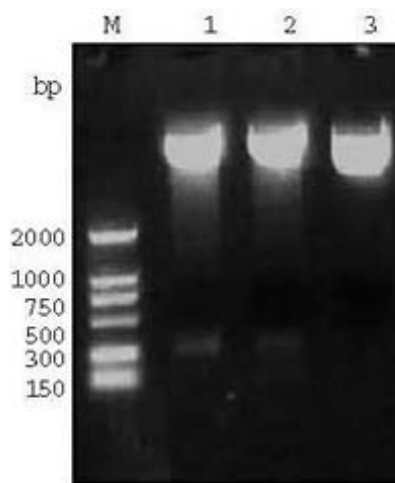


图3 穿梭质粒pAdTrack-CMV/IP-10酶切鉴定

Fig.3 Construction and identification of the vector pAdTrack-CMV/IP-10M: DNA ladder; Lanes 1, 2: pAdTrack-CMV/IP-10 digested by Hind III and Xba I; Lane 3: Vector of pAdTrack-CMV/IP-10

2.3 重组腺病毒载体pAd/IP-10的构建及鉴定

Pme I线形化的pAd/IP-10与超螺旋的pAdEasy-1在BJ5183菌中能够发生同源重组，且转化后细菌可在含卡那霉素的培养基中生长。用Pac I酶切重组质粒可出现一4.5 kb的特征性条带得以鉴定(图4)。重组腺病毒载体命名为pAd/IP-10。

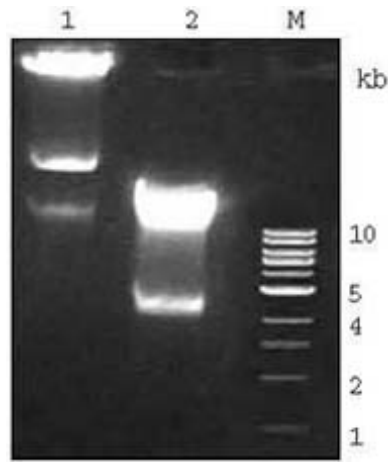


图4 腺病毒载体pAd/IP-10的构建和鉴定

Fig.4 Construction and identification of pAd/IP-10 Lane 1: pAd/IP-10 vector; Lane 2: pAd/IP-10 digested by Pac I; M: 1 kb DNA ladder

2.4 重组腺病毒Ad/IP-10的包装

用Pac I线形化的pAd/IP-10质粒转染HEK293细胞3 d后，在荧光显微镜下观察，大量细胞有EGFP表达，并可见感染细胞出现细胞病变效应，细胞收缩变圆，12 d后感染细胞释放病毒使周围细胞都被感染，可以观察到明显的病毒斑块。

2.5 重组腺病毒Ad/IP-10的鉴定

用重组腺病毒Ad/IP-10基因组DNA为模板，以扩增目的基因IP-10的引物进行PCR反应，可扩增出预期大小的条带(图5)，表明重组腺病毒携带有所克隆入的IP-10基因。

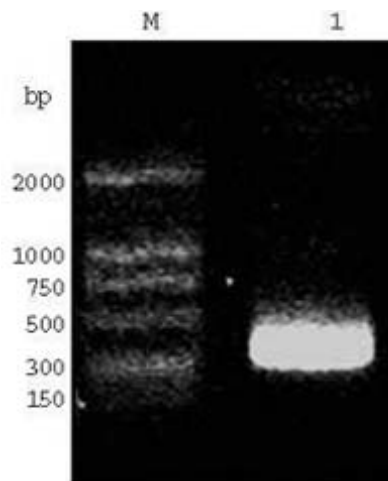


图5 重组腺病毒Ad-IP-10的鉴定

Fig.5 Identification of recombinant adenovirus Ad/IP-10M: 2000 bp DNA ladder; Lane 1: PCR product of IP-10 gene

2.6 重组腺病毒Ad/IP-10感染HEK293细胞

取部分Ad/IP-10病毒上清反复感染HEK293细胞扩增重组病毒(图6)。

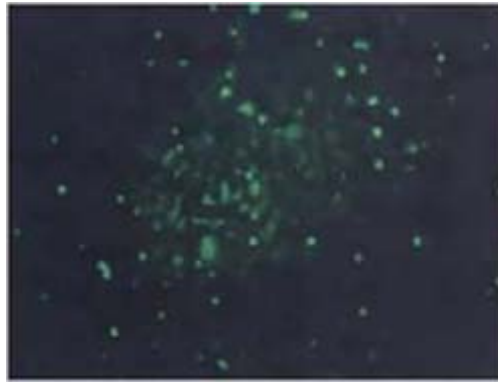


图6 腺病毒Ad/IP-10感染HEK293细胞
Fig.6 Infection of HEK293 cells by the adenovirus Ad-IP-10

3 讨论

腺病毒是一种无包膜病毒，病毒颗粒呈二十面体，直径70~90 nm，含有14个蛋白，病毒的基因组为线形双链DNA，长度约为36 kb。腺病毒表达载体的主要优点有：在体外有很高的繁殖滴度；易感染的宿主细胞范围广，既能感染增殖细胞，又能感染非增殖细胞；病毒基因组存在于细胞染色体外，避免了因整合引起的细胞突变。由于腺病毒载体在哺乳动物及其他多种细胞中进行基因转移和蛋白表达的高效性，其在细胞信号转导、基因表达调控和基因治疗的研究中受到人们的亲睐，成为当今被广泛使用的病毒载体之一[7][8][9]。

既往的研究一直在争论肿瘤是由已经存在的血管提供营养，还是由新生血管提供营养，并且普遍认为这种血管反应只是一种炎症反应，并非肿瘤生长所必需。直到20世纪70年代，美国学者Folkman提出了肿瘤生长是依赖血管的，为靶向血管的抗肿瘤研究奠定了坚实的基础。实体肿瘤的生长必须依赖持续和广泛的血管生成，它不仅为肿瘤组织提供营养物质和氧气，还是肿瘤转移的主要途径[10]。

由于IP-10具有抑制新血管生成和募集T淋巴细胞、单核细胞和NK细胞的生物效应。根据IP-10的这一特点已开展了许多关于IP-10抗肿瘤作用的研究。研究表明，腺病毒介导的IP-10在肿瘤中的过表达可引起肿瘤内淋巴细胞、单核细胞和NK细胞的浸润，抑制新血管形成，从而有效抑制肿瘤的生长，显示出强大的抗肿瘤潜力。腺病毒介导的IP-10和IL-18、IL-12表达可协同作用，发挥强大的抗肿瘤效应[11]；过继性T细胞治疗和IP-10基因转导治疗联合起来可最大程度清除发育完全的实体肿瘤[12]。尽管目前这种治疗肿瘤的方法尚未在临床上得到广泛应用，但是IP-10重组腺病毒是基因治疗肿瘤的一个非常有前景的新方法。我们的实验根据已知的人IP-10基因组序列，设计了一对引物，从人肺cDNA文库中扩增出带有信号肽的IP-10基因，并将其成功克隆到腺病毒穿梭质粒中。在含有病毒骨架质粒的BJ5183细菌中同源重组得到IP-10重组腺病毒质粒pAd/IP-10后，在HEK293细胞中包装、扩增了重组病毒。IP-10重组腺病毒颗粒的获得不仅为我们研究IP-10蛋白的功能提供了有力的工具，还在肿瘤治疗的研究中具有重要意义。

参考文献：

- [1]邵紫媪, 刘志锋, 彭毅, 等. 人IP-10融合蛋白表达载体的构建和表达及活性鉴定[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(5): 898-901.
- [2]Luster AD, Ravetch JV. Biochemical characterization of an inter-feron-inducible cytokine (IP-10)[J]. J Exp Med, 1987, 166(4): 1084-97.
- [3]Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, et al. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo[J]. J Exp Med, 1995, 182(1): 155-62.

[4]Sgadari C, Angiolillo AL, Chemey BW, et al. Interferon-inducible protein 10 identified as a mediator of tumor necrosis in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(24): 13791-6.

[5]Neville LF, Mathiak G, Bagasra O. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 1997, 8(3): 207-19.

[6]Narvaiza I, Mazzolini G, Barajas M, et al. Intratumoral coinjection of two adenoviruses, one encoding the chemokine IFN-inducible protein-10 and another encoding IL-12, results in marked antitumor synergy[J]. J Immunol, 2000, 164(6): 3112-22.

[7]李红乐, 李浩威, 邢飞跃, 等. BDNF重组腺病毒的构建及在大鼠骨髓间质干细胞的表达[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(4): 438-42.

[8]李红乐, 秦清和, 王静珍, 等. 应用细菌同源重组法快速构建和制备重组腺病毒[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(11): 1451-4.

[9]罗 燕, 唐仕波, 李 湘, 等. 细菌内同源重组高效制备含绿色荧光蛋白和抗凋亡基因bcl-XL的重组腺病毒载体[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(12): 1462-7.

[10] Folkmen J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent[J]? J Natl Cancer Inst, 1990, 82(1): 4-6.

[11]Liu Y, Huang H, Saxena A, et al. Intratumoral coinjection of two adenoviral vectors expressing functional interleukin-18 and inducible protein-18, respectively, synergizes to facilitate regression of established tumors[J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9(6): 533-42.

[12]Huang H, Liu Y, Xiang J. Synergistic effect of adoptive T cell therapy and intratumoral interferon-inducible protein-10 transgene expression in treatment of established tumors[J]. Cell Immunol, 2002, 217(1-2): 12-22.