

重组 p16 腺病毒的构建及其 对人白血病细胞的抑制作用

白雪源* 孟令英 周煜 姜黎 鹿建春 李军保 车凤翔

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘要 为了探讨腺病毒载体用于基因治疗的可行性及野生型 p16 基因的抗肿瘤特性, 构建了复制缺陷型重组 p16 腺病毒。首先将 p16 全长 cDNA 插入穿梭质粒 pAdCMV 产生重组质粒 pAdCMV-p16, 然后通过脂质体介导与 pJM17 共转染 293 细胞, 经同源重组产生 E1 区缺失的重组腺病毒空斑。用纯化后的腺病毒感染人白血病细胞株 HL-60 后, PCR 及 Western blot 分析显示在感染细胞中有外源性 p16 cDNA 存在和 p16 蛋白表达; 被感染的 HL-60 细胞的生长受到明显抑制, 而未感染细胞及对照腺病毒感染的细胞没有受到抑制。结果表明, 腺病毒作为一种新型基因转移载体, 可有效地介导肿瘤抑制基因 p16 的表达, 在肿瘤基因治疗方面具有很大的应用前景。

关键词 重组腺病毒, p16 基因, 基因治疗

中图分类号 Q78

Construction of Recombinant p16 Adenovirus and its Suppressive Role in the Growth of Human Leukemia Cells

BAI Xue-yuan, MENG Ling-ying, ZHOU Yu, JIANG Li, LU Jian-cun, LI Jun-bao, CHE Feng-xiang
(Institute of Microbiology & Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract To explore the suppressive function of wild type p16 gene in the growth of tumor cells and the potential of adenovirus vector in gene therapy, an E1-deficient and replication-defective recombinant p16 adenovirus was generated. The virus, Ad-p16, carried human CMV promoter, p16 cDNA and SV40 polyadenylation signal. First, p16 cDNA was cloned into shuttle plasmid pAdCMV to construct recombinant plasmid pAdCMV-p16, which was cotransfected with pJM17 into the 293 packaging cells by lipofectine-mediated transfection. The prepared recombinant adenovirus was identified by dot blot hybridization and purified by CsCl-gradient ultracentrifuge. The leukemia cell line HL-60, which had a hemizygous deletion and point mutation of p16 gene, was infected with recombinant adenovirus at a multiplicity of infection (M. O. I.) of 50-100 plaque-forming-unit (pfu)/cell. PCR and Western blot indicated that the presence of p16 cDNA and p16 protein was expressed in the infected HL-60; Growth of the Ad-p16 virus-infected HL-60 was inhibited markedly, whereas that of noninfected cells and the cells infected with the control virus Ad-LacZ was not inhibited. These results suggest that adenovirus is an efficient vector for mediating transfer and expression of tumour suppressor gene in human tumor cells and the prepared recombinant p16 adenovirus could be used for cancer gene therapy.

Key words Recombinant adenovirus, p16 gene, Gene therapy

基因治疗的关键之一是如何将外源基因有效地转移到靶细胞内。由于腺病毒载体具有转移效率高、病毒滴度高、安全性好及宿主细胞广泛等优点, 故日益引起重视, 已被广泛用于多种疾病的基因治疗研究^[1]。p16 是近年发现的一种新型肿瘤抑制基因, 其编码的 p16 蛋白是细胞周期蛋白依赖性激酶-4 (cy-

* 联系人: 白雪源, 男, 1962 年生, 博士

Tel: (010) 66937763, E-mail: baixy@usa.net;

现地址: 解放军总医院, 解放军肾脏病研究中心暨重点实验室, 北京 100853

收稿日期: 1999-04-09, 修回日期: 1999-07-12

clin dependent kinase-4, CDK4) 的抑制因子, 与 CDK4 结合后可阻止后者与 D 型细胞周期蛋白(cyclin D) 结合, 从而使细胞周期停滞在 G₁ 期^[2]. 已在多种肿瘤细胞中发现 p16 基因缺失、重排、突变及不表达^[3,4], 故 p16 被认为是重要的肿瘤抑制基因. 为了研究腺病毒载体的基因转移能力及探讨 p16 基因的肿瘤抑制功能, 我们构建了携带野生型 p16 基因的重组腺病毒载体并观察了其对白血病细胞 HL-60 的生长抑制作用.

1 材料与方法

1.1 主要试剂、质粒和细胞系

限制性内切酶、缺口翻译试剂盒和 Wizard 质粒提取试剂盒购自美国 Promega 公司. MEM 培养基、脂质体 Lipofectine 及 T4 DNA 连接酶购自美国 Gibco 公司. [α -³²P]dCTP 购自北京亚辉公司.

人 p16 cDNA 基因系用逆转录 PCR 从正常人外周血淋巴细胞中扩增获得, 并克隆到 pBluescript SK 质粒的 EcoR V 位点, 得到重组质粒 pBluescript-p16, 序列测定证明与 GenBank 库收录的 p16 cDNA 顺序一致. 含有 LacZ 报告基因的质粒 pCMV β 由本室保存. 腺病毒穿梭质粒 pAdCMV 由美国宾州大学 Guo 博士转赠.

含有腺病毒基因组的 pJM17 大质粒及腺病毒包装细胞 293 由本所杨佩英教授赠送. 白血病细胞株 HL-60 来自 ATCC, 其 p16 基因杂合性缺失. 上述两种细胞分别培养在含有 10% FBS、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素及 100 μ g/ml 链霉素的 MEM 及 RPM-1640 培养基中.

1.2 腺病毒穿梭质粒 pAdCMV-p16 的构建

用 Hind III + Spe I 分别双酶切 pBluescript-p16 和 pAdCMV, 电泳后用玻璃奶分别回收 p16 cDNA 片段及 pAdCMV 载体骨架, 用 T4 DNA 连接酶将两者连接, 然后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态. 挑选转化菌落, 少量快速提取质粒, 双酶切鉴定重组质粒 pAdCMV-p16. 同样地将 pCMV β 中的 LacZ 基因插入 pAdCMV 中构建 pAdCMV-LacZ.

1.3 重组 p16 腺病毒的产生

将 1 μ g pAdCMV-p16 与 2 μ g 氯化铯 (CsCl) 密度梯度超速离心纯化的 pJM17 质粒混合后, 由脂质体 Lipofectine 介导共转染 80% 成片的 293 细胞. 转染 5 h 后, 在细胞上覆盖含 5% 马血清的 MEM 营养琼脂, 放 37 培养约 12 d, 出现细胞病变 (cytopathic effects, CPE), 表现为贴壁细胞变圆, 出现病毒空

斑. 挑取单个病毒空斑加到含 10% 甘油的 PBS 中, -70 保存, 所得到的重组腺病毒命名为 Ad-p16. 以同样方式制备含有 LacZ 基因的重组腺病毒作为对照载体, 命名为 Ad-LacZ.

1.4 重组 p16 腺病毒的繁殖、鉴定、纯化和滴度测定

用平头毛吸管挑出单个病毒空斑, 置于 0.5 ml PBS 中捣碎, 取 0.2 ml 接种到 293 细胞培养瓶中进行病毒的小量增殖. 当镜下观察到 90% 以上细胞出现病变后, 离心收集上清, 并将细胞于 -70 及 37 反复冻融 3 次, 3 000 g 离心收集上清, 按 Hirt 法提取病毒 DNA^[5], 以 [α -³²P]-dCTP 标记的 p16 cDNA 作探针, 通过斑点杂交筛选出阳性病毒空斑. 重组腺病毒大量繁殖后用 CsCl 密度梯度超离心法进行纯化, 然后将纯化的病毒经 1:10 系列稀释后, 用空斑形成实验测定病毒滴度.

1.5 用重组 p16 腺病毒感染白血病细胞 HL-60

取对数生长期的 HL-60 细胞, 按 50~100 pfu/cell 的感染量 (M.O.I.) 将 Ad-p16 病毒加入到细胞瓶中, 室温感染 60 min, 然后加入含 10% FBS 的 RPM-1640 培养基 37 培养; 对照组则加入同样量的 Ad-LacZ.

1.6 细胞内外源 p16 cDNA 的检测

分别从 Ad-p16、Ad-LacZ 病毒感染后 2 d 及未感染的 HL-60 细胞中提取总 DNA, 用 PCR 检测外源性 p16 cDNA. 根据 GenBank 中收录的 p16 cDNA 序列及 Okamoto 修正后的 p16 基因序列^[2,6], 设计一对扩增 p16 cDNA 的 PCR 引物, 上下游引物分别位于 p16 基因的第 1 及第 3 外显子, 因此可以区分外源性 p16 cDNA 与含有内含子的内源性 p16 基因. 因为两者的分子量明显不同, 外源性 p16 cDNA 产物的长度应当是 520 bp, 内源性基因组 p16 基因含有两个大内含子, 其长度是 8.4 kb. 用于扩增 p16 基因的上下游引物顺序分别为 5'-ATGGAGCCGCGGGGAG-3' 和 5'-TTTCCC GAGGTTTCTCAGAG-3'. PCR 扩增条件是 95 变性 60 s, 55 退火 30 s, 72 延伸 60 s, 30 次循环后, 72 继续延伸 10 min.

1.7 细胞内外源 p16 蛋白的检测

用 Ad-p16 及 Ad-LacZ 感染 HL-60 细胞 24~48 h 后, 提取细胞总蛋白质, 用 Western blot 检测胞内 p16 蛋白的表达, 检测抗体为抗 p16 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司), 检测方法用 DAB 直接显色或用 Amersham 公司的增强型化学发光 (ECL)

Western blotting 检测试剂盒以增强灵敏度。首先将细胞总蛋白质转移到尼龙膜上, 然后取膜依次与 p16 单抗和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 反应, 再于暗室中将化学发光液涂于尼龙膜上, 压 X 光片曝光 20~ 180 s。

1.8 细胞生长曲线测定

将 5×10^4 个 HL-60 细胞接种于细胞培养瓶中培养 24 h 后, 加入 50~ 100 pfu/cell 的 Ad-p16 感染 HL-60 细胞, 对照组包括不加病毒组及加 Ad-LacZ 组。从感染后第 1~ 6 d, 每天每组各取 3 瓶细胞进行细胞计数, 按平均数绘制细胞生长曲线。

2 结 果

2.1 重组穿梭质粒 pAdCMV-p16 的构建

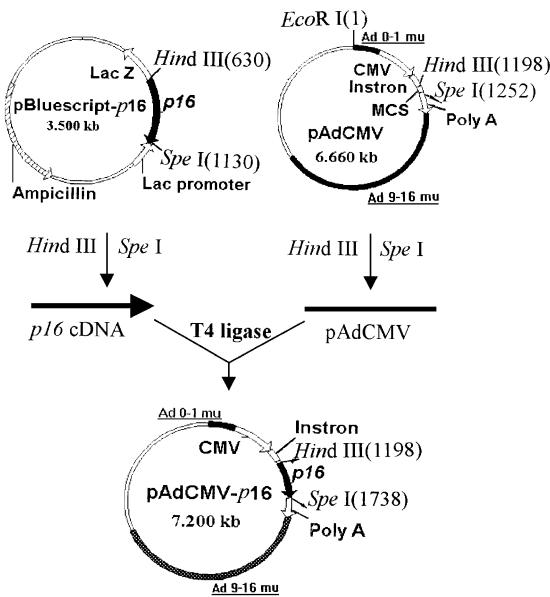


Fig 1 Scheme for construction of pAdCMV-p16

如 Fig 1 所示, 穿梭质粒 pAdCMV 含有部分腺病毒序列(0~ 1 及 9~ 16 m. u.), 可与腺病毒基因组 DNA 进行同源重组; 它还具有真核表达元件如 CMV 启动子、内含子及 Poly A 信号。将 p16 基因定向插入 pAdCMV 的 Hind III 与 Spe I 位点之间即得到重组质粒 pAdCMV-p16。

2.2 重组 p16 腺病毒的产生

如 Fig 2 所示, pAdCMV-p16 和 pJM17 共转染 293 细胞后约 11 d, 培养的细胞开始出现 CPE, 表现为胞膜收缩变圆、细胞成片脱落并出现多个病毒空斑, 到转染后 14 d 病变达到完全(Fig 3)。表明两者已发生重组并在 293 细胞中包装成病毒颗粒。

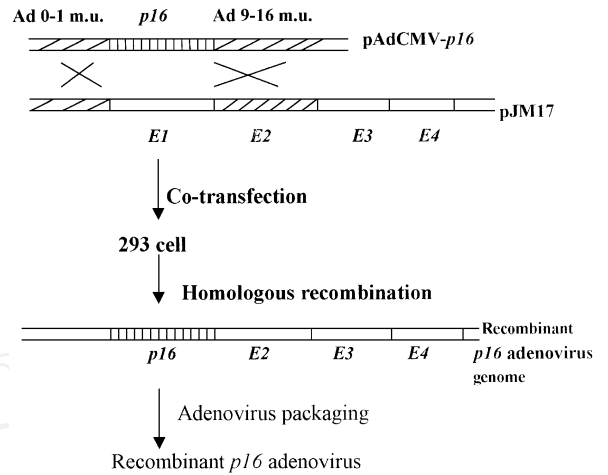


Fig 2 Scheme for generation of recombinant p16 adenovirus

Fig 3 Observation of CPE on 293 cells by recombinant adenovirus (magnification $\times 400$)
(A) Negative control 293 on day 12 post-transfection
(B) Onset of the CPE (adenovirus plaques) on day 12 post-transfection

2.3 重组 p16 腺病毒的鉴定、纯化和滴度测定

挑选 3 个病毒空斑再感染 293 细胞, 提取病毒 DNA, 用同位素标记的 p16 cDNA 作探针进行斑点杂交鉴定。结果有 2 个病毒空斑显示阳性, 表明有外源 p16 cDNA 插入。取一个空斑, 大量繁殖后用 CsCl 密度梯度离心法纯化病毒, 经空斑形成试验测得病毒滴度为 3.9×10^9 pfu/ml。

2.4 HL-60 细胞中外源 p16 cDNA 的检测

用 Ad-p16 感染后的 HL-60 细胞总 DNA 进行 PCR, 可扩增出长 520 bp 的 p16 cDNA 编码序列, 说明外源性野生型 p16 cDNA 已稳定地转移到 HL-

60 细胞中; 而未感染的细胞及 Ad-LacZ 感染的细胞 DNA 作模板进行 PCR 扩增, 未能扩出 520 bp 的外源 p16 cDNA; 也没有扩增出内源性 p16 DNA (Fig 4). Nakamaki 报道, HL-60 细胞本身存在 p16 基因杂合性缺失^[7], 用 PCR 应当能扩增出内源性基因组 p16 基因. 但由于基因组 p16 基因长达 8.4 kb, 加之在 p16 基因的上游启动子区存在 CpG 岛, 编码区的 GC 碱基含量也高达 70%, 易形成二级结构, 使扩增该基因变得更加困难, 故我们未能扩增出内源性 p16 基因. 虽然国外一些厂商宣称能用 PCR 扩增出 10 kb 以上的长 DNA 片段, 但技术尚远未完善, 以复杂的基因组 DNA 为模板扩增 DNA 长片段仍然并非易事. 目前国内用 PCR 技术能扩出的最长 DNA 片段为 6.5 kb^[8].

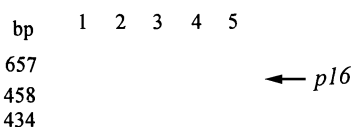


Fig 4 Electrophoretic analysis for PCR product of p16 cDNA

- 1: DNA marker pGEM-7Zf(+)/HaeIII;
- 2: Positive control pBluescript-p16 plasmid;
- 3: PCR product from Ad-p16 infected HL-60 cell;
- 4: PCR product from Ad-LacZ infected HL-60 cell;
- 5: PCR product from non-infected HL-60 cell

2.5 HL-60 细胞中外源 p16 蛋白表达的检测

Western blot 结果表明, 未感染细胞及 Ad-LacZ 感染的细胞均无 p16 蛋白表达, 而 Ad-p16 感染的细胞有 p16 蛋白表达 (Fig 5).

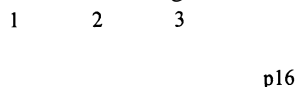


Fig 5 Western blot analysis of expressed p16 protein

- 1: Non-infected HL-60 cell;
- 2: Ad-LacZ infected HL-60 cell;
- 3: Ad-p16 infected HL-60 cell

2.6 外源 p16 基因对 HL-60 细胞生长的影响

细胞生长曲线表明, Ad-p16 腺病毒可显著抑制 HL-60 细胞生长, 而 Ad-LacZ 并未明显影响细胞生长, 表明细胞生长受到抑制不是由于腺病毒本身所致, 而是由于 p16 基因表达后发挥了抑制作用 (Fig 6).

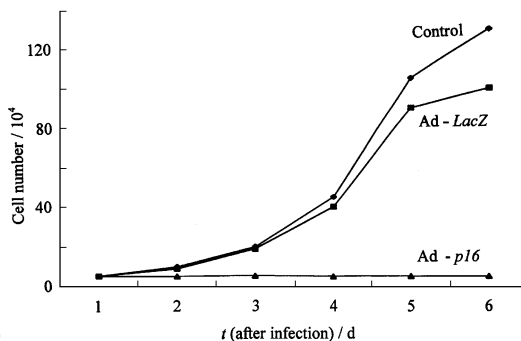


Fig 6 Cell growth curve of Ad-p16 infected HL-60 cell
· · · Control; - Ad-LacZ; - Ad-p16

3 讨 论

重组腺病毒作为一种高效基因转移载体被广泛用于将外源基因导入哺乳细胞, 原因是腺病毒本身分子稳定, 基因组不会发生重排, 插入的外源基因也相当稳定. 腺病毒允许插入的外源基因容量可达 7.5 kb. 病毒易于增殖与纯化, 滴度高达 10^{11} pfu/ml. 不仅能感染分裂期细胞, 也可感染静止期细胞, 感染率几乎 100%^[11]. 另外, 它不与宿主基因组整合, 没有基因毒性, 比较安全. 腺病毒的上述优点是逆转录病毒所不具备的, 因此在基因治疗与基因免疫中具有极大的应用前景^[9]. 美国 NIH 已批准用腺病毒载体进行多项基因治疗试验.

腺病毒的 E1 区基因 (early region 1, 早期区 1) 是复制所必需的. 根据 E1 区是否缺失, 腺病毒载体分为复制缺陷型和非缺陷型两类, 前者只能在含有 E1 基因的互补细胞系 (如 293 细胞) 中才能生长繁殖. 293 细胞是用腺病毒 E1 区基因转化的人胚肾细胞系.

我们将含有外源基因 p16 的穿梭质粒与含有腺病毒基因组的大质粒 pJM17 通过脂质体介导共转染 293 细胞, 经同源重组成功地得到了具有感染活力的复制缺陷型重组腺病毒, 其中的 E1 区基因缺失, 被外源基因 p16 取代. 由于 293 细胞能通过提供 E1 蛋白进行反式互补, 故这种缺陷型病毒可在其中大量复制繁殖, 但它并不能在其他细胞如靶细胞中复制, 故用于基因治疗是非常安全的. 随后我们用得到的重组病毒感染 p16 基因杂合性缺失的 HL-60 细胞, 结果在感染细胞中检测到了外源性 p16 蛋白表达, 并发现 p16 蛋白恢复表达后, 可使 HL-60 细胞的生长受到明显抑制, 而未感染细胞以及用 Ad-LacZ 感染的细胞则无生长抑制现象, 说明抑制作用是由外源性 p16 引起的, 不是由腺病毒本

身造成的。

但是 Quesnel 用携带 p16 基因的逆转录病毒感染白血病细胞株 HL-60 和 K562 后, K562 的生长受到明显抑制, 而 HL-60 的生长没有明显受到抑制; 软琼脂集落形成实验显示 p16 可明显抑制 K562 集落形成, 仅中度抑制 HL-60 集落形成^[10]。对于这种实验结果的差别, 我们推测可能与这两种白血病细胞株对腺病毒和逆转录病毒感染的敏感性不同有关, 也可能与感染效率不同有关。Quesnel 用重组 p16 逆转录病毒感染 HL-60 细胞时, 并非完全不能抑制其生长, 只是抑制作用不如 K562 明显。当用腺病毒载体感染 HL-60 细胞时, 由于腺病毒的感染效率高, 可将较多的 p16 基因转移到细胞中, 使抑制作用得到增强。我们后来又用重组 p16 腺病毒对 p16 基因纯合缺失的肺癌细胞 A549 进行了细胞生长抑制实验及体内致瘤率抑制实验, 结果表明 p16 基因可明显抑制 A549 的生长及在裸鼠体内形成肿瘤。

p16 基因抑制肿瘤细胞生长的机理与其细胞周期阻滞作用有关。正常情况下 p16 蛋白是 CDK4 的抑制剂, 与 CDK4 结合后阻止后者与 D 型细胞周期蛋白结合, 从而使细胞周期阻滞在 G₁ 期^[2]。当 p16 缺失后, CDK4 活性增强, 促使细胞提前从 G₁ 期进入 S 期, 细胞分裂加快, 使 DNA 损伤修复不完全, 容易导致肿瘤发生。如将丢失的 p16 基因重新导入肿瘤细胞中发挥作用, 即可抑制细胞过快地分裂^[11]。总之, 本研究表明复制缺陷型腺病毒作为一种新型基因转移载体, 能有效地介导肿瘤抑制基因 p16 在肿瘤细胞中表达, 重组 p16 腺病毒可用于肿瘤的替代性基因治疗。

参考文献(References)

1 Nielsen L L, Gurnani M, Syed L, Dell J, Hartman B, Cartwright M, Johnson R C. Recombinant E1-deleted adenovirus-mediated

gene therapy for cancer efficacy studies with p53 tumor suppressor gene and liver histology in tumor xenograft models *Hum Gene Ther*, 1998, **9**: 681~ 694

2 Serrano M, Hannon G J, Beach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4 *Nature*, 1993, **66**: 704~ 707

3 Otterson G A, Kratzke R A, Coxon A, Kim Y W, Kaye F J. Absence of p16 protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB. *Oncogene*, 1994, **9**: 3375~ 3378

4 Liu Q, Kamb A, Cruis N A, Weaver-Feldhaus J, Harshman K, Tavtigian S V, Stockert E, Day III R S, Johnson B E, Skolnick M H. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types *Science*, 1994, **264**: 436~ 440

5 Yates J, Warren N, Reisman D, Sugden B. A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits its stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**: 3806~ 3810

6 Okamoto A, Demetrick D J, Spillare E A, Hagivara K, Hussain S P, Bennett W P, Forrester K, Gerwin B, Serrano M, Beach D H, Harris C C. Mutations and altered expression of p16 in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 11045~ 11049

7 Makamaki T, Kawamata N, Schwaller J, Tobler A, Fey M, Pakkala S, Lee Y Y, Kim B K, Fukuchi K, Tsuruoka N, Kahan J, Miller C W, Koeffler H P. Structural integrity of the cyclin-dependent kinase inhibitor genes, p15, p16, and p18 in myeloid leukaemias *British J Haematol*, 1995, **91**: 139~ 149

8 武辉, 张思仲. 用长 PCR 方法检测含有较大缺失或插入的 DNA 大片段. 遗传(Wu Hui, Zhang Sizhong Long PCR amplification of fragment with large deletion or insertion allele *Hereditas*), 1998, **20**(3): 8~ 10

9 Kremer E J, Perricaudet M. Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer *British Med Bull*, 1995, **51**: 31~ 44

10 Quesnel B, Preudhomme C, Lepelley P, Hetuin D, Vanmbeke M, Bauters F, Velu T, Fenaux P. Transfer of p16/CDKN2 gene in leukaemic cell lines inhibits cell proliferation *British J Haematol*, 1996, **95**: 291~ 298

11 Nobori T, Mura K, Wu D J, Ito A, Takabayashi K, Carson D A. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers *Nature*, 1994, **368**: 753~ 756