

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)22-2054-03

NT4p53(C22)Ant 重组腺伴病毒对人 Miapaca- II 胰腺癌细胞的杀伤作用

周琦 纪宗正 (西安交通大学医学院第二附属医院超声研究室 陕西 西安 710004)

Killing effects of recombinant AAV expressing fusion peptide NT4p53 (C22)Ant on human pancreatic cancer Miapaca- II cells

ZHOU Qi , Ji Zong-Zheng

Research Laboratory of Medical Ultrasound , Second Affiliated Hospital , Medical College , Xi'an Jiaotong University , Xi'an 710004 , China

【Abstract】 AIM : To study the killing effects of recombinant adeno-associated virus(AAV) expressing fusion peptide NT4p53 (C22)Ant on human pancreatic cancer Miapaca-II cells. **METHODS :** NT4p53(C22)Ant was constructed and subcloned into the vector of recombinant AAV , and that was amplified in 293 packaging cells. The recombinant plasmid AAV-NT4p53 (C22)Ant was transferred into Miapaca-II cells. The direct effects on human pancreatic cancer cell line Miapaca-II were detected with light microscope , MTT , flow cytometry and lactate dehydrogenase(LDH) release assay. **RESULTS :** It could be observed under microscope that the AAV-NT4p53(C22)Ant could directly kill the Miapaca-II cells. MTT revealed that the survival rate of the cells was decreased obviously. Flow cytometry showed that the number of apoptotic cells was significantly increased in AAV- NT4p53(C22)Ant group as compared with control group and simple AAV group ($P < 0.05$). LDH level went up a little ($P > 0.05$). **CONCLUSION :** The AAV-NT4p53(C22)Ant could cause the apoptosis of human pancreatic cancer Miapaca-II cells to kill the cells directly.

【Keywords】 NT4p53(C22)Ant ; recombinant adeno-associated virus (rAAV) ; pancreatic neoplasms ; cell line

【摘要】目的 : 研究 NT4p53(C22)Ant 重组腺伴病毒对人 Miapaca-II 胰腺癌细胞杀伤作用。方法 : 构建 NT4p53(C22)Ant 将其亚克隆于腺伴病毒载体中 , 经 293 细胞包装、扩增构成具有感染性的重组腺伴病毒 AAV-NT4p53(C22)Ant 转染人胰腺癌 Miapaca-II 细胞 , 经光镜下观察、MTT 比色试验、PI 染色实验及乳酸脱氢酶释放检测(LDH) , 观察 AAV-NT4p53 (C22)Ant 对细胞的杀伤作用。结果 : 光镜下可见随 AAV-

NT4p53(C22)Ant 感染 Miapaca-II 细胞时间延长 , 肿瘤细胞数目明显减少 ; MTT 实验检测发现细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$) ; 流式细胞检测凋亡细胞数目较对照组及空病毒组增加 ($P < 0.05$) ; LDH 检测培养基中 LDH 只有轻度增加 ($P > 0.05$)。结论 : 重组腺伴病毒 NT4p53(C22)Ant 对胰腺癌细胞有杀伤作用 , 并且是通过引起细胞凋亡而实现的。

【关键词】 NT4p53(C22)Ant 重组腺伴病毒 胰腺肿瘤 细胞系
【中图分类号】 R735 **【文献标识码】** A

0 引言

胰腺癌的发生发展与多种基因异常有关 , 其中 p53 基因最受瞩目 , 这是因为 70% 的胰腺癌患者均有 p53 的突变。研究表明 , 野生型 p53 基因与细胞周期生长调节、细胞转化的调节、DNA 复制以及诱导细胞程序性死亡有密切关系 , 腺病毒介导的天然 p53 可以抑制人胰腺癌肿瘤组织的生长并可诱导发生细胞凋亡。在多种肿瘤细胞中 , p53 蛋白由于突变而失活或由于其他原因而受限 , 恢复其功能是肿瘤研究中的重要目标^[1] , 但是近年来研究者已经阐明直接向肿瘤细胞内转导野生性 p53 的抗癌作用是有限的^[2] , 因此抑制 p53 的降解和挽救突变的 p53 来治疗肿瘤成为了新的研究热点。

1 材料和方法

1.1 材料 pGEM-T Easy 质粒购自 Promega 公司 ; pBV220-NT4 质粒、腺伴病毒载体 pSSHG-CMV 由西安华广生物工程有限公司提供 ; 293 细胞(人胚肾细胞) 美国 ATCC 公司产品 , 西安华广生物公司复苏传代 ; RPMI1640 培养基购自华美生物工程公司 ; Miapaca-II 细胞株由吕毅教授馈赠 ; DMEM 购自美国 Gibco 公司 ; MTT 试剂购自华美生物工程公司 ; PI 试剂购自 Sigma 公司 ; LDH 试剂盒购自宝灵曼公司。

1.2 方法

1.2.1 构建 AAV-NT4p53(C22)Ant ① 采用非对称引物/模板法 , 根据 GenBank 提供的人 p53 361-382 位氨基酸 cDNA 序列及果蝇同源框序列 43-58 位氨基酸的 cDNA , 设计正、负向引物/模板链 , PCR 扩增目的基因片段 , 回收的目的基因片段连接于 pGEM-T-easy 载体 , 质粒转化细菌 , 阳性克隆筛选、酶切鉴定、

收稿日期 2006-06-06 ; 接受日期 2006-07-15

作者简介 : 周琦 , 博士 , 副主任医师。Tel (029) 87679279 Email : zhouqi1998@yahoo.com.cn

序列测定正确后,大量制备酶切回收 p53(C22)Ant 片段;②连接于 pBV220-NT4 质粒,转化细菌,阳性克隆筛选、酶切鉴定、序列测定分析正确后,大量制备重组质粒 pBV220/NT4p53(C22)Ant,回收 NT4p53(C22)Ant 目的 cDNA 片段;③亚克隆于腺伴病毒载体中,经 293 细胞包装、扩增、纯化及滴度测定构成具有感染性的重组腺伴病毒 AAV-NT4p53(C22)Ant。

1.2.2 重组腺伴病毒感染 Miapaca-II 细胞 ①复苏 Miapaca-II(p53 变异)细胞株,挑选 50% 融合的细胞 10 瓶,每瓶细胞数约为 10×10^5 个,100 mL 细胞瓶面积为 30 cm^2 ;②分别以 AAV-NT4p53(C22)Ant(1×10^{10} pfu/次),AAV-空病毒(1×10^{10} pfu/次)感染 Miapaca-II 细胞;③ AAV-NT4p53(C22)Ant 和 AAV-空病毒感染的细胞在 37°C 50 mL/L CO_2 湿化室中孵育 2 h,移去感染液,加入含新鲜血清的 DMEM,然后继续孵育至 96 h,此间每 24 h 换 1 次培养基。

1.2.3 AAV-NT4p53(C22)Ant 对胰腺癌 Miapaca-II 细胞的杀伤作用 ①于转染 24,48,72 h 分别收集转染后 Miapaca-II 细胞及其培养基,光镜下观察 Miapaca-II 细胞的形态变化,连续观察 72 h,记录并拍片;②MTT 比色试验:以每孔 $10^3 \sim 10^4$ 个细胞接种于 96 孔培养板中,每孔体积 $200 \mu\text{L}$,每孔加入 MTT 试剂(5 g/L) $20 \mu\text{L}$, 37°C 继续培养 4 h,终止培养,吸去上清液,再加入 DMSO(二甲基亚砷) $150 \mu\text{L}$,摇匀 15 min,使反应产物充分溶解,在发射波长为 490 nm 的酶标仪进行测定。细胞存活率 $\text{PR} = \text{T}/\text{C} \times 100\%$,其中 T 为处理孔 $A_{490 \text{ nm}}$,C 为对照孔 $A_{490 \text{ nm}}$;③PI 染色,流式细胞仪检测细胞凋亡、坏死情况;④乳酸脱氢酶(LDH)释放的测定,LDH 能催化乳酸生成丙酮酸,丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼反应生成丙酮酸二硝基苯腙,在碱性溶液中呈棕红色,通过比色可求出酶活力,通过对 LDH 测定可观察 AAV-NT4p53(C22)Ant 对细胞的杀伤作用。

统计学处理:实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析采用 SPSS10.0 统计软件进行方差分析和 LSD-t 检验 $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 Miapaca-II 细胞的形态变化 AAV-NT4p53(C22)Ant 感染 Miapaca-II 细胞后 24~72 h,光镜下连续观察到细胞皱缩,细胞间隙增宽,界限模糊,并随时间延长,肿瘤细胞明显减少。不处理或用空病毒感染 Miapaca-II 细胞,发现细胞形态无明显变化(图 1)。

2.2 AAV-NT4p53(C22)Ant 对 Miapaca-II 细胞的杀伤作用 AAV-NT4p53(C22)Ant 感染 Miapaca-II

细胞 24,48,72 h 细胞存活率随作用时间延长逐渐降低,分别为 24.4%,21.5%,14.0%,与 AAV-空病毒组(30.8%,72.7%,95.3%)及未处理对照组(34.3%,77.9%,100%)比较,48 h 及 72 h 均有统计学差异($P < 0.05$)。

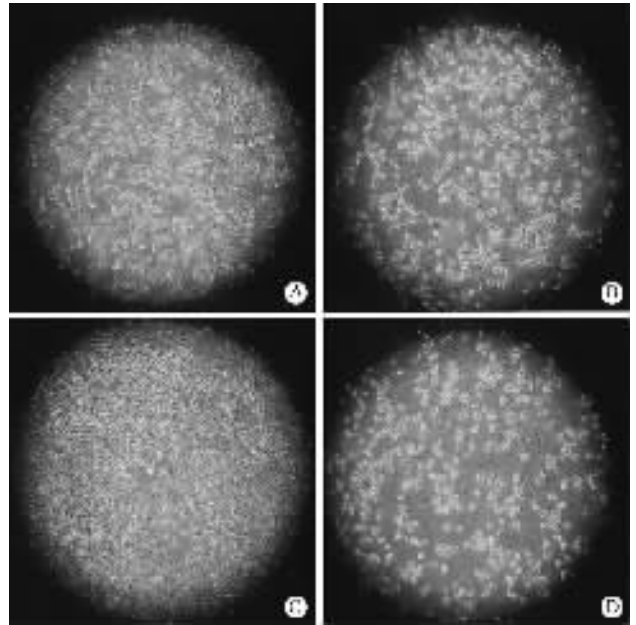


图 1 AAV-NT4p53(C22)Ant 感染 Miapaca-II 细胞的形态变化 $\times 200$

A:未处理 48 h;B:AAV-NT4p53(C22)Ant 治疗 48 h;C:未处理 72 h;D:AAV-NT4p53(C22)Ant 治疗 72 h。

2.3 PI 染色流式细胞仪检测细胞凋亡 PI 染色流式细胞仪检测发现 AAV-NT4p53(C22)Ant 转染 Miapaca-II 细胞 24 h 后,未处理组凋亡细胞占(0.21 ± 0.02)%,空病毒组凋亡细胞占(0.25 ± 0.03)%,治疗组凋亡细胞占(3.93 ± 0.22)%,说明 AAV-NT4p53(C22)Ant 治疗 Miapaca-II 细胞 24 h 后凋亡细胞增多,与未处理对照组及空病毒组比较有统计学差异($P < 0.05$)。

2.4 LDH 释放的测定 随着 AAV-NT4p53(C22)Ant 对 Miapaca-II 转染时间的增加,培养基中 LDH 逐渐增加,但与空病毒组及未处理对照组间无差异($P > 0.05$,表 1)。

表 1 AAV-NT4p53(C22)Ant 转染 Miapaca-II 后 LDH 释放量 ($n=4, \text{nkatal/L}, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | 处理时间(h) | | |
|-----------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| | 24 | 48 | 72 |
| AAV-p53C-Ant 治疗 | 240.04 ± 50.84 | 430.09 ± 154.36 | 523.44 ± 171.70 |
| AAV-空病毒 | 168.01 ± 47.18 | 236.71 ± 81.85 | 236.71 ± 85.85 |
| 未处理 | 102.19 ± 34.34 | 136.69 ± 70.01 | 170.87 ± 85.68 |

3 讨论

随着对 p53 蛋白的结构区的研究,发现 p53 氨基端肽及 p53 羧基端肽在体外对人的肿瘤细胞均有明显抑制作用^[3],但它们的抗肿瘤机制不同。p53 氨基端肽形成的 S 螺旋结构,可直接导致肿瘤细胞坏死^[4]。来自 p53 核心区的结构肽,可以稳定 p53 的结构和恢复变异 p53 诱导肿瘤细胞凋亡的功能。p53 羧基端肽任意的盘绕结构能够穿过细胞膜,捆绑在细胞内的靶目标上,引起细胞凋亡,它是选择性地诱导细胞死亡,对正常细胞或非肿瘤细胞没有毒性,并且对 p53 变异型的肿瘤细胞作用更强,尤其是当 p53 羧基端肽和膜渗透肽嵌合后可以有效增强抗肿瘤作用^[5]。p53 羧基端肽的抗肿瘤作用是 p53 依赖性的,它是通过 FADD/caspase-8 途径特异的诱导肿瘤细胞的凋亡^[6-8]。故通过转导 p53 羧基端肽挽救 p53 的功能是一种新的方法。然而只利用生物短肽治疗肿瘤,由于肽容易被降解需要反复多次注射,在体内的半衰期较短,水溶性、稳定性差,生物利用度低,对在体肿瘤不能达到有效浓度剂量。

细胞穿膜肽可有效将多肽、蛋白质分子及 DNA 片段,通过无受体介导、无耗能的方式,导入多种哺乳动物细胞,并且细胞膜亲和性高,穿膜速度快,且在一定浓度范围内不会造成细胞损伤^[9]。穿膜肽可有效将目的基因片段导入细胞内^[10],有望解决目前运用病毒载体进行基因治疗时,转染效率低的主要问题,具有较高的临床治疗价值,已应用于肿瘤细胞系、动物移植瘤的治疗,为此我们在表达盒中设计了 Ant 穿膜肽^[11]。基因转移载体的设计是基因治疗研究中的一个关键,理想的体内基因转移载体应用有较好的细胞靶向性、目的基因表达的可控性以及转移方法的简单易行,以往在基因治疗的研究中,逆转录病毒、腺病毒等载体应用较多。随着研究的深入,人们发现上述载体由于自身的某些缺陷不能满足研究与治疗的需要。AAV 载体则避免了上述载体的缺陷,是近年来使用的转导效率高的病毒载体,提高了转导效率,并能感染分裂和非分裂细胞,适合肿瘤基因治疗^[12]。为此本课题成功地回收的嵌合 NT4p53(C22)Ant cDNA 片段亚克隆于腺伴随病毒穿梭质粒 pSSHG-CMV 中,构建了重组质粒 pSSHG-CMV-NT4p53(C22)Ant。应用斑点杂交试验检测重组病毒 AAV-NT4p53(C22)Ant 的滴度为 2×10^{10} /mL。为了提高腺伴随病毒载体的转导效率,我们用了神经营养因子(NT4)信号肽,引导肽与目的短肽相连接。

我们发现,AAV-NT4p53(C22)可导致肿瘤形态变异,数目减少,证明了 AAV-NT4p53(C22)Ant 重组腺伴随病毒对胰腺癌细胞系 Miapaca-II 的杀伤作用。PI 流式细胞检测发现治疗组细胞凋亡较对照组增多;LDH 检测结果显示随着 AAV-NT4p53(C22)对 Miapaca-II 转染时间的增加,培养基中 LDH 逐渐增加,但与空病毒组与未处理组间无差异。LDH 测定是检测细胞坏死情况的指标,表明重组病毒对细胞的杀伤作用不是引起细胞坏死,而是细胞的凋亡,这同流式细胞仪检测的结果一致。再次证实了 AAV-NT4p53(C22)Ant 对胰腺癌细胞 Miapaca-II 有杀伤作用,并且是通过引起细胞凋亡而实现的。

【参考文献】

- [1] Bykov VJ, Issaeva N, Shilov A, et al. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound [J]. *Nat Med*, 2002, 8(3): 282-288.
- [2] Winter M, Milne D, Dias S, et al. Protein kinase CK1 delta phosphorylates key sites in the acidic domain of murine double-minute clone 2 protein (MDM2) that regulate p53 turnover [J]. *Biochemistry*, 2004, 43(51): 16356-16364.
- [3] Saleh J, Kreissler-Haag D, Montenarh M. p53 autoantibodies from patients with colorectal cancer recognize common epitopes in the N- or C-terminus of p53 [J]. *Int J Oncol*, 2004, 25(4): 1149-1155.
- [4] Rosal R, Brandt-Rauf P, Pincus MR, et al. The role of alpha-helical structure in p53 peptides as a determinant for their mechanism of cell death: necrosis versus apoptosis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(4): 653-660.
- [5] Li Y, Rosal RV, Brandt-Rauf PW, et al. Correlation between hydrophobic properties and efficiency of carrier-mediated membrane transduction and apoptosis of a p53 C-terminal peptide [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 298(3): 439-449.
- [6] Falke D, Fisher MH, Juliano RL. Selective transcription of p53 target genes by zinc finger-p53 DNA binding domain chimeras [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1681(1): 15-27.
- [7] Teruya K, Murphy AC, Burlin T, et al. Fmoc-based chemical synthesis and selective binding to supercoiled DNA of the p53 C-terminal segment and its phosphorylated and acetylated derivatives [J]. *J Pept Sci*, 2004, 10(8): 479-493.
- [8] Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, et al. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse [J]. *Science*, 1999, 285(3): 1569-1572.
- [9] Lindgren ME, Hallbrink MM, Elmquist AM, et al. Passage of cell-penetrating peptides across a human epithelial cell layer in vitro [J]. *Biochem J*, 2004, 377(1): 69-76.
- [10] Gratton JP, Yu J, Griffith JW, et al. Cell-permeable peptides improve cellular uptake and therapeutic gene delivery of replication-deficient viruses in cells and in vivo [J]. *Nat Med*, 2003, 9(3): 357-362.
- [11] Yomoki S, Shiroh F, Miki N, et al. Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides [J]. *J Biochem*, 2002, 277(4): 2437-2443.
- [12] Gao G. Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(10): 6081-6086.