

VP₃ 对鼻咽癌细胞 CNE-2 细胞株的体外杀伤效应

徐 婧¹, 邱元正^{1,*}, 唐瑶云¹, 田勇泉¹, 肖献忠², 赵素萍¹

(中南大学 1. 湘雅医院耳鼻咽喉科, 长沙 410078 ; 2. 湘雅医学院病理生理学教研室, 长沙 410078)

[摘要] 目的 : 体外实验观察 VP₃ 对鼻咽癌 CNE-2 细胞株的杀伤效应。方法 : 构建质粒表达载体 pcDNA3.1(-)CMV. VP₃-His, *Kpn* I/*EcoR* I 酶切鉴定, 测序分析 VP₃ 基因序列。脂质体法将 pcDNA3.1(-)CMV. VP₃-His 和 pcDNA3.1(-)-His 分别瞬时转染鼻咽癌细胞 CNE-2 细胞株, Western 印迹鉴定 VP₃ 基因的表达。四甲基偶氮唑盐(methylthiazolotetrazolium, MTT)法检测 VP₃ 对鼻咽癌细胞株 CNE-2 的杀伤效应。结果 : 酶切和测序分析证实重组质粒中包含完整的 VP₃ 基因的编码序列, Western 印迹在转染细胞总蛋白中检测到该基因表达的 16.03 kD 的蛋白。表达 VP₃ 基因的 CNE-2 细胞生长受到抑制, 而不表达 VP₃ 基因的 CNE-2 细胞生长未受到抑制。结论 : VP₃ 可杀伤鼻咽癌细胞 CNE-2 细胞株。

[关键词] VP₃; 杀伤; 鼻咽癌

[中图分类号] R739.6 [文献标识码] A [文章编号] 1672-7347(2006)05-0706-04

Killing effect of VP₃ on human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2 cells

XU Jing¹, QIU Yuan-zheng^{1,*}, TANG Yao-yun¹,

TIAN Yong-quan¹, XIAO Xian-zhong², ZHAO Su-ping¹

(1. Department of Otolaryngology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008 ;

2. Department of Pathophysiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract : Objective To investigate the killing effects of VP₃ on nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2. **Methods** Plasmid expression vector pcDNA3.1(-)CMV. VP₃-His was constructed and identified by *Kpn* I/*EcoR* I endonuclease analysis, and then sequenced to verify successful insertion in the sense direction of VP₃ gene. pcDNA3.1(-)CMV. VP₃-His and pcDNA3.1(-)-His expression plasmid was transiently transfected into nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2. VP₃ protein expression was detected by Western blotting. MTT assay was used to determine the killing effects of VP₃ gene on nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2. **Results** Endonuclease analysis and sequencing confirmed the recombinant plasmid contained the complete VP₃ CDS sequence. Western blotting detected a 14.03 kD protein expression from the transfected cells, which was the expecting band of VP₃ gene. The growth of CNE-2 cells that expressed VP₃ gene was inhibited, while the growth of CNE-2 cells that did not express VP₃ gene was not inhibited. **Conclusion** VP₃ gene can kill nasopharyngeal carcinoma cell CNE-2.

Key words : VP₃; killing; nasopharyngeal carcinoma

[J Cent South Univ (Med Sci), 2006, 31(5) : 0706-04]

VP₃基因来源于鸡贫血病毒、由 363 个碱基组成、编码分子量为 16.03 kD 的小分子蛋白质^[12]。既往研究表明,VP₃基因编码物对多种肿瘤细胞有杀伤效应^[13],但是否能杀伤鼻咽癌细胞迄今尚未见报道。因此,本研究拟构建质粒表达载体 pcDNA3.1(-)CMV.VP₃-His,并进一步观察 VP₃在体外对鼻咽癌细胞的杀伤作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒,菌种和细胞株 带 His 标签的 pcDNA3.1(-)-His 由本校病理生理学教研室提供,含 VP₃基因的重组质粒 pcDNA3.1(-)CMV.VP₃-His 自行构建,病毒 TK5803 基因组由本院保存,人鼻咽癌细胞株 CNE-2 细胞由本科实验室保存。

1.1.2 主要试剂 小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,RPMI-DMEM 购自美国 GIBCOBRL 公司,余培养试剂均购自 Sigma 公司,各种限制性内切酶购自 Takara 公司,T₄DNA 聚合酶及 T4 连接酶(美国 Biolabs 公司),Lipofectamine2000 购自 Inventrogen 公司,余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 CNE-2 培养在含 20% 小牛血清 RPMI-DMEM 培养基中,37℃、5% CO₂ 开放式培养。

1.2.2 表达载体的构建及鉴定 采用 PCR 方法从病毒 TK5803 基因组中克隆出 VP₃基因,根据 VP₃基因序列,设计一对引物,两边分别添加 *Kpn*I、*Eco*R I 酶切位点,去掉其终止密码子,使蛋白翻译至 pcDNA3.1(-)-His 上自带标签 His。上游引物:5'-GGTACCCAAATGAACGCTCTCCAAGAAG-3';下游引物:5'-GAATTCCTTGCCATCTTACAGTCT-3'。PCR 循环参数为 95℃总变性 5 min 后,94℃变性 30 s,56℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,72℃总延伸 10 min,共循环 30 次。采用酶切及连接等方法构建 pcDNA3.1(-)CMV.VP₃-His 质粒表达载体,通过酶切及测序鉴定 pcDNA3.1(-)CMV.VP₃-His 是否构建成功(图 1)。

1.2.3 VP₃基因瞬时表达细胞株的建立及鉴定

将质粒 pcDNA3.1(-)CMV.VP₃-His 和空白质粒 pcDNA3.1(-)-His 各 20 μg 分别用脂质体法瞬时转染 CNE-2 细胞,转染过程按照说明书进行。

采用 Western 印迹鉴定 VP₃基因在 CNE-2 细胞中的表达。实验步骤主要包括:收集长满 6 孔培养板的瞬时转染质粒 pcDNA3.1(-)CMV.VP₃-His 和空白质粒 pcDNA3.1(-)-His 的 CNE-2 细胞,抽提细胞总蛋白,进行蛋白质电泳、转膜和封闭,靶蛋白与第一抗体反应,靶蛋白与第二抗体反应,曝光。

1.2.4 MTT 法检测 VP₃对 CNE-2 细胞的杀伤效应 消化处于生长对数期的 CNE-2 细胞,制成 10⁴/mL 的细胞悬液。于 96 孔板培养至细胞贴壁后,用脂质体法将重组载体 pcDNA3.1(-).CMV.VP₃-His 及 pcDNA3.1(-)各 20 μg 体外转染 CNE-2 细胞,具体转染过程按说明书进行。分别于转染后 24,48,72 和 96 h 加入 MTT 溶液 20 μL,于 37℃、5% CO₂培养箱中继续培养 4 h 后,小心吸去培养上清液,每孔加入 150 μL 二甲亚砷,震荡 10 min 后,于酶联免疫检测仪上测各孔 A 值,按公式:杀伤率(%)=[(空白对照孔 A 值-实验孔 A 值)/对照孔 A 值]×100% 计算相对杀伤率(及特异性促凋亡率),其中空白对照孔只含有培养基。

1.3 统计学处理 以上各组实验重复 3 次,采用计算机 SPSS 12.0 统计分析软件包进行数据处理,采用双样本方差齐性 *t* 检验进行分析。

2 结果

2.1 PCR 从 TK5803 基因组中扩增 VP₃基因

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,呈现一条清晰的特异性带,该条带所在位置与预计产物 VP₃大小(372 bp)相符,而阴性对照组中无 PCR 产物(图 2)。

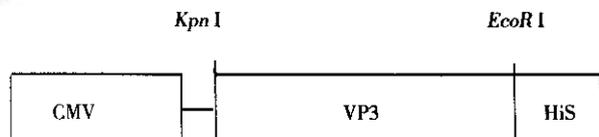


图 1 pcDNA3.1(-)CMV.VP₃-His 质粒表达载体的结构

Fig. 1 The construction of pcDNA3.1(-)CMV.VP₃-His plasmid expression vector

2.2 酶切及测序鉴定重组质粒载体 pcDNA3.1(-)CMV.VP₃-His 酶切产物经凝胶电泳分析后获得大小为 5 464 bp/366 bp 两个片段,证实目的基因已插入载体骨架,然后送测序,测序结果表明重组载体中含有 VP₃基因的完整编码序列(图 3 4)。

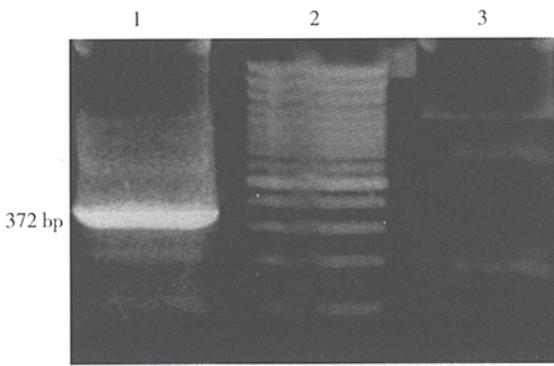


图2 VP_3 基因 PCR 产物凝胶电泳 1:PCR 产物 2:Marker 3:阴性对照

Fig.2 Gel electrophoresis VP_3 gene PCR products 1:PCR products ; 2: Marker ; 3: Negative control

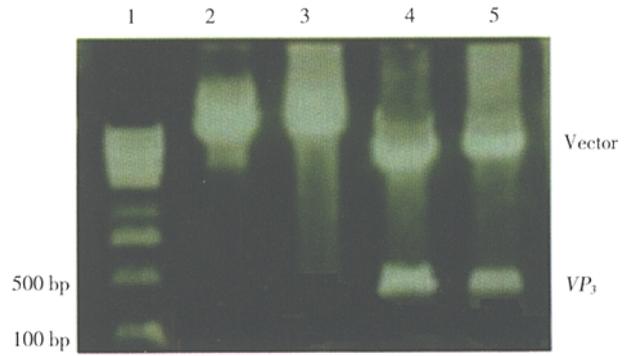


图3 重组质粒 pcDNA3.1(-)CMV. VP_3 -His 的酶切鉴定 1:分子量标准 2 3:阴性重组质粒 4 5:阳性重组质粒

Fig.3 Restriction endonuclease analysis of plasmid pcDNA3.1(-)CMV. VP_3 -His reconstruction 1:DNA marker ; 2 3: Negative plasmid ; 4 5: Positive plasmid

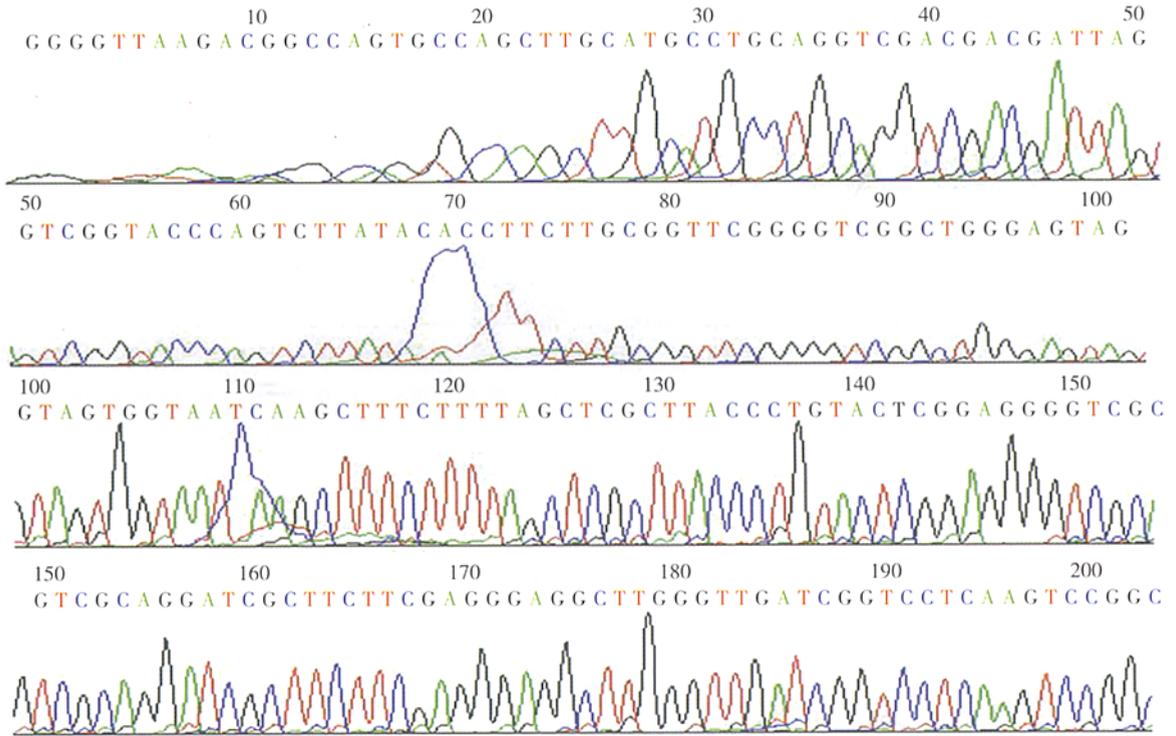


图4 VP_3 基因的测序结果

Fig.4 Sequencing of VP_3 gene

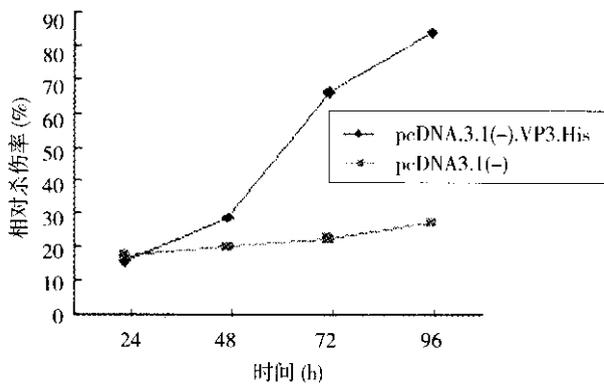
2.3 Western 印迹鉴定 VP_3 基因在 CNE-2 细胞中的表达 在转染 VP_3 基因的 CNE-2 细胞中检测到大小为 16.3 kD 的蛋白的表达,而转染空载体的 CNE-2 细胞则未检测到此蛋白的表达,表明实验组细胞在翻译水平上表达 VP_3 基因(图 5)。

2.4 VP_3 基因对 CNE-2 细胞的杀伤作用 从 24 h 到 96 h 之间,转染 pcDNA3.1(-).CMV. VP_3 -His 重组载体的鼻咽癌细胞 CNE-2 细胞的凋亡率明显升高,而转染 pcDNA3.1(-)-His 空载体的凋亡率则无明显上升趋势,提示 VP_3 对 CNE-2 细胞有杀伤作用(图 6,表 1)。



图5 Western 印迹检测 VP_3 蛋白的表达 1:转染 pcDNA3.1(-)CMV. VP_3 -His 组 2.转染 pcDNA3.1(-)-His 组

Fig.5 Western blotting detection of VP_3 protein expression 1:pcDNA3.1(-)CMV. VP_3 -His ; 2:pcDNA3.1(-)-His

图6 MTT法检测VP₃对CNE-2细胞的相对杀伤率Fig.6 MTT assay analysis of killing effect of VP₃ on CNE-2 cells表1 以96 h为时间点,VP₃基因对CNE-2细胞的相对杀伤效应(n=3,%)

细胞种类	相对杀伤率(%)		t值	P
	pcDNA3.1(-)	pcDNA3.1(-)		
	CMV.VP3-His	-His		
CNE-2	84.25 ± 1.74	27.22 ± 0.51	6.829	0.02 < P < 0.05

3 讨 论

鼻咽癌是严重威胁中国南方人民生命健康的恶性肿瘤,且发病率呈逐年上升趋势,目前的主要治疗手段为传统的放射治疗,但相当部分患者对放射治疗不敏感,且有部分患者治疗后复发,加大放射剂量,虽可提升治疗效果,但会产生严重的放射副作用,因此探索一种新途径,在消灭鼻咽癌实体瘤时又不损害人正常组织具有重要意义。基因治疗正日益成为除手术、放疗、化疗之外的治疗恶性肿瘤的第4种手段,有着广阔的研究前景。

1997年Noteborn等发现从鸡贫血病毒分离出来的VP₃基因可编码杀伤多种肿瘤细胞小分子蛋白质apoptin。将VP₃基因及空白对照载体分别转入3种人的正常细胞株以及4种白血病恶性肿瘤细胞株中,发现VP₃基因可特异性杀伤恶性肿瘤细胞,但对正常细胞无毒性^[3-7]。VP₃是否可杀伤

鼻咽癌细胞,成为鼻咽癌治疗的新方向?在本研究中,将VP₃基因装控在CMV启动子下游,VP₃基因由CMV启动子调控表达,将pcDNA3.1(-)-CMV.VP₃-His以及空白对照载体pcDNA3.1(-)-His分别转染鼻咽癌CNE-2细胞株。Western印迹显示转染含VP₃基因载体的CNE-2细胞株有VP₃蛋白的表达,而空白对照载体组无VP₃的表达。进一步采用MTT法测定细胞的活性以反映活细胞的数量,在本研究中用来评价各组细胞的杀伤率。结果显示,转染VP₃基因的实验组细胞杀伤率明显高于转染空载体组。这表明VP₃对鼻咽癌细胞有明显的杀伤效应。

参考文献:

- [1] Poon I K, Oro C, Dias M M, et al. A tumor cell-specific nuclear targeting signal within chicken anemia virus VP3/apoptin[J]. J Virol, 2005, 79(2):1339-1341.
- [2] Pietersen A, Noteborn H M. Apoptin[J]. Adv Exp Med Biol, 2000, 465:153-161.
- [3] Noteborn M H. Apoptin-induced apoptosis[J]. Apoptosis, 1999, 4(5):317-319.
- [4] Noteborn M H. Chicken anemia virus induced apoptosis: underlying molecular mechanisms[J]. Vet Microbiol, 2004, 98(2):89-94.
- [5] Leliveld S R, Dame R T, Mommaas M A, et al. Apoptin protein multimers form distinct higher-order nucleoprotein complexes with DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(16):4805-4813.
- [6] Pietersen A M, Rutjes S A, van Tongeren J, et al. The tumor-selective viral protein apoptin effectively kills human biliary tract cancer cells[J]. J Mol Med, 2004, 82(1):56-63.
- [7] Pietersen A M, van der Eb M M, Rademaker H J, et al. Specific tumor-cell killing with adenovirus vectors containing the apoptin gene[J]. Gene Ther, 1999, 6(5):882-892.

(本文编辑 郭 征)