

[文章编号] 1000-1182(2007)02-0202-04

AdTERT-TRAIL对腺样囊性癌细胞株 SACC-83靶向转基因作用的研究

苏涛¹, 孙宏晨², 郑长玉³, 张红¹, 卢东民¹

(1.湖州师范学院医学院 口腔系, 浙江 湖州 313000;

2.吉林大学口腔医院 病理科, 吉林 长春 130041; 3.美国国立卫生研究院 牙颌面研究中心, 美国 贝塞斯达)

[摘要] 目的 探讨人端粒酶逆转录酶(hTERT)启动子调控TRAIL基因在端粒酶阳性的涎腺肿瘤细胞SACC-83中靶向表达的作用。方法 通过同源重组构建腺病毒载体AdTERT-TRAIL, 并转染SACC-83细胞和端粒酶阴性的HEL细胞, 通过RT-PCR检测TRAIL基因表达, MTT法检测TRAIL基因表达对细胞增殖的影响, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果 转染AdTERT-TRAIL后, TRAIL基因在SACC-83细胞中明显表达, 对该肿瘤细胞的增殖有明显的抑制作用, 而且诱导细胞凋亡比率增加; 而在HEL细胞中未能诱导TRAIL基因表达, 对该细胞的增殖没有影响, 也没有诱导明显的细胞凋亡。结论 成功构建腺病毒载体AdTERT-TRAIL, 对涎腺肿瘤细胞具有靶向转基因作用。

[关键词] 人端粒酶逆转录酶启动子; 腺病毒; 涎腺肿瘤

[中图分类号] R739.87 **[文献标识码]** A

Targeting Transgene Effect of AdTERT-TRAIL on Salivary Adenoid Cystic Carcinoma Cell Line SACC-83
SU Tao¹, SUN Hong-chen², ZHENG Chang-yu³, ZHANG Hong¹, LU Dong-min¹. (1. Dept. of Stomatology, Huzhou Normal University Medical School, Huzhou 313000, China; 2. Dept. of Oral Pathology, Stomatological School of Jilin University, Changchun 130041, China; 3. National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda USA)

[Abstract] Objective To investigate the targeting expression of TRAIL gene driven by human telomerase reverse transcriptase(hTERT) promoter in SACC-83 cell with telomerase activity. Methods Adenovirus vector AdTERT-TRAIL was constructed by homologous recombination. After transfecting AdTERT-TRAIL into SACC-83 cell and HEL cell, its effect on these cells in vitro was investigated using RT-PCR technique, MTT method and flow cytometry. Results After transfection of AdTERT-TRAIL, expression of extrinsic TRAIL gene driven was detected in SACC-83, the proliferation of SACC-83 cell showed significant inhibitory effect(the relative cell viability was 49.70%) and its apoptotic rate was promoted(30.49%), whereas no TRAIL gene was detected in HEL cell, also no inhibitory effect was observed in HEL cell and its apoptotic rate showed little change. Conclusion Adenovirus vector AdTERT-TRAIL was successfully constructed, which can be used to induce expression of TRAIL gene in SACC-83 cell with targeting effect.

[Key words] human telomerase reverse transcriptase promoter; adenovirus; salivary tumor

已有研究^[1]表明,人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)启动子在端粒酶阳性细胞中的转录活性明显高于在端粒酶阴性细胞中的活性,而且具有一定的靶向性。因此,本实验构建含有hTERT启动子的腺病毒载体来介导

TRAIL基因表达,观察其在体外对端粒酶阳性的涎腺肿瘤细胞靶向转基因作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

293细胞(Clontech公司,美国),SACC-83细胞及HEL细胞由吉林大学口腔生物医学工程实验室保存。穿梭质粒pACCMV-TRAIL、pACTERT-TRAIL以及腺病毒质粒pJM17由美国NIH郑长玉惠赠,并已经纯化;腺病毒AdCMV-EGFP、AdTERT-EGFP由

[收稿日期] 2006-02-08; [修回日期] 2006-05-30

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30672338);高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20030183068)

[作者简介] 苏涛(1970-),男,浙江人,副主任医师,博士

[通讯作者] 孙宏晨, Tel: 0431-8796010

郑长玉构建,均为复制缺陷型腺病毒,-70℃冻存。FACScan流式细胞仪(Becton-Dickinson公司,美国),MTT(Gibco公司,美国)。

1.2 重组腺病毒的构建、纯化和滴度测定

分别将pACCMV-TRAIL和pACTERT-TRAIL与pJM17采用磷酸钙沉淀法共转染293细胞,约7~10 d左右,可以看到噬斑,挑取噬斑,得到重组腺病毒(AdCMV-TRAIL和AdTERT-TRAIL)。 $-70^{\circ}\text{C}/+37^{\circ}\text{C}$ 反复冻融3次裂解细胞,离心后收集含病毒的上清,部分上清用于抽提重组腺病毒基因组DNA,进行PCR反应,对腺病毒进行鉴定。设计2对引物,分别针对腺病毒区(5'-TAGTGTGGCGGAAGTGTGATGTTGC-3',5'-TCGACCATAGGGGATCGGGAGATC-3')和TRAIL区(5'-CATCGATGGGATGACCTCTGAGGAAACC-3',5'-CTAGTCTAGACTAGTTAGCCAAC-TAAAA-3'),预计扩增片段长度为312 bp和594 bp。其余上清重新感染293细胞,扩增3轮大量繁殖后用CsCl密度梯度离心法纯化,透析除菌后,分装, -70°C 保存。用分光光度仪在 $A_{260\text{nm}}$ 处测定腺病毒的吸光度值,病毒滴度= $A_{260\text{nm}}\times 10^{12}$ viral particles/mL。

1.3 腺病毒转染滴度(multiplicity of infection, MOI)的确定

选取生长良好的SACC-83细胞,用0.25%胰酶消化,接种至12孔板中,接种的密度为 5×10^4 个/孔。AdCMV-EGFP和AdTERT-EGFP分别按照MOI值为10、100、1000、2000、5000和10000 particles/cell进行转染,每种病毒各转染6个孔,每孔为1个MOI值,另有1个孔不转染病毒作为对照。计算机分析各MOI值的转染效率,以转染率达到80%以上的MOI值作为转染时腺病毒的转染滴度,即所使用的腺病毒用量。

1.4 MTT法分析细胞活力

每种细胞设4组,分别为转染AdCMV-TRAIL、AdTERT-TRAIL、AdCMV-EGFP组和未转染腺病毒的空白对照组。取生长良好的SACC-83细胞和HEL细胞,接种至96孔细胞培养板中,每孔细胞数 5×10^3 个,每组设3个孔,按照确定好的MOI值加入腺病毒进行转染,于不同时间点(第1、3、5、7天)加入MTT^[2],用Bio-Rad 550酶标仪,选择570 nm波长测定各孔吸光度(A)值。细胞存活率=(转染基因组平均A值/同一时期对照组平均A值) $\times 100\%$ 。

1.5 流式细胞仪测定细胞凋亡

细胞分组同1.4,于6孔板内接种细胞,密度为 1×10^6 个/孔,然后加入腺病毒转染,共作用3 d,期间每天观察细胞形态变化,于第3天收集细胞,固定在70%的冷乙醇中过夜。上机检测前离心,PBS

洗涤3次以除去固定液,再经过0.1%的Triton X-100和5 mg/L RNase A处理后,用50 mg/L的碘化丙啶染色60 min(4℃)上机分析,测定细胞凋亡百分比。

1.6 RT-PCR TRAIL mRNA表达检测

取生长良好的SACC-83细胞和HEL细胞,接种至6孔细胞培养板中,每孔细胞数为 5×10^4 个,每种细胞分为3组,即未转染腺病毒组,转染AdCMV-TRAIL和AdTERT-TRAIL组。72 h后,收集各组细胞,提取细胞总RNA,反转录合成cDNA,用设计好的TRAIL引物进行扩增,以 β -actin为对照。

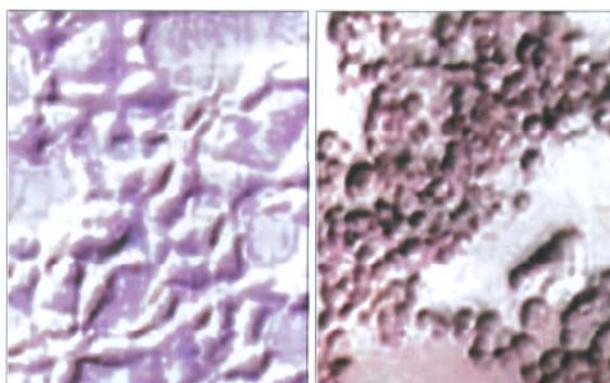
1.7 统计学分析

使用SPSS 11.0统计软件采用 χ^2 检验进行各组间差异分析, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 重组腺病毒的产生

含TRAIL基因的穿梭质粒与pJM17经过磷酸钙共沉淀法转染293细胞后,7~10 d左右,293细胞开始出现细胞病变,表现为细胞肿胀、变圆、折光性增强,随后出现串珠样改变直至葡萄簇样改变(图1),噬斑出现。将噬斑提取物以腺病毒DNA区及TRAIL区双引物进行PCR扩增,获得两条分别为312 bp及594 bp的特异性片段(图2)。获得的重组腺病毒再感染293细胞后,48 h出现明显的细胞病变。用分光光度仪测得纯化后MOI分别为:AdCMV-TRAIL 7.8×10^{12} viral particles/mL,AdTERT-TRAIL 1.4×10^{12} viral particles/mL。



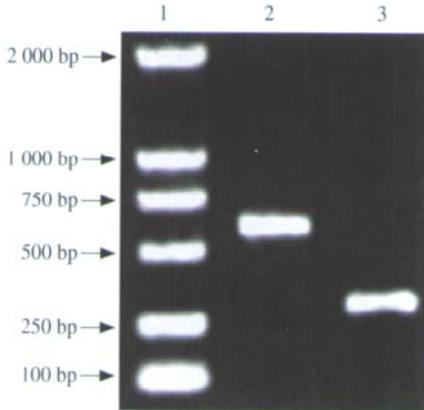
左:正常293细胞;右:293细胞的病变反应
图1 正常293细胞与细胞的病变反应 倒置相差显微镜
 $\times 200$

Fig 1 Normal 293 cells and the cytopathic effect of 293 cells
inverted phase-contrast microscopy $\times 200$

2.2 MOI值的确定

腺病毒转染4~5 h后,荧光显微镜下可看见EGFP表达后发出绿色荧光的细胞,在转染72 h后荧光强度达到最大(图3),此后逐渐减弱,至1周时仍可见表达绿色荧光的细胞,未转染腺病毒组细胞未见荧

光表达。每孔取3个不同视野分别在普通光和紫外光下拍照，经分析，MOI值为2 000 particles/cell时转染效率最高，达到了85%，故在后续实验中使用此MOI值作为转染时腺病毒的滴度。



1: 2000 Marker; 2: hTERT引物; 3: 腺病毒引物

图2 重组腺病毒双引物PCR鉴定

Fig 2 PCR products of the recombinant adenovirus by its double primers

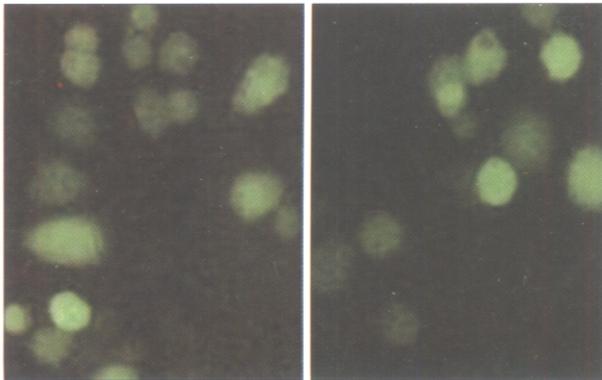


图3 AdCMV-EGFP(左)和AdTERT-EGFP(右)转染72h的SACC-83细胞 荧光显微镜 ×40

Fig 3 SACC-83 cell of 72 h after AdCMV-EGFP(left) and AdTERT-EGFP(right) gene transfer fluorescence microscopy ×40

2.3 腺病毒介导TRAIL基因转染对细胞增殖的影响

SACC-83细胞和HEL细胞转染AdCMV-EGFP后，细胞存活率与未转染组差别不大，说明本实验中所使用的腺病毒对细胞没有明显毒性。转染AdCMV-TRAIL后，对肿瘤细胞和正常细胞均产生了较明显的细胞杀伤效应，HEL细胞存活率降低明显(55.70%)，与SACC-83细胞的存活率(50.20%)相当，与AdCMV-EGFP组相比差异显著($P<0.05$)。而转染AdTERT-TRAIL后，端粒酶阳性的SACC-83细胞的增殖受到明显抑制，7 d时细胞存活率最低(49.70%)，与AdCMV-EGFP组差异显著($P<0.05$)；端粒酶阴性的HEL细胞存活率下降不明显(84.30%)，与AdCMV-TRAIL组差异显著($P<0.05$)(表1)。

表1 转染7 d后MTT法检测细胞相对活性(%)

Tab 1 Relative cell viability after 7 d transfection determined by MTT (%)

分组	SACC-83细胞	HEL细胞
空白对照	100.00	100.00
AdCMV-EGFP	92.40	90.70
AdCMV-TRAIL	50.20	55.70
AdTERT-TRAIL	49.70	84.30

2.4 流式细胞仪细胞凋亡检测结果

第3天收集细胞，SACC-83细胞用AdCMV-TRAIL和AdTERT-TRAIL转染后，诱导细胞凋亡的比率相似(32.98%和30.49%)，两者差异无统计学意义($P>0.05$)，但都明显高于AdCMV-EGFP阴性对照组(2.49%)和未转染的空白对照组(2.91%)，差异具有统计学意义($P<0.05$)；在HEL细胞中，用AdCMV-TRAIL转染可引起明显的细胞凋亡(34.98%)，与AdTERT-TRAIL组(3.37%)、AdCMV-EGFP组(2.59%)和空白对照组(2.87%)之间的差异均有统计学意义($P<0.05$)。

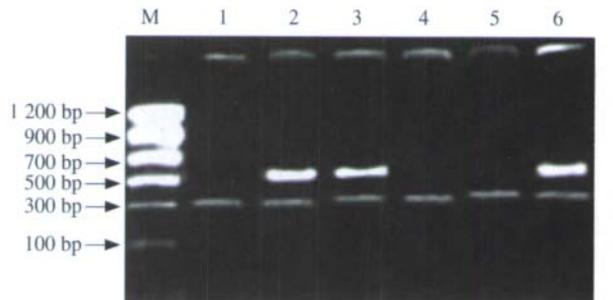
表2 转染72 h后流式细胞仪分析细胞凋亡率(%)

Tab 2 The percentage of apoptotic cells after 72 h transfection determined by flow cytometry (%)

分组	SACC-83细胞	HEL细胞
空白对照	2.91	2.87
AdCMV-EGFP	2.49	2.59
AdCMV-TRAIL	32.98	34.98
AdTERT-TRAIL	30.49	3.37

2.5 RT-PCR TRAIL mRNA检测结果

各组细胞TRAIL mRNA表达情况见图4。



M: PCR Marker; 1: SACC-83; 2: SACC-83+AdTERT-TRAIL; 3: SACC-83+AdCMV-TRAIL; 4: HEL; 5: HEL+AdTERT-TRAIL; 6: HEL+AdCMV-TRAIL

图4 外源基因TRAIL在SACC-83细胞和HEL细胞中的表达

Fig 4 TRAIL mRNA in SACC-83 and HEL cells

从图4可以看出，SACC-83转染AdTERT-TRAIL和AdCMV-TRAIL后，均扩增出约600 bp的目的片

段,在未转染的肿瘤细胞中则未扩增出目的片段;而转染AdTERT-TRAIL的正常细胞和未转染的正常细胞中均未扩增出目的片段,转染AdCMV-TRAIL的正常细胞则扩增出了600 bp左右的目的片段。

3 讨论

Delporte等^[3]证实,复制缺陷型腺病毒载体是对涎腺细胞进行转基因时效率最高的载体,在大鼠颌下腺中能使高达35%的腺上皮细胞被转染。为此,本课题组构建了复制缺陷型腺病毒。

利用由人巨细胞病毒启动子和hTERT启动子控制的含TRAIL基因的穿梭质粒pACCMV-TRAIL和pACTERT-TRAIL,应用同源重组法制备重组腺病毒,pAC穿梭质粒含有腺病毒基因组的1-453和3334-6231核苷酸序列^[4],与pJM17(E1区缺陷)用磷酸钙法共转染293细胞(含腺病毒E1区)后,两者的同源部分发生重组,启动子和外源基因及polyA序列等插入腺病毒的453-3334核苷酸之间,以取代E1缺失区,并在293细胞提供的E1蛋白作用下,包装产生具有感染性但无复制能力的E1缺陷型重组腺病毒。本实验结果发现,AdCMV-EGFP和AdTERT-EGFP的滴度(MOI)在2 000 particles/cell时可以获得比较高的转染效率,达到了85%。在此基础上,本课题组又使用AdCMV-EGFP、AdCMV-TRAIL和AdTERT-TRAIL分别同时转染SACC-83细胞和HEL细胞,AdCMV-EGFP转染SACC-83细胞和HEL细胞后,两者的相对细胞活力和细胞凋亡率与空白对照组相比无明显差别,说明本实验中所使用的腺病毒对细胞没有明显毒性,从而排除了腺病毒对实验结果的影响,使得实验组的结果与空白对照组具有可比性。

本研究观察到AdTERT-TRAIL转染SACC-83细胞后,检测到外源TRAIL明显表达,肿瘤细胞的生长受到明显的抑制(存活率为49.70%),同时其细胞凋亡率明显增加(30.49%)。而AdTERT-TRAIL转染后在端粒酶阴性的HEL细胞中检测不到外源TRAIL的表达,并且对其生长没有明显的抑制作用(存活率为84.30%),细胞凋亡率也仅为3.37%。但是作为阳性对照的AdCMV-TRAIL转染后,在SACC-83细胞和HEL细胞中均可检测到外源TRAIL表达,细胞生长均有不同程度的抑制(存活率分别为50.20%和55.70%),且细胞凋亡率也分别达到了32.98%和34.98%,显微镜下观察到AdCMV-TRAIL和AdTERT-TRAIL转染SACC-83细胞后,出现细胞凋亡的形态学改变,细胞皱缩、变圆,突起减少,呈浮起状,HEL细胞用AdCMV-TRAIL转染后出现类似凋亡的形态改变,而用AdTERT-TRAIL转染后细胞没出现明

显的形态学改变。这些结果表明hTERT启动子可以调控外源TRAIL基因仅在端粒酶阳性涎腺肿瘤细胞中特异表达,从而诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞的增殖,并能减少TRAIL对正常细胞的毒性,达到对涎腺肿瘤靶向基因治疗的目的。这与Gu等^[5]、Koga等^[6]利用hTERT启动子驱动Bax基因或Caspase-8基因诱发肺癌、肠癌、宫颈癌、前列腺癌、恶性胶质瘤、恶性黑色素瘤、乳腺癌、膀胱癌等肿瘤细胞出现明显的凋亡,而对正常细胞系没有明显影响的结果相一致,但是利用hTERT启动子驱动TRAIL基因进行涎腺肿瘤治疗的研究尚未见报道。

有证据表明^[5],hTERT在静止期或G₀期干细胞中可能不发挥作用,在对骨髓细胞中端粒酶活性进行的一项研究表明,原始干细胞及其成熟的分化细胞具有较低的端粒酶活性,而其前体细胞则有较高的端粒酶活性,提示hTERT启动子如果对干细胞有毒性作用也是短暂的,而且,干细胞对腺病毒的感染具有耐受性,即使使用高浓度的腺病毒载体,并延长细胞-载体的作用时间,也只有少量的干细胞被感染。因此,如果把hTERT启动子和转染干细胞效率低的腺病毒载体一起使用,由hTERT启动子介导的促凋亡基因在干细胞中表达产生的毒性将是很小的。

[参考文献]

- [1] Komata T, Kondo Y, Kanzawa T, et al. Treatment of malignant glioma cells with the transfer of constitutively active caspase-6 using the human telomerase catalytic subunit gene promoter[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(15): 5796-5802.
- [2] 高振南,李声伟,高家让,等.人肿瘤坏死因子- β 基因转染对舌癌细胞的抑制作用[J]. *华西口腔医学杂志*, 2002, 20(1): 52-54.
(GAO Zhen-nan, LI Sheng-wei, GAO Jia-rang, et al. Suppression effect of human tumor necrosis factor- β gene transfection on tongue carcinoma cells[J]. *West China J Stomatol*, 2002, 20(1): 52-54.)
- [3] Delporte C, O'Connell BC, He X, et al. Increased fluid secretion after adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA to irradiated rat salivary glands[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(7): 3268-3273.
- [4] Baum BJ, Wellner RB, Zheng C. Gene transfer to salivary glands[J]. *Int Rev Cytol*, 2002, 213: 93-146.
- [5] Gu J, Kagawa S, Takakura M, et al. Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancer[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(19): 5359-5364.
- [6] Koga S, Hirohata S, Kondo Y, et al. A novel telomerase-specific gene therapy: Gene transfer of caspase-8 utilizing the human telomerase catalytic subunit gene promoter[J]. *Hum Gene Ther*, 2000, 11(10): 1397-1406.