

含人纤溶酶原 K5 基因的腺病毒载体制备和功能研究

杨 健 王跃祥 官孝群 马春姑 王龙生 宋后燕*

(复旦大学教育部分子医学重点实验室,上海 200032)

摘 要 应用 PCR 将人纤溶酶原信号肽序列引入 K5 cDNA 基因,与真核表达载体 pcDNA3 重组,形成重组质粒 pcDNA3K5,与穿梭质粒 pShuttle 重组得 pShuttleK5,经与腺病毒 DNA 重组,PCR 鉴定正确,即为 pAd-K5。脂质体法将其转染 293 细胞后,制备细胞裂解液,噬斑分析法测定病毒滴度为 5×10^8 pfu/mL。将病毒以不同的感染系数(MOI)感染人脐静脉内皮细胞株 ECV304 和人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231,MTT 法检测两者的增殖情况:ECV304 细胞增殖受抑制,而 MDA-MB-231 细胞增殖未受明显影响。将感染病毒的 ECV304 细胞接种于 ECMatrix™ 胶,显示内皮细胞分化和毛细血管管腔形成受抑制。表明所构建的含人纤溶酶原 K5 基因的重组复制缺陷型腺病毒具有抑制 ECV304 细胞增殖、分化和管腔形成的作用而对 MDA-MB-231 细胞的生长则无影响。

关键词 新生血管生成抑制因子 K5 腺病毒 基因治疗

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)02-0217-06

肿瘤新生血管生成(Tumor angiogenesis)在肿瘤生长、转移过程中具有重要作用,抗肿瘤新生血管生成可望成为抗肿瘤治疗的一种新手段。现已发现多种肿瘤新生血管生成抑制因子,如血管抑素(Angiostatin)内皮抑素(Endostatin)等,临床前及临床实验表明它们具有一定的抗肿瘤效果。但由于这些因子中有很大一类为蛋白质和多肽,它们在体内半衰期短,而长期给药价格昂贵,因此,抗肿瘤新生血管生成基因治疗成为研究热点^[1]。

目前,基因治疗所用的载体可分为非病毒、病毒载体两大类。其中,常用的病毒载体有逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒等。腺病毒载体有易于包装和扩增,感染宿主范围广,能感染分裂期或静止期细胞,病毒滴度高等特点,在基因治疗中具有广阔的应用前景^[2]。

人纤溶酶原共有 5 个 K 区(Kringle),各 K 区氨基酸序列同源性为 48%~50%。血管抑素为 K1-4,具有抑制血管内皮细胞增殖、迁移和管腔形成等作用,并能抑制多种实验性肿瘤生长、转移。K5 区与前四区氨基酸序列约有 50% 同源性,它也有抑制血管内皮细胞增殖、迁移等作用,但其抗肿瘤作用尚少有报道^[3-4]。本实验构建了含人纤溶酶原 K5 基因的重组腺病毒载体,在人胚肾细胞株 293 细胞内包

装、扩增后,体外感染人脐静脉内皮细胞系(ECV304)和人乳腺癌细胞系(MDA-MB-231),检测两者的增殖情况,并观察其对 ECV304 形成管腔的影响,为进行 K5 抗肿瘤新生血管生成基因治疗的动物实验打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 宿主菌 *E. coli*: JM109, DH5 α ; 真核表达载体 pcDNA3; 含人纤溶酶原 K4K5 cDNA 的质粒 pUCK4K5 为本室保存; Adeno-X™ 表达试剂盒(Clontech 公司)。

1.1.2 细胞培养 人胚肾 293 细胞株由中科院上海生物化学研究所邵卫国博士提供,培养液为 DMEM,其中含胎牛血清 10%; 人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 为本室保存; 人脐静脉内皮细胞株 ECV304 购自中科院上海细胞生物学研究所,培养液为 DMEM,其中含 10% 小牛血清,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.1.3 试剂和仪器 限制酶: BamH I, Bgl II, EcoR V, Xba I, Not I, I-Ceu I, PI-Sce I, Sma I, Pac I; T4 DNA ligase; Klenow 酶(NEB)质粒纯化试剂盒(Qiagen); GeneJammer 转染试剂盒

$OD_{570nm}/\text{未转染组 } OD_{570nm} \times 100\%$

1.2.9 体外新生血管生成分析^[6]:对数生长期的 ECV304 以 $1 \times 10^4/\text{孔}$ 接种于 24 孔板, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养 24h 后弃培养液, 将 Ad-K5, Ad-LacZ 以不同的感染系数(MOI)感染细胞, 2h 后补足含 5% 小牛血清, 3ng/mL bFGF 的 DMEM, 每一 MOI 设 2 复孔, 另设空白对照。 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养 72h 后收集细胞。取一 96 孔板, 以 $50\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入 ECMatrix™ 胶, 37°C 固化后将上述收集的细胞以 $1 \times 10^4/\text{孔}$ 接种于 ECMatrix™ 胶, 24h 后观察血管内皮细胞管腔形成情况。

1.2.10 统计学处理:各组数据以均数 \pm 标准差($\bar{X} \pm S$)表示, 两组结果比较应用 t 检验, 显著性差异定义为 $P < 0.05$ 。

2 结 果

2.1 载体构建

应用 PCR 方法将人纤溶酶原信号肽序列引入 K5 cDNA 基因, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 可见在 370bp 处有一特异性条带, 与预期的结果一致。将该目的片段与 pcDNA3 重组后, 转化 JM109, 随机挑取克隆, 经 *Bam*H I、*Eco*R V 和 *Bgl* II、*Eco*R V 两套酶切鉴定, 测序, 结果表明, 人纤溶酶原信号肽序列与 K5 cDNA 正确连接, 证实重组质粒 pcDNA3K5 构建正确(图 1)。将含目的基因的片段与穿梭质粒 pShuttle 重组, 转化 DH5 α , 随机挑取克隆, 经 *Eco*R I、*Eco*R V 和 *Bgl* II、*Eco*R V 两套酶切鉴定, 证实重组质粒 pShuttleK5 构建正确(图 2)。再将含目的基因的片段与 Adeno-X™ DNA 重组, 转化 DH5 α , 随机挑取克隆, 用 Adeno-X™ 表达试剂盒提供的特异的引物和 K5 自身的引物进行 PCR 鉴定, 结果可见, Adeno-K5 均在 370bp 处有一条带, 而 Ad-LacZ 则仅在以 Adeno-X™ 表达试剂盒提供的引物进行 PCR 时在 370bp 处有一条带(图 3)。

2.2 包装及扩增后的病毒滴度与 PCR 鉴定

Ad-K5 及 Ad-LacZ 经包装后测滴度均为 1×10^7 pfu/mL。扩增后的滴度达到 5×10^8 pfu/mL。PCR 鉴定结果与前述一致。

2.3 内皮细胞增殖实验

Ad-K5, Ad-LacZ 以 MOI 为 10, 20, 40, 80 感染 ECV304 细胞 4d 后, 进行 MTT 法检测细胞存活率, 结果表明, Ad-K5 在 MOI 为 80 时, 抑制血管内皮细胞增殖, 与空白对照和 Ad-LacZ 感染组比较, 其差异在统计学上有显著性($P < 0.05$); Ad-K5 在低 MOI 则无明显抑制作用; 比较空白对照和 Ad-LacZ 感染

组的内皮细胞存活率, 两者差异在统计学上无显著性($P > 0.05$)(图 4)。

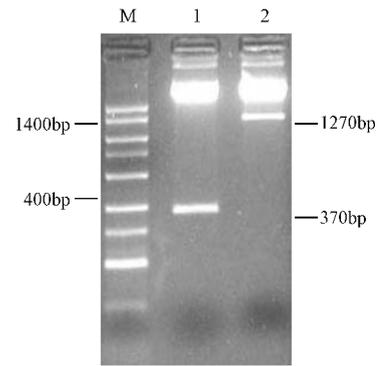


图 1 pcDNA3K5 限制酶分析

Fig. 1 Restriction endonuclease analysis of pcDNA3k5

M. Marke(100bp DNA Ladder);

1. pcDNA3k5/*Eco*R V + *Bam*H I (5.4kb Δ . 37kb);

2. pcDNA3k5/*Eco*R V + *Bgl* II (4.5kb Δ . 27kb)

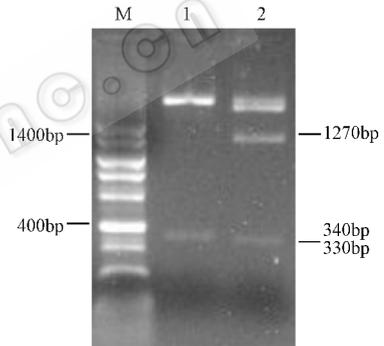


图 2 pShuttleK5 限制酶分析

Fig. 2 Restriction endonuclease analysis of pShuttlek5

M. Marke(100bp DNA Ladder);

1. pShuttlek5/*Eco*R V + *Eco*R I (4.13kb Δ . 34kb);

2. pShuttlek5/*Eco*R V + *Bgl* II (2.87kb Δ . 27kb Δ . 33kb)

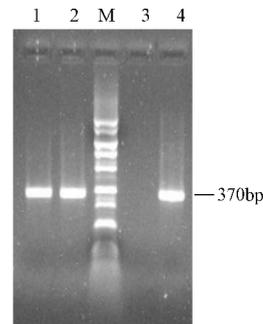


图 3 PCR 鉴定 pAd-K5 和 pAd-LacZ

Fig. 3 Identification of pAd-K5 and pAd-LacZ by PCR

M. Marke(100bp DNA Ladder);

1. pAd-LacZ amplified with Adenovirus specific primers(0.37kb);

2. pAd-K5 amplified with Adenovirus specific primers(0.37kb);

3. pAd-LacZ amplified with K5 specific primers ;

4. pAd-K5 amplified with K5 specific primers(0.37kb)

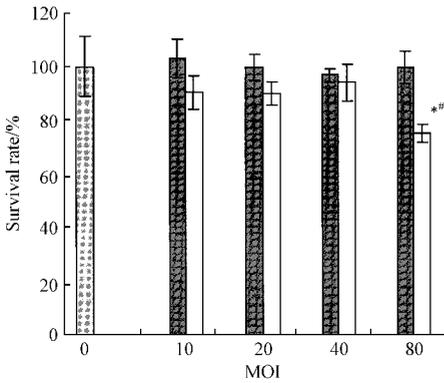


图 4 Ad-K5 感染 ECV304 内皮细胞 96h 后细胞存活率

Fig. 4 Survival rate of ECV304 endothelial cell infected with Ad-K5 (96h)

* vs uninfected control ($p < 0.05$); # vs Ad-LacZ infected control ($p < 0.05$);
 ■ Uninfected control ■ Ad-LacZ infected control □ Ad-K5 infected control

2.4 肿瘤细胞增殖实验

Ad-K5, Ad-LacZ 以 MOI 为 10, 20, 40, 80 感染 MDA-MB-231 细胞 4d 后, 进行 MTT 法检测细胞存活率。结果表明, Ad-K5 对 MDA-MB-231 细胞增殖无明显抑制作用, 与空白对照和 Ad-LacZ 感染组比较, 其差异在统计学上无显著性 ($P > 0.05$); 比较空白对

照和 Ad-LacZ 感染组的内皮细胞存活率, 两者差异在统计学上无显著性 ($P > 0.05$) (图 5)。

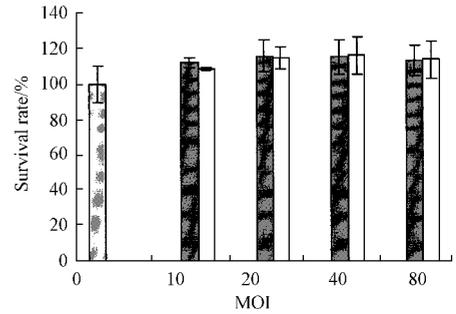


图 5 Ad-K5 感染 MDA-MB-231 细胞 96h 后细胞存活率

Fig. 5 Survival rate of MDA-MB-231 infected with Ad-K5 (96h)
 ■ Uninfected control ■ Ad-LacZ infected control □ Ad-K5 infected control

2.5 体外新生血管生成分析

Ad-K5, Ad-LacZ 以 MOI 为 10, 50, 100 感染 ECV304 细胞 72h 后, 收集细胞, 将其接种至 ECMatrix™ 胶, 观察血管内皮细胞管腔形成情况。可见 Ad-K5 在 MOI 为 100 时抑制 ECV304 细胞形成管腔, 而在低 MOI 时则无明显抑制作用; Ad-LacZ 感染对 ECV304 细胞管腔形成无明显抑制作用 (图 6)。

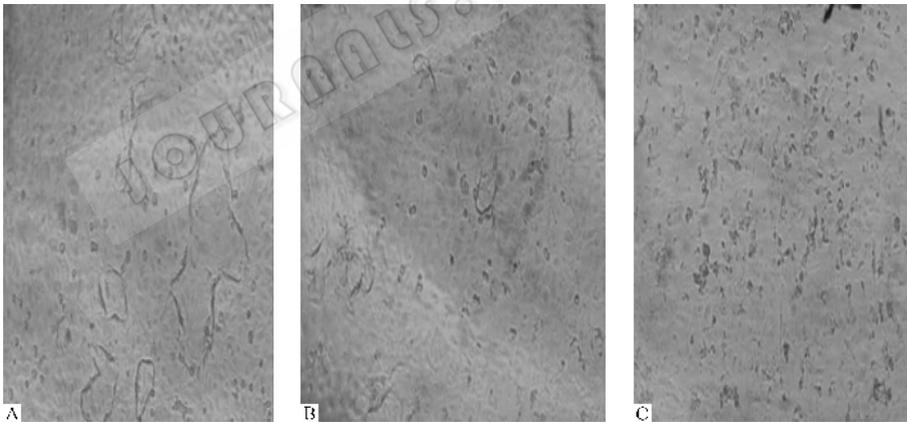


图 6 Ad-K5 对 ECV304 细胞管腔形成的抑制作用 (24h $\times 200$)

Fig. 6 Ad-K5 inhibited ECV304 tube formation in ECMatrix™ gel (24h $\times 200$)

A. Uninfected control; B. Ad-LacZ infected control (MOI = 100); C. Ad-K5 infected group (MOI = 100)

3 讨 论

本实验为构建重组复制缺陷的腺病毒载体, 首先将真核表达载体 pcDNA3K5 的目的基因与穿梭质粒 pShuttle 重组为 pShuttleK5, 经特异的 I-Ceu I 和 PI-Seu I 双酶切后与经相同酶切的 Adeno-X™ DNA 连接, 转化大肠杆菌, 挑选阳性克隆进行 PCR 鉴定。由于原 Adeno-X™ DNA 在 I-Ceu I 和 PI-Seu I 酶切位点之间存在 Swa I 的酶切位点, 而含目的基因的片

段正确插入后该位点则消失, 故将连接产物用 Swa I 酶切后再转化可使假阳性克隆大为减少。相对其他腺病毒载体的制备方法, 该法操作较简单, 并能较好地减少在 293 细胞中重组产生野生型腺病毒的可能性。

本研究采用噬斑分析法测定病毒滴度, 该法简便易操作, 但仍存在一定的误差, 且需时较长。此实验所测得的病毒滴度为 5×10^8 pfu/mL, 有待进一步扩增、纯化以提高滴度。

通过抑制肿瘤新生血管生成而达到抑制肿瘤生长、转移的目的,目前认为是一种可行的、具有潜在应用价值的抗肿瘤疗法。对多种新生血管生成抑制因子的动物实验研究已表明,它们能有效地抑制多种实体瘤和血液系统恶性肿瘤的生长和转移,其中一部分正在进行临床实验^[7-8]。动物实验证明:新生血管生成抑制因子如血管抑素等进行基因治疗,它们对实验肿瘤的生长、转移具有抑制作用^[9]。已有实验表明人纤溶酶原 K5 区具有抑制血管内皮细胞增殖、迁移等作用。本实验通过构建含 K5 基因的重组复制缺陷型腺病毒(Ad-K5),将其感染 ECV304 和 MDA-MB-231 细胞,观察其对两者增殖的影响,结果表明,Ad-K5 能特异地抑制 ECV304 细胞增殖而对 MDA-MB-231 细胞的生长则无明显影响,这与其他研究者的结果类似^[3]。有研究认为 K5 可通过阻滞细胞周期和促进细胞凋亡从而抑制血管内皮细胞增殖^[10]。在体外将血管内皮细胞接种于三维胶上,细胞能够形成毛细血管腔样结构,模拟体内新生血管生成^[11]。将感染 Ad-K5 的 ECV304 细胞接种于 ECMatrix™ 胶后,可见管腔形成能力受抑制,说明 K5 具有抑制 ECV304 细胞迁移、分化形成管腔的作用,但其具体机制还有待进一步研究。

上述结果表明,本实验成功地构建了含人纤溶酶原 K5 基因的重组复制缺陷型腺病毒载体,能抑制 ECV304 内皮细胞的增殖和毛细血管管腔形成,而对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的生长无明显抑制作用,为重组复制缺陷型腺病毒介导的 K5 抗肿瘤新生血管生成基因治疗动物实验奠定了基础。

Preparation and Functional Study of an Adenovirus Vector Expressing Human Plasminogen Kringle 5 Gene

YANG Jian WANG Yue-Xiang GUAN Xiao-Qun MA Chun-Gu WANG Long-Sheng SONG Hou-Yan*

(The Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract Tumor angiogenesis plays a pivotal role in the progress of tumor. Among the various endogenous angiogenic inhibitors discovered, the human plasminogen kringle 5 (K5) has been demonstrated to be a potential inhibitor of the proliferation and migration of vascular endothelial cells *in vitro*. The replication-incompetent adenovirus (Ad) vector Adeno-X-CMV-K5 (Ad-K5) (where CMV is cytomegalovirus) was constructed and its antiangiogenic effect was tested on vascular endothelial cell and tumor cell. For the construction, the K5 cDNA was fused in-frame with human plasminogen signal sequence and inserted into the eu-

REFERENCES (参考文献)

- [1] Feldman A L, Libutti S K. Progress in antiangiogenic gene therapy of cancer. *Cancer*, 2000, **89**(6): 1181 - 1194
- [2] GU J R (顾建人), CAO X T (曹雪涛). Gene Therapy (基因治疗). Beijing: Science Press (科学出版社), 2001
- [3] Cao Y, Chen A, An S S A *et al.* Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth. *J Biol Chem*, 1997, **272**(36): 22924 - 22928
- [4] Ji W-R, Barrientos L G, Llinás M *et al.* Selective inhibition by kringle 5 of human plasminogen on endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **247**(2): 414 - 419
- [5] Griscelli F, Li H, Cheong C *et al.* Combined effects of radiotherapy and angiostatin gene therapy in glioma tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, **97**(12): 6698 - 6703
- [6] Mühlhauser J, Merrill M J, Pili R *et al.* VEGF165 expressed by a replication-deficient recombinant adenovirus vector induces angiogenesis *in vivo*. *Circ Res*, 1995, **77**(6): 1077 - 1086
- [7] Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, **33**(4): 357 - 369
- [8] Folkman J. Angiogenesis-dependent diseases. *Semin Oncol*, 2001, **28**(6): 536 - 542
- [9] Sacco M G, Mira Catò E, Ceruti R *et al.* Systemic gene therapy with anti-angiogenic factors inhibits spontaneous breast tumor growth and metastasis in MMTVneu transgenic mice. *Gene Ther*, 2001, **8**(1): 67 - 70
- [10] Lu H, Dhanabal M, Volk R *et al.* Kringle 5 causes cell cycle arrest and apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **258**(3): 668 - 673
- [11] Vaihè B, Vittet D, Feige J-J. *In vitro* models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest*, 2001, **81**(4): 439 - 452

Received: 10-29-2002

* Corresponding author. Tel: 86-21-64033738; Fax: 64033738; E-mail: hysong@shmu.edu.cn

