

## 靶向于 SW1990 细胞 K-ras exon 1 反义 RNA 腺病毒的构建

吕纯业,邵成浩\*,胡先贵

(第二军医大学长海医院普通外科,上海 200433)

**[摘要]** **目的:**构建靶向于 SW1990 细胞 K-ras exon 1 序列的反义 RNA 腺病毒,观察其对 SW1990 细胞的增殖和凋亡的影响。**方法:**将 K-ras exon 1 cDNA 克隆至穿梭质粒 pShuttle-CMV,筛选出反向插入的克隆,与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 共转染大肠杆菌 BJ5183,同源重组产生腺病毒重组质粒。腺病毒重组质粒转染 293 细胞进行包装,产生重组腺病毒。腺病毒载体 Ad-LacZ 转染 SW1990 细胞,X-gal 染色观察感染效率。重组腺病毒感染体外培养的 SW1990 细胞,MTT 法检测 SW1990 细胞增殖,Annexin V/PI 流式细胞术检测 SW1990 细胞凋亡。**结果:**所构建的重组腺病毒 PCR 扩增出 282 bp 的目的基因片段;制备出了高滴度重组病毒,CsCl<sub>2</sub> 密度梯度纯化前后病毒滴度分别为  $7.6 \times 10^8$  pfu/ml 和  $5.0 \times 10^{10}$  pfu/ml,当 MOI=100 时对 SW1990 的感染效率接近 100%;重组腺病毒体外转染能抑制 SW1990 细胞增殖( $P < 0.05$ ),转染后 4~5 d,抑制效应达到最高峰,抑制率约为 40.5%,也能促进 SW1990 细胞凋亡,转染后 72 h,凋亡率为  $(22.54 \pm 5.38)\%$  ( $P < 0.01$ )。**结论:**成功构建了靶向于 SW1990 细胞 K-ras exon 1 序列的反义 RNA 腺病毒,为进一步探讨胰腺癌以 K-ras 为靶点的反义基因治疗奠定了基础。

**[关键词]** 基因,ras;RNA,反义;腺病毒;胰腺肿瘤**[中图分类号]** R 730.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2007)05-0500-04**Construction of adenovirus-mediated anti-sense RNA targeting K-ras exon 1 in SW1990 cell line**

LÜ Chun-ye, SHAO Cheng-hao\*, HU Xian-gui (Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To construct an adenovirus-mediated anti-sense RNA targeting K-ras exon 1 of SW1990 cell line and observe its effect on cell proliferation and apoptosis after transferred into SW1990 cell line. **Methods:** K-ras exon 1 cDNA was cloned into shuttle vector pShuttle-CMV and the resultant plasmid was confirmed by enzyme digestion and PCR. Clones with inverted insertion were selected and co-transferred into *E. coli* BJ5183 with an adenoviral backbone plasmid pAdEasy-1 to produce recombinant plasmid by homologous recombination. Recombinants were then selected and transfected into 293 cell line to produce recombinant adenovirus. Recombinant adenovirus production was confirmed by PCR analysis and was amplified and purified; the virus titer was determined. Ad-LacZ was used to infect SW1990 cells and the infection efficiency was observed by X-gal staining. SW1990 cells was infected with the recombinant adenovirus and their proliferation and apoptosis were determined by MTT and annexin V/PI FCM assay. **Results:** A 282 bp target gene fragment was acquired by PCR; the titer of recombinant adenovirus was  $7.6 \times 10^8$  pfu/ml before purification by CsCl<sub>2</sub> gradient centrifugation and  $5.0 \times 10^{10}$  pfu/ml after CsCl<sub>2</sub> gradient centrifugation. When the recombinant adenovirus was at 100 MOI, the infection efficiency of SW1990 cells nearly reached 100%. The transfection of recombinant adenovirus significantly inhibited SW1990 cell proliferation ( $P < 0.05$ ), with a maximal inhibitory rate of 40.5% 4-5 days after infection; it also significantly increased SW1990 cell apoptosis, with the apoptotic rate being  $(22.54 \pm 5.38)\%$  72 hours after infection. **Conclusion:** We have successfully constructed an anti-sense RNA adenovirus vector targeting K-ras exon 1 of SW1990 cell line, paving a way for the anti-sense K-ras gene therapy of pancreatic carcinoma.

**[KEY WORDS]** gene,ras;RNA,antisense;adenovirus;pancreatic neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ,2007,28(5):500-503]

迄今为止,胰腺癌仍然是临床治疗最为困难的消化道恶性肿瘤之一,外科手术仅仅能使极少数的患者获得临床治愈的可能,大多数患者是外科手术不能治愈的,3年生存率不足10%,5年生存率低于5%<sup>[1]</sup>。胰腺癌对目前使用的化疗和放疗等治疗方法具有高度的抵抗性,新的药物如 Gemcitabine,虽然已经成为中晚期胰腺癌治疗的首选用药,但不能显著延长患者的中位生存时间<sup>[2]</sup>,因此需要探索

新的胰腺癌治疗方法。本研究成功构建了靶向于 SW1990 细胞 K-ras exon 1 序列的反义 RNA 腺病毒载体,为进一步研究胰腺癌以 K-ras 为靶点的反

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30200275)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30200275)。**[作者简介]** 吕纯业,博士生,主治医师。

\* Corresponding author. E-mail: schhao@133sh.com

义基因治疗奠定了基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料和仪器** pGEM-T-K-ras exon 1质粒由第二军医大学东方肝胆外科研究所薛惠斌博士构建(K-ras exon 1 cDNA通过PCR反应扩增SW1990细胞的K-ras exon 1序列获取,并经测序验证,第12密码子GGT突变为GTT,无第13和61密码子突变),AdEasy™载体系统试剂盒为Stratagene公司产品, BJ5183、DH5 $\alpha$ 菌株和293细胞为腺病毒载体试剂盒所带。Lipofectamine质粒转染试剂盒购自Invitrogen公司。胰腺癌细胞系SW1990由第二军医大学长海医院消化内科屠振兴教授惠赠,电穿孔仪Gene Pulser Electroporator购自BIO-RAD公司,小牛血清、DMEM为Gibco公司产品, DNA限制性内切酶、T<sub>4</sub>DNA连接酶为BioLabs公司产品,柱离心式小量胶回收试剂盒、DNA抽提纯化试剂盒为Qiagen公司产品,PCR试剂为上海闪晶生物公司产品。

**1.2 引物设计** 根据目的基因序列设计PCR反应引物, K-ras exon 1引物 P1: 5'-CTC ACT GGT GGA GTA GAT AG-3', 引物 P2: 5'-CTC GGT CAG AGA AAC CTT TAT CTG-3', pShuttle载体序列引物 P0: 5'-TAG TGA ACC GTC AGA TCC GCT AGA-3'。引物合成由上海闪晶生物公司完成。

**1.3 反义K-ras重组腺病毒质粒载体的构建** Not I酶切经测序验证的pGEM-T-K-ras exon 1质粒,回收282 bp大小的目的基因片段。Not I线性化pShuttle-CMV,与K-ras exon 1 cDNA片段16℃下连接反应。取2  $\mu$ l连接反应物转化感受态细胞,卡那霉素抗性筛选。小量扩增抽提重组质粒,分别用Not I酶切和Hind III、Kpn I双酶切鉴定。以重组质粒为模板,以P1P2为引物,PCR鉴定是否有目的基因插入;以P0P1、P0P2为引物进行PCR扩增,鉴定目的基因插入方向。选择反向插入的克隆, Pme I酶切,用电穿孔法与腺病毒骨架质粒pAdEasy-1共转染感受态BJ5183,进行体外重组。重组腺病毒质粒经卡那霉素抗性筛选, Pac I酶切鉴定,鉴定正确的克隆电击转化至DH5 $\alpha$ 感受态细胞中扩增,大量抽提质粒备用。

**1.4 反义K-ras重组腺病毒载体的制备** Pac I酶切腺病毒重组质粒,按Lipofectamine转染试剂盒说明书转染293细胞进行包装,7~10 d后,收集细胞,-20℃、37℃反复冻融3次,最大速度离心10

min,收集上清,重复感染293细胞,扩增重组腺病毒至第4代。抽提病毒DNA,以P1P2为引物PCR鉴定。鉴定正确的克隆命名为Ad-aK-ras。测定病毒滴度,结果以TCID<sub>50</sub>(50%组织培养感染量)表示,按照Karber公式计算,TCID<sub>50</sub> = 第一排稀释度 $\times$ 稀释度 $^{2^{-0.5}}$ ,  $\Sigma$  = 出现病态反应孔的数目/每个稀释度的标本数。

**1.5 反义K-ras重组腺病毒对SW1990细胞的感染效率** 对数生长期SW1990细胞消化重悬制成单细胞悬液,10<sup>5</sup>/孔接种于6孔板,贴壁后按感染复数(MOI)分别为0、20、40、60、80、100、200转染,48 h后X-gal染色,显微镜下观察,计数500个细胞中蓝染细胞个数,以蓝染细胞百分比代表转染效率。每个MOI值重复检测3次,取平均值作为重组腺病毒的转染效率。

**1.6 反义K-ras重组腺病毒转染对SW1990细胞增殖的影响** 同法制备携带报告基因的重组腺病毒载体Ad-LacZ。对数生长期的SW1990细胞消化重悬后按10<sup>3</sup>/孔接种于7块96孔板,按最适MOI分别用Ad-aK-ras、Ad-LacZ进行转染,用含10% FBS的DMEM培养液作对照组。每板每组做8个复孔。4 h后弃上清,加入新鲜完全培养液,终体积150  $\mu$ l。第3、5日更换培养液。于转染后1~7 d,每天取1板,每孔加入MTT(5 mg/ml)50  $\mu$ l,继续培养4 h,弃上清,每孔加入DMSO 150  $\mu$ l,在酶联免疫检测仪上测定各孔490 nm波长光密度值(D)。以培养天数为横轴, D<sub>490</sub>值为纵轴,绘制生长曲线。

**1.7 反义K-ras重组腺病毒转染对SW1990细胞凋亡的影响** 对数生长期的SW1990细胞按最适MOI分别用Ad-aK-ras、Ad-LacZ进行转染,用含10% FBS的DMEM培养液作对照组。4 h后弃上清,加入新鲜完全培养液继续培养72 h。消化收集细胞,移入离心管中,调细胞数为每个样本10<sup>6</sup>, 1 000 r/min (r=6 cm)离心5 min弃去培养液,洗涤、离心,标记溶液重悬细胞,室温下避光孵育10~15 min,再次离心洗涤,加入Annexin V和PI至终浓度1  $\mu$ g/ml。4℃下避光孵育20 min,400目尼龙筛网过滤,加样入流式细胞分析仪样品室,进行细胞凋亡检测。实验重复3次,取平均值作为该组的细胞凋亡率。

**1.8 统计学处理** 实验所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 13.0统计软件对各组数据进行统计学处理,方差分析比较各组相应数据之间有无显著性差异,两样本t检验分别比较实验组和对照组有无显著性差异,检验水准均定为0.05。

## 2 结果

2.1 反义 K-ras 重组腺病毒质粒载体的构建 重组穿梭质粒 pShuttle-CMV 分别用 *Not* I 酶切和 *Hind* III、*Kpn* I 双酶切,均切出大小约 282 bp 的清晰条带,以 P1P2 为引物 PCR 扩增出 282 bp 的目的基因片段。分别以 P0P1、P0P2 为引物进行 PCR 反应,以 P0P1 为引物扩增出 282 bp 的片段、以 P0P2 为引物未扩增出 DNA 片段的为反向插入克隆,反之则为正向插入克隆。重组质粒用 *Pac* I 酶切获得 35 kb、4.5 kb 左右的目标片段(图 1)。

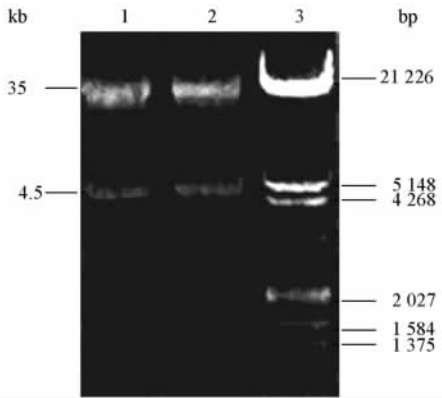


图 1 pAdEasy 重组腺病毒质粒的酶切鉴定  
Fig 1 Enzymatic digestion analysis of recombinant adenovirus plasmid

1, 2: pAdEasy-aK-ras digested by *Pac* I ; 3: Lamda *EcoR* I and *Hind* III marker

2.2 反义 K-ras 重组腺病毒载体的鉴定及滴度测定 以病毒 DNA 为模板,以 P1P2 为引物 PCR 反应扩增出 282 bp 大小的目的基因片段(图 2)。按照 Karber 公式计算第 4 代重组腺病毒的滴度, CsCl<sub>2</sub> 密度梯度纯化前后分别为  $7.6 \times 10^8$  pfu/ml 和  $5.0 \times 10^{10}$  pfu/ml。

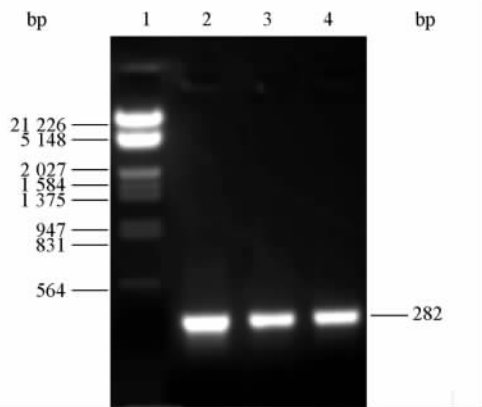


图 2 反义 K-ras 重组腺病毒的 PCR 鉴定

Fig 2 Identification of recombinant adenovirus by PCR

1: Lamda *EcoR* I and *Hind* III marker; 2-4: PCR with P1P2 of different adenovirus clones

2.3 重组腺病毒对 SW1990 细胞的感染效率测定 当 MOI 值为 0、20、40、60、80、100、200 时 SW1990 细胞感染率分别为 0、(56.3 ± 5.0)%、(68.9 ± 4.4)%、(88.3 ± 7.5)%、(94.6 ± 2.3)%、(99.2 ± 0.8)%、100%。随着 MOI 值增加,重组腺病毒载体对 SW1990 细胞的转染效率逐渐上升,当 MOI=100 时,近于 100% 的肿瘤细胞被转染,表明重组腺病毒体外能有效地介导目的基因向 SW1990 细胞的转移,因此确定 MOI=100 为最适感染值。

2.4 反义 K-ras 重组腺病毒转染对 SW1990 细胞增殖的影响 MTT 法检测转染后 1~7 d 各组细胞的  $D_{490}$  值,绘制生长曲线(图 3)。对各组细胞同一检测点的  $D_{490}$  值进行统计分析, Ad-LacZ 组与对照组在 7 个检测点上的差异均无显著意义; Ad-aK-ras 组与 Ad-LacZ 组及对照组相比,其第 2~7 日的  $D_{490}$  值差异具有显著意义 ( $P < 0.05$ )。实验结果表明, Ad-aK-ras 对 SW1990 细胞的增殖具有抑制作用,转染后第 4~5 日,抑制效应达到最高峰, Ad-LacZ 则无此作用。

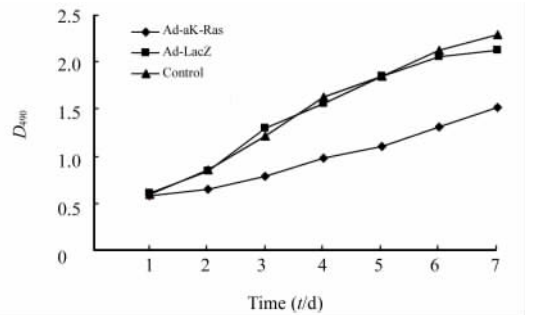


图 3 SW1990 细胞生长曲线

Fig 5 Growth curve of SW1990 cell line

2.5 SW1990 细胞的凋亡检测 流式细胞仪检测转染后 72 h Ad-aK-ras 组、Ad-LacZ 组和对照组 SW1990 细胞的凋亡率分别为 (22.54 ± 5.38)%、(6.36 ± 1.62)%、(7.02 ± 1.88)%。对各组细胞凋亡率进行统计分析, Ad-LacZ 组与对照组差异无统计学意义; Ad-aK-ras 组与对照组相比,差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。实验结果表明, Ad-aK-ras 能诱导 SW1990 细胞的凋亡, Ad-LacZ 则无此作用。

## 3 讨论

选择在肿瘤发生发展过程起重要作用的基因作为靶点,是基因治疗的关键之一。随着对胰腺癌发生、发展分子生物学机制的研究深入,已发现在胰腺

癌的发病过程中涉及到多个癌基因的过度表达、抑癌基因的失活以及生长因子的异常表达,其中最重要的是K-ras突变。K-ras基因点突变在胰腺癌中的发生率约70%~90%,并且95%的点突变发生于K-ras基因的第12密码子,其余5%发生于第13或61密码子。突变的K-ras蛋白仅有微弱的GTP酶活性,不能迅速分解GTP,处于GTP结合的状态,信号转导增加,细胞处于无限制增殖状态。在胰腺癌发生发展的不同时期,K-ras基因的突变率无显著变化<sup>[3]</sup>,因此K-ras基因是胰腺癌基因治疗非常理想的靶点之一,可应用于胰腺癌发生发展的各个时期。以突变K-ras基因为靶点的反义基因治疗不仅能抑制肿瘤的生长<sup>[4]</sup>,而且能抑制肿瘤的浸润和转移<sup>[5-6]</sup>。

反义基因疗法是肿瘤基因治疗重要组成部分,其基本原理是根据核酸碱基互补配对规律设计出能与靶基因特定区域结合的RNA或DNA,影响靶基因的表达,抑制其功能。常用的有两条途径:一是利用质粒载体或病毒载体转化或转染肿瘤细胞,在细胞内转录出能与目的基因正义RNA相互补的反义RNA,从而阻断目的基因蛋白质的表达;二是体外人工合成反义寡核苷酸。但只有与K-ras基因突变相匹配的反义基因才能有效抑制胰腺癌的生长。针对基因非翻译区、翻译起始区、剪切区或第12密码子的反义序列是反义K-ras基因抑制胰腺癌所必需的,如果是寡核苷酸则其长度要 $\geq 17$ 个碱基<sup>[7]</sup>。本实验所用腺病毒载体携带的反义基因序列靶向于K-ras基因exon 1及其侧翼序列,同时覆盖了非翻译区、翻译起始区、剪切区和突变的12密码子4个有效区域,理论上可能最大程度阻断K-ras基因的表达,在体内通过表达反义RNA阻断突变K-ras mRNA的表达,因此属于反义RNA。

有效的基因转移方法和转移基因的高效表达是基因治疗的又一关键。和其他基因载体系统相比,腺病毒载体病毒滴度高,宿主范围广,能同时感染休止期和增殖期细胞,本身分子稳定,不与宿主基因组整合,插入的外源基因也相当稳定,安全性高,是目前最常用的基因治疗载体之一<sup>[8]</sup>。但某些因素限制

了腺病毒作为基因转移载体在基因功能研究中的应用,尤其是在293细胞中进行同源重组产生重组腺病毒效率较低,技术要求高。AdEasy载体系统使得腺病毒载体的构建变得容易掌握和实施<sup>[9]</sup>。本实验应用AdEasy系统成功构建了反义K-ras重组腺病毒,体外对SW1990细胞的感染效率可达100%,转染后显著抑制肿瘤细胞的增殖,促进凋亡,证明反义基因在肿瘤细胞内得到有效的表达,为进一步探讨胰腺癌以K-ras基因为靶点的反义基因治疗奠定了基础。

## [参考文献]

- [1] Jemal A, Thomas A, Murray T, et al. Cancer statistics, 2002 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2002, 52: 23-47.
- [2] el-Rayes B F, Shileds A F, Viatkevicius V, et al. Developments in the systemic therapy of pancreatic cancer[J]. *Cancer Invest*, 2003, 21: 73-86.
- [3] Motojima K, Urano T, Nagata Y, et al. Mutations in the Kirsten-ras oncogene are common but lack correlation with prognosis and tumor stage in human pancreatic carcinoma[J]. *Am J Gastroenterol*, 1991, 86:1784-1788.
- [4] Yoshida T, Ohnami S, Aoki K. Development of gene therapy to target pancreatic cancer[J]. *Cancer Sci*, 2004, 95:283-289.
- [5] Morioka C Y, Machado M C, Saito S, et al. Suppression of invasion of a hamster pancreatic cancer cell line by antisense oligonucleotides mutation-matched to K-ras gene[J]. *In Vivo*, 2005, 19: 535-538.
- [6] Morioka C Y, Saito S, Machado M C, et al. Antisense therapy specific to mutated K-ras gene in hamster pancreatic cancer model. Can it inhibit the growth of 5-FU and MMC-resistant metastatic and remetastatic cell lines[J]? *In Vivo*, 2004, 18: 113-117.
- [7] Bacon T A, Wickstrom E. Walking along human c-myc mRNA with antisense oligodeoxynucleotides: maximum efficacy at the 5' cap region[J]. *Oncogene Res*, 1991, 6:13-19.
- [8] Cascallo M, Alemany R. Adenovirus-mediated gene transfer to tumor cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 246: 121-138.
- [9] Zeng M, Smith S K, Siegel F, et al. AdEasy system made easier by selecting the viral backbone plasmid preceding homologous recombination[J]. *Biotechniques*, 2001, 31: 260-262.

[收稿日期] 2006-12-13

[修回日期] 2007-02-13

[本文编辑] 曹静