

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00994

氧依赖性降解结构域-RANTES 融合基因腺病毒表达载体的构建及体外趋化活性观察

黎江^{1,2}, 吴红平², 李林芳², 刘辉², 王春红², 金华君², 钱其军^{1,2*}

1. 浙江理工大学生命科学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室, 上海 200438

[摘要] **目的:** 构建携带活化 T 细胞表达和分泌调节因子 (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted, RANTES/CCL5) 基因及氧依赖性降解结构域 (oxygen-dependent degradation domain, ODD) 融合基因的重组腺病毒, 并观察其体外趋化活性。 **方法:** PCR 法将人 RANTES 基因与 ODD 融合, 构建携带该融合基因的重组腺病毒 SG511-CCL5-ODD; 增殖实验观察重组腺病毒增殖特性, ELISA 法观察常氧和缺氧条件下 RANTES 蛋白的表达; 趋化试验观察重组腺病毒感染肝癌细胞后的趋化活性。 **结果:** 成功构建携带人 RANTES-ODD 融合基因的重组腺病毒 SG511-CCL5-ODD; 增殖实验表明重组腺病毒具有肿瘤选择性复制的特性; 缺氧条件下重组病毒转染肝癌细胞后 RANTES 蛋白表达量均比常氧条件下高 ($P < 0.05$), 显示 ODD 可有效调节 RANTES 蛋白表达; 趋化试验表明重组腺病毒感染肝癌细胞具有趋化 NK92 细胞的作用。 **结论:** 重组腺病毒 SG511-CCL5-ODD 体外能有效感染肝癌细胞株 HepG2 和 Hep3B, 并在 ODD 调控下表达 RANTES 蛋白, 有效发挥体外趋化 NK92 细胞的活性。

[关键词] RANTES; 氧依赖性降解结构域; 腺病毒; 肝肿瘤**[中图分类号]** R 730.51 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)09-0994-04

Construction of adenovirus vector harboring RANTES regulated by oxygen-dependent degradation domain and its chemoattractant activity *in vitro*

LI Jiang^{1,2}, WU Hong-ping², LI Lin-fang², LIU Hui², WANG Chun-hong², JIN Hua-jun², QIAN Qi-jun^{1,2*}

1. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

2. Laboratory of Viral and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438

[ABSTRACT] **Objective:** To construct an adenovirus vector harboring the human RANTES gene regulated by oxygen-dependent degradation domain (ODD) and to observe its chemoattractant activity *in vitro*. **Methods:** The human RANTES gene was fused with ODD by PCR and the recombinant adenovirus was used to construct SG511-CCL5-ODD with the Gateway System. Viral replication experiments were performed to evaluate the selective replication ability of SG511-CCL5-ODD. The expression of RANTES protein was determined by ELISA under normal and hypoxia condition, Chemotactic test was used to analyze the chemoattractant ability of the expressed RANTES in liver cancer cells. **Results:** A recombinant adenovirus SG511-CCL5-ODD was constructed successfully. Cells infected with the recombinant virus expressed RANTES selectively. The expression of RANTES protein in the transfected liver cancer cells was higher under hypoxia condition than under normal condition ($P < 0.05$), indicating ODD can effectively regulate RANTES protein expression. Chemotactic test showed that liver cancer cell infected with SG511-CCL5-ODD had the ability to recruit NK92 cells. **Conclusion:** Recombinant vector SG511-CCL5-ODD can effectively infect liver cancer cell line HepG2 and Hep3B, and can express RANTES protein under the regulation of ODD, demonstrating a chemoattractant activity *in vitro*.

[KEY WORDS] RANTES; oxygen-dependent degradation domain; adenovirus; liver neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(9): 994-997]

[收稿日期] 2009-03-26 **[接受日期]** 2009-06-08**[基金项目]** 国家自然科学基金(30730104), 浙江省自然科学基金重点项目(Z205618). Supported by National Natural Science Foundation of China (30730104) and Natural Science Foundation of Zhejiang Province(Z205618).**[作者简介]** 黎江, 硕士生. E-mail: iamlijiang@hotmail.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81875371, E-mail: qianqj@sino-gene.com

机体整个或局部的免疫功能障碍是肿瘤细胞免疫逃逸的重要原因之一,因此打破机体免疫抑制是肿瘤生物治疗领域的重要研究思路。活化T细胞表达和分泌调节因子(regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted, RANTES/CCL5)对各种免疫细胞均具有强大的趋化作用^[1-2],可趋化大量免疫细胞到肿瘤组织局部,达到杀伤肿瘤细胞的目的。氧依赖性降解结构域(oxygen-dependent degradation domain, ODD)与胞内蛋白快速降解密切相关,含有该结构域的蛋白可在肿瘤内部缺氧环境下稳定存在,而在有氧环境下会被快速降解^[3]。实体瘤内部为缺氧环境, ODD可以作为一种翻译后调控元件使特定蛋白在实体瘤内达到特异性高浓度。因此,本研究尝试构建携带 RANTES-ODD 融合基因的 Ad5/F11 嵌合型增殖腺病毒 SG511-CCL5-ODD,观察体外缺氧条件下 RANTES 蛋白表达情况,并将其感染肝癌细胞,初步观察其体外趋化活性,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 人 RANTES 基因购自武汉三鹰生物技术有限公司, Ad5/F11 嵌合型腺病毒骨架质粒 pPE3-F11B-RC(+), pSG500, pPE3-F11B 质粒均由第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室构建。pDC315 质粒购自 Microbix 公司, pENTR12 购自 Invitrogen 公司。实验用限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司。Gateway 重组试剂盒购自 Invitrogen 公司。QIAamp DNA Blood Mini Kit 试剂盒购自 Qiagen 公司。人肝癌细胞株 HepG2 和 Hep3B、人正常皮肤成纤维细胞株 BJ、人淋巴细胞癌细胞株 NK92 均由第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室保存。细胞用培养基均购自 Gibco 公司。RANTES ELISA 检测试剂盒及标准品购自 R&D 公司。孔径为 5 μm 的 24 孔板 Millicell 悬挂式培养小室购自 Millipore 公司。

1.2 引物设计与合成 根据 PCGENE 软件中的 PCRPLAN 程序,并在 RANTES 基因序列 3'端加入 ODD 序列,具体序列如下:引物 1(含有 *EcoR* I 酶切位点)为 5'-CGG AAT TCA CCA TGA AGG TCT CCG CGG CAG-3';引物 2 为 5'-GCT AAC ATC TCC AAG TCT AAG CTC ATC TCC AAA GAG-3';引物 3 为 5'-GTC ATC ATC CAT TGG GAT ATA GGG AGC TAA CAT CTC CAA G-3';引物

4(含有 *Bam*H I 酶切位点)为 5'-CGG GAT CCC TAT AAC TGG AAG TCA TCA TCC ATT G-3'。所有引物均由 Invitrogen 公司合成。

1.3 携带 RANTES-ODD 融合基因腺病毒质粒的构建 应用引物 1~4,采用定点突变重叠 PCR 技术,将 RANTES 基因与 ODD 融合,并在融合基因的 5'端引入酶切位点 *EcoR* I, 3'端引入酶切位点 *Bam*H I,将 PCR 产物片段分别插入 pENTR12、pDC315 载体中,测序正确命名为 pENTR12-CCL5-ODD、pDC315-CCL5-ODD。pENTR12-CCL5-ODD 与嵌合型腺病毒骨架质粒 pPE3-F11B-RC(+)进行 Gateway 重组,重组产物进行酶切鉴定,鉴定正确的命名为 pPE3-F11B-CCL5-ODD。

1.4 重组腺病毒的包装及鉴定 利用 Lipofectamine 2000 试剂盒,将穿梭质粒 pSG500 和 Ad5/F11 嵌合型腺病毒骨架载体 pPE3-F11B-CCL5-ODD 共转染至 HEK293 细胞包装条件增殖型腺病毒 SG511-CCL5-ODD。将 pDC315-CCL5-ODD 与 pPE3-F11B 共转染至 HEK293 细胞包装增殖缺陷型病毒 AD5/11-CCL5-ODD。当观察到大部分 HEK293 细胞中出现病毒空斑并发生细胞病变(CPE)时,收集病变细胞悬浮于 2 ml PBS 中。通过 -80 $^{\circ}\text{C}$ /37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反复冻融,使细胞充分释放病毒颗粒。经过 3 次病毒空斑纯化,得到不含有野生型腺病毒的重组腺病毒。参考 Qiagen 公司操作说明应用 QIAamp DNA Blood Mini Kit 试剂盒提取腺病毒 DNA。应用 CCL5-ODD 特异性引物 1 与 4 进行 PCR 扩增,PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳分析。将重组腺病毒在 HEK293 细胞中反复大量扩增,通过氯化铯密度梯度离心法进行纯化,并用 TCID₅₀ 法测得重组腺病毒 SG511-CCL5-ODD 和 AD5/11-CCL5-ODD 的滴度。

1.5 重组增殖腺病毒在肝癌细胞中增殖能力分析 取对数生长期细胞,消化、重悬、稀释;细胞计数,铺 6 孔板,肿瘤细胞密度 5×10^5 /孔,正常细胞密度 1×10^6 /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱 24 h;换无血清培养液,按 MOI=5 加入 SG511-CCL5-ODD,十字法摇匀;轻摇,2 h 后换含 5% 血清培养液;收集病毒感染 0、48、96 h 的细胞及上清液,-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存;TCID₅₀ 法检测病毒滴度。

1.6 ELISA 法检测常氧、缺氧条件下 RANTES 蛋白的表达 对数生长期细胞,消化,重悬稀释;

HepG2、Hep3B 肝癌细胞 5×10^5 /孔, 铺 6 孔板, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $18\% \text{O}_2$ 和 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $1\% \text{O}_2$ 两种氧浓度条件下分别培养 24 h; 换无血清培养液, 按 $\text{MOI}=5$ 感染细胞; 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $18\% \text{O}_2$ 和 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $1\% \text{O}_2$ 两种氧浓度条件下分别培养 72 h 后取上清检测。检测方法依照试剂盒说明书进行。实验重复 3 次。根据标准品的光密度 (D) 值, 建立 ELISA 标准曲线。

1.7 重组增殖腺病毒感染肝癌细胞后对 NK92 细胞体外趋化效应分析 使用 Millipore 公司的孔径为 $5 \mu\text{m}$ 的 24 孔板 Millicell 悬挂式培养小室, 根据说明书在 24 孔板中分别加入 1.25 ml 收集的 1.6 项下部分细胞上清、标准品、对照品, 在 Millicell 悬挂式培养小室中按每孔 $1 \times 10^5/200 \mu\text{l}$ 加入 NK92 细胞, 8 h 后收集下室细胞计数。实验重复 3 次。

1.8 统计学处理 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用方差分析检验各因素的作用效果, 进一步应用独立样本 t 检验比较不同组别相同时段目的基因表达水平的差异性, 应用单因素方差分析比较感染病毒后细胞上清对 NK92 细胞趋化作用的差异性。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 重组腺病毒的鉴定 应用 CCL5-ODD 特异性引物 1 与 4 进行 PCR 扩增, PCR 产物在琼脂糖凝胶上进行电泳分析。结果(图 1)显示, 重组腺病毒均能扩增出 350 bp 条带, 与阳性对照一致, 说明重组腺病毒均含有 CCL5-ODD 融合基因。

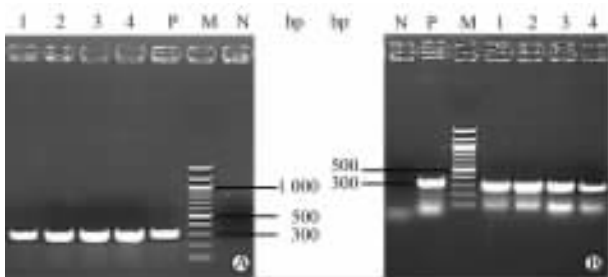


图 1 重组腺病毒的酶切鉴定

Fig 1 Identification of adenovirus vector by PCR amplification

A: Identification of SG511-CCL5-ODD gene by PCR amplification. M: 100 bp DNA Ladder; N: Negative; P: Positive (pENTR12-CCL5-ODD plasmid); 1-4: SG511-CCL5-ODD viral genome. B: Identification of AD5/11-CCL5-ODD gene by PCR amplification. M: 100 bp DNA Ladder; N: Negative; P: Positive (pDC315-CCL5-ODD plasmid); 1-4: AD5/11-CCL5-ODD viral genome

2.2 重组增殖型腺病毒的增殖特性分析结果 增殖实验结果(图 2)显示: Ad5/F11 嵌合型增殖腺病毒 SG511-CCL5-ODD 在肝癌细胞株中随着时间呈几何倍数增殖, 特别是在 Hep3B 细胞中 96 h 的增殖倍数达到 316 000 倍, 显示病毒具有良好的增殖能力; SG511-CCL5-ODD 在正常细胞株 BJ 中的增殖倍数很低, 说明 SG511-CCL5-ODD 在正常细胞的增殖能力较弱。

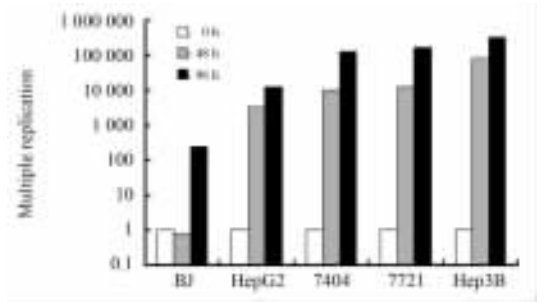


图 2 重组腺病毒 SG511-CCL5-ODD 增殖实验

Fig 2 Selective replication ability of SG511-CCL5-ODD

2.3 不同条件下 RANTES 蛋白的表达水平 结果(图 3)表明: Ad5/F11 嵌合型腺病毒能在肝癌细胞 Hep3B 与 HepG2 内大量表达 RANTES 蛋白, 缺氧条件下在 HepG2 中表达量达到 68 175 pg/ml。且无论是 Ad5/F11 嵌合型增殖腺病毒 SG511-CCL5-ODD 还是非增殖型腺病毒 AD5/11-CCL5-ODD 在缺氧条件下的 RANTES 表达量均比常氧条件下高, 显示 ODD 可有效地调节 RANTES 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。

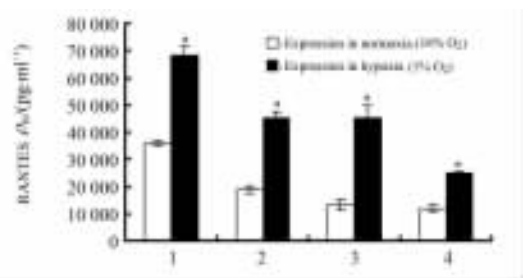


图 3 不同条件下 RANTES 蛋白的表达水平

Fig 3 Protein expression of RANTES gene in different conditions of oxygen

1: HepG2 SG511-CCL5-ODD; 2: Hep3B SG511-CCL5-ODD; 3: HepG2 Ad5/11-CCL5-ODD; 4: Hep3B Ad5/11-CCL5-ODD. * $P < 0.05$ vs expression in normoxia group; $n=3, \bar{x} \pm s$

2.4 体外对 NK92 细胞的趋化效应分析结果 趋化试验结果(图 4)表明: 与对照组及标准组相比, Ad5/F11 嵌合型腺病毒表达的 RANTES 对 NK92 细胞具有趋化活性 ($P < 0.01$), 且在缺氧条件下的趋

化效应高于常氧条件($P < 0.05$),说明其趋化效应与 RANTES 的含量成正比。

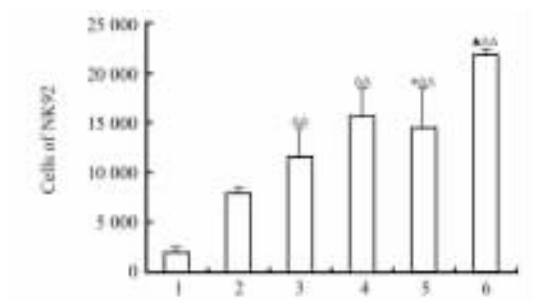


图4 体外趋化试验结果

Fig 4 Chemotaxis experiment of CCL5

1: Blank; 2: Standard; 3: Hep3B normoxia; 4: HepG2 normoxia; 5: Hep3B hypoxia; 6: HepG2 hypoxia. * $P < 0.05$ vs Hep3B normoxia; ▲ $P < 0.05$ vs HepG2 normoxia; △△ $P < 0.01$ vs Blank; $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

RANTES(CCL5)因子^[4]是一种相对分子质量为 8 000 的细胞因子,对参与免疫/炎症反应的细胞,如淋巴细胞、单核/巨噬细胞具有明显的趋化活性,并能调节效应细胞的功能^[1-2]。本研究成功构建了携带 CCL5-ODD 融合基因的条件增殖型腺病毒 SG511-CCL5-ODD,采用人端粒酶逆转录酶(hTERT)启动子及重组的缺氧反应元件(HRE)启动子来分别调控腺病毒的 E1A 及 E1B 基因,使病毒在肿瘤细胞中特异性复制,从而达到广谱、特异、安全、高效的抗癌效果^[5]。因为重组腺病毒具有 11 型腺病毒的纤毛,与 5 型腺病毒相比能有效逃脱免疫系统的监控^[6],更好地靶向肿瘤细胞甚至肿瘤干细胞^[7-8]。

通过病毒增殖曲线可以说明病毒在肿瘤细胞中的增殖能力。本研究结果表明,SG511-CCL5-ODD 在多种实体瘤细胞中均有良好的增殖能力,特别在 Hep3B 中,增殖倍数高达 316 000 倍,但在人正常皮肤成纤维细胞 BJ 中增殖较少(96 h 的增殖倍数为 246 倍),证明该病毒 hTERT 启动子及 HRE 启动子可有效发挥调控作用,使之具有良好的肿瘤靶向性及安全性。

本研究应用 ELISA 法检测不同肿瘤细胞感染 SG511-CCL5-ODD 和 AD5/11-CCL5-ODD 后 RANTES 蛋白的表达量,发现在常氧与缺氧两种条件下相同 MOI 值及相同时间段 SG511-CCL5-ODD 病毒 RANTES 蛋白的表达量均显著高于 AD5/11-CCL5-ODD($P < 0.05$),证实增殖型腺病毒 SG511-CCL5-

ODD 比非增殖型 AD5/11-CCL5-ODD 具有更强的特异性增殖和表达基因的能力。而无论是增殖型腺病毒还是非增殖型腺病毒在缺氧条件下 RANTES 蛋白表达量均高于常氧条件,证明在 ODD 基因的调控下,RANTES 蛋白在常氧条件下被部分降解,达到了调控的目的。

趋化试验是一种证明趋化因子趋化效应的有效方法,本研究通过与标准的 RANTES 及空白对照进行比较,可以发现病毒在肝癌细胞中能高效表达 RANTES 蛋白并且对 NK92 细胞具有较强的趋化效应。同时由于 RANTES 基因受 ODD 基因的调控,在缺氧条件下感染 SG511-CCL5-ODD 的肝癌细胞上清可以更有效地趋化 NK92 细胞。结果证实 RANTES 蛋白是 NK92 细胞的强趋化剂。肿瘤局部高浓度的 RANTES 蛋白可趋化免疫细胞向肿瘤组织局部浸润,使肿瘤组织周围保持有高浓度的免疫细胞,这对于肿瘤的生物治疗极为重要。

[参考文献]

- [1] Kudo T, Lu H, Wu J Y, Graham D Y, Casola A, Yamaoka Y. Regulation of RANTES promoter activation in gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*[J]. *Infect Immun*, 2005, 73:7602-7612.
- [2] Chen C J, Chen J H, Chen S Y, Liao S L, Raung S L. Upregulation of RANTES gene expression in neuroglia by Japanese encephalitis virus infection[J]. *J Virol*, 2004, 78:12107-12119.
- [3] Kim D H, Lee S H, Chi S W, Nam K H, Han K H. Backbone resonance assignment of a proteolysis-resistant fragment in the oxygen-dependent degradation domain of the hypoxia inducible factor 1alpha[J]. *Mol Cells*, 2009, 27:493-496.
- [4] Schall T J, Jongstra J, Dyer B J, Jorgensen J, Clayberger C, Davis M M, et al. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family[J]. *J Immunol*, 1988, 141:1018-1025.
- [5] Zhang Q, Chen G, Peng L, Wang X, Yang Y, Liu C, et al. Increased safety with preserved antitumoral efficacy on hepatocellular carcinoma with dual-regulated oncolytic adenovirus[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12:6523-6531.
- [6] Lemckert A A, Sumida S M, Holterman L, Vogels R, Truitt D M, Lynch D M, et al. Immunogenicity of heterologous prime-boost regimens involving recombinant adenovirus serotype 11 (Ad11) and Ad35 vaccine vectors in the presence of anti-ad5 immunity[J]. *J Virol*, 2005, 79:9694-9701.
- [7] Yotnda P, Zompeta C, Heslop H E, Andreeff M, Brenner M K, Marini F. Comparison of the efficiency of transduction of leukemic cells by fiber-modified adenoviruses[J]. *Hum Gene Ther*, 2004, 15:1229-1242.
- [8] Stone D, Ni S, Li Z Y, Gaggari A, DiPaolo N, Feng Q, et al. Development and assessment of human adenovirus type 11 as a gene transfer vector[J]. *J Virol*, 2005, 79:5090-5104.

[本文编辑] 贾泽军