

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00668

蛇毒半胱氨酸蛋白酶抑制剂重组腺病毒对人肝癌细胞 MHCC97H 侵袭转移的影响

谢 群^{1△}, 唐南洪^{2,3△}, 林扬元¹, 林建银^{2*}

1. 福建省莆田学院基础医学院, 莆田 351100
2. 福建医科大学分子医学研究中心, 消化道恶性肿瘤教育部重点实验室, 福州 350004
3. 福建医科大学附属协和医院肝胆外科研究所, 福州 350001

[摘要] **目的** 构建携带蛇毒半胱氨酸蛋白酶抑制剂(*sv-cystatin*)基因的重组腺病毒载体(Ad/*sv-cystatin*),研究其对人肝癌细胞 MHCC97H 在体内、外侵袭转移的影响。**方法** 构建携带 *sv-cystatin* 的重组腺病毒,体外感染 MHCC97H 细胞,采用 CCK-8 法检测细胞生长,Transwell 小室检测细胞侵袭和迁移能力,通过裸鼠皮下肝癌细胞肺转移模型观察 Ad/*sv-cystatin* 瘤内注射对裸鼠的治疗作用。**结果** 体外实验证实 Ad/*sv-cystatin* 能够感染 MHCC97H 细胞。与对照组及空载体组相比,Ad/*sv-cystatin* 对 MHCC97H 细胞体外生长、侵袭和迁移均具有明显的抑制作用,瘤内注射 Ad/*sv-cystatin* 可以显著降低 MHCC97H 细胞的肺转移。**结论** 重组腺病毒 Ad/*sv-cystatin* 具有抑制人肝癌细胞 MHCC97H 体内外侵袭转移的作用,在肝癌基因治疗方面具有开发应用潜能。

[关键词] 蛇毒半胱氨酸蛋白酶抑制剂;腺病毒;肝细胞癌;肿瘤侵袭;肿瘤转移

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)06-0668-04

Effect of recombinant adenovirus harboring snake venom cystatin on invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells MHCC97H

XIE Qun^{1△}, TANG Nan-hong^{2,3△}, LIN Yang-yuan¹, LIN Jian-yin^{2*}

1. School of Basic Medical Science, Putian University, Putian 351100, Fujian, China
2. Research Center of Molecular Medicine, Key Laboratory of Ministry of Education for Gastrointestinal Cancer, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian, China
3. Hepatobiliary Surgery Institute, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian, China

[Abstract] **Objective** To construct recombinant adenovirus harboring snake venom cystatin (Ad/*sv-cystatin*) and to investigate its effect on invasion and metastasis (*in vivo* and *in vitro*) of human hepatocellular carcinoma (HCC) MHCC97H cells. **Methods** The recombinant Ad/*sv-cystatin* harboring *sv-cystatin* was constructed to infect MHCC97H cells. Then the growth of MHCC97H cells was assessed by CCK-8. Transwell matrigel assay was used to assess MHCC97H cell migration and invasiveness *in vitro*. Spontaneous lung metastasis assays were used to examine the effects of Ad/*sv-cystatin* on the invasion and metastasis of MHCC97H cells *in vivo*. **Results** Recombinant Ad/*sv-cystatin* harboring *sv-cystatin* gene could infect MHCC97H cells. Ad/*sv-cystatin* significantly inhibited the growth, migration and invasion of MHCC97H cells *in vitro* compared with control and Ad/null groups. Intra-tumoral injection of Ad/*sv-cystatin* significantly inhibited the lung metastasis of MHCC97H cells in nude mice compared with control and Ad/null-treated mice. **Conclusion** It is indicated that recombinant Ad/*sv-cystatin* can suppress MHCC97H cell growth, invasion and metastasis *in vitro* and *in vivo*, showing a potential for gene therapy of HCC.

[Key words] snake venom cystatin; adenovirus; hepatocellular carcinoma; neoplasm invasiveness; neoplasm metastasis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(6):668-671]

[收稿日期] 2013-09-19 **[接受日期]** 2014-02-26

[基金项目] 国家自然科学基金(30371747),福建省教育厅资助省属高校科研专项(JK2011050),莆田市科技计划项目[2012S11(1)],福建省自然科学基金指导性科技计划项目(2012D117). Supported by National Natural Science Foundation of China (30371747), Special Scientific Foundation for Higher Institutions of the Education Department of Fujian Province (JK2011050), Science and Technology Project of Putian City [2012S11(1)], and Guiding Sci-Tech Research Project of Natural Science Foundation of Fujian Province (2012D117).

[作者简介] 谢 群,博士,副教授. E-mail: xqptu@163.com;唐南洪,博士,教授. E-mail: fztmh@sina.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0591-83569132, E-mail: jylin@mail.fjmu.edu.cn

肿瘤基因治疗被认为是除了手术、放疗和化疗之外的第4种治疗手段^[1]。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是仅次于肺癌和结肠癌的第三大常见癌症^[2],探讨HCC的基因治疗具有重要意义。蛇毒半胱氨酸蛋白酶抑制剂(snake venom cystatin, sv-cystatin)是从眼镜蛇(*Naja naja atra*)蛇毒中分离纯化的一种新型小分子蛋白质。我们前期通过基因工程合成 sv-cystatin 全基因,利用毕氏酵母系统表达生产 sv-cystatin 重组蛋白,证实了该蛋白可以抑制肿瘤细胞体内外侵袭转移^[3],并通过基因转染技术证实 sv-cystatin 能够抑制多种肿瘤细胞侵袭转移,推测其具有基因治疗潜能^[4]。为了进一步探讨 sv-cystatin 在基因治疗中的作用,本研究拟构建 sv-cystatin 重组腺病毒载体,探讨其对肝癌细胞 MHCC97H 体内外侵袭转移的影响,为 sv-cystatin 在 HCC 基因治疗方面的开发应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

限制性内切酶 *Sal* I、*Xho* I、*Pme* I 和 *Pac* I 购自 Biolab 公司;脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。腺病毒纯化试剂盒 AdEasy™ Virus Purification 购自 Stratagene 公司。兔抗 sv-cystatin 由上海超世生物科技有限公司生产。纤维连接蛋白(fibronectin, FN)、基底膜基质胶(matrigel)、Transwell 侵袭小室(Corning Costar 3422 型,孔径 8.0 μm)均购自 BD 公司。

1.2 质粒、细胞系和动物

腺病毒载体 pShuttle-IRES-hrGFP-1 和 QBI-293A 细胞购自 Stratagene 公司,人肝癌细胞 MHCC97H 购自复旦大学肝癌研究所,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液进行培养。SPF 级裸鼠 24 只,体质量(18±2) g,雄性,购自上海斯莱克实验动物有限公司,生产许可证号:[SCXK(沪)2007-0005]。

1.3 pAd-sv-cystatin 重组腺病毒 DNA 的构建

从本室保存的 pUC18-cystatin 质粒^[5]中扩增 sv-cystatin 基因并克隆入 pShuttle-IRES-hrGFP-1 载体,正向引物 CystatinAdF 序列为:5'-ACG CGT CGA CGC ATG ATC CCA GGT GGT TTG TCT C-3' (含 *Sal* I 酶切位点),反向引物 CystatinAdR 序列为:5'-CCG CTC GAG CCA AAC TTG GAA ACC ACA C-3' (含 *Xho* I 酶切位点)。获得的重组载体以双酶切和测序鉴定,命名为 pShuttle-IRES-hrGFP-sv-cystatin。以 *Pme* I 酶切线性化重组载体,产物转化 BJ5183-Ad-1 感受态菌,提取质粒,将用 *Pac* I 酶切鉴定正确的重组子命名为 pAd-sv-cystatin,转化入感受

态菌 XL-10Gold 以获得质粒 DNA。用相同方法以空载体 pShuttle-IRES-hrGFP 构建 pAd-null。

1.4 重组腺病毒 Ad/sv-cystatin 包装、扩增及滴度测定

按 4×10^6 个/10 cm 直径培养皿接种 QBI-293A 细胞,24 h 后,采用 Lipofectamine 2000 转染线性化 pAd-sv-cystatin 质粒(6 μg/培养皿)。荧光显微镜下观察绿色荧光(GFP),当 50% 细胞变圆漂浮时,回收所有细胞及培养液,并在 37℃/−80℃ 反复冻融 3 次,离心后,收集上清获原代病毒,经扩增 3 代后获取第 4 代病毒备用。采用感染复数[multiplicity of infection, MOI] 计算病毒滴度。用同样方法制备对照重组腺病毒 Ad/null。获得的重组腺病毒按照 AdEasy™ 病毒纯化试剂盒说明书进行纯化浓缩。

1.5 Ad/sv-cystatin 感染 MHCC97H 细胞

MHCC97H 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔培养板内,加入不同 MOI 值的重组病毒液。以培养 3 d 时所有细胞均表达 GFP 作为最适感染 MOI 值。以最适 MOI 分别加入 Ad/sv-cystatin 和 Ad/null 腺病毒,同时设置未感染对照组,用蛋白质印迹法验证蛋白表达。

1.6 Ad/sv-cystatin 对 MHCC97H 细胞生长能力的影响

MHCC97H 细胞以 2×10^3 个/孔接种于 96 孔培养板中,待细胞融合后分别加入相应最适 MOI 的 Ad/sv-cystatin 和 Ad/null 腺病毒,设立未感染对照组。连续 3 d 每隔 24 h 每孔加 10 μL 的 CCK-8,30 min 后于 BioRad550 型酶标仪测定,读取 450 nm 波长处光密度值。

1.7 Ad/sv-cystatin 对 MHCC97H 细胞侵袭迁移能力的影响

Transwell 小室聚碳酸酯膜外侧包被 10 μL 的 FN(0.5 g/L),内侧包被 20 μg 的 matrigel 胶。小室内分别加入 1×10^5 个 Ad/sv-cystatin 及 Ad/null 感染后的 MHCC97H 细胞,设置未感染对照组,下室加 800 μL 含 10% FBS 的细胞培养液,24 h 后用棉签擦净上室膜面未穿膜的细胞及 matrigel,未感染对照组行 H-E 染色后观察,Ad/sv-cystatin 及 Ad/null 组于荧光显微镜下观察,分别计数 5 个视野的侵袭细胞数,取其平均值。观察迁移能力时,小室膜内侧不包被 matrigel 胶,余步骤同侵袭能力测定。侵袭(迁移)抑制率(%)=[1−实验组侵袭(迁移)细胞数/对照组侵袭(迁移)细胞数]×100%。

1.8 Ad/sv-cystatin 对裸鼠肝癌肺转移的影响

用生理盐水稀释 MHCC97H 细胞至 5×10^7 个/mL,在每只裸鼠右上肢腋下皮内注射 0.2 mL(细胞数 1×10^7)。10 d 后随机分为 3 组,每组 8 只,分别在注射瘤细胞第 10、13、16、19 天向瘤体内注射 0.9% NaCl(对照组,NS)、Ad/null 空病毒(1×10^8 pfu)和 Ad/sv-cys-

tatin 腺病毒(1×10^8 pfu),每只注射体积为 $100 \mu\text{L}$ 。造模后6周处死裸鼠,取各组原位瘤组织称量;取各组肺组织经 H-E 染色后镜检,计数各组的肺转移灶,肿瘤转移抑制率($\%$)=(对照组平均转移数-治疗组平均转移数)/对照组平均转移数 $\times 100\%$ 。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 获得重组腺病毒 获得的重组质粒 pAd-sv-cystatin 及 pAd-null 经 *Pac* I 酶切后电泳鉴定出现 4.5 kb 条带的为正确克隆,表明腺病毒质粒同源重组成功。Ad/null 和 Ad/sv-cystatin 重组腺病毒感染 MHCC97H 细胞 3 d 时均表达 GFP,MOI 值分别为 50、100;MHCC97H 细胞对重组腺病毒敏感,100 MOI 可实现 100% 感染。蛋白质印迹鉴定显示 Ad/sv-cystatin 感染 MHCC97H 细胞后能表达 sv-cystatin 蛋白。详见图 1。

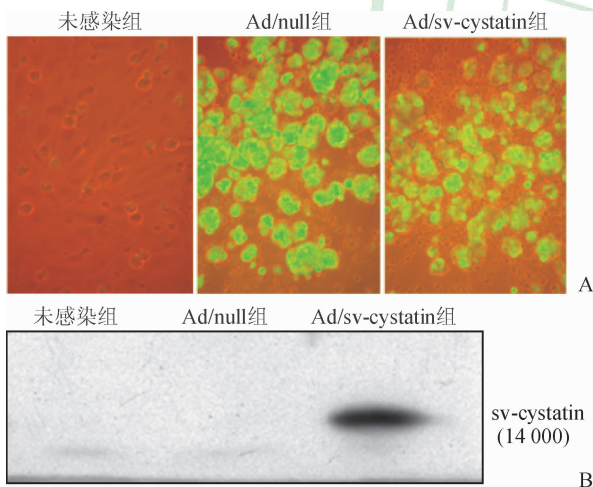


图 1 重组腺病毒 Ad/sv-cystatin 感染 MHCC97H 细胞的绿色荧光(GFP)和 sv-cystatin 蛋白表达

A: Ad/sv-cystatin 感染 MHCC97H 细胞 GFP 表达。Original magnification: $\times 100$; B: Ad/sv-cystatin 感染 MHCC97H 细胞后 sv-cystatin 蛋白的表达

2.2 Ad/sv-cystatin 对 MHCC97H 细胞生长的抑制作用 由图 2 可见,与未感染组及 Ad/null 组相比,Ad/sv-cystatin 在作用 24、48、72 h 时对 MHCC97H 细胞生长均具有明显的抑制作用($P < 0.05$)。

2.3 Ad/sv-cystatin 对 MHCC97H 细胞侵袭和迁移能力的抑制作用 细胞侵袭实验发现,Ad/sv-cystatin 作用 24 h 后穿越 matrigel 的 MHCC97H 细胞数目明显低于未感染对照组和 Ad/null 感染组,

抑制率分别是 55% 和 52%。细胞迁移实验发现,Ad/sv-cystatin 感染组穿过 FN 至小室滤膜下表面的细胞明显低于未感染对照组和 Ad/null 感染组,抑制率分别是 24% 和 20%。

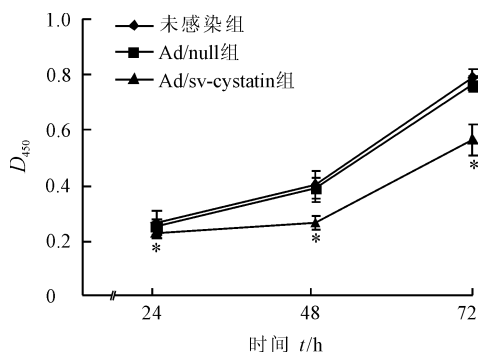


图 2 重组腺病毒 Ad/sv-cystatin 对 MHCC97H 细胞生长的抑制作用

* $P < 0.05$ 与未感染组和 Ad/null 组比较. $n = 5, \bar{x} \pm s$

2.4 Ad/sv-cystatin 对裸鼠移植瘤体内转移能力的抑制作用 造模 6 周后,Ad/null 和生理盐水(NS)组裸鼠肺部可见较多较大的肿瘤转移灶,Ad/sv-cystatin 组肺转移灶数明显减少,与 NS 和 Ad/Null 组比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$);与 NS 和 Ad/null 组比较,Ad/sv-cystatin 组的转移抑制率分别为 30% 和 28%。Ad/sv-cystatin 治疗后的原位瘤组织质量虽有所下降,但与 NS 和 Ad/null 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见图 3。

3 讨论

Sv-cystatin 是一种新型的 II 型 cystatin,其氨基酸序列的保守区与 II 型 cystatin(如 cystatin C)十分相似,即具有 N 端的 Gly 序列和中部 Gln-Xaa-Val-Xaa-Gly 的 cystatin 基序^[6],且都具有对半胱氨酸蛋白酶活性的调控作用,实验证实 sv-cystatin 具有与 cystatin C 等相似的抗肿瘤作用^[4,7]。Kopitz 等^[8]采用携带 cystatin C 的腺病毒感染人纤维肉瘤细胞所致的肺转移,与空腺病毒相比大大降低了裸鼠的肺转移。本实验成功构建了携带 sv-cystatin 基因的重组载体,获得重组腺病毒 Ad/sv-cystatin,并证实 Ad/sv-cystatin 具有抗肿瘤作用。

本研究将 Ad/sv-cystatin 直接感染处理 MHCC97H 细胞后,细胞的生长、迁移和侵袭等生物学特性即能受到明显抑制。采用瘤内注射腺病毒来观察对裸鼠的实验性治疗效果,发现肝癌细胞的肺转移得到有效抑制,进一步证明了 Ad/sv-cystatin 对 MHCC97H 细胞侵袭转移的抑制作用。我们的前期

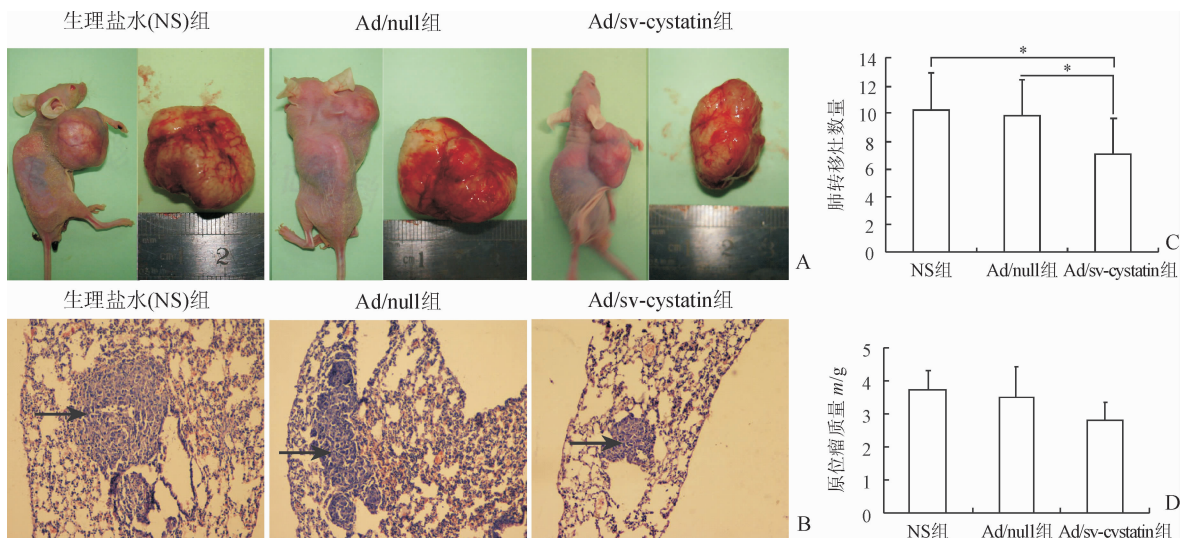


图3 重组腺病毒 Ad/sv-cystatin 治疗对荷瘤裸鼠的影响

A: 造模结束后的裸鼠和原位肿瘤组织; B: 裸鼠肺转移灶(箭头所示)(H-E染色, Original magnification: $\times 200$); C: 各组间肺转移灶数量的比较; D: 各组间原位瘤质量的比较. * $P < 0.05$. $n = 8, \bar{x} \pm s$

研究曾探讨过 sv-cystatin 抑瘤作用机制的多样性, 可能与抑制肿瘤细胞黏附、血管生成、信号转导、细胞免疫和细胞凋亡等紧密相关^[4,7,9]。瘤内注射若能抑制肿瘤生长可能与基因作用于肿瘤细胞致使其出现变性坏死或细胞凋亡等机制有关, 本实验中 Ad/sv-cystatin 对瘤内肝癌细胞生长的抑制作用不明显可能与其作用机制较复杂等因素相关, 也可能存在腺病毒表达目的蛋白时效较短等方面的原因。

我们后续研究将着手对现有的腺病毒载体进行改造, 如插入分泌信号肽, 利用腺病毒的嗜肝细胞特性引导 sv-cystatin 蛋白从感染的肝细胞分泌; 或是改变重组 Ad/sv-cystatin 腺病毒载体的启动子为 AFP 组织特异启动子, 使 sv-cystatin 蛋白只能靶向于分泌 AFP 的肝癌细胞, 以期达到更为贴近临床试验的目的; 同时也将尝试增加瘤内给药的次数、或是采用瘤内和静脉同时注射的方式来进一步提高治疗效果; 当然, 还将对 Ad/sv-cystatin 抑瘤作用机制进行深入探讨以期寻找 sv-cystatin 抗肿瘤作用的新靶点, 为开发应用提供更丰富的实验依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Yan F, Zheng Y, Huang L. Adenovirus-mediated combined anti-angiogenic and pro-apoptotic gene therapy enhances antitumor efficacy in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5: 348-354.
- [2] Wei Z, Doria C, Liu Y. Targeted therapies in the treat-

ment of Advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Med Insights Oncol*, 2013, 20: 87-102.

- [3] Xie Q, Tang N, Wan R, Qi Y, Lin X, Lin J. Recombinant snake venom cystatin inhibits the growth, invasion and metastasis of B16F10 cells and MHCC97H cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Toxicol*, 2011, 57: 704-711.
- [4] Tang N, Xie Q, Wang X, Li X, Chen Y, Lin X, et al. Inhibition of invasion and metastasis of MHCC97H cells by expression of snake venom cystatin through reduction of proteinases activity and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34: 781-789.
- [5] 宋军, 万榕, 翁绳美, 林旭, 林建银. 蛇毒 cystatin 基因合成及其在大肠杆菌的表达 [J]. *福建医科大学学报*, 2004, 38: 241-245.
- [6] Brillard-Bourdet M, Nguyen V, Ferrer-di Martino M, Gauthier F, Moreau T. Purification and characterization of a new cystatin inhibitor from Taiwan cobra (*Naja naja atra*) venom [J]. *Biochem J*, 1998, 331: 239-244.
- [7] Xie Q, Tang N, Wan R, Qi Y, Lin X, Lin J. Recombinant snake venom cystatin inhibits tumor angiogenesis *in vitro* and *in vivo* associated with downregulation of VEGF-A165, Flt-1 and bFGF [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13: 663-671.
- [8] Kopitz C, Anton M, Gansbacher B, Krüger A. Reduction of experimental human fibrosarcoma lung metastasis in mice by adenovirus-mediated cystatin C expression in the host [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 8608-8612.
- [9] 谢群, 万榕, 林旭, 林建银. 蛇毒半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因转染对小鼠黑色素瘤 B16F1 细胞基因表达谱的影响 [J]. *癌症*, 2008, 27: 716-22.

[本文编辑] 徐佳