

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00332

## Akt 重组腺病毒载体的构建及其对肝癌细胞生存的影响

陈可和<sup>1△\*</sup>, 韩泽龙<sup>2△</sup>, 李建军<sup>3</sup>, 潘金飞<sup>1</sup>, 刘安玲<sup>2</sup>

1. 广西壮族自治区人民医院临床肿瘤中心, 肝胆腺体外科, 南宁 530021

2. 南方医科大学基础医学院细胞生物学教研室, 广州 510515

3. 解放军总政治部机关门诊部保健科, 北京 100120

**[摘要]** **目的** 构建携带 Akt 基因的重组腺病毒载体, 初步研究其对肝癌细胞生存的影响。 **方法** 分别将 Akt-wt 及 Akt-dn 基因亚克隆至穿梭质粒 pacAd5 CMV-K-NpA, 采用 RAPAd<sup>®</sup> CMV 腺病毒表达系统构建重组腺病毒并用 PCR 鉴定, 以蛋白质印迹检测 Akt 及其下游 GSK3 $\beta$ 、p-GSK3 $\beta$  的表达, 后将 Akt 重组腺病毒感染肝癌 SK-HEP-1 细胞, 检测血清饥饿 24 h 后细胞存活情况。 **结果** 酶切 pacAd5 CMV-Akt-wt 和 pacAd5 CMV-Akt-dn 均获得大小为 6 kb 和 1.44 kb (Akt) 的两个片段。PCR 扩增得到 1.44 kb 左右的条带。蛋白质印迹结果显示两组中 p-GSK3 $\beta$  表达有明显差别, 肝癌 SK-HEP-1 细胞存活率在感染 pacAd5 CMV-Akt-dn 组较感染 Akt-wt 腺病毒组明显降低。 **结论** 成功构建了 Akt-wt 及 Akt-dn 基因重组腺病毒载体, 并初步发现其有促进肝癌细胞死亡作用, 为体内外进一步研究 Akt 基因及其相关信号通路在肝癌发生发展中的作用奠定了基础。

**[关键词]** Akt; 腺病毒; SK-HEP-1 细胞; 肝细胞癌**[中图分类号]** R 735.7**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2012)03-0332-04

### Construction of recombinant adenovirus vectors containing Akt gene and its effect on survival of hepatic cancer cells

CHEN Ke-he<sup>1△\*</sup>, HAN Ze-long<sup>2△</sup>, LI Jian-jun<sup>3</sup>, PAN Jin-fei<sup>1</sup>, LIU An-ling<sup>2</sup>

1. Clinical Oncology Center, Department of Hepatobiliary Pancreatic Surgery, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi, China

2. Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

3. Department of Health Care, Clinic of Outpatients, PLA General Political Department, Beijing 100120, China

**[Abstract]** **Objective** To construct a recombinant adenovirus encoding the Akt gene and to investigate its influence on the survival of hepatic cancer patients. **Methods** The Akt-wt and Akt-dn genes were subcloned into pacAd5 CMV-K-NpA plasmid separately, and then the adenoviral recombinant adenovirus encoding the Akt gene was constructed with the RAPAd<sup>®</sup> CMV Adenoviral Expression System and was identified by PCR. The expression of Akt, GSK3 $\beta$  and p-GSK3 $\beta$  protein was detected by Western blotting analysis. SK-HEP-1 cells were infected with pacAd5 CMV-Akt-wt, pacAd5 CMV-Akt-dn and pacAd5 CMV-GFP, respectively. The cell survival was observed under fluorescence microscope after 24 h-starvation. **Results** pacAd5 CMV-Akt-wt and pacAd5 CMV-Akt-dn were enzymatically digested into two fragments (6 kb and 1.44 kb). PCR result of the viral supernatant yielded a band of about 1.44 kb. Western blotting analysis showed p-GSK3 $\beta$  expression in the Akt-wt group was stronger than that in the Akt-dn group. The survival rate of the SK-HEP-1 cells significantly decreased in the Akt-dn group than in the Akt-wt group. **Conclusion** We have successfully constructed the recombinant adenoviruses pacAd5-Akt-wt and pacAd5-Akt-dn, and they have pro-death effect in hepatic cancer cells, which paves a way for further studying Akt gene and the related signal pathway in hepatocellular carcinoma.

**[Key words]** Akt; adenovirus; SK-HEP-1 cells; hepatocellular carcinoma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(3):332-335]

**[收稿日期]** 2012-01-02 **[接受日期]** 2012-02-29**[基金项目]** 国家自然科学基金(30870955). Supported by National Natural Science Foundation of China(30870955).**[作者简介]** 陈可和, 硕士, 副主任医师。

△共同第一作者(Co-first authors).

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0771-2186337, E-mail: ckhxy@163.com

近年来的研究表明,肌醇三磷酸激酶(phosphoinositide 3 kinase, PI3K)/Akt 信号通路是肿瘤生物信息网络中最重要的信息通路之一,其过度激活可引起正常细胞过度增殖,使细胞存活失去抑制,进而促使正常细胞恶性转化为肿瘤细胞<sup>[1-2]</sup>。同时,该通路有促进肿瘤进一步发展的能力,可通过提高肿瘤细胞的运动能力、调节生长因子受体的激活、降低细胞间的黏附力,对恶性肿瘤浸润、转移发挥重要作用<sup>[3]</sup>。Akt 又称为蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB),磷脂酰肌醇依赖性激酶 1(phosphoinositide-dependent kinase-1, PDK1)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 2(mammalian target of rapamycin complex 2, mTOR C2)可分别使其第 308 位上的苏氨酸位点(Thr 308)和第 473 位上的丝氨酸位点(Ser 473)发生磷酸化而被激活。Akt 可通过磷酸化多种底物如 mTOR、P21Cip1/WAF1、GSK3、Foxo 等,进而促进肿瘤细胞生长增殖并抑制肿瘤细胞凋亡<sup>[4]</sup>。Akt 的第 473 位丝氨酸突变后(S473A)无活性,且可竞争性地抑制内源性 Akt 的活性。因此 Akt (S473A)突变体可作为 dominant negative (DN)用于研究 Akt 的功能<sup>[5]</sup>。腺病毒载体是重要的转基因病毒载体,具有转染效率高、感染细胞范围广、病毒滴度高、可感染细胞周期中静止期和分裂期细胞、可高效介导基因的体内外转移等优点<sup>[6-7]</sup>。本研究采用 Cell BioLabs 公司的复制缺陷型腺病毒作为基因表达载体,构建携带野生型 Akt-wt 及抑制型 Akt-dn 的腺病毒,将其作用于人肝癌 SK-HEP-1 细胞株,观察其感染能力、下游蛋白表达及肝癌细胞死亡情况,为将来研究 Akt 基因对肝癌细胞的作用提供更为方便的工具。

## 1 材料和方法

1.1 质粒、菌株与细胞株 大肠杆菌 TOP10 感受态细胞及携带 Akt-wt 及 Akt-dn 基因的原始质粒 pCDNA3.1-flag-Akt-wt 和 pCDNA3.1-flag-Akt-dn(南方医科大学基础医学院细胞生物学教研室保存);穿梭质粒 pacAd5 CMVK-NpA、重组穿梭质粒 pacAd5 CMV-GFP、腺病毒骨架载体 pacAd5 9.2-100(New England Biolabs 公司);肝癌 SK-HEP-1 细胞株、病毒包装细胞 HEK-293 AD(南方医科大学基础医学院细胞生物学教研室保存);人乳腺癌 MCF-7 细胞株(中国科学院上海细胞库)。

1.2 酶及其他生化试剂 限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 和 *Pac* I (New England Biolabs 公司);*T*<sub>4</sub> DNA 连接酶、DNA 纯化回收试剂盒、250 bp DNA Ladder Marker (TaKaRa 公司);1 kb plus DNA Ladder[天根生化科技(北京)有限公司];质粒 DNA 小/中量提取试剂盒(深圳市易瑞生物技术有限公司);脂质体 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen 公司);DMEM 高糖细胞培养基[赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司];胎牛血清(Gibco 公司);病毒纯化试剂盒(Cell BioLabs 公司);Akt (cat# 2966)、 $\beta$ -actin (cat# 4970)与 p-GSK3 $\beta$ (S9) (cat# 9323)抗体购自 Cell Signaling Biotechnology;硝酸纤维素膜(NC 膜, BioRad 公司);ECL 试剂、HRP-免

二抗(Santa Cruz 公司)。PCR 引物合成及测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成,其他试剂均为进口或国产分析纯产品。

1.3 重组质粒 pacAd5 CMV-Akt 的构建与鉴定 分别取 pacAd5 CMVK-NpA 和 pCDNA3.1-flag-Akt-wt 质粒,用 *Hind* III/*EcoR* I 双酶切后,琼脂糖凝胶电泳回收、纯化,*T*<sub>4</sub> DNA 连接酶 16℃定向连接 12 h,取 10  $\mu$ l 连接产物转化 TOP10 感受态细胞,涂布到 Ampicillin 抗性固体培养基平皿,挑取若干单克隆菌落,接种到 Ampicillin 抗性液体培养基中,培养 12 h,随机挑选 Ampicillin 抗性菌落扩增后小量提取质粒,用 *Hind* III/*EcoR* I 双酶切鉴定,得到 6 kb 和 1.44 kb 大小的条带。同样的方法获得 pacAd5 CMV-Akt-dn。

1.4 pacAd5-GFP 和 pacAd5-Akt 重组腺病毒的包装、扩增与纯化 转染前一天将 HEK-293 AD 细胞接种于 60 mm 培养皿中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中过夜。分别取 pacAd5 CMV-GFP 和经 *Pac* I 酶切线性化的 pacAd5 9.2-100 质粒,去除 pacAd5 9.2-100 质粒中的 ori 和 Amp 抗性基因等质粒构件,16~24 h 后待培养皿中细胞覆盖 70%~80%时, Lipofectamine™ 2000 脂质体共转染 HEK-293 AD 细胞,当 HEK-293 AD 细胞出现完全细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)时,收获 HEK-293 AD 细胞,-80℃与 37℃反复冻融 3 次获得 pacAd5-GFP 第一代腺病毒。按上述方法将第一代腺病毒反复感染 HEK-293 AD 细胞进行腺病毒扩增、纯化,-70℃冻存备用。同样的方法获得 pacAd5-Akt-wt 和 pacAd5-Akt-dn 腺病毒。

1.5 pacAd5-Akt 重组腺病毒的 PCR 扩增及鉴定 纯化 pacAd5-Akt 病毒上清液 5  $\mu$ l,与 1  $\mu$ l 蛋白酶 K(20 g/L)在 55℃的温水中水浴 1 h,100℃煮沸 5 min,高速离心后取 1  $\mu$ l 上清稀释液为模板,PCR 扩增 Akt DNA:上、下游引物为 pacAd5 CMV myr-Akt1 5'-*Hind* III-ccg AAG CTT ATG GGG AGC AGC AAG AGC AAG CCC AAG 和 pacAd5 CMV-myr-Akt1 3'-*EcoR* I-Agc att GAA TTC TCA GGC TGT GCC ACT GGC TGA GT。扩增产物为 1.44 kb,反应条件为 94℃预变性 5 min,94℃变性 1 min,58℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,30 个循环,最后在 72℃延伸 10 min,PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.6 Akt 及其下游蛋白的表达及免疫印迹鉴定 MCF-7 细胞接种于 6 孔板中,5 $\times$ 10<sup>6</sup>/孔,细胞铺至 80%~90%,加入上述制备好的重组腺病毒(包括对照病毒及 PBS),转染后 48 h 荧光显微镜下观察 GFP 的表达。培养 48 h 后收集细胞,细胞裂解液处理细胞,离心后取上清,BCA 法测定蛋白质含量,10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白电转至 NC 膜上,封闭液封闭后,加入 Akt 单克隆抗体结合(或  $\beta$ -actin 多克隆抗体),之后用 HRP 标记的二抗结合,ECL 法显色后照相。

1.7 Akt 重组腺病毒感染肝癌 SK-HEP-1 细胞后肝癌细胞存活情况观察 SK-HEP-1 细胞接种于 12 孔板中,接种密度为 30%,待细胞贴壁后,分别加入 pacAd5 CMV-Akt-wt、pacAd5 CMV-Akt-dn、pacAd5 CMV-GFP 重组腺病毒,待培养皿

中细胞覆盖 60%~70% 时,去除培养基,用不含血清的 DMEM 培养基漂洗 2~3 遍后,加入不含血清的 DMEM 培养,饥饿处理 24 h 后,倒置荧光显微镜下观察细胞死亡情况。

## 2 结果

2.1 重组质粒 pacAd5 CMV-Akt 的鉴定 重组质粒 pacAd5 CMV-Akt-wt 和 pacAd5 CMV-Akt-dn 经 *Hind* III/*Eco*R I 双酶切后均获得大小约为 6 kb 和 1.44 bp(Akt) 的两个片段(图 1)。

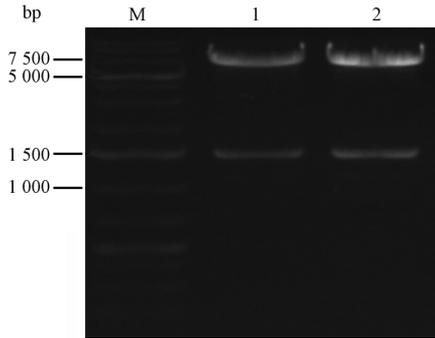


图 1 重组质粒载体 *Hind* III/*Eco*R I 双酶切后鉴定

M: 标记物; 1: pacAd5 CMV-Akt-wt; 2: pacAd5 CMV-Akt-dn

2.2 pacAd5-Akt 重组腺病毒 PCR 鉴定 重组腺病毒经 PCR 扩增,均获得约 1.44 kb 的特异性扩增条带(图 2)。

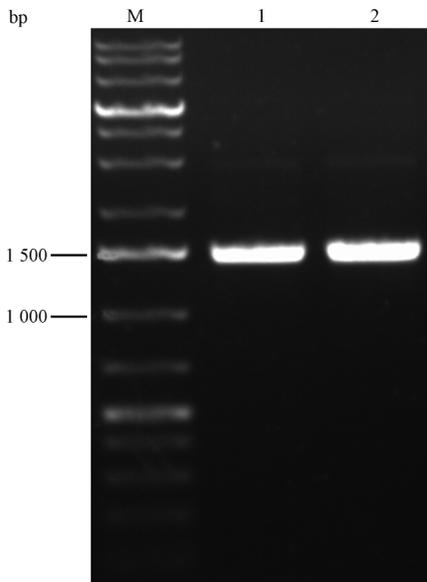


图 2 PCR 法鉴定重组腺病毒

M: 标记物; 1: pacAd5 CMV-Akt-wt; 2: pacAd5 CMV-Akt-dn

2.3 pacAd5-Akt 重组腺病毒的包装与扩增 转染 2 d 后,普通光源与倒置荧光显微镜下显示:HEK-293 AD 细胞中有 GFP 表达,并随时间逐渐增多(图 3)。48 h 后细胞呈现明显的 CPE 现象,表现为:细胞变圆,脱壁、变大,出现明显噬斑(图 4)。

2.4 重组腺病毒 pacAd5-Akt 感染 MCF-7 细胞后 Akt、GSK3 $\beta$  及 p-GSK3 $\beta$  的表达 蛋白质印迹结果显示,pacAd5-

Akt-wt 和 pacAd5-Akt-dn 组 Akt、GSK3 $\beta$  表达无明显差异; pacAd5-Akt-wt 组中 p-GSK3 $\beta$  表达量明显高于 pacAd5-Akt-dn 组(图 5)。

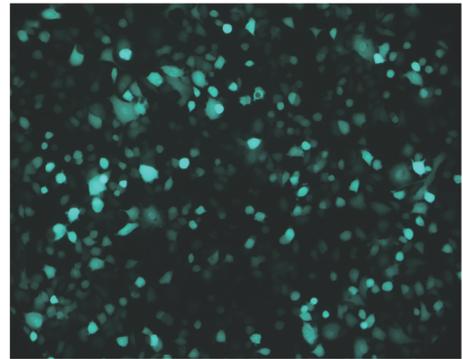


图 3 腺病毒转染 48 h 后 HEK-293 AD 细胞 GFP 表达

Original magnification:  $\times 400$



图 4 病毒感染细胞后出现的细胞病变效应

Original magnification:  $\times 400$

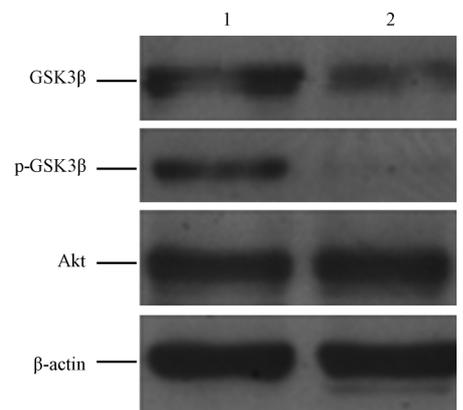


图 5 Akt 重组腺病毒转染 MCF-7 细胞后 Akt、GSK3 $\beta$ 、p-GSK3 $\beta$  的表达

1: pacAd5 CMV-Akt-wt; 2: pacAd5 CMV-Akt-dn

2.5 Akt 重组腺病毒感染肝癌 SK-HEP-1 细胞,饥饿处理 24 h 后细胞死亡观察 在倒置荧光显微镜下对 pacAd5-Akt-dn、pacAd5-GFP 及 pacAd5-Akt-wt 存活细胞(图 6)进行计数,3 组细胞存活率分别为 30%、90%、70%、结果表明 pacAd5-Akt-dn 腺病毒可明显促进肝癌细胞的死亡。

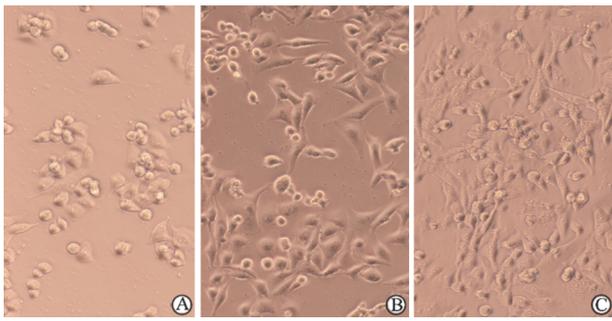


图6 肝癌 SK-HEP-1 细胞感染重组腺病毒后存活情况

A: pacAd5-Akt-dn; B: pacAd5-GFP; C: pacAd5-Akt-wt. Original magnification:  $\times 400$

### 3 讨论

本研究中使用的复制缺陷型腺病毒载体相比其他载体有许多优点:宿主细胞范围广,包括分裂细胞和非分裂细胞;感染效率比较高,可以制备出高滴度的病毒颗粒;产生的重组蛋白不会裂解细胞;通过重组腺病毒导入细胞的目的基因还会整合到宿主细胞的染色体中。因此,该类型载体在基因治疗和临床研究中应用比较广泛<sup>[6]</sup>。Cell BioLabs 公司的 RAPAd<sup>®</sup>腺病毒表达系统提供了一种更加快速、安全的方法,可高滴度地扩增复制缺陷型重组腺病毒。该系统使用一个左边 ITR、包装信号和 E1 序列缺陷的新 Ad 骨架载体,它不需要在细菌中进行同源重组,而且也不需要多板分离,可以 2 周内扩增重组病毒<sup>[8-10]</sup>。

PI3K/Akt 信号通路与多种恶性肿瘤的发生与发展有密切关系<sup>[4,11-13]</sup>。因此,PI3K/Akt 信号通路是癌症治疗中的重要靶点。多种靶向该信号通路的抑制剂已在临床中应用或在临床试验阶段。我们的研究结果初步显示,携带抑制型 Akt(DN)的腺病毒感染肝癌细胞 SK-HEP-1 后,可明显促进血清饥饿引起的 SK-HEP-1 细胞死亡。相反,携带野生型 Akt(wt)的腺病毒感染该细胞后可明显抑制 SK-HEP-1 细胞的死亡。这些结果进一步证明了 Akt 在肿瘤细胞存活中的关键作用,为后续对其参与调控细胞凋亡的相关机制提供了重要线索。本研究中蛋白质印迹结果发现,与 Akt-wt 相比, Akt-dn 对其下游的 p-GSK3 $\beta$  有明显的抑制作用,这与以前的多数报道一致<sup>[14-15]</sup>。这一结果也表明我们构建的这一抑制型 Akt 突变体(Akt dn)腺病毒具有功能活性,这为我们利用这一病毒研究 Akt/p-GSK3 $\beta$  通路及其功能奠定了基础。

### 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] Rohan T E, Li S Q, Hartwick R, Kandel R A. p53 alterations and protein accumulation in benign breast tissue and breast cancer risk; a cohort study[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15:1316-1323.
- [2] Li-Ning-T E, Ronchetti R, Torres-Cabala C, Merino M J. Role of chromogenic *in situ* hybridization (CISH) in the evaluation of HER2 status in breast carcinoma; comparison with immunohistochemistry and FISH[J]. *Int J Surg Pathol*, 2005, 13:343-351.
- [3] Cheng J Q, Godwin A K, Bellacosa A, Taguchi T, Franke T F, Hamilton T C. AKT2, a putative oncogene encoding a member of subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovaria carcinomas[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:9267-9271.
- [4] Manning B D, Cantley L C. AKT/PKB signaling: navigation downstream[J]. *Cell*, 2007, 129:1261-1274.
- [5] Jetzt A, Howe J A, Horn M T, Maxwell E, Yin Z, Johnson D. Adenoviral-mediated expression of a kinase-dead mutant of Akt induces apoptosis selectively in tumor cells and suppresses tumor growth in mice[J]. *Cancer Res*, 2003, 63:6697-6706.
- [6] 李红乐,秦清和,王静珍,邓鹏,李树浓,姜勇.应用细菌同源重组法快速构建和制备重组腺病毒[J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18:1451-1454.
- [7] 罗燕,唐仕波,李湘玆,刘双信.细菌内同源重组高效制备含绿色荧光蛋白和抗凋亡基因 bcl-X<sub>L</sub> 的重组腺病毒载体[J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18:1462-1467.
- [8] Bett A J, Haddara W, Prevec L, Graham F L. Homologous recombination in packaging cell line[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:8802-8806.
- [9] He T C, Zhou S, da Costa L T, Yu J, Kinzler K W. pAdEasy System[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:2509-2514.
- [10] Anderson R D, Haskell R E, Xia H, Roessler B J, Davidson B L. RAPAd System[J]. *Gene Ther*, 2000, 7:1034-1038.
- [11] 刘新奎,王琳,张明智. JNK 与 Akt 通路在夏枯草抑制人淋巴瘤细胞生长中的作用[J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31:452-454.
- [12] Liu X K, Wang L, Zhang M Z. Roles of JNK and Akt pathways in inhibition of lymphoma cells by *Prunella vulgaris*. [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2010, 31:452-454.
- [13] Kim H J, Cui X, Hilsenbeck S G, Lee A V. Progesterone receptor loss correlates with human epidermal growth factor receptor overexpression in estrogen receptor positive breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12:1013-1018.
- [14] 黄宪章,赵学芹,李曼,何敏,庄俊华. Akt shRNA 载体的构建及其对结肠癌细胞株 Lovo Akt 基因表达的抑制作用[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31:1914-1917.
- [15] Beaulieu J M, Gainetdinov R R, Caron M G. Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2009, 49:327-347.
- [16] Kucab J E, Lee C, Chen C S, Zhu J, Gilks C B, Cheang M. Celecoxib analogues disrupt Akt signaling, which is commonly activated in primary breast tumours[J]. *Breast Cancer Res*, 2005, 7:796-807.

[本文编辑] 魏学丽,孙岩