

· 技术与方法 ·

负载 hTERT 调控相关 miR-138 复制缺陷型腺病毒的包装及鉴定*

熊晓峰, 陈陵[△], 范亚川, 邹利全, 张方征, 王洪斌, 游斌, 刘志鹏
(解放军第三二四医院消化内科, 重庆 400020)

摘要:目的 包装负载人端粒酶逆转录酶(hTERT)调控相关 miR-138 前体全长 cDNA(pre-miR-138)的复制缺陷型腺病毒载体(Ad-miR138)。方法 pre-miR-138 全基因合成后插入腺病毒穿梭质粒(pDC315-miR138),与腺病毒包装质粒 pBHGloxDeltaE1、3Cre 共转染人胚肾 293 细胞(HEK293),包装 Ad-miR138 并大量扩增,收集纯化。对纯化后的 Ad-miR138 进行滴度测定、感染性鉴定、电镜鉴定及双引物 PCR 鉴定。结果 包装成功的腺病毒载体具有良好的感染性,纯化浓缩后的病毒滴度可达 5×10^{10} pfu/mL。电镜可见病毒在 HEK293 细胞中大量复制。PCR 双引物鉴定 Ad-miR138 可扩增出 Ad 及 pre-miR-138 特异片段,而对照 Ad-LacZ 只能扩增出 Ad 特异片段,不能扩增出 pre-miR-138 特异片段。结论 成功包装了负载 miR-138 全长 cDNA 的复制缺陷型腺病毒载体,为进一步研究微 RNAs(microRNAs)在肿瘤发生、发展中的作用,以及 hTERT 调控相关 miR-138 在肿瘤治疗中的价值奠定了基础。

关键词:RNA 指导的 DNA 聚合酶;微 RNAs;人胚肾 293 细胞;复制缺陷型腺病毒载体

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.09.026

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)09-0896-03

Package and identification of replication-deficient adenovirus carrying hTERT-regulated miR-138*

Xiong Xiaofeng, Chen Ling, Fang Yachuan, Zhou Liquan,
Zhang Fangzheng, Wang Hongbing, You Bing, Liu Zhipeng

(Department of Gastroenterology, 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020, China)

Abstract: Objective To construct a replication-deficient recombinant adenovirus carrying hTERT-regulated miR-138. **Methods**

The pre-miR-138 sequence was inserted into downstream of CMV promoter of the adenoviral shuttle plasmid pDC315 in sense direction, and the recombinant plasmid pDC315-miR138 was transfected into HEK293 cell together with plasmid pBHGlox(deltaE1, 3) containing adenoviral genome, then the replication-deficient recombinant adenovirus expression vector of pre-miR-138 (Ad-miR138) was obtained, and identified by infecting test, electronic microscope observation and PCR amplification. **Results** After purification and concentration, the titer of Ad-miR138 was achieved to 5×10^{10} pfu/mL. Virus particles could be found in HEK293 cells under transmission electron microscope. Both adenovirus and pre-miR-138 special fragment could be amplified from Ad-miR138 by PCR, whereas pre-miR-138 special fragment could not be amplified from the control Ad-LacZ. **Conclusion** The replication-deficient recombinant adenovirus carrying miR-138 was constructed successfully. This study establishes a foundation to further research on how microRNAs involves in the carcinoma development and the value of hTERT-regulated miR-138 on tumor therapy.

Key words: RNA-directed DNA polymerase; microRNAs; HEK293; replication-deficient adenoviral vector

人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)在肿瘤细胞内的活化调控过程是肿瘤发生及治疗研究领域的热点之一, hTERT 不仅在肿瘤发生的初始阶段起关键作用,还可促进肿瘤转移^[1]。并且,以 hTERT 为靶位的肿瘤免疫治疗取得令人鼓舞的成果,但有关 hTERT 的调控机制仍尚未完全明确。微 RNAs(microRNAs)是最大的一类基因表达转录后调控因子^[2],微量的 microRNAs 即可对靶蛋白的表达产生明显的调控作用^[3]。因此参与 hTERT 调控的 microRNAs 在肿瘤发生、发展中具有重要意义,可作为潜在的肿瘤治疗靶位^[4-5]。Mitomo 等^[6]研究表明, miR-138 对 hTERT 具有调控作用,但未进一步进行功能研究。通过上调 miR-138 表达丰度,抑制 hTERT 表达,有可能抑制肿瘤生长。最新研究趋势表明,基于 microRNAs 层面的肿瘤基因治疗正在成为肿瘤治疗的一个新的方向^[7]。腺病毒载体系统作为哺乳动物细胞表达载体,在重组疫苗和基因治疗载体研究中备受关注,被广泛应用于基因治疗的研究中。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒 大肠埃希菌 DH5- α 、腺病毒穿梭质粒 pDC315 及包装质粒 pBHGloxDeltaE1、3Cre 由本室保存。

1.1.2 分子生物学试剂 1 kb plus Ladder Marker(TAKARA 公司);质粒 DNA 小量快速抽提试剂盒(Omega 公司);Dotap 脂质体转染试剂(Roche 公司);PCR 试剂盒(Promega);酵母提取物及胰蛋白胨(上海生工);低熔点琼脂糖(西班牙进口);氨苄西林(华北制药厂);EcoR I 与 BamH I 内切酶(TAKARA 公司)。

1.1.3 细胞和培养试剂 高糖 DMEM 1X 培养液及标准胎牛血清(HyClone);转化有腺病毒 E1 区基因的包装细胞 HEK293(本室保存)。

1.1.4 病毒 负载有 β -半乳糖苷酶(β -gal)基因 LacZ 的复制缺陷型腺病毒载体(Ad-LacZ),本室保存。

1.1.5 引物设计与合成 miR-138 前体全长 cDNA(pre-miR-138)的 PCR 引物采用 Primer Premier 5 自行设计,上海生工合成纯化,其上游序列 P1:5'-GAA TTC CGG ACA AAG GCA TC-3'。下游序列 P2:5'-AGT CGA CAA GCT GGA TCC GC-3',扩增片段长度 205 bp。腺病毒 E2b 区引物,上游序列 P3:

* 基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(2008BB5274;2009BB5314)。 Δ 通讯作者, Tel:(023)68762092; E-mail:lingcong_008@126.com。

5'-TCG TTT CTC AGC AGC TGT TG-3'; 下游序列 P4: 5'-CAT CTG AAC TCA AAG CGT GG-3', 扩增片段长度 860 bp。

1.2 方法

1.2.1 Ad-miR138 的包装 (1) pDC315-miR138 质粒构建。NCBI 查到 pre-miR-138 序列(99 bp), 两端延伸 50 bp 并在 5' 端设计 EcoR III 酶切位点, 在 3' 端设计 BamH I 酶切位点, 全基因合成后, 插入双酶切后的 pDC315 穿梭质粒。质粒常规扩增后酶切电泳及测序鉴定。(2) 脂质体介导 pDC315-miR138 和 pBHGloXΔE1、3Cre 质粒共转染 HEK293 细胞。参照 Dot-ap 使用说明书将 pDC315-miR138 及 pBHGloXDeltaE1、3Cre 共转染 HEK293 细胞; 转染后 10~12 d 出现空斑后, 仔细挑取 5 个空斑, 用少量无菌 PBS 溶液悬浮后, 分别装管冻存于 -70 °C。(3) 重组缺陷型病毒载体(Ad-miR138) 的筛选及小量扩增。①将挑取的空斑溶液冻融离心, 取上清液感染 HEK293; 同时设立阴性转染对照; ②培养 3~5 d 后, 用空斑上清液转染的 HEK293 细胞出现细胞病变效应(cytopathic effect, CPE), 即 90%~100% 的细胞肿胀、变圆、10%~20% 的细胞脱壁漂浮, 而阴性对照组细胞无 CPE; ③离心收集出现 CPE 的 HEK293 细胞, 冻存于 -70 °C, 上清液用于再感染 HEK293 细胞。

1.2.2 Ad-miR138 的大量扩增、纯化及滴度测定 (1) 大量扩增: 经鉴定正确的 Ad-miR138 在 HEK293 细胞中大量扩增。主要步骤为 HEK293 细胞传代于 250 mL 培养瓶中, 细胞 80% 汇合时, 加 5 mL 病毒上清液, 37 °C、5% CO₂ 培养 3~5 d, 当出现 CPE 时收集细胞, 室温 200 g, 离心 3~5 min, -70 °C 分别保存上清液及细胞, 分别用于再感染和收集高滴度病毒。(2) 病毒纯化: 将收集的病变 HEK293 细胞反复冻融 4 次, 室温下 2 500 g 离心 5 min。上清液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 然后将除菌后的病毒上清液加于无菌梯度氯化铯(CsCl) 溶液上层(0.5 mL, 密度 1.5 g/mL; 3.0 mL, 密度 1.35 g/mL; 3.0 mL, 密度 1.25 g/mL), 10 °C、150 000 g 离心 1 h 后在 1.25 g/mL 和 1.35 g/mL CsCl 溶液间可见灰白色病毒带, 将病毒带吸出并与密度为 1.35 g/mL 的 CsCl 溶液混合, 以 4 °C、150 000 g 离心 18 h, 留取病毒液, 4 °C 避光透析(10 mmol Tris-Cl pH 7.5; 1 mmol MgCl₂; 10% 甘油) 24 h, 收集病毒液于无菌离心管中, 取少许检测病毒滴度, 余置 -70 °C 冻存备用。(3) 病毒滴度测定: 24 孔培养板每孔接入 1×10⁵ HEK293 细胞, 培养 24 h, 取病毒转染液 0.2 mL 加 PBS 至总量 2 mL, 混匀后作 10 倍比稀释至第 6 管, 每个稀释度设 3 孔, 加入不同稀释度病毒液 0.2 mL, 置 37 °C、5% CO₂ 培养 1 h, 其间每 10~15 min 摇动一次培养板, 1 h 后补加培养液 1.5 mL, 继续培养 36~48 h, 观察细胞病变情况。取 100% 出现 CPE 的最大稀释度, 按下列公式计算病毒滴度:

$$\text{pfu/mL} = \frac{10^5 \text{ 细胞} \times \text{稀释度} \times 10 \text{ 个病毒/细胞}}{0.2 \text{ mL}}$$

设定公式中每个细胞感染 10 个病毒, 36~48 h 内导致细胞完全病变。

1.2.3 pre-miR-138 腺病毒载体的鉴定 (1) 感染性鉴定: 用冻存的 Ad-miR138 感染 70% 融合的 HEK293 细胞, 观察 HEK 293 有无 CPE 出现。用 PBS 作对照。(2) 电镜鉴定: 取少量 Ad-miR138 病毒浓缩液感染 HEK293 细胞, 透射电镜下观测细胞内有无病毒颗粒复制。(3) 双引物 PCR 鉴定: 取 Ad-miR138 病毒浓缩液 200 μL 于 EP 管内, 沸水煮 10 min 后取 5 μL 用于 PCR 的 DNA 模板。采用插入的 pre-miR138 特有引物 P1、P2 和腺病毒载体特有引物 P3、P4, 进行双引物 PCR 鉴

定。反应条件为 94 °C 3 min, 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。用 Ad-LacZ 作对照。

2 结 果

2.1 pDC315-miR138 穿梭质粒载体的构建 pDC315 腺病毒载体经 EcoR I 和 BamH I 双酶切后, 与全基因合成的 pre-miR-138 片段相连接, 成功连接的重组质粒可显示(3.9±0.2) kb 两条带, 与理论计算相符。基因测序结果表明全长 pre-miR-138 序列正确接入到重组质粒中。结果证实成功构建负载体人 pre-miR-138 cDNA 的腺病毒表达载体, 命名为 pDC315-miR138。

2.2 病毒的滴度测定 含病毒的细胞冻融液离心去细胞碎片并经梯度 CsCl 低温超速离心纯化后, 得到病毒液 5 mL。采用倍比稀释法测定 Ad-miR138 的滴度可达 5×10¹⁰ pfu/mL。

2.3 感染性鉴定 用腺病毒载体感染 HEK293 细胞, 37 °C 培养 2~3 d, 发现 HEK293 细胞圆缩、脱落, 出现 CPE。表明包装的腺病毒载体感染能力强, 在 HEK293 细胞中大量增生, 并阻断宿主细胞 DNA 和蛋白质生成, 最终导致细胞营养耗竭而死亡。而用 PBS 作对照的 HEK293 细胞则生长良好。

2.4 电镜鉴定

2.4.1 用 Ad-miR138 感染 HEK293 细胞出现 CPE 后, 收集细胞, 制作透射电镜标本, 在电镜下观测, 发现有大量病毒颗粒形成(见图 1), 大小约 75~85 nm, 细胞器模糊。未感染腺病毒的 HEK 293 细胞(见图 2)则发现无病毒样颗粒形成, 可见细胞核膜完整连续, 细胞质内细胞器清晰可见。

2.4.2 双引物 PCR 鉴定 分别对 Ad-LacZ 和 Ad-miR138 用两对引物进行 PCR 扩增, 结果 Ad-LacZ 只出现 860 kb 的 Ad 特异条带, 而 Ad-miR138 则可扩增出 860 bp 和 538 bp 两条带(见图 3)。这表明包装的腺病毒载体内携带 pre-miR-138 序列。

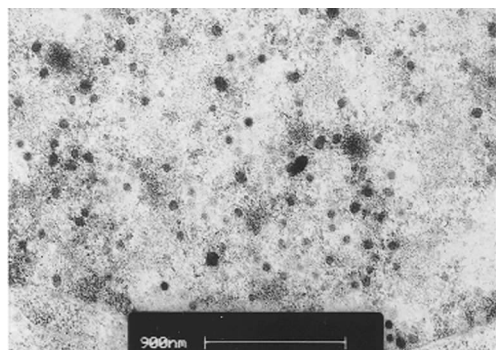


图 1 细胞内见大量病毒颗粒(透射电镜, ×17 000)

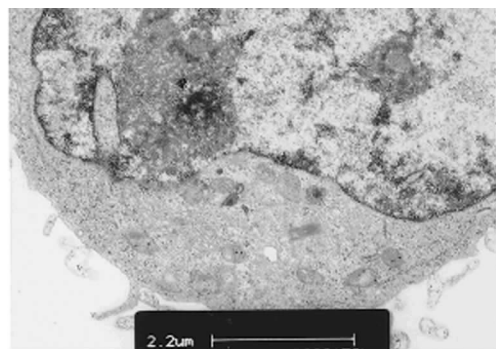
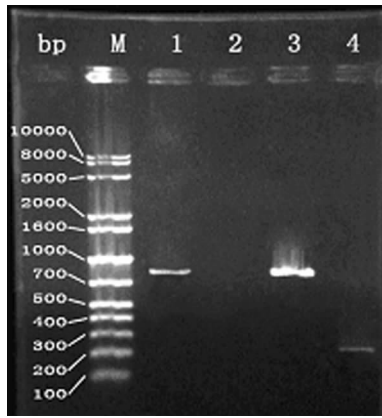


图 2 细胞内未见病毒颗粒(透射电镜, ×10 000)



M:DNA 标志物;1: Ad-LacZ(Ad 引物);2: Ad-LacZ(miR-138 引物);3: Ad-miR138(Ad 引物);4: Ad-miR138(miR-138 引物)。

图 3 重组腺病毒载体双引物 PCR 鉴定

3 讨论

端粒酶由 3 个主要亚单位组成,其中 hTERT 是端粒酶的限速亚单位,直接决定着细胞内端粒酶的活性^[8]。因此,hTERT 在肿瘤细胞内的活化调控过程已成为肿瘤发生及治疗研究领域的热点之一^[9]。hTERT 的活化在肿瘤的发生及发展中具有重要作用,针对 hTERT 的肿瘤免疫治疗,在体外^[10]及小鼠体内均显示出明显效果^[11]。但 hTERT 基因的调节机制到目前为止所知甚少,已认识的几个能上调 hTERT 基因表达的因子有^[8]:Sp1,Ap-2;同时也发现一些抑制其表达的因子,如 MZF-2,Wint-1,p53。p21 与 E2F 可能介导了 p53 对 hTERT 的抑制作用;癌蛋白 c-myc 在 hTERT 启动子上有潜在结合位点,可能上调 hTERT 基因表达;孤儿受体 COUP-TFII 能与 hTERT 启动子特异作用,抑制 hTERT 的表达;TEIF(transcriptional elements-interacting factor)与 EWS/ETS 癌蛋白通过与 hTERT 启动子结合,上调 hTERT mRNA,激活端粒酶活性;核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B) 被发现可能起激活 hTERT 的作用。这些有关 hTERT 表达调控的研究大多为转录水平的调节,未涉及转录后的调节。并且,转录水平的调节因子众多,关系复杂,很难通过控制转录水平的调节有效控制 hTERT 的表达。基因转录后水平的调节,作用于 mRNA 翻译为蛋白的环节,直接决定了蛋白的表达水平,主要涉及 microRNAs^[4]。microRNAs 是一种广泛存在于真核生物细胞中、非编码的、长 19-24nt 的单链小分子 RNA,首先在线虫中发现可时序调控胚胎发育,随后在多种动物、植物细胞中发现 microRNAs 分子的存在^[12]。microRNAs 的广泛存在与进化保守性,提示它在生命活动中具有重要的调节作用。迄今为止,已发现的大部分 microRNAs 功能尚未明确。已有研究表明,microRNAs 在肿瘤的发生与发展过程中起着重要作用^[13-14],是肿瘤良好的临床诊断指标与治疗靶位^[15-16]。本研究采用分子生物学技术,成功包装负载 pre-miR-138 cDNA 的腺病毒载体,感染性实验证明了腺病毒载体具有良好的感染活力;电镜鉴定从形态学上显示了腺病毒载体在 HEK293 细胞内的包装;采用插入的 pre-miR-138 cDNA 特有引物和腺病毒载体特有引物,进行双引物 PCR 鉴定后,证明包装的腺病毒载体内携带 pre-miR-138 cDNA。经浓缩纯化后得到的高滴度病毒,为研究 miR-138 在肿瘤发生及发展过程中的作用,以及肿瘤基因治疗奠定基础,同时也为研究 hTERT 在肿瘤发生、发展过程中活化的机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Yu ST, Chen L, Wang HJ, et al. hTERT promotes the invasion of telomerase-negative tumor cells in vitro[J]. *Int J Oncol*, 2009, 35(2): 329-336.
- [2] Liu N, Okamura K, Tyler DM, et al. The evolution and functional diversification of animal microRNA genes[J]. *Cell Res*, 2008, 18(10): 985-996.
- [3] Brodersen P, Voinnet O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(2): 141-148.
- [4] Petri A, Lindow M, Kauppinen S. MicroRNA silencing in primates: towards development of novel therapeutics[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(2): 393-395.
- [5] Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, et al. MicroRNA expression and function in cancer[J]. *Trends Mol Med*, 2006, 12(12): 580-587.
- [6] Mitomo S, Maesawa C, Ogasawara S, et al. Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines[J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(2): 280-286.
- [7] Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, et al. MicroRNAs—the micro steering wheel of tumour metastases[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(4): 293-302.
- [8] 陈陵, 杨仕明, 蔡永国, 等. 针对端粒酶蛋白催化亚单位的肿瘤免疫治疗研究[J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(4): 528-533.
- [9] 周来新, 汪小平, 杨仕明. 胃癌组织中端粒酶活性与细胞周期蛋白 D1 表达关系的研究[J]. *重庆医学*, 2003, 32(9): 1144-1146.
- [10] Chen L, Liang GP, Tang XD, et al. In vitro anti-tumor immune response induced by dendritic cells transfected with hTERT recombinant adenovirus[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351(4): 927-934.
- [11] Chen L, Tang XD, Yu ST, et al. Induction of anti-tumour immunity by dendritic cells transduced with hTERT recombinant adenovirus in mice[J]. *J Pathol*, 2009, 217(5): 685-692.
- [12] Herranz H, Cohen SM. MicroRNAs and gene regulatory networks: managing the impact of noise in biological systems[J]. *Genes Dev*, 2010, 24(13): 1339-1344.
- [13] 孔燕, 梁志清. miRNA 与肿瘤及子宫颈癌的研究进展[J]. *重庆医学*, 2008, 37(16): 1838-1839.
- [14] 李琼, 王阁, 王红中, 等. MicroRNA 在 HepG2 肝癌细胞表达差异谱的研究[J]. *重庆医学*, 2007, 36(20): 2024-2025.
- [15] Lin RJ, Lin YC, Yu AL. miR-149 * induces apoptosis by inhibiting Akt1 and E2F1 in human cancer cells[J]. *Mol Carcinog*, 2010, 49(8): 719-727.
- [16] Alcaraz MJ, Megias J, Garcia-Arnandis I, et al. New molecular targets for the treatment of osteoarthritis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(1): 13-21.