文章编号:1000-5404(2005)21-2115-03

论著

人IL-24基因重组腺病毒的构建及其在A549细胞中的表达

田文标,陈丽芬,邹全明 (第三军医大学医学检验系临床微生物与免疫学教研室,重庆 400038)

提 要: 目的 构建含有人IL-24基因的重组腺病毒载体,并转染肺腺癌细胞A549细胞观察其感染能力,为进一步的基因治疗奠定实验基础。**方法** 采用基因工程技术将人IL-24基因cDNA亚克隆至穿梭质粒pAdTrack-CMV上,采用PAdEasy系统进行细菌内同源重组,后通过脂质体将正确重组体包裹并转染293T细胞以包装并扩增病毒。采用PCR方法对重组腺病毒进行鉴定,利用穿梭质粒中所带绿色荧光蛋白GFP报告基因,对病毒滴度和感染效率进行检定;最后采用免疫组化法对IL-24在A549中的表达进行检测。**结果** 酶切和PCR结果证实IL-24基因重组腺病毒载体构建成功,病毒滴度达1.2×10^{10}pfu/ml,能够成功转染A549细胞并在其中进行表达。**结论** 成功构建了有较强感染能力的含人IL-24基因的重组腺病毒载体。

关键词: 腺病毒; L-24基因; 源重组
中图法分类号: R373.1; R392.2; R739.5 **文献标识码**: A

Construction of recombinant adenovirus containing human IL-24 gene and expression in A549 cells

TIAN Wen-biao, CHEN Li-fen, ZOU Quan-ming (Department of Clinical Microbiology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct the recombinant adenovirus encoding human IL-24 gene for future gene therapy. **Methods** The human IL-24 gene fragment was cloned into the shuttle plasmid pAdTrack-CMV to form the transfer vector by the method of homogenous recombination in bacteria. Then the recombinant adenovirus was transfected into 293T cells using Lipofectine DOTAP. The target gene was detected by polymerase chain reaction (PCR). The titer and its infection rate were determined using the green fluorescent protein (GFP) expression in the shuttle plasmid. The expression of target protein was measured by the method of immunohistochemistry. **Results** Restriction endonuclease and PCR analysis confirmed that the human IL-24 gene was successfully inserted into the adenovirus vector. The titer of the recombinant adenovirus was 1.2×10^{10}pfu/ml. The adenovirus has a strong effect on A549 cells and human IL-24 can express in it. **Conclusion** The recombinant adenovirus containing human IL-24 gene was successfully constructed by the method of homogenous recombination in bacteria.

Key words: adenovirus; human IL-24 gene; homogenous recombination; gene therapy

人白介素24(hIL-24)基因最初被命名为黑色素瘤分化相关基因7(melanoma differentiation-associated gene, MDA-7),是Jiang等[1]在1995年应用分化诱导减数杂交方法从人的黑色素瘤HO-1细胞分离克隆得到的。从其结构、染色体定位、碱基序列同源性及细胞因子样特性等方面考虑,MDA-7于2002年被归于IL-10家族,正式命名为IL-24[2]。作为一种新命名的细胞因子,IL-24由激活的单核-巨噬细胞和T淋巴细胞产生,与人脾脏、胸腺、外周血淋巴细胞等免疫系统的发育有关,发挥着重要的免疫调节功能。后来的研究表明IL-24能选择性地抑制肿瘤细胞生长并诱导其凋亡,在肿瘤的基因免疫治疗方面有着广阔的应用前景,引起了广泛的关注。本实验拟先构建含有人IL-24基因的腺病毒穿梭质粒,利用同源重组将其融合到V型腺病毒载体基因组中,然后通过脂质体转染技术将其转入293T细胞进行病毒的包装与扩增,最后将构建好的重组腺病毒转染A549细胞并进行表达测定,以期为下一步的肿瘤基因治疗研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 含hIL-24基因的质粒T-IL24由本室构建。BJ5183菌株及其衍生物Adeasier-1细胞、含绿色荧光蛋

作者简介:田文标(1970-),男,河北省石家庄市人,博士研究生,主管技师,主要从事临床微生物及免疫学方面的研究。电话:(023)68753591, E-mail:thinklike6405@163.com
通讯作者:邹全明,电话:(023)68752315, E-mail:qmzou@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-07-08;修回日期:2005-10-12

白(GFP)的穿梭质粒 pAdTrack-CMV、腺病毒基因组质粒 pAdeasy-1 由美国 Howard Hughes 医学研究所 Bert Vogelstein 教授赠送。大肠杆菌 $DH_{5\alpha}$ 菌株由本室保存,腺病毒包装细胞 293T 细胞和肺癌 A549 分别由西南医院全军烧伤研究所和新桥医院全军肿瘤诊治中心馈赠。

1.1.2 酶类和主要生化试剂 限制性内切酶、T4 连接酶购自 NEB 公司,*Taq* DNA 聚合酶购自 Takara 公司,质粒 DNA 提取及回收试剂盒购于 Omega 公司,脂质体 DOTAP 购于 Roche 公司,DMEM 培养基为 Hyclone 公司产品,PCR 引物由上海生工合成,DNA 测序送交大连 TaKaRa 公司进行,小鼠抗 hIL-24 单克隆抗体购自 R&D 公司,羊抗小鼠免疫组化检测试剂盒购自晶美公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌感受态的制备、质粒提取、纯化、酶切、连接及转化 参照文献[3]的方法进行。

1.2.2 编码 hIL-24 基因 cDNA 序列 DNA 片断的获得 以含 hIL-24 基因的质粒 T-IL24 为模板进行 PCR 反应。上游引物:5′-CCGGAGATCTATGAATTTTCAACAGAGGCTG-3′;下游引物:5′-GCGCAAGCTTTCAGAGCTTGTAGAATTTCTG-3′(上下游引物 5′端分别引入 *Bgl* Ⅱ 和 *Hind* Ⅲ 酶切位点);扩增条件为 94 ℃预变性 5 min,接 94 ℃ 30 s→60 ℃退火 30 s→72 ℃延伸 1 min(30 个循环)→72 ℃继续延伸 10 min。扩增完毕后进行胶回收获得目的片断。

1.2.3 腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV/IL-24 的构建与测序 用 *Bgl* Ⅱ 和 *Hind* Ⅲ 分别双酶切腺病毒载体质粒 pAdTrack-CMV 和 hIL-24 PCR 产物回收片断,以胶回收试剂盒分别回收 IL-24 片断及 pAdTrack-CMV 载体骨架,用 T4 DNA 连接酶将二者连接,转化大肠杆菌 $DH_{5\alpha}$,挑选转化菌落,小量快速提取质粒,经酶切鉴定正确后委托 TaKaRa 公司进行序列测定,抽提质粒 DNA 备用。

1.2.4 重组腺病毒质粒载体 pAdEasy-1/IL-24 的构建及鉴定 取 1 μg pAdTrack-CMV/IL-24 DNA,*Pme* Ⅰ 酶切过夜充分线性化。将已转化腺病毒基因组质粒 pAdasy-1 的 BJ5183 菌制备成电转感受态细胞(BJ5183-AD-1),二者混匀后用电穿孔法转化细菌(BIORAD 公司,2 500 V,200 Ohm,25 μF)。转化液在 SOC 培养基中 37 ℃震摇孵育 1 h 后涂布卡那抗性 LB 平板过夜培养。挑选较小菌落震摇后以碱变性法小量抽提质粒,根据琼脂糖电泳质粒大小,初步筛选重组体,再进一步经 *Pac* Ⅰ 酶切鉴定正确后,抽提重组腺病毒质粒 pADEasy-1/IL-24 DNA 备用。

1.2.5 重组腺病毒的包装、扩增和纯化 pAdEasy-1/IL-24 质粒 DNA 经 *Pac* Ⅰ 酶切、酚-氯仿抽提、乙醇沉淀后,脂质体介导转染 293T 细胞。转染方法如下:转染前 1 d 将 293T 细胞接种于 6 孔培养板,待 75% 融合时转染。将预先配制的 A 液(质粒 DNA 2 μg + HEPES 缓冲液 50 μl)和 B 液(DOTAP30 μl + HEPES 缓冲液 70 μl)混合,室温下静置 15 min 后,加入 850 μl 不含血清的 DMEM 培养基,然后将上述混合液滴加到漂洗后的细胞中,37 ℃孵育,8 h 后换成完全培养基。转染后分别在不同时间荧光显微镜下观察 GFP 表达状况,了解腺病毒包装过程。转染后 10 d 收集细胞,-80 ℃及 37 ℃反复冻融 4 次裂解细胞,充分振荡并离心后收集含病毒的上清并用其重新感染 293T 细胞,将重组腺病毒大量扩增。重组腺病毒重复扩增 3 轮大量繁殖后用 CsCl 密度梯度超离心法进行纯化,加入 10% 灭菌甘油,分装后 -80 ℃保存备用。

1.2.6 重组腺病毒的滴度测定 GFP 阳性细胞记数法,参照 Kaneto 等[4]的方法进行。

1.2.7 重组腺病毒的鉴定 抽提重组腺病毒基因组 DNA,采用 PCR 方法对腺病毒进行鉴定。上下游引物分别为 F:5′-CCGGAGATCTATGAATTTTCAACAGAGGCTG-3′;R:5′-GCGCAAGCTTTCAGAGCTTGTAGAATTTCTG-3′。扩增条件为 94 ℃预变性 5 min,接 94 ℃ 30 s→60 ℃退火 30 s→72 ℃延伸 1 min(30 个循环)→72 ℃继续延伸 10 min。

1.2.8 病毒感染效率的测定 在六孔板上按照 2×10^5 浓度接种人肺腺癌 A549 细胞,待长至融合度约 80% 时,用感染复数(MOI)分别为 50、100、150、200 的腺病毒感染,37 ℃ 5% CO_2 培养箱中培养 1 h 后加入完全培养基,48 h 后在荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞率。

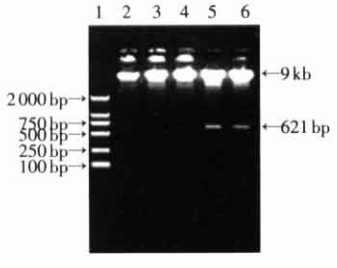
1.2.9 目的基因的表达分析 重组腺病毒转染 A549 细胞 48 h 后以羊抗小鼠免疫组化试剂盒对 IL-24 的表达进行检测,一抗采用小鼠抗 hIL-24 单克隆抗体(抗体稀释度采用1∶500)。

2 结果

2.1 质粒的构建及鉴定

2.1.1 IL-24 基因 DNA 片断的获得 经 PCR 反应后可得到长度为 621bp 的 hIL-24 基因 cDNA 片断。

2.1.2 pAdTrack-CMV/IL-24 的酶切鉴定与测序结果 用 *Bgl* Ⅱ 和 *Hind* Ⅲ 进行酶切鉴定。双酶切后产生两个大小分别为 9 kb(质粒骨架)和 621 bp(IL-24 基因)的 DNA 片段,和预期结果一致,表明构建成功(图 1)。测序分析结果显示,克隆得到的序列与 GenBank 上所公布的人 IL-24 序列完全一致。



1: DNA marker; 2-4: pAdTrack-IL-24; 5, 6: pAdTrack-IL-24 + *Bgl* Ⅱ and *Hind* Ⅲ

图 1 *Bgl* Ⅱ 和 *Hind* Ⅲ 酶切鉴定 pAdTrack-IL-24

Fig1 Restriction enzyme digestion of pAdTrack-IL-24

2.1.3 pAdEasy-1/IL-24 的酶切鉴定 构建成功的 pAdTrack-CMV/IL-24 经 *Pme* Ⅰ 酶切线性化后,电转入 BJ5183-AD-1 细菌中与其内的腺病毒基因组质粒 pADEasy-1 进行同源重组。挑选转化克隆,小量抽提质粒 DNA 经 *Pac* Ⅰ 酶切后可见 4.5 kb 和 30 kb 左右的电泳条带各一条,证明同源重组成功。

2.2 重组腺病毒的鉴定

2.2.1 重组腺病毒的产生 pAdEasy-1/IL-24 经脂质体转染 293T 细胞后 24 h 出现绿色荧光蛋白表达,荧光表达随时间增强(图 2)。约 5~7 d 左右,培养细胞开始出现 CPE,表现为细胞肿胀、变圆、蚀斑出现。将该病毒空斑抽提物经 PCR 扩增检测,可

特异性扩增出 621 bp 的 hIL-24 cDNA 片段，而未转染的细胞基因组未扩增出相应条带，至此表明重组腺病毒构建成功。

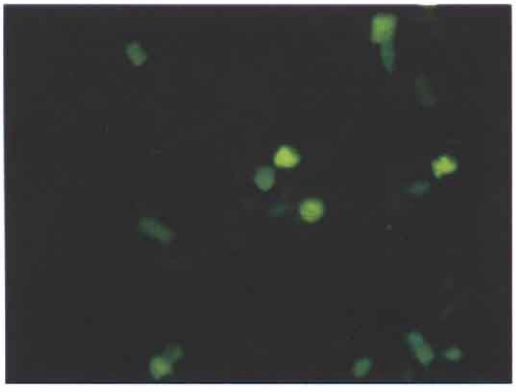


图 2　293T 细胞转染后 48 h GFP 的表达　（荧光显微镜 ×200）

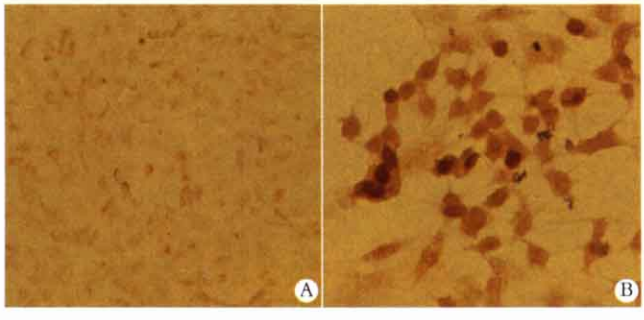
Fig 2　GFP expression at 48 h after transfected into 293T cells

（Fluorescence microscope ×200）

2.2.2　重组腺病毒的滴度及感染效率测定　GFP 计数法测定腺病毒滴度为 1.2×10^{10} pfu/ml 。用不同 MOI 的重组腺病毒感染 A549 细胞，当 MOI 为 50 时仅有少数细胞有荧光；当 MOI 达到 200 时，超过 80% 的细胞出现荧光，表明所构建重组腺病毒生物活性高，可以有效地转导目的基因表达。

2.3　IL-24 在 A549 中的表达分析

在胞浆和胞核内免疫组化结果表明，重组腺病毒转染 A549 细胞 48 h 后，出现大量被染成棕黄色的阳性颗粒，表明 hIL-24 基因已经成功转染并表达（图 3）。



A: untran's fected control; B: 48 h after transfection; The yellow-brown cells are A549 cells of positive hIL-24 expression

图 3　免疫组化法栓测 hIL-24 在 A549 中的表达　（SABC ×200）

Fig 3　Expression of hIL-24 in A549 cells by immunohistochemistry　（SABC ×200）

3　讨论

研究表明，借助于腺病毒表达载体，将 hIL-24 基因转染入肿瘤细胞，使其异位表达，可特异性地抑制肿瘤细胞生长，诱导肿瘤细胞凋亡。除此之外，它还被证明可以抑制肿瘤血管的形成，增加肿瘤放射敏感性，且抗瘤谱广，副作用小。而当其被转染入正常细胞时，细胞的生长和死亡却不受影响。IL-24 的这种独特作用目前至少在 50 余种人类恶性肿瘤细胞实验中得到证实，包括黑色素瘤、神经胶质细胞瘤、骨肉瘤、乳腺癌、子宫颈癌、结直肠癌、肺癌、鼻咽癌、前列腺癌、胰腺癌等[5]。作为肿瘤治疗新的靶点，hIL-24 的研究已成为肿瘤免疫治疗的热点[6,7]。目前国外 hIL-24 的研究已进入临床Ⅱ期试验阶段[8]。

本实验选择了重组腺病毒载体作为转染载体。众所周知，基因治疗中载体的选择对后续疗效是至关重要的。目前基因治疗领域应用最广泛的生物病毒载体是逆转录病毒载体和腺病毒载体。相对于逆转录病毒载体而言，腺病毒载体具有更高的感染能力，宿主范围广，既能感染静止期的细胞，又能感染分裂增殖期的细胞；此外，腺病毒载体病毒滴度高，转载容量大，又不整合入宿主细胞染色体基因组，因而毒性低有更好的生物安全性，目前已被美国 FDA 批准应用于临床研究，是理想的基因转染载体。

本研究成功构建了含有人 IL-24 基因的腺病毒载体，病毒滴度达 1.2×10^{10} pfu/ml ，经实验证明可以高效感染人肺腺癌 A549 细胞并能在其中表达，表明该病毒能有效介导基因转染，这将为下一步的肿瘤基因治疗研究奠定良好的实验基础。

参考文献：

[1] Jiang H, Lin J J, Su Z Z, *et al*. Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression[J]. Oncogene, 1995, 11(12): 2477 - 2486.

[2] Caudell E G, Mumm J B, Poindexter N, *et al*. The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24[J]. Immunol, 2002, 168(12): 6041 - 6046.

[3] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社, 1993. 34 - 36.

[4] KanetoH, XU G, Song K H, *et al*. Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress[J]. J Biol Chem, 2001, 276(33): 31099 - 31104.

[5] Chada S, Sutton R B, Ekmekcioglu S, *et al*. MDA-7/IL-24 is a unique cytokine—tumor suppressor in the IL-10 family[J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(5): 649 - 667.

[6] Chada S, Ramesh R, Mhashilkar A M. Cytokine- and chemokine-based gene therapy for cancer[J]. Curr Opin Mol Ther, 2003, 5(5): 463 - 474.

[7] Talmadge J E. Gene therapy of cancer - 12th International Conference [J]. IDrugs, 2004, 7(2): 100 - 104.

[8] Fisher P B, Gopalkrishnan R V, Chada S, *et al*. mda-7/IL-24, a novel cancer selective apoptosis inducing cytokine gene: from the laboratory into the clinic[J]. Cancer Biol Ther, 2003, 2(4 Suppl 1): S23 - S37.

（编辑　周　芳）