论著

文章编号:1000-5404(2006)21-2130-05

重组逆转录病毒双表达载体的构建及其对K562细胞增殖活性的影响

曾建明[1],冯文莉[1],王小中[1],赵世巧[1],白卫君[1],罗云萍[1],温健萍[2],涂植光[3],黄宗干[4] (重庆医科大学:[1]临床血液学教研室,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室;[3]临床生物化学教研室;[4]临床学院血液科,重庆 400016;[2]Canadian Blood Services, Hamilton, ON L8S 1H8 Canada)

提 要: 目的 构建针对慢性粒细胞白血病bcr-abl b3a2型mRNA的双表达逆转录病毒载体,初步探讨其对K562细胞表型的影响。**方法** 以逆转录病毒载体pMSCV-neo为骨架,构建eGFP及针对bcr-abl b3a2型mRNA的反义RNA双表达载体pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL40AS,同时构建对照载体pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL40S和pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL80AS,酶切及测序鉴定各重组载体;以脂质体法转染各载体到PT67包装细胞后,G418筛选稳定的病毒产生细胞株,再以NIH3T3细胞测定病毒滴度并感染K562细胞,计数细胞数绘制细胞生长曲线,FCM检测细胞凋亡情况、并用Western blot检测PKR激活情况。**结果** 酶切及测序结果证实各重组载体构建完全正确;G418筛选到高滴度重组逆转录病毒生产细胞株:PT67-MSCV/GFP、PT67-40as、PT67-40s和PT67-80as,且PT67-40as上清感染组K562细胞生长受抑制,其24 h时早期细胞凋亡率为22.54±3.19%,与除PT67-80as组外的其余各组相比有显著差异($P<0.05$);PT67-40as和PT67-80as处理组细胞PKR磷酸化水平分别增高了59.20%和60.33%,2AP能抑制PT67-40as的作用。**结论** 成功构建重组逆转录病毒双表达载体,并发现其能抑制K562细胞生长并引起细胞凋亡,通过激活PKR抗肿瘤可望成为肿瘤新的靶向治疗策略。

关键词: 慢性粒细胞白血病;PKR;反义RNA;逆转录病毒载体;基因克隆

中图法分类号: Q782; R329.28; R733.722 **文献标识码**: A

Construction of double expression retroviral vectors and its effect on phenotype of K562 cells

ZENG Jian-ming[1], FENG Wen-li[1], WANG Xiao-zhong[1], ZHAO Shi-qiao[1], BAI Wei-jun[1], LUO Yun-ping[1], WEN Jian-ping[2], TU Zhi-guang[3], HUANG Zong-gan[4] ([1]Department of Clinical Hematology, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, [3]Department of Clinical Biochemistry, [4]Department of Hematology, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China; [2]Canadian Blood Services, Hamilton, ON L8S 1H8, Canada)

Abstract: Objective To construct double expression retroviral vectors targeting chronic myeloid leukemia (CML) b3a2-type mRNA and investigate its effect on the phenotype of K562 cells. **Methods** The eGFP coding sequence was inserted into the retroviral vector pMSCV-neo to construct pMSCV/GFP, then H1-RNA pol III-based transcription cassettes was subcloned into it to form pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL40AS. Two control vectors pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL40S & pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL80AS were constructed in addition. All these constructions were identified by restriction enzyme analysis and DNA sequencing. After that, the recombinant vectors were transferred into retrovirus packaging cell line PT67 by using lipofectamine2000, and G418 were used to select stable virus-producing cell lines. Viral titer was determined by infection of NIH3T3 cells sequentially. The cell-growth curve was assayed, cell apoptosis was checked with Annexin V-PE/7AAD double staining and flow cytometry analysis after 24-hour infection, the PKR phosphorylation was assayed by Western blotting. **Results** The plasmids were successfully constructed. Four cell lines, named as PT67-MSCV/GFP, PT67-40as, PT67-40s and PT67-80as were gained by G418 selection, and virus titers were 6.2×10^5, 5.6×10^5, 4.6×10^5 and 6.0×10^5 CFU/ml respectively. PT67-40as suspensions could induce K562 cell apoptosis by

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470744)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470744)

作者简介:曾建明(1975-),男,四川省蓬溪县人,博士研究生,主要从事白血病分子机制和基因治疗方面的研究。电话:13101234686

通讯作者:冯文莉,电话:(023)68485938

收稿日期:2005-11-28;**修回日期**:2006-01-17

(22.54 ± 3.19)%, significantly different from PT67-MSCV/GFP or PT67-40s ($P < 0.05$), except PT67-80as. The level of phosphorylated PKR was only increased in PT67-40as group and PT67-80as group (by 59.20% and 60.33%, respectively). **Conclusion** The double expression retroviral vectors have been successfully constructed and it can inhibit K562 cell growth and induce cell apoptosis. Therefore, a PKR-activating dependent method may be set up as a new strategy for cancer targeting therapy.

Key words: chronic myeloid leukemia; PKR; antisense RNA; retroviral vector; gene clone

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是造血干细胞水平染色体易位 t(9;22)(q34;q11)形成 bcr-abl 融合基因,其编码产生具有强烈酪氨酸激酶活性的 BCR/ABL 融合蛋白,该蛋白激活多条信号转导通路,干扰细胞增殖、分化、凋亡及黏附过程,导致细胞恶性转化[1]。目前有关 CML 基因治疗的研究较多,但通过反义 RNA 和目的基因 mRNA 形成特定长度的双链 RNA(dsRNA)以激活双链 RNA 依赖性蛋白激酶(double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR)特异性地引起靶细胞凋亡的策略国内外鲜见报道。本研究构建特异性高效激活 PKR 的重组逆转录病毒双表达载体,包装病毒并感染白血病 K562 细胞,观察细胞生长和凋亡情况,旨在探索一种新的 CML 基因治疗策略。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　主要试剂　　*Taq* DNA 多聚酶为上海生物技术有限公司工产品,高保真 *Taq* 酶(*Taq* Plus),限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ、*Sac* Ⅰ、*Hind* Ⅲ,DNA 连接试剂盒、胶回收试剂盒均购于 TakaRa 公司。RPMI1640 培养基为 Hyclon 公司产品,胎牛血清(FCS)来源于杭州四季清公司,L-谷胺酰胺、2-氨基嘌呤(2AP)、聚凝胺(Polybrene)为 Sigma 公司产品。凋亡检测试剂 Annexin V-PE (BioVision),7AAD(深圳晶美)。Actin 抗兔一抗,辣根过氧化物酶标记兔抗羊 IgG 抗体,辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 抗体均购自武汉博士德公司;DAB 显色液、蛋白 marker、丙烯酰胺、PVDF(polyvinylidene fluoride)膜、N,N'-亚甲双丙烯酰胺、溴酚蓝、甘氨酸等购自北京中山生物技术公司;PKR 一抗和磷酸化抗体均购自 Santa Cruz 公司。

1.1.2　菌株及质粒　　大肠埃希菌(*E. coli*) DH5α 为本室保存菌种;pMSCV-neo 逆转录病毒载体购于 BD 公司,pSilencer3.0-H1 购于 Ambion 公司,IRES2-EGFP 由重庆医科大学医学超声工程研究所左国伟硕士惠赠。

1.1.3　引物及反义片段设计　　根据 BCR/ABL b3a2 型 mRNA(GenBank 登陆号:AJ131466)融合位点左右各 20 bp 序列设计互补序列 40as1 和 40as2,见表 1。序列两端设计酶切位点,为防止转录过早终止,其中一对核苷酸 T-A(斜体下划线标记)被更换为 C-g(单个碱基对的误配不会影响双链 RNA 对蛋白激酶 PKR 的激活[2])。合成 40s1、40s2 用以构建对照载体。根据 b3a2 融合点左右各 40 bp 序列合成 3'末端互补的序列 P80f 和 P80r(表 1),用以自身 PCR 扩增,其中 P80f 的序列如 40as1 进行单个碱基突变。合成亚克隆所需 PCR 引物 Ec-GFP、Xh-GFP、sa 和 Hd,序列见表 1。以上寡核苷酸均由上海生工合成,溶解后于 -20℃保存备用。

表 1　合成的序列

名称	序列
40as1	5'-GATCCACTGGCCGCTGAAGGGCTTCTGAACTCTGCTTAAATCCTTTTTTGGAAA-3' (54 nt)
40as2	5'-AGCTTTTCCAAAAAAGGATTTAAGCAGAGTTCAGAAGCCCTTCAGCGGCCAGTG-3' (54 nt)
40s1	5'-GATCCGGATTTAAGCAGAGTTCAAAAGCCCTTCAGCGGCCAGTTTTTTGGAAA-3' (54 nt)
40s2	5'-AGCTTTTCCAAAAAAACTGGCCGCTGAAGGGCTTTTGAACTCTGCTTAAATCCG-3' (54 nt)
P80f	5'-GATCGGATCCGAGGCTCAAAGTCAGATGCTACTGGCCGCTGAAGGCTTCTGAACTCTGCTTAAATCCAGTGGCTGAGTGGACGATGA-3' (88 nt)
P80r	5'-AGCTAAGCTTTTCCAAAAAAG TCATCGTCCACTCAG-3' (36 nt)
Ec-GFP	5'-CTAGAATTCAACCATGGTGAGC-3' (22 nt)
Xh-GFP	5'-GCACTCGAGCTTTACTTGTAC-3' (21 nt)
sa	5'-GTCGTCGACGGTACCGAATTCAT-3' (23 nt)
Hd	5'-CCGCTCGAGAAGCTTTTCC-3' (19 nt)

1.2　方法

1.2.1　*E. coli* DH5α 感受态细菌制备　　按文献[3]氯化钙法制备。

1.2.2　细胞培养 PT67 细胞(BD 公司)　　用含 10% 胎牛血清(V/V)DMEM 高糖培养基培养于含 5% CO_2 的 37℃恒温培养箱中;小鼠成纤维细胞 NIH3T3 细胞由重庆医科大学医学超声工程研究所马芳博士惠赠,培养条件同前;K562 细胞系由本室冻存,复苏后用含 10% FCS 的 PRMI1640 液培养,培养箱条件同前,常规换液传代,取对数生长期的细胞作实验。

1.2.3　pH1-BCR/ABL40as、pH1-BCR/ABL40s 和 pH1-BCR/ABL80as 重组质粒的构建及鉴定　　40as1、40as2 和 40s1、40s2 片段两端分别引入 *Bam*H Ⅰ、*Hind* Ⅲ酶切位点(表 1),融解退火成双链后插入质粒 pSilencer3.0-H1,获得 pH1-BCR/ABL40as 和 pH1-BCR/ABL40s 重组载体;引物 P80f 和 P80r 部分互补(表 1),自身 PCR、酶切后插入 pSilencer3.1-H1,获得重组质粒 pH1-BCR/ABL80as。

1.2.4　pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL40AS、pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL40S 和 pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL80AS 重组逆转录病毒双表达载体的构建及鉴定　　首先以逆转录病毒载体 pMSCV-neo 为骨架构建重组载体 pMSCV/GFP。引物 Ec-GFP 和 Xh-GFP(表 1) PCR 扩增质粒 IRES2-EGFP 的 EGFP 片段,产物 744 bp, *Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切后插入载体 pMSCV-neo 得到 pMSCV/GFP;其次,以引物 sa 和 Hd(表 1) PCR 扩增重组载体 pH1-BCR/ABL40as、pH1-BCR/ABL40s 和 pH1- BCR/ABL 80as 的 RNA 表达框:H1-40as、H1-40s 和 H1-80as,产物经 *Sal* Ⅰ、*Hind* Ⅲ

双酶切后插入 pMSCV/GFP，获得重组载体 pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL40AS、pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL40S、pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL80AS。各重组载体均经酶切、测序鉴定。

1.2.5 病毒包装及滴度测定（参考 BD 公司逆转录病毒操作手册，PT3132-1） 分别以脂质体 lipofectamin2000 介导逆转录病毒载体 pMSCV/GFP、pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL40AS、pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL40S 和 pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL80AS 转染 PT67 包装细胞，48 h 后换成含 0.5 mg/ml G418（GIBCO 公司）的完全 DMEM 培养液继续培养，每 4 天换液 1 次，筛选 7～14 d，挑取阳性细胞克隆；PT67-MSCV/GFP、PT67-40as、PT67-40s 和 PT67-80as，继续培养至细胞完全融合时吸取培养基，离心取上清，以 NIH3T3 为靶细胞测定病毒滴度（colony forming unit，CFU/mL），将滴度大于 5.0×10^5 CFU/ml 病毒上清保存于 -80 ℃备用。病毒滴度计算公式如下：

$$\text{CFU/ml} = \frac{\text{GFP 阳性细胞克隆数}}{\text{病毒原液体积 ml 数}} \times \text{细胞稀释倍数}$$

1.2.6 细胞生长曲线 实验分组：PT67-MSCV/GFP、PT67-40as、PT67-40as＋2AP（2AP 为 PKR 抑制剂）、PT67-80as、PT67-80as＋2AP 和 PT67-40s 处理组；各组病毒上清经 0.45 μm 醋酸纤维素膜过滤后感染 K562 细胞，同时培养基中加入 polybrene（终浓度为 4 μg/ml），以 1×10^4/孔接种 24 孔板；此外，PKR 抑制剂处理组（PT67-40as＋2-氨基嘌呤组、PT67-80as＋2-氨基嘌呤组）还需加入 PKR 抑制剂 2-氨基嘌呤（终浓度 5 mmol/L）；接种后常规培养，连续 7 d 以台盼蓝染色计数活细胞数目，绘制细胞生长曲线。

1.2.7 流式细胞仪（FCM）检测细胞凋亡 实验分组及细胞处理同前，培养 24 h 后，收集 K562 细胞，用预冷的 PBS 缓冲液洗细胞 2 次，再用 1 × Binding Buffer 制成 1×10^6 细胞/mL 的悬液，加入 Annexin V-PE 与核酸染料 7AAD，轻轻混匀，室温避光处放置 15 min，加入 400 μl 1 × Binding Buffer，流式细胞仪（FACScan，美国 BD 公司）测定结果。

1.2.8 Western blot 测定 PKR 磷酸化 细胞处理同前，收集处理后的细胞，PBS 冲洗细胞 3 次，加入细胞裂解液（50 mmol/L Tris-HCl，pH 7.2，0.1% 去氧胆酸钠，1% Triton X-100，5 mmol/L EDTA，5 mmol/L EGTA，150 mmol/L NaCl，10 mmol/L NaF，0.4 mmol/L 正钒酸钠，0.1% SDS，0.1% 抑酶肽，1 mmol/L PMSF）冰上孵育 30 min，4 ℃ 12 000 × *g* 离心 10 min，以 BSA 为标准蛋白，用 Bradford 法测定上清液蛋白浓度。9% SDS-PAGE 分离蛋白后电转移至 PVDF 膜，用 5% 脱脂奶粉封闭，PBS 冲洗后，加入抗 PKR 抗体，4 ℃过夜，PBS 冲洗，加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h，DAB 显色后，用 Bio-Rad 图像分析系统对所得区带的积分光密度进行扫描分析。

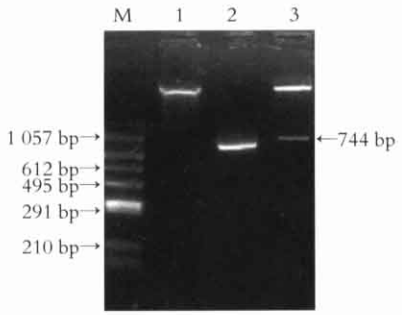
1.3 统计学处理

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SAS 8.2 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 重组载体的鉴定

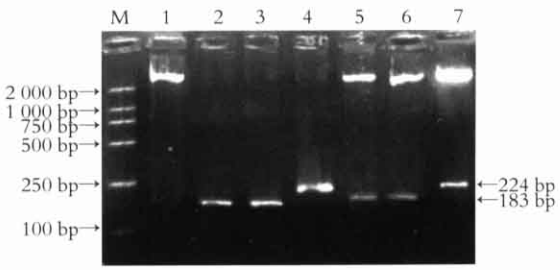
pMSCV/GFP 经 *Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ 双酶切，1% 琼脂糖凝胶电泳，在 Bio-Rad 凝胶成像仪下观察结果并照相，结果显示产生了 744 bp 左右的小片段，与 EGFP PCR 产物位置一致，酶切鉴定结果如图 1。重组载体进一步经测序证实序列完全正确，测序结果未显示。



M：φX174-Hinc Ⅱ DNA 标准；1：pMSCV-neo 载体；2：PCR 扩增 IRES2-EGFP 质粒得到的 GFP 片段；3：*Eco*R Ⅰ & *Xho* Ⅰ 双酶切 pMSCV/GFP 的片段

图 1 pMSCV/GFP 酶切鉴定

质粒 pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL40AS、pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL40S 和 pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL80AS 经 *Sal* Ⅰ 和 *Hind*Ⅲ双酶切，1.5% 琼脂糖凝胶电泳后，可见 200 bp 左右的小片段，与对应的插入片段产物位置一致，结果如图 2。测序鉴定：因为 H140as、H140s 和 H180as 片段插入位点在 pMSCVneo 载体的 neo 基因后，无现成的测序引物，所以我们另外设计测序引物 p2：5′-ATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGC-3′ 23 bp，测序结果经 DNAman 软件比对分析完全正确，测序结果未显示。



M：DL2000 DNA 标准；1：*Sal*Ⅰ和 *Hind*Ⅲ酶切的 pMSCV/GFP 片段；2：H140as PCR 片段；3：H140s PCR 片段；4：H180as PCR 片段；5：*Sal*Ⅰ和 *Hind* Ⅲ 酶切的 pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL40AS 片段；6：*Sal*Ⅰ和 *Hind*Ⅲ 酶切的 pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL40S 片段；7：*Sal*Ⅰ和 *Hind*Ⅲ 酶切的 pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL80AS 片段

图 2 pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL40AS、pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL40S、pMSCV/GFP-H1-BCR/ABL80AS 酶切鉴定

2.2 病毒滴度检测

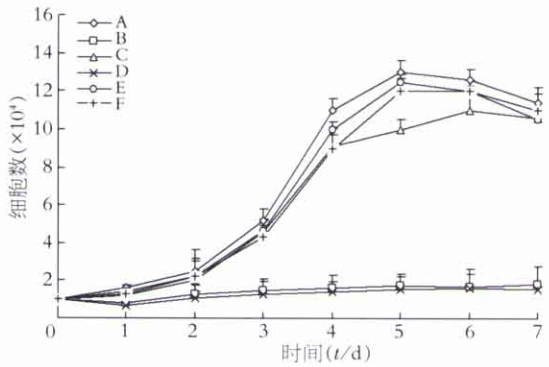
以不同稀释度的病毒上清感染 NIH3T3 细胞，24 h 时在倒置荧光显微镜下计数 GFP 的阳性细胞，各病毒上清 10 × 稀释度下细胞荧光表达情况相当，结果如图 3。PT67-MSCV/GFP、PT67-40as、PT67-40s 和 PT67-80as 病毒滴度经计算后依次为：6.2×10^5 CFU/ml，5.6×10^5 CFU/ml，4.6×10^5 CFU/ml 和 6.0×10^5 CFU/ml。结果表明 GFP 表达成功，可作为报告基因用于感染效率检测，且各逆转录病毒载体包装成功。

2.3 逆转录病毒对 K562 细胞生长曲线的影响

逆转录病毒感染 K562 细胞后，细胞生长曲线显示 PT67-40as 和 PT67-80as 组细胞生长明显受抑制，而 2-氨基嘌呤处理能抑制这种效应，结果如图 4。



图 3　重组逆转录病毒感染 NIH3T3 细胞后 GFP 的表达
（荧光显微镜 ×200）

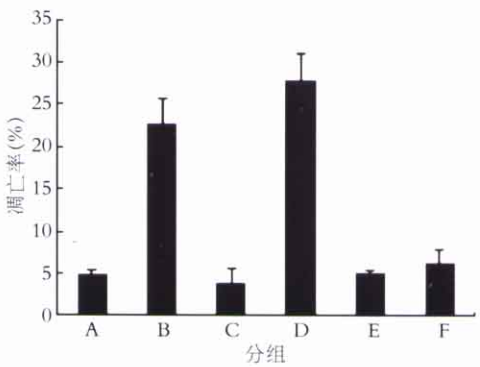


A：PT67-MSCV/GFP 处理组；B：PT67-40as 处理组；C：PT67-40as +2AP 处理组；D：PT67-80as 处理组；E：PT67-80as + 2AP 处理组；F：PT67-40s 处理组

图 4　细胞生长曲线

2.4　Annexin V-PE/7AAD 双染法检测细胞凋亡

FCM 检测结果显示，24 h 后 PT67-40as 组细胞早期凋亡率达（22.54 ± 3.19）%，与除 PT67-80as 组外的其余各组相比有显著差异（$P < 0.05$），结果见图 5。

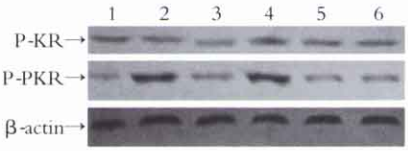


逆转录病毒感染 K562 细胞 24 h 后，K562 细胞的凋亡情况经 Annexin V-PE/7AAD 染色后用流式细胞仪检测。得到的数据为 3 次实验的平均数；A：PT67-MSCV/GFP 处理组；B：PT67-40as 处理组；C：PT67-40as + 2AP 处理组；D：PT67-80as 处理组；E：PT67-80as + 2AP 处理组；F：PT67-40s 处理组。用 Student's t test 方法进行统计学分析。B 组的凋亡率与 A、C、E、F 组相比较有显著性差异（$P < 0.05$）

图 5　各病毒处理 24 h 后 K562 细胞的凋亡率

2.5　Western blot 检测 PKR 蛋白磷酸化情况

各病毒处理 K562 细胞后 PKR 蛋白表达及磷酸化 Western blot 结果如图 6 所示，PKR 蛋白表达水平无明显改变，但 PT67-40as 和 PT67-80as 处理组 PKR 磷酸化水平增高。将各目的条带与内参 Actin 的密度相比，PT67-40as 和 PT67-80as 处理组 PKR 磷酸化分别增高了 59.20% 和 60.33%，与其余组比较均有显著性差异（$P < 0.05$）。



1：PT67-MSCV/GFP 处理组；2：PT67-40as 处理组；3：PT67-40as +2AP 处理组；4：PT67-80as 处理组；5：PT67-80as + 2AP 处理组；6：PT67-40s 处理组

图 6　Western blotting 检测 K562 细胞 PKR 磷酸化状况

3　讨论

因为 bcr-abl 在 CML 中高度特异，所以目前绝大多数的研究都是针对 bcr-abl 基因及其蛋白产物展开的，包括：反义 RNA、反义 DNA、反义核酶、RNA 干涉技术（RNA interference，RNAi）和 BCR-ABL 蛋白激酶抑制剂 STI571（CML 治疗一线药物）。这些研究虽然有一定的效果，但是，一旦 CML 进展到急变期，就会对包括 STI571 在内的多种药物耐药。本课题组前期研究显示阻断 STAT5 信号途径能部分逆转 K562 细胞表型[4]，可见从不同的侧面探索 CML 新的治疗策略具有重要的现实意义。

文献[5，6]提示 PKR 可作为新的肿瘤治疗靶点。PKR 是一种 RNA 依赖蛋白激酶，在宿主细胞抗病毒感染中起到重要作用，其可被病毒 dsRNA 激活并与 eIF2α、p53、NF-κB、MEK、IRF-1 和 FADD 等分子作用，在抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡中起重要作用，故而 PKR 也被归为抗肿瘤分子[5]。本实验以此为切入点，在原理上与以往各技术完全不同[7]，其兼顾 CML 特异性 bcr-abl 融合基因和 PKR 能被 dsRNA 激活的特点，设计针对 BCR-ABL b3a2 型 mRNA 构建的由 H1 启动子驱动的重组逆转录病毒双表达载体，表达 bcr-abl mRNA 的反义 RNA 片段，并与之形成特定长度的 dsRNA 以激活 PKR，进一步诱导 K562 细胞凋亡。通常，激活 PKR 的 dsRNA 长度有一定要求，小于 20 bp 的 dsRNA 不足以激活 PKR，激活 PKR 的 dsRNA 长度要求在 40 ~ 85 bp，且较长的片段的激活能力较强。因此，我们设计反义 RNA 位置在 bcr-abl 基因融合点左右各占 20 nt，共 40 nt，所以，这 40 nt 的 RNA 能和

b3a2 型融合基因 mRNA 相结合形成足够长度的 dsRNA 激活 PKR;而反义 RNA 与对照细胞,即:bcr-abl 阴性细胞的 bcr 基因 mRNA 或者 abl 基因 mRNA 结合最多产生 20 bp 的 dsRNA,其不足以激活 PKR,从而使反义 RNA 能特异性地引起 K562 细胞凋亡。本研究通过 Western blot 试验检测到 PT67-40as 和 PT67-80as 处理组细胞 PKR 磷酸化水平增高,且能被 2AP 抑制,以及 PT67-40s 处理组没有明显变化,说明激活 PKR 的确能够引起 K562 细胞凋亡。

其次,本实验所采用 pMSCVneo 逆转录病毒载体系统,其 PT67 细胞基因组中整合了病毒包装所需的 gag、pol 和 env 基因,包装过程中形成复制完全型病毒(replication competent retrovirus, RCRs)至少需要 2 次基因重组,在生物安全性方面得到进一步提高;此外,逆转录病毒载体对骨髓来源细胞的基因转导效率高,可承载 6.5 kb 的外源序列,实验中插入 eGFP 编码区序列和 H1 启动子短 RNA 表达框不会影响逆转录病毒载体的复制、包装和感染等生物学活性[6,7]。H1 启动子能精确控制 <400 nt RNA 的转录,其在 RNAi 技术中常用来控制 50 nt 左右长的 RNA 表达,在本实验中设计来控制了 40 nt 和 80 nt 长的 RNA 表达。

综上所述,实验成功构建重组逆转录病毒双表达载体,并发现其能抑制 K562 细胞生长及诱导细胞凋亡,通过激活 PKR 抗肿瘤可望成为肿瘤新的靶向治疗策略。PKR 激活后引起凋亡的具体机制目前正在进一步研究中。

(致谢:感谢重庆医科大学感染性疾病分子生物学实验室张文露老师、医学超声工程研究所左国伟硕士和马芳博士在实验中给予的帮助!)

参考文献:

[1] GOLDMAN J M, MELO J V. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment[J]. N Engl J Med, 2003, 349(15): 1451-1464.

[2] BEVILACQUA P C, GEORGE C X, SAMUEL C E, *et al*. Binding of the protein kinase PKR to RNAs with secondary structure defects: role of the tandem A-G mismatch and noncontiguous helixes[J]. Biochemistry, 1998, 37(18): 6303-6316.

[3] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W 著. 分子克隆实验指南[M]//第3版. 黄培堂,王嘉玺,朱厚础, 等译. 北京:科学出版社,2002: 96-99.

[4] 王小中, 冯文莉, 史梅, 等. 诱骗寡核苷酸靶向阻断信号转导和转录活化蛋白5抑制 K562 细胞生长增殖[J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(12): 724-727.

[5] DONZE O, DENG J, CURRAN J, *et al*. The protein kinase PKR: a molecular clock that sequentially activates survival and death programs [J]. EMBO J, 2004, 23(3): 564-571.

[6] SHIR A, LEVITZKI A. Inhibition of glioma growth by tumor-specific activation of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(9): 895-900.

[7] SCHERR M, BATTMER K, SCHULTHEIS B, *et al*. Stable RNA interference (RNAi) as an option for anti-bcr-abl therapy[J]. Gene Ther, 2005, 12(1): 12-21.

(编辑 陈聪连)

《中华创伤杂志》2007 年征订启事

《中华创伤杂志》创刊于 1985 年 9 月,是国内唯一能全面、系统地反映我国创伤医学成果和发展动向的高级医学专业学术期刊。本刊能较充分地反映我国创伤医学领域临床救治和基础研究所取得的重要进展和重大成就,如严重多发伤救治和创伤评分、交通伤临床救治及基础理论研究、创伤流行病学分析、部位伤救治、创伤分子生物学、创伤免疫学研究等。本刊主要栏目有专家论坛、述评、论著、经验交流、新技术、病例报道、综述、讲座等。本刊以从事创伤医学和相关学科的各级临床医师和研究人员为读者对象。

国家科技部中国科技信息研究所信息中心、中国科学院文献情报中心等单位均将本刊收录并列为核心期刊,其影响因子和总被引频次均居国内医学期刊,尤其是外科类期刊的前列。本刊被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》($P_{Ж}$)等著名检索系统收录。

本刊页码为 80 页,定价 14.80 元/册,全年共计 177.60 元。我们将进一步了解读者需求,增加应用研究和临床类文章的刊稿量,更加注重总体设计,调整并丰富栏目。真诚希望您能赐予我刊高质量的文章,敬请您对杂志提出宝贵的意见,以便使它更贴近您的需要。同时,也希望你随时订阅《中华创伤杂志》。国内订阅:全国各地邮局,邮发代号 78-83,编辑部办理邮购。

地 址:重庆市渝中区大坪长江支路 10 号《中华创伤杂志》编辑部 邮 编:400042

电 话:(023)68757458 传 真:(023)68818654 E-mail:zhcszz@163.com

网 址:http://zhcs.chinajournal.net.cn, http://www.cmaph.com.cn