论著

文章编号:1000-5404(2008)23-2194-04

细胞死亡调控基因GRIM19重组腺病毒的构建及在恶性胶质瘤CHG-5细胞中的表达

姚声涛[1*],黄 轶[2,3*],曾昭淳[2],唐文渊[1] (重庆医科大学:[1]附属第一医院神经外科,[2]基础医学院生物化学与分子生物学教研室,重庆 400016,[3]附属儿童医院临床分子医学中心,重庆 400014)

摘 要:目的 构建细胞死亡调控基因GRIM19(genes associated with retinoid-IFN-induced mortality 19)重组腺病毒载体,观察GRIM19对病毒包装细胞是否具有细胞毒作用,并验证其对脑胶质瘤CHG-5细胞的感染效率。**方法** 采用PCR方法分别将GRIM19以及EGFP基因亚克隆至穿梭质粒pAdTrack-CMV,在BJ5183(pAdeasy)菌内同源重组,筛选阳性克隆,酶切测序鉴定,线性化后转染293T细胞进行包装、扩增、纯化,PCR检测病毒上清,$TCID_{50}$法测定病毒滴度并感染CHG-5细胞后Western免疫印迹法验证GRIM19蛋白表达。**结果** 连接重组后经酶切和测序法筛选出pAd-GRIM19;转染293T包装细胞,观察到绿色荧光蛋白(GFP)明显表达,细胞生长状态良好,未见明显细胞毒作用。Ad-GRIM19及Ad-EGFP初纯病毒经氯化铯梯度离心纯化最终获得约5×10^{10} U/ml与8×10^{10} U/ml滴度的重组病毒;将其体外感染胶质瘤CHG-5细胞,均能达到90%左右的感染率,Western免疫印迹法表明Ad-GRIM19感染组GRIM19蛋白表达明显升高。**结论** 成功构建了携带GRIM19基因的重组腺病毒,为体内外进一步研究GRIM19对脑胶质瘤的作用奠定了基础。

关键词:GRIM19;腺病毒;胶质瘤细胞;CHG-5

中图法分类号:R394-33;R394.3;R730.264 **文献标识码**:A

Construction of recombinant GRIM19 gene adenovirus and its expression in glioma cell CHG-5

YAO Sheng-tao[1], HUANG Yi[2,3], ZENG Zhao-chun[2], TANG Wen-yuan[1] ([1]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, [3]Center for Clinic Molecular Medicine, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To construct the adenoviral recombinant plasmid encoding the genes associated with retinoid-IFN-induced mortality 19 (GRIM19), and observe its cytotoxic effect on the viral packaging cells and evaluate the expression of GRIM19 in human glioma cell line CHG-5. **Methods** The GRIM19 gene and IRES2EGFP gene were respectively subcloned into pAdTrack-CMV plasmid. After confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing, the recombinant plasmid of pAdTrack-CMV-GRIM19 was linearized with *Pme* Ⅰ and transformed into competent BJ5183 cells containing pAdeasy-1 vector. Then the positive clones with homologous recombination (pAd-GRIM19) was confirmed by *Pac* Ⅰ digestion and transfected into the packaging 293 T cells to generate virus and the viral supernatant containing the GRIM19 gene was confirmed by PCR. After the virus was tittered by using $TCID_{50}$ method, CHG-5 cells were infected with the recombinant adenovirus and the expression of GRIM19 was detected by Western blot analysis. **Results** The recombinant adenoviral plasmid pAd-GRIM19 was successfully constructed. The adenoviral titers for GRIM19 and EGFP control recombinant were 5×10^{10} U/ml and 8×10^{10} U/ml respectively. The recombinant virus infected CHG-5 cells with great efficiency. **Conclusion** The recombinant adenoviral plasmid of pAd-GRIM19 and pAd-EGFP control are constructed successfully. GRIM19 is overexpressed in CHG-5 cells, providing a basis for further study of GRIM19 *in vitro* and *in vivo*.

Key words: the genes associated with retinoid-IFN-induced mortality 19; adenovirus; glioma cell line CHG-5

神经胶质瘤是最常见的神经系统原发肿瘤,手术、放化疗等传统方法治疗效果差。治疗预后差,易复发已成为胶质瘤治疗研究的迫切课题[1]。近年研究显示胶质瘤的发生、发展与STAT3过度表达与持续活化密切相关[2,3],STAT3活性抑制剂可诱导恶性脑胶质

作者简介:姚声涛,男,贵州省遵义市人,博士研究生,副主任医师,主要从事颅内肿瘤方面的研究,发表论文10余篇。E-mail:zhuyf1027@163.com

*:同等贡献者

通信作者:唐文渊,电话:13908308771

收稿日期:2008-06-16;修回日期:2008-07-23

瘤细胞凋亡[1]。STAT3 信号途径可能是恶性脑胶质瘤干预治疗的一种有效分子标靶[2,4]。

GRIM19 (genes associated with retinoid-IFN-induced mortality 19)是新近由干扰素 β(interferon beta, IFN-β)/全反式维甲酸(all-trans retinoic acid,ATRA)联合诱导产生而命名的一种细胞死亡调控基因,GRIM19 能特异地与 STAT(signal transducers and activators of transcription)家族中 STAT3 蛋白相互作用,是关键信号分子 STAT3 特异抑制分子,其高表达能抑制肿瘤细胞增殖、促细胞凋亡[5-8]。

本研究拟在采用复制缺陷型腺病毒作为基因治疗载体,构建携带 GRIM19 基因的腺病毒,观察 GRIM19 对正常细胞 293T 是否具有毒性,并进一步将其作用人恶性胶质瘤 CHG-5 细胞株,观察其感染能力,为体内外研究 GRIM19 能否应用于恶性胶质瘤的基因治疗奠定基础。

1　材料与方法

1.1　主要材料与试剂

穿梭质粒 pAdTrack-CMV(携带 EGFP 报告基因),含腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 的 *E. coil* BJ5183 菌,DH5α 与 TOP10 大肠杆菌,包装细胞 293T 以及 pCDNA3.1-GRIM19 质粒均由本实验室保存。脑胶质瘤 CHG-5 细胞株由第三军医大学西南医院病理学研究所提供,限制性内切酶 *Not* Ⅰ、*Hind* Ⅲ、*Pme* Ⅰ和 *Pac* Ⅰ、T_4 DNA 连接酶(New England Biolabs),1 kb DNA 标准,RT-PCR 反转录试剂盒(TaKaRa 公司),SYBR Green Master Mix (TOYOBA 公司),碱性磷酸酶、质粒提取试剂盒及 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒(OMEGA 公司),脂质体 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司),DMEM 高糖细胞培养基、胎牛血清(GIBCO 公司),人 GRIM19 鼠单抗(BD 公司),goat anti-mouse IgG/HRP 二抗(北京中衫公司),蛋白抽提 RIPA(上海申能博采公司),SuperSignal West Pico 化学发光底物 kit(Pierce 公司)。

1.2　穿梭质粒 pAdTracker-CMV-GRIM19 的构建与鉴定

分别取 pAdTrack-CMV 和 pCDNA3.1-GRIM19 质粒,各经 *Hind* Ⅲ和 *Not* Ⅰ双酶切后,琼脂糖凝胶电泳回收,T_4 连接酶 16 ℃过夜定向连接,产物转化 DH5α 感受态菌。挑选阳性克隆,扩增后提纯质粒进行酶切鉴定。

1.3　pAd -GRIM19 重组质粒的制备[9,10]

pAdTrack-CMV -GRIM19 经 *Pme* Ⅰ酶切线性化后琼脂糖凝胶电泳回收,碱性磷酸酶(CIAP)去磷酸化后 $CaCl_2$ 法转化含 pAdeasy-1 的超感受态 BJ5183,经细菌内同源重组,卡那霉素抗性筛选。挑选单克隆菌落,小量扩增后提取质粒进行 *Pac* Ⅰ酶切鉴定。取鉴定为阳性的质粒转化 TOP10 感受态菌进行扩增,挑选阳性克隆。同样方法获得 pAd-EGFP 对照重组质粒。

1.4　pAd-GRIM19 重组腺病毒的包装、纯化与滴度测定

取 10 μg pAd-GRIM19 质粒经 *Pac* Ⅰ酶切,去除 ori 和 kan 抗性基因等质粒构件,Lipofactamine2000 转染 293T 细胞,当 293T 细胞出现完全细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)时,收获 293T 细胞,-80 ℃与 37 ℃反复冻融 3 次获得 pAd-GRIM19 第一代腺病毒。按上述方法将第一代病毒反复感染 293T 细胞进行腺病毒扩增,初纯的腺病毒经 1.25 ~ 1.35 g/ml $CsCl_2$ 密度梯度离心和透析纯化,$TCID_{50}$ 法[11]测定病毒滴度,-70 ℃ 冻存备用。同方法获得 pAd-EGFP 对照病毒。

1.5　pAd-GRIM19 重组腺病毒的 PCR 鉴定

取 Ad-GFP 对照病毒与 Ad-GRIM19 病毒上清液各 5 μl,分别与 1 μl 蛋白酶 K(20 g/L)在 55 ℃ 2 h,煮沸 5 min,高速离心后稀释 100 倍,取 1 μl 上清稀释液为模板,用 PCR 扩增 GRIM19 DNA:上下游引物分别为 5′-AACAAGATCTTCGTGGAGAC-3′ 和 5′-TGATGGCCTTCTCGTAC-3′。扩增产物为 452 bp,反应条件为 94 ℃预变性 3 min,94 ℃变性 45 s,56 ℃退火 35 s,72 ℃延伸 1 min,35 个循环,最后在 72 ℃延伸10 min,1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

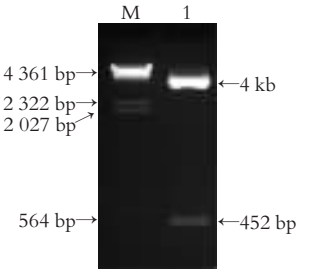
1.6　pAd-GRIM19 在 CHG-5 细胞中的表达与免疫印迹鉴定

取感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 120 的 pAd-EGFP 对照与 pAd-GRIM19 病毒分别在无血清和双抗的 DMEM 培养基中感染 CHG-5 细胞,2 h 后补加含 10% FBS DMEM,37 ℃ 5% CO_2,持续孵育 48 h 后荧光倒置显微镜成像,观察 EGFP 绿色荧光表达情况。蛋白提取液 RIPA 提取细胞总蛋白,具体操作按说明书进行,BCA 法定量蛋白。取 20 μg 细胞总蛋白,12% 变性 SDS-PAGE 电泳,半干转印至 PVDF 膜,5% 脱脂奶封闭,β-actin 鼠单抗(1∶400),GRIM19 鼠抗(1∶1 000)4 度封闭过夜,TBST 洗膜,goat anti-mouse IgG/HRP 二抗(1∶8 000)室温孵育 1 h,ECL 法显色。

2　结果

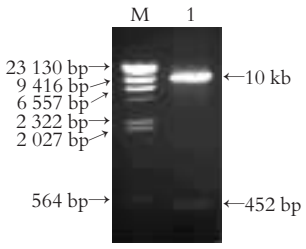
2.1　pAdTrack-CMV- GRIM19 质粒的构建与鉴定

包含 GRIM19 目的基因的 pCDNA3.1-GRIM19 经 *Not* Ⅰ与 *Hind* Ⅲ双酶切后可获得大小为 4 kb 和 452 bp 的 GRIM19 的两个片段(图 1)。将 GRIM19 基因亚克隆入 pAdTrack-CMV 中,构建的重组质粒 pAdTrack-CMV-GRIM19 质粒,经 *Not* Ⅰ与 *Hind* Ⅲ双酶切,可获得大小为 10 kb 和 452 bp 的两个片段(图 2),测序结果表明序列正确。表明 GRIM19 基因已成功亚克隆入 pAdTrack-CMV 腺病毒穿梭质粒。



M: DNA 标准; 1: pCDNA3.1-GRIM19 质粒经 *Not* Ⅰ + *Hind* Ⅲ双酶切

图 1　pCDNA3.1-GRIM19 的双酶切鉴定

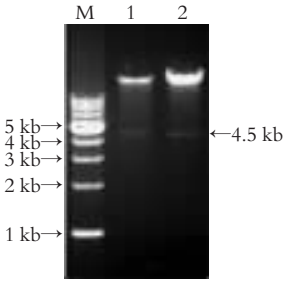


M:DNA 标准; 1: pAdTrack-CMV- GRIM19 质粒经 *Not* Ⅰ + *Hind* Ⅲ 双酶切

图 2 pAdTrack-CMV- GRIM19 的双酶切鉴定

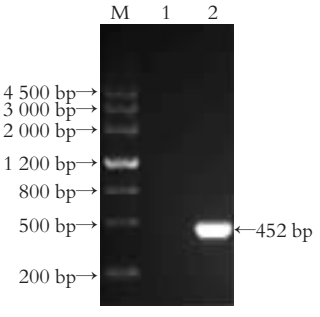
2.2 重组腺病毒质粒及包装后病毒上清的鉴定

pAd-EGFP 重组腺病毒对照质粒与 pAd-GRIM19 重组腺病毒质粒经 *Pac* Ⅰ酶切释放出一大于 20 kb 的大片段和 4.5 kb 的特征性小片段(图 3)。经过同源重组后,由于在 pAdTrackerC-MV 的 MCS 插入了 GRIM19 目的基因,并且以 pAd-GRIM19 为模板,以 P1, P2 为引物进行 PCR 反应,获得约 452 bp 的扩增产物(图 4),证明 GRIM19 基因已成功插入到腺病毒骨架质粒中。由于 pAdeasy-1 是氨苄青霉素抗性, pAdTrack-CMV/GRIM19 是卡那霉素抗性,pAdeasy-1 中的氨苄青霉素抗性基因及复制起始位点被重组掉,重组后质粒上具有卡那霉素抗性,据此特点可对含有重组质粒的 BJ5183 进行初筛。



M: 1 kb DNA 标准 ; 1: *Pac* Ⅰ单酶切腺病毒对照重组质粒 pAd-EGFP;2: *Pac* Ⅰ单酶切腺病毒重组质粒 pAd-GRIM19

图 3 pAd-EGFP 与 pAd-GRIM19 重组腺病毒质粒的 *Pac* Ⅰ单酶切鉴定

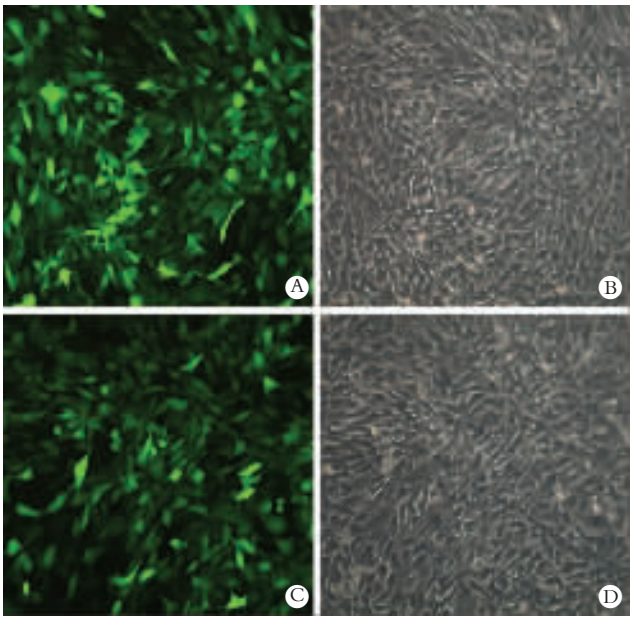


M: 200 bp DNA 标准; 1: PCR 扩增 Ad-EGFP 对照病毒上清 GRIM19 基因; 2: PCR 扩增 Ad-GRIM19 病毒上清 GRIM19 基因

图 4 pAd-EGFP 与 pAd-GRIM19 重组腺病毒上清 GRIM1 基因的 PCR 鉴定

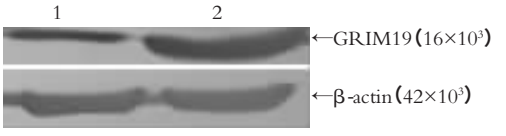
2.3 重组腺病毒 pAd-GRIM19 滴度测定及在 CHG-5 细胞中的表达

Ad-EGFP 对照病毒及 pAd-GRIM19 重组病毒经扩增及纯化后,各自滴度分别可达 8×10^{10}、5×10^{10} U/ml,均以 MOI 值为 120 感染 CHG-5 细胞,感染结果表明 GRIM19 重组病毒与EGFP 对照病毒均能较好感染 CHG-5 靶细胞,感染率在 90% 左右,48 h 时细胞状态均良好(图 5)。实验组 GRIM19 蛋白明显增强(图 6)。



A、B:EGFP 重组对照腺病毒感染 CHG-5 细胞的荧光显微镜与光镜成像; C、D :GRIM19 重组腺病毒感染 CHG-5 细胞的荧光显微镜与光镜成像

图 5 重组 EGFP 对照腺病毒与 GRIM19 基因重组腺病毒感染脑胶质瘤 CHG-5 细胞株 (×100)



1: CHG-5 经重组 Ad-EGFP 对照腺病毒感染 48 h 后 GRIM19 蛋白表达; 2: CHG-5 经重组 Ad-GRIM19 腺病毒感染 48 h 后 GRIM19 蛋白表达

图 6 Western blot 检测 GRIM19 在 CHG-5 细胞株的表达

3 讨论

复制缺陷型腺病毒载体具有许多优点:感染的宿主细胞范围广,既可以感染分裂细胞又可以感染非分裂细胞;感染效率高,容易制备高滴度的病毒粒子;以低剂量方式产生蛋白, 不裂解细胞,重组腺病毒导入细胞的目的基因并不整合入宿主细胞染色体中。其在基因治疗和临床研究中应用广泛,另在腺病毒中插入报告基因 EGFP,使得病毒滴度和感染效率检测简单方便。

为进一步研究 GRIM19 对恶性胶质瘤的效应, 本实验选择了腺病毒表达体系 Adeasy-1 系统,将腺病毒骨架质粒与带有目的基因及 EGFP 报告基因的穿梭载

体在 *E. coli* BJ5183 菌中进行同源重组，利用菌内高效的 RecA 重组酶，将穿梭载体和骨架质粒在细菌内发生同源重组，在 293T 细胞中进行重组腺病毒的包装和扩增，成功制备了高滴度的重组 GRIM19 腺病毒，由此表明 GRIM19 基因对 293T 包装细胞系并无明显细胞毒性。

有研究显示 GRIM19 随胶质瘤细胞诱导分化而表达增高，表明 GRIM19 与胶质瘤细胞的分化关系密切[12]。本研究选择了由我国学者自行建立的一种恶性人脑间变性星形细胞瘤的细胞系—CHG-5 细胞[1]。将重组腺病毒感染 CHG-5 系，通过蛋白质印迹直接检测 GRIM19 在受感染的 CHG-5 细胞中的表达。MOI = 120 感染 24 h 后，感染效率可达 90% 以上，证实该腺病毒对恶性胶质瘤 CHG-5 系具有高效感染性，并能介导 GRIM19 基因在转染细胞高效表达。因此，利用腺病毒载体介导 GRIM19 基因在胶质瘤 CHG-5 细胞中的表达，可为研究 GRIM19 对胶质瘤的分化调控及其信号转导通路奠定坚实基础。

参考文献：

[1] 陈自强，卞修武，辛　榕，等. 人脑胶质瘤细胞系 CHG-5 的建立及其生物学特性的分析[J]. 第三军医大学学报，1999，21（12）：880－883.

[2] Iwamaru A，Szymanski S，Iwado E，*et al*. A novel inhibitor of the STAT3 pathway induces apoptosis in malignant glioma cells both *in vitro* and *in vivo*[J]. Oncogene，2007，26(17)：2435－2444.

[3] 陈飞兰，张华蓉，卞修武，等. 诺帝对大鼠 C6 脑胶质瘤的诱导分化治疗作用及对信号转导分子 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响[J]. 中华神经外科杂志，2005，21(6)：359－362.

[4] 张化明，陈谦学，邹志鹏，等. 人脑胶质瘤中 STAT 3 和 VEGF 表达的相关性[J]. 中国临床神经外科杂志，2006，11(5)：279－281.

[5] Yu H，Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age[J]. Nat Rev Cancer，2004，4(2)：97－105.

[6] Zhang J，Yang J，Roy S K，*et al*. The cell death regulator GRIM-19 is an inhibitor of signal transducer and activator of transcription 3[J]. Proc Natl Acad Sci USA，2003，100(16)：9342－9347.

[7] Lufei C，Ma J，Huang G，*et al*. GRIM-19，a death-regulatory gene product，suppresses STAT3 activity via functional interaction[J]. EMBO J，2003，22(6)：1325－1335.

[8] Kalakonda S，Nallar S C，Lindner D J，*et al*. Tumor-suppressive activity of the cell death activator GRIM-19 on a constitutively active signal transducer and activator of transcription 3[J]. Cancer Res，2007，67(13)：6212－6220.

[9] 卓贤露，姜振东，魏运军，等. 大鼠 Otos 基因重组腺病毒载体的构建和鉴定[J]. 第三军医大学学报，2008，30（6）：533－535.

[10] 黄佳祎，毕　杨，左国伟，等. 腺病毒载体介导的 HBx 表达对 HepG2 细胞中 PPARγ 定位的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30（18）：1693－1696.

[11] Svensson L，Hjalmarsson A，Everitt E. $TCID_{50}$ determination by an immuno dot blot assay as exemplified in a study of storage conditions of infectious pancreatic necrosis virus[J]. J Virol Methods，1999，80(1)：17－24.

[12] 黄　强，董　军，王爱东，等. 胶质瘤细胞分化与恶性进展相关分子研究[J]. 中华神经外科疾病研究杂志，2005，4（3）：227－232.

（编辑　王　红）

（上接 2190 页）

对照组（$P<0.05$）。服米非司酮后绝大部分患者无严重不良反应，仅 5.3% 出现恶心、头晕、乏力等副反应，一般不需特殊治疗，停药后缓解。复查肝功能，肝酶无升高。除产后月经复潮较迟外，2 组中期引产后患者服药后至月经恢复时间无明显差别（$P>0.05$），分别为平均 33.2、34.6 d。

3　讨论

产后不规则出血是产后及中期引产后常见症状，与子宫本身结构异常，多次流产，子宫胎盘面修复不良等因素有关，严重者可以导致盆腔感染，继发贫血、不孕；新生化汤治疗时间相对较长，疗效不够确切。

米非司酮为受体水平的抗孕酮药物，主要作用于子宫内膜的孕酮受体，引起子宫蜕膜和绒毛的变性[1]；米非司酮可使宫颈软化扩张，提高子宫对催产素的敏感性，引发子宫收缩；米非司酮抗孕激素的同时尚有抗雌激素作用，从而认定米非司酮有抗子宫内膜增殖的作用[2,3]。米非司酮通过上述机制促使宫腔收缩，加速组织的修复，促进子宫复旧，使阴道流血停止。尤其适用于阴道流血时间长的患者，B 超未能明确有宫内组织残留，已行 1～2 次清宫术者，可避免不必要的医疗纠纷，是短期有效的治疗方法。

中药新生化汤具有活血、化瘀、消炎、止血的作用。可见中药新生化汤对加速子宫复旧的作用是多方面的，联合氨甲苯酸达到止血的目的。

以前往往对无宫内残留的产后继续不规则出血仅使用止血抗炎药物，目前米非司酮用于宫内残留的产后出血已有较多经验，在治疗功能失调性出血也取得了成功。本次试验表明米非司酮用于无宫内残留的产后不规则出血也有较好疗效，比新生化汤更可靠。

关键词： 阴道出血；引产；米非司酮

中图法分类号： R984　　**文献标识码：** B

参考文献：

[1] 徐　明. 小剂量米非司酮治疗围绝经期功能性子宫出血的临床观察[J]. 临床和实验医学杂志，2006，5(11)：1768.

[2] 王振国，吕秋兰，朱　虹，等. 米非司酮配伍小剂量甲基睾丸素治疗子宫内膜非典型增生 50 例分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志，2002，18(4)：233－234.

[3] 孟晓燕. 药物流产后加服产妇安口服液对阴道出血时间的影响[J]. 郑州大学学报：医学版，2007，42(5)：1006－1007.

（编辑　栾　嘉）