文章编号:1000-5404(2011)18-1887-06

论著

携SH2-Caspase8融合基因重组腺病毒的构建及对K562细胞增殖的影响

刘双凤,胡 晶,曹唯希,史 静,彭 智,王海霞,李亚娟,冯文莉 (400016 重庆,重庆医科大学临床血液学教研室,临床检验诊断学教育部重点实验室)

[摘要] **目的** 构建并鉴定携SH2-Caspase8融合基因的重组腺病毒AdE-SC-EGFP及其突变体,观察其对K562细胞增殖的抑制作用。**方法** 采用RT-PCR、重叠PCR扩增SH2-Caspase8融合基因,克隆至腺病毒穿梭载体pAdTrack-CMV中,构建穿梭质粒pAdT-SC-EGFP,进行酶切和测序鉴定。将*Pme* Ⅰ酶切后的穿梭质粒转化pAdEasy-BJ5183感受态,通过细菌内同源重组产生复制缺陷型重组腺病毒质粒pAdE-SC-EGFP及其突变体,*Pac* Ⅰ酶切后将其转染AD293细胞进行包装,PCR和Western blot鉴定重组腺病毒AdE-SC-EGFP,验证后扩增病毒并测定滴度。**结果** PCR检测、酶切和测序结果均表明腺病毒穿梭质粒pAdT-SC-EGFP和重组腺病毒质粒pAdE-SC-EGFP构建成功;PCR检测、EGFP表达检测结果证明重组腺病毒AdE-SC-EGFP包装成功,扩增后,滴度可达1.5×10^{12}pfu/ml。感染K562细胞后,Western blot检测目的蛋白的表达,MTT和半固体集落形成实验检测其对K562细胞生长增殖的影响。**结论** 成功构建并鉴定了携带SH2-Caspase8融合基因的重组腺病毒AdE-SC-EGFP及其突变体;MTT和克隆形成实验证明重组腺病毒AdE-SC-EGFP对BCR-ABL阳性的K562细胞有明显的增殖抑制作用。

[关键词] 细胞增殖;SH2;Caspase8;重组腺病毒;构建;K562细胞;bcr-abl
[中图法分类号] R394-33;R73-362;R733.7 [文献标志码] A

Construction of recombinant adenovirus carrying SH2-Caspase8 fusion gene and its effect on proliferation in K562 cells

Liu Shuangfeng, Hu Jing, Cao Weixi, Shi Jing, Peng Zhi, Wang Haixia, Li Yajuan, Feng Wenli (Department of Clinical Hematology, Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnosis of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] Objective To construct the recombinant adenovirus carrying SH2-Caspase8 fusion gene and its mutant to observe its inhibitory effect on proliferation of K562 cells. Methods SH2-Caspase8 fusion gene was amplified by RT-PCR and splicing PCR, and cloned into the shuttle plasmid pAdTrack-CMV of adenovirus. The shuttle plasmid pAdT-SC-EGFP was constructed and identified by double-enzyme digestion and DNA sequencing, and transformed into ultra-competent pAdEasy-BJ5183 after *Pme* Ⅰ digestion. Defective replication recombinant adenovirus plasmid pAdE-SC-EGFP and its mutant were generated by homologous recombination and further transfected into AD293 cells to package recombinant adenovirus after *Pac* Ⅰ digestion. Recombinant adenovirus plasmid AdE-SC-EGFP was identified by PCR and Western blotting, respectively, and amplified for the measurement of its titers. Results PCR, enzyme digestion and DNA sequencing showed that the shuttle and recombinant plasmids of adenovirus, pAdT-SC-EGFP and pAdE-SC-EGFP, were successfully constructed. PCR and EGFP expression confirmed that the recombinant plasmid of adenovirus, pAdE-SC-EGFP, was successfully packaged. After amplification, its titer was 1.5×10^{12}pfu/ml. Western blot analysis displayed the expression of target protein. MTT and colony formation test could inhibit the proliferation of K562 cells. Conclusion Recombinant adenovirus plasmid, AdE-SC-EGFP, carrying SH2-Caspase8 fusion gene and its mutant, has been successfully constructed, and can significantly inhibit the proliferation of BCR-ABL positive K562 cells *in vitro*.

[**Key words**] cell proliferation; SH2; Caspase8; recombinant adenovirus; construction; K562 cell; bcr-abl

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30871102). Corresponding author: Feng Wenli, Tel: 86-23-68485938, E-mail: fengwlcqmu@sina.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30871102)
[通信作者] 冯文莉,电话:(023)68485938,E-mail:fengwlcqmu@sina.com

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)特征性的BCR-ABL融合蛋白具有强烈的酪氨酸激酶活性,可以激活PI3K、Ras、STAT5等信号转导通路,导致细胞恶性转化[1]。目前因CML患者Bcr-Abl融合蛋白的激酶区发生点突变等,治疗CML的一线药物耐药性日益增多[2],因此,研究靶向激酶区外位点的治疗方法至关重要。在CML中,Bcr-Abl融合蛋白第177位酪氨酸磷酸化后(Y177-p),能与Grb2的SH2(Src homology2)结构域特异性结合,进而激活RAS-MAPK和PI3K-AKT细胞信号转导途径,导致细胞恶性转化。此外,在细胞凋亡的细胞膜死亡受体途径中,即Caspase8(半胱氨酸蛋白酶8)途径,凋亡蛋白Caspase8的激活是细胞发生凋亡的关键一步。

在SH2结构域可与Bcr-Abl的Y177-p特异性结合,以及Caspase8蛋白能诱导凋亡的分子基础上,本课题拟构建SH2-Caspase8融合肽,利用其SH2端竞争性抑制Grb2蛋白与Bcr-Abl的Y177-p的结合、Caspase8端诱导细胞凋亡的特性,达到抑制CML细胞增殖和诱导凋亡的双重目的。本研究拟通过基因重组技术构建重组腺病毒AdE-SH2-Caspase8及其突变体,并在慢粒细胞系K562细胞中高效表达外源性SH2-Caspase8蛋白,研究其对bcr-abl阳性慢性粒细胞白血病细胞增殖的影响,为进一步研究SH2-Caspase8融合蛋白对慢性粒细胞白血病的治疗机制和体内效应奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 质粒、菌株、细胞和生长条件 *E. coil* DH5α、BJ5183菌株、腺病毒穿梭载体pAdTrack-CMV、骨架载体pAdEasy-1、AD293细胞均为本室保存;DH5α常规培养用LB培养基,37 ℃振荡培养,氨苄青霉素二钠的工作浓度为100 μg/ml;AD293细胞用含10%胎牛血清的DMEM、37 ℃、5% CO_2培养。K562细胞接种在含10% FBS、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素、2 ml L-谷氨酰胺的RPMI1640细胞培养基,置37 ℃、饱和湿度的含5% CO_2的培养箱中培养。按1∶3传代、换液,培养致细胞状态良好的对数生长期细胞进行实验。

1.1.2 主要试剂及仪器 蛋白酶K、T_4 DNA连接酶、DNA聚合酶、DNA标准、RT-PCR试剂盒、各种限制性内切酶等均购自TaKaRa公司,限制性内切酶*Pme* Ⅰ、*Pac* Ⅰ购自New England BioLabs公司,DNA纯化试剂盒、PCR产物胶回收试剂盒购自华舜公司,质粒提取试剂盒(大提)购自Promega公司,脂质体Lipofectamine™2000、Trypsin-EDTA购自Invitrogen公司,DMEM与胎牛血清购自GIBCO公司,荧光显微镜(Nikon公司),CO_2培养箱(Heraeus Heracell-240)。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计与合成 根据GenBank中人Caspase8基因序列,设计并合成Caspase8的扩增引物。Caspase8-拼接:5′-GGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTTCGGACTCTCCAAGAGAAC-AG-3′,Caspase8-HA-R:5′-CCC AAGCTT CTAAGCGTAGTCTGG-GACGTCGTATGGGTAATCAGAAGGGAAGACAAGT-TTTT-3′(方框内为*Hind*Ⅲ酶切位点,下划线为HA序列)。

根据GenBank中人GRB2基因(NM_002086.4)SH2序列的CDS,设计并合成SH2的扩增引物。SH2-F:5′-CGG GGTACC GCCACCATGTGGTTTTTTGGCAAAATCCCCAG-3′, SH2-R: 5′-CCC AAGCTT TTCTATGTCCCGCAGGAATATCTG-3′(方框内为*Kpn* Ⅰ、*Hind* Ⅲ酶切位点),SH2-拼接:5′-ACCACCACCA-GAACCACCACCACCTTCTATGTCCCGCAGGAATATCTG-3′,产物大小为306 bp。SH2mut基因是在SH2蛋白第86位精氨酸突变为赖氨酸(R86K)的核苷酸序列,通过在突变位点设计重叠PCR引物扩增SH2mut基因,突变位点引物序列如下(下划线为突变位点):5′-CTCTCACTCTCTTTGATAAGAAAG-3′;R86KP2:5′-CTTTCTTATCAAAGAGAGTGAGAG-3′。上述引物合成及测序均委托上海生工完成。

1.2.2 目的基因的克隆腺病毒穿梭载体的构建 提取对数生长期的K562细胞的总RNA,逆转录合成cDNA,以SH2-F和SH2-拼接为引物扩增SH2拼接片段。PCR反应体系如下:5×PCR PrimerSTAR Buffer(Mg^+plus) 10 μl,dNTP Mixture 4 μl,模板1 μl,引物各1 μl,DNA Polymerase 0.5 μl,补ddH_2O至50 μl。反应条件如下:98 ℃,10 s;56 ℃,15 s;72 ℃,30 s,共30个循环;72 ℃延伸5min。同样以K562细胞的cDNA为模板,以Caspase8-拼接和Caspase8-HA-R为引物扩增Caspase8拼接片段,扩增条件均为98 ℃,10 s;54 ℃,15 s;72 ℃,40 s,30个循环。PCR产物经凝胶电泳后纯化回收,SH2拼接片段和Caspase8拼接片段以等摩尔比例,进行6个循环的拼接反应,再以此为模板,以SH2-F和Caspase8-HA-R为引物,扩增SH2-Caspase8融合基因,扩增条件为98 ℃,10s;54 ℃,15 s;72 ℃,60 s,30个循环。

同理,以SH2-F和R86KP1为引物扩增含突变位点的SH2mut上游片段,以R86KP2和SH2-R为引物扩增包含突变位点的SH2mut下游片段,扩增条件均为98 ℃,10 s;54 ℃,15 s;72 ℃,25 s30个循环。PCR产物胶回收后通过拼接PCR扩增SH2mut拼接片段基因全长,通过2次拼接PCR,扩增出SH2mut-Caspase8突变融合基因。将SH2-Caspase8和SH2mut-Caspase8分别克隆至穿梭质粒pAdTrack-CMV,命名为pAdT-SC-EGFP和pAdT-SmC-EGFP(SC为SH2-Caspase8的缩写,SmC为SH2mut-Caspase8的缩写)。

1.2.3 重组腺病毒质粒pAdE-SC-EGFP和pAdE-SmC-EGFP的构建 用$CaCl_2$法制备含骨架质粒的pAdEasy-BJ5183感受

态,酶切鉴定正确后分装保存。*Pme* Ⅰ酶切穿梭质粒 pAdT-SC-EGFP 和 pAdT-SmC-EGFP,CIAP 去磷酸化处理(50 ℃ 1 h)。将线性化片段转化 pAdEasy-BJ5183 感受态,在含卡那霉素的 LB 平板上培养(37 ℃,18 ~ 24 h),挑取单菌落增菌,提取质粒进行琼脂糖凝胶电泳。*Pac* Ⅰ酶切鉴定电泳位置高于骨架质粒 AdEasy-1 的重组质粒。鉴定正确的腺病毒载体命名为 pAdE-SC-EGFP 和 pAdE-SmC-EGFP。

1.2.4 重组腺病毒 AdE-SC-EGFP 和 AdE-SmC-EGFP 的包装和扩增 提前 12 h 将对数生长期的 AD293 细胞接种于 6 孔板,每孔 5×10^5 个细胞。5 μg pAdE-SC-EGFP 经 *Pac* Ⅰ酶切后用乙醇沉淀法纯化,测定浓度。将 Lipofectamine™2000 脂质体(μl)与纯化后质粒(μg)按照 3∶1,加入 1 ml DMEM 中,室温孵育 15 ~ 30 min,再逐滴加入含融合度达 50% ~ 60% AD293 细胞的 6 孔培养板中。培养 5 h,弃转染液,加入培养基 2 ml/孔。每隔 3 天在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况。当观察到细胞病变(cytopathic efect,CPE,即细胞开始成网状,伪足收缩,变圆、脱落漂浮)时,收集病毒悬液,离心弃上清,重复“冷冻-融化-涡旋振荡”4 次,离心收集病毒,获取第 1 代病毒原液,命名为重组腺病毒 AdE-SC-EGFP。重组腺病毒 AdE-SmC-EGFP 和空载腺病毒 AdE-EGFP 的包装步骤同上。

预先 6 ~ 15 h 在培养瓶中接种 7×10^6 AD293 细胞,细胞融合度达 80% ~ 90% 时,更换无血清 DMEM 培养基,加入 1 代病毒原液进行感染,2 h 后补加 DMEM 培养基(10% FBS),参考文献[3]。出现 CPE 时收集细胞,制备病毒悬液,步骤同上。经 4 轮扩增,获得高滴度的重组病毒。分装后置 -80 ℃保存。

1.2.5 重组腺病毒的滴度测定 将 AD293 细胞接种于 96 孔板(1×10^5/ml,100 μl/孔),12 ~ 24 h 后,DMEM 培养基孵育 20 min 后弃去,分别加入不同稀释度的重组病毒 AdE-SC-EGFP(10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10}、10^{-11}、10^{-12}、10^{-13}),10 μl/孔,培养 2 h 后,补加 90 μl 含 5% FBS 培养基,24 h 后于荧光显微镜下进行荧光计数,测定滴度,病毒滴度(pfu/ml) =(每孔荧光平均数 × 10)/稀释度。

1.2.6 重组腺病毒的鉴定 以重组腺病毒 DNA 为模板进行 PCR 检测,扩增目的基因 SH2-Caspase8 和 SH2mut-Caspase8,引物同前,琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。将对数生长期的 K562 细胞接种于 24 孔板中,分别用 MOI 为 10、20、50 和 l00 的重组腺病毒 AdE-SC-EGFP 和 AdE-SmC-EGFP 感染 K562 细胞,分别于 24、48 h 后在荧光显微镜下观察 EGFP 的表达情况,观察感染效率。

1.2.7 重组腺病毒在 K562 细胞中的表达与鉴定 将 AdE-SC-EGFP、AdE-SmC-EGFP 和空载腺病毒 AdE-EGFP 分别感染 AD293 细胞,48 h 后离心收集细胞(1 500 r/min,5 min),一部分常规提取 RNA,逆转录成 cDNA,再以此为模板,PCR 扩增 SH2-Caspase8 和 SH2mut-Caspase8,引物和条件同前;其余细胞用 PBS 洗涤 2 ~ 3 次,将冻融裂解的细胞样品制样,取适量进行 SDS-PAGE,电转移至 PVDF 膜上,以抗 HA 单抗为一抗(1∶1 000 稀释),羊抗鼠 IgG-HRP 为二抗(1∶1 000 稀释),ECL 化学发光系统检测目的蛋白表达。

1.2.8 MTT 实验检测重组腺病毒对 K562 细胞增殖能力的影响 收集对数生长期的 K562 细胞,2×10^4/孔接种于 96 孔培养板,感染 MOI 为 100 的 AdE-SC-EGFP、AdE-SmC-EGFP、空载腺病毒,同时设置 PBS 对照组。置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 72 h,在每组的平行孔中加入四甲基偶氮哇盐(MTT,浓度为 0.5 mg/ml),继续培养 4 h,1 000 × *g* 离心 10 min,小心弃去上清,加入 DMSO 200 μl,振荡 5 min,用酶标仪在 570 nm 处读取吸光度值[*D*(570)],计算细胞增殖抑制率。

细胞增殖抑制率 =[1 - 实验组平均 *D*(570)值/对照组平均*D*(570)值] × 100%

1.2.9 细胞集落形成实验观察 AdE-SC-EGFP 对细胞克隆形成能力的影响 实验分 3 组,分别为 AdE-SC-EGFP 处理组、突变对照组、PBS 对照,每组设 3 个平行孔,隔日在倒置显微镜下观察,培养 2 周后计数细胞集落,以 50 个以上细胞为 1 个集落,计算克隆抑制率:实验组集落形成率克隆抑制率 =(1 - 实验组集落形成率/对照组集落形成率) × 100%

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 15.0 统计软件进行组间差异方差分析。

2 结果

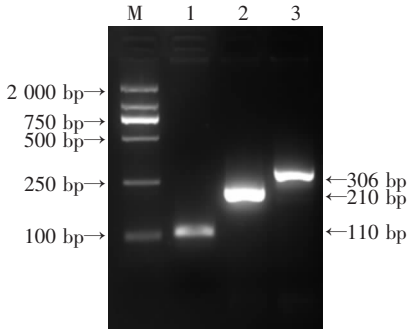
2.1 目的基因的克隆

2.1.1 SH2-Caspase8、SH2mut-Caspase8 基因的 PCR 扩增 通过 PCR 分别扩增出 SH2(306 bp)、Caspase8(842 bp),重叠 PCR 扩增 SH2mut 的上下游片段后拼接成全长(图 1);同时经重叠 PCR 将 SH2、Caspase8 拼接扩增出 1 130 bp 的 SH2-Caspase8(图 2),进行凝胶电泳鉴定,片段长度均符合预设计。

2.1.2 穿梭质粒的构建与鉴定 腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV,目的基因片段 SH2-Caspase8 和 SH2mut-Caspase8 分别经 *Hind* Ⅲ与 *Kpn* Ⅰ双酶切后连接过夜,转化后挑取单菌落摇菌,提取质粒进行 PCR 鉴定筛选阳性克隆,双酶切鉴定结果可见 1 130 bp的目的条带(图 3),测序验证结果证实序列与设计相符(sample:06030447),表明重组穿梭质粒 pAdT-SC-EGFP、pAdT-SmC-EGFP 构建成功。

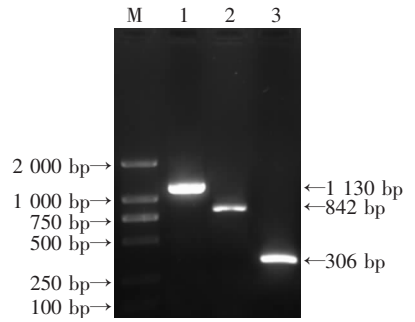
2.2 重组腺病毒的双酶切鉴定

将重组腺病毒穿梭质粒 pAdT-SC-EGFP 和 pAdT-SmC-EGFP 分别用 *Pme* Ⅰ酶切线性化后转化含有骨架质粒 AdEasy-BJ5183 感受态,摇菌提取质粒进行琼脂糖凝胶电泳,结果显示重组质粒 1、3、4、6、7 号的电泳条带位置要明显高于未重组的穿梭质粒 2、5 号(图 4)。重组腺病毒质粒 pAdE-SC-EGFP 和 pAdE-SmC-EGFP 分别经 *Pac* Ⅰ酶切后,电泳可见 2 条条带(图 5),若只有 9 kb 和 4 kb 的条带,说明只是切开了穿梭载体,穿梭载体与骨架载体在 BJ5183 中没有重组,如酶切后显示 30 kb 位置的大片段和 4.5 kb 的小片段,如 1、3 号,说明腺病毒穿梭质粒与骨架质粒重组成功。



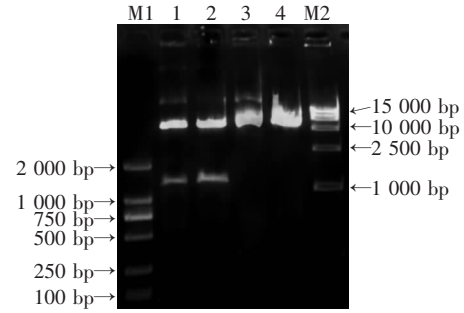
M：DL2000 标准；1：SH2mut 上游片段；2：SH2mut 下游片段；3：SH2mut 基因

图1 PCR 扩增 SH2mut 基因结果



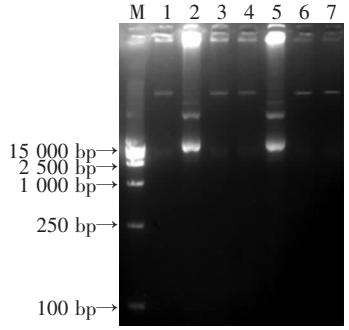
M：DL2000 标准；1：SH2-Caspase8 融合基因；2：Caspase8 基因；3：SH2 基因

图2 PCR 扩增 SH2-Caspase8 基因结果



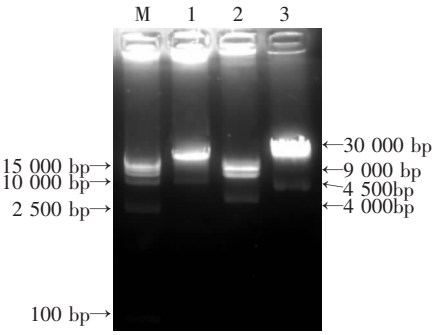
M1：DL2000 标准；1、2：pAdT-SC-EGFP；3：pAdT-SmC-EGFP；4：阴性对照 pAdTrack-CMV；M2：DL15000 标准

图3 重组穿梭质粒的双酶切鉴定结果



M：DL15000 标准；1、3、4、6、7：pAdE-SC-EGFP；2、5：pAdeasy-1

图4 重组腺病毒质粒电泳结果



M：DL15000 标准；1、3：重组质粒 pAdE-SC-EGFP；2：未重组质粒 pAdT-SC

图5 *Pac* Ⅰ 酶切 pAdE-SC-EGFP

2.3 重组腺病毒感染 AD293 细胞后绿色荧光蛋白的表达

Pac Ⅰ酶切纯化重组腺病毒质粒 pAdE-SC-EGFP 和 pAdE-SmC-EGFP，转染对数生长期的 AD293 细胞，3 d 后于荧光显微镜下可见少量 EGFP 表达，随着时间延长，荧光表达数量和强度逐渐增高，呈“满天星”状，到第 14 天时，荧光表达强度达峰值（图 6），有 35% ~50% AD293 细胞脱落漂浮，可以收毒。同时因为病毒扩增，可以明显的观察到 CPE，即细胞逐渐变圆，折光性增强，从瓶壁脱落下来。

2.4 重组腺病毒的滴度测定

通过倍比稀释法测定重组腺病毒的滴度，经 4 轮的扩增，重组腺病毒 AdE-SC-EGFP 和 AdE-SmC-EGFP 的滴度均可达 1.5×10^{12}，可满足后续实验要求。

2.5 重组腺病毒的 PCR 鉴定

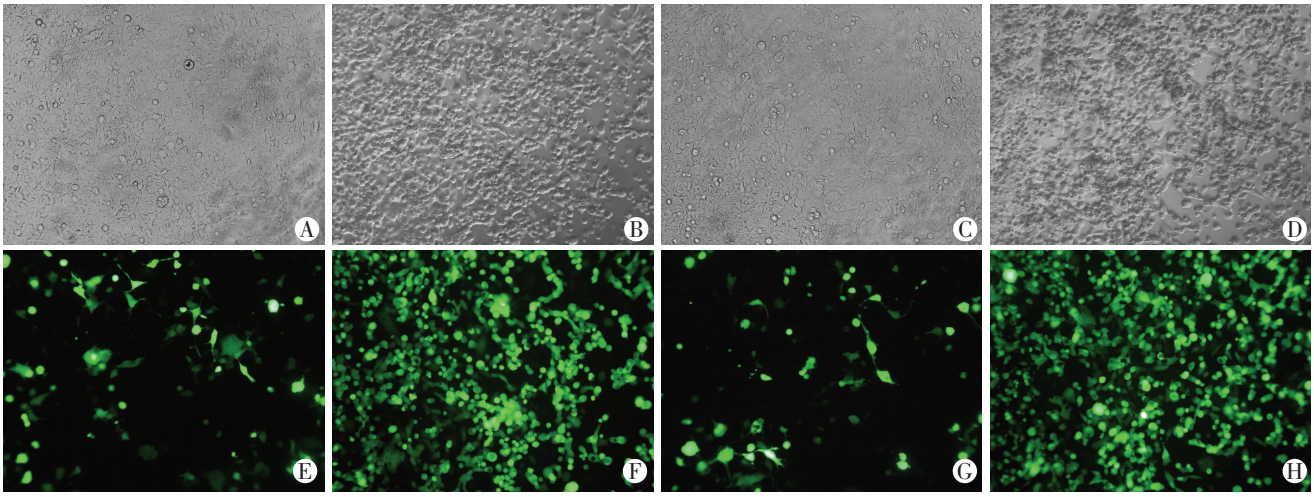
以蛋白酶 K 裂解法提取的重组腺病毒 AdE-SC-EGFP 和 AdE-SmC-EGFP 的 DNA 为模板，进行 PCR 检测，扩增产物经琼脂糖凝胶电泳可见 SH2-Caspase8 和 SH2mut-Caspase8 基因的特异性表达（1 130 bp），说明扩增的重组腺病毒中含有目的基因，重组腺病毒包装和扩增成功（图 7）。

2.6 重组腺病毒在 K562 细胞中的表达鉴定

将对数生长期的 K562 细胞接种于 24 孔板中，重组腺病毒感染 K562 细胞 72 h 后收集细胞，冰上用细胞裂解液裂解细胞，提取蛋白进行 SDS-PAGE；经过转膜，一抗二抗孵育，显色后，可检测到 82×10^3 的 SH2-Caspase8 和 SH2mut-Caspase8 蛋白（图 8），说明重组腺病毒能在 K562 细胞中高效表达 SH2-Caspase8 和 SH2mut-Caspase8。

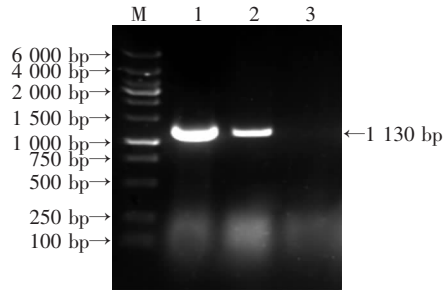
2.7 重组腺病毒对 K562 细胞增殖的影响

K562 细胞分别重组腺病毒 AdE-SC-EGFP、AdE-SmC-EGFP、PBS 对照组和空载对照处理后，MTT 结果显示，与突变对照组相比，AdE-SC-EGFP 对 K562 细胞有明显的增殖抑制作用，这种抑制作用随时间的延长而增强（图 9）。



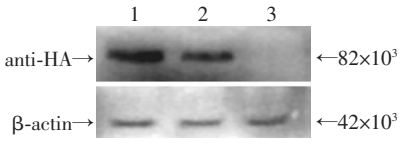
A、E:pAdE-SC-EGFP 第 3 天;B、F:pAdE-SC-EGFP 第 14 天;C、G:pAdE-SmC-EGFP 第 3 天;D、H:pAdE-SmC-EGFP 第 14 天;A-D:可见光下细胞形态;E-H:荧光显微镜下细胞形态

图 6　荧光显微镜观察病毒感染 AD293 细胞后绿色荧光蛋白的表达和 293 细胞形态变化　(×100)



M: DL6000 标准;1: 重组病毒 AdE-SC-EGFP;2: AdE-SmC-EGFP;3:阴性对照(无模板)

图 7　重组腺病毒的 PCR 鉴定结果



1: 经 AdE-SC-EGFP 感染;2:经 AdE-SmC-EGFP 感染;3: K562 细胞对照

图 8　Western blot 鉴定重组腺病毒感染 K562 细胞后目的蛋白的表达

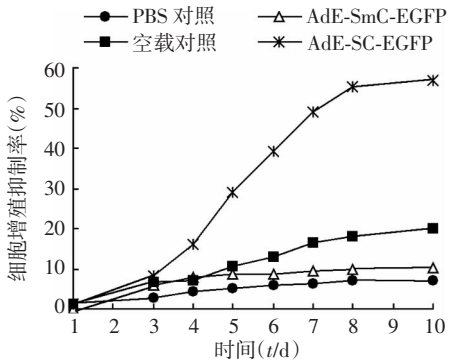
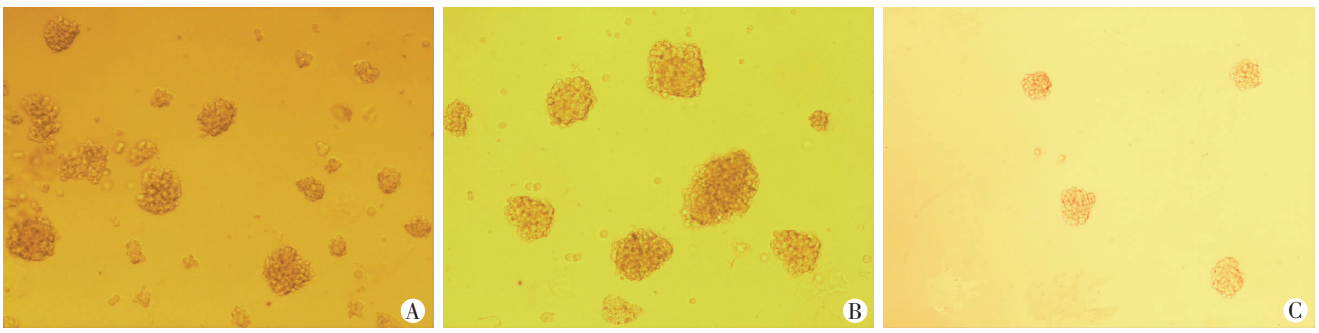


图 9　MTT 检测重组腺病毒 AdE-SC-EGFP 对 K562 细胞增殖的抑制作用

2.8　重组腺病毒 AdE-SC-EGFP 对 K562 细胞集落形成能力的影响

琼脂半固体培养 2 周后倒置显微镜可见光下成像显示 AdE-SC-EGFP 处理组集落形成少,所形成的集落包含的细胞数也偏少。而对照组形成的集落多,每个集落所包含的细胞数较多,形成紧密的团块状(图 10)。



A:PBS 对照;B:突变对照组;C:AdE-SC-EGFP 组

图 10　AdE-SC-EGFP 对 K562 细胞克隆形成能力的影响　(倒置显微镜 ×200)

3 讨论

在CML中,BCR-ABL是其治疗中的明确靶点。其中,第177位酪氨酸磷酸化后(Y177-p)特异性与Grb2的SH2结构域特异性结合,继而激活下游细胞信号转导途径,导致细胞恶性转化[4-5]。在细胞凋亡的细胞膜死亡受体途径中,凋亡蛋白Caspase8的激活是细胞发生凋亡的关键[6]。在上述分子基础上,本研究通过外源性高效表达SH2-Caspase8蛋白,通过:①竞争性抑制Grb2与Bcr-Abl的结合,导致RAS-MAPK、PI3K-AKT途径信号途径活化受抑,从而抑制CML细胞Ras依赖性增殖;②Caspase8蛋白的寡聚化,诱导CML细胞凋亡。

目前基因治疗载体中,慢病毒、逆转录病毒载体存在转染效率低、易整合致突变安全性等问题,而腺病毒载体具有较高的转染效率,既能感染增殖期又能转染静止期细胞,这对大多处于静止期造血细胞的转染尤其有利,且不整合到宿主基因组中。另外腺病毒载体构建、制备、扩增相对简便,且病毒滴度较高[7-9]。因而,腺病毒载体近年来已被广泛地用于造血细胞基因治疗和生物学机制研究。本研究采用Adeasy™系统,同源重组在大肠杆菌中进行,与传统的细胞内重组法相比同源重组率更好,并且重组载体的筛选更为简便。穿梭质粒pAdTrack-CMV上有携带CMV启动子的EGFP,可直接在荧光显微镜下观察目的蛋白在细胞中的表达情况,便于简便、直观的评估病毒包装和感染是否成功,观察腺病毒的转染效率[10-11]。骨架pAdEasy-1是E1和E3双缺失的载体,可以在表达E1的包装细胞系如293细胞中扩增。此外,AD293细胞株由于在常用的HEK293细胞基础上引入了促进贴壁和空斑形成能力的基因,在实验中更利于腺病毒的包装和扩增。

常用的bcr-abl阳性白血病细胞株主要有K562、KU812、32DP210、BaF3-p210等[12-13]。本课题组的前期实验发现,重组腺病毒对K562细胞的转染效率相对较高,可达到65%~85%,因此,本课题在成功构建重组腺病毒AdE-SC-EGFP及其突变体的基础上,为了验证目的基因对bcr-abl诱导的细胞增殖信号是否具有抑制作用,运用白血病慢性粒细胞株K562细胞,通过MTT和克隆形成实验来验证引入外源性SH2-Caspase8对bcr-abl阳性白血病细胞的增殖抑制作用。

总之,本研究应用Adeasy™系统腺病毒重组技术,成功构建了高效表达SH2-Caspase8融合基因的重组腺病毒质粒pAdE-SC-EGFP及其突变体,采用AD293细胞株包装扩增出复制缺陷的重组腺病毒AdE-SC-EGFP,并经PCR、酶切、测序、RT-PCR和Western blot等方法对重组载体进行了验证。在体外通过MTT和克隆形成实验证明了重组腺病毒AdE-SC-EGFP对K562细胞的增殖有明显的抑制作用,为进一步探讨腺病毒介导的SH2-Caspase8基因在体内外对慢粒白血病细胞的治疗作用及机制奠定了基础。

参考文献:

[1] Druker B J. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML[J]. Blood, 2008, 112(13): 4808-4817.

[2] Schiffer C A. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia[J]. N Engl J Med, 2007, 357(3): 258-265.

[3] Luo J, Deng Z L, Luo X, *et al*. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system[J]. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1236-1247.

[4] Brehme M, Hantschel O, Colinge J, *et al*. Charting the molecular network of the drug target Bcr-Abl[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(18): 7414-7419.

[5] Chu S, Li L, Singh H, *et al*. BCR-tyrosine 177 plays an essential role in Ras and Akt activation and in human hematopoietic progenitor transformation in chronic myelogenous leukemia[J]. Cancer Res, 2007, 67(14): 7045-7053.

[6] Pendergast A M, Quilliam L A, Cripe L D, *et al*. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein[J]. Cell, 1993, 75(1): 175-185.

[7] Ulasov I V, Tyler M A, Han Y, *et al*. Novel recombinant adenoviral vector that targets the interleukin-13 receptor alpha2 chain permits effective gene transfer to malignant glioma[J]. Hum Gene Ther, 2007, 18(2): 118-129.

[8] Sweigard J H, Cashman S M, Kumar-Singh R. Adenovirus-mediated delivery of CD46 attenuates the alternative complement pathway on RPE: implications for age-related macular degeneration[J]. Gene Ther, 2011, 18(6): 613-621.

[9] Huang P T, Chen K C, Prijovich Z M, *et al*. Enhancement of CPT-11 antitumor activity by adenovirus-mediated expression of beta-glucuronidase in tumors[J]. Cancer Gene Ther, 2011, 18(6): 381-389.

[10] 罗红伟, 田文君, 季茂胜, 等. β-TrCP-OD-HA重组腺病毒对白血病K562细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(15): 1602-1604.

[11] 卢忠燕, 甘立霞, 王哲, 等. 抑制FoxO1基因表达的siRNA重组腺病毒载体的构建及功能鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(23): 2215-2218.

[12] Shah N P, Tran C, Lee F Y, *et al*. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor[J]. Science, 2004, 305(5682): 399-401.

[13] O'Hare T, Shakespeare W C, Zhu X, *et al*. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance[J]. Cancer Cell, 2009, 16(5): 401-412.

(**收稿**:2011-04-18;**修回**:2011-05-30)

(编辑 王 红)