重组腺病毒介导的人 AWP1 基因转移对人源肝癌细胞增殖的影响

曹永宽，龚加庆，罗国德，周 均，王培红，张国虎，田伏洲 （成都军区总医院全军普通外科中心，四川 成都 610083）

［摘 要］ **目的** 以重组腺病毒作为 AWP1（associated with PRK1）的转基因载体，研究 AWP1 对人肝癌细胞增殖的影响，为进一步研究 AWP1 基因功能提供依据。**方法** 重组腺病毒质粒 pAd-flag-AWP1 转染 293 细胞进行重组腺病毒的包装和扩增，并进行 PCR 鉴定。用空病毒 Ad-Null 和重组腺病毒 Ad-flag-AWP1 分别感染人源肝癌细胞 SMMC-7721，并于感染后 24 h、72 h、第 5 天和第 7 天收集细胞计数，绘制细胞生长曲线，计算细胞倍增时间。**结果** 重组腺病毒 Ad-flag-AWP1 能够感染 SMMC-7721 细胞；依据细胞生长曲线计算的 SMMC-7721 细胞倍增时间分别为：SMMC-7721 细胞约为 5 d；而 Ad-Null 感染后其生长被抑制，倍增时间约为 6 d；Ad-flag-AWP1 感染后，其倍增时间约为 3 d。**结论** 重组 flag-AWP1 腺病毒转染 SMMC-7721 细胞过表达的 AWP1 蛋白可能具有促进人肝癌细胞生长的作用。

［关键词］ AWP1；重组腺病毒；肝癌；SMMC-7721

［中图分类号］ R735.7 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1672-5042(2010)05-0403-03

Influence of human AWP1 recombinant adenovirus on proliferation of hepatocarcinoma cells

CAO Yong-kuan, GONG Jia-qing, LUO Guo-de, ZHOU Jun, WANG Pei-hong, ZHANG Guo-hu, TIAN Fu-zhou
(General Surgery Center of PLA, Chengdu General Army Hospital, Chengdu Sichuan 610083, China)

Abstract: Objective To explore the influence of human AWP1 (associated with protein kinase C related kinase 1) recombinant adenovirus on the proliferation of hepatocarcinoma cells so as to further investigate the biologic function of AWP1. **Methods** Recombinant adenoviruses Ad-flag-AWP1 were packaged and amplified in 293 cells transfected by recombinant plasmids pAd-flag-AWP1, and were identified by PCR assays. Human hepatocarcinoma cells SMMC-7721 were infected by Ad-Null or Ad-flag-AWP1 and the cell number was counted at 24 h; 72 h; 5 d and 7 d after the infection. The cell growth curves were painted and the proliferation time was counted. **Results** According to the growth curves of SMMC-7721, the cell doubling time of SMMC-7721 was five days and that of Ad-Null was six days, but for the cells that were infected by Ad-flag-AWP1, the doubling time was only three days. **Conclusion** The expression of human AWP1 gene in human hepatocarcinoma cells infected by AWP1 recombinant adenoviruses may be able to accelerate the cellular proliferation.

Keywords: AWP1; recombinant adenovirus; liver cancer; SMMC-7721

肝癌的治疗一直没有取得突破性的进展。近年来，随着细胞信号转导研究的深入，了解和掌握肝癌细胞内的信号转导可能为其治疗提供有价值的思路。如蛋白激酶 C 相关激酶 1（protein kinase C related kinase 1，PRK1）就是蛋白激酶 C 相关激酶家族中最典型的成员，是一组由脂质激活的丝/苏氨酸激酶。在哺乳动物细胞中 PRK1 可与小分子 G 蛋白 RhoA 结合并被激活而参与细胞的生命活动[1-2]。AWP1（associated with PRK1）是 Duan 等[3]在利用酵母双杂交系统筛选可能与人类 CDc34 相互作用的蛋白质时发现的一种新蛋白，由于其能够与 PRK1 特异性地结合而得名，并由此推测 AWP1 可能通过 PRK1 等途径参加了细胞内的信号转导而参与细胞的分裂和增殖。运用绿色荧光蛋白作为指示剂对 AWP1 在细胞内的定位进行可视性研究发现，AWP1 表达定位于细胞浆内，表明其具有作为细胞信号蛋白的基本条件[4]。因此，本文采用细菌内同源重组法构建的重组腺病毒作为 AWP1 基因转移工具，研究 AWP1 蛋白的过表达对肝癌细胞株 SMMC-7721 生长的影响，初步探讨 AWP1 基因的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 材料

人胚肾 293 细胞系为本室保存。小牛血清（Hyclone 公司），RPMI 1660 培养基（Gibco 公司），Qiagen Plasmid Mini Kit（Qiagen 公司），3S Plasmid Miniprep Kit（Version 3.1，上海博彩生物科技公司），DNA 聚合酶 Taq、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 EcoR Ⅰ、BamH Ⅰ、Bgl Ⅱ、Not Ⅰ、Pac Ⅰ、Pme Ⅰ（大连宝生物公司），1kb DNA Marker（Gibco 公司），琼脂糖和 LB 培养基（Life Technology 公司），引物由大连宝生物公司合成。大肠杆菌 BJ5183、DH10B、穿梭质粒 pAdTrack-CMV、腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 购自 Strategene 公司，其他试剂为国产分析纯。携带

［作者简介］ 曹永宽（1965－），男，四川省南部县人，副主任医师，博士，主要从事普通外科基础与临床方面的研究。电话：(028)86570355

［收稿日期］ 2010-08-16 ［修回日期］ 2010-08-30

AWP1基因的原核细胞表达载体AWP1/pET-14b由本室构建。人肝癌细胞株SMMC-7721由刘晓波博士后赠送。

1.2 Ad-flag-AWP1的包装与病毒滴度测定

将克隆重组质粒flag -AWP1/pcDNA3经BglⅡ/NotⅠ双酶切出flag-AWP1基因片段,凝胶回收,亚克隆至经同样酶切的腺病毒穿梭质粒pAdTrack-CMV的MCS中,构建穿梭质粒pAdTrack-flag-AWP1。Pme Ⅰ酶切pAdTrack-flag-AWP1成线性化的穿梭载体片段,与超螺旋骨架质粒pAdEasy-1共转化BJ5183高效感受态菌。克隆质粒再转化DH5(感受态菌,提取质粒,Pac Ⅰ酶切鉴定。提取重组腺病毒质粒pAd-flag-AWP1 5 ug,用Pac Ⅰ酶切线性化。按照lipofectAMINE(Gibco公司)使用说明书操作,将线性化的质粒pAd-flag-AWP1转染293细胞,24 h后开始在荧光显微镜下观察转染效率和重组腺病毒包装情况。取病毒上清反复感染对数期生长的293细胞扩增重组腺病毒,命名为Ad-flag-AWP1。用倍比稀释的病毒上清分别感染293细胞,24 h后以绿色荧光蛋白(EGFP)阳性细胞数目计算病毒滴度[5-6]。

1.3 重组腺病毒Ad-flag-AWP1的PCR鉴定

取培养达对数生长期的293细胞,用含10%胎牛血清的DMEM培养液培养(5% CO_2,饱和湿度,37 ℃)至50%丰度时,高速低温离心纯化病毒上清,提取病毒DNA为模板,以扩增目的基因AWP1的引物进行PCR反应鉴定。PCR扩增的上游引物为5'-C GAATTC ATG GCT CAA GAA ACT AAT CAC AGC-3',下游引物为5'-CT GGATCC GCA ATC TTT TGG ATC TTT TCA CCA AC-3'。PCR反应体积为20 ul,引物浓度为25 pmol/ul,扩增参数为94 ℃ 5 min、94 ℃ 20 s、57 ℃ 20 s、72 ℃ 60 s,35个循环后72 ℃延伸10 min。扩增产物行1.0%琼脂糖凝胶电泳分析[6]。

1.4 Ad-flag-AWP1在细胞中感染效率测定

用0.25%胰蛋白酶消化处于对数生长期的SMMC-7721细胞,计数后用含1%胎牛血清的1660培养液培养(5% CO_2,饱和湿度,37 ℃)该细胞24 h;弃培养液,用纯化的重组病毒上清感染细胞,加入含10%胎牛血清的1660培养液培养24 h,用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达,并计算病毒感染效率。

1.5 Ad-flag-AWP1对细胞倍增时间的影响

以60%细胞感染率为度,用空病毒Ad-Null和重组腺病毒Ad-flag-AWP1分别感染经1%胎牛血清的1660培养液培养24 h的SMMC-7721细胞,于感染后24 h、72 h、第5天和第7天收集细胞计数,绘制细胞生长曲线,计算细胞倍增时间。每次2复孔,重复2次。

2 结果

2.1 Ad-flag-AWP1的包装和病毒滴度测定

Pac Ⅰ线性化的重组质粒pAd-flag-AWP1转染293细胞24 h后,在荧光显微镜下观察大约有40%的293细胞表达EGFP(图1),5~7 d后绝大多数293细胞均可见EGFP表达。取部分包装的Ad-flag-AWP1病毒上清反复感染293细胞扩增重组腺病毒,病毒上清滴度可达 2×10^8 efu/mL。

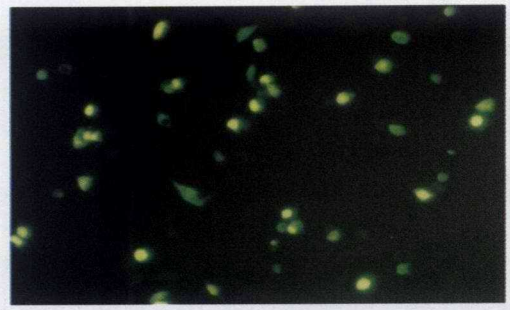
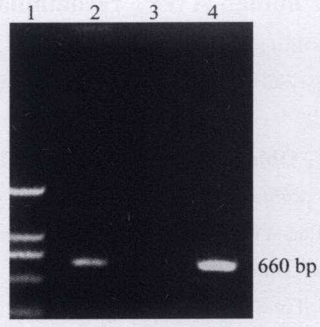


图1 重组腺病毒在293细胞中的EGFP表达(×100)

2.2 重组腺病毒Ad-flag-AWP1的PCR鉴定

以重组腺病毒Ad-flag-AWP1的病毒颗粒的基因组DNA为模板,以扩增目的基因AWP1的引物进行PCR反应,可扩增出预期大小约660 bp的条带,与插入的目的片段Flag-AWP1大小一致(图2)。



1:DL2000 DNA marker;2:Ad-flag-AWP1;3:空病毒Ad-Null;4:Flag-AWP1

图2 重组腺病毒Ad-flag-AWP1的PCR鉴定

2.3 Ad-flag-AWP1感染SMMC-7721细胞及感染效率

重组腺病毒Ad-flag-AWP1感染SMMC-7721细胞,24 h后可见EGFP表达所发出的绿色荧光(图3),表明该重组病毒具有感染SMMC-7721细胞的能力;当MOI为1:100时,其感染效率为80%;当MOI为1:50时,其感染效率为60%。

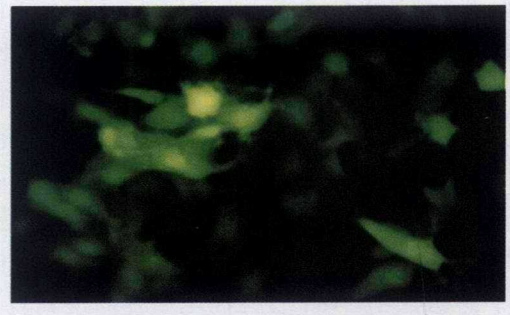


图3 重组腺病毒在SMMC-7721细胞中表达EGFP

2.4 重组腺病毒Ad-flag-AWP1感染对SMMC-7721细胞倍增时间的影响

Ad-Null(作对照)和Ad-flag-AWP1分别感染SMMC-7721细胞,绘制细胞生长曲线(图4)。依据细胞生长曲线,分别计算SMMC-7721细胞倍增时间为:SMMC-7721细胞约为5 d;而Ad-Null感染后其生长被抑制,倍增时间约为6 d;Ad-flag-AWP1

感染后,其倍增时间约为 3 d。

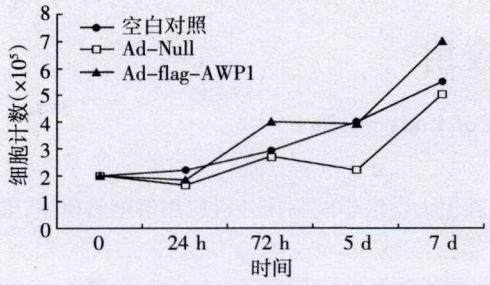


图 4 AWP1 对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞增殖的影响

3 讨论

随着现代分子生物学技术的应用,人类新基因不断被发现,AWP1 就是其中之一。尽管它在 2000 年就被成功的克隆和表达,但对其功能的研究一直没有任何进展[1-2]。为了方便 AWP1 基因功能的研究,本实验将其与缺陷型腺病毒进行重组,并且还便于以后在蛋白 - 蛋白相互作用研究中对 AWP1 蛋白的纯化检测,还在其前面增加了 flag 标签。重组腺病毒载体具有安全性好、无致癌性和致畸作用、转染效率高、感染细胞范围广等优点,可用于高效介导基因体内外转移。细菌内同源重组法构建重组腺病毒载体,采用超螺旋腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 与线性化穿梭质粒 pAdTrack-CMV 共转化含多种遗传重组酶的 BJ5183 菌,实现两个质粒的同源重组,具有重组效率高、技术简便等诸多的优点,而且由于骨架质粒 pAdEasy-1 自身携带有增强型绿色荧光蛋白 EGFP 的 cDNA 序列,因而其病毒包装过程可以在可视条件下完成,大大简化了病毒包装过程的观察和病毒滴度的检测[4-6]。

Duan 等[7] 对人体组织提取物的 Northern 分析发现,AWP1 蛋白在人类心、肝、肾等组织中有较高水平的表达。GenBank EST branch 搜索发现,AWP1 基因在人类结肠、子宫、卵巢、耳、大动脉和胚胎中心区 B 细胞等组织中广泛表达。在人类 8 ~ 9 周胎儿和小鼠 8-细胞期的 mRNA 中亦发现 AWP1 mRNA。上述分析表明,AWP1 可能在人类组织细胞的分裂、增殖和分化中发挥有意义的作用。

对推定的人类 AWP1 氨基酸序列分析显示,AWP1 的 C-末段和 N-末段存在保守的锌指结构,分别位于 149 ~ 189 位氨基酸的 ZF-AN1 和 11 ~ 35 位氨基酸的 ZF-A20。锌指结构蛋白 A20 有抑制 NF-(B 和凋亡的双重作用[8]。因此,本文推测 AWP1 可能在细胞增殖、凋亡等细胞调节中发挥重要作用。

在本实验中,将成功重组的人源 AWP1 基因构建的重组腺病毒 Ad-flag-AWP1[6] 感染人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞,观察 AWP1 对细胞增殖的影响。结果显示,AWP1 感染的 SMMC-7721 细胞较空病毒对照明显生长要快,其倍增时间明显缩短[9-11]。结果表明,AWP1 在人肝癌细胞的生长和增殖中可能具有促进作用,同时也表明 AWP1 基因可能是具有重要生物学功能的基因,值得进一步研究。

[参考文献]

[1] Amano M, Mukai H, Ono Y, et al. Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N[J]. Science, 1996, 271(5249): 648 - 650.

[2] 汤 勇,周训平,王晓芹. 原发性肝癌的基因治疗进展[J]. 局解手术学杂志,2009,18(3):202 - 203.

[3] Watanabe G, Saito Y, Madaule P, et al. Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhophilin as targets of small GTPase Rho[J]. Science, 1996, 271(5249): 645 - 648.

[4] 曹永宽,莫永炎,田伏洲,等. 人 GFP-AWP1 融合基因载体的构建及其在 293 细胞中的表达[J]. 第一军医大学学报,2005,25(2):174 - 176.

[5] 曹永宽,莫永炎,田伏洲,等. 人 AWP1-RFP 融合基因重组腺病毒的快速构建及其鉴定[J]. 中华神经医学杂志,2005,4(5):434 - 438.

[6] 曹永宽,莫永炎,刘志峰,等. 人 AWP1 重组腺病毒的构建及其在人血管内细胞中的表达和定位[J]. 中国普外基础与临床杂志,2009,16(12):987 - 990.

[7] Duan W, Sun B, Li TW, et al. Cloning and characterization of AWP1, a novel protein that associates with serine/threonine kinase PRK1 in vivo[J]. Gene, 2000, 256(1-2): 113 - 121.

[8] He TC, Zhou S, da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(5): 2509 - 2514.

[9] He KL, Ting AT. A20 inhibits tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced apoptosis by disrupting recruitment of TRADD and RIP to the TNF receptor 1 complex in Jurkat T cells[J]. Mol Cell Bio, 2002, 22(17): 6034 - 6045.

[10] 莫永炎,曹永宽,刘亚伟,等. 人 His-AWP1 融合蛋白表达载体的构建及其在原核生物的表达[J]. 中华神经医学杂志,2003,2(2):123 - 125.

[11] 曹永宽,莫永炎,薛 刚,等. RTP-AWP1 原核表达载体的构建及表达特性研究[J]. 华西医学,2008,23(4):701 - 703

(编辑:余汇洋)

《局解手术学杂志》http://www.JRAOS.com.cn