DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.10.006

文章编号:1000-5404(1999)10-0712-04

重组RA538、反义c-myc腺病毒对正常细胞作用的研究*

陈洁平** 徐采朴 (第三军医大学附属西南医院消化内科)重庆,400038
林 晨 张雪艳 隗 月 吴 旻 (中国医学科学院肿瘤研究所细胞生物室)北京,100021

提 要 **目的**:了解重组RA538、反义c-myc腺病毒载体对正常细胞的影响。**方法**:采用形态学观察、MTT、RT-PCR等方法,对腺病毒介导RA538及反义c-myc基因对正常人胚肺成纤维细胞(2BS)的影响进行研究。**结果**:以Ad-LacZ进行重组腺病毒转导效率检测发现腺病毒2BS细胞具有很高的转导效率。Ad-RA538、Ad-ASc-myc对正常人胚肺2BS细胞无生长抑制及凋亡诱导作用,同时Ad-RS538对2BS内源性c-myc、bcl-2基因的表达也无影响。**结论**:腺病毒载体具有很高的转导效率,能实现目的基因在转导细胞中的高水平表达。Ad-RA538、Ad-ASc-myc对2BS细胞无明显的生长抑制及凋亡诱导作用,对2BS细胞内源性bcl-2、c-myc基因的表达无调节作用。

关键词 腺病毒;基因治疗;维甲酸;c-myc;bcl-2
中图法分类号 R34;Q784 **文献标识码**:A

癌基因激活与抑癌基因失活是肿瘤发生最基本的分子机制[1,2]。因此,重建抑癌基因功能及抑制癌基因的表达成为目前肿瘤基因治疗所追求的基本目标。以往的研究显示,重组RA538及反义c-myc腺病毒在诱导肿瘤细胞凋亡的同时抑制了c-myc、bcl-2基因的表达,是理想的基因治疗药物。肿瘤基因治疗的靶细胞是肿瘤细胞,而携带目的基因的腺病毒载体在对肿瘤细胞有效杀灭的剂量范围内对正常细胞是否有抑制作用,是基因治疗安全性研究中的重要环节。本文就腺病毒介导RA538及反义c-myc基因对正常人胚肺成纤维细胞(2BC)的影响进行研究。

1 材料与方法

1.1 细胞系

293细胞为腺病毒E1基因转化的人胚肾细胞系。2BS细胞为人胚肺成纤维细胞系。培养条件均为DMEM培养基,含10%胎牛血清,37℃,5%CO_2。

1.2 重组体腺病毒的繁殖、滴度测定及鉴定

RA538、反义c-myc及LacZ重组体腺病毒(Ad-ASc-myc、Ad-LacZ)为中国医学科学院肿瘤研究所细胞生物室构建,为E1和E3区缺失的复制缺陷型腺病毒载体构建而成。采用Ad-RA538、Ad-ASc-myc、Ad-LacZ经鉴定为阳性的重组体腺病毒,在293细胞中进行繁殖。将腺病毒以10倍比稀释后,以293细胞进行滴度测定,取接近100%细胞病变的病毒稀释度,按公式计算。

取100 μl病毒液经蛋白酶K处理,酚抽提,乙醇沉淀后PCR鉴定。用1对目的基因引物及1对腺病毒基因组引物。扩增条件为95℃ 50 s,55℃ 1 min,30个循环。

腺病毒引物:上游:5′-TCGTTTCTCAGCAGCTGTTG-3′
下游:5′-CATCTGAACTCAAAGCGTGG-3′
RA538引物:上游:5′-ATGGGTGAACAACAGAAGAG-3′
下游:5′-TTAGAGATTCAGATTTGGCT-3′
反义c-myc引物:上游:5′-TACACGTTAGCTTCACCAAC-3′
下游:5′-TGGGCGAGCTGCTGTCGT-3′

1.3 病毒感染

按不同的实验需要接种一定量的细胞于培养皿中,24 h以内在细胞贴壁后感染病毒,以一定的感染强度(Multiplicity of infection,MOI)计算所需病毒量。弃培养液,用适量PBS稀释病毒后加入培养皿中,置37℃ CO_2孵箱中作用1 h,每15 min摇晃培养皿1次。之后加入完全培养基,置孵箱中培养。

1.4 腺病毒转导效率测定

采用重组腺病毒Ad-LacZ(含报告基因LacZ),按25、50、100、200 MOI感染细胞。培养细胞弃去培养基,1%多聚甲醛固定。加入X-gal染液[1 mg/ml X-gal溶于0.1 mol/L PBS中,1.3 mmol/L $MgCl_2$,3 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$,3 mmol/L $K_4Fe(CN)_6$],37℃孵箱中2~4 h。显微镜下观察,蓝染的细胞即LacZ基因表达的阳性细胞。计算蓝染细胞的百分率。

1.5 细胞生长曲线(MTT法)

采用96孔板,每孔接种细胞5 000~8 000个,24 h内按不同感染强度感染腺病毒。于不同时间点每孔加入MTT溶液(0.5 mg/ml),4 h后弃之,另加入DMSO,振摇数分钟后酶标仪检测每孔OD值。

1.6 逆转录PCR(RT-PCR)分析

细胞总RNA提取:按Promega公司的PRN gents TM Total RNA Isolation system试剂盒说明分别提取并纯化细胞系的总RNA。

逆转录:采用Promega公司M-MLV逆转录试剂盒说明将细胞总RNA的mRNA逆转录成cDNA。PCR条件:

PCR引物序列:

* 国家"863"计划资助项目,No. Z 20-01-02
** 陈洁平,女,36岁,主治医师,博士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

β-actin：上游：5′-GCGGGAAATCGTGCGTGACATT-3′
　　下游：5′-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3′
C-myc：上游：5′-CTCTCAACGACAGCAGCCCG-3′
　　下游 5′-AGGTGATCCAGACTCTGACC-3′
bcl-2：上游：5′-TGTGGCCTTCTTTGAGTTCG-3′
　　下游：5′-TCACTTGTGGCTCAGATAGG-3′

1.7 统计学分析

采用计算机统计程序进行 χ^2 检验及 t 检验。

2 结果

2.1 重组体腺病毒

Ad-RA538、Ad-ASc-myc 及 Ad-LacZ 3 种重组体腺病毒，经 293 细胞繁殖后制备成病毒贮存液。在 293 细胞中测定各重组体腺病毒滴度分别为 Ad-RA538 3.0×10^{9}、Ad-ASc-myc 3.0×10^{9}、Ad-LacZ 3.0×10^{11}。

提取各重组体腺病毒 DNA，分别以腺病毒、RA538 及反义 c-myc 的引物进行 PCR 鉴定，Ad-RA538 可见腺病毒及 RA538 阳性扩增带，Ad-ASc-myc 可见腺病毒及 ASc-myc 阳性扩增带，Ad-LacZ 可见腺病毒阳性扩增带。

2.2 重组体腺病毒的转导效率

采用插入 LacZ 报告基因的重组体腺病毒，进行重组体腺病毒对不同细胞转导效率的检测。以 Ad-LacZ 按 MOI 25、50、100、200 的量分别感染正常 2 倍体细胞(2BS)。48 h 后进行 X-gal 染色，结果见表 1。2BS 细胞在 MOI 大于 100 时，重组体腺病毒可达 90%的转导效率。

表 1　Ad-LacZ 对 2BS 细胞的转染效率

Tab 1　Transduction efficiency of Ad-LacZ Infected 2BS cells

MOI	Percent of positive cell by X-gal staining(%)
25	50
50	60
100	90
200	90

2.3 重组 RA538，反义 c-myc 腺病毒对正常 2BS 细胞的生物学作用

2.3.1 Ad-RA538、Ad-ASc-myc 对 2BS 细胞形态学的影响

以 Ad-RA538 及 Ad-myc MOI 100 的感染强度分别感染 2BS 细胞，对照组以 Ad-LacZ MOI 100 感染 2BS 细胞，观察持续 7 d，Ad-RA538 和 Ad-ASc-myc 与 Ad-LacZ 相比无明显变化，3 组 2BS 细胞形态均无明显改变。

2.3.2 Ad-RA538、Ad-ASc-myc 对 2BS 细胞生长的影响

用 MTT 法对感染 Ad-ASc-myc 及 Ad-LacZ 的 2BS 细胞生长情况进行检测，腺病毒量按 MOI 25～200 感染 2BS 细胞。应用 MTT 法测定感染后 2、4、6、8 d 的 OD_{525} 值。将 Ad-RA538、Ad-ASc-myc 和 Ad-LacZ 进行比较，得出其对 2BS 细胞生长影响值，见表 2。观察 2、4、6、8 d MTT 试验结果显示 Ad-RA538、Ad-ASc-myc 对 2BS 细胞生长均无明显影响。

表 2　Ad-RA538 及 Ad-ASc-myc 对 2BS 细胞生长的影响

Tab 2　Anti-proliferation effect of Ad-RA538 and Ad-ASc-myc on 2BS cells (8 d)

MOI	Survival(%)		
	Ad-RA538	Ad-ASc-myc	Ad-LacZ
25	100±8.1*	90.1±8.0*	90.8±1.3
50	100±5.2*	96.1±2.4*	98.3±3.5
100	96.0±4.3*	100±4.1*	100±6.4
200	97.7±3.1*	93.8±6.2*	98.1±7.0

*：$P>0.05$ *vs* Ad-LacZ

2.4 重组 RA538，反义 c-myc 腺病毒对正常 2BS 细胞 c-myc、bcl-2 基因表达的影响

分别提取 Ad-RA538 处理组 1、3、5 d 及对照组细胞的总 RAN，进行 RT-PCR 分析，结果显示，在 2BS 细胞中 c-myc 及 bcl-2 基因表达量极低，经加大模板量、降低退火温度及增加循环数等处理后，内源性的 c-myc 及 bcl-2 可见少量表达，而 Ad-RA538 对这 2 种基因的表达无调节作用，见图 1。

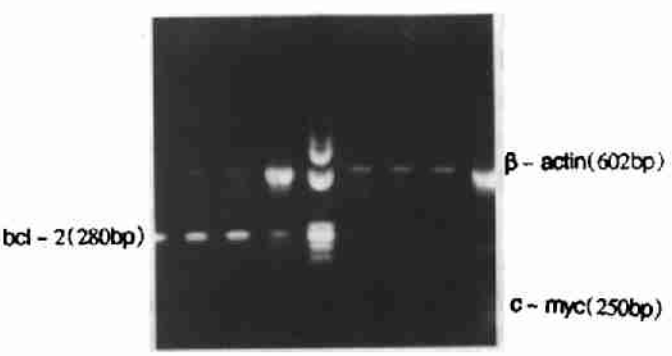


图 1　RT-PCR 分析 Ad-RA538 感染后 2BS 细胞 bcl-2、c-myc 基因表达

1～3：5 d、3 d、1 d；4：对照；5：分子量标准品；6～8：5 d、3 d、1 d；9：对照

Fig 1　RT-PCR analysis expression of c-myc and bcl-2 gene on 2BS cell infected with Ad-RA538

Lane 1～3：5 d、3 d、1 d；Lane 4：Control；Lane 5：DNA Marker；Lane 6～8：5 d、3 d、1 d；Lane 9：control

3 讨论

腺病毒载体在基因治疗中的广泛应用，使其安全性倍受关注。基因治疗的载体及目的基因对正常细胞的影响，是基因治疗安全性研究中的重要环节。国外已有一些相关的探索[3～6]，但多局限于腺病毒载体复制能力及对细胞生长的影响。有关目的基因对正常细胞中内源性基因表达的调节作用，未见报道。肿瘤基因治

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

疗的靶细胞是肿瘤细胞，而携带目的基因的腺病毒载体在对肿瘤细胞有效杀灭的剂量范围内对正常细胞传导效率如何，有无生长抑制作用，其分子机制怎样，是值得重视的问题，对此，我们研究了腺病毒介导RA538及反义c-myc基因对正常人胚肺成纤维细胞(2BS)的影响及其机制。

由于腺病毒对人的致病性轻微，其感染和复制过程均不整合入宿主细胞基因组，因而无引起插入突变的危险。目前基因治疗中选用的腺病毒载体均为复制缺陷型，不能产生有复制能力的腺病毒[7~9]。本研究采用的腺病毒载体为E1区及E3区缺失型。这种载体是以外源基因替代腺病毒基因组中一些反式作用序列的方式构建的。在腺病毒基因组中被替代的主要有E1和E3两个区，E1区为腺病毒复制所必须的，其缺失将导致腺病毒复制缺陷。在采用Ad-LacZ观察2BS细胞的转染效率的实验中我们发现，腺病毒转导效率高，能将目的基因转移到90%的2BS细胞，通过使用LacZ重组腺病毒转导细胞而显示的转染率可以看出，MOI 25时，培养细胞的转导效率即达50%以上，2BS细胞在MOI大于100时，重组腺病毒可达90%的转导效率，表明重组腺病毒能进入正常细胞并有效表达；以Ad-RA538及Ad-ASc-myc MOI 25～200感染强度分别感染2BS细胞，以Ad-LacZ(MOI 25～200)感染2BS细胞作为对照，结果显示，Ad-RA583，Ad-ASc-myc对2BS细胞的形态、生长曲线(MTT法)均无明显影响。表明Ad-RA538和Ad-ASc-myc在对癌细胞有效杀灭的剂量范围，对正常2BS细胞的生长无明显抑制作用。从而印证了重组腺病毒载体的安全性。同时也说明目的基因RA538及反义c-myc对正常细胞生长没有明显抑制作用。Clarke等[10]报告bcl-xs重组腺病毒(Ad-bcl-xs)能有效杀灭多种肿瘤细胞，同时研究了Ad-bcl-xs对正常造血干细胞和能产生严重免疫缺陷小鼠的原始细胞的影响，结果显示Ad-bcl-xs对它们没有杀灭作用。Zhang等[9]用P53腺病毒感染正常人支气管上皮细胞，用肺癌细胞H1299作阳性对照，发现P53腺病毒不敏感，其生长曲线与对照病毒处理组相似。这些均与我们的实验结果相似。以上结果表明重组腺病毒对正常细胞生长无抑制作用，其在基因治疗中的应用是安全的。

由于Ad-RA538和Ad-ASc-myc能降调节肿瘤细胞中c-myc及bcl-2基因的表达(另文发表)，在观察重组腺病毒载体对2BS细胞转染效率及生长影响的同时，我们研究了腺病毒介导的目的片段RA538及ASc-myc对2BS细胞中c-myc及bcl-2基因表达的影响，结果显示，在2BS细胞中内源性的c-myc及bcl-2基因表达量极低，常规RT-PCR方法不能显示其表达。而经过加大模板量，增加循环数、降低退火温度等处理后发现，Ad-RA538对内源性c-myc及bcl-2基因的表达无任何调节作用，以上结果表明对于c-myc和bcl-2表达量极低的正常2BS细胞，相应的目的基因转入对它们相关基因的表达没有影响。也就是说，携带目的基因的复制缺陷型病毒载体能转染正常细胞并有效表达，但对其相应内源性基因的表达无调节作用。这可能是Ad-RA538和Ad-ASc-myc不损伤正常2BS细胞的分子机制之一。

参考文献

1 Anderson W. F. Gene therapy for cancer. Hum Gene Ther, 1994, 5(1): 1

2 Land H, Parada L F, Weinberg R A. Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. Science, 1983, 222(4625): 771

3 Imler J L, Bout A, Dreyer D, *et al*. Trans-complementation of E-deletedm adenovirus: A new vector to reduce the possibility of codissemination of wild-type and recombirnant adenoviruses. Hum Gene Ther, 1995, 6(6): 711

4 Ouantin B, Perricaudet L D, Tajbakhsh S, *et al*. Adenovirus as an expression vector in muscle cells in vivo. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(7): 2581

5 Herz J, Gerard R D. Adenovirus-mediated transfer of low density lipoprotein receptor gene acutely accelerates cholesterol clearance in normal mice. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(7): 2812

6 Oualikene W, Gonin P, Eloit M. Lack of evidence of phenotypic complementation of E1A/E1B-deleted adenovirus type 5 upon superinfection by wild-type virus in the cotton rat. J Virol, 1995, 69(10): 6518

7 Krougliak V, Graham F L. Development of cell lines capable of camplementing E1, E4, and protein Ⅸ defective adenovirus type 5 mutants. Hum Gene Ther, 1995, 6(12): 1575

8 Coldman M J, Litzky L A, Engelhardt J F, *et al*. Transfer of the CFTR gene to the lung of non-human primates with E1-deleted, F2A-defective recombinant adenoviruses: A preclinical toxicology study. Hum Gene Ther, 1995, 6(7): 839

9 Zhang W W, Alemany R, Wang J, *et al*. Safety evaluation of Ad5CMV-p53 *in vitro* and *in vivo*. Hum Gene Ther, 1995, 6(2): 155

10 Clarke M F, Apel I J, Benedict M A, *et al*. A recom binant BCL-XS adnovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(24): 111024

(收稿：1998-11-03；修回：1999-07-22)

(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Effects of recombinant RA538 antisense c-myc adenovirus on human normal cells

Chen Jieping, Lin Chen, Xu Caipu, Zhang Xueyan, Kui Yue, Wu Min (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To study the effects of recombinant RA538 antisense c-myc adenovirus (Ad-ASc-myc) on 2BS human normal cell line. Methods: 2BS human normal cells were treated with Ad-RA538, Ad-ASc-myc and Ad-LacZ and morphological changes and others were observed and MTT nad RT-PCR were employed. Results: Ad-RA538 and Ad-ASc-myc could not inhibit the growth of 2BS cells or induce their apoptosis. Ad-RA538 could not affect the expression of endogenous genes of c-myc and bcl-2. Conclusion: Ad-RA538 and Ad-ASc-myc can not inhibit the growth or induce apoptosis of 2BS cells and can not down regulate the expression of bcl-2 and c-myc genes on 2BS cells.

Key words adenovirus; gene therapy; retinoic acid; c-myc; bcl-2

文章编号:1000-5404(1999)10-0715-01

经眼窗、颞窗探测大脑前、中、后动脉血流速度之比较

A comparison between bloody speeds of arteriae cerebri anterior, media, and posterior probed optical windows and temporal windows

赵静怡*　（第三军医大学附属西南医院神经内科）重庆，400038

笔者曾撰文报告过 TCD 经眼窗能探测到大脑前动脉、中动脉、后动脉[1]。这里，我们就经眼窗探及的大脑前、中、后动脉的血流速度与常规颞窗探及的大脑前、中、后动脉的血流速度相比较，拟进一步证明经眼窗探测大脑前、中、后动脉血流速度可以作为颞窗失测后的一种补救方法。

1　资料与方法

选择门诊进行 TCD 检查的病人 47 例，其中男 27 例，女 20 例，平均年龄 52.83 岁。采用德国 EME 公司生产的 TCD 2020 进行检测。具体探测方法详见参考文献[1]。

统计学处理：采用 t 检验。

2　结果

经眼窗、颞窗同时探测到大脑前、中、后动脉者，左侧分别为 31、33、2 例，右侧分别为 29、37、2 例。探及率大脑前、中、后动脉左侧为 65.96%、70.21%、4.26%；右侧为 61.70%、78.72%、4.26%。经眼窗对大脑前、中动脉的探及率较高。2 个部位所探测的血流速度比较，$P>0.05$，差别不显著，结果见表1。

表 1　大脑前、中、后动脉血流速度($\bar{x}\pm s$, cm/s)

血管	收缩期血流速度(Vs)				舒张期血流速度(Vd)			
	左颞窗	右颞窗	左眼窗	右眼窗	左颞窗	右颞窗	左眼窗	右眼窗
前动脉	78.90±16.10	85.29±30.58	80.74±14.4	78.32±13.92	34.52±9.14	36.24±10.52	37.07±8.41	36.08±6.17
中动脉	98.04±19.52	92.45±19.79	91.23±19.26	89.63±15.77	44.26±9.85	40.23±9.71	40.12±8.10	38.67±8.50
后动脉	59.5±3.54	54.5±10.61	60.5±21.92	52.5±0.71	28.5±0.7	27.0±1.41	32.5±9.19	24.5±2.12

3　讨论

经眼窗探测大脑前、中、后动脉作为颞窗失测后的一种补救手段得到了大家的广泛认同。本文对 2 个部位的同一动脉的血流速度的比较，显示 2 个部位的血流速度无差异，进一步证明经眼窗探测大脑前、中、后动脉血流速度的可行性，说明经眼窗探及的大脑前、中、后动脉血流速度可以代替颞窗所探测的大脑前、中、后动脉的血流速度，从而作为 TCD 的诊断依据，再一次支持了经眼窗探测大脑前、中、后动脉是颞窗失测后的一种良好的补救手段，为提高大脑前、中、后动脉的检出率及确保临床诊断提供了可靠的依据。

关键词　眼窗；颞窗；动脉血流速度
中图法分类号　R741.044　　**文献标识码**：B

参考文献

1　赵静怡. 经眼窗探测大脑前、中、后动脉的方法和意义. 中国超声医学杂志，1993，9 增刊(1)：21

（收稿：1999-03-12；修回：1999-07-22）
（编辑　王　红）

* 赵静怡，女，36 岁，主管技师，本科

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net