

表达人 γ -干扰素的重组腺病毒的制备及检测

徐人尔 应蓓蓓 王义斌* 赵寿元 李昌本

(复旦大学遗传所 遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

摘 要 E1 区缺失的腺病毒载体插入人 γ -干扰素 cDNA 序列, 与 pJM17 质粒通过磷酸钙沉淀法共转染 293 细胞, 经同源重组, 共获得 6 个病毒噬斑。经 PCR 共扩增检测, 证实这 6 个噬斑均为带有人 γ -干扰素 cDNA 的重组腺病毒; 受其感染的 293 细胞的上清中, 都能测到 γ -干扰素的活性, 且这种活性可被一定稀释度的兔抗人 γ -干扰素多克隆抗体所中和。其中的 1 号重组病毒纯化后, 按不同的 MOI (Multiple of infection) 值感染复制缺陷型腺病毒不能在其中增殖的 B16F10 细胞, 未出现细胞病变效应 (Cytopathic effect, CPE), 而上清中的 γ -干扰素活性却随 MOI 值增大而升高, 这证实构建的复制缺陷型腺病毒是能表达并分泌人 γ -干扰素的。

关键词 腺病毒, γ -干扰素, 同源重组, 活性检测

基因治疗的关键之一是将外源基因有效地转入靶细胞, 体内 (*in vivo*) 基因转移无疑是临床应用上最理想的途径。腺病毒感染率高 (可达 100%), 能感染分裂或不分裂的细胞, 易于增殖和纯化, 滴度高, 不整合到宿主细胞基因组内而比较安全; 同时, 它的蛋白质结构、遗传背景、致癌作用和细胞转化机理等方面都已有详细的资料, 所以腺病毒是体内转移基因的有效载体, 用于治疗囊性纤维化病和人脑胶质瘤时, 显示出较好的应用前景^[1]。复制缺陷型重组腺病毒的制备是开展腺病毒介导基因治疗的第一步, 现阶段, 这类重组腺病毒的制备和生产都必需在 293 细胞系中进行操作。293 细胞是一株经腺病毒转化可以持久地分泌产生腺病毒 E1 蛋白的人胚胎肾细胞, 经反式互补作用, E1 蛋白能使由同源重组产生的缺失 E1 区、带有外源基因的重组腺病毒在 293 细胞中繁殖、包装, 即可产生有感染活力的复制缺陷型腺病毒^[2]。本文利用美国 FDA 批准使用的 E1 区缺失的腺病毒载体, 通过同源重组方法, 在国内外首次成功地制备了表达和分泌人 γ -干扰素 (IFN- γ) 的重组腺病毒 (Recombinant Adenovirus, rAd), 可进一步用于恶性肿瘤的基因治疗研究。

1 材料和方法

1.1 细胞系

利诚 - 复旦生物高新技术基金资助项目。

* Scripps Research Institute, La Jolla, CA92037, USA

本文于 1996 年 3 月 14 日收到。

整合了人 5 型腺病毒 E1 区的人胚胎肾细胞 293 细胞系(ACTT CLR1573)培养液为含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM, 人 T 淋巴细胞瘤 Jurkat 细胞系(CD⁺4)和鼠黑色素瘤 B16F10 细胞系生长的培养液为含 10% 小牛血清的 RPMI1640。

1.2 质粒

pAd12/RSV-bpA 和 pJM17 均为本室保存的氨苄青霉素抗性质粒(图 1)。

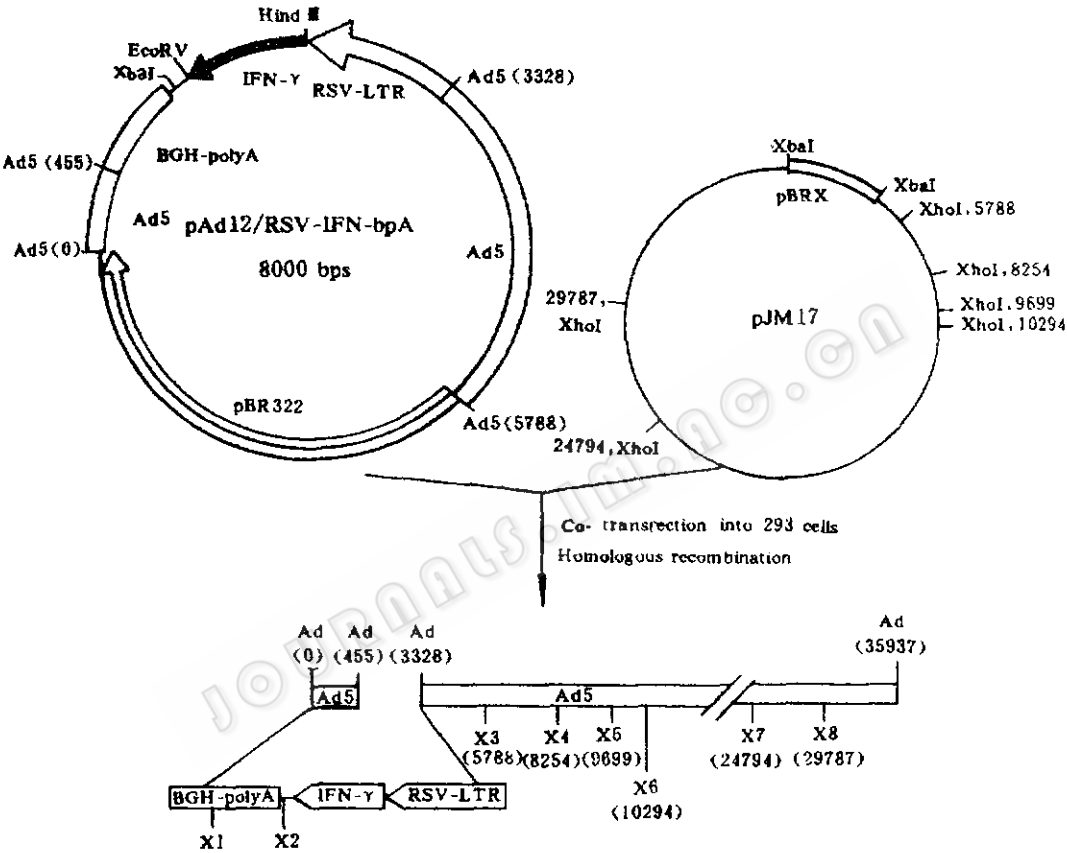


图 1 重组腺病毒的制备

Fig. 1 Construction of recombinant adenovirus

The number in the brackets indicated the position from the left end of adenoviral DNA, size in bp. Ad:adenovirus, X: Xho I

1.3 重组腺病毒

rAd(RSV/ β -gal)^[5]为缺失 E1 区的重组腺病毒, E1 区有 RSV-LTR 启动子控制的、带核定位因子的 *E. coli* β -半乳糖苷酶基因。

1.4 RT-PCR 扩增人 γ -干扰素 cDNA 片段及检测

Jurkat 细胞经 PMA(10 μ g/ml)和 ionomycin(1 μ g/ml)刺激 24h 后, 用 TRIzol(GIBCO/BRL)抽提其总 RNA; 再以 Oligo(dT)12~18 为引物, 经 SUPERScriptTM Preamplification System(GIBCO/BRL)系统反转录出 cDNA 第一链, 用 Boheringer PCR 试剂盒进行

PCR 扩增反应。人 INF- γ 的 PCR 引物:

5'-GCA GCA AGC TTC AAC TTC TTT GGC TTA ATT CTC-3'和

5'-GC AGG TAC CAG GCA GGA CCA CAA TTA CTG GGA-3'

PCR 反应条件:94℃ X30s,58℃ X30s,72℃ X60s,30 个循环。扩增片段酶切回收后插入 pAd12/RSV-bpA 质粒的 HindⅢ和 EcoRV 位点,得 pAd12/RSV-IFN-bpA(图 1)。

1.5 重组腺病毒制备、纯化和滴度测定

质粒 pAd12/RSV-IFN-bpA 和 pJM17 各 15 μ g 混合后用磷酸钙沉淀法共转染 293 细胞,37℃、5%CO₂ 培养 5h,小心吸去转染液,铺 20ml Modified Eagle's Medium(MEM)上层培养基(0.5%琼脂糖/5mmol/LHepes 缓冲液(pH7.5)/5%灭活马血清/10 000 单位双抗/1mmol/L 谷氨酰胺/0.05%酵母抽提液)。37℃、5%CO₂ 培养 6d 后补铺 10mlMEM 上层培养基(含 0.1mg/ml 中性红染料),5d 后出现重组腺病毒的噬斑。用切去尖端的 1 ml 吸嘴小心挑出单个噬斑,置于 24-孔细胞培养板中按常规方法进行腺病毒的噬斑。用切去尖端的 1ml 吸嘴小心挑出单个噬斑,置于 24-孔细胞培养板中按常规方法进行病毒增殖。CsCl 超速离心纯化重组腺病毒及运用精确的噬斑法测定病毒滴度^[2]。

1.6 病毒 DNA 的抽提

基本按 Hirt 法实验^[6]。

1.7 293 细胞上清的 PCR 检测

重组噬斑在 24-孔培养板中小量增殖,至出现完全 CPE,取 400 μ l 上清,4℃,3000g 离心 5min。取上清加蛋白酶 K(50 μ g/ml)/SDS(5%),56℃ 处理 1h,苯酚:氯仿(1:1)抽提一次,酒精沉淀,所得 DNA 直接作 PCR 反应。人 5 型腺病毒 E2B 区的扩增引物为:5'-TCGTTTCTCAGCAGCTGTTG-3'和 5'-CATCTGAACTCAAAGCGTGG-3';人 γ -干扰素的扩增引物同上。PCR 共扩增反应时,50 μ l 反应体积中,含 4mmol/L MgCl₂,50mmol/L KCl,0.1% Triton X-100,200 μ mol/L dNTP,2 单位 Taq DNA polymerase(Promega),引物浓度均为 2 μ mol/L;PCR 反应条件为 94℃ × 30s,56℃ × 30s,72℃ × 60s,30 个循环。

1.8 IFN- γ 活性测定

上述出现完全 CPE 的 293 细胞上清,3000g 离心 5min,制备得到干扰素测活样品。干扰素的测活方法参照文献^[7],人 γ -IFN 标准品购自 GIBCO/BRL 公司。兔抗人 IFN- γ 多克隆抗体(第二军医大学克隆公司惠赠)效价约 1:10 稀释度~10⁶ 单位 IFN- γ 。抗体中和反应中,样品与不同稀释度的抗体等体积混合,37℃ 保温 1h,10 000g 离心 5min,取上清测活。

2 结果

1.2 重组腺病毒的制备

经 PMA 和 ionomycin 刺激的 Jurkat 细胞的总 RNA 作 RT-PCR 后,在电泳凝胶上可见一条清晰的 570bp 左右的 IFN- γ cDNA 扩增条带(图 2),HindⅢ酶切后回收扩增片段,插 pAd12/RSV-bpA 质粒,构建成 pAd12/RSV-IFN-bpA 质粒。为验证 PCR 反应的保真性,从上述质粒中切出 HindⅢ-XbaI DNA 片段插入测序载体 pUC118,DNA 双链双向测序证实 PCR 扩增的片段序列与天然的人 IFN- γ 序列一致。同时,pAd12/RSV-

IFN-bpA 质粒磷酸钙沉淀法转染 293 细胞,48h 后,可在上清中测出明显的 IFN- γ 瞬时表达活性,说明经过分子克隆操作得到的质粒 pAdl2/RSV-IFN-bpAp,其表达、分泌 IFN- γ 的所有分子元件是完整而有功能的,可用于下一步的同源重组实验。

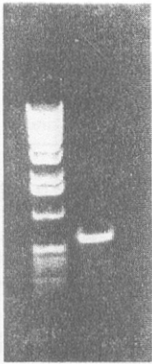


图 2 RT-PCR 扩增人 IFN- γ cDNA 片段

Fig. 2 Amplification of human IFN- γ cDNA fragment by RT-PCR

- 1.1kb DNA Ladder (GIBCO/BRL)
- 2.Human IFN- γ cDNA fragment

6 个病毒噬斑经 24 孔培养板小量增殖后,取 400 μ l 上清作 PCR,都扩增出两个片段,一为 570bp 左右的 IFN- γ 条带,另一为 860bp 的人类 5 型腺病毒 E2B 区特异的 DNA 条带,对照质粒 pJM17 只扩增出 860bp 的条带(图 4)。这说明检测的 6 个噬斑都是带有人 IFN- γ cDNA 的重组腺病毒。

2.3 重组腺病毒表达的 IFN- γ 活性检测

感染 293 细胞后,当出现完全 CPE 时,吸取上清离心直接测活。结果(表 1)表明,制备的 6 个重组腺病毒都产生有活性的 IFN- γ ;对照病毒 rAd(RSV/ β -gal)则测不出活性。

同样的上清在兔抗人 IFN- γ 多克隆抗体的中和试验中,当抗体浓度较高时,能完全消除上清样品对测试细胞 - Wish 细胞保护作用,镜检时出现完全 CPE 反应(复制缺陷型

表 1 重组腺病毒感染的 293 细胞上清的 IFN- γ 活性测定

Table 1 Measurement of IFN- γ activity of the supernatant from recombinant adenovirus infected 293 cells

Samples	Activity/u \cdot ml ⁻¹
Supernatant of uninfected 293 cells	0
rAd(RSV/IFN-01)	1.3 \times 10 ³
rAd(RSV/IFN-02)	6.4 \times 10 ²
rAd(RSV/IFN-03)	3.2 \times 10 ²
rAd(RSV/IFN-04)	3.2 \times 10 ²
rAd(RSV/IFN-05)	1.6 \times 10 ²
rAd(RSV/IFN-06)	3.2 \times 10 ²
rAd(RSV/ β -gal)	0

pAdl2/RSV-IFN-bpA 和 pJM17 共转染 293 细胞后 11 d,2 个 100mm 平皿共长出 6 个病毒噬斑。重组腺病毒的制备流程见图 1。

2.2 重组腺病毒的检测

挑取各个噬斑在培养有 293 细胞的 24-孔细胞培养板上小量增殖病毒,并抽提病毒 DNA。病毒 DNA 经 XhoI 酶切后,凝胶电泳分析可见一系列腺病毒基因组特征性的酶切片段(图 3);结合图 1 所示的腺病毒 DNA 的 XhoI 酶切位点分布,可知图 3 中大小约为 3.5 kb 的 DNA 片段(图 3 箭头指示)为重组病毒 DNA 所特有的。

重组腺病毒只能在 293 细胞之中增殖并产生 CPE 现象,不能在 IFN- γ 测活细胞 - Wish 细胞中复制);当抗体稀释至一定浓度后,对测试样品又显示出保护作用,使测试细胞不出现 CPE 反应(表 2)。

纯化一号重组腺病毒 rAd(RSV/IFN-01),测定其滴度后按一定的 MOI 值感染 6cm 细胞培养板中培养的 1 \times 10⁶ B16F10 细胞,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 3h 后,吸去感染液,用 PBS(pH7.4)洗 4 次,加 10% 小牛血清的高糖 DMEM 培养基 5ml,24h 后取上清离心后测活,结果(表 3)指出:随着 MOI 值增大,上清中的 IFN- γ 活性也相应增高,而对照 rAd(RSV/ β gal)在 MOI = 500

时,也测不出 IFN- γ 的活性。另外,重组腺病毒感染的 B16F10 细胞在培养 72h 后,也未出现 CPE 现象。上述结果显示制备的重组腺病毒当感染不适应在其中复制的细胞系时,也能分泌一定量的有活性的 IFN- γ 。

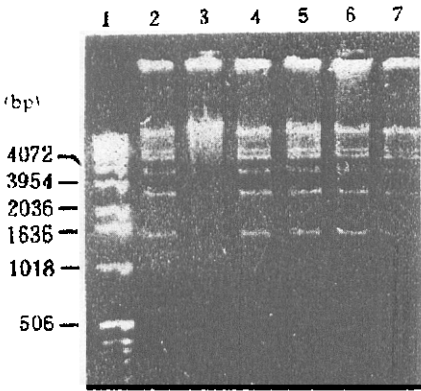


图 3 XhoI 酶切重组腺病毒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of recombinant adenoviral DNA digested by XhoI

1. 1kb DNA ladder M. W. marker
2. No. 1~6 recombinant adenoviruses
Arrowhead indicated the position of 3.5 kb fragments of recombinant adenoviruses

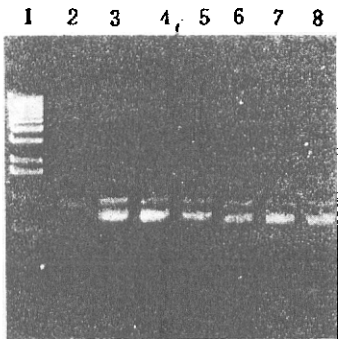


图 4 重组腺病毒感染的 293 细胞上清的 PCR 共扩增分析

Fig.4 Analysis of the supernatant of infected 293 cells by PCR

1: 1kb DNA Ladder (GIBCO/BRL)
2: pJM17 plasmid
3~8: No. 1~6 recombinant adenoviruses

表 2 IFN- γ 抗体中和分析反应

Table 2 Neutralization analysis of IFN- γ antibody

Dilution degree of IFN- γ antibody	Microscopic examination on the CPE degree of wish cells		
	Uninfected 293 cells	rAd(RSV/IFN-01)	rAd(RSV/ β gal)
1:3 \times 10 ¹	+++	+++	+++
1:3 \times 10 ²	+++	+++	+++
1:3 \times 10 ³	+++	++	+++
1:3 \times 10 ⁴	+++	+	+++
1:3 \times 10 ⁵	+++		+++

Notes: + + + , 75% CPE; + + , 50% CPE; + , 25% CPE; - , NoCPE

3 讨论

肿瘤的生物治疗,如全身性应用细胞因子、输入 LAK/TIL 细胞的过继免疫疗法、自身肿瘤细胞与不同佐剂混合后的特异免疫接种等,取得的疗效是有限的。随着基因转移技术的发展,把细胞因子基因直接导入肿瘤细胞是一种比较理想的治疗尝试,因为这与细胞因子自分泌或旁分泌抵抗肿瘤的免疫保护作用的生理模式无疑是十分接近的。导入的细胞因子基因在局部(如肿瘤灶内)的表达释放,避免了全身性应用而引发的严重毒副作用。在把外源基因导入哺乳类细胞时,腺病毒载体是美国 NIH 最近选作基因治疗的有效

表 3 纯化的 rAd(RSV/IFN-01)感染 B16F10 细胞上清的 IFN- γ 活性测定

Table 3 Measurement of IFN- γ activity of the supernatant from the purified rAd(RSV/IFN-01)-infected B16F10 cells

Samples		Activity/u·ml ⁻¹
Supernatant of uninfected 293 cells		0
rAd(RSV/IFN-01)	MOI = 100	3.2×10^2
	MOI = 200	6.4×10^2
	MOI = 500	2.6×10^3
rAd(RSV/ β -gal)	MOI = 500	0

载体之一。

本项研究利用同源重组方法,把含信号肽的人 IFN- γ cDNA 与 E1 缺失的腺病毒构建能表达、分泌具生物学活性的 IFN- γ 的重组腺病毒,这是开展 IFN- γ 介导的肿瘤基因治疗的第一步。

在设计 IFN- γ 的 PCR 引物时,我们注意到在 IFN- γ cDNA 终止密码子 TAA 下游约 40bp 处,存在三个串联的 ATTTA 序列,即“AT 富集区”。这一特征性区域是很多种细胞因子,如 IL2, GM-CSF、IL-1、IFN 等所共有的,普遍认为与细胞因子 mRNA 的不稳定性有

关^[8]。该序列不利于构建的重组腺病毒表达和分泌 IFN- γ ,所以,设计的 3'端引物到 TAA 下游 15bp 为止,以消除“AT 富集区”对重组腺病毒稳定表达 IFN- γ 的潜在影响。

病毒噬斑出现后,首先要鉴定它们是否是同源重组后产生的腺病毒。虽然,研究表明腺病毒的正常包装上限为其基因组长度的 105%,即至多可包装的 DNA 长度约为 38kb^[9],而质粒 pJM17 约 40kb,按理在 293 细胞系中不能形成噬斑。但是,研究发现,pJM17 质粒在 293 细胞中是不太稳定的,可通过重排等方式使自身长度缩短,落在腺病毒的包装范围内,因此也能形成噬斑,这将干扰正常的同源重组实验结果^[4]。本项研究利用 PCR 共扩增技术,在同一 PCR 反应体系中加入两对引物,即 γ -IFN 特异的及腺病毒 E2B 区特异的引物,幸运地发现挑出的 6 个噬斑都能扩增出两条大小与预期相符的 DNA 片段,说明这 6 个噬斑都是同源重组后产生的病毒。同时,由于 PCR 的模板是从噬斑小量扩增后的培养基上清中得到的,提示释放进 293 细胞培养基上清中的病毒浓度,足够用于制备 PCR 所需的模板 DNA。这种简便、准确的 PCR 共扩增技术在重组噬斑及野生型腺病毒的快速鉴定中是十分有用的。

从国内外报道的研究结果分析,肿瘤细胞中导入 IL-2、IL4 及 IFN- γ 基因后产生的抗肿瘤作用是比较理想的。IFN- γ 转基因的抗肿瘤机制,目前认为有以下几种:(1)在输入 IFN- γ 的肿瘤细胞中,MHC-I 类抗原的表达均明显增强,提高杀伤细胞对肿瘤的识别和杀伤能力;(2)INF- γ 除对肿瘤细胞的增殖抑制外,还对肿瘤相关抗原起修饰作用;(3)在某些高转移的肿瘤细胞中,通过产生 IFN- γ 而明显抑制肿瘤的转移,说明 IFN- γ 可通过降低肿瘤细胞的粘附性和浸润性来抑制肿瘤细胞的转移。

表 3 数据显示,MOI 值增大时,IFN- γ 的活性也增高;当 MOI = 100 时,IFN- γ 的分泌量已达 320u/10⁶cell/d。而在 Howard 等利用反转录病毒载体导入 IFN- γ 基因的实验中,IFN- γ 基因修饰的 B16 细胞分泌 IFN- γ 为 210u/10⁶cell/d 时,就能够明显抑制肿瘤细胞在小鼠中的生长;当用 IFN- γ 基因修饰原代培养的人黑色素瘤细胞时,虽然 IFN- γ 的分泌量一般 < 100u/10⁶cell/d,但也能明显地激活外周血淋巴细胞产生肿瘤特异的 CTL 反应^[10]。因此,本项研究构建的带 IFN- γ 的重组腺病毒,在恶性肿瘤的基因治疗中,应有其用武之地。

参 考 文 献

- [1] Sikora K. *Gene Therapy*, 1994, 1:149~151.
[2] Graham F L, Prevec L. *Method in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocol*, Vol. 7. 1991.
[3] Fang B, Chen S H, Wang Y B, *et al.* *Proc. Natl. Acad. USA.*, 1995, 92:2577~2581.
[4] McGrory W J, Bantista D S, Graham F L. *Virology*, 1988, 163:614~617.
[5] Stratford-Perricaudt L D, Levrero M, Chase J F, *et al.* *Hum Gene Ther*, 1990, 1:241~256.
[6] Yates J, Warren N, Reisman D. *Proc Natl Acad USA*, 1984, 81:3806~3810.
[7] Pestka S, McInnes J, Havell E A *et al.* *Proc Natl Acad USA.* 1975, 72:3898~3901.
[8] Shaw G, Kawen R. *Cell*, 1986, 46:659~667.
[9] Bett A J, Prevec L, Graham F. *J of Virology*, 1993, 10:5911~5921.
[10] Howard B, Burrascano M, McCallister T *et al.* *Annals New York Academy of Sciences*, 1994, pp167~187.

Construction and Identification of Recombinant Adenovirus for Expressing Human Interferon - γ

Xu Ren'er Ying Beibei Wang Yibin* Zhao Shouyuan Li Changben

(*Institute of Genetics, Fudan University, State Key Laboratory of*

Genetic Engineering, Shanghai 200433)

(*Scripps Research Institute, La Jolla, CA92037, USA*) *

Abstract E1-deleted adenoviral vector, pAd2/RSV-IFN-bpA, harboring human IFN - γ cDNA, and plasmid pJM17 were co-transfected into human embryo kidney cell line 293 cells by calcium phosphate precipitation-mediated transfection. Six strains of recombinant adenoviruses (rAd) were obtained after 11 day's incubation. PCR analysis indicated that all six rAds contained human IFN - γ cDNA. The biological activity of IFN - γ was detected in the supernatant of the cultured 293 cells following rAds' infection, and it could be blocked by the antibody for IFN - γ . The B16F10 cells infected with the purified rAd(RSV/IFN -01) didn't show cytopathic effect (CPE), and the more biological activity of INF - γ was detected in the infected B16F10 cells' supernatant with the increased MOI(multiple of infection) values. Therefore, the recombinant adenovirus constructed in this study can express and secrete human IFN - γ .

Key words Adenovirus, IFN - γ , homologous recombination, bioassay