

Tet-On 调控 HSVtk 表达的重组腺相关病毒载体的构建和感染活性的检测 The Construction of Recombinant AAV Vector Expressing HSVtk Gene Controlled by Tet-On and the Detection of its Activity

陈 迁, 李子博, 曾赵军, 罗赛群, 胡维新*

CHEN Qian, LI Zi-Bo, ZENG Zhao-Jun, LUO Sai-Qun and HU Wei-Xin*

中南大学生物科学与技术学院分子生物学研究中心, 长沙 410078

Molecular Biology Research Center, College of Biological Science and Technology, Central South University, Changsha 410078, China

摘 要 构建含有 Tet 基因调节系统及自杀基因 HSVtk 的重组腺相关病毒载体 pAAV/TRE/HSVtk/Tet-On, 并使用 PCR 技术和限制性内切酶消化进行鉴定。用构建好的重组质粒分别与辅助质粒 pAAV-RC、pHelper 以磷酸钙共沉淀法转染 HEK293 细胞, 进行病毒包装后得到了 AAV/TRE/HSVtk/Tet-On 重组腺相关病毒, 以氯化铯密度梯度离心对包装好的病毒进行纯化。用纯化后的重组腺相关病毒感染乳腺癌细胞株 MCF-7 后, 斑点杂交检测结果显示, HSVtk 基因整合进入 MCF-7 细胞基因组中。有感染活性的重组腺相关病毒能将目的基因转移到宿主细胞中, 在 Dox 诱导下, GCV 对 AAV 感染的 MCF-7 细胞具有明显的杀伤作用。

关键词 乳腺癌, 基因治疗, 腺相关病毒, HSVtk 基因, Tet-On

中图分类号 Q784, R73-76² 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0360-05

Abstract In order to investigate the application of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector containing Tet regulation system and HSVtk gene in cancer gene therapy, pAAV/TRE/HSVtk/Tet-On was constructed and identified with PCR and restriction enzyme digestion. Packaging cells HEK293 were cotransfected with plasmids pAAV/TRE/HSVtk/Tet-On, pAAV-RC and pAAV-helper to produce infectious rAAV, and CsCl₂ density gradient centrifugation method was performed for purification and concentration of rAAV. The viruses were then transduced into MCF-7 cells. The results of dot blot hybridization indicate that the rAAV can transfer the target gene into MCF-7 cells. MTT assay showed that GCV could kill AAV-infected MCF-7 cells under the induction of Dox. The data demonstrated that rAAV containing Tet regulation system and HSVtk gene was successfully obtained, and could be used for further investigation of *in vivo* and *in vitro* experiments.

Key words humanbreast cancer, gene therapy, adeno-associated virus, HSVtk gene, Tet-On

自杀基因是近年来肿瘤基因治疗广泛采用的研究策略之一。单纯疱疹病毒胸苷激酶 (HSVtk) 能在细胞内将无毒副作用的前药——丙氧鸟苷

(ganciclovior, GCV) 磷酸化, 该磷酸化的丙氧鸟苷和内源性的三磷酸脱氧鸟嘌呤 (dGTP) 竞争性地结合到 DNA 链上, 导致 DNA 链延伸终止, 从而导致肿瘤

Received: December 13, 2004; Accepted: February 7, 2005.

This work was supported by the grant from CMB (China Medical Board of New York, INC. Grant # 99-698).

* Corresponding author. Tel: 86-731-4805449; E-mail: weixinhu@xysm.net

美国中华医学会 (CMB) 基金资助项目 (No: # 99-698):

细胞的死亡^[1]。在基因治疗中,目的基因在宿主细胞中的表达及表达量的调节是一个关键问题。Gossen^[2,3]等建立的四环素基因表达调控系统(Tet 基因表达调控系统),可以用四环素及其衍生物强力霉素(Doxycycline, Dox)来调节目基因的表达。在 Tet-On 调控系统中,当 Dox 存在时,可诱导目的基因的表达;当 Dox 从系统中除去后,目的基因转录关闭。而在 Tet-Off 系统中,如需关闭外源基因的表达,则需持续给予诱导剂。因而,相对于 Tet-Off 系统, Tet-On 系统更方便和适于临床应用^[4],并广泛应用于多种疾病的基因治疗研究中^[5,6]。

基因治疗时需要将外源基因有效地导入靶细胞,并实现治疗基因的受控稳定表达。腺相关病毒载体具有无致病性、无免疫原性、能介导外源基因稳定整合到宿主细胞基因组中等优点^[7],所以被人们称为最有前途的基因治疗载体。本研究以腺相关病毒为载体,将自杀基因 HSVtk 基因和 Tet-On 基因调控系统构建于同一载体中,使 HSVtk 基因的表达受 Tet-On 调控,并通过 GCV 药物治疗,观察其体外杀伤乳腺癌细胞的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和菌株:人胚肾细胞 HEK293、乳腺癌细胞株 MCF-7 来自中南大学湘雅医学院细胞中心,均培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,37℃ 和 5% CO₂ 条件下培养。大肠杆菌菌株 DH5 α 为本中心自存。

1.1.2 质粒:pRevTRE/HSVtk 为本中心构建^[8]含有四环素反应元件(TRE)和自杀基因 HSVtk; pRevTet-On 购自 Clontech 公司, Tet-On 基因编码四环素结合蛋白 rTA。AAV Helper Free 系统(包括 pAAV-MCS, pAAV-RC, pAAV-Helper 质粒)购自 Stratagene 公司。

1.1.3 主要试剂:限制酶, T4 DNA 连接酶、Klenow DNA 聚合酶、质粒 DNA 提取试剂盒,基因组 DNA 提取试剂盒购自 Promega 公司;高保真 DNA 聚合酶、Taq DNA 聚合酶、尼龙膜购自 Roche 公司;DNA 分子量标志物购自 MBI 公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Q. BIO gene 公司;Ganciclovir (GCV)、MTT、CsCl₂ 和其他试剂均为 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增:PCR 反应体系含 20 ng 模板 DNA, 0.2 μ mol/L 引物, 200 μ mol/L dNTP 以及 2 u 高保真 DNA 聚合酶,反应体积为 50 μ L。94℃ 变性

5 min 后,进行热循环反应,反应条件为 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 50 s, 共 35 个循环,反应完成后,72℃ 延伸 10 min, 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察实验结果。PCR 引物见表 1。

表 1 PCR 扩增所用引物及其序列

Table 1 Primer sequences used for PCR amplification

Name	Primer sequence
TK1	5'-TCT ATG GAT CCA GAT CTT GGT GGC GTG AAA C-3'
TK2	5'-TAG CCA AGC TTT ATT GCC GTC ATA GCG C-3'
TET1	5'-CTC TAT CGA TGG ATC CGG CCA TTA GCC AT-3'
TET2	5'-CTC TGT TAA CTA CCC ACC GTA CTC GTC-3'

TET1 和 TET2 分别带有 *Cla* I 和 *Hpa* I 酶切位点。以上引物均由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.2.2 重组腺相关病毒载体 pAAV/TRE/HSVtk/Tet-On 的构建:以 TET1 和 TET2 为引物,用 PCR 扩增 pRevTet-On 质粒上的 rTA 基因片段。PCR 产物经 *Cla* I 和 *Hpa* I 酶切后,与经 *Cla* I 和 *Hpa* I 酶切后的 pRevTRE/HSVtk 相连接,得到 pRevTRE/HSVtk/Tet-On 质粒。pRevTRE/HSVtk/Tet-On 经 *Xho* I 和 *Cla* I 酶切,回收的含有 HSVtk 基因和 rTA 基因的大片段,与 pAAV-MCS 以 *Xho* I 和 *Cla* I 酶切后的片段相连接,筛选出阳性重组克隆,将此阳性重组克隆进一步以 *Not* I 和 *Cla* I 进行部分酶切后,除去不受 Tet-On 系统调控的启动子 P_{CMV},部分酶切后的片段末端经 Klenow 聚合酶补平后进行自身环化后,筛选阳性克隆,得到 pAAV/TRE/HSVtk/Tet-On 质粒(如图 1)。

1.2.3 DNA 片段回收、连接:将 PCR 产物或限制酶消化产物经琼脂糖凝胶电泳后,在紫外灯下切取目的 DNA 条带,以琼脂糖凝胶回收试剂盒回收,溶于无菌水中 -20℃ 保存。

在无菌的 Eppendorf 管中加入下列成分并进行连接反应:目的 DNA 片段 6 μ L,载体 DNA 片段 2 μ L (插入片段与载体量比例约为 3:1),加入 1 μ L 10 \times 连接缓冲液,1 μ L T4 DNA 连接酶(10 u),总反应体系为 10 μ L。16℃ 连接过夜后,取 5 μ L 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。

1.2.4 重组克隆筛选、鉴定:随机挑取单克隆菌落,接种于氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 培养基中,37℃ 振荡过夜。提取细菌质粒 DNA,然后以酶切、PCR 进行鉴定。

1.2.5 序列分析:DNA 序列分析由上海博亚生物工程公司完成,所用测序仪器为 ABI PRISM 377-96。

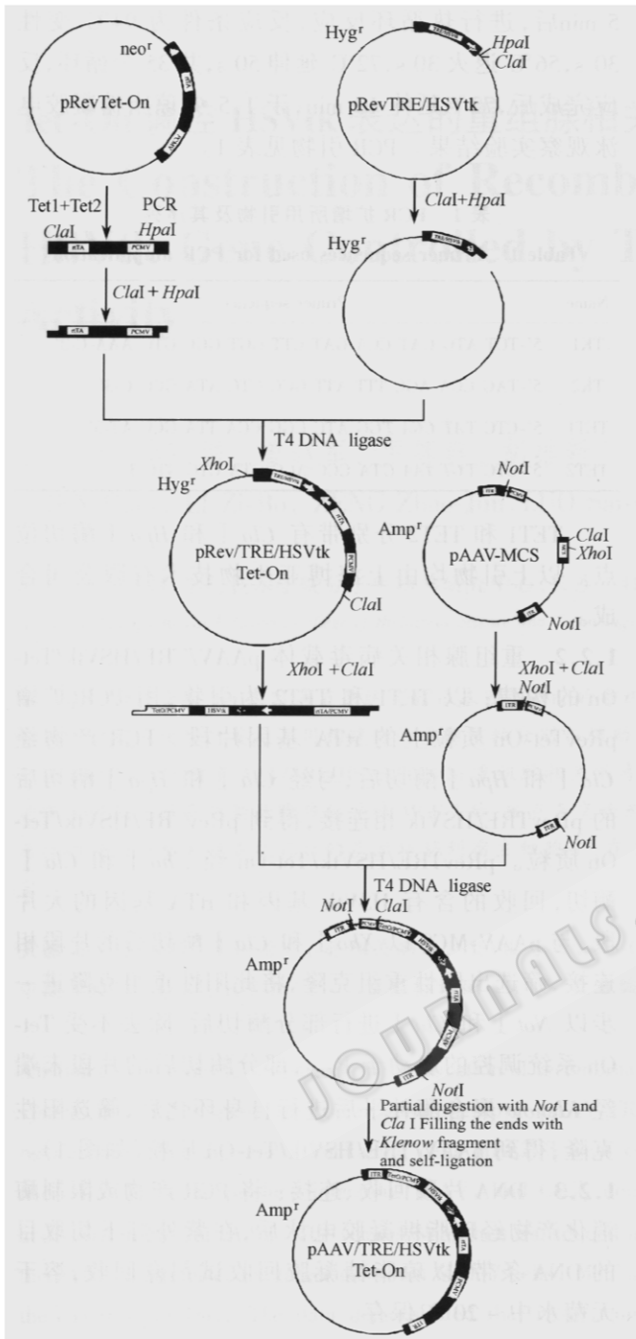


图1 pAAV/TRE/HSVtk/Tet-On 重组载体的构建示意图
Fig.1 Construction of pAAV/TRE/HSVtk/Tet-On vector

1.2.6 重组腺相关病毒的制备、分离和纯化:将构建好的 pAAV/TRE/HSVtk/Tet-On 质粒与 pAAV-RC, pAAV-Helper 一起,以磷酸钙共转染法转染 HEK293 细胞,转染 72 h 后,收集细胞、离心、弃上清、磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬、反复冻融 3 次,离心,取上清,加入固体 NaCl 至终浓度为 1 mol/L 以及 PEG-8000 至终浓度为 10% (W/V),振荡溶解后冰浴放置 1 h, 11 000 r/min 离心 15 min,弃去上清,然后加入密度为 1.38 g/mL CsCl₂ 溶液重悬。将上述配好的溶液于

55 000 r/min (Beckman SW41), 4 °C, 离心 24 h。小心吸取病毒液体,放于无菌的 1.5 mL 离心管中。PBS 透析后置于 -70 °C 低温冰箱中保存。

1.2.7 重组腺相关病毒物理滴度的测定:用斑点杂交方法检测纯化后 rAAV 的物理滴度(病毒颗粒数/mL)。取 1 μg pAAV/TRE/HSVtk/Tet-On 和 100 μL 纯化的病毒液,用稀释缓冲液以 1:10 作系列稀释后点膜。以 α-³²P 标记的 HSVtk 基因 PCR 产物作为探针,进行斑点杂交。通过计算 pAAV/TRE/HSVtk/Tet-On 的分子数,再乘以与其杂交信号强度一致的病毒液样品的稀释倍数得出重组腺相关病毒的物理滴度。

1.2.8 斑点杂交检测病毒感染前后细胞中 HSVtk 基因的检测:以 AAV/TRE/HSVtk/Tet-On 病毒感染 MCF-7 细胞,提取细胞基因组 DNA,同时提取未感染的 MCF-7 细胞的基因组 DNA,以各自的重组 AAV 质粒作为阳性对照点于尼龙膜上。用 HSVtk 基因片段作为探针与之杂交。经预杂交、杂交、洗膜、显影后,判定结果。

1.2.9 GCV 对 MCF-7 细胞的杀伤效应:于 96 孔板中接种 MCF-7 细胞,2 × 10⁴ 个细胞/孔。待细胞贴壁后,分 3 组进行实验,每一组均分别以病毒感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 10⁴、10⁵ 和 10⁶ 三种不同浓度的 rAAV 感染 MCF-7 细胞,每种浓度各做 4 孔。24 h 后,第一组每孔加入 Dox (1.0 μg/mL) 和 GCV (3.0 μg/mL),第二组每孔加入 GCV (3.0 μg/mL),第三组每孔加入 Dox (1.0 μg/mL),继续培养 72 h 后用 MTT 法测定细胞存活率。

2 结果

2.1 重组腺相关病毒载体质粒的鉴定

2.1.1 pAAV/TRE/HSVtk/Tet-On 重组载体质粒的鉴定:所获阳性重组质粒经 BamH I 酶切后可产生 3.1 kb 和 3.9 kb 大小 2 个片段(图 2A);以重组质粒为模板分别以引物 TK1, TK2 和 TET1, TET2 进行 PCR 扩增鉴定,PCR 可扩增出 1.24 kb 的 HSVtk 基因和 1.8 kb 的 rTA 基因片段(图 2B)。这些证明此重组质粒同时含有 HSVtk 基因和 rTA 基因,将此重组质粒命名为 pAAV/TRE/HSVtk/Tet-On。

2.1.2 序列分析:所获 pAAV/TRE/HSVtk/Tet-On 重组质粒进行测序,以分析 HSVtk 基因与 rTA 调控序列连接处序列。测序结果表明与预测结果相同。

2.2 斑点杂交测定重组腺相关病毒的物理滴度

以 HSVtk 基因片段为探针对纯化的病毒进行斑点杂交。经预杂交、杂交、洗膜、显影后,结果如图 3 所示。经计算 AAV/TRE/HSVtk/Tet-On 病毒的物理

滴度为 2.37×10^{11} particle/mL。

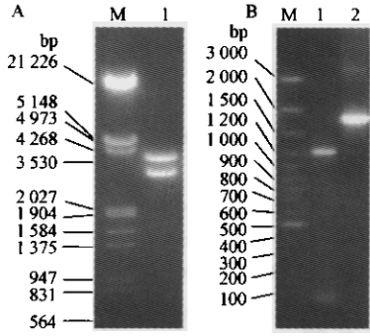


图2 重组质粒 pAAV/TRE/HSVtk/Tet-On 的鉴定

Fig.2 Identification of recombinant pAAV/TRE/HSVtk/Tet-On
 A: recombinant plasmid digested with *Bam* HI; M: Lambda DNA/*Eco*R I + *Hind* III DNA Marker; 1: pAAV/TRE/HSVtk/Tet-On digested with *Bam*H I; B: Recombinant plasmid amplified with PCR; M: GeneRuler 100 bp DNA ladder plus. 1: PCR product with primer TK1 and TK2. 2: PCR product with primer TET1 and TET2.

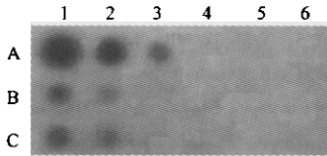


图3 斑点杂交测定重组病毒浓度

Fig.3 Titer of recombinant AAV with dot-blot hybridization

A1-6 shows the gradient dilution by 1:10 for 1 µg of pAAV/TRE/HSVtk/Tet-On plasmid; B and C1-6 show the gradient dilution by 1:10 for 100 µL of AAV/TRE/HSVtk/Tet-On virus.

2.3 MCF-7 细胞中 HSVtk 基因的检测

使用斑点杂交技术可以检测 AAV/TRE/HSVtk/Tet-On 感染后的 MCF-7 细胞基因组 DNA 中整合的 HSVtk 基因,而未感染的 MCF-7 细胞的基因组 DNA 中检测不到 HSVtk 基因,这表明病毒载体能够将目的基因转移到宿主细胞中。结果如图 4 所示。

2.4 在 Dox 诱导下 GCV 对 MCF-7 细胞杀伤作用

以 MOI 为 10^4 、 10^5 、 10^6 三种不同浓度的病毒感染 MCF-7 细胞,72 h 培养后,MTT 检测,发现加入 1.0 µg/mL Dox 诱导后,在 MOI 为 10^4 时,GCV (3.0 µg/mL)对 rAAV + Dox + GCV 组的 MCF-7 细胞杀伤率达到 36%,随着 MOI 增加到 10^6 时,细胞死亡率可达到 47%,而且在 3 种不同浓度下,rAAV + Dox + GCV 组细胞死亡率均明显高于其余两组(rAAV + GCV 组及 rAAV + Dox 组)($P < 0.05$)。结果见图 5。

3 讨论

AAV 病毒是一种缺陷病毒,需要辅助病毒的存在才能包装出完整的病毒颗粒。本实验中采用的 AAV 载体系统,以辅助质粒 pHelper 代替辅助病毒

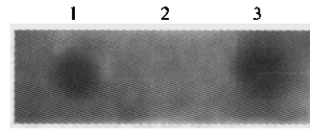


图4 斑点杂交检测 AAV/TRE/HSVtk/Tet-On 感染前后 MCF-7 细胞基因组中的 HSVtk 基因

Fig.4 Detection of HSVtk in MCF-7 genome with dot-blot hybridization

1: positive control;

2: before infection of AAV/TRE/HSVtk/Tet-On;

3: after infection of AAV/TRE/HSVtk/Tet-On.

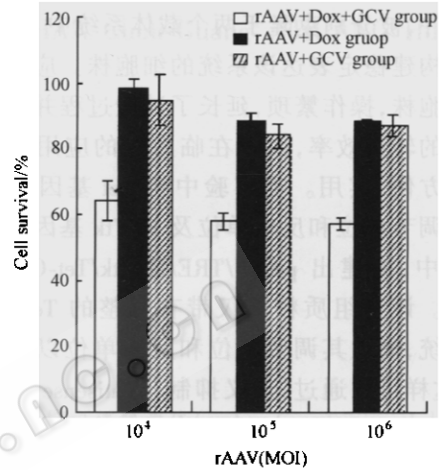


图5 在 Dox 诱导下 GCV 对 MCF-7 细胞杀伤作用

Fig.5 Killing effect on three groups of infected MCF-7 cells with different multiplicity of infection

提供病毒包装、复制所需的元件,来进行重组腺相关病毒的包装。这种以辅助质粒代替辅助病毒的方式,不仅提高了包装效率,而且省略了辅助病毒感染这一过程,从根本上防止了重组腺相关病毒中的辅助病毒的污染。在一些利用病毒性载体转导自杀基因的研究中,人们利用逆转录病毒或腺病毒作为基因的导入载体。逆转录病毒不能感染未分裂细胞,且能在宿主细胞中随机整合,有导致基因突变,诱发肿瘤的可能^[9];而腺病毒载体能引起机体强烈的免疫反应^[10],并且在实体瘤中,其转导效率低于 AAV-2 载体^[11]。Veldzwijk 等^[12]检测了重组腺相关病毒 2 (AAV-2)载体在人的乳腺癌细胞 MCF-7 中的表达。结果表明 AAV-2 对 MCF-7 有较高的感染效率。

如何有效的调控基因表达时间和水平是基因治疗面临的重大难题。Gossen 和 Bujard 等构建的 Tet-On/Tet-Off 基因表达调控系统,具有开/关功能严密、特异性强、诱导效率高、对细胞无毒性等特点^[13,14],为基因表达调控提供了一条可行的途径。在 Tet-On 系统中,由于 rTA 与 TRE 之间的残留亲和力 (residual affinity),因而导致该系统基础表达高^[15]。

为此人们对 Tet-On 系统做了大量的改进,提高其调控的严谨性,并取得较好的成效,从而进一步完善了 Tet-On 系统^[16,17]。

在利用 Tet-On 系统调控 HSVtk 基因作用方面,我们进行了一些研究,将质粒 pRev TRE/HSVtk 与 pRevTet-On 共转染 MCF-7 细胞,构建出稳定的细胞株,并利用此稳定表达的细胞建立了人乳腺癌 SCID 小鼠模型,研究了 Tet-On 系统调控下自杀基因对乳腺癌的治疗作用,取得了满意的结果^[18]。在该试验中, Tet-On 调控系统的两个组成元件: TRE 元件和 rTA 元件,被分别克隆于两个载体系统中,并应用两次转染构建稳定表达该系统的细胞株。应用该方法构建细胞株,操作繁琐,延长了试验过程并大大降低了细胞的转染效率,因而在临床上的应用明显不如单载体方便、实用。本实验中将 Tet 基因表达调控系统的调节单位和反应单位及 HSVtk 基因插入到同一载体中,构建出 pAAV/TRE/HSVtk/Tet-On 重组病毒载体。该重组质粒不仅带有完整的 Tet-On 基因调控系统,而且其调节单位和反应单位以相对方向插入,这样可以通过“反义抑制”(antisense inhibition)减低 HSVtk 基因本底表达;另一方面,四环素基因调节系统的引入,使构建的重组载体具有更大的优越性和实用价值,它不仅可以高效、稳定的表达 HSVtk 基因,而且还可以定时“开”、“关”和定量的调节 HSVtk 基因的表达。经体外包装后,该病毒能将目的基因转移到宿主细胞中,并在体外实验中可观察到 GCV 对肿瘤细胞的杀伤作用存在着 Dox 依赖性,即 HSVtk 基因的表达受 Tet-On 基因调控。

以上结果表明,本实验成功构建了 Tet-On 调控 HSVtk 表达的重组腺相关病毒载体。体外包装后该病毒颗粒能有效地感染乳腺癌细胞 MCF-7,结合 CCV 治疗,可抑制肿瘤细胞生长,从而为腺相关病毒介导的可调控自杀基因治疗研究奠定了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] RFillat C, Carrio M, Cascante A *et al.* Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr Gene Ther*, 2003, **3**(1): 13 - 26
- [2] Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(12): 5547 - 5551
- [3] Gossen M, Freundlieb S, Bender G *et al.* Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 1995, **268**(5218): 1766 - 1769
- [4] Chtarto A, Bender HU, Hanemann CO *et al.* Tetracycline-inducible transgene expression mediated by a single AAV vector. *Gene Therapy*, 2003, **10**: 84 - 94
- [5] Zabala M, Wang L, Hernandez-Alcoceba R *et al.* Optimization of the Tet-On system to regulate interleukin 12 expression in the liver for the treatment of hepatic tumors. *Cancer Research*, 2004, **64**(8): 2799 - 2804
- [6] Qin XY, Shen KT, Zhang X *et al.* Establishment of an artificial β -cell line expressing insulin under the control of doxycycline. *World J Gastroenterol*, 2002, **8**(2): 367 - 370
- [7] Wright JF, Qu G, Tang C, Sommer JM. Recombinant adeno-associated virus: formulation challenges and strategies for a gene therapy vector. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2003, **6**(2): 174 - 178
- [8] Luo SQ(罗赛群), Hu WX(胡维新), Yi WF(易伟峰) *et al.* The construction of suicide gene expression vector controlled by Tet-On and the transfection of human breast cancer cell line(MCF-7). *Life Science Research(生命科学研究)*, 2002, **6**(2): 137 - 141
- [9] McTaggart S, Al-Rubeai M. Retroviral vectors for human gene delivery. *Biotechnology Advances*, 2002, **20**: 1 - 31
- [10] Berlinghoff S, Veldwijk MR, Laufs S *et al.* Susceptibility of mesothelioma cell lines to adeno-associated virus 2 vector-based suicide gene therapy. *Lung Cancer*, 2004, **46**: 179 - 186
- [11] Enger PO, Thorsen F, Lonning PE *et al.* Adeno-associated viral vectors penetrate human solid tumor tissue *in vivo* more effectively than adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*, 2002, **13**: 1115 - 1125
- [12] Veldwijk MR, Fruehauf S, Schiedlmeier B *et al.* Differential expression of a recombinant adenoassociated virus 2 vector in human CD34 + cells and breast cancer cells. *Cancer Gene Ther*, 2000, **7**(4): 597 - 604
- [13] Mizuguchi H, Hayakawa T. Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline-controllable expression system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, **1568**: 21 - 29
- [14] Aurisicchio L, Bujard H, Hillen W *et al.* Regulated and prolonged expression of mIFN(α) in immunocompetent mice mediated by a helper-dependent adenovirus vector. *Gene Ther*, 2001, **1**: 516 - 521
- [15] Urlinger S, Baron U, Thellmann M *et al.* Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 7963 - 7968
- [16] Zhican Qu, Jaideep V, Thottassery *et al.* Homogeneity and long-term stability of tetracycline-regulated gene expression with low basal activity by using the rTA2S-M2 transactivator and insulator-flanked reporter vectors. *Gene*, 2004, **327**: 61 - 73
- [17] Shockett PE, Zhou S, Hong X, Schatz DG. Partial reconstitution of V(D)J rearrangement and lymphocyte development in RAG-deficient mice expressing inducible, tetracycline-regulated RAG transgenes. *Mol Immunol*, 2004, **40**(11): 813 - 829
- [18] Hu WX, Zeng ZJ, Luo SQ *et al.* The suicide gene therapy of human breast cancer in SCID mice model by the regulation of Tet-On. *Chinese Medical Journal*, 2004, **117**(3): 434 - 439