

• 实验研究 •

突变型 Rad50 腺病毒载体的制备及其在人鼻咽癌细胞株 CNE1 中的最适感染量测定*

严睿成^{1△} 黄健聪¹ 朱玲² 常利红¹ 黎景佳¹ 吴喜福¹ 叶进¹ 张革化¹

[摘要] 目的:测定携带突变型 Rad50 基因的重组腺病毒载体 Ad-Rad50-GFP 在人鼻咽癌细胞株 CNE1 中的表达及其对 CNE1 的最适感染倍率(MOI)。方法:终点稀释法测定 Ad-Rad50-GFP 生物滴度,细胞生长曲线观察重组腺病毒载体对 CNE1 生长的影响,荧光显微镜下计算重组腺病毒载体的转染效率;免疫印迹实验检测以最适感染量感染后 CNE1 细胞内突变型 Rad50 蛋白的表达。结果:Ad-Rad50-GFP 生物滴度为 1.26×10^{11} pfu/ml,重组腺病毒载体以不高于 50 的感染倍率转染时对 CNE1 生长无明显影响,且 MOI=50 时转染 24 h 后 GFP 表达水平最高,可检出高表达的突变型 Rad50 蛋白,在转染 72 h 后仍维持约 70% 的转染效率。结论:重组腺病毒载体 Ad-Rad50-GFP 能有效转染 CNE1 细胞并使其表达突变型 Rad50 蛋白,MOI=50 为 Ad-Rad50-GFP 对 CNE1 的最适感染倍率。

[关键词] 重组腺病毒;鼻咽肿瘤;感染倍率

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2015.24.010

[中图分类号] R739.63 **[文献标志码]** A

The preparation of recombinant adenovirus Ad-Rad50-GFP and detection of the optimal multiplicity of infection in CNE1 transfected by Ad-Rad50-GFP

YAN Ruicheng¹ HUANG Jiancong¹ ZHU Ling² CHANG Lihong¹

LI Jingjia¹ WU Xifu¹ YE Jin¹ ZHANG Gehua¹

(¹Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510630, China; ²Department of Otolaryngology, Nanhai Maternity and Child Healthcare Hospital)

Corresponding author: ZHANG Gehua, E-mail:gehuazh@hotmail.com

Abstract Objective: The optimal multiplicity of infection (MOI) of the recombinant adenovirus Ad-Rad50-GFP carrying a mutant Rad50 gene expression region on the cell growth of nasopharyngeal carcinoma and the viral amplification efficiency of CNE1 cell infected by this adenovirus were studied. **Method:** The biological titer of Ad-Rad50-GFP was measured by end point dilution method. The impact of recombinant adenoviral vector transfection on the growth of CNE1 cells was observed by cell growth curve. Transfection efficacy of recombinant adenoviral vector was observed and calculated through fluorescence microscope. The expression of mutant Rad50 in the Ad-Rad50-GFP transfected CNE1 cells with optimal MOI was detected by Western Blot after transfection. **Result:** The biological titer of Ad-Rad50-GFP was 1.26×10^{11} pfu/ml. CNE1 cell growth was not influenced significantly as they were transfected by recombinant adenoviral vector with MOI less than 50. Transfection efficacy of recombinant adenoviral vector was most salient at 24 hours after transfection, with the high expression of mutant Rad50, and the efficiency still remained about 70% after 72 hours. **Conclusion:** Recombinant adenoviral vector Ad-Rad50-GFP could transfect CNE1 cells as well as result in the expression of mutant Rad50 in CNE1 cells effectively. MOI=50 was the optimal multiplicity of infection of CNE1 cells transfected by recombinant adenoviral vector Ad-Rad50-GFP.

Key words recombinant adenoviral vector; nasopharyngeal neoplasms; multiplicity of infection

放射治疗是临床上鼻咽癌的首选治疗方法。

放射线照射细胞引起 DNA 损伤,由 Mre11、Rad50、Nbs1 三种蛋白组成的 MRN 复合体是细胞内修复 DNA 损伤的重要组分^[1-2],其中 Rad50 蛋白结构的完整性对 MRN 复合体的形成及其功能起关键性作用。随着基因治疗在疾病治疗上的应用,通过腺病毒载体转染细胞,可使细胞表达外源

* 基金项目:广东省对外合作项目(No:2012B050600015)

¹中山大学附属第三医院耳鼻咽喉头颈外科(广州,510630)

[△]现在广州市增城区人民医院耳鼻咽喉科

²广东省佛山市南海妇幼保健院耳鼻咽喉科

通信作者:张革化, E-mail:gehuazh@hotmail.com

性基因产物。感染倍率(multiplicity of infection, MOI)是在转染过程中病毒数量与细胞数量的比值,确定合适的 MOI 对转染实验研究具有重要意义。本研究首先测定携带突变型 Rad50 蛋白基因的重组腺病毒载体 Ad-Rad50-GFP 的生物滴度。Ad-Rad50-GFP 瞬时转染人鼻咽癌细胞株 CNE1 后,通过细胞生长曲线实验和测定转染效率,确定 Ad-Rad50-GFP 对 CNE1 的最适 MOI,并通过免疫印迹实验验证突变型 Rad50 蛋白在 CNE1 细胞内的表达,为进一步研究该腺病毒载体表达突变型 Rad50 对人鼻咽癌细胞正常 MRN 复合体功能的干扰,及其增强鼻咽癌细胞对放射线敏感性的效果提供初步的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株与重组腺病毒载体 293A 细胞由中山大学附属第三医院疫苗研究所提供。人鼻咽癌细胞株 CNE1 购自中山大学动物实验中心。重组腺病毒载体质粒 pAd-Rad50-GFP 由美国宾夕法尼亚医学院李大庆教授馈赠,在中山大学附属第三医院疫苗研究所完成包装和扩增;对照重组腺病毒载体 Ad-EGFP 购自上海英潍捷基生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂 RPMI1640 培养液、DMEM 培养液(美国, Gibco);胎牛血清(美国, Hyclone);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)(美国, Amresco);过硫酸铵、TEMED(美国, Sigma);电泳 Marker(美国, Thermo Fisher Scientific);兔抗人 GAPDH 抗体(美国, Proteintech),兔抗人 Rad50 一抗抗体(美国, Novus)。蛋白提取试剂盒、蛋白含量检测试剂盒、ECL 检测试剂盒(南京凯基生物科技);羊抗兔辣根过氧化物酶标记的二抗抗体(武汉博士德生物工程)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 293A 细胞和 CNE1 细胞分别以含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液、RPMI 1640 培养液培养,培养条件为 37℃、5% CO₂ 浓度。细胞常规传代培养,铺板前通过结晶紫染色并在显微镜下行细胞计数。

1.2.2 Ad-Rad50-GFP 生物滴度的测定 293A 细胞铺 96 孔板,贴壁后加入不同稀释度的 Ad-Rad50-GFP 病毒液,培养 7 d 后显微镜下观察各孔细胞病变情况,记录各组细胞病变孔数的百分率,计算 Ad-Rad50-GFP 的生物滴度。Ad-Rad50-GFP 的生物滴度 (pfu/ml) = $10^{0.3 + \log_{10}(\text{稀释度}) \times (\text{各稀释度组细胞病变孔数百分率之和} - 0.5)}$ 。

1.2.3 细胞生长曲线实验 CNE1 细胞铺 96 孔板,细胞贴壁后,将病毒液按 MOI=5、10、20、50、100、300 不同的稀释度稀释后加入相应实验孔中,

空白对照组加入无血清 RPMI 1640 培养液。培养 4 h 后更换为常规细胞培养液培养。病毒作用后连续 3 d 取 96 孔板经 MTT 和 DMSO 溶液作用后,在酶标仪中测量各孔在 490 nm 波长下的吸光度值 OD₄₉₀,绘制 CNE1 细胞在不同 MOI 病毒载体作用下的细胞生长曲线。

1.2.4 转染效率测定 CNE1 细胞铺 24 孔板,病毒作用及细胞培养方法同 1.2.3。转染后连续 3 d 在荧光显微镜下观察细胞荧光情况,分别计算不同 MOI 下荧光细胞的百分率,即病毒载体对 CNE1 细胞的转染效率。转染效率=出现绿色荧光的细胞数/视野内的细胞总数。

1.2.5 免疫印迹实验 免疫印迹实验(Western-Blot)设空白对照组、Ad-Rad50-GFP 作用组和 Ad-EGFP 作用组,每组接种细胞数 4×10^6 。细胞贴壁后,将病毒液按 MOI=50 稀释后加入实验孔中,空白对照组加入无血清 RPMI1640 培养液,4 h 后更换为常规细胞培养液培养。转染 24 h 后,提取细胞全蛋白,根据蛋白标准曲线计算蛋白浓度。配制 12%的分离胶和 5%的浓缩胶,将稀释后的蛋白样品加入泳道,分别以恒压 80 V 和 120 V 完成浓缩胶和分离胶的蛋白电泳。恒定电流 200 mA 将蛋白从凝胶转移至 PVDF 膜上,漂洗后封闭液室温封闭,孵育一抗和二抗抗体,避光加入 ECL 化学发光液,通过化学发光凝胶成像系统曝光检测各组蛋白条带情况。

1.3 统计学方法

统计学分析通过 SPSS v16.0 统计学软件完成,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,细胞生长曲线数据比较采用单因素方差分析,组间数据比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ad-Rad50-GFP 的生物滴度

转染后第 7 天,各稀释度组细胞病变孔数百分率如表 1 所示,计算 Ad-Rad50-GFP 的生物滴度为 1.26×10^{11} pfu/ml。

2.2 细胞生长曲线

CNE1 细胞在重组腺病毒载体作用下的生长曲线见图 1。Ad-EGFP 作用 CNE1 细胞 24 h 后,MOI=300 时 OD₄₉₀ 较空白对照组显著减少($P < 0.05$),细胞生长抑制率为 16.8%。48、72 h MOI ≥ 100 的各组 OD₄₉₀ 与空白对照组比较均差异有统计学意义($P < 0.05$),而当 MOI 不高于 50 时,转染 72 h 后 CNE1 细胞数量未受明显影响。

2.3 转染效率测定

计算镜下荧光细胞比例,病毒载体的转染效率随 MOI 增大而升高,Ad-EGFP、Ad-Rad50-GFP 以 MOI=50 转染 CNE1 细胞,在转染 24 h 后效率最高,分别为 80.6%和 83.3%,Ad-Rad50-GFP 在转

染 72 h 后转染效率仍维持在 70% 以上。见表 2。

表 1 不同稀释度 Ad-Rad50-GFP 作用下的细胞病变情况

稀释度	细胞病变孔数	细胞病变百分率/%
10	10	100
10 ²	10	100
10 ³	10	100
10 ⁴	10	100
10 ⁵	10	100
10 ⁶	10	100
10 ⁷	10	100
10 ⁸	10	100
10 ⁹	10	100
10 ¹⁰	8	80
10 ¹¹	7	70
10 ¹²	5	50
10 ¹³	3	30
10 ¹⁴	0	0

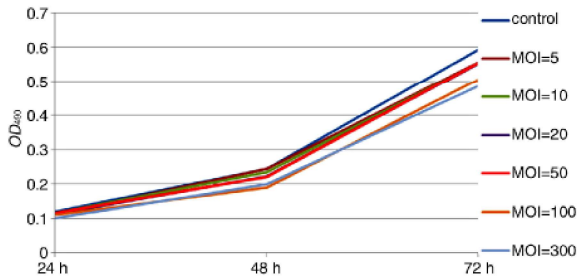


图 1 CNE1 细胞在重组腺病毒载体作用下的生长曲线

表 2 不同 MOI 下重组腺病毒载体的转染效率 %

组别	24 h	48 h	72 h
Ad-EGFP			
空白对照组	0	0	0
MOI=5	55.3	48.2	45.0
MOI=10	58.9	53.7	48.7
MOI=20	73.4	66.9	60.4
MOI=50	80.6	72.1	62.8
MOI=100	90.2	88.7	88.9
MOI=300	99.5	99.2	99.1
Ad-Rad50-GFP			
空白对照组	0	0	0
MOI=5	57.4	59.6	55.7
MOI=10	60.3	58.6	59.5
MOI=20	71.6	66.9	61.4
MOI=50	83.3	74.1	72.4
MOI=100	91.3	90.5	90.9
MOI=300	98.6	99.4	100.0

2.4 蛋白标准曲线

Western-Blot 根据稀释后标准蛋白的 OD₄₉₀，绘制蛋白标准曲线(图 2)。拟合蛋白标准曲线的

回归方程为 $Y = 0.025X + 0.008$, Y 为吸光度值 OD₄₉₀, X 为蛋白含量(μg), 回归方程 $R^2 = 0.989$ 。Western-Blot 实验表明, 各组均可检测出 37 kDa 处的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的表达, 表达量无显著差别 ($P > 0.05$), 仅 Ad-Rad50-GFP 作用组在 13 kDa 处检测出突变型 Rad50 蛋白表达(图 3)。

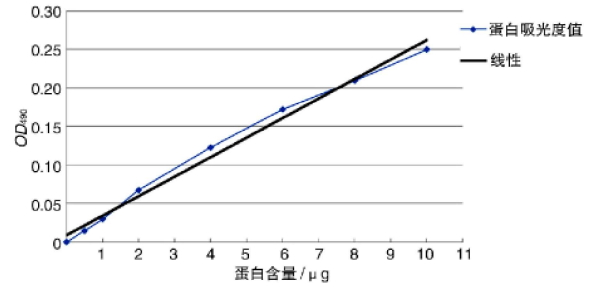
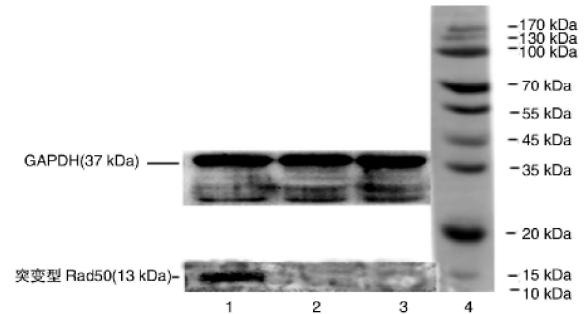


图 2 蛋白标准曲线



第 1~4 电泳泳道的上样顺序依次为: Ad-Rad50-GFP 作用组、Ad-EGFP 作用组、空白对照组和 Marker 标记物。所有条带在同一块凝胶中完成电泳, 按不同分子量的蛋白区间切开凝胶后分开转膜。

图 3 CNE1 细胞内突变型 Rad50 蛋白的检测

3 讨论

鼻咽癌是耳鼻咽喉科常见的恶性肿瘤, 高发于我国南方的广东、广西等地区, 据统计, 该地区人群的鼻咽癌患病率女性为 9/10 万~12/10 万, 男性为 22/10 万~28/10 万^[3]。鼻咽癌在组织学上以鳞状细胞癌多见^[4-5], 放射治疗是首选的治疗手段。放射线照射细胞后主要通过 DNA 双链断裂产生杀伤效应, 由 Mre11、Rad50、Nbs1 组成的 MRN 复合体在细胞损伤修复过程中发挥重要作用^[1-2]。Rad50 蛋白参与构成 MRN 复合体并完成细胞修复, 干扰其功能会影响细胞的自我修复, 导致细胞损伤程度增加^[6], 因此 Rad50 蛋白可作为研究增强放射线对鼻咽癌细胞杀伤作用的潜在靶点。

随着基因治疗的发展, 通过基因载体的传递, 将目的基因导入细胞内, 目前已有应用于乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌等恶性肿瘤治疗的相关报道^[7-9]。

基因载体决定了目的基因能否在细胞内有效表达,对治疗效果产生直接的影响。

基因载体主要分为病毒型载体和非病毒型载体两大类,腺病毒载体是最常用的病毒型载体,在传递基因方面具有以下明显的优点:①腺病毒基因组的结构和功能已被深入研究,2型和5型腺病毒的全序列已被完全阐明^[10];②允许插入较大容量的基因片段,目的基因几乎不整合到其他细胞的基因组中,不干扰宿主细胞自身基因组的表达;③不易突变,稳定性高,扩增简便,能获得较高滴度的重组腺病毒载体;④对肿瘤细胞等上皮细胞亲和力高,能感染增殖性细胞和非增殖性细胞;⑤不同的腺病毒载体可共同转染一个目的细胞株,可携带两个基因的表达盒分别表达相应的蛋白。

分子量为 13kDa 的突变型 Rad50 蛋白,在结构上仅保留了锌钩结构域和 CXXC 模体^[6]。本研究中以携带突变型 Rad50 蛋白基因的重组腺病毒载体转染 CNE1 细胞,Western-Blot 实验结果表明仅被 Ad-Rad50-GFP 转染的 CNE1 细胞可有效表达目的基因产物突变型 Rad50 蛋白,而被对照腺病毒载体转染的细胞不表达目的基因产物。

重组腺病毒载体能够感染细胞,过高的感染倍率会影响细胞的生长增殖能力,而过低的感染倍率则可能导致病毒载体转染效率下降,影响目的基因在细胞内表达,因此确定合适的感染倍率在病毒载体转染研究中尤为重要。本研究通过细胞生长曲线实验发现,重组腺病毒载体以不同 MOI 作用于 CNE1 细胞,当 MOI 为 300 时,转染 24 h 后细胞数量即较空白对照组显著减少,而当 MOI 不超过 50 时,在转染 72 h 后细胞数量与空白对照组相比无明显差异($P>0.05$),表明腺病毒载体感染倍率不高于 50 时,不会对细胞产生明显的生长抑制作用。

由于重组腺病毒载体携带的目的基因含有荧光蛋白基因,转染成功后,目的基因表达同时会表达出荧光蛋白,在荧光显微镜下可观察到发出绿色荧光的细胞即为转染成功的细胞,计算荧光细胞的比例即为转染效率。本研究表明,病毒载体转染 CNE1 时,转染效率随着感染倍率的增大而升高,随着转染时间的延长转染效率下降,可能为部分未转染的细胞分裂生长所致。当 MOI 为 50 时,病毒载体在转染 24 h 后效率最高,本研究表明在 Ad-Rad50-GFP 实验组中超过 80% 的细胞可表达突变型 Rad50 蛋白,在转染 72 h 仍有约 70% 细胞维持表达目的蛋白。

综上所述,重组腺病毒载体 Ad-Rad50-GFP 以 MOI=50 转染 CNE1 后,细胞可有效表达突变型 Rad50 蛋白。腺病毒载体以 MOI=50 转染 CNE1

未对细胞生长产生明显抑制作用。Ad-Rad50-GFP 转染 CNE1 后 24 h 转染效率最高,83.3% CNE1 细胞可表达突变型 Rad50 蛋白,因此,本研究确定 MOI=50 为 Ad-Rad50-GFP 对 CNE1 的最适感染倍率。突变型 Rad50 蛋白在细胞内与 MRN 复合体相关组分的相互作用以及对 NPC 细胞损伤修复的影响,将有待进一步的实验研究予以阐明。

参考文献

- [1] ZHANG Y, ZHOU J, LIM C U. The role of NBS1 in DNA double strand break repair, telomere stability, and cell cycle checkpoint control[J]. *Cell Res*, 2006,16: 45-54.
- [2] STAVRIDIS E S, HALAZONETIS T D. Nbs1 moving up in the world[J]. *Nat Cell Biol*,2005,7:648-650.
- [3] CAO S M, SIMONS M J, QIAN C N. The prevalence and prevention of nasopharyngeal carcinoma in China[J]. *Chin J Cancer*, 2011,30:114-119.
- [4] SCHOTTENFELD D, FRAUMENI J F. Cancer epidemiology and prevention 3rd ed [M]. New York: Oxford University Press, 2006: 620-626.
- [5] SHANMUGARATNAM K, SOBIN L II. The World Health Organization histological classification of tumours of the upper respiratory tract and ear. A commentary on the second edition [J]. *Cancer*, 1993,71: 2689-2697.
- [6] ABUZEID W M, JIANG X, SHI G, et al. Molecular disruption of RAD50 sensitizes human tumor cells to cisplatin-based chemotherapy[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119:1974-1985.
- [7] HUNG M C, HORTOBAGYI G N, UENO N T. Development of clinical trial of E1A gene therapy targeting HER-2/neu-overexpressing breast and ovarian cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*,2000,465:171-180.
- [8] FREYTAG S O, STRICKER H, PEGG J, et al. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double-suicide gene therapy in combination with conventional-dose three-dimensional conformal radiation therapy for the treatment of newly diagnosed, intermediate-to high-risk prostate cancer [J]. *Cancer Res*,2003,63:7497-7506.
- [9] FREYTAG S O, MOVSAS B, AREF I, et al. Phase I trial of replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy combined with IMRT for prostate cancer[J]. *Mol Ther*,2007,15:1016-1023.
- [10] CHROBOCZEK J, BIEBER F, JACROT B. The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2[J]. *Virology*, 1992, 186: 280-285.

(收稿日期:2015-09-01)