

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.03.002

CD20 特异性启动子调控腺病毒分泌 stTRAIL 对淋巴瘤细胞的抑制作用

张砚君¹,袁向飞¹,张晓龙¹,张晴¹,卢杨¹,杨圆圆¹,吴杰²,熊冬生^{1△},范冬梅¹(1. 中国医学科学院血液病医院暨血液学研究所 实验血液学国家重点实验室,天津 300020; 2. 辽河油田总医院 放射科,辽宁 盘锦 124010)

[摘要] **目的:** 研究腺病毒携带 CD20 启动子调控的 TRAIL 基因特异性杀伤 B-NHL 细胞的作用。**方法:** 人工合成含有 CD20 启动子片段-分泌信号-异亮氨酸拉链-sTRAIL(aa114~aa281)-真核 poly(A) 序列的融合基因,装入腺病毒载体 AdEasy 系统,包装出携带 P20-stTRAIL 序列的腺病毒感染细胞,采用荧光素酶报告基因法研究 CD20 启动子在 CD20⁺ 细胞系中的特异性转录,Western blotting 验证 TRAIL 蛋白在细胞内的特异性表达,体外 MTT 法检测 TRAIL 特异性抑制 CD20⁺ 细胞生长的作用。**结果:** 成功构建携带 P20-stTRAIL 序列的腺病毒载体并分别感染 CD20 阳性和阴性淋巴瘤细胞系后发现,CD20 启动子仅在 CD20⁺ 的 BJAB 淋巴瘤细胞中具有转录活性、启动 sTRAIL 表达并在体外形成具有生物学功能的同源三聚体结构;在细胞中和培养上清中均检测到 stTRAIL 在 mRNA 和蛋白水平的表达,但在 CD20⁻ 细胞系中则无明显表达。体外功能实验显示,BJAB 细胞在被 AdP20-stTRAIL 感染后自身生长受到明显抑制,而 AdP20-stTRAIL 感染的 CD20 阴性细胞以及空白载体感染的细胞未见生长抑制现象。**结论:** CD20 启动子可以特异性调控腺病毒携带的治疗基因 stTRAIL 的表达,实现 TRAIL 对 CD20⁺ B-NHL 细胞的靶向杀伤。

[关键词] CD20 启动子;基因治疗;腺病毒;stTRAIL;淋巴瘤;BJAB 细胞

[中图分类号] R737.1;R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)03-0290-09

Inhibiting effect of CD20 promoter-driven recombinant adenovirus-stTRAIL on lymphoma cell growth

Zhang Yanjun¹, Yuan Xiangfei¹, Zhang Xiaolong¹, Zhang Qing¹, Lu Yang¹, Yang Yuanyuan¹, Wu Jie², Xiong Dongsheng^{1△}, Fan Dongmei¹(1. State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Hospital of Blood Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin, 300020 China; 2. Radiology Department, Liaohe Oil Field General Hospital, Panjin 124010 Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effect of a CD20 promoter-driven recombinant adenovirus-soluble trimeric tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (stTRAIL) vector on the growth of lymphoma cells *in vitro*. **Methods:** An adenoviral vector encoding stTRAIL driven by the CD20 promoter whose activity was confirmed in lymphoma cell lines by luciferase assay was constructed. The constructed vector was infected into CD20 positive and CD20 negative lymphoma cell lines respectively. Protein content of stTRAIL was assessed by Western blotting and cell viability was determined by MTT assay in infected cells. **Results:** Soluble trimeric TRAIL protein was detected in CD20 positive lymphoma cells but not in CD20 negative lymphoma cells after infection with AdP20-stTRAIL ($P < 0.05$). Overexpression of stTRAIL in BJAB cells resulted in a significant increase in apoptotic cell death ($P < 0.05$). **Conclusion:** The CD20 promoter is capable of enhancing stTRAIL transcription in CD20 positive lymphoma cells, thereby having significant clinical implications in targeted cancer therapy.

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金资助项目(No. 81400176)。Projects supported by the National Natural Science Foundation for Young Scientists of China(No. 81400176)

[作者简介] 张砚君(1978-),女,天津市人,博士,助理研究员,主要从事肿瘤细胞靶向治疗的研究,E-mail: junjunfriend@126.com

[通信作者] 范冬梅(Fan Dongmei, corresponding author), E-mail: fdm19691217@163.com;熊冬生(Xiong Dongsheng, co-corresponding author), E-mail: dsxiong@ihcams.ac.cn。△共同通信作者

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20150615.1554.002.html>

[**Keywords**] CD20 promoter; gene therapy; adenovirus; stTRAIL; lymphoma; BJAB cell

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(3): 290-298]

非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)是一组发病率持续增高、以恶性 B 或者 T 淋巴细胞克隆性增殖为主要特征的异质性恶性血液肿瘤^[1],90% 以上的 NHL 等恶性肿瘤 B 淋巴细胞表面以及一些 T 淋巴细胞表面表达 CD20 抗原^[2-3]。目前治疗 NHL 的一线药物利妥昔单抗(Rituximab)主要通过 B 细胞表面的 CD20 分子特异结合而发挥作用,并在临床取得良好疗效,但有 50% 的患者会发生耐药,其耐药机制主要来自 CD20 分子转录后水平的表达异常和抗体介导的 ADCC、CDC 作用的缺失。因此,在转录水平利用 CD20 启动子特异性开展的治疗既可保证 CD20 的特异性,又能克服转录后因素带来的耐药。近年来因 TNF 相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-induced ligand, TRAIL)对肿瘤细胞具有相对特异性杀伤而备受关注,但在体内 TRAIL 易被降解而需大量用药,毒性作用较大。因此许多研究借助病毒携带治疗基因感染肿瘤细胞,通过肿瘤细胞自身表达出大量 TRAIL 蛋白,在局部形成较高浓度,杀死肿瘤细胞。但腺病毒感染细胞的过程不具有靶向性,成为制约其应用的障碍。基于以上理论,本研究利用 CD20 启动子调控腺病毒携带的分泌型 stTRAIL 融合基因在感染的肿瘤细胞特异性表达,实现腺病毒介导的 TRAIL 靶向杀伤 CD20⁺ 肿瘤细胞。

1 材料与方 法

1.1 细胞株及主要试剂

BJAB 淋巴瘤细胞、Raji 淋巴瘤细胞、Jurkat 急性 T 细胞白血病细胞系和 K562 慢性髓系白血病细胞系为本实验室保存。大肠杆菌 DH5a 感受态细胞购自索莱宝公司,pMD19-T simple 质粒购自 TaKaRa 公司,pGL3-Basic、pGL3-Control、pRL-TK 质粒及 Dual-Luciferase Reporter Assay System 均购自 Promega 公司,Cell Line Nucleofector[®] Kit V 购自 Lonza Amaxa 公司,基因组 DNA 提取试剂盒购自 Qingen 公司。

1.2 流式细胞术检测肿瘤细胞 CD20 的表达

分别取 BJAB、Raji、Jurkat 和 K562 细胞 2×10^6 个,冰冷 PBS 洗两次之后,重悬于 400 μ l PBS。将细胞悬液分别置于两支流式管中,一支加入 5 μ l PE 标记的小鼠抗人 CD20 单克隆抗体,另一支加入 PE 标记的小鼠 IgG 同型对照抗体,避光室温孵育 30

min。冷 PBS 洗两次,流式细胞术检测细胞表面 CD20 抗原的表达。

1.3 构建含有 CD20 启动子的报告基因载体

DNA 提取试剂盒提取 CD20 阳性细胞系 BJAB 细胞基因组 DNA,P1: GCGCCTCGAGGGGGAC-CCCTAAGTATAGTG; P2: GCGCAAGCTTCGGAGT-TCAGTGGGTGCAG 为上下游引物(分别含有 *Xho* I 和 *Hind* III 限制性内切酶位点),扩增 -425/+52 的 CD20 启动子片段,用 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切将 CD20 启动子片段装入带有荧光素酶(luciferase)报告基因的 pGL3-Basic 载体中。

1.4 CD20 启动子的特异转录活性的鉴定

采用常规电转方法转染含有 CD20 启动子的 pGL3-Basic 载体质粒,然后将电转杯中细胞转移至已有 2 ml RPMI 1640 培养基(10%血清)的 6 孔板中继续进行常规培养。48 h 后,加入 $1 \times$ Passive Lysis Buffer 100 μ l,冰浴裂解细胞 30 min,收集上清 20 μ l 加入检测管,再向管中加入 100 μ l 萤火虫荧光素酶底物,混匀,立即用发光检测仪读取 570 nm 波长的数值;数值读取之后再向其中加入 $1 \times$ Stop & Glo Reagent(海肾荧光素酶底物),混匀,再次立即用发光检测仪读取数值,每个样本重复 3 次实验。相对荧光活性(%) = (萤火虫荧光素酶的数值/海肾荧光素酶的数值)/每一种细胞的 pGL3-Control 组数值 $\times 100\%$ 。

1.5 人工合成含有分泌信号-异亮氨酸拉链-TRAIL 的融合基因

淋巴瘤细胞分离液分离正常人外周静脉血单个核细胞(PBMC),用 PBS 洗涤两遍后,以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养 2 d,同时加入 IL-2 (1 000 U/ml)刺激;提取 PBMC 总 RNA 并逆转录成 cDNA。以 P3: GCGAGAGGGAAGTGAGAGAAAGAG-GTCCTCAG, P4: ATCGTCTAGAGCGGCCGCTTAGC-CAACTAAAAGGCCCC 为上下游引物(下划线为 *Xba* I 和 *Not* I 限制性内切酶位点)扩增 TRAIL 基因;利用引物 P5: GGCATTCCGGTACTGTTGGTA-AAGCCACCATGGAGACAGACACTCCTGCTATGG-GTAC; P6: GATCTGCTTGTACCAGTGGAACTG-GAACCCAGAGCAGCAGTACCCATAGCAGGAGTG 扩增 SS(secretion signal)序列;利用引物 P7: CCACTG-GTGACAAGCAGATCGAGGACAAAATTGAGGAAAT-CCTGTCCAAGATTTACCAC, P8: TTCCCTCTCGC-

CAATGAGTTTCTTAATCCGGGCGATCTCGTTCTCGA-TGTGGTAAATCTTGGACAG 扩增 ILZ(isoleucine zipper)序列。

再利用 P9: ATCGAAGCTTGGCATTCCGGTACT-GTTGG(含 *Hind* III 内切酶位点), P10: CTTTCTCT-CACTTCCCTCTCGCCAATGAGTTTC 引物扩增能与 *TRAIL* 连接的 SS 和 ILZ 序列;最后用 P9 和 P4 扩增 SS-ILZ-*TRAIL* 全长。用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切 SS-ILZ-*TRAIL* 片段和 pGL3-Basic 质粒,纯化并连接获得 pGL3-st*TRAIL* 质粒(图 1)。

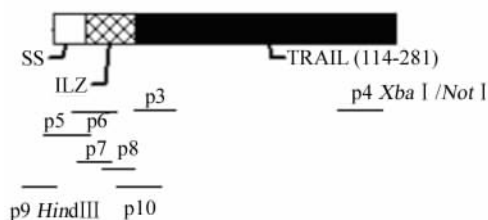


图 1 stTRAIL 片段克隆示意图
Fig. 1 Clone stTRAIL fragment

1.6 构建携带 P20-stTRAIL-Poly A 序列的腺病毒载体

构建步骤:(1)用 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切鉴定正确的 pGL3-st*TRAIL* 质粒和上述 pGL3-Basic 质粒,连接构建 pGL3-P20-st*TRAIL* 质粒;(2)将鉴定正确的 pGL3-P20-st*TRAIL* 质粒和腺病毒穿梭质粒 pAdTrack 用 *Xho* I 和 *Not* I 进行双酶切,回收目的片段后连接构建 pADP20-st*TRAIL* 质粒;(3)以 pAdTrack 为模板,利用 P11: GGGGGCGCCGCTG-GAGTTCGTGACCGCCGC(含 *Not* I 内切酶位点)和 P12: GGGGGGTACCCGCTTAAGATACATTGATGAG 为上下游引物(含 *Kpn* I 内切酶位点)扩增 Poly A 片段;(4)测序正确的 Poly A 片段和 pADP20-st*TRAIL* 质粒,再用 *Not* I -HF 和 *Kpn* I -HF 进行双酶切,连接,至此穿梭质粒 pADP20-st*TRAIL*-Poly A 构建完毕(图 2)。

1.7 携带 P20-stTRAIL--PolyA 序列腺病毒的包装

(1)腺病毒质粒的细菌内重组:制备含腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的大肠杆菌 BJ5183 感受态细胞,用限制性内切酶 *Pme* I 线性化 pADP20-st*TRAIL*-PolyA 质粒后转化上述感受态细胞,获得重组腺病毒质粒 pADP20-st*TRAIL*-PolyA-Lcz,按照无内毒素质粒大量提取试剂盒说明书提取重组子质粒,并线性化。

(2)24 孔培养板中接种对数生长期 293A 细

胞,至细胞的汇合度为 90%,按照 Lipofectamine™ 2 000 转染试剂说明书操作将线性化 pADP20-st*TRAIL*-PolyA-Lcz 质粒转入 293A 细胞。

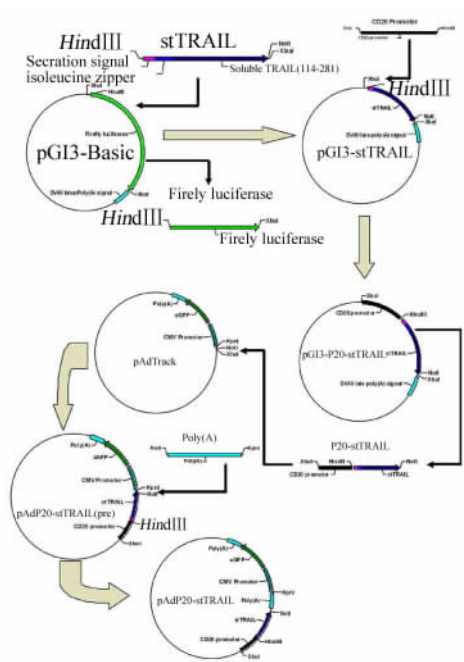


图 2 pAdP20-stTRAIL-PolyA 质粒的构建流程示意图
Fig. 2 A diagram of the pAdP20-stTRAIL-PolyA plasmid construction

(3)待上述转染的细胞培养液颜色稍变黄后,适量补充新鲜无抗生素高糖 DMEM 培养基继续培养,在 10 ~ 14 d 后出现病变效应(cytopathic effect, CPE)。将 24 孔板于 -20 °C 和 37 °C 反复冻融并振荡 3 次,注意慢冻速融,收集培养基于离心管中储存于 -80 °C,此为第一代病毒。连续包装第二、三代病毒,采用腺病毒纯化试剂盒纯化第二、三代腺病毒,分装后置于 -80 °C 保存。

(4)参照 AdEasySystem 说明书操作,用 50% 组织培养感染剂量法(TCID₅₀)测定腺病毒滴度。

1.8 感染腺病毒后肿瘤细胞中 stTRAIL 蛋白特异性表达的检测

1.8.1 RT-PCR 检测细胞被感染后 stTRAIL mRNA 的表达 取对数生长期的 BJAB、Jurkat 和 K562 细胞系接种于 6 孔板,每种细胞 1 × 10⁵/2 ml 接种两孔,取一孔向其中加入 4 × 10⁷ PFU 的 AdTrack 病毒悬液(200 MOI);向另一孔细胞加入 4 × 10⁷ PFU 的 AdP20-st*TRAIL* 病毒悬液(200 MOI),恒温培养箱常规培养 96 h 后,收集细胞,用 PBS 洗两遍,提取每一孔细胞的总 RNA,并逆转录成为 cDNA。以 P4 和 P9 为引物进行 PCR 反应扩增 stTRAIL,以 P13:

GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 和 P14: GAAGATGGT-GATGGGATTTTC 为上下游引物扩增 *GAPDH*。

1.8.2 Western blotting 检测细胞被感染后 stTRAIL 蛋白的表达 上述方法感染细胞后,用 RIPA 裂解液(强)提取细胞总蛋白,定量后进行 SDS-PAGE 与 Western blotting 实验。

1.8.3 ELISA 法检测 BJAB 细胞感染后培养基中 TRAIL 蛋白的含量 上述方法感染细胞后,用检测 TRAIL 的 ELISA 试剂盒测定感染后细胞上清中的 stTRAIL 的表达量。

1.9 CCK-8 法检测 AdP20-stTRAIL 病毒对 B 淋巴瘤细胞生长的抑制作用

1.9.1 不同细胞对 sTRAIL 敏感性的检测 取对数生长期的 BJAB、Jurkat 和 K562 细胞系,用 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基稀释至 1×10^5 个/ml,接种于 96 孔板,每孔 90 μ l。用 RPMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清)稀释 sTRAIL,质量浓度分别为 4 000、2 000、1 000、500、100、50、0 ng/ml,将 10 μ l 不同浓度的 sTRAIL 加入各种细胞,每种细胞每个浓度做 3 个重复孔。恒温常规培养 72 h 后,每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂,再继续培养 4 h 后,用酶标仪在 450 nm 波长处读取数值。抑制率(%)=(对照孔-试验孔)/对照孔 \times 100%。将每种细胞 0 浓度的平均值定为 100%,此种细胞其他浓度孔都与之相比做百分比处理。实验重复 3 次。

1.9.2 AdP20-stTRAIL 对 B 淋巴瘤细胞生长抑制的测定 分别取对数生长期的 BJAB、Jurkat 和 K562 细胞系,用 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基稀释至 1×10^5 个/ml,接种于 96 孔细胞培养板,每孔接种 90 μ l 细胞悬液,每种细胞均接种 5 板。用 RPMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清)稀释 AdTrack 和 AdP20-stTRAIL 病毒至 1.8×10^8 PFU/ml(200 MOI)后加入实验孔,同时用 1640 培养基(含 10% 胎牛血清)作对照。置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 恒温培养箱常规培养,每隔 24 h 取一板每孔加 10 μ l CCK-8 试剂,直至第 5 天。计算同上,每天以 1640 培养基组的平均值为 100%,其他各孔都与之相比做百分比处理。实验重复 3 次。

1.10 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 t 检验或方差检验进行组间比较,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 四种血液肿瘤细胞表面的 CD20 表达率

四种血液肿瘤细胞中,BJAB 和 Raji 细胞的 CD20 表达率分别为(81.2 \pm 1.7)%和(62.7 \pm 1.3)%,属于 CD20 阳性细胞;在 Jurkat 和 K562 细胞中 CD20 的表达率分别仅为(0.075 \pm 0.04)%和(0.067 \pm 0.02)%,属于 CD20 阴性细胞(图 3)。

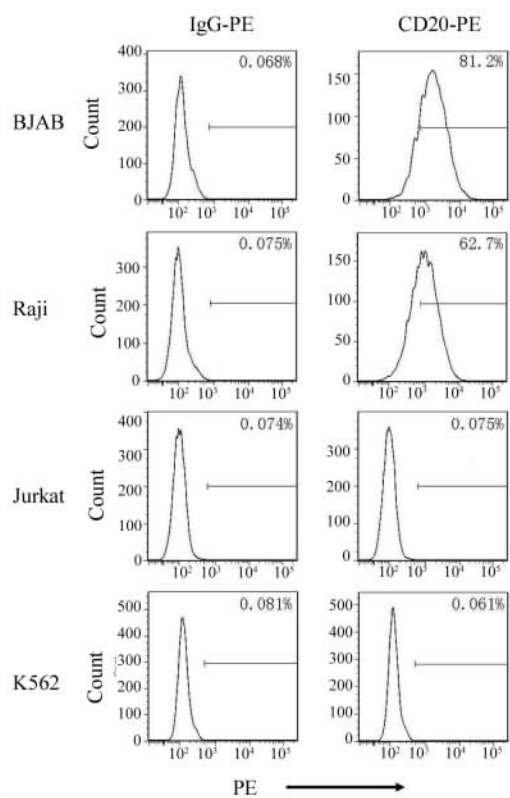


图3 CD20 在 BJAB、Raji、Jurkat 和 K562 四种细胞系中的表达
Fig. 3 The CD20 expression on different cell lines

2.2 CD20 阳性细胞系中 CD20 启动子片段的特异性表达

以 BJAB 细胞基因组 DNA 为模板扩增 500 bp 左右的 CD20 启动子,构建 pGL3-P20 质粒后,经酶切和 PCR 鉴定正确(图 4)。

荧光素酶报告基因检测 CD20 启动子活性结果(图 5)显示,pGL3-Basic 的活性在 4 种细胞系中没有显著变化,说明各样本之间的实验背景一致。而 BJAB 和 Raji 细胞中 CD20 启动子控制的报告基因活性是 Jurkat 和 K562 细胞的 10~20 倍。这与之前检测到的 CD20 抗原在四种细胞表面的表达强弱完全吻合,证明 CD20 启动子在 CD20⁺ 细胞中的表达具有特异性。

2.3 成功构建携带 P20-stTRAIL-Poly A 序列的腺病毒载体

经特异引物成功克隆 TRAIL 片段,长度为

536 bp(图6A)。融合分泌信号(SS)和亮氨酸拉链(ILZ)基因长度为209 bp(图6B);将上述两个片段用重叠延伸PCR连接在一起,最终合成的stTRAIL片段大小为723 bp(图6C);将stTRAIL片段装入pGL3-Basic质粒,用限制性内切酶进行双酶切鉴定,切下的stTRAIL片段大小为723 bp, pGL3-Basic酶切大片段大小约为3100 bp,与(图6D)所示相符。将上述P20启动子装入pGL3-stTRAIL质粒,用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Hind* III 进行酶切鉴定,切得的两个片段,一个略小于500 bp(P20),另一个介于3000 bp和5000 bp之间(线性pGL3-stTRAIL质粒片段),证明pGL3-P20-stTRAIL质粒构建正确(图6E)。将P20-stTRAIL装入pAdTrack腺病毒载体中,经 *Xho* I 和 *Not* I 限制性内切酶酶切鉴定,切得的两个片段,一个为P20-stTRAIL片段(大于1000 bp),另一个为线性pAdTrack载体片段(大于5000 bp),说明pAdP20-stTRAIL质粒构建成功(图6F)。克隆PolyA片段后装入pAdP20-stTRAIL质粒,双酶切得到两个片段,一个为pAdP20-stTRAIL载体片段(9300 bp),另一个为PolyA片段(340 bp)。至此,证明含有PolyA片段的LpAdP20-stTRAIL载体构建完成,并鉴定正确(图6G)。

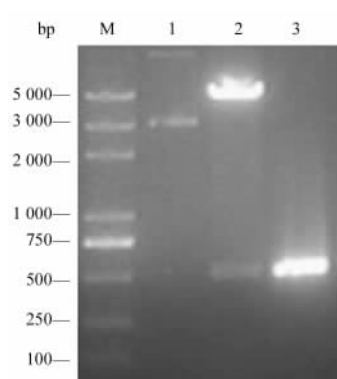


图4 pGL3-P20质粒鉴定

Fig. 4 Identification of pGL3-P20 recombinant plasmid

M:DNA marker;1:pGL3-P20 plasmid;
2:*Xho* I 和 *Hind* III double restriction enzyme digestion;
3:PCR identification with P1 and P2 primer

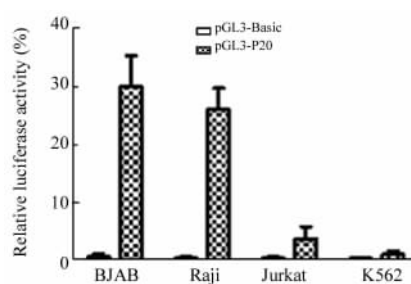


图5 pGL3-P20在四种细胞系中的相对荧光活性

Fig. 5 Relative activity of luciferase driven by CD20 promoter

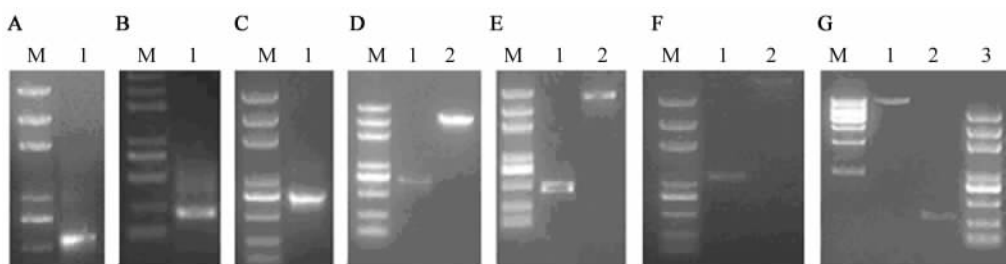


图6 P20-stTRAIL--PolyA腺病毒载体构建过程

Fig. 6 Construction of P20-stTRAIL-PolyA adenoviruses

A:Human sTRAIL gene fragment;B:Secretion signal(SS)and isoleucine zipper fusion gene(IST)fusion gene fragment;
C:stTRAIL fusion gene fragment;D:Identification of pGL3-stTRAIL recombinant plasmid(1:stTRAIL fragment;
2:pGL3-Basic plasmid fragment);E:Identification of pGL3-P20-stTRAIL recombinant plasmid(1:CD20 promoter fragment;
2. pGL3-stTRAIL plasmid fragment);F:Identification of pAdP20-stTRAIL adenoviruses plasmid(1. pAdP20-stTRAIL fragment;
2:P20-stTRAIL fragment);G: Identification of pAdP20- stTRAIL-polyA adenoviruses plasmid
(1: pAdP20-stTRAIL fragment;2. polyA fragment);M:marker

2.4 成功包装并鉴定 P20-stTRAIL--PolyA 腺病毒
线性化的 pAdP20-stTRAILcz 重组子腺病毒转染 293A 细胞后,3 d 已有绿色荧光蛋白的表达,7 d 出现了绿色荧光比较密集的细胞团,10 d 绿色荧光

密集的细胞团数目增多且面积增大,14 d 出现明显的 CPE 现象,形成空洞,此时收获病毒(图7)。病毒感染 293A 细胞后,24 h 即可观察到目标细胞中有绿色荧光出现,至 48 h 进一步增强(图8)。

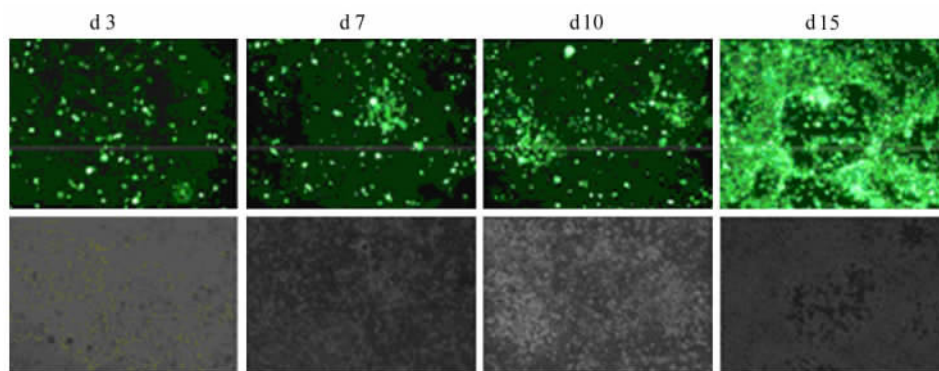


图7 线性化 pAdP20-stTRAILcz 重组子腺病毒转染 293A 细胞(×100)

Fig. 7 pAdP20-stTRAILcz adenoviruses plasmid transfected 293A cell(×100)

Note: The top line is under the fluorescence microscope images;

The bottom line is the same vision corresponding light microscope images

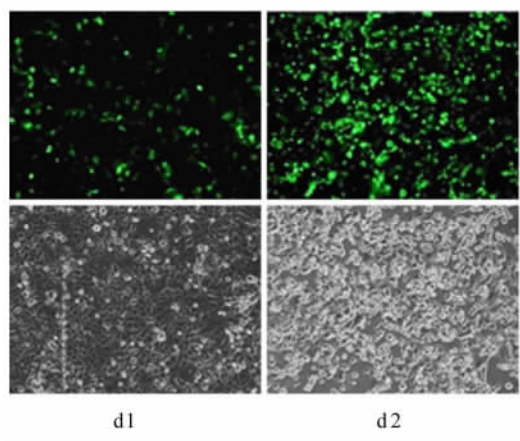


图8 病毒感染 293A 细胞后的荧光显微镜照片(×100)

Fig. 8 Observed the GFP expression under electron microscope with pAdP20-stTRAILcz adenoviruses plasmid infection(×100)

Note: The top line is under the fluorescence microscope images;
Bottom line is the same vision corresponding light microscope images

根据上述 1.7(4)方法,计数各稀释倍数组阳性孔占总共 10 个孔的比例,再按照公式 $T = 10^{7+(S-1.2)}$ 最后计算出 AdP20-stTRAIL 病毒的滴度约为 2.51×10^{13} PFU/ml; AdTrack 的滴度约为 6.31×10^{11} PFU/ml。采用 MOI 200 感染目标细胞,以流式细胞术分析,48 h 后空腺病毒载体 AdTrack 对 BJAB 细胞感染阳性率约为 32.5%, Jurkat 和 K562 细胞的感染阳性率约为 25.1% 和 90.4%(图 9)。

2.5 腺病毒感染后 BJAB 细胞 stTRAIL mRNA 及蛋白表达阳性

2.5.1 AdP20-stTRAIL 感染后 BJAB 细胞 stTRAIL mRNA 表达阳性

病毒感染细胞 96 h 后,只有在 AdP20-stTRAIL 感染的 BJAB 细胞中可以检测到 stTRAIL mRNA 的表达(略小于 750 bp 处的条带),而在 AdP20-stTRAIL 感染的其他两种细胞系里以及 AdTrack 空载体感染的 3 种细胞系中都没有检测到 stTRAIL mRNA 的表达(图 10)。

2.5.2 AdP20-stTRAIL 感染后 BJAB 细胞 stTRAIL 蛋白表达阳性

在 AdP20-stTRAIL 感染的 BJAB 细胞中可以检测到 stTRAIL 蛋白的表达,而在 AdP20-stTRAIL 感染的其他两种细胞系里以及 AdTrack 感染的 3 种细胞系中都没有检测到 stTRAIL 蛋白的表达(图 11)。

2.5.3 感染后的 BJAB 细胞培养基中可溶性 TRAIL 的含量

ELISA 检测结果显示,病毒感染 BJAB 细胞后 96 h, AdP20-stTRAIL 感染的细胞培养基中 TRAIL 蛋白的含量为 (465.98 ± 64.32) pg/ml, 而 AdTrack 感染的细胞培养基中 TRAIL 蛋白的含量仅为 (4.42 ± 6.18) pg/ml。

2.6 感染腺病毒后 stTRAIL 阳性表达的 BJAB 细胞的增殖受到明显抑制

CCK-8 法检测结果(图 12、13)显示, stTRAIL 作用 72 h 后, K562 细胞存活率未见明显变化,而对于另外两种淋巴瘤细胞,从 10 ng/ml 的质量浓度开始细胞生存率都发生了明显降低,而且 Jurkat 细胞的生存率受到的影响比 BJAB 细胞要大。200 MOI 的 AdP20-stTRAIL 感染 CD20 阳性的 BJAB 细胞后第 3 天细胞存活率明显下降,第 4 天下降到大约 50% 的

水平。对于另外两种 CD20 阴性细胞而言,并没有明显的生长抑制效果。同时,空载体病毒 AdTrack

对于三种细胞的生长都没有影响。

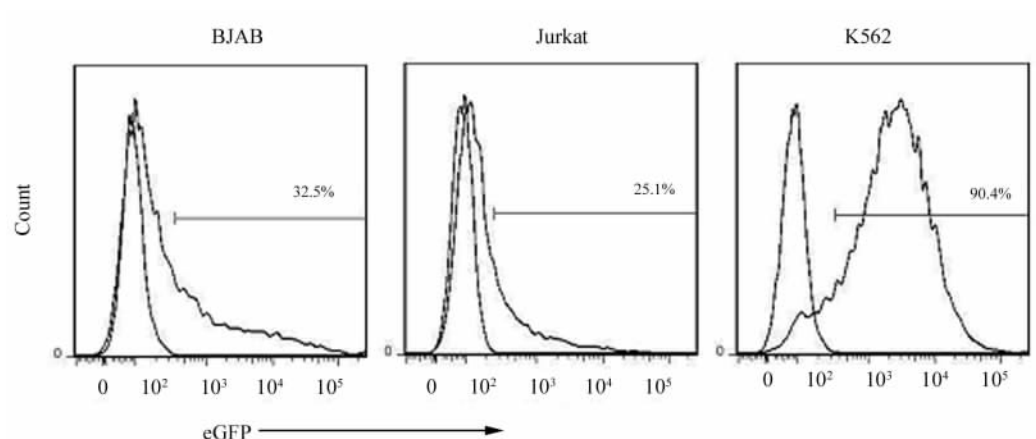


图 9 腺病毒载体对 BJAB、Jurkat 和 K562 三种细胞系的感染效率

Fig. 9 Infection efficiency of pAdP20-stTRAILcz adenoviruses plasmid in BJAB, Jurkat and K562 cell lines

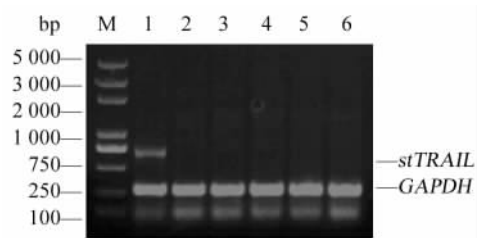


图 10 stTRAIL mRNA 在病毒感染的各细胞系中的表达情况

Fig. 10 Expression of stTRAIL mRNA in infected cells

1: AdP20-stTRAIL infected BJAB; 2: AdTrack infected BJAB; 3: AdP20-stTRAIL infected Jurkat; 4: AdTrack infected Jurkat; 5: AdP20-stTRAIL infected K562; 6: AdTrack infected K562

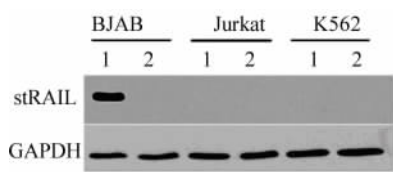


图 11 stTRAIL 蛋白在病毒感染的各细胞系中的表达

Fig. 11 Expression of stTRAIL in infected cells

1: AdP20-stTRAIL; 2: AdTrack

至于在一些 T 淋巴细胞肿瘤表面,无论良性还是恶性,也有 CD20 的少量表达^[4-5]。因而 CD20 分子是治疗 NHL 的重要靶点。美罗华是能够特异识别 B 细胞表面 CD20 抗原的单克隆抗体,是临床疗效卓越的靶向药,但大约有一半左右的患者会发生耐药,因此许多研究者开始考虑 CD20 的融合蛋白以及利用 CD20 分子的基因治疗。

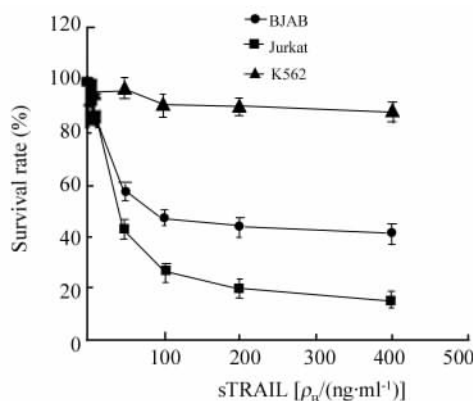


图 12 三种细胞系对 sTRAIL 的敏感性

Fig. 12 Sensitivity of cell line to sTRAIL

3 讨论

CD20 分子表达于正常 B 淋巴细胞生长发育的大部分阶段,从前 B 淋巴细胞直到成熟的 B 淋巴细胞、激活的 B 淋巴细胞和记忆性 B 淋巴细胞,仅在发育的终末阶段——浆细胞开始表达缺失。在几乎全部的恶性 B 淋巴细胞表面 CD20 都有其表达,甚

Torlakovic 等^[6]在对 CD20 启动子序列分析研究后,发现位于转录起始点 -149 和 -161 之间的 PU.1/Pip 复合物结合位点和上游 75 bp 处的 E box 位点是 B 淋巴细胞特有的,对于激活启动子的活性和保证特异性具有重要作用。

人 TRAIL 基因位于 3 号染色体上,TRAIL 是一

个由 281 个氨基酸残基组成的典型的 II 型跨膜蛋白,在其蛋白 C 端有同源三聚体的亚单位结构,在特定蛋白酶作用下水解可形成可溶性 TRAIL(soluble TRAIL, sTRAIL),sTRAIL 具有与完整 TRAIL 相同的生物学活性,且与膜结合形式的 TRAIL 相比,其引起的细胞毒性更小^[7]。

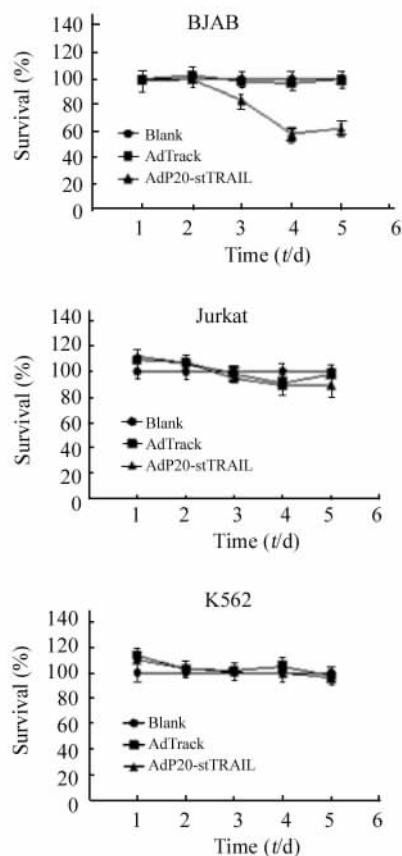


图 13 AdP20-stTRAIL 腺病毒对 3 种细胞系的生长抑制作用

Fig. 13 Cell growth was inhibited by AdP20-stTRAIL adenoviruses plasmid infection

Blank: No infection; AdTrack: Control plasmid infection;
AdP20-stTRAIL: Treated group

迄今,已发现 2 类 5 种 TRAIL 受体。包括 2 个死亡受体(death receptor, DR)DR4 和 DR5, 3 个诱骗受体(decoy receptor, DcR)DcR1、DcR2 和破骨素(osteoprotegerin, OPG)。DR4 和 DR5 为典型的 I 型穿膜蛋白^[8],与 TRAIL 结合后激发 caspase 凋亡信号通路。DcR1 的胞质区和胞内区缺失,DcR2 的胞质区含有一个没有功能的死亡结构域,因此它们与 TRAIL 结合均不能诱发细胞凋亡,相反,对 TRAIL 诱导的细胞凋亡有竞争性抑制作用^[9]。由于 TRAIL 在肿瘤细胞作用时,结合的是具有诱导凋亡功能的 DR4 和 DR5^[10],然而在正常细胞表面与之结合的却

是没有功能的死亡受体^[11-12],因此 TRAIL 诱导的细胞凋亡只会发生在肿瘤细胞上,而对于正常的细胞几乎没有影响^[13]。但 TRAIL 在体内很不稳定,目前多采用腺病毒携带 TRAIL 基因治疗肿瘤。同时,病毒携带的治疗基因被细胞表达出来之后,能够影响大多数的癌症细胞,其中包括那些未获得基因的细胞,这通常被称之为旁观者效应(bystander effect)^[14],这一点也使得病毒介导的基因治疗相比较难感染的血液肿瘤极为有利。

腺病毒载体可以使治疗基因在短时间内获得高水平的表达,但这种表达不会长时间地持续,而且缺乏靶向性。故在本研究中,希望通过 CD20 启动子调控 TRAIL 在特异肿瘤细胞中的表达以加强腺病毒基因治疗方法的靶向性。

然而全长 TRAIL 蛋白很少自发形成具有活性构象的 sTRAIL 蛋白,不足以产生很强的抗肿瘤活性和旁观者效应^[15]。对其结构研究^[16-17]表明,同源三聚体结构对于 sTRAIL 的生物活性是至关重要的,当其被破坏后活性即丧失。Rezvani 等^[18]构建了一种新的重组 sTRAIL 序列,其表达产物被命名为 stTRAIL,这个序列包括了三个部分:分泌信号、异亮氨酸拉链和 sTRAIL,其中异亮氨酸拉链区域是促使 sTRAIL 形成功能性同源三聚体的部分。实验数据表明,携带这种人造 sTRAIL 基因的腺病毒载体的抗肿瘤活性要强于之前的携带 TRAIL 全长和天然 sTRAIL 基因的腺病毒载体。其中 sTRAIL(114 ~ 281)及 DR4 或 DR5 的单克隆抗体已经获准进入临床试验^[19]。

本实验首先构建携带 CD20 启动子-stTRAIL 基因-真核转录终止序列这样一个转录单元的腺病毒穿梭质粒,然后将之与腺病毒骨架质粒在重组菌中发生同源重组获得重组子质粒,最终用腺病毒包装细胞 293A 包装出病毒颗粒,经过 3 次传代以后收获,再经过纯化浓缩,得到高滴度的病毒悬液。

为了验证构建的 P20-stTRAIL 腺病毒是否真的和设计一样:①能够选择性地 CD20 阳性的细胞系中表达 stTRAIL;②所表达的 stTRAIL 能够成功地分泌到细胞外;③所分泌的 stTRAIL 在体内外都具有诱导肿瘤细胞凋亡的功能。实验中分别验证了 CD20 启动子在各细胞中荧光素酶报告基因的表达水平,证明 CD20 启动子在 CD20 阳性的 BJAB 细胞中转录活性最好,而在阴性细胞中几乎不启动。利用包装好的腺病毒感染 CD20 阳性细胞 BJAB 后,CD20 启动子驱动 stTRAIL 在 mRNA 与蛋白水平高表达,而在空载体对照组和阴性细胞中均未检测到

sfTRAIL 水平。同时,为了验证所构建的 sfTRAIL 基因的表达产物能分泌到细胞外,实验采用人 TRAIL 蛋白 ELISA 检测试剂盒,检测到被 AdP20-sfTRAIL 感染的 BJAB 细胞培养上清中的 TRAIL 含量远远高于 AdTrack 空载体感染的 BJAB 细胞,而 CD20 阴性的 Jurkat 和 K562 细胞系培养上清中均没有发现 TRAIL 蛋白。体外抗肿瘤活性研究也发现,AdP20-sfTRAIL 感染的 BJAB 细胞随着感染时间延长出现了明显的生长抑制,而对照组未见此现象。以上实验结果证明,在腺病毒载体中利用特异性 CD20 启动子驱动 TRAIL 蛋白表达,可以实现其在目标肿瘤细胞中的特异性杀伤。

实验中,病毒载体感染 CD20 阳性的 Raji 细胞系的效率很低,大约不到 10%(数据未在本文中给出)。由于感染效率过低,即使在“旁观者效应”存在的前提下,也可能不足以产生治疗性的效果,故而在后续的实验中放弃了将其作为研究对象。这可能与不同细胞对腺病毒的敏感性不同相关。在今后的工作中希望寻找到一种感染效率更高的载体来解决这个问题,比如 AD5/F35 腺病毒载体^[20]。

研究过程中发现的一些对 TRAIL 并不敏感的 CD20 阳性细胞系,比如 Raji 细胞,可以在解决了感染效率低的问题之后,与一些能够提高细胞表面 DR4/DR5 表达水平的化疗药物(比如顺铂、三氧化二砷等)进行联合应用,预期会取得更理想的应用效果。

综上,研究旨在为 B-NHL 的治疗探讨一种新的策略和方法,以丰富现有的治疗手段。实验结果证明了利用启动子在转录水平增强腺病毒基因治疗的靶向性是科学、可行的,对于 B-NHL 治疗来说具有应用价值。

【参考文献】

- [1] Wong DJ, Hurvitz SA. Recent advances in the development of anti-HER2 antibodies and antibody-drug conjugates [J]. *Ann Transl Med*, 2014, 2(12): 122: 2305-5839.
- [2] Lanciotti J, Song A, Doukas J, et al. Targeting adenoviral vectors using heterofunctional polyethylene glycol FGF2 conjugates [J]. *Mol Ther*, 2003, 8(1): 99-107.
- [3] Stoff-Khalili MA, Rivera AA, Nedeljkovic-Kurepa A, et al. Cancer-specific targeting of a conditionally replicative adenovirus using mRNA translational control [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 108(1): 43-45.
- [4] Hultin LE, Hausner MA, Hultin PM, et al. CD20 (pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes [J]. *Cytometry*, 1993, 14(2):196-204.
- [5] Zhang H, Song L, Ye H, et al. Characterization of a novel hu-

manized anti-CD20 antibody with potent anti-tumor activity against non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(3): 645-654.

- [6] Torlakovic E, Malecka A, Myklebust JH, et al. PU.1 protein expression has a positive linear association with protein expression of germinal centre B cell genes including BCL-6, CD10, CD20 and CD22: Identification of PU.1 putative binding sites in the BCL-6 promoter [J]. *J Pathol*, 2005, 206(3): 312-319.
- [7] Kimberley FC, Sreaton GR. Following a TRAIL: Update on a ligand and its five receptors [J]. *Cell Res*, 2004, 14(5): 359-372.
- [8] Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: Nodes of coordination in immune signaling networks [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(4): 348-355.
- [9] Cullen SP, Henry CM, Kearney CJ, et al. Fas/CD95-induced chemokines can serve as “find-me” signals for apoptotic cells [J]. *Mol Cell*, 2013, 49(6): 1034-1048.
- [10] Preyat N, Rossi M, Kers J, et al. Intracellular nicotinamide adenine dinucleotide promotes TNF-induced necroptosis in a sir-tuin-dependent manner [J]. *Cell Death Differ*, 2015, doi: 10.1038/edd.2015.60 [Epub ahead of print].
- [11] Karl I, Jossberger-Werner M, Schmidt N, et al. TRAF2 inhibits TRAIL- and CD95L-induced apoptosis and necroptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5:e1444. Doi:10.1038/cddis.2014.404.
- [12] Kim SM, Woo JS, Jeong CH, et al. Potential application of temozolomide in mesenchymal stem cell-based TRAIL gene therapy against malignant glioma [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2014, 3(2):172-182.
- [13] Croft M. The TNF family in T cell differentiation and function--unanswered questions and future directions [J]. *Semin Immunol*, 2014, 26(3): 183-190.
- [14] Dorer DE, Nettelbeck DM. Targeting cancer by transcriptional control in cancer gene therapy and viral oncolysis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(7/8): 554-571.
- [15] Nettelbeck DM, Jerome V, Müller R. Gene therapy: Designer promoters for tumour targeting [J]. *Trends Genet*, 2000, 16(4): 174-181.
- [16] Freedman AS, Nadler LM. Immunologic markers in non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1991, 5(5): 871-889.
- [17] Vega MI, Huerta-Yepez S, Jazirehi AR, et al. Rituximab (chimeric anti-CD20) sensitizes B-NHL cell lines to Fas-induced apoptosis [J]. *Oncogene*, 2005, 24(55): 8114-8127.
- [18] Rezvani AR, Maloney DG. Rituximab resistance [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2011, 24(2):203-16.
- [19] den Hollander MW, Gietema JA, de Jong S, et al. Translating TRAIL-receptor targeting agents to the clinic [J]. *Cancer Lett*, 2013, 332(2):194-201.
- [20] 王凯,彭建强,袁振华,等. AD5/F35 腺病毒载体对不同来源造血系统恶性细胞转染效率的研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2006, 14(3):525-528.

【收稿日期】 2015-03-23

【修回日期】 2015-04-27

【本文编辑】 阮芳铭