

基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000201

腺病毒介导凋亡素诱导人大细胞肺癌 NCI-H460 细胞凋亡的研究

阮 军,任春利,缪李丽

(重庆医科大学附属永川医院呼吸内科,重庆 402160)

【摘要】目的:构建携带 VP3 基因重组腺病毒载体(pAdxsi-GFP-VP3),探讨凋亡素(Apoptin)在人大细胞肺癌 NCI-H460 细胞中的表达及诱导凋亡效应。**方法:**以 pcDNA3.1-VP3 重组质粒为模板,经酶切将 VP3 基因连接至穿梭质粒,后转移至 pAdxsi 载体上,收获 pAdxsi-GFP-VP3,经酶切和测序鉴定正确后进行病毒扩增和纯化,最后测定病毒滴度。将 pAdxsi-GFP-VP3 以最适感染复数转染入人大细胞肺癌 NCI-H460 细胞,利用 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)和 Western blot 技术检测 Apoptin 在细胞中的表达情况;透射电镜(transmission electron microscopy,TEM)下观察细胞的超微结构;MTT 法检测细胞的增殖活性;流式细胞仪(flow cytometry,FCM)检测转染后细胞的凋亡率及细胞周期。**结果:**成功构建重组腺病毒载体 pAdxsi-GFP-VP3,经酶切与测序鉴定证实连接正确,病毒滴度可达 1.6×10^9 PFU/ml。RT-PCR 显示转染 48 h 后 Apoptin 的 mRNA 表达;Western blot 证实转染 72 h 后 Apoptin 蛋白获得高表达。TEM 观察发现 NCI-H460 细胞凋亡早期染色质聚集,线粒体固缩,凋亡中晚期出现凋亡小体等超微形态学改变。MTT 法检测显示转染后的 NCI-H460 细胞增殖活性明显降低,呈时间依赖性($F=93.384, P=0.000$),与空病毒组和细胞对照组比较,差异有统计学意义($F=18.427, P=0.003$)。FCM 法检测显示 Apoptin 能有效地诱导 NCI-H460 细胞发生凋亡($F=47.307, P=0.000$),且凋亡率随时间呈逐渐上升趋势($F=303.237, P=0.000$);细胞周期表现为 S 期细胞比例降低($F=80.240, P=0.000$),G2/M 期细胞比例增高($F=110.080, P=0.000$)。**结论:**Apoptin 可以有效地诱导人大细胞肺癌 NCI-H460 细胞发生凋亡,这为 Apoptin 临床应用于人非小细胞肺癌基因治疗的深入研究奠定实验基础。

【关键词】凋亡素;大细胞肺癌;细胞凋亡;基因治疗**【中图分类号】**R730.59;R734.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-08-30

Apoptosis-inducing effect of adenovirus-mediated Apoptin on human large cell lung cancer NCI-H460 cells

Ruan Jun, Ren Chunli, Miao Lili

(Department of Respiratory Medicine, the Affiliated Hospital of Yongchuan, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct recombinant adenovirus vector(pAdxsi-GFP-VP3) containing VP3 gene and to investigate the apoptosis-inducing effect of VP3 gene on human large cell lung cancer NCI-H460 cells. **Methods:** VP3 gene was gained by enzyme digestion with pcDNA3.0-VP3 recombinant plasmid as a template and was diverted to shuttle vector. The pAdxsi-GFP-VP3 was obtained by connecting with pAdxsi vector. After enzymatic digestion and verification by sequencing, virus amplification and purification were conducted, and the titer of the recombinant adenovirus was determined by biological and physical assays finally. The pAdxsi-GFP-VP3 was used to transfect human large cell lung cancer NCI-H460 cells with optimum multiplicity of infection. Expression of Apoptin in large cell lung cancer cells was respectively detected by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western blot. Cell ultrastructure at different periods of time after the transfection was observed by transmission electron microscopy(TEM). Effect of Apoptin on cell proliferative vitality was determined by MTT assay. Apoptotic rate and cell cycle in NCI-H460 cells after transfection were measured by flow cytometry(FCM). **Results:** The pAdxsi-GFP-VP3 was successfully constructed by enzyme digestion and sequencing identification and the virus titer was 1.6×10^9 PFU/ml. RT-PCR results showed the mRNA expression of Apoptin in each experimental group at 48 h after the transfection. Western blot confirmed that Apoptin protein was highly expressed in each experimental group at 72 h after the transfection. The typical morphological changes in early apoptosis such as cell shrinkage, chromatin condensation and apoptotic bodies were observed under TEM. MTT assay indicated that the proliferative activity of trans-

ected NCI-H460 cells was remarkably decreased and presented in a time-dependent manner($F=93.384, P=0.000$) and there were statistical significances among different groups($F=18.427, P=0.003$). FCM detection showed that the expression of Apoptin

作者介绍:阮 军, Email: ruanjunsy@163.com,

研究方向:支气管哮喘。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150209.1116.022.html>

(2014-04-04)

in NCI-H460 cells after the transfection could induce cell apoptosis with a gradual increase in the apoptotic rate over time ($F=47.307$, $P=0.000$; $F=303.237$, $P=0.000$). Moreover, the proliferation of NCI-H460 cells was slowed down; the proportion of cells was decreased at S phase ($F=80.240$, $P=0.000$) and was blocked at G2/M phase after the transfection compared with that of control group ($F=110.080$, $P=0.000$). **Conclusion:** Our data demonstrate that Apoptin can effectively induce apoptosis of NCI-H460 cells, which may lay an experimental basis for applying Apoptin in human NSCLC gene therapy.

【Key words】Apoptin; large cell lung cancer; apoptosis; gene therapy

近年来,肿瘤基因治疗作为恶性肿瘤治疗的一种新策略,已经引起了国内外研究者的广泛关注与重视^[1]。研究表明,凋亡素即 Apoptin,是来源于鸡贫血病毒 VP3 基因编码的一种功能蛋白,具有广谱的诱导肿瘤细胞凋亡的效应,能选择性地诱导多种肿瘤细胞和转化细胞凋亡,而对人正常二倍体细胞无毒副作用,因此其被视为新型抗肿瘤生物制剂^[2-3]。目前,尽管 Apoptin 作用于多种肿瘤细胞的相关研究报道很多,但是有关 Apoptin 对人大细胞肺癌 NCI-H460 细胞的诱导凋亡效应却鲜见报道。本研究运用基因工程技术构建携带 VP3 基因的重组腺病毒,通过观察腺病毒介导 VP3 基因诱导人大细胞肺癌 NCI-H460 细胞凋亡的效应,探讨 Apoptin 对人非小细胞肺癌细胞的作用效果,以期为其进一步的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

VP3 基因重组质粒 pcDNA3.1-VP3 由本室构建并保存;基因工程菌 *E.coli* DH5a 购自 Strategene 公司;限制性内切酶购自 NEB 公司;T4 DNA 连接酶购自晶美生物公司;dNTPs 及引物合成购自上海生工生物工程公司;质粒小/中量提取纯化试剂盒、DNA 纯化试剂盒(柱离心型)、DNA 凝胶回收与纯化试剂盒(柱离心型)均购自北京威格拉斯生物公司;Trizol、RT 试剂盒、PCR mix 及 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司;蛋白提取试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、ECL 试剂及蛋白相对分子质量标准购自碧云天公司;兔抗人 Apoptin 多克隆抗体购自武汉晶赛生物工程公司;二抗山羊抗兔购自杭州联科生物公司;MTT、DMSO 购自 Sigma 公司;Annexin V-PE/7AAD 凋亡检测试剂盒购自晶美生物公司。人大细胞肺癌细胞株 NCI-H460 购于中国科学院上海细胞库。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒载体 pAdxsi-GFP-VP3 的构建 利用限制性内切酶 *Kpn* I + *Eco* R I 分别双酶切 pcDNA3.1-VP3 重组质粒和 pShuttle-GFP-CMV 穿梭质粒,胶回收目的基因和穿梭质粒片段,由 T4 DNA 连接酶连接过夜,连接产物转染大

肠杆菌菌株 DH5a,筛选氨苄青霉素阳性克隆进行酶切鉴定。将验证正确的重组穿梭质粒 pShuttle-GFP-VP3 分别用 *I*-*Ceu* I + *I*-*Sce* I 双酶切线性化后,胶回收并与腺病毒骨架质粒 pAdxsi 共转染大肠杆菌菌株 DH5a,筛选重组腺病毒载体 pAdxsi-GFP-VP3 的阳性克隆并通过测序分析鉴定。将获得的 pAdxsi-GFP-VP3 转染人胚肾 HEK293 细胞,以使重组腺病毒获得大量扩增,经纯化后采用经典法测定病毒滴度

1.2.2 细胞培养和转染 NCI-H460 细胞采用含 10%胎牛血清及 100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液,置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中进行培养。取对数生长期细胞按 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,培养 24 h 后将培养液更换为无血清无双抗培养液,并将病毒滴度为 1.6×10^9 PFU/ml 的 pAdxsi-GFP-VP3 稀释 10 倍后分别取 2、5、10、25、50 μ l (相应的病毒量为: 3.2×10^5 、 8×10^5 、 1.6×10^6 、 4×10^6 、 8×10^6) 加入 6 孔板中的 5 孔,第 6 孔作为细胞对照组。转染 6 h 后,更换新鲜完全培养液,每日于荧光显微镜下观察细胞的病毒感染情况。选取接近 100%细胞发荧光的孔所对应病毒量来计算最适感染复数(multiplicity of infection, MOI),公式: MOI=病毒数/细胞数。

1.2.3 RT-PCR 检测 Apoptin 的 mRNA 表达 转染后 48 h 一步法提取孔板中 NCI-H460 细胞的总 RNA,逆转录得到 cDNA 后进行 PCR 反应。VP3 基因:上游引物 5'-ACCATC-AACGGTGTTCAGGC-3',下游引物 5'-TTACAGTCTTATACA-CCTTCTTGC-3'。以 GAPDH 为内参照:上游引物 5'-GGT-GGTCTCTCTGACTTCAACA-3',下游引物 5'-GTTGCTGT-AGCCAAATTCGTTGT-3'。PCR 反应参数设置:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s、60 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。取 10 μ l 扩增产物于 2%琼脂糖凝胶上电泳观察分析结果。

1.2.4 Western blot 检测 Apoptin 的蛋白表达 转染后 72 h 收集 NCI-H460 细胞并用预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗 2 次,加入细胞裂解液、提取蛋白,用 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,电转移至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜以 5%脱脂奶粉于摇床上室温振荡封闭 1 h,加入兔抗人 Apoptin 一抗,4 $^{\circ}$ C 保存过夜, PBST (PBS with Tween-20, PBST)洗膜 3 次,每次 10 min;再加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBST 洗膜 3 次,每次 10 min;最后加入 ECL 化学发光试剂显色,曝光底片,观察 Apoptin 的蛋白表达情况。

1.2.5 透射电镜观察细胞超微结构 转染后 24、48、72 h 分别收集 6 孔板上的 NCI-H460 细胞(每个标本细胞数 $\geq 2 \times 10^6$ 个),用 PBS 洗涤细胞 2 次,800 r/min 离心 5 min,吸弃上清液,留取 1.5 ml 细胞悬液并吹散均匀,1 200 r/min 离心 10 min,吸弃上清液后保留细胞团块,加入 3%戊二醛固定 4 h 后再用 1%锇酸固定 1 h,丙酮酸梯度脱水。Epon812 环氧树脂包埋,并进行超薄切片(厚度为 80 nm);醋酸铅-枸橼酸铅染色,透射电子显微镜下观察摄片,检测电压为 80 kV。

1.2.6 MTT 法检测细胞增殖活性 将对数生长期 NCI-H460 细胞接种于 96 孔培养板中,调整细胞密度为 5×10^3 个/孔细胞,置于 37 ℃、5%CO₂ 培养箱中进行培养。实验分为 3 组:重组腺病毒组(Ad-GFP-VP3)、空病毒组(Ad-GFP)和细胞对照组,每组设 5 个重复孔,分别加入最适 MOI 重组腺病毒、等量空病毒和 PBS。转染后 24、48、72、96 h 分别加入噻唑蓝(MTT, 5 mg/ml)20 μ l,孵育 4 h,弃去培养基,加入二甲亚砜(DMSO)150 μ l,置摇床低速振荡 10 min,酶标仪在 570 nm 波长处测定吸光度(absorbance, A)值。以 A 值为纵坐标,以时间(h)为横坐标绘制生长曲线。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞凋亡率 利用 AnnexinV-PE/7AAD 细胞凋亡检测试剂盒,按使用说明通过检测膜磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)评估细胞凋亡。转染后 24、48、72 h 分别收集各组 NCI-H460 细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清, PBS 洗涤细胞 2 次,收集 106 个细胞后加入 195 μ l 的 AnnexinV-PE/7AAD 结合液重悬细胞,再加入 5 μ l AnnexinV-PE/7AAD 混匀,室温避光孵育 10 min,流式细胞仪上测定细胞凋亡率。

1.2.8 流式细胞仪检测细胞周期 转染后 72 h 收集 6 孔板中的 NCI-H460 细胞,经离心、PBS 洗涤后重悬细胞,调整细胞密度为 $(1 \sim 2) \times 10^6$ 个/ml,加入 70%预冷乙醇溶液 2~3 ml,混匀置 4 ℃固定 24 h,离心去上清, PBS 洗涤细胞 2 次,加入碘化丙啶(PI)染液,冰浴中避光染色 30 min,流式细胞仪上定量分析细胞周期变化。

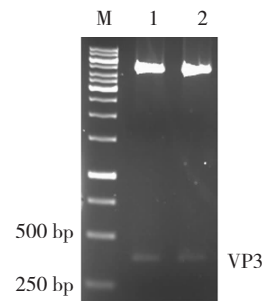
1.3 统计学分析

用 SPSS 13.0 统计分析软件处理数据,全部数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,其中,MTT 实验数据和细胞凋亡率实验数据均采用重复测量的方差分析,细胞周期实验数据采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 重组腺病毒载体的鉴定与滴度测定

重组穿梭质粒 pShuttle-GFP-VP3 经双酶切后进行电泳鉴定,可见在 366 bp 左右有 1 条较亮的目的条带,其与 VP3 基因大小相当(图 1)。经氨苄霉素筛选的阳性克隆质粒 pAdxsi-GFP-VP3 送华大基因公司测序分析鉴定,结果证实 VP3 基因与基因库中的序列同源性达 99%以上,表明 VP3 基因正确地插入到载体中,且插入方向为正向。重组腺病毒滴度测定结果为 1.6×10^9 PFU/ml。



M. Marker (1 kb DNA ladder); 1-2. VP3 基因阳性克隆

图 1 pShuttle-GFP-VP3 酶切电泳

Fig.1 Enzyme electrophoresis of pShuttle-GFP-VP3

2.2 荧光显微镜下观察转染细胞形态学

将不同 MOI 的 pAdxsi-GFP-VP3 转染入 NCI-H460 细胞,通过荧光显微镜观察发现 NCI-H460 细胞的荧光表达强度随着感染复数的提高而增强,同时部分细胞也出现了细胞脱壁的现象,这提示腺病毒的毒性作用在逐渐增大。经过多次荧光显微镜下细胞形态的观察,最后确定重组腺病毒的最适感染复数值为 40(图 2)。

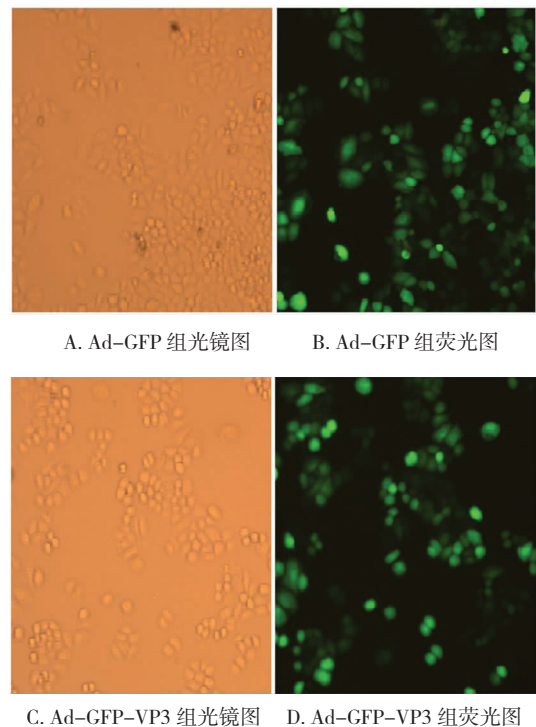


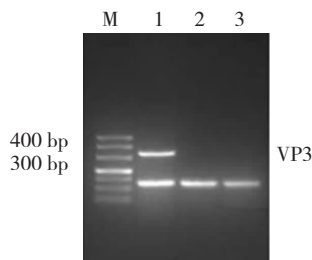
图 2 细胞转染效率的光镜和荧光观察结果 (100 $\times$)

Fig.2 Observation of cell transfection efficiency with optical microscopy and fluorescence microscopy (100 $\times$)

2.3 RT-PCR 检测 Apoptin 的 mRNA 表达

转染 48 h 后提取各组细胞 RNA 进行 RT-PCR 检测,凝胶电泳结果显示重组腺病毒组(Ad-GFP-VP3)可扩增出 2 条 DNA 条带,1 条为 334 bp 左右的 VP3 基因片段条带,另 1 条为 127 bp 左右的内参(GAPDH)条带,表明 VP3 基因已在

NCI-H460 细胞中获得成功转录。而 Ad-GFP 组和细胞对照组显示其 VP3 基因扩增结果为阴性,仅扩增出 1 条内参条带 (图 3)。



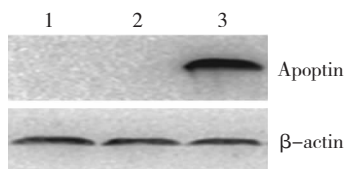
M. Maker (DL500 DNA ladder); 1. Ad-GFP-VP3 组;
2. Ad-GFP 组; 3. 细胞对照组

图 3 RT-PCR 检测 VP3 基因的 mRNA 表达

Fig.3 mRNA expression of VP3 gene detected by RT-PCR

2.4 Western blot 检测 Apoptin 的蛋白表达

转染 72 h 后收集各组细胞蛋白进行 Western blot 检测,结果显示各组的内参对照 β -actin 蛋白的条带亮度相似,表明其在各组细胞内的表达基本一致;同时,重组腺病毒组(Ad-GFP-VP3)出现 Apoptin 条带,表明 VP3 基因被成功转入 NCI-H4 细胞内并获得高表达,而空病毒组(Ad-GFP)与细胞对照组均未见 Apoptin 条带(图 4)。



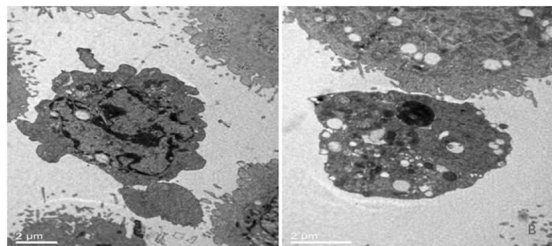
1. 细胞对照组; 2. Ad-GFP 组; 3. Ad-GFP-VP3 组

图 4 Western blot 检测 Apoptin 的蛋白表达

Fig.4 Expression of Apoptin protein detected by Western blot

2.5 透射电镜观察结果

转染 pAdxsi-GFP-VP3 后 24~72 h,透射电镜下可见 NCI-H460 细胞出现细胞凋亡的超微形态学改变,并且随着转染时间的延长逐步加重,早期凋亡时细胞体积缩小,核膜表面凹凸不平,核染色质边集、解离;中晚期凋亡时细胞核固缩,由膜包裹的含胞质和染色质的凋亡小体形成(图 5)。



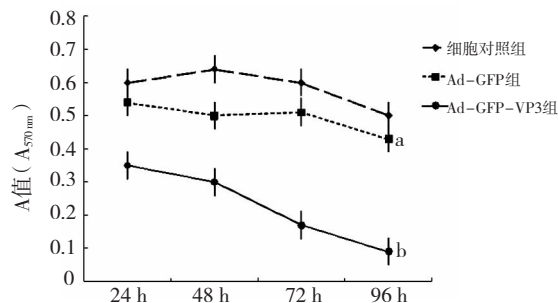
A. 凋亡早期 (7000 $\times$) B. 凋亡中晚期 (10000 $\times$)

图 5 透射电镜下观察细胞凋亡的超微结构变化

Fig.5 Observation of cell ultrastructural changes under TEM

2.6 MTT 法检测转染细胞的生长状况

转染 24、48、72、96 h 后采用 MTT 法分别检测各组 NCI-H460 细胞的增殖活力,结果显示重组腺病毒组(Ad-GFP-VP3)于转染 24 h 后即开始出现细胞增殖活力下降($0.350 7 \pm 0.510 5$),且随时间推移抑制效果表现更明显,呈时间依赖性 ($F=93.384, P=0.000$),48 h 和 72 h 后细胞活力明显降低 ($0.298 7 \pm 0.049 1; 0.170 3 \pm 0.072 8$),于转染 96 h 后细胞增殖活性被明显抑制 ($0.897 0 \pm 0.061 3$),与空病毒组(Ad-GFP)与细胞对照组比较,差异有统计学意义 ($F=18.427, P=0.003$) (图 6)。



a, $P < 0.05$, 与空病毒组与细胞对照组比较;

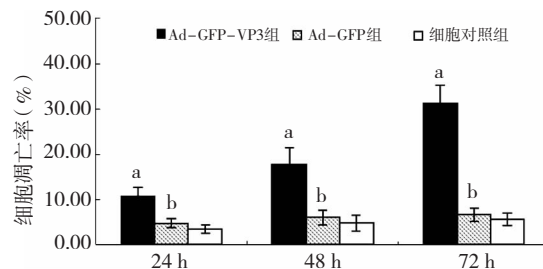
b, $P > 0.05$, 与细胞对照组比较

图 6 MTT 法检测 Apoptin 对细胞增殖的作用

Fig.6 Effect of Apoptin on cell proliferation detected by MTT assay

2.7 流式细胞仪检测转染后细胞的凋亡率

转染 24、48、72 h 后分别检测各组 NCI-H460 细胞的凋亡率,结果显示重组腺病毒组(Ad-GFP-VP3)于转染 24 h 后即开始出现细胞凋亡 ($10.703 3 \pm 2.040 0$),48 h 和 72 h 后细胞凋亡率逐渐增高 ($17.783 3 \pm 3.740 1; 31.360 0 \pm 3.821 7$)。各时段的细胞凋亡率均明显增高,且随转染时间呈现明显增加的趋势 ($F=303.237, P=0.000$),表明 Apoptin 可以有效诱导 NCI-H460 细胞发生凋亡,与空病毒组(Ad-GF)和细胞对照组比较,差异有统计学意义 ($F=47.307, P=0.000$) (图 7)。



a, $P < 0.05$, 与空病毒组与细胞对照组比较;

b, $P > 0.05$, 与细胞对照组比较

图 7 FCM 法检测各组细胞凋亡率

Fig.7 Detection of apoptotic rate in each group by flow cytometry

2.8 流式细胞仪检测转染后细胞的周期

转染 72 h 后采用流式细胞术检测 NCI-H460 细胞的周

期变化状况,结果显示重组腺病毒组(Ad-GFP-VP3)的 S 期细胞比例降低,DNA 合成受阻($F=80.240, P=0.000$),而 G2/M 期细胞比例增加,DNA 降解和异倍体细胞出现($F=110.080, P=0.000$),这提示 Apoptin 可引起 G2/M 期阻滞,与空病毒组(Ad-GFP)和细胞对照组比较,差异有统计学意义(表 1)。

表 1 FCM 法检测各组细胞周期的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab.1 Comparison of cell cycle detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	G0/G1	S	G2/M
细胞对照组	64.37 $\pm$ 3.75	30.58 $\pm$ 3.00	5.05 $\pm$ 0.76
Ad-GFP 组	63.19 $\pm$ 1.93	29.04 $\pm$ 2.09 ^b	7.77 $\pm$ 0.58 ^b
Ad-GFP-VP3 组	63.98 $\pm$ 2.64	8.93 $\pm$ 1.74 ^a	27.09 $\pm$ 3.34 ^a
F 值	0.131	80.240	110.080
P 值	0.880	0.000	0.000

注:a,与空病毒组和细胞对照组比较 $P < 0.05$;b,与细胞对照组比较 $P > 0.05$

3 讨 论

肺癌是当今世界发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,其五年总生存率仅为 15% 左右^[4],被视为目前对人类生命和健康威胁最大的恶性肿瘤。其中,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌总数的 75%~80%。国际癌症中心的数据显示,2008 年全球约有 161 万新发肺癌病例,而因肺癌死亡的人数每年高达 138 万^[5]。据中国肿瘤死亡报告显示,近三十年来我国肺癌死亡率逐年上升了 46.5%,尤其是 NSCLC 呈现上升的趋势^[6]。与此同时,肺癌作为预后最差的恶性肿瘤之一,其早期临床诊断困难,大部分患者确诊时已属中晚期,失去手术根治的最佳时机,而且传统治疗手段如手术、放疗和化疗等难以达到令人满意的疗效,故探索新的肺癌治疗策略成为临床研究的热点^[7]。

Apoptin 是由鸡贫血病毒 VP3 基因编码的一种小分子凋亡蛋白,包含 121 个氨基酸,相对分子量 13 600,含有 2 个脯氨酸富含区和 2 个碱性区,其 C 端碱性区(11 个氨基酸)是核定位信号和(或)DNA 结合区域^[8]。Apoptin 具有 2 个细胞核定位信号(nuclear localization signal, NLS),分别位于 C 端的 82~88 和 111~121 氨基酸处,以及 1 个核输出信号(nuclear export signal, NES)^[9]。研究表明,Apoptin 特异性诱导肿瘤细胞凋亡的效应既不依赖于 p53 介导,也不被 Bcl-2 的过表达所抑制,这提示 Apoptin 可以成为一种理想的新型抗肿瘤制剂^[10-11]。Apoptin 通过线粒体途径特异性诱导肿瘤细胞凋亡,在凋亡后期线粒体跨膜电位被破坏,引起细胞色素的释放及

下游 Caspase-3 的激活,从而导致肿瘤细胞凋亡。此外,Apoptin 诱导凋亡效应还与其核定位为效应、磷酸化调节、DNA 结合能力以及小分子蛋白间的相互作用等有关^[12]。因此,Apoptin 在肿瘤基因治疗中具有重大潜力,对其进行深入研究具有极强的研究及应用价值。

近年来,肿瘤基因治疗因其具有高效性、安全性及特异性强的特点,成为国内外学者广泛关注的焦点。然而,如何选择合适的载体将 VP3 基因成功导入靶细胞,从而发挥其诱导肿瘤细胞凋亡的效应一直困扰着 Apoptin 的临床应用,故解决其合理的给药途径也是 Apoptin 临床应用研究的热点和难点。目前,利用病毒载体介导基因转移,是肿瘤基因治疗中广泛应用的方法,其中以腺病毒载体最常用,已被广泛应用于基因治疗的研究中,且已被美国 FDA 批准可作为基因治疗载体应用于临床实验^[13]。在本研究中,将 VP3 基因定向克隆入绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记的真核载体中,成功构建重组腺病毒载体(pAdxsi-GFP-VP3),其示踪剂 GFP 能有效追踪观察重组腺病毒的包装与 VP3 基因的表达,为后续研究提供了极大方便。随后将重组腺病毒以最适感染复数(MOI=40)转染入 NCI-H460 细胞,通过荧光显微镜观察发现,转染 48 h 后细胞出现了典型的凋亡形态学改变,而对照组细胞核形态及染色正常,并可见正常的细胞分裂现象。逆转录(RT)-PCR 和 Western blot 检测结果均显示 VP3 基因可在转染后的 NCI-H460 细胞中获得高表达,表明 Apptin 能够在人大细胞肺癌细胞株中顺利表达。FCM 检测发现重组腺病毒组转染后的细胞凋亡率显著高于空病毒组和细胞对照组,且凋亡率随时间呈逐渐升高趋势,提示 Apoptin 对 NCI-H460 细胞具有明显的促凋亡作用。而且流式细胞术检测转染后不同时相点细胞周期变化发现,腺病毒组转染后的细胞周期变化表现为 S 期 DNA 合成受到限制,而 G2/M 期细胞阻滞,这与 Teodoro 等^[14]报道的实验结果基本一致。同时,通过透射电子显微镜观察转染后的 NCI-H460 细胞形态变化,结果发现转染早期的细胞体积开始缩小,核染色质边集并向核膜靠拢,后期细胞核逐渐固缩,由膜包裹的含胞质和染色质的凋亡小体形成,这进一步证实 Apoptin 特异性诱导肿瘤细胞凋亡与其细胞核定位紧密相关^[15]。此外,还采用 MTT 法检测 NCI-H460 细胞在重组腺病毒转染后的增殖活性变化,结果发现 Apoptin 能够有效地抑制 NCI-H460 细胞的增殖活性。

基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.000195

铜绿蝇幼虫在不同脏器组织源食物上生长发育变化

王 尧¹,杜琳敏²,袁增琼²,李学博²,万立华²

(1. 贵阳医学院法医学系, 贵阳 550004; 2. 重庆医科大学基础医学院法医学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究铜绿蝇幼虫在不同组织源的食物上生长发育变化。**方法:**在 26℃ 恒温、相对湿度 70% 条件下,用猪的肌肉组织、肝脏组织、脑组织、肌肉与脂肪的混合物(6:4)分别饲养铜绿蝇幼虫。每隔 12 h 测体长和体质量,化蛹后测蛹的体长和体质量。统计幼虫及蛹的死亡率。推算各组幼虫发育总历期和成虫的性别比。**结果:**40% 脂肪混合组与其他 3 组相比生长缓慢,达到最大个体的时间延迟 24 h 以上。肝脏组幼虫体长(15.02 ± 1.39) mm 和 40% 脂肪混合组体长(14.85 ± 1.43) mm 明显小于脑组织组(17.53 ± 2.08) mm、肌肉组(16.82 ± 2.15) mm ($F=5.440, P=0.003$);肝脏组幼虫体质量(72.8 ± 14.2) mg 和 40% 脂肪混合组体质量(70.4 ± 15.4) mg 均明显小于脑组织组(89.6 ± 19.2) mg 和肌肉组(85.9 ± 16.7) mg ($F=3.320, P=0.030$)。40% 脂肪混合组蛹体长及体重均明显小于脑组织组和肌肉组 ($F=7.890, P=0.001$; $F=9.280, P=0.001$)。40% 脂肪混合组幼虫和蛹的死亡率均明显高于脑组织组、肌肉组、肝脏组 ($F=3.470, P=0.040$; $F=4.720, P=0.035$)。**结论:**铜绿蝇幼虫在 40% 脂肪混合食物上生长发育历期较长,肝脏组和 40% 脂肪混合组幼虫及蛹的体长和体质量较小。

【关键词】死后间隔时间;铜绿蝇幼虫;法医昆虫学**【中图分类号】**R384.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-11-19

作者介绍:王 尧,Email:wangyao123abcd@163.com,

研究方向:法医现场学。

通信作者:万立华,Email:441567490@qq.com。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150209.1123.028.html
(2014-04-04)

综上所述,本研究结果表明腺病毒载体介导 Apoptin 可以明显降低人大细胞肺癌 NCI-H460 细胞的增殖活性,并有效地诱导肺癌细胞发生凋亡;因此,Apoptin 是一种潜在的抗肿瘤生物制剂,为 NSCLC 的基因治疗提供了新的方向。

参 考 文 献

- [1] Moldvay J. Personalized therapy in non-small cell lung cancer: from diagnosis to therapy[J]. *Orv Hetil*, 2012, 153(23): 909-916.
- [2] Los M, Panigrahi S, Rashedi I, et al. Apoptin, a tumor-selective killer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(8): 1335-1342.
- [3] Argiris K, Panethymitaki C, Tavassoli M. Naturally occurring, tumor-specific, therapeutic proteins[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011, 236(5): 524-536.
- [4] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [5] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917.
- [6] 孔灵芝, 赵平. 中国肿瘤死亡报告: 全国第三次死因回顾抽样调查[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010, 11-19.
- [7] Zhu CQ, Pintilie M, John T, et al. Understanding prognostic gene expression signatures in lung cancer[J]. *Clin Lung Cancer*, 2009, 10(5): 331-340.
- [8] Backendorf C, Visser AE, de Boer AG, et al. Apoptin: therapeutic potential of an early sensor of carcinogenic transformation[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2008, 48(2): 143-169.
- [9] Bullenkamp J, Cole D, Malik F, et al. Human Gyrovirus Apoptin shows a similar subcellular distribution pattern and apoptosis induction as the chicken anaemia virus derived VP3/Apoptin[J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3(e296): 1-7.
- [10] Noteborn MH. Proteins selectively killing tumor cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 625(1-3): 165-173.
- [11] Grimm S, Noteborn M. Anticancer genes: inducers of tumour-specific cell death signaling[J]. *Trends Mol Med*, 2010, 16(2): 88-96.
- [12] 王春晖, 王建松, 詹 辉, 等. 改良型 TAT-凋亡素体外抗人膀胱肿瘤活性的研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2011, 38(5): 246-254.
- [13] Bernt KM, Ni S, Tieu AT, et al. Assessment of a combined adenovirus-mediated oncolytic and immunostimulatory tumor therapy[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(10): 4343-4352.
- [14] Teodoro JG, Heilman DW, Parker AE, et al. The viral protein Apoptin associates with the anaphase-promoting complex to induce G2/M arrest and apoptosis in the absence of p53[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(16): 1952-1957.
- [15] Wang QM, Fan GC, Chen JZ, et al. A putative NES mediates cytoplasmic localization of apoptin in normal cells[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2004, 36(12): 817-823.

(责任编辑: 冉明会)