

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.13.007

EBV 融合基因 Z2A 腺病毒的制备及其在诱导 EBV 阳性细胞凋亡的应用*

王森¹ 赵毅² 康海仙¹ 丁伟斌¹ 姚运红³ 胡新荣¹ 王云⁴ 罗兵⁴ 朱伟^{1△}

(1 广东医学院肿瘤研究所 广东 东莞 523808; 2 广东医学院微免教研室 广东 东莞 523808;

3 广东医学院病理教研室 广东 东莞 523808; 4 青岛大学医学院微生物教研室 山东 青岛 266021)

摘要 目的:构建 EB 病毒基因 LMP2A 及 BZLF1 的融合基因(Z2A)重组腺病毒表达载体,探讨 Z2A 融合蛋白对 EBV+ 细胞凋亡的作用。**方法:**利用 AdEasy 系统构建重组腺病毒载体 pAd-Z2A,而后将之转染 293 细胞(人胚肾细胞)产生重组腺病毒 rAd-Z2A。后者用于感染 EBV 阳性及阴性细胞,RT-PCR、Western-blotting 检测 Z2A 的 mRNA 和蛋白表达,以及流式细胞术检测其对 EBV 阳性细胞凋亡的调控。**结果:**序列测定和酶切实验均证实,Z2A 融合基因正确插入穿梭质粒,并成功获得重组腺病毒表达载体 pAd-Z2A 及重组腺病毒 rAd-Z2A。感染 rAd-Z2A 的 NEC 靶细胞检测到 Z2A 的表达。流式细胞术检测发现,与 EBV- 细胞组及 EBV+ 空白质粒转染组相比,接种 rAd-Z2A 的 EBV+ 细胞组 48h(P<0.05)凋亡细胞显著增多,72h 时细胞近乎全部凋亡(P<0.01)。**结论:**重组腺病毒 rAd-Z2A 可有效感染 EBV+ 及 EBV- 细胞,从而显著促进 EBV+ 细胞凋亡而不影响 EBV- 细胞,为进一步特异性靶向 EBV+ 肿瘤的基因治疗奠定基础。

关键词:LMP2A; BZLF1; 融合基因; 腺病毒载体; EBV

中图分类号:Q75, Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)13-2426-04

Construction of Recombinant Adenovirus Expressing EBV fusion gene Z2A and its Application on Apoptosis of EBV+ Cells*

WANG Sen¹, ZHAO Yi², KANG Hai-xian¹, DING Wei-bin¹, YAO Yun-hong³, HU Xin-rong¹, WANG Yun⁴, LUO Bing⁴, ZHU Wei^{1△}

(1 Cancer institute of Guangdong Medical College, Dongguan, Shangdong, 523808, China; 2 Immunology Department of Guangdong

Medical College, Dongguan, Shangdong, 523808, China; 3 Pathology Department of Guangdong Medical College, Dongguan,

Shangdong, 523808, China; 4 Immunology Department of Qingdao University Medical College, Qingdao, Shangdong, 266021, China)

ABSTRACT Objective: To construct recombinant adenovirus carrying EBV fusion gene Z2A (LMP2A/BZLF1) and to investigate its function on the apoptosis of EBV+ cells. **Methods:** The recombinant adenovirus vector carrying Z2A was constructed with AdEasy system. The resulting construct was linearized and then transfected to 293 cells to generate recombinant adenovirus rAd-Z2A. EBV+ and EBV- cells were infected with recombinant adenoviruses. The expression and its effect on EBV+ cells of target gene were tested by RT-PCR, Western-blotting, and FACS. **Results:** It was confirmed by sequencing identification and restrictive analysis that the recombinant adenovirus vector was constructed successfully. The recombinant adenovirus rAd-Z2A produced with 293 cells showed stable infectivity. Z2A expression was detected in EBV+ NEC cells infected by recombinant adenovirus rAd-Z2A. And the expression of Z2A promoted markedly the apoptosis of EBV+ cells, at 48h (P<0.05) and 72h (P<0.01) compared with that of EBV- cells and EBV+ cells infected with empty vector. **Conclusion:** The recombinant adenoviruses expressing Z2A can effectively infect EBV+ cells and promote the apoptosis of EBV+ cells without obvious effects on EBV- cells, which can be applied further to gene therapy of EBV infection-related tumors.

Key words: LMP2A; BZLF1; Fusion gene; Adenoviral vector; EBV

Chinese Library Classification: Q75, Q78, R73 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)13-2426-04

前言

作为一种重要的致癌病毒,EBV(Epstein-Barr virus, EBV)

与多种淋巴系统恶性肿瘤如何杰金氏病等的发生发展有密切的关联,同时,该病毒亦被发现参与了上皮性肿瘤的发生。EBV 与鼻咽癌的关系已经得到公认,一些胃癌组织中也发现有 E-

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81302244);广东省自然科学基金博士启动项目(S2012040006311, S2012040006383);

广东医学院科研基金项目(B2011004, B2011012)

作者简介:王森(1983-),男,博士,讲师,主要研究方向:鼻咽癌、宫颈癌、结直肠癌发病机制

△通讯作者:朱伟(1970-),男,博士,硕士生导师,副教授,主要研究方向鼻咽癌、宫颈癌、结直肠癌发病机制, E-mail: zhuw168@126.com

(收稿日期:2013-12-14 接受日期:2014-01-13)

BV 基因组的存在^[1-4]。EBV 阳性癌组织与正常组织的显著差异在于,绝大多数的癌细胞均有 EBV 基因的表达,我们可以利用这一点选择性杀伤肿瘤细胞而同时不伤及正常细胞。此外,鉴于肿瘤细胞中 EBV 以潜伏感染为主,可通过活化潜伏状态的 EBV 进入裂解期进而诱导 EBV+ 肿瘤细胞凋亡以达到治疗目的。应用 EBV 的重要基因 LMP2A 的表达载体转染抗原提呈细胞如树突状细胞等可诱导特异性 CTL 杀伤肿瘤细胞。因此,本研究拟将 LMP2A 和 BZLF1 进行融合构建,协同发挥 LMP2A 诱导特异性 CTL 和 BZLF1 诱导潜伏期 EBV 进入裂解期复制的作用,从而更有效杀伤 EBV 阳性肿瘤细胞,我们初步研究了融合基因表达对 EBV+ 细胞的促凋亡作用。本研究为 EBV 相关疾病的治疗提供前期基础和依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料

DNA marker, *EcoRV*、*BglII* 及 T4 DNA 连接酶购自大连 Takara 公司。ZEBRA 抗体购自法国 Argene 公司。脂质体 2000 购买于 Invitrogen 公司。腺病毒穿梭质粒 pAd-Track-CMV,腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1,大肠杆菌 BJ5183 和 DH10B 为青岛大学医学院微生物教研室保存。

1.2 细胞

EBV 阴性胃癌细胞 SGC 及 EBV 阳性鼻咽癌细胞 NEC 为青岛大学医学院微生物教研室保存;人胚肾 293 细胞由中国疾病预防控制中心邵一鸣教授惠赠。细胞于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。

1.3 重组腺病毒的制备

RT-PCR:根据 LMP2A 和 BZLF1 开放读码框序列^[5,6]设计 LMP2A 和 BZLF1 的引物。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。LMP2A 上游引物 P1:5'-GGCAGATCTATGGGTCCTAGAAATGGTG-3',下游引物 P2:5'-GCTGCCCCACCGCCGCTTCCGCCACCGCCGCTTCCACCGCCACCTACAGTGTGCGATATGGGGT-3';BZLF1 上游引物 P3:5'-GGTGGCGGTGGAAGCGGCGGTGGCGGAAGCGGCGGTG GCGGCAGCATGATG GACCCAAACTCGAC-3',下游引物 P4:5'-GCGATATCTTAGAAATTTAAGAGATCCTCGTG -3'。序列下划线部分为 linker,斜体部分表示酶切位点。Trizol 法提取 RNA 后采用 Thermo scientific 生产的 RevertAid First Strand Cdna Synthesis Kit-K1622 试剂盒合成,按照操作步骤进行。25 μL PCR 反应体系中含上下游引物 0.3mmol/L, Taq 1U, cDNA 2 μL。反应条件:94℃ 5min;94℃ 60sec,55℃ 60sec,72℃ 90sec,35 循环;72℃ 10min。产物于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 30min 后检测结果。

1.4 基因克隆及腺病毒载体构建和滴度测定

将 PCR 的扩增产物 (LMP2A 和 BZLF1) 分别插入 pMD18-T 后转化 JM109 感受态细菌构建 TA-LMP2A 和 TA-BZLF1 克隆并测序及比对。以 TA-LMP2A 和 TA-BZLF1 质粒为模板进行扩增,获得带有 linker 互补序列的 LMP2A 和 BZLF1。而后以重叠延伸原理进行基因重组^[7]得到 Z2A 并将之插入 TA 载体。分别以 *EcoRV* 和 *BglII* 酶切 Z2A 和穿梭载体 pAdTrack-CMV,并按 3:1 的比例 16℃ 连接获取 pAd-

Track-CMV-Z2A。将 pAdTrack-CMV-Z2A 质粒与 pAdEasy-1 进行同源重组并筛选单克隆重组腺病毒载体 pAd-Z2A,脂质体法转染 293 细胞包装重组腺病毒 rAd-Z2A。对照载体命名为 rAd-GFP。最后采用本原正阳公司快速腺病毒感染性滴度检测试剂盒测定病毒滴度:96 孔板中培养的 293 细胞生长至 80%~90% 汇合时,每行各孔接种等量病毒上清,共 10 孔,最后 2 孔设阴性对照。病毒上清从 10⁻⁴ 稀释度开始,依次进行连续 10 倍的倍比稀释共 8 列。68h 孵育后根据每行即每一病毒稀释度 293 细胞出现病变的数量(孔数)测算病毒滴度。

1.5 Western-Blotting

病毒感染靶细胞 72h 后收集细胞提取总蛋白。10% SDS-PAGE 电泳,转至 PVDF 膜后 5% 脱脂奶粉 4℃ 过夜,然后与融合基因 Z2A 编码产物 Z 蛋白的 ZEBRA 抗体室温孵育 3~4h,二抗室温孵育 2h,ECL 系统显色反应。

1.6 流式细胞术

细胞汇合度至 85% 左右感染重组腺病毒,分别于第 1d,3d,5d 收集细胞。加碘化丙啶染液,流式细胞仪检测,Win-MDI2.9 软件分析细胞凋亡。

2 结果

2.1 pAdTrack-CMV-Z2A 及 pAd-Z2A 质粒的构建及鉴定

pAdTrack-CMV-Z2A 载体经 *BglII* 和 *EcoRV* 酶切后电泳,分别获得长约 2291bp 和 9200bp 的 2 条目的片段,符合预期。这一结果表明,融合基因已经被正确插入穿梭质粒中。将 pAd-Z2A 进行酶切后电泳,我们观察到约 31kb、4.5kb 的两条 DNA 泳带,根据这一结果分析,pAdTrack-CMV-Z2A 质粒和 pAdEasy-1 质粒在质粒的右臂与左臂区发生重组(图 1,图 2)。

2.2 重组腺病毒包装

将经过 *Pac I* 酶切线性化后的 pAd-Z2A 质粒转染 293 细胞。转染 48h 后,荧光显微镜下可见细胞内出现绿色荧光,这一现象提示质粒转染成功,目的基因表达(图 3)。转染后 5d,绿色荧光的表达达高峰。第 8d 左右转染率达到约 90% 时收获细胞。将获取的细胞反复冻融 3 次后离心取上清感染 293 细胞,24h 后细胞内表达绿色荧光蛋白,表明获得的重组腺病毒具有良好的感染性。病毒滴度经检测可达 1×10⁹ IU/ml。

2.3 RT-PCR 检测融合基因 Z2A 的转录表达

RT-PCR 结果显示,融合基因可在靶细胞内表达,将获取的 PCR 产物进行琼脂糖电泳,得到约 2290bp 左右的片段,与预期一致(图 4)。

2.4 Western-blotting 检测 Z2A 的蛋白表达

Western-blotting 检测发现,rAd-GFP 感染组无特异条带,而 rAd-Z2A 感染组出现特异性目的条带,表明 Z2A 融合基因在靶细胞内成功表达(图 5)。

2.5 目的基因对 EBV- 及 EBV+ 细胞凋亡的作用检测及分析

rAd-Z2A 分别感染 EBV- SGC 细胞和 EBV+ NEC 细胞,rAd-GFP 感染 EBV+ NEC 细胞作对照,采用流式细胞技术检测。结果表明,病毒感染后 24h 各组细胞凋亡数量少,未见明显差别。EBV- SGC 细胞接种 rAd-Z2A 后,24h,72h,96h 的凋亡细胞均少于 5%,说明 rAd-Z2A 对 EBV- 细胞无作用。将同样滴度

rAd-GFP 感染 EBV+ NEC 细胞, 48h 及 72h 凋亡细胞比例均低于 20%, 无明显差别, 说明空载质粒对实验组无干扰, 可以作为对照使用。最后, 接种 rAd-Z2A 48h 的 EBV+ NEC 细胞凋亡比例明显增多 ($P < 0.05$), 72h 时几近全部凋亡 ($P < 0.01$), 这一结果提示, rAd-Z2A 对 EBV+ 细胞的凋亡具有特异性识别并诱导凋亡作用。

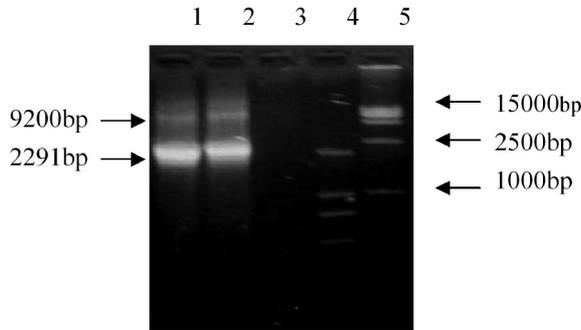


图 1 pAdTrack-CMV-Z2A 酶切鉴定

泳道 1, 2: *Bgl*III and *Eco*RV 双酶切 pAdTrack-CMV-Z2A; 泳道 3: 阴性对照;

泳道 4: PCR marker DL2000; 泳道 5: PCR marker DL15000

Fig. 1 Analysis of pAdTrack-CMV-Z2A by enzyme digestion

Lane 1, 2: pAdTrack-CMV-Z2A digested by *Bgl*III and *Eco*RV; Lane 3: negative control;

Lane 4: PCR marker DL2000; Lane 5: PCR marker DL15000

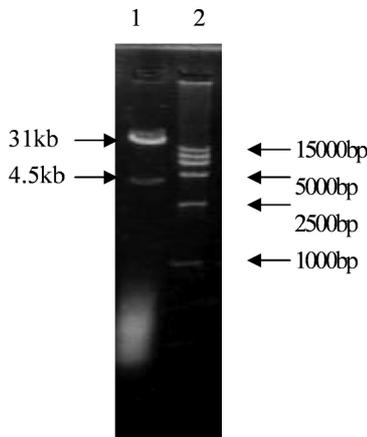


图 2 pAd-Z2A Pac I 酶切分析结果

泳道 1: pAd-Z2A/Pac I; 泳道 2: DNA marker DL15000

Fig. 2 Restrictive analysis of pAd-Z2A with Pac I

Lane 1: pAd-Z2A/Pac I; lane 2: DNA marker DL15000

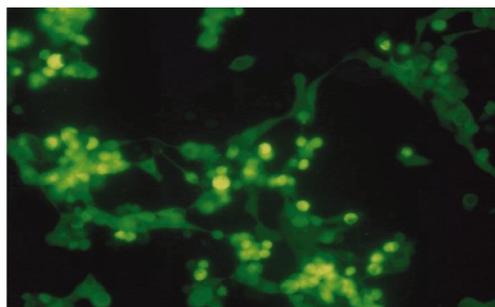


图 3 重组腺病毒载体转染的 293 细胞 (400×, 48h)

Fig. 3 Recombinant adenovirus vector transfected 293 cells (400×, 48h)

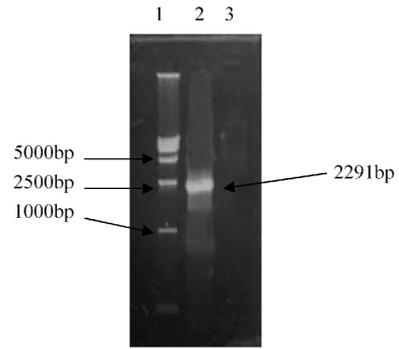


图 4 rAd-Z2A 感染细胞后 RT-PCR 产物

泳道 1: DNA marker DL15000; 泳道 2: RT-PCR products; 泳道 3: total RNA digested by DNase I

Fig. 4 RT-PCR of rAd-Z2A infected cell

lane 1: DNA marker DL15000; lane 2: RT-PCR products; lane 3: total RNA digested by DNase I

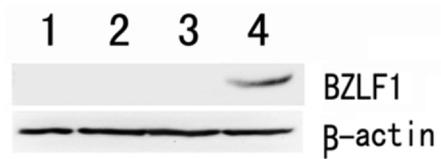


图 5 Western-Blotting 检测重组腺病毒目的基因的表达

泳道 1: 未感染的 NEC cells; 泳道 2: rAd-GFP 感染 NEC cells; 泳道 3: rAd-Z2A 感染 SGC cells; 泳道 4: rAd-Z2A 感染 NEC cells

Fig. 5 The Western-Blotting analysis of expression of the recombinant adenoviruses gene

Lane 1: uninfected NEC cells; Lane 2: rAd-GFP infected NEC cells;

Lane 3: rAd-Z2A infected SGC cells; Lane 4: rAd-Z2A infected NEC cells

3 讨论

肿瘤治疗的一大难题是如何区分肿瘤细胞与正常细胞从而使得药物或其他手段能够特异性地杀伤肿瘤。在 EBV 相关肿瘤中, 癌组织与正常组织的显著差异在于癌细胞均呈现 EBV 阳性而正常细胞则无, 这为 EBV 相关肿瘤的治疗提供了很好的切入点。因此, 以 EBV 为靶点的抗肿瘤治疗策略值得深入研究和大力推广。在肿瘤细胞中 EBV 以潜伏感染为主, 因此, 我们可通过活化潜伏状态的 EBV 进入裂解期进而诱导 EBV 阳性肿瘤细胞凋亡。本研究将 LMP2A 和 BZLF1 进行融合构建, 协同发挥 LMP2A 诱导特异性 CTL 和 BZLF1 诱导潜伏期 EBV 进入裂解期复制的作用, 期待在后续的体内实验中其能介导更有效的 EBV 阳性肿瘤细胞杀伤效应, 本研究同时亦初步探索了融合基因对 EBV+ 细胞的体外促凋亡作用。

BZLF1 和 LMP2A 基因均是 EBV 的标志性基因之一, 以二者作为靶标是合理的选择。BZLF1 基因编码产物是 Z 蛋白, 该蛋白的表达标志病毒增殖进入即刻早期。此后, 众多的病毒基因被活化, 病毒开始合成与 DNA 复制相关的酶和 DNA 结合蛋白^[8-11]。病毒 DNA 开始复制, 经过一系列的合成成俗, 最终组装为成熟的病毒颗粒经细胞膜释放, 导致细胞的溶解死亡。在此过程中, BZLF1 基因的表达起到了细胞死亡的启动作用。本研究即将外源性 BZLF1 基因导入 EBV 阳性肿瘤细胞

中,最后导致肿瘤细胞溶解死亡,起到治疗肿瘤的作用。此外,近年来人们发现针对 EBV 阳性肿瘤细胞亦可以通过诱导特异性 CTL 的产生达到靶向该类细胞的目的^[12,13]。在靶抗原的选择上,研究发现 LMP2 含有特殊的抗原表位,该表位能被具有 MHC 限制性的病毒特异性 CTL 识别,进而介导细胞毒性 T 细胞发挥功能^[14,15],因此,将 LMP2 作为治疗 EBV 阳性肿瘤的靶抗原成为很好的选择^[16-19]。综合上述理由,我们将 LMP2A 和 BZLF1 进行融合构建,协同发挥 LMP2A 诱导特异性 CTL 和 BZLF1 诱导潜伏期 EBV 进入裂解期复制的作用,这一结果将来极有可能帮助我们实现更有效杀伤 EBV 阳性肿瘤细胞的目的。

此外,我们采用 AdEasy 系统成功构建了携带融合基因 Z2A 的重组腺病毒^[20,21],进而感染 EBV 阳性肿瘤细胞,将之与阴性对照和 EBV 阴性细胞做对比,探讨了重组腺病毒激活潜伏 EBV 进入裂解期增殖的作用。流式细胞术分析结果发现,与相同滴度的阴性对照相比较重组腺病毒能明显促进 EBV 阳性细胞的凋亡,这提示了重组腺病毒确实具有杀伤肿瘤细胞的作用。我们发现,接种病毒 48 小时内,实验组与载体对照组和细胞对照组比较,病毒对细胞的裂解能力无显著性差异,这可能是归因于诱导潜伏状态 EBV 活化进而批量增殖需要一定的时间。在接种病毒 3 天后,实验组开始表现出杀伤细胞的作用,而同时,病毒对 EBV 阴性 SGC 细胞的杀伤作用仍然不明显,提示病毒对 EBV 阳性肿瘤细胞具有特异的杀伤作用。总之,本研究结果表明,选择 BZLF1 和 LMP2A 基因作为靶基因,通过腺病毒包装感染细胞的方式能够特异并且显著地促进 EBV 阳性细胞的凋亡,这种杀伤作用对 EBV 阴性细胞影响不大。本方法对 EBV 阳性肿瘤的治疗提供了很好的思路,同时也能够治疗同时不伤及正常细胞,从而大大减少治疗的副作用。

参考文献(References)

- [1] Maeda E, Akahane M, Kiryu S, et al. Spectrum of Epstein Barr virus-related diseases:a pictorial review [J]. Jpn J Radiol,2009,27(1): 4-19
- [2] Iizasa H, Nanbo A, Nishikawa J, et al. Epstein-Barr Virus (EBV) -associated gastric carcinoma[J]. Viruses, 2012,4(12):3420-3439
- [3] Song HJ, Srivastava A, Lee J, et al. Host inflammatory response predicts survival of patients with Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma[J]. Gastroenterology, 2010, 139(1):84-92
- [4] Cullen BR. Viruses and microRNAs [J]. Nature Genetics,2006, 38: S25-S30
- [5] Baer R, Bankier A, Biggen M, et al. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus[J]. Nature, 1984,310:207-211
- [6] Sample J, Liebowitz D, Kieff E. Two related Epstein Bar virus membrane proteins are encoded by separate genes [J]. J Virol, 1989,63:933-937
- [7] Weiss L, Movahed L, Warnke R, et al. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease [J]. N Engl J Med,1989,320:502-506
- [8] Coral K, Wille, Dhananjay M, Nawandar, Amanda R, Panfil, et al. Viral Genome Methylation Differentially Affects the Ability of BZLF1 versus BRLF1 To Activate Epstein-Barr Virus Lytic Gene Expression and Viral Replication[J]. J Virol, 2013,87(2):935-950
- [9] Hammerschmidt W, Sugden B. Replication of Epstein-Barr Viral DNA [J]. Cold Spring Harb. Perspect. Biol, 2013,5(1):a013029
- [10] Yu X, McCarthy PJ, Wang Z, et al. Shutoff of BZLF1 Gene Expression Is Necessary for Immortalization of Primary B Cells by Epstein-Barr Virus[J]. J Virol,2012,86(15): 8086-8096
- [11] Jochum S, Ruiss R, Moosmann A, et al. RNAs in Epstein-Barr virions control early steps of infecti on [J]. Proc Natl Acad Sci, 2012,109(21):E1396-E1404
- [12] Brewin J,Mancao C,Straathof K, et al.Generation of EBV-specific cytotoxic T cells that are resistant to calcineurin inhibitors for the treatment of posttransplantation lymphoproliferative disease [J]. Blood, 2009,114(23):4792-4803
- [13] Berthomé M, Gallot G, Vivien R, et al. Viral DNA contamination is responsible for Epstein-Barr virus detection in cytotoxic T lymphocytes stimulated in vitro with Epstein-Barr virus B-lymphoblastoid cell line [J]. Cancer Immunol Immunother, 2010, 59(12):1867-1875
- [14] Fogg M, Murphy JR, Lorch J, et al. Therapeutic targeting of regulatory T cells enhances tumor-specific CD8⁺ T cell responses in Epstein-Barr virus associated nasopharyngeal carcinoma[J]. Virology, 2013,doi: 10.1016/j.virol.2013.03.016
- [15] Wasil LR, Tomaszewski MJ, Hoji A, et al. The effect of Epstein-Barr virus Latent Membrane Protein 2 expression on the kinetics of early B cell infection[J]. PLoS One,2013, 8(1):e54010
- [16] L.S. Young, A.B. Rickinson.Epstein-Barr virus: 40 years[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4:757-768
- [17] N. Raab-Traub.Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC [J]. Semin Cancer Biol, 2002,12: 431-441
- [18] M. Rovedo, R. Longnecker.Epstein-Barr virus latent membrane protein 2B (LMP2B) modulates LMP2A activity[J]. J Virol, 2007, 81: 84-94
- [19] M.F. Pang, K.W. Lin, S.C. Peh. The signaling pathways of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A (LMP2A) in latency and cancer[J]. Cell Mol Biol Lett, 2009,14:222-247
- [20] 宫海滨,魏翠,张清林,等.应用 AdEasy 载体系统构建人 B2-AR 基因重组腺病毒[J].现代生物医学进展,2009,9(4): 618-621
Gong Hai-bin, Wei Cui, Zhang Qing-lin, et al. Construction of human B2-AR recombinant adenovirus by AdEase system [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 9(4): 618-621
- [21] 徐爱晶,李堂.应用 AdEasy 腺病毒载体系统构建鼠白细胞介素 10 基因重组腺病毒 [J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(7): 1277-1280
Xu Ai-jing, Li Tang. Construction of Mouse IL-10 recombinant adenovirus by AdEase system [J]. Chinese Tissue Engineering and Clinical Recovery, 2008,12(7):1277-1280