

[文章编号] 1007-3949(2009)17-04-0273-04

• 实验研究 •

# 热休克蛋白 72重组腺病毒包装及其对细胞凋亡的影响

鲁敏翔<sup>1</sup>, 祝成亮<sup>2</sup>, 宋 惠<sup>3</sup>, 李 毅<sup>3</sup>, 刘 芳<sup>2</sup>, 刘兴晖<sup>3</sup>

(1 武汉大学中南医院检验科, 湖北省武汉市 430071; 2 武汉大学生命科学院, 病毒学国家重点实验室, 湖北省武汉市 430071; 3 鄖阳医学院附属东风医院检验科, 湖北省鄖阳市 442008)

[关键词] 热休克蛋白 72 腺病毒包装; 凋亡; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 包装热休克蛋白 72重组腺病毒表达载体, 探讨其对 ECV 304 细胞凋亡的影响。方法 采用细菌同源重组法构建了热休克蛋白 72重组腺病毒表达载体; 流式细胞仪检测重组腺病毒对细胞凋亡的影响; 荧光报告系统和蛋白印迹分析重组腺病毒对 p53 转录的调节和蛋白表达的影响。结果 成功包装了热休克蛋白 72重组腺病毒, 热休克蛋白 72能够促进细胞凋亡, 从转录水平上调 p53 蛋白的表达。结论 热休克蛋白 72可能通过上调 p53 蛋白的表达促进细胞凋亡。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Packaging of Heat Shock Protein 72 Recombinant Adenoviruses and its Effect on Cell Apoptosis

LU Ming-Xiang ZHU Cheng-Liang SONG Hui LI Yi LU Fang and LU Xing-Hui

(Department of Clinical Laboratory, Dongfeng Affiliated Hospital of Yungang Medical College, Shiyan 442008, China)

[KEY WORDS] Heat Shock Protein 72 Recombinant Adenoviruses Apoptosis Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To package heat shock protein 72 recombinant adenoviruses and to explore its effect on ECV 304 cell apoptosis. **Methods** Heat shock protein 72 recombinant adenoviruses was generated by employing homologous recombination in bacteria. flow cytometric analysis was used to invest the effect of heat shock protein 72 recombinant adenoviruses on cell apoptosis. luciferase reporter system and western blotting were used to analyse its effects on p53 Transcription and expression. **Results** Heat shock protein 72 recombinant adenoviruses were successfully packaged, and heat shock protein 72 could enhance cell apoptosis. **Conclusions** Heat shock protein 72 may contribute to cell apoptosis by upregulating P53 expression.

大量流行病学与临床数据表明, 冠心病是多数发达国家和许多发展中国家成人发病和死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>。虽然近年来冠心病的诊断和治疗有了很大的发展, 但其病因学与发展机制的研究进展缓慢。热休克蛋白 72 (heat shock protein 72, HSP72) 是一种分子伴侣, 帮助蛋白质维持空间结构而发挥重要作用。研究表明, HSP72 与冠心病存在着相关性, HSP72 在冠心病的发生和发展中起着重要作用<sup>[2]</sup>。到目前为止, 关于 HSP72 在冠心病发生发展过程中所起的作用尚不清楚, 本研究采用细菌内同源重组法来制备 HSP72 重组腺病毒载体, 检测其对细胞凋亡的调节, 并初步探讨 HSP72 影响细胞凋亡的机制, 为揭示冠心病的发病机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株及细胞系

大肠杆菌 E. Coli DH 5α 由本室保存, 腺病毒包装系统 AdEasy™ 购自 Invitrogen 公司。该系统包括大肠杆菌株 BJ5183、感受态细胞 AdEasy-1 (转化有腺病毒 5 型基因组骨架质粒 AdEasy-1 的大肠杆菌 BJ5183) 和穿梭载体 pAdTrack-CMV 等, 载体系统中腺病毒载体 pAdEasy 为 E1 区缺失的复制缺陷型 5 型腺病毒载体, 含有 GFP 荧光标记。腺病毒载体包装细胞为 293 细胞, 即腺病毒转化的人胚肾细胞系, 含有 Ad5E1 区。p53 荧光素酶报告质粒 p53-luc 和 pCMV-Tag2B-HSP72 真核表达质粒由本室构建。血管内皮细胞系 ECV 304 购自武汉大学典型培养物保藏中心。

### 1.2 主要试剂

限制性内切酶 XhoI KpnI Pme I Pac I 和 T4DNA 连接酶均购自 BioLund 公司。M-MLV 逆转录酶和 Trizol 购自 Invitrogen 公司, 脂质体转染试剂 Transfectin 购自厦门太阳马生物有限公司, 凝

[收稿日期] 2008-12-01 [修回日期] 2009-03-10

[基金项目] 湖北省教育厅重点科研项目 (B200524021)

[作者简介] 鲁敏翔, 硕士, 主管技师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, 联系电话为 027-67813497, E-mail 为 lx409@163.com。祝成亮, 博士, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 chengliangzhu@163.com。通讯作者刘兴晖, 硕士, 副主任技师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 syluxh@163.com。

胶纯化试剂盒购自 MBI公司, 质粒提取试剂盒购自 Ferments公司。

### 1.3 构建重组质粒 pAdTrack-CMV-HSP72

根据 Genbank 中 HSP72 mRNA 的序列 (genbank 号为 NM\_021979), 采用 Primer 5.0 设计引物, 在其上游引物 5' 端引入 XhoI 酶切位点, 下游引物 5' 端引入 KpnI 酶切位点, 引物序列如下: AdHSP72 上游引物: 5' AAT CTC GAG ATG TCT GCC CGT GGC CCG 3' AdHSP72 下游引物: 5' ATC GGT ACC TTA GTC CAC TTC TTC GAT G 3' 扩增片段大小为 1 938 bp 用实验室保存的 pCMV-Tag2B-HSP72 真核表达质粒为模板, PCR 扩增 HSP72 基因片段。PCR 产物和 pAdTrack-CMV 穿梭载体分别用 XhoI 和 KpnI 双酶切后纯化回收, 16℃ 水浴连接过夜。取上述连接产物通过电转化转入 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂于含卡那霉素 (50 mg/L) 的平板; 碱裂解法提取质粒 pAdTrack-CMV-HSP72 后, 采用酶切鉴定阳性克隆, 最后经测序确证。

### 1.4 构建同源重组质粒 pAdeasy-HSP72

测序鉴定正确的 pAdTrack-CMV-HSP72 用限制性内切酶 PmeI 进行线性化后, 将线性化的穿梭质粒电转化感受态细胞 E. coli BJ5183, 涂于含卡那霉素 (50 mg/L) 的平板鉴定, 碱裂解法小量提取质粒 pAdeasy-HSP72 用 PacI 酶切进行鉴定, 同源重组成功的重组体均应产生一个约 30 kb 的大片段和一个 3.0 kb 或 4.5 kb 的小片段。

### 1.5 重组腺病毒 AdHSP72 的包装

用质粒提取试剂盒提取 5  $\mu$ g 以上高纯同源重组质粒 pAdeasy-HSP72。限制性内切酶 PacI 消化后, 采用乙醇沉淀回收线性化产物; 293T 细胞培养在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中于 37℃, 5% 的 CO<sub>2</sub> 条件下培养, 待细胞生长至对数期, 将上述经 PacI 线性化 pAdeasy-HSP72 用脂质体 SofasfIM 进行转染。7~10 d 后, 观察 GFP 的表达情况, 用细胞刮子收集细胞到离心管中, 1 kr/min 离心 5 min, 弃掉上清, 用 1.0 mL 无菌 PBS 重悬细胞, 放入 -70℃ 反复冻融 3 次后, -70℃ 的冰箱中备用。

### 1.6 流式细胞仪测定重组腺病毒滴度

用带有 GFP 荧光标记重组病毒 AdHSP72 稀释液 0.4 mL 感染 293 细胞 18 h 后, 通过胰蛋白酶消化收集细胞, 经 PBS 洗 3 次, 直接在流式细胞仪上进行检测, 所用荧光激发波长为 488 nm, 发射波长为 525 nm。检测 0.4 mL 细胞悬液, 统计 GFP 细胞阳性数, 按以下公式计算。

$$\text{病毒滴度} = \frac{\text{GFP 细胞阳性数} \times \text{病毒上清稀释}}{0.4 \text{ mL}} \text{ pfu/mL}$$

### 1.7 重组病毒感染效率测定

将 293 细胞按  $2 \times 10^5$  细胞/孔分别接种于 6 孔板中, 分别用 0.1, 1, 10, 100 MOI (multiplicity of infection, MOI) 的腺病毒感染, 48 h 后在荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞百分率。

### 1.8 重组腺病毒 AdHSP72 对细胞凋亡的影响

细胞  $2.0 \times 10^5$  接种于 6 孔细胞培养板中, 待细胞长到 60%~80% 单层时, 加入重组腺病毒 AdHSP72 以空腺病毒 (Ad-control) 为对照。继续培养 48 h 后, 胰蛋白酶充分消化收集细胞, 冰冷 PBS (含 1% BSA) 洗两次, 弃上清, 沉淀细胞样品加入 PBS 50  $\mu$ L, 吹匀, 缓慢加入预冷的 70% 乙醇于 4℃ 固定细胞 30 min, 2 kr/min 离心 10 min, 弃固定液, PBS (含 1% BSA) 洗两次, PBS 重悬细胞, 加入 RNase A 至终浓度为 50 mg/L, 37℃ 孵育 30 min, 加入 PI 至终浓度为 50 mg/L, 室温避光染色 30 min。采用流式细胞仪检测细胞内 DNA 含量, 使用 CellQuest 软件分析数据。

### 1.9 p53 转录活性检测

将 ECV 304 细胞铺到 24 孔板中, 当每孔内细胞密度为 80% 时, 分别转染 p53-luc 和 pCMV-Tag2B-HSP72 或对照质粒。转染后 48 h, 细胞用 PBS 洗 3 次, 然后加入裂解液 (Promega) 100  $\mu$ L/孔, 室温下细胞裂解 30 min。待细胞裂解完全后, 取 10  $\mu$ L 的细胞裂解液和 10  $\mu$ L 的荧光色素酶底物 (Promega) 混匀, 用 Lumimeter (Bio-Rad) 进行光密度测定。

### 1.10 蛋白印迹检测 p53 表达

将 ECV 304 细胞铺到 6 孔板中, 当每孔内细胞密度为 70% 时, 用感染复数 MOI 为 20 的重组病毒 AdHSP72 和 Ad-CMV 感染细胞。感染 48 h 后, 用冰冷的 PBS 清洗细胞两次, 加裂解液充分裂解细胞, 同时用超声波处理细胞。12 kr/min 加入  $1 \times$  上样缓冲液, 煮沸 5 min 后, SDS-PAGE 电泳, SDS-PAGE 电泳后, 分别用 p53 和  $\beta$ -Actin 的抗体进行杂交检测, 37℃ 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 每次 15 min, 加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG (美国 invitrogen 公司), 室温振荡 45 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 15 min, 电化学发光 (ECL) 发光剂显色, 结果扫描保存。

## 2 结果

### 2.1 重组病毒的包装结果

腺病毒重组质粒 pAdTrack-CMV-HSP72 经 PacI 酶切线性化后, 通过转染试剂梭华-SofasfIM 转染 293 细胞, 48 h 后在荧光显微镜下可见约 10% 左右

的细胞有 GFP 表达, 转染后 3~5 d 293 细胞的 GFP 表达呈现出特有的彗星尾状病毒蚀斑。转染 7~10 d 后, 大多数细胞的 GFP 荧光斑点增多, 荧光增强 (图 1)。这些结果表明, 包装病毒的形成和扩增。

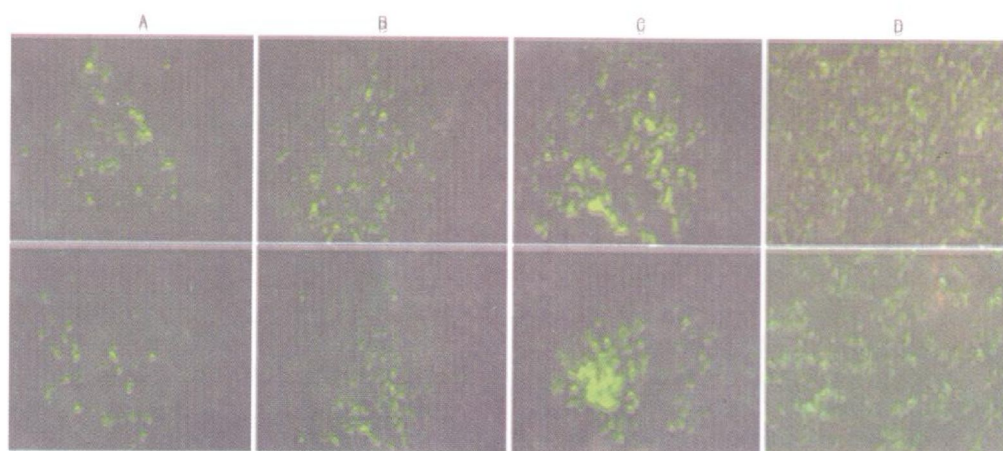


图 1 重组腺病毒的产生 上图为 Ad-control 下图为 AdHSP72。A、B、C、D 分别代表 3 d、5 d、7 d 和 10 d GFP 荧光斑点。

## 2.2 重组病毒的 PCR 鉴定

采用重组病毒上清进行 PCR 扩增, 结果显示, 出现预期大小为 1 938 bp 的目的条带, 表明 HSP72 的基因已克隆入重组腺病毒基因组中 (图 2)。

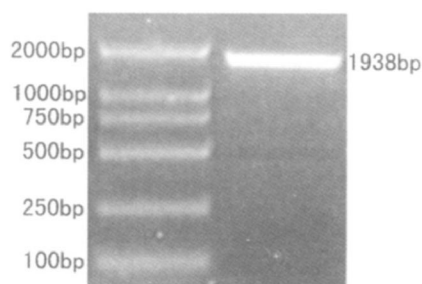


图 2 重组病毒的 PCR 鉴定

## 2.3 重组腺病毒感染效率的测定

根据  $OD_{260\text{ nm}}$  (VP/mL) 吸光度法测定腺病毒滴度, 结果表明, AdHSP72 的滴度为  $1.8 \times 10^{12}$  OPU/mL, 为进一步检测重组腺病毒对 ECV 304 细胞的敏感性, 以重组病毒 AdHSP72 感染 ECV 304 细胞。结果表明, 当 MOI 为 20 时, 约 90% 以上的细胞 GFP 表达阳性 (图 3)。

## 2.4 重组腺病毒 AdHSP72 对细胞凋亡的影响

流式细胞仪结果表明, 在 ECV 304 细胞中, AdHSP72 可以明显促进细胞凋亡, 出现特征性的低于  $G_0/G_1$  相 DNA 峰的亚二倍体 DNA 峰, 凋亡率为 46

为了进一步确定重组病毒包装成功, 将收获转染 10 d 后的 293 细胞及上清液, 反复冻融裂解后, 再重新感染 293 细胞, 结果表明, 在感染后 2 d 细胞即出现了 GFP 表达。

2%, 而转染空载体对照组细胞凋亡率 15.7%, 两组凋亡率差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。表明 HSP72 可能通过促进细胞凋亡来抑制 ECV 细胞生长。

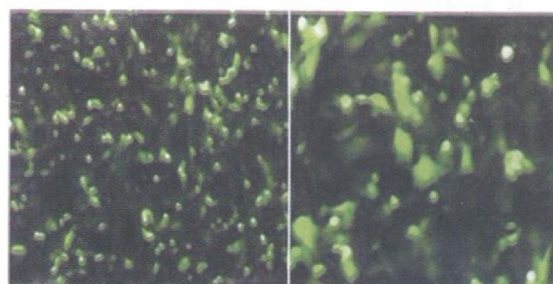


图 3 感染重组腺病毒后, 90% 的 ECV 细胞中出现绿色荧光色素酶的表达 其中左图放大倍数为 100 倍, 右图放大倍数为 200 倍

## 2.5 p53 转录活性检测结果

感染 AdHSP72 可以明显促进 ECV 304 细胞中 p53 的转录活性, 与感染对照腺病毒 Ad-control 组比较, 差异有显著性 ( $1538.5 \pm 226.7$  比  $275.8 \pm 228.6$   $\mu\text{g}/\text{protein}$ ,  $P < 0.001$ )。

## 2.6 重组腺病毒对 p53 表达的影响

AdHSP72 腺病毒感染 ECV 304 后, 采用 western blotting 检测了 p53 的蛋白表达变化。结果表明, 与感染对照腺病毒 Ad-control 相比较而言, 感染 AdHSP72 可以明显促进 ECV 304 细胞中 p53 的蛋白表达 (图 4)。



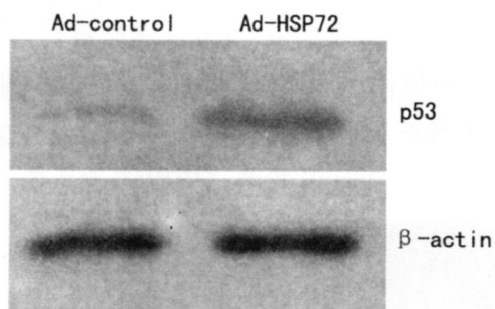


图 4 腺病毒感染 ECV 304 对 p53 蛋白表达的影响

### 3 讨论

冠心病是由于窄性冠状动脉疾病而引起的心肌缺氧(供血不足)所造成的缺血性心脏病,冠心病绝大多数由冠状动脉粥样硬化引起<sup>[3]</sup>。动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发生是一个多因素多层次综合作用的过程。有报道表明内皮损伤时可将所受血流切应力变换成一定细胞内信号,从而引起细胞发生一系列改变,其中 HSP 的改变是内皮损伤后的一个重要指标<sup>[4]</sup>。目前研究表明, HSP72 与冠心病存在着相关性, HSP72 在 As 的发生和发展中起着重要作用,有学者认为 HSP72 可能促进细胞凋亡,从而促进 As 发生<sup>[5]</sup>。但亦有研究认为其可起到细胞保护作用,其机制可能是抑制细胞凋亡<sup>[6-7]</sup>,因此对于 As 时, HSP72 在 As 中到底是抑制凋亡还是促进凋亡还存在争议。

关于重组腺病毒载体的制备,传统的方法是通过细胞内同源重组而产生的。然而,这种方法涉及的步骤多,成功率低、工作量大,实验周期长。本研究中采用细菌内同源重组法来制备 HSP72 重组腺病毒载体。与细胞内同源重组法的根本区别在于,两种质粒共转染和同源重组均在细菌内完成,再用经筛选鉴定的重组克隆质粒 DNA 转染 293 细胞,包装和扩增病毒。这种方法的优点是成功率高且方法简便、快捷、实验周期短。重组腺病毒载体制备的关键环节是同源重组和对重组体进行的筛选、鉴定。细菌内同源重组法的这一过程在细菌内完成。结果表明,本实验成功构建了 HSP72 重组腺病毒,其滴度达到了  $1.8 \times 10^{12}$  OPU/mL,并且构建的腺病毒对

血管内皮细胞系 ECV 304 敏感性很强,其感染效率能达到 90%。

本实验采用流式细胞仪检测了重组腺病毒对 ECV 细胞凋亡的影响,与对照相比, Ad-HSP72 可以明显促进细胞凋亡,凋亡率为 46.2%, HSP72 可能通过促进细胞凋亡来抑制 ECV 细胞生长。由于 P53 是一个重要的抑癌基因,在细胞凋亡中起到重要作用,能够促进细胞凋亡<sup>[8]</sup>。为进一步探讨 HSP72 是否通过调节 p53 的表达来促进细胞凋亡,采用绿色荧光报告系统检测了 Ad-HSP72 腺病毒感染 ECV 304 细胞后 p53 的转录活性的变化,结果显示,与感染对照腺病毒 Ad-control 组相比较而言,感染 Ad-HSP72 可以明显促进 p53 的转录活性,表明 HSP72 可能在转录水平调节 p53 的表达,进一步采用 western blotting 在蛋白水平对 p53 的表达进行了检测,感染 Ad-HSP72 可以明显促进肝癌细胞中 p53 的蛋白表达。以上结果表明 HSP72 可能通过上调 p53 的表达,促进 ECV 304 细胞凋亡,从而促进 As 发生。

本研究采用细菌内同源重组法成功包装了 HSP72 的重组腺病毒,探讨了 HSP72 对细胞凋亡的影响,为进一步揭示冠心病的发病机制奠定了基础。

### 【参考文献】

- [1] Kinlay S, Egidio J. Inflammatory biomarkers in stable atherosclerosis [J]. *Am J Cardiol*. 2006; **98** (11A): 2P-8P.
- [2] Zhu J, Quyyum AA, Wu H, et al. Increased serum levels of heat shock protein 70 are associated with low risk of coronary artery disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; **23** (6): 1055-1059.
- [3] 万文辉, 葛才荣. 冠心病新危险因素研究进展 [J]. *中国误诊学杂志*, 2008; **8** (4): 778-780.
- [4] Pockley AG, Georgiades A, Thulin T, et al. Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension [J]. *Hypertension*. 2003; **42** (3): 235-238.
- [5] Marsh SA, Pat BK, Gobe GC, et al. Evidence for a non-antioxidant dose-dependent role of alpha-lipoic acid in caspase-3 and ERK2 activation in endothelial cells [J]. *Apoptosis*. 2005; **10** (3): 657-665.
- [6] Jones EL, Zhao M, Stevenson MA, et al. The 70 kilodalton heat shock protein is an inhibitor of apoptosis in prostate cancer [J]. *Int J Hyperthermia*. 2004; **20** (8): 835-849.
- [7] 王贞, 李海波. 细胞凋亡与动脉粥样硬化关系的最新研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008; **10** (4): 352-354.
- [8] Wang X, Zou Y, Sun A, et al. Emodin induces growth arrest and death of human vascular smooth muscle cells through reactive oxygen species and p53 [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007; **49** (5): 253-260.

(此文编辑 李玲玲)