

BAD 慢病毒载体的构建及其对 A549 细胞增殖的影响

黄娜^{1,2}, 何彦琪², 朱静³, 李为民^{2△}

1. 成都医学院第一附属医院 呼吸内科(成都 610500); 2. 四川大学华西医院 呼吸内科(成都 610041);
3. 绵阳中心医院 呼吸内科(绵阳 621000)

【摘要】 目的 探讨促凋亡基因 BAD(Bcl-2-associated death protein)重组慢病毒表达载体构建及其对肺癌 A549 细胞株增殖的影响。方法 应用 PCR 法从含有目的基因的质粒 pAV-MCMV-BAD-GFP 中扩增 BAD 基因片段,克隆至慢病毒载体(pLVX-IRES-ZsGreen 1),应用 PCR、酶切和测序鉴定正确后,经病毒包装,感染 A549 细胞,经流式细胞仪筛选稳定表达细胞株,Western blot 鉴定重组慢病毒感染的 A549 细胞 BAD 的表达。采用 CCK-8 试剂盒定点检测细胞的光密度(OD)值,分析 BAD 蛋白过表达对 A549 细胞增殖能力的影响。结果 酶切鉴定和基因测序证实长度为 507 bp 的 BAD 基因成功克隆至慢病毒表达载体 pLVX-IRES-ZsGreen1;重组慢病毒通过感染 A549 细胞株和流式细胞仪筛选出单克隆细胞株 BAD-A549,Western blot 检测结果显示,细胞培养 BAD-A549 细胞可稳定过表达 BAD 蛋白。体外增殖结果显示,细胞培养 120~144 h,BAD 组的 OD 值均较对照组低($P<0.05$)。结论 成功构建了 BAD 重组慢病毒载体,获得稳定表达 BAD 的 A549 细胞株。BAD 过表达能有效抑制 A549 细胞的增殖速度。

【关键词】 BAD A549 慢病毒 稳定细胞株

Construction of BAD Lentivirus Vector and Its Effect on Proliferation in A549 Cell Lines HUANG Na^{1,2}, HE Yanqi², ZHU Jing³, LI Wei-min^{2△}. 1. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; 2. Department of Respiratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Department of Respiratory Medicine, Mianyang Central Hospital, Mianyang 621000, China

△ Corresponding author, E-mail: weimi003@yahoo.com

【Abstract】 **Objective** To construct the recombinant lentivirus expressing vector BAD (Bcl-2-associated death protein) gene and to study its effect on A549 cell proliferation. **Methods** The BAD gene was amplified from plasmid pAV-MCMV-BAD-GFP by PCR. The purified BAD gene fragment was inserted into a lentivirus vector (pLVX-IRES-ZsGreen 1), and the insertion was identified by PCR, restriction endonuclease analysis and DNA sequencing. A549 cells were then transfected with the packaged recombinant lentivirus, and resistant cell clones were selected with flow cytometry. The expression of BAD in A549 cell lines stably transduction with a lentivirus was examined using Western blot. The effect of BAD overexpression on proliferation of A549 cells was evaluated by using CCK-8 kit. **Results** Restriction enzyme digestion and DNA sequencing showed that the full-length BAD gene (507 bp) had been successfully subcloned into the lentiviral vector to result in the recombinant vector pLVX-IRES-ZsGreen 1. Monoclonal cell lines BAD-A549 was produced after transfection with the recombinant lentivirus and selected with flow cytometry. Stable expression of BAD protein was verified by Western blot. *In vitro*, the OD value in BAD group was significantly lower than that of control groups from 120-144 h ($P<0.05$). **Conclusion** A549 cell lines stably transduced with a lentivirus expressing the BAD gene had been successfully generated. *In vitro*, BAD overexpression significantly inhibited A549 cells proliferation.

【Key words】 BAD A549 Lentivirus Stable cell line

肺癌是发病率和死亡率极高的恶性肿瘤之一,其中肺腺癌的发病率呈逐年上升趋势,早期可侵犯淋巴管、血管,发生转移,预后极差。因此,愈来愈多的研究专注于肺腺癌细胞的生物学特性^[1]。促凋亡

基因 BAD(Bcl-2-associated death protein)是 Bcl-2 家族中的一员^[2]。Bcl-2 家族超过 20 多个成员,是凋亡调节的重要因素,通过调节线粒体的功能控制细胞的生死。其中抗凋亡成员有可能是癌基因,而促凋亡的成员(包括 BAD)可能是肿瘤抑制基因^[3]。本实验拟通过构建 BAD 的慢病毒载体,初步探讨

BAD 过表达对 A549 细胞增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

过表达慢病毒载体 pLVX-IRES-ZsGreen1 系统由上海中科院惠赠; pAV-MCMV-BAD-GFP 质粒、人肺腺癌细胞系 A549 和 293T 细胞由四川大学华西医院干细胞生物实验室惠赠; pGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司; TaqDNA 聚合酶及快速连接试剂盒购自 TaKaRa 公司; 限制性内切酶、T4 连接酶购自 New England Biolabs 公司; 抽提质粒、DNA 片段纯化回收试剂盒购自 QIAGEN 公司; 细胞转染试剂盒 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; Polybrene 购自 Sigma 公司; 胎牛血清、H-DMEM 培养基、胰蛋白酶购自 Thermo Scientific 公司; 兔抗人 BAD 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; β -actin 购自美国 Millipore 公司; 蛋白抽提试剂盒购自中国南京凯基生物科技公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计合成 从 pAV-MCMV-BAD-GFP 质粒扩增 BAD 基因, 用 Primer 5 软件设计引物: BAD 上游, 5'-CGGAATTCATGTTCCAGATCCCAGAGTTTGA-3', BAD 下游, 5'-CGGGATCCTCACTGGGAGGGGCG-3', 引物由英骏公司合成。

1.2.2 重组质粒的构建和鉴定 用 T4 连接酶将 PCR 产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 经转化、扩增、克隆, 产生大量重组质粒。快速抽提质粒 DNA 后, 用 *EcoR* I 内切酶酶切连接产物进行鉴定, 将酶切鉴定正确的质粒送上海英骏公司进行测序验证。

1.2.3 慢病毒载体重组及包装 慢病毒载体骨架质粒 pLVX-IRES-ZsGreen1 载体和测序正确的质粒 BAD 分别经 *EcoR* I 和 *Bam*HI 双酶切消化, 回收并纯化。获得目的 DNA 和慢病毒载体骨架质粒进行连接, 然后转化、克隆, 酶切鉴定。重组的慢病毒骨架质粒经 *EcoR* I 和 *Bam*HI 双酶切后电泳, 选择酶切鉴定正确的连接产物摇菌过夜后, 进行无内毒素高浓度质粒抽提, 同时包装质粒也进行无内毒素高浓度质粒抽提。将重组的慢病毒骨架质粒、包装质粒混合物及 Lipofectamine 2000 共同转染 293T 细胞, 于 5% CO₂、37 °C 孵箱中培养过夜后, 经 0.45 μ m 滤器过滤, 高速离心, 提纯病毒后置 -80 °C 保存备用。

1.2.4 过表达 BAD 的 A549 细胞株的建立和筛选 用含 10% 胎牛血清的 H-DMEM 培养 A549 细胞,

显微镜下观察细胞融合达 60% 左右时吸走培养液, 加入新的培养基、重组慢病毒颗粒及 Polybrene, 待孵箱调至 5% CO₂、37 °C 后, 将细胞放入孵箱培养过夜。24 h 后, 更换培养基, 待细胞融合度至 80% 左右时, 进行传代培养。同时以空载体(不含目的基因)包装的病毒感染的 A549 细胞和未感染慢病毒的 A549 为对照, 以上 3 组细胞分别命名为 PLV-BAD 组、空载组(empty vector, EV)组和 A549 组。感染 5 d 后检测感染效率。制备细胞悬液, 最后通过流式细胞术分选表达绿色荧光蛋白的细胞。分选后用含 10% 胎牛血清的 H-DMEM 继续培养, 置于荧光倒置显微镜下观察。

1.2.5 Western blot 鉴定 BAD 表达 选取培养状态良好的 3 组 A549 细胞, 根据蛋白抽提试剂盒说明书提取细胞总蛋白, 聚丙烯酰胺凝胶电泳后将目的蛋白转至 PVDF 膜, 采用底物化学发光法显影、曝光、定影后分析, 以 β -actin 为内参, Western blot 验证 BAD 蛋白的表达。

1.2.6 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖能力 将 3 组细胞分别接种于 96 孔板, 每组设 3 个复孔, 每天固定时间加入 CCK-8, 1.5 h 后酶标仪下 450 nm 处检测光密度值(OD₄₅₀), 以细胞培养时间为横轴、OD₄₅₀ 值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.2.7 统计学方法 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较用单因素方差分析和 SNK 法两两比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BAD 基因的鉴定

见图 1, 图 2。从 pAV-MCMV-BAD-GFP 质粒扩增 BAD 基因, 在 BAD 基因理论预期值处可见一清晰特异性扩增条带(507 bp)。酶切连接后, 可见电泳产物大小与理论预测的产物大小(507 bp)一致。测序结果显示该扩增产物与 BAD 基因序列完全一致。

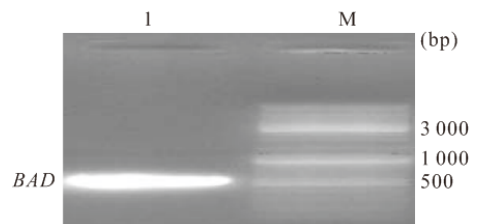


图 1 扩增的 BAD 产物

Fig 1 PCR amplification of BAD

M: Marker; 1: PCR amplification of BAD

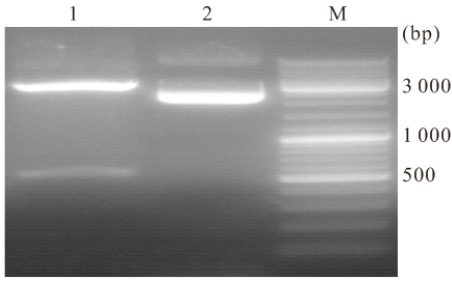


图 2 BAD 基因与 T 载体连接产物酶切结果

Fig 2 Restriction enzyme digestion result of BAD gene and T vector ligation product

M; Marker; 1: The restriction enzyme digestion result of BAD gene and T vector ligation product; 2: T vector

2.2 重组慢病毒的构建

见图 3。慢病毒载体骨架质粒载体和测序正确的质粒经双酶切后电泳,出现的片段为 507 bp 和 8 204 bp,与理论预测产物大小一致。

2.3 稳定过表达 BAD 基因的细胞克隆的筛选

细胞培养 5 d 后,荧光倒置显微镜观察细胞感染效率为 80% 左右。流式分析仪分选出的稳定过

表达 BAD 基因的细胞克隆见图 4。镜下可见 PLV-BAD 组和 EV 组细胞均被绿色荧光标记(图 5)。

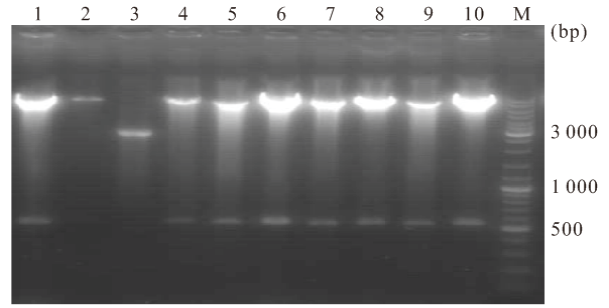


图 3 BAD 与 pLVX-IRES-ZsGreen 1 载体连接产物的酶切结果

Fig 3 Restriction enzyme digestion result of BAD gene and pLVX-IRES-ZsGreen 1 vector ligation product

M; Marker; 1, 4-10: The correct strip verified by restriction enzyme digestion; 2, 3: The incorrect strip verified by restriction enzyme digestion

2.4 重组慢病毒感染的 A549 细胞 BAD 蛋白表达的检测

由图 6 可见, PLV-BAD 组细胞 BAD 蛋白条带

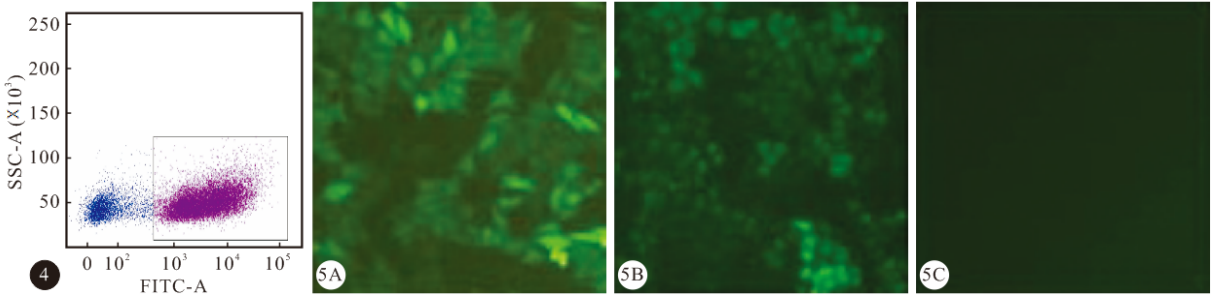


图 4 流式细胞分选表达 GFP 强阳性的细胞为慢病毒感染的细胞

Fig 4 The lentivirus-infected cells were GFP positive cells sorted by flow cytometry

图 5 荧光倒置显微镜下的各组细胞

Fig 5 Three groups of cells under the inverted fluorescence microscope

5A, 5B, 5C: PLV-BAD, EV and A549 group

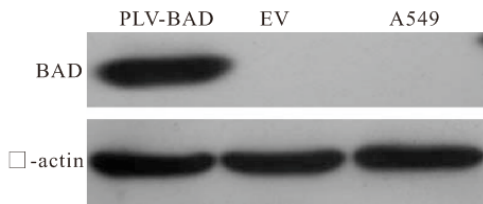


图 6 Western blot 检测细胞 BAD 蛋白表达

较其它 2 组明显,说明重组慢病毒感染的 PLV-BAD 组细胞存在 BAD 蛋白过表达。

2.5 BAD 过表达对 A549 细胞增殖能力的影响

见图 7。A549 细胞培养 96 h 时, PLV-BAD 组细胞增殖速度有所下降,但差异没有统计学意义;而在 120~144 h 时间段,稳定过表达 BAD 的细胞组

较 EV 组、A549 组生长明显抑制 (P 均 < 0.05),说明 BAD 基因过表达可以抑制细胞增殖速度。EV 组与 A549 组细胞增殖能力差异无统计学意义 ($P >$

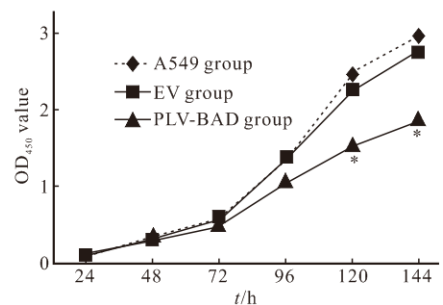


图 7 各组细胞生长曲线

Fig 7 Growth curves of cells

* $P < 0.05$, vs. other groups

0.05),说明慢病毒表达载体本身对细胞增殖无明显影响。

3 讨论

肿瘤的治疗一直是以手术、放疗、化疗为主,肿瘤基因治疗是继这些传统治疗方式之后出现的一种全新的治疗方式。慢病毒是逆转录病毒家族的一员,它可以将目的基因安全有效的植入宿主细胞的 DNA, 转染或感染几乎所有的哺乳动物细胞,包括非分裂细胞、分裂细胞、原代细胞和干细胞,并在细胞中持续表达^[4]。因此它成为了基因递送最有效的载体之一。慢病毒载体基因组是正链 RNA,其基因组进入细胞后,在胞浆中被其自身携带的反转录酶反转为 DNA,形成 DNA 整合前复合体,进入细胞核后,DNA 整合到细胞基因组中。整合后的 DNA 转录 mRNA,回到细胞浆中,表达目的蛋白。慢病毒实验系统被广泛应用于各类疾病的基因治疗的实验研究中^[5,6],也为肿瘤的基因治疗提供了更广阔的前景。

BAD 作为凋亡前体蛋白,通过与 Bcl-xl 和 Bcl-2 形成异二聚体,促使线粒体细胞色素 C 的释放和激活下游的胱天蛋白酶导致细胞凋亡的发生^[2]。BAD 既可以通过抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xl 的抗凋亡作用,也可以直接激活前凋亡蛋白 BAK 和 BAX^[7]促凋亡作用,从而调节细胞的生死。而另一方面,Howells 等^[8]研究却指出 BAD 不能直接导致凋亡,而是通过降低凋亡发生的阈值促进凋亡的发生。有研究表明一种 NFD(Naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione)化合物,可以通过抑制磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)通路的激活,导致磷酸化 BAD 的下调和 BAD 的上调,从而促使 NFD 抑制 A549 细胞的生长^[9]。Li 等^[10]也发现一种潜在的肺癌诱导物 NNK(4-[N-methyl-N-nitrosoamino]-1-[3-pyridyl]-1-butanone),促进肺癌发生可能与 BAD 的下调有关。还有研究采用病理确诊的乳腺癌手术标本,通过体外分离培养的方式进行实验,结果表明 BAD(-)的乳腺癌细胞对表柔比星、盖诺的敏感性低于 BAD(+)的乳腺癌细胞^[11]。大量研究表明 BAD 促凋亡功能异常与肿瘤的发生、发展及治疗息息相关。

我们在前期实验中已经验证了 BAD 在 293T 细胞中的表达^[4],本研究重组 BAD 过表达的慢病毒载体构建成功。将该慢病毒包装质粒感染 A549 细胞后用流式细胞仪成功分选出稳定表达 BAD 的 A549 细胞,并经 Western blot 验证,PLV-BAD 组

BAD 蛋白水平表达明显高于 EV 组及 A549 组。我们通过体外实验证实 BAD 蛋白过表达抑制 A549 细胞的增殖。Fernando 等^[12]发现 BAD 过表达可以抑制 MCF7 乳腺癌细胞增殖,而抑制内源性 BAD 的表达可以促进 MCF7 乳腺癌细胞增殖。但是,Smith 等^[13]的研究却发现 BAD 过表达促进了 C4-2 前列腺癌细胞的增殖,抑制 BAD 的表达却抑制 C4-2 前列腺癌细胞的增殖。我们的研究结果与 Fernando 等一致,而与 Smith 等相悖。产生这一差异的原因可能是 BAD 在不同的肿瘤细胞中发挥不同的作用。我们将进一步通过体内实验验证 BAD 蛋白对肿瘤细胞的影响,从而为肿瘤的治疗提供新的靶点。

参 考 文 献

- Kadara H, Kabbout M, Wistuba L. Pulmonary adenocarcinoma; a renewed entity in 2011. *Respirology*, 2012; 17(1):50-55.
- 黄娜,李为民. BAD 与肿瘤关系的研究. *华西医学*, 2011; 26(11):1194-1196.
- Giménez-Cassina A, Garcia-Haro L, Choi CS, et al. Regulation of hepatic energy metabolism and gluconeogenesis by BAD. *Cell Metab*, 2014; 19(2):272-284.
- 朱静,陈勃江,黄娜等. 携带人 AKT2、PDK1、BAD 基因的慢病毒表达载体的构建及其在 293T 细胞中的表达. *四川大学学报(医学版)*, 2014; 45(2):299-303.
- 杨绍兴,汤传昊,王思涵等. CD147 慢病毒表达载体的构建及稳定转染 A549 细胞系的建立. *中国肺癌杂志*, 2012; 15(12):694-700.
- 余桂芳,严跃红,王瑞鑫等. 慢病毒介导 HBV X 基因稳定表达 HepG2 细胞系的建立. *世界华人消化杂志*, 2012; 20(8):638-643.
- Lindsay J, Esposti MD, Gilmore AP. Bcl-2 proteins and mitochondria-specificity in membrane targeting for death. *Biochim Biophys Acta*, 2011; 1813(4):532-539.
- Howells CC, Baumann WT, Samuels DC, et al. The Bcl-2-associated death promoter (BAD) lowers the threshold at which the Bcl-2-interacting domain death agonist (BID) triggers mitochondria disintegration. *J Theor Biol*, 2011; 271(1):114-123.
- Su JC, Lin KL, Chien CM, et al. Naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione inactivates EGFR and PI3K/Akt signaling pathways in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Life Sci*, 2010; 86(5-6):207-213.
- Li MY, Yip J, Hsin MK, et al. Haem oxygenase-1 plays a central role in NNK-mediated lung carcinogenesis. *Eur Respir J*, 2008; 32(4):911-923.
- Yu B, Sun X, Shen HY, et al. Expression of the apoptosis-related genes BCL-2 and BAD in human breast carcinoma and their associated relationship with chemosensitivity. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010; 29:107. doi: 10.1186/1756-9966-29-107.
- Fernando R, Foster JS, Bible A, et al. Breast cancer cell proliferation is inhibited by BAD: regulation of cyclin D1. *J Biol Chem*, 2007; 282(39):28864-28873.
- Smith AJ, Karpova Y, D'Agostino RJr, et al. Expression of the Bcl-2 protein BAD promotes prostate cancer growth. *PLoS One*, 2009; 4:e6224. doi: 10.1371/journal.pone.0006224.

(2014-05-10 收稿, 2014-06-19 修回)

编辑 沈进