

# P37 腺病毒表达载体的构建 及对乳腺癌细胞的促迁移作用\*

龚曼曼 孟 麟 寿成超\*\*

(北京大学临床肿瘤学院, 北京市肿瘤防治研究所生化与分子生物学实验室, 北京 100036)

**摘要** 胃癌组织中存在着较高的猪鼻支原体感染率, 而 P37 是猪鼻支原体的主要免疫原。以往研究表明, P37 能抑制肿瘤细胞的黏附, 促进肿瘤细胞浸润和转移。为了更好地研究 P37 在肿瘤发生和转移中的功能, 通过基因克隆的方法, 利用 Ad-easy 体系, 在细菌 BJ5183 中同源重组后, 转染 293 细胞, 成功包装出重组 P37 腺病毒。它能有效感染乳腺癌细胞 BICR。通过 RT-PCR 和蛋白质印迹检测表明, 感染重组 P37 腺病毒后的 BICR 细胞能大量表达并分泌 P37 蛋白。运用该腺病毒体系进行细胞迁移实验表明, P37 能显著增强 BICR 细胞的体外迁移能力。

**关键词** 腺病毒, 支原体, P37, 肿瘤, 迁移

**学科分类号** Q78, R73

支原体是一组能够自我复制的最小的原核细胞微生物, 与许多疾病相关。我们的前期工作表明, 猪鼻支原体在胃癌患者中有较高的感染率, 并发现猪鼻支原体感染和胃癌的淋巴结转移、Lauren 分型和 TNM 分期存在相关性<sup>[1]</sup>。我们前期工作还发现, P37 是猪鼻支原体的主要免疫原, 是一种膜蛋白<sup>[2,3]</sup>。P37 能促进肿瘤细胞侵袭<sup>[4]</sup>, 抑制肿瘤细胞黏附<sup>[5]</sup>, 并能诱导外周血单核细胞释放肿瘤坏死因子<sup>[6]</sup>, 提示 P37 可能与肿瘤的发生和浸润转移相关。

为了更好地研究 P37 的功能和作用机制, 我们成功构建了 P37 腺病毒载体, 并证明了其在肿瘤细胞内的高效表达与分泌。利用该腺病毒载体, 通过感染乳腺癌细胞 BICR 并进行细胞体外迁移实验, 结果表明 P37 能显著提高 BICR 细胞的迁移能力。P37 腺病毒载体的构建为 P37 的功能和机制研究提供了便利的实验工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

BJ5183 菌株, 腺病毒基因组质粒 pAdEasy-1, 穿梭质粒 pAdTrack-CMV 均为本室保存。含全长 p37 cDNA 的重组质粒 pcDNA3-p37 由本室构建保存, 293 包装细胞和乳腺癌细胞 BICR 均为本室保存, 分别在 10% 胎牛血清 DMEM 和 10% 胎牛血清

RPMI 1640 中培养。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司。TRIZOL 试剂盒, 逆转录试剂盒, DMEM, RPMI 1640 培养基均购自 Gibco 公司。Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。抗 P37 单克隆抗体 PD4 由本室制备。ECL (Enhanced Chemiluminescence) 发光系统购自 Amersham 公司。24 孔迁移小室板 (8.0  $\mu$ m 孔径) 购自 Corning 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 重组腺病毒质粒的构建及鉴定** 参考 He 等<sup>[7]</sup> 曾经报道的方法, 用 *Kpn* I 和 *Xba* I 分别双酶切质粒 pcDNA3-p37 和穿梭质粒 pAdTrack-CMV, 回收目的片段后进行常规连接, 获得带有绿色荧光蛋白 (GFP) 基因的穿梭质粒 pAdTrack-CMV-p37。将 200 ng 经 *Pme* I 线性化并经纯化的 pAdTrack-CMV-p37 与 100 ng PEG 纯化的 pAdEasy-1 共同电转化细菌 BJ5183, 获得同源重组子 Ad-p37, 将其转入 DH10B, 大量扩增后用 PEG 纯化。纯化后重组质粒分别经 *Pac* I 酶切和测序鉴定。

\* 国家自然科学基金重点项目 (30130109), 北京大学 211 工程肿瘤学重点学科资助项目。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 010-88196766, E-mail: cshou@vip.sina.com

收稿日期: 2007-03-14, 接受日期: 2007-04-29

**1.2.2 重组腺病毒的包装.** 采用脂质体转染方法, 按说明书将5  $\mu\text{g}$ 经*Pac* I 线性化的Ad-p37转染293病毒包装细胞. 转染5 h以后去掉转染液, 加入正常培养基继续培养, 24 h后在倒置荧光显微镜下观察表达绿色荧光蛋白(GFP)的阳性细胞, 此后每隔2天换液, 转染7~10天后, 收集细胞及培养上清. 上清冻存于 $-70^{\circ}\text{C}$ . 细胞沉淀用1 ml培养上清悬浮, 于液氮和 $37^{\circ}\text{C}$ 水浴中反复冻融4次,  $7\,000\text{ g}$ 离心10 min, 上清即为第一代病毒液, 冻存于 $-70^{\circ}\text{C}$ . 同样的方法制备阴性对照的腺病毒Ad-control.

**1.2.3 重组腺病毒的扩增.** 取0.5 ml 上述冻存的第一代腺病毒稀释于6 ml 含5%胎牛血清的DMEM培养基, 感染一皿(直径10 cm)生长至80%~90%汇合的293细胞.  $37^{\circ}\text{C}$ 感染1~2 h后再添加5% 胎牛血清的DMEM, 继续培养2~3天后用上述方法反复冻融获得第二代病毒液. 按照该方法扩增3~4轮, 收获大量腺病毒以备后续实验.

**1.2.4 重组腺病毒的鉴定.** 分别将10  $\mu\text{l}$ 培养上清和5  $\mu\text{l}$ 病毒液与1  $\mu\text{l}$ 蛋白酶K(20 g/L)在 $55^{\circ}\text{C}$ 作用2 h, 煮沸5 min, 离心后取2.5  $\mu\text{l}$ 作为模板, 用PCR扩增*p37* cDNA: 上下游引物分别为5' AACAA-GATCTTCGTGGAGAC 3' 和 5' TAGGATCCAGC-TTGATGGCCTTCTCGTAC 3'. 扩增片段长为600 bp. PCR条件为 $94^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min后 $94^{\circ}\text{C}$ 变性45 s,  $56^{\circ}\text{C}$ 退火45 s,  $72^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min, 共33个循环, 最后在 $72^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min. 用5  $\mu\text{l}$  PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳分析.

**1.2.5 病毒滴度的检测.** 293 细胞以 $10^6$ 个/孔铺六孔板, 培养至80%~90%汇合, 10倍系列稀释病毒液, 从 $10^{-2}$ 至 $10^{-9}$ , 用不同稀释度的病毒液感染细胞, 1 ml/孔,  $37^{\circ}\text{C}$ 孵育3~6 h后补加含5%胎牛血清的DMEM, 继续培养18 h后在荧光显微镜下计数绿色荧光阳性细胞数, 该数目乘以该孔的稀释倍数即为病毒的滴度(pfu/ml).

**1.2.6 RT-PCR检测腺病毒对BICR细胞的感染.** 经过预实验后选择 $\text{MOI}=80$ 的腺病毒(每个细胞用80 pfu病毒)对BICR细胞进行感染. 3 h后弃去病毒液, 用PBS洗3遍, 加无血清RPMI 1640继续培养48 h, 收集细胞及上清. 用TRIZOL试剂盒按说明书方法提取细胞总RNA, 使用MMLV(莫落尼鼠类白血病病毒)逆转录酶合成第一链cDNA, 用*p37*特异引物进行PCR扩增. 同时以人GAPDH基因作为参照(上下游引物分别为5' ACCACAGTCCATGCC-ATCAC 3' 和 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3',

扩增片段长为452 bp, 反应条件同前).

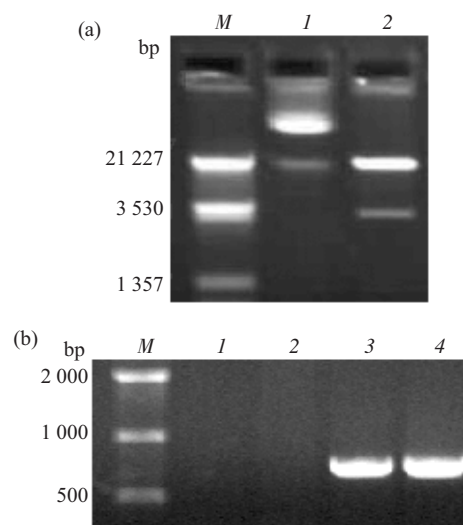
**1.2.7 蛋白质印迹检测感染腺病毒后BICR细胞和培养上清中目的蛋白的表达.** 相同条件下感染并收集BICR细胞和上清, 将10  $\mu\text{l}$ 细胞裂解液和20  $\mu\text{l}$ 培养上清分别进行SDS-PAGE, 随后转硝酸纤维素膜(NC膜), PD4抗体作为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG为二抗, ECL发光系统显示蛋白质表达. 阳性对照为本室制备的猪鼻支原体总蛋白.

**1.2.8 利用腺病毒载体检测P37对BICR细胞体外迁移能力的影响.** 按照说明书方法, 在迁移动小室下室加入600~800  $\mu\text{l}$ 含10%胎牛血清和2%BSA的RPMI 1640培养基, 经Ad-p37或Ad-control感染24 h后的BICR细胞消化计数后悬浮于无血清培养基中, 以 $10^5$ 个/孔加入上室. 继续培养24 h后, 吸去液体, 用湿棉棒擦去上室底部膜上表面未迁移的细胞, 75%的甲醛固定膜上的细胞15 min, Gimsa染液染色30 min, 在显微镜下计数膜下表面的细胞数, 取9个随机视野计数的平均值. 重复3次实验, 利用SPSS 10.0软件进行统计学分析.

## 2 结 果

### 2.1 重组腺病毒质粒的鉴定

用*Pac* I 酶切重组子Ad-p37, 释放出约4.0 kb的片段(图1a), 证明Ad-p37重组质粒构建成功, 同时得到测序的进一步验证.



**Fig. 1 Identification of recombinant adenovirus of Ad-p37**

(a) Mapping analysis of recombinant vector Ad-p37. M:  $\lambda$ DNA/*Hind* III +*Eco*R I marker; 1: Recombinant vector Ad-p37; 2: Ad-p37 digested with *Pac* I. (b) Presence of recombinant adenovirus of Ad-p37 confirmed by PCR. M: Marker; 1: 293 cell culture medium of Ad-control; 2: Virus supernatant of Ad-control; 3: 293 cell culture medium of Ad-p37; 4: Virus supernatant of Ad-p37.

## 2.2 重组腺病毒的PCR鉴定

将Ad-p37和Ad-control感染后的293上清及病毒液分别进行PCR扩增p37 cDNA. 结果显示, 感染Ad-p37的细胞和上清中均有目的片段的扩增, 而对照组未见条带(图1b). 证明重组腺病毒包装成功, Ad-p37和Ad-control滴度分别为  $1.92 \times 10^{10}$  和  $1.8 \times 10^{10}$ .

## 2.3 RT-PCR检测腺病毒介导的p37基因在BICR细胞中的转录

Ad-p37以 $MOI=80$ 对BICR细胞进行感染, 20 h后荧光镜下观察, 感染率几乎为100% (图2). 收集细胞进行RT-PCR检测, 可见Ad-p37感染后细胞能扩增出600 bp的目的片段, 而对照Ad-control组未见条带(图3). 证明腺病毒介导的p37能在BICR细胞mRNA水平进行转录.

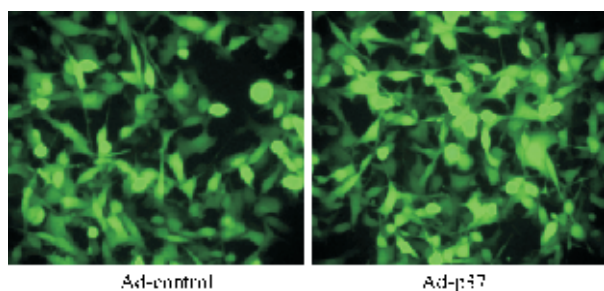


Fig. 2 BICR cells infected by recombinant adenovirus ( $MOI=80$ ) observed with fluorescence microscopy ( $\times 200$ )

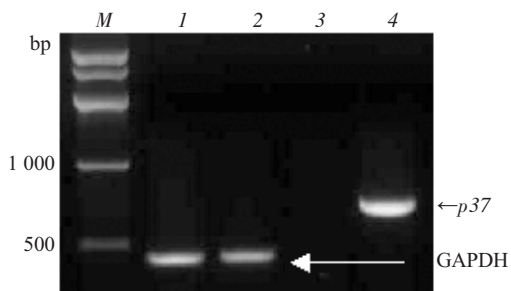


Fig. 3 RT-PCR analysis of p37 gene transcription in BICR cells infected by Ad-p37

M: Marker; 1,3: BICR cells infected by Ad-control; 2,4: BICR cells infected by Ad-p37.

## 2.4 蛋白质印迹检测感染腺病毒后BICR细胞和培养上清中目的蛋白的表达

收集感染后BICR细胞和上清, 用P37特异性单抗PD4检测. 感染Ad-p37的细胞裂解液和细胞培养上清中均检测到约43 ku的目的条带, 而对照组未见相应条带(图4). 说明腺病毒介导的p37转录不仅

能在细胞内表达, 而且能分泌至细胞外.

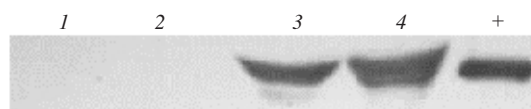


Fig. 4 Detection of P37 protein in supernatant and cell lysis in infected BICR cells

1: Supernatant of Ad-control; 2: Cell lysis of Ad-control; 3: Supernatant of Ad-p37; 4: Cell lysis of Ad-p37; +: Total protein of mycoplasma hyorhinis as positive control.

## 2.5 P37对BICR细胞体外迁移能力的影响

细胞迁移能力能间接通过穿过迁移小室上室底部有孔膜的细胞数目来检测(图5a). 取9个随机视野的细胞数平均值, 3次独立实验结果依次为: Ad-control, 67, 55, 70 (平均值64); Ad-p37, 98, 91, 103 (平均值97.3). 统计分析3次实验结果, 感染Ad-p37的BICR细胞平均穿膜数比对照组多52.03%, 其迁移能力显著增强,  $P < 0.05$  (图5b).

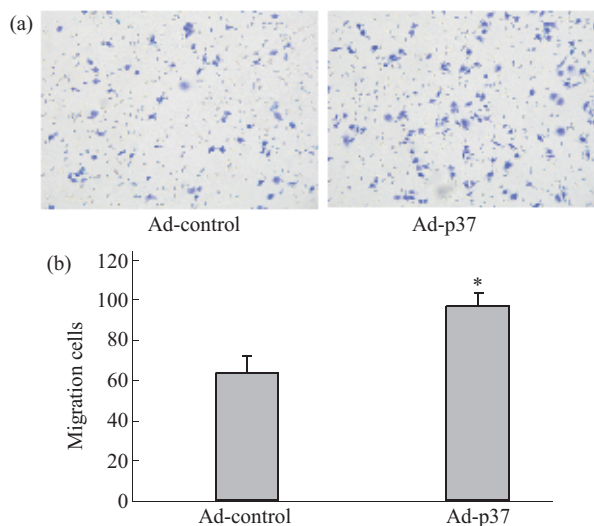


Fig. 5 Ad-p37 promotes BICR cell migration *in vitro*

(a) Migrated cells in one random microscopic field. (b) Average of 9 microscopic fields per well in each group; Data are reported as the  $\bar{x} \pm s$  from three independent experiments (\* $P < 0.05$ ).

## 3 讨 论

支原体是自然界中最小的细胞型生物, 它们能够引起人、动物和植物的许多疾病. 自从Tsai等<sup>[8]</sup>发现, 发酵和穿透支原体的感染能够引起小鼠胚胎细胞系C3H恶性转化, 并伴有核型异常及癌基因上调, 支原体感染和肿瘤发生之间的关系日益引起人们重视. 近年来我们发现, 猪鼻支原体在胃癌患者

中有较高的感染率, 并发现猪鼻支原体的感染率同胃癌的分期和转移呈一定正相关<sup>[1]</sup>. 这些工作均提示支原体感染与肿瘤发生似有一定关系.

P37作为猪鼻支原体的一种膜蛋白, 据报道可能与跨膜能量转运有关<sup>[2,3]</sup>. P37也是猪鼻支原体的主要免疫原, 能诱导人外周血单核细胞释放肿瘤坏死因子TNF- $\alpha$ <sup>[6]</sup>. 我们曾经证实, 支原体感染细胞后能分泌P37蛋白. 本室前期工作人员利用酵母双杂交技术, 发现P37蛋白能与一种细胞骨架蛋白NORPEG相互作用<sup>[9]</sup>. 此外, 我们还发现, 转染p37基因的AGS细胞形态上变小, 变圆, 细胞之间黏附能力减弱<sup>[9]</sup>. 因此P37蛋白可能影响细胞骨架, 从而影响细胞的形态, 运动和黏附能力, 可能与肿瘤的转移及生物个体的发育相关. 近期有文献报道, P37能促进黑色素瘤细胞(C8161, A375M)和膀胱癌细胞(PC-3, DU-145)的体外侵袭能力<sup>[4]</sup>. 这些均提示P37可能在肿瘤的发生, 浸润和转移过程中有着重要的作用, 但相关分子机制不清.

为了更好地研究P37的功能及相关分子机制, 我们曾经用Flp-In-T-REx-293细胞成功建立四环素调控的P37高表达细胞系<sup>[10]</sup>, 并通过亲和层析的方法纯化获得了真核表达的P37蛋白. 通过飞行质谱及N端氨基酸序列测定发现, P37表现为不同大小的分子片段, 3种形式的P37蛋白的精确分子质量分别为47.644、46.105和43.984 ku<sup>[11]</sup>. 细胞系的建立和纯化蛋白质的分析为P37蛋白的功能研究奠定了一定的基础, 但在不同细胞当中的应用也受到一定限制. 腺病毒载体具有许多优点: 可感染的宿主细胞范围广, 既可以感染分裂细胞又可以感染非分裂细胞; 而且基因感染效率高, 容易制备高滴度的病毒粒子; 可插入大片段的外源基因; 此外, 由于在腺病毒中插入报告基因GFP, 使得测定病毒滴度和感染效率十分方便. 因此, 在本工作中我们选择了腺病毒表达体系制备了重组P37腺病毒. 经鉴定其滴度均达 $10^{10}$ . 利用该腺病毒感染乳腺癌细胞BICR, 在 $MOI=80$ 感染20 h后, 感染效率几乎为100%, 证明该腺病毒具有高效感染性. 此外, 通过RT-PCR和蛋白质印迹检测感染的BICR细胞, 证实p37不仅能有效整合入细胞基因组, 并能在转染细胞高效表达和分泌.

迁移小室实验是体外研究细胞迁移、侵袭能力最为常用的实验方法. 大量研究资料表明, 该方法

与动物体内侵袭实验的相关性较好. 迁移小室实验是利用一张8  $\mu m$ 孔径的聚碳酸酯滤膜将培养小室上下分开, 一般正常细胞不具备侵袭穿透8  $\mu m$ 孔径滤膜的能力, 只有迁移能力强的细胞才能通过滤膜, 用它可以评价细胞的迁移能力. 在本工作中, 我们利用构建好的腺病毒体系检测P37对乳腺癌细胞BICR体外迁移能力的影响. 结果发现, 与对照相比, 感染P37腺病毒的BICR细胞迁移能力显著增强. P37腺病毒载体的构建为进一步研究P37功能和有关机制提供了便利的条件, 体外迁移实验结果提示, P37在肿瘤转移过程中可能具有一定作用.

### 参 考 文 献

- 1 Huang S, Li J Y, Wu J, *et al.* Mycoplasma infections in different human carcinomas. *World J Gastroenterol*, 2001, **7** (2): 266~269
- 2 Dudler R, Schmidhauser C, Parish R W, *et al.* A mycoplasma high-affinity transport system and the *in vitro* invasiveness of mouse sarcoma cells. *The EMBO J*, 1998, **7** (12): 3963~3970
- 3 Ushio S, Lwaki K, Taniai M, *et al.* Metastasis-promoting activity of a novel molecule, Ag 243-5, derived from mycoplasma, and the complete nucleotide sequence. *Microbiol Immunol*, 1995, **39**(6): 393~400
- 4 Catherine M K, Satoshi A, Robbie R, *et al.* p37 induces tumor invasiveness. *Mol Cancer Ther*, 2005, **4** (7): 1031~1038
- 5 Liu W B, Zhang J Z, Jiang B H, *et al.* Lipoprotein p37 from mycoplasma hyorhinis inhibiting mammalian cell adhesion. *J Biomedical Science*, 2006, **13** (3): 323~331
- 6 Ning J Y, Huang S, Wu J, *et al.* Protein P37 of mycoplasma hyorhinis induces secretion of TNF- $\alpha$  from human peripheral blood mononuclear cells. *Chin Sci Bull*, 2003, **48** (7): 658~662
- 7 He T C, Zhou S, Costa L T, *et al.* A simplified system for generation recombinant adenovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (5): 2509~2514
- 8 Tsai S, Wear D J, Shih J W, *et al.* Persist infection and multistage malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (22): 10197~10201
- 9 孙玉宁, 靳更林, 张建芝, 等. 猪鼻支原体p37蛋白相互作用蛋白的筛选与鉴定. *生物化学与生物物理进展*, 2004, **31** (10): 902~905  
Sun Y N, Jin G L, Zhang J Z, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2004, **31** (10): 902~905
- 10 Gong M M, Meng L, Liu W B, *et al.* Establishment of stable and regulable 293 cell line expressing mycoplasma hyorhinis protein P37. *Journal of Peking University*, 2005, **37** (6): 575~578
- 11 Liu W B, Meng L, Jiang B H, *et al.* Mass spectrometry analysis *Mycoplasma hyorhinis* lipoprotein p37 by protease cleavage. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2006, **22** (4): 328~332

## The Construction of Recombinant Adenovirus P37 and Its Function of Promoting Migration of BICR\*

GONG Man-Man, MENG Lin, SHOU Cheng-Chao\*\*

(Peking University School of Oncology, Beijing Cancer Hospital & Institute, Beijing, 100036, China)

**Abstract** Previous work showed that there was high ratio of *Mycoplasma hyorhinis* infection in human gastric carcinoma. P37 protein is a membrane lipoprotein of *Mycoplasma hyorhinis*. It was reported that P37 inhibited cell adhesion and induced tumor invasiveness. To investigate the function of P37 in cancer development, the *p37* gene was subcloned into shuttle vector of pAdTrack-CMV. Linearized pAdTrack-CMV-p37 was co-transformed into BJ5183 cells with adenoviral genomic plasmid pAdEasy-1. The identified recombinant DNA was transfected into 293 cells to package adenovirus. From the supernatant and cell lysis, the presence of recombinant adenovirus P37 was proved by PCR. And then BICR cells with this recombinant adenovirus of P37 were successfully infected. RT-PCR and Western blot demonstrated the transcription and expression of P37 in infected BICR cells. And the soluble P37 protein can be secreted into the culture supernatant of infected BICR cells. In the migration assay *in vitro*, the number of migration BICR cells infected with Ad-p37 was 52.03% more than that of control. The construction of recombinant adenovirus provided a good tool for studying P37 function and its molecular mechanism, which will be further used for *in vivo* migration and invasion experiments.

**Key words** adenovirus, mycoplasma, P37, cancer, migration

---

\* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30130190) and 211 Project of Peking University.

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-10-88196766, E-mail: cshou@vip.sina.com

Received: March 14, 2007 Accepted: April 29, 2007