

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*

朱 静^{1,2}, 陈勃江², 黄 娜³, 李为民^{2△}

1. 绵阳市中心医院 呼吸内科(绵阳 621000); 2. 四川大学华西医院 呼吸内科(成都 610041);
3. 成都医学院第一附属医院 呼吸内科(成都 610050)

【摘要】 目的 构建含人丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/*AKT2*)、磷酸肌醇依赖激酶-1 (phosphoinositide-dependent kinase 1, *PDK1*)、*bcl-2* 相关性死亡蛋白 (*bcl-2*-associated death protein, *BAD*) 基因的绿色荧光慢病毒载体, 鉴定其在 293T 细胞中的表达。方法 选择病理证实的非小细胞肺癌 (NSCLC) 组织, 采用特异性引物 RT-PCR 扩增 *AKT2*、*PDK1* 及 *BAD* cDNA。将 PCR 产物与 T 载体连接测序, 测序正确的目的片段从 T 载体上酶切下与慢病毒骨架质粒连接, 将此重组的慢病毒表达载体质粒及包装系统共转染入 293T 细胞 (人胚肾细胞系), 收集病毒上清, Western blot 检测 *AKT2*、*BAD* 及 *PDK1* 蛋白质表达。结果 凝胶电泳证实 *AKT2*、*BAD*、*PDK1* 三基因成功转导至以 pCDF1-MCS2-EF1-copGFP 为骨架质粒的慢病毒包装系统中, 磷酸钙转染法 72 h 后 *BAD*、*PDK1* 及 *AKT2* 的转染率分别约为 100%、95%、90%。慢病毒包装后测定 3 种病毒滴度均达 6.7×10^6 PFU/mL, 并通过 Western blot 法检测到 *AKT2*、*BAD*、*PDK1* 蛋白在 293T 细胞的表达。结论 成功构建了携带人 *AKT2*、*BAD*、*PDK1* 原癌基因的慢病毒表达载体, 在 293T 细胞中成功鉴定其表达。

【关键词】 *AKT2* *BAD* *PDK1* 慢病毒载体 绿色荧光蛋白 非小细胞肺癌

Construction and Expression of Recombinant Lentiviral Vectors of *AKT2*, *PDK1* and *BAD* ZHU Jing^{1,2}, CHEN Bo-jiang², HUANG Na³, LI Wei-min^{2△}. 1. Department of Respiratory Medicine, Mianyang Central Hospital, Mianyang 621000, China; 2. Department of Respiratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610050, China

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

【Abstract】 **Objective** To construct human protein kinase B (*AKT2*), phosphoinositide-dependent kinase 1 (*PDK1*) and *bcl-2*-associated death protein (*BAD*) lentiviral expression vector, and to determine their expressions in 293T cells. **Methods** Total RNA was extracted from lung cancer tissues. The full-length coding regions of human *AKT2*, *BAD* and *PDK1* cDNA were amplified via RT-PCR using specific primers, subcloned into PGEM-Teasy and then sequenced for confirmation. The full-length coding sequence was cut out with a specific restriction enzyme digest and subclone into pCDF1-MCS2-EF1-copGFP. The plasmids were transfected into 293T cells using the calcium phosphate method. The over expression of *AKT2*, *BAD* and *PDK1* were detected by Western blot. **Results** *AKT2*, *PDK1* and *BAD* were subcloned into pCDF1-MCS2-EF1-copGFP, with an efficiency of transfection of 100%, 95%, and 90% respectively. The virus titers were 6.7×10^6 PFU/mL in the supernatant. After infection, the proteins of *AKT2*, *PDK1* and *BAD* were detected by Western blot. **Conclusion** The lentiviral vector pCDF1-MCS2-EF1-copGFP containing *AKT2*, *BAD* and *PDK1* were successfully constructed and expressed in 293T cells.

【Key words】 *AKT2* *BAD* *PDK1* Lentivirus Green fluorescent protein (GFP) Non-small cell lung cancer

肺癌是当今世界上严重威胁人类健康与生命的恶性肿瘤之一,然而,目前对肺癌的研究大多局限于

少数蛋白的表达水平上,而对于信号通路整体激活、调控模式,及其整体上下游信号的网络调节机制,少有报道。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/*AKT2*) 是一种重要的信号蛋白分子,它是磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphoinositide-3-kinase, *PI3K*) 信号传导通路的中心环节,以 *AKT* 为中心的 *AKT*/*PKB* 网络信号通路参与多种生物

* 国家自然科学基金 (No. 81241068, No. 81372504)、中国博士后科学基金 (No. 2013M542281)、四川省科技厅应用基础研究 (No. 2013JY0012) 资助

△ 通讯作者, E-mail: weimin003@yahoo.com

学功能的调节,包括介导细胞增殖、细胞生长、细胞存活、以及组织血管形成等。当细胞受到胰岛素样生长因子等胞外信号刺激时,磷酸肌醇依赖激酶-1(PDK1)催化 AKT,促使其磷酸化,加速细胞的生长与增殖^[1]。bcl-2 相关性死亡蛋白(BAD)属于 B 淋巴细胞/白血病-2 蛋白家族,参与识别不同类型的促凋亡信号,AKT 可通过促使 BAD 磷酸化,阻止细胞色素 C 释放入胞浆,而抑制细胞凋亡^[2]。本研究的目的是以慢病毒 pCDF1-MCS2-EF1-copGFP 为载体,通过基因克隆、磷酸钙转染和 Western blot 法,构建携带 AKT2、BAD、PDK1 原癌基因慢病毒载体,为研究以 AKT 为中心的 PDK/AKT/BAD 信号通路致正常支气管上皮细胞恶变提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

限制性内切酶 *EcoR* I、*Bgl* II 及 T4 DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司;TaqDNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;细胞培养基 DMEM 购自 GIBCO 公司;TRIzol 总 RNA 提取试剂购自北京康为世纪生物科技有限公司;兔源性 AKT2、BAD、PDK 抗体及辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 抗体均购自 Cell signaling 公司。

1.2 质粒及细胞株

克隆 pGEM-Teasy 载体自 Promega 公司(片段大小为 3 015 bp);慢病毒质粒系统包括骨架质粒 pCDF1-MCS2-EF1-copGFP[自带报告基因绿色荧光蛋白(GFP),片段大小为 6 771 bp]和包装质粒 pMDLg-pRRE,pRSV-REV,pMD2G。慢病毒载体包装细胞 293T 为四川大学华西医院干细胞生物学研究室保存;非小细胞肺癌组织来源于四川大学呼吸内科。

1.3 引物设计

使用 Primer5 软件设计基因引物。AKT2 引物:上游(P1) 5'-CGGAATTCATGAATGAGG TGTCTGTCATCAAAG-3',下游(P2) 5'-CGGGA TCCTCACTCGCGGATGCTGGC-3',扩增片段为 1 446 bp;PDK1 引物:上游(P1) 5'-CGGAATTC ATGAGGCTGGCGCGGC-3',下游(P2) 5'-GGAC TAGTCTAGGCACTGCG GAACGTC,扩增片段为 1 310 bp;BAD 引物:上游(P1) 5'-CGGAATTC ATGTTCCAGATCCCAGAGTTTGA - 3',下游(P2) 5'-CGGGATCCTCACT GGGAGGGGGCG-

3',扩增片段为 506 bp。

1.4 方法

1.4.1 目的基因的克隆

1.4.1.1 目的基因的 PCR 扩增 选择病理证实的非小细胞肺癌组织,从组织中抽提总 RNA;使用特异性引物 RT-PCR 扩增目的基因 AKT2、PDK1、BAD;琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增结果。

1.4.1.2 质粒的构建和扩增 将扩增正确的 PCR 产物进行胶回收,用 T4 DNA 连接酶将 PCR 产物与 pGEM-Teasy 载体进行连接,并转化至感受态细胞 DH5 α ;在转化的平板上蓝白斑筛选挑阳性克隆,以 160 r/min 的转速摇菌,快速抽提质粒 DNA。

1.4.1.3 质粒的鉴定和测序 *EcoR* I 和 *Bgl* II 双酶切电泳鉴定重组质粒 pGEM-AKT2-Teasy、pGEM-BAD-Teasy 和 pGEM-PDK1-Teasy,鉴定正确的重组质粒寄至上海 Invitrogen 测序,酶切鉴定及测序正确的质粒即为克隆成功的目的基因。

1.4.2 pCDF1-AKT2-EF1-copGFP、pCDF1-BAD-EF1-copGFP 及 pCDF1-PDK1-EF1-copGFP 重组慢病毒表达载体的构建和鉴定

1.4.2.1 质粒的构建和扩增 慢病毒载体骨架质粒 pCDF1-MCS2-EF1-copGFP 载体和测序正确的 AKT2、BAD、PDK1 分别经 *EcoR* I、*Bgl* II 双酶切消化,回收,使用柱层析法纯化。将 AKT2、BAD、PDK1 与慢病毒骨架质粒用 T4 DNA 连接酶进行连接,转化至感受态细胞 DH5 α ;在转化的平板上蓝白斑筛选挑阳性克隆,以 160 r/min 的转速摇菌,快速抽提质粒 DNA。

1.4.2.2 质粒的鉴定 *EcoR* I 和 *Bgl* II 双酶切电泳鉴定抽提的重组质粒 pCDF1-AKT2-EF1-copGFP、pCDF1-BAD-EF1-copGFP 及 pCDF1-PDK1-EF1-copGFP,酶切鉴定正确者即为构建好的携带 AKT2、BAD、PDK1 基因的重组慢病毒表达载体,以备转染用。

1.4.3 慢病毒包装体系的建立

1.4.3.1 细胞培养 使用含 10% FBS 的 DMEM 细胞培养基培养 293T 细胞,将细胞置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养、传代,传至第 3 代的 293T 细胞供转染及感染用。

1.4.3.2 转染体系 磷酸钙转染体系:2×BBS 500 μ L,pCDF1-AKT2-EF1-copGFP、pCDF1-BAD-EF1-copGFP 及 pCDF1-PDK1-EF1-copGFP 及包装质粒共 12 μ g,0.25 mmol/L CaCl₂ 500 μ L。

1.4.3.3 质粒转染 在 Ep 管中建立磷酸钙包装

体系,轻弹使其混匀,室温放置 20 min。取生长良好的 293T 细胞接种于 6 孔板上,待细胞覆盖率达 80% 时利用磷酸钙转染法进行转染,然后将含有 293T 细胞的培养皿于 37 °C,3% CO₂ 孵箱中过夜。转染 24 h,给 293T 细胞换液后,将培养瓶放入孵箱中继续培养,分别于 24 h、48 h 及 72 h 后观察细胞变化及绿色荧光的表达情况。通过高倍显微镜下计数带 GFP 蛋白的 293T 细胞,5 次计数取平均数来计算质粒转染效率。

1.4.3.4 病毒滴度测定 分别收集含有病毒颗粒的上清(原液),按病毒原液滴度的 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 进行系列稀释,检测 3 种病毒滴度。

1.4.4 病毒感染 293T 细胞 将 1 mL 病毒上清液加入 2×10⁵/皿 293T 细胞培养皿中,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h 后镜下观察 GFP 蛋白的表达,反映病毒感染的大致情况。

1.4.5 Western blot 检测 293T 细胞中 AKT2、

BAD、PDK1 蛋白的表达 用细胞裂解液裂解感染 72 h 后的细胞及培养上清,1 500 r/min 离心 5 min,取离心后的上清液进行蛋白定量。将等量的蛋白及内参蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,1:100 兔源性抗 AKT2、BAD、PDK1 抗体 4 °C 孵育过夜,洗膜后以碱性磷酸酶标记的二抗室温孵育 2 h,碱性磷酸酶显色,以 β-actin 为内参蛋白,于凝胶自动成像分析系统下成像。

2 结果

2.1 *AKT2*、*BAD* 及 *PDK1* 基因的 PCR 扩增

见图 1~图 3。*AKT2*、*PDK1* 及 *BAD* 电泳产物的大小与理论预测的产物大小(1 446 bp、506 bp、1 310 bp)一致。

2.2 重组质粒 pGEM-*AKT2*-Teasy、pGEM-*BAD*-Teasy、pGEM-*PDK1*-Teasy 的鉴定

重组质粒双酶切后分别产生 1 446 bp

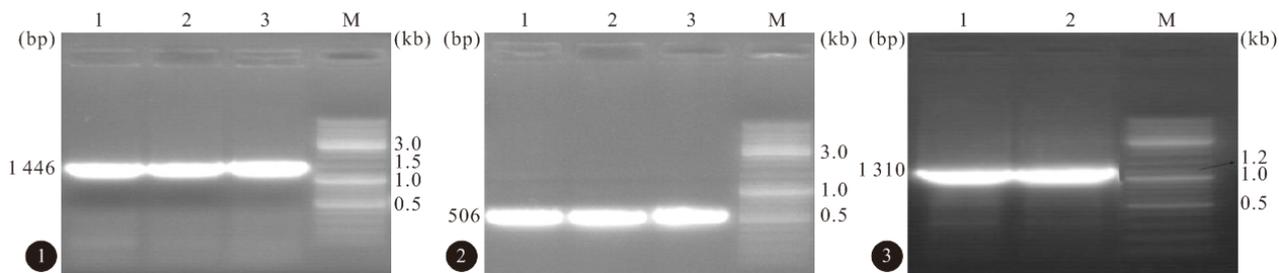


图 1 *AKT2* PCR 产物

图 2 *BAD* PCR 产物

图 3 *PDK1* PCR 产物

Fig 1 PCR amplification of *AKT2* (lane 1, 2 and 3)

Fig 2 PCR amplification of *BAD* (lane 1, 2 and 3)

Fig 3 PCR amplification of

PDK1 (lane 1 and 2)

M: marker

(*AKT2*), 506 bp(*BAD*), 1 310 bp(*PDK1*)和 3 015 bp(pGEM-Teasy 载体)cDNA 片段。电泳产物大小与理论预测的产物大小一致,从 DNA 层面证明了质粒的构建成功。见图 4。

2.3 重组慢病毒表达载体的鉴定

见图 5。重组慢病毒载体质粒 pCDF1-*AKT2*-EF1-copGFP, pCDF1-*BAD*-EF1-copGFP 及 pCDF1-*PDK1*-EF1-copGFP 经双酶切后电泳,出现的片段分别为 1 446 bp(*AKT2*), 506 bp(*BAD*), 1 310 bp(*PDK1*)和 6771 bp(慢病毒骨架质粒),与理论预测的产物大小一致,证明慢病毒载体构建成功。

2.4 质粒转染 293T 细胞后的转染率和病毒滴度

3 种慢病毒载体质粒转染 293T 细胞后的镜下表现相似,荧光显微镜下可见于 24 h、48 h 及 72 h

细胞均有绿色荧光,且荧光强度逐渐增强,72 h 后可达高峰,见图 6。72 h 后携带 *BAD*、*PDK1* 及 *AKT2* 的质粒的转染率分别约为 100%、95%、90%,显示出本研究慢病毒包装系统高效性。收集含有病毒颗粒的上清液,系列稀释法可检测到 3 种病毒的滴度均可达 6.7×10⁶ PFU/mL。转染率及病毒滴度的结果均证明包装病毒成功。

2.5 病毒感染的感染情况

3 种病毒感染细胞后的表现相似,荧光显微镜下可见大量 GFP 蛋白在细胞中表达,见图 7。

2.6 *AKT2*、*BAD* 及 *PDK1* 蛋白的表达

Western blot 分别检测到 *AKT2*、*PDK1* 及 *BAD* 蛋白的表达,大小与理论预测一致,证实 *AKT2*、*BAD* 及 *PDK1* 在 293T 细胞中成功表达,见图 8。

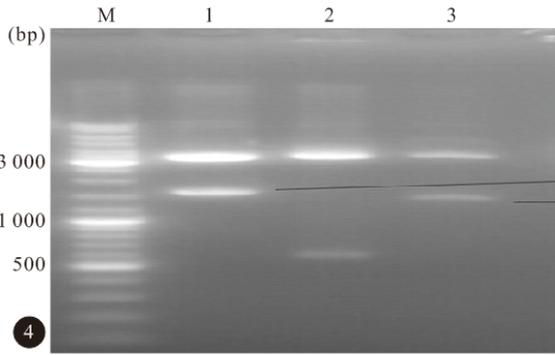
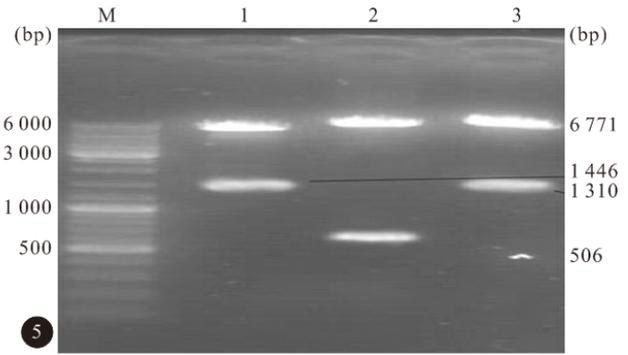
图 4 *AKT2*, *BAD*, *PDK1* 与 T 载体重组后酶切鉴定结果

图 5 慢病毒表达载体的酶切鉴定结果

Fig 4 The results of enzyme digestion of *AKT2* (lane 1), *BAD* (lane 2), *PDK1* (lane 3) and pGEM-Teasy vector Fig 5 The results of enzyme digestion of pCDF1-*AKT2*-EF1-copGFP (lane 1), pCDF1-*BAD*-EF1-copGFP (lane 2) and pCDF1-*PDK1*-EF1-copGFP (lane 3)

M: Marker; pGEM-Teasy vector: 3015 bp; pCDF1-MCS2-EF1-copGFP vector: 6771 bp

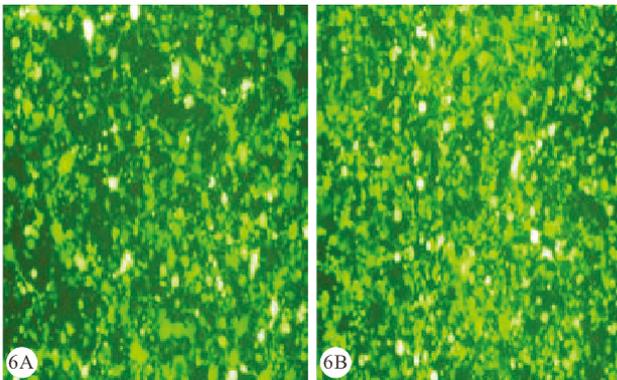
图 6 pCDF1-*BAD*-EF1-copGFP 转染后不同时间在 293T 细胞中的表达

Fig 6 The expression of pCDF1-*BAD*-EF1-copGFP (fluorescence microscope) infection

A: 24 h; B: 48 h; C: 72 h

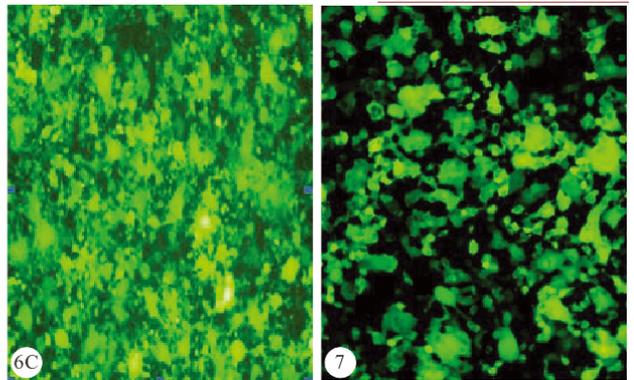
图 7 *BAD* 病毒感染 293T 细胞后的绿色荧光蛋白的表达

Fig 7 The green fluorescence protein in 293T cells after *BAD*

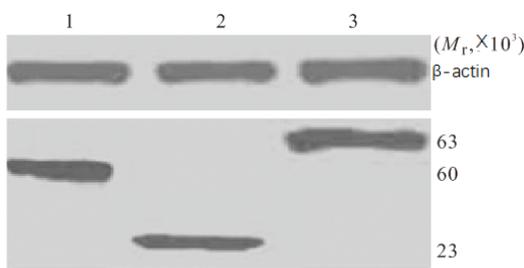
图 8 蛋白免疫印迹检测 *AKT2*, *PDK1* 及 *BAD* 蛋白的表达

Fig 8 Western blot of *AKT2* (lane 1), *BAD* (lane 2), *PDK1* (lane 3)

3 讨论

PI3K/AKT 通路是一个经典抗凋亡、促存活的信号转导途径^[3], 在众多肿瘤发生发展、侵袭转移及放疗化疗抵抗中发挥重要作用, 如肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、膀胱癌等^[4]。AKT 的磷酸化依赖于信号通路上游的 PI3K, 当细胞受到胰岛素样生长因子等胞外信号刺激时, 细胞膜上的酪氨酸激酶受体活化, PI3K 调节亚基(p85)中的 SH2 结构域

与之结合并引起催化亚基(p110)变构激活, 随即催化二磷酸酯酰肌醇(PIP2)生成三磷酸酯酰肌醇(PIP3), 通过募集 AKT 至质膜, 并导致 AKT 构型改变, 从而在 PDK1 催化下磷酸化 AKT。而 AKT 可通过促使 *BAD* 磷酸化而降低 *BAD* 与 *bcl-xl* 和 *bcl-2* 结合, 阻止细胞色素 C 释放入胞浆, 而抑制细胞凋亡。

在本研究中, 我们先将目的基因与 T 载体连接, 酶切、测序正确后, 再与慢病毒载体连接, 通过转染、感染及 Western blot 法检测到目的基因的表达。然而, 目前不少研究是将目的基因与慢病毒载体直接连接^[5], 但此连接方法不能保证目的基因的复制。使用 *Taq*DNA 聚合酶扩增的 PCR 产物中有多个位点带有 A 碱基, 取适量回收的 PCR 片段与带 T 碱基的 pGEM-Teasy 载体进行 T-A 连接, 这样与直接连于慢病毒载体上相比, PCR 产物与 T 载体连接效率会大幅提高, 目的基因能在 T 载体高效稳定地复制增殖。

本研究中,慢病毒骨架质粒 pCDF1-MCS2-EF1-copGFP 自带报告基因 GFP,在荧光显微镜下计数带 GFP 蛋白的细胞,即能准确反映转染效率及感染情况。在本实验中,随着 293T 细胞培养时间的延长,AKT2、BAD 及 PDK1 转染率均出现逐渐升高的趋势,在 72 h 时可达到高峰,可高达 100%,高于众多文献报道^[6]的转染率。然而在相同细胞密度、细胞状态、质粒加入量和转染条件一样的情况下,3 种质粒的转染率不一致,我们分析可能跟我们需转入的目的基因片段大小有关:磷酸钙形成的沉淀更易将小片段的 DNA 复合物包裹,通过胞吞的方法将质粒导入 293T 细胞内部,所以 BAD (506 bp) 的转染效率高于 AKT2 (1 446 bp) 和 PDK1 (1 310 bp)。

常用的病毒载体主要包括慢病毒和腺病毒。腺病毒的基因组较大,在转移外源性基因的同时,也会表达大量的病毒自身蛋白,激活宿主免疫系统,从而杀灭感染细胞^[7]。慢病毒载体为“自杀性”病毒,其特点在于病毒感染目的细胞后不会再感染其他细胞,也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒。本研究采用慢病毒包装系统,最终测得的病毒滴度高达 6.7×10^6 PFU/mL,与 Binaifer 等^[8]所报道的结果基本一致,显示出慢病毒包装系统的稳定性及高效性,为后续分析比较细胞生物学行为的研究奠定了基础。

目前大多数对 AKT 磷酸化及活化的研究仅局限于已经病理证实的肺癌组织中^[9,10]。至于在正常支气管上皮细胞中,AKT 是怎样被激活的,以及 AKT 磷酸化后对促进肿瘤细胞的生长、增殖、抑制凋亡、促进转移与侵袭的鲜有报道。目前尚无 AKT2 诱导正常支气管上皮细胞恶变的研究,亦无有关 PDK1 对 NSCLC 中 AKT 活性调节和 AKT 是如何通过调节 BAD 在 NSCLC 的发生发展中发挥作用的报道。本实验旨在通过构建携带目的基因的慢病毒和在正常支气管上皮细胞过表达等处理,率先探讨以 AKT2 为中心的 PDK1/AKT2/BAD

信号通路在 NSCLC 中的作用及网络调节机制,对于研究非小细胞肺癌的发病机制及基因治疗提供了新的、有益实验依据。

参 考 文 献

- 1 Sridhar SS, Hedley D, Siu LL. Raf kinase as a target for anticancer therapeutics. *Mol Cancer Ther*, 2011; 4 (9): 677-685.
- 2 Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, *et al.* NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, 2007; 401(6748): 82-85.
- 3 Nam SY, Jung GA, Hur GC, *et al.* Upregulation of FLIP(S) by Akt, a possible inhibition mechanism of TRAIL-induced apoptosis in human gastric cancers. *Cancer Sci*, 2003; 94(12): 1066-1073.
- 4 Wallerand H, Cai Y, Wainberg ZA, *et al.* Phospho-Akt pathway activation and inhibition depends on N-cadherin or phospho-EGFR expression in invasive human bladder cancer. *Urol Oncol*, 2010; 28(2): 180-188.
- 5 Hu HP, Hsieh SC, King CC, *et al.* Characterization of retrovirus-based reporter viruses pseudotyped with the precursor membrane and envelope glycoproteins of four serotypes of dengueviruses. *Virology*, 2007; 368(2): 376-387.
- 6 Liu GP, Wei W, Zhou X, *et al.* I₂PP₂A regulates p53 and Akt correlatively and leads the neurons to abort apoptosis. *Neurobiol Aging*, 2010; 165(3): 25-32.
- 7 Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Bio technol*, 2007; 36(3): 184-204.
- 8 Binaifer R, Pei J, Mitsuuchi Y, *et al.* Frequent activation of AKT in non-small cell lung carcinomas and preneoplastic bronchial lesions. *Carcinogenesis*, 2009; 25(11): 2053-2055.
- 9 Weaver CV, Liu SP. Differentially expressed pro- and anti-apoptogenic genes in response to benzene exposure: Immunohistochemical localization of p53, Bag, Bad, Bax, Bcl-2, and Bcl-w in lung epithelia. *Exp Toxicol Pathol*, 2012; 59(5): 265-272.
- 10 Singh P, Yam M, Russell PJ, *et al.* Molecular and traditional chemotherapy: A united front against prostate cancer. *Cancer Lett*, 2010; 293(1): 1-14.

(2013-12-11 收稿, 2014-01-08 修回)

编辑 吕 熙