

慢病毒介导的 HIF-1 α mODD 在肿瘤细胞中的高表达

赵玉娇 龙海亭 潘 玥 李 华 陈俊英 施海晶 马绍辉 孙强明

摘要 目的 在肿瘤细胞中利用重组慢病毒介导缺氧诱导因子-1 α 突变体(HIF-1 α mODD)在正常氧压下高表达,以模拟肿瘤缺氧微环境下肿瘤细胞中 HIF-1 α 的高表达,为研究 HIF-1 介导的缺氧信号通路及其在肿瘤细胞中的作用提供实验模型。方法 将含 HIF-1 α mODD 基因片段的慢病毒表达质粒 pWPI GW/HIF-1 α mODD,与 pVSVG 及 pSPAX 质粒共转染人胚肾 293T 细胞,包装制备重组慢病毒,重组病毒经过纯化后直接感染 GLC、H157 和 YTMLC 等肿瘤细胞,并在正常氧压条件下培养,通过 RT-PCR、免疫印迹等方法检测 HIF-1 α mODD 在细胞中的表达水平。结果 重组慢病毒介导 HIF-1 α mODD 在 GLC、H157 和 YTMLC 细胞内获得高表达。结论 成功模拟了肿瘤细胞在缺氧微环境下高表达 HIF-1 α 的情况,为体外研究 HIF-1 α 在肿瘤血管新生及肿瘤生长中的作用提供途径。

关键词 HIF-1 α 慢病毒 缺氧微环境

Lentiviral Vector Mediated High Expression of HIF-1 α mODD in Tumor Cells. Zhao Yujiao, Long Haiting, Pan Yue, Li Hua, Chen Junying, Shi Haijing, Ma Shaohui, Sun Qiangming. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College; Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Diseases, Yunnan 650118, China

Abstract Objective To induce high expression of HIF-1 α mODD in tumor cells mediated by lentiviral vector in normoxia condition, and simulate high expression of HIF-1 α in tumor cells under hypoxia microenvironment in vivo. **Methods** The packing cell line (human embryonic kidney 293T cells) was cotransfected with pWPI GW/HIF-1 α mODD expression vector, pVSVG and pSPAX. The recombinant lentivirus was packaged and amplified, followed by purification, infection of GLC, H157 and YTMLC cells. The expression level of HIF-1 α mODD gene was analyzed by RT-PCR and Western blotting. **Results** RT-PCR and Western blotting results demonstrated that HIF-1 α mODD was highly expressed in GLC, H157 and YTMLC cells. **Conclusion** A model of high expression of HIF-1 α in tumor cells hypoxia microenvironment was successfully created. It will provide a method to investigate the role of HIF-1 α in tumor angiogenesis and growth in vitro.

Key words HIF-1 α ; Lentivirus; Hypoxia microenvironment

缺氧是实体瘤微环境的基本特征之一,同时肿瘤细胞的缺氧也是肿瘤发生恶性转化甚至转移的启动因子之一^[1]。研究表明,缺氧诱导因子-1(HIF-1)是广泛存在于哺乳动物和人体内的一种转录因子,能激活许多缺氧反应基因的表达,是哺乳动物和人在缺氧条件下维持氧稳态的关键性物质^[2]。HIF-1是由 α 和 β 两个亚基组成的异源二聚体转录激活因子。HIF-1 α C端的氧依赖降解结构域(oxygen-dependent degradation domain, ODDD),氨基酸401~603,ODDD的作用主要是决定HIF-1的氧调节稳定性和蛋白转录活性。HIF-1 α 的蛋白表达水平受到细胞

内氧浓度的高度调控。正常氧浓度下,脯氨酸羟化酶域蛋白(prolyl hydroxylase domain proteins, PHDs)在氧分子的参与下使HIF-1 α 的ODDD中第402和564位上的脯氨酸残基羟基化,进而促进HIF-1 α 和Von Hippel-Lindau(VHL)肿瘤抑制蛋白的相互作用,VHL作为E3泛素化酶的识别组分促使HIF-1 α 泛素化,经26S蛋白酶体途径降解。低氧状态下,由于脯氨酸羟化酶功能丧失,HIF-1 α 亚单位降解受阻,哺乳动物细胞内HIF-1 α 蛋白水平急剧增加。HIF-1 α 入核后与HIF-1 β 形成二聚体与缺氧反应元件(HRE,其核心识别序列为5'-RCGTG-3')结合,形成转录起始复合物,启动VEGF等缺氧调节相关靶基因的转录和表达,直接参与血管生成的全过程,维持缺氧条件下的氧稳态。大量研究已经证实HIF-1 α 的高表达对维持肿瘤细胞的能量代谢、新血管生成,促进肿瘤增殖和转移起着重要作用^[3,4]。

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81171946);中国医学科学院医学生物学研究所人才引进项目(IMB2009RC01)

作者单位:650118 昆明,北京协和医学院/中国医学科学院医学生物学研究所、云南省重大传染病疫苗研发重点实验室

通讯作者:孙强明,电子邮箱:qmsun1972@yahoo.com.cn

慢病毒作为一种有效的递送载体,与腺病毒和其他反转录病毒相比,不但能感染分裂细胞,也能感染静止细胞^[5]。另外,慢病毒可以有效地将外源基因整合入靶细胞基因组并稳定持续地表达。而且慢病毒比腺相关病毒整合效率高,不易诱发宿主免疫反应,目的基因表达时间长。使得慢病毒介导的基因转移具有高效性和持久性,对于细胞水平和动物体内试验来说均是非常有效的基因转移工具^[6]。

本研究利用 pWPI GW/HIF-1 α mODD[氧依赖降解结构域(ODDD)中脯氨酸残基羟基化位点突变]质粒,与 pVSVG 及 pSPAX 质粒共转染人胚肾 293T 细胞,包装获得表达 HIF-1 α mODD 的慢病毒,由于 HIF-1 α 氧依赖降解结构域(ODDD)中脯氨酸残基羟基化位点突变,病毒感染肿瘤细胞后表达的 HIF-1 α mODD 在正常氧压下不发生降解,从而模拟肿瘤细胞缺氧状态。在本研究中我们利用包装获得 HIF-1 α mODD 慢病毒感染 3 种肿瘤细胞,在 3 种肿瘤细胞中实现了 HIF-1 α mODD 过量表达,成功建立了模拟肿瘤细胞缺氧环境下过量表达 HIF-1 α 的方法。为研究肿瘤缺氧微环境中相应缺氧调节相关细胞信号传导、肿瘤细胞的能量代谢、血管新生、肿瘤增殖和转移提供研究模型。

对象与方法

1. 材料:菌种与质粒 E. coli DH5 α 感受态购自天根生化科技有限公司;慢病毒包装系统, HIF-1 α mODD 基因及 pVSVG, pSPAX 等质粒由美国马里兰大学 Basile John 博士惠赠;人胚肾 293T 及肿瘤细胞 GLC、H157、YTMLC 由中国医学科学院医学生物学研究所保存。Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen; Polylysine 及 Polybrene 购自美国 Sigma 公司; anti-HIF-1 α 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; anti- β -Actin 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; 羊抗兔二抗购自 KPL 公司; SuperSignal West Pico HRP 化学发光底物购自 Thermo Scientific 公司。

2. 慢病毒的包装制备:第 1 天:在转染 24h 以前,将低代次状态良好的 8×10^6 293T 细胞加入到多聚赖氨酸包被过的 10cm^2 培养皿中。第 2 天:取 1.5ml 灭菌 EP 管,加入 pVSVG (Env) 包膜质粒 1 μg , pSPAX (structure) 质粒 3 μg 及 pWPI GW/HIF-1 α mODD 表达质粒 4 μg 混合于无血清 Opti MEM。然后按照 Lipofectamine 2000 转化操作试剂的说明按比例加入试剂,轻柔混匀,室温孵育 20min,然后将 DMEM/质粒/ Lipofectamine 2000 混合物小心滴加到培养瓶皿的各个位置。37 $^{\circ}\text{C}$, 10% 的二氧化碳孵育培养过夜。同时取 pCEFL/GFP 质粒转染 293T 细胞作为实验转染对照。第 3 天:转染 24h 后,将含有转染混合物的培养基替换为新鲜完全培养基。第 4~6 天:分别于更换培养基 24、48 和 72h 后收获含有慢病毒的细

胞培养上清(如第 2 天需收集含病毒的培养上清,收获上清后需要加入新鲜培养基),收集液通过 $0.45 \mu\text{m}$ 的过滤器后,收集到离心管中,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后集中存放。

3. 慢病毒的纯化及浓缩:慢病毒的浓缩采用超速离心的方法。收集的病毒上清液在 70000g 于 20 $^{\circ}\text{C}$ 离心 2h,病毒将沉淀于离心管底部,将病毒沉淀重悬于 HBSS,达到浓缩目的。病毒的纯化采用 20% 蔗糖密度梯度离心。于 50000g, 20 $^{\circ}\text{C}$ 离心 2h。将病毒沉淀重悬于 $1 \times \text{HBSS}$ 中获得纯度较高的病毒。

4. 重组慢病毒效价测定:接种 10^5 个 293T HEK 细胞到 24 孔板,不要让细胞黏附到细胞板,将稀释的含慢病毒的培养基分别加入 24 孔板中,同时加入终浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 polybrene 以增加感染效率,每孔的终体积为 500 μl ,轻微混匀,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育。第 2 天更换为普通培养基,病毒感染 48h 后用 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤两遍,以去除上清中的残留病毒。然后将每孔中的细胞反复吹打重悬于 PBS 中。通过流式细胞仪检测带有绿色荧光的被感染细胞,通过计算绿色荧光细胞/非绿色荧光细胞的比率获得被感染细胞的百分比。根据公式 $\text{TU}/\text{ml} = (\text{P} \times \text{N} / 100 \times \text{V}) \times 1/\text{DF}$ 计算获得生物学效价 (BT = TU/ml, transducing units),其中 P = GFP $^+$ 细胞%, N 为感染时的细胞数 10^5 , V 为加入到每孔中稀释液的体积 0.5ml, DF 为稀释度^[7]。

5. 重组慢病毒感染肿瘤细胞的荧光鉴定:将稀释的含慢病毒的培养基分别加入 24 孔板中,同时加入终浓度为 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 polybrene 以增加感染效率,感染 GLC、H157 和 YTMLC 3 种肿瘤细胞,48h 后荧光倒置显微镜下(激发波长 495nm)观察发出绿色荧光的肿瘤细胞,鉴定重组病毒对 3 种肿瘤细胞的感染性。

6. RT-PCR 测定 GLC、H157 和 YTMLC 细胞中 HIF-1 α mRNA 水平:重组慢病毒感染 GLC、H157、YTMLC 细胞,48h 后提取重组慢病毒感染细胞以及对照病毒感染细胞的总 RNA,分别以上述 RNA 为模板,用 TAKARA PrimeScript One Step RT-PCR Kit 进行 RT-PCR。总反应体系为 20 μl ,引物序列:上游 5' - GCGGATCCAACGTCGAAAAGAAAAGTCTCG - 3', 下游 5' - GCTCTAGAAAAGTTTGTGCAGTATTGTAGCC - 3'。扩增条件:50 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 30min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1min, 30 个循环,循环结束后以 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10min。1% 琼脂糖电泳鉴定 RT-PCR 产物。

7. Western blotting 检测感染重组慢病毒后 HIF-1 α 在肿瘤细胞 GLC、H157 和 YTMLC 内的表达:重组慢病毒感染 GLC、H157 和 YTMLC 细胞,于感染后 48h,去除培养基,以 PBS 洗 2 遍,加入 RIPA + PMSF 裂解液,冰里放置 30min 裂解细胞,将样品转移到 1.5ml 离心管,4 $^{\circ}\text{C}$ 14000g 高速离心 20min,将上清小心转移到干净无菌离心管中。使用 Bradford 蛋白浓度测定试剂测定蛋白浓度。样品经 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,转印到 PVDF 膜上进行免疫印迹分析。一抗为兔抗人 HIF-1 α 抗体 (1:1000),上样对照一抗为兔抗人 β -Actin (1:1000)。二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG

(1:5000), 使用 Pierce 公司 SuperSignal West PicoHRP 化学发光底物, Kodak X 线片曝光显影。

结 果

1. 重组慢病毒效价测定: 浓缩纯化后的慢病毒感染 293T 细胞, 24h 后在荧光倒置显微镜下能看到细胞中的绿色荧光, 48h 后收获细胞并用流式细胞仪检测 293T 细胞 GFP 表达率。并通过公式 $TU/ml = (P \times N / 100 \times V) \times 1 / DF$ 计算重组慢病毒的生物学效

价。经计算, 重组慢病毒的生物学效价为 2.2×10^6 TU/ml。

2. 荧光倒置显微镜鉴定重组慢病毒: 重组慢病毒感染 GLC、H157 和 YTMLC 细胞 48h 后, 荧光倒置显微镜下(激发波长 495nm), 观察到 3 种细胞均有约 30% ~ 40% 的肿瘤细胞发出绿色荧光(图 1), 说明构建的重组病毒的报告蛋白 GFP 基因有表达, 重组病毒具有感染性。而对照组未观察到明显绿色荧光。

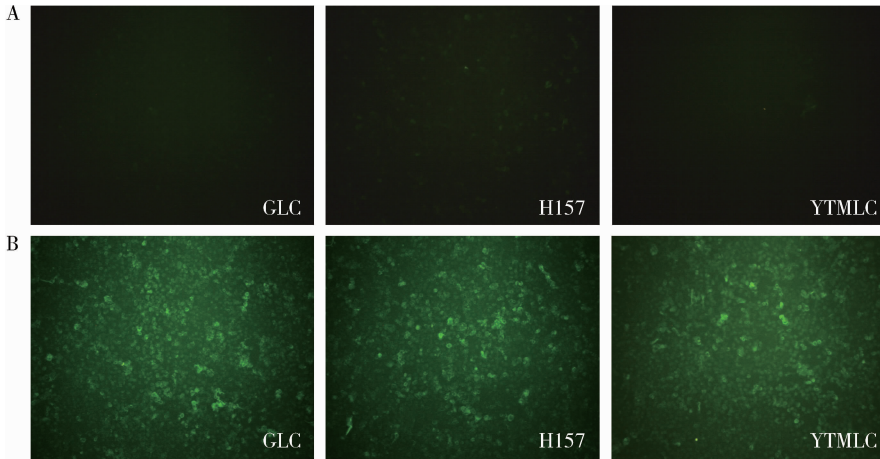
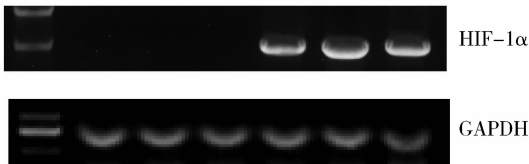


图 1 重组慢病毒感染肿瘤细胞 GLC、H157 和 YTMLC 的荧光鉴定结果

A. 对照组 GLC、H157、YTMLC 细胞; B. 重组慢病毒感染组 GLC、H157、YTMLC 细胞

3. RT-PCR 测定 GLC、H157 和 YTMLC 细胞 HIF-1 α mRNA 水平: 重组慢病毒感染 GLC、H157、YTMLC 细胞, 48h 后提取重组慢病毒感染细胞以及对照病毒感染细胞的总 RNA, 进行 RT-PCR 和 1% 琼脂糖电泳分析。琼脂糖凝胶电泳显示, HIF-1 α mODD 重组慢病毒感染后的 GLC、H157 和 YTMLC 细胞与对照病毒感染细胞相比能够检测出较高的 HIF-1 α mODD mRNA 水平(图 2)。

经 Western blotting 检测分析表明 HIF-1 α mODD 在重组慢病毒感染后的 GLC、H157 和 YTMLC 细胞中均获得高效表达, 而对照病毒感染组的细胞只能检测到微弱的内源性表达的 HIF-1 α 蛋白(图 3)。



标记 GLC H157 YTMLC GLC H157 YTMLC
感染前 感染后

图 2 重组慢病毒感染 GLC、H157 和 YTMLC 细胞前后 HIF-1 α mRNA 水平

HIF-1 α 表示 HIF-1 α mODD 基因, GAPDH 为内参

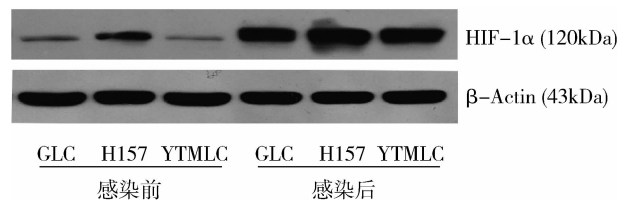


图 3 重组慢病毒感染 GLC、H157 和 YTMLC 细胞前后细胞内 HIF-1 α 的表达量
 β -Actin 表示内参

4. Western blotting 检测重组慢病毒介导的 HIF-1 α mODD 在 GLC、H157 和 YTMLC 细胞内的表达: 重组慢病毒感染肿瘤细胞后 72h 收获细胞裂解液上清,

缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 是肿瘤缺氧反应中关键性因子, 也是调节肿瘤新生血管生成、能量代谢、细胞增殖、浸润和转移等相关基因的上游转录调节蛋白^[8]。肿瘤细胞通过激活 HIF 信号通路, 导致肿瘤恶性程度的增加和肿瘤生物学行为的改变。到目前为止, 已经证明的受 HIF 调节和控制的基因超过 100 余种, 包括血管生成因子、能量代

讨 论

谢相关因子、细胞增殖相关因子等。这些基因都是影响肿瘤生存和生长的关键要素,决定着肿瘤发生、生长、转移和对放疗耐受^[9]。但由于细胞缺氧培养的条件限制,给进一步研究肿瘤缺氧信号通路这一受多因素调控的复杂网络带来一定局限。本研究利用能过量表达 HIF-1 α mODD 的慢病毒感染肿瘤细胞,由于 HIF-1 α 氧依赖降解结构域(ODDD)突变,病毒感染肿瘤细胞后表达的 HIF-1 α mODD 在正常氧压下不发生降解,从而模拟肿瘤细胞缺氧状态,建立一种简单、有效模拟肿瘤缺氧微环境下高表达 HIF-1 α 的手段,为进一步研究 HIF-1 α 在肿瘤发生与发展过程中的作用提供途径,为探索控制肿瘤发生和发展及肿瘤治疗的相关研究打下基础。

本研究中采用的包装方法是通过通过将 pWPI GW/HIF-1 α mODD 慢病毒表达质粒, pVSVG 包膜质粒,病毒结构蛋白质粒 pSPAX3 个质粒共同转染 293T 包装细胞产生完整的病毒颗粒。实验中发现收获的重组慢病毒效价与转染细胞密度、纯化方案等因素密切相关。我们采用传统的超速离心纯化和浓缩的方法,病毒量损失较大,操作比较繁琐^[7]。在随后的研究中,我们将参照相关研究论文的纯化方案加以改进或尝试使用 Millipore 公司的 Fast-Trap Virus Purification and Concentration Kits 以及 Clontech 公司的 Lenti-XTM Maxi Purification Kit 慢病毒浓缩纯化试剂盒获得高效价的病毒。

总之通过上述实验,在肿瘤细胞建立了一种简单、有效模拟肿瘤缺氧微环境下高表达 HIF-1 α 的

模型。肿瘤细胞在缺氧状态下导致 HIF-1 α 高表达后所激活的一系列缺氧反应信号通路和信号分子将是我们今后研究的重点。另外,将高表达 HIF-1 α 的肿瘤细胞接种裸鼠所建立的移植瘤模型对于肿瘤相关治疗研究也具有一定意义。

参考文献

- 1 刘芳. 缺氧微环境与实体瘤[J]. 现代诊断与治疗, 2007, 18(1): 36-39
- 2 程林峰, 杨向民. 缺氧诱导因子-1与肿瘤的关系[J]. 实用肿瘤学杂志, 2007, 21(4): 370-373
- 3 Arany Z, Foo SY, Ma Y, et al. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α [J]. Nature, 2008, 451(7181): 1008-1012
- 4 Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system[J]. Nat Med, 2003, 9(6): 677-684
- 5 Dittgen T, Nimmerjahn A, Komai S, et al. Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(52): 18206-18211
- 6 Matrai J, Chuah MK, VandenDriessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications[J]. Mol Ther Mar, 2010, 18(3): 477-490
- 7 Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors[J]. Nat Protoc, 2006, 1(1): 241-245
- 8 Sun QM, Zhou H, Binmadi NO, et al. Hypoxia-inducible factor-1-mediated regulation of semaphorin 4D affects tumor growth and vascularity[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(46): 32066-32074
- 9 孙学英, 姜宪, 姜洪池. 针对肿瘤缺氧微环境探寻新的治疗方法[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(17): 1741-1746

(收稿: 2011-05-06)

(修回: 2011-10-31)

结直肠癌淋巴结转移与 APC、p53 和 K-ras 基因变异的相关性研究

徐新民 邓周录 钱建畅 王 鹏 蔡 哲 蔡剑平

摘要 目的 探讨结直肠癌淋巴结转移与 APC、p53 和 K-ras 基因变异的相关性。**方法** 用组织 DNA 抽提试剂盒提取 32 例淋巴结转移和 20 例无淋巴结转移的结直肠癌组织 DNA, 用 DHPLC 法对 APC 基因第 15 号外显子突变富集区 (mutation cluster region, MCR) 和 p53 基因的第 4~9 外显子进行基因变异初筛, 对 K-ras 第 12、13 和 61 密码子采用 PCR 产物直接测序进行基

作者单位: 100730 北京协和医学院研究生院(徐新民); 中日友好医院(邓周录、王鹏、蔡哲); 325035 温州医学院药学院药理教研室(钱建畅); 100730 卫生部北京医院/卫生部北京老年医学研究所/卫生部老年医学重点实验室(徐新民、钱建畅、蔡剑平)

通讯作者: 蔡剑平, 电子信箱: caijp61@vip.sina.com