

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.20.003

慢病毒载体介导 HIF1 α 稳定表达 A549 细胞系构建*

邹斌¹, 周学亮^{1#}, 詹宇亮², 陈紫晴¹, 赖松青¹, 吴霞¹, 刘季春^{1 Δ}

(南昌大学第一附属医院:1.心胸外科;2.心血管内科,南昌 330006)

[摘要] **目的** 利用慢病毒载体系统构建稳定表达 HIF1 α 的 A549 细胞系。**方法** 以 NCBI 人 HIF1 α 基因编码序列为模板,设计并合成引物,PCR 法扩增 HIF1 α 。酶切回收的 HIF1 α 片段与制备的慢病毒载体 HBLV-RFP-Puro 重组反应。PCR 和基因测序鉴定重组质粒。重组质粒和辅助质粒共转染 293T 细胞。包装好的病毒经过滤、浓缩后,利用稀释计数法测定病毒滴度。制备好的慢病毒感染 A549 细胞,采用药物筛选稳定转染细胞系。荧光显微镜及 Western blot 检测观察转染及筛选效果。**结果** PCR 扩增 HIF1 α 片段经鉴定成功,重组质粒经 PCR、基因测序鉴定构建成功。成功包装获得高滴度 LV-HIF1 α 。LV-HIF1 α 感染 A549 细胞后经药物筛选,荧光显微镜下细胞带有红色荧光,Western blot 结果显示 LV-HIF1 α 组 HIF1 α 的表达水平明显高于对照组。**结论** 慢病毒载体介导 HIF1 α 稳定表达的 A549 细胞系构建成功。

[关键词] HIF1 α ;慢病毒载体;稳定表达;A549

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)20-2744-03

Establishment of A549 cell line with stable expression of HIF1 α mediated by lentiviral vector*

Zou Bin¹, Zhou Xueliang^{1#}, Zhan Yuliang², Chen Ziqing¹, Lai Songqing¹, Wu Xia¹, Liu Jichun^{1 Δ}

(1. Department of Cardiothoracic Surgery; 2. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To establish the A549 cell line with stable expression of HIF1 α by using lentiviral vector system. **Methods** Primers were designed and synthesized with human HIF1 α gene coding sequence by the National Center of Biotechnological Information (NCBI) as the template. HIF1 α was amplified by PCR. The HIF1 α fragment recycled by enzyme digestion was recombined with prepared lentiviral vector HBLV-RFP-Puro. The recombinant plasmid was identified by PCR and gene sequencing. The recombinant plasmid and the auxiliary plasmid were co-transfect into 293T cell. After filtration and concentration of packaged virus, the viral titer was detected by using the dilution counting method. The prepared lentivirus was infected A549 cells. The drug screening was adopted to stabilize the transfected cell line. The transfection effect was detected and observed by fluorescence microscope and Western blotting. **Results** The HIF1 α fragment amplified by PCR was successfully verified and the recombinant plasmid was successfully constructed by PCR and gene sequencing identification. High-titer LV-HIF1 α was obtained by successful package. After LV-HIF1 α infecting A549 cells, the cells showed the red fluorescence by fluorescence microscope. The expression level of HIF1 α in the LV-HIF1 α group was significant higher than that in the control group by Western blot. **Conclusion** The 549 cell line with HIF1 α stable expression mediated by lentivirus is constructed successfully.

[Key words] HIF1 α ; lentivirus; stable expression; A549

肺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,其导致的死亡人数居各类恶性肿瘤之首^[1]。在过去的研究中,尽管在肿瘤生物学、临床研究等方面取得了不断的进展,但肺癌的 5 年生存率仅提高了 5%^[2]。基于分子分型的个体化治疗及靶向治疗是肺癌治疗的发展方向之一。因此,肺癌的生物学研究聚焦于寻找关键驱动基因或信号通路。由于肿瘤缺氧激活的缺氧反应信号通路对肿瘤生物学行为(血管生成、侵袭、转移等)产生重要影响^[3-4]。HIF1 α 是缺氧反应信号通路关键调控因子。临床研究发现,肺癌组织 HIF1 α 的表达与淋巴结转移、分期、癌细胞分化等相关,肿瘤组织 HIF1 α 阳性的肺癌患者 5 年生存率和总生存率明显低于阴性患者,HIF1 α 可能是具有潜质的预后生物标志物^[5]。本研究基于慢病毒载体系统构建 HIF1 α 慢病毒表达载体(LV-HIF1 α),筛选稳定表达 HIF1 α 的 A549 细胞系,为

深入探讨 HIF1 α 在肺癌中的生物学作用建立基础。

1 材料与方法

1.1 材料 慢病毒包装系统(HBLV-RFP-Puro、pSPAX2、pMD2G)购于汉恒生物科技有限公司;A549 细胞、293T 细胞购于 ATCC。大肠杆菌菌株 DH5 α 购于 Invitrogen 公司;限制性内切酶购于 Fermentas 公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒购于 Axygen 公司;一步式克隆试剂盒购于南京诺唯赞生物科技有限公司;质粒 DNA 大抽提取试剂盒购于 Qiagen 公司;LipofiterTM 购于汉恒生物科技有限公司;嘌呤霉素(Puromycin)购于 Sigma 公司;mouse monoclonal to HIF1 α Antibody 购于 Stan Cruz biotechnology 公司; β -Actin Mouse Monoclonal Antibody 购于 Cell signaling technology 公司;HRP laaffinipure goat anti-Mouse IgG 购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81260024)。 作者简介:邹斌(1980—),主治医师,博士,主要从事肺癌综合治疗研究。 # 共同第一作者:周学亮(1980—),主治医师,博士,主要从事肺癌综合治疗研究。 Δ 通信作者:E-mail:liujichun999@163.com。

PCR 引物合成和目的基因测序由汉恒生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 重组慢病毒质粒 pHBLV-HIF1 α -RFP-Puro 构建 根据 NCBI 人 HIF1 α 基因编码序列设计引物,正向序列:5'-GGA TCT ATT TCC GGT GAA TTC GCC ACC ATG GAG GGC GCC GGC GG-3',反向序列:5'-GGA TCC GCG GCC GCT TCT AGA GTT AAC TTG ATC CAA AG-3',下划线序列为酶切位点。按试剂操作说明进行 PCR 扩增,50 μ L 反应体系,反应条件:95 $^{\circ}$ C,预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C,20 s;55 $^{\circ}$ C,20 s;72 $^{\circ}$ C,2.5 min;25 个循环;72 $^{\circ}$ C,延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。EcoR I、Xba I 双酶切后回收目的片段。载体 HBLV-RFP-Puro 经双酶切后回收,处理好的目的片段和载体进行重组反应(37 $^{\circ}$ C 30 min),后转化 DH5 α 细胞,接种于含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的培养皿过夜,挑选单克隆菌落,摇菌后用菌液进行 PCR 鉴定,将阳性克隆菌液测序。软件对测序的克隆序列和基因库中的序列比对分析。

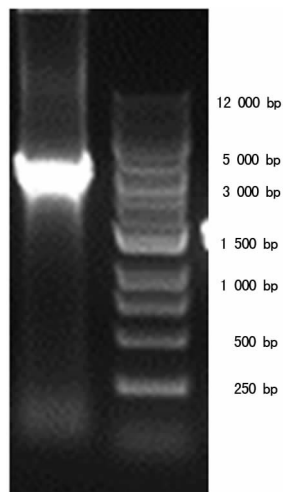
1.2.2 慢病毒包装及滴度测定 Qiagen 试剂盒大量抽提制备好的慢病毒重组质粒及其辅助包装载体质粒,按 LipofiterTM 转染试剂说明,将重组慢病毒质粒 pHBLV-HIF1 α -RFP-Puro 和辅助包装载体 pSPAX2、pMD2G 共转染 293T 细胞,转染后 6 h 更换为完全培养基,培养 48 h 和 72 h 后收集富含慢病毒颗粒的上清液,0.45 μ m 滤器过滤后离心浓缩病毒。稀释计数法测定 LV-HIF1 α 滴度。病毒做 3 倍梯度稀释(连续 6 个稀释度),准备 6 个 1.5 mL EP 管,第 1 管加入 105 μ L 培养液及 15 μ L 病毒原液,混匀后从第 1 个管吸取 40 μ L 加入第 2 个管(含有 80 μ L 培养液),依次类推。稀释好的病毒液分别加入 293T 细胞,24 h 后更换为含 Puromycin(2.5 μ g/mL)的培养液。因该慢病毒带有 Puromycin 抗性,通过感染后活细胞数目来判定滴度。显微镜下活细胞在 10%~30% 的孔计算病毒滴度。滴度(TU/mL)=细胞数 \times 百分比 \times 1(MOI) \times 病毒稀释倍数 \times 10³。

1.2.3 LV-HIF1 α 介导的 A549 稳定转染细胞系筛选 将状态良好的 A549 细胞接种于 6 孔板(5 \times 10⁵/孔),分为 LV-HIF1 α 组和慢病毒空载体组(LV-RFP-Puro)并做好标记。培养 24 h 后至融合度达 70%~80%,估计细胞数目,更换含慢病毒的培养液 1 mL(含 5 μ g/mL Polybrene),MOI 取 20,4 h 补充另半量培养液 1 mL(含 5 μ g/mL Polybrene),感染 24 h 后换完全培养基。利用该病毒携带有 Puromycin 抗性基因,采用药物筛选法筛选稳定转染细胞系。48 h 后,更换含 Puromycin(2 μ g/mL)的完全培养液进行筛选。由于该病毒同时带有 RFP 基因,成功转染后的细胞将存活并表达红色荧光蛋白,在荧光显微镜观察到红色荧光。每隔 2~3 天换液、传代,反复筛选 2 周左右,未转染的细胞逐渐被筛选,带有红色荧光的细胞即为稳定转染的细胞。在此基础上,Western blot 方法检测目的基因的表达,进一步验证转染、筛选是否成功。稳定表达目的基因的细胞系命名为 A549-HIF1 α ,对照组命名为 A549-RFP-Puro,待稳定转染细胞生长稳定后冻存细胞以备后续实验所需。

2 结果

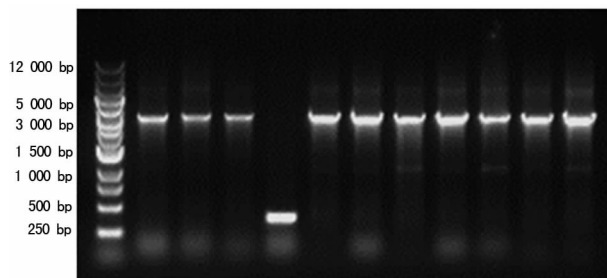
2.1 重组慢病毒质粒 pHBLV-HIF1 α -RFP-Puro 成功构建

1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 扩增后的产物(图 1),大小与预期一致。扩增的目的基因片段及慢病毒载体经酶切回收,在适当的条件下重组反应,构建重组慢病毒质粒 pHBLV-HIF1 α -RFP-Puro。重组慢病毒质粒转化 DH5 α 细胞,挑选单克隆菌落 PCR 鉴定,1% 琼脂糖凝胶电泳可见与预计相符的特异性条带(图 2),由于 PCR 鉴定用的是载体上的一段通用引物,故比理论大小大 400 bp 左右。挑选阳性克隆菌液测序,测序的克隆序列和 NCBI 数据库中基因序列比对分析,核苷酸序列完全一致。



Lane1: HIF1 α PCR 产物; Lane2: DNA Marker

图 1 目的基因 HIF1 α PCR 产物鉴定



Lane1: DNA Marker; Lane2~12: 单克隆 PCR 产物

图 2 pHBLV-HIF1 α -RFP-Puro 单克隆 PCR 产物鉴定

2.2 慢病毒包装、滴度测定 采用三质粒系统(pHBLV-HIF1 α -RFP-Puro、pSPAX2 和 pMD2G)共转染 293T 细胞包装病毒,高效转染试剂盒提高转录效率。经过滤、浓缩后采用稀释计数法测定滴度。病毒做 3 倍梯度稀释,连续 6 个浓度,分别感染 293T 细胞,后加入 Puromycin 筛选未感染慢病毒的细胞,通过感染后活细胞数目来判定病毒滴度。如果某稀释度中有 10 个活细胞,那么说明该稀释度中至少含有 10 个病毒颗粒。显微镜下观察加入不同量的慢病毒存活细胞数目(图 3)。LV-HIF1 α 组 0.033 μ L 病毒孔细胞数目估计为 4 \times 10⁴ \times 10% 左右,病毒稀释了 30 倍。滴度(TU/mL)=细胞数 \times 10% \times 1(MOI) \times 病毒稀释倍数 \times 10³=1 \times 10⁸ TU/mL。同样方法计算对照组 LV-RFP-Puro 病毒滴度。

2.3 LV-HIF1 α 介导的 A549 稳定转染细胞系成功构建 LV-HIF1 α 及 LV-RFP-Puro 分别感染 A549 细胞,利用载体同时带有 RFP 报告基因及 Puromycin 抗性基因的特点,采用 Puromycin 进行反复筛选。荧光显微镜观察,实验组和对照组细

胞均带有红色荧光(图 4),获得目的基因稳定转染细胞系 A549-HIF1 α 和阳性对照稳定转染细胞系 A549-RFP-Puro。提取细胞总蛋白,Western blot 检测两组细胞 HIF1 α 的表达,结果显示 LV-HIF1 α 组 HIF1 α 的表达明显高于 LV-RFP-Puro 组(图 5),荧光显微镜及 Western blot 结果共同证实 LV-HIF1 α 介导的 A549 细胞稳定转染细胞系构建成功。

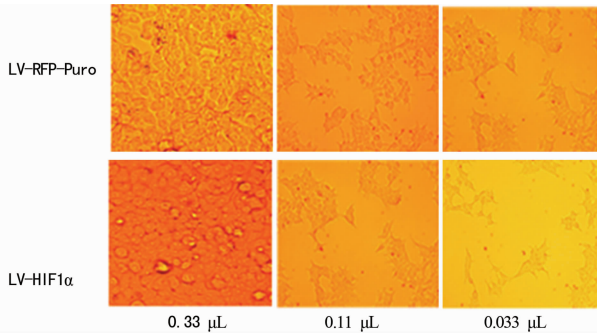
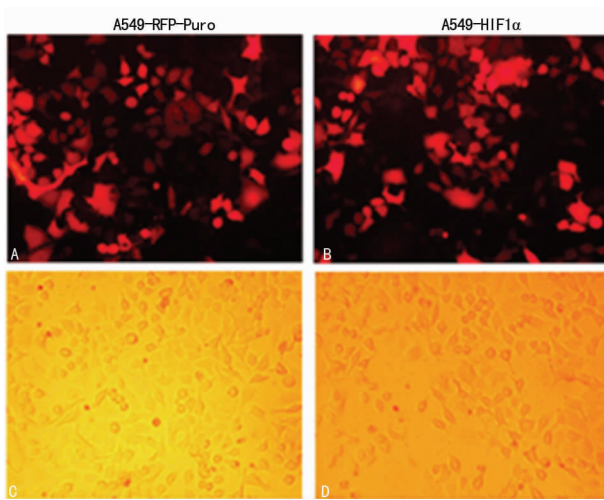


图 3 慢病毒载体滴度测定



A、B: 荧光显微镜下观察到红色荧光; C、D: 普通观察结果

图 4 荧光显微镜下观察转染及筛选效果

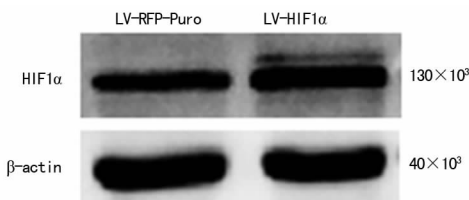


图 5 Western blot 检测 HIF1 α 的表达

3 讨论

肿瘤细胞快速分裂、增殖而肿瘤内异常血管形成,这将导致肿瘤组织氧供需失衡。包括肺癌在内的许多实体肿瘤普遍存在缺氧的现象^[6-8]。缺氧的肿瘤细胞将主要通过 HIFs 激活一系列的转录程序,如血管内皮生长因子、糖酵解酶、转化生长因子等,改变代谢,促进血管生成、侵袭、转移,并且影响肿瘤细胞对放化疗的敏感性^[3]。临床研究发现,HIF1 α 与肺癌患者临床病理学和预后相关,HIF1 α 可能是具有潜质的预后生物标志物及治疗靶点^[5-9]。近来研究发现,缺氧和 HIFs 可诱导肺腺癌细胞获得肿瘤干细胞特性^[10-12]。然而,作为缺氧反应的关键调控因子,HIF1 α 在肿瘤干细胞中的作用及机制目前还不明

了。因此本研究拟构建慢病毒载体介导 HIF1 α 稳定表达的 A549 细胞系,为进一步研究 HIF1 α 在肺癌干细胞中的作用及机制建立前期基础。

体外细胞缺氧模型通常采用缺氧或缺氧模拟物如二氯化钴来建立,虽然可以激活 HIF1 α 信号通路,但其同时也激活了 HIF2 α ,因此特异性较差。而且该缺氧细胞模型不适合用于体内肿瘤移植实验。慢病毒介导的外源基因转移具有高效、稳定、精准等特点,是目前细胞分子生物学研究常用的工具^[13-14]。慢病毒可以将其携带的目的基因整合进宿主细胞基因组中,目的基因在细胞内长期稳定表达。慢病毒转染系统是构建稳定过表达或干扰细胞系的主要方式^[15]。本研究涉及体内肿瘤移植实验,因此选择慢病毒载体系统构建 HIF1 α 过表达载体,进一步筛选其介导的 HIF1 α 稳定表达的 A549 细胞系。

该病毒同时携带有 Puromycin 抗性基因和 RFP 基因,利用该特点,采用药物筛选法筛选出稳定转染细胞系。未成功转染或非稳定表达的细胞对药物敏感,经反复药物筛选将逐渐剔除。成功转染并稳定表达的细胞在荧光显微镜下可以观察到红色荧光。经反复筛选,本研究观察到细胞形态无明显变化,70%~80% 的细胞可见红色荧光,剩余细胞未见荧光或荧光较弱。这可能有以下 2 种情况:(1)本研究所选的筛选浓度可能非最佳筛选浓度,未成功转染的细胞产生了耐药;(2)成功转染的细胞活力受到影响,Puromycin 抗性基因和 RFP 基因表达较弱,但对该浓度的 Puromycin 抵抗。笔者已采用较低病毒浓度转染细胞,以尽量减小病毒对细胞活力的影响。因此后续实验前有必要对细胞活力进行检测,通过荧光强度能间接反映目的基因的表达情况。Western blot 结果显示 LV-HIF1 α 组 HIF1 α 表达明显高于 LV-RFP-Puro 组,进一步证实 LV-HIF1 α 介导的 A549 稳定转染细胞系构建成功。

参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Johnson DH, Schiller JH, Bunn PA. Recent clinical advances in lung cancer management [J]. J Clin Oncol, 2014, 32(10): 973-982.
- [3] Wigerup C, Pühlman S, Bexell D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer [J]. Pharmacol Ther, 2016, 164(2): 152-169.
- [4] Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer [J]. Cell, 2007, 129(3): 465-472.
- [5] Yang SL, Ren QG, Wen L, et al. Clinicopathological and prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha in lung cancer: a systematic review with meta-analysis [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2016, 36(3): 321-327.
- [6] Le QT, Chen E, Salim A, et al. An evaluation of tumor oxygenation and gene expression in patients with early stage non-small cell lung cancers [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(5): 1507-1514.
- [7] Trinkaus ME, Blum R, Rischin D, et al. (下转第 2750 页)

参考文献

- [1] Bottegoni C, Dei Giudici L, Salvemini S, et al. Homologous platelet-rich plasma for the treatment of knee osteoarthritis in selected elderly patients: an open-label, uncontrolled, pilot study [J]. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2016, 8(2): 35-41.
- [2] Martinez-Zapata MJ, Marti-Carvajal AJ, Solà I, et al. Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 25(5): CD006899.
- [3] Pastar Z, Kulisic SM. Effects of platelet-rich plasma in the treatment of chronic ulcer [J]. *Acta Med Croatica*, 2016, 70(1): 65-70.
- [4] Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation [J]. *J Oral Maxillo-fac Surg*, 2000, 58(3): 297-300.
- [5] 黄国均. 医药实验动物模型: 制作与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [6] 秦川. 实验动物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [7] Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data [J]. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1971, 53(3): 523-537.
- [8] Sánchez M, Anitua E, Delgado D, et al. A new strategy to tackle severe knee osteoarthritis: Combination of intra-articular and intraosseous injections of Platelet Rich Plasma [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2016, 16(5): 627-643.
- [9] Tsutsumi R. Celecoxib inhibits production of MMP and NO via down-regulation of NF- κ B and iNOS in a PGE2 independent manner in human articular chondrocytes [J]. *Rheumatol Int*, 2008, 28(8): 727-736.
- [10] Mastbergen SC. Inhibition of COX-2 by celecoxib in the canine groove model of osteoarthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2006, 45(4): 405-413.
- [11] Rasheed N, Alghasham A, Rasheed Z. Lactoferrin from camelus dromedarius inhibits nuclear transcription factor- κ B activation, cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in stimulated human chondrocytes [J]. *Pharmacognosy Res*, 2016, 8(2): 135-141.
- [12] Kim HJ, Yeom JS, Koh YG, et al. Anti-inflammatory effect of platelet-rich plasma on nucleus pulposus cells with response of TNF- α and IL-1 [J]. *Orthop Res*, 2014, 32(4): 551-556.
- [13] Bendinelli P, Matteucci E, Dogliotti G, et al. Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF- κ B inhibition via HGF [J]. *Cell Physiol*, 2010, 225(3): 757-767.

(收稿日期: 2017-02-11 修回日期: 2017-04-16)

(上接第 2746 页)

- al. Imaging of hypoxia with 18F-FAZA PET in patients with locally advanced non-small cell lung cancer treated with definitive chemoradiotherapy [J]. *J Med Imaging Radiat Oncol*, 2013, 57(4): 475-481.
- [8] Osinsky S, Zavelevich M, Vaupel P. Tumor hypoxia and malignant progression [J]. *Exp Oncol*, 2009, 31(2): 80-86.
- [9] Ren W, Mi D, Yang K, et al. The expression of hypoxia-inducible factor-1 α and its clinical significance in lung cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Swiss Med Wkly*, 2013, 143(5): w13855.
- [10] Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, et al. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(13): 4640-4652.
- [11] Murakami A, Takahashi F, Nurwidya F, et al. Hypoxia increases gefitinib-resistant lung cancer stem cells through the activation of insulin-like growth factor 1 receptor [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86459.
- [12] Zhao M, Zhang Y, Zhang H, et al. Hypoxia-induced cell stemness leads to drug resistance and poor prognosis in lung adenocarcinoma [J]. *Lung Cancer*, 2015, 87(2): 98-106.
- [13] 孟凡荣, 陈琛, 万海粟, 等. 慢病毒载体及其研究进展 [J]. *中国肺癌杂志*, 2014(12): 870-876.
- [14] 张曼, 孙秀萍, 宋铭晶. 慢病毒载体用于转基因技术的研究进展 [J/CD]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2014, 8(10): 1949-1953.
- [15] Khetawat D, Broder CC. A functional henipavirus envelope glycoprotein pseudotyped lentivirus assay system [J]. *Virol J*, 2010, 7(1): 312.

(收稿日期: 2017-02-09 修回日期: 2017-04-14)

欢迎投稿

欢迎订阅