

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00247

· 论 著 ·

hSulf-1 基因腺病毒表达载体的构建及其对血管内皮细胞增殖、迁移能力的影响

季卫丹¹, 包龙龙¹, 严妍², 曹璐², 傅晓辉², 姜小清², 苏长青^{1,2*}

1. 苏州大学医学部遗传学系, 苏州 215123

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤研究室, 上海 200438

[摘要] **目的** 构建携带人硫酸酯酶 1 基因(hSulf-1)的腺病毒载体, 研究其对于人脐静脉内皮细胞 ECV-304 增殖、迁移能力的影响。**方法** 通过基因操作技术将 hSulf-1 基因插入到腺病毒基因组中, 构建重组腺病毒 Ad5-hSulf1; 应用蛋白质免疫印迹法检测 hSulf-1 蛋白在 ECV-304 细胞中的表达及细胞内磷酸化 Akt、ERK 的表达变化; MTT 实验检测 hSulf-1 过表达对于 ECV-304 细胞增殖的影响; 采用划痕实验研究 hSulf-1 过表达对于 ECV-304 细胞迁移的影响。**结果** 成功构建携带目的基因 hSulf-1 的腺病毒载体; 免疫印迹结果表明 hSulf1 基因过表达会下调 ECV-304 细胞 Akt 和 ERK 信号分子的磷酸化水平; 细胞增殖实验结果表明 hSulf1 基因过表达抑制了 ECV-304 细胞增殖, 感染复数为 50、100 时细胞存活率下降至 $(68.49 \pm 0.05)\%$ 以及 $(67.78 \pm 0.06)\%$ ($P < 0.05$); 划痕实验结果表明 hSulf1 基因过表达能够抑制细胞的迁移, 相比于对照组细胞迁移能力减弱 ($P < 0.01$)。**结论** 重组腺病毒 Ad5-hSulf1 介导的 hSulf-1 基因在 ECV-304 细胞中的过表达明显抑制细胞增殖及迁移, 为 hSulf-1 用于肿瘤及血管生长相关疾病的基因治疗奠定了基础。

[关键词] 腺病毒; hSulf-1 基因; 血管; 内皮细胞; 细胞增殖; 细胞运动

[中图分类号] R 730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2012)03-0247-05

Construction of adenovirus vector carrying hSulf-1 gene and its effects on proliferation and migration of human endothelial cells

Ji Wei-dan¹, Bao Long-long¹, Yan Yan², Cao Lu², Fu Xiao-hui², Jiang Xiao-qing², Su Chang-qing^{1,2*}

1. Department of Medical Genetics, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China

2. Department of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To construct a recombinant adenovirus vector carrying hSulf-1 gene and to investigate its effect on the proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells. **Methods** The hSulf-1 protein was inserted into adenovirus genome to generate recombinant adenovirus Ad5-hSulf1, and then the virus was used to infect ECV-304 cell line. The expression of hSulf-1 protein was detected by Western blotting analysis, the cell viability was examined by MTT assay, and the cell migration ability was evaluated by wound-healing assay in ECV-304 cells. **Results** The recombinant adenovirus Ad5-hSulf1 was successfully constructed. Western blotting analysis showed that over-expression of hSulf1 down-regulated the phosphorylation levels of Akt and ERK in ECV-304 cells. MTT assay showed that over-expression of hSulf1 inhibited the proliferation of ECV-304 cells, with the cell survival rate decreased to $(68.49 \pm 0.05)\%$ at MOI of 50 pfu/ml and $(67.78 \pm 0.06)\%$ at MOI of 100 pfu/ml ($P < 0.05$). Wound-healing assay showed that over-expression of hSulf1 significantly inhibited the migration of ECV-304 cells compared with the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** The recombinant adenovirus Ad5-hSulf1-mediated hSulf-1 over-expression can markedly inhibit the proliferation and migration of ECV-304 cells, laying a foundation for hSulf-1 related gene therapy of tumor and angiogenesis-associated diseases.

[Key words] adenovirus; hSulf-1 gene; blood vessels; endothelial cells; cell proliferation; cell movement

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(3): 247-251]

人硫酸酯酶 1(hSulf-1)是一个细胞生长的负向 调控因子, 在人体正常组织中恒定表达, 而在绝大多

[收稿日期] 2011-12-14

[接受日期] 2012-01-16

[基金项目] 国家科技重大专项(2009ZX09102-235), 国家自然科学基金(81172019, 81172303). Supported by National Science and Technology Project(2009ZX09102-235) and National Natural Science Foundation of China(81172019, 81172303).

[作者简介] 季卫丹, 硕士生. E-mail: jiweidan326@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875351, E-mail: suchangqing@gmail.com

数的肿瘤细胞系和肿瘤组织中(如乳腺癌、胰腺癌、肾脏癌、肝细胞癌等)表达水平下调^[1-3]。因此,hSulf-1基因在肿瘤治疗中是一个很有潜力的分子靶点。已有研究证明,肿瘤细胞中hSulf-1基因的再表达会导致细胞增殖、迁移、侵袭能力有所减弱,同时促进药物诱导的肿瘤细胞的凋亡,抑制肿瘤发生和血管形成^[4]。血管新生和个体发育及器官组织形成、组织损伤与修复、肿瘤发生与转移等很多疾病关系非常密切。血管内皮细胞增殖与迁移的变化直接影响到毛细血管结构的形成^[5-6]。因此,血管内皮细胞增殖及迁移在血管新生、肿瘤形成与发展中具有重要的理论意义与研究价值。本研究通过构建hSulf-1基因腺病毒表达载体,研究其对血管内皮细胞ECV-304增殖与迁移能力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人血管内皮细胞系 ECV-304 购自中国科学院上海细胞研究所细胞库,携带 hSulf-1 全长 cDNA 的质粒 pcDNA3.1-hSulf1 由 Viji Shridhar 教授(美国明尼苏达州罗切斯特市梅奥医学中心实验病理学实验室)赠予,腺病毒质粒 pDC315、包装质粒 pBHGloxdelE13cre、HEK293 细胞均购自加拿大 Microbix 生物技术公司,转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司,限制性内切酶、T₄ 连接酶系 NEB 公司产品,四甲基偶氮唑盐(MTT)为 Sigma 公司产品,胎牛血清、DMEM 培养基为 Gibco 公司产品,兔抗 hSulf1 抗体为美国 Abcam 公司产品,t-Akt、t-ERK、p-Akt、p-ERK 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,携带绿色荧光蛋白报告基因(EGFP)的腺病毒 Ad5-EGFP 由第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤研究室构建并保存。

1.2 腺病毒载体构建 以 pcDNA3.1-hSulf1 为模板,以目的基因 hSulf-1 引物(P1: 5'-CGG GAT CCA CCA TGA AGT ATT CTT GC-3', P2: 5'-GCG TCG ACT TAA CCT TCC CAT CCC ATA AC-3')扩增 hSulf-1 cDNA,反应条件: 94℃ 变性 2 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 60 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物行 BamH I + Sal I 双酶切,插入到腺病毒质粒载体 pDC315 的多克隆位点区,构建 pDC315-hSulf1。利用 Lipofectamine 2000 转染试剂,将 pDC315-hSulf1 与腺病毒包装质粒 pBHGloxdelE13cre 一起转入 HEK293 细胞中,几天后出现肉眼可见腺病毒噬斑,吸取单个噬斑至 24 孔板中,一孔一斑,小量扩增后将细胞和培养液一同回收,37℃/-80℃ 反复冻融 3 次后,9 670×g 离

心 15 min,弃去细胞碎片,取上清液用于重组腺病毒 Ad5-hSulf1 的鉴定及大量扩增。取 10 μl 病毒悬液加等量蛋白酶 K(20 mg/ml),55℃ 处理 1 h,100℃ 灭活 5 min。取 2 μl 作为模板进行 PCR 鉴定。用引物 P1/P2 鉴定 hSulf1,同时进行 DNA 测序确认。鉴定正确后,用 HEK293 细胞进行大量扩增,氯化铯梯度离心法纯化病毒。得到纯的重组腺病毒 Ad5-hSulf1,TCID₅₀法测定病毒滴度^[7]。

1.3 蛋白质免疫印迹分析 取对数生长期的 ECV-304 细胞接种于 6 孔板,2×10⁵ 细胞/孔。过夜培养后,分别以感染强度(MOI)=50、100 加入 Ad5-hSulf1 进行感染,设 MOI=100 的 Ad5-EGFP 阴性病毒对照组和无病毒感染的空白对照组。感染后 2 h 换成培养液,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 48 h,回收并裂解细胞,采用蛋白质免疫印迹检测 hSulf1、Akt、ERK 蛋白的表达。

1.4 细胞增殖实验(MTT 法) 收集对数生长期 ECV-304 细胞,用含 10% 血清的培养液配制成单细胞悬液,铺 96 孔板,每孔 100 μl(1×10⁴ 个细胞),置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养过夜。以无血清培养液稀释病毒,以 MOI=50、100 加入 Ad5-hSulf1 进行感染,设 MOI=100 的 Ad5-EGFP 阴性病毒对照组和无病毒感染的空白对照组,每组设 5 个复孔。37℃、5% CO₂ 孵箱培养 48 h,加入 5 mg/ml 的 MTT 试剂 20 μl/孔,置于 37℃、5% CO₂ 孵箱继续培养 4 h,吸去孔内的培养液,每孔加入 150 μl DMSO,在摇床上低速振荡 10 min,酶联免疫检测仪上测定 570 nm 波长处光密度(D)值,校正波长为 655 nm。计算公式: 细胞生存率(%)=(实验孔 D₅₇₀/空白对照组 D₅₇₀)×100%。

1.5 细胞划痕实验 将基质胶与无血清培养液以 1:9 混匀后铺 6 孔板,每孔 300 μl 铺匀,4℃ 过夜。吸弃剩余液体,加入基底膜水化剂(无血清培养液+10 mg/ml BSA),置 37℃ 孵箱中。1 h 后铺细胞,在每个孔中加入相同体积的细胞悬液(2×10⁵ 细胞/孔,60%~70% 汇合度)。待细胞贴壁之后,按 MOI=50、100 加入 Ad5-hSulf1 进行感染,设 MOI=100 的 Ad5-EGFP 阴性病毒对照组和无病毒感染的空白对照组。培养 4 h 后吸去培养液,PBS 洗细胞 2~3 次,加入含血清的培养液继续培养至细胞长满。用小枪头划痕,PBS 洗细胞 3 次,除去划下的细胞,加入血清培养液,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,0、12、24、36、48 h 时间点拍照,直尺测量 5 次,以 0 h 和 48 h 两个时间点之间的细胞迁移距离的平均值进行统计分析。

1.6 统计学处理 实验重复 3 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表

示,数据两两比较采用配对资料 t 检验,采用 SPSS 13.0 软件包,检验水平(α)为 0.05。

2 结 果

2.1 重组腺病毒的鉴定和扩增 挑取 4 个重组腺病毒克隆进行 PCR 鉴定,琼脂糖凝胶电泳结果(图 1A)显示 4 个克隆均成功携带 hSulf1 基因,DNA 测序结果见图 1B,与插入的 hSulf1 基因基因序列完全吻合。PCR 和测序均说明重组腺病毒 Ad5-hSulf1 构建成功。TCID₅₀ 法测病毒滴度,Ad5-hSulf1 为 1.15×10^{10} pfu/ml,对照病毒 Ad5-EGFP 滴度为 1.80×10^8 pfu/ml。

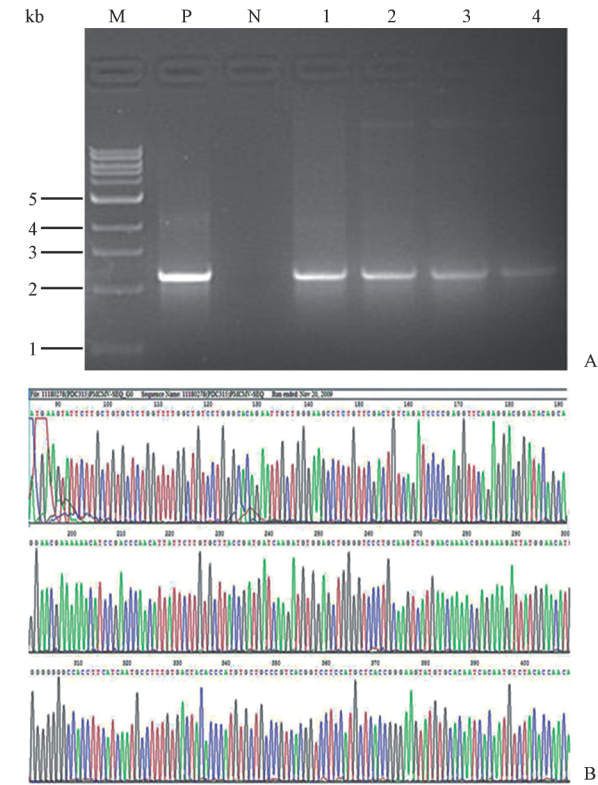


图 1 携带 hSulf-1 基因的腺病毒克隆鉴定

Fig 1 Identification of adenovirus clones carrying hSulf-1 gene by PCR(A) and DNA sequencing(B)

M: 1 kb DNA ladder; P: pDC315-hSulf1 plasmid as positive control; N: Negative control; 1-4: Four adenovirus clones

2.2 hSulf-1 表达的免疫印迹检测结果 ECV-304 细胞以 MOI=50、100 感染 Ad5-hSulf1,培养 48 h 后,与感染空载对照病毒 Ad5-EGFP 的 ECV-304 细胞以及未感染病毒的 ECV-304 细胞相比,hSulf1 蛋白水平增高($P<0.05$),t-Akt 和 t-ERK 水平不变,而 p-Akt 和 p-ERK 水平均有所下降($P<0.05$, $P<0.01$,图 2)。

2.3 细胞增殖实验结果 ECV-304 细胞感染 Ad5-

hSulf1 后 48 h,MTT 法测定细胞存活率。Ad5-hSulf1 感染组 MOI=50、100 时细胞存活率分别为 $(68.49 \pm 0.05)\%$ 、 $(67.78 \pm 0.06)\%$,与空白对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$),而阴性对照组与空白对照组差异无统计学意义($P>0.05$,图 3),说明 hSulf-1 蛋白过表达能抑制 ECV-304 细胞增殖。两个不同 MOI 的实验组之间细胞存活率变化不大。

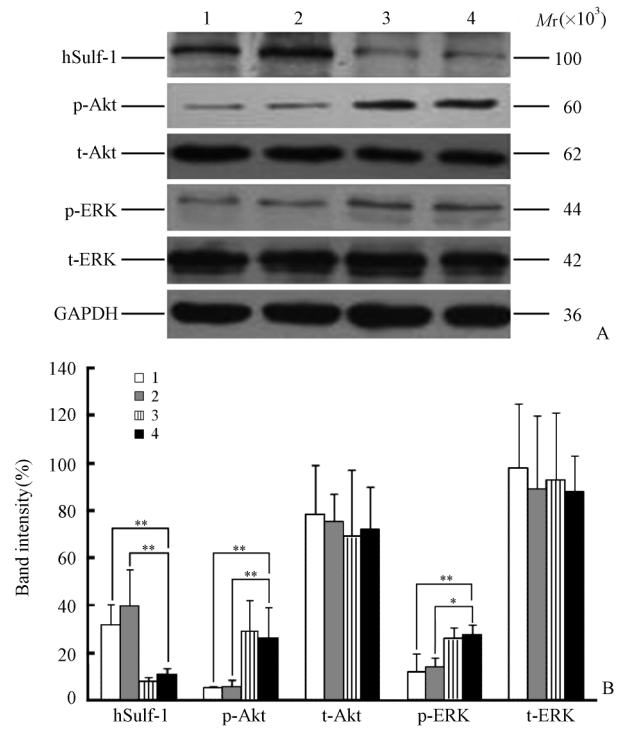


图 2 ECV-304 细胞感染 Ad5-hSulf1 后 hSulf-1 及相关信号蛋白的变化

Fig 2 Expression of hSulf-1 and its related pathway proteins in ECV-304 cell after Ad5-hSulf1 infection

A: Western blotting band images; B: Relative band intensities. 1: ECV-304 cells were infected with Ad5-hSulf1 at an MOI of 50 pfu/ml; 2: ECV-304 cells were infected with Ad5-hSulf1 at an MOI of 100 pfu/ml; 3: Negative control (ECV-304 cells were infected with Ad5-EGFP); 4: Blank group. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.4 细胞划痕实验结果 细胞划痕结果显示,Ad5-hSulf1 感染组 MOI=50、100 时细胞迁移距离分别为 (0.55 ± 0.03) cm 和 (0.50 ± 0.02) cm,而阴性对照组和空白对照组为 (1.05 ± 0.05) cm 和 (1.10 ± 0.05) cm。阴性对照组与空白对照组之间细胞迁移距离差异无统计学意义($P>0.05$),而两个实验组相比于空白对照组,细胞迁移能力均减弱($P<0.01$)。两个实验组之间细胞的迁移距离差异无统计学意义($P>0.05$)。实验结果说明,hSulf1 蛋白过表达在一定程度上能够抑制 ECV-304 细胞的迁移。见图 4。

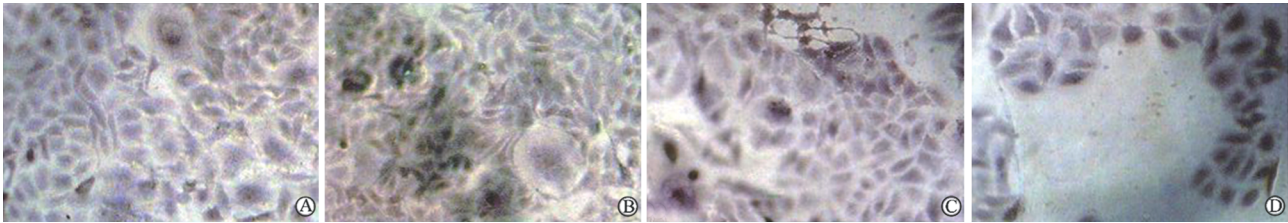


图 3 显微镜下观察 Ad5-hSulf1 对于 ECV-304 细胞存活率的影响

Fig 3 Viability of ECV-304 cells after Ad5-hSulf1 infection

A: Blank control; B: Negative control; C: MOI=50; D: MOI=100. Original magnification; ×200

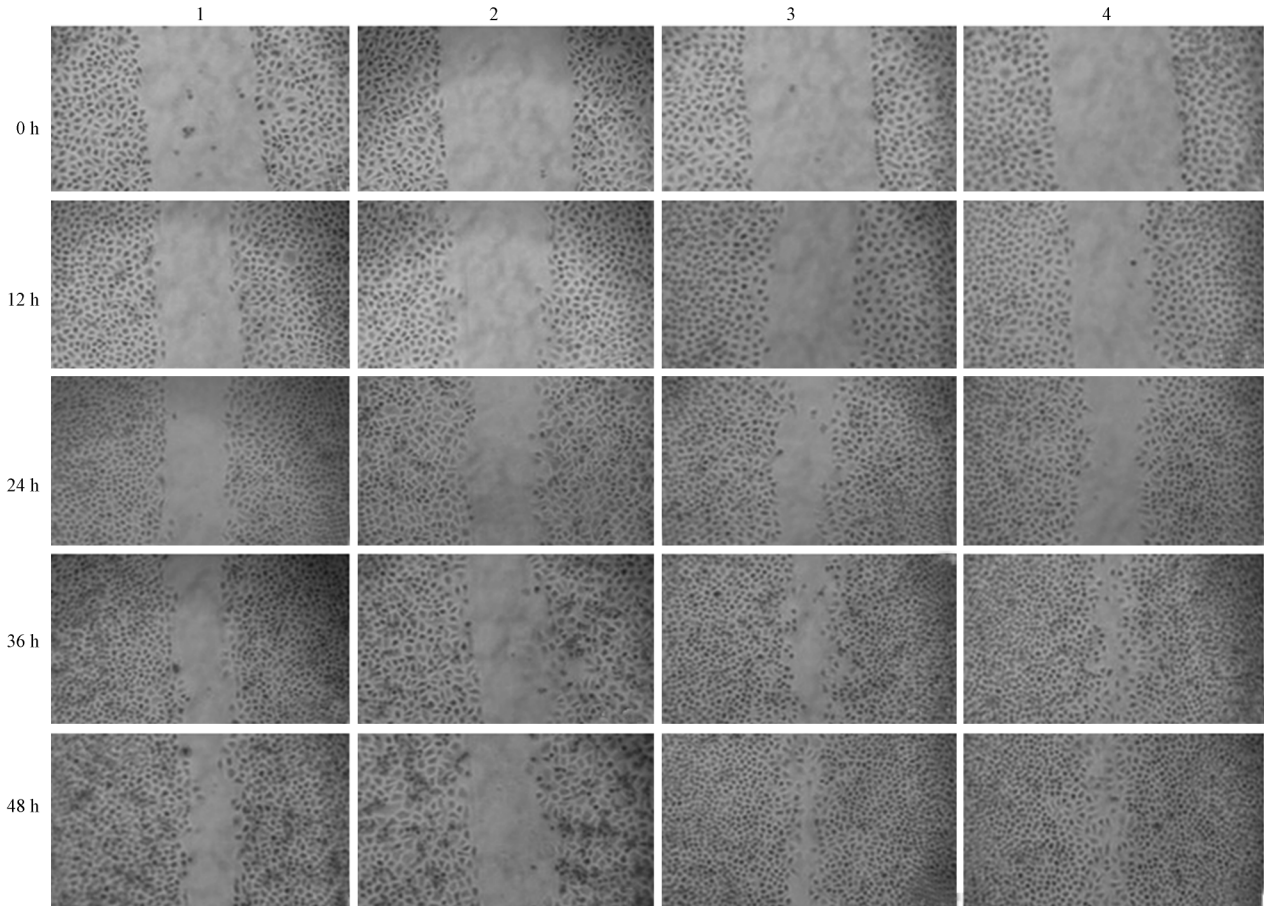


图 4 ECV-304 感染 Ad5-hSulf1 后细胞迁移能力的变化

Fig 4 Migration ability of ECV-304 cells after Ad5-hSulf1 infection

1: ECV-304 cells were infected with Ad5-hSulf1 at an MOI of 50 pfu/ml; 2: ECV-304 cells were infected with Ad5-hSulf1 at an MOI of 100 pfu/ml; 3: Negative control (ECV-304 cells were infected with Ad5-EGFP); 4: Blank group

3 讨论

hSulf-1 是近年来发现的一种新型肿瘤抑制基因,人恶性肿瘤中 hSulf-1 常处于失活状态^[1-3]。hSulf-1 基因的杂合性丢失、CpG 岛甲基化以及组蛋白修饰可能是 hSulf-1 基因失活的主要原因^[8-9]。hSulf-1 阴性表达的肿瘤细胞导入外源 hSulf-1 基因后,可引起细胞增殖速度的下降,并提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,诱导肿瘤细胞凋亡^[1]。研究发现,hSulf-1 基因是通过自身的硫酸酯酶活性而发挥作用的。细胞表面的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖

(HSPGs)是细胞与细胞外基质相互作用的关键糖蛋白,HSPGs 的硫酸化作用对于胞外生长因子和它们的酪氨酸激酶受体之间的相互作用中十分关键^[10-11]。hSulf-1 基因能够使细胞表面的 HSPGs 脱硫酸化,降低了 HSPGs 的硫酸化程度,影响与 HSPGs 密切相关的多种胞外信号分子与其相应受体结合的过程^[12-13],从而抑制 HSPGs 介导的酪氨酸激酶的激活,下调生长因子和细胞因子信号途径,尤其是肝素结合生长因子的信号通路^[3,14],如成纤维细胞生长因子(FGF)、表皮生长因子(EGF)、肝细胞生长因子(HGF)、血管表皮生长因子(VEGF)等。

这些生长因子信号通路(MAPK、ERK、PI3K/AKT)的下调,促使肿瘤细胞的增殖和迁徙能力显著减弱。

我们之前的一项研究证实,用携带 hSulf-1 基因的腺病毒来治疗小鼠的肝癌和卵巢癌移植瘤,显示 hSulf-1 表达可通过抑制 VEGFR-2 信号途径使瘤内血管密度降低、瘤体生长减弱^[1]。为进一步研究 hSulf-1 对血管的作用机制,本研究通过腺病毒载体将目的基因 hSulf-1 转染到血管内皮细胞 ECV-304 中,使 hSulf-1 蛋白在细胞中过表达,观察 hSulf-1 对于血管内皮细胞生长、迁移的影响。细胞学实验结果显示,Ad5-hSulf1 感染 ECV-304 细胞后能有效提高 hSulf-1 的表达,并且引起细胞内磷酸化 Akt 和 ERK 的水平下调。这与 hSulf-1 基因对癌细胞分子调控的机制一致。肿瘤细胞 hSulf-1 基因的表达会阻止胞外的生长因子和膜上的受体结合,从而抑制下游 Akt、ERK 的活化,导致磷酸化的 Akt 和 ERK 水平下降。在血管内皮细胞中,正常状态下 hSulf-1 基因恒定表达,当导入外源 hSulf-1 基因使其过量表达时,同样引起 HSPGs 脱硫酸化,使胞外信号分子与膜上受体结合受阻,下游信号通路无法被激活。细胞增殖实验结果显示,Ad5-hSulf1 以 MOI=50、100 感染 ECV-304 细胞,细胞存活率下降到 $(68.49 \pm 0.05)\%$ 、 $(67.78 \pm 0.06)\%$,抑制了细胞的增殖。细胞划痕实验结果同样显示,过表达 hSulf-1 的血管内皮细胞迁移能力减弱。我们知道,ERK、PI3K/Akt 信号通路与细胞的增殖、迁移密切相关,过表达 hSulf-1 导致 Akt、ERK 无法被激活,细胞内一系列信号通路水平下调,细胞最终表现为生长抑制,细胞运动和侵袭能力减弱。

肿瘤的生长是一个依赖于血管的过程,当肿瘤体积超过 $1 \sim 2 \text{ mm}^3$ 时,维持其生长就离不开新生血管的生成。肿瘤血管生成是当今肿瘤研究的热点和前沿领域。本研究发现外源性 hSulf-1 基因能够抑制血管内皮细胞的增殖及迁移,阻止血管新生。另有大量研究证实,向肿瘤细胞内导入 hSulf-1 基因会抑制肿瘤细胞生长和转移,促进肿瘤细胞凋亡^[8,15-16]。因此采用靶向 hSulf-1 基因的治疗策略,能同时抑制肿瘤细胞和血管内皮的增殖与迁移,在一定程度上遏制了肿瘤无限制生长和瘤内血管新生。由此可见,hSulf-1 基因作为一个很有潜力的抗癌基因,为临床上肿瘤的基因治疗提供了新的分子靶标。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Ji W, Yang J, Wang D, Cao L, Tan W, Qian H, et al. hSulf-1 gene exhibits anticancer efficacy through negatively regulating VEGFR-2 signaling in human cancers[J]. PLoS One, 2011, 6: e23274.
- [2] Narita K, Chien J, Mullany S A, Staub J, Qian X, Lingle W L, et al. Loss of hSulf-1 expression enhances autocrine signaling mediated by amphiregulin in breast cancer[J]. J Biol Chem, 2007, 282:14413-14420.
- [3] Khurana A, Liu P, Mellone P, Lorenzon L, Vincenzi B, Datta K, et al. HSulf-1 modulates FGF2- and hypoxia-mediated migration and invasion of breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2011, 71:2152-2161.
- [4] Lai J, Chien J, Staub J, Avula R, Greene E L, Matthews T A, et al. Loss of hSulf-1 up-regulates heparin-binding growth factor signaling in cancer[J]. J Biol Chem, 2003, 278:23107-23117.
- [5] Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis[J]. Cell, 2011, 146:873-887.
- [6] Escudier B, Albiges L. Vascular endothelial growth factor-targeted therapy for the treatment of renal cell carcinoma[J]. Drugs, 2011, 71:1179-1191.
- [7] LaBarre D D, Lowy R J. Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID50 and plaque assays[J]. J Virol Methods, 2001, 96:107-126.
- [8] Chen Z, Fan J Q, Li J, Li Q S, Yan Z, Jia X K, et al. Promoter hypermethylation correlates with the hSulf-1 silencing in human breast and gastric cancer[J]. Int J Cancer, 2009, 124:739-744.
- [9] Staub J, Chien J, Pan Y, Qian X, Narita K, Aletti G, et al. Epigenetic silencing of hSulf-1 in ovarian cancer: implications in chemoresistance[J]. Oncogene, 2007, 26:4969-4978.
- [10] Raman K, Kuberan B. Chemical tumor biology of heparan sulfate proteoglycans[J]. Curr Chem Biol, 2010, 4:20-31.
- [11] Lemjabbar-Alaoui H, van Zante A, Singer M S, Xue Q, Wang Y Q, Tsay D, et al. Sulf-2, a heparan sulfate endosulfatase, promotes human lung carcinogenesis[J]. Oncogene, 2010, 29:635-646.
- [12] Hossain M M, Hosono-Fukao T, Tang R, Suqaya N, van Kuppevelt T H, Jenniskens G J, et al. Direct detection of HSulf-1 and HSulf-2 activities on extracellular heparan sulfate and their inhibition by PI-88[J]. Glycobiology, 2010, 20:175-186.
- [13] Frese M A, Milz F, Dick M, Lamanna W C, Dierks T. Characterization of the human sulfatase sulf1 and its high-affinity heparin/heparan sulfate interaction domain[J]. J Biol Chem, 2009, 284:28033-28044.
- [14] Lai J P, Chien J, Strome S E, Staub J, Montoya D P, Greene E L, et al. hSulf-1 modulates HGF-mediated tumor cell invasion and signaling in head and neck squamous carcinoma[J]. Oncogene, 2004, 23:1439-1447.
- [15] Liu P, Gou M, Yi T, Xie C, Qi X, Zhou S, et al. Efficient inhibition of an intraperitoneal xenograft model of human ovarian cancer by HSulf-1 gene delivered by biodegradable cationic heparin-polyethyleneimine nanogels[J]. Oncol Rep, 2012, 27:363-370.
- [16] Li J, Mo M L, Chen Z, Yang J, Li Q S, Wang D J, et al. HSulf-1 inhibits cell proliferation and invasion in human gastric cancer[J]. Cancer Sci, 2011, 102:1815-1821.

[本文编辑] 尹 茶