

慢病毒介导的 GFP-Hsp90 α E47A 基因在 HepG2 细胞表达及对细胞增殖性影响的研究*

尹强兵[#] 王晓捷[#] 马晓姣 邹 飞 陈雪梅[△]

(南方医科大学公共卫生与热带医学院职业卫生与职业医学系 广东 广州 510515)

摘要 目的 建立真核细胞表达的 GFP-Hsp90 α E47A 基因重组慢病毒载体三质粒包装细胞系统,并检测其对细胞增殖性的影响,为进一步研究 HSP90 分子伴侣功能奠定基础。方法 制备完整的重组慢病毒载体三质粒系统:转移质粒(Hsp90 α E47A/psin-GFP),包装质粒(Δ NRF)及包膜蛋白质粒(VSV-G)。磷酸钙法将三质粒共转染 293T 包装细胞,48 h 后收集病毒上清。将制备好的慢病毒颗粒感染 HepG2 细胞,在荧光显微镜下观察报告基因 GFP 的表达情况,Western blot 检测 HepG2 细胞 GFP-Hsp90 α 表达。MTT 法检测细胞增殖情况。结果 转染后的 293T 和感染后的 HepG2 细胞能观察到较强的绿色荧光 培养液上清病毒滴度约为 3.0×10^3 ifu/ μ l,HepG2 细胞中有 GFP-Hsp90 α 蛋白的表达。内源性 Hsp90 α 表达无明显上升(为对照组的 1.05 ± 0.15 倍, $P < 0.05$ t 检验),有明显外源性 GFP-Hsp90 α E47A 蛋白的表达,为对照组内源性 Hsp90 α 的 0.68 ± 0.12 倍。外源性 GFP-Hsp90 α E47A 蛋白的表达 HepG2 细胞增殖活性于第 4d 有明显抑制。(1.051 ± 0.03 vs 1.349 ± 0.05 , $P < 0.05$ t 检验)。结论 成功建立重组慢病毒载体的三质粒包装细胞系统,并将 GFP-Hsp90 α E47A 基因在 HepG2 细胞中稳定表达,且并未引起细胞明显的热休克反应而导致的内源性 Hsp90 α 增高;且能明显抑制细胞增殖,为后期 Hsp90 α 分子伴侣功能进行研究奠定基础。

关键词 热休克蛋白 90 ;ATP 酶活性;慢病毒载体 绿色荧光蛋白

中图分类号:Q256 Q75 Q78 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)09-1643-04

Expression of Recombinant GFP-Hsp90P E47A Gene by Lentiviral Vector Transfection and Its Effect on Cell Proliferation in HepG2 Cells*

YIN Qing-bing[#], WANG Xiao-jie[#], MA Xiao-jiao, ZOU Fei, CHEN Xue-mei[△]

(Department of Occupational Health and Occupational Medicine, School of Public Health and Tropical Medicine, South Medical University, Guangzhou 510515)

ABSTRACT Objective: To construct the three-plasmid packaging cell line of the recombinant lentiviral vector encoding Hsp90 α E47A/psin-GFP gene and investigate the molecular chaperon function of hsp90 α . **Methods:** The three-plasmid recombinant lentiviral vector, which was made up of the vector plasmid (Hsp90 α E47A/psin-GFP), the packaging plasmid (Δ NRF) and the envelop plasmid encoding the vesicular stomatitis virus-glycoprotein (VSV-G), was isolated and purified. Human embryonic kidney 293T cells were co-transfected with the three plasmids by calcium phosphate method. 48 hours after the transfection, the viral supernatant was collected to infect HepG2 cells. The expression of reporter gene GFP was detected by fluorescence microscope, and the GFP-Hsp90 α E47A protein expressed in HepG2 cells was detected by Western blot. Cell proliferation was tested by CCK-8 method. **Results:** There was strong expression of GFP s in 293T and HepG2 cells after transfection. The viral titer was 3.0×10^3 ifu/ μ l. The expression of GFP-Hsp90 α in HepG2 cells was confirmed by Western blot. Cell proliferation of GFP-Hsp90 α E47A protein expressing HepG2 cells was obviously inhibited at 4d. (1.051 ± 0.03 vs 1.349 ± 0.05 , $P > 0.05$ t test). **Conclusion:** The three-plasmid packaging cell line system of recombinant lentiviral vector was successfully established, cell proliferation was obviously inhibited by GFP-Hsp90 α E47A gene transfection, which will provide a basis for exploring the molecular chaperon function of Hsp90 α .

Key words: Hsp90 α ; ATPase activity; Lentiviral vector; Green fluorescence protein

Chinese Library Classification(CLC): Q256, Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)09-1643-04

前言

热休克蛋白(Heat Shock Protein, HSPs)是一类与应激密切相关的保护性分子。HSPs 通过帮助底物蛋白质正确折叠,稳定

蛋白质构象,清除不可修复的蛋白质,实现其应激保护机制。HSP90 是热休克蛋白类中重要的分子伴侣,与正常的生物合成、应激反应及机体的稳态调控密切相关,与其他热休克蛋白类不同,其底物蛋白多为信号转导的关键分子^[1]。Hsp90 与激

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.305000580, No.30971193) 广东省自然科学基金资助(No.05300465)

[#] 共同第一作者:尹强兵(1983-)硕士研究生 研究方向:应激与适应 E-mail: 258464308@qq.com

王晓捷 硕士研究生,1983 年 7 月出生 研究方向:应激与适应, E-mail: wxj_0620898@126.com

[△]通讯作者:陈雪梅,Tel:020-62789125 ;Fax: 020-62789125; E-mail: cxmcshz@fimmu.com

(收稿日期 2011-02-07 接受日期 2011-02-31)

酶、转录因子及其他结构相关蛋白等一系列底物蛋白相互作用,有稳定、激活、或引导至蛋白酶降解底物蛋白的作用。因此,HSP90在信号转导、染色体重塑、细胞物质转运、表观遗传学调控、发育及形态学进化、衰老进程等方面发挥着关键作用^[2,3]。

HSP90 α 是一类广泛存在于胞质中的高度保守的分子伴侣,在细胞内具有重要的功能。在人体内,Hsp90 α 主要以同形二聚体的形式存在于胞质中,每个亚单位含三个功能域:N末端ATP结合域、中间域、含有TRP(tetratricopeptide repeat motif)C末端二聚体化结构域^[4]。Hsp90是一种ATP依赖的伴侣蛋白,并具有ATPase活性,其N末端ATP结合域的ATPase活性与其分子伴侣功能密切相关,并已成为肿瘤治疗研究中Hsp90抑制剂的靶点,其相关药物如格尔德霉素(Geldanamycin)同系物17-AAG、17-DMAG,已进入I/II期临床试验。应用于其他衰老相关性疾病(如神经退行性变和心肌损伤等)的尝试,亦在涌现^[5]。

Hsp90 α 在生物体内发挥分子伴侣功能,与其表达水平及ATPase活性有关。外源性Hsp90的抑制剂如格尔德霉素(Geldanamycin及其同系物17-AAG、17-DMAG由于会引发热休克反应(heat shock response,HSR),使Hsp90继发性表达增加,干扰实验结果。Hsp90 α E47A/psin-GFP基因转染表达的Hsp90 α -FLRELIS-第47位点E变为A成为-FLRALIS-,从而使外源性表达的Hsp90 α E47A无ATP酶的活性,并不影响体内hsp90的表达水平^[6]。Hsp90 α E47A一方面通过竞争性抑制的方式使参与底物结合的有ATPase活性的内源性hsp90减少,另一方面通过无ATPase活性Hsp90 α E47A与底物蛋白的直接结合影响底物蛋白的转归,从而能获得单纯的Hsp90 α ATPase抑制对细胞生物行为影响的实验资料,而非hsp90表达水平上升与ATPase活性抑制同时存在的混杂数据。

慢病毒载体系统是一种高效的基因转导工具,由人类免疫缺陷病毒-1(HIV-1)改良而来,能感染分裂期细胞与非分裂期细胞,并通过将目的基因整合入宿主细胞基因组而长期稳定表达外源性基因^[7]。本实验旨在构建重组慢病毒载体系统,通过绿色荧光蛋白的示踪作用,观察其对入肝癌细胞株HepG2的感染能力。基于Hsp90 α ATPase在肿瘤治疗中巨大潜力和慢病毒载体在转基因研究中的诸多优点,我们将两者结合,完成了用于真核细胞表达的重组慢病毒载体转移质粒Hsp90 α E47A/psin-GFP在入肝癌细胞株HepG2的稳定表达。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

XL-10-Gold感受态细胞为Stratagene公司产品;去内毒素质粒提取试剂盒为OMEGA公司产品;DMEM、胎牛血清、牛血清白蛋白(组分V)为GIBCO公司产品;D-Hanks液、双抗(青霉素50 U/ml、链霉素50 U/ml)、PBS液、胎牛血清、DMEM、琼脂粉、LB琼脂均购自Invitrogen公司;0.45 μ m PVDF膜购自Millipore公司;磷酸钙转染试剂盒购自Promega公司;单克隆抗Hsp90 α 抗体为Stressgen公司产品;羊抗兔IgG-HRP为Santa Cruz公司产品;ECL显色试剂购自Pierce公司;CCK-8试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;其他常用试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 质粒与包装细胞

重组慢病毒载体转移质粒Hsp90 α E47A/psin-GFP、包装质粒 Δ NRF、包膜蛋白质粒VSV-G由南加州大学医学院皮肤创伤研究中心栗卫教授惠赠^[6],包装细胞293T由本研究室储存。

1.3 方法

1.3.1 三质粒的扩增与质量鉴定 取-70 $^{\circ}$ C保存的XL-10感受态细胞,冰浴放置10 min,使之冰中融化,分别用转移质粒Hsp90 α E47A/psin-GFP、包装质粒 Δ NRF、包膜蛋白质粒VSV-G转化感受态细胞。并加入到100 ml含氨苄青霉素的LB培养基过夜培养,收集细菌沉淀后OMEGA去内毒素质粒提取试剂盒分别提取三种质粒,Nanodrop 2000微量核酸蛋白检测仪测定质粒浓度,用1.5%琼脂糖凝胶进行DNA电泳检测各质粒的完整性,电泳结果显示3种质粒的大小与质粒图谱资料一致。

1.3.2 293T细胞转染 选择生长状态良好的293T细胞在P100培养皿中进行传代培养,当细胞生长达70%融合时,转染当天换新鲜培养基10 ml,8 h后准备DNA溶液:转移质粒Hsp90 α E47A/psin-GFP 15 μ g、 Δ NRF 10 μ g、VSV-G 5 μ g加无菌水定容至500 μ l,逐滴加入500 μ l 2 $\times$ HBSS,室温放置15 min,逐滴缓慢温和加入到293T细胞,室温静置15 min,移至细胞培养箱中培养过夜。次日去除培养基,加入含1 M丁酸钠的新鲜培养基。8小时后换成无丁酸钠的全培,24 h后收集病毒上清,使用0.45 μ m的PVDF膜过滤后冰冻保存并-80 $^{\circ}$ C贮存,倒置荧光显微镜下观察细胞的转染效率。

1.3.3 慢病毒滴度测定(梯度稀释法) 收集293T细胞培养液上清后,获得慢病毒载体颗粒,以梯度稀释法再次感染293T细胞,96 h后,待绿色荧光蛋白表达稳定时,对有荧光表达的细胞进行计数并进行病毒滴度的计算。病毒滴度的计算:假设取体积为V(μ l)的病毒原液进行10倍稀释,在加入第A次10倍稀释后(即稀释倍数为10A)的病毒稀释液孔中可见B个带有荧光的细胞,则病毒的滴度计算公式为:病毒滴度=(B/V) $\times$ 10A(ifu/ μ l)。

1.3.4 HepG2细胞的培养 复苏HepG2细胞,加入含15%胎牛血清、双抗(青霉素50 U/ml、链霉素50 U/ml)的完全培养基。血球计数板计数,以 5×10^6 /ml密度接种于25 cm²培养瓶,置于CO₂培养箱中,37 $^{\circ}$ C,饱和湿度,5% CO₂条件下培养。48 h后视细胞贴壁情况更换培养液,以后每2 d换液1次。倒置显微镜下观察细胞生长情况,70%融合后,胰酶消化传代培养。

1.3.5 慢病毒载体感染HepG2细胞 取复苏第3代生长良好的HepG2细胞以每孔 2×10^5 个细胞接种细胞到60 mm培养皿中,24 h后换无血清培养基并加入2 ml病毒悬液(MOI值=10)和聚凝胺(8 μ g/ml),37 $^{\circ}$ C共培养6 h后换不含聚凝胺的生长培养基^[8],在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况,并计算绿色荧光蛋白基因转染效率。

1.3.6 Western-blot检测HepG2中Hsp90 α -GFP表达 收集转染慢病毒重组载体的HepG2细胞,离心沉淀提取细胞可溶性蛋白,Bradford法测定蛋白浓度,100 $^{\circ}$ C 5 min煮沸。上样量30 μ g/泳道,80 V~120 V行SDS-PAGE凝胶电泳样品,半干法转移凝胶至PVDF膜,5%BSA慢摇4 h封闭PVDF膜,TTBS洗膜后

加入大鼠 Hsp90 α 单克隆抗体,慢摇 4℃ 过夜,加入 HRP 酶标兔抗大鼠 IgG,慢摇 2 h 后进行 ECL 显色处理,压片,Epson 扫描仪摄像,Image J 图像分析软件行条带灰度分析。

1.3.7 CCK-8 法测定 HepG2 细胞增殖性 取对数生长期的 HepG2 细胞接种于 96 孔培养板内,使每孔细胞密度为 1×10^4 个,每组设 4 个平行孔并设不含细胞的空白对照,37℃ 培养 1d 至 6 d。每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂,继续培养 4h,检测 45nm 波长下的 OD 值。

2 结果

2.1 绿色荧光蛋白在包装细胞 293T 中的表达

慢病毒转移质粒 Hsp90 α E47A/psin-GFP、包装质粒 Δ NRF、包膜蛋白质粒 VSV - G 共转染包装细胞 293T 48 h 后,相差显微镜下观察到 293T 细胞生长良好,倒置荧光显微镜下可观察到明显的绿色荧光(如图 1),证实了构建在转移质粒 GFP-Hsp90 α E47A 基因的表达,转染效率 >90%,表明慢病毒载体系统包装细胞已成功建立。

2.2 慢病毒载体的滴度测定

通过病毒的滴度计算公式计算,测定结果为: 3.0×10^3 i-fu/ μ l。

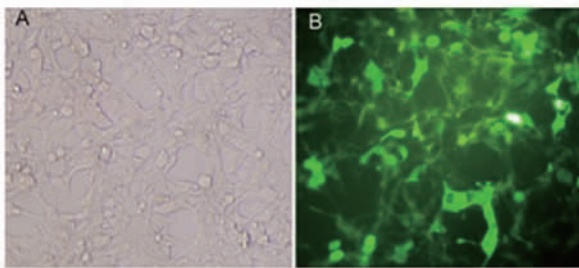


图 1 慢病毒包装系统共转染 293T 细胞后 48h 形态学(X200)观察结果。A.相差显微镜下,转染后 293T 细胞生长良好。B.荧光显微镜下,转染后 293T 细胞有较强的绿色荧光蛋白 GFP 表达。

Fig.1 Morphological observation of human embryonic kidney 293T cells cotransfected with the three-plasmid recombinant lentiviral vector after 48 h transfection. X200) A. 293T cells grew well under phase contrast microscope; B. A strong expression of GFP showed up under fluorescence microscope in 293T cells.

2.3 慢病毒载体对 HepG2 细胞的转染

在 MOI=10 值下以重组的慢病毒载体系统感染 HepG2 细胞,48h 后在相差显微镜下观察到 HepG2 细胞生长状态良好,形态正常,在倒置荧光显微镜下观察,可见在胞浆内有明显的绿色荧光蛋白表达(如图 2),转染效率达 90%以上。

2.4 Western blot 检测 HepG2 细胞中 GFP-Hsp90 α 表达

通过 Western blot 检测转染 Hsp90 α E47A 基因的 HepG2 细胞,与未转染的 HepG2 对照组细胞比较,内源性 Hsp90 α 表达无明显上升(为对照组的 1.2 ± 0.15 倍 $n=3$, $P<0.05$ t 检验),有明显外源性 GFP-Hsp90 α E47A 蛋白的表达(为对照组内源性 Hsp90 α 的 0.78 ± 0.12 倍,如图 3)。提示外源性的基因已成功导入,且并未引起细胞明显的热休克反应而导致的内源性 Hsp90 α 增高。

2.5 外源性 Hsp90 α E47A 基因表达明显抑制 HepG2 细胞增殖

分别在细胞接种后 1d-6d,以 CCK-8 法检测细胞增殖性状,与未转染的 HepG2 对照组细胞比较,第 4d 起,外源性 Hsp90 α E47A 基因表达明显抑制 HepG2 细胞增殖(1.051 ± 0.03 vs 1.349 ± 0.05 , $P<0.05$ t 检验,如图 4)。提示外源性的基因在体内发挥竞争性抑制野生型 Hsp90 α 分子伴侣功能的作用,进而影响细胞增殖。

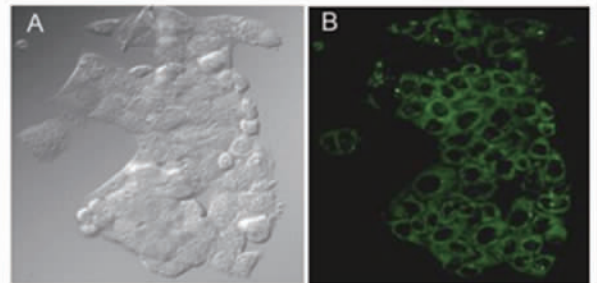


图 2 慢病毒颗粒感染 HepG2 细胞后 48h 形态学(X400)观察结果。A.相差显微镜下,转染后 HepG2 细胞生长良好。B.荧光显微镜下,转染后 HepG2 细胞有较强的绿色荧光蛋白 GFP 表达。

Fig.2 Morphological observation of HepG2 cells infected with the lentiviral virus after 48 h infection. (X400) A. HepG2 cells grew well under phase contrast microscope. B. A obvious expression of GFP showed up in HepG2 cells.

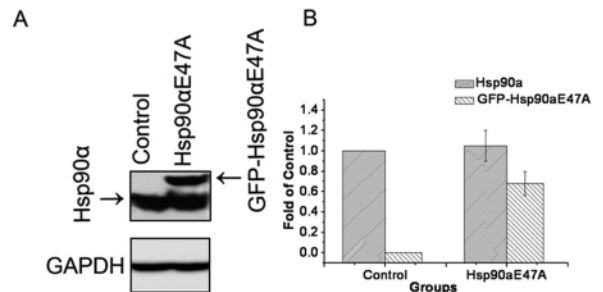


图 3. GFP-Hsp90 α E47A 在 HepG2 肝癌细胞株中的表达。A.转染后的 HepG2 cells 的免疫印迹结果,右侧箭头指示外源性的 GFP-Hsp90 α E47A 表达条带。B. 外源性的 GFP-Hsp90 α E47A 表达条带为对照组的 0.68 ± 0.12 倍,同时未引起内源性 Hsp90 α 的增多(1.05 ± 0.15 倍 vs. 对照组, $P<0.05$, t 检验)

Fig.3.Expression of GFP-Hsp90 α E47A in human liver tumor cell HepG2. A. Western blot results of HepG2 cells infected with the lentiviral virus. Right arrow indicated the exogenous GFP-Hsp90 α E47A band. B. Band intensity analysis of Western blot results of HepG2 cells infected with the lentiviral. GFP-Hsp90 α E47A transfected cells presented an additional band of exogenous GFP-Hsp90 α E47A (0.68 ± 0.12 fold of control) without significant increase of endogenous Hsp90 α (1.05 ± 0.15 fold vs. control. $P<0.05$, t test)

3 讨论

目前常用的基因转移载体包括脂质体、质粒载体等非病毒性载体和单纯疱疹病毒载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、痘病毒载体等病毒性载体。非病毒性载体具有低毒、低免疫反应、载体容量大、易于制备等优点,但转染效率

低、表达时间短成为其在基因转导应用中难以逾越的瓶颈^[7]。本研究所采用的慢病毒载体是近年来出现的一种新的基因转移工具,在多项研究中表现出具有转染分裂期和非分裂期细胞、容载外源目的基因片段大、能够将目的基因整合至靶细胞的染色体在体内长期表达、免疫反应小等独特优点^[8],成为较为理想 Hsp90α E47A/psin-GFP 基因转染载体。Ruitenber 等运用基因转移技术分别以腺病毒和慢病毒载体将外源基因转入鞘内神经胶质(OEG),再将 OEG 移植给受体大鼠^[9]。结果发现,腺病毒载体介导的外源基因在 OEG 移植 7 天内表达水平较高,7 天以后逐渐下降。而慢病毒载体转染的 OEG 表达稳定,在移植后连续 4 个月维持高水平。病毒性载体由于较高的基因转染效率目前应用较为广泛,但仍存在着免疫源性、生物安全性、载体容量有限、制备滴度不高等局限性^[10]。

目前,慢病毒载体经过不断改造优化,在生物安全性、病毒滴度及靶细胞嗜性范围方面均有提高,能够提供高效的基因转移和长期稳定的蛋白表达。本研究中慢病毒载体采用三质粒系

性,能够允许通过高速离心对其进行浓缩,提高病毒滴度和活性,使真核转染成功率大为提高。

包装细胞系的建立是获得完整病毒颗粒并得以转染靶细胞的关键步骤。本研究中选用来源于人胚肾细胞系的 293T 包装细胞完成对慢病毒载体三质粒系统的包装,使其在包装过程中能提供产生病毒颗粒所需的蛋白,并且由于引入 VSV-G 包膜的假构型载体,极大地提高了细胞亲和性和稳定性。通过 293T 细胞包装,我们获得用于转染真核靶细胞的完整病毒颗粒,并且经 Western blot 检测表明转染重组慢病毒载体的 HepG2 细胞,在不引起细胞明显热休克反应的同时,有较强的外源性 GFP-Hsp90α E47A 的表达。同时,外源性 GFP-Hsp90α E47A 的表达明显抑制 HepG2 细胞增殖。研究结果证实了我们成功建立肝癌细胞 Hsp90α E47A/psin-GFP 基因重组慢病毒载体的三质粒包装细胞系统,为今后进一步研究 hsp90α 的分子伴侣功能奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Wandinger SK, Richter K, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery [J]. J Biol Chem,2008, 283(27):18473-18477
- [2] Hahn JS. The Hsp90 chaperone machinery: from structure to drug development[J]. BMB Rep,2009, 42(10):623-630
- [3] Specchia V, Piacentini L, Tritto P, et.al. Hsp90 prevents phenotypic variation by suppressing the mutagenic activity of transposons[J]. Nature, 2010,463(7281):662-665
- [4] Pearl LH, Prodromou C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery [J]. Annu Rev Biochem, 2006, 75: 271-294
- [5] Day JE, Sharp SY, Rowlands MG, et.al.Targeting the Hsp90 Chaperone: Synthesis of Novel Resorecylic Acid Macrolactone Inhibitors of Hsp90[J]. Chemistry, 2010, 16(9):2758-2763
- [6] Chen M, Li W, Fan J, et.al. An efficient gene transduction system for studying gene function in primary human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes[J]. Clin. Exp Dermatol, 2003,28:193-199
- [7] Kafri T, Blomer U , Peterson DA , et al . Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors [J] . Nat Genet, 1997,17(3):314-317
- [8] Buchschacher GLJ, Wong SF. Development of lentiviral vector for gene therapy for human diseases[J]. Blood, 2000, 95(8):2499-2504
- [9] Ruitenber MJ, Plant GW, Christensen CL, et al. Viral vector mediated gene expression in olfactory ensheathing glia implants in the lesioned rat spinal cord[J] . Gene Ther, 2002, 9(2):135-146
- [10] Kawakami S, Higuchi Y, Hashida M. Nonviral approaches for targeted delivery of plasmid DNA and oligonucleotide [J]. J Pharm Sci, 2008, 97:726-745

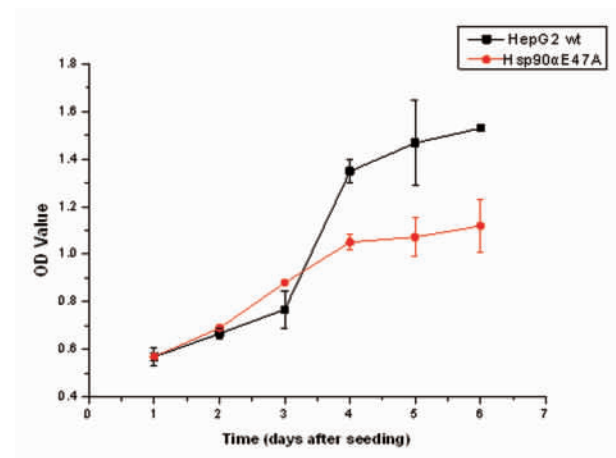


图4 外源性表达的 GFP-Hsp90α E47A 抑制 HepG2 肝癌细胞增殖
Fig.4. Exogenous GFP-Hsp90α E47A inhibited proliferation of human liver tumor cell HepG2. There was significant inhibition of cell proliferation till 4 days after seeding. 4d:1.051± 0.03 vs.1.349± 0.05;5d: 1.072± 0.08 vs.1.467± 0.185;6d: 1.119± 0.11 vs. 1.529± 0.01,*; vs control, P< 0.05, t test)

统进行构建,包括转移质粒、包装质粒和包膜蛋白质粒。其中转移质粒中含有包装、逆转录及整合所需的顺式序列,保留多克隆位点,在其中插入目的基因 Hsp90α E47A/psin-GFP;包装质粒在 CMV 启动子的控制下,表达病毒复制所需的全部反式激活蛋白,但不产生病毒包膜蛋白及辅助蛋白 VPU。包膜蛋白质粒编码水疱性口炎病毒 -G 糖蛋白(VSV-G),应用 VSV-G 包膜的假构型慢病毒载体一方面降低病毒自我复制能力,提高生物安全性,另一方面拓宽与靶细胞的亲和力,增加了载体的稳定