

. 实验研究 .

表达 VASH1 基因的人脑胶质瘤 U-87MG 细胞 对化疗药物敏感性的变化

付 锴 江普查 宫 睿 王 伟

【摘要】目的 探讨表达人血管生成抑制因子 1 (VASH1) 的人脑胶质瘤 U-87MG 细胞对化疗药物的敏感性变化。**方法** 构建针对 VASH1 的慢病毒载体 pGCL-GFP-VASH1, 经测序鉴定后转染 293T 细胞, 筛选出适合浓度的慢病毒转染人脑胶质瘤 U-87MG 细胞, 荧光显微镜下检测转染效率; 通过 RT-PCR 和 Western blot 分析 U-87MG 细胞 VASH1 mRNA 和蛋白表达水平; 用 CCK-8 法检测 U-87MG 细胞在化疗药物顺铂和替莫唑胺作用下的存活率。流式细胞仪检测 U-87MG 细胞凋亡。**结果** 成功构建 pGCL-GFP-VASH1 慢病毒载体, 并成功转染 U-87MG 细胞, 转染率达 70% 以上; RT-PCR 和 Western blot 结果证实转染 VASH1 慢病毒载体的 U-87MG 细胞表达 VASH1 mRNA 和蛋白。在顺铂或替莫唑胺作用下, 表达 VASH1 的 U-87MG 细胞存活率均较未表达 VASH1 的 U-87MG 细胞明显降低 ($P<0.01$), 而且 U-87MG 细胞凋亡率明显增加 ($P<0.01$)。**结论** VASH1 慢病毒载体转染 U-87MG 细胞可使其稳定表达 VASH1, 并提高人脑胶质瘤 U-87MG 细胞对化疗药物敏感性、增加细胞凋亡率。

【关键词】 脑胶质瘤; U-87MG 细胞; 血管生成抑制因子 1; 慢病毒载体; 化疗; 药物敏感性

【文章编号】 1009-153X(2016)01-0034-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; R 730.53

Effect of lentiviral vector-mediated VASH1 gene on chemosensitivity of human glioma U-87MG cells

FU Kai, JIANG Pu-cha, GONG Rui, WANG Wei. Department of Neurosurgery, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China

【Abstract】 Objective To construct the lentiviral vector over-expressing VASH1 and study the relationship between the expression of VASH1 and the chemosensitivity of human glioma U-87MG cells. **Methods** The lentiviral vector carrying human VASH1 gene (pGCL-GFP-VASH1), which was constructed and sequenced, was transinfected into 293 T cells. The transinfection efficiency was evaluated and then the lentiviral vector was transfected into the human glioma U-87MG cells. Transfection efficiency was determined by Fluorescence microscopy. The expression of VASH1 mRNA and protein in U87MG cells were detected respectively by RT-PCR and Western blot. The changes in the sensitivity of transfected U-87MG cells to the chemotherapeutic drugs including cispatin and temozolomide were determined by cell counting kit-8 (CCK-8). The apoptosis of U-87MG cells transfected with pGCL-GFP-VASH1 was determined by flow cytometry (FCM). **Results** The lentiviral vector-mediated VASH1 gene was successfully constructed and transfected into the U-87 cells. Immunofluorescence assay demonstrated that the transfection efficiency was above 70%. RT-PCR and Western blot analyses demonstrated that pGCL-GFP-VASH1 significantly increased the expressions of VASH1 mRNA and protein by 21.57% and 27.29% respectively in transfected U-87MG cells 96 hours after the transfection compared to the control group ($P<0.01$); CCK-8 results showed that when exposed to cisplatin or temozolomide, the survival rate of pGCL-GFP-VASH1-transfected U-87 cells were significantly decreased to 23.96 and 17.24% respectively, which were significantly lower than those in the control groups. FCM results showed that the apoptosis rate of U-87MG cells transfected with pGCL-GFP-VASH1 was significantly higher than that in the control groups ($P<0.01$). **Conclusion** The lentiviral vector-mediated VASH1, which can significantly increase the expression of VASH1 in U-87 MG cells, may enhance chemosensitivity and apoptosis of human glioma U-87MG cells.

【Key words】 VASH1; Lentiviral vector; Glioma; Chemosensitivity

恶性胶质瘤呈侵袭性生长, 术后复发率高。因此, 术后放化疗成为恶性胶质瘤重要辅助治疗方法。顺铂和替莫唑胺分别被视为传统和现代最流行的两类胶质瘤化疗药物。研究发现, 恶性胶质瘤细

胞化疗后某些耐药相关蛋白表达逐渐上调, 进而对相关的化疗药物产生耐药性^[1,2]。血管生成抑制因子 1 (vasohibin 1, VASH1) 能抑制血管内皮细胞增殖和新生血管网的形成, 在部分肿瘤中作为抑癌基因发挥作用^[3]。有研究还发现给予外源性 VASH1 能使残留肿瘤血管表现得更加规整和成熟, 可提高抗肿瘤药物的疗效^[4]。本研究探讨表达人 VASH1 的人脑胶质瘤 U-87MG 细胞对化疗药物的敏感性变化。

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.01.012
作者单位: 430071 武汉, 武汉大学中南医院神经外科 (付 锴、江普查、宫 睿、王 伟)

1 材料与方法

1.1 材料 人脑胶质瘤 U-87MG 细胞购自上海中科院细胞所;DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清 购自美国 Hyclon 公司;慢病毒载体系统 pGCL-GFP 载体、pHelper 1.0 (gag/pol 元件)载体、pHelper 2.0 (VSVG 元件)载体、293T 细胞、DH5 α 大肠杆菌菌株、PCR 引物购自上海吉凯基因技术有限公司;Taq 聚合酶、RT-PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司;T4DNA 连接酶、Hpa I、EcoR I 购自美国 NEB 公司;Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;Western blot 检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;VASH1 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;异硫氰酸荧光素-膜联蛋白 V (fluorescein isothiocyanate-Annexin V, FITC-Annexin V)凋亡检测试剂盒购自美国 BIOVision 公司;顺铂购自美国 Sigma 公司;替莫唑胺购自江苏天士力帝益药业公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人脑胶质瘤 U-87MG 细胞置于 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基中,内加青霉素 (100 U/ml)+链霉素 (100 μ g/ml),5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内培养。

1.2.2 VASH1 基因获取 参考 GeneBank 的 VASH1 基因序列 (NM_014909)设计合成一对 VASH1 基因引物。引物序列:上游 5'-TTG GAG ACC AGC GAA GGA AC-3',下游 5'-TCT CCA TCG GGG TGG ATC TT-3'。抽提人 VASH1 cDNA,并以此为模板进行 PCR 扩增。

1.2.3 pGCL-GFP-VASH1 重组质粒构建、扩增、鉴定 通过限制性内切酶 Hpa I、EcoR I 使慢病毒表达质粒 pGCL-GFP 载体线性化,通过 T4-DNA 连接酶将线性化的载体和 DNA 构建为带有目的基因 VASH1 序列的质粒载体。连接后的重组质粒转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,培养筛选后,挑取单克隆并扩大培养以进行 PCR 鉴定及测序。

1.2.4 病毒颗粒包装和浓缩 将对数生长期的 293T 细胞接种于细胞培养皿,培养 24 h 使密度达 70%~80%,加入所制备的各 DNA 溶液 (pGCL-GFP 载体 20 μ g, pHelper 1.0 载体 15 μ g, pHelper 2.0 载体 10 μ g)包装人 293T 细胞。培养 48 h 后,收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.5 实验分组及转染 实验分为 3 组:空白对照组,不转染任何载体;阴性对照组,转染 pGCL-GFP-

Negative 载体;VASH1 组,转染 pGCL-GFP-VASH1 载体。取对数生长期 U-87MG 细胞接种于 6 孔板中,待细胞生长融合约 70%,用 Lipofectin-2000 介导进行转染。转染条件:每孔 1 ml 培养基,含 10%胎牛血清,10⁹ TU/ml 病毒液 (7 μ l),转染 12 h 后去掉培养基,PBS 清洗,加入 2 ml 完全培养基,48 h 后更换完全培养基,荧光显微镜下检测转染效率。

1.2.6 RT-PCR 检测 VASH1 mRNA 的表达 收集细胞,按 Trizol 试剂说明提取细胞总 RNA,按 RT-PCR 试剂盒说明反转录 cDNA。Caspase3 引物:上游 5'-GGA AGC GAA TCA ATG CAG TC-3',下游 5'-CTC AGA AGC ACA CAA ACA AAA C-3';内参照 β -actin 引物:上游 5'-GGC GGC ACC ACC ATG TAC CCT-3',下游 5'-AGG GGC CCG GAC TCT CGT CAT ACT-3'。反应体系、反应条件同前。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳。经凝胶图像分析仪分析结果。以 VASH1 与 β -actin 条带的吸光度比值表示 VASH1 mRNA 的相对含量。

1.2.7 Western blot 检测 U-87MG 细胞 VASH1 蛋白的表达量 收集细胞,细胞裂解液处理细胞,离心后取上清,考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度,每泳道加入 20 μ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。转至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶室温封闭 2 h,加一抗 (VASH1 单抗)孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜,PBST 清洗 5 次 (5 min/次),加二抗,室温 2 h,PBST 清洗 3 次 (10 min/次);ECL 法显色后照相。最后以 image-proplus 4.5 图像分析系统测定各条带灰度值,以此反映 VASH1 蛋白的表达度。

1.2.8 CCK-8 法检测 U-87MG 细胞增殖活性 取转染 48 h 后的细胞,按 2 \times 10³ 个/孔 (0.1 ml)种植于 96 孔板中。24 h 后分别添加顺铂 (1、4、8 μ g/ml)或替莫唑胺 (1、4、8 μ g/ml),72 h 后吸出原培养基,加入含 10% CCK-8 的培养基 10 μ l,37 $^{\circ}$ C 继续培养 2 h。在全自动酶标仪上测 450 nm 波长的吸光度值。细胞存活率=(实验组吸光度值-空白对照组吸光度值)/(阴性对照组吸光度值-空白对照组吸光度值) \times 100%。实验重复 3 次。

1.2.9 流式细胞仪检测 U-87MG 细胞凋亡 以上各组细胞分别用顺铂 (浓度为 10 μ g/ml)和替莫唑胺 (浓度为 10 μ g/ml)处理 48 h 后,用胰酶消化并用预冷 PBS 将细胞定量为 (1~2) \times 10⁶ 个/ml,预冷 PBS 洗涤、低速 (900 转/min)、4 $^{\circ}$ C 离心,共 3 次后尽量去除 PBS,用预冷结合缓冲液 200 μ l 重新悬浮细胞,先加入 FITC-Annexin V 5 μ l 和碘化丙啶 5 μ l 孵育,15 min 后再加入 300 μ l 结合缓冲液,上机检测前 5 min

加入5 μl碘化丙啶。

1.2.10 统计学处理 应用SPSS 15.0软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 t 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 VASH1慢病毒载体的酶切鉴定 pGCL-GFP-VASH1经Hpa I、EcoR I双酶切后在1%琼脂糖凝胶电泳中条带显示pGCL-GFP-VASH1组PCR产物381bp(插入片段为56 bp), 阴性对照组pGCL-GFP慢病毒载体经双酶切后没有插入片段的PCR产物325 bp为对照, 与预计结果符合, 证实载体构建成功。见图1。

2.2 VASH1慢病毒载体转染U-87MG细胞的效率

2.2.1 荧光显微镜观察结果 筛选转染pGCL-GFP-VASH1 24 h后的细胞, 倒置荧光显微镜($\times 200$)观察发现, 转染后的大部分细胞均有绿色荧光蛋白表达, 转染效率达70%以上。见图2。

2.2.2 U-87MG细胞VASH1 mRNA表达变化 转染96 h后, pGCL-GFP-VASH1组VASH1 mRNA表达水平(0.765 ± 0.031)明显高于阴性对照组(0.629 ± 0.026 ; $P<0.05$)及空白对照组(0.608 ± 0.063 ; $P<0.05$), 后两组之间无统计学差异($P>0.05$)。见图3。

2.2.3 U-87MG细胞VASH1蛋白表达变化 转染96 h后, pGCL-GFP-VASH1组VASH1蛋白表达水平(0.845 ± 0.056)显著高于阴性对照组(0.664 ± 0.069 ; $P<0.05$)及空白对照组(0.682 ± 0.012 ; $P<0.01$), 而后两组之间无统计学差异($P>0.05$)。见图4。

2.3 转染VASH1的U-87MG细胞对化疗药物敏感性

的变化 在不同浓度的顺铂或替莫唑胺作用下, 与空白对照组及阴性对照组比较, pGCL-GFP-VASH1组U-87MG细胞存活率均显著下降($P<0.01$), 详见表1、2。提示VASH1慢病毒载体转染U-87MG细胞后, 细胞对化疗药物的敏感性显著提高。

2.4 VASH1对U-87MG细胞凋亡的影响 pGCL-GFP-VASH1组细胞凋亡率($46.28\pm 3.67\%$)明显高于空白对照组($7.72\pm 1.24\%$; $P<0.05$)和阴性对照组($9.29\pm 0.79\%$; $P<0.01$), 而后两组无显著差异($P>0.05$)。见图5。

3 讨论

丰富的微血管体系是恶性实体性肿瘤的特征之一, 是肿瘤生长、浸润和耐药的关键所在, 并与肿瘤恶性生物学行为密切相关^[5]。VASH1基因是迄今为止发现的唯一的一个以负反馈为作用机制调节血管新生的基因, 可以选择性地表达于内皮细胞, 不但能直接抑制内皮细胞的迁移、增殖、内皮网及血管的形成; 还能通过负反馈调节血管内皮生长因子, 间接地抑制血管生成^[6]。在肝癌与乳腺癌的相关研究中发现, 外源性地增加VASH1后肿瘤组织的微血管密度和数量均明显减少, 并且肿瘤的体积也明显缩小^[7,8]。

本研究使用的慢病毒载体pGCL-GFP能在宿主细胞中持续表达目的基因, 同时该载体能表达由PSV40启动子驱动的绿色荧光蛋白, 可有效地检测目的基因在宿主细胞的感染效率。本研究成功的构建VASH1慢病毒载体, 荧光显微镜观察发现VASH1慢病毒载体在U-87MG细胞转染效率达到70%以上, 而且稳定表达VASH1。本研究还发现将VASH1

表1 不同浓度顺铂作用下各组细胞存活率的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	顺铂浓度(μg/ml)		
	1	4	8
空白对照组	(85.21±3.82)%	(70.79±2.24)%	(59.28±3.27)%
阴性对照组	(80.33±4.53)%	(64.89±5.66)%	(52.76±2.98)%
pGCL-GFP-VASH1组	(56.28±6.25)%*	(40.32±4.91)%*	(23.96±5.17)%*

注:与空白对照组及阴性对照组比较, * $P<0.01$

表2 不同浓度替莫唑胺作用下各组细胞存活率比较($\bar{x}\pm s$)

组别	替莫唑胺浓度(μg/ml)		
	1	4	8
空白对照组	(77.84±5.33)%	(59.21±3.46)%	(48.09±4.21)%
阴性对照组	(73.33±2.69)%	(64.89±4.51)%	(41.56±6.13)%
pGCL-GFP-VASH1组	(46.88±2.41)%*	(52.27±5.88)%*	(17.24±2.84)%*

注:与空白对照组及阴性对照组比较, * $P<0.01$

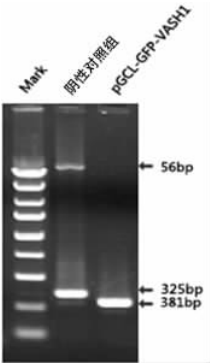


图1 血管生成抑制因子1基因慢病毒载体转染U-87MG细胞后血管生成抑制因子1 mRNA电泳图

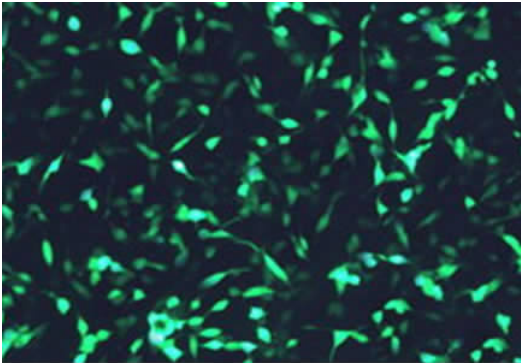


图2 血管生成抑制因子1基因慢病毒载体转染后荧光显微镜观察(×200)

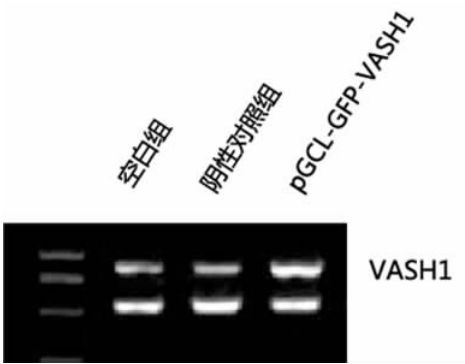


图3 血管生成抑制因子1基因慢病毒载体转染U-87MG细胞后血管生成抑制因子1 mRNA电泳图

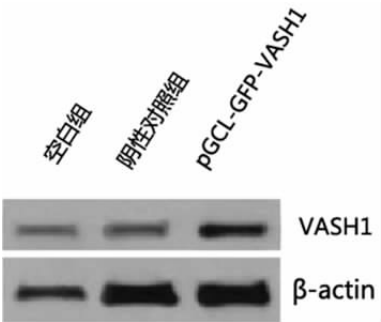


图4 血管生成抑制因子1基因慢病毒载体转染U-87MG细胞后血管生成抑制因子1蛋白表达电泳图

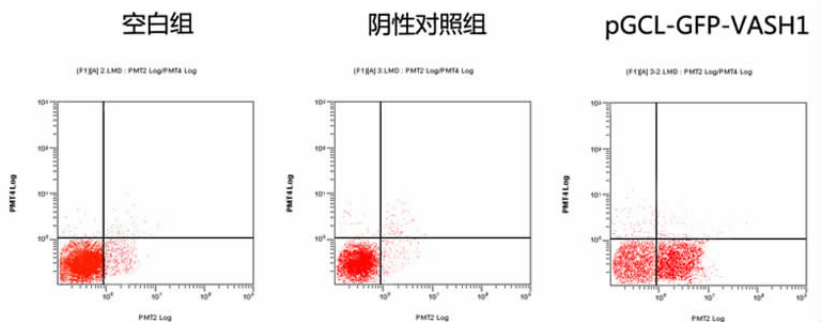


图5 血管生成抑制因子1基因慢病毒载体转染U-87MG细胞后流式细胞仪检测图

基因转染到U-87MG细胞后,细胞对顺铂和替莫唑胺的敏感性明显提高,U-87MG细胞的凋亡率明显增高。由于肿瘤血管的异常增生及杂乱无章导致肿瘤内部的血液供应不足,从而导致化疗药物无法通过肿瘤血管运送到肿瘤内部^[9]。而VASH1可使肿瘤内杂乱无序、不成熟以及含有缺乏壁细胞的肿瘤血管则表现得更加规整和成熟,从而使化疗药物更容易的被运送到肿瘤内部发挥抗肿瘤作用。

总之,本研究结果表明,VASH1能增加胶质瘤U-87MG细胞对化疗药物的敏感性,提示其可能成为胶质瘤新治疗靶点,为进一步研究其影响耐药性的相关信号通路奠定了基础。

【参考文献】

[1] Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma [J]. N Engl J Med, 2005, 352(10): 997-1003.

[2] 潘强,杨学军. 胶质瘤化疗药物耐药性分子机制的研究[J]. 中国临床神经外科杂志,2010,15(2):118-122.

[3] Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H. Vasohibin as an

endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis [J]. J Clin Invest, 2004, 114(7): 898-907.

[4] Hosaka T, Kimura H, Heishi T, *et al.* Vasohibin-1 expression in endothelium of tumor blood vessels regulates angiogenesis [J]. Am J Pathol, 2009, 175(1): 430-439.

[5] Kerbel RS. Tumor angiogenesis [J]. N Engl J Med, 2008, 358 (19): 2039-2049.

[6] Shimizu K, Watanabe K, Yamashita H, *et al.* Gene regulation of a novel angiogenesis inhibitor, vasohibin, in endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 327 (3): 700-706.

[7] Li D, Zhou K, Wang S, *et al.* Recombinant adenovirus encoding vasohibin prevents tumor angiogenesis and inhibits tumor growth [J]. Cancer Sci, 2010, 101(2): 448-452.

[8] Tamaki K, Moriya T, Sato Y, *et al.* Vasohibin-1 in human breast carcinoma: a potential negative feedback regulator of angiogenesis [J]. Cancer Sci, 2009, 100(1): 88-94.

[9] Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy [J]. Science, 2005, 307 (5706): 58-62.

(2015-06-01收稿,2015-08-21修回)