

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.02.019

· 技术方法 ·

## 过表达缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 的结直肠癌裸鼠可视化模型的建立

李喆<sup>1</sup>, 叶小磊<sup>2</sup> $\Delta$ , 杨生生<sup>3</sup> $\Delta$ , 殷佩浩<sup>4</sup>, 胡送娇<sup>4</sup>, 陈磊<sup>1</sup>, 房林<sup>1</sup>(1. 同济大学附属第十人民医院 甲状腺乳腺外科, 上海 200072; 2. 宁波市医学科学研究所 药物与药理研究室, 浙江 宁波 315020; 3. 第二军医大学 生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433; 4. 上海中医药大学附属普陀中心医院 普通外科, 上海 200062)

[摘要] **目的:** 建立一种荧光可视化显像且稳定过表达缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )的裸鼠结直肠癌移植瘤模型。**方法:** 对不同的人结直肠癌细胞系(SW480、SW620、LOVO及HCT116细胞)用缺氧诱导剂CoCl<sub>2</sub>处理,根据HIF-1 $\alpha$ 被诱导表达的情况选择合适的靶细胞;将HIF-1 $\alpha$ 的cDNA序列克隆至慢病毒表达质粒pLV-TRC-EGFP,构建pLV-HIF1 $\alpha$ -EGFP慢病毒表达质粒,并包装过表达HIF-1 $\alpha$ 的慢病毒颗粒Lenti-HIF1 $\alpha$ -EGFP。将Lenti-HIF1 $\alpha$ -EGFP感染SW480细胞,嘌呤霉素筛选稳定过表达HIF-1 $\alpha$ 的细胞株SW480HIF-1 $\alpha$ ,Western blotting检测SW480HIF-1 $\alpha$ 细胞内HIF-1 $\alpha$ 及其下游蛋白VEGF、M1型丙酮酸激酶(pyruvate kinase expression M1, PKM1)的表达情况,Transwell实验检测其迁移能力。裸鼠腹腔注射SW480HIF-1 $\alpha$ 建立结直肠癌移植瘤模型,倒置荧光显微镜观察裸鼠腹腔移植瘤结节。**结果:** 常氧条件下4种结直肠癌细胞均不表达HIF-1 $\alpha$ ,经CoCl<sub>2</sub>诱导后,除SW480细胞系以外的细胞均可被诱导表达HIF-1 $\alpha$ ,故选择SW480细胞作为研究靶细胞。成功构建稳定过表达HIF-1 $\alpha$ 的细胞株SW480HIF-1 $\alpha$ ,SW480HIF-1 $\alpha$ 细胞内HIF-1 $\alpha$ 、VEGF和PKM1的表达水平均高于野生型SW480细胞,其迁移能力较野生型SW480细胞显著增强[观察视野内迁移细胞数:(250 $\pm$ 11)vs(50 $\pm$ 5)个, $P$ <0.01]。SW480HIF-1 $\alpha$ 组裸鼠肠壁形成肿瘤结节数量显著多于SW480组[(15 $\pm$ 4)vs(4 $\pm$ 1)个, $P$ <0.05]。**结论:** 成功建立了高表达HIF-1 $\alpha$ 的荧光可视化裸鼠移植瘤模型,为进一步的相关功能学研究以及药物筛选提供条件。

[关键词] 结直肠癌;移植瘤模型;稳定转染;慢病毒;缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ;绿色荧光蛋白

[中图分类号] R735.3;R730.54;R73-35 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2015)02-0246-06

## Establishment of a nude mouse model of fluorescently tagged-colorectal cancer overexpressing hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$

Li Zhe<sup>1</sup>, Ye Xiaolei<sup>2</sup> $\Delta$ , Yang Shengsheng<sup>3</sup> $\Delta$ , Yin Peihao<sup>4</sup>, Hu Songjiao<sup>4</sup>, Chen Lei<sup>1</sup>, Fang Lin<sup>1</sup>(1. Department of Thyroid and Breast Surgery, The 10th People's Hospital of Shanghai Affiliated to Tongji University, Shanghai 200072, China; 2. Department of Drugs and Pharmacological Research, Institute of Medical Sciences of Ningbo, Ningbo 315020, Zhejiang, China; 3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 4. Department of General Surgery, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a nude mice xenograft model of fluorescently tagged-colorectal cancer overexpression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). **Methods:** Four human colorectal cancer cell lines, SW480, SW620, LOVO and HCT116, were treated with CoCl<sub>2</sub>, and the one that remained HIF-1 $\alpha$ -negative under CoCl<sub>2</sub> induction was chosen. The selected cell line was infected with a lentiviral vector overexpressing HIF-1 $\alpha$  and EGFP, Lenti-HIF1 $\alpha$ -EGFP. Infected cells underwent puromycin selection. Cells stably expressing HIF-1 $\alpha$  and EGFP. HIF-1 $\alpha$ , confirmed by Western blotting, were used in transwell assay of migration in vitro and injected intraperitoneally into nude mice to create a xenograft

[基金项目] 上海市科学技术委员会专项基金资助项目(No. 12140902302)。Project supported the Special Fund from Shanghai Municipal Science and Technology Commission (No. 12140902302)

[作者简介] 李喆(1974-),男,天津市人,博士,副主任医师,主要从事乳腺癌、甲状腺癌基础及临床研究,E-mail: lizhe@medmail.com.cn; 叶小磊(1982-),男,浙江宁波人,博士,副研究员,主要从事肿瘤药理学研究,E-mail: yexiaolei@gmail.com.  $\Delta$ 共同第一作者

[通信作者] 李喆(Li Zhe, corresponding author),E-mail: lizhe@medmail.com.cn; 杨生生(Yang Shengsheng, co-corresponding author),E-mail: yssc@126.com.  $\Delta$ 共同通信作者

model of colorectal cancer in vivo. **Results:** After CoCl<sub>2</sub> induction, only SW480 remained HIF-1 $\alpha$ -negative and was thus selected. SW480 cells stably overexpressing HIF-1 $\alpha$  and EGFP had enhanced migration ability (250  $\pm$  11) as compared with control Sw480 cells (50  $\pm$  5) ( $P < 0.01$ ). The number of tumor nodules formed on the abdominal wall was significantly higher in mice injected with SW480 cells overexpressing HIF-1 $\alpha$  (15  $\pm$  4) than in mice injected with control cells (4  $\pm$  1) ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Injection of endogenously HIF-1 $\alpha$ -negative colorectal cancer SW480 cells infected by a lentiviral vector overexpressing HIF-1 $\alpha$  and EGFP into nude mice would provide a feasible approach of creating a xenograft model of fluorescently visible colorectal cancer for investigations on the function of HIF-1 $\alpha$  in the pathogenesis of colorectal cancer.

[ **Keywords** ] colorectal cancer; xenograft model; stable transfection; lentivirus; hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ); green fluorescent protein (GFP)

[ Chin J Cancer Biother, 2015, 22(2): 246-251 ]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的消化道恶性肿瘤,世界范围内其平均发病率居男性第3位、女性第2位。在北美、新西兰、西欧和日本(男性)等经济发达地区其发病率高居第1、2位,我国结直肠癌发病率也呈现逐年上升的趋势,是临床上病死率较高的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。缺氧是CRC等实体瘤组织常见的病理特点<sup>[2]</sup>,缺氧直接导致缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )高表达。研究显示,有近80%的结直肠癌患者存在HIF-1 $\alpha$ 高表达<sup>[3]</sup>,活化的HIF-1 $\alpha$ 与缺氧反应元件(hypoxia response element, HRE)结合,调控下游近60种不同基因的表达,包括VEGF和bFGF<sup>[4]</sup>。HIF-1 $\alpha$ 表达在促进结直肠癌的发生中扮演重要的角色,在结肠癌细胞中瞬时表达HIF-1 $\alpha$ 后可迅速提高VEGF表达<sup>[5]</sup>,在裸鼠皮下注射HIF-1 $\alpha$ 过表达结肠癌细胞后则可以促进肿瘤的增殖和血管生成<sup>[6]</sup>。缺氧可以诱导结直肠癌发生上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),从而促进转移的发生<sup>[7]</sup>。因此,缺氧所诱导的基因表达谱也是预测II期和III期结肠癌患者预后的独立因素<sup>[8]</sup>。探索以HIF-1 $\alpha$ 为靶点的有效药物对于临床防治结直肠癌血管新生及侵袭转移具有重要的现实意义。因此,本研究构建携带GFP以及HIF-1 $\alpha$ 双表达基因的慢病毒载体体外感染结直肠癌细胞,筛选稳定转染细胞株来建立可视化的裸鼠移植瘤模型,以期在体研究HIF-1 $\alpha$ 在结直肠癌中的生物学功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与材料

含HIF-1 $\alpha$ 全长cDNA的片段(GenBank登录号:NM\_001530)的质粒pBabe-HIF1 $\alpha$ 由中科院生化所季红斌实验室提供,慢病毒表达质粒pLV-TRC-EGFP和包装质粒p $\Delta$ 8.91、pMD2.G及HEK293T细胞购自北京中原公司。人结直肠癌细胞系SW480、

SW620、LOVO及HCT116购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,HEK293T细胞由本实验室保存。胎牛血清、DMEM培养基和RMPI 1640培养基均购自HyClone公司,X-tremeGENE HP转染试剂购自Roche公司,CoCl<sub>2</sub>购自Sigma公司,质粒小抽试剂盒以及分子克隆所用的工具酶均购自上海生工生物工程有限公司,其他生化试剂如嘌呤霉素等均购自Santa Cruz公司。实验用裸鼠购自常州卡文斯实验动物有限公司[实验动物许可证号SCXK(苏)2011-0003]。

### 1.2 CoCl<sub>2</sub>诱导细胞缺氧模型的建立

SW480和SW620培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,LOVO和HCT116细胞培养于含10%胎牛血清的RMPI 1640培养基中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。分别将对数生长期的SW480、SW620、LOVO和HCT116细胞接种于6孔板中,每孔细胞为2 $\times$ 10<sup>5</sup>;每种细胞各2组,每组3个复孔,分别加入终浓度为40和80 $\mu$ mol/L的CoCl<sub>2</sub>,孵育24h后收集细胞。为选择合适的结直肠癌细胞作为靶细胞,利用Western blotting分别检测4种结直肠癌细胞LOVO、SW480、SW620、及HCT116在正常细胞培养条件下和缺氧诱导剂CoCl<sub>2</sub>处理条件下HIF-1 $\alpha$ 的表达情况,

### 1.3 慢病毒过表达质粒pLV-HIF1 $\alpha$ -EGFP的构建

以质粒pBabe-HIF1 $\alpha$ 为模板,根据HIF-1 $\alpha$ 的cDNA序列设计引物,PCR扩增HIF-1 $\alpha$ 基因序列,定向克隆至同样经过Nhe I酶切的pLV-TRC-EGFP质粒。转化DH5 $\alpha$ 感受态细胞并扩增培养阳性克隆,抽提质粒获得慢病毒过表达质粒pLV-HIF1 $\alpha$ -EGFP,并采用酶切和DNA测序方法鉴定。

### 1.4 慢病毒颗粒包装及滴度测定

根据转染试剂X-tremeGENE HP操作手册,将慢病毒过表达质粒pLV-HIF1 $\alpha$ -EGFP、包装质粒

pΔ8.91 和 pMD2.G 以 10:10:1 的质量比共转染汇合度为 70%~80% 的 293T 细胞, 12 h 后更换含 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养, 并在荧光显微镜下观察荧光表达情况。48 h 后, 4 °C 下  $4\ 000 \times g$  离心 10 min, 上清液经 0.45 μm 滤器过滤, 于 4 °C 下  $89\ 000 \times g$  离心 2 h, 沉淀用冰 PBS 液重悬, 4 °C 溶解后保存于 -80 °C 冰箱中。取 10 μl 病毒悬液用含 2% FBS 的 DMEM 培养液进行 10 倍梯度稀释 ( $10^{-1}$  ~  $10^{-6}$ ), 分别加入细胞 50% 汇合的 96 孔板中, 每个稀释度设置 3 个复孔。培养 5 d 后, 荧光显微镜下观察荧光细胞, 计数表达 GFP 的细胞个数, 计算病毒滴度 (U/L)。病毒滴度 (U/L) = 表达荧光的细胞数 × 相应的稀释倍数。

### 1.5 慢病毒介导 pLV-HIF1α-EGFP 感染 SW480 细胞及筛选

取对数生长期 SW480 细胞, 接种于 6 孔板培养 12 h 后弃上清, 每孔滴加 Lenti-HIF1α-EGFP 病毒悬液 200 μl, 加入 4 μg/ml 含聚凝胺的培养基, 感染 8 h 后换普通培养基; 将慢病毒 Lenti-HIF1α-EGFP 感染 SW480 细胞 72 h 后在荧光显微镜下观察 GFP 表达及细胞形态, 48 h 后加含嘌呤霉素 (终浓度 0.5 μg/ml) 的培养基, 每隔 2 d 更换培养液, 去除死细胞, 培养 6 d 后获得稳定感染细胞株 SW480HIF-1α。

### 1.6 Western blotting 检测稳转细胞株 SW480HIF-1α 内 HIF-1α 的表达

分别将 SW480HIF-1α 和野生型 SW480 细胞培养至对数增长期, 取出后弃去上清, 冷 PBS 漂洗 2 遍, 加入 RIPA 裂解液在冰浴中裂解细胞 30 min, 离心收集蛋白, BCA 法定量细胞总蛋白。蛋白液加入 5 × 加样缓冲液, 煮沸 10 min 后进行 10% SDS-PAGE, PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭液封闭 1 h, 加入 HIF-1α 一抗 4 °C 过夜, 次日 TBST 洗膜后加入 HRP 标记的二抗室温反应 1 h, 洗膜后用 ECL 检测试剂盒显色, 暗室中压片、显影。实验重复 3 次。同时 Western blotting 检测 SW480HIF-1α 和 SW480 细胞 HIF-1α 下游靶基因表皮生长因子 (vascular endothelial cell growth factor, VEGF) 以及 M1 型丙酮酸激酶 (pyruvate kinase expression M1, PKM1) 的蛋白质表达水平。

### 1.7 Transwell 实验检测 HIF-1α 过表达对 SW480 细胞迁移能力的影响

从 -80 °C 冰箱中取出基质胶, 4 °C 融化, DMEM 培养液将基质胶按照 1:4 体积比稀释, 每小室加 50 μl, 37 °C 孵育 3~4 h。然后每个小室加 50 μl DMEM 培养液, 37 °C 30 min 后再加入  $5 \times 10^5$  个/ml

的 100 μl 细胞悬液, 每组设 3 个复孔, 每个下室加 600 μl 含有 10% 血清的 DMEM 培养液。培养箱中培养 24 h, 弃去小室上下室培养液, 取出膜后风干。每孔加入 600 μl 按 1:4 稀释的 0.5% 结晶紫溶液, 染色 30 min。PBS 洗 2 遍, 用棉签擦去小室上部的细胞。然后于显微镜下观察拍照。

### 1.8 过表达 HIF-1α 的结直肠癌裸鼠腹腔肿瘤可视化模型的建立

分别取对数生长期的稳转细胞株 SW480HIF-1α 和野生型 SW480 细胞, 用 0.25% 胰酶消化。消化前 2 h 使用新鲜培养液换液 1 次, 消化后再用新鲜培养液洗 1 次。收集细胞, 离心去上清, 用无菌生理盐水洗涤两次, 调整活细胞密度为  $1 \times 10^7$  个/ml, 用于裸鼠腹腔注射。取 20 只 4 周龄雌性裸鼠随机分为 SW480HIF-1α 组和 SW480 组, 10 只/组。裸鼠腹部皮肤消毒后以 1 ml 注射器将 200 μl 细胞悬液 (细胞量为  $2 \times 10^6$  个/只) 注入小鼠腹腔。14 d 后解剖裸鼠, 取出肿瘤, 在荧光显微镜下确认其 GFP 表达情况。

### 1.9 统计学处理

采用 SPSS14.0 软件, 所有计量资料符合正态分布的均表示为  $\bar{x} \pm s$ , 组间比较采用配对设计 *t* 检验; 所有计数资料的组间比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CoCl<sub>2</sub> 诱导结直肠癌细胞中 HIF-1α 的表达

Western blotting 检测结果发现, 在正常条件下 4 种结直肠癌细胞株中 HIF-1α 均不表达 (图 1A); 而在缺氧诱导剂 CoCl<sub>2</sub> 处理 24 h 后, SW620 和 HCT116 细胞可以显著表达 HIF-1α, LOVO 细胞中有微量的表达, 而 SW480 细胞中未见 HIF-1α 表达 (图 1B)。因为 SW480 细胞为低转移潜能的结直肠癌细胞株, 因此选择 SW480 细胞进行后续研究。

### 2.2 成功包装 Lenti-HIF1α-EGFP 慢病毒

将构建好的 pLV-HIF1α-EGFP 质粒利用 *Nhe* I 酶切后进行琼脂糖凝胶电泳, 结果 (图 2) 显示质粒酶切后产生大小分别为 8.8 和 2.5 kb 的 2 个片段, 与预期一致, DNA 测序结果证实构建正确。将 pLV-HIF1α-EGFP 慢病毒表达质粒与包装质粒共转染 HEK293T 细胞后, 荧光显微镜观察结果 (图 3) 显示, 被转染的 HEK293T 细胞发出绿色荧光, 转染效率在 80% 以上; 转染 48 h 后收集培养液上清中的病毒进行滴度测定, 病毒滴度为  $5 \times 10^6$  TU/ml (TU: transducing units, 转导单位), 表明 Lenti-HIF1α-EG-

FP 慢病毒包装成功。

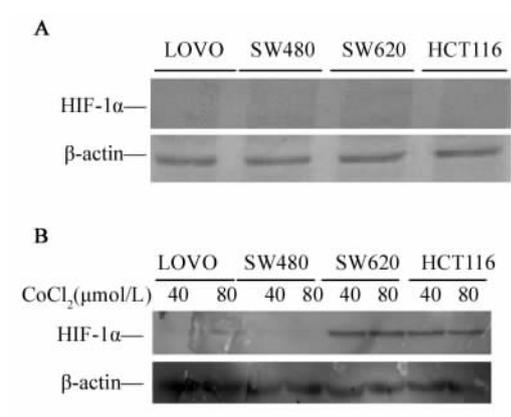


图1  $\text{CoCl}_2$  处理对不同结直肠癌细胞中 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平的影响

Fig. 1 Expression of HIF-1 $\alpha$  in different colorectal cancer cell lines after treatment with  $\text{CoCl}_2$

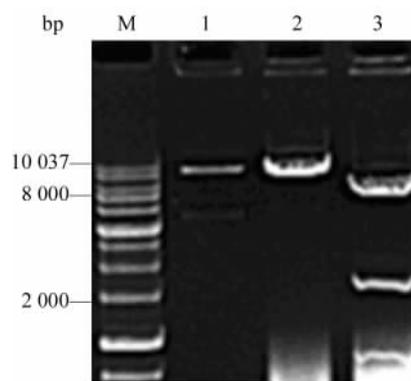


图2 pLV-HIF1 $\alpha$ -GFP 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pLV-HIF1 $\alpha$ -GFP by restriction enzyme digestion

1: pLV-HIF1 $\alpha$ -GFP; 2: pLV-HIF1 $\alpha$ -GFP digested and linearized by Age I; 3: pLV-HIF1 $\alpha$ -GFP digested by Nhe I

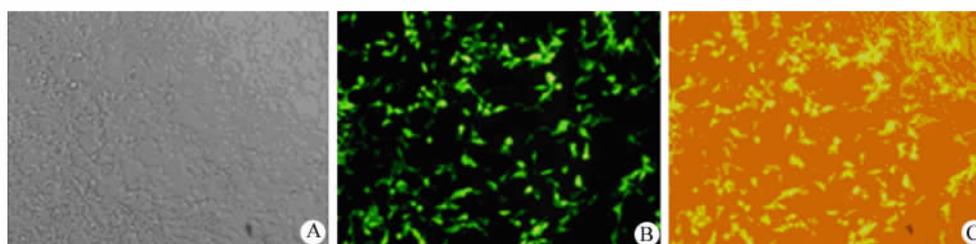


图3 Lenti-HIF1 $\alpha$ -EGFP 慢病毒的包装(  $\times 40$  )

Fig. 3 Package of Lenti-HIF1 $\alpha$ -EGFP(  $\times 40$  )

A: Bright; B: Fluorescenc; C: Merge

### 2.3 成功构建 HIF-1 $\alpha$ -EGFP 稳定过表达的 SW480HIF-1 $\alpha$ 细胞

将慢病毒 Lenti-HIF1 $\alpha$ -EGFP 感染 SW480 细胞 72 h 后,在荧光显微镜下观察 GFP 表达及细胞形态证实,慢病毒可有效感染 SW480 细胞(图 4A);随后加入嘌呤霉素经过 3 周的筛选得到稳定表达 HIF-1 $\alpha$  的细胞株。

Western blotting 证实筛选获得稳定表达 HIF-1 $\alpha$  的 SW480HIF-1 $\alpha$  细胞可高表达 HIF-1 $\alpha$  蛋白,并且 HIF-1 $\alpha$  下游靶基因表达的 VEGF 及 PKM1 的蛋白表达均有一定程度的上调,以 VEGF 的上调尤为明显(图 4B),表明成功筛选获得稳定表达细胞株 SW480HIF-1 $\alpha$ 。

### 2.4 过表达 HIF-1 $\alpha$ 促进 SW480 细胞的迁移

利用 Transwell 实验观察野生型细胞株 SW480

和稳转细胞株 SW480HIF-1 $\alpha$  的细胞迁移能力,结果显示 SW480HIF-1 $\alpha$  细胞迁移能力较野生型细胞株 SW480 显著提高(图 5),穿膜细胞数从(  $50 \pm 5$  )个/视野增加到(  $250 \pm 11$  )个/视野(  $\times 200$  )(  $P < 0.01$  )。

### 2.5 成功建立过表达 HIF-1 $\alpha$ 的结直肠癌裸鼠腹腔肿瘤可视化模型

将稳定表达 GFP 和 HIF-1 $\alpha$  的 SW480HIF-1 $\alpha$  细胞和野生型 SW480 细胞分别注入裸鼠腹腔,14 d 后解剖裸鼠并统计腹腔中瘤结节数目,发现 SW480HIF-1 $\alpha$  鼠的结节数为(  $15 \pm 4$  )个/只,明显高于对照组的(  $4 \pm 1$  )个/只(  $P < 0.05$  )(图 6A)。荧光显微镜观察(图 6B)发现,结节呈现绿色荧光,证明这些结节确为 SW480HIF-1 $\alpha$  细胞所形成的肿瘤结节。

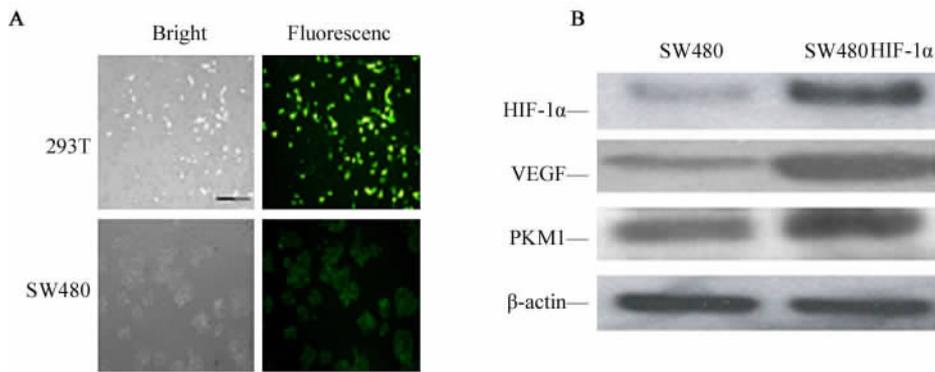


图 4 稳定表达 HIF-1 $\alpha$  的细胞株 SW480HIF-1 $\alpha$  的鉴定

Fig . 4 Identification of SW480HIF-1 $\alpha$  cells with stable expression of HIF-1 $\alpha$

A: Cell morphology diagram after infection with lentivirus particles( horizontal line represent 100 $\mu$ m )(  $\times$  40 );  
 B: Western blotting analysis of HIF-1 $\alpha$  and its target genes

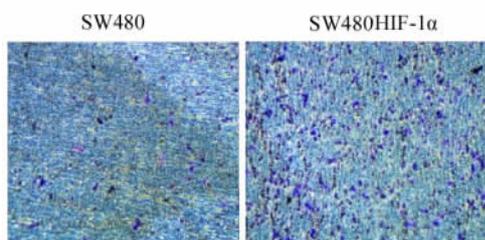


图 5 Transwell 检测 SW480HIF-1 $\alpha$  细胞的迁移能力(  $\times$  40 )  
 Fig. 5 Cell migration analysis of SW480HIF-1 $\alpha$  by Transwell assay(  $\times$  40 )

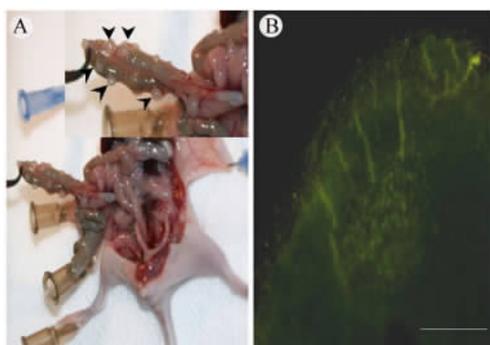


图 6 SW480HIF-1 $\alpha$  细胞的体内成瘤能力

Fig. 6 tumorigenesis of SW480HIF-1 $\alpha$  cells *in vivo*

A: Tumor nodules was shown after anatomy, as indicated by arrows; B: Fluorography of nodules stripped from abdominal cavity ( right scale on behalf of 100  $\mu$ m )(  $\times$  40 )

### 3 讨 论

慢病毒载体与其他逆转录病毒载体相比,其独特的优势在于慢病毒对靶细胞的感染不受细胞分裂和环境的影响。因此,慢病毒表达载体能够显著提高某些不稳定蛋白在细胞中的表达水平<sup>[9]</sup>,该技术作为新一代高效表达载体不仅大大推进了肿瘤的基础研究,而且可以作为基因治疗的载体用于临床<sup>[10]</sup>。HIF-1 $\alpha$  作为在肿瘤发生发展中极为重要的因子,在结直肠癌中有较为广泛系统的研究。由于 HIF-1 $\alpha$  仅在缺氧状态下表达而在常氧状态下被降解,因此,对于该基因功能的研究往往需要通过在缺氧诱导或者使用 CoCl<sub>2</sub> 模拟缺氧状态<sup>[11]</sup>。虽然这两种传统方法能够在一定程度上促进 HIF-1 $\alpha$  的表达,但是却存在显著的局限性:缺氧诱导会导致细胞其他蛋白的反馈应答,而化学诱导则同时存在改变细胞渗透压和产生细胞毒的缺点。因此,传统诱导 HIF-1 $\alpha$  表达的方法给该基因功能的研究带来诸多干扰因素<sup>[12]</sup>。这或许也就是为何到目前为止,鲜有针对 HIF-1 $\alpha$  靶向药物问世的一个重要原因<sup>[13]</sup>。本研究利用慢病毒载体建立稳定表达 HIF-1 $\alpha$  的体内外模型,为该蛋白的深入研究提供更稳定的细胞模型。此外,HIF-1 $\alpha$  与 GFP 的双重共表达则可建立一种新型的体内模型,可以通过绿色荧光表达的强度与位置对 HIF-1 $\alpha$  进行定位与示踪,进而促进以 HIF-1 $\alpha$  为靶标的药物的研发。

本研究利用慢病毒载体成功构建了稳定表达 HIF-1 $\alpha$ -GFP 的结直肠癌细胞株 SW480HIF-1 $\alpha$ ,实现了 HIF-1 $\alpha$  与 GFP 的双重表达并对其进行小鼠体内

示踪检测。但是,由于小动物活体成像系统对 GFP 的分辨率较差,因此,GFP 所产生的绿色荧光无法有效透过裸鼠皮肤,而且动物体表皮肤亦存在荧光干扰,故本研究中需要在解剖小鼠以后,才能对结节的性质进行确定,但无法通过小动物成像系统获得比较好的影像学数据,与一些研究报道利用 GFP 能获得活体影像有一定距离<sup>[14]</sup>。后续研究将在所建立的稳定过表达 HIF-1 $\alpha$  和 GFP 细胞的基础上,进一步考虑构建使用荧光素酶 Luciferase 元件替换 GFP 元件作为体内指示蛋白,该系统的优点在于其荧光波长较后者长,可有效地透过动物表皮以直接显示带有荧光信号的细胞在动物体内的分布情况。此外,探索 HIF-1 $\alpha$  下游相关信号通路对肿瘤细胞增殖的影响,找到直接影响细胞增殖、周期变化以及转移的相关蛋白也是今后研究的方向。

综上,本研究通过慢病毒技术不仅实现了肿瘤关键蛋白在结直肠癌细胞中的稳定表达,而且其同时伴有的荧光标签使得对相关蛋白功能以及体内示踪的研究更为便利。此外,本研究亦可为其他急慢性缺氧相关性疾病如卒中<sup>[15]</sup>、高原肺水肿的基础研究提供有效的技术支持方案。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014 [ J ]. CA Cancer J Clin, 2014, 64( 2 ): 104-117.
- [ 2 ] 隋文文, 张维东. 缺氧诱导因子促进肿瘤血管生成的研究 [ J ]. 国际肿瘤学杂志, 2013, 40( 6 ): 416-418.
- [ 3 ] 王前, 安泽武. HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 在大肠癌中的表达及其相关性研究 [ J ]. 肿瘤学杂志, 2013, 19( 11 ): 858-861.
- [ 4 ] Kim SE, Shim KN, Jung SA, et al. The clinicopathological significance of tissue levels of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor in gastric cancer [ J ]. Gut Liver, 2009, 3( 2 ): 88-94.
- [ 5 ] Lucarini G, Zizzi A, Belvederesi L, et al. Increased VEGF165

expression in HCT116 colon cancer cells after transient transfection with a GFP vector encoding HIF-1 gene [ J ]. J Exp Clin Cancer Res, 2007, 26( 4 ): 515-519.

- [ 6 ] Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in common human cancers and their metastases [ J ]. Cancer Res, 1999, 59( 22 ): 5830-5835.
- [ 7 ] Hongo K, Tsuno NH, Kawai K, et al. Hypoxia enhances colon cancer migration and invasion through promotion of epithelial-mesenchymal transition [ J ]. J Surg Res, 2013, 182( 1 ): 75-84.
- [ 8 ] Dekervel J, Hompes D, van Malenstein H, et al. Hypoxia-driven gene expression is an independent prognostic factor in stage II and III colon cancer patients [ J ]. Clin Cancer Res, 2014, 20( 8 ): 2159-2168.
- [ 9 ] Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors [ J ]. Mol Biotechnol, 2007, 36( 3 ): 184-204.
- [ 10 ] 罗望, 张泓, 许森, 等. 慢病毒--基因转移的潜在新载体 [ J ]. 江苏药学与临床研究, 2006, 14( 6 ): 366-371.
- [ 11 ] Zhang B, Guo W, Yu L, et al. Cobalt chloride inhibits tumor formation in osteosarcoma cells through upregulation of HIF-1 $\alpha$  [ J ]. Oncol Lett, 2013, 5( 3 ): 911-916.
- [ 12 ] 赵宁辉, 杨勇涛, 徐蔚, 等. 低氧诱导因子 1 $\alpha$  过表达对 PC12 细胞在 CoCl<sub>2</sub> 拟缺氧模型中凋亡的影响 [ J ]. 中华神经医学杂志, 2010, 9( 12 ): 1189-1192.
- [ 13 ] Onnis B, Rapisarda A, Melillo G. Development of HIF-1 inhibitors for cancer therapy [ J ]. J Cell Mol Med, 2009, 13( 9A ): 2780-2786.
- [ 14 ] Li ZH, Liao W, Cui XL, et al. Intravenous transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells and its directional migration to the necrotic femoral head [ J ]. Int J Med Sci, 8( 1 ): 74-83.
- [ 15 ] Ralph GS, Parham S, Lee SR, et al. Identification of potential stroke targets by lentiviral vector mediated overexpression of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in a primary neuronal model of hypoxia [ J ]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24( 2 ): 245-258.

[ 收稿日期 ] 2014 - 10 - 23 [ 修回日期 ] 2015 - 01 - 25

[ 本文编辑 ] 黄静怡

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

## 文稿中计量单位使用的要求

本刊严格执行国务院颁发的《中华人民共和国法定计量单位》,全面贯彻国家标准 GB3100-3102-1993《量和单位》的规定,正确使用量和单位的名称和符号。(1)量符号以斜体拉丁和希腊字母表示( pH 用正体除外),例如  $m$ (质量)、 $t$ (时间)、 $c$ (浓度)、 $V$ (体积)、 $p$ (压力)、 $F$ (力)等。(2)单位符号一律以正体拉丁或希腊字母表示,例如 kg(千克)、m(米)、h(小时)、mol/L(摩尔每升)等。(3)表示人体检验指标的量浓度或质量浓度时,一般使用 L(升)作为检验组成含量单位的分母。(4)表示用药剂量单位时,不能写成 mg/kg/d 的形式,应写成 mg/( kg · d )或 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 的形式。(5)单位符号常见书写错误:长度单位符号 A<sup>°</sup>(埃)已不用,应写作 0.1 nm;时间单位“小时”符号为 h(不是 hr)、“秒”符号为 s(不是 sec);转速单位符号为 r/min(不是 rpm);量浓度单位符号为 mol/L(不是 M、N,也不是 mol/mm<sup>3</sup>);力的单位“牛顿”符号为 N(不是 dyn(达因)、kgf(千克力),换算 1 dyn = 10<sup>-5</sup> N);热量单位“焦耳”符号为 J(不是 cal(卡)、kcal(千卡),换算 1 cal = 4.187 J);放射性活度单位符号为 Bq(不是 Ci(居里),换算 1 Ci = 3.7 × 10<sup>10</sup> Bq)。

(本刊编辑部)