技术方法

文章编号:1000-5404(2008)09-0876-02

高效稳定表达人缺氧诱导因子抑制因子肠上皮细胞株的建立

王 裴,戚华兵,陈传莉,刘依凌,赵 云,王凤君 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 通过转染含有人FIH全长cDNA的质粒pcDNA3.1-V5-His-A-FIH,建立FIH高效表达的肠上皮细胞株。方法 对pcDNA3.1-V5-His-A-FIH进行扩增、提取,用脂质体Lipofectamine 2000将pcDNA3.1-V5-His-A-FIH转入Caco-2细胞,经G418筛选并逐步传代,RT-PCR和Western blot法检测阳性细胞克隆FIH mRNA和蛋白表达。结果 转染pcDNA3.1-V5-His-A-FIH后Caco-2细胞FIH mRNA是普通Caco-2细胞的1.98倍,而FIH蛋白含量是普通Caco-2细胞的1.70倍。结论 成功建立了高效、稳定表达人FIH基因的肠上皮细胞株。

缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor-1α,HIF-1α)通过调控与缺氧反应相关的靶基因转录而在缺氧反应中起重要作用。研究表明,烧伤后HIF-1α mRNA及蛋白表达升高,并对烧伤后细胞能量代谢及葡萄糖转运具有调控作用[1-3]。近来研究表明,HIF-1抑制因子(factor inhibiting HIF-1,FIH)在HIF-1α转录活性的调控中具有重要作用。为此,我们成功建立了高表达FIH的肠上皮细胞株,旨在为深入研究HIF-1α的作用及其调控机制搭建技术平台。

1 材料与方法

1.1 材料

人肠上皮细胞株Caco-2由上海细胞所提供;含人FIH全长cDNA的质粒pcDNA3.1-V5-His- A-FIH由美国得克萨斯西南医学中心Bruick博士惠赠。FIH抗体由Novus Biologicals生产;β-actin抗体购自Sigma公司;Opti-MEM、Lipofectamine 2000、Trizol、ThermoScript RT-PCR System购自Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒扩增与提取 将pcDNA3.1-V5-His-A-FIH质粒转染大肠杆菌DH5α,提取质粒。

1.2.2 FIH基因转染 待培养皿中Caco-2细胞生长至70%~80%融合时,用Opti-MEM培养基漂洗后,加入DNA、Lipofectamine 2000及Opti-MEM。培养8~12 h后弃Opti-MEM,改用含10%小牛血清的DMEM培养液培养。

1.2.3 阳性克隆的筛选 转染24 h后将细胞传代再培养24 h,改用含G418(500 μg/ml)的DMEM培养液培养,直到阳性克隆形成。

1.2.4 阳性克隆的鉴定

1.2.4.1 RT-PCR方法 用Trizol提取总RNA,RNA的逆转录、PCR反应按ThermoScript RT-PCR System试剂盒使用说明进行。引物及扩增条件为:①GAPDH(GenBank登录号:BC083511)引物上游为5′-TCAACGGATTTGGTCGTCGTATTG-3′,下游为5′-TGGAAGATGGTGATGGGATT-3′。扩增条件:94 ℃,5 min;94 ℃ 45 s,50 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,35个循环;72 ℃ 10 min。PCR产物片段为211 bp。②FIH(GenBank登录号:NM_017902)引物:上游为5′-CAGTTGCGCAGTTATAGCTTC-3′,下游为5′-GCCATCTTCTTCTCATCATAG-3′。扩增条件:94 ℃,5 min;94 ℃ 45 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,35个循环;72 ℃ 10 min。PCR产物片段为236 bp。将PCR产物行琼脂糖凝胶电泳,ChemiDoc XRS图像仪扫描,Quantity One软件分析密度,以目的基因密度与内参GAPDH密度的比值作为目的基因表达的相对含量。

1.2.4.2 Western blot方法 冷PBS漂洗细胞后加入上样缓冲液裂解细胞,12 000×g离心5 min,取上清行7.5% SDS-PAGE电泳并转移至PVDF膜。5%脱脂奶粉封闭1 h,加入FIH抗体(1∶1 000)或β-actin抗体(1∶5 000),4 ℃孵育过夜。洗膜后加入HRP标记二抗(1∶5 000),室温孵育1 h。洗膜后加入发光液,ChemiDoc XRS图像仪采集信号,Quantity One软件分析密度,以目的蛋白密度与内参β-actin密度的比值作为目的蛋白表达的相对含量。

1.3 统计学分析

数据均以$\bar{x} \pm s$表示,组间比较采用t检验。

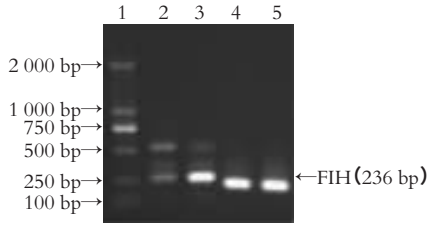
2 结果

2.1 转染FIH对肠上皮细胞FIH mRNA表达的影响

RT-PCR可在普通Caco-2细胞检测到FIH mRNA(图1),表明正常肠上皮细胞即有FIH表达。但在转染FIH基因的Caco-2细胞,FIH mRNA明显高于未转染FIH基因的Caco-2细胞。转染FIH基因与否对内参GAPHD mRNA的表达无明显影响。相对定量分析结果显示,转染FIH基因后Caco-2细胞的FIH mRNA含量为(0.466±0.105),而未转染FIH基因的Caco-2细胞的FIH mRNA含量为(0.235±0.169),前者为后者的

基金项目:国家自然科学基金(30571923,30670952)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30571923, 30670952)
作者简介:王 裴,女,重庆市人,实验技术员,主要从事烧伤肠道损伤方面的研究。电话:13452916968
通信作者:王凤君,电话:(023)68754176
收稿日期:2007-05-17;修回日期:2007-09-06

1.98 倍。二者比较，差异显著（$P < 0.05$），提示稳定转染 FIH mRNA 后，肠上皮细胞 FIH mRNA 表达显著增加。

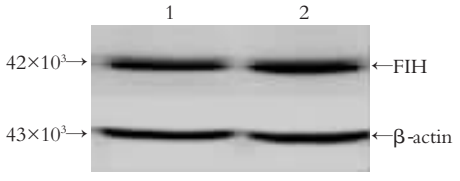


1：DNA 标准；2、4：未转染 FIH 的 Caco-2 细胞；3、5：稳定转染 FIH 的 Caco-2 细胞

图 1　转染 FIH 前后 Caco-2 细胞 FIH mRNA 表达的变化

2.2　转染 FIH 基因对肠上皮细胞 FIH 蛋白表达的影响

普通 Caco-2 细胞也有 FIH 蛋白表达（图 2），但在转染 FIH 基因的 Caco-2 细胞，FIH 蛋白表达明显高于未转染 FIH 基因的 Caco-2 细胞。转染 FIH 基因前后，内参 β-actin 蛋白表达无明显变化。相对定量分析结果显示，转染 FIH 基因的 Caco-2 细胞的 FIH 蛋白含量为（0.100 ± 0.039），是未转染 FIH 基因的 Caco-2 细胞（0.059 ± 0.010）的 1.70 倍，二者比较，差异显著（$P < 0.05$）。提示稳定转染 FIH 基因后，肠上皮细胞 FIH 蛋白表达显著增加。



1：未转染 FIH 的 Caco-2 细胞；2：稳定转染 FIH 的 Caco-2 细胞

图 2　转染 FIH 前后 Caco-2 细胞 FIH 蛋白表达的变化

3　讨论

机体对缺氧的适应性反应涉及到一系列分子机制，诸多调节因子参与这一适应性反应过程的调节，其中 HIF-1 居于关键地位，被认为是缺氧适应性反应中最重要的核转录调控因子。HIF-1 是一个由 HIF-1α 亚基和 HIF-1β 亚基组成的异二聚体，HIF-1α 亚基的表达受氧浓度调节，而 HIF-1β 亚基则持续表达，不受氧浓度的影响。HIF-1α 亚基的表达和转录活性，决定了 HIF-1 的生物学活性。缺氧时细胞中广泛表达的 HIF-1α 蛋白稳定性增加，转位入核，与 HIF-1β 形成二聚体，结合在靶基因调控序列的缺氧反应元件上，诱导了大量基因的表达，这些基因的表达产物参与调控缺氧适应性反应的诸多环节如红细胞生成、糖酵解增加、血管生成等[4]。

目前普遍认为，FIH 在 HIF-1α 转录活性的调控中具有非常重要的作用[5,6]。常氧条件下，FIH 通过至少两种不同的机制抑制了 HIF-1α 的转录活性，一是通过募聚组蛋白脱乙酰酶抑制了染色质重构，二是通过羟化 HIF-1α C-末端转录激活结构域中的天冬酰氨残基（Asn803），阻止了 HIF-1α 与共激活因子 CBP/p300、p160/SRC-1 等蛋白的结合。这种翻译后修饰提供了一种后备机制，使常氧下未被降解的 HIF-1α 蛋白都被灭活，从而不能发挥 C-末端转录激活结构域活性。低氧状态下，FIH 活性受到抑制，羟化被终止，FIH 脱离 HIF-1α，使 C-末端转录激活结构域可以聚集 p300/CBP 等共激活因子，从而增强 C-末端转录激活结构域转录活性。

为了深入研究严重烧伤缺血缺氧时 HIF-1α 的作用及 FIH 对 HIF-1α 转录活性的调控，我们采用脂质体转染法将含有人 FIH 全长 cDNA 序列的真核表达重组质粒 pcDNA3.1-V5-His-A-FIH 转入 Caco-2 肠黏膜上皮细胞，并分别采用 RT-PCR 及 Western blot 方法对阳性克隆细胞进行 FIH mRNA 及蛋白表达的鉴定。结果表明，稳定转染人 FIH 基因的 Caco-2 细胞的 FIH mRNA 及蛋白表达均较未转染人 FIH 基因的普通 Caco-2 细胞明显增加，分别为普通 Caco-2 细胞的 1.98 倍和 1.70 倍。提示，人 FIH 基因已在 Caco-2 细胞高效稳定表达，即成功建立了高效稳定表达人 FIH 的肠上皮细胞株。为进一步研究烧伤后 FIH 对 HIF-1α 转录活性的调控并探索 HIF-1α 在缺血缺氧反应中的作用搭建了关键的技术平台。

关键词：FIH；肠上皮细胞；基因表达

中图法分类号：R329.2　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 党永明，黄跃生，周军利，等. 缺氧诱导因子 1α 对缺氧条件下大鼠心肌细胞糖酵解的影响[J]. 中华烧伤杂志，2005，21(5)：339－342.

[2] 戚华兵，王凤君，汪仕良. 缺氧诱导肝细胞株中葡萄糖转运体 1 表达的变化[J]. 中华烧伤杂志，2005，21(1)：66－67.

[3] 王桂芝，任文杰，吴松远，等. 瓦斯爆炸对大鼠心肌损伤过程中 HIF-1α 的动态变化[J]. 第三军医大学学报，2005，27(7)：640－642.

[4] Maxwell P H. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator [J]. Exp Physiol，2005，90(6)：791－797.

[5] Lando D，Peet D J，Gorman J J，*et al*. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor[J]. Genes Dev，2002，16(12)：1466－1471.

[6] Dann C E，3rd.，Bruick R K，Deisenhofer J. Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1：An asparaginyl hydroxylase involved in the hypoxic response pathway[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2002，99(24)：15351－15356.

（编辑　龙　亮）