

## Vasohibin-2 慢病毒过表达载体的构建及相关增殖功能研究

孙 杰<sup>1,2</sup>, 涂 敏<sup>1,2</sup>, 卫积书<sup>1</sup>, 高文涛<sup>1</sup>, 苗 毅<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院胆胰外科, <sup>2</sup>普外科实验室, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:构建 Vasohibin-2(VASH2)慢病毒过表达载体,获得稳定表达的肝癌细胞株 HepG2,并观察其对 HepG2 增殖的影响。方法:通过逆转录、PCR 技术从细胞总 RNA 中获得 VASH2 目的基因,引入 *Nhe* I 和 *Pst* I 酶切位点,连接到 pTA2 vector 中,经 *Nhe* I 和 *Pst* I 双酶切后再连接到 Lv-CMV-EGFP vector 中,并对重组后的质粒进行双酶切和测序分析;VASH2 过表达载体、pVSV-G 及 delta8.91 3 个质粒共转染 293T 细胞,获得慢病毒感染肝癌细胞株 HepG2,经流式细胞仪分选阳性细胞;提取细胞总 RNA 和总蛋白,利用 real-time PCR 和 Western blot 鉴定稳转细胞株中 VASH2 的表达,用 MTT 法和细胞周期法检测各组 HepG2 的增殖能力。结果:成功构建 VASH2 慢病毒过表达载体,感染肝癌细胞株 HepG2 后能够稳定高表达 VASH2;稳定高表达 VASH2 的 HepG2 增殖能力明显增强 ( $P < 0.05$ )。结论:成功构建了 VASH2 慢病毒过表达载体,并发现 VASH2 可以促进 HepG2 的增殖能力,这为进一步研究 VASH2 在肝癌中的功能及作用机制奠定了基础。

**[关键词]** Vasohibin-2;慢病毒过表达载体;细胞增殖

**[中图分类号]** R329.28

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)06-732-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130604

## Lentivirus-mediated expression of Vasohibin-2 and its effect on proliferation

Sun Jie<sup>1,2</sup>, Tu Min<sup>1,2</sup>, Wei Jishu<sup>1</sup>, Gao Wentao<sup>1</sup>, Miao Yi<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Biliary and Pancreatic Surgery, <sup>2</sup>Laboratory of General Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:**To construct lentivirus-mediated expression vector of Vasohibin-2 (VASH2) and infect hepatocellular carcinoma cell line HepG2, and study its effect on proliferation. **Methods:**The full-length VASH2 was obtained from total cellular RNA by reverse transcription and PCR. Two restriction enzyme cutting sites *Nhe* I and *Pst* I were introduced and linked to pTA2 vector. After restriction digestion of pTA2 vector, the target gene was inserted into the digested expression vector Lv-CMV-EGFP. Then the recombinant was evaluated by restriction digestion and sequencing. The recombinant vector, pVSV-G and delta8.91 were co-transfected into 293T cells to produce packed lentivirus. HepG2 was infected with the recombinant lentivirus and screened by flow cytometry. The expression level of VASH2 mRNA and protein in HepG2 was measured by real-time PCR and Western blot. The proliferation was detected by MTT and cell cycle analysis. **Results:**The lentivirus stably expressing VASH2 were successfully constructed. And the HepG2 proliferation were increased remarkably after infected with the recombinant lentiviral vector. **Conclusion:**The recombinant lentiviral vector expression VASH2 was successfully constructed and VASH2 can promote the proliferation of HepG2, which will provide a foundation for further study on functions and mechanisms of VASH2 in hepatocellular carcinoma.

**[Key words]** Vasohibin-2; lentivirus-mediated expression vector; cell proliferation

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(6): 732-737]

Vasohibin-2(VASH2)是近年来新发现的一个基因,属于 Vasohibin 家族,同源于 Vasohibin-1

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81172267,81170336);卫生公益性行业科研专项经费(201202007)资助

\*通信作者(Corresponding author), E-mail:miaoyi@njmu.edu.cn

(VASH1),且同源性> 50%<sup>[1-5]</sup>。VASH1 是在 VEGF 诱导人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)基因表达谱的 DNA 微阵列实验中所发现,受外源性 VEGF 浓度依赖性调节且具有抗血管生成的活性,它普遍表达于人体的各个组织器官,在人的生理病理过程中发

挥着重要作用<sup>[6-11]</sup>。与 VASH1 不同,VASH2 高表达于骨髓起源的单核细胞中,它不依赖于 VEGF 的浓度调节且具有促进血管生成的作用<sup>[1,12]</sup>。最近本课题组发现,与癌旁组织相比较,VASH2 高表达于肝癌组织中<sup>[13]</sup>,虽然具体机制有待进一步研究,但这一发现对于进一步研究 VASH2 与肝癌间关系起着重要意义。

本研究构建了 VASH2 慢病毒过表达载体,通过三质粒系统共转染感受态细胞 293T,包装产生病毒后感染人肝癌细胞株 HepG2,从而构成稳定高表达 VASH2 的细胞株;同时,利用 MTT 法和细胞周期法检测了各组 HepG2 的增殖能力。这为进一步研究 VASH2 在肝癌中的功能及作用机制奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

肝癌细胞株 HepG2、293T 细胞株、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细菌、慢病毒载体 Lv-CMV-EGFP 及辅助包装元件载体 pVSV-G 和 delta8.91 均由本实验室提供。高糖 DMEM、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Wisent 公司,加拿大);Taq DNA 聚合酶、dNTP、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶(*Nhe* I 和 *Pst* I)DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒(QIAGEN 公司,德国);pTA2 Vector (Toyobo 公司,日本);脂质体 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司,美国);SYBR real-time PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本);MTT 粉剂(Sigma 公司,美国);VASH2 多克隆小鼠抗体由日本 Sato 教授赠送;细胞周期检测试剂盒、山羊抗小鼠 HRP 标记二抗、GAPDH 抗体、ECL 显影液及 PVDF 膜(碧云天生物技术研究,中国);PCR 引物、测序由 Invitrogen 公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

HepG2 和 293T 细胞株用含 10%FBS 的 DMEM 培养液,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$  饱和湿度条件下培养,取对数生长期的细胞做实验。

#### 1.2.2 PCR 引物设计与合成

用 TRIzol 试剂提取 HepG2 细胞的总 RNA,经逆转录获得 cDNA,通过 PCR 扩增获得 VASH2 目的基因,引物序列为:F:5'-AATGCTAGCATGACCG-GCTCCGCGGCCGACA-3';R:5'-GCATGCAGCTAA-ATTCCGATTTGATAGCCCACTT-3'。

#### 1.2.3 VASH2 过表达载体的构建

PCR 扩增片段,反应条件为 95 $^{\circ}$ C 10 min 预变性,95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min。把扩增好的片段通过胶回收,连接到 pTA2 vector,转化到 DH5 $\alpha$  感受态细菌,挑选出阳性菌落提取质粒。用 *Nhe* I、*Pst* I 分别双酶切阳性 pTA2 vector 及 Lv-CMV-GFP 空载体,用 T4 DNA 连接酶连接双酶切后的质粒和片段,形成重组载体,转化 DH5 $\alpha$  感受态细菌,经菌液 PCR 检测阳性克隆后进行酶切鉴定并送公司测序。

#### 1.2.4 重组慢病毒载体的包装、细胞感染和流式细胞分选

用 293T 细胞铺 6 孔板,使 24 h 后汇合率达到 70%。三质粒共 4  $\mu$ g (慢病毒质粒:pVSV-G:delta8.91=4:3:2)加入到 250  $\mu$ l DMEM 培养基中,同时取 10  $\mu$ l 脂质体 Lipofectamine 2000 加入到 250  $\mu$ l DMEM 培养基中,室温孵育 5 min 后混合,再室温孵育 20 min,均匀滴入 293T 细胞中。6 h 后更换培养液,48 h 后收取上清病毒液。上清病毒液用 0.45  $\mu$ m PVDF 微孔滤膜过滤后(加入 5  $\mu$ g/ml 的聚凝胺)感染肝癌细胞株 HepG2,48~72 h 收取细胞进行流式分选(感染后的 HepG2 带绿色荧光),获得稳定高表达 VASH2 的细胞株。

#### 1.2.5 Real-time PCR 的检测

采用 TRIzol 提取细胞总 RNA,检测各组细胞内 VASH2 基因的表达,VASH2 real-time PCR 的引物为:F:5'-GGGAGAAATGGTGGGCG-3',R:5'-GCCA-GTCTGGGATCGTCATC-3'。 $\beta$ -actin 的引物为:F:5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3',R:5'-CAG-CGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'。反应体系 10  $\mu$ l,先 95 $^{\circ}$ C 10 min 后,按照 95 $^{\circ}$ C 15 s、60 $^{\circ}$ C 60 s,扩增 40 个循环。

#### 1.2.6 Western blot 的检测

提取细胞总蛋白,4:1 体积与 5  $\times$  SDS 上样缓冲液混合,100 $^{\circ}$ C 变性 5 min。进行 12%SDS-PAGE 凝胶电泳。PVDF 膜用含 5%脱脂奶粉的 TBST 室温封闭,2 h 后弃封闭液,加入 VASH2 多克隆小鼠抗体(1:1 500),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗膜 3  $\times$  10 min,加入抗鼠二抗(1:1 000),孵育后洗膜、显影,并以 GAPDH 作对照。

#### 1.2.7 MTT 法检测

分别取对数生长期的 VASH2 过表达组 HepG2 (HepG2-VASH2)、阴性对照组 HepG2(HepG2-EGFP)和空白组的野生型 HepG2,接种于 96 孔板,每孔 2  $\times$  10 $^3$  个细胞,每组细胞取 3 个复孔,分别培养 1、2、3、4

和5 d后进行MTT检测。具体方法:每孔加20 μl的5 mg/ml MTT溶液,37℃孵育4 min,离心10 min(1 500 r/min),弃液,每孔加二甲基亚砜200 μl,震荡5 min,酶标仪550 nm波长测光密度值。

### 1.2.8 细胞周期检测

收集对数生长期的3组细胞,用PBS洗涤,胰酶消化后离心3 min(1 500 r/min),弃上清液,70%乙醇固定,-20℃过夜,PBS洗涤2次,用含有0.2% Triton X-100,10 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA),100 μg/ml RNase A和50 μg/ml 碘化丙啶(PI)的500 μl PBS重悬细胞,室温下静置30 min,之后用流式细胞仪检测细胞周期。

### 1.3 统计学方法

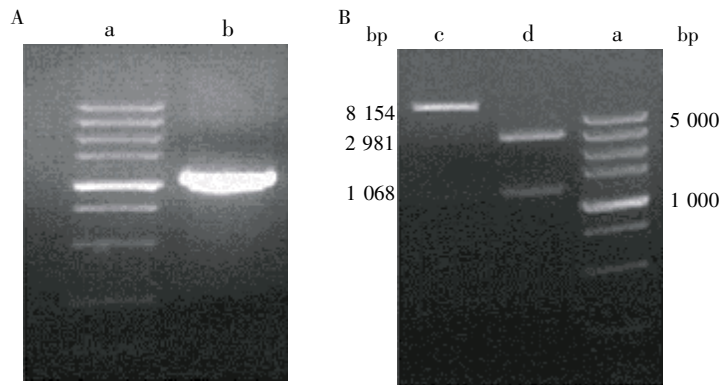
采用SPSS13.0软件对数据进行t检验等相关

统计分析,数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PCR扩增VASH2的片段及重组T载体与慢病毒载体的双酶切鉴定

通过PCR从肝癌细胞株HepG2中扩增出VASH2的片段,经琼脂糖凝胶电泳后可见一特异性条带,大小为1 068 bp(图1A),与软件预测值符合;扩增的片段与pTA2 vector连接,经双酶切后可见T载体片段(2 981 bp)和目的基因片段(1 068 bp,图1B);慢病毒载体与目的基因片段连接,经双酶切后可见大小为8 154 bp的慢病毒载体片段和大小为1 068 bp的目的基因片段(图1B)。



A:PCR扩增VASH2片段琼脂糖凝胶电泳;B:重组T载体与慢病毒载体双酶切鉴定。a:Marker; b:PCR扩增的VASH2片段;c:慢病毒载体片段和目的片段;d:T载体片段和目的片段。

图1 VASH2片段的扩增及双酶切鉴定

Figure 1 Amplifying VASH2 and evaluating the recombinant vector by restriction digestion

### 2.2 慢病毒过表达载体的测序

经菌液PCR及酶切分析后,将正确的克隆送Invitrogen公司测序,结果与UCSC Genome Bioinformatics中的序列一致,证实慢病毒过表达载体构建成功(图2)。

### 2.3 慢病毒的包装和HepG2的感染

293T细胞经三质粒共转染后产生慢病毒过表达颗粒,24 h后在倒置显微镜下观察,可见转染成功的细胞带有绿色荧光(重组慢病毒质粒携带绿色

荧光蛋白基因),转染率大于70%(图3A)。48 h后收集慢病毒颗粒,经检测得出病毒颗粒滴度为 $5 \times 10^7$ 。慢病毒感染HepG2后,细胞形态及生长状态无明显变化,感染效率40%左右。经流式分选后,继续培养细胞代数,其阳性率可达90%以上(图3B)。

### 2.4 VASH2过表达细胞株的鉴定

采用real-time PCR和Western blot分别检测空白组(HepG2-WT)、对照组(HepG2-EGFP)及过表达组(HepG2-VASH2)VASH2的表达量,发现过表达组

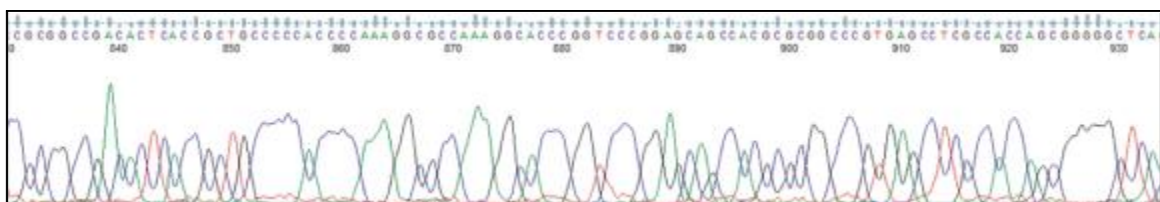
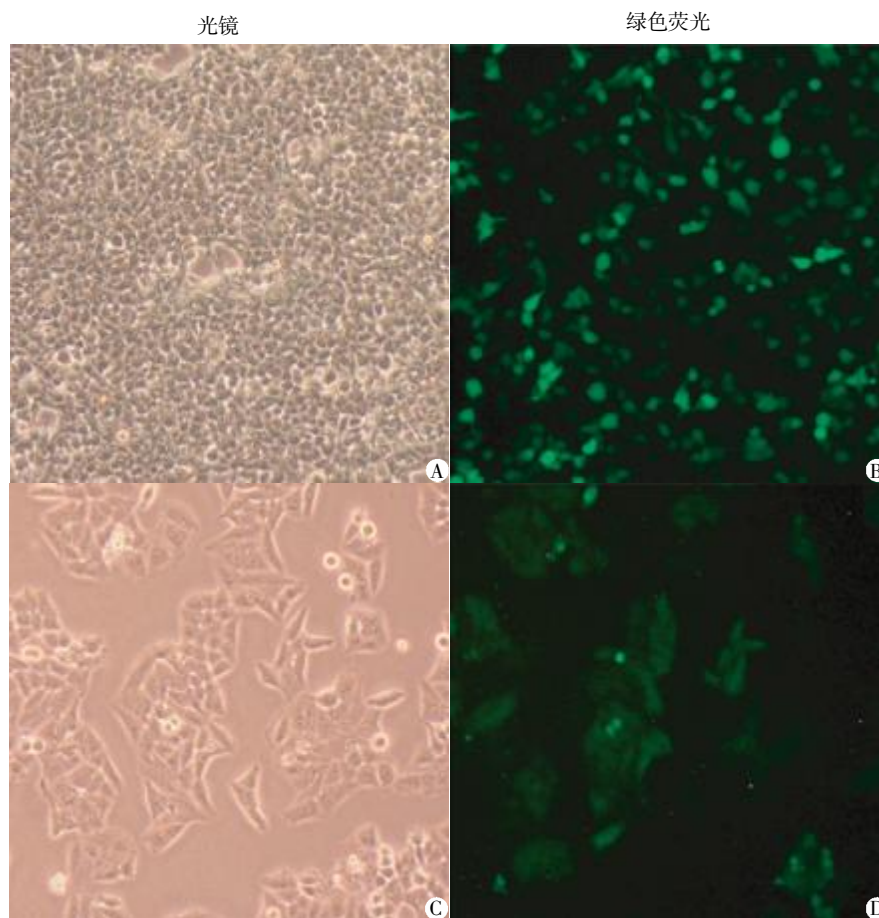


图2 慢病毒过表达载体测序分析的结果

Figure 2 Sequencing result of the recombinant lentiviral vector expression VASH2



A、B:三质粒共转染的 293T 细胞( $\times 200$ );C、D:病毒感染的 HepG2 细胞( $\times 200$ )。

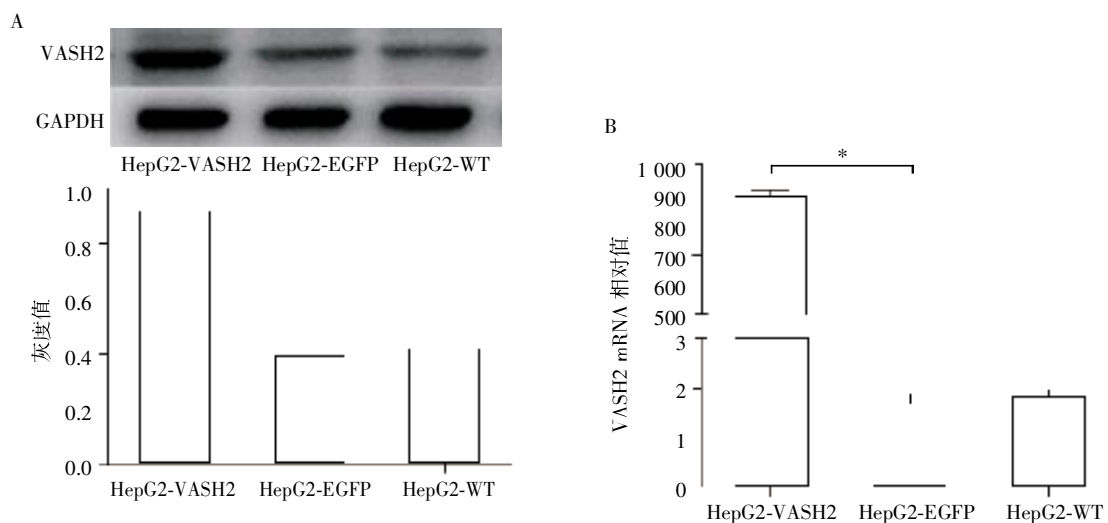
图 3 VASH2 重组慢病毒的包装及感染

Figure 3 Constructing recombinant lentivirus expression VASH2 and infecting HepG2

的表达量显著高于对照组( $P < 0.05$ ),而对照组和空白组之间无统计学差异( $P > 0.05$ ,图 4)。

### 2.5 HepG2 增殖能力的检测

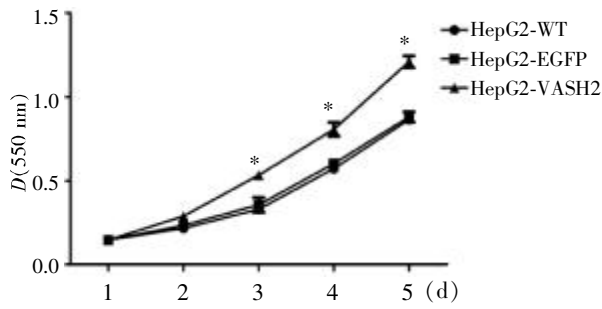
经 MTT 法检测发现过表达组细胞增长速度明显快于对照组( $P < 0.05$ ),而对照组与空白组间无明显差异( $P > 0.05$ ,图 5)。



A:Western blot 检测 VASH2 的蛋白表达;B:Real-time PCR 检测各组 HepG2 中 VASH2 基因的表达(\* $P < 0.05$ )。

图 4 过表达细胞株 HepG2 的鉴定

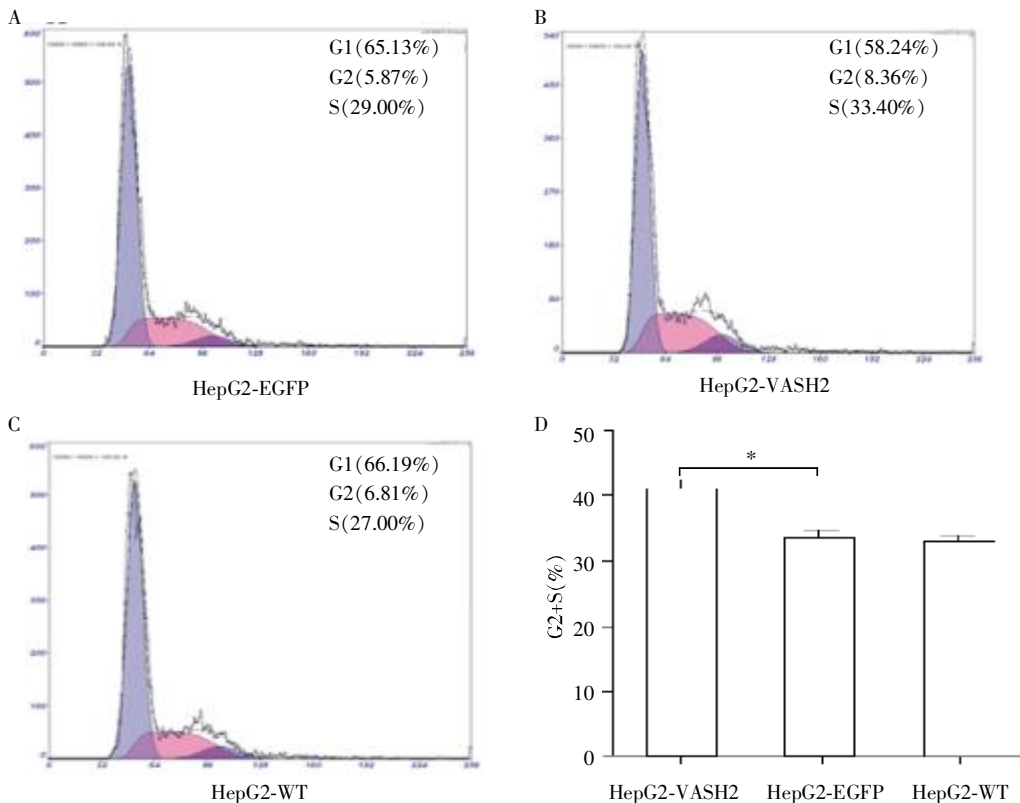
Figure 4 Identification of stably transfected HepG2 cells



与同时时间点 HepG2-WT、HepG2-EGFP 组相比, \* $P < 0.05$ 。

图5 各组 HepG2 的生长曲线

Figure 5 Effects of VASH2 on the proliferation of HepG2 cells



A: 对照组 HepG2-EGFP 的周期检测; B: 实验组 HepG2-VASH2 的周期检测; C: 空白对照组 HepG2 的周期检测; D: 3 组增殖能力分析 (\* $P < 0.05$ )。

图6 各组 HepG2 细胞周期的检测

Figure 6 Cell cycle analysis of HepG2 cells

的是原发性肝癌。原发性肝癌是全世界最常见的恶性肿瘤之一,全球发病率位居恶性肿瘤中的第5位,病死率居第4位<sup>[14]</sup>。根据相关统计,我国肝癌年发病人数约35万,年死亡人数约32万,发病率和病死率均居肿瘤中的第2位<sup>[15]</sup>。肝癌发病隐匿,进展快,容易转移,早期缺乏典型的临床症状和体征,发现时往往已属于中晚期<sup>[16]</sup>。目前手术切除是治疗肝癌的最佳方法,但手术切除率低,根治切除术后5年内复发率高达61.8%<sup>[17-18]</sup>。可见,对于肝癌的治疗急需寻找一种新的靶点。

### 2.6 细胞周期的检测

通过流式细胞分析技术检测各组细胞所处的细胞周期比例,发现过表达组细胞中处于G2+S期的细胞比例多于对照组,并且差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而对对照组与空白组G2+S期细胞所占的比例无明显差异( $P > 0.05$ ,图6)。

### 3 讨论

肝癌是指发生于肝脏的恶性肿瘤,包括原发性肝癌和转移性肝癌两种,人们日常说的肝癌多数指

作为 Vasohibin 家族的一个新成员, VASH2 表现特点明显不同于 VASH1。它在内皮细胞中表达很低,体外实验中无法由内皮细胞介导产生,但在体内实验中可以检测到。Kimura 等<sup>[1]</sup>在新生小鼠皮下血管模型中发现, VASH2 作用的区域与 VASH1 不同,且当外源性的 VASH2 在抑制血管终止区终止时,其内源性 VASH2 仍保持极低水平,同时,他们还发现 VASH2 主要表达于骨髓来源的单核细胞中。Shen 等<sup>[3]</sup>研究发现在胃癌转移性的细胞株中 VASH1 和 VASH2 的 mRNA 表达要显著高于胃癌非转移性细

胞株,且不同胃癌细胞株中,VASH1 与 VASH2 的表达受肿瘤相关性巨噬细胞(tumor-associated macrophages,TAM)与缺氧的调控程度也不相同。另外,在胃癌细胞株中,他们发现 VASH1 与血管内皮细胞生长因子 A(vascular endothelial growth factor A,VEGF-A)的表达有强烈的正相关性,而 VASH2 与 VEGF-A 的表达没有相关性。这些结果表明,VASH2 在血管生成和肿瘤发展的过程中所起的作用不同于 VASH1,但具体作用机制尚不明确。

本课题组前期研究发现,与癌旁组织相比较,VASH2 高表达于肝癌组织中,这可能是由于组蛋白修饰促进了 VASH2 的转录激活<sup>[13]</sup>。纵观前人对肿瘤的研究历史来看,VASH2 在肝癌中表达升高提示它可能作为一个新的癌基因样基因,参与肿瘤的发生发展,并在肿瘤的进展过程中发挥着特定的作用。但具体发挥着怎样的作用以及是否关键,有待于进一步研究。

在本实验中,成功构建了 VASH2 慢病毒过表达载体,感染肝癌细胞株 HepG2 后通过流式细胞仪分选获得稳定高表达 VASH2 的细胞株,这为进一步研究 VASH2 在肝癌中的作用机制奠定了基础。通过 MTT 检测和细胞周期检测,发现 VASH2 过表达细胞株的增殖能力明显增强。本文推论:在肝癌组织中增高的 VASH2 促进了肝癌细胞的增殖。因此,VASH2 可能是一个肿瘤增殖相关基因,这一发现可能为肝癌的治疗提供了一个新的靶点,为进一步理解肿瘤的生物学行为和肿瘤的治疗奠定了基础。

#### [参考文献]

[1] Kimura H,Miyashita H,Suzuki Y, et al. Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis [J]. *Blood*,2009,113(19):4810-4818

[2] Sato Y,Sonoda H.The vasohibin family:a negative regulatory system of angiogenesis genetically programmed in endothelial cells [J].*Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2007,27(1):37-41

[3] Shen Z,Kauttu T,Seppänen H,et al. Vasohibin-1 and vasohibin-2 expression in gastric cancer cells and TAMs[J]. *Med Oncol*,2012,29(4):2718-2726

[4] Sato Y. The vasohibin family:Novel regulators of angiogenesis[J]. *Vascul Pharmacol*,2012,56(5-6):262-266

[5] Sato Y. The vasohibin family:a novel family for angiogen-

esis regulation[J]. *J Biochem*,2013,153(1):5-11

[6] Abe M,Sato Y. cDNA microarray analysis of the gene expression profile of VEGF-activated human umbilical vein endothelial cells[J]. *Angiogenesis*,2001,4(4):289-298

[7] Nasu T,Maeshima Y,Kinomura M,et al. Vasohibin-1,a negative feedback regulator of angiogenesis,ameliorates renal alterations in a mouse model of diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*,2009,58(10):2365-2375

[8] Sato Y,Abe T,Wakusawa R,et al. Vitreous levels of vasohibin-1 and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Diabetologia*,2009,52(2):359-361

[9] 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

[10] Miyake K,Nishida K,Kadota Y,et al. Inflammatory cytokine-induce expression of vasohibin-1 by rheumatoid synovial fibroblasts [J]. *Acta Med Okayama*,2009,63(6):349-358

[11] Shirasuna K,Kobayashi A,Nitta A,et al. Possible action of vasohibin-1 as an inhibitor in the regulation of vascularization of the bovine corpus luteum [J]. *Reproduction*,2012,143(4):491-500

[12] Takahashi Y,Koyanagi T,Suzuki Y,et al. Vasohibin-2 expressed in human serous ovarian adenocarcinoma accelerates tumor growth by promoting angiogenesis [J]. *Mol Cancer Res*,2012,10(9):1135-1146

[13] Xue X,Gao W,Sun B,et al. Vasohibin 2 is transcriptionally activated and promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*,2012,[Epub ahead of print]

[14] Bruix J,Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*,2005,42(5):1208-1236

[15] Xiaobin F,Zipei L,Shuguo Z,et al. The Pringle manoeuvre should be avoided in hepatectomy for cancer patients due to its side effects on tumor recurrence and worse prognosis[J]. *Med Hypotheses*,2009,72(4):398-401

[16] 周梅芳,林 彬,朱杰敏,等. 靶向肝癌表达 p16 基因的腺病毒载体对裸鼠移植瘤的抗癌活性[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2008,28(2):166-169

[17] Delis SG,Bakoyiannis A,Tassopoulos T,et al. Hepatic resection for hepatocellular carcinoma exceeding Milan criteria[J]. *Surg Oncol*,2010,19(4):200-207

[18] 涂云霞,孔炜伟,李晓林,等. 汉防己甲素联合顺铂对小鼠肝癌的局部治疗作用[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2008,28(4):472-474,483

[收稿日期] 2013-02-17