

## 稳定表达人血红素加氧酶-1 细胞系的建立及其功能鉴定

杨根欢<sup>1</sup>, 吴 为<sup>2</sup>, 李砚川<sup>2</sup>, 倪 冷<sup>1</sup>, 王占启<sup>1</sup>, 宋希涛<sup>1</sup>, 刘昌伟<sup>1</sup>

<sup>1</sup>中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院血管外科, 北京 100730

<sup>2</sup>中国医学科学院 北京协和医学院 基础医学研究所医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005

通信作者: 刘昌伟 电话: 010-69152501, 电子邮件: liucw@vip.sina.com

**摘要:** **目的** 构建稳定表达人血红素加氧酶-1 (HO-1) 的细胞系, 探讨内源性过表达 HO-1 对抗细胞氧化损伤的作用。**方法** PCR 扩增 HO-1 基因并将其克隆至改造的慢病毒载体 pLentiLox3.7 中, 构建携带目的基因的重组质粒。用重组质粒转染 HEK293T 细胞, 并用 Western blot 检测 HO-1 的表达。将重组质粒与慢病毒辅助质粒 (p1p1、p1p2、VSVG) 共同转染 HEK293T 细胞, 包装有活力的慢病毒。用携带 HO-1 的慢病毒感染 HEK293T 细胞, 筛选出能稳定表达目的基因的单克隆, 并行 Western blot 检测 HO-1 的表达。将过氧化氢加入正常的及过表达 HO-1 的 HEK293T 细胞和人脐静脉内皮细胞, 检测细胞内活性氧的含量。**结果** 成功筛选出能稳定表达 HO-1 的单克隆细胞系并扩大培养, Western blot 检测其 HO-1 的表达明显升高。加入过氧化氢后, 过表达 HO-1 的 HEK293T 细胞和人脐静脉内皮细胞内的活性氧明显减少。**结论** 成功构建了能稳定表达人 HO-1 的细胞系, 内源性过表达 HO-1 能够对抗细胞的氧化损伤。

**关键词:** 血红素加氧酶-1; 慢病毒; 稳定细胞株; 氧化损伤

中图分类号: R34 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2014)04-0420-06

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2014.04.013

### Establishment and Functional Identification of A Stable Cell Line Overexpression Heme Oxygenase-1

YANG Gen-huan<sup>1</sup>, WU Wei<sup>2</sup>, LI Yan-chuan<sup>2</sup>, NI Leng<sup>1</sup>, WANG Zhan-qi<sup>1</sup>,  
SONG Xi-tao<sup>1</sup>, LIU Chang-wei<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Vascular Surgery, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences,  
CAMS and PUMC, Beijing 100005, China

Corresponding author: LIU Chang-wei Tel: 010-69152501, E-mail: liucw@vip.sina.com

**ABSTRACT: Objective** To establish a stable cell line overexpression heme oxygenase-1 (HO-1) mediated by a modified lentivirus system and identify its function. **Methods** The HO-1 gene was amplified by polymerase chain reaction and cloned into the modified pLentiLox3.7 expression vectors. The recombinant plasmids were transfected into HEK293T cells and the HO-1 was detected by Western blot. The recombinant plasmids were transfected into HEK293T cells to produce the viruses, with the helping plasmids including p1p1, p1p2, and VSVG. HEK293T cells were infected by the viruses and the cells that can express HO-1 were identified by Western blot. The reactive oxygen species were detected in the HO-1-overexpression HEK293T cells and the normal cells after the adding of hydrogen peroxide. The same experiment was performed with human umbilical vein endo-

thelial cells. **Results** The stable cell line that can overexpress HO-1 was established, which was verified by Western blot. The reactive oxygen species in the HO-1-overexpression HEK293T cells and human umbilical vein endothelial cells decreased obviously after exposure to hydrogen peroxide. **Conclusions** The lentivirus-carrying HO-1 was successfully packaged and the stable cell line overexpression HO-1 was established. HO-1 can play a protective role in the course of oxidative damage.

**Key words:** heme oxygenase-1; lentivirus; stable cell lines; oxidative damage

*Acta Acad Med Sin*, 2014,36(4):420-425

血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 是体内血红素代谢的限速酶, 它可以将血红素代谢为胆红素、一氧化氮及  $\text{Fe}^{2+}$ 。胆红素在体内具有强大的抗氧化作用, 一氧化氮具有重要的细胞保护作用,  $\text{Fe}^{2+}$  也是重要的抗氧化损伤的物质<sup>[1]</sup>。因此 HO-1 在体内具有重要的抗氧化损伤和细胞保护的作用, 同时还发现其具有抗炎、抗凋亡等重要作用<sup>[2]</sup>。大量研究表明 HO-1 对机体的多个脏器均具有重要的保护功能, 同时还与肿瘤有密切关系<sup>[3]</sup>。氧化损伤可由活性氧、氧自由基及超氧离子等引起, 能够氧化体内的核酸、蛋白质及脂质, 给机体带来巨大的损害<sup>[4]</sup>。有研究证实, 氧化损伤能够造成细胞凋亡、细胞信号转导异常、细胞膜流动性异常、炎症的产生及癌症的发生等<sup>[5]</sup>。本研究构建携带 HO-1 基因的慢病毒载体, 同时筛选出能稳定表达 HO-1 的单克隆细胞系并对其抗氧化损伤功能进行初步鉴定, 为进一步研究 HO-1 基因的功能奠定基础。

## 材料和方法

**材料** 改造的 pLentiLox3.7 质粒、慢病毒辅助质粒 (plp1、plp2、VSVG), HEK293T 细胞由中国医学科学院北京协和医学院基础医学研究所医学分子生物学国家重点实验室惠赠。引物合成 (美国 Invitrogen 公司), 限制性核酸内切酶和 T4 DNA 连接酶 (英国 NEB 公司), DNA 聚合酶 (北京 Transgene 生物技术有限公司), FuGENE HD 转染试剂 (瑞士 Roche 公司), 高糖-DMEM 培养基 (美国 Hyclone 公司), 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 及内皮细胞培养基 (ScienCell 公司), Opti-MEM (美国 Gibco 公司), 胎牛血清 (美国 Gibco 公司), 鼠抗人 HO-1 抗体 (美国 BD 公司), 山羊抗小鼠 IgG 抗体 (北京中杉金桥有限公司), 细胞内氧化应激活性氧红色荧光检测试剂盒 (上海杰美基因医药科技有限公司)。

**引物设计与目的基因扩增** 根据 Genbank 人源 HO-1 基因的序列设计引物, 上下游引物分别加入酶切位点 Mlu I 和 BamH I。引物序列如下: 正向: 5'-TAAGAATTCCGCCACCATGGAGCGTCCGCAACC-3'; 反向: 5'-AATACGCGTCATGGCATAAAGCCCTACAGC-3'。PCR 扩增 HO-1 基因, 目的基因模板由中国医学科学院北京协和医学院基础医学研究所医学分子生物学国家重点实验室惠赠。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳回收。

**重组质粒的构建与鉴定** 对 PCR 产物和改造的病毒空载体 pLentiLox3.7 (带有标记标签) 行 Mlu I 和 BamH I 双酶切。纯化后于 4 °C 过夜连接, 并将连接产物转化于感受态大肠杆菌, 涂于 LB 平板后 37 °C 孵育 16 h。PCR 鉴定 3 个阳性的克隆, 并用 3 个重组质粒转染 HEK293T 细胞, Western blot 检测 HEK293T 中 HO-1 的表达。收集细胞并用 SDS 裂解液裂解细胞, 充分震荡至液体透明。将细胞裂解后的液体置于 100 °C 中孵育 10 min 后, 常温下 12 000 r/min (转矩: 3 100 Nm) 离心 10 min。BCA 法测定蛋白浓度并计算上样量。每孔上样 20  $\mu\text{g}$ , 140 V 下 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 60 min。330 mA 下转膜 60 min, 将蛋白转移至 NC 膜上。5% 脱脂奶粉封闭。4 °C 下单克隆鼠抗 HO-1 (1:4 000) 抗体孵育过夜。洗膜 3 次后辣根过氧化物酶标记二抗 (1:8 000) 室温下孵育 1 h, 再次洗膜 3 次后显影。

**慢病毒的包装和收集** 将制备的重组质粒与辅助质粒 (plp1、plp2、VSVG) 共同转染 HEK293T 细胞。转染前 1 h 更换新鲜培养基。重组质粒与辅助质粒总共 50  $\mu\text{g}$ , 二者之比为 2:1。将二者加入 150 mmol/L 的 NaCl 中, 总体积为 1 ml。取 FuGENE HD 转染试剂 20  $\mu\text{l}$  加入 150 mmol/L 的 NaCl 中, 总体积为 1 ml, 室温静置 5 min。将稀释的 FuGENE HD 转染试剂逐滴加入质粒的稀释溶液中, 轻轻混匀并室温静置 20 min。

将上述转染工作液逐滴加入 HEK293T 细胞的培养皿中，轻轻混匀，置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的孵箱中。12 h 后换液，24 和 48 h 后收集培养基并置于 4 °C 冰箱中保存。将收集的培养基用 0.22 μm 的滤器过滤，4 °C 离心机中 18 000 r/min (转矩: 27 450 Nm) 离心 3 h。弃掉上清后用 200 μl 冷 PBS 重悬病毒，待溶解后置于 -80 °C 冰箱中保存或直接用于感染细胞。

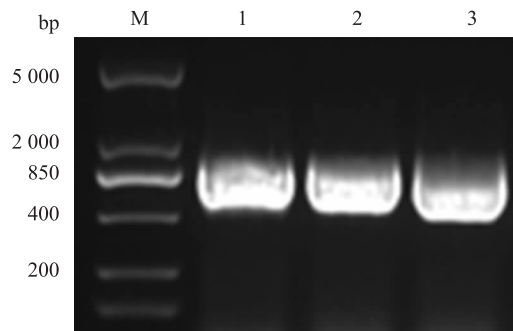
**病毒感染 HEK293T 细胞及单克隆挑选** 将 HEK293T 细胞从液氮中取出立即置于 37 °C 温水中，轻轻震荡使其快速溶解。然后置于离心管中，室温下 2 000 r/min (转矩: 300 Nm) 离心。弃掉上清后，加入新鲜培养基 2 ml 吹匀，将细胞接种于 24 孔培养板中。12 h 后细胞汇合 80% 时，分别加入 5、10、20 μl 病毒液感染。同时加入终浓度为 5 μg/μl 的聚凝胺辅助感染。感染 72 h 后于荧光显微镜下观察是否有绿色荧光，消化细胞并调节其终浓度为 10 个/ml。将细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板行单克隆筛选，每周补液 200 μl，4 周后挑选带荧光的单克隆进行鉴定和扩大培养。同时行 Western blot 检测 HO-1 的表达。

**加入过氧化氢的 HEK293T 及 HUVEC 内活性氧的检测** 用二氢溴化乙啶 (dihydroethidium bromide; DHE) 检测细胞内活性氧的含量是基于 DHE 能够完全自由通过细胞膜并在细胞内长期滞留而不外漏，一旦被细胞内活性氧氧化即转变为溴化乙啶，溴化乙啶进入细胞核后与 DNA 紧密结合并产生红色荧光。将稳定表达 HO-1 及正常对照的 HEK293T 细胞传代于 6 孔板中，其中实验组传两个孔，对照组传 4 个孔。细胞铺约 80% 时，将两个孔的实验组和两个孔的对照组加入终质量浓度为 0.5 mmol/L 的过氧化氢，留两孔正常 HEK293T 做空白对照。3 h 后换液，加入稀释的 DHE (1:1 000)，37 °C 孵育 20 min。吸尽 DHE 后加入试剂盒中的保存液，置于荧光显微镜下观察各组荧光强度

并照相，荧光的强弱代表细胞内活性氧的含量即细胞被氧化的程度。同样复苏人脐静脉内皮细胞于 6 孔板中，分组同 HEK293T。待细胞汇合至 50% 时，用携带 HO-1 的慢病毒感染实验组的两个孔的细胞。72 h 后进行实验，方法同 HEK293T 细胞，同时行 Western blot 检测 HUVEC 中 HO-1 的表达情况。

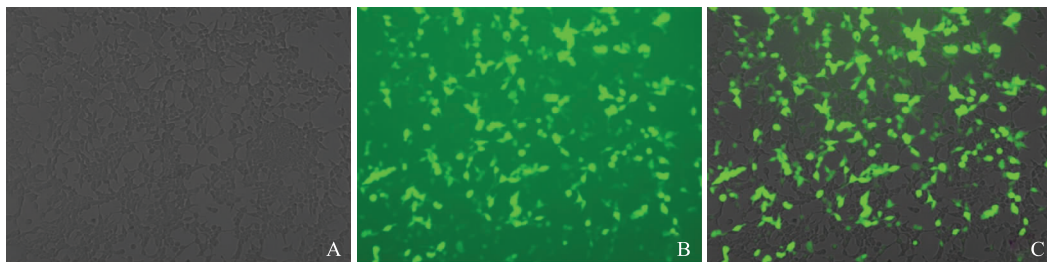
## 结 果

**重组质粒的鉴定** 将目的基因扩增产物和改造的病毒空载体 pLentiLox3.7 行 Mlu I 和 BamH I 双酶切后连接并转化。挑取 3 个阳性克隆行 PCR 鉴定，结果显示目的基因 HO-1 片段大小与预期的相符 (图 1)。用 3 个重组质粒转染 HEK293T 细胞，48 h 后置于荧光显微镜下观察，结果显示绿色荧光明显且转染效率较高 (图 2)。收集转染重组质粒的细胞行 Western blot 检测 HO-1 的表达，结果显示与对照组相比 HO-1 (带有标记标签) 表达明显增高 (图 3)。



HO-1: 血红素加氧酶-1; M: marker; 1~3: 重组质粒  
HO-1: heme oxygenase-1; M: marker; 1-3: recombinant plasmid  
图 1 PCR 检测重组质粒中 HO-1 基因

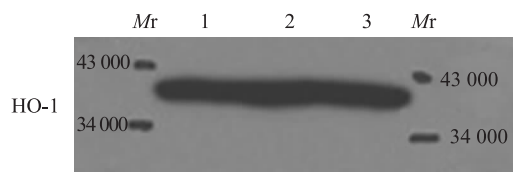
Fig 1 Identifying the HO-1 gene in the recombinant plasmid by polymerase chain reaction



A. 光镜下视野; B. 荧光下视野; C. 合并视野  
A. vision under the ordinary light; B. vision under the fluorescent light; C. the merged vision

图 2 重组质粒转染 HEK293T 细胞

Fig 2 The HEK293T cells transfected by the recombinant plasmid



Mr: 相对分子质量; 1~3: 重组质粒

Mr: relative molecular mass; 1-3: recombinant plasmid

图3 转染重组质粒的 HEK293T 细胞行 Western blot 检测 HO-1

Fig 3 Detecting the HO-1 in the transfected HEK293T cells by Western blot

**慢病毒包装** 将重组质粒与辅助质粒共同转染 HEK293T 细胞。24 h 后置于荧光显微镜下观察有绿色荧光出现, 表明质粒转染成功。48 h 后荧光显微镜下观察, 荧光亮度强且表达率高, 表明已成功包装出病毒。

**慢病毒感染 HEK293T 细胞** 用包装出的携带 HO-1 目的基因的慢病毒感染 HEK293T 细胞并行单克隆筛选, 荧光显微镜下观察, 结果显示稳定表达 HO-1 的细胞占总细胞的比例接近 100% (图 4)。行 Western blot 检测, 结果显示与对照组相比实验组细胞的 HO-1 表达明显升高 (图 5)。

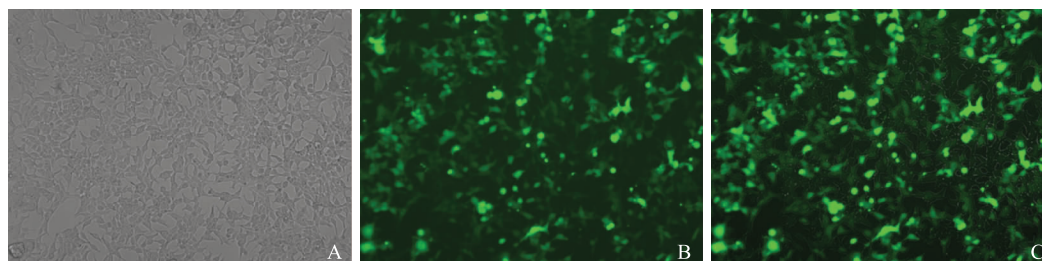
**过表达 HO-1 抗细胞氧化损伤的作用** 将过氧化

氢分别加入过表达 HO-1 及正常对照的 HEK293T 细胞和 HUVEC 中, 用 DHE 检测细胞内活性氧的含量, 结果显示与正常对照组相比, 加入过氧化氢的细胞内活性氧的含量明显增多 (荧光强度明显增强)。而过表达 HO-1 后, 细胞内活性氧含量明显减低 (图 6)。

## 讨 论

人体内的血红素加氧酶有 3 种不同的亚型, 其中 HO-1 被称为热休克蛋白 32, 是诱导型的血红素加氧酶。氧化损伤、炎症刺激、缺血、缺氧、感染等均可诱导其表达<sup>[6]</sup>。在各种诱导因素的作用下, 机体的心血管、肝脏、肾脏、肺等多个脏器均可表达 HO-1<sup>[7]</sup>。大量研究表明 HO-1 与多种疾病密切相关, 如炎症相关性疾病 (感染、哮喘)、肺损伤 (肺氧化损伤、肺纤维化、呼吸机相关的肺损伤)、心血管疾病 (心肌梗死、高血压、肺动脉高压、动脉粥样硬化)、缺血再灌注损伤、器官移植、肿瘤等<sup>[8]</sup>。

目前国内外构建的用于研究 HO-1 的病毒载体有腺病毒载体、腺相关病毒载体、慢病毒载体及逆转录病毒载体<sup>[9-12]</sup>, 各种载体均有其优缺点。慢病毒载体

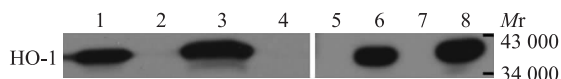


A. 光镜下视野; B. 荧光下视野; C. 合并视野

A. vision under the ordinary light; B. vision under the fluorescent light; C. the merged vision

图4 携带 HO-1 基因的慢病毒感染 HEK293T 细胞

Fig 4 HEK293T cells infected by the lentivirus carrying the HO-1



HUVEC: 人脐静脉内皮细胞; Mr: 相对分子质量; 1、3: 感染病毒的 HEK293T 细胞; 2、4: 空白对照的 HEK293T 细胞; 5、7: 空白对照的 HUVEC; 6、8: 感染病毒的 HUVEC

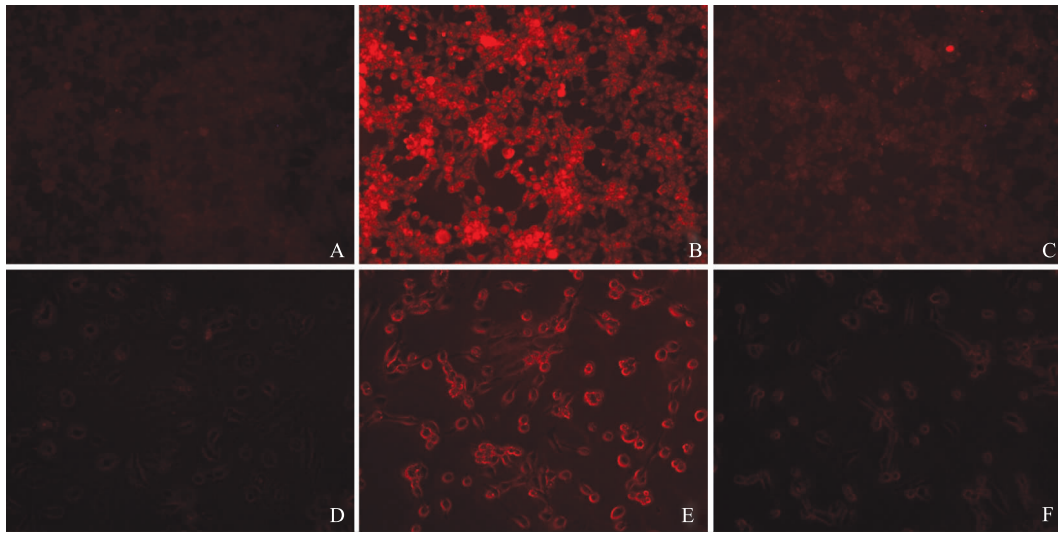
HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; Mr: relative molecular mass; 1 and 3: HEK293T cell infected with virus; 2 and 4: the uninfected HEK293T cell; 5 and 7: the uninfected HUVEC; 6 and 8: HUVEC infected with virus

图5 感染慢病毒的 HEK293T/HUVEC 行 Western blot 检测 HO-1

Fig 5 Detecting the HO-1 in the infected HEK293T/HUVEC cells by Western blot

可以有效地将外源基因整合到宿主的染色体上, 并且能够使之持久性地表达<sup>[13]</sup>。慢病毒载体不但能够感染分裂期细胞而且还能够感染非分裂期细胞, 其感染细胞的种类范围广泛。同时慢病毒还具有能够容纳外源大片段基因、免疫反应较小、安全性好等优点, 是目前研究基因调控及功能的常用载体<sup>[14]</sup>。本研究构建的携带 HO-1 的慢病毒载体具有操作简单、可重复性好、产毒量高、感染率高及表达稳定等优点。本研究通过扩增 HO-1 基因并将其与改造的病毒空载体 pLentiLox3.7 连接构建出了携带 HO-1 目的基因的质粒。用此质粒转染 HEK293T 并行 Western blot 检测, 其





A. 未加入过氧化氢的 HEK293T 细胞; B. 加入过氧化氢的 HEK293T 细胞; C. 加入过氧化氢的过表达 HO-1 的 HEK293T 细胞; D. 未加入过氧化氢的 HUVEC; E. 加入过氧化氢的 HUVEC; F. 加入过氧化氢的过表达 HO-1 的 HUVEC  
 A. the HEK293T cell without hydrogen peroxide added in the medium; B. the HEK293T cell with hydrogen peroxide added in the medium; C. the HO-1-overexpression HEK293T cell with hydrogen peroxide added in the medium; D. the HUVEC without hydrogen peroxide added in the medium; E. the HUVEC with hydrogen peroxide added in the medium; F. the HO-1-overexpression HUVEC with hydrogen peroxide added in the medium

图6 过氧化氢对 HEK293T/HUVEC 的氧化作用及 HO-1 的保护作用

Fig6 Oxidative role of hydrogen peroxide on the HEK293T/HUVEC and the protective role of HO-1

HO-1 表达明显升高, 表明重组质粒构建成功。将包装出的病毒感染 HEK293T 并行 Western blot 检测, 其 HO-1 表达明显升高, 表明成功包装出携带 HO-1 的有活力的慢病毒。同时本研究用包装出的病毒感染 HEK293T 并筛选出能够稳定表达 HO-1 的细胞系, 这解决了正常情况下 HO-1 在细胞内表达低的难点。本研究对 HO-1 的功能进行了初步探索, 加入过氧化氢的 HEK293T 及 HUVEC 内活性氧的含量较空白对照组明显增多, 表明过氧化氢对细胞具有明显的氧化损伤作用。而加入过氧化氢后, 过表达 HO-1 的 HEK293T 及 HUVEC 内活性氧的含量较对照组明显减少, 表明 HO-1 具有明显抗氧化损伤的作用。

综上, 本研究构建了能稳定表达人 HO-1 的细胞系, 并对 HO-1 的抗氧化损伤作用进行了初步研究, 为进一步探索 HO-1 的功能和机制奠定了基础。

### 参 考 文 献

- [1] Origassa CS, Camara NO. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 and heme degradation derived end products in liver injury [J]. *World J Hepatol*, 2013, 5(10):541-549.
- [2] Choi AM, Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996, 15(1):9-19.
- [3] Wijayanti N, Katz N, Immenschuh S. Biology of heme in health and disease [J]. *Curr Med Chem*, 2004, 11(8):981-986.
- [4] Selman C, Blount JD, Nussey DH. Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? [J]. *Trends Ecol Evol*, 2012, 27(10):570-577.
- [5] Fu PP, Xia QS, Hwang HM, et al. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species [J]. *Yao Wu Shi Pin Fen Xi*, 2014, 22(1,SI):64-75.
- [6] Calay D, Mason JC. The multifunctional role and therapeutic potential of ho-1 in the vascular endothelium [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(11):1789-1809.
- [7] Shibahara S, Muller R, Taguchi H, et al. Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985, 82(23):7865-7869.
- [8] Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications [J]. *Physiol Rev*, 2006, 86(2):583-650.
- [9] Juan SH, Lee TS, Tseng KW, et al. Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer inhibits the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circu-*

- lation, 2001, 104(13):1519-1525.
- [10] Melo LG, Agrawal R, Zhang LN, et al. Gene therapy strategy for long-term myocardial protection using adeno-associated virus-mediated delivery of heme oxygenase gene [J]. *Circulation*, 2002, 105(5):602-607.
- [11] Abraham NG, Quan S, Mieyal PA, et al. Modulation of cGMP by human HO-1 retrovirus gene transfer in pulmonary microvessel endothelial cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 283(5):L1117-L1124.
- [12] Laumonier T, Yang S, Konig S, et al. Lentivirus mediated HO-1 gene transfer enhances myogenic precursor cell survival after autologous transplantation in pig [J]. *Mol Ther*, 2008, 16(2):404-410.
- [13] Segura MM, Kamen AA, Garnier A. *Viral vectors for gene therapy* [M]. Barcelona: Humana Press, 2011: 89-116.
- [14] Kaikkonen MU, Lesch HP, Pikkarainen J, et al. (Strept) avidin-displaying lentiviruses as versatile tools for targeting and dual imaging of gene delivery [J]. *Gene Ther*, 2009, 16(7):894-904.

(收稿日期: 2014-03-07)