

转 IE2 基因荷瘤小鼠中 ATF5 功能影响的研究

于 森¹, 刘 婷², 胡 明², 王 斌², 钱冬萌^{1*}

(1. 青岛大学 生命科学学院, 山东 青岛 266071; 2. 青岛大学基础医学院 病原生物学系, 山东 青岛 266071)

摘要 利用转 IE2 基因小鼠荷瘤的方法, 对肿瘤组织中 ATF5 转录激活因子进行定性和定量的检测, 从而探究巨细胞病毒 (HCMV) 即刻早期蛋白 IE86 对 ATF5 功能的影响。通过鼠胶质瘤细胞 GL261 对转基因鼠进行荷瘤, 采用 RT-PCR 和 Western blot 的方法, 对荷瘤鼠的肿瘤组织中转录因子 ATF5 的表达量进行检测。采用 RT-PCR 和 Western blot 的方法检测荷瘤鼠肿瘤组织中转录因子 ATF5 的表达, 结果显示, 转 IE2 基因小鼠体内 ATF5 表达量较正常小鼠 ATF5 表达量高。ATF5 在转 IE2 基因荷瘤鼠中呈现高表达状态, ATF5 是一个与凋亡密切相关的转录因子, 在凋亡、分化及发育等生理过程中发挥着重要作用。

关键词 人巨细胞病毒; IE86; 鼠胶质瘤细胞; 转录激活因子 5 (ATF5); 动物模型

中图分类号 Q935 **文献标识码** A **文章编号** 1005-7021(2019)02-0071-05

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2019.02.011

Effects of ATF5 Function on IE2 Transgenic Mice Bearing Tumor

YU Miao¹, LIU Ting², HU Ming², WANG Bin², QIAN Dong-meng¹

(1. Dept. of Microbiol., Coll. of Life Sci., 2. Dept. of Patho-Biol., Coll. of Basic Med. Sci., Qingdao Uni., Qingdao 266071)

Abstract Qualitative and quantitative detections of ATF5 activated transcription factors in tumor tissue were carried out using method of transfection IE2 mouse tumor to explore the effect of HCMV immediate early protein IE86 on ATF5 function. Transfected mice were treated with GL261 mouse glioma cells. The expression of transcription factor ATF5 in the tumor tissues of tumor-bearing mice was detected by RT-PCR and Western blot methods. RT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of transcription factor ATF5 in the tumor tissue of tumor-bearing mice. The experimental results showed that the expression of ATF5 was higher in IE2 transgenic mice than in normal mice. ATF5 assumed high expression condition in IE2 transgenic mice, and ATF5 was a transcription factor closely related to apoptosis and played important roles in apoptosis, differentiation and development and other physiological processes.

Keywords human cytomegalovirus; IE86; mouse glioma cell; ATF5; animal model

人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV)^[1] 属于疱疹病毒家族, 在人群中引起广泛且持续的感染, 脑是 HCMV 感染的优先位点, 可导致人的精神障碍或癫痫等功能障碍^[2]。HCMV 通过影响细胞存活、细胞周期和侵袭潜能来调控肿瘤恶性表型。转 IE2 基因小鼠^[3] 的建立是通过 DNA 原核显微注射方法, 转入的目的基因仅仅是整合在二倍体动物的其中一条染色体上, 所以是

半合子, 它的后代只有一部分个体带有整合的基因, 有的没有目的基因。所以, 转基因小鼠需要一个相当长的筛选和纯化过程, 以期获得纯合子的转基因小鼠。HCMV 感染后第一个病毒基因是即刻早期基因, 基因中表达最丰富的产物被称为即刻早期 1 和 2 蛋白^[4] (IE72 和 IE86)。IE86 蛋白是一种强烈的反式激活因子, 与基础转录机制的因子相互作用。参与病毒和细胞启动子反式激活

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81471958); 青岛市博士后应用研究项目 (2015160)

作者简介: 于森 女, 硕士研究生。主要研究方向为病原微生物的检测与控制。E-mail: 17854230941@163.com

* 通讯作者。女, 副教授, 硕士生导师。主要研究方向为病毒致病机制与肿瘤发生的关系。E-mail: qiandongmeng@sina.com

收稿日期: 2018-09-22

的 IE86 蛋白在病毒调节蛋白中是独特的,因为它可以同时负向和正向调节病毒和细胞启动子^[5]。越来越多的证据证明,转录激活因子 5 (activating transcription factor5, ATF5)^[6] 是一个与凋亡密切相关的因子。研究表明,在鼠胶质瘤模型中干扰抑制 ATF5 的功能会引起胶质瘤细胞的特异性凋亡,而对胶质瘤细胞周围的正常细胞不具有这种凋亡作用。在许多肿瘤组织中也发现有 ATF5 的高表达,例如在乳腺癌细胞中干扰抑制 ATF5 的表达也能引起细胞的凋亡^[7]。ATF5 是一个与凋亡密切相关的转录因子,在凋亡、分化及发育等生理过程中发挥着重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 小鼠与细胞 国际标准化 ICR(Institute of Cancer Research) C57BL/6 小鼠 30 只,雌性,体重 18 ~ 20 g,6 ~ 8 月龄;GL261 小鼠胶质瘤细胞系购自上海细胞库。

1.1.2 试剂与仪器 胎牛血清(FBS, Hyclone), DMEM(Hyclone), 基因组 DNA 提取试剂盒及组织 RNA 提取试剂盒(康为世纪生物科技有限公司), RNA 反转录试剂盒,青霉素及链霉素(Solarbio), Anti-ATF5 antibody(abcom), HRP 山羊抗鼠 IgG; PCR 仪, BIO RAD Real-time PCR 仪(My-iQ Optics Module), 蛋白凝胶电泳系统(韦伯), 离心机, 恒温培养箱等。

1.1.3 PCR 引物 本研究中使用的 PCR 引物见表 1。

表 1 PCR 引物

Table 1 The sequences of primers used PCR experiments

引物	序列(5'-3')
IE2-F	CCGCAAGAAGAAGAGCAAACG
IE2-R	CACCTGCTGCATACTGGGAAT
ATF5-F	ACCTCCACCACCAGCAGCAG
ATF5-R	AGCCAGCAGGTCCAAGGTATCC

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 GL261 鼠胶质瘤细胞在含有青霉素和链霉素的 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱,每 3 d 传代 1 次,取对数生长期的细胞进行下一步实验。

1.2.2 鼠尾鉴定 剪取长度为 0.4 ~ 0.6 cm 的小鼠鼠尾,分装于 1.5 mL 高压灭菌的离心管内,加入 100 μL 蛋白酶 k 于 70 °C 水浴裂解过夜,用 DNA 提取试剂盒提取鼠尾 DNA,以此 DNA 作为模板,在 IE2 引物、酶等条件下用 PCR 方法进行 DNA 扩增,产物进行琼脂糖电泳检测目的条带,观察最后显影结果,最终确定小鼠的阴性或阳性,以备后续实验。

1.2.3 小鼠荷瘤 当细胞长成至培养瓶 90% 融合时传代,用含有 EDTA 的胰酶消化细胞,消化成细胞数为 1×10^7 /mL 悬浮细胞 2 mL;用 1 mL 的注射器分别给予 3 个实验组的小鼠右侧腋下注射 0.2 mL,对照组小鼠相同位置注射相同剂量的悬浮细胞。记录每日观察并称量小鼠皮下肿瘤的生长情况。

1.2.4 肿瘤组织 DNA 的提取 荷瘤后短时间内荷瘤小鼠的体重呈现直线生长的状态,但是这个过程并不是持续的,待小鼠体重稳定不再增长,并呈现减重现象时,对小鼠进行脱颈处死并解剖,并对肿瘤进行剥离,用电子天平分别称取 20 ~ 30 mg 置于 1.5 mL 高压灭菌的离心管内,用灭菌的研磨杵研磨充分,用 RNA 提取试剂盒进行肿瘤组织的 RNA 提取,并以提取的 RNA 为模板,用反转录试剂盒反转录成 cDNA 置于 -20 °C 备用。

1.2.5 荧光定量 PCR (qPCR) Real-time PCR 采用 β-actin 作为内参基因,内参基因与目的基因各设 3 个平行反应管。反应体系为 20 μL,其中 10 μL SYBR green mixture,上下游引物各 1 μL, cDNA 2 μL,加水至 20 μL,95 °C 10 s,55 °C 30 s,循环 40 次。60 °C、30 s 时读出荧光值。

1.2.6 肿瘤组织蛋白的提取 将肿瘤组织用电子天平分别称取 20 ~ 30 mg 于 1.5 mL 高压灭菌的离心管内,用灭菌的研磨杵研磨充分,加入裂解液(RIPA : PMSF = 500 : 1) 501 μL,最后在冰上裂解 30 min,4 °C 13 000 r/min 离心 10 min,收集上清即为总蛋白。

1.2.7 蛋白免疫印迹(Western blot) 提取的蛋白按照 1 : 4 的比例加入 5 × SDS loading buffer,煮沸 5 min,经 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳结束后,用 300 mA 恒电流将蛋白从胶上转移到 PVDF 膜上,用 TBST 配制的 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,一抗(1 : 2 000 稀释)4 °C 孵育过夜,二抗(1 : 2 000 稀释)

孵育 2 h, TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 加入 ECL 显色液(A 液 : B 液 = 1 : 1) 黑暗保存 5 min 后显影检测目的蛋白的表达。

2 结果与分析

2.1 GL261 小鼠胶质瘤的细胞状态

复苏 GL261 小鼠胶质瘤细胞, 显微镜下观察细胞会具有明显的星形触角伸出, 贴壁生长 24 h, 生长状态如图 1 所示。继续生长 72 h 至铺满培养瓶整个底部, 待细胞数达到要求(一般荷瘤细胞数在 $10^6 \sim 10^8$ 个/mL), 生长状态如图 1d 所示, 胰酶消化细胞并用计数板计数, 重悬细胞备用, 用于后期对小鼠进行荷瘤。

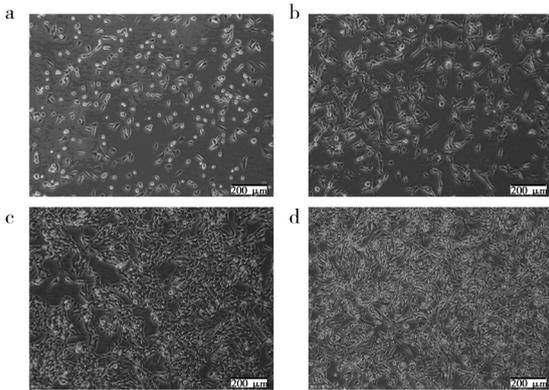


图 1 GL261 小鼠胶质瘤细胞生长状态

Fig.1 GL261 mouse glioma cell growth status

a ~ d: 12, 24, 48, 72 h 后细胞的生长状态

a-d: Growth status of cells after 12 h, 24 h, 48 h, 72 h

2.2 PCR 定性鉴定 IE2 与 ATF5

对实验的 30 只标准化小鼠进行鼠尾鉴定, 将鉴定后的阴性小鼠和阳性小鼠分组以便进行后续实验, 图 2 显示了 5 对阴性小鼠和阳性小鼠中 ATF5 的表达, 通过电泳条带可观察出显著差异。

2.3 小鼠荷瘤后肿瘤状态

荷瘤后短时间内荷瘤小鼠体重呈直线生长的状态, 对阴、阳性小鼠肿瘤组织体内外形态进行对比, 结果如图 3 所示。图 3A 为 GL261 胶质瘤在小鼠体内生长时小鼠的体表形态。选取 5 只阴性对照组和 5 只阳性实验组(共 10 只)荷瘤鼠, 待小鼠体重稳定不再增长, 并呈现减重现象时, 对小鼠进行脱颈处死并解剖, 对肿瘤进行剥离, 图 3B 为肿瘤剥离后的形态比较, 可以观察出明显的状态区别。阳性荷瘤小鼠较阴性荷瘤小鼠, 肿瘤大小

不论在小鼠体内还是在体外剥离后, 与对照组相比, 均呈现显著性差异, 具有统计学意义 ($P < 0.0001$), 阳性荷瘤小鼠的肿瘤大小整体水平较阴性荷瘤小鼠的肿瘤大。

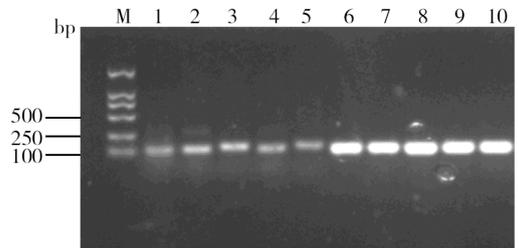
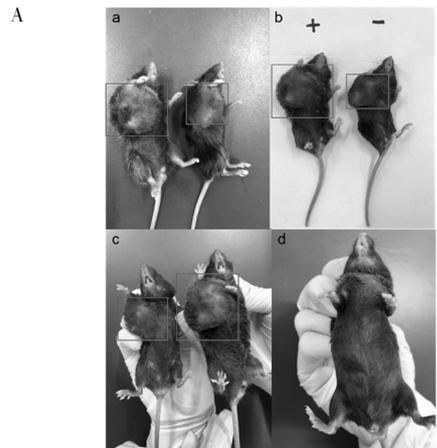


图 2 ATF5 转录因子的 PCR 鉴定

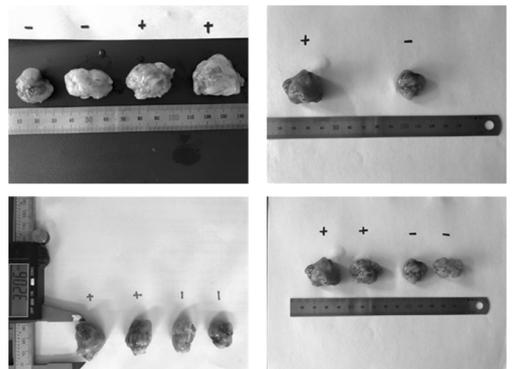
Fig.2 PCR identification of ATF5 transcription factor

M: DNA 分子量标准品, 分子量大小为 2 000 bp; 1 ~ 10: 不同 PCR 反应管编号; 1 ~ 5: 阴性小鼠中 ATF5 的表达; 6 ~ 10: 阳性小鼠中 ATF5 的表达

M: DNA marker, the molecular weight is 2 000 bp; 1-10: different PCR reaction tube numbers; 1-5: expression of ATF5 in negative mice; 6-10: Expression of ATF5 in positive mice



B



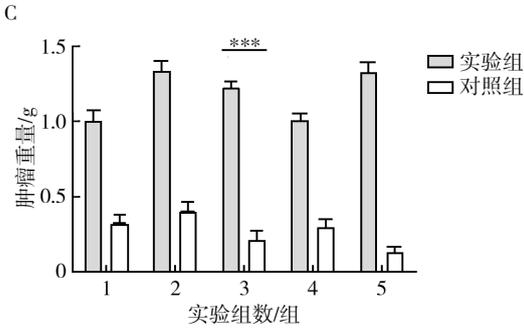


图3 肿瘤在小鼠体内及体外的形态

Fig. 3 Tumor *in vivo* and *in vitro* morphology in mice

A: a~c 为阴性、阳性小鼠荷瘤对照比较, d 为野生小鼠对照比较; B: 阴性、阳性小鼠肿瘤组织体外形态比较; C: 荷瘤阴性小鼠体重变化; +: 阳性小鼠, -: 阴性小鼠; * * * $P < 0.0001$

A: a-c plots are comparisons of negative-positive mouse-bearing controls, d is comparisons of wild-mouse controls; B: comparisons of tumor-*in vitro* morphology of negative-positive mice; C: Changes in body weight of tumor-bearing positive mice; +: positive mice, -: negative mice; * * * $P < 0.0001$

2.4 qPCR 法定量检测 ATF5 表达水平

选取鼠尾鉴定后的阳性鼠进行后续实验,用荧光实时定量 PCR 方法定量检测 5 组阳性小鼠(共 10 只)中 ATF5 的表达量,见图 4。结果显示 IE2 表达与 ATF5 存在明显的定量关系,呈显著性差异,具有统计学意义($P < 0.05$),为了验证它们之间的关系,进行了后续的 Western blot 实验。

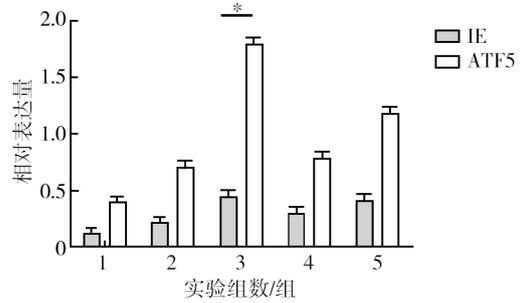


图4 qPCR 法检测 IE2 与 ATF5 的表达量

Fig. 4 qPCR assay for expression of IE2 and ATF5

1~5: 阳性荷瘤小鼠的实验组编号, * $P < 0.05$

1-5: Experimental group number of positive tumor-bearing mice, * $P < 0.05$

2.5 蛋白免疫印迹 (Western blot) 法定量检测 ATF5 表达水平

对选取的 5 只阴性对照和 5 只阳性实验组(共 10 只)荷瘤鼠,肿瘤组织蛋白提取继而进行蛋白免疫印迹法检测 ATF5 表达量,Western blot 方法从蛋白水平检测了 ATF5 与 IE86 蛋白之间的定量关系,实验组为阳性荷瘤小鼠 ATF5 表达的平均值,对照组为阴性荷瘤小鼠 ATF5 表达的平均值,如图 5 所示,与对照组相比,呈显著性差异,具有统计学意义($P < 0.05$)。结果显示,阳性荷瘤鼠中 ATF5 呈现高表达状态,说明在转 IE2 基因小鼠中,ATF5 转录因子起到重要的调节作用。

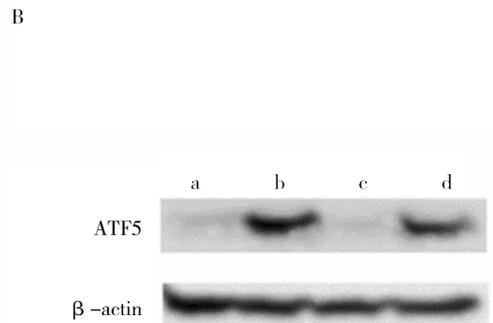
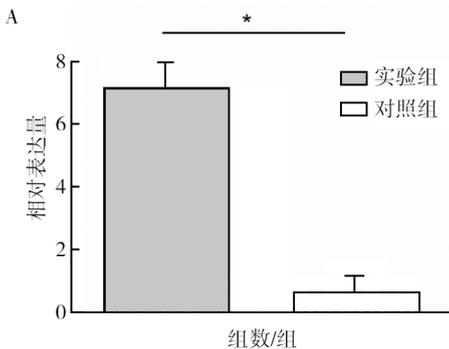


图5 Western blot 检测 ATF5 的表达量

Fig. 5 Western blot detection of ATF5 expression

A: Western blot 方法从蛋白水平检测了 ATF5 与 IE2 之间的定量关系; B: a, c 为阴性鼠中 ATF5 的表达量, b, d 为阳性鼠中 ATF5 的表达量; * $P < 0.05$

A: The quantitative relationship between ATF5 and IE2 was detected from the protein level by Western blot; B: a, c is the expression level of ATF5 in negativity mice, b, d is the expression level of ATF5 in positive mice; * $P < 0.05$

3 讨论

人巨细胞病毒属于 β 疱疹病毒亚科,是人类

疱疹病毒中最大的一组病毒^[8-9],感染率可高达 100%。HCMV 基因组是全长超过 240 kb 的双链 DNA,整个基因组含有 250 个开放阅读框(ORF)。

在病毒感染过程中, HCMV 基因的表达表现一定的时序性,可分为早早期(IE)、早期(E)和晚期(L)基因^[10-12]。病毒穿入细胞后, IE 基因被宿主细胞因子激活并最早表达,编码两种重要的调控蛋白 IE1(IE72)和 IE2(IE86)。其中 IE2(IE86)蛋白是一种重要的反式激活因子并在 HCMV 感染中发挥了重要作用^[13]。近年有资料证实, IE2(IE86)调节许多与控制细胞周期相关的因子。

本研究应用到的转 IE2 基因^[14]小鼠,是通过 DNA 原核显微注射方法,转入的目的基因仅仅只是整合在二倍体动物的其中一条染色体上,所以是半合子,它的后代只有一部分个体带有整合的基因,有的没有目的基因,所以,转基因小鼠需要一个相当长的筛选和纯化过程,以期获得纯合子的转基因小鼠。ATF5 最初是从人 T 淋巴细胞中分离出来^[15],并在肿瘤发展中起重要作用。ATF5 是具有碱性亮氨酸拉链(bZIP)结构域的 ATF/CREB 家族的成员。ATF5 转录因子参与 DNA 结合和蛋白质-蛋白质相互作用,并具有抗凋亡的作用^[16]。研究发现 ATF5 的抗凋亡功能是具有选择性的,在对 DNA 损伤试剂诱导的凋亡过程中就没有抗凋亡的功能。ATF5 是一个与凋亡密切相关的转录因子,在凋亡、分化及发育等生理过程中发挥着重要作用^[17]。

本研究以转基因小鼠为切入点,将胶质瘤细胞在小鼠皮下建立移植瘤模型,着重在分子水平研究 IE86 和 ATF5^[18-20]之间表达和分布的关系,结果显示,ATF5 在转 IE2 基因小鼠中呈现高表达状态,并与之存在显著的定量关系。本研究结果为治疗病毒感染以及拓展肿瘤治疗与预防提供了参考。

参考文献:

- Castillo JP, Kowalik TF. Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control[J]. *Gene*, 2002, 290(1-2): 19-34.
- Snaar SP, Verdijk P, Tanke H J, et al. Kinetics of HCMV immediate early mRNA expression in stably transfected fibroblasts. [J]. *Journal of cell science*, 2002, 115(2): 321-328.
- Wang YF, Chen SC, Wu FYH, et al. The interaction between human cytomegalovirus immediate-early gene 2 (IE2) protein and heterogeneous ribonucleoprotein A1[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 232(3): 590-594.
- Fiallos E, Judkins J, Matlaf L, et al. Human cytomegalovirus gene expression in long-term infected glioma stem cells[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(12): 1-22.
- Sorocanu L, Gherghel CS. Is HCMV a tumor promoter? [J]. *Virus Research*, Elsevier B. V., 2011, 157(2): 193-203.
- Marchini A, Liu H, Zhu HUA. Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes[J]. *Journal of Virology*, 2001, 75(4): 1870-1878.
- Khan Z, Yaiw KC, Wilhelmi V, et al. Human cytomegalovirus immediate early proteins promote degradation of connexin 43 and disrupt gap junction Communication: Implications for a role in gliomagenesis[J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(1): 145-154.
- Huang R, Qian D, Hu M, et al. Association between human cytomegalovirus infection and histone acetylation level in various histological types of glioma [J]. *Oncology Letters*, 2015, 10(5): 2812-2820.
- Li L, Wang B, Li P, et al. Human cytomegalovirus infection inhibits the differentiation of human hippocampus neural precursor cells into astrocytes [J]. *Virologica Sinica*, 2009, 24(6): 552-558.
- 李琦涵,姜莉. 人类疱疹病毒的病原生物学[M]. 北京:化学工业出版社,2009.
- Martínez FP, Cruz R, Lu F, et al. CTCF binding to the first intron of the major immediate early (MIE) gene of human cytomegalovirus (HCMV) negatively regulates MIE gene expression and HCMV replication [J]. *Journal of virology*, 2014, 88(13): 7389-7401.
- Zhu H, Shen Y, Shenk T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis[J]. *Journal of virology*, 1995, 69(12): 7960-7970.
- Ahn JH, Hayward GS. The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells[J]. *Journal of virology*, 1997, 71(6): 4599-4613.
- Jackson SE, Mason GM, Wills MR. Human cytomegalovirus immunity and immune evasion[J]. *Virus research*, 2011, 157(2): 151-160.
- Schmidt T, Striebing H, Haas J, et al. The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is important for herpes simplex virus-1 propagation [J]. *FEBS Letters*, Federation of European Biochemical Societies, 2010, 584(20): 4361-4365.
- Bomsztyk K, Denisenko O, Ostrowski J. hnRNP K: One protein multiple processes [J]. *BioEssays*, 2004, 26(6): 629-638.
- Stinski MF. Synthesis of Proteins and Glycoproteins in Cells Infected with Human Cytomegalovirus [J]. *Journal of virology*, 1977, 23(3): 751-767.
- Angelastro JM, Mason JL, Ignatova TN, et al. Downregulation of activating transcription factor 5 is required for differentiation of neural progenitor cells into astrocytes [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(15): 3889-3899.
- Garayoa M, Man YG, Martínez A, et al. Downregulation of hnRNP A2/B1 expression in tumor cells under prolonged hypoxia [J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2003, 28(1): 80-85.
- Sheng Z, Li L, Zhu L J, et al. A genome-wide RNA interference screen reveals an essential CREB3L2-ATF5-MCL1 survival pathway in malignant glioma with therapeutic implications [J]. *Nat Med*, 2010, 16(6): 671-677.