

· 论著 ·

## 建立以 HIF-1 $\alpha$ 为靶标的高通量筛选防治动脉粥样硬化先导化合物的细胞模型

钱俞君, 秦春霞, 孙莉莉, 丁华敏, 李铁军 (上海市浦东新区浦南医院药剂科, 上海 200125)

**[摘要]** 目的 建立一个高通量筛选防治动脉粥样硬化先导化合物的体外细胞模型。方法 克隆 HIF-1 $\alpha$  低氧反应元件(hypoxia response element, HRE)至荧光素酶报告基因表达载体 pGL3-Enhancer, 构建荧光素酶表达载体 pGL3-HIF-1 $\alpha$ -HRE, 转染人单核细胞 THP-1 并筛选稳定表达细胞株 THP-1-HIF-1 $\alpha$ -HRE。结果 Real Time-PCR 检测表明低氧培养可以有效上调 THP-1-HIF-1 $\alpha$ -HRE 细胞 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达和荧光素酶活性, 而洛伐他汀和姜黄素预处理可以有效抑制低氧引起的 THP-1-HIF-1 $\alpha$ -HRE 细胞内 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达及荧光素酶活性。结论 成功建立了筛选抗动脉粥样硬化的先导化合物体外高通量细胞模型 THP1-HIF-1 $\alpha$ -HRE。

**[关键词]** 缺氧诱导因子 1 $\alpha$ ; 高通量; 荧光素酶活性; 动脉粥样硬化; 筛选

**[中图分类号]** R541.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)01-0027-05

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.007

## A cell model for high-throughput screening lead compounds targeting HIF-1 $\alpha$ for atherosclerosis treatment

QIAN Yujun, QIN Chunxia, SUN Lili, DING Huamin, LI Tiejun (Department of Pharmacy, Punan Hospital of Pudong New Area, Shanghai 200125, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a high-throughput *in-vitro* screening cell model for anti-atherosclerosis leading compounds. **Methods** Hypoxia response element (HRE) was cloned into a luciferase reporter vector, pGL3-Enhancer, to construct pGL3-HIF-1 $\alpha$ -HRE. The THP-1 human monocyte cell line was infected with the pGL3-HIF-1 $\alpha$ -HRE and a stable cell line, THP-1-HIF-1 $\alpha$ -HRE, was screened. **Results** Real-time PCR assay showed that HIF-1 $\alpha$  expression and luciferase activity in THP-1-HIF-1 $\alpha$ -HRE cells was effectively upregulated by hypoxia. The increase of HIF-1 $\alpha$  expression and luciferase activity induced by hypoxia was significantly inhibited by lovastatin or curcumin. **Conclusion** THP1-HIF-1 $\alpha$ -HRE, an *in-vitro* cell model for high-throughput screening lead compounds for anti-atherosclerosis (AS) was successfully established.

**[Key words]** hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ; high-throughput; luciferase; atherosclerosis; screen

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是多种心脑血管疾病共同的病理学基础,主要发病机制包括血管内皮损伤、慢性炎症反应、氧化应激、泡沫细胞形成等<sup>[1]</sup>。缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)与缺氧、炎症、泡沫细胞形成、氧化应激等众多 AS 致病因素密切相关,提示 HIF-1 可能是 AS 发生发展的重要靶标和开发防治 AS 的药物新靶点。本研究将建立一个以荧光素酶活性检测反映 HIF-1 $\alpha$  活性变化为观测指标,高通量筛选抗 AS

先导化合物的体外细胞模型,并通过阳性药洛伐他汀及姜黄素的抗 HIF-1 $\alpha$  活性检测分析对该模型进行验证。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料和设备

人单核巨噬细胞系 U937 和 THP-1 系购自上海中科院细胞所;RPMI-1640 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、Lipofectamine2000 转染试剂和 Trizol 等(Invitrogen 公司);pGL3-Enhancer 荧光素酶表达载体、双荧光素酶活性检测系统购自美国 Promega 公司;无内毒素质粒 DNA 制备试剂盒购自 Qiagen 公司;蛋白一抗及二抗(Abcam 公司),细胞培养箱(美国 Nuair 公司),定量 PCR 仪及配套检测试剂盒(Takara 公司);DNA 合成及测

**[基金项目]** 上海市浦东新区科技发展基金(PKJ2015-Y26);上海市浦东新区卫生和计划生育委员会学科建设(PWZbr 2017-16)

**[作者简介]** 钱俞君, 学士, 主管药师, 研究方向: 临床药学, Tel:13816369883

**[通讯作者]** 李铁军, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 心脑血管药理学, Email:18930502906@163.com

序在上海 Invitrogen 公司完成,洛伐他汀和姜黄素购自 Sigma 公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 载体构建

文献查阅 HRE 核心序列信息为 5'-(A/G)CGT (G/C) C-3',根据核心序列,设计长链互补双链引物,为核心序列的 7 组重复序列,引物两端添加 KpnI 和 XhoI 酶切位点及保护碱基。上游引物:5'-GGGGTACCACGTGCACGTGC ACGTGCACGTGCACGTGCACGTGCACGTGCCG-3';下游引物:5'-CCGCTCGAGGCACGTGCACGTGCACGTGCACGTGCACGTGCACGTGCACGTGCACGTCC-3'。引物设计完成之后,按照 Page 级进行合成。后将双链 DNA 稀释退火形成双链 DNA,克隆至线性化的表达载体 pGL3-Enhancer,构建荧光素酶重组表达载体 pGL3-HIF-1 $\alpha$ 。重组载体经过序列分析确认无误后,扩增转化菌株,使用 Qiagen 的无内毒素质粒 DNA 抽提试剂盒制备无内毒素质粒 DNA。

### 1.2.2 细胞转染及工具细胞株筛选

取对数生长期 U937 和 THP-1 细胞,使用完全培养基(RPMI-1640+10%FBS)调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  个/ml,将细胞接种到 6 孔板,每孔添加 2 ml 细胞悬液,37 °C 和 5%CO<sub>2</sub> 浓度下培养 24 h,按照转染试剂 Lipofectmaine 2000 说明书进行 pcDNA-GFP 质粒转染实验。转染后 72 h,荧光倒置显微镜下观察两组细胞转染效率。

### 1.2.3 稳定表达细胞株筛选

以转染效率高的 THP-1 细胞进行稳定表达细胞株筛选试验。将 THP-1 细胞( $1 \times 10^5$  个/ml)接种到 6 孔板培养 24 h 后,进行 pGL3-HIF-1 $\alpha$ -HRE 质粒转染。转染后 48 h,使用台酚蓝进行活细胞染色,制备细胞悬液(10 个/ml)后接种细胞至 96 孔细胞培养板,正常条件(37 °C 和 5%CO<sub>2</sub>)继续培养,每 3 d 换液,培养至第 9 天。倒置显微镜下观察,选择细胞形态均一的 6 个细胞克隆(标记为 C1~C6)后转移至 24 孔板继续培养,再放大培养至 12 孔板,直至 6 孔板和 10 cm 培养皿。然后通过基因筛查的方法对其中的克隆片段 HIF-1 $\alpha$ -HRE 进行定量,根据检测结果选取其中 1 株克隆进行后续实验。

### 1.2.4 RealTime-PCR 检测细胞克隆中 HRE 相对含量

取对数生长期的 6 组克隆细胞各  $1 \times 10^6$  个,按照 Trizol 说明书,提取细胞总 RNA,使用通用反转录引物 Random9 并参照试剂盒说明进行反转录制备 cDNA,然后进行定量 PCR 反应。检测引物序

列: $\beta$ -actin 上游引物:5'-AACCCCTAAGGCCAAC-CGTGAAAAG-3', $\beta$ -actin 下游引物:5'-CGAC-CAGAGGCATACAGGGACAAC-3';HRE 上游引物:5'-GGGGTACCACGTGCACGTGCA-3',HRE 下游引物:5'-CCGGCACGTGCACGTGCACGTGCA-3', $\beta$ -actin 为内参使用。PCR 的反应总体体系为 20  $\mu$ l:SYBR Premix Ex Tap 10  $\mu$ l,上下游引物(20  $\mu$ mol/L)各 0.2  $\mu$ l,cDNA 2  $\mu$ l。PCR 反应条件:95 °C,10 min;60 °C,20 min;72 °C,20 min,反应设置为 40 个循环。通过扩增曲线与阈值线的交点来计算每组样本的 Ct 值,目的基因相对于内参基因的表达式为  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。根据定量结果,选取 HRE 表达最高的一株细胞克隆,命名为 THP-1-HIF-1 $\alpha$ -HRE-Luciferase 进行后续实验。

### 1.2.5 荧光素酶报告基因实验

取对数生长期 THP-1-HIF-1 $\alpha$ -HRE-Luciferase 细胞,使用完全培养基制备细胞悬液,接种细胞到 96 孔细胞培养板,正常条件培养 24 h,使用完全培养基进行全量换液,同时添加洛伐他汀(10  $\mu$ mol/L)和姜黄素(1、2 和 10  $\mu$ mol/L),正常条件培养 2 h 后,细胞转入低氧条件(95% N<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub>)继续培养 24 h。而后收集细胞,分别检测各组细胞荧光素酶活性和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达。

### 1.2.6 免疫印迹法检测 HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达

离心法收集待测细胞,提取细胞总蛋白,BCA 法检测总蛋白浓度。每组样本取 11  $\mu$ l 进行 10% SDS-PAGE 垂直电泳,湿法将胶中蛋白水平转移至 PVDF 膜上,5% 的脱脂牛奶常温封闭 2 h,加入 TBST 稀释后的一抗(HIF-1 $\alpha$  一抗,1:500, $\beta$ -actin 一抗,1:1 000 稀释),4 °C 过夜;取出后 TBST 洗膜 3 次再加入二抗(羊抗鼠二抗,1:3 000 稀释),孵育 2 h,再洗膜 3 次,添加化学发光反应底物,进行 X 光曝片,目的条带经扫描后通过光密度分析软件进行分析, Twist 蛋白相对含量=目的条带的光密度值/ $\beta$ -actin 条带的光密度值。

### 1.2.7 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件分析,数据结果采用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用析因分析进行组间差异及组内差异的比较,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 pGL3-HIF-1 $\alpha$ -HRE 表达载体构建

载体经序列分析(图 1),插入 HRE 序列与设计序列完全一致。

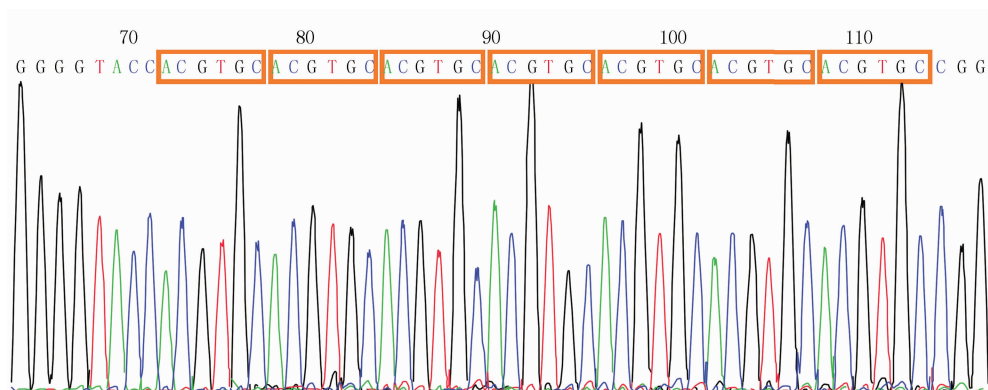


图1 pGL3-HIF-HRE 重组载体序列分析

## 2.2 工具细胞株筛选

质粒转染后 72 h,笔者发现 THP-1 细胞的转染效率(GFP 表达细胞占所有细胞的比例)远远大于 U937(图 2)。细胞的转染效率是稳定表达细胞株筛选和建立的前提。同时,THP-1 细胞增殖旺盛,细胞大小形态更为均一,因此,选择 THP-1 进行后续稳定表达细胞株的筛选,即工具细胞株建立。

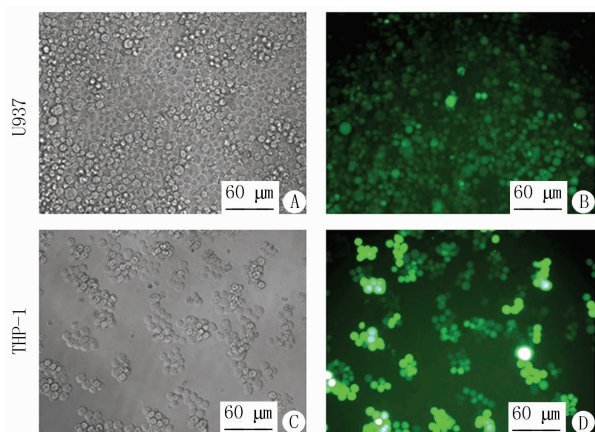


图2 U937 和 THP-1 细胞转染后 72 h 细胞转染效率检测

A、C. 为可见光下拍照;B、D. 为相同视野下的可见光视野

## 2.3 细胞克隆鉴定

通过荧光定量的方法对形态学初步筛选的 6 组克隆细胞(C1~C6)中外源基因 HIF-1 $\alpha$ -HRE 序列做了定量分析以选择高质量细胞进行克隆。结果(图 3)表明,6 组克隆细胞中均有外源基因 HIF-1 $\alpha$ -HRE 检出,其中 C1 克隆的外源基因相对含量最低,C2 最高。与 C1 比较,C2、C4 和 C5 组克隆 HIF-1 $\alpha$ -HRE 相对含量均明显升高,且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。因此,选择 C2 号克隆(命名为 THP-1-HIF-1 $\alpha$ -HRE-Luciferase)进行后续实验。

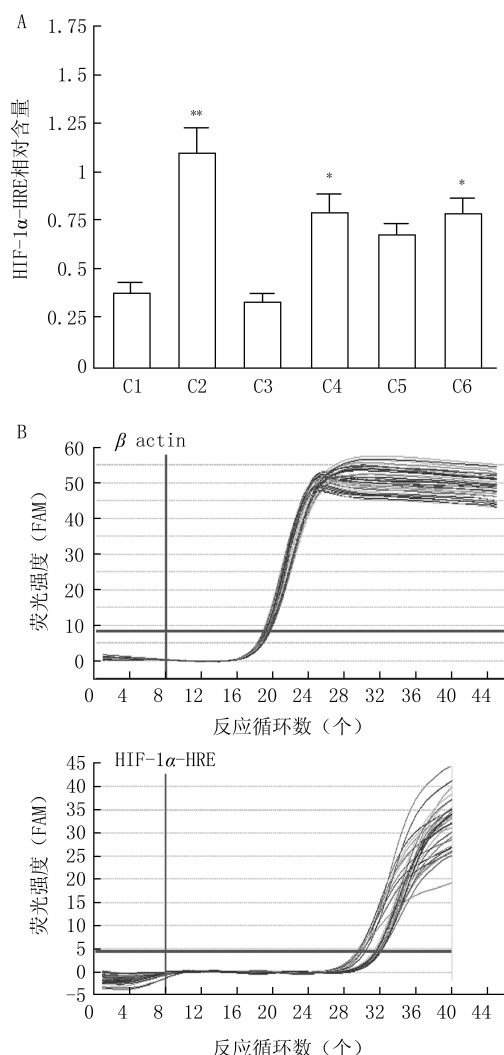


图3 HIF-1 $\alpha$ -HRE 的定量检测( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与 C1 组比较

A. HIF-1 $\alpha$ -HRE 相对含量的组间差异分析;  
B. Realtime-PCR 检测原始曲线

## 2.4 THP-1-HIF-1 $\alpha$ -HRE-Luciferase 细胞的荧光素酶活性检测

THP-1-HIF-1 $\alpha$ -HRE-Luciferase 经 24 h 低氧



培养,与溶媒对照组比较,胞内荧光素酶活性明显增强( $P < 0.01$ )。洛伐他汀( $10 \mu\text{mol/L}$ )预处理 2 h,可以有效抑制低氧引起的 THP-1-HIF-1 $\alpha$ -HRE-Luciferase 细胞荧光素酶升高,与低氧组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。姜黄素(1、2 和  $10 \mu\text{mol/L}$ )预处理也可有效抑制低氧引起的荧光素酶升高,其中  $2 \mu\text{mol/L}$  和  $10 \mu\text{mol/L}$  预处理组与低氧组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 4。

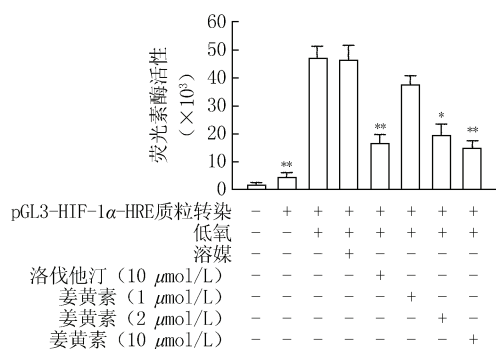


图 4 THP-1-HIF-1 $\alpha$ -HRE-Luciferase 细胞荧光素酶活性检测( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,与低氧组比较

### 2.5 THP-1-HIF-1 $\alpha$ -HRE-Luciferase 细胞的 HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达检测

低氧培养 24 h 能够明显增强 THP-1-HIF-1 $\alpha$ -HRE-Luciferase 细胞内 HIF-1 $\alpha$  表达,与溶媒组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。洛伐他汀( $10 \mu\text{mol/L}$ )和姜黄素(1、2 和  $10 \mu\text{mol/L}$ )均可抑制低氧引起的 THP-1-HIF-1 $\alpha$ -HRE-Luciferase 细胞内 HIF-1 $\alpha$  表达增强,与低氧组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结果与荧光素酶活性的结果相一致(图 5)。

### 3 讨论

AS 是一个由动脉血管壁粥样斑块进行性积聚,最终导致局灶性动脉阻塞的病理过程。天然物质中尤其是中药中有许多成分如黄酮类,通过抗氧化作用抑制泡沫细胞形成和 AS 的发生<sup>[2]</sup>。从中药及其提取物、单体成分中筛选抑制泡沫细胞形成的活性成分可能是一条可行的便捷途径,因此建立高通量和特异的筛选模型是十分重要的课题。报告基因法筛药模型就是针对靶基因表达调控发展起来的。功能性新药高通量筛选方法,即将靶基因表达的调控序列与编码某些酶活性(如荧光素酶)的基因相连,转入细胞内,通过简单地检测酶活性(如荧光强

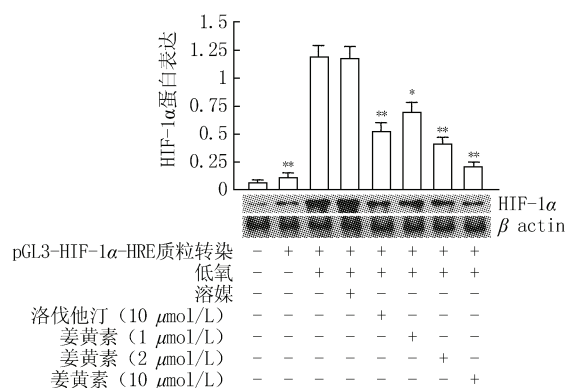


图 5 免疫印迹检测 THP-1-HIF-1 $\alpha$ -HRE-Luciferase 细胞 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,与低氧组比较

度)变化,来反映化合物对转录因子和靶基因表达的作用性质和强度。

HIF-1 是由  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基组成的异二聚体,其中 HIF-1 $\alpha$  蛋白是 HIF-1DNA 结合活性的主要决定因素,通过与 HRE 结合调控相应基因的表达。HIF-1 在缺氧适应和许多病理过程中(如肿瘤、心肌缺血、肺动脉高压和慢性阻塞性肺疾病等)起重要作用<sup>[3]</sup>。研究表明缺氧在 AS 发生、发展中起重要作用,而 HIF-1 是缺氧诱导基因表达的中心调节子<sup>[4-5]</sup>。AS 是一个慢性炎症过程<sup>[1]</sup>,包括细胞因子、黏附分子产生、氧化应激、泡沫细胞形成等,而 HIF-1 是炎症细胞功能的关键调节因子<sup>[6]</sup>。有报道高胆固醇低密度脂蛋白通过诱导 HIF-1 $\alpha$  高表达促进内皮细胞 VEGF 和 VEGF 受体-2 过度表达<sup>[7]</sup>;而维生素 C 和维生素 E 等抗氧化剂通过降低 HIF-1 $\alpha$  表达从而抑制 VEGF 和 VEGF 受体-2 上调,是其抗 AS 的机制之一<sup>[8-9]</sup>。Shatrov 等<sup>[10]</sup>报道氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)通过氧化还原调节途径引起人巨噬细胞 HIF-1 $\alpha$  蛋白积累。本课题组应用体外 ox-LDL 诱导人单核细胞株 U937 形成泡沫细胞模型,发现 RNA 干扰 HIF-1 $\alpha$  可显著抑制泡沫细胞形成,抑制许多 AS 相关基因表达<sup>[11]</sup>。综上所述, HIF-1 $\alpha$  是泡沫细胞和 AS 形成的重要靶标,针对 HIF-1 靶点可研发防治 AS 的药物。有报道从天然植物提取物中针对肿瘤细胞 HIF-1 $\alpha$  为靶点采用报告基因法筛选了 HIF-1 抑制物<sup>[12]</sup>。但未见针对单核细胞中 HIF-1 $\alpha$  为靶点的中药活性成分筛选的报道。

羟甲基戊二酸单酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶抑制剂他汀类药物是临床上疗效确切的调血脂药和抗 AS 药,目前研究表明他汀类药物在不降低高脂

血症血浆脂蛋白情况下,可下调人血管内皮细胞和平滑肌细胞 HIF-1 表达,减轻冠状动脉壁缺氧和滋养血管生成<sup>[13-14]</sup>。芹菜素和姜黄素等天然化合物通过降解 HIF-1 $\alpha$  抑制 VEGF 表达从而抑制血管生成<sup>[15]</sup>。本研究中采用洛伐他汀和姜黄素作为阳性对照药物,观察对模型体系中 HIF-1 $\alpha$  表达的抑制作用。

在本研究中,笔者首先构建含人 HIF-1 启动子即 HRE 特定部位和 LUC 的嵌合体报告基因质粒(pGL3-HIF-HRE-Luc),进而转染巨噬细胞 THP-1,通过单细胞培养法建立稳定表达细胞株 THP-1-HIF-1 $\alpha$ -HRE-Luc,即高效 HIF-1 $\alpha$  活性筛选模型。然后通过研究 HIF-1 $\alpha$  抑制物工具药洛伐他汀和姜黄素对筛选模型进行功能鉴定。课题组针对泡沫细胞 HIF-1 $\alpha$  采用报告基因法建立了高通量细胞筛药模型,该模型为研发防治 AS 的新药提供了有利工具。

#### 【参考文献】

[1] ROSS R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. *New Engl J Med*, 1999, 340(2):115-126.  
[2] KALIORA A C, DEDOUSSIS G V Z, SCHMIDT H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis[J]. *Atherosclerosis*, 2006, 187(1):1-17.  
[3] LIM C S, KIRIAKIDIS S, SANDISON A, et al. Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall[J]. *J Vasc Surg*, 2013, 58(1):219-230.  
[4] PARATHATH S, MICK S L, FEIG J E, et al. Hypoxia is present in murine atherosclerotic plaques and has multiple adverse effects on macrophage lipid metabolism[J]. *Circ Res*, 2011, 109(10): 1141-1152.  
[5] PARATHATH S, YANG Y, MICK S, et al. Hypoxia in murine atherosclerotic plaques and its adverse effects on macrophages[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2013, 23(3):80-84.

[6] SCHOLZ C C, TAYLOR C T. Targeting the HIF pathway in inflammation and immunity[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 13(4):646-653.  
[7] MAZI RE C, MAZI RE J C. Activation of transcription factors and gene expression by oxidized low-density lipoprotein[J]. *Free Radic Bio Med*, 2009, 46(2):127-137.  
[8] RODR GUEZ J A, NESPEREIRA B, P REZ-ILZARBE M, et al. Vitamins C and E prevent endothelial VEGF and VEGFR-2 overexpression induced by porcine hypercholesterolemic LDL[J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 65(3): 665-673.  
[9] ZHU X Y, RODRIGUEZ-PORCEL M, BENTLEY M D, et al. Antioxidant intervention attenuates myocardial neovascularization in hypercholesterolemia[J]. *Circulation*, 2004, 109(17):2109-2115.  
[10] SHATROV V A. Oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) triggers hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) accumulation via redox-dependent mechanisms[J]. *Blood*, 2003, 101(12): 4847-4849.  
[11] JIANG G, LI T, QIU Y, et al. RNA interference for HIF-1 $\alpha$  inhibits foam cells formation in vitro[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 562(3):183-190.  
[12] MANOLESCU B, OPREA E, BUSU C, et al. Natural compounds and the hypoxia-inducible factor (HIF) signalling pathway[J]. *Biochimie*, 2009, 91(11-12):1347-1358.  
[13] WILSON S H, HERRMANN J, LERMAN L O, et al. Simvastatin preserves the structure of coronary adventitial vasa vasorum in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering[J]. *Circulation*, 2002, 105(4):415-418.  
[14] DICHTL W. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 23(1):58-63.  
[15] HOSSAIN C F, KIM Y P, BAERSON S R, et al. Saururus cernuus lignans-potent small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor-1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(3): 1026-1033.

【收稿日期】 2018-06-11 【修回日期】 2018-09-25  
【本文编辑】 李睿旻

(上接第4页)

[23] HARNER M J, FRANK A O, FESIK S W. Fragment-based drug discovery using NMR spectroscopy[J]. *J Biomol NMR*, 2013, 56:65-75.  
[24] WU B, BARILE E, DE S K, et al. High-throughput screening by nuclear magnetic resonance (HTS by NMR) for the identification of PPIs antagonists[J]. *Curr Top Med Chem*, 2015, 15:2032-2042.  
[25] VESTERGAARD B, SAYERS Z. Investigating increasingly complex macromolecular systems with small-angle X-ray scattering[J]. *IUCrJ*, 2014, 1(Pt 6):523-529.  
[26] TUUKKANEN A T, SVERGUN D I. Weak protein-ligand interactions studied by small-angle X-ray scattering[J]. *FEBS J*, 2014, 281(8):1974-1987.

[27] NAGATOISHI S, YAMAGUCHI S, KATOH E, et al. A combination of 19F NMR and surface plasmon resonance for site-specific hit selection and validation of fragment molecules that bind to the ATP-binding site of a kinase[J]. *Bioorg Med Chem*, 2018, 26(8):1929-1938.  
[28] YAN C, LIU D, LI L, et al. Discovery and characterization of small molecules that target the GTPase Ral[J]. *Nature*, 2014, 515(7527):443-447.  
[29] RENAUD J P, CHUNG C W, DANIELSON U H, et al. Biophysics in drug discovery: impact, challenges and opportunities[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(10):679-698.

【收稿日期】 2018-09-19 【修回日期】 2018-11-16  
【本文编辑】 李睿旻