

# hAIF-1 基因重组腺病毒的构建及其对 A549 细胞增殖和迁移的影响

罗丽芸, 白 敏, 张 剑, 曹令森, 曹祥荣

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

**[摘要]** hAIF-1 是一种炎症因子, 本研究通过构建 hAIF-1 基因的重组腺病毒, 探讨 hAIF-1 对 A549 细胞增殖和迁移能力的影响. 用 PCR 的方法克隆 hAIF-1 基因编码序列, 并亚克隆到腺病毒穿梭质粒载体 pDC315-EGFP 上, 构建穿梭质粒 pDC315-EGFP-hAIF-1, 将穿梭质粒与腺病毒骨架质粒 pBHGloxdeltaE13Cre 共转染 293 细胞, 利用 AdMax 腺病毒载体包装系统包装腺病毒, TCID<sub>50</sub> 法测定病毒滴度, 利用 RT-PCR 和 Western Blot 分析检测目的基因表达, 用 MTT 法检测 A549 细胞的增殖, 细胞划痕和 Transwell 实验检测 A549 细胞的迁移. 结果表明, 成功构建了表达 hAIF-1 基因的重组腺病毒, 所得病毒滴度为  $2.5 \times 10^8$  pfu/mL; 用 hAIF-1 重组腺病毒感染 A549 细胞, RT-PCR 和 Western Blot 鉴定显示细胞可过表达 hAIF-1; MTT 显示过表达 hAIF-1 可显著增强 A549 细胞增殖能力; 细胞划痕和 Transwell 实验证明 hAIF-1 能够促进 A549 细胞迁移.

**[关键词]** hAIF-1, 腺病毒, 增殖, 迁移

**[中图分类号]** Q28 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2015)03-0064-07

## Construction of Recombinant Adenovirus of hAIF-1 Gene and Its Effect on Proliferation and Migration of A549 Cells

Luo Liyun, Bai Min, Zhang Jian, Cao Lingsen, Cao Xiangrong

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Province Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** hAIF-1 is an inflammatory factor. The study was supposed to explore the effect of hAIF-1 on the proliferation and migration of A549 cells by the preparation of the recombinant adenovirus with hAIF-1 gene. The hAIF-1 gene was cloned by PCR and subcloned into the shuttle vector pDC315-EGFP. The shuttle plasmid and adenovirus genomic plasmid pBHGloxdeltaE13Cre were co-transfected into 293 cells for packaging recombinant adenovirus with the help of the adenovirus packaging system AdMax. The titer of the virus was measured by TCID<sub>50</sub>. The expression of the target gene was identified by RT-PCR and Western Blot, and the effect of the target gene on the proliferation and migration of A549 cells was examined by MTT, wound healing and Transwell assay. The results showed that the AdDC315-EGFP-hAIF-1 was successfully constructed and the titer of the virus was  $2.5 \times 10^8$  pfu/mL; Analysis of RT-PCR and Western Blot indicated that A549 cells could overexpress hAIF-1 after infected with the recombinant adenovirus; The MTT assay showed that hAIF-1 could increase the proliferative rate of A549 cells; The wound healing and Transwell assay proved that hAIF-1 could promote the migration of A549 cells.

**Key words:** hAIF-1, adenovirus, proliferation, migration

AIF-1 (allograft inflammatory factor-1, 同种异体移植炎症因子-1) 是一个 17kDa、含 Ca<sup>2+</sup> 结合 EF-手形结构域并且能被 INF- $\gamma$  等诱导表达的亲水性蛋白, 基因定位于第 6 号染色体的人类组织相容性抗原 (histocompatibility antigen, HLA) III 类基因区域内<sup>[1]</sup>, 这一区域包含许多与炎症和免疫反应有关的基因. AIF-1 与一些自身免疫性疾病如风湿性关节炎、I 型糖尿病等发病机制有关, 并影响这些疾病的发生和发

收稿日期: 2014-12-04.

基金项目: 企业委托项目 (K11100BY62).

通讯联系人: 曹祥荣, 教授, 博导, 研究方向: 肿瘤发生与基因治疗分子机制. E-mail: 08085@njnu.edu.cn

展<sup>[2,3]</sup>.最近的研究发现,AIF-1 在珍珠贝、牡蛎和刺参的病原感染或组织损伤的免疫反应中也起着至关重要的作用<sup>[4-6]</sup>,这说明 AIF-1 在免疫调节方面的功能从无脊椎动物到哺乳动物都很保守. AIF-1 作为一种炎症因子与肿瘤发生和发展的相关性受到越来越多的关注. 早先就在大鼠和人的神经胶质瘤中发现,激活的小神经胶质细胞以及浸润性肿瘤的巨噬细胞都能够表达 AIF-1<sup>[7]</sup>. AIF-1 能够促进人脐静脉内皮细胞的增殖和迁移,以及血管的生成,这对血管瘤的产生和发展可能有着重要的影响<sup>[8]</sup>. 近些年来 Chen 等人的研究发现,AIF-1 能够促进人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和人肝癌细胞 HepG2 的增殖和迁移<sup>[9-11]</sup>. 然而对于 AIF-1 与肺癌相关性的研究,至今未见报道. 该研究通过构建 hAIF-1 基因的腺病毒,感染不表达 hAIF-1 的人肺癌细胞株 A549,来探究 hAIF-1 对 A549 细胞增殖和迁移能力的影响.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、携带增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)报告基因的质粒 pDC315-EGFP(由本实验室构建并保存)、含有 5 型腺病毒右臂并缺失 E1/E3 区域的腺病毒骨架质粒 pBHGloxdeltaE13Cre、人胚胎肾细胞 293 及人肺癌细胞 A549 均为本实验室保存;T4 连接酶、pMD19-T 载体、Taq 酶、DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司;蛋白酶 K 购自 Merck 公司;抗 AIF-1 一抗购自 Abcam,HRP 二抗购自 Santa Cruz 公司;MTT 试剂盒购自凯基生物公司;DMSO 购自南京生兴生物公司;高糖 DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司;脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司;Transwell Chamber 购自 Costar 公司;质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒购自 Biomiga 公司.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 hAIF-1 基因的克隆

依据 GenBank 中人 AIF-1 的序列(登录号:NM\_001623.3)信息,利用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.0 软件设计引物,上游引物 P1:5'-CGGGATCC(*Bam*H I)ATGAGCCAAACCAGGGATTAC-3',下游引物 P2:5'-GCGT-CGAC(*Sal*I)TCAGGGCAACTCAGAGATAGCTT-3'. 反应条件:94℃,5 min;94℃,30 s;56℃,40 s;72℃,1 min;30 个循环;72℃,7 min;4℃,10 min. 割胶回收的目的片段,克隆到 pMD19-T 载体中,进行测序.

#### 1.2.2 pDC315-EGFP-hAIF-1 质粒构建

制备测序正确的 pMD19-T-hAIF-1 质粒,*Bam*H I 和 *Sal*I 双酶切,回收 hAIF-1 基因片段,将目的基因片段与 pDC315-EGFP 质粒载体相连,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 感受态细胞,菌落 PCR 和酶切鉴定阳性克隆,获腺病毒穿梭质粒 pDC315-EGFP-hAIF-1.

#### 1.2.3 重组腺病毒的包装

将 293 细胞按每孔  $3 \times 10^5$  的数量接种到 6 孔板中,10% FBS 细胞培养液培养细胞至 70%左右的汇合度,加入穿梭质粒 pDC315-EGFP/pDC315-EGFP-hAIF-1、骨架质粒 pBHGloxdeltaE13Cre 和脂质体 Lipofectamine 2000 转染试剂的混合液,转染后 4 h~5 h,换去转染液,5% FBS 的细胞培养液继续培养,每天观察细胞的生长状况,3 d 左右换一次培养液,连续观察(约 8 d~15 d),直到出现病毒噬斑. 将出现的病毒噬斑吸出,加入接种 293 细胞的 24 孔板中,2 d 后会出现 CPE 现象,将细胞和培养液收集起来,冻存于 -80℃ 冰箱备用.

#### 1.2.4 PCR 鉴定重组病毒

将 24 孔板中出现 CPE 现象的细胞和培养液收集起来后,-80℃(1 min)和 37℃(8 min)反复冻融 3 次,4℃、12 000 r/min 离心 10 min,收集上清,并取 10  $\mu$ L 用于 PCR 鉴定重组腺病毒. 取 10  $\mu$ L 上清液,加入等体积的 20 mg/mL 蛋白酶 K,55℃处理 1 h,100℃灭活 5 min,取 2  $\mu$ L 做模板以 P1、P2 为引物,进行 PCR 鉴定,反应条件同前.

#### 1.2.5 重组腺病毒的扩增及病毒滴度的测定

将稀释好的病毒加入接种 293 细胞 75 cm<sup>2</sup>的培养瓶中,1.5 h 后换液,培养 2 d 后出现细胞病变效应(cytopathic effects, CPE),离心收集细胞,反复冻融 3 次,将上清保存于 -80℃ 备用.

将病毒稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 一直到  $10^{-12}$  的稀释液,然后加入接种 293 细胞的 96 孔板中,每孔 100  $\mu$ L,

每个稀释度设置10个复孔,5%的FBS细胞培养基培养10 d,观察并记录每一个稀释度下出现CPE的孔数.利用Karbers公式计算病毒滴度,对于100  $\mu\text{L}$  稀释液,病毒滴度  $T=10^{1+d(S-0.5)}$  (TCID<sub>50</sub>/mL)= $10^{2+d(S-0.5)-0.7}$  (pfu/mL),其中  $d=\text{Log}10$  稀释度=1(表示按10倍稀释), $S$ =每个稀释度下阳性孔的比率的总和(总是从 $10^{-1}$  稀释液开始).

### 1.2.6 RT-PCR和Western Blot分析hAIF-1在A549细胞中的表达

接种A549细胞于96孔板中,每孔加 $1 \times 10^4$ 个细胞,细胞培养24 h后,以MOI值为40感染腺病毒AdDC315-EGFP/AdDC315-EGFP-hAIF-1,设置空白对照组,病毒感染2 h后换成完全培养液,其间晃匀一次,感染后2 d提取细胞的RNA,利用反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA,hAIF-1上游引物:5'-AGAC-GATCCCAAATATAGCAG-3',下游引物:5'-TAGCTCTAGGTGAGTCTTGG-3';GAPDH上游引物:5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',下游引物:5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3',进行RT-PCR检测hAIF-1 mRNA表达.与此同时,提取细胞的总蛋白,加入SDS上样缓冲液,混匀后,99  $^{\circ}\text{C}$ 加热10 min后用于Western Blot分析hAIF-1蛋白表达水平.

### 1.2.7 MTT检测细胞增殖实验

将感染腺病毒AdDC315-EGFP/AdDC315-EGFP-hAIF-1的A549细胞以相同数量接种到96孔板中,每组设置6个重复孔,同时设置3个空白对照孔(不加细胞)培养24 h后,每孔加入50  $\mu\text{L}$  1×MTT溶液,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h,弃上清,每孔加150  $\mu\text{L}$  DMSO,摇床摇匀,酶标仪在570 nm波长处检测每孔的光密度,72 h和120 h,同样方法检测每孔的光密度.

### 1.2.8 腺病毒感染A549细胞的划痕实验

将A549细胞以每孔 $5 \times 10^5$ 的数量接种到3.5 cm的培养皿中,培养24 h后,以MOI值为40感染腺病毒AdDC315-EGFP/AdDC315-EGFP-hAIF-1,感染2 h换液,其间晃匀一次,2 d后,用枪头在皿底划4条直线,1×PBS洗去划下的细胞,显微镜下拍取可见光和荧光照片,24 h、36 h后分别观察拍照,测量迁移距离.

### 1.2.9 腺病毒感染A549细胞的Transwell实验

按之前同样的方法将A549细胞接种到3.5 cm的培养皿中,感染腺病毒AdDC315-EGFP/AdDC315-EGFP-hAIF-1 2 d后,将小皿中细胞消化下来,用0.1% FBS细胞培养基将细胞吹成悬液并计数,Transwell小室的上室加入100  $\mu\text{L}$ 的细胞悬液,每孔 $5 \times 10^4$ 个细胞,下室加入600  $\mu\text{L}$  10% FBS细胞培养基,细胞培养箱中培养24 h后,取出小室,1×PBS洗3遍,4%多聚甲醛室温固定30 min,用棉签去除上层细胞,1×PBS洗3遍,将膜剥下,覆盖于载玻片上,荧光倒置显微镜下观察,并选取5个视野进行计数拍照.

### 1.2.10 实验数据处理

实验数据用(Mean $\pm$ SD)表示,用Excel和Origin 8.0软件统计并作图,两组之间的差异用Student's *t*-test进行比较, $P < 0.05$ 认为有显著性差异,用\*表示; $P < 0.01$ 认为有非常显著性差异,用\*\*表示; $P < 0.001$ 认为有极显著性差异,用\*\*\*表示.

## 2 结果

### 2.1 hAIF-1基因的克隆

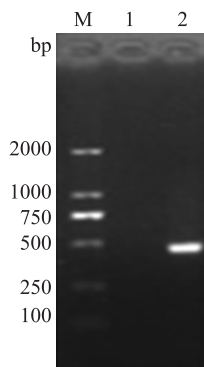
以HL-60细胞cDNA为模板,加入P1、P2引物,PCR扩增后,经琼脂糖凝胶电泳鉴定,在500 bp下方有一条目的条带,与理论值(约460 bp)相符(图1),序列分析显示为正确的hAIF-1基因.

### 2.2 pDC315-EGFP-hAIF-1质粒构建

目的基因片段与pDC315-EGFP质粒载体连接后,连接产物转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,氨苄抗生素LB培养平板初筛阳性克隆,菌落PCR进一步鉴定阳性克隆(图2).将阳性克隆菌落进行小量扩大培养后,提取质粒,进行酶切验证,用BamH I和Sal I双酶切后,在500 bp下方释放出一条明显条带,为hAIF-1(图3),至此初步鉴定质粒构建成功,并命名为pDC315-EGFP-hAIF-1(图4).

### 2.3 腺病毒的包装

将腺病毒穿梭质粒pDC315-EGFP/pDC315-EGFP-hAIF1与腺病毒骨架质粒pBHGloxdeltaE13Cre共转染293细胞,8 d~15 d后会观察到病毒噬斑的出现(图5).



M:DL 2000 DNA Marker; 1:阴性对照(ddH<sub>2</sub>O);2:PCR产物

图1 hAIF-1 cDNA 扩增产物

Fig.1 PCR products of hAIF-1

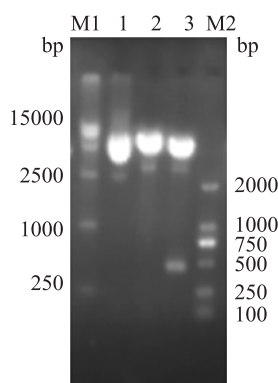
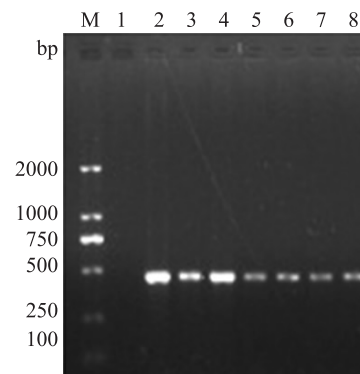


图3 重组质粒 pDC315-EGFP-hAIF-1 的酶切鉴定

Fig.3 Enzyme digestion of pDC315-EGFP-hAIF-1



M:DL 2000 DNA Marker; 1:阴性对照(ddH<sub>2</sub>O);2:阳性对照; 3-8:阳性克隆菌落 PCR 产物

图2 重组质粒 pDC315-EGFP-hAIF-1 的菌落 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of pDC315-EGFP-hAIF-1 by colony PCR

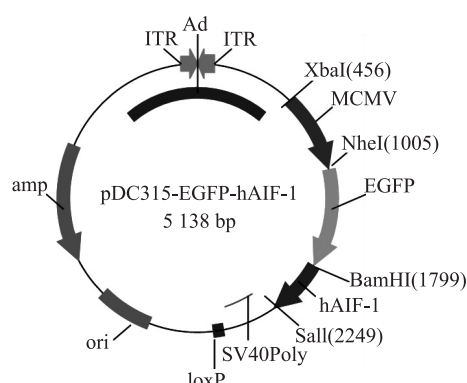
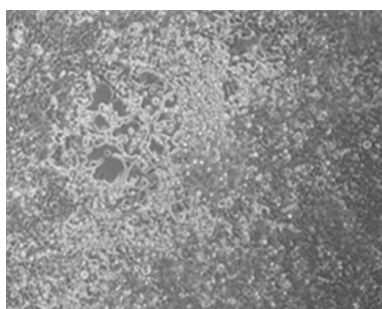
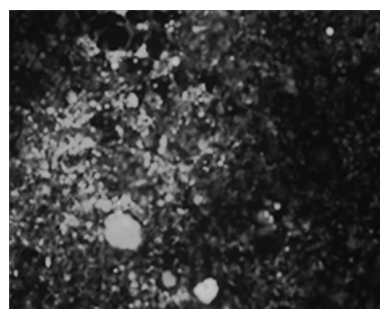


图4 重组质粒 pDC315-EGFP-hAIF-1 图谱

Fig.4 The map of pDC315-EGFP-hAIF-1 recombinant plasmid



(a) 可见光照片(×100)



(b) 荧光照片(×100)

图5 腺病毒噬斑

Fig.5 The plaques of adenovirus

## 2.4 PCR 鉴定重组腺病毒

将 24 孔板中出现 CPE 现象的细胞和培养液收集起来后,反复冻融 3 次,收集上清,并取 10  $\mu$ L 用于 PCR,电泳鉴定显示 AdDC315-EGFP-hAIF-1 有约 500 bp 的条带,为 hAIF-1 片段(图 6). 以上结果表明腺病毒 AdDC315-EGFP 和 AdDC315-EGFP-hAIF-1 包装成功.

## 2.5 重组腺病毒滴度的测定

大量扩增重组腺病毒,利用 50%组织培养感染剂量法(TCID<sub>50</sub>)测定滴度,并运用 Karbers 公式计算腺病毒的滴度. 腺病毒 AdDC315-EGFP:  $3.6 \times 10^8$  pfu/mL; AdDC315-EGFP-hAIF-1:  $2.5 \times 10^8$  pfu/mL.

## 2.6 RT-PCR 和 Western Blot 分析 hAIF-1 在 A549 细胞中的表达

重组腺病毒 AdDC315-EGFP/AdDC315-EGFP-hAIF-1 感染 A549 细胞,48 h 制备细胞的 RNA 和蛋白,进行 RT-PCR 和 Western Blot 分析,结果表明在腺病毒 AdDC315-EGFP-hAIF-1 感染的 A549 细胞中,可以检



测到hAIF-1大量表达,而在对照组 AdDC315-EGFP感染的 A549 细胞和不加病毒感染的 A549 细胞中均检测不到(图7). 这进一步说明腺病毒构建成功,并且能在 A549 细胞中表达.

2.7 MTT 检测细胞增殖实验

将感染腺病毒 AdDC315-EGFP(对照组)和 AdDC315-EGFP-hAIF-1(实验组)的 A549 细胞以相同数量接种到96 孔板中,分别培养 24 h、72 h 和 120 h,取样进行 MTT 检测,数据处理结果如表 1 所示. 随着培养天数的增加,对照组和实验组的细胞活力及细胞数都在逐渐增加,培养 120 h 后,实验组细胞活力及细胞数明显强于对照组,表明过表达 hAIF-1 可显著增强 A549 细胞的增殖能力(图8).

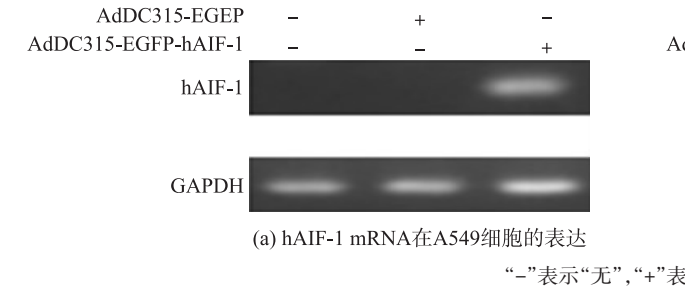


图7 hAIF-1 mRNA 和蛋白在 A549 细胞中的表达

Fig.7 The expressions of mRNA and protein of hAIF-1 in A549 cells

| 表 1 MTT 检测感染腺病毒的 A549 细胞在不同时间点的 OD 值  |                |             |               |  |
|---|----------------|-------------|---------------|--|
| Table 1 Detection the OD values of A549 cells which infected with adenovirus at various time-points |                |             |               |  |
| 分组  | OD 值 (Mean±SD) |             |               |  |
|   | 24 h           | 72 h        | 120 h         |  |
| AdDC315-EGFP  | 1.112±0.036    | 1.275±0.088 | 1.733±0.047   |  |
| AdDC315-EGFP-hAIF-1   | 1.13±0.031     | 1.436±0.046 | 2.099±0.068** |  |

注:实验组与相同时间点的对照组进行比较,\*\* $P<0.01$ .

2.8 细胞划痕实验

将生长良好的 A549 细胞接种到 3.5 cm 的培养皿中,细胞培养 24 h 后,分别感染重组腺病毒 AdDC315-EGFP(对照组)和 AdDC315-EGFP-hAIF-1(实验组),培养 48 h,取样进行划痕实验,分别在划痕后 0 h、24 h 和 36 h 3 个时间点进行拍照,结果如图 9,测量并计算细胞在划痕后 24 h 和 36 h 的迁移距离,并做柱状图,结果如图 10. 从图 10 可以看出,对照组和实验组在划痕后 24 h 和 36 h 都发生迁移,经统计分析表明,实验组比对照组迁移的距离要长,而且差异显著( $P<0.05$ ),可见光和荧光拍摄的照片(表示已被重组病毒感染的细胞)一致,这表明将感染 hAIF-1 基因重组腺病毒的 A549 细胞可以过表达 hAIF-1 蛋白,而且外源表达蛋白可以明显地促进 A549 细胞迁移.

2.9 Transwell 实验

将 A549 细胞接种于细胞 3.5 cm 培养皿中,分别感染腺病毒 AdDC315-EGFP(对照组)和 AdDC315-EGFP-hAIF-1(实验组),培养 48 h,收集细胞,计数,接种细胞于 Transwell 小室,24 h 后,固定细胞并观察计数,结果如图 11,从拍摄的荧光照片上可以看出,实验组迁移的细胞多于对照组,选取 5 个视野进行计数,统计分析结果表明,实验组迁移的细胞明显多于对照组而且差异显著. Transwell 结果与细胞划痕实验结果相一致,进一步证明 hAIF-1 具有促进 A549 细胞迁移的能力.

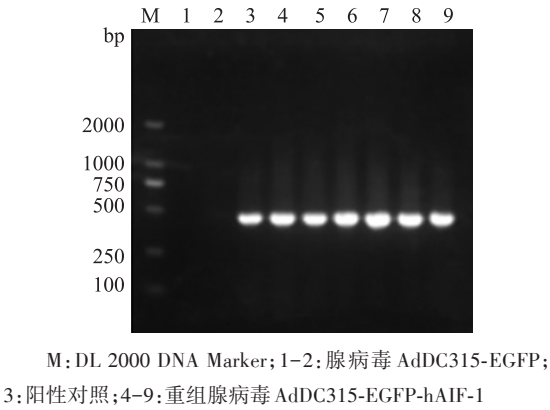


图6 PCR 鉴定重组腺病毒  
Fig.6 Identification of recombinant adenovirus by PCR

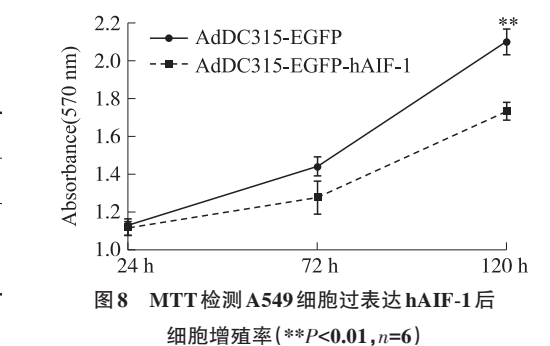
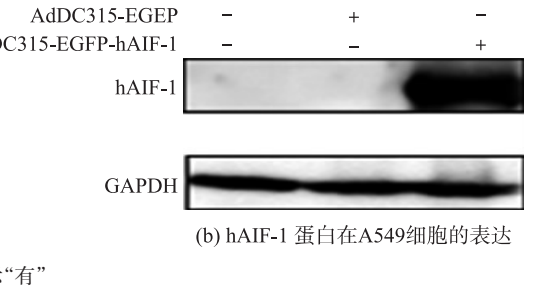


图8 MTT 检测 A549 细胞过表达 hAIF-1 后  
细胞增殖率 (\*\* $P<0.01$ ,  $n=6$ )  
Fig.8 Detection the proliferation rate of A549  
cells which overexpress hAIF-1 by MTT  
colorimetry (\*\* $P<0.01$ ,  $n=6$ )

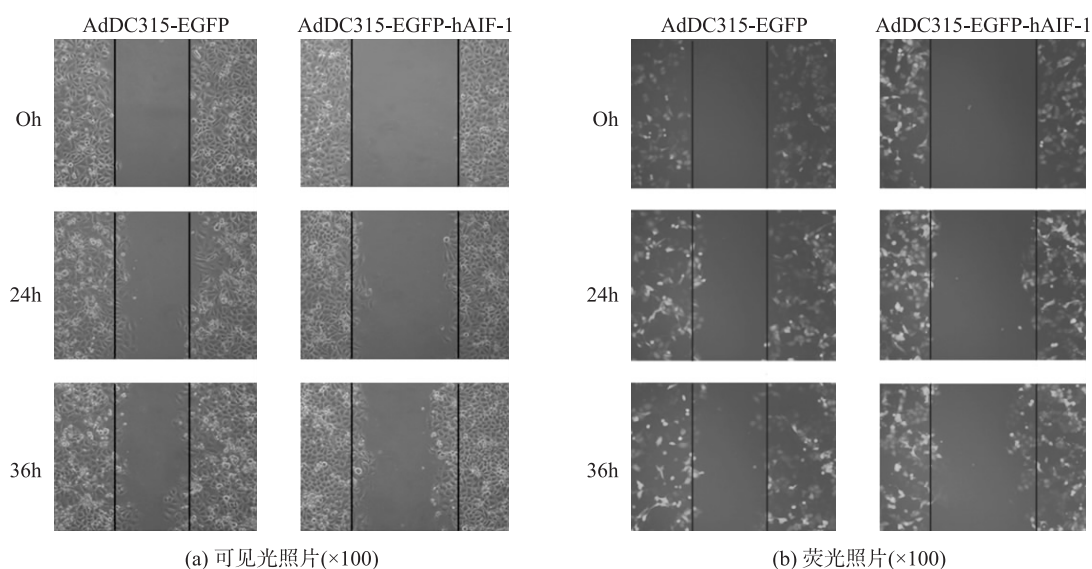


图9 细胞划痕实验检测 hAIF-1 过表达对 A549 细胞迁移能力的影响

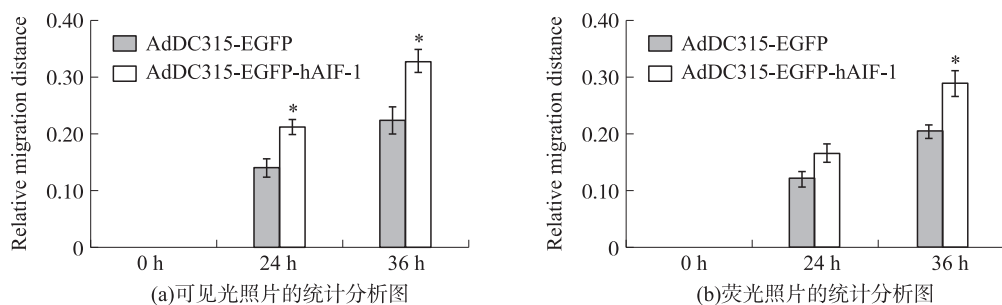
 Fig.9 The effect of the hAIF-1 overexpression on the migration of A549 cells by wound healing assay (\* $P<0.05$ ,  $n=9$ )

 图10 细胞划痕实验检测 hAIF-1 过表达对 A549 细胞迁移能力的影响 (\* $P<0.05$ ,  $n=9$ )

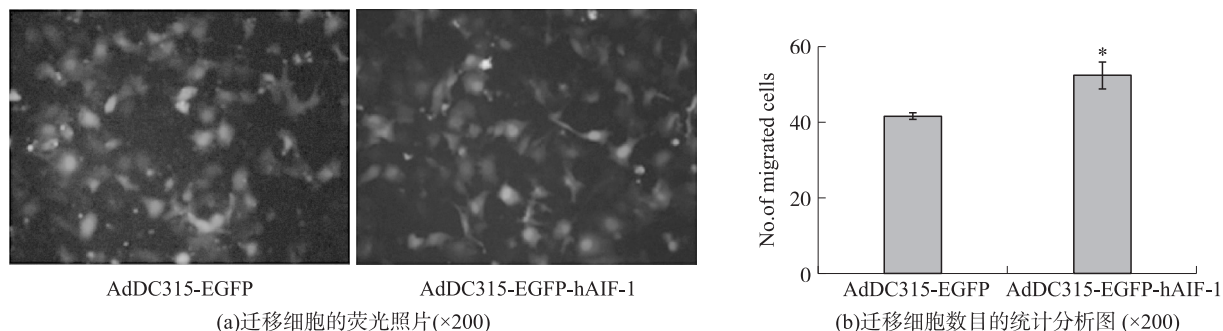
 Fig.10 The effect of the hAIF-1 overexpression on the migration of A549 cells by wound healing assay (\* $P<0.05$ ,  $n=9$ )

 图11 Transwell 实验检测 hAIF-1 过表达对 A549 细胞迁移能力的影响 (\* $P<0.05$ ,  $n=5$ )

 Fig.11 Detection the effect of the hAIF-1 overexpression on the migration of A549 cells by Tanswell assay (\* $P<0.05$ ,  $n=5$ )

### 3 讨论

本实验使用的腺病毒载体是由 AdMax 腺病毒载体包装系统包装而成,该腺病毒载体由缺少 E1 和 E3 区域的 5 型复制缺陷型腺病毒 (Ad5) 构成<sup>[12]</sup>. AdMax 腺病毒载体包装系统是 Dr. Frank LGraham<sup>[13]</sup> 创建的,它的包装原理又回到双质粒共转染的方法,但与之前不同的是共转染后,采用 Cre-loxP 或 FLP-frt 重组酶系统,极大地提高了重组效率.穿梭质粒 pDC315-EGFP-hAIF-1 携带外源基因,骨架质粒 pBHGloxdeltaE13Cre 包含大部分腺病毒基因组,利用 Cre/loxP 重组酶系统,借助脂质体将两种质粒共转染到含有 Ad5 基因组左端序列的人胚肾细胞 293 细胞中,重组包装成携带外源基因的腺病毒载体. AdMax 腺病毒载体包装系统有很多优点,比如,操作简单、重组率高、病毒滴度高、基因表达水平和转染效率相对较高,而且 Cre/loxP 重组酶系统可以提高重组效率;EGFP 是一个相对较新的标记基因,可以用于研究细胞内蛋白的

功能定位,被转染的细胞可以通过荧光显微镜和流式细胞仪直接观察检测而不用做任何处理,所以非常适合用于无毒性标记活细胞实验和一些体内研究<sup>[14]</sup>.运用此方法,该实验成功构建了重组腺病毒 AdDC315-EGFP 和 AdDC315-EGFP-hAIF-1.

在冠状动脉血管病变患者的冠状动脉 T 淋巴细胞中可以检测到 AIF-1 的表达,过表达 AIF-1 可以促进 T 淋巴细胞的增殖和迁移,这也可能与冠状动脉血管病变的发病机理有关<sup>[15]</sup>.利用 siRNA 干扰 AIF-1 的内源性表达会降低巨噬细胞增殖和迁移能力,加入携带 AIF-1 的腺病毒进行挽救会使细胞的增殖和迁移能力恢复<sup>[16]</sup>.此外,AIF-1 还可以通过上调 bFGF 来促进内皮细胞的增殖和迁移,通过激活 NF- $\kappa$ B/cyclinD1 通路来促进乳腺癌细胞的增殖,通过激活 p38 MAPK 信号通路上调 TNF- $\alpha$  来促进乳腺癌细胞的迁移,通过上调 CyclinD1 和 CDK4 的表达同时抑制 p27 的表达来促进细胞周期的进程从而促进肝癌细胞的增殖,通过缩短细胞周期来促进血管平滑肌细胞的增殖,引起新生内膜增生导致动脉粥样硬化的产生,与 Rac1 共定位,可能通过激活 Rac1 来促进血管平滑肌细胞的迁移<sup>[8-11,17,18]</sup>.可以看出,AIF-1 可以通过上调不同的细胞因子,激活不同的信号通路来促进各种细胞的增殖和迁移从而影响相关疾病的发生和发展.

本实验用构建成功的重组腺病毒感染人肺癌细胞 A549,MTT 法检测细胞增殖,细胞划痕和 Transwell 实验检测细胞迁移,结果显示 AIF-1 能够促进 A549 细胞的增殖.细胞划痕实验和 Transwell 实验结果一致都说明 AIF-1 能明显促进 A549 细胞的迁移.细胞迁移是癌细胞恶化和转移的主要环节,在癌症的发展过程中起着重要的作用,细胞增殖和迁移都是主动耗能的过程,需要细胞骨架尤其是由肌动蛋白组成的微丝骨架的参与,在整个迁移过程中涉及到肌动蛋白连续的解聚和重聚.AIF-1 具有结合肌动蛋白,并聚合交联肌动蛋白成束的功能<sup>[18]</sup>.AIF-1 这种促进 A549 细胞增殖和迁移的作用,可能和它能结合并聚合肌动蛋白的功能有关,也有可能是由于 AIF-1 调节了与细胞增殖和迁移相关的蛋白表达或者激活相关的信号通路.

#### [参考文献]

- [1] Zhao Y Y, Yan D J, Chen Z W. Role of AIF-1 in the regulation of inflammatory activation and diverse disease processes[J]. Cell Immunol, 2013, 284(1/2): 75-83.
- [2] Pawlik A, Kurzawski M, Dziedzicko V, et al. Allograft inflammatory factor-1 gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2012, 16(5): 341-345.
- [3] Zhao Y Y, Huang X Y, Chen Z W. Daintain/AIF-1 (Allograft Inflammatory Factor-1) accelerates type 1 diabetes in NOD mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 427(3): 513-517.
- [4] Li J, Chen J, Zhang Y, et al. Expression of allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) in response to bacterial challenge and tissue injury in the pearl oyster, *Pinctada martensii*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 34(1): 365-371.
- [5] Zhang Y, Li J, Yu F, et al. Allograft inflammatory factor-1 stimulates hemocyte immune activation by enhancing phagocytosis and expression of inflammatory cytokines in *Crassostrea gigas*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 34(5): 1071-1077.
- [6] Ji N, Chang Y, Zhao C, et al. Cloning and gene expression of allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) provide new insights into injury and bacteria response of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2014, 38(2): 400-405.
- [7] Deininger M H, Seid K, Engel S, et al. Allograft inflammatory factor-1 defines a distinct subset of infiltrating macrophages/microglial cells in rat and human gliomas[J]. Acta Neuropathol, 2000, 100(6): 673-680.
- [8] Jia J, Cai Y, Wang R, et al. Overexpression of allograft inflammatory factor-1 promotes the proliferation and migration of human endothelial cells(HUV-EC-C) probably by up-regulation of bFGF[J]. Pediatr Res, 2010, 67(1): 29-34.
- [9] Liu S, Tan W Y, Chen Q R, et al. Daintain/AIF-1 promotes breast cancer proliferation via activation of the NF- $\kappa$ B/cyclin D1 pathway and facilitates tumor growth[J]. Cancer Sci, 2008, 99(5): 952-957.
- [10] Li T, Feng Z, Jia S, et al. Daintain/AIF-1 promotes breast cancer cell migration by up-regulated TNF- $\alpha$  via activate p38 MAPK signaling pathway[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 131(3): 891-898.
- [11] 贾绍辉,姜华,杜仲夏,等. Daintain/AIF-1 促进肝癌细胞的增殖与迁移[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(2): 257-259.
- [12] Zhang C, Liu H M, Li Q W, et al. Construction of recombinant adenovirus vector containing hBMP2 and hVEGF165 genes and its expression in rabbit bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Tissue and Cell, 2014, 46(5): 311-317.

(下转第 79 页)

[参考文献]

- [1] Tomozawa Y, Nitta N, Ohta S, et al. Antitumor effect of miriplatin-lipiodol suspension/emulsion using a VX2 liver tumor model[J]. Jpn J Radiol, 2013, 31: 662–667.
- [2] Oguro S, Hashimoto S, Tanaka T, et al. Short-term therapeutic effects of transcatheter arterial chemoembolization using miriplatin-lipiodol suspension for hepatocellular carcinoma[J]. Jpn J Radiol, 2012, 30: 735–742.
- [3] Zhao J, Ma J J. Progress in pharmacological and clinical studies of miriplatin on interventional therapy of hepatocellular carcinoma[J]. Chin J of New Drugs, 2012, 21: 2 097–2 099.
- [4] Zhao Y N, Chen X Q, Zhu K, et al. Thermostability and crystal structure of anticancer drug dasatinib [J]. Acta Pharm Sin, 2011, 46: 1 104–1 107.
- [5] Zhang H, Zhao Y N, Li G. Study on polymorphism and thermostability of minodronic acid[J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32: 1 771–1 773.
- [6] Petruševski G, Zbačnik M, Kajdžanoska M, et al. Pholcodine monohydrate: crystal structure and polymorphism [J]. J Cryst Growth, 2013, 375: 119–124.
- [7] Li G, Qin T, Huang C G, et al. Composition and thermal stability of the mineral traditional Chinese medicine pyrite (Zirantong) [J]. Acta Chim Sin, 2009, 27: 466–470.
- [8] Wang Q K, Zhou L M, Pu S P, et al. Synthesis of miriplatin, a novel platinum-based antitumor drug [J]. Chin Pharm J, 2013, 48: 1 594–1 595.
- [9] Wang Q K, Pu S P, Zhu Z B, et al. Improved synthesis of miriplatin, an antitumor drug [J]. Chin J of Med Chem, 2012, 22: 36–37.
- [10] Wang Q K, Pu S P, Zhu Z B, et al. A new synthetic method and characterization of miriplatin, an antitumor drug [J]. Chin J of Med Chem, 2011, 21: 213–215.

[责任编辑:黄 敏]

---

(上接第 70 页)

- [13] Ng P, Parks R J, Cummings D T, et al. A high efficiency Cre/loxP based system for construction of adenoviral vectors [J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(16): 2 667–2 672.
- [14] Lin J Q, Lin C Z, Lin X Z, et al. Construction of a bicistronic recombinant adenoviral vector for human interleukin-10 and enhanced green fluorescent protein expression in bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(1): 102–108.
- [15] Kelemen S E, Autieri M V. Expression of Allograft Inflammatory Factor-1 in T-Lymphocytes a role in T-Lymphocyte activation and proliferative arteriopathies [J]. Am J Pathol, 2005, 167(2): 619–626.
- [16] Tian Y, Kelemen S E, Autieri M V. Autieri Inhibition of AIF-1 expression by constitutive siRNA expression reduces macrophage migration, proliferation, and signal transduction initiated by atherogenic stimuli [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 290(4): C1 083–C1 091.
- [17] Autieri M V, Carbone C M. Overexpression of Allograft Inflammatory Factor-1 promotes proliferation of vascular smooth muscle cells by cell cycle deregulation [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21(9): 1 421–1 426.
- [18] Autieri M V, Kelemen S E, Wendt K W. Smooth muscle cell migration AIF-1 is an actin-polymerizing and Rac1-activating protein that promotes vascular [J]. Circ Res, 2003, 92(10): 1 107–1 114.

[责任编辑:黄 敏]