

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2019.03.003

血清对 Hela 细胞整合素 $\alpha v \beta 3$ 受体内存循环的影响*

张璐琳 刘文琦 蔡荣荣 沈皖珠 崔亚男[△] 管华[△]

(济宁医学院药学院,日照 276826)

摘要 目的 探讨血清对 Hela 细胞整合素 $\alpha v \beta 3$ 受体内存循环的影响。方法 培养 Hela 细胞,激光共聚焦显微镜观测其表面 $\alpha v \beta 3$ 受体的表达情况。通过对细胞表面蛋白进行生物素标记,利用酶联免疫吸附法,考察含血清培养基培养条件下和不含血清的培养条件下,细胞表面 $\alpha v \beta 3$ 受体的内存循环情况。结果 $\alpha v \beta 3$ 受体在 Hela 细胞表面具有高表达。与不含血清培养条件相比,含血清培养组 $\alpha v \beta 3$ 受体的入胞量在 5min 和 10min 时显著减少,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 含血清培养基培养的条件下,Hela 细胞中的 $\alpha v \beta 3$ 受体可能更快地循环返回至细胞表面。

关键词 整合素 $\alpha v \beta 3$ 受体;细胞内存;血清;人宫颈癌细胞;酶联免疫吸附法

中图分类号:R730.1 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2019)06-162-04

The impact of serum on the endocytic recycling of $\alpha v \beta 3$ integrin in Hela cells

ZHANG Lulin, LIU Wenqi, CAI Rongrong, SHEN Wanzhu, CUI Yanan, Guan Hua

(College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To determine the impact of serum on the endocytic recycling of $\alpha v \beta 3$ integrin in Hela cells. **Methods** Hela cells were purchased as the cell model, and the expression of $\alpha v \beta 3$ integrin was studied by using confocal laser scanning microscopy analysis. Capture-enzyme linked immunosorbent assay was used to investigate the endocytic recycling of $\alpha v \beta 3$ integrins which were labelled by biotin. **Results** Obvious difference of the intracellular quantity of $\alpha v \beta 3$ integrins was observed under the two culture conditions. The difference was enlarged by the end of 5min and 10min respectively. **Conclusion** Integrin $\alpha v \beta 3$ would recycle back to the surface of Hela cells more quickly when the cells were cultured in complete DMEM.

Keywords: Integrin $\alpha v \beta 3$; Cellular uptake; Serum; Hela cells; Enzyme linked immunosorbent assay

随着纳米医学以及分子生物学的发展,以肿瘤细胞中异常表达的蛋白或受体为靶标,通过对药物或载体进行特异性修饰,将药物分子选择性地递送到肿瘤细胞甚至其细胞器中,是药学工作者长期以来的研究方向^[1-4]。相应的,对于这类药物的入胞循环分子机制的探索,亦成为近年来的研究热点之一^[5-6]。目前,在给药系统对象的细胞内存循环机制的研究方面,大多数实验采用的是无血清培养条件,对于血清的添加与否目前尚缺乏共识^[7-9]。有

文献报道,细胞表面受体的内存循环机制与培养基中添加的成分密切相关^[10]。血清作为培养基中模拟细胞体内生长环境所必需的营养成分,其成分复杂。本文将考察血清对受体的内存循环转运产生的影响。现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

台式高速冷冻离心机(TGL-185,长沙平凡仪器仪表有限公司);TCS SP8 徕卡激光共聚焦荧光显微镜(德国 Heidelberg 公司);MCO-175CO2 孵育箱(日本 SANYO 公司);IX73 倒置荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司);DNM-9602G 酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司)。

* [基金项目] 济宁医学院大学生创新训练计划项目(cx2016002);国家级大学生创新训练项目(201810443046);山东省自然科学基金青年基金(ZR2017QH006)

[△][通信作者] 崔亚男, E-mail: guancyn@sina.com
管华, E-mail: jl790217@163.com

1.2 试剂

胎牛血清, DMEM 培养基(中科迈晨北京科技有限公司); 抗整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体鼠单克隆抗体(ab78289, 英国 Abcam 公司); Alexa Fluor® 647 标记的羊抗鼠二抗(A-21236, 美国 Invitrogen 公司); 生物素基二硫代 N-羧基琥珀酰亚胺活泼酯(NHS-SS-Biotin, 美国赛默飞科技有限公司); 巯乙磺酸钠(MesNa, 中海威北京基因科技有限公司); ELISA 套装(北京欣博盛生物科技有限公司); 辣根过氧化物酶链霉亲和素(美国 Jackson Immuno Research 公司)。

1.3 细胞及分组

人宫颈癌 HeLa 细胞, 由中国医学科学院基础医学研究所提供。内吞循环实验中, 细胞分成两组: 不含血清培养基组和含血清培养基组, 每组细胞设定三个样本。数据用 GraphPad Prism6.0 统计软件进行分析。

2 方法

2.1 细胞培养条件及 HeLa 细胞表面 $\alpha v\beta 3$ 整合素受体的表达

HeLa 细胞培养于 DMEM 完全培养基中, 置于细胞培养箱中培养。待细胞汇合度达到 80% 以上时, 消化收集细胞, 按一定比例稀释接种于 12 孔板中, 继续培养至汇合度达 80% 左右。吸弃上清, 以 PBS 缓冲液洗涤 3 次后, 加入 4% 的多聚甲醛于 37°C 固定细胞 20min。室温下以 0.1% TPBS(w/v) 处理细胞 5min 后, 以 3% BSA(w/v) 的 PBS 溶液于 37°C 封闭 1h。随后细胞中加入抗整合素 $\alpha v\beta 3$ 受体的鼠源单克隆抗体, 于 37°C 孵育 2h。同时设置阴性表达组, 阴性表达组为不加一抗的含 1% BSA 的溶液。PBS 洗涤 3 次后, 加入荧光探针 Alexa Fluor® 647 标记的羊抗鼠多克隆抗体, 继续于 37°C 孵育 2h。以 Hoechst 33258 于室温下处理细胞 15min 后, 封片, 然后通过荧光共聚焦显微镜(CLSM) 观察细胞表面受体表达情况。

2.2 细胞毒性考察

采用传统的磺酰罗丹明 B 法(SRB) 考察了实验中用到的 MesNa 和 NHS-SS-Biotin 两种试剂对 HeLa 细胞活性的影响。收集 HeLa 细胞, 以 5×10^3 / 孔的密度将细胞铺设于 96 孔板中, 于 37°C, 5% CO₂ 孵箱中孵育 24h。轻轻吸弃上清液, 加入以不完全培养基稀释的 MesNa(0.2mg/ml) 和 NHS-SS-Biotin(0.15mg/ml) 溶液 200 μ l/孔, 同时设置不完

全培养基孵育的细胞为阳性对照组, 继续培养 1h。结束后, 吸弃上清液, 每孔加入 200 μ l 10% (w/v) 的 TCA 溶液于 4°C 固定细胞 1h。以去离子水洗涤, 晾干, 每孔加入 100 μ l 0.4% (w/v) 的 SRB 溶液室温孵育 30min, 以 1% (v/v) 冰醋酸溶液洗涤, 晾干后, 每孔精确加入 200 μ l 10mM 的 Tris 碱溶液室温振荡 30min 后, 于 540nm 波长处测定各孔的吸光度。通过下述公式计算细胞生存率。

$$\text{细胞生存率}/\% = (\text{待测细胞 OD 值} - \text{对照 OD 值}) / (\text{阳性对照 OD 值} - \text{对照组 OD 值}) \times 100\%$$

2.3 HeLa 细胞表面 $\alpha v\beta 3$ 整合素受体的内吞循环

将 HeLa 细胞铺于 6 孔板中, 待细胞长至约 80% 的汇合度后, 吸弃上清培养液, 以冰 PBS 溶液洗涤细胞 3 遍, 每孔加入 1ml NHS-SS-Biotin 溶液(0°C, 0.15mg/ml, 以不含血清培养基稀释), 并于冰浴上孵育 30min, 之后以冰 PBS 洗涤细胞 3 遍, 加入 1ml 预热至 37°C 的 DMEM 培养基(含/不含血清), 并迅速置于 37°C 孵箱中培养预定的时间(3min, 5min, 10min), 结束后, 迅速转移孔板至冰浴, 吸弃上清, 并以冰 PBS 洗涤细胞 3 遍。每孔加入 1ml 0°C 的 MesNa 溶液(0.2mg/ml, 以不含血清培养基稀释) 处理细胞 15min, 以释放结合在细胞表面的 NHS-SS-Biotin。以冰 PBS 洗涤细胞 3 遍后, 用细胞刮刀将细胞刮下, 4°C 1000rpm 离心 5min 收集细胞, 冻融循环 4 次裂解细胞。通过二喹啉甲酸(BCA) 蛋白分析法测定细胞蛋白含量, 通过捕获酶联免疫吸附法(Elisa) 对标记有生物素的 $\alpha v\beta 3$ 整合素的含量进行测定, 以生物素的吸光度值表示。 $\alpha v\beta 3$ 整合素受体的内吞循环测定原理如图 1 所示, 具体 Elisa 操作流程如图 2 所示。

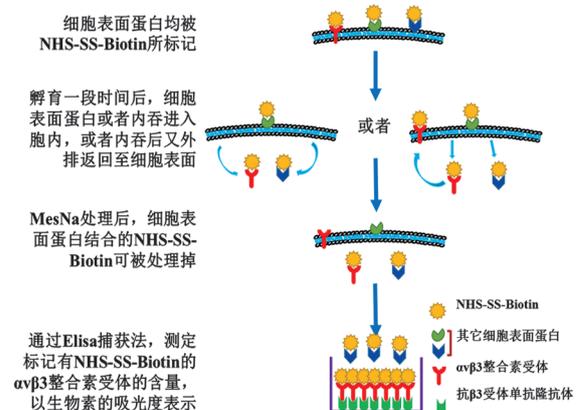


图 1 HeLa 细胞中 $\alpha v\beta 3$ 整合素受体内吞循环测定原理示意图

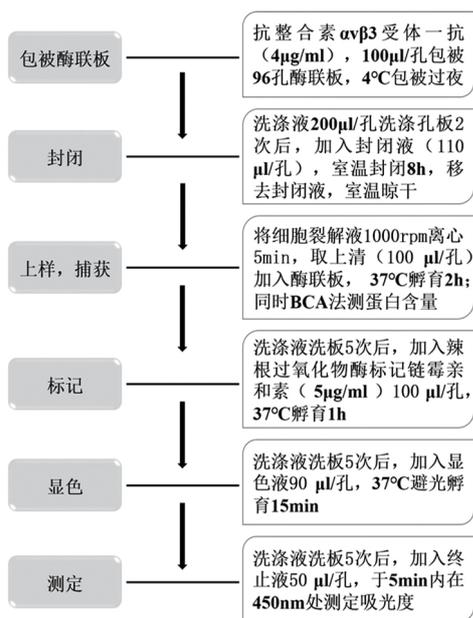
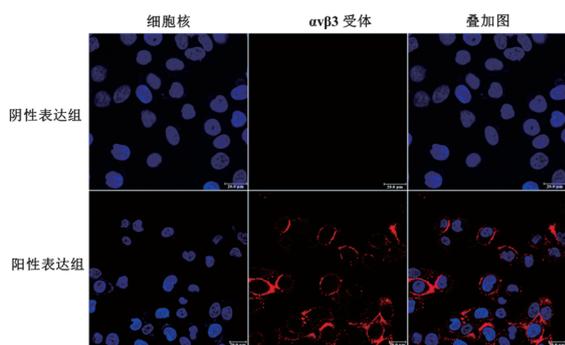


图 2 Elisa 法测定生物素标记的 $\alpha v \beta 3$ 整合素受体操作流程

3 结果和讨论

3.1 Hela 细胞表面 $\alpha v \beta 3$ 整合素受体的表达

$\alpha v \beta 3$ 整合素受体在 Hela 细胞中具有高表达, 可以用于 $\alpha v \beta 3$ 整合素受体的内吞循环研究。见图 3。



注: 红色表示已经被染色的 $\alpha v \beta 3$ 受体; 蓝色表示经 Hoechst 33258 荧光染料染色的细胞核, 图中标尺的长度为 20

图 3 Hela 细胞表面 $\alpha v \beta 3$ 整合素受体表达情况

3.2 细胞毒性考察

MesNa (0.2mg/ml) 和 NHS-SS-Biotin (0.15mg/ml) 溶液对 Hela 细胞的生存活性无影响, 可用于下一步的实验研究。见图 4。

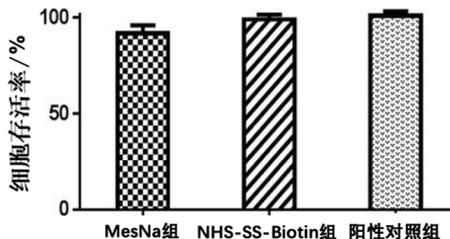
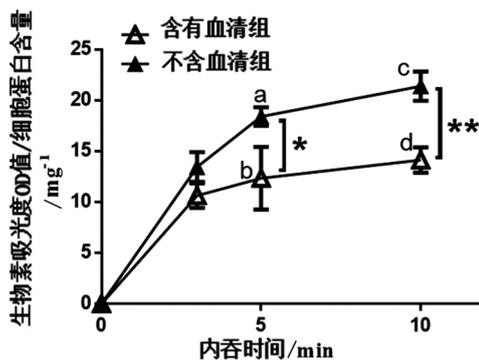


图 4 MesNa 和 NHS-SS-Biotin 对 Hela 细胞活性的影响

3.3 Hela 细胞表面 $\alpha v \beta 3$ 整合素受体的内吞循环

在含血清和不含血清的培养条件下, Hela 细胞中 $\alpha v \beta 3$ 受体的内吞循环具有明显的不同。0min 时, 生物素吸光度/细胞蛋白含量比值为 0, 说明经过 MesNa 处理后, 细胞表面修饰的生物素被处理完全, 且细胞内吞尚未开始, 尚未有生物素标记的 $\alpha v \beta 3$ 受体内吞入胞; 3min 时, 生物素吸光度/细胞蛋白含量比值明显升高, 由于 MesNa 处理表面生物素标记蛋白时不能影响已经内吞入胞的生物素标记蛋白, 说明在两种培养条件下, 生物素标记的 $\alpha v \beta 3$ 受体已经开始内吞进入胞内; 而在 5min 和 10min 时, 两种培养条件相比, $\alpha v \beta 3$ 受体的入胞量出现显著差异 (如图 5a 和 b 所示), 我们推断, 在完全培养基培养的条件下, Hela 细胞中的 $\alpha v \beta 3$ 受体可能比在不含血清的培养条件下, 更快地循环返回细胞表面, 因此, 经过 MesNa 处理后, 返回至细胞表面的 $\alpha v \beta 3$ 受体其生物素标记被处理掉, 表现出总入胞量要少。见图 5。



注: * $P < 0.05$ (a 和 b 比较); ** $P < 0.01$ (c 和 d 比较)

图 5 不同培养条件下 Hela 细胞表面的 $\alpha v \beta 3$ 受体内吞入胞量随时间变化关系 (n=3)

4 结论

整合素作为细胞与胞外基质 (ECM) 以及细胞与细胞之间信号转导的最重要的中介异源二聚体, 在细胞的增殖、迁移、凋亡以及吞噬方面发挥重要

作用。自 Mark Bretscher^[11-12]首次提出整合素在细胞内存在循环通路以来,目前已经证实,大部分的整合素内吞后,将会循环返回至细胞膜表面。Jim Norman 等^[10]报道, $\alpha\beta3$ 受体既可以利用 Rab4 依赖的快循环途径返回至胞膜,亦可以通过 Rab11 依赖的慢循环途径返回。这主要取决于培养环境中是否存在血小板衍生生长因子(PDGF),这与本课题的研究结果相近。同时,Brenner 等^[13]研究表明,部分 $\beta3$ 整合素受体可通过巨胞饮的内吞途径入胞,且在 PDGF 的刺激下,这部分 $\beta3$ 整合素受体可通过快速外排途径出胞。因此,本课题考察的整合素 $\alpha\beta3$ 受体在不同的培养条件下(完全培养基/无血清培养基)的胞内循环转运情况,将为今后 $\alpha\beta3$ 受体介导的靶向给药系统的设计及其细胞转运机制研究提供重要参考。

参考文献:

[1] Danhier F, Feron O, Pr at V. To exploit the tumor micro-environment; Passive and active tumor targeting of nano-carriers for anti-cancer drug delivery [J]. J Control Release, 2010, 148(2): 135-146. DOI: 10. 1016/j. jconrel. 2010. 08. 027.

[2] Farokhzad OC, Langer R. Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2006, 58(14): 1456-1459. DOI: 10. 1016/j. addr. 2006. 09. 011.

[3] Davis ME, Chen ZG, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer [J]. Nat Rev Drug Discov, 2008, 7(9): 771-782. DOI: 10. 1038/nrd2614.

[4] Peer D, Karp JM, Hong S, et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy [J]. Nat Nanotechnol, 2007, 2(12): 751-760. DOI: 10. 1038/nnano. 2007. 387.

[5] Ragelle H, Colombo S, Pourcelle V, et al. Intracellular siRNA delivery dynamics of integrin-targeted, PEGylated

chitosan-poly(ethylene imine) hybrid nanoparticles: A mechanistic insight [J]. J Control Release, 2015, 211: 1-9. DOI: 10. 1016/j. jconrel. 2015. 05. 274.

[6] Douglas KL, Piccirillo CA, Tabrizian M. Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2008, 68(3): 676-687. DOI: 10. 1016/j. ejpb. 2007. 09. 002.

[7] He B, Jia Z, Du W, et al. The transport pathways of polymer nanoparticles in MDCK epithelial cells [J]. Biomaterials, 2013, 34(17): 4309-4326. DOI: 10. 1016/j. biomaterials. 2013. 01. 100.

[8] He B, Lin P, Jia Z, et al. The transport mechanisms of polymer nanoparticles in Caco-2 epithelial cells [J]. Biomaterials, 2013, 34(25): 6082-6098. DOI: 10. 1016/j. biomaterials. 2013. 04. 053.

[9] Du W, Fan Y, Zheng N, et al. Transferrin receptor specific nanocarriers conjugated with functional 7peptide for oral drug delivery [J]. Biomaterials, 2013, 34(3): 794-806. DOI: 10. 1016/j. biomaterials. 2012. 10. 003.

[10] Roberts M, Barry S, Woods A, et al. PDGF-regulated rab4-dependent recycling of alphavbeta3 integrin from early endosomes is necessary for cell adhesion and spreading [J]. Curr Biol, 2001, 11(18): 1392-1402.

[11] Brescher MS. Endocytosis and recycling of the fibronectin receptor in CHO cells [J]. EMBO J, 1989, 8(5): 1341-1348.

[12] Brescher MS. Circulating integrins: alpha 5 beta 1, alpha 6 beta 4 and Mac-1, but not alpha 3 beta 1, alpha 4 beta 1 or LFA-1 [J]. EMBO J, 1992, 11(2): 405-410.

[13] Gu Z, Noss EH, Hsu VW, et al. Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration [J]. J Cell Biol, 2011, 193(1): 61-70. DOI: 10. 1083/jcb. 201007003.

(收稿日期 2017-11-09)

(本文编辑:石俊强)

