网络首发时间：2025-06-30 13:13:04　网络首发地址：https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250630.0856.008

人 HACE1 过表达慢病毒细胞株构建及其对胶质瘤细胞增殖迁移的影响

黄　冉[1],单　明[2],李巍松[1]
(安徽医科大学第一附属医院[1] 小儿外科、[2] 神经外科,合肥　230022)

摘要　目的　构建 HACE1 慢病毒过表达细胞株,检测其对胶质瘤细胞增殖、迁移的影响。**方法**　以人 HACE1 全长的 cDNA 序列的菌液为模板,构建慢病毒表达质粒 pCDH-HACE1 并筛选慢病毒细胞株。采用 Western blot 法检测其在胶质瘤细胞中的表达情况,同时借助 CCK-8 实验、细胞划痕实验检测 HACE1 对胶质瘤细胞增殖、迁移的影响。**结果**　成功构建了 HACE1 慢病毒细胞株,Western blot 法检测表明 HACE1 在真核细胞中能有效表达。CCK-8 检测显示:与对照组比较,培养 24、48 h 后 HACE1 过表达组细胞增殖增强($t=2.42,1.85$,均 $P<0.01$)。细胞划痕实验显示:与对照组比较,培养 24、48 h 后 HACE1 过表达组划痕面积减少($t=4.46,P<0.05$;$t=1.30,P<0.01$)。**结论**　成功构建 HACE1 过表达慢病毒细胞株,HACE1 可促进 U251 胶质瘤细胞的增殖和迁移。

关键词　HACE1;过表达;慢病毒载体;胶质瘤;增殖;迁移
中图分类号　R 363
文献标志码　A　**文章编号**　1000－1492(2025)07－1241－05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000－1492.2025.07.011

HACE1 属于 HECT 家族的 E3 泛素连接酶,定位于染色体 6q21,是多种恶性肿瘤中频繁发生突变的一个位点,最早发现与肾母细胞瘤的发生发展密切相关[1]。HACE1 功能复杂,通常认为是抑癌基因,在多种人类恶性肿瘤中起抑制作用[2-5]。然而,在黑色素瘤细胞中却显示出促侵袭特性[6]。此外,HACE1 可以激活核因子 E2 相关因子-2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2,NRF2)进而促进神经胶质瘤细胞恶性表型增强和放射敏感性降低[7],但其在胶质瘤发生发展中确切分子的机制和功能仍有待深入研究。胶质瘤作为临床常见的脑部恶性肿瘤,呈浸润性生长,难以完全切除,术后易复发,虽治疗取得了长足进展,但预后仍不乐观 ,一直是临床治疗的难点和热点,明确胶质瘤发病的相关分子机制意义重大。因此,该研究拟构建 HACE1 过表达慢病毒,筛选出 HACE1 过表达人胶质瘤细胞株,并通过 CCK-8 和细胞划痕实验明确 HACE1 对胶质瘤细胞增殖、迁移的影响,旨在为进一步研究 HACE1 在胶质瘤发生发展进程中的分子机制奠定基础。

2025－03－24 接收
基金项目:安徽省自然科学基金(编号:2208085MH224)
作者简介:黄　冉,男,主治医师;
李巍松,男,博士,副主任医师,通信作者,E-mail:15955199807@126.com

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　*细胞*　实验所用人胚胎肾细胞系 HEK 293T 和人胶质瘤细胞系 U251 均购于上海赛瑞格生物科技有限公司,货号分别是 FH0244、FH0159。

1.1.2　*主要试剂*　DMEM 培养基(货号:SH30022.01,美国 HyClone 公司),胎牛血清、胰酶 Trypsin-EDTA 0.25%(货号:A5256701、25200056,美国赛默飞公司),Lipofectamine 3000(货号:L3000015,美国赛默飞世尔科技公司),Tween-20、Triton X-100、HEPES、NP-40、PMSF(货号:a-shr-3182、VWRVM236、VWRVJ848、VWRCJ619、0754-25G,美国 Amresco 公司),蛋白酶抑制剂(货号:11836145001,瑞士罗氏公司),大肠杆菌质粒抽提(货号:DP104,天根生化科技有限公司),CCK-8 试剂盒(货号:MK400,日本 TAKARA 公司)。

1.1.3　*主要仪器*　电泳仪、凝胶成像分析系统(型号:EPS-300、Tanon 4600,上海天能生命科学有限公司),细胞培养箱(型号:HERAcell 150i,美国 Thermo 公司),细胞超净台(型号:SW-CJ-1FD,苏州净化设备有限公司),水浴锅(型号:DKZ-2B,上海精宏实验设备有限公司),倒置显微镜(型号:IX73,日本 OLYMPUS 公司)。

1.2　方法

1.2.1 细胞培养 HEK 293T 和 U251 细胞均采用高糖 DMEM 培养基进行培养，该培养基添加了 10% 胎牛血清 和 1% 青－链霉素，将接种好细胞的培养皿放置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内进行培养。当细胞生长至 90% 时，将培养皿从培养箱中取出，加入适量胰酶，在 37 ℃ 条件下消化细胞 1 min。用含有 10% 血清培养基终止消化。轻轻吹打混匀细胞，将细胞悬液转移至无菌离心管中，1 000 r/min 离心 3 ~5 min，离心结束后弃上清液，加入新鲜含有 10% 血清培养基充分悬浮、混匀细胞，按 1∶3 传代。

1.2.2 克隆构建 依据 NCBI 数据库提供的 HACE1 序列信息分别设计上下游引物，F：CCGGAATTCATGGAGAGAGCGATGGAGCAA；R：TTTATAGCGGCCGCTGCCATTGTGTAACCATAGCT；酶切位点：EcoRI/NotI；用上述引物 PCR 扩增出 HACE1 序列，PCR 胶回收片段经过酶切后连接至 pCDH 载体后，酶切鉴定送测序。pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 载体图谱见图 1。

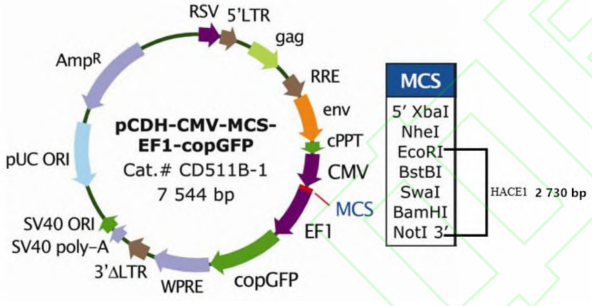

图 1 慢病毒载体图谱

Fig. 1 Lentiviral vector plasmid map

1.2.3 病毒包装 待细胞密度生长至 70% ~80% 时，lipofectamine 3000 转染。慢病毒包装的目的质粒（pCDH）与包装质粒（pVSVG，△8.91）按照 pCDH∶△8.91∶pVSVG＝5∶3∶2 的比例充分混匀。持续培养 24 h 后，若观察到细胞融合现象，表示病毒包装成功且开始产生病毒颗粒。转染后 48、72 h 分 2 次收取含有病毒的上清液。病毒滤液于－80 ℃ 冰箱保存。

1.2.4 病毒感染 提前 1 d 分好待感染的细胞，待细胞密度生长至 60% ~80% 时，吸去培养基，加入病毒滤液；感染 24 h 后，更换新鲜培养基，再培养 24 h 后，使用最佳的嘌呤霉素浓度进行筛选。实验分为对照组和 HACE1 过表达组，对照组为正常 U251 细胞系，HACE1 过表达组为 HACE1 过表达 U251 细胞系。

1.2.5 Western blot 实验 弃培养基，收集细胞于离心管中，预冷 1×PBS 悬浮细胞，1 000 r/min 离心 3 min，弃上清液，重复上述步骤 2 次。加入细胞裂解液 RIPA，混匀，冰上静置 30 min，加入 5×loading buffer 混匀，100 ℃ 煮样 5 min。使用 SDS-PAGE 胶电泳后，采用湿转法 110 V、90 min 转 PVDF 膜。封闭 1 h 后一抗 4 ℃ 过夜孵育。TBST 洗膜 3 次后，室温孵育二抗 1 h，TBST 洗膜 3 次后加入 ECL 显色液显色曝光。

1.2.6 CCK-8 检测细胞活力 预先培养足量状态良好的胶质瘤细胞系 U251，传代准备实验。第 2 天取前 1 d 传代的处于对数期生长的细胞，加入适量胰酶消化并用含 10 % 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基终止消化，制成细胞悬液。调整细胞密度至 1×10^4 个/mL，每孔各加 100 μL，并分别设置副孔。置于 37 ℃ 培养，待细胞贴壁一段时间后，每孔各加入 100 μL CCK-8 试剂，37 ℃ 避光培养 2 h。用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度（optical density，OD）。细胞增殖活力＝（实验组 OD 值 / 对照组 OD 值）× 100%。

1.2.7 划痕实验 预先培养足量状态良好的胶质瘤细胞系 U251，待细胞生长至 90% 左右，消化细胞并将细胞均匀传代于 6 孔板中，继续培养细胞。待细胞贴壁一段时间后，使用无菌枪头在孔板底面划出一条平行直线，然后吸去孔内原有培养基，加入新鲜无血清培养基继续培养，分别在加入无血清培养基后的 0、24、48 h 时间点于显微镜下观察细胞生长情况以及划痕愈合情况，测量各时间点划痕宽度，标记图像位置，并记录图像并分析。划痕面积率＝ 某时间点划痕面积 / 初始划痕面积 × 100%。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行统计分析，对数据进行正态性检验及方差齐性检验，符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组间均数比较采用 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HACE1 质粒构建 根据设计的上下游引物，PCR 扩增 HACE1 基因全长，胶回收的基因片段经双酶切后与慢病毒载体 pCDH 进行连接（载体信息详见图 1）。编码蛋白 HACE1 由 909 个氨基酸组成，分子量约 103 ku，琼脂糖凝胶电泳显示片段大小约为 2 730 bp，见图 2。

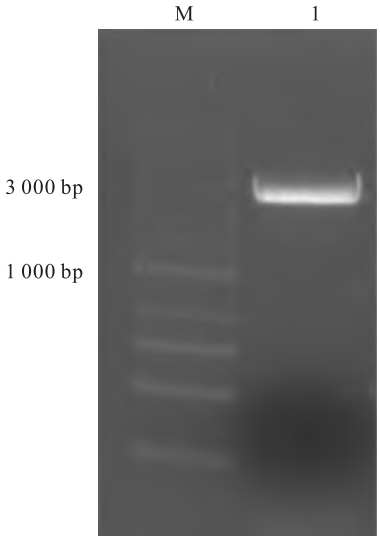

图 2 HACE1 基因 CDS 区的 PCR 鉴定结果

Fig. 2 PCR identification results of the CDS region of the HACE1 gene

M: Marker; 1: HACE1.

2.2 HACE1 在细胞内的表达 成功筛选到 HACE1 过表达稳转细胞株后，Western blot 检测 HACE1 蛋白表达水平。通过 Western blot 检测对照组、HACE1 过表达组 GFP 表达水平，HACE1 过表达组中 HACE1 融合表达 GFP 标签蛋白后，理论分子量约 130 ku。结果显示，GFP 及 GFP-HACE1 表达水平很高，HACE1 过表达稳转细胞株构建成功。见图 3。

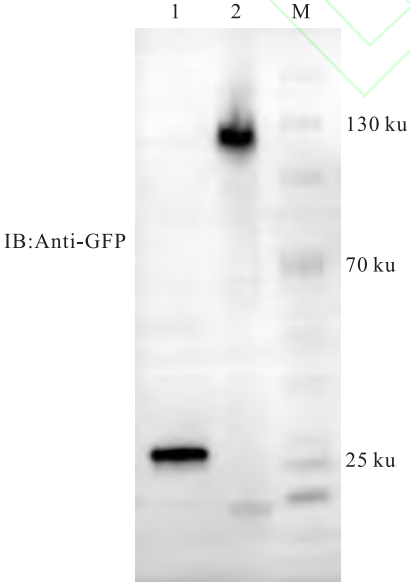

图 3 HACE1 过表达细胞系 Western blot 检测结果

Fig. 3 Western blot detection results of HACE1-overexpressing cell lines

M: Marker; 1: pCDH-GFP empty vector group; 2: pCDH-GFP-HACE1 vector control group.

2.3 HACE1 对细胞增殖活力的影响 使用 CCK-8 分别检测不同时间点对照组以及 HACE1 过表达组细胞增殖活性，实验结果显示，与对照组比较，培养 24、48 h 后，HACE1 过表达组细胞增殖率均增加（$t=2.42$、1.85，均 $P<0.01$），显示 HACE1 过表达后促进 U251 细胞的增殖活力。见图 4。

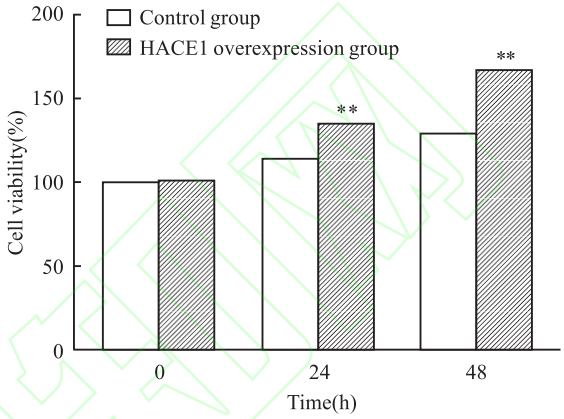

图 4 HACE1 对细胞增殖活性的影响

Fig. 4 The effects of HACE1 on cell proliferation activity

$P<0.01$, $^{**}P<0.01$ *vs* Control group at the same time point.

2.4 HACE1 对细胞迁移的影响 划痕实验结果显示，对照组 24 h 划痕面积缩小至原面积（80.40 ± 4.63）%，48 h 划痕面积缩小至原面积（64.18 ± 4.67）%，HACE1 过表达组 24 h 划痕面积缩小至原面积（67.49 ± 4.47）%，48 h 划痕面积缩小至原面积（44.99 ± 1.30）%。与对照组比较，培养 24、48 h 后 HACE1 过表达组划痕面积均明显缩小（$t=4.46$，$P<0.05$；$t=1.30$，$P<0.01$），提示 HACE1 过表达增强了 U251 细胞的迁移能力。见图 5。

3 讨论

HACE1 作为一种在生物体内具有重要功能的蛋白质，其相对分子量为 103 ku，由 909 个氨基酸组成，包含 1 个 C 端 HECT 泛素连接酶结构域、1 个链接序列和 1 个 N 端含 6 个锚蛋白的重复序列，N 端的锚蛋白序列可介导蛋白质相互作用，能与多种配体结合以实现复杂的生物学功能[8-10]。HACE1 通常被视为肿瘤抑制因子，这可能与其介导细胞自噬受体蛋白泛素化有关，该过程促进细胞自噬受体蛋白与 p62 相互作用并形成大的自噬受体蛋白复合物，进而“激活”细胞自噬并抑制肿瘤增殖[11-12]。然而，也有研究[6]表明其具有促进肿瘤细胞侵袭作用，近期研究[13-15]还发现其在脑缺血再灌注损伤、

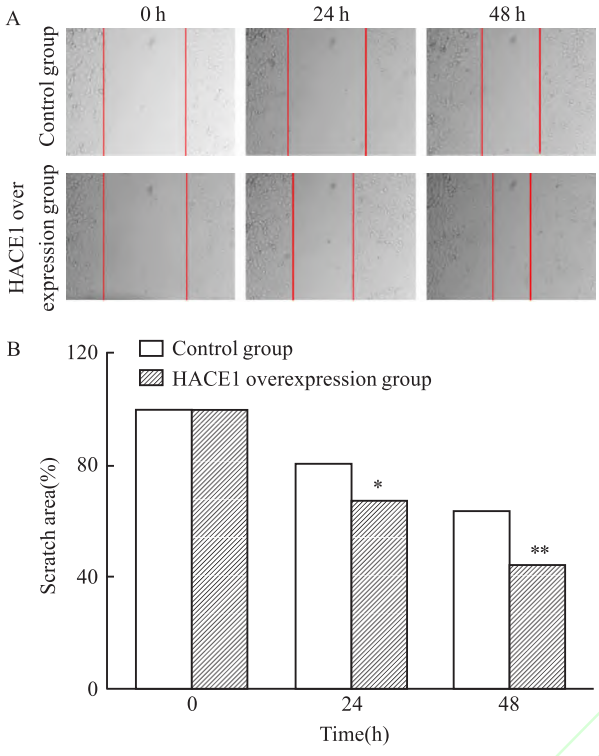

图 5 HACE1 对细胞迁移能力的影响

Fig. 5 The effects of HACE1 on cell migration ability

A: Time-course scratch closure graph × 40; B: Comparison of Scratch areas; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ *vs* Control group at the same time point.

心衰、痉挛性截瘫等疾病中亦发挥重要作用。

胶质瘤是常见的脑部恶性肿瘤,具有发病率高、临床治疗困难、预后不佳等特点,一直是临床研究的热点和难点。尽管 HACE1 在多种恶性肿瘤中被推定为抑制肿瘤因子,但其在胶质瘤中的作用仍未明确。相关研究[7]显示,通过瞬时转染针对 HACE1 的 siRNA,发现敲低 HACE1 后可显著抑制 U87 和 SF295 细胞的活力与增殖,而过表达 HACE1 则呈现出促进作用,其机制可能是 HACE1 通过与另一种 E3 连接酶 Kelch 样环氧氯化丙烷蛋白-1 竞争性地与 NRF2 结合,增强了 NRF2 的蛋白稳定性。这与 HACE1 在其他肿瘤中的表现大相径庭,其在胶质瘤发病中的分子机制仍有待深入探究。

相对于瞬时表达,慢病毒载体具有能将外源基因整合到宿主细胞基因组中,并随细胞分裂实现长期稳定基因表达的优势,且对细胞毒性较低,不显著影响细胞生存和增殖,广泛应用于基因编辑。基于此,本研究构建了 HACE1 过表达慢病毒载体,并在胶质瘤细胞系 U251 上成功构建了 HACE1 过表达稳转细胞系,采用 CCK-8 实验检测 HACE1 对肿瘤细胞增殖活性的影响,使用细胞划痕实验检测细胞迁移能力,旨在探究 HACE1 在 U251 人神经胶质瘤细胞增殖、迁移等关键生物学特性中的具体作用,这些特性与肿瘤的发生、发展进程紧密相关。

细胞增殖是肿瘤生长的基础,生理状态下,细胞的增殖受到严格的调控,然而,在胶质瘤细胞中,这种调控机制被破坏,导致细胞持续增殖,进而产生一系列临床症状。此外,快速增殖的肿瘤细胞会使肿瘤内部及周围组织处于缺氧和营养匮乏的微环境中,这种微环境会进一步促使肿瘤细胞发生适应性变化,如上调血管生成相关因子的表达,诱导肿瘤血管生成,虽为肿瘤细胞提供了更多的营养和氧气,但也为肿瘤细胞的进一步扩散提供了途径。细胞迁移则是肿瘤侵袭和转移的重要步骤,胶质瘤细胞具有较强的迁移能力,能够突破肿瘤组织的边界,向周围正常脑组织浸润,这种浸润性生长方式使得手术难以完全切除肿瘤,这些残留的肿瘤细胞容易导致肿瘤复发和远处转移。

本研究结果表明,HACE1 过表达可促进 U251 人神经胶质瘤细胞的增殖和迁移,这提示 HACE1 可能在胶质瘤的发生发展中起到促进作用。然而,本研究仅基于细胞实验,具体机制仍不明确,存在一定的局限性,后续需要开展更多的体内实验和临床研究。

参考文献

[1] Anglesio M S, Evdokimova V, Melnyk N, et al. Differential expression of a novel ankyrin containing E3 ubiquitin-protein ligase, Hace1, in sporadic Wilms' tumor versus normal kidney[J]. Hum Mol Genet, 2004, 13(18): 2061 – 74. doi: 10.1093/hmg/ddh215.

[2] Turgu B, El-Naggar A, Kogler M, et al. The HACE1 E3 ligase mediates RAC1-dependent control of mTOR signaling complexes [J]. EMBO Rep, 2023, 24(12): e56815. doi: 10.15252/embr.202356815.

[3] Kogler M, Tortola L, Negri G L, et al. HACE1 prevents lung carcinogenesis *via* inhibition of RAC-family GTPases[J]. Cancer Res, 2020, 80(14): 3009 – 22. doi: 10.1158/0008 – 5472.CAN – 19 – 2270.

[4] Zhang Z, Teng M, Xu Z, et al. Correlations of HACE1 expression with pathological stages, CT features and prognosis of hepatocellular carcinoma patients[J]. J BUON, 2020, 25(6): 2570 – 5.

[5] Hu Y, Zhu Z, Xu Y, et al. Inhibition of esophageal cancer progression through HACE1-TRIP12 interaction and associated RAC1 ubiquitination and degradation[J]. J Cancer, 2024, 15(10): 3114 – 27. doi: 10.7150/jca.93833.

[6] El-Hachem N, Habel N, Naiken T, et al. Uncovering and deci-

phering the pro-invasive role of HACE1 in melanoma cells[J]. Cell Death Differ, 2018, 25(11): 2010 – 22. doi: 10.1038/s41418 – 018 – 0090 – y.

[7] Da C, Pu J, Liu Z, et al. HACE1-mediated NRF2 activation causes enhanced malignant phenotypes and decreased radiosensitivity of glioma cells[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 399. doi: 10.1038/s41392 – 021 – 00793 – z.

[8] Düring J, Wolter M, Toplak J J, et al. Structural mechanisms of autoinhibition and substrate recognition by the ubiquitin ligase HACE1[J]. Nat Struct Mol Biol, 2024, 31(2): 364 – 77. doi: 10.1038/s41594 – 023 – 01203 – 4.

[9] Ugarteburu O, Sánchez-Vilés M, Ramos J, et al. Physiopathological bases of the disease caused by HACE1 mutations: alterations in autophagy, mitophagy and oxidative stress response[J]. J Clin Med, 2020, 9(4): 913. doi: 10.3390/jcm9040913.

[10] Palicharla V R, Gupta D, Bhattacharya D, et al. Ubiquitin-independent proteasomal degradation of Spindlin-1 by the E3 ligase HACE1 contributes to cell-cell adhesion[J]. FEBS Lett, 2021, 595(4): 491 – 506. doi: 10.1002/1873 – 3468.14031.

[11] Liu Z, Chen P, Gao H, et al. Ubiquitylation of autophagy receptor Optineurin by HACE1 activates selective autophagy for tumor suppression[J]. Cancer Cell, 2014, 26(1): 106 – 20. doi: 10.1016/j.ccr.2014.05.015.

[12] Petracchini S, Hamaoui D, Doye A, et al. Optineurin links Hace1-dependent Rac ubiquitylation to integrin-mediated mechanotransduction to control bacterial invasion and cell division[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 6059. doi: 10.1038/s41467 – 022 – 33803 – x.

[13] Zhang X, Wang X, Yin L, et al. HACE1 exerts a neuroprotective role against oxidative stress in cerebral ischemia-reperfusion injury by activating the PI3K/AKT/Nrf2 pathway[J]. Neuroscience, 2024, 559: 249 – 62. doi: 10.1016/j.neuroscience.2024.09.002.

[14] Yin P, Wu Y, Long X, et al. HACE1 expression in heart failure patients might promote mitochondrial oxidative stress and ferroptosis by targeting NRF2[J]. Aging, 2023, 15(23): 13888 – 900. doi: 10.18632/aging.205272.

[15] Kovalskaia V A, Zabnenkova V V, Petukhova M S, et al. Previously undescribed gross HACE1 deletions as a cause of autosomal recessive spastic paraplegia[J]. Genes, 2022, 13(12): 2186. doi: 10.3390/genes13122186.

Construction of a lentiviral cell line with overexpression of human HACE1 and its impact on the proliferation and migration of glioma cells

Huang Ran[1], Shan Ming[2], Li Weisong[1]

([1]*Dept of Pediatric Surgery*, [2]*Dept of Neurosurgery*, *The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University*, *Hefei* 230022)

Abstract ***Objective*** To construct a lentiviral overexpression cell line of HACE1 and to investigate its effects on the proliferation and migration of glioma cells. ***Methods*** Using the bacterial liquid containing the full-length cDNA sequence of human HACE1 as a template, the lentiviral expression plasmid pCDH-HACE1 was constructed, and the lentiviral cell line was screened. Western blot was employed to detect the expression of HACE1 in glioma cells. Meanwhile, the CCK-8 assay and the cell scratch assay were utilized to assess the impacts of HACE1 on the proliferation and migration of glioma cells. ***Results*** The lentiviral cell line with HACE1 overexpression was successfully established. Western blot analysis demonstrated that HACE1 could be effectively expressed in eukaryotic cells. The results of the CCK-8 assay showed that, compared with the control group, the cell proliferation in the HACE1 overexpression group was significantly enhanced at 24 hours and 48 hours after cultivation (t values: 2.42 and 1.85 respectively, both $P<0.01$). The cell scratch assay revealed that, at 24 hours and 48 hours after cultivation, the Scratch areas in the HACE1 overexpression group were higher than those in the control group (t values: 4.46, $P<0.05$; t value: 1.30, $P<0.01$). ***Conclusion*** The lentiviral cell line with HACE1 overexpression is successfully constructed. HACE1 can promote the proliferation and migration abilities of U251 glioma cells, providing a foundation for further research.

Key words HACE1; over-expression; lentiviral vector; glioma; proliferation; migration

Fund program Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2208085MH224)

Corresponding author Li Weisong, E-mail: 15955199807@126.com