

携带低氧诱导因子1 α^{mu} 和人源化海肾绿色荧光蛋白双基因真核表达载体构建及其在HEK293A细胞中的表达*[☆]

张 正, 李 谌, 胡 亮, 刘丹平

Construction of double gene eukaryotic expression vector carrying hypoxia inducible factor 1 α^{mu} and human renilla reniformis green fluorescent protein and its expression in HEK293A cells

Zhang Zheng, Li Chen, Hu Liang, Liu Dan-ping

Department of Bone and Joint Surgery, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Zhang Zheng[★], Master, Associate chief physician, Department of Bone and Joint Surgery, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
zhangzheng_85@yahoo.com.cn

Correspondence to: Liu Dan-ping, Doctor, Professor, Master's supervisor, Department of Bone and Joint Surgery, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
liudanping2009@sohu.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20062199*

Received: 2010-05-23
Accepted: 2010-06-21

Abstract

BACKGROUND: Hypoxia inducing factor 1 is able to regulate co-expression of various gene and induce new vascular generation in bone defects areas. It can supply nutritional support and metabolism promotion for osteogenesis differentiation and osteogenesis activity in cells and accelerate bone healing. However, studies regarding the construction and expression of hypoxia inducing factor 1 are few.

OBJECTIVE: To construct a new adenovirus eukaryotic expression vector which can express mutant hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) interest protein and reporter molecule of human renilla reniformis green fluorescent protein (hrGFP) and to transfect it into HEK293 cells to observe its expression.

METHODS: Three aminoacid including the 402 location, the 564 location and the 803 location in gene coding region in donor vector pCMV6-XL5-HIF1 α carrying HIF-1 α were selected to complete site-directed mutagenesis and add new enzyme sites including *Not* I and *Pvu* I after removing stop codon pre and post gene sequence by polymerase chain reaction. The mutation was monitored by restriction enzyme and sequencing. The correct HIF-1 α gene mutation HIF-1 α^{mu} was linked into adenovirus shuttle vector pShuttle-CMV-IRES-hrGFP-1 directionally. The recombinant adenovirus shuttle vector carrying HIF-1 α^{mu} gene was transferred to BJ5183-AD-1 electroporation competent cell after sequencing identification and *Pme* I restriction enzyme linearization. The transfection status was determined by hrGFP fluorescent expression.

RESULTS AND CONCLUSION: Aminoacid including the 402 location, the 564 location and the 803 location in gene coding region in HIF-1 α turned to alanine after site-directed mutagenesis and removing stop codon was successful. Enzyme restriction and sequencing confirmed that the recombinant adenovirus expressing vector was successful constructed. Results of fluorescence microscope showed there was a large number of green fluorescence expression in HEK293A cells, which confirmed that the recombinant adenovirus vector was successful transfected into HEK293A cells by Lipofectamine 2000.

Zhang Z, Li C, Hu L, Liu DP. Effects of brain microvascular endothelial cells and astrocytes following treatment with baicalin on neural stem cell differentiation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(46): 8594-8599. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 低氧诱导因子 1 能够调控多种基因共同表达, 在骨缺损部位可诱导成熟的血管生成, 为各种细胞的成骨分化和成骨活动提供营养支持和代谢保证, 促进骨愈合, 但其真核表达载体的构建及表达却少见报道。

目的: 实验拟构建携带低氧诱导因子 1 α^{mu} (hypoxia inducible factor 1 alpha, HIF-1 α)目的蛋白和人源化海肾绿色荧光蛋白(human renilla reniformis green fluorescent protein, hrGFP)的双基因真核表达载体, 并将其转染HEK293A细胞, 观测其在细胞中的表达。

方法: 利用PCR技术定点突变目的基因供体质粒pCMV6-XL5-HIF1 α 携带的人HIF1 α 基因编码区的第 402 位、564 位和 803 位氨基酸以及去掉其终止密码子, 之后在基因序列前后添加新的酶切位点*Not* I和*Pvu* I, 酶切、测序检测突变情况, 将正确突变的HIF1 α^{mu} 定向连入腺病毒穿梭载体pShuttle-CMV-IRES-hrGFP-1中。经测序鉴定、*Pme* I酶切线性化后转化BJ5183-AD-1电感受态细胞, 通过hrGFP基因荧光表达检测转染情况。

结果与结论: 经基因测序证实, HIF-1 α 基因编码区的第 402 位、564 位和 803 位氨基酸均定点突变成丙氨酸, 终止密码子成功去除。经酶切鉴定及测序证实, 重组腺病毒表达载体构建成功。荧光显微镜下观察表明, 感染重组腺病毒的 HEK293A 细胞内有大量绿色荧光表达证实通过 Lipofectamine 2000 途径可使得重组腺病毒载体成功转染 HEK293A 细胞。

关键词: 低氧诱导因子 1 α ; 基因突变; 腺病毒载体; 绿色荧光蛋白; HEK293A 细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.46.011

张正, 李谌, 胡亮, 刘丹平. 携带低氧诱导因子 1 α^{mu} 和人源化海肾绿色荧光蛋白双基因真核表达载体构建及其在HEK293A细胞中的表达[J].中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(46):8594-8599.

[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

骨缺损骨不连的修复是一个复杂的受多种细胞因子调控的结缔组织修复过程。骨缺损疾病的治疗中血管的形成和生长时骨组织再生过程中的重要环节,是维系骨折区局部再生的必要条件^[1]。血管新生过程本身受一系列生长因子的调节,如血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子、表皮生长因子和血管生成素等,且这些生长因子相互协调、相互补充,而单个生长因子并不足以诱导成熟的血管新生^[2-4]。

近几年才发现的转录激活因子——低氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor 1 alpha, HIF-1 α)已经被证实可以激活低氧代谢和调控促血管新生基因的转录;在转基因小鼠体内实验证实,重组的HIF-1 α 可以促进皮肤形态功能正常的血管新生^[5]。由于HIF-1 α 诱导的新生血管不渗漏、无组织水肿、炎症反应小,血管没有曲折和囊性血管形成,使得近年来在缺血性研究中,被认为是最具有临床应用前景的基因之一^[6-7],这也为该因子治疗骨不连骨缺损提供了坚实的理论依据。然而,在常氧条件下,HIF-1 α 蛋白极易被降解和失活^[8]。

实验利用人源化海肾绿色荧光蛋白(human renilla reniformis green fluorescent protein, hrGFP)为报告基因,拟构建能够在常氧条件下同时表达具有抗原表位FLAG标记的HIF-1 α^{mu} 基因和hrGFP基因的新型腺病毒双基因真核细胞表达系统pAd-HIF1 α^{mu} -IRES-hrGFP-1^[9-10],并通过脂质体Lipofectamine 2000将其转染体外培养的HEK293A细胞,通过荧光显微镜观察其表达情况。

1 材料和方法

设计: 载体构建,体外实验。

时间及地点: 于2008-11/2009-12在辽宁医学院附属第一医院中心实验室完成。

材料: 含人HIF1 α 目的基因的供体质粒pCMV6-XL5-HIF1 α 购自Clontech公司;腺病毒穿梭质粒pShuttle-CMV-IRES-hrGFP-1及腺病毒骨架载体pAdEasy-1购自Stratagene公司;BJ5183-AD-1电感受态细胞购自上海杰美基因医药科技有限公司;pMD19-T Simple载体由TaKaRa公司提供;大肠杆菌DH5 α 感受态细胞、HEK293A细胞由辽宁医学院附属第一医院中

心实验室提供并保存。

主要试剂和仪器见下表:

主要试剂及仪器	来源
各种限制性内切酶, DNA Ligation Kit Ver. 2.0, 高保真 DNA 聚合酶, Prime STAR™ HS DNA Polymerase、Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0, DNA A-Tailing 试剂盒, 质粒小量提取试剂盒, dNTP, DNA marker, 1 kb DNA ladder marker, DL15000, DL2000 等	TaKaRa 公司
<i>Pme</i> I、 <i>Pac</i> I	纽英伦生物技术(北京)公司
超纯质粒提取试剂盒	QIAGEN 公司
脂质体 Lipofectamine 2000、OPTI-MEM	Invitrogen 公司
DMEM 培养基、胰蛋白酶	苏州净化设备有限公司
SW-CJ-1C μ 型双人单面净化工作台	Gibco 公司
GSKP-01B II 型电热恒温隔水式培养箱	湖北省黄石市医疗器械厂
Celljct Pro 型电穿孔仪, PCR 仪, HERA cell 150 型细胞孵育箱	Thermo 公司
GL-16G 型冷冻台式离心机, TDL-5-A 型筒式离心机	上海安亭科学仪器厂

实验方法:

HIF1 α 基因的突变及携带突变后基因(记作HIF1 α^{mu})的亚克隆:

PCR引物由TaKaRa公司设计并合成,序列如下:

基因	序列(5'-3')	长度(mers)
B-F1	GTG AAC CCA TTC CTC ACC CAT C	22
B-F2	CTG GCC GCA GCC GCT GGA GAC AC	23
B-F3	GAT GTT AGC TGC CTA TAT CCC AAT G	25
B-R1	TCT CCA GCG GCT GCG GCC AGC AAA G	25
B-R2	GGA TAT AGG CAG CTA ACA TCT CC	23
B-R3	TTC ACC CTG CAG TAGG TTT CTG CTG CCT TGT ATA GGA GCA GCA ACT TCA CAA TC	54
C-F1	GCG GCC GCA TGG AGG GCG CCG GCG GCG CGA ACG	33
C-R1	CGA TCG GGT TAA CTT GAT CCA AAG CTC TGA GT	32
C-P1	TGG TTT TGT TAT GGT TCT CA	20
C-P2	TTT AGG CCG CTC AAT TTA TG	20
C-P3	GAT GTA ATG CTC CCC TCA CC	20
M13-47	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC	24
RV-M	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG	24

辽宁医学院附属第一医院骨关节外科,辽宁省锦州市 121001

张正★,男,1968年生,辽宁省锦州市人,汉族,2006年辽宁医学院毕业,硕士,副主任工程师、骨关节方面研究。zhangzheng_85@yahoo.com.cn

通讯作者:刘丹平,博士后,教授,硕士生导师,主任医师,辽宁医学院附属第一医院骨关节外科,辽宁省锦州市 121001 liudanping2009@sohu.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225 (2010)46-08594-06

收稿日期:2010-05-23
修回日期:2010-06-21
(20100209005/ZW Z)

以pCMV6-XL5-HIF1 α 质粒为模版, 以C-F1/C-R1为引物进行扩增, 回收约2.5 kb的PCR产物。使用TaKaRa DNA Ligation Kit中的Solution I, 将回收产物与pMD19-T Simple Vector连接后, 热转化至*E. coli* Competent Cell DH5 α 中, 涂布平板, 37 °C过夜培养。分别挑取单菌落使用载体两端的引物M13-47/RV-M进行PCR检测, 筛选阳性克隆, 琼脂糖凝胶电泳检测。将选定的含有阳性克隆的单菌落进行植菌, 提取质粒并使用引物M13-47、RV-M、C-P1、C-P2和C-P3对质粒进行测序验证, 结果正确, 在编码区起始密码子前添加Not I酶切位点, 终止密码子前添加Pvu I酶切位点及为了保证读码框正确而添加单个碱基G, 完成pMD19-T-HIF1 α 克隆(HIF1 α 基因CDS区去掉了终止密码子)。

以质粒pMD19-T-HIF-1 α 为模版, 利用PCR技术, 以B-F1、B-F2、B-F3、B-R1、B-R2、B-R3为引物, 使用Prime STAR™ HS DNA Polymerase对其进行PCR扩增, 将上述PCR产物分别进行切胶回收, 并将回收后的产物作为下次PCR扩增的模版。以B-F1/B-R3为引物, 再一次进行PCR扩增。将产物进行切胶回收约1 800 bp的片段后, 使用限制性内切酶Sal I和Pst I进行双酶切, 乙醇沉淀。使用TaKaRa DNA Ligation Kit中的Solution I, 将回收片段和pMD19-T Simple Vector连接后, 热转化至*E. coli* Competent Cell DH5 α 中, 涂布平板, 37 °C过夜培养。挑选阳性菌落植菌, 提取质粒, 使用引物M13-47、RV-M、C-P1、C-P2和C-P3对其测序验证, 结果正确, 完成pMD19-T-HIF-1 α^{mu} 克隆。

重组腺病毒表达载体pAd-HIF1 α^{mu} -IRES- hrGFP-1的构建: 分别以pMD19-T-HIF-1 α^{mu} 质粒和pShuttle-CMV-IRES-hrGFP-1穿梭载体为底物, 建立两个独立的Not I/Pvu I双酶切反应体系, 反应产物在1%琼脂糖凝胶上电泳, 切胶回收大小约2.5 kb的HIF-1 α^{mu} 基因片段和约8.9 kb的pShuttle-CMV-IRES-hrGFP-1载体大片段。建立标准的连接反应体系, 将突变后的HIF-1 α^{mu} 基因与pShuttle-CMV-IRES-hrGFP-1载体大片段连接。热转化至*E. coli* Competent Cell DH5 α 中, 接种于含卡那霉素抗性的LB平板, 37 °C过夜培养, 挑选阳性菌落植菌, 提取质粒, 用Not I/Pvu I进行双酶切鉴定, 筛选阳性克隆。重组质粒送TaKaRa公司测序鉴定。

用Pme I单酶切pShuttle-CMV-HIF1 α^{mu} -IRES-hrGFP-1腺病毒穿梭质粒, 使其线性化并提纯, 后建立去磷酸化(BAP)反应体系; 将电穿孔仪设置在200 Ω , 2 500 V, 25 μ F, 利用细菌内同源重组机制将Pme I酶切后且去磷酸化的穿梭载体与电感受态细胞BJ5183-AD-1按照一定比例放入预冷的电击杯中穿孔1次, 涂布卡那霉素抗性的平板, 37 °C过夜培养。挑选阳性菌落植菌, 提取质粒, 使用Pac I进行酶切鉴定。

重组腺病毒载体转染HEK293A: Pac I酶切

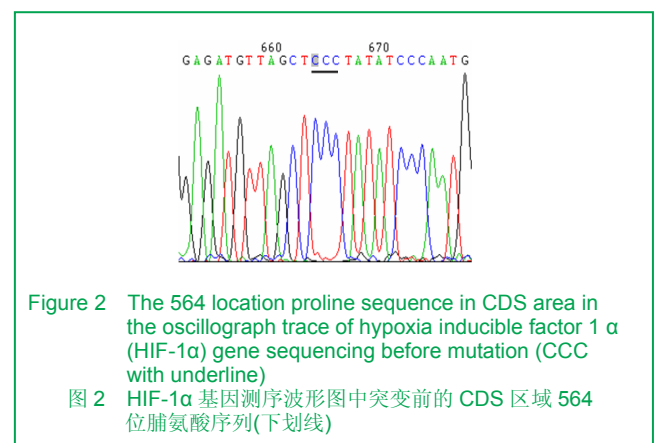
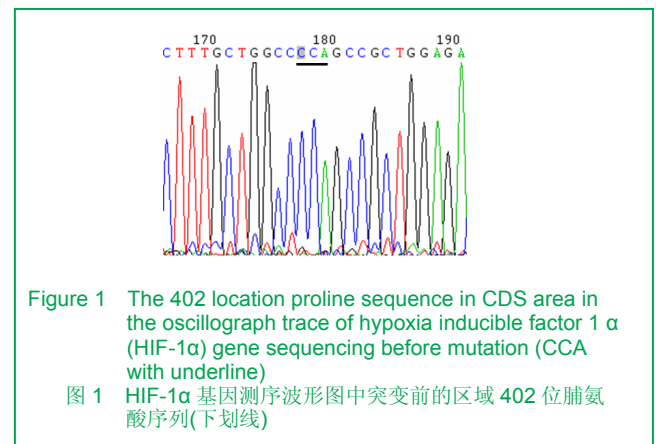
pAd-HIF1 α^{mu} -IRES -hrGFP-1重组腺病毒载体, 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收大片段, 纯化, 备用; 取实验室冻存HEK293A细胞1管, 常规复苏, 传代至第3代细胞, 待到细胞长到70%融合, 通过脂质体Lipofectamine 2000转染试剂按照一定比例与回收的大片段混合后, 转染细胞, 24~48 h荧光显微镜下观察荧光表达情况, 培养7~10 d待到细胞出现病变效应后反复冻融3次收集病毒; 重复上述操作3次, 病毒得以大量扩增, 得到重组腺病毒。

主要观察指标: 基因测序碱基排列顺序、酶切电泳以及荧光显微镜下观察感染重组腺病毒的HEK293A细胞情况。

设计、实施、评估者: 实验设计与实施为第一、二、三作者, 由第四作者评估。

2 结果

2.1 HIF-1 α 基因的定点突变成HIF1 α^{mu} 基因 测序结果显示HIF-1 α 基因测序波形图中突变前后的402、564、803位氨基酸序列分别见图1~6。结果显示, 第402位脯氨酸(CCA)定点突变为丙氨酸(GCA); 564位脯氨酸(CCC)定点突变为丙氨酸(GCC); 803位天冬酰胺(AAT)定点突变为丙氨酸(GCT)(由于803位氨基酸序列测序时是反义, 因此天冬酰胺与丙氨酸的正义链分别为AAT和GCT)。



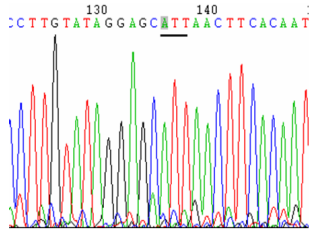


Figure 3 The 803 location asparagine sequence in CDS area in the oscillograph trace of hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) gene sequencing before mutation (ATT with underline)

图3 HIF-1 α 基因测序波形图中突变前的 CDS 区域 803 位天冬酰胺序列(下划线)

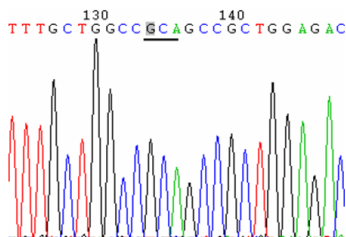


Figure 4 In the sequence the 402 location proline has been turn into alanine in CDS area of hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) gene after rite-directed mutagenesis (GCA with underline)

图4 HIF-1 α 基因行定点突变后 CDS 区域 402 位脯氨酸突变成丙氨酸后序列(下划线)

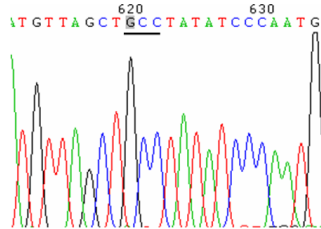


Figure 5 In the sequence the 564 location proline has been turn into alanine in CDS area of hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) gene after rite-directed mutagenesis (GCC with underline)

图5 为 HIF-1 α 基因行定点突变后 CDS 区域 564 位脯氨酸突变成丙氨酸后序列(下划线)

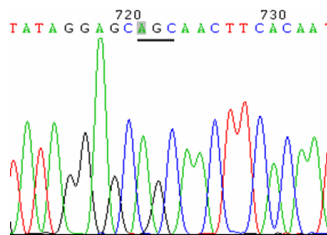
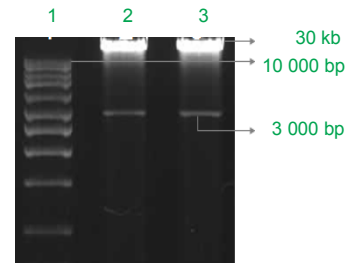


Figure 6 In the sequence the 803 location asparagine has been turn into alanine in CDS area of hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) gene after rite-directed mutagenesis (AGC with underline)

图6 为 HIF-1 α 基因行定点突变后 CDS 区域 803 位天冬酰胺突变成丙氨酸后序列(下划线)

2.2 pAd-HIF1 α^{mut} -IRES-hrGFP-1载体构建 图7为构建成功的pAd-HIF1 α^{mut} -IRES-hrGFP-1载体经Pac I酶切鉴定结果, 酶切结果显示, 2、3泳道跑出2个片段, 大片段在10 000 bp以上, 而小片段为3 000 bp, 符合Pac I酶切反应结果, 载体构建成功。



Lane 1: 1 kb DNA ladder marker; 2-3: identification result of pAd-HIF1 α^{mut} -IRES-hrGFP-1 adenovirus eukaryotic cells vector by restriction enzyme

Figure 7 Identification result of pAd-HIF1 α^{mut} -IRES-hrGFP-1 adenovirus eukaryotic cells vector which is constructed successfully by Pac I restriction enzyme.

图7 构建成功的pAd-HIF1 α^{mut} -IRES- hrGFP-1 腺病毒真核细胞载体经Pac I酶切鉴定结果

2.3 腺病毒载体转染HEK293A细胞情况 正常第3代HEK293A细胞见图8; 腺病毒转染HEK293A细胞后24 h 荧光显微镜下观察到有绿色荧光表达见图9; 转染9 d后 荧光显微镜下可见大量绿色荧光表达和明显的细胞病变效应, 见图10。

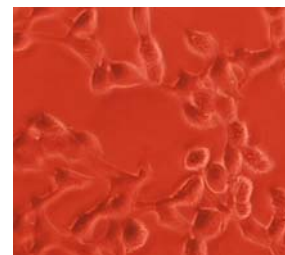


Figure 8 The third passage of normal HEK293A cells ($\times 100$)
图8 正常第3代 HEK293A 细胞($\times 100$)

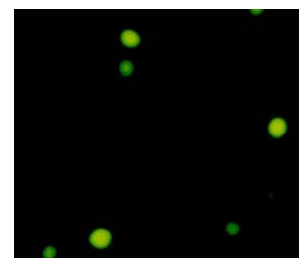


Figure 9 At 24 h after transfection into HEK293A cells ($\times 100$)
图9 为转染 HEK293A 细胞后 24 h($\times 100$)

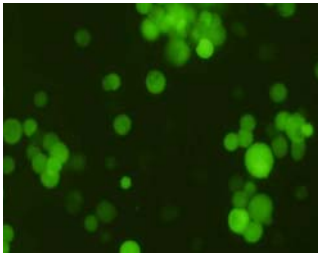


Figure 10 At 9 d after transfection into HEK293A cells ($\times 100$)
图 10 为转染 HEK293A 细胞后 9 d ($\times 100$)

3 讨论

HIF-1是缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内的一种转录因子,具有 α 和 β 两个亚基,它的生理作用主要通过 α 亚基调节的^[11-15]。局部组织缺氧即可诱导HIF-1表达,其表达量与缺氧呈时间依赖性^[16-18]。大量的研究表明,在常氧环境下表达外源性HIF-1 α 的质粒可以达到与低氧诱导相似的生理效果。但是在常氧状态下,细胞产生的HIF-1 α 将很快被机体降解(数分钟内),其机制是HIF-1 α CDS区编码的826个氨基酸,其中包含一个由200多个氨基酸组成的氧依赖性降解结构域,在脯氨酸羟化酶的催化下,使HIF-1 α 分子ODD区中的第402、564位脯氨酸残基羟化,羟化修饰后的HIF-1 α 迅速被泛素蛋白酶降解^[19-20],而在低氧条件下,由于脯氨酸402、564不能被羟化,这一过程被阻断,HIF-1 α 得以积累,并转移到细胞核内,在那里激活低氧反应基因群。不仅如此,决定HIF-1 α 的转录活性区位于其羧基端(COOH-terminal transactivation domain)的第803位天冬酰胺,用化学抑制剂或基因重组法阻止其羟化,可导致HIF-1 α 的强烈转录活性^[21]。从而,阐明了HIF-1 α 的重要结构区不仅包括ODD区的脯氨酸402和564,而且还包括了羧基端的天冬酰胺803。

细菌内同源重组法是一种高效构建腺病毒载体的方法,这种方法通过细菌内同源重组机制将目的基因及其在真核细胞中表达所必需的顺势表达元件插入腺病毒基因组^[22-25]。pShuttle-CMV-IRES-hrGFP-1是美国Stratagene公司开发的一种新型腺病毒穿梭质粒,具有CMV启动子、多克隆位点和PolyA信号区等真核基因表达所必需的顺势调控元件和同源重组序列。并且在多克隆位点后依次设计安排了FLAG抗原表位基因、内部核糖体进入位点和hrGFP基因。由于IRES的存在,使插入多克隆位点的目的基因能与GFP基因以双顺反子的形式同时表达。双基因表达载体是载体构建的新发展方向,以双顺反子形式表达hrGFP报告基因和HIF-1 α 目的基因,同时能够对HIF-1 α 进行抗原表位标记的腺病毒表达载体可极大的方便HIF-1 α 蛋白表达检测;而与增强型

绿色荧光蛋白相比,hrGFP的激发和发射光谱要窄的多,因此在各种细胞系中均比增强型绿色荧光蛋白要亮,也更容易被检测,其稳定性和毒性也较低,因此更适合在细胞系中作为报告基因^[26-28]。

实验结果显示,pCMV6-XL5-HIF1 α 所携带的HIF1 α 基因序列全长4 082 bp,与GenBank上登录的人类HIF1 α 基因mRNA序列(NM_001530)碱基完全一致,CDS区编码826个氨基酸,序列长度为2 481 bp (405~2 885 bp)。利用PCR技术对HIF1 α 基因的第402、564和803位氨基酸进行定点突变^[29-30],均突变成丙氨酸,使其能够在常氧条件下高效表达。实验成功完成pShuttle-CMV-HIF1 α^{mu} -IRES-hrGFP-1新型腺病毒穿梭载体,并利用BJ5183-AD-1通过细菌内同源重组机制构建了腺病毒质粒Ad-CMV-HIF1 α^{mu} -IRES-hrGFP-1。*Pac* I酶切图谱表明,由于穿梭质粒和腺病毒质粒均存在DNA原核复制起点Ori序列,重组成功的腺病毒质粒经*Pac* I酶切后应该产生一个大于23 kb的DNA片段和约3 kb或4.5 kb的小片段两种均可以接受的情况。在已鉴定的Ad-CMV-HIF1 α^{mu} -IRES-hrGFP-1阳性克隆中,*Pac* I酶切产生了大于10 kb和3 kb两种长度的DNA酶切片段的情况。

当重组腺病毒DNA经*Pac* I酶切暴露其反向末端重复序列后,转染入HEK293A细胞,以完成载体的包装和扩增。经10 d培养,光镜下观察约有80%细胞出现细胞脱壁、胞体肿胀变圆和细胞核明显变大等病毒复制和包装所导致的典型细胞病变表现。实验结果证明病毒包装成功,成功收集病毒液,为下一步体内实验打下了良好的基础。

综上所述,本次实验成功构建了新型重组腺病毒突变型真核细胞表达载体pAd-HIF1 α^{mu} -IRES-hrGFP-1,并通过Lipofectamine 2000途径使得重组腺病毒载体成功转染HEK293A细胞。为后期实验构建BMP2和HIF-1单载体双基因打下了坚实的基础,并且与单载体单基因相比减少了腺病毒的使用量,进一步减少了腺病毒的毒性,为以后用于临床实验打下了坚实的基础。

4 参考文献

- [1] Peng H, Wright V, Usas A, et al. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest.* 2002;110(6):751-759.
- [2] Bruick RK, McKnight SL. Building better vasculature. *Genes Dev.* 2001;15(19):2497-2502.
- [3] Chen Y, Liu D. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(21):4093-4096.
陈毅,刘丹平.三种细胞因子体外联合诱导兔骨髓间充质干细胞向血管内皮细胞的分化[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(21):4093-4096.
- [4] Habisch HJ, Fiedler J, Ludolph AC, et al. Altered migration and adhesion potential of proneurally converted human bone marrow stromal cells. *Cytotherapy.* 2008;10(8):824-833.
- [5] Elson DA, Thurston G, Huang LE, et al. Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Genes Dev.* 2001;15(19):2520-32.

- [6] Khan TA, Sellke FW, Laham RJ. Gene therapy progress and prospects: therapeutic angiogenesis for limb and myocardial ischemia. *Gene Ther.* 2003;10(4):285-291.
- [7] Giaccia A, Siim BG, Johnson RS. HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(10):803-811.
- [8] Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat med.* 2003;9(6):677-684.
- [9] Seregin SS, Amalfitano A. Overcoming pre-existing adenovirus immunity by genetic engineering of adenovirus-based vectors. *Expert Opin Biol Ther.* 2009;9(12):1521-1531.
- [10] Douglas JT. Adenoviral vectors for gene therapy. *Mol Biotechnol.* 2007;36(1):71-80.
- [11] Qutub AA, Popel AS. Reactive oxygen species regulate hypoxia-inducible factor 1 α differentially in cancer and ischemia. *Mol Cell Biol.* 2008;28(16):5106-5119.
- [12] Semenza GL. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov Today.* 2007;12(19-20):853-859.
- [13] Cheng LF, Yang XM. Shiyong Zhongliuxue Zazhi. 2007;21(4):370-373.
程林峰, 杨向民. 缺氧诱导因子-1与肿瘤的关系[J]. 实用肿瘤学杂志, 2007, 21(4):370-373.
- [14] Lim W, Cho J, Kwon HY, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α activates and is inhibited by unoccupied estrogen receptor beta. *FEBS Lett.* 2009;583(8):1314-1318.
- [15] Li C, Liu DP. Zhongguo Zuzhi Gongcheng yu Linchuang Kangfu. 2008;12(50):9946-9950.
李谏, 刘丹平. 低氧诱导因子1在骨缺损过程中的应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复. 2008, 12(50):9946-50.
- [16] Zhou J, Hara K, Inoue M, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by glucose availability under hypoxic conditions. *Kobe J Med Sci.* 2008;53(6):283-296.
- [17] Tai TC, Wong-Faull DC, Claycomb R, et al. Hypoxic stress-induced changes in adrenergic function: role of HIF1 α . *J Neurochem.* 2009;109(2):513-524.
- [18] Millonig G, Hegedüs S, Becker L, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α under rapid enzymatic hypoxia: cells sense decrements of oxygen but not hypoxia per se. *Free Radic Biol Med.* 2009;46(2):182-191.
- [19] Ceradini DJ, Yao D, Grogan RH, et al. Decreasing intracellular superoxide corrects defective ischemia-induced new vessel formation in diabetic mice. *J Biol Chem.* 2008;283(16):10930-10938.
- [20] Poellinger L, Johnson RS. HIF-1 and hypoxic response: the plot thickens. *Curr Opin Genet Dev.* 2004;14(1):81-85.
- [21] Lando D, Peet DJ, Whelan DA, et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science.* 2002;295(5556):858-861.
- [22] He TC, Zhou S, da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(5):2509-2514.
- [23] Hu HX, Liu DP, Zhang Z, et al. Zhonghua Shiyian Waikexue Zazhi. 2009;26(12):1690-1692.
胡汉祥, 刘丹平, 张正, 等. 腺病毒骨形成蛋白2绿色荧光蛋白基因转染兔骨髓基质干细胞成骨及示踪作用[J]. 中华实验外科杂志, 2009, 26(12):1690-1692.
- [24] Wei LC, Liu DP, Pu Q, et al. Zhongguo Gu yu Guanjie Sunshang Zazhi. 2009;24(1):52-54.
魏利成, 刘丹平, 蒲勤, 等. pcDNA3-hBMP2转染兔骨髓基质细胞前后生长特性的研究[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2009, 24(1):52-54.
- [25] Wei LC, Liu DP, Pu Q. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(38):7587-7590.
魏利成, 刘丹平, 蒲勤. pcDNA3-hBMP2转染兔骨髓基质细胞的体外表达及体内成骨能力. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(38):7587-7590.
- [26] Yang JR, Shiue YL, Liao CH, et al. Establishment and characterization of novel porcine embryonic stem cell lines expressing hrGFP. *Cloning Stem Cells.* 2009;11(2):235-244.
- [27] Chen C, Yu Z. siRNA targeting HIF-1 α induces apoptosis of pancreatic cancer cells through NF- κ B-independent and -dependent pathways under hypoxic conditions. *Anticancer Res.* 2009;29(4):1367-1372.
- [28] Minematsu T, Harumi T, Naito M. Germ cell-specific expression of GFP gene induced by chicken vasa homologue (Cvh) promoter in early chicken embryos. *Mol Reprod Dev.* 2008;75(10):1515-1522.
- [29] Tong K, Xie YJ, Wang YG, et al. Nanfang Yike Daxue Xuebao. 2007;27(4):445-453.
董锴, 谢宜军, 王月刚, 等. 人双突变型低氧诱导因子1 α 腺病毒载体的构建及鉴定[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(4):445-453.
- [30] Lai YX, Liu C, Wang YG, et al. Zhongguo Yike Daxue Xuebao. 2008;37(1):86-89.
赖艳娟, 刘城, 王月刚, 等. 人3突变型低氧诱导因子1 α 真核表达载体和腺病毒表达载体的构建及鉴定[J]. 中国医科大学学报, 2008, 37(1):86-89.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 辽宁省自然科学基金资助项目(项目编号: 20062199), 课题名称: 促进转染 BMP2 基因后的兔骨髓基质细胞在骨组织工程。

致谢: 感谢辽宁医学院附属第一医院中心实验室郭涛、张男两位同事及师兄弟们在实验过程中的大力支持。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 虽然人们对改善骨缺损区血运进行了多年的探索, 曾用携带血管内皮生长因子等真核表达载体做过努力, 但改善血运的效果并不明显。本研究应用生理作用更为广泛的血管内皮生长因子上游基因-低氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α) 基因构建重组腺病毒真核表达载体, 同时应用入源化海肾绿色荧光蛋白 (human renilla reniformis green fluorescent protein, hrGFP) 为示踪基因追踪目的片段在细胞内的表达情况; 并且为了避免常氧条件下 HIF1 α 基因迅速降解以及表达量低的情况发生, 通过 PCR 技术突变了 HIF1 α 基因 CDS 区三个羟甲基化修饰位点, 使得 HIF1 α 基因在正常氧条件下能够在 HEK293A 细胞内高效且大量表达, 为组织水平和动物水平评价 HIF1 α 的生物学功能、尤其是它的促血管新生功能打下基础。

课题评估的“金标准”: 实验为体外腺病毒基因载体构建实验, 实验结果的判定一是测序观察基因序列的正确性 (与 GenBank 相比), 二是要经过平端酶切鉴定, 能够酶切出 30 kb 和 3 kb (或 4.5 kb) 大小, 基本可以断定腺病毒载体构建成功, 由于有 hrGFP 示踪因子, 可在荧光显微镜下观察绿色荧光表达, 可以继续对骨髓间充质干细胞内转染及动物模型等实验研究。

设计或课题的偏倚与不足: 本实验在体外构建了三点突变后的 HIF1 α 腺病毒载体, 但并没有继续进行动物体内实验研究, 因而对体内血管新生情况的掌握并不准确。其次, 腺病毒载体作为转染率较高的载体, 已大量用于实验研究, 但是病毒载体的不良反应还是存在的, 希望在今后的研究中能够找到副作用更小, 转染率更高的其他载体。

提供临床借鉴的价值: 本研究将 HIF1 α 三点突变的基因作为成骨成血管辅助因子应用于骨组织工程领域, 发挥其综合成血管作用, 创造生理功能成熟的、更接近自然规律的血管化环境, 为骨组织工程技术的改进和进步提供了一定的帮助, 在分子水平为骨缺损疾病促血管新生治疗开辟新途径。