

骨髓间充质干细胞中突变型人低氧诱导因子1 α 真核表达载体的表达* \diamond

张男¹, 李 谏¹, 郭 韬¹, 刘丹平²

Expression of mutant human hypoxia-inducible factor 1 alpha eukaryotic expression vector in bone marrow mesenchymal stem cells

Zhang Nan¹, Li Chen¹, Guo Tao¹, Liu Dan-ping²

Abstract

BACKGROUND: *In vivo* experiments of transgenic mice have shown that recombinant hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) can promote angiogenesis under the conditions of normal skin morphology and function.

OBJECTIVE: To construct a new adenovirus eukaryotic expression vector that can co-express HIF-1 α mutant protein and human renilla reniformis green fluorescent protein (hrGFP) reporter molecule under normoxia conditions to transfect bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) of the Sprague-Dawley rats.

METHODS: A successful recombinant adenovirus eukaryotic expression vector pAd-HIF1 α ^{mut}-IRES-hrGFP-1 was constructed and transfected into human embryonic kidney 293A cells (HEK293A) using Lipofectamine 2000 for packaging the virus. The recombinant adenovirus eukaryotic expression vector was transfected into BMSCs of the rats at the best value multiplicity of infection 50. Three control groups were established: positive control group transfected with Ad-CMV-HIF1 α -IRES-hrGFP-1, negative control group transfected with Ad-CMV-IRES-hrGFP-1 and blank control group without transfection.

RESULTS AND CONCLUSION: ①The adenovirus vectors were transfected into the HEK293A cells with packaging successfully and a large amount of green fluorescence expression was found in the cells. ②The protein expression in the cells transfected with mutant adenovirus HIF-1 α expression vector under normoxia conditions was higher than that of the three control groups. The difference among the three control groups had no significance ($P > 0.05$). To transfect mutant adenovirus eukaryotic expression vector pAd-HIF1 α ^{mut}-IRES-hrGFP-1 into the HEK293A cells with packaging successfully can induce the great and efficient expression of HIF-1 α gene under normoxia conditions.

Zhang N, Li C, Guo T, Liu DP. Expression of mutant human hypoxia-inducible factor 1 alpha eukaryotic expression vector in bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2011;15(45): 8495-8498. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 转基因小鼠体内实验证实, 重组的低氧诱导因子1 α 可以促进皮肤形态功能正常的血管新生。

目的: 构建能够在常氧条件下同时表达突变型低氧诱导因子1 α 目的蛋白和绿色荧光蛋白报告分子的新型腺病毒真核表达载体, 并转染SD大鼠骨髓间充质干细胞, 检测该基因在细胞中的表达情况。

方法: 利用Lipofectamine 2000介导将构建成功的重组腺病毒真核表达载体pAd-HIF1 α ^{mut}-IRES-hrGFP-1转染HEK293A细胞, 包装病毒, 以最佳感染指数=50将重组腺病毒转染大鼠骨髓间充质干细胞, 并设3个对照组, 即阳性对照组: 转染Ad-CMV-HIF1 α -IRES-hrGFP-1; 阴性对照组: 转染Ad-CMV-IRES-hrGFP-1组; 空白组: 未转染病毒。

结果与结论: ①腺病毒载体成功转染HEK293A细胞, 包装成功, 细胞内有大量绿色荧光表达。②转染突变型低氧诱导因子1 α 腺病毒表达载体的细胞在常氧条件下蛋白表达量明显高于转其他3组, 3个对照组间差异无显著性意义($P > 0.05$)。提示突变型腺病毒真核表达载体Ad-HIF1 α -IRES-hrGFP-1在HEK293A内成功包装; 突变后低氧诱导因子1 α 基因能够在常氧条件下大量且高效表达。

关键词: 低氧诱导因子1 α ; 基因突变; 重组腺病毒载体; 骨髓间充质干细胞; 转染

doi: 10.3969/j.issn.1673-8225.2011.45.030

张男, 李谏, 郭韬, 刘丹平. 骨髓间充质干细胞中突变型人低氧诱导因子1 α 真核表达载体的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(45):8495-8498. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

血管的形成和生长是骨组织再生过程中的重要环节及必要条件^[1-3]。只有尽早地在骨折区内构建有效的血管网络, 才能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, 促进骨缺损骨折愈合。血管新生过程受一系列生长因子的调节, 如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、成纤维细胞生长因子、表皮生长因子和血管生

成素等, 这些生长因子相互协调、相互补充, 单个生长因子并不足以诱导成熟的血管新生。

近几年才发现的上游基因——低氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor -1 alpha, HIF1 α) 已经被证实可以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HIF1 α 可以促进皮肤形态功能正常的血管新生^[4-8]。由于HIF1 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^[9-11], 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, 这也为该因子治疗

¹Department of Central Laboratory, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China; ²Department of Bone and Joint Surgery, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Zhang Nan, Technician, Department of Central Laboratory, Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China youna1024@sina.com

Correspondence to: Liu Dan-ping, Doctor, Professor, Chief Physician, Master's supervisor, Department of Bone and Joint Surgery, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China liudanping2009@sohu.com

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

Received: 2011-04-13 Accepted: 2011-05-13

辽宁医学院附属第一医院, 1 中心医学组织工程重点实验室, 辽宁省外科学重点实验室, 辽宁省骨科学重点实验室, 2 骨关节外科, 辽宁省锦州市 121000

张男, 男, 1972 年生, 辽宁省锦州市人, 汉族, 1999 年锦州医学院毕业, 技师, 主要从事骨组织工程实验技术研究。
youna1024@sina.com

通讯作者: 刘丹平, 博士, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 辽宁医学院附属第一医院骨关节外科, 辽宁省锦州市 121000
liudanping2009@sohu.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)45-08495-04

收稿日期: 2011-04-13
修回日期: 2011-05-13
(20101101005/W -W)

骨不连骨缺损提供了坚实的理论依据。但是, 在常氧条件下, HIF1 α 蛋白极易被降解和失活。为此, 作者利用hrGFP为报告基因^[12-14], 构建了能够在常氧条件下同时表达HIF1 α 基因和hrGFP基因的新型腺病毒双基因真核表达系统, 并检测HIF1 α 基因在SD大鼠骨髓间充质干细胞中的蛋白表达情况, 为下一步研究HIF1 α 基因及其突变体对骨缺损部位的血管新生作用及以后的临床应用奠定基础。

1 材料和方法

设计: 对比观察。

时间及地点: 实验于2010-03/09在辽宁医学院附属第一医院中心实验室完成, 实验室生物安全防护水平: BSL-3, 本实验室为辽宁省科技厅医学组织工程重点实验室及辽宁省教育厅外科学重点实验室。

材料: SD大鼠用于骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSC)提取, 由辽宁医学院动物饲养中心提供。

质粒、菌株及主要试剂:

质粒、菌株及主要试剂	来源
含人 HIF1 α 目的基因的供体质粒 pCMV6-XL5-HIF1 α	Clontech 公司, 美国
腺病毒穿梭质粒 pShuttle-CMV-IRES-hrGFP-1、腺病毒骨架载体 pAdEasy-1	Stratagene 公司, 美国
大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、由本实验室保存 HEK293A 细胞	
各种限制性内切酶、DNA Ligation Kit Ver. 2.0、Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0、质粒小量提取试剂盒、DNA marker: λ -Hind III DNA digest、1 kb DNA ladder marker、DL15000、DL2000 等	TaKaRa 公司, 日本
Pme I、Pac I	NEB 公司, 美国
超纯质粒提取试剂盒	QIAGEN 公司, 德国
脂质体 Lipofectamine 2000、OPTI-MEM、TRIzol 等	Invitrogen 公司, 美国
一抗: 鼠抗人 HIF1 α 单克隆抗体	Santa Cruz 公司
二抗: 内参 β -actin、抗体稀释液	北京中杉金桥生物技术有限公司
Western-blot 等其他试剂	碧云天生物公司

实验方法:

重组腺病毒表达载体 pAd-HIF1 α ^{mutu}-IRES-hrGFP-1 的构建: 分别以突变后 pMD19-T-HIF1 α ^{mutu} 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, 回收大小约2.5 kb的HIF1 α ^{mutu}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。重组质粒送TaKaRa公司测序鉴定。用Pme I单酶切腺病毒穿梭质粒后提纯, 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穿梭载体与电感受态细胞BJ5183-AD-1进行重组。

重组腺病毒的包装: 通过脂质体Lipofectamine 2000转染试剂按照一定比例与重组腺病毒载体混合后转染HEK293细胞, 培养7~10 d待到细胞出现病变效应(Cytopathic effect, CPE)后反复冻融3次收集病毒, 滴度测定后为1.6 \times 10⁸ pfu/mL。同理构建阳性对照(突变前)及阴性对照(空病毒载体)。

BMSCs的原代分离培养: 参考文献[15]进行。

实验分组: 取第3代生长状态良好的大鼠BMSCs 12瓶, 随机分为4组: 实验组转染Ad-CMV-HIF1 α ^{mutu}-IRES-hrGFP-1; 阳性对照组转染Ad-CMV-HIF1 α -IRES-hrGFP-1; 阴性对照组转染Ad-CMV-IRES-hrGFP-1组; 空白组未转染病毒。

重组腺病毒转染SD大鼠BMSCs: 取第3代SD大鼠BMSCs以5 \times 10⁵/孔的密度接种于6孔细胞培养板, 常规培养24 h, 待细胞贴壁后吸去上清。以感染复数(MOI)=50转染, 37 $^{\circ}$ C、体积分数5%CO₂恒温细胞培养箱中孵育3 h, 之后每瓶补充培养基2 mL继续培养, 24~72 h在荧光倒置显微镜下观察转染效果。

Western blot蛋白免疫印迹检测HIF1 α 蛋白表达: 提取4组细胞蛋白, 分别做Western blot蛋白免疫印迹检测HIF1 α 蛋白在SD大鼠BMSCs中的表达情况。

主要观察指标: ①琼脂糖凝胶电泳观察重组腺病毒载体构建效果及限制性核酸内切酶反应体系。②通过基因测序手段检测目的基因与GenBank上基因序列的一致性。③通过在荧光显微镜下观察病毒转染细胞后的CPE及GFP表达检测病毒包装效率。④通过SDS-PAGE电泳半定量检测HIF1 α 目的蛋白在各组中的表达量。

统计学分析: 所有数据均用SPSS17.0软件包进行统计学分析, Western blot计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 重组腺病毒载体转染HEK293A细胞进行腺病毒包装结果 重组腺病毒转染HEK293A细胞后24 h荧光显微镜下观察见图1, 倒置显微镜下观察到的细胞病变效应见图2。可见细胞聚集, 肿胀, 触角回收, 部分细胞悬浮, 间隙加宽。

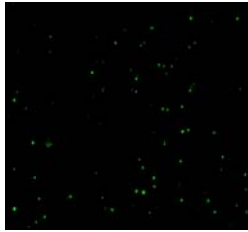


Figure 1 At 24 h after adenovirus recombinant transfected into HEK293 cells under fluorescence microscope ($\times 40$)

图1 重组腺病毒转染HEK293A细胞后24 h荧光显微镜下观察($\times 40$)

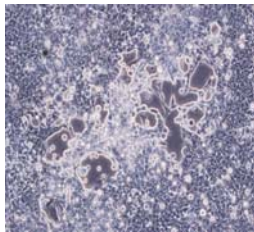


Figure 2 Cytopathic effect under inverted microscope ($\times 100$)

图2 倒置显微镜下观察到的细胞病变效应($\times 100$)

2.2 重组腺病毒转染SD大鼠BMSCs后的绿色荧光表达结果 BMSCs转染腺病毒48 h后荧光表达情况见图3, 可见细胞内有大量荧光表达。

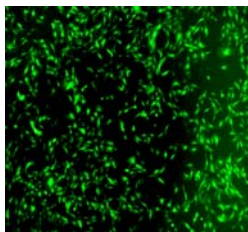
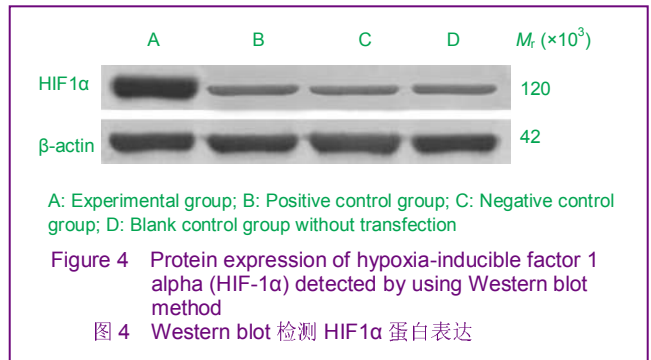


Figure 3 Green fluorescence expression at 48 h after recombinant adenovirus was transfected into bone marrow mesenchymal stem cells of the Sprague-Dawley rats ($\times 100$)

图3 SD大鼠骨髓间充质干细胞转染腺病毒后48 h绿色荧光表达情况($\times 100$)

2.3 转染腺病毒的SD大鼠BMSCs Western blot蛋白免疫印迹检测结果 见图4。可见实验组细胞的HIF1 α 蛋白表达量明显高于其他3组, 其相对 β -actin的吸光度

值(即净吸光度值)为1.023, 而阳性对照组、阴性对照组、空白组分别为0.325, 0.269, 0.307, 差异有显著性意义($P < 0.01$); 阳性对照组、阴性对照组、空白组之间HIF1 α 蛋白表达量净吸光度值差异无显著性意义($P > 0.1$)。



3 讨论

骨折发生的同时也破坏了骨折区的血运, 营养物质供应严重不足, 致使此部位成骨活动缓慢以至停滞, 甚至连种子细胞生长的基本营养需求都不能满足^[16-21]。充足的血液供应是维系骨折区, 特别是骨缺损、骨不连局部再生的必要条件。以往的研究多用VEGF等因子促进血管生成, 但单独应用均有不足之处。目前研究发现HIF1是一个较为合适的候选基因^[22]。

大量的研究表明, 在常氧环境下表达外源性HIF1 α 的质粒可以达到与低氧诱导相似的生理效果^[23-27]。但是在常氧状态下, HIF1 α 将很快被机体降解(数分钟内); 而在低氧条件下, 由于编码区脯氨酸402, 564不能被羟化, HIF1 α 得以积累。除此之外, Lando等^[28]报道: 决定HIF1 α 的转录活性区位于其羧基端(COOH-terminal transactivation domain, CAD)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HIF1 α 的强烈转录活性。从此, 阐明了HIF1 α 的重要结构区不仅包括氧依赖降解区(ODDD)的脯氨酸402和564, 而且还包括了CAD的天冬酰胺803。

有研究表明, 不含ODDD的HIF1 α 基因转染细胞, 在任何氧浓度下均可表达HIF1 α 活性蛋白^[4]; 而体内实验表明与单独VEGF过度表达诱导的血管不同, 该重组HIF1 α 诱导的新生血管床稳定, 转基因鼠的皮肤不出现水肿、炎症和血管渗漏; 血管没有曲折和囊性血管形成。Ivan等^[29]将HIF1 α 的脯氨酸564定点突变为丙氨酸, 发现突变型的HIF1 α 较之野生型更稳定而不容易被降解。Wan等^[30]报道在小鼠骨修复模型成骨阶段HIF1 α 是成熟血管生成必不可少的调控因子, 且可以加速骨组织再生。Wang等^[31]实验显示在HIF1 α 高表达的小鼠成骨过程中VEGF浓度升高, 血管化明显, 且无不良反应, 认

为骨发育过程中HIF1 α 途径与完整血管化密切相关。

Western blot蛋白免疫印迹检测结果说明,无突变的重组腺病毒真核表达载体 Ad-CMV-HIF1 α -IRES-hrGFP-1转染入BMSCs后HIF1 α 蛋白的水平并无明显提高,这提示了Ad-CMV-HIF1 α -IRES-hrGFP-1转染尽管可能引起HIF1 α 蛋白表达的增加,但是增加的HIF1 α 蛋白由于正常ODDD结果的存在,仍然容易被降解而不能在细胞内发生蓄积,因而不能发挥它的功能。

与转染了 Ad-CMV-HIF1 α -IRES-hrGFP-1 的BMSCs不同的是,转染了突变型重组腺病毒真核表达载体Ad-CMV-HIF1 α mu-IRES-hrGFP-1的BMSCs在用Western blot方法检测时能检测到细胞内高水平的HIF1 α 蛋白,提示这种突变的表达载体在常氧条件下能在BMSCs内表达蛋白并且蛋白能在细胞内蓄积。

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] Li C,Liu DP.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2008;12(50):9946-9950.
李谏,刘丹平.低氧诱导因子1在骨缺损修复过程中的应用[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(50):9946-9950.

[3] Liu DP, Wang GX, Hu L, et al. Construction of adenovirus-mediated eukaryotic expression vector co-expressing mutant hypoxia-inducible factor-1 alpha target protein and humanized Renilla reniformis green fluorescent protein reporter molecule under normoxic conditions.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.2010;14(20):3787-3792.

[4] 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): 2520-2532.

[5] Evans CE,Humphries J,Mattock K,et al.Hypoxia and upregulation of hypoxia-inducible factor 1{alpha} stimulate venous thrombus recanalization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12): 2443-2451.

[6] Bahadori B, Uitz E, Mayer A, et al. Polymorphisms of the hypoxia-inducible factor 1 gene and peripheral artery disease. *Vasc Med.* 2010;15(5):371-374.

[7] Monsef N, Soller M, Panagopoulos I, et al. HIF1alpha isoforms in benign and malignant prostate tissue and their correlation to neuroendocrine differentiation. *BMC Cancer.* 2010;21(10):385.

[8] Jiang M,Wang CL,Wang BR,et al.Zhongguo Dongmai Yinghua Zazhi.2006;14(5):382-386.
姜萌,王长谦,王彬尧,等.低氧诱导因子在低氧中对人外周血内皮祖细胞分化的影响[J].中国动脉硬化杂志,2006,14(5):382-386.

[9] Bruick RK,McKnight SL.Building better vasculature. *Genes Dev.*2001; 15(19):2497-2502.

[10] 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.

[11] Giaccia A, Siim BG, Johnson RS. HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discov.*2003;2(10): 803-811.

[12] Hu HX,Liu DP,Zhang Z,et al.Zhonghua Shiyian Waike Zazhi. 2009;26(12):1690-1692.
胡汉祥,刘丹平,张正,等.腺病毒骨形成发生蛋白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.

[13] Morrow JM, Chang BS. The p1D4-hrGFP II expression vector: a tool for expressing and purifying visual pigments and other G protein-coupled receptors. *Plasmid.* 2010;64(3): 162-169.

[14] Hu HW,Li XK,Zheng RY, et al.bFGF expression mediated by a hypoxia-regulated adenoviral vector protects PC12 cell death induced by serum deprivation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(1):115-120.

[15] Li XF,Zhao JM,Su W, et al.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.2011;15(10):1721-1725.
李晓峰,赵劲民,苏伟,等.大鼠骨髓间充质干细胞的培养与鉴定[J].中国组织工程研究与临床康复,2011;15(10):1721-1725.

[16] Kneser U,Polykandriotis E,Ohnoiz J,et al.Engineering of vascularized transplantable bone tissues: induction of axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop.*Tissue Eng.* 2006;12(7):1721-1731.

[17] Nakasa T, Ishida O, Sunagawa T, et al. Prefabrication of vascularized bone graft using a combination of fibroblast growth factor-2 and vascular bundle implantation into a novel interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramic. *J Biomed Mater Res A.*2005;75(2):350-355.

[18] Gao Y,Yang SH,Yang C,et al.Zhonghua Shiyian Waike Zazhi. 2006; 23(2):138-140.
郭勇,杨述华,杨操,等.人血管内皮细胞生长因子重组腺病毒载体的构建、鉴定及在骨髓间充质干细胞的表达[J].中华实验外科杂志,2006,23(2):138-140.

[19] Chen Y,Liu DP.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.

[20] Wei LC,Liu DP,Pu Q,et al.Zhongguo Guyuguanjie 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.

[21] 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[J].中国组织工程研究与临床康复,2008, 12(38): 7587-7590.

[22] 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.

[23] Hu Y,Duan XJ,Yang L.Zhonghua Shiyian Waike Zazhi. 2006;23(8): 993-996.
胡鸾,段小军,杨柳.缺氧诱导因子-1 α 基因转染人间充质干细胞的体内促血管生成作用[J].中华实验外科杂志,2006,23(8):993-996.

[24] Liu DP, Li C, Hu L. et al Construction of Adenovirus Vector Carrying VEGF121- FLAG and hrGFP-1 and Their Expressions in Mesenchymal Stem Cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.*2010;14(45):8539-8543.

[25] Zhang Z,Li C,Hu L,et al.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(46): 8594-8599.
张正,李谏,胡亮,等.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.

[26] 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.

[27] He MC, Li J, Zhao CH. Effect of hypoxia on mesenchymal stem cells-review. *Zhong guo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2007;15(2): 433-436.

[28] Lando D, Peet DJ, Whelan DA, et al.Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science.*2002; 295 (5556):858-861.

[29] Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation:implications for O2 sensing. *Science.* 2001;292(5516):464-468.

[30] Wan C, Gilbert SR, Wang Y, et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-1-alpha pathway accelerates. *Proc Nat Acad Sci.*2008;105(2):686-691.

[31] Wang Y, Wan C, Deng L, et al. The hypoxia-inducible factor 1 alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest.* 2007;117(6): 1616-1626.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 辽宁省自然科学基金资助项目(20062199)。

作者贡献: 设计与实施为第一作者, 评估为通讯作者, 盲法评估。

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。

伦理批准: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

创新性说明: 在技术层面上应用重组腺病毒载体承载目的基因片段, 构建重组无致病性的真核表达载体, 并且通过基因突变手段将导致低氧诱导因子1 α 常氧条件下降解的3个关键基因突变后转染入SD大鼠骨髓间充质干细胞中, 国内外研究目前仅限于两个氨基酸位点突变或ODD区整段去除, 而以前研究表明兔骨髓间充质干细胞转染效率较低。结果中显示SD大鼠骨髓间充质干细胞转染效率较高, 常氧条件下蛋白表达非常高, 为后期将其应用于骨缺损动物实验促新血管生成打下了坚实的基础。