

低氧诱导因子1 α 基因三点突变体体外转染骨髓间充质干细胞

惠春影¹, 肖洪艳², 何欣玲¹, 王维³ (辽宁医学院附属第一医院, ¹心脑血管外科, ²介入科, ³康复医学科, 辽宁省锦州市 121001)

文章亮点:

1 文章创新性地将低氧诱导因子1 α 基因的3个相关降解位点均进行了突变, 这样不仅使得低氧诱导因子1 α 在常氧条件下可以表达, 表达效率也相应增加。同时将突变后的低氧诱导因子1 α 基因应用于脊髓损伤治疗目前国内尚未见报道。

2 不足之处在于仅观察了低氧诱导因子1 α 基因在体外对骨髓间充质干细胞的作用, 并没有进行动物实验, 后期将进行后续实验完善该课题。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 骨髓间充质干细胞; 脊髓损伤; 低氧诱导因子1 α ; 基因突变; 血管内皮细胞生长因子

主题词:

干细胞; 间质干细胞; 脊髓损伤; 基因; 血管内皮生长因子类

基金资助:

辽宁省科学技术厅社会发展处资助项目(2012408002)

摘要

背景: 脊髓损伤后只有尽早地在损伤局部构建有效的血管网络, 才能为各种细胞的分化提供营养支持和代谢保证, 加速损伤局部的愈合。

目的: 构建三点突变的低氧诱导因子1 α 重组腺病毒表达载体, 将其转染大鼠骨髓间充质干细胞后检测常氧条件下对脊髓损伤促血管新生的作用。

方法: 利用PCR方法定点突变低氧诱导因子1 α 编码区的第402, 564和803位氨基酸, 将突变后低氧诱导因子1 α 基因重组入腺病毒pAdEasy-1系统, 包装病毒并测定滴度, 同理包装未突变组和空病毒组; 以3种病毒液连同空白组共分4组进行后续实验。将病毒液转染入大鼠骨髓间充质干细胞内, 通过示踪因子增强型绿色荧光蛋白观察病毒转染效率, 通过RT-PCR方法检测4组细胞中低氧诱导因子1 α 基因mRNA表达情况; 进一步通过Western blot方法检测4组细胞中低氧诱导因子1 α 基因及其下游成血管基因血管内皮细胞生长因子的蛋白表达情况。

结果与结论: 编码区第402, 564和803位氨基酸均定点突变为丙氨酸; 3种腺病毒重组体构建成功并包装鉴定完毕。含突变基因病毒液组、含未突变基因病毒液组低氧诱导因子1 α mRNA表达量明显高于空病毒液组、空白组($P < 0.05$)。含突变基因病毒液组细胞低氧诱导因子1 α 蛋白及血管内皮细胞生长因子蛋白表达量显著高于其他3组($P < 0.05$)。提示三点突变后低氧诱导因子1 α 基因不仅能够在常氧条件下大量且高效表达, 还同时能够促进其下游血管内皮细胞生长因子基因的高效表达, 为脊髓损伤疾病的血管新生治疗提供了一种新的治疗方向。

惠春影, 肖洪艳, 何欣玲, 王维. 低氧诱导因子1 α 基因三点突变体体外转染骨髓间充质干细胞[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(19):2953-2960.

In vitro transfection of triple-point mutants of hypoxia-inducible factor 1 alpha into bone marrow mesenchymal stem cells

Hui Chun-ying¹, Xiao Hong-yan², He Xin-ling¹, Wang Wei³ (¹Department of Cardiocerebral Surgery, ²Department of Intervention Medicine, ³Department of Rehabilitation, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: The incidence of spinal cord injury is increasing year by year in China so that the construction of effective vascular network in local injury as soon as possible is the guarantee of metabolism and nutritional support to differentiation of all kinds of cells and healing of injury is also promoted by vascular network.

OBJECTIVE: To study the effect of triple-point mutants of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) to promote angiogenesis after spinal cord injury in normoxic condition.

METHODS: Site-directed mutagenesis of 402, 564 and 803 amino acids in human HIF1 α coding sequence area was completed by PCR, and the adenovirus pAdEasy-1 system was recombined with post-mutation HIF1 α gene. Packaging viral and titration determination of experimental group was completed and the same was done to non mutation group and control virus group. The future experiment was continued with three virus groups and blank group (A group: including mutation HIF1 α gene virus liquid; B group: including non mutation HIF1 α gene virus liquid; C group: including control virus liquid; D group: blank group). Then, virus liquid was transferred into rat

惠春影, 女, 1983年生, 吉林省榆树市人, 汉族, 2007年吉林大学毕业, 主要从事脊髓损伤的基因治疗。

通讯作者: 王维, 硕士, 副教授, 辽宁医学院附属第一医院康复医学科, 辽宁省锦州市 121001

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.19.001

[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)19-02953-08

稿件接受: 2014-02-26

Hui Chun-ying, Department of Cardiocerebral Surgery, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Corresponding author: Wang Wei, Master, Associate professor, Department of Rehabilitation, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Accepted: 2014-02-26

bone marrow mesenchymal stem cells. We observed transfection efficiency of virus by enhanced green fluorescent protein and to detect mRNA and protein expression of HIF1 α gene in all transfection cells. We also detected protein expression of vascular endothelial growth factor acting as downstream angiogenesis gene of HIF1 α in four groups by Western blot.

RESULTS AND CONCLUSION: Three adenoviral recombinants were successfully constructed and the packaging and identification were accomplished. The site-directed mutations of 402, 564 and 803 amino acids in coding sequence area were successful and all of them were changed to alanine. The level of HIF1 α mRNA expression in both A group and B group were significantly higher than that in the C group and D group ($P < 0.05$). The expression levels of HIF1 α and vascular endothelial growth factor proteins in A group was significantly higher than those in the other three groups ($P < 0.05$). These findings indicate that the HIF1 α gene largely and effectively express in normoxic condition after triple-point mutation and the high-efficiency expression of vascular endothelial growth factor which is a downstream angiogenesis gene of HIF1 α is promoted so that it is maybe a new therapeutic way of angiogenesis in the treatment of spinal cord injury.

Subject headings: stem cells; mesenchymal stem cells; spinal cord injuries; genes; vascular endothelial growth factors

Funding: the Funded Project of the Social Development Department of Liaoning Science and Technology Bureau, No. 2012408002

Hui CY, Xiao HY, He XL, Wang W. In vitro transfection of triple-point mutants of hypoxia-inducible factor 1 alpha into bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(19):2953-2960.

0 引言 Introduction

脊柱外伤、脊髓压迫或脊髓组织供血动脉损伤导致循环血容量急剧减少等因素均可引起脊髓急性缺血, 从而引起高致瘫性的中枢神经系统创伤, 即脊髓损伤, 其发病率在中国呈逐年增高的趋势^[1]。如何改进脊髓损伤的治疗方法, 改善脊髓损伤的治疗效果成为了目前医学界亟待解决的重大课题。目前对脊髓损伤的研究已深入到基因水平, 细胞移植联合基因治疗是前沿的治疗途径, 技术关键是选择有效的目的基因和载体细胞, 这种治疗方式有望在治疗脊髓损伤中取得进一步的突破^[2]。

只有尽早地在脊髓损伤局部构建有效的血管网络, 才能为各种细胞的分化提供营养支持和代谢保证, 加速损伤局部的愈合^[3]。如血管内皮细胞生长因子、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, 单个生长因子并不足以诱导成熟的血管新生^[4-6]。因此人们在探索多基因治疗的同时, 正在寻求能调控多基因表达的因子, 以诱导生理功能完整的血管新生, 而由于低氧诱导因子1 α 在促血管新生中的作用日益显著, 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^[7-8]。

低氧诱导因子1可提高组织和细胞在缺血环境下的生存能力^[9]。作为促进血管内皮细胞生长因子等刺激血管形成生长因子基因的上游基因, 低氧诱导因子1可以启动和促进血管内皮细胞生长因子等基因及其受体基因的表达, 产生内源性的血管内皮细胞生长因子和其受体。在促进血管再生、形成稳定的血供系统、维持局部成血管微环境方面比任何基因均有更广泛的生理作用^[10]。但是低氧诱导因子1 α 仅能在低氧条件下表达并积累, 其编码区中氧依赖性降解结构域中的第402, 564位脯氨酸不能被羟化是细胞产生的低氧诱导因子1 α 很快被降解(数分钟内)的主要原因^[11-12]。另外Lando等^[13]报道认为低氧诱导因子1 α 的转录活性可以由其编码区第803位天冬酰胺的作用而减低。这提示编码区第402, 564

位脯氨酸和第803位天冬酰胺都是低氧诱导因子1 α 的重要结构位点。因此, 为了能够发挥低氧诱导因子1 α 在常氧条件下的最强转录活性, 文章将在突变脯氨酸402和564的同时, 联合突变编码区的第803位天冬酰胺为丙氨酸, 并且为了更加直观的研究低氧诱导因子1 α 的作用, 构建了三突变体的低氧诱导因子1 α 重组腺病毒表达载体, 由于人的骨髓间充质干细胞存在取材困难以及伦理学争论等问题, 因此实验将其转染大鼠骨髓间充质干细胞后检测其对促血管新生的作用, 以期后续将其应用于脊髓损伤动物实验奠定基础。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照实验。

时间及地点: 于2012年10月至2013年10月在辽宁医学院附属第一医院中心实验室完成。

材料:

转染骨髓间充质干细胞治疗脊髓损伤实验的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
含人低氧诱导因子 1 α 基因供体质粒	美国 Clontech 公司
腺病毒 pAdEasy-1 系统、病毒滴度检测试剂盒	美国 Stratagene 公司
DNA 连接试剂盒、凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒、pMD19-T Simple Vector、DNA/RNA Marker、RT-PCR 试剂盒、限制性内切酶	日本 TaKaRa 公司
超纯质粒提取试剂盒	德国 QIAGEN 公司
Lipofectamine 2000、OPTI-MEM、Trizol 试剂	美国 Invitrogen 公司
兔抗人低氧诱导因子 1 α 、血管内皮细胞生长因子单克隆抗体、二抗、 β -actin	美国 Santa Cruz 公司
DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清	美国 Gibco 公司
HEK293A 细胞、DH5 α 感受态细胞	辽宁医学院附属第一医院中心实验室
CO ₂ 培养箱、深低温-80 °C 冰箱、液氮罐	美国 Thermo 公司
倒置荧光显微镜	日本 Nikon 公司

实验动物: 实验用SD大鼠, 体质量(250 \pm 50) g, 雌雄不限, 由辽宁医学院实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK(辽)2003-0007。实验动物操作过程遵循实验动物伦理要求并获辽宁医学院实验动物伦理委员会批准。

方法:

引物序列: 引物设计、合成, 基因测序由日本TaKaRa公司完成。其中低氧诱导因子1 α 基因定点突变区引物6条; RT-PCR反应引物4条(表1)。

表1 低氧诱导因子1 α 基因定点突变PCR引物序列
Table 1 PCR primers of triple-point mutants of hypoxia-inducible factor 1 α

名称	序列(5'-3')
402-F1	GTG AAC CCA TTC CTC ACC CAT C
402-R1	TCT CCA GCG GCT GCG GCC AGC AAA G
564-F2	CTG GCC GCA GCC GCT GGA GAC AC
564-R2	GGA TAT AGG CAG CTA ACA TCT CC
803-F3	GAT GTT AGC TGC CTA TAT CCC AAT G
803-R3	TTC ACC CTG CAG TAG GTT TCT GCT GCC TTG TAT AGG AGC AGC AAC TTC ACA ATC
低氧诱导因子1 α -F	GAA ACC ACC TAT GAC CTG C
低氧诱导因子1 α -R	GTC GTG CTG AAT AAT ACC ACT C
β -actin-F	GGG ACC TGA CTG ACT ACC TC
β -actin-R	TCA TAC TCC TGC TTG CTG AT

低氧诱导因子1 α 基因定点突变: 利用突变引物以含人低氧诱导因子1 α 基因供体质粒为模版进行第1次PCR扩增(反应条件: 98 $^{\circ}$ C、10 s, 55 $^{\circ}$ C、10 s, 72 $^{\circ}$ C、30 s, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C、10 min, 1个循环)。回收PCR产物作为模版进行第2次PCR扩增(反应条件: 98 $^{\circ}$ C、10 s, 55 $^{\circ}$ C、10 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 共30个循环; 72 $^{\circ}$ C、10 min, 1个循环)。回收约1 800 bp产物片段后利用Sal I /Pst I进行双酶切, 经乙醇沉淀纯化后与pMD19-T Simple Vector连接, 连接产物转化DH5 α 后在LB固体培养基上划平板进行细菌培养16 h, 筛选阳性克隆进行低氧诱导因子1 α 突变基因测序鉴定, 完成三点突变体克隆(突变后低氧诱导因子1 α 基因写作低氧诱导因子1 α^{mut})。

重组腺病毒载体的构建及包装: 以突变克隆体和pAdEasy-1中pShuttle载体为底物建立2个双酶切反应体系, 回收2.5 kb的低氧诱导因子1 α^{mut} 片段和8.9 kb的pShuttle载体片段, 连接重组后筛选阳性克隆进行测序鉴定, 构建成腺病毒穿梭重组体(pShuttle-HIF1 α^{mut} -IRES-EGFP-1); 上述产物经Pme I酶切后与pAdEasy-1中BJ5183感受态细胞混合于电穿孔仪中以200 Ω , 2.5 kV, 25 μ F为条件电击1次, 构建成pAd-HIF1 α^{mut} -IRES-EGFP-1重组体; 超纯提取该重组体后经Pac I酶切提纯大片段, 通过Lipofectamine 2000转染HEK293A细胞7 d进行病毒包装, 利用示踪因子增强型绿色荧光蛋白观察转染效果, 反复冻融3次获得Ad-HIF1 α^{mut} -IRES-EGFP-1病毒液, 检测病毒滴度后-80 $^{\circ}$ C保存备用^[14]。同理分别包装阳性对照Ad-HIF1 α -IRES-EGFP-1和阴性对照Ad-IRES-

EGFP-1。

大鼠骨髓间充质干细胞的体外分离培养及转染: 用颈椎脱臼法处死SD大鼠, 体积分数75%乙醇浸泡。取出股骨及肱骨, 剪断骨两端显露骨髓, PBS清洗。吸取DMEM培养基(含体积分数10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素)反复冲洗骨髓腔直至变白。充分吹打形成单细胞悬液, 1 000 r/min离心6 min, 去上清, 加培养液, 吹打均匀后分装到25 cm²培养瓶中, 放入37 $^{\circ}$ C、体积分数5%CO₂培养箱孵育, 隔日换液。1周时可见细胞长满瓶底约90%。PBS清洗3次, 0.25%胰酶37 $^{\circ}$ C消化1 min, 吹打成单细胞悬液后血球计数板计数调整浓度为1 \times 10⁸ L⁻¹, 接种到新培养瓶中传至第3代。将上述3种病毒液分别以最佳感染复数=100转染, 72 h后在倒置荧光显微镜下观察转染效果^[15]。

实验分组:

组别	处理方法
含突变基因病毒液组	将含突变低氧诱导因子1 α 基因病毒液转染大鼠骨髓间充质干细胞(Ad-HIF1 α^{mut} -IRES-EGFP-1)
含未突变基因病毒液组	将未突变低氧诱导因子1 α 基因病毒液转染大鼠骨髓间充质干细胞(Ad-HIF1 α -IRES-EGFP-1)
空病毒液组	将空病毒液转染大鼠骨髓间充质干细胞(Ad-IRES-EGFP-1)

4组细胞均常规培养72 h。

RT-PCR检测各组细胞中低氧诱导因子1 α 基因mRNA表达: 利用Trizol分别提取4组细胞的总RNA, 紫外分光光度计检测A_{260 nm}/A_{280 nm}, 其比值均在1.8-2.0之间。配制反应液后进行RT-PCR反应(反应条件: 50 $^{\circ}$ C、30 min, 94 $^{\circ}$ C、2 min, 1个循环; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 30个循环)。反应结束后取反应液5 μ L直接进行10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统分析各条带吸光度值, 重复实验3次, 分别计算相对吸光度值。

Western blot检测各组细胞中低氧诱导因子1 α 及血管内皮细胞生长因子蛋白表达: 通过细胞蛋白裂解液提取各组细胞总蛋白, 利用BCA试剂盒检测各组蛋白浓度; 配制5%浓缩胶与8%分离胶, 60 V \times 30 min, 150 V \times 1 h进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳结束后取下分离胶洗涤3次放入转膜仪, 以100 mA \times 30 min进行转膜, 转膜后孵育一抗(1:1 500), 4 $^{\circ}$ C摇摆过夜, 洗膜后继续孵育二抗及显影液, 室温避光孵育30 min, 洗脱液洗涤3次终止显色反应, 凝胶成像系统分析膜上目的条带与内参照吸光度值。重复实验3次, 计算相对吸光度值。

主要观察指标: 各组细胞中低氧诱导因子1 α 及血管内皮细胞生长因子的相对吸光度值。

统计学分析: 由惠春影采用SPSS 18.0 for Windows软件包对所得结果进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较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 Results

2.1 测序及腺病毒载体鉴定结果 通过基因测序显示低氧诱导因子1 α 基因编码区第402位脯氨酸由CCA突变成GCA(丙氨酸), 第564位脯氨酸由CCC突变成GCC(丙氨酸), 第803位天冬酰胺由ATT突变成AGC丙氨酸(说明第803位天冬酰胺测序的是反义链, 所以天冬酰胺正义链应为AAT, 而丙氨酸正义链应为GCT)(图1A-F)。凝胶电泳成像显示 Ad-HIF1 α^{mut} -IRES-EGFP-1 及 Ad-HIF1 α -IRES-EGFP-1经Pac I 酶切后均出现30 kb和3 kb两个条带, 提示重组腺病毒载体构建成功(图2)。

2.2 腺病毒包装结果 经 3 种病毒重组体转染的 HEK293A 细胞在荧光显微镜下均观察到有大量绿色荧光蛋白表达(图 3A-C), 同时在普通倒置显微镜下观察均出现相似的细胞病变效应: 细胞触角回收、肿胀变圆, 一部分细胞脱落, 悬浮于视野中(图 3D-F); 病毒滴度检测结果依次为 2.3×10^8 pfu/mL, 2.6×10^8 pfu/mL 和 1.8×10^8 pfu/mL, 符合后续转染实验要求。

2.3 病毒转染骨髓间充质干细胞表达结果 3 种包装成功的病毒液在高倍数荧光显微镜下均观察到较强绿色荧光蛋白表达并且表达绿色荧光蛋白的大鼠骨髓间充质干细胞也较多, 转染效率较高; 而未转染任何病毒液的骨髓间充质干细胞在荧光显微镜下并未显现出任何荧光效应(图 4)。

2.4 RT-PCR 结果 含突变基因病毒液组、含未突变基因病毒液组细胞内低氧诱导因子 1 α mRNA 表达相对吸光度值分别为 0.85 ± 0.06 , 0.83 ± 0.07 , 两组差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 空病毒液组、空白组低氧诱导因子 1 α mRNA 的表达量非常低, 几乎可以忽略, 差异也无显著性意义 ($P > 0.05$); 而含突变基因病毒液组、含未突变基因病毒液组细

胞内低氧诱导因子 1 α mRNA 表达量均明显高于空病毒液组、空白组, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$, 图 5A)。

2.5 Western blot 结果 含突变基因病毒液组细胞低氧诱导因子 1 α 蛋白及血管内皮细胞生长因子蛋白表达相对吸光度值分别为 0.79 ± 0.08 和 0.61 ± 0.05 , 显著高于含未突变基因病毒液组、空病毒液组、空白组 ($P < 0.05$); 而含未突变基因病毒液组、空病毒液组、空白组 3 组差异均无显著性意义 ($P > 0.05$, 图 5B, C)。结果显示, 三点突变型低氧诱导因子 1 α 不仅可以在常氧条件下高效表达, 还能够促进其下游基因血管内皮细胞生长因子的高效表达。

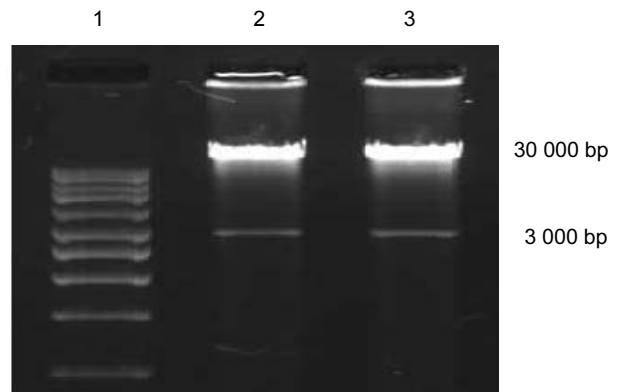


图 2 低氧诱导因子 1 α 腺病毒载体酶切电泳鉴定图

Figure 2 Electrophoretic pattern of adenovirus vectors digested by Pac I

图注: 1 泳道为 Marker; 2 泳道为突变后低氧诱导因子 1 α 腺病毒载体(Ad-HIF1 α^{mut} -IRES-EGFP-1)经 Pac I 酶切后电泳条带; 3 泳道为未突变低氧诱导因子 1 α 腺病毒载体(Ad-HIF1 α -IRES-EGFP-1)经 Pac I 酶切后电泳条带。凝胶电泳成像显示 Ad-HIF1 α^{mut} -IRES-EGFP-1 及 Ad-HIF1 α -IRES-EGFP-1 经 Pac I 酶切后均出现 30 000 bp 和 3 000 bp 两个条带, 提示重组腺病毒载体构建成功。

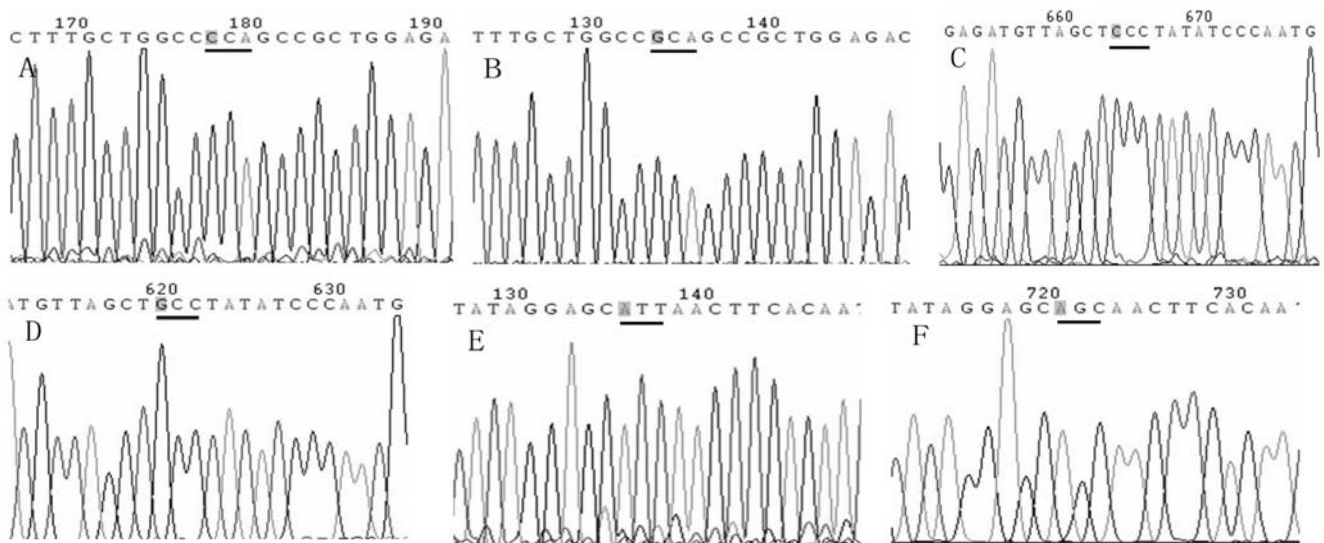


图 1 低氧诱导因子 1 α 基因编码区第 402, 564, 803 位氨基酸突变前后测序图

Figure 1 The DNA sequence before and after the mutations of the 402, 564, and 803 amino acids in coding sequence area of hypoxia-inducible factor 1a gene

图注: 图 A 中第 402 位脯氨酸(CCA)突变为图 B 中丙氨酸(GCA); 图 C 中第 564 位脯氨酸(CCC)突变为图 D 中丙氨酸(GCC); 图 E 中第 803 位天冬酰胺(ATT)突变为图 F 中丙氨酸(AGC)。

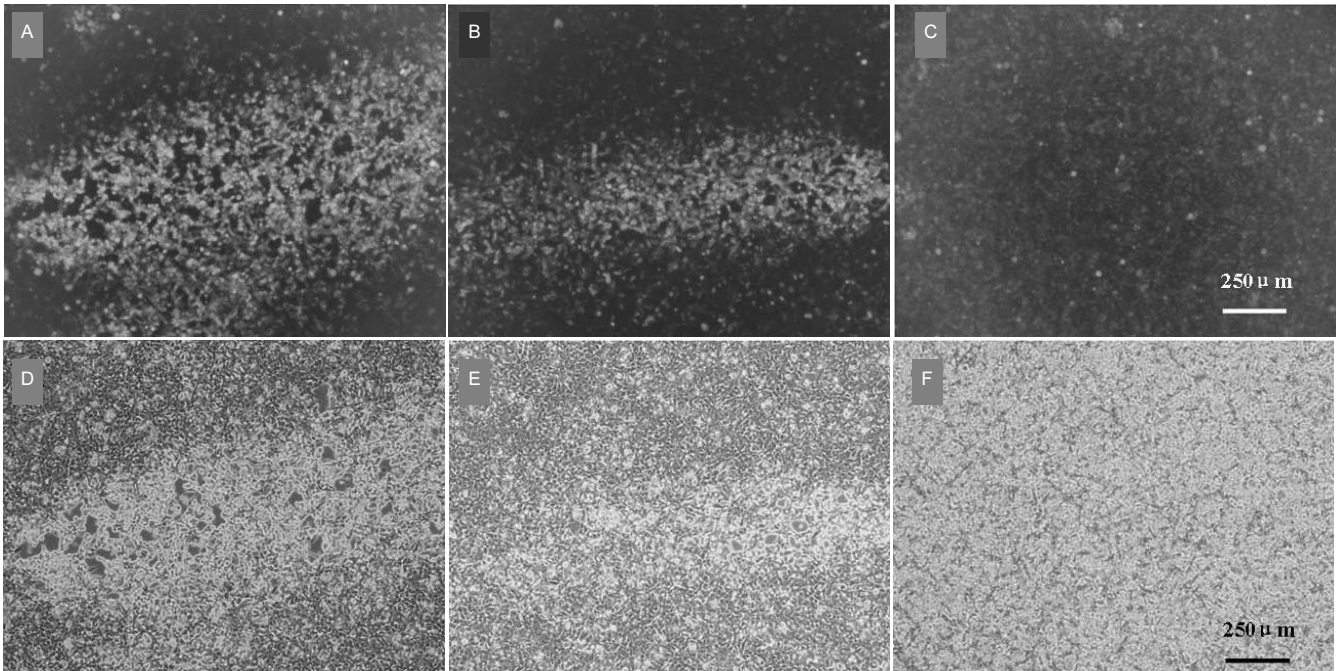


图3 腺病毒载体转染 HEK293A 细胞后绿色荧光分布及病毒包装图($\times 40$)

Figure 3 Green fluorescence distribution and virus packaging in adenovirus vector-transfected HEK293A cells ($\times 40$)

图注: 图 A-C 显示低氧诱导因子 1 α 突变后病毒载体、未突变病毒载体及空病毒载体转染 HEK293A 细胞后在荧光显微镜下均观察到有大量绿色荧光蛋白表达; D-F 显示以上 3 种病毒重组体转染 HEK293A 细胞进行包装时在普通倒置显微镜观察下均出现相似的细胞病变效应。

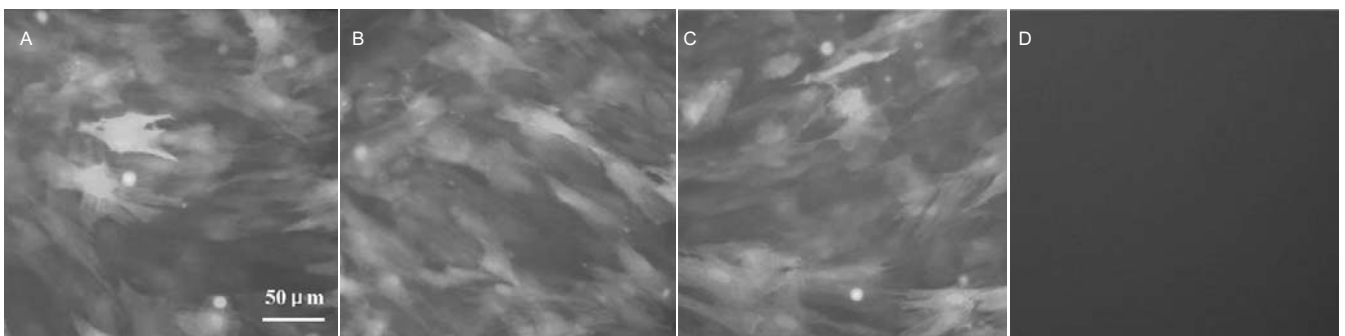


图4 转染病毒液骨髓间充质干细胞的绿色荧光分布图($\times 200$)

Figure 4 The expression of green fluorescence in bone marrow mesenchymal stem cells transfected with mutation HIF1 α gene virus liquid ($\times 200$)

图注: 图中 A-C 显示低氧诱导因子 1 α 突变后病毒液、未突变病毒液及空病毒液分别转染骨髓间充质干细胞后均观察到较强绿色荧光蛋白表达; 图 D 显示未转染任何病毒液的骨髓间充质干细胞在荧光显微镜下并未显现出任何荧光效应。

3 讨论 Discussion

脊髓损伤后的血供重建是一个缓慢的过程, 关键是尽快在损伤局部构建有效的血管网来支撑修复过程, 既要促进新生毛细血管尽快再生, 又要使之进一步增粗、加厚和固定, 即微血管化, 形成包括有微动脉-毛细血管-微静脉的微血管系统, 这样才能使局部血供趋于稳定而获得修复所需的充足的营养供给^[16]。这是组织工程学在损伤区内血管构筑研究方向的理想模式, 血管构筑成功越早对脊髓损伤后的愈合就越有利^[17]。随着低氧诱导因子 1 α 促血管新生作用的发掘, 该基因在组织工程领域内的应用前景逐渐被看好。

以往的研究多用血管内皮细胞生长因子、成纤维生长因子或体外培养的血管内皮细胞植入局部促进血管生成,

然而血管内皮细胞生长因子可导致新生血管不成熟、血管渗漏、组织水肿等。Thurston 等^[18]研究发现单纯的血管内皮细胞生长因子基因治疗在转基因鼠皮肤出现了血管高通透性, 而以血管内皮细胞生长因子及血管生成素 1 两种基因共转染治疗则不会出现上述现象。但 Visconti 等^[19]用同样两种基因共转染鼠心脏却发现血管内皮细胞生长因子的促血管生成作用被阻断。实验观察还表明即使骨折区局部有血管内皮细胞生长因子的稳定存在, 也多只形成无功能、低流量和不稳定的毛细血管, 而这些毛细血管随着时间的推移可以产生不同程度的退化, 难以进化形成有意义的血管网^[20-21], 并且血管内皮细胞生长因子的使用还涉及到几个严重的安全性问题, 如可诱导非缺血靶组织的非特异性新血管化或“附带”新血管化, 不可控制的新血管化可能会导

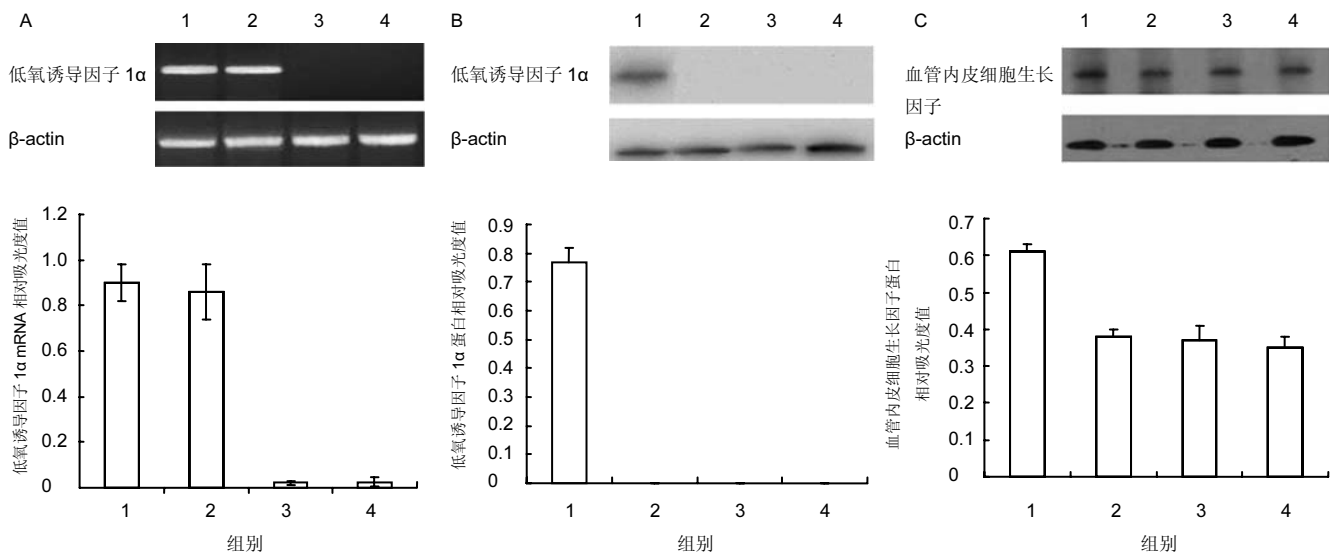


图5 各组细胞低氧诱导因子1 α 基因mRNA、蛋白及血管内皮细胞生长因子基因蛋白表达情况

Figure 5 mRNA and protein expression of hypoxia-inducible factor 1 α and vascular endothelial growth factor in different groups

图注: 图中1, 2, 3, 4分别为含突变基因病毒液组、含未突变基因病毒液组、空病毒液组及空白组。图A为低氧诱导因子1 α 基因mRNA表达的RT-PCR结果, 结果显示含突变基因病毒液组、含未突变基因病毒液组细胞内低氧诱导因子1 α mRNA表达量均明显高于空病毒液组、空白组($P < 0.05$); 图B, C分别为低氧诱导因子1 α 基因、血管内皮细胞生长因子蛋白表达的Western blot结果, 结果显示含突变基因病毒液组细胞低氧诱导因子1 α 蛋白及血管内皮细胞生长因子蛋白表达量显著高于其他3组($P < 0.05$)。

致处于静止状态的肿瘤细胞或组织的生长; 体外培养自体来源的血管内皮细胞, 不仅存在操作繁琐, 体外培养较难的问题, 而且在人类血管内皮细胞标本来源和取材就是一个难于越过的鸿沟; 而在应用成纤维生长因子治疗时可能出现贫血、血小板减少症和肾脏毒性等^[22]。由此也反映了血管生长过程的复杂性, 血管生长过程本身是受一系列生长因子的调节, 这些因子之间形成一个巨大的调控网络, 相互协调、相互补充, 单个生长因子治疗并不足以诱导成熟而又安全的血管新生。因此人们在探索多基因治疗的同时, 正在寻求能调控多基因表达的因子, 以诱导生理功能完整的血管新生^[23]。目前比较研究发现低氧诱导因子1可能是个较为合适的候选基因。

低氧诱导因子1属于碱性螺旋环螺旋/PAS蛋白家族, 主要以同源二聚体的形式存在, 由 M_r 120 000的 α 亚基(低氧诱导因子1 α)和 M_r 91 000-94 000的 β 亚基(低氧诱导因子1 β)组成, 存在于大部分哺乳动物与人体组织中。低氧诱导因子1 α 和低氧诱导因子1 β 均有N-端的碱性螺旋环螺旋/PAS结构, 它是两个亚基聚合所必需的结构^[24-33], 其负责与低氧诱导因子1 β , 又称芳香烃受体核转运蛋白结合形成异二聚体引起构象改变, 这种特性是低氧诱导因子1与DNA上顺式反应元件呈高亲和性结合所必需的。目前, 低氧诱导因子 α 有低氧诱导因子1 α 、低氧诱导因子2 α 和低氧诱导因子3 α 三种亚型。低氧诱导因子1 α 和低氧诱导因子2 α 的生物学作用可能更为重要和突出, 两者均为DNA结合蛋白, 受缺氧诱导^[34-39]。人低氧诱导因子1 α cDNA序列全部为4 082 bp, 编码区编码826个氨基酸, 基因定位于14q21-24。研究发现低氧诱导因子1 α 对于细

胞和组织抗低氧, 提高其在缺血环境下的生存能力及促进血管再生, 微血管系统的形成方面有及其重要的意义^[40-47]。本实验在不改变低氧诱导因子1 α 其他氨基酸结构的基础上仅将氧依赖性降解结构域中的3个关键氨基酸位点进行定点突变为丙氨酸, 最大程度的保留了组成低氧诱导因子1 α 基因的氨基酸的功能, 不仅使得低氧诱导因子1 α 在常氧条件下能够不被降解而稳定表达, 又增强了其转录活性, 提高了单位剂量内低氧诱导因子1 α 蛋白的表达量。

有报道表明, 不含氧依赖性降解结构域的低氧诱导因子1 α 基因转染细胞后在任何氧浓度下均可表达低氧诱导因子1 α 活性蛋白; 而体内实验表明能诱导新的成熟血管床生成, 并且该重组低氧诱导因子1 α 诱导的新生血管床稳定, 转基因鼠的皮肤不出现水肿、炎症和血管渗漏且没有曲折和囊性血管形成, 并在长达18个月观察期中未发现溃疡、血管瘤或皮肤原发肿瘤发生^[48]。但是, 在通常情况下, 大片的基因缺失(如氧依赖性降解结构域的缺失)可能引起蛋白某些还没被发现的功能丧失, 显然发生定点突变的低氧诱导因子1 α 所表达的蛋白从结构上和正常低氧诱导因子1 α 蛋白要接近得多, 在改变蛋白的某些特性、如易降解和易失活的同时, 更有利于保留蛋白的生理功能^[49]。另有报道称, 氧依赖性降解结构域中的第402或564位脯氨酸单一突变也可以在任何氧浓度条件下表达该蛋白的活性, 但是, 一个降解羟基化位点的保留或多或少会对该基因的常氧表达起到一个抑制的作用, 不如两者同时突变效果更加完善^[13]。因此, 本文中的三点突变法可能是该基因重组的较好选择。

通过对细胞内低氧诱导因子1 α 基因mRNA和蛋白的检测发现, 尽管含未突变基因病毒液组细胞中低氧诱导因子1 α mRNA表达明显增加, 但是蛋白检测并无任何发现, 这提示了含未突变基因病毒液组尽管可能引起低氧诱导因子1 α 蛋白表达的增加, 但是增加的蛋白由于其正常结构中第402, 564位脯氨酸的存在, 仍然被降解而不能在细胞内发生蓄积, 可以推测出野生型低氧诱导因子1 α 蛋白在常氧条件下是完全降解的, 因而不能发挥它的任何功能。而空病毒液组、空白组由于未转染低氧诱导因子1 α 基因, 所以并未检测出mRNA与蛋白的表达。与含未突变基因病毒液组不同的是, 含突变基因病毒液组在用Western blot方法检测时能在常氧条件下检测到细胞内含有高水平的低氧诱导因子1 α 蛋白, 说明这种突变的表达载体在常氧条件下在大鼠骨髓间充质干细胞内能够高效表达并且蛋白能够在细胞内蓄积, 提示降解对低氧诱导因子1 α 表达的影响主要发生在转录后的翻译水平, 即蛋白水平; 而突变后低氧诱导因子1 α 在常氧条件下较之野生型更加稳定、表达量大而不被降解。同样, 对于低氧诱导因子1 α 的下游基因血管内皮细胞生长因子来说, 其蛋白的表达量在含突变基因病毒液组与另外3组相比, 同样有显著的提高, 在这一点上也证明了突变后的低氧诱导因子1 α 对于血管内皮细胞生长因子是有一个促进作用的。

综上, 可以初步认为低氧诱导因子1 α 基因三点突变体联合细胞移植很可能为脊髓损伤疾病的血管新生治疗提供一个新的方向。

致谢: 向为实验做出指导的辽宁医学院实验动物中心以及辽宁医学院附属第一医院中心实验室各位老师表示感谢。

作者贡献: 实验设计惠春影, 实验实施惠春影和孙飞, 实验评估王维, 资料收集何欣玲。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 编码区序列-在核酸序列中能够翻译成蛋白质氨基酸序列的部分, 该段核酸序列要有起始与终止密码子。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Kuniyoshi Y, Koja K, Miyagi K, et al. Prevention of postoperative paraplegia during thoracoabdominal aortic surgery. *Ann Thorac Surg.* 2003; 76(5): 1477-1484.
- [2] Dppolito G, Diabirras S, Howard GA, et al. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cell. *Bone.* 2006; 39(3): 513-522.
- [3] Nishimura R, Okuda K. Hypoxia is important for establishing vascularization during corpus luteum formation in cattle. *J Reprod Dev.* 2010; 56(1): 110-116.
- [4] Giatromanolaki A, Fiska A, Pitsiava D, et al. Erythropoietin receptors in endometrial carcinoma as related to HIF1{alpha} and VEGF expression. *In Vivo.* 2009; 23(5): 699-703.
- [5] 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.
- [6] Fiorenzo P, Mongiardi MP, Dimitri D, et al. HIF1-positive and HIF1-negative glioblastoma cells compete in vitro but cooperate in tumor growth in vivo. *Int J Oncol.* 2010; 36(4): 785-791.
- [7] 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.
- [8] Giaccia A, Siim BG, Johnson RS. HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2(10): 803-811.
- [9] 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.
- [10] Semenza GL. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov Today.* 2007; 12(19-20): 853-859.
- [11] Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science.* 2001; 294(5545): 1337-1340.
- [12] 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.
- [13] Lando D, Peet DJ, Whelan DA, et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science.* 2002; 295(5556): 858-861.
- [14] Zhang Z, Wang G, Li C, et al. Construction and characterization of a recombinant human adenovirus vector expressing bone morphogenetic protein 2. *Exp Ther Med.* 2013; 6(2):329-334.
- [15] Liu D, Hu L, Zhang Z, et al. Construction of human BMP2-IRES-HIF1 α adenovirus expression vector and its expression in mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep.* 2013; 7(2):659-663.
- [16] Emans PJ, Spaapen F, Surtel DA, et al. A novel in vivo model to study endochondral bone formation; HIF-1 α activation and BMP expression. *Bone.* 2007; 40(2): 409-418.
- [17] Lim W, Cho J, Kwon HY, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha activates and is inhibited by unoccupied estrogen receptor beta. *FEBS Lett.* 2009; 583(8): 1314-1318.
- [18] Thurston G, Suri C, Smith K, et al. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science.* 1999; 286(5449):2511-2514.
- [19] Visconti RP, Richardson CD, Sato TN. Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(12):8219-8224.
- [20] 朱国强, 吴织芬, 王勤涛, 等. IGF-1对骨髓基质细胞分泌BMP-2和VEGF的影响[J]. *临床口腔医学杂志*, 2004, 20(4):215-217.
- [21] 邵勇, 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.
- [22] Fam NP, Verma S, Kutryk M, et al. Clinician guide to angiogenesis. *Circulation.* 2003; 108(21):2613-2618.
- [23] Bruick RK, McKnight SL. Building better vasculature. *Genes Dev.* 2001; 15(19): 2497-2502.

- [24] Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol.* 2000; 88(4):1474-1480.
- [25] Rebours V, Albuquerque M, Sauvanet A, et al. Hypoxia pathways and cellular stress activate pancreatic stellate cells: development of an organotypic culture model of thick slices of normal human pancreas. *PLoS One.* 2013; 8(9): e76229.
- [26] Cury V, Moretti AI, Assis L, et al. Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2. *J Photochem Photobiol B.* 2013; 125: 164-170.
- [27] Pawlus MR, Hu CJ. Enhanceosomes as integrators of hypoxia inducible factor (HIF) and other transcription factors in the hypoxic transcriptional response. *Cell Signal.* 2013; 25(9): 1895-1903.
- [28] Ding G, Liu HD, Liang HX, et al. HIF1-regulated ATRIP expression is required for hypoxia induced ATR activation. *FEBS Lett.* 2013; 587(7): 930-935.
- [29] Tong Y, Li QG, Xing TY, et al. HIF1 regulates WSB-1 expression to promote hypoxia-induced chemoresistance in hepatocellular carcinoma cells. *FEBS Lett.* 2013; 587(16): 2530-2535.
- [30] Wu WJ, Zhang XK, Zheng XF, et al. SHH-dependent knockout of HIF-1 alpha accelerates the degenerative process in mouse intervertebral disc. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2013; 26(3): 601-609.
- [31] Huang C, Hales BF. Effects of exposure to a DNA damaging agent on the hypoxia inducible factors in organogenesis stage mouse limbs. *PLoS One.* 2012; 7(12): e51937.
- [32] Zimmermann SM, Würgler-Hauri CC, Wannier GA, et al. Echinomycin in the prevention of heterotopic ossification - an experimental antibiotic agent shows promising results in a murine model. *Injury.* 2013; 44(4):570-575.
- [33] Huang SM, Chen TS, Chiu CM, et al. GDNF increases cell motility in human colon cancer through VEGF-VEGFR1 interaction. *Endocr Relat Cancer.* 2013; 21(1): 73-84.
- [34] Steunou AL, Ducoux-Petit M, Lazar I, et al. Identification of the hypoxia-inducible factor 2 α nuclear interactome in melanoma cells reveals master proteins involved in melanoma development. *Mol Cell Proteomics.* 2013; 12(3): 736-748.
- [35] Maher ER. HIF2 and endocrine neoplasia: an evolving story. *Endocr Relat Cancer.* 2013; 20(3): C5-7.
- [36] Bensellam M, Duvaillie B, Rybachuk G, et al. Glucose-induced O₂ consumption activates hypoxia inducible factors 1 and 2 in rat insulin-secreting pancreatic beta-cells. *PLoS One.* 2012; 7(1): e29807.
- [37] Lange C, Caprara C, Tanimoto N, et al. Retina-specific activation of a sustained hypoxia-like response leads to severe retinal degeneration and loss of vision. *Neurobiol Dis.* 2011; 41(1):119-130.
- [38] Pawlus MR, Wang L, Ware K, et al. Upstream stimulatory factor 2 and hypoxia-inducible factor 2 α (HIF2 α) cooperatively activate HIF2 target genes during hypoxia. *Mol Cell Biol.* 2012; 32(22): 4595-4610.
- [39] Aragonés J, Elorza A, Acosta-Iborra B, et al. Myeloid hypoxia-inducible factors in inflammatory diseases. *Crit Rev Immunol.* 2011; 31(1): 1-13.
- [40] Simon F, Bockhorn M, Praha C, et al. Deregulation of HIF1-alpha and hypoxia-regulated pathways in hepatocellular carcinoma and corresponding non-malignant liver tissue--influence of a modulated host stroma on the prognosis of HCC. *Langenbecks Arch Surg.* 2010; 395(4): 395-405.
- [41] Wu XQ, Huang C, He X, et al. Feedback regulation of telomerase reverse transcriptase: new insight into the evolving field of telomerase in cancer. *Cell Signal.* 2013; 25(12): 2462-2468.
- [42] Coudyzer P, Lemoine P, Jordan BF, et al. Hypoxia is not required for human endometrial breakdown or repair in a xenograft model of menstruation. *FASEB J.* 2013; 27(9): 3711-3719.
- [43] Sena JA, Wang L, Hu CJ. BRG1 and BRM chromatin-remodeling complexes regulate the hypoxia response by acting as coactivators for a subset of hypoxia-inducible transcription factor target genes. *Mol Cell Biol.* 2013; 33(19): 3849-3863.
- [44] Shen G, Li X, Jia YF, et al. Hypoxia-regulated microRNAs in human cancer. *Acta Pharmacol Sin.* 2013; 34(3): 336-341.
- [45] Lin J, Qin X, Zhu Z, et al. FHL family members suppress vascular endothelial growth factor expression through blockade of dimerization of HIF1 α and HIF1 β . *IUBMB Life.* 2012; 64(11): 921-930.
- [46] Minervini G, Masiero A, Moro S, et al. In silico investigation of PHD-3 specific HIF1- α proline 567 hydroxylation: a new player in the VHL/HIF-1 α interaction pathway? *FEBS Lett.* 2013; 587(18):2996-3001.
- [47] Green L, Cookson A, Bruce IN, et al. Identification of multiple, oxygen-stable HIF1 alpha isoforms, and augmented expression of adrenomedullin in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2013; 31(5):672-682.
- [48] 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.
- [49] Li C, Liu D, Zhang Z, et al. Triple point-mutants of hypoxia-inducible factor-1 α accelerate in vivo angiogenesis in bone defect regions. *Cell Biochem Biophys.* 2013; 67(2): 557-566.