技术方法

文章编号:1000-5404(2005)09-0928-02

缺氧诱导因子-1α基因转染人间充质干细胞

Transfection of hypoxia-inducible factor 1α gene into human mesenchymal stem cells

胡 鸢,杨 柳,段小军 (第三军医大学西南医院关节外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 将HIF-1α基因转染人间充质干细胞(hMSCs),并检测该基因在hMSCs中的表达。**方法** 构建含人缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)的重组逆转录病毒载体,制备含目的基因的重组逆转录病毒,感染hMSCs。采用RT-PCR法检测HIF-1α基因的表达。**结果** 转基因hMSCs的HIF-1α表达水平较正常hMSCs明显增高。**结论** HIF-1α基因成功转入hMSCs并被强制表达,为研究骨组织工程的血管化奠定了基础。

缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)是促血管生成的核心调控因子。人间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)是组织工程的重要种子细胞。本实验通过构建以内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)连接HIF-1α基因和增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因的逆转录病毒载体,感染hMSCs,并检测其表达水平。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 含人HIF-1α质粒(2.5 kb)pBSKhHIF1α T7由瑞士苏伊士大学Gassmann教授惠赠。逆转录病毒载体pLEGFP-N1、pIRES2-EGFP购自Clontech公司。大肠杆菌DH5α菌株、病毒包装细胞PT67、NIH3T3细胞由本校国家重点实验室复合伤研究分室馈赠。

1.1.2 酶类和主要生化试剂 限制性内切酶、DNA平末端连接试剂盒、DNA胶回收试剂盒、RT-PCR试剂盒等(Takara公司),T4 DNA连接酶、质粒提取试剂盒(Promega公司),PCR引物由上海生工公司合成,脂质体DOTAP、RNA提取液Tripure(Roche公司),淋巴细胞分离液(天津TBD),低糖DMEM培养基(Gibco公司),优等胎牛血清(Hyclone公司),polybrene(Sigma公司),G418(Merck公司)。

1.2 人HIF-1α基因重组逆转录病毒载体的构建及病毒液的制备

具体方法见文献[1],构建的逆转录病毒载体通过IRES序列连接HIF-1α基因和EGFP基因,该载体命名为pIRES3/HIF-1α载体。收集PT67细胞产生的病毒液备用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270375)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270375)
作者简介:胡 鸢(1976-),男,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事骨组织工程血管化方面的研究。电话:(023)66164133
通讯作者:杨 柳,电话:(023)68765280,E-mail:jointsurgery@163.com
收稿日期:2005-03-11;**修回日期**:2005-04-13

1.3 hMSCs的分离和培养

参照文献[2]进行。hMSCs培养基(低糖型DMEM+10%胎牛血清+青霉素钠100 U/ml+链霉素100 U/ml),首次换液时间为48 h,以后每3天全量换液。培养箱内培养条件:37 ℃、5% CO_2的空气、饱和湿度。

1.4 重组逆转录病毒感染hMSCs

hMSCs于感染前12 h传代。感染时移去培养液,加入病毒液(polybrene终浓度为8 μg/ml)。37 ℃培养12 h。然后再加入hMSCs培养基,继续培养36 h后按1∶5密度传代,用含200 μg/ml G418的hMSCs培养基筛选直至形成抗性克隆。挑选表达EGFP的克隆传代培养。

1.5 转基因hMSCs表达HIF-1α水平的检测

将转基因hMSCs与正常hMSCs在37 ℃、2% O_2、5% CO_2、93% N_2、饱和湿度条件下培养12 h后,用Tripure提取细胞RNA(具体方法参照Roche公司说明书)。以提取的RNA为模板,反转录生成cDNA(具体方法参照Takara公司说明书)。再以cDNA为模板,上游引物:5′-AAACCACCTATGACCTGC-3′,下游引物:5′-GTCGTGCTGAATAATACCACTC-3′,内参为人β-actin。反应条件:变性94 ℃×10 min,然后94 ℃×60 s,退火54 ℃×60 s,延伸72 ℃×60 s,共30个循环,最后54 ℃×10 min。产物进行琼脂糖电泳、目的片段为407 bp。

2 结果

2.1 重组逆转录病毒感染hMSCs

感染后的hMSCs经G418筛选14 d后,大部分未感染的hMSCs漂浮死亡,经换液清除,成功感染的hMSCs逐渐形成克隆,每个克隆均表达EGFP。混合所有克隆传代培养,在倒置荧光显微镜下可见明亮的绿色荧光,见图1。

2.2 转基因hMSCs表达HIF-1α水平的检测

RT-PCR反应结果如图2:2、3道的较小片断为人β-actin,较大片断为HIF-1α。可见在缺氧状态下,转基因hMSCs较正常hMSCs中缺氧诱导因子1-α的转录明显增加。用Quantity One软件进一步分析其D值表明:转基因hMSCs中HIF-1α mRNA表达丰度是正常hMSCs的2.4倍。

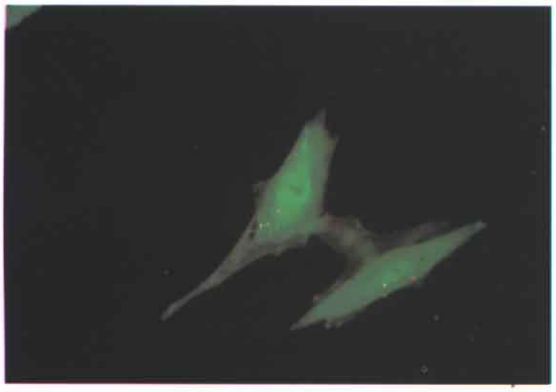
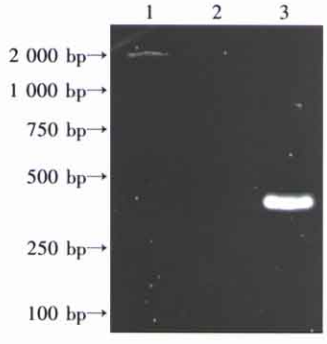


图 1　感染重组逆转录病毒后表达绿色荧光蛋白的 hMSCs（荧光显微镜 ×200）



1：Marker；2：正常 hMSCs；3：转基因 hMSCs

图 2　RT-PCR 法检测 HIF-1α 的表达

3　讨论

血管化和骨再生是骨愈合过程中的两个最基本环节。虽然血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）是主要的促血管生成因子，但血管生成需要多种生长因子协同作用才能完成。在小鼠皮肤实验中，单纯 VEGF 的高表达虽然能增加血管数量，但血管通透性也随之增高[3]，许多数据也表明单独一个生长因子远不足以生成最终功能正常的血管[4]，同时一直高表达的 VEGF 有诱发血管瘤的危险。而近年来的研究表明，HIF-1 作为促血管生成的核心调控因子，对 VEGF、VEGF 受体 FLT-1、血管生成素 1、血管生成素 2、成纤维细胞生长因子等有重要的调节作用[4,5]。HIF-1 是由 α 亚基和 β 亚基组成的异二聚体，β 亚基在细胞内稳定存在，而 HIF-1α 在缺氧的条件下才能稳定存在，尤其当氧浓度低于 6% 时呈指数增长[6]。通过强制表达 HIF-1α来促进血管化有以下优势：①低氧时HIF-1 上调 VEGF 等多种生长因子的表达，共同促进血管生成[6]。②作为 VEGF 的上游调控因子，转染 HIF-1 促进 VEGF 等因子的表达比单纯转染这些因子更有效率。③当氧浓度恢复正常后，HIF-1α 在几分钟内就彻底被降解，不会导致血管瘤，具有可控性[7]。本研究通过 IRES 连接上游的 HIF-1α 基因和下游的 EGFP 基因，构建双表达逆转录病毒载体，保证了 HIF-1α 基因的完整性，同时实现在 hMSCS 中 HIF-1α 与 EGFP 同时表达。

hMSCs 因为取材方便，增殖能力较强，不仅能诱导分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等，而且在 VEGF-B 作用下，还可以向血管母细胞、EC 表型分化，表达 CD34、CD31、Ⅷ因子等而成为骨组织工程的重要种子细胞[8]。本实验将 HIF-1α 基因转染 hMSCs，并检测到 HIF-1α 基因得到强制表达，为研究组织工程化骨的快速血管化奠定了基础。以后我们将对转基因 hMSCs 体内促血管生成开展进一步研究。

关键词：缺氧诱导因子-1α 基因；骨髓间充质干细胞；基因表达

中图法分类号：R394-33　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 段小军，杨　柳，董世武，等. 人 HIF1α 基因重组逆转录病毒载体构建及鉴定[J]. 第三军医大学学报，2004，26(18)：1639－1642.

[2] Majumadr M K, Thiede M A, Mosca J D, *et al*. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells[J]. J Cell Physiol, 1998, 176(1): 57－66.

[3] Thurston G, Suri C, Smith K, *et al*. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1[J]. Science, 1999, 286 (5449): 2511－2514.

[4] Kelly B D, Hackett S F, Hirota K, *et al*. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1[J]. Circ Res, 2003, 93 (11): 1074－1081.

[5] Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64(5-6): 993－998.

[6] Jiang B H, Semenza G L, Bauer C, *et al*. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O_2 tension[J]. J Am Physiol, 1996, 271(4 Pt 1): C1172－C1180.

[7] Huang L E, Gu J, Schau M, *et al*. Regulation of hypoxia-inducible factor lalpha is mediated by an O_2-dependent degradation domain via ubiquitin-proteasome pathway[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(14): 7987－7992.

[8] Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, *et al*. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow[J]. J Clin Invest, 2002, 109(3): 337－346.

（编辑　陈聪连）