论著

文章编号:1000-5404(2006)20-2040-04

人 HIF-1α 基因重组腺病毒的构建与鉴定

蒋春华[1],高钰琪[1],黄庆愿[1],黄 缄[1],贺伟峰[2],段小军[3] (第三军医大学:[1]高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,[2]西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,[3]西南医院骨关节中心,全军矫形外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 构建人缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)基因的重组腺病毒载体,并观察其对 HepG2 细胞的转染情况。**方法** 采用基因工程技术,经过亚克隆将人 HIF-1α 基因片段克隆至穿梭质粒 pAdTrack-CMV 上,利用 pAdEasy 系统进行细菌内同源重组后,经脂质体转染 HEK293 细胞,进行重组腺病毒的包装、扩增。采用 PCR 方法对重组腺病毒进行鉴定,利用穿梭质粒中带有绿色荧光蛋白 GFP 报告基因,进行病毒滴度的测定和对 HepG2 细胞感染效率的监测。**结果** 酶切鉴定及 PCR 结果证明重组腺病毒载体成功,人 HIF-1α 重组腺病毒滴度达 1.15×10^{10} pfu/ml,阴性对照腺病毒的滴度为 8×10^{10} pfu/ml,并对 HepG2 细胞具有很强的感染力。**结论** 应用细菌内同源重组法成功构建了含人 HIF-1α 基因的重组腺病毒载体。

关键词:腺病毒;HIF-1α 基因;同源重组

中图法分类号:Q782;Q789 **文献标识码**:A

Construction and identification of human HIF-1α gene recombinant adenovirus

JIANG Chun-hua[1], GAO Yu-qi[1], HUANG Qing-yuan[1], HUANG Jian[1], HE Wei-feng[2], DUAN Xiao-jun[3] ([1]Department of Pathophysiology, College of High Altitude Military Medicine, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, [3]Department of Joint Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the recombinant adenovirus of human HIF-1α gene and observe its ability to infect HepG2 hepatoma carcinoma cells. **Methods** The human HIF-1α gene fragment was cloned into the shuttle plasmid pAdTrack-CMV to form the transfer vector by the method of homogenous recombination in bacteria, and then was transfected into HEK293 cells with Lipofectamine™ 2000. The target gene was detected by PCR. The titer and its infection rate were determined by using the green fluorescent protein (GFP) expression in the shuttle plasmid. **Results** Restriction endonuclease and PCR analyses confirmed that the HIF-1α gene was successfully inserted into the adenovirus vector. The titer of the human HIF-1α gene recombinant adenovirus was 1.15×10^{10} pfu/ml, and that of the negative control recombinant adenovirus was 8×10^{10} pfu/ml. The adenovirus had a strong effect on HepG2 hepatoma carcinoma cells. **Conclusion** The recombinant adenovirus containing human HIF-1α gene is successfully constructed by the method of homogenous recombinant in bacteria.

Key words: adenovirus; HIF-1α gene; homogenous recombination

缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是近年来发现的一种核转录因子,对缺氧状态下的基因表达起核心调控作用[1,2]。受其调控的基因非常广泛,如血管生成、葡萄糖转运、能量代谢等基因的表达都与 HIF-1 密切相关[3-5]。HIF-1 是由 α 亚基和 β 亚基构成的异物二聚体,属于 bHLH-PAS 家族成员,其中 β 亚基在细胞内稳定表达,α 亚基在功能调节方面起主要作用[6,7]。为此,我们利用基因工程技术,体外构建表达人 HIF-1α 基因的重组腺病毒载体,旨在为进一步研究 HIF-1 在介导不同类型缺氧中所起的作用及其机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 含人 HIF-1α 全长 cDNA 质粒(3.4 Kb)pBSKhHIF-1αT7 由西南医院骨关节中心段小军博士惠赠[8]。带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV、腺病毒基因组质粒 pAdEasy-1、腺病毒包装细胞 HEK293 细胞及 BJ5183 菌株和大肠杆菌 DH5α 菌株由西南医院烧伤研究所贺伟峰副教授惠赠。人 HepG2 细胞由西南医院感染科徐宝艳博士赠送。

作者简介:蒋春华(1979-),男,湖南省新田县人,硕士研究生,助教,主要从事缺氧病理生理学方面的研究。电话:(023)68752339-8210, E-mail:xtjch@yahoo.com.cn

通讯作者:高钰琪,电话:(023)68752331

收稿日期:2005-11-17;修回日期:2006-03-15

1.1.2　酶类及主要生化试剂　　限制性内切酶、连接酶购自基因公司,质粒 DNA 提取试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购自杭州维特洁公司,脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司,PCR 引物由上海生物工程公司合成。

1.2　方法

1.2.1　质粒提取、酶切、连接及转化　　参照文献[9]的方法进行。

1.2.2　PCR 引物设计　　参照已在 GenBank 上发表的人 HIF-1α 序列,应用 Primer Primer 5.00 程序设计特异性人 HIF-1α 基因上游引物:5′-AAACCACCTATGACCTGC-3′,下游引物:5′-GTCGTGCTGAATAATACCACTC-3′。用同样方法,为扩增型腺病毒 E1 蛋白的基因序列设计 1 对特异性引物,上游引物:5′-TGACGACGAGGATGAAGA-3′,下游引物:5′-GGAGTCACAGC-TATCCGTAC-3′。

1.2.3　腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV/hHIF-1α 的构建及鉴定　　用 *Not* Ⅰ + *Kpn* Ⅰ分别双酶切腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 和 pBSKhHIF-1αT7,琼脂糖凝胶电泳回收线性化 pAdTrack-CMV 载体骨架和 hHIF-1α 片段,用 T_4 连接酶将二者连接起来,转化 DH5α 菌,提取质粒,*Pac* Ⅰ + *Eco*R Ⅰ双酶切初步鉴定重组质粒,并送 TaKaRa 公司测序鉴定。

1.2.4　重组腺病毒质粒载体 pAdEasy-1/hHIF-1α 的构建及鉴定　　将重组的 pAdTrack-CMV/hHIF-1α 穿梭质粒用 *Pme* Ⅰ酶切线性化。采用氯化钙法将线性化的穿梭质粒转化感受态 Adeasier-1 细胞,卡那霉素筛选阳性克隆,扩增培养,提纯质粒。将 *Pac* Ⅰ酶切初步鉴定正确的重组子转化 DH5α 菌,大量扩增克隆,得到腺病毒重组质粒 pAdEasy-1/hHIF-1α。

1.2.5　重组腺病毒质粒载体 pAdEasy-1/hHIF-1α 的鉴定

酶切鉴定:用 *Pac* Ⅰ分别酶切腺病毒基因组骨架质粒 pAdEasy-1 和 pAdEasy-1/hHIF-1α;酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。PCR 鉴定:分别以 pAdEasy-1 和 pAd/hHIF-1α 为模板;用前面合成的人 HIF-1α 的特异性引物进行 PCR 扩增。扩增反应的条件为:变性 94 ℃ ×10 min,然后 94 ℃ ×60 s,退火 54 ℃ ×60 s,延伸 72 ℃ ×80 s,共 30 个循环,最后 72 ℃ ×10 min。PCR 产物进行琼脂糖电泳分析。

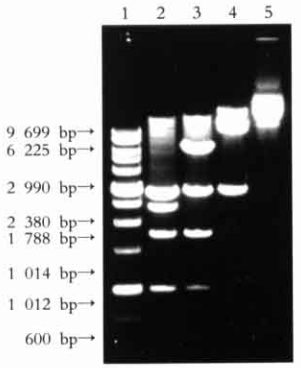
1.2.6　人 HIF-1α 重组腺病毒的包装、扩增及鉴定　　① 重组腺病毒质粒转染 HEK293 细胞:重组腺病毒质粒 pAdEasy-1/hHIF-1α 用 *Pac* Ⅰ酶切线性化后经 Lipofectamine™ 2000 脂质体介导转染 HEK293 包装细胞,第 10 天回收细胞和上清,回收病毒,将其加入 HEK293 细胞中继续培养,直至扩增出足量的腺病毒。② 重组腺病毒的鉴定:用试剂盒提取病毒 DNA。获得的病毒 DNA 分别用前面合成的 HIF-1α 和 E1 基因的特异性引物进行 PCR 鉴定,人 HIF-1α 特异性引物 PCR 扩增条件同前,E1 蛋白特异性引物 PCR 扩增条件如下:变性 94 ℃ ×10 min,然后 94 ℃ ×60 s,退火 52 ℃ ×30 s,延伸 72 ℃ ×30 s,共 30 个循环,最后 72 ℃ ×10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.7　病毒滴度和感染效率的测定　　① 病毒滴度的测定:参照文献[10]方法进行,按下面公式计算病毒滴度:病毒滴度(pfu/ml) = GFP 阳性细胞数 × 病毒稀释倍数/0.01 ml。② 病毒感染效率的测定:在六孔板上按照 2×10^5 接种 HepG2 细胞,待融合至 80% 时,用感染复数病毒/细胞(multiply of infenction, MOI)为 25、50、75、100 的腺病毒感染 HepG2 细胞。48 h后在荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞率。

2　结果

2.1　重组 pAdTrack-CMV/hHIF-1α 穿梭质粒的鉴定

Pac Ⅰ + *Eco*R Ⅰ双酶切鉴定:由于 pAdTrack-CMV 含有 1 个 *Eco*R Ⅰ酶切位点,插入的 hHIF-1α 片段上含有 4 个 *Eco*R Ⅰ酶切位点,因此 *Eco*R Ⅰ酶切 pAdTrack-CMV/hHIF-1α 可以产生 5 个片段;由于 pAdTrack-CMV 含有 2 个 *Pac* Ⅰ酶切位点,因此 *Pac* Ⅰ酶切 pAdTrack-CMV/hHIF-1α 可以产生 2 个片段;用 *Pac* Ⅰ + *Eco*R Ⅰ双酶切重组 pAdTrack-CMV/hHIF-1α 穿梭质粒应该产生 7 个片段,但是由于双酶切后产生了 1 012 bp 和 1 014 bp 及 2 921 bp 和 2 995 bp 大小的片段,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳时无法分离,因此电泳后只能看到 5 个条带(图 1)。测序鉴定:经 TakaRa 公司测序的结果与 GenBank 公布的序列完全一致。

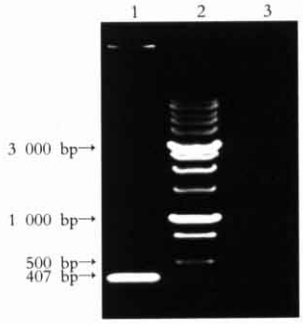


1:标准;2:pAdTrack-CMV/hHIF-1α(*Pac* Ⅰ + *Eco*R Ⅰ);3:pAdTrack-CMV/hHIF-1α(*Eco*R Ⅰ);4:pAdTrack-CMV/hHIF-1α(*Pac* Ⅰ);5:pAdTrack-CMV/hHIF-1α

图 1　质粒酶切电泳图

2.2　重组腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1/hHIF-1α 的鉴定

酶切鉴定:用 *Pac* Ⅰ酶切腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1/hHIF-1α得到 30 kb 和 4.5 kb 2 个片段;PCR 鉴定:以人 HIF-1α 为特异性引物对质粒 pAdEasy-1/hHIF-1α 进行 PCR 扩增,可得到 407 bp 大小的片段(图 2)。



1:pAdEasy-1/hHIF-1α;2:标准;3:pAdEasy-1

图 2　PCR 检测重组腺病毒质粒

2.3 人 HIF-1α 重组腺病毒的鉴定

① 将 *Pac* Ⅰ 酶切线性化的 pAd/hHIF-1αDNA 片段转染 HEK293 细胞，培养 24 h 后可见绿色荧光蛋白 GFP 的表达，1 周后细胞逐渐呈悬浮生长，并出现细胞病变效应（cytopathiefect，CPE）（图 3）。② 将提取的重组腺病毒 DNA 用 HIF-1α 引物进行 PCR 扩增，人 HIF-1α 重组腺病毒得到特异性目的条带，阴性对照腺病毒未见目的条带（图 4）。③ 以重组腺病毒 DNA 和 HEK293 细胞基因组 DNA 为模板，用 E1 基因特异性引物进行 PCR 扩增，进行琼脂糖凝胶电泳分析，重组腺病毒 DNA 的 PCR 产物未出现特异性的条带，说明扩增的腺病毒内没有突变的扩增型腺病毒，故确定为阳性克隆（图 5）。

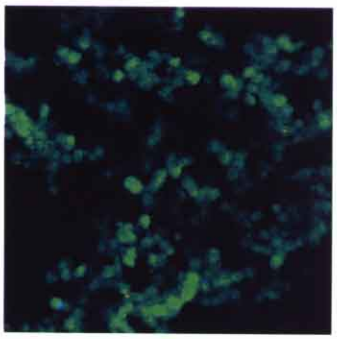
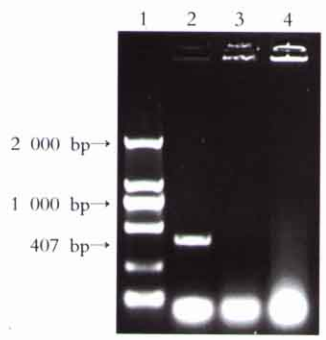


图 3 腺病毒转染 HEK293 细胞后 24 h GFP 的表达
（荧光显微镜 ×100）



1：标准；2：对照腺病毒 PCR 产物；3：hHIF-1α 腺病毒的 PCR 产物

图 4 PCR 检测重组腺病毒 DNA



1：标准；2：HEK293 细胞基因组 DNA 的 PCR 产物；3：hHIF-1α 腺病毒的 PCR 产物；4：对照腺 PCR 病毒的 PCR 产物

图 5 PCR 检测重组腺病毒 E1 蛋白的表达

2.4 病毒滴度和感染效率的测定

根据 GFP 计数法进行滴度测定，测得人 HIF-1α 重组腺病毒的滴度为 1.15×10^{10} pfu/ml，阴性对照腺病毒的滴度为 8×10^{10} pfu/ml。用不同 MOI 的重组腺病毒感染 HepG2 细胞，当 MOI 为 75 时，48 h 后，80% 的细胞出现荧光（图 6），表明所构建的腺病毒对 HepG2 细胞具有较高的感染能力。

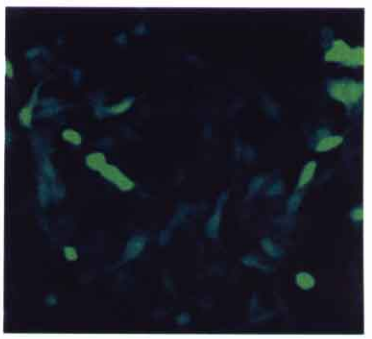


图 6 重组腺病毒转染 HepG2 细胞后 48 h 绿色荧光蛋白的表达
（激光共聚焦显微镜 ×200）

3 讨论

HIF-1 是调控细胞中多种缺氧反应相关基因的核转录因子，所调控的基因涉及到氧的运输、氧的利用、能量的转运和利用等很多方面，因此在介导细胞的缺氧反应中具有重要作用[11]。HIF-1 对靶基因的调控机制基本阐明，HIF-1 的反式激活需要与一些转录共轭子形成启动复合物从而诱导靶基因的转录，如 p300/CBP（cyclic-AMP response element binding protein，CREB）binding protein，CBP）。缺氧时，HIF-1 的 DNA 结合活性增强，HIF-1 在 p300/CBP 协助下，通过与靶基因序列上游的缺氧反应元件（HER）的结合，促进靶基因的转录[12,13]。缺氧诱导因子 1 通过激活 VEGF 的转录，诱导血管生成。应用腺病毒转染上调 HIF 表达，进而促进相关基因的表达和生物效应，如血管生成等，为缺血缺氧性疾病的防治提供了新的线索，初步的研究已显示了良好的应用前景。

常氧状态下，细胞内 HIF-1α 的蛋白水平很低，其主要原因是表达的 HIF-1α 蛋白通过泛素化和蛋白水解酶的方式被迅速降解；HIF-1α 脯氨酸羟化酶引起 HIF-1α402 和 564 位脯氨酸的羟基化是其泛素蛋白水解的必要条件，只有羟基化的 HIF-1α 才能与蛋白水解酶体系（von Hippel-Lindau protein，pVHL）结合降解[14,15]。低氧可以抑制这两个过程，通过抑制 HIF-1α 的降解，使细胞内蛋白水平迅速升高，但是 HIF-1α 转录水平并无变化[16]。有研究表明，常氧状态下，氯化

钴模拟缺氧也可以引起 HIF-1α 蛋白水平的迅速升高,但其转录水平是增高还是不变,尚有争议,对其具体机制也没有详细的阐述;线粒体复合体抑制剂模拟的缺氧却并没有引起 HIF-1α 蛋白水平的增加,其转录水平如何变化尚少见报道[16]。由此说明,不同类型的缺氧介导 HIF-1 表达的机制不同,HIF-1 在不同类型的缺氧反应中所起的作用也不同。

目前的研究表明,NO、ROS 和 ATP 在缺氧诱导导 HIF-1 表达的信号通路中起着非常重要的作用[17-19];不同类型缺氧诱导 HIF-1 表达时,细胞内 NO、ROS 和 ATP 的变化、它们在缺氧反应中起什么作用、以及是否起作用仍有很大的争议,甚至存在相反的结论。所以,有必要在下一步的实验探讨这些因素在不同类型缺氧诱导 HIF 表达中所起的作用。

实验所用腺病毒 AdEasy 系统,其骨架质粒 pAdEasy-1 带有病毒的大部分基因组,已经被转化到 BJ5183 细胞即 Adeasier-1 细胞中,该特性显著降低了由于非重组穿梭质粒所引起的背景,使其容易获得含有重组腺病毒质粒的克隆。另外,穿梭质粒 pAdTrack-CMV(卡那霉素抗性)具有左右臂同源区,借助 *E. coli* BJ5183 细菌内高效的同源重组机制并进行抗生素筛选,可以在很短时间内得到重组腺病毒质粒。再用 *Pac* Ⅰ 酶切去此质粒上的 *ori* 和卡那霉素抗性基因,暴露其末端重复 ITRs 序列,即可用来转染 HEK293 包装细胞,得到表达外源基因的重组腺病毒,该方法简化了实验步骤,缩短了载体构建周期。

实验成功构建了携带人 HIF-1α 基因的重组腺病毒载体,并获得了较高的病毒滴度,这对利用构建的重组腺病毒转染 HepG2 细胞,初步研究 HIF-1α 在缺氧信号通路中的作用奠定了基础。

参考文献:

[1] 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]. Am J Physiol, 1996, 271(4 Pt 1): C1172-C1180.

[2] JIANG B H, RUE E, WANG G L, *et al*. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1[J]. J Biol Chem, 1996, 271(30): 17771-17778.

[3] CARMELIET P, DOR Y, HERBERT J M, *et al*. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis[J]. Nature, 1998, 394(6692): 485-490.

[4] FLAMME, I, FROHLICH T, VON-REUTERN M, *et al*. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels[J]. Mech Dev, 1997, 63(1): 51-60.

[5] SEBASTIEN PAIRS, HELENE DENIS, EDOUARD DELAIVE, *et al*. Up-regulation of 94-kDa glucose-regulated protein by hypoxia-inducible factor-1 in human endothelial cells in response to hypoxia[J]. FEBS Lett, 2005, 579(1): 105-114.

[6] WANG G L, JIANG B H, RUE E A, *et al*. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O_2 tension[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(12): 5510-5514.

[7] SEMENZA, G L. Perspectives on oxygen sensing[J]. Cell, 1999, 98(3): 281-284.

[8] 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.

[9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京:科学出版社, 2002: 16-56.

[10] 江千里, 王建民, 温丽敏, 等. 批量快速测定法测定标志基因为 GFP 的重组病毒滴度[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(9): 1034-1035.

[11] HEWITSON K S, SCHOFIELD C J. The HIF pathway as a therapeutic target[J]. Drug Discov Today, 2004, 9(16): 704-711.

[12] GU J, MILLIGAN J, HUANG L E. Molecular mechanism of hypoxia-inducible factor 1alpha -p300 interaction. A leucine-rich interface regulated by a single cysteine [J]. J Biol Chem, 2001, 276(5): 3550-3554.

[13] LEE J W, LEE Y C, NA S Y, *et al*. Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: coactivators and corepressors[J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58(2): 289-297.

[14] SALCEDA S, CARO J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes[J]. J Biol Chem, 1997, 272(36): 22642-22647.

[15] MAXWELL P H, WIESENER M S, CHANG G W, *et al*. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis[J]. Nature, 1999, 399(6733): 271-275.

[16] XI L, TAHER M, YIN C, *et al*. Cobalt chloride induces delayed cardiac preconditioning in mice through selective activation of HIF-1alpha and AP-1 and iNOS signaling[J]. Am J Physiol Heart Circ Phsiol, 2004, 287(6): H2369-H2375.

[17] CHANDEL N S, MCCLINTOCK D S, FELICIANO C E, *et al*. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing [J]. J Biol Chem, 2000, 275(33): 25130-25138.

[18] ACKER H. The oxygen sensing signal cascade under the influence of reactive oxygen species[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360(1464): 2201-2210.

[19] POSTOVIT L M, SULLIVAN R, ADAMS M A, *et al*. Nitric oxide signalling and cellular adaptations to changes in oxygenation[J]. Toxicology, 2005, 208(2): 235-248.

(编辑　龙　亮)