文章编号:1000-5404(2007)02-0117-04

论著

携EGFP的人低氧诱导因子-1α腺病毒载体的构建及鉴定

谢宜军,王月刚,郭寿贵,童 锴,吴平生 (南方医科大学南方医院心内科,广州 510515)

提 要:目的 构建携EGFP的人低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor 1 alpha, HIF-1α)腺病毒表达载体,为研究人HIF-1α基因对冠心病的血管新生作用奠定基础。**方法** 采用分子克隆技术,以*Kpn* Ⅰ、*Apa* Ⅰ双酶切pcDNA3.1(+)-HIF-1α质粒获得HIF-1α cDNA,克隆到质粒pEGFP-C1,以*Nhe* Ⅰ、*Apa* Ⅰ双酶切得到EGFP-HIF-1α cDNA,重组到穿梭质粒pShuttle2,再以PI-*Sce* Ⅰ和I-*Ceu* Ⅰ双酶切重组穿梭质粒,获得含有EGFP-HIF-1α cDNA的表达盒,与线性化的腺病毒骨架质粒Adeno-X Viral DNA连接,重组成pAdeno-EGFP-HIF-1α腺病毒质粒,脂质体法转染HEK293细胞,荧光显微镜下观察结果,在HEK293细胞中包装成为重组Adeno-EGFP-HIF-1α腺病毒,并进行PCR鉴定及滴度测定。**结果** 经酶切鉴定及PCR证实重组腺病毒质粒构建成功,包装后冻融细胞的上清PCR检测重组腺病毒包装成功,病毒滴度为2×10^9 nfu/ml。**结论** 成功构建重组腺病毒Adeno-EGFP-HIF-1α,为冠心病的HIF-1α基因治疗研究奠定更直观的基础。

关键词: 低氧诱导因子-1α;绿色荧光蛋白;基因治疗
中图法分类号: Q503;Q513.1;Q782 **文献标识码:** A

Construction and identification of adenovirus vector of human hypoxia-inducible factor-1α fused with enhanced green fluorescent protein

XIE Yi-jun, WANG Yue-gang, GUO Shou-gui, TONG Kai, WU Ping-sheng (Department of Cardiology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To construct adenovirus vector containing the enhanced green fluorescent protein (EGFP)-HIF-1 alpha gene for studying therapeutic angiogenesis of coronary heart disease. **Methods** Human HIF-1α cDNA obtained from the plasmid pcDNA3.1(+)-HIF-1 alpha with double digestion of *Kpn* Ⅰ and *Apa* Ⅰ was cloned into plasmid pEGFP-C1. EGFP-HIF-1 alpha cDNA obtained from pEGFP-C1 with double digestion of *Nhe* Ⅰ and *Apa* Ⅰ was cloned into plasmid pShuttle2. The expression cassette containing EGFP-HIF-1 alpha cDNA was obtained from the recombinant pShuttle2-EGFP-HIF-1 alpha with double digestion of PI-*Sce* Ⅰ and I-*Ceu* Ⅰ, then ligated to Adeno-X Viral DNA. The recombinant adenoviral plasmid was identified and transfected into the adenoviral packaging cell HEK293 by lipofectamine2000. The recombinant adenovirus was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) and the titer was determined. **Results** The recombinant pAdeno-EGFP-HIF-1 alpha was correctly constructed and confirmed by restriction endonuclease analysis and PCR amplification. The transfected HEK293 cells were lysed by freeze-thawing to obtain the recombinant adenovirus in the lysate. The PCR product of the lysate confirmed the presence of recombinant adenovirus. The viral titer was 2×10^9 nfu/ml. **Conclusion** The recombinant adenovirus containing the EGFP-HIF-1 alpha gene was successfully constructed. It provides the further appreciable foundation of HIF-1 alpha gene therapy for coronary heart disease.

Key words: hypoxia-inducible factor-1 alpha; enhanced green fluorescent protein; gene therapy

低氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是一种在体内广泛存在的由低氧等诱导细胞产生的具有转录活性的核蛋白,由α和β亚基组成,两亚基结合才有活性,它能与靶基因的缺氧反应元件(hypoxia response element, HRE)结合促进血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、血管生成素-2(an-

基金项目:国家自然科学基金(30370587)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370587)
作者简介:谢宜军(1977-),男,山东省沂源县人,硕士研究生,医师,主要从事冠心病血管新生基因治疗方面的研究。电话:(0750)5108826,E-mail: sj801229@fimmu.com
通讯作者:吴平生,E-mail: wps@fimmu.com
收稿日期:2006-02-22;修回日期:2006-06-26

giopoietin-2, Ang-2)、血管生成素-4(angiopoietin-4, Ang-4)等一系列靶基因的转录,对血管新生等起极其关键的调节作用。低氧诱导因子-1alpha(HIF-1α)受低氧诱导,决定 HIF-1 的活性。绿色荧光蛋白(green fluorescent protein)是一种来源于水母体内的生物发光物质,增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)是 GFP 的突变体,其荧光比前者强 100 倍,是基因工程中常见的标记物。为更直观的研究人 HIF-1α 基因及其靶基因的表达对冠心病的血管新生作用,我们构建了携 EGFP 的人 HIF-1α 腺病毒表达载体。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂、试剂盒 内切酶 *Apa* Ⅰ、*Nhe* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ、*Xho* Ⅰ(TaKaRa),*Pac* Ⅰ(NEB),PI-*Sce* Ⅰ、I-*Ceu* Ⅰ(BD. Clontech);Marker(TaKaRa, SNBC),T_4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶(TaKaRa);DMEM 培养基(Gibco),Opti-MEM、Lipofectamine 2000(Invitrogen),胎牛血清(杭州四季清);超纯质粒提取试剂盒(Qiagen)。

1.1.2 质粒、菌株、细胞系 Adeno-X™ Adenoviral Expression Systems(BD. Clontech):包括有 pShuttle2、Adeno-X™ Viral DNA 等,重组质粒 pcDNA3.1(+)-HIF-1α(本室构建),pEGFP-C1(clotech),大肠杆菌 DH5α(本室保存),HEK293 细胞(中科院上海细胞所)。

1.1.3 引物 HIF-1α cDNA 片段引物(博亚公司合成),片段 1 上游:5′-GACACAGAAGCAAAGAACCC-3′,下游:5′-TCAAAGCGACAGATAACACG-3′,PCR 产物片段长 460 bp;片段 2 上游引物:5′-CCAGACGATCATGCAGCTAC-3′,下游:5′-GGTTTCTGCTGCCTTGTATAG-3′,PCR 产物片段长 214 bp。BD. Clontech 所提供引物(该 2 个引物分别与穿梭质粒表达盒及骨架质粒的部分序列结合)上游:5′-TAGTGTGGCGGAAGTGTGATGTTGC-3′,下游:5′-AGATCTGAGCTTTCGCTACC-3′,PCR 产物片段长 287 bp。

1.2 方法

1.2.1 重组 pEGFP-HIF-1α-C1 质粒构建 以 *Kpn* Ⅰ、*Apa* Ⅰ双酶切 pcDNA3.1(+)-HIF-1α 及 pEGFP-C1,胶回收 HIF-1α 及 pEGFP-C1 片断,连接转化感受态 DH5α,卡那霉素抗性筛选单菌落扩增,提取质粒,行酶切及 PCR 鉴定。

1.2.2 重组穿梭质粒(pShuttle2-EGFP-HIF-1α)构建 以 *Nhe* Ⅰ、*Apa* Ⅰ双酶切 pEGFP-HIF-1α-C1 及 pShuttle2,胶回收 EGFP-HIF-1α 片段及 pShuttle2 酶切片段,连接转化感受态,卡那霉素抗性筛选单菌落扩增,提取质粒,重组 pShuttle2-EGFP-HIF-1α 有 2 个 *Kpn* Ⅰ酶切位点,行 *Kpn* Ⅰ单酶切及 *Nhe* Ⅰ、*Apa* Ⅰ双酶切和 PCR 鉴定。

1.2.3 重组腺病毒骨架质粒(pAdeno-EGFP-HIF-1α)的构建 以 PI-*Sce* Ⅰ、I-*Ceu* Ⅰ双酶切 pShuttle2-EGFP-HIF-1α,胶回收含有 CMV-EGFP-HIF-1α 片段,与线性化的腺病毒骨架质粒 pAdeno-X™ Viral DNA 作连接,以 *Swa* Ⅰ酶切消除未含有目的基因的 Adeno-X™ Viral DNA 自身环化质粒,转化感受态 DH5α,氨苄青霉素抗性 LB 平板筛选、扩增,以 BD. Clontech 所提供的引物及 HIF-1α 两对引物作菌液 PCR 鉴定,提取重组腺病毒质粒 pAdeno-EGFP-HIF-1α,予 PCR 鉴定及 *Xho* Ⅰ酶切鉴定。

1.2.4 重组腺病毒包装 HEK293 细胞转染前 1 d 细胞传代,使得转染时细胞汇合率为 60% ~ 70%。重组腺病毒质粒 pAdeno-EGFP-HIF-1α 约 3 μg 以 *Pac* Ⅰ线性化,乙醇沉淀法纯化,脂质体法常规转染 HEK293 细胞,24 h 后在绿色荧光显微镜下观察转染效率,待大部分细胞出现细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)后收集细胞,予 200 μl PBS 重悬,-70 ~ 37 ℃反复冻融细胞 3 次,离心收集上清,此称为病毒原液,-20 ℃保存。

1.2.5 病毒扩增、滴度测定及鉴定 取上述细胞裂解液重新感染 HEK293 细胞,同上待大部分细胞 CPE 完全形成后,收集细胞,PBS 重悬,冻融细胞,离心收集上清,采用 CPE 法测定病毒滴度,方法见 Adeno-X™ Adenoviral Expression Systems 详细说明,重组病毒称 Adeno-EGFP-HIF-1α,取 2 μl 病毒液,以上述 3 对引物行 PCR 鉴定。

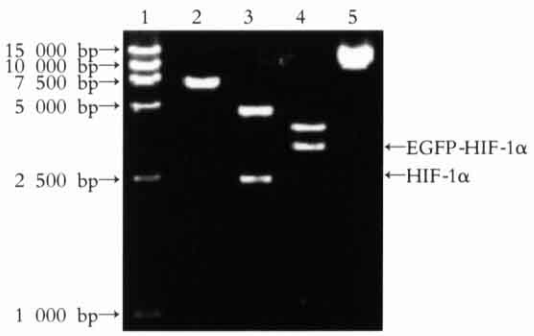
2 结果

2.1 重组 pEGFP-HIF-1α-C1 质粒的鉴定

本室构建质粒 pcDNA3.1(+)-HIF-1α 的 HIF-1α 在 *Kpn* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ之间,*Kpn* Ⅰ、*Apa* Ⅰ双酶切 pcDNA3.1(+)-HIF-1α 得到目的片断,与经 *Kpn*Ⅰ、*Apa*Ⅰ酶切后的穿梭质粒 pEGFP-C1 连接,经 PCR 鉴定成功后提取质粒,经酶切鉴定成功,*Kpn*Ⅰ、*Apa*Ⅰ双酶切可见约 4 700、2 500 bp 两片断;*Kpn*Ⅰ单酶切可见 7 200 bp 片断。HIF-1α 片断 1、2 区 PCR 产物分别为 460、214 bp。

2.2 重组穿梭质粒 pShuttle2-EGFP-HIF-1α 的鉴定

以 *Nhe* Ⅰ、*Apa* Ⅰ双酶切 pEGFP-HIF-1α-C1 得到 EGFP-HIF-1α 片断,与经上述两酶切的 pShuttle2 片断连接经 PCR 鉴定成功后提取质粒,*Nhe* Ⅰ、*Apa* Ⅰ双酶切可见约 4 000、3 300 bp 片断,其中 3 200 bp 片断为 EGFP-HIF-1α,*Kpn* Ⅰ酶切可见4 800、2 500 bp 片断,其中 2 500 bp 片断为 HIF-1α,*Apa* Ⅰ双酶切见 7 300 bp 片段,为线性化 pShuttle2-EGFP-HIF-1α(图 1),酶切鉴定正确;以 HIF-1α 的 2 对引物行 PCR 鉴定,扩增出约 460、214 bp 片断,与预期值一致。

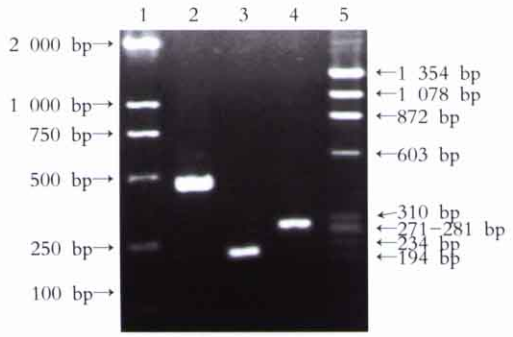


1:DL15000 标准;2:pShuttle2-EGFP-HIF-1α *Apa* Ⅰ酶切;3:pShuttle2-EGFP-HIF-1α *Kpn* Ⅰ酶切;4:pShuttle2-EGFP-HIF-1α *Nhe* Ⅰ、*Apa* Ⅰ双酶切;5:pShuttle2-EGFP-HIF-1α 质粒

图 1 pShuttle2-EGFP-HIF-1α 酶切鉴定

2.3　重组腺病毒质粒 pAdeno-EGFP-HIF-1α 鉴定

提取重组腺病毒质粒 pAdeno-EGFP-HIF-1α 以 *Xho* Ⅰ 酶切，酶切片段有约 14 500、8 046、5 080、2 465、1 435、595 bp 等，与预期酶切片断大小符合，酶切鉴定正确；分别以 BD Clontech 公司所提供的引物和 HIF-1α 的两对引物行 PCR 鉴定，扩增出 287、460、214 bp 的 DNA 片段（图 2），与预期值一致。



1：DL2000 标准；2：pAdeno-EGFP-HIF-1α PCR 产物（460 bp）；3：pAdeno-EGFP-HIF-1α PCR 产物（214 bp）；4：pAdeno-EGFP-HIF-1α PCR 产物（287 bp）；5：ΦX174-*Hae*Ⅲ 酶切标准

图 2　pAdeno-EGFP-HIF-1α PCR 鉴定

2.4　重组腺病毒质粒 pAdeno-EGFP-HIF-1α 转染 HEK293 细胞结果

pAdeno-EGFP-HIF-1α 以 Lipofectamine2000 转染 HEK293 细胞 24 h 后，绿色荧光显微镜下观察，转染效率约 30%（图 3）。

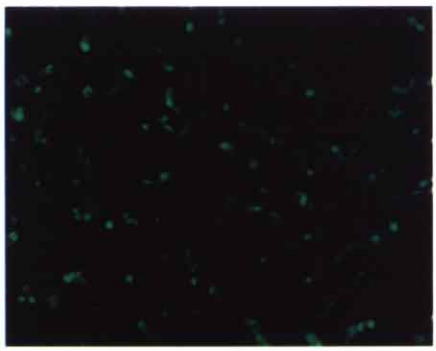


图 3　pAdeno-EGFP-HIF-1α 转染 HEK293 细胞
（荧光显微镜 ×100）

2.5　重组腺病毒 Adeno-EGFP-HIF-1α 的鉴定及滴度测定

重组腺病毒 Adeno-EGFP-HIF-1α 以 BD Clontech 公司所提供的引物行 PCR 和 HIF-1α 的 2 对引物鉴定，成功扩增出 287、214、460 bp 的目的条带，说明重组病毒成功。测病毒原液滴度为 3×10^{7} nfu/L，扩增后的病毒滴度为 2×10^{9} nfu/L。

3　讨论

腺病毒感染效率高，腺病毒基因不整合宿主细胞染色体，表达时间短（1－2 周），极少发生插入突变，是基因治疗常用的基因转移载体。常用的腺病毒载体系统是人类血清 5 型腺病毒经过改造去除 E1 和/或 E3 基因后的一种基因转移载体，E1 基因缺失的腺病毒不能自主复制，只能在可反式提供 E1 基因产物的包装细胞如 293 细胞等的帮助下进行繁殖。目前重组缺陷型腺病毒正被应用于促血管新生Ⅱ/Ⅲ期临床实验，已有Ⅱ期临床实验证实携带血管内皮生长因子（VEGF）、成纤维细胞生长因子（FGF）等基因的腺病毒载体可促进治疗性血管新生从而改善缺血性心脏病患者的临床症状[1,2]。EGFP 是基因工程中常用的标记物，不影响目的基因的效应，其突出的优点在于 EGFP 与蛋白偶联后可在活体细胞或生物体内动态观察目标蛋白的表达、分布及其效应[3]。

促血管新生因子研究较多的有 VEGF、FGF 等，以缺陷型腺病毒、腺相关病毒或质粒为载体通过冠脉内或心肌内注射，在治疗组可观察到心脏负荷实验、血管造影、心肌灌注显像及临床症状等方面的改善[4]。然而，有确凿的资料显示，VEGF 可导致新生血管组织水肿、血管通透性增高、易发生炎症反应等，甚至可能促进动脉硬化进展，毛细血管过度增殖及血管瘤形成等，FGF 治疗则与蛋白尿有关[5-7]。近年发现，HIF-1α 是低氧反应中的上游调控转录因子，能与靶基因的 HRE 结合促进 VEGF、Ang-2、Ang-4、EPO 等 60 余基因的转录。实验表明 HIF-1α 可诱导具有完整生理功能的血管新生，在冠心病血管新生的基因治疗研究中，HIF-1α 被认为是最具有临床治疗前景的基因之一[8,9]。动物实验表明 HIF-1α 的基因治疗可促进血管新生，促进缺血侧支血管灌注，增加毛细血管密度，相比 VEGF、FGF 等在组织灌注、血管新生效果更显著[10,11]。HIF-1α 在血管新生的可能优势在于 HIF-1α 可以促进 VEGF、Ang-2、Ang-4、EPO 的转录，而 VEGF 可以促进内皮细胞的增殖，但新生的血管渗透性高，Ang-2、Ang-4 可促进内皮细胞和血管平滑肌的增殖，减少 VEGF 的新生血管的渗透性，两者在血管新生具有累加作用，但可以生成具有生理活性的不渗漏的血管[7,10,11]；而且 HIF-1α 诱导 EPO 升高具有减少缺血再灌注损伤的作用[12]。我们成功构建携 EGFP 的人 HIF-1α 腺病毒载体，可在活体细胞或生物体内动态观察 HIF-1α 蛋白的表达、分布，为研究 HIF-1α 的表达及其对冠心病的血管新生作用奠定了基础。

参考文献：

[1] Relph K, Harrington K, Pandha H. Recent developments and current status of gene therapy using viral vectors in the United Kingdom [J]. BMJ, 2004, 329(7470): 839－842.

[2] Hedman M, Hartikainen J, Syvanne M, *et al*. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT)[J]. Circulation, 2003, 107(21): 2677-2683.

[3] Bian G, Shin S W, Cheon H M, *et al*. Transgenic alteration of Toll immune pathway in the female mosquito Aedes aegypti[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(38): 13568-13573.

[4] Grines C L, Watkins M W, Helmer G, *et al*. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris[J]. Circulation, 2002, 105(11): 1291-1297.

[5] Fam N P, Verma S, Kutryk M, *et al*. Clinician guide to angiogenesis[J]. Circulation, 2003, 108(21): 2613-2618.

[6] Celletti F L, Waugh J M, Amabile P G, *et al*. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression[J]. Nat Med, 2001, 7(4): 425-429.

[7] 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.

[8] Giaccia A, Siim B G, Johnson R S. HIF-1 as a target for drug development[J]. Nat Rev Drug Discov, 2003, 2(10): 803-811.

[9] Khan T A, Sellke F W, Laham R J. Gene therapy progress and prospects: therapeutic angiogenesis for limb and myocardial ischemia[J]. Gene Ther, 2003, 10(4): 285-291.

[10] Yamakawa M, Liu L X, Date T, *et al*. Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors[J]. Circ Res, 2003, 93(7): 664-673.

[11] Vincent K A, Shyu K G, Luo Y, *et al*. Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1alpha/VP16 hybrid transcription factor[J]. Circulation, 2000, 102(18): 2255-2261.

[12] Prass K, Scharff A, Ruscher K, *et al*. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin[J]. Stroke, 2003, 34(8): 1981-1986.

(编辑 龙 亮)

(上接116页)

2 结果

2.1 Dukes分期

62例结直肠癌中，直肠癌39例，结肠癌23例。高分化腺癌23例，中分化腺癌28例，黏液腺癌11例。根据1978年杭州会议提出的中国改良Dukes分期法，Ⅲ、Ⅳ期病例占83.4%。

2.2 透明大切片立体显微镜观察结果

微血管密度计数在大肠癌远端2 cm处肠黏膜与远端肿瘤组织、肿瘤远近端癌组织与中心处癌组织、肿瘤近端癌组织与肿瘤近端2,4 cm处正常肠黏膜之间均有非常显著的差异($P<0.01$)(表1)；在高分化、中分化和黏液腺癌中无显著差异($P>0.05$)。高分化腺癌的微血管密度较高，而黏液腺癌的微血管密度较少。

表1 62例结直肠癌标本6个部位血管密度($\bar{x}\pm s$)

部位	n	$\bar{x}\pm s$	$s_{\bar{x}}$	CV
距离肿瘤远端2 cm正常肠黏膜	62	21 810.2±6 012.4	1 074.9	26.51
肿瘤远端癌组织	62	34 181.5±10 676.5[a]	1 775.9	31.35
肿瘤中心组织	62	8 000.9±4 820.4[b]	0 896.0	60.91
肿瘤近端癌组织	62	36 845.5±12 404.8[c]	2 094.2	34.56
距离肿瘤近端2 cm正常肠黏膜	62	25 686.4±7 203.0	1 240.0	27.62
距离肿瘤近端4 cm正常肠黏膜	62	21 604.4±6 562.5	1 140.9	30.93

a：$P<0.01$，与距离肿瘤远端2 cm正常肠黏膜比较；b：$P<0.01$，与肿瘤中心组织比较；c：$P<0.01$，与肿瘤近端癌组织比较。

3 讨论

3.1 结直肠癌的发生、发展及恶性程度与微血管密度的关系

肿瘤的血管形成是实体肿瘤生长、侵袭、转移的基本条件[1]。在无血管状态下，大部分肿瘤生长的直径不超过1 mm[2]。本组62例各种分化程度的结直肠癌镜下微血管密度在癌肿远近端瘤组织内显著高于癌肿远近端肠黏膜，表明结直肠癌的发生和发展与血管形成密切相关，说明结直肠癌的发生和发展必需依赖于血管形成。

微血管密度用于肿瘤恶性程度的判定，现争议较多。从理论上讲，肿瘤血管密度增多为肿瘤细胞提供了足够的营养物质，使瘤细胞骤然增加。同时血管形成增加了肿瘤细胞进入血液循环的可能性，瘤细胞在血液循环中生长，继而附着在转移脏器上生长，最终导致肿瘤侵袭和播散。微血管密度越高，发生转移的倾向越大。Saito等[3]用微血管密度评估发生肝脏转移的准确率为95%。本研究结果显示，在立体显微镜下微血管密度计数在结直肠癌不同病理组织类型中未见有显著差异。Shan等[4]用测定微血管密度对进展期和早期结直肠癌的研究结果也显示，微血管密度未见显著差异。因此微血管密度对结直肠癌的恶性程度判断有待进一步研究和探讨。

3.2 结直肠癌微血管密度的临床应用

基于肿瘤微血管和正常血管在结构上的差异性，肿瘤微血管密度可作为血管介导治疗的最佳靶位。进行恶性肿瘤介导治疗有多种方法，如采用血管生长抑制剂、光动力学、化学药物、加温、细胞因子等。我们对结直肠癌微血管定密度的测定，可为结直肠癌术后的血管介导治疗，观察肿瘤微血管密度的改变，计算及筛选作用剂量，设计有关前瞻性研究奠定一定基础。

关键词：结肠肿瘤；直肠肿瘤；血管密度

中图法分类号：R730.21 文献标识码：B

参考文献：

[1] Acikalin M F, Oner U, Topcu I, *et al*. Tumour angiogenesis and mast cell density in the prognostic assessment of colorectal carcinomas[J]. Dig Liver Dis, 2005, 37(3): 162-169.

[2] Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth[J]. Semin Cancer Biol, 1992, 3(2): 65-71.

[3] Saito H, Tsujitani S. Angiogenesis, angiogenic factor expression and prognosis of gastric carcinoma[J]. Anticancer Res, 2001, 21(6B): 4365-4372.

[4] Shan Y S, Lee J C, Chow N H, *et al*. Immunohistochemical microvessel count is not a reliable prognostic predictor in colorectal carcinoma[J]. Hepatogastroenterology, 2003, 50(53): 1316-1320.

(编辑 陈聪连)