文章编号:1000-5404(2007)07-0595-04

论著

HIF-1α基因转染对β-淀粉样蛋白25-35诱导原代培养海马神经细胞凋亡的影响

刘凌云[1],柴锡庆[2],李清君[1],程桂花[2] ([1]河北医科大学基础医学院病理生理学教研室,石家庄 050017;[2]河北化工医药职业技术学院药学系,石家庄 050017)

提 要:目的 构建人类缺氧诱导因子-1α(human hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)基因真核表达载体pSNAV-HIF-1α,并观察其对β-淀粉样蛋白25-35(Aβ25-35)诱导原代培养海马神经细胞凋亡及细胞内游离钙离子浓度的影响。**方法** 采用基因重组技术,将pBSKhHIF1αT7原核表达载体上HIF-1α基因序列克隆至真核表达载体pSNAV2.0,磷酸钙共沉淀法介导转染pSNAV-HIF-1α,Aβ25-35诱导原代培养海马神经细胞凋亡。Western blot检测HIF-1α蛋白表达,流式细胞术分析细胞凋亡百分率,激光共聚焦显微镜测定细胞内游离钙离子浓度。**结果** 酶切、PCR及DNA测序结果均表明成功构建了重组质粒pSNAV-HIF-1α,磷酸钙共沉淀法介导的pSNAV-HIF-1α质粒转染显著增加了海马神经细胞HIF-1α蛋白表达($P<0.05$),同时可显著降低Aβ25-35诱导海马神经细胞凋亡百分率及细胞内游离钙离子浓度上调($P<0.05$)。**结论** 缺氧诱导因子-1α基因转染可能通过抑制细胞内游离钙离子浓度上调使海马神经细胞对Aβ25-35产生抗凋亡作用。

关键词: 缺氧诱导因子-1α;原代培养;海马;转染
中图法分类号: R322.81; R329.28; R394.3 **文献标识码:** A

Effect of human hypoxia inducible factor-1α gene transfection on apoptosis of Aβ25-35 induced hippocampal neurons of primary culture

LIU Ling-yun[1], CHAI Xi-qing[2], LI Qing-jun[1], CHENG Gui-hua[2] ([1]Department of Pathophysiology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, [2]Faculty of Pharmacy, Hebei Chemical & Pharmaceutical Vocational Technology College, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: Objective To construct the eukaryotic expression vector for human hypoxia inducible factor-1α gene (pSNAV-HIF-1α), and to investigate the apoptosis and intracellular calcium concentration of the transfected Aβ25-35 induced hippocampal neurons of primary culture. **Methods** Human hypoxia inducible factor-1α gene from pBSKhHIF1αT7 was inserted into pSNAV2.0 by the method of gene recombination, then the constructed vector was transfected into hippocampal neurons of primary culture and followed by Aβ25-35 for treatment. Empty pSNAV2.0 vector was treated the same way as pSNAV-HIF-1α as a control. The expression level of HIF-1α protein was assayed by Western blotting. Apoptosis was detected by flow cytometry. Intracellular calcium concentration was determined by laser scanning confocal microscopy with Fluo-3/AM as the fluorescent dye. **Results** It was shown that pSNAV-HIF-1α was successfully constructed by restriction enzyme digestion, PCR and DNA sequencing. The expression level of HIF-1α protein was significantly increased in transfected hippocampal neurons of primary culture ($P<0.05$). The up-regulation of apoptosis and intracellular calcium concentration induced by Aβ25-35 were significantly decreased in transfected hippocampal neurons of primary culture ($P<0.05$). **Conclusion** Human hypoxia inducible factor-1α gene transfection could inhibit Aβ25-35 induced apoptosis of hippocampal neurons of primary culture by suppressing the up-regulation of intracellular calcium concentration.

Key words: hypoxia inducible factor-1α; primary culture; hippocampus; transfection

作者简介: 刘凌云(1978-),男,河北省邢台市人,博士研究生,主要从事老年性痴呆病因及发病机制方面的研究。电话:(0311)85110002
通讯作者: 柴锡庆,电话:(0311)85110002,E-mail:xqchai@163.com
收稿日期: 2006-06-21;**修回日期:** 2006-11-28

阿尔茨海默病（Alzheimer's disease，AD）是老年人常见的中枢神经系统退行性疾病，临床表现为进行性痴呆、认知障碍和神经、精神异常。主要的病理学特征包括脑皮质广泛性萎缩，神经细胞之间形成大量老年斑和神经细胞内出现神经元纤维缠结。老年斑的主要成分是纤维状沉积的β-淀粉样蛋白（β amyloid peptide，Aβ），其被认为是AD形成和发展的关键因素。有资料证实，铁螯合剂能够通过诱导缺氧诱导因子-1α（hypoxia inducible factor-1α，HIF-1α）表达增加从而防治Aβ对皮层神经细胞的损伤作用[1]，提示HIF-1α具有神经保护作用，但其作用机制至今尚未完全阐明。因此，本实验构建了人类HIF-1α基因真核表达载体pSNAV-HIF-1α，并转染原代培养的海马神经细胞，检测其对Aβ25-35诱发海马神经细胞凋亡的影响，旨在为今后深入研究HIF-1α神经保护作用的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

含人类缺氧诱导因子-1α基因质粒pBSKhHIF1αT7由瑞士苏伊士大学Gassmann教授惠赠，真核表达载体pSNAV2.0购自本元正阳基因技术有限公司。DNA纯化回收试剂盒和质粒DNA小量纯化试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司；限制性内切酶、*Taq*酶、T_4 DNA连接酶及PVDF膜购自华美公司；PCR试剂盒购自Promega公司；MARKER购自TaKaRa公司；DMEM购自Invitrogen公司；胎牛血清、马血清购自HyClone公司；阿糖胞苷、Aβ25-35、抗人HIF-1α单克隆抗体及多聚赖氨酸购自Sigma公司；二抗购自北京鼎国生物技术有限责任公司；DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 pSNAV-HIF-1α载体的构建、鉴定及纯化

采用*Kpn* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切pBSKhHIF1αT7质粒获取人类HIF-1α cDNA全长，插入至pSNAV2.0质粒*Kpn* Ⅰ、*Bgl* Ⅱ位点，得到pSNAV-HIF-1α。采用限制性内切酶双酶切、PCR技术及DNA测序鉴定含人类HIF-1α基因的真核表达载体pSNAV-HIF-1α。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成，引物序列如下，上游引物：5′-AGAAACCACCTA TGACCT-3′，下游引物：5′-TTGGCAAG CATCC TGTAC-3′，扩增片段为292 bp。DNA测序由本元正阳基因技术有限公司完成。

1.3 海马神经细胞培养及转染

取新生1 d内的SD乳鼠（购自本校实验动物中心），75%乙醇浸泡5 min后，在超净工作台中取脑，仔细剥除脑膜及血管，分离出海马并剪碎，加入0.125%胰蛋白酶溶液37 ℃消化20 min，用含10%胎牛血清、5%马血清DMEM培养基终止消化，1 000 r/min离心5 min，弃上清，用上述血清培养基重新悬浮细胞沉淀，吹打均匀，用200目不锈钢网过滤制成单细胞悬液，以5×10^5/ml接种于预先用多聚赖氨酸包被的直径35 mm塑料培养皿中，每皿2 ml，每隔2～3 d换液1次，培养第4天加入终浓度为10 μmol/L的阿糖胞苷作用1～2 d，以抑制非神经细胞的繁殖。培养第6天采用磷酸钙共沉淀方法将pSNAV-HIF-1α质粒转入海马神经细胞，同时设立空载体pSNAV2.0对照，详细步骤参见分子克隆[2]。

1.4 Western blot检测HIF-1α蛋白的表达

转染3 d后收集转染pSNAV-HIF-1α的原代培养海马神经细胞（HIF-1α组）、转染空载体pSNAV2.0的原代培养海马神经细胞（载体组）以及未转染的原代培养海马神经细胞（正常组），提取细胞核蛋白，考马斯亮蓝蛋白定量。按100 μg/孔加样量计算应加细胞核提取物的体积。7.5%十二烷基硫酸钠-聚丙烯凝胶电泳分离蛋白后，100 V电转移3 h至PVDF膜上，5%脱脂奶粉封闭过夜，PBS清洗PVDF膜。加入小鼠抗人HIF-1α（1∶1 000）单克隆抗体，4 ℃孵育过夜，PBS清洗。加入二抗（1∶2 000）HRP兔抗小鼠抗体，37 ℃孵育1 h，PBS清洗。DAB法显色，照相，以labworks4.0软件测定积分光密度进行统计分析。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡百分率

转染3 d后将HIF-1α组细胞、载体组细胞以及正常组细胞分别与10 μmol/L的Aβ25-35作用24 h（分别简称HIF-1α+Aβ组、载体+Aβ组、正常+Aβ组），以0.25%胰酶消化处理细胞，离心收集细胞，以pH 7.4的PBS制成单细胞悬液，浓度为1×10^6/ml。加入两倍体积在-20 ℃预冷的70%乙醇固定细胞1 h，PBS洗涤1次。加入含有50 mg/ml的碘化吡啶和100 mg/ml的无DNA酶污染的RNA酶，PBS染色液，置4 ℃避光染色1 h，上机检测。

1.6 激光共聚焦技术检测细胞内Ca^{2+}荧光强度

吸去塑料培养皿中的培养基，将细胞用D-Hanks液清洗3次，用终浓度为5 μmol/L的Fluo-3/AM在37 ℃恒温避光条件下负载30 min，然后吸出染液，再以D-Hanks液清洗3次后在激光共聚焦显微镜下检测细胞荧光强度，激发光选用488 nm，发射光为530 nm。随机选取结构清楚，胞突完整的神经细胞，每组扫描20个以上细胞，所得图像和数据由计算机收集分析，即得每个细胞内Ca^{2+}的荧光强度值，荧光强度值越大，则细胞内游离Ca^{2+}浓度越高。

1.7 统计学处理

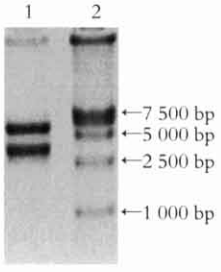
数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件，多组间比较采用单因素方差分析，两样本比较采用t检验。

2 结果

2.1 pSNAV-HIF-1α酶切图谱、PCR及DNA测序结果

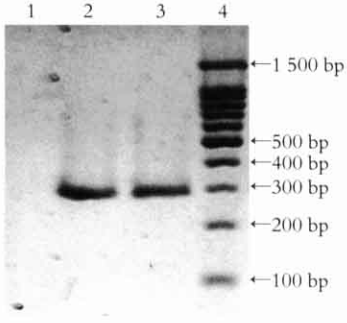
酶切鉴定：由于pSNAV-HIF-1α的构建系通过*Bam*H Ⅰ和*Bgl* Ⅱ位点融合，从而使HIF-1α基因进入载体pSNAV2.0，原来的*Bgl* Ⅱ位点消失，所以利用*Kpn* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切pSNAV-HIF-1α后琼脂糖凝胶电泳鉴定，可以产生3.8 kb和7.0 kb两条片段，其中3.8 kb片段包含HIF-1αcDNA全长（图1）。PCR法鉴定：以pBSKhHIF1αT7和pSNAV-HIF-1α为模板，引物浓度

0.2 μmol/L，扩增条件 94 ℃预变性 5 min，然后 94 ℃变性 30 s、56 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 1 min，共 30 个循环，最后 72 ℃延伸 7 min，取 2 μl 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，扩增片段为 292 bp（图 2）。并且 DNA 测序亦证实人类 HIF-1αcDNA 成功插入至载体 pSNAV2.0。



1：*Bam*H Ⅰ/*Kpn* Ⅰ 双酶切 pSNAV-HIF-1α；2：DNA 标准

图 1　重组质粒 pSNAV-HIF-1α 酶切鉴定

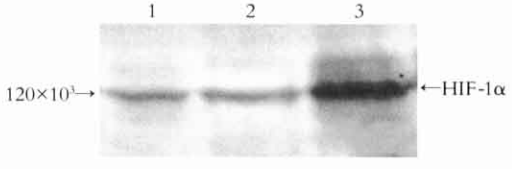


1：阴性对照组；2：pBSKhHIF1αT7 模板组；3：pSNAV-HIF-1α 模板组；4：DNA 标准

图 2　重组质粒 pSNAV-HIF-1α PCR 鉴定

2.2　转染细胞 HIF-1α 蛋白的表达

Western blot 检测结果表明，各组细胞中均表达相对分子量为 120×10^3 的 HIF-1α 蛋白，但表达量不同，与正常组（812.96 ± 54.27）、载体组（859.43 ± 72.33）细胞相比，HIF-1α 组（2176.04 ± 110.56）细胞 HIF-1α 蛋白的表达量显著增加（$P<0.05$）（图 3），而载体组、正常组细胞相比 HIF-1α 蛋白表达无显著性差异（$P>0.05$）。



1：正常组；2：载体组；3：HIF-1α 组

图 3　Western blot 检测 pSNAV-HIF-1α 转染原代培养海马神经细胞 HIF-1α 蛋白的表达

2.3　HIF-1α 基因转染对 Aβ25-35 诱导细胞凋亡的影响

流式细胞分析结果表明，正常 + Aβ 组、载体 + Aβ 组细胞凋亡百分率较正常组、载体组显著升高（$P<0.05$），而 HIF-1α + Aβ 组细胞凋亡百分率较正常 + Aβ 组、载体 + Aβ 组显著降低（$P<0.05$），正常 + Aβ 组、载体 + Aβ 组细胞凋亡百分率相比无显著性差异（$P>0.05$）（表 1），这说明 HIF-1α 能够抑制 Aβ25-35 诱导海马细胞发生凋亡。

表 1　流式细胞术检测细胞凋亡

组别	凋亡百分率（%，$\bar{x}\pm s$）
正常组	5.27 ± 1.06
载体组	6.35 ± 1.34
正常 + Aβ 组	31.25 ± 5.14^{abc}
载体 + Aβ	30.48 ± 4.39^{abc}
HIF-1α + Aβ 组	12.39 ± 2.56

a：$P<0.05$，与正常组比较；b：$P<0.05$，与载体组比较；c：$P<0.05$，与 HIF－α + Aβ 组比较

2.4　HIF-1α 基因转染对 Aβ25-35 诱导细胞内 Ca^{2+} 荧光强度上调的影响

以 Fluo-3/AM 荧光染色，在激光共聚焦显微镜下检测结果表明，正常 + Aβ 组、载体 + Aβ 组细胞内 Ca^{2+} 荧光强度上调［（196.42 ± 22.38）、（209.27 ± 19.63）］显著高于正常组、载体组［（81.93 ± 15.36）、（69.52 ± 12.71）］（$P<0.05$），而 HIF-1α + Aβ 组细胞内 Ca^{2+} 荧光强度被抑制到（136.42 ± 17.52）显著低于正常 + Aβ 组、载体 + Aβ 组（$P<0.05$），正常 + Aβ 组、载体 + Aβ 组细胞内 Ca^{2+} 荧光强度相比无显著性差异（$P>0.05$），这说明 HIF-1α 能够抑制 Aβ25-35 诱导细胞内 Ca^{2+} 荧光强度（即游离 Ca^{2+} 浓度）的上调。

3　讨论

缺氧诱导因子-1 是在缺氧环境下存在于哺乳动物体内一种真核转录因子，由 α，β 亚基组成，α 亚基在功能调控方面起主要作用，β 亚基在细胞内稳定表达[3]。常氧情况下，HIF-1α 通过泛素-蛋白酶体途径降解，其半衰期 <5min。HIF-1α 最先由 Semenza 等[4]于 1992 年在缺氧诱导的细胞核抽提物中发现，广泛存在于人和动物的多种肿瘤细胞中，可调控一系列靶基因如促红细胞生成素、血管内皮生长因子、糖酵解酶和一些涉及细胞生存蛋白质等的转录，同能量代谢、肿瘤治疗、凋亡等密切相关[5-7]。

本研究成功构建了携带人类 HIF-1α 基因的真核表达载体 pSNAV-HIF-1α，经磷酸钙共沉淀介导的质粒转染技术将外源性 HIF-1α 基因导入原代培养海马

神经元细胞3 d后,海马神经细胞表达HIF-1α蛋白明显增加,与转染pSNAV2.0空载体及未转染组比较有显著性差异,说明细胞能够高效表达外源性HIF-1α基因。10 μmol/L的Aβ25-35作用于HIF-1α组海马神经细胞后诱导的细胞凋亡百分率显著低于载体+Aβ组及正常+Aβ组,而载体+Aβ组和正常+Aβ组凋亡百分率相比无显著性差异,表明导入了HIF-1α基因的海马神经细胞对Aβ25-35诱导凋亡的敏感性降低,即产生了抗凋亡效应。这提示通过转染HIF-1α基因使细胞高效表达HIF-1α蛋白,能够拮抗Aβ25-35的促凋亡作用。进一步研究证实Aβ25-35诱导海马神经细胞凋亡的同时,细胞内游离钙离子浓度显著上调,预转染pSNAV-HIF-1α质粒后,细胞内游离钙离子浓度上调被显著抑制,提示HIF-1α蛋白能够拮抗Aβ25-35诱导的细胞内游离钙离子浓度的升高,推测其机制可能与以下因素有关:即HIF-1α通过上调细胞质内质网钙泵SERCA2蛋白表达和增强线粒体的钙离子缓冲能力,促进细胞内钙离子向内质网、线粒体转移,降低细胞内游离钙离子浓度[8];此外,HIF-1α尚能够下调细胞膜非典型L型钙通道表达,这可能引起钙离子内流减少[9],从而发挥调节细胞内游离钙浓度的作用。

目前普遍认为胞内游离钙离子浓度升高是细胞凋亡的一个重要事件,其可以通过线粒体依赖的和非线粒体依赖的2种途径启动细胞凋亡。钙离子顺电化学势进入线粒体,促使线粒体膜上的渗透性转移孔开放,细胞色素C等释放出线粒体进入细胞浆,并直接激活caspase凋亡级联,引发细胞凋亡;另一方面,游离钙离子浓度上调也可直接激活内源性核酸内切酶,造成DNA的剪切损伤,加速凋亡的发生。因此本研究认为,HIF-1α抗Aβ25-35诱发原代培养海马神经细胞凋亡作用可能与降低细胞内游离钙浓度,从而抑制细胞色素C释放及内源性核酸内切酶活性有关。并且资料证实在鳞癌细胞HIF-1α可以通过激活糖酵解酶,降低代谢耗氧,减少活性氧产生,抑制细胞色素C释放及caspase凋亡级联反应,发挥抗凋亡作用[10],与本实验结果一致。

近年来国外学者纷纷证实HIF-1α能够减弱氧化应激等因素对皮层神经细胞、视网膜神经细胞以及C6神经胶质瘤细胞的损伤[11-13],并且本研究亦证实通过HIF-1α基因转染使海马神经细胞高效表达HIF-1α蛋白,降低了Aβ25-35诱导细胞凋亡的敏感性,提示进一步研究HIF-1α功能,有望对AD等神经变性疾病防治提供新的方案。

参考文献:

[1] Soucek T, Cumming R, Dargusch R, *et al*. The regulation of glucose metabolism by HIF-1 mediates a neuroprotective response to amyloid beta peptide[J]. Neuron, 2003, 39(1): 43-56.

[2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 787-793.

[3] 段东晓,张桂红,邢 莹,等. 低氧预处理大鼠缺血再灌注脑组织缺氧诱导因子-1α的表达[J]. 郑州大学学报:医学版, 2004, 39(6): 974-976.

[4] Semenza G L, Wang G L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation[J]. Mol Cell Biol, 1992, 12(12): 5447-5454.

[5] Kim J W, Tchernyshyov I, Semenza G L, *et al*. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia[J]. Cell Metab, 2006, 3(3): 177-185.

[6] Griffiths E A, Pritchard S A, Welch I M, *et al*. Is the hypoxia-inducible factor pathway important in gastric cancer? [J]. Eur J Cancer, 2005, 41(18): 2792-2805.

[7] Liu X H, Yu E Z, Li Y Y, *et al*. HIF-1alpha has an anti-apoptotic effect in human airway epithelium that is mediated *via* Mcl-1 gene expression[J]. J Cell Biochem, 2006, 97(4): 755-765.

[8] Neumann A K, Yang J, Biju M P, *et al*. Hypoxia inducible factor 1 alpha regulates T cell receptor signal transduction[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(47): 17071-17076.

[9] Callinan L, McCarthy T V, Maulet Y, *et al*. Atypical L-type channels are down-regulated in hypoxia[J]. Biochem Soc Trans, 2005, 33(Pt 5): 1137-1139.

[10] Sasabe E, Tatemoto Y, Li D, *et al*. Mechanism of HIF-1alpha-dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in squamous cell carcinoma cells[J]. Cancer Sci, 2005, 96(7): 394-402.

[11] Liu J, Narasimhan P, Yu F, *et al*. Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin[J]. Stroke, 2005, 36(6): 1264-1269.

[12] Yang Y T, Ju T C, Yang D I. Induction of hypoxia inducible factor-1 attenuates metabolic insults induced by 3-nitropropionic acid in rat C6 glioma cells[J]. J Neurochem, 2005, 93(3): 513-525.

[13] Grimm C, Hermann D M, Bogdanova A, Hotop S, *et al*. Neuroprotection by hypoxic preconditioning: HIF-1 and erythropoietin protect from retinal degeneration[J]. Semin Cell Dev Biol, 2005, 16(4-5): 531-538.

(编辑 王小寒)