DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.18.011
第26卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 18
2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

文章编号:1000-5404(2004)18-1639-04

论著

人HIF1α基因重组逆转录病毒载体构建及鉴定

段小军[1],杨 柳[1],董世武[2],周 跃[3],唐康来[1],胡 鸢[1] (第三军医大学:[1]西南医院骨科,[2]基础医学部解剖学教研室,重庆市生物力学实验室,重庆 400038,[3]新桥医院骨科,重庆 400037)

提 要:目的 构建人缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)基因重组逆转录病毒载体,并观察其对NIH3T3细胞感染效率。方法 采用基因工程技术,经过2次亚克隆将HIF-1α基因片段克隆至含IRES-EGFP逆转录病毒载体上,鉴定后用脂质体法转染PT67细胞进行包装、扩增,最后用重组逆转录病毒感染NIH3T3细胞。其中采用PCR方法对重组载体进行鉴定,利用绿色荧光蛋白作为报告基因,对病毒滴度和感染效率进行检测。结果 酶切鉴定及PCR结果与HIF-1α基因重组逆转录病毒载体的预期结果一致,病毒滴度达(1.4×10^6 pfu/ml),并对NIH3T3细胞有强感染能力。结论 应用基因工程技术,成功构建了含人HIF-1α基因重组逆转录病毒载体,为应用于治疗性血管生成创造了条件。

关键词:逆转录病毒;缺氧诱导因子-1;基因克隆
中图法分类号:R782;R394-33;R394.3 文献标识码:A

Construction and identification of human hypoxia-inducible factor-1α gene recombinant retrovirus

DUAN Xiao-jun[1], YANG Liu[1], DONG Shi-wu[2], ZHOU Yue[3], TANG Kang-lai[1], HU Yuan[1]([1]Department of Joint Surgery, Southwest Hospital, [2]Department of Anatomy, College of Medicine, [3]Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct the recombinant retrovirus of human hypoxia-inducible factor-1α(HIF-1α) gene and to observe its ability to infect NIH3T3 fibroblasts. **Methods** The full-length human HIF-1α cDNA was cloned into the retroviral vector containing internal ribosomal entry site (IRES) and enhanced green fluorescent protein (EGFP) by the method of gene engineering. Then the retroviral vector with HIF-1α was transfected into PT67 cells using the lipofectine DOTAP and NIH3T3 cells was infected by the recombinant retrovirus. The target gene was detected by polymerase chain reaction (PCR). The titer and its infection rate were determined using the EGFP expression with a fluorescent microscope. **Results** Restriction endonuclease and PCR analyses confirmed that the human HIF-1α cDNA was successfully inserted into the retroviral vector. The titer of recombinant retrovirus with HIF-1α gene was 1.4×10^6 pfu/ml and the retrovirus had a strong effect on NIH3T3 cells. **Conclusion** The recombinant retrovirus containing HIF-1α gene has been successfully constructed by the method of gene engineering, which lays a foundation for the application in therapeutic angiogenesis.

Key words: retrovirus; hypoxia-inducible factor-1; gene clone

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,对缺氧状态下的血管生成(Angiogenesis)起核心调控作用,同时还具有调节细胞能量代谢,增强机体氧供给等作用[1]。HIF-1是由α亚基和β亚基组成的异二聚体,属于bHLH-PAS家族成员,其中β亚基在细胞内稳定表达,α亚基在功能调控方面起主要作用[2]。为此,本实验采用基因工程技术,体外构建表达人HIF-1α基因重组逆转录病毒载体,旨在为进一步应用HIF-1促进血管生成的研究创造条件。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌株

含人HIF-1α质粒(2.5 kb)pBSKhHIF1αT7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由创伤、烧伤与复合伤全军复合伤研究所国家重点实验室

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:段小军(1972-),男,四川省渠县人,博士研究生,主治医师,主要从事组织工程学、血管生成方面的研究,发表论文11篇。电话:(023)68754000-73007,E-mail:dxj9@163.com
通信作者:杨 柳,电话:(023)68765280,E-mail:jointsurgery@sina.com
收稿日期:2004-01-15;修回日期:2004-06-21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

馈赠。

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、PCR 试剂盒等(Takara 公司), T4 DNA 链接酶、质粒提取试剂盒(Promega 公司), 脂质体 DOTAP(Roche 公司), DMEM 培养基(Hyclone 公司), PCR 引物由上海生工公司合成。

1.3 质粒提取、酶切、连接及转化

参照文献[3]的方法进行。

1.4 带 IRES-EGFP 病毒表达载体(命名为 pIRES3)的构建及鉴定

1.4.1 IRES-EGFP 片段的制备 采用 PCR 法扩增 IRES-EGFP 片段, 以 pIRES2-EGFP 为模板, 上游: 5′-CCGGGATCCGCCCC-TCTCCCTCC-3′ 含 *Bam*HⅠ 酶切位点, 下游: 5′-TATGATCTAGAG-TCGCGG-3′含 *Xba*Ⅰ 酶切位点, 引物浓度 20 μmol/L。反应条件: 变性 94 ℃× 10 min, 然后 94 ℃× 60 s, 退火 54 ℃× 60 s, 延伸72 ℃× 90 s, 共 30 个循环, 最后 72 ℃× 10 min。片段纯化回收后, 用 *Bam*HⅠ +*Xba*Ⅰ 双酶切后琼脂糖电泳、胶回收, 产物全长 1 326 bp。

1.4.2 pIRES3 表达载体的构建 用 *Bam*HⅠ +*Xba*Ⅰ 双酶切 pLEGFP-N1 载体 16 h, 琼脂糖电泳、胶回收 5 778 bp 片段。以 1∶3 分子数比例, 混合 pLEGFP-N1 载体片段和 IRES-EGFP 片段用 T4 DNA 链接酶进行链接反应。常规方法进行 DH5α 感受态转化、铺含氨苄青霉素琼脂粉平板、挑选数个菌落扩增后提取质粒。

1.4.3 pIRES3 表达载体的鉴定 ①酶切鉴定, 选用 *Hind*Ⅲ酶切构建的重组表达载体和 pLEGFP-N1 载体; ②PCR 法鉴定, 条件同前 IRES-EGFP 片段的制备。

1.5 pIRES3/HIF-1α 载体的构建及鉴定

1.5.1 pIRES3/HIF-1α 载体的构建 ①HIF-1α cDNA 基因片段的制备: 用 *Eco*RⅤ 酶和 *Dra*Ⅰ 酶从 pBSKhHIF1αT7 载体上切下 HIF-1α 全长片段, 胶回收 2.7 kb 平滑末端 DNA 片段; ②pIRES3 载体处理: 用 *Bam*HⅠ 酶切 pIRES3 载体 16 h, 琼脂糖电泳、胶回收线性 cDNA 片段, 利用试剂盒中 T4 DNA 聚合酶平末端处理。③链接转化过程: 以 1∶10 分子数比例, 混合 pIRES3 载体片段和 HIF-1α cDNA 基因片段, 用 T4 DNA 链接酶进行连接反应 24 h(16 ℃)。常规方法进行 DH5α 感受态转化、铺含氨苄青霉素琼脂粉平板、挑选数个菌落扩增后提取质粒。

1.5.2 pIRES3/HIF-1α 载体的鉴定 ①酶切鉴定: 选用 *Xba*Ⅰ +*Stu*Ⅰ、*Xba*Ⅰ +*Hpa*Ⅰ 以及 *Hind*Ⅲ酶切构建的重组表达载体和 pIRES3, 挑选正确链接的载体进行后序实验。②PCR 法鉴定: 以 pIRES3/HIF-1α 载体为模板, pIRES3 为对照组。使用 Primer Premier 5.00 程序, 设计检测 hHIF-1α 的特异性上游: 5′-AAACCACCTATGACCTGC-3′, 下游引物: 5′-GTCGTGCTGAA TAAT-ACCACTC-3′, 引物浓度 20 μmol/L。反应条件: 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, 然后 72 ℃× 10 min。最后进行琼脂糖电泳, 目的片段为 407 bp。③DNA 测序: 上游: 5′-AAACCACCTATGACCTGC-3′, 下游: 5′-GTCGTGCTGAATAATACCACTC-3′, 由 Takara 公司完成。

1.6 重组逆转录病毒的包装、扩增

pIRES3/HIF-1α 质粒 DNA 经酚-氯仿抽提、乙醇沉淀后, 脂质体介导转染 PT67 细胞。转染方法: 培养 PT67 细胞至 75% 融合面积, 配制 A 液(基因 DNA2 μg+ HEPES 缓冲液 25 μl)、B 液(DOTAP20 μl+ HEPES 缓冲液 30 μl)混合后室温下静置 15 min, 加入 925 μl 不含血清 DMEM(高糖型)培养液静置 30 min。细胞用无血清培养液漂洗后, 加入转染混合液, 置孵箱内培养 10 h, 然后换完全培养液。培养 24 h, 加入含 G418(200 μg/ml)培养液, 待抗性克隆形成后传代培养, 加入含 G418(400 μg/ml)培养液。细胞长满瓶底后, 收集 24 h 培养液, 孔径 0.22 μm 的滤膜过滤后, 加入 10% 甘油于-70 ℃保存。

1.7 重组逆转录病毒的鉴定

裂解转染 pIRES3/HIF-1α 质粒的 PT67 细胞, 收集上清液中 DNA, 应用 PCR 法鉴定重组逆转录病毒, 条件同 1.5.2, 同时以未转染细胞为对照组。

1.8 病毒滴度测定

参照文献[4]测定, 病毒滴度(pfu/ml)=GFP 阳性细胞数×病毒稀释度/0.5 ml。

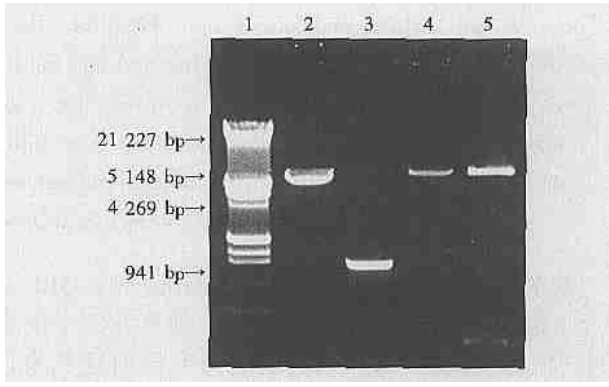
1.9 病毒感染效率的测定

在 6 孔培养板内培养 NIH3T3 细胞长至 75% 面积时, 用感染复数(Multiplicity of infection, MOI)为 10, 30, 50, 70, 100 的病毒感染, 37 ℃, CO_2 培养箱中培养 10 h, 然后加入完全培养基。48 h 在荧光显微镜下计数 GFP 阳性细胞率。

2 结果

2.1 重组质粒的构建及鉴定

2.1.1 pIRES3 表达载体的鉴定 由于 IRES-EGFP 片段和 pLEGFP-N1 载体各有 1 个 *Hind*Ⅲ酶切位点, 因此正确构建的重组载体可以产生 270 bp 的片段, 见图 1, PCR 反应也进一步证实 pIRES3 载体构建成功。



1: Marker; 2: pLEGFP-N1(*Bam*HⅠ +*Xba*Ⅰ); 3: IRES-EGFP(*Bam*HⅠ +*Xba*Ⅰ); 4: pLEGFP-N1(*Hind*Ⅲ); 5: pIRES3(*Hind*Ⅲ)

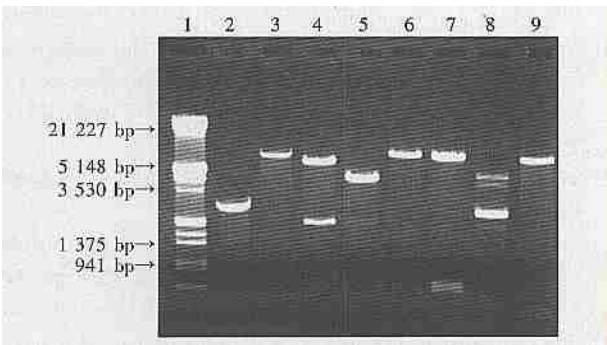
图 1 pIRES3 表达载体酶切鉴定分析

Fig 1 Analysis of the expression vector pIRES3 by double restriction endonucleases

2.1.2 pIRES3/HIF-1α 载体的鉴定 由于 pIRES3 含有 1 个 *Xba*Ⅰ 酶切位点, HIF-1α 含有 1 个 *Stu*Ⅰ 和 *Hpa*Ⅰ 酶切位点, 分别位于 HIF-1α 基因始末, 因此 *Xba*Ⅰ +*Stu*Ⅰ、*Xba*Ⅰ +*Hpa*Ⅰ 酶切正确链接载体时均可以产生 2 个片段; 而 *Hind*Ⅲ酶切可以产

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

生3 个片段; *Bgl* Ⅱ酶切正向链接质粒时仅见 1 条带, 其不足 100 bp 的小片段不明显, 而 *Bgl* Ⅱ 酶切反向链接质粒时可见 2 7 kb 与 7 1 kb 片段。综合酶切结果筛选出正确链接质粒, 弃去反向链接质粒, 见图 2; PCR 反应进一步证实 pIRES3/ HIF-1α 载体构建成功; Takara 公司测序结果显示, 重组质粒 DNA 序列与 Gene bank 数据库提供的 hHIF1α 序列完全一致, 无碱基缺失和错位。



1: Marker; 2: pIRES3; 3: pIRES3/HIF-1α; 4: Correct recombinant vector (*Xba* Ⅰ + *Stu* Ⅰ); 5: Reverse recombinant vector(*Xba* Ⅰ + *Stu* Ⅰ); 6: pIRES3 (*Xba* Ⅰ + *Stu* Ⅰ); 7: Correct recombinant vector (*Hind* Ⅲ); 8: Reverse recombinant vector (*Hind* Ⅲ); 9: pIRES3 (*Hind* Ⅲ)

图2　**pIRES3/ HIF-1α** 载体酶切鉴定分析

Fig 2　Analysis of the recombinant vector pIRES3/ HIF-1α by double restriction endonucleases

2.2　重组逆转录病毒的鉴定

pIRES3/ HIF-1α cDNA 经脂质体转染 PT67 细胞后 36 h 出现明显的绿色荧光蛋白表达, 筛选扩增后几乎全部 PT67 细胞均表达绿色荧光蛋白, 见图 3。从重组病毒载体感染的 PT67 细胞中提取 DNA 进行 PCR 反应, 出现特异性目的片段, 见图 4。根据 GFP 计数法测得重组逆转录病毒滴度为 1. 4× 10^6 pfu/ ml。

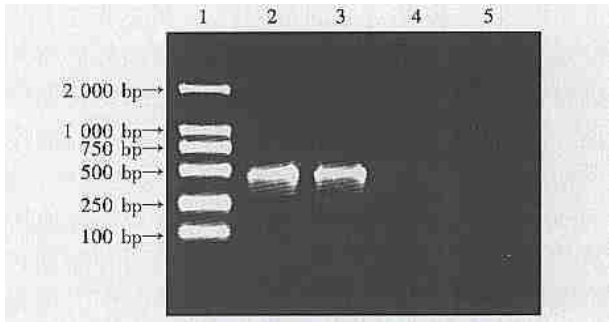
2.3　重组逆转录病毒对细胞的感染

用不同 MOI 的重组逆转录病毒感染成纤维样细胞 NIH3T3, 当 MOI 为 50 时, 50%的细胞出现荧光, 见图 5; 表明所构建重组逆转录病毒对细胞具有较高的感染能力, 并且可以有效表达目的基因。



图 3　**PT67** 细胞基因转染后 **GFP** 的表达　(荧光显微镜 × 200)

Fig 3　GFP expression after transfection in PT67 cells　(Fluorescence microscope × 200)



1: Marker; 2, 3: Transfected PT67 cells; 4, 5: Untransfected PT67 cells

图4　**PCR** 分析 **HIF-1α** 重组逆转录病毒 **DNA**

Fig 4　PCR analysis of the HIF-1α recombinant retrovirus



图 5　重组逆转录病毒感染 **NIH3T3** 细胞后 **GFP** 的表达 (荧光显微镜× 200)

Fig 5　GFP expression in NIH3T3 cells after infection with recombinant retrovirus　(Fluorescence microscope × 200)

3　讨论

HIF-1 是 Semenza 等[5] (1992 年)在研究促红细胞生成素增强子时发现的核转录因子, 随后研究表明, HIF-1 调控的靶基因包括[6]: ①影响红细胞与离子代谢的, 如血红素加氧酶 1; ②影响血管生成与改建的, 如血管内皮细胞生长因子及其受体; ③涉及能量代谢的, 如乳酸脱氢酶 A; ④参与凋亡的, 如 p21。HIF-1 可以上调细胞存活、生长、分化以及凋亡等基因的表达, 在缺氧状态下对氧的平衡起中心作用。尤其是在缺氧状态下, HIF-1 是血管生成的核心调控因子, 通过影响相关生长因子的表达, 直接参与血管生成的全过程[1]。Vincent 等[7] 在兔后肢缺血模型中, 应用基因转染技术, 表达含有 HIF-1 的融合蛋白, 明显地促进了血管生成, 并改善了血流灌注区域; Shyu 等[8] 在鼠急性心肌梗塞的模型中, 采用促进 HIF-1 表达方法也改善了梗塞区域的血流灌注, 这些血管组织中未观察到直接应用 VEGF 时常出现的血管渗漏和组织肿胀等现象。

基因治疗的前提是将外源基因有效的导入靶细胞

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

并适量的表达,因此合适的基因转移方法是决定基因治疗效果的关键。逆转录病毒载体可以高效的将外源基因整合入分裂期靶细胞的基因组中,从而长期稳定表达外源基因,该载体在基础科研和临床基因治疗中广泛使用。本实验使用的逆转录病毒表达载体,来源于 Molloney 小鼠白血病病毒的改良,除了具有遗传背景清楚、较大的外源基因容量、易于操作等传统逆转录病毒载体优势外,由于使用绿色荧光蛋白作为报告基因,还可以直观、及时判断目的基因的转染,而核糖体插入位点(internal ribosomal entry site, IRES)成功接入,可以实现目的基因与报告基因的独立表达[9],这也保证了 HIF-1α 序列的完整性,因而利用该改良载体作为 HIF-1α 表达载体具有较多的优势。

作者构建了含人 HIF-1α 基因逆转录病毒载体,并且经多种酶切鉴定分析和 PCR 鉴定,结果证实重组 HIF-1α 逆转录病毒载体构建成功。重组病毒具有较高的滴度,能高效感染成纤维样细胞,这为进一步应用 HIF-1α 促进血管生成的治疗研究奠定了基础。

参考文献:

[1] Pugh C W, Ratcliffe P J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system[J]. Nat Med, 2003, 9(6): 677-684.

[2] Min J H, Yang H, Ivan M, *et al*. Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling[J]. Science, 2002, 296(5574): 1886-1889.

[3] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002. 27-99.

[4] 董世武, 应大君, 刘光久, 等. 小鼠 Osf2/Cbfa1 基因的重组腺病毒构建及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(21): 1947-1950.

[5] 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): 5447-544.

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

[7] 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.

[8] Shyu K G, Wang M T, Wang B W, *et al*. Intramyocardial injection of naked DNA encoding HIF-1alpha/VP16 hybrid to enhance angiogenesis in an acute myocardial infarction model in the rat[J]. Cardiovasc Res, 2002, 54(3): 576-583.

[9] 吴 旋, 徐海伟, 黎海蒂, 等. APP695 和绿色荧光蛋白在 PC12 细胞中的共表达及对细胞的影响[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(3): 205-208.

(编辑 陈聪连)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2004)18-1642-01

18F-FDG PET 显像在消化道恶性肿瘤随访中的临床价值

Clinical value of 18F-FDG PET imaging in the follow-up of the digestive malignant tumor

秦丽娟, 许 敏 (无锡市第四人民医院肿瘤科, 无锡 214062)

本研究对 20 例消化道恶性肿瘤术后进行 FDG PET 显像,并作回顾性的分析。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本组从 2002 年 1 月至 2002 年 12 月,共收集病例 20 例,男 14 例,女 6 例,平均年龄 57.2 岁,(年龄范围 42~73 岁),其中食道鳞癌 2 例,贲门腺癌 3 例,胃腺癌 5 例,胃平滑肌肉瘤 1 例,小肠神经内分泌瘤 1 例,小肠平滑肌肉瘤 1 例,回盲部腺癌 1 例,结肠腺癌 5 例,直肠腺癌 1 例。所有病例分别在术后 2~48 个月进行 CEA 测定、FDG PET 及 CT 或 MRI 检查。

1.2 显像方法

显像仪器为 MarconiIRIX (γ-PTE3)。受检者均于显像前禁食 6 h 以上静脉注射 18F-FDG 185~296 MBq, 1 h 后进行显像。受检者双臂上举,平卧位,一般采集胸腹两个体位,按照程序依次发射扫描、散射校正、透射扫描、空白扫描。完成一个体位采集约需 40 min,其中用于衰减校正的追射和空白扫描时间约为 8 min。图像分析由两位有经验核医学科医师共同对衰减与无衰减较正断层图像进行阅片,以 3 个层面连续出现不对称局灶性放射浓聚视为异常。应用感兴趣区(ROI)技术分别在衰减校正图像中勾划病灶边缘,并镜像复制该 ROI 放置于病灶对侧或邻近正常组织。图像经重建处理后形成冠状面、矢状面、横断面各断层显像,应用感兴趣区技术分析肿瘤组织与对称正常组织的 FDG 摄取程度,对原发肿瘤复发及转移肿瘤进行诊断。目测判断标准为正常部位以外出现 FDG 异常浓聚视作恶性肿瘤病灶。

1.3 CT 或 MRI 检查

由有经验的放射科医师和临床医师对 CT 和 MRI 进行共同读片,以病灶直径> 10 mm 为阳性。

1.4 统计学处理

采用 χ^2 检验。

(下转 1645 页)

作者简介: 秦丽娟(1963-),女,江苏省无锡市人,主治医师,主要从事恶性消化道肿瘤治疗方面研究。电话: (0510)8903909

收稿日期: 2003-12-13; 修回日期: 2004-01-31

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net