DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.16.001
第26卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 16
2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

文章编号:1000-5404(2004)16-1419-04

论著

低氧诱导因子-1α条件性敲除载体的构建

赵 玲,宋瑞华,孙 晶,苏 楠,苟元彬,宋维威,王建民,陈 林 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军战创伤中心,重庆 400042)

提 要:目的 通过建立低氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)条件性敲除载体,并在体外验证引入的LoxP介导的同源重组等情况,为最终建立HIF-1α条件性敲除小鼠模型奠定基础。方法 以含有*neo*、*tk*基因的pLoxPneo载体为基本骨架,用涵盖3、4、5、6号外显子的HIF-1α基因组片段(7.6 kb)为构建载体的同源DNA片段,通过引入LoxP等步骤,最终建立旨在条件性敲除HIF-1α第5号外显子的条件性敲除载体。结果 经酶切,测序和在体外细菌中用*cre*介导的重组等方法证明成功地构建了HIF-1α的条件性敲除载体。结论 成功地构建了HIF-1α的条件性敲除载体,为今后进一步获得HIF-1α条件性敲除小鼠打下了基础。

关键词:低氧诱导因子-1α;条件性基因敲除;同源重组;*cre*;基因
中图法分类号:Q782;Q784;R394-33 文献标识码:A

Construction of vector for conditional knockout of murine HIF-1α

ZHAO Ling, SONG Rui-hua, SUN Jing, SU Nan, GOU Yuan-bin, SONG Wei-wei, WANG Jian-min, CHEN Lin (Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To construct the vector for conditional knockout by hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) and verify the targeting LoxP-mediated homologous recombination for conditional knockout of murine HIF-1α. Methods pLoxPneo containing *neo* and *tk* genes was used to make the targeting construction. A 7.6 kb HIF-1α genomic DNA fragment, containing exons 3—6, was used as the homologous arm. A LoxP was inserted into intron 4 for conditional knockout of exon 5 of HIF-1α. Results The correct structure of the targeting construction, HIFCKO, was confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing analysis. The *cre*-mediated recombination function of the inserted LoxP in intron 4 was also confirmed by *in vitro* transformation of HIFCKO into *cre*-expressing bacteria, AM-1. Conclusion A targeting construction for conditional knockout of murine HIF-1α has been successfully constructed.

Key words: hypoxia-inducible factor-1α; conditional knockout; homologous recombination; *cre*; gene

低氧(hypoxia)可启动机体一系列适应性反应,以维持细胞、组织在低氧条件下的氧供稳定和能量代谢,但持续太久或太严重的低氧可最终导致细胞、组织机能障碍或死亡。近年来发现低氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是介导哺乳动物低氧反应的主要因子之一。它包括HIF-1α和HIF-1β两个亚基,HIF-1α对氧气浓度敏感,是HIF-1的氧气敏感成分[1~3]。低氧主要经HIF-1α引起细胞、组织有关改变,包括葡萄糖/能量代谢、红细胞增生/铁代谢、血管发育/重建等[4]。但上述结论多源自细胞培养实验,需要在整体动物水平加以验证并发现HIF-1α的新功能。

为研究HIF-1α在重要细胞、组织发育和病理生理反应过程中的作用,需要建立HIF-1α敲除小鼠模型。本研究报道了HIF-1α条件性敲除载体的构建情况。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠HIF-1α基因组克隆H1由本实验室保存,经测序和酶切发现该克隆长约14 kb,覆盖范围为2~7号外显子。基因敲除载体pLoxPneo由美国NIH邓初夏博士惠赠,pBlueScript SK II质粒由本实验室保存。限制性内切酶、Klenow、*Taq*酶分别购自Roche、New England Biolab、TaKaRa公司。质粒纯化和DNA片段分离试剂盒购自Qiagen、TaKaRa公司。测序由上海申能博彩公司完成。LoxP3引物5′-AAGCTTGGATCCTAATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATATTAAGGGTTCCAGCTT-3′(下画线为LoxP序列),由美国Gibco公司合成。

1.2 方法

以含有*neo*、*tk*基因的pLoxPneo载体为基本骨架,用涵盖3、4、5、6号外显子的HIF-1α基因组片段(7.6 kb)为构建载体的

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G1999054203);国家自然科学基金资助项目(30370318)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054203) and the National Natural Science Foundation of China (30370318)
作者简介:赵 玲(1979—),女,山东省济南市人,助理实验师。电话:(023)68757572,E-mail:zhaoling63@sohu.com
通信作者:陈 林,电话:(023)68757572,E-mail:linchen70@163.com
收稿日期:2003-10-17;修回日期:2003-12-13

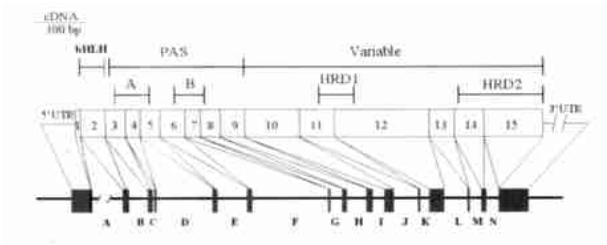
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

同源 DNA 片段，通过引入 LoxP 等步骤，最终建立敲除 HIF-1α 第 5 号外显子的条件性能敲除载体。

2 结果

2.1 载体构建

PAS 是 HIF-1α 的重要功能域，介导 HIF-1α、β 间形成异二聚体，PAS 由外显子 3-9 构成（图 1），综合考虑到基因结构和现有克隆片段，本实验计划用条件性敲除技术敲除 5 号外显子，去除该外显子可望破坏 PAS 功能域，进而破坏整个 HIF-1α 的结构、功能，实现条件性敲除 HIF-1α 的目的。



The arabic numbers indicate the exons, and the letters indicate the introns

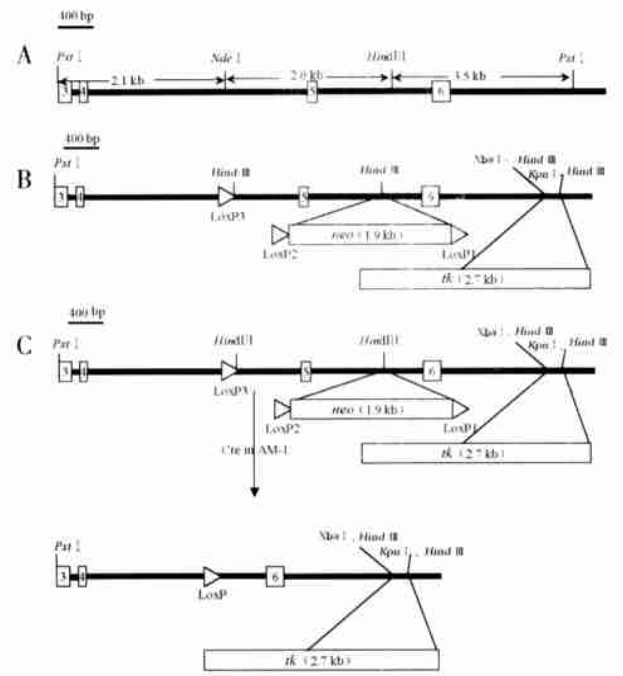
图 1 小鼠 **HIF-1**α 基因结构

Fig 1 Genomic structure of murine HIF-1α containing bHLH, PAS, and variable domains

HIF-1α 基因条件性敲除载体 HIFCKO 的结构如图 2 所示，简叙如下。首先用 *Pst* Ⅰ 把含部分 HIF-1α 基因组片段的克隆 H1 切为 4 个片段，以涵盖 3、4、5、6 号外显子的 *Pst* Ⅰ 片段为构建载体的基本片段，该片段长约 7.6 kb。选择位于第 5 号内含子的 *Hind* Ⅲ为 *neo* 基因的插入位点。为条件性敲除第 5 号外显子，在位于 4 号内含子的 *Nde* Ⅰ 处切开并用 Klenow 酶做粘端钝化处理后，插入含 LoxP 的序列（LoxP3）。用酶切的方法对构建的敲除载体 HIFCKO 予以检测（图 3），其中 *Hind* Ⅲ酶切应有 4.9、3.5、2.7、2.0、1.9 kb 等 5 个带（图 3 中的第 4 泳道），而 *Hind* Ⅲ+ *Xba* Ⅰ 酶切应有 3.5、2.7、2.1、1.8、1.7、0.3 kb 等 6 个带（图 3 中的第 3 泳道）。为进一步证实所构建的 pLoxPneo 正确无误，用 DNA 测序技术检查插入 pLoxPneo 的两个臂和置于 *Nde* Ⅰ 处的 LoxP3 序列和方向，结果均正确。

2.2 LoxP3 参与 *cre* 介导的重组作用的检测

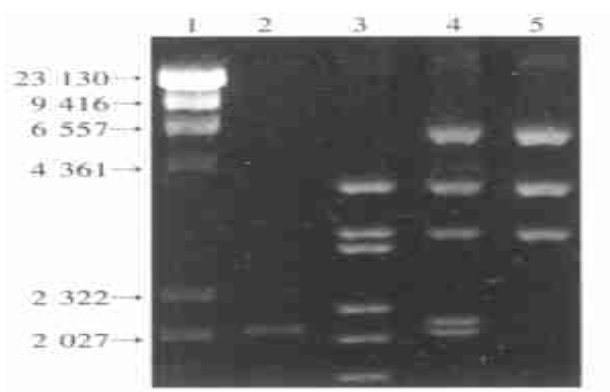
为证明引入至第 4 号内含子的 LoxP3 能在 Cre 蛋白存在的情况下参与重组发生，把 HIFCKO 质粒用电击穿孔的方法转入 AM-1 细菌。AM-1 细菌可表达 Cre 蛋白，如在 DNA 序列中存在两个方向一致的 LoxP，则 Cre 蛋白可介导它们间的 DNA 重组，去除其间的 DNA 序列。在 HIFCKO 载体中有 3 个 LoxP，即位于 *neo* 基因前后的两个 LoxP（LoxP1、2）和引入第 4 号内含子的 LoxP3，和 5 个 *Hind* Ⅲ（包括在向第 4 号内含子中引入 LoxP3 时引入的 *Hind* Ⅲ）。HIFCKO 未发生重组和在 LoxP1、3 间发生重组后用 *Hind* Ⅲ酶切的 DNA 片段带型不一致，其中未进行重组的 HIFCKO 被 *Hind* Ⅲ酶切后有 5 个带（见前），而如在 LoxP1、3 间如发生重组，则会使位于它们之间的 DNA（*neo* 基因和外显子 5 及其前后部分 4、5 内含子）丢失，出现的酶切带型为：4.8、3.5、2.7 kb。酶切结果证实在 LoxP1、3 间发生了重组（图 2、3 为发生在 LoxP1、3 间的重组的示意图，图 3 中的第 5 泳道为电泳结果），表明引入的 LoxP3 能介导重组功能的发生。



A: A 7.6 kb genomic fragment of murine HIF-1α containing exons 3, 4, 5, and 6; B: Structure of the conditional knockout construction for HIF-1α; C: Recombination mediated by *cre* protein, in which the *neo* gene, and exons 4 and 5 were deleted

图 2 **HIF-1**α 基因条件性敲除载体构建示意图

Fig 2 Diagram of construction of the vector for conditional knockout of murine HIF-1α



1: λ/*Hind* Ⅲ marker; 2: DNA marker, 2 kb band was shown here; 3: Non-recombined construction showed 6 bands following digestion with *Hind* Ⅲ plus *Xba* Ⅰ; 4: Non-recombined construction showed 5 bands following digestion with *Hind* Ⅲ; 5: When recombination happened between LoxP1, 3, the recombined construction showed 3 bands following digestion with *Hind* Ⅲ

图 3 敲除载体 **HIFCKO** 的检测与 **LoxP3** 参与 ***cre*** 介导的重组作用的检测

Fig 3 Confirmation of the correct structure of the HIF-1α conditional knockout construction and the expected recombination mediated by *cre* protein using restriction enzyme digestion

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

3　讨论

低氧在机体许多重要的生理、病理过程中具有重要作用, 已在细胞水平对 HIF-1α 进行了大量研究, 发现 HIF-1α 是介导机体低氧反应的主要因子之一, 但在整体水平利用转基因技术来研究 HIF-1α 功能的工作是近年来才开展的。

基因敲除技术可在整体动物等多层次研究基因功能。由于常规基因敲除 HIF-1α 后小鼠死于胚胎发育期[5,6], 不能研究其在胚胎发育后期和成年后各种生理、病理情况中, 特别是低氧时机体病生反应中的作用, 而条件性敲除小鼠技术可回答上述问题。

CKO 技术是在基因敲除中利用 Cre/LoxP 系统来在特定的时期或特定的细胞、组织中敲除目标基因。Cre 蛋白为源于噬菌体 P1 中的一种重组酶, 大小为 38 × 10^3, LoxP 为一段 34 bp 的回文 DNA 序列。Cre 蛋白可特异地识别 lox 序列, 可介导两个方向相同的 LoxP 间的重组, 从而把位于两个 LoxP 间的 DNA 序列切除。CKO 中, 通常在目的基因的重要功能域 DNA 序列两侧各置一个 LoxP, 得到的 CKO 小鼠的目的基因的重要区域 DNA 便被 LoxP 序列所标记, 一旦该小鼠和在特定组织或细胞表达 Cre 蛋白的转基因小鼠交配后, 在表达 Cre 蛋白的细胞、组织中便发生 Cre 蛋白介导的对目标基因 DNA 的切除, 使这些组织、细胞的目的基因被敲除, 而其它组织、细胞由于没有 Cre 蛋白表达, 不发生上述 DNA 被切除现象, 目的基因仍正常。CKO 技术可避免在发育早期所有细胞、组织中完全敲除目的基因后可能产生的胚胎期死亡或因严重发育障碍而不能传代的情况。此外, 和常规基因敲除技术相比, CKO 技术可在特定的细胞、组织去除某基因的功能, 了解有关表型变化是由何种细胞缺失目的基因后引起, 从而明确目的基因在这些细胞中的作用。从 2001 年 11 月开始至今已有报道在软骨细胞[7]、myeloid cell lineage[8](主要包括单核、巨噬细胞等)、乳腺上皮[9]敲除 HIF-1α(去除 2 号外显子)后小鼠的表型变化, 发现 HIF-1α 在各种细胞中的作用是不一样的, 尤其重要的是发现 HIF-1α 是介导炎症反应的重要因子, 因为单核、巨噬细胞缺失 HIF-1α 的小鼠不能对炎性刺激产生炎性反应。

鉴于 HIF-1α 在机体生理、病理过程中的重要性, 而国内难以获得国外已建立的 HIF-1α 条件性敲除小鼠模型, 我们决定独自建立 HIF-1α 条件性敲除小鼠模型。HIF-1α 包含 3 个功能域[3]: ①bHLH 结构域: 介导 HIF-1α 和 HIF-1β 二聚体形成。②PAS 结构域: 可使蛋白高效地形成二聚体。③羧基端的两个转录激活区域(TAD), 可和转录起始复合物结合, 影响靶基因的转录表达。考虑到 HIF-1α 的上述基因结构和已有的 HIF-1α 基因组克隆, 决定敲除 5 号外显子, 破坏 PAS 功能域, 最终达到敲除 HIF-1α 的目的。

建立敲除载体是最终建立敲除小鼠模型的关键步骤之一。目前用于构建基因敲除的载体较多, 基于我们自己和其他研究人员的经验[10,11], 我们选择了 pLoxPneo 来构建 HIF-1α 条件性敲除载体。和其它类似的基因敲除载体一样, 该载体含有用于正负双向选择的 *neo* 基因和 *tk* 基因, 但为便于在后期工作期间用 *cre*-LoxP 系统去除 *neo*, 以排除 *neo* 对被敲除基因表达的干扰, 在 *neo* 基因 5、3 端均置入了 LoxP(LoxP1、2)。HIFCKO 的同源臂总长约 7.6 kb, 一般认为基因敲除载体的同源臂长度应至少在 4 kb 以上, 每个臂的长度在 1 kb 以上。我们自己的经验认为一般同源臂在 5~15 kb 较合适, 既便于基因操作, 又保证有较高的同源重组率。为了达到条件性敲除 HIF-1α 第 5 号外显子的目的, 我们在 HIF-1α 第 4 号内含子中置入了另外一个 LoxP 序列(LoxP3), 加上已预置于 *neo* 两端的 LoxP, HIFCKO 共有 3 个 LoxP。当 HIF-1α 条件性敲除小鼠和携带 *cre* 的转基因小鼠交配后并引入 *cre* 基因后, 则可选择性地在表达 *cre* 的细胞、组织中把第 5 号外显子敲除, 即在这些细胞把 HIF-1α 的功能去除。由于 *cre* 对 LoxP 序列的特异性识别, 只有在两个 LoxP 序列的方向一致时, 其间的 DNA 才可能被去除, 所以要特别注意 LoxP3 和 LoxP1、2 的方向应一致, 这主要通过测序来完成。但为了防止在小鼠上不发生 *cre* 介导的 DNA 重组, 浪费大量时间、经费, 我们参考其它实验室的做法, 在细菌水平进一步检验了引进的 LoxP3 介导 DNA 重组的情况, 结果显示位于 LoxP1、3 间的 DNA 能被重组剔除, 表明我们建立的 HIF-1α 条件性敲除载体一旦进入小鼠体内后能发生 *cre* 介导下的条件性敲除。

本载体的成功构建为下一步的 ES 细胞转染, 中靶 ES 细胞的筛选, 显微注射和最终获得 HIF-1α 条件性敲除小鼠打下了基础。

参考文献:

[1] Bruick R K, McKnight S L. Transcription. Oxygen sensing gets a second wind[J]. Science, 2002, 295(5556): 807-808.

[2] Elson D A, Thurston G, Huang L E, *et al*. Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1α[J]. Genes Dev, 2001, 15(19): 2520-2532.

[3] Luo G, Gu Y Z, Jain S, *et al*. Molecular characterization of the murine Hif-1α locus[J]. Gene Exp, 1997, 6(5): 287-299.

[4] Semenza. Gregg L. HIF-1 and human disease: one highly involved factor [J]. Genes Develop, 2000, 14(16): 1983-1991.

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

[5] Iyer N V, Kotch L E, Agani F, *et al*. Cellular and developmental control of O_2 homeostasis by hypoxia-inducible factor-1α[J]. Genes Dev, 1998, 12(2): 149—162.

[6] Ryan H E, Lo J, Johnson R S. HIF-1α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization[J]. EMBO J, 1998, 17(11): 3005—3015.

[7] Schipani E, Ryan H E, Didrickson S, *et al*. Hypoxia in cartilage: HIF-1α is essential for chondrocyte growth arrest and survival[J]. Genes Develop, 2001, 15(21): 2865—2876.

[8] Cramer T, Yamanishi Y, Clausen B E, *et al*. HIF-1 alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation[J]. Cell, 2003, 112(5): 645—657.

[9] Seagroves T N, Hadsell D, McManaman J, *et al*. HIF1α is a critical regulator of secretory differentiation and activation, but not vascular expansion, in the mouse mammary gland[J]. Development, 2000, 130(8): 1713—1724.

[10] Chen L, Li D, Li C, *et al*. A Ser250Trp substitution in mouse fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) results in craniosynostosis[J]. Bone, 2003, 33(2): 169—178.

[11] Xu X, Qiao W, Li C, *et al*. Generation of Fgfr1 conditional knockout mice[J]. Genesis, 2002, 32(2): 85—86.

（编辑 张 宁）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)16-1422-02

焦虑抑郁障碍患者 ET 的变化

Changes of ET in patients with depression/anxiety

陈康宁，瞿 伟，覃园园 （第三军医大学西南医院神经内科，重庆 400038）

脑涨落图分析(encephalofluctuography, ET)技术是近几年来由我国首创的世界先进技术[1]。通过脑电载波涨落信息反映脑内神经递质含量。抑郁焦虑是常见的情感、情绪障碍。长期以来人们对抑郁焦虑障碍的观察，多采用一些心理量表及患者的临床表现。由于技术的原因，对抑郁焦虑患者大脑神经递质及其活性的变化的观察，很少有报道。为此，我们采用 ET 技术，观察抑郁、焦虑患者脑内神经递质活性的变化，为临床抑郁焦虑的诊断及疗效判定提供新的方法。

1 临床资料

所有的患者均为我科门诊的患者。抑郁、焦虑障碍的诊断参照 2002 年 10 月至 2003 年 4 月的标准。选择抑郁、焦虑障碍的患者各 20 例。抑郁障碍组患者男性 6 例，女性 14 例，平均年龄(30.9±9.5)岁。焦虑障碍组男性 5 例，女性 15 例，平均年龄(34.3±12.6)岁。患者在确诊以后行 ET、SAS 及 SDS 评分。所有的患者选用 SSRIs 类药物治疗，治疗后 1 个月复查 ET、SAS 及 SDS 评分。

统计学处理：采用 SPSS10.0 统计分析，检验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，进行组间 t 检验。

2 结果

2.1 抑郁组患者的 ET、SAS 及 SDS 评分的治疗前后变化

见表 1。

表 1 抑郁组患者的 ET、SAS 及 SDS 评分的治疗前后变化($\bar{x}\pm s$)

	GABA	5-HT	NE	DA	SAS	SDS
正常值	8.8±2.6	23.2±6.8	10.7±3.2	9.3±2.8	—	—
治疗前	4.3±3.8	6.8±6.4 **	5.7±3.9 **	9.1±3.5	40.3±5.6	51.4±5.4
治疗后	8.4±4.1 ##	23.6±6.8 ##	9.9±3.2 ##	8.7±3.2	23.6±6.1 ##	17.8±7.4 #

##：与正常值和治疗前比，$P<0.01$；**：与正常组比较，$P<0.01$

2.2 焦虑组患者的 ET、SAS 及 SDS 评分的治疗前后变化

见表 2。

表 2 焦虑组患者的 ET、SAS 及 SDS 评分的治疗前后变化($\bar{x}\pm s$)

	GABA	5-HT	NE	DA	SAS	SDS
正常值	8.8±2.6	23.2±6.8	10.7±3.2	9.3±2.8	—	—
治疗前	2.6±2.5 **	11.7±6.4 **	6.4±4.2 *	8.7±2.9	47.3±6.5	41.4±2.7
治疗后	7.4±3.1 ##	22.4±7.2 ##	11.6±5.1 ##	8.4±4.1	24.4±5.3 ##	22.5±5.5 ##

##：与正常值和治疗前比，$P<0.01$；**：与正常值比较，$P<0.01$

3 讨论

抑郁和焦虑障碍是常见的情感(绪)障碍，据 WHO 报道，全世界 50 亿人口中有 1.5 亿患有情感(绪)障碍，其中主要为抑郁。WHO 用“失能调整寿命年”来评估医疗负荷的情况，结果情感(绪)障碍派名第二。情感(绪)障碍在人群的患病率很高，仅抑郁在人群中的患病率高达 1.3%～5.5%。而且人们对情感(绪)障识别率非常低。我国上海内科医生对抑郁的识别率仅有 15.9%[2]。基于以上现状，各国都大力开展对情感情绪障碍的研究，主要是对发病机制及提高识别(诊断)的研究。

ET 技术是近几年来由我国首创的世界先进技术[1]。它是一种无创伤性的脑功能检测方法，通过脑电载波涨落信息，反映脑内神经递质含量。脑电信号中的超慢频率中隐藏着与神

（下转 1425 页）

作者简介：陈康宁(1964—)，男，四川省雅安市人，博士，副主任医师，副教授，从事脑血管病及神经症方面的研究，发表论文 40 余篇。电话：(023)68765253

收稿日期：2003-06-25；修回日期：2003-09-01

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