

重组人缺氧诱导因子-1 α 腺相关病毒载体的构建及表达

柴锡庆^{1*}, 刘凌云¹, 郑 龙², 王俊霞², 程桂花³, 杨 涛¹

(1. 河北医科大学研究生院, 石家庄 050017; 2. 河北省实验动物中心, 石家庄 050017; 3. 河北化工医药职业技术学院, 石家庄 050000)

[摘要] **目的:** 构建重组人缺氧诱导因子-1 α 腺相关病毒载体 (rAAV-HIF-1 α), 并观察其在原代培养海马神经细胞中的表达。**方法:** 构建含人类 HIF-1 α 基因的 AAV 载体质粒 pSNAV-HIF-1 α , 转染 BHK21 细胞并选择培养获得的 G418 抗性细胞, 即 AAV 载体细胞株, 以重组单纯疱疹病毒感染此细胞株获得 rAAV-HIF-1 α , PCR 技术鉴定病毒, 地高辛标记的 CMV 探针点杂交方法测定重组病毒滴度, SDS-PAGE 电泳测定病毒纯度, Western 印迹检测目的蛋白的表达。**结果:** PCR 证实 rAAV-HIF-1 α 内含有人 HIF-1 α 基因序列, 病毒滴度为 1×10^{12} v. g. /ml, 纯度大于 98%, 感染原代培养海马神经细胞后能够表达目的蛋白。**结论:** 成功构建了 rAAV-HIF-1 α , 为进一步应用该基因进行临床基因治疗提供了实验依据。
[关键词] 缺氧诱导因子-1 α ; 原代培养; 海马; 腺相关病毒
[中图分类号] R 338. 2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)06-0633-04

Construction and expression of adeno-associated virus vector harboring human hypoxia inducible factor-1 α gene
CHAI Xi-qing^{1*}, LIU Ling-yun¹, ZHENG Long², WANG Jun-xia², CHENG Gui-hua³, YANG Tao¹ (1. Graduate School of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. The Laboratory Animal Center of Hebei Province, Shijiazhuang 050017; 3. Hebei Vocational College of Chemical & Pharmaceutical Technology, Shijiazhuang 050000)
[ABSTRACT] **Objective:** To construct a recombinant adeno-associated virus (AAV) vector harboring human hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) gene and to express it in primarily cultured neurons in the hippocampus. **Methods:** Human HIF-1 α gene was inserted into AAV vector plasmid pSNAV 2. 0 to generate a recombinant plasmid pSNAV-HIF-1 α , then pSNAV-HIF-1 α was transfected into BHK-21 cells and selected by G418. The construction of rAAV-HIF-1 α was achieved by infecting G418-resistant BHK-21 cells with recombinant herpes simplex virus. The recombinant rAAV-HIF-1 α was confirmed by polymerase chain reaction(PCR). The titer of rAAV-HIF-1 α was detected by dot-blot with digoxin labelled cytomegalovirus probe. The purity of rAAV-HIF-1 α was detected by SDS-PAGE. The expression of HIF-1 α protein was determined by Western blot. **Results:** PCR demonstrated that human HIF-1 α gene was successfully inserted into rAAV-HIF-1 α . The virus titer was 1×10^{12} v. g. /ml and the virus purity exceeded 98%. Western blot analysis demonstrated that rAAV-HIF-1 α infected hippocampal neurons expressed HIF-1 α protein. **Conclusion:** rAAV-HIF-1 α has been successfully constructed and it is capable of expressing HIF-1 α in cultured hippocampal neurons.
[KEY WORDS] hypoxia-inducible factor-1 α ; primary culture; hippocampus; adeno-associated virus
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(6): 633-636]

近年来病毒载体介导的阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)基因治疗迅速发展并取得初步成功^[1-2], 但仍有众多难题亟待解决, 其中选择适当的基因载体以将具有治疗价值的基因导入靶细胞并使其有效表达是 AD 基因治疗研究的关键所在。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体具有安全性好, 免疫原性低, 宿主细胞范围广, 能介导外源基因在体内长期稳定表达, 并且不表达任何病毒自身蛋白基因等优点, 是目前基因治疗研究中应用最为广泛的载体之一。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)是一种在缺氧应答过程中起重要作用的核转录因子^[3-4], 广泛参与缺氧诱导的细胞适应性反应, 已成为缺氧应答时基因表达和恢复细胞内环境稳定的调节中心。最近研究证实 HIF-1 α 尚具有神经保护作用, 能够减弱氧化应激等因素对

皮质神经细胞的损伤作用^[5]。因此, 本实验选用 AAV 为基因载体, 人 HIF-1 α cDNA 为治疗基因, 构建重组人缺氧诱导因子-1 α 腺相关病毒载体(rAAV-HIF-1 α)并转染原代培养的海马神经元, 为进一步应用该基因进行 AD 的临床基因治疗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 载体与试剂 含人 HIF-1 α 基因质粒 pBSKh-HIF1 α T7 由瑞士苏伊士大学 Gassmann 教授惠赠 (GenBank: U22431), 通用型 AAV 载体 pSNAV2. 0、AAV 载体包装系统、rAAV2/lacZ 及具有 AAV 复制和包装功能的重组 1 型单纯疱疹病毒

[作者简介] 柴锡庆, 教授, 博士生导师。
* Corresponding author. E-mail: xiqingchai@126. com

HSV1-rc/ Δ UL2 由本元正阳基因技术有限公司提供。DMEM 购自 Invitrogen 公司;胎牛血清、马血清购自 HyClone 公司;阿糖胞苷、抗人 HIF-1 α 单克隆抗体及多聚赖氨酸购自 Sigma 公司。

1.2 rAAV-HIF-1 α 的构建 限制性内切酶双酶切 pBSK-hHIF1 α T7 质粒获取人 HIF-1 α 基因片段,构建含人 HIF-1 α 基因的 AAV 载体质粒 pSNAV-HIF-1 α 。按 GibcoBRL 产品说明书提供的方法,用 LipofectAmine 2000 将 pSNAV-HIF-1 α 质粒转染 6 孔板中的 BHK-21 细胞,24 h 后用 0.8 mg/ml G418 选择培养。待抗性克隆生长至孔底面积的 1/2 左右时,用胰酶消化,继续用 G418 选择培养直至细胞长满,传代后换用不含 G418 的培养液。将此混合细胞株命名为 BHK/pSNAV-HIF-1 α ,即 AAV 载体细胞株。将 AAV 载体细胞株用转瓶培养,细胞长满后用 HSV1-rc/ Δ UL2 感染(MOI 为 0.1)该细胞株。待 48 h 细胞完全病变、容易脱落时,盖紧瓶盖剧烈振荡,将瓶壁上的细胞全部洗脱至培养液中,然后采用氯仿处理-PEG/NaCl 沉淀-氯仿抽提技术粗纯化 AAV 病毒,透析袋浓缩法进一步浓缩 AAV 病毒,即得到用于细胞实验的 rAAV-HIF-1 α (图 1)。进行酶切及 PCR 鉴定,PCR 引物由本元正阳基因有限公司设计(上游引物 5'-TAA GAA ACC ACC TAT GAC CT-3',下游引物 5'-TGA GTT TCA ACC CAG ACA TA -3')。

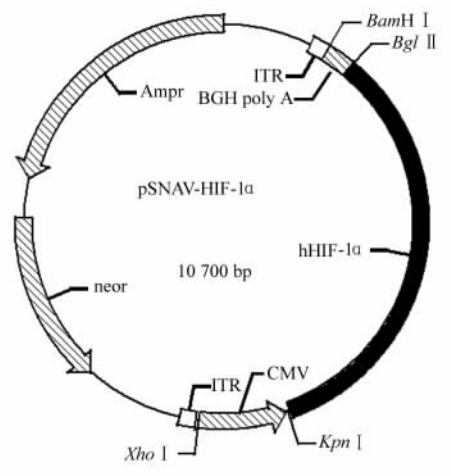


图 1 AAV 载体质粒 pSNAV-HIF-1 α 构建示意图
Fig 1 Schematic outline for construction of pSNAV-HIF-1 α

ITR: The inverted terminal repeat of the adeno-associated virus; CMV: The enhancer/promoter of the cytomegalovirus immediate early genes; hHIF-1 α : Human hypoxia inducible factor-1 α ; BGH poly A: Bovine growth hormone polyadenylation signals; Amp^r: The ampicillin resistant gene; neor: The neomycin resistant gene

1.3 rAAV-HIF-1 α 滴度的测定 以 pSNAV 质粒为模板,PCR 法标记探针。用地高辛标记的 CMV 探针点杂交方法对经梯度稀释的病毒原液和标准品进行检测,依据检测到的杂交信号判断病毒滴度。

1.4 rAAV-HIF-1 α 纯度的测定 采用凝胶扫描图像分析系统,分析 rAAV-HIF-1 α 样品经 10% 的 SDS-PAGE 后所得蛋白条带测定病毒纯度,加样孔加 rAAV-HIF-1 α 样品 15 μ g。电泳完毕后用考马斯亮蓝染色,脱色液脱色至显出低背景的、清晰的条带。

1.5 海马神经元培养及转染 取新生 1 d 内的 SD 大鼠,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 $^{\circ}$ C 消化 20 min,用含 10% 胎牛血清、5% 马血清 DMEM 培养基终止消化,200 $\times$ g 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 cell/ml 接种于预先用多聚赖氨酸包被的 6 孔培养板中,每孔 1 ml,每隔 2~3 d 换液 1 次,培养第 4 天加入终浓度为 10 μ mol/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 天吸去培养液,每孔加入无血清培养基 500 μ l,按 1×10^5 v. g. /cell 滴度加入 rAAV-HIF-1 α 及 rAAV2/lacZ,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育 1 h 后,吸去每孔液体,加入 1 ml/孔含 10% 胎牛血清、5% 马血清的 DMEM 培养基,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 72 h 后,检测海马神经元表达产物。

1.6 Western 印迹技术检测 HIF-1 α 蛋白的表达 收集转染 rAAV-HIF-1 α 的海马神经元(简称 rAAV-HIF-1 α 组)、转染载体对照 rAAV2/lacZ 的海马神经元(简称 Vector 组)以及未转染的海马神经细胞(简称 Normal 组),提取细胞总蛋白,考马斯亮蓝蛋白定量。按 100 μ g/孔加样量计算应加细胞总蛋白的体积。SDS-PAGE 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-1 α (1 : 1 000)单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 清洗。加入二抗 (1 : 2 000)HRP 兔抗小鼠抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,PBS 清洗,DAB 法显色,采用 Labworks4.0 图像分析系统扫描测定积分光密度。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 10.0 统计分析软件进行统计处理,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),两样本比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 作为判断差异显著性的标准。

2 结 果

2.1 pSNAV-HIF-1 α 及 rAAV-HIF-1 α 鉴定结果 利用 *Kpn* I、*Bam*H I 双酶切 pSNAV-HIF-1 α 后琼脂糖凝胶电泳鉴定,可以产生 3 800 bp 和 7 000 bp 两条片段,其中 3 800 bp 片段包含 HIF-1 α cD-NA 全长(图 2)。PCR 扩增产物为 324 bp(图 3)。表明 pSNAV-HIF-1 α 及 rAAV-HIF-1 α 构建成功。

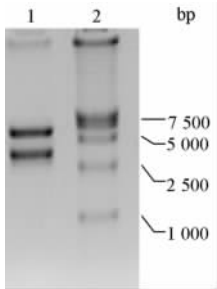


图 2 重组质粒 pSNAV-HIF-1 α 酶切鉴定分析
Fig 2 Identification of the constructed pSNAV-HIF-1 α by restriction enzyme digestion

1: pSNAV-HIF-1 α digested by *Bam*H I / *Kpn* I ; 2: DNA marker DL 15 000

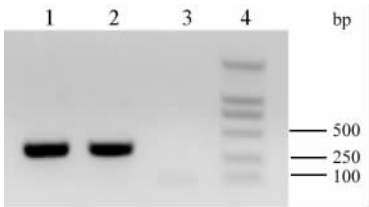


图 3 pSNAV-HIF-1 α 及 rAAV-HIF-1 α PCR 鉴定分析
Fig 3 Identification of the constructed pSNAV-HIF-1 α and rAAV-HIF-1 α by PCR

1: pSNAV-HIF-1 α ; 2: rAAV-HIF-1 α ; 3: Negative control; 4: DL2000 marker

2.2 病毒滴度的测定 病毒滴度测定如图 4 所示, 横向一排是标准品, 自左向右 1~7 号 DNA 拷贝浓度依次是 2.0×10^{12} , 1.0×10^{12} , 0.5×10^{12} , 0.25×10^{12} , 0.125×10^{12} , 0.0625×10^{12} , 0.0375×10^{12} v. g. /ml; 纵向一排是经过纯化的 rAAV-HIF-1 α 样品, 自上向下依次为 rAAV-HIF-1 α 原液、4 倍稀释品及 8 倍稀释品。样品与标准品对照得出结论, 可知样品原液与标准品中 2 号相当, 即浓度为 1×10^{12} v. g. /ml。

2.3 病毒纯度的测定 AAV 的外壳由 VP1、VP2、VP3 三种蛋白质组成, 相对分子质量依次为 82 000、72 000、62 000, 在 AAV 病毒颗粒中 VP1、VP2、VP3 蛋白的比例约为 1 : 1 : 10。纯化后的 rAAV-

HIF-1 α 经 10%SDS-PAGE 电泳分离后, VP1、VP2、VP3 三条特征性条带清晰, 无其他杂带, 大约符合 1 : 1 : 10 的比例, 经凝胶扫描图像分析系统分析后认为 rAAV-HIF-1 α 纯度大于 98%(图 5)。

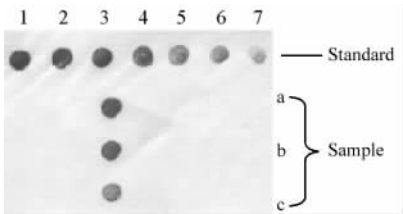


图 4 病毒滴度检测

Fig 4 Detection of the virus titer by dot-blot with digoxin labelled cytomegalovirus probe
1-7: 2.0×10^{12} , 1.0×10^{12} , 0.5×10^{12} , 0.25×10^{12} , 0.125×10^{12} , 0.0625×10^{12} , 0.0375×10^{12} v. g. /ml, respectively; a: Sample stock solution; b: Four fold dilution of sample stock solution; c: Eight fold dilution of sample stock solution

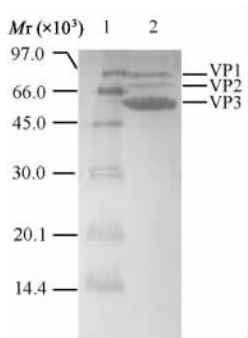


图 5 病毒纯度检测

Fig 5 Detection of the virus purity by SDS-PAGE
1: Low molecular weight protein marker; 2: Sample stock solution

2.4 HIF-1 α 蛋白的表达 Western 印迹检测结果表明, 各组细胞中均表达相对分子质量为 120 000 的 HIF-1 α 蛋白, 但表达量不同。rAAV-HIF-1 α 组细胞 HIF-1 α 蛋白表达(727.57 ± 36.08)较 Vector 组(335.94 ± 20.19)、Normal 组(328.57 ± 23.71)明显增强($P < 0.05$, $n = 6$), 而 Vector 组、Normal 组细胞相比 HIF-1 α 蛋白表达无显著性差异(图 6)。

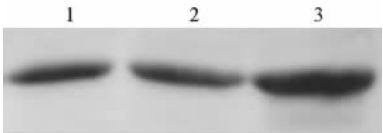


图 6 Western 印迹检测 HIF-1 α 蛋白的表达
Fig 6 Detection of the HIF-1 α protein expression by Western blot
1: Normal group; 2: Vector group; 3: rAAV-HIF-1 α group

3 讨论

缺氧是影响神经系统疾病如AD等发生、发展的重要因素之一^[6],神经细胞因缺乏糖原储备,很容易遭受缺氧等因素的攻击。缺氧时HIF-1 α 生成增加,通过调控糖酵解酶、促红细胞生成素、血管内皮生长因子和一些涉及细胞生存蛋白质等的表达,调节能量代谢,增加毛细血管网密度,改善组织血流供应,使细胞产生适应性反应。因此,以HIF-1 α 为靶点基因治疗AD是很有希望的方案。纤维状沉积的 β -淀粉样蛋白(β amyloid, A β)是AD重要病理特征——老年斑的主要成分,其通过诱导活性氧在神经细胞内蓄积产生氧化应激损伤、线粒体和溶酶体功能受损导致能量代谢障碍、继发细胞内离子平衡紊乱从而杀伤细胞,具有强烈的神经毒性。而最近研究证实HIF-1 α 能够减弱A β 神经毒性作用,其机制可能与激活糖酵解、磷酸己糖途径促使还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸生成增加,降低细胞内活性氧含量,减弱氧化应激造成的神经损伤;以及促进葡萄糖载体蛋白-1、醛缩酶A、乳酸脱氢酶A及磷酸果糖激酶蛋白水平表达增加,从而促进糖的转移、利用,改善脑组织能量代谢途径等有关^[7];除上述机制外,是否尚存在其他途径参与这一过程值得深入探讨。并且研究还发现HIF-1 α 能够减弱氧化应激等因素对视网膜神经细胞以及C6神经胶质瘤细胞的损伤^[8-10],均支持HIF-1 α 具有神经保护作用的观点。

鉴于以上分析,本研究采用AAVMax病毒包装系统构建重组人缺氧诱导因子-1 α 腺相关病毒载体(rAAV-HIF-1 α),为HIF-1 α 用于AD基因治疗奠定基础。与传统的rAAV的包装系统如双质粒共转染加辅助病毒感染法、无辅助病毒参与的三质粒共转染法相比,AAVMax病毒包装系统以单纯疱疹病毒重组体为辅助病毒感染AAV载体细胞株,在很大程度上模拟了野生型AAV病毒的生活周期,避免了大量提取质粒和反复转染,易于扩大生产制备规模^[11-12]。单纯疱疹病毒是有包膜的病毒,容易被有机溶剂和非离子型表面活性剂灭活;而AAV病毒是无包膜的正二十面体病毒,十分稳定且具有“刚性”,对氯仿、乙醚、乙醇等有机溶剂和非离子型表面活性剂具有很好的抵抗性。利用这种病毒结构特性上的明显差异,本研究采用氯仿处理-PEG/NaCl沉淀-氯仿抽提技术粗纯化AAV病毒,透析袋浓缩法进一步浓缩AAV病毒,即将粗纯化AAV病毒制品装于预处理好的透析袋中,置于固体PEG进行“吸水”

浓缩,从而缩小制品的体积,使病毒滴度达到 1×10^{12} v. g./ml,纯度大于98%,成功制备了用于离体细胞和在体动物实验的rAAV-HIF-1 α ^[13-14]。将rAAV-HIF-1 α 转染原代培养海马神经元后,Western印迹技术可检测到HIF-1 α 蛋白的表达明显高于对照组,表明rAAV-HIF-1 α 能够有效转染海马神经元并高效表达目的蛋白,为进一步应用rAAV-HIF-1 α 进行临床AD基因治疗提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Tuszynski M H, Thal L, Pay M, et al. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease[J]. *Nat Med*, 2005, 11: 551-555.
- [2] Blesch A, Tuszynski M H. Gene therapy and cell transplantation for Alzheimer's disease and spinal cord injury[J]. *Yonsei Med J*, 2004, 45 (Suppl): 28-31.
- [3] 孙学军, 彭兆云, 陈箫莹, 等. 活性氧对低氧诱导因子的调节[J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27: 660-664.
- [4] 王丽, 王素霞, 梅长林. RNA干扰对比观察HIF1 α 和HIF2 α 在人肾癌细胞中的作用及机制[J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27: 590-593.
- [5] Zaman K, Ryu H, Hall D, et al. Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21waf1/cip1, and erythropoietin[J]. *J Neurosci*, 1999, 19: 9821-9830.
- [6] Bazan N G, Palacios-Pelaez R, Lukiw W J. Hypoxia signaling to genes: significance in Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2002, 26(2-3): 283-298.
- [7] 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: 43-56.
- [8] 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: 1264-1269.
- [9] 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: 513-525.
- [10] Grimm C, Hermann D M, Bogdanova A, 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.
- [11] Wu Z, Wu X, Hou Y. Generation of a series of recombinant herpes simplex viruses which can provide replicating and packaging functions for recombinant adeno-associated virus[J]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, 2002, 16: 74-78.
- [12] 伍志坚, 吴小兵, 曹晖, 等. 一种高效的重组腺伴随病毒载体生产系统[J]. *中国科学(C辑)*, 2001, 31: 423-430.
- [13] 吴小兵, 董小岩, 伍志坚, 等. 一种快速高效分离和纯化重组腺病毒伴随病毒载体的方法[J]. *科学通报*, 2000, 45: 2071-2075.
- [14] 彭建强, 彭文心, 谭淑萍, 等. 一种高效快速浓缩腺相关病毒载体的方法[J]. *病毒学报*, 2005, 21: 11-14.

[收稿日期] 2006-12-20

[修回日期] 2007-04-14

[本文编辑] 孙岩