

siRNA 沉默 HIF-1 α 对胎肝基质细胞 SDF-1 α 表达的影响*

吉 蕾 习佳飞 袁红丰 张 鹏 刘雨潇 王韞芳 施双双
陈 琳 南 雪 白慈贤 裴雪涛**

(军事医学科学院输血医学研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850)

摘要 为了研究低氧诱导因子 (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 在干细胞增殖分化过程中的作用机制, 构建了 2 个 HIF-1 α 慢病毒 siRNA 干扰载体, 并转染人胎儿肝脏基质细胞 (fetal liver stromal cell, FLSC). 根据绿色荧光蛋白的表达评估转染效率后进行流式细胞分选, 获得高表达慢病毒干扰载体的细胞. 实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹检测了转染细胞中 HIF-1 α 基因的干扰效率, 结果显示, 与对照组相比, 常氧下培养的细胞 HIF-1 α 基因表达量仅为其相对表达量的 18.8% 和 25.5%, 干扰效率分别为 81.2% 和 74.5%, 低氧处理后的细胞 HIF-1 α 相对表达量分别为对照组的 21.2% 和 29.3%, 干扰效率分别为 78.8% 和 70.7%, 均具有显著差异. 蛋白质印迹结果显示, 在蛋白质水平表达也明显受抑制, 且重组干扰质粒 pSicoR-HIF-1 α 1 的干扰效应较强. RT-PCR、免疫荧光和 ELISA 法检测了沉默 HIF-1 α 后胎肝基质细胞衍生因子 1 α (SDF-1 α) 在 RNA 和蛋白质水平的表达变化, 干涉后细胞 SDF-1 α 的表达明显减低. 低氧条件下 SDF-1 α 基因的调控作用有可能是通过低氧激活 HIF-1 α 而诱导产生的, HIF-1 α 在干细胞增殖分化的分子调控机制中具有重要作用.

关键词 siRNA, 基因沉默, 低氧诱导因子 1 α , 慢病毒, 基质细胞, 基质细胞衍生因子 1 α

学科分类号 Q28, R34

氧对生命的存在至关重要, 机体组织细胞的正常生理功能维持依靠内环境中氧含量的稳定. 然而, 大量证据却表明, 早期的胚胎发育大多是在低氧的环境中发育的^[1~5], 低氧微环境是生命发育过程中一个重要的基本环境, 也是干细胞发生、增殖过程中一个重要的基本内环境, 低氧条件下干细胞增殖和分化的机制研究已逐渐受到重视. 研究表明^[6~8], 低氧微环境可维持造血干细胞、神经干细胞及胚胎干细胞的自我更新与增殖, 但具体机制尚不清楚.

低氧诱导因子 1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 为近年来发现的介导哺乳动物细胞低氧反应的核转录因子, 由 HIF-1 α 和 β 两个亚基组成. HIF-1 α 是唯一的氧调节亚基, 它决定 HIF-1 的活性^[9]. 正常氧分压条件下, HIF-1 α 通过泛素-蛋白水解酶系统迅速降解, 当氧分压降低或其他因素调节作用时, HIF-1 α 降解途径被阻断, 在胞浆中积聚、活化, 转移到细胞核, 与 HIF-1 β 形成二聚体 HIF-1 分子, 与相应的靶基因结合, 调控其靶基因的活化,

在抑制葡萄糖代谢、促进细胞增殖与存活、抑制凋亡、促进血管发生等方面具有重要的作用^[10].

基质细胞衍生因子 1 (stromal cell derived factor 1, SDF-1) 是骨髓造血微环境中的重要分子, 在维持造血干细胞增殖、扩增方面具有重要的作用^[11]. 研究提示, 在肿瘤组织内局部氧浓度的梯度改变可引起 SDF-1 表达的变化, 从而导致血管、肿瘤内皮细胞的增殖和迁移^[12]. 在早期干细胞发育的微环境中, SDF-1 表达是否受到低氧环境下激活的 HIF-1 的调控尚不明确. 因此, 我们构建了慢病毒 RNA 干扰载体 pSicoR-HIF-1 α , 通过转染人胎肝基质细胞 (fetal liver stromal cell, FLSC), 探讨了 HIF-1 α 基因沉默对来源于胚胎发育期重要器官的胎

* 国家高技术发展计划重大专项 (2006AA02A107), 国家重大基础研究发展计划 (973) (2005CB522702) 和北京市科委重大项目培育专项 (Z0005190043331) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-66932203, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2007-02-02, 接受日期: 2007-04-11

肝基质细胞中SDF-1基因的调控作用,期望为进一步研究低氧微环境对干细胞增殖分化的影响作用机制提供方向.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒和菌株.人胎儿肝脏基质细胞(fetal liver stem cells, FLSCs)为本室分离保存,293FT细胞系为本室保存.携带有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因的慢病毒RNA干涉载体pSico Reverse-GFP (pSicoR)为美国Andrea Ventura和Alex Meissner教授惠赠^[13],慢病毒包装质粒pLP1、pLP2和包膜质粒pLP/VSVG购自Invitrogen公司. DH5 α 感受态菌购自天为时代公司.

1.1.2 主要试剂与工具酶.TRIzol试剂、lipofectamine 2000和Opti-MEM[®] I培养基购自Invitrogen公司;高糖DMEM和DMEM/F12培养基购自Sigma公司;胎牛血清(FBS)购自Gibco公司;兔抗人HIF-1 α 抗体和鼠抗人SDF-1 α 抗体购自R&D公司;兔抗人 β -actin抗体和蛋白质印迹化学发光检测试剂盒购自Santa Cruz公司;反转录试剂与T4连接酶、rTaq酶及各种限制性内切酶均购自大连宝生物公司;RealMasterMix(SYBR Green)购自北京天根生化科技有限公司;质粒提取试剂盒和DNA回收试剂盒购自Qiagen公司;TRITC标记的羊抗鼠荧光二抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠和羊抗兔IgG抗体均购自北京中杉金桥公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与低氧处理.胎肝基质细胞培养于含10%胎牛血清的高糖DMEM与DF-12混合(1:1)培养基中,每2~3天用0.25%胰酶消化传代.细胞生长至次融合状态时进行低氧处理:以去气泡培养液换液,置细胞于充入5% CO₂及90%氮气(氧气浓度为5%)的37℃ CO₂孵箱中培养72 h.

1.2.2 siRNA序列的设计.GenBank中查找人HIF-1 α 基因mRNA序列(NM_001530),根据慢病毒RNA干涉载体pSicoR的要求,应用Gene specific siRNA selector^[14]设计,获得以HIF-1 α 编码区为靶点的特异性siRNA寡核苷酸序列2对.利用RNA Structure软件分析其mRNA二级结构,并进行BLAST同源性分析.选取2对特异性寡核苷酸互补链.1:正义链5' TGAAGGAACCTGATGCTTTATTCAAGAGATAA-AGCATCAGGTTCTTCTTTTTC 3',反义链5' TCGAGAAAAAAGAAGGAACCTGATGCTTTAT-

CTCTTGAATAAAGCATCAGGTT CCTTCA 3'; 2:正义链5' TGTAGCCTCTTTGACAAACTTTTCAA-GAGAAGTTTGTCAAAGAGGC TACTTTTTTC 3',反义链5' TCGAGAAAAAAGTAGCCTCTTTGAC-AAACTTCTCTTGAAAGTTTGTCAAAGAGGCTA-CA 3'.同时选取一对与人HIF-1 α 基因序列完全没有同源性的siRNA寡核苷酸序列作为阴性对照,均送北京奥科生物公司合成.

1.2.3 慢病毒干涉载体pSicoR-HIF-1 α 的构建.各取1 μ l的正向和反向siRNA寡核苷酸片段与48 μ l的退火缓冲液混合,95℃温育4 min,70℃温育10 min,缓慢冷却至室温退火.取5 μ l退火后的siRNA寡核苷酸片段加到T4DNA连接酶缓冲液中,加入PNK激酶,37℃温育30 min,70℃温育10 min进行磷酸化.同时用Hpa I和Xho I限制酶将慢病毒RNA干涉载体pSicoR线性化,与磷酸化后的siRNA寡核苷酸片段连接.重组质粒转化DH5 α 大肠杆菌,挑选阳性克隆,扩增并提取质粒,用Xho I和Xba I酶切鉴定,选择含插入片段的克隆进行基因测序.

1.2.4 慢病毒的包装.分别将慢病毒干涉载体质粒pSicoR-HIF-1 α 和阴性对照质粒与包装质粒pLP1、pLP2、包膜质粒pLP/VSVG,在无血清Opti-MEM[®] I培养基中与42 μ l lipofectamine 2000混合,室温孵育20 min,形成DNA-lipofectamine 2000复合物.293-FT细胞用含10% FBS的高糖DMEM同时加入0.1 mmol/L非必需氨基酸(NEAA)、2 mmol/L L-谷氨酰胺、1%青链霉素和500 mg/L G418的培养基培养,细胞长至90%汇合时,胰酶消化,收集约6 $\times$ 10⁶个细胞重悬于5 ml的生长培养基中,与DNA-lipofectamine 2000复合物混匀,加入10 cm的细胞培养皿中,37℃ CO₂孵箱中培养过夜,次日用含有1 mmol/L丙酮酸钠的完全培养基换液.转染48~72 h后收集上清,4℃,3 000 r/min离心15 min去除细胞碎片,病毒液用0.45 μ m滤膜过滤后分装冻存于-80℃.

1.2.5 细胞转染与流式细胞术分选.取第3代的FLSCs以3 $\times$ 10⁵/ml密度接种于6孔板中,待其长至80%汇合时每孔加入2 ml毒液,同时加入Polybrene(终浓度为6 mg/L),进行病毒转染过夜.次日加入含10%胎牛血清和抗生素的完全培养基,继续培养至72 h.转染后24~72 h于荧光显微镜下观察细胞转染效率,收集转染后的细胞进行流式细胞术分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS),获得高表达GFP的FLSCs.

1.2.6 半定量RT-PCR检测干涉效率. 转染慢病毒干涉载体质粒pSicoR-HIF-1 α 和阴性对照质粒的FLSC, 置于低氧条件下培养24 h, 收集各组细胞, Trizol法提取细胞总RNA, 按AMV逆转录酶说明书进行反转录, 获得cDNA模板. 取等量cDNA模板用人HIF-1 α 上游引物特异引物进行PCR扩增, 同时以人甘油醛-3'-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参照. 所用引物序列: HIF-1 α 上游引物, 5' CCA TTT TCT ACT CAG GAC ACA G 3', 下游引物, 5' TCT ACA TGC TAA ATC AGA GGG T 3', 片段长度598 bp; GAPDH上游引物, 5' ACCACAGTCCA-TGCCATC 3', 下游引物, 5'TCCACCAC CCTGT-TG C T G T A 3', 片段长度452 bp. 反应条件均为: 94℃ 5 min预变性, 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 40 s, 扩增30个循环, 72℃延伸10 min. PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳, Alpha Imager3300软件分析结果.

1.2.7 实时荧光定量PCR检测干涉效率. Trizol法提取各组细胞总RNA, 反转录后的cDNA中取1个样品进行梯度稀释作为绘制标准曲线的样本, 与其余样品同时进行PCR反应. 用20 μ l反应体系, 包括1 $\times$ RealMasterMix, 1 $\times$ SYBR Green, HIF-1 α 的上、下游引物各1 μ l (5 pmol) 及1 μ l模板, 以GAPDH基因作为内参照, 每样品均做3个复孔, 以不加模板为空白对照. 反应条件为: 94℃ 5 min预变性, 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 40 s, 72℃延伸10 min. 30个循环扩增后获得各组Ct值, 绘制标准曲线, 用基于 $\Delta\Delta C_t$ 方法的进行相对定量分析, 基因表达差异为 $2^{\Delta\Delta C_t}$, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (样品) - ΔC_t (参考基因).

1.2.8 蛋白质印迹法检测干涉后HIF-1 α 蛋白的表达. 取转染pSicoR-HIF-1 α 和对照组FLSC, 放射性免疫沉淀裂解缓冲液(RIPA)裂解细胞, 用BCA蛋白质定量试剂盒检测蛋白质浓度. 50 μ g蛋白质上样进行6% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 半干式电转的方法转至PVDF膜, 5%脱脂奶粉室温封闭2 h后, TBST洗膜, 加入兔抗人HIF-1 α 单抗4℃孵育过夜. 次日TBST洗膜后再加HRP标记的鼠抗兔二抗室温孵育1 h, TBST洗膜. 化学发光试剂于暗室自显影. 以 β -actin作为内参照.

1.2.9 半定量RT-PCR法检测HIF-1 α 沉默后SDF-1 α 基因mRNA水平的表达. 收集各组细胞, 提取细胞总RNA后, 用半定量RT-PCR方法检测HIF-1 α 沉默对细胞SDF-1 α 基因mRNA表达的影响, 以GAPDH基因作为内参照. 人SDF-1 α 基因扩增引物序列为:

正向引物5' TGAACGCCAAGGTCGTGGT 3'; 反向引物5' AGGGCATGGATGAATATAAGC 3', 片段长度500 bp. PCR反应条件: 94℃ 5 min预变性, 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 30 s, 扩增35个循环, 72℃延伸7 min. PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳, 用Alpha Imager3300软件分析结果.

1.2.10 免疫化学荧光法检测HIF-1 α 沉默后SDF-1 α 蛋白的表达变化. 取转染pSicoR-HIF-1 α 和阴性对照质粒的胎肝基质细胞, 以 3×10^3 /ml密度接种于96孔板, 4%多聚甲醛固定30 min, PBS冲洗, 0.1%的TritonX-100室温破膜30 min, PBS冲洗, 山羊血清室温封闭30 min. 然后分别加入鼠抗人SDF-1 α 单克隆抗体, 4℃孵育过夜. 次日用PBS洗去一抗, 加入TRITC标记的羊抗鼠二抗, 37℃孵育30 min, PBS冲洗后, 加入DAPI (终浓度为5 mg/L) 混匀, 37℃染色30 min. PBS冲洗3次, 荧光显微镜下观察荧光表达情况.

1.2.11 ELISA双抗体夹心法检测SDF-1 α 蛋白分泌量的变化. 收获培养细胞上清液, SDF-1 α 单克隆抗体 (1:500稀释) 包被ELISA酶标板, 100 μ l/孔, 室温孵育过夜. 次日用含0.05% Tween20的PBS溶液冲洗每孔3次, 1% BSA 37℃封闭2 h. 加入培养细胞上清100 μ l/孔, 37℃孵育2 h, PBS洗涤3次, 按100 μ l/孔加入生物素化的SDF-1 α 检测多克隆抗体, 37℃孵育2 h, PBS洗涤, 加入HRP标记二抗, 37℃孵育30 min, PBS洗涤3次, 每孔加入底物溶液100 μ l, 避光室温反应20 min后, 每孔加入50 μ l终止液终止. 酶标仪492 nm波长检测各孔吸光度值(A). 根据样品A值在标准曲线图上查出相应各组细胞培养上清中SDF-1 α 的含量.

1.2.12 统计学处理. 各组数据均以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用SPSS 11.0软件进行统计分析. 配对组间比较采用t检验, 多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为存在显著性差异.

2 结 果

2.1 慢病毒干涉载体pSicoR-HIF-1 α 的构建及鉴定
重组慢病毒干涉载体pSicoR-HIF-1 α 用Xho I 和Xba I 双酶切, 以空载体pSicoR为对照, 得到含插入片段的阳性克隆(图1), 经基因测序证实, 2针对人HIF-1 α mRNA序列设计的寡核苷酸双链成功克隆入pSicoR慢病毒干涉载体, 序列完全正确, 与预期设计相符, 重组质粒构建成功.

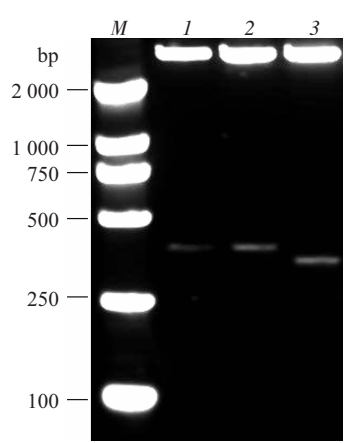


Fig. 1 Identification of recombinant by digestion of restrict endnuclease *Xho*I and *Xba*I

M: DL2000 marker; *1*: Recombinant pSicoR-HIF-1 α plasmid 1; *2*: Recombinant pSicoR-HIF-1 α plasmid 2; *3*: PSicoR lentiviral plasmid.

2.2 慢病毒的包装

293-FT细胞包装慢病毒24 h后，荧光显微镜下可见细胞中有绿色荧光蛋白的表达，并且由于VSVG糖蛋白使293FT融合的作用，见到多核合胞体的大量形成(图2a)，且呈现绿色荧光的细胞在包装48~72 h后超过98%(图2b)，病毒包装质量较高。包装72 h后，收集毒液过滤备用。

2.3 流式细胞术检测慢病毒转染FLSCs效率与细胞分选

包装好的慢病毒转染胎肝基质细胞，24 h后荧光显微镜下观察，发现表达绿色荧光蛋白的细胞很少，持续培养至72 h后，表达GFP的细胞逐渐增

多，但总数不超过10%(图3a)。收集细胞经流式细胞仪检测GFP阳性细胞仅占9.5%(图4a)。为获得高表达慢病毒干涉载体的细胞，对转染72 h的胎肝基质细胞根据GFP阳性表达进行流式分选，获得其中仅5%的强表达GFP的细胞，分选后细胞荧光显微镜下观察，表达GFP的细胞基本达100%(图3b)。

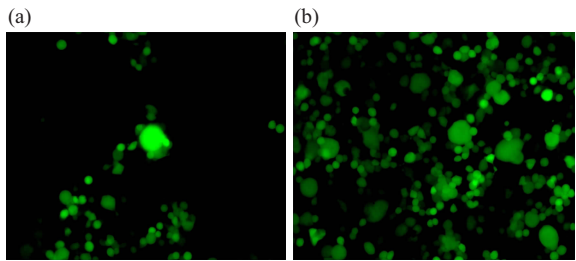


Fig. 2 Producing Lentivirus in 293FT cells by fluorescence microscope

(a) The appearance of multinucleated syncytia of 293 FT cells. (b) The GFP expression of 293 FT cells producing lentivirus for 48 ~72 h (100 $\times$).

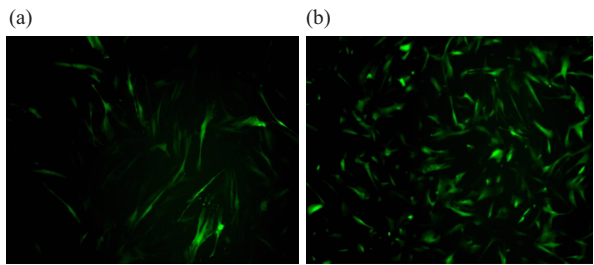


Fig. 3 GFP expression of non-sorted and sorted transfected-FLSCs

(a) Transfected FLSCs cultured for 72 h. (b) GFP expression of sorted FLSCs (100 $\times$).

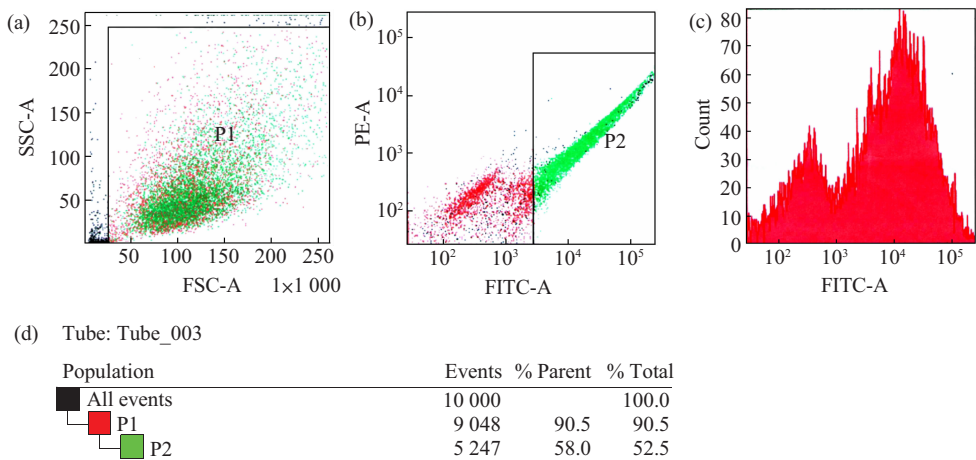


Fig. 4 Expression of GFP in FLSCs analyzed and sorted by FACS

(a) The FLSCs before sorted(P1). (b) The zonation of the selected FLSCs, P2 represent the FLSCs express GFP. (c) The FLSCs being sorted. (d) The exact number of the sorting process.

2.4 HIF-1 α 基因干涉效果的检测

2.4.1 半定量RT-PCR检测HIF-1 α mRNA的表达变化. 提取未转染、阴性对照组和分别转染2对慢病毒干涉载体pSicoR-HIF-1 α 的胎肝基质细胞总RNA, 半定量RT-PCR法检测HIF-1 α 基因mRNA水平的表达. 结果显示, 未转染和转染了阴性对照载体的细胞均有HIF-1 α 的表达, 相对表达量基本一致, 而转染了HIF-1 α 慢病毒干涉载体的胎肝基质细胞HIF-1 α 的表达量明显减低(图5a, b). 用Alpha Imager 3300分析软件进行灰度扫描分析, 转染2对干涉载体的细胞与阴性对照组相比, HIF-1 α 的表达量分别下降到对照组的14.3%和30.2%, 有显著差异($P < 0.05$)(图5c), 经比较, 第一对较第二对寡核苷酸片段的抑制作用更强.

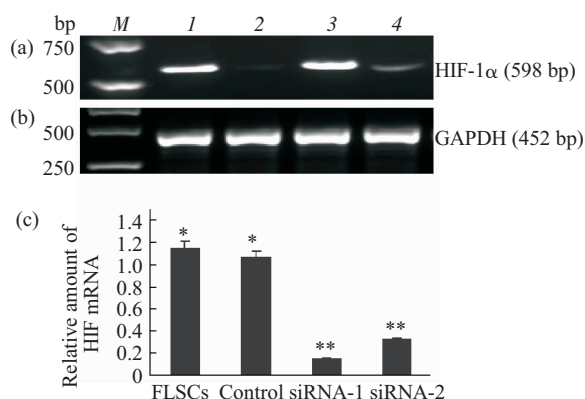


Fig. 5 RT-PCR analysis of HIF-1 α gene expression in FLSCs

(a) Expression of HIF-1 α . (b) Expression of GAPDH. (c) Relative amount of HIF-1 α (* $P > 0.05$, ** $P < 0.05$). M: DL2000 marker; 1: Untransfected group; 2: pSicoR-HIF-1 α -1 transfection group; 3: Negative control group; 4: pSicoR-HIF-1 α -2 transfection group.

2.4.2 实时荧光定量PCR检测siRNA-HIF-1 α 的干涉效果. 为进一步验证pSicoR-HIF-1 α 质粒的干涉效果, 以上述获得的不同组细胞的RNA反转录为cDNA作为模板, 进行了以GAPDH为内参照的HIF-1 α 相对表达量的实时荧光定量PCR检测. 反应在Bio-Lab荧光定量PCR仪上运行, 用SYBR Green染料分析, 表达最高的细胞样品设为100%比较 C_t 值计算相对定量. 结果显示, 转染慢病毒干涉HIF-1 α 载体1和2的细胞HIF-1 α 基因的相对表达量在常氧与低氧培养条件下受明显抑制, 与对照组相比, 常氧下培养的细胞HIF-1 α 基因的表达量仅为其相对表达量的18.8%和25.5%, 即干涉效率分别为81.2%和74.5%. 同时低氧处理后的细胞HIF-1 α 相对

表达量分别为对照组的21.2%和29.3%, 干涉效率分别为78.8%和70.7%. 均具有显著差异($P < 0.05$)(图6). 而各组细胞在低氧与常氧条件下培养后HIF-1 α 的表达并无显著性差异($P > 0.05$), 未转染细胞与阴性对照组间HIF-1 α 的表达也无显著性差异($P > 0.05$).

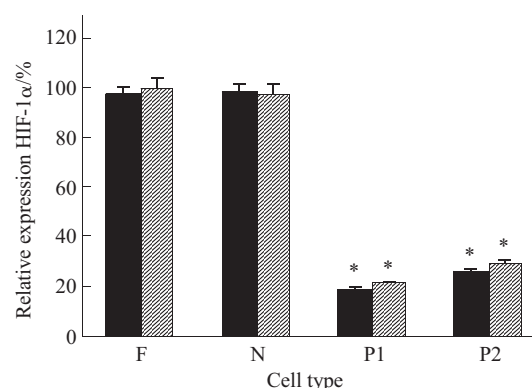


Fig. 6 Effect of RNA interference on HIF-1 α expression by real-time PCR

F: FLSCs; N: Negative group; P1: pSicoR-HIF-1 α -1 transfection group; P2: pSicoR-HIF-1 α -2 transfection group (* $P < 0.05$). ■: Normoxia; ▨: Hypoxia.

2.4.3 蛋白质印迹法检测siRNA对HIF-1 α 蛋白表达的影响. 采用蛋白质印迹检测转染阴性对照载体和2对慢病毒HIF-1 α 干涉载体1和2的胎肝基质细胞HIF-1 α 蛋白水平的干涉效果, 结果发现, 转染第一组pSicoR-HIF-1 α 载体的细胞未检测到HIF-1 α 蛋白的表达, 转染第二组干涉载体的细胞HIF-1 α 蛋白的表达也较阴性对照明显减低(图7), 可见, 通过RNA干扰有效抑制了胎肝基质细胞HIF-1 α 蛋白的表达, 且重组载体pSicoR-HIF-1 α -1的干扰效应尤其强烈, 结果与实时荧光定量PCR一致, 因此后续实验选择pSicoR-HIF-1 α -1质粒转染的FLSCs做进一步研究.

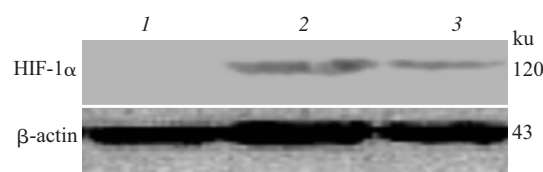


Fig. 7 Effect of RNA interference on HIF-1 α protein expression under hypoxia by Western-blot

1: pSicoR-HIF-1 α -1 transfection group; 2: Negative control group; 3: pSicoR-HIF-1 α -2 transfection group.

2.5 HIF-1 α 沉默对胎肝基质细胞SDF-1 α 基因表达的影响

2.5.1 HIF-1 α 沉默对SDF-1 α 基因mRNA表达的影响. 半定量RT-PCR法检测HIF-1 α 基因沉默对SDF-1 α 基因mRNA表达的影响, 结果显示, 未转染和转染了阴性对照载体的细胞SDF-1 α 基因均有较高的表达, 相对表达量基本一致, 而转染了HIF-1 α 慢病毒干涉载体的胎肝基质细胞SDF-1 α 的表达量明显减低, 且pSicoR-HIF-1 α -1比2的抑制作用强, 未转染组和阴性对照组均表达SDF-1 α , 无明显差异($P > 0.05$) (图8a, b). 用Alpha Imager 3300分析软件进行灰度扫描分析, 转染2对干涉载体的细胞与阴性对照组相比SDF-1 α 的表达量减低, 有显著差异($P < 0.05$) (图8c).

2.5.2 免疫荧光法检测HIF-1 α 沉默后SDF-1 α 蛋白的表达变化. 分别转染了阴性对照和pSicoR- HIF-1 α -1的胎肝基质细胞用免疫荧光法检测SDF-1 α 蛋白的表达, 阴性对照组细胞胞浆呈现红色荧光, SDF-1 α 蛋白100%阳性表达, 而转染干涉载体的细胞表达极弱的红色荧光, SDF-1 α 蛋白的表达明显受抑制(图9).

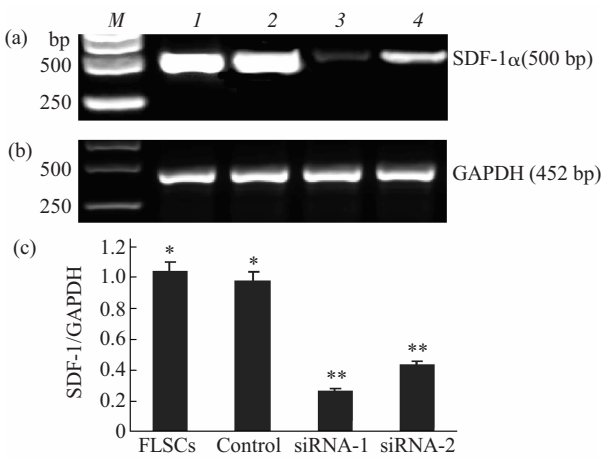


Fig. 8 Effect of HIF-1 α gene silencing on SDF-1 α mRNA expression

(a) Expression of SDF-1 α mRNA. (b) Expression of GAPDH. (c) Relative amount of SDF-1 α mRNA after HIF-1 α gene silence (* $P > 0.05$, ** $P < 0.05$). M: DL2000 marker; 1: Untransfected group; 2: Negative control group; 3: pSicoR-HIF-1 α -1 transfection group; 4: pSicoR- HIF-1 α -2 transfection group.

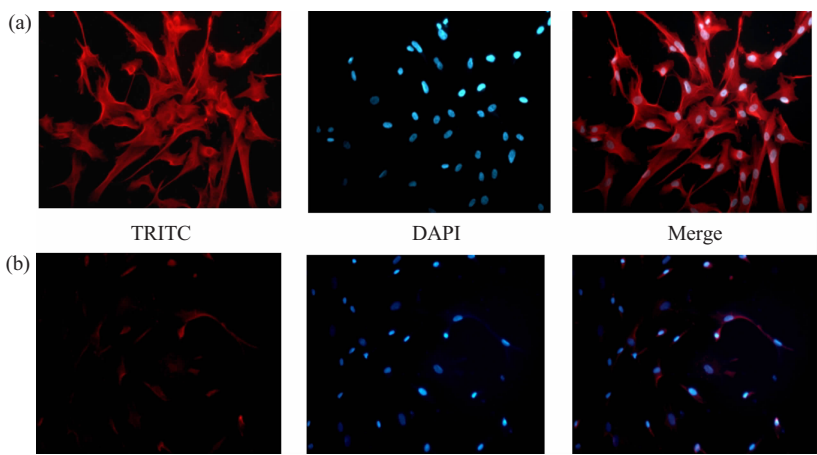


Fig. 9 Fluorescent immunocytochemistry analysis of SDF-1 α protein expression (100 $\times$)
(a) FLSCs transfected with control plasmid. (b) FLSCs transfected with pSicoR-HIF-1 α .

2.5.3 ELISA双抗体夹心法检测SDF-1 α 蛋白的相对表达. 收集常氧和低氧条件下各组细胞的培养上清, ELISA法检测SDF-1 α 蛋白的分泌量, 结果显示, 低氧处理72 h后的各组细胞, 上清中SDF-1 α 蛋白的含量均高于常氧条件下, 未转染组最高, 低氧处理后SDF-1 α 蛋白的含量达(140.62 $\pm$ 0.48) ng/L, 常氧下

仅为(45.44 $\pm$ 0.28) ng/L, 低氧条件培养细胞使SDF-1 α 蛋白的含量升高了3倍, 转染pSicoR-HIF-1 α -1的胎肝基质细胞在低氧和常氧条件下培养, 与未转染和阴性对照组比较, 上清SDF-1 α 蛋白的含量均明显受抑制, SDF-1 α 蛋白分泌量分别为对照组的10.4%和16.7%, 具显著性差异($P < 0.05$).

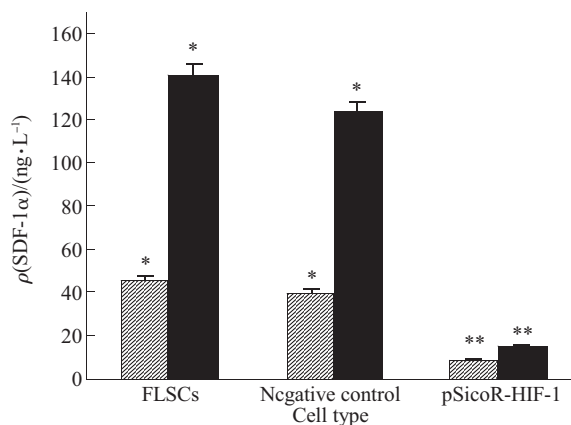


Fig. 10 Secretory volume of SDF-1 α protein in culture supernatants detected by sandwich ELISA

* $P > 0.05$, ** $P < 0.05$. ▨: Normoxia; ■: Hypoxia.

3 讨 论

低氧是生命发育过程中一个重要的基本环境,最近的研究证实,低氧微环境对于干细胞的增殖分化具有重要的影响作用,也是干细胞发生与扩增的重要内环境.用低氧处理造血干细胞后,发现低氧条件可以明显维持其增殖与扩增^[15]; 3% O₂能促进鼠中脑前体细胞增殖,提高生长率^[16]. Lennon等^[17]在体外培养大鼠骨髓间充质干细胞(rMSCs)时,发现低氧能促进rMSCs的增殖.但是,目前关于低氧微环境调节干细胞增殖分化的研究大多为细胞扩增分化的功能影响研究,其相关的具体分子调控机制尚不清楚.

机体感受O₂浓度变化并对缺氧做出适应性反应,基因表达调控是这种适应性反应的一种主要方式,低氧诱导因子1是缺氧条件激活的最主要的转录调控基因. HIF-1是低氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内的一种转录因子,最先由Semenza等^[18]于1992年在缺氧诱导的细胞核抽提物中发现.HIF-1可调节多种靶基因如VEGF、红细胞生长因子(EPO)等的表达.调节细胞内HIF-1的机制非常复杂,它与氧依赖的信号传递机制密切相关, HIF-1的2个亚单位中, HIF-1 α 的氧依赖区(ODD)与靶基因启动子DNA的结合增加了其转录活性,并通过多靶基因协同起作用.因此,我们选择了HIF-1 α 基因作为研究对象,探讨低氧微环境对于干细胞作用的可能分子机制.

RNA干扰技术是生物进化过程中基因组水平上的免疫监控机制^[19],他作为一种特异性基因沉默技术,越来越多地在反向遗传学研究、细胞信号转

导通路研究和某些疾病的发病机制和治疗等研究中发挥着重要作用.由于siRNA具有RNA双链结构和3'端双核苷酸悬垂,较难被核酶降解,所以RNA干涉具有更好的稳定性和更优越的抑制效果^[20],是高通量基因功能研究的得力工具.本研究中设计了2对HIF-1 α -siRNA寡核苷酸片段,并通过分子克隆技术成功构建了慢病毒干涉质粒pSicoR-HIF-1 α 1和pSicoR-HIF-1 α 2.实时荧光定量PCR和蛋白质印迹鉴定结果显示,2种siRNA在胎肝基质细胞中均有不同程度的干扰作用,其中pSicoR-HIF-1 α 1对HIF-1 α 的抑制效果显著,表达量较空白对照组和转染空载体组的差异有统计学意义,干涉效率达到85%以上.同时,本实验选取的是慢病毒载体系统,病毒宿主范围广,具有自身灭活作用,能稳定整合宿主基因组,且具高效感染静止期细胞以及高表达外源蛋白并且能逃避甲基化抑制的特点.基于慢病毒的这些特点, siRNA对HIF-1 α 的抑制作用,能持续在胎肝基质细胞稳定表达,更有利于我们进行深入的机制研究.

基质细胞衍生因子(stromal cell derived factor 1, SDF-1)属于趋化因子CXC亚家族,编码区含267 bp,编码89个氨基酸残基多肽.由于其对造血干细胞归巢的影响作用也被称为趋化因子^[21]. SDF-1对免疫系统反应,胚胎发育和造血系统功能等方面均有调节作用. Lataillade等^[22]采用无血清培养基在CD34⁺细胞体外培养中发现, SDF-1 α 对造血干细胞有刺激其增殖的作用,并且与其他造血细胞生长因子如干细胞因子(SCF)及白介素3(IL-3)有协调作用,它还能促进更多的CD34⁺细胞进入细胞周期,使S期和G2期/M期细胞明显多于对照组,提示SDF-1 α 可能维持干细胞的增殖.最新研究发现,在缺血组织中,随着缺氧程度的增加, SDF-1 α 的表达也随之升高,在血管内皮细胞以及部分肿瘤细胞中HIF-1 α 可上调SDF-1 α 的作用得以证实^[23].

本研究中检测了siRNA沉默HIF-1 α 基因后,胎肝基质细胞中SDF-1 α 基因的表达变化,结果表明,当HIF-1 α 被抑制后, SDF-1 α 的上调机制被阻断,细胞SDF-1 α 的表达无论从mRNA水平或蛋白质水平都明显减低.反之,说明低氧条件下SDF-1 α 基因的上调作用有可能是通过低氧激活HIF-1 α 而诱导产生的.胎肝基质细胞来源于胚胎发育期的重要器官肝脏,通过干涉此细胞HIF-1 α 的表达及研究HIF-1 α 对SDF-1 α 基因的调控作用,为进一步探讨低氧微环境对于干细胞增殖分化的分子机制奠定了基础,使

体外模拟低氧微环境促进干细胞的增殖开拓了新的思路和方法。

参 考 文 献

- 1 Olga G, Zhou Y, John W L, *et al.* Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*, 1997, **277** (5332): 1669~1672
- 2 Huang T J, Kim T V, Lyell D J, *et al.* Developmental response to hypoxia. *The FASEB J*, 2004, **18** (9): 1348~1365
- 3 Bergeron R D L, Runge A, Adelman D M, *et al.* HIF-dependent hematopoietic factors regulate the development of the embryonic vasculature. *Dev Cell*, 2006, **11** (7): 81~92
- 4 Bergeron R D, Simon M C. Hypoxia-inducible factor and the development of stem cells of the cardiovascular system. *Stem Cells*, 2001, **19** (3): 279~286
- 5 Genbacev O. To proliferate or to divide—to be or not to be. *Early Pregnancy*, 2001, **5** (2): 63~64
- 6 Toshihiko E, Padmalaya D, Roberts R M. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *PNAS*, 2005, **102** (13): 4783~4788
- 7 Gustafsson M V, Zheng X, Pereira T, *et al.* Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*, 2005, **9** (11): 617~628
- 8 Ivanovic Z, Belloc F, Faucher J L, *et al.* Hypoxia maintains and interleukin-3 reduces the pre-colony-forming cell potential of dividing CD34⁺ murine bone marrow cells. *Exp Hematol*, 2002, **30** (2): 67~73
- 9 Miguel L. HIF-1: hypoxia-inducible factor or dysoxia-inducible factor?. *The FASEB J*, 2006, **20** (5): 828~832
- 10 Melillo G. Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy. *Mol Can Res*, 2006, **4** (9): 601~605
- 11 Lataillade J J, Clay D, Dupuy C, *et al.* Chemokine SDF - 1 enhances circulating CD34⁺ cell proliferation in synergy with cytokines possible role in rogenitor survival. *Blood*, 2000, **95** (3): 756~768
- 12 Ceradini D J, Kulkarni A R, Callaghan M J, *et al.* Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*, 2004, **10** (8): 858~864
- 13 Ventura A, Meissner A, Dillon C P, *et al.* Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101** (28): 10381~10385
- 14 Levenkova N, Gu Q, Rux J J. Gene specific siRNA selector. *Bioinformatics*, 2004, **20** (3): 430~432
- 15 Cipolleschi M G, Sbarba P D, Olivetto M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*, 1993, **182** (7): 2031~2037
- 16 Studer L, Csete M, Lee S H, *et al.* Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci*, 2000, **20** (11): 7377~7383
- 17 Lennon D P, Edmison J M, Caplan A I. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on *in vivo* and *in vivo* osteochondrogenesis. *J Cell Physiol*, 2001, **187** (4): 345~355
- 18 Semenza G. Signal transduction to hypoxia inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*, 2002, **64** (526): 993~998
- 19 Hutvagner G, Zamore P D. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, **12** (2): 225~232
- 20 Bass B L. RNA interference. The short answer. *Nature*, 2001, **411** (6836): 428~429
- 21 Guo Y, Hangoc G, Bian H, *et al.* SDF-1/CXCL12 enhances survival and chemotaxis of murine embryonic stem cells and production of primitive and definitive hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*, 2005, **23** (10): 1324~1332
- 22 Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest*, 2006, **1** (1): 1~12

Effect of Silencing Hypoxia Inducible Factor 1 α by siRNA on The Expression of Stromal Cell Derived Factor 1 α in Fetal Liver Stroma Cell*

Ji Lei, XI Jia-Fei, YUAN Hong-Feng, ZHANG Peng, LIU Yu-Xiao, WANG Yun-Fang,
SHI Shuang-Shuang, CHEN Lin, NAN Xue, BAI Ci-Xian, PEI Xue-Tao**

(Research Center of Stem Cell and Regenerative Medicine, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) is a key regulator of the physiological response to hypoxia. To study the regulation mechanism of HIF-1 α in proliferation and differentiation of stem cells, two small interference RNA expression vectors of HIF-1 α were constructed, and transfected into the fetal liver stromal cell lines (FLSCs) stably by lentiviral system. The efficiency of virus transfection was identified by expression of green fluorescence protein (GFP) analyzed by fluorescence microscope, then the high GFP expression FLSCs were sorted by fluorescence-activated cell sorting (FACS) according to strong GFP expression. Analysis of efficiency of RNA interfering on HIF-1 α was detected by real time-PCR and Western-blot. The HIF-1 α gene expression at mRNA level of FLSCs transfected by lentivirus plasmids pSicoR-HIF-1 α -1 and pSicoR-HIF-1 α -2 are 18.8% and 25.5% of the FLSCs transfected by the control lentivirus under 20% O₂; 21.2% and 29.3% under hypoxia. The HIF-1 α protein were down regulated by siRNA. The pSicoR-HIF1 showed higher interfering efficiency than pSicoR-HIF2. The expression of SDF-1 α gene in HIF-1 α silencing FLSCs were detected by RT-PCR, fluorescent immunocytochemistry analysis and ELISA. The mRNA and protein of SDF-1 α gene were down regulated after silencing of HIF-1 α . Therefore, the regulation of SDF-1 α gene under hypoxia could be activated by HIF-1 α , that plays an important role in the influence on the proliferation and differentiation of stem cell.

Key words small interference RNA, gene silence, hypoxia inducible factor 1 α , lentivirus, stromal cells, stromal cell derived factor 1 α

This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02A107), National Basic Research Program of China (2005CB522702) and The Special Incubating funds of Beijing Municipal Science and Technology Commission (Z0005190043331).

**Corresponding author. Tel: 86-10-66932203, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

Received: February 2, 2007 Accepted: April 11, 2007