

## 条件性缺氧诱导因子-1 $\alpha$ RNAi 转基因小鼠模型的建立

戚华兵<sup>†</sup>, 宋瑞华<sup>†</sup>, 杜晓兰, 赵玲, 苏楠, 刘道诚, 李福兵, 陈林

第三军医大学第三附属医院野战外科研究所全军创伤中心, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042

**摘要:** 缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1  $\alpha$ , HIF-1  $\alpha$ ) 是细胞在缺氧等条件下稳定表达的具有转录活性的蛋白, 通过与多种靶基因调控区的缺氧反应元件 (hypoxia response element, HRE) 结合, 调控靶基因表达, 使机体对缺氧、缺血等病理生理过程产生适应性反应。为从整体动物水平研究 HIF-1  $\alpha$  的作用, 需要建立 HIF-1  $\alpha$  相关遗传修饰小鼠。分别针对 HIF-1  $\alpha$  mRNA 序列的两个靶位点合成两对互补的寡核苷酸链, 构建可诱导的 RNA 干扰真核表达载体 HIF-AB 和 HIF-CD。分别将 CRE 重组酶真核表达载体 CRE-ER<sup>T2</sup> 与 HIF-AB 或 HIF-CD 转染入 RAW264.7 细胞, 筛选得到稳定表达 CRE-ER<sup>T2</sup> 与 HIF-AB, 或 CRE-ER<sup>T2</sup> 与 HIF-CD 的稳定细胞系。在用 4-HT 诱导去除上述细胞系中 HIF-AB 或 HIF-CD 所含的 Neo 基因后, 用 CoCl<sub>2</sub> 诱导 HIF-1  $\alpha$  表达, 采用半定量 RT-PCR 检测 HIF-AB 或 HIF-CD 对 HIF-1  $\alpha$  基因表达的影响。结果发现干扰载体 (HIF-AB 和 HIF-CD) 对 HIF-1  $\alpha$  mRNA 序列的沉默效果分别为 85% 和 72%。选择干扰效率较高的表达载体 HIF-AB 经显微注射获得 HIF-1  $\alpha$  基因敲低小鼠模型, 经 PCR 以及测序验证获得 2 个转基因阳性小鼠 (Founders, G<sub>0</sub> 代)。G<sub>0</sub> 代雄鼠与 FVB/N 雌鼠交配后获得 2 只 F<sub>1</sub> 代 (first filial generation) 转基因阳性小鼠, 经与 EIIA-Cre 转基因小鼠交配, 得到 EIIA-Cre; HIFRNAi<sup>fllox/+</sup> 小鼠, RT-PCR 结果显示, EIIA-Cre; HIFRNAi<sup>fllox/+</sup> 小鼠肝、肺、肾等组织的 HIF-1  $\alpha$  mRNA 水平明显降低, 分别约为正常对照的 44%、38.2% 和 23.5%。该小鼠模型的建立为进一步研究 HIF-1  $\alpha$  的功能及作用机制提供了新的手段。

**关键词:** 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ , 发夹状小干扰 RNA, 转基因小鼠

## Generation of Inducible HIF-1 $\alpha$ RNAi Transgenic Mice

Huabing Qi<sup>†</sup>, Ruihua Song<sup>†</sup>, Xiaolan Du, Ling Zhao, Nan Su, Daocheng Liu, Fubing Li, and Lin Chen

Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University; State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Chongqing 400042, China

**Abstract:** Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) is a transcription factor that responds to changes in oxygen concentration. In this study, we constructed two vectors, HIF-AB and HIF-CD, to transcribe functional short interfering RNA against different region of mouse HIF-1  $\alpha$ . The oligonucleotide encoding small hairpin RNAs against mouse HIF-1  $\alpha$  was inserted into the downstream of U6 promoter of pBSK/U6-NEO plasmid. Cre-expression vector CRE-ER<sup>T2</sup> with either HIF-AB or HIF-CD was transfected into RAW264.7 cell line, after selection with G418 and hygromycin, to obtain cell lines with stabilized expression of CRE-ER<sup>T2</sup> and

**Received:** December 19, 2006; **Accepted:** January 17, 2007.

**Supported by:** the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (Nos. G1999054203 and 2005 CB522604) and the National Natural Science Foundation of China (No. 30370318).

**Corresponding author:** Lin Chen. Tel: +86-23-68757041; E-mail: linchen70@163.com

<sup>†</sup>为共同第一作者。They are the co-first authors.

国家重点基础研究发展项目(973 计划)(No. G1999054203 and No. 2005CB522604); 国家自然科学基金资助项目(No. 30370318)。

HIF-AB, or CRE-ER<sup>T2</sup> and HIF-CD. The expression levels of HIF-1 $\alpha$  of these stable cell lines were detected by semi-quantitative RT-PCR following treatment of CoCl<sub>2</sub>, a HIF-1  $\alpha$  expression inducer. The HIF-1  $\alpha$  mRNA expression was reduced by 85% and 72% by HIF-AB and HIF-CD respectively. HIF-AB vector was microinjected into pronucleus of zygotes to generate transgenic mice. We got two founder and two first filial generation transgenic mice containing HIF-AB and these transgenic mice were crossed with EIIA-Cre transgenic mouse to get EIIA-Cre;HIFRNAi<sup>lox/+</sup> mice. The conditional knock down mice were viable and developed normally. The results of RT-PCR indicated that the HIF-1 $\alpha$  mRNA expression of liver, lung and kidney were reduced significantly compared with the normal control.

**Keywords:** HIF-1  $\alpha$ , shRNA, transgenic mice

缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是细胞在缺氧等条件下稳定表达的具有转录活性的核蛋白,它能够与靶基因调控序列中的 HRE 相结合,诱导靶基因的表达变化,介导机体对缺氧、缺血产生适应性反应。目前已确定的 HIF-1 靶基因近 50 种<sup>[1]</sup>,其中包括 EPO<sup>[2]</sup>、转铁蛋白、VEGF 等一系列功能重要的蛋白质。HIF-1 是由 $\alpha$ 亚基和 $\beta$ 亚基组成的异源二聚体,HIF-1 $\beta$ 在一般情况下很稳定,对 HIF-1 的调节通常发生在 HIF-1 $\alpha$ 。氧浓度是调节 HIF-1 $\alpha$ 蛋白水平和功能的重要因素,在常氧条件下,HIF-1 $\alpha$ 亚基被蛋白酶所降解;缺氧时,HIF-1 $\alpha$ 降解减少,HIF-1 $\alpha$ 蛋白水平提高,促转录活性增加<sup>[3]</sup>。

为更好地研究 HIF-1 $\alpha$ 在体内的功能及相应生物学机制,研究者建立了 HIF-1 $\alpha$ 条件性敲除小鼠模型,但遗憾的是在全身<sup>[4]</sup>、血管内皮<sup>[5]</sup>以及软骨细胞<sup>[6]</sup>敲除 HIF-1 $\alpha$ 基因的小鼠在胚胎期或出生后即死亡,难以进一步研究 HIF-1 $\alpha$ 基因的功能。如能部分降低 HIF-1 $\alpha$ 的表达或功能,可望获得能存活的 HIF-1 $\alpha$ 在特定细胞表达降低的小鼠模型。RNAi 技术的发展,为实现靶基因表达的部分降低提供了可能。在较早的哺乳动物 RNAi 实验中,siRNAs 通过体外化学方法或体外转录合成,基因沉默效应可以持续几天,甚至可遗传给子代细胞,但最终还是会消失的。为了能够达到长时间沉默基因的目的,研究者开发出能够在哺乳动物细胞中持续表达 siRNAs 的表达载体。Svoboda<sup>[7]</sup>首先尝试使用可以表达短发夹状 RNAs (small hairpin RNAs, shRNAs)的质粒表达载体,与瞬时转染 siRNA 相比,质粒表达载体引发的 RNAi 效果相当甚至更好。近年来还建立了基于四环素<sup>[8]</sup>、蜕皮素<sup>[9]</sup>反应元件以及 Cre-LoxP 系统<sup>[10]</sup>的可诱导表达 shRNA 的质粒表达载体。Coumoul<sup>[11]</sup>等成功地运用基于 Cre-LoxP 系统的表达载体获得了能够在特定组织中降低 FGFR2 表达的转基因小鼠。为获得在特

定细胞或组织部分降低 HIF-1 $\alpha$ 表达的小鼠模型,本文针对 HIF-1 $\alpha$ 构建了基于 Cre-LoxP 系统的可诱导表达短发夹状 RNA 的真核表达载体,并建立了 RNAi 转基因小鼠。经与现有的 Cre 转基因小鼠交配,获得了在不同器官组织特异性敲低 HIF-1 $\alpha$ 基因的小鼠模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

小鼠腹腔巨噬细胞系 RAW264.7 由重庆医科大学徐晓玉教授惠赠。pBSK/U6-NEO 真核表达载体由 NIH 邓初夏教授惠赠,CRE 重组酶真核表达载体 CRE-ER<sup>T2</sup> 由 Chambon P.P 教授惠赠。转染试剂 Lipofectamin 2000<sup>TM</sup>、Trizol、RT-PCR 相关试剂均购于 Invitrogen 公司。限制性内切酶、工具酶等购自 TaKaRa 公司。测序试剂为美国 ABI 公司产品。细胞培养液、小牛血清等为 Hyclone 公司产品。4-HT 购自 Sigma 公司,G418、潮霉素为 Roche 公司产品。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 载体 HIF-AB 和 HIF-CD 构建

GenBank 查找 HIF-1 $\alpha$  cDNA 全长序列,应用 Qiagen 公司 RNAi 设计软件并参考有关文献,设计针对 HIF-1 $\alpha$ 进行 RNAi 的两个靶点,进行 Blast 基因同源性分析以保证基因沉默的特异性, RNA Draw 软件分析 mRNA 二级空间结构。为避免编码发夹状 siRNA 的 DNA 双链在复性过程中发生自身折叠,降低连接效率,将发夹状 siRNA DNA 双链从茎环处分为两段分别人工合成,其序列分别为: HIF-1A: 5'-GGCG GCG AGA ACG AGA AGA AA-3', HIF-1B: 5'-AGC TTT TCT TCT CGT TCT CGC CCGC-3'; HIF-2A: 5'-AGC TTT TCT TCT CGT TCT CGC CGCC CTT TTT G-3', HIF-2B: 5'AAT TCA AAA AGGG CGG CGA GAA CGA GAA GAA A-3'。

HIF-1C: 5'-GGC CAT ATT CAT GTC TAT GAA A-3', HIF-1D: 5'-A GCT TTC ATA GAC ATG AAT ATG GCC-3'; HIF-2C: 5'-GC TTT CAT AGA CAT GAA TAT GGC CCT TTT TG-3', HIF-2D: 5'-AAT TCA AAA AGG GCC ATA TTC ATG TCT ATG AA-3'。HIF-AB 和 HIF-CD 载体构建过程见图 1。选取 RNA 干扰效率较高的载体, 以 *Afl* III 和 *Kpn* I 酶切, 回收大小为 2.7 kb 的片段用于显微注射。

**1.2.2 HIF-AB 和 HIF-CD 表达载体转染 RAW264.7 细胞**

整个转染过程参照 Lipofectamine 2000™ 说明书进行。简言之, 转染前 24 h, RAW264.7 细胞以  $5 \times 10^5$ /孔接种 6 孔培养板, 真核表达载体 CRE-ER<sup>T2</sup> 与转染试剂 Lipofectamine 2000™ 按 1:3 混合, 逐滴加入 opti-MEM I 培养液中孵育 6 h 后, 改用完全培养基 (10%小牛血清), 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 孵箱中继续培养 48 h, 加入潮霉素(300  $\mu$ g/mL)进行筛选, 约 3 周后获得抗性细胞, 获得的抗性细胞于潮霉素浓度 100  $\mu$ g/mL 培

养液中维持培养。将获得的抗性克隆细胞以  $5 \times 10^5$ /孔接种 6 孔培养板, 按上述方法转染 HIF-AB 和 HIF-CD 质粒, 所用选择性培养基 G418 浓度为 500  $\mu$ g/mL, 潮霉素浓度 100  $\mu$ g/mL, 同时转染 pBSK/U6-NEO 质粒作为阴性对照。经过两次筛选得到的阳性克隆细胞命名为 RAW-CRE-HRAB 和 RAW-CRE-HRCD。在培养液中加入 4-HT(1  $\mu$ mol/L) 诱导 CRE 重组酶表达, 96 h 后在培养液中加入化学缺氧剂 CoCl<sub>2</sub> (150  $\mu$ mol/mL) 诱导 HIF-1 $\alpha$  表达。培养 24 h 后, 收集细胞进行相关指标的检测。

**1.2.3 半定量 RT-PCR 检测**

收获培养细胞, Trizol 法提取细胞总 RNA, RNA 定量为 500 ng/ $\mu$ L 并进行电泳纯度检测, 逆转录合成 cDNA 第一链, 引物设计如下: HIF-1 $\alpha$  sense: 5'-CCC AAA GAC AAT AGC TTC GC-3'; HIF-1 $\alpha$  antisense: 5'-CTG CCT TGT ATG GGA GCA TT-3';  $\beta$ -actin sense: 5'-TTG TTA CCA ACT GGG ACG ACA

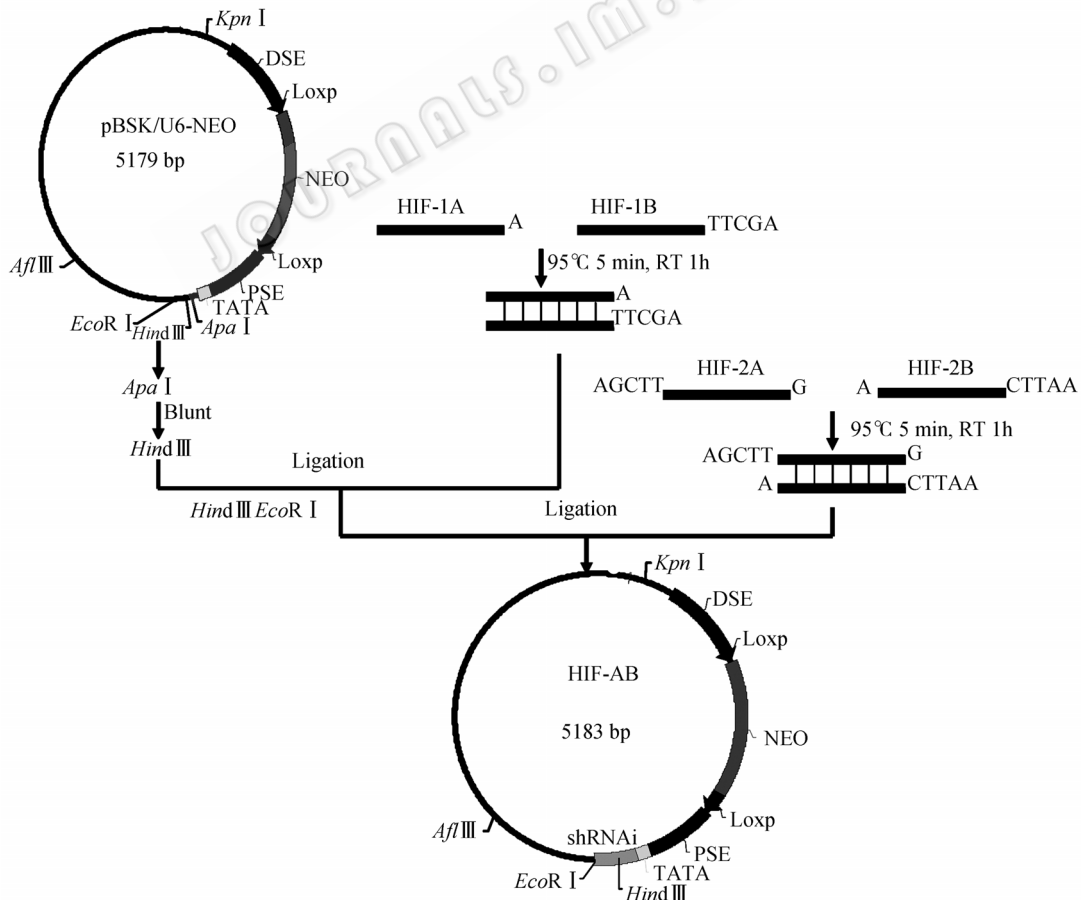


图1 RNAi表达载体的构建  
Fig. 1 Construction of RNAi expression vector

TGG-3';  $\beta$ -actin antisense: 5' -GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AGG-3'。2%琼脂糖电泳鉴定产物, Bio-Rad 凝胶分析软件进行灰度值分析。以目的产物/内参照的灰度值比值表示结果。

#### 1.2.4 转基因注射

取 4~5 周龄的 FVB/N 雌鼠, 超排后取卵, 将纯化的 DNA(用注射缓冲液稀释至 2.5 ng/ $\mu$ L)经显微注射到受精卵原核中, 再将注射后的卵移植到假孕鼠的输卵管, 每只假孕鼠的输卵管单侧移卵约 20 枚。

#### 1.2.5 小鼠基因组 DNA 的提取

待小鼠 10 日龄后剪取鼠尾 0.5 cm, 加入含有 2  $\mu$ L 蛋白酶 K (10mg/mL)的组织裂解液 200  $\mu$ L, 56°C 消化过夜。离心取上清, 无水乙醇沉淀, 70%酒精洗涤, 稍晾干后溶解于 200  $\mu$ L TE 缓冲液中。

#### 1.2.6 PCR 及测序鉴定转基因阳性鼠

选取 RNA 干扰片段以及 NEO 基因上的引物 TW13 用于转基因阳性鼠的鉴定。TW13: 5' -CAG CTC ATT CCT CCC ACT CAT GAT-3'; HIF-1B、HIF-1C 序列如下所示, 分别位于 NEO 基因序列和 siRNA 片段上。转基因阳性小鼠应扩增出大小为 583 bp 的片段, 而野生型小鼠则不能扩增出相应片段。

HIF-AB :

```
GCAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATCT
AGAGTCGACAGCACAAAAGGAACTCACCCCTAACTGTAAA
GTAATTGTGTGTTTTGAGACTATAAATATCCCTTGGAGAAA
AGCCTTGTGTTGGGCGGCGAGAACGAGAAGAAAANNNNN
NNN
AGCTTGACATGATTACGCCAAGCGCGCATTACCCTCACTA
AAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCC
GCTCTAGAAGTGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCA
AAAAGGGCGAGAACGAGAAGAAAAGCTANNN
```

HIF-CD :

```
ACAAAAGGAACTCACCCCTAACTGTAAAGTAATTGTGTGT
TTTGAGACTATAAATATCCCTTGGAGAAAAGCCTTGTGTTG
GGCCATATTCATGTCTATGAAANNNCNCNACCCNCCNCC
TNCCNNNNAACC
AAAANTGGGANCTCCCCGCGGTGGCGGCCNTCNTCGACT
AGTGGGATCCCCCGGGNTGCAGG
AATTCAAAAGGGCCATATTCATGTCTATGAAANNNNNT
NNNNNN
```

#### 1.2.7 条件敲除小鼠的鉴定以及组织 HIF-1 $\alpha$ mRNA 表达水平的检测

上述得到的阳性 F1 代转基因小鼠经与 EIIA-Cre 转基因小鼠交配, 提取小鼠基因组 DNA 行 PCR 鉴定, 所用引物为 HIF1B 和 TW12。HIF1B 序列见前, TW12: 5' -ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAG TTC-3'。得到的 EIIA-Cre; HIFRNAi<sup>fllox/+</sup>小鼠生长至

2 月时, 处死, Trizol 法提取心脏、肝脏、肺脏、肾脏等组织总 RNA, 取 1  $\mu$ g 总 RNA 为模板合成 cDNA 第一链, 然后进行 PCR 扩增。

#### 1.2.8 统计处理

采用 SPSS10.0 统计分析软件, 样本显著性分析用配对 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 表达载体的构建及转基因注射片段的纯化

为减少 RNA 干扰片段回文结构造成的测序难度, 将重组质粒用 *Hind* III 酶切后回收酶切产物进行测序分析, 证实已将针对序列的两个靶点设计的寡核苷酸双链克隆入真核表达载体, 插入序列完全正确, 这两个载体分别命名为 HIF-AB 和 HIF-CD。测序结果如下(加框部分为本研究插入的 HIF-1 $\alpha$  shRNA 序列)。表达载体 HIF-AB 酶切获取转基因注射片段电泳图见图 2。

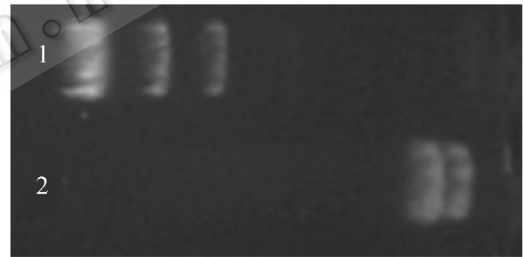


图2 HIF-1 $\alpha$  RNAi-AB酶切图谱

Fig. 2 HIF-1  $\alpha$  RNAi-AB cut with *Afl* III and *Kpn* I

1:  $\lambda$ /*Hind* III marker; 2: RNAi vector cut with *Afl* III and *Kpn* I

### 2.2 RAW264.7 细胞 HIF-1 $\alpha$ mRNA 水平表达检测

构建 CRE-ER<sup>T2</sup> 与 HIF-AB 和 CRE-ER<sup>T2</sup> 与 HIF-CD 稳定表达的细胞系后, 经 1  $\mu$ mol/L 的 4-HT 诱导 CRE-ER<sup>T2</sup> 表达 CRE 重组酶, 通过 RT-PCR 来检测构建的载体的 RNAi 效率, 结果见图 3 所示。HIF-1 $\alpha$  和  $\beta$ -actin 相对应的扩增片段大小分别为 306 bp 和 382 bp。结果表明, 针对两个靶点设计的短发夹状 RNA 真核表达质粒转染 RAW264.7 细胞后, HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达水平明显受到抑制。以目的产物/内参照的灰度值比值进行半定量分析, 与未转染组相比, 转染组细胞中 HIF-1 $\alpha$  的表达分别下降了 85% 和 72%, 具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而阴性对照组之间没有显著性差异。

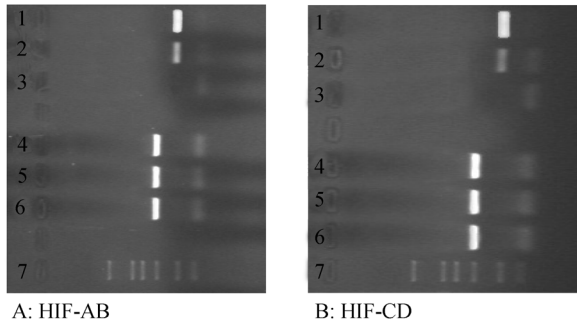


图 3 RAW264.7 细胞内 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达变化  
Fig. 3 The changes of HIF-1 $\alpha$  mRNA expression in RAW264.7 cells

1: pBSK/U6-NEO empty vector transfection group; 2: HIF-1 $\alpha$  shRNAi vector (A: HIF-AB; B: HIF-CD) transfection group; 3: negative control; 4~6:  $\beta$ -actin; 7: DL2000 marker

### 2.3 转基因阳性鼠的鉴定

以 PCR 法鉴定所得小鼠, 共获得 G<sub>0</sub> 代 HIF-1 $\alpha$  RNAi 阳性鼠 2 只, F<sub>1</sub> 代 2 只。见图 4。对这些阳性鼠 PCR 产物进行测序验证, 证实所得 G<sub>0</sub> 代和 F<sub>1</sub> 代阳性鼠的基因组中均含有注射的目的片段。

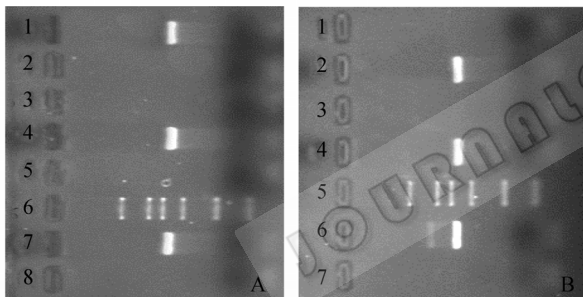


图 4 PCR 鉴定 HIF-1 $\alpha$ RNAi 转基因小鼠

Fig. 4 Identification of transgenic mouse by PCR

A: identification of founder transgenic mouse. 1~5: mouse tails; 6: DL2000 marker; 7: positive control; 8: negative control  
B: identification of F<sub>1</sub> transgenic mouse. 1~4: mouse tails; 5: DL2000 marker; 6: positive control; 7: negative control

### 2.4 条件敲低小鼠的获得以及组织 HIF-1 $\alpha$ mRNA 表达水平的检测

经与 EIIA-Cre 转基因小鼠交配, 得到的 EIIA-Cre; HIFRNAi<sup>flox/+</sup> 小鼠生长良好, 至 2 月时, 提取心脏、肝脏、肺脏、肾脏等组织总 RNA, 行 RT-PCR 检测 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达水平, 结果如图 5 所示。结果表明, 与全身各组织均表达 Cre 的转基因小鼠交配得到的小鼠, 肝脏、肺脏、肾脏等组织中 HIF-1 $\alpha$  mRNA 具有不同程度的降低。与同窝的正常对照相比, 肝组织约降低了 56%, 肺组织约降低了 62%, 肾脏组织约降低了 77%( $P < 0.05$ )。

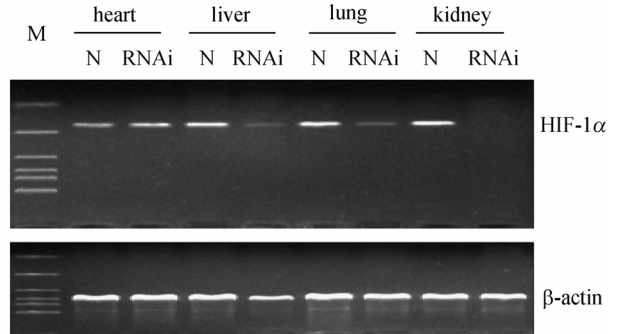


图 5 条件敲低小鼠中 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的表达变化  
Fig. 5 The expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA in the inducible RNAi mouse

M: DL2000 marker; N: normal Control mouse; RNAi: EIIA-Cre; HIFRNAi<sup>flox/+</sup> mouse

## 3 讨论

氧稳态是机体或细胞正常功能所必需的。低氧现象可见于胚胎发育等生理过程, 也是肿瘤、心血管疾病等许多疾病发病过程中的一个重要病理因素。大量研究表明 HIF-1 靶基因的编码产物在胚胎发育、血管生长与重塑、红细胞生成、葡萄糖转运、糖酵解、离子代谢、细胞凋亡、细胞增殖分化、炎症、肿瘤生长、浸润与转移等诸多方面起重要作用<sup>[1-3]</sup>。HIF-1 是由 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  组成的异源二聚体, HIF-1 $\alpha$  对低氧敏感, 是 HIF-1 的特异性氧调节亚基, 决定 HIF-1 的生物活性, 因此目前对 HIF-1 的研究主要侧重于对 HIF-1 $\alpha$  的研究。

建立去除或降低某个基因的遗传工程小鼠, 是研究基因功能的有效方法之一。常规基因敲除技术虽然有效, 但费用高、周期长且失败的风险较大。反义技术以及核酶技术虽然比较简单, 却存在效果较差, 实验系统不稳定等缺点。自从 RNAi 现象发现以来, 许多学者运用 RNAi 技术在植物、线虫、果蝇等低等动植物以及哺乳动物中进行了大量研究, 并显示不同长度的双链 RNA(double strand RNA, dsRNA) 可以使不同类型细胞的靶基因表达明显下降甚至没有表达。由于 RNAi 技术简便、快捷、高效, 如今成为遗传学研究的一把利器。2005 年比利时生物公司 Galapagos 利用腺病毒表达的抗 4900 个药物标靶的 shRNAs 对基因组高通量筛选, 找到了包括关节炎、哮喘和阿尔茨海默病在内的多种药物标靶<sup>[14]</sup>。Song<sup>[15]</sup> 等通过鼠尾静脉注射合成的小鼠 Fas 基因的特异性 siRNA 片段, 特异性的沉默了小鼠肝细胞 Fas 蛋白的表达。Gupta<sup>[8]</sup> 和 Wang<sup>[9]</sup> 分别建立了基于四环素和蜕皮素反应元件的可诱导表达

siRNA 的真核 shRNAs 表达载体, 利用这一技术实现了靶基因的可诱导性沉默。

本研究利用可以稳定表达 shRNA 的真核表达载体 pBSK/U6-NEO, 该载体在 pol III 启动子的近端调控序列和远端调控序列之间插入两端带有 LoxP 的 NEO 基因, TATA 序列下游为对应目的基因特异序列的、带有 4~5 个 T 的转录终止位点、其 RNA 能形成发夹结构的 DNA 序列。本实验设计合成了针对 HIF-1 $\alpha$  基因的特异性 siRNA 片段, 将复性后的 siRNA 片段插入 pBSK/U6-NEO, 构建 HIF-1 $\alpha$  siRNA 真核表达载体, 经 PCR、测序验证所插入的片段正确无误。将该载体转入已转染了 CRE-ER<sup>T2</sup> 质粒的 RAW264.7-CRE 细胞系, CRE-ER<sup>T2</sup> 表达载体在 4-HT 的诱导下表达 CRE 重组酶, 位于 pol III 启动子近端调控序列和远端调控序列之间 NEO 基因被重组去除, pol III 启动子功能恢复, 转录形成双链 siRNA 片段, 干预 HIF-1 $\alpha$  转录, 下调 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达。结果显示, 转染组细胞内 HIF-1 $\alpha$  mRNA 水平较对照组分别下降 85% 和 72%, 选取干扰效率较高的表达载体进行显位注射获得转基因小鼠。经显微注射获得的转基因小鼠与组织特异性表达 CRE 的相关转基因小鼠交配后即可实现组织特异性的 HIF-1 $\alpha$  基因敲降。由于在全身<sup>[4]</sup>、血管内皮细胞<sup>[5]</sup>和软骨细胞<sup>[6]</sup>敲除 HIF-1 $\alpha$  后小鼠在胚胎早期或出生后即发生死亡, 提示在内皮、软骨等细胞高效率降低 HIF-1 $\alpha$  可导致胚胎期或出生后早期死亡, 而我们建立的 HIF-1 $\alpha$  RNAi 转基因小鼠可望在内皮、软骨细胞等细胞或全身只部分敲低 HIF-1 $\alpha$  水平, 从而建立可存活的在内皮、软骨等细胞或全身降低 HIF-1 $\alpha$  的小鼠模型。经过与全身表达的 EIIA-Cre 转基因小鼠交配, 我们获得了可在全身各组织降低 HIF-1 $\alpha$  mRNA 水平的 EIIA-Cre; HIFRNAi<sup>fllox/+</sup> 小鼠。降低 HIF-1 $\alpha$  mRNA 水平的小鼠发育正常, 与同窝的正常对照小鼠之间无明显的异常。经过 RT-PCR 证实, 该小鼠肝、肺、肾脏等组织 HIF-1 $\alpha$  mRNA 水平明显降低, 约为正常对照的 44%、38.2% 和 23.5%。与传统条件性敲除动物模型的建立方法相比, 本研究采用的方法具有简便快捷、费用较低等优点。此外, 由于 RNAi 具有放大效应<sup>[1]</sup>, 仅杂合子 RNAi 转基因动物即可出现表型, 缩短了传统基因敲除(条件性敲除)动物模型获取纯合子的繁殖时间。尽管目前 RNAi 转基因动物技术还存在着降低靶基因表达不如常规基因敲除高、特异性相对较差等不足之处, 但随着 RNAi 技术的不断发展, 这一方法将逐渐成为研究基因功能的一个有

力手段。

## REFERENCES

- [1] Semenza GL. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*, 2002, **64**(5-6): 993-998.
- [2] Stockmann C, Fandrey J. Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, **33**(10): 968-979.
- [3] Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, **13**(2): 167-171.
- [4] Iyer N V, Kotch LE, Agani F, et al. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev*, 1998, **12**: 149-162.
- [5] Licht AH, Muller-Holtkamp F, Flamme I, et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor activity in endothelial cells disrupts embryonic cardiovascular development. *Blood*, 2006, **107**(2): 584-90.
- [6] Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, et al. Hypoxia in cartilage: HIF-1 is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes & Development*, 2001, **15** (9): 2865-2876.
- [7] Svoboda P, Stein P, Schultz RM. RNAi in mouse oocytes and preimplantation embryos: effectiveness of haperin dsRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **87**: 1099-1104.
- [8] Gupta S, Schoer RA., Egan JE, et al. Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, **101**: 1927-1932.
- [9] Wang J, Tekle E, Oubrahim H, et al. Stable and controllable RNA interference: investigating the physiological function of glutathionylated actin. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, **100**: 5103-5106.
- [10] Coumoul X, Li W, Wang RH. Inducible suppression of Fgfr2 and Survivin in ES cells using a combination of the RNA interference (RNAi) and the Cre-LoxP system. *Nucleic Acids Research*, 2004, **32**: e85.
- [11] Coumoul X, Shukla V, Li CL, et al. Conditional knock-down of Fgfr2 in mice using Cre-LoxP induced RNA interference. *Nucleic Acids Research*, 2005, **33**: e102.
- [12] Lee SH, Wolf P L, Escudero R, et al. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med*, 2000, **343**(2): 148-149.
- [13] Marti HJ, Beraudin M, Bellail A, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes Neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol*, 2000, **156**: 965-976.
- [14] Wu D, Wu BY, Liang HY, et al. The application of RNAi to the medical genetics. *Journal of Peking University(Health Sciences)*, 2005, **37**(1): 106-110. 吴丹, 吴白燕, 梁红业. RNA 干扰技术在医学遗传学中的应用. *北京大学学报(医学版)*, 2005, **37**(1): 106-110.
- [15] Song E, Lee SK, Wang J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*, 2003, **9**: 347-351.
- [16] Hammond SM, Bernstein E, Beach D et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature*, 2000, **404**(6775): 293-296.