

miR-210 诱导犬 BMSCs 成血管及成骨向分化的体外实验研究

王默涵¹, 邹多宏¹, 周咏¹, 吴轶群², 朱艳秋¹, 何家才¹

摘要 目的 体外检测 miR-210 基因诱导犬骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨和成血管方向分化的作用,探讨目的基因双重调控作用。方法 构建慢病毒载体 Lenti-miR-210 和 Lenti-LacZ,并分别用 Lenti-LacZ 和 Lenti-miR-210 转染 BMSCs。分别在目的基因转染 BMSCs 的第 0、1、4、7、14、21 天提取 mRNA 和蛋白,利用 RT-PCR 和 Western blot 检测关键性成血管和成骨因子[血管内皮生长因子(VEGF)和核心结合因子 2(Runx2)]的表达。同时在目的基因转染的第 21 天通过碱性磷酸酶(ALP)和钙结节茜素红染色观察体外骨形成的情况。结果 慢病毒载体 Lenti-miR-210 和 Lenti-LacZ 能够成功转入 BMSCs 中,并在目的基因转染后,miR-210 能够显著上调 BMSCs 关键性成骨和成血管因子 VEGF 和 Runx2 的表达($P < 0.05$);碱性磷酸酶和茜素红染色显示,相对于 BMSCs 组和 Lenti-LacZ 组,Lenti-miR-210 组能够明显促进 BMSCs 的成骨向分化。结论 miR-210 可以显著促进 BMSCs 向成骨和成血管方向分化,这为将来的体内实验奠定了基础。

关键词 miR-210; 骨髓间充质干细胞; 基因转染; 血管生成; 骨形成

中图分类号 Q 7; R 34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)09-1258-05

目前临床上骨缺损的修复重建仍然面临挑战。除了自体骨移植,再生医学或组织工程骨的研究和临床应用也日益受到关注。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)是再生医学或骨组织工程常用的种子细胞,其具有自我更新和

多向分化的潜能。在骨的发育及再生中,血管生成与骨形成密不可分,并以耦合的形式存在^[1]。组织工程骨的研究中,功能性血管网的建立是骨形成的关键因素^[2]。因此,探索具有双重调控作用的生长因子已经成为骨组织工程研究领域的热点和难点。微小 RNA(microRNAs, miRNAs)是由 20~22 个核苷酸组成的单链 RNA,在细胞的基因调控中具有重要作用^[3],研究^[4-5]显示 miRNAs 在血管再生和骨修复过程中发挥重要作用,动物实验^[6]表明 miR-210 有促进血管生成、抑制细胞凋亡的作用,而且其可通过抑制转化生长因子- β (TGF- β)/activin 信号通路促进成骨细胞的分化。基于此,该研究运用基因转染技术,探讨 miR-210 诱导 BMSCs 成骨及成血管方向分化的双重调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取健康 36 周龄雄性拉布拉多犬(约 15 kg),由安徽医科大学实验动物中心提供,在整个实验过程中对动物的处置均符合医学伦理学标准。

1.1.2 慢病毒载体的构建 慢病毒载体 Lenti-LacZ 和 Lenti-miR-210 的构建由和元生物技术(上海)有限公司构建、鉴定和提供,病毒滴度为 2.33×10^9 TU/ml。病毒包装完成后,收集病毒原液,超速离心机浓缩,并进行病毒滴度测定,感染复数(multiplicity of infection, MOI) = 加入病毒总数/细胞总数,本研究预实验分别采取 MOI 值为 1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 转染细胞,病毒转染 4~7 d 后倒置荧光显微镜下观察细胞形态及绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)表达情况,确定最佳 MOI 值。

1.1.3 主要试剂和仪器 DMEM 培养基、胰蛋白酶、TRIzol RNA 抽提试剂盒(Gibco 公司,美国);胎牛血清(FBS)(浙江天杭生物科技有限公司,浙江);逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本);成骨及成血管因子 核心结合因子 2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)和血管内

2016-04-14 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31370983、81371114、81371190); 安徽省自然科学基金(编号: 1408085MK129); 安徽省杰出青年科学基金(编号: 1508085J08); 高校优秀青年人才支持计划重点项目(编号: gxyqZD2016058); 安徽医科大学“青年拔尖人才支持计划”

作者单位: ¹安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032

²上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔种植科,上海 200011

作者简介: 王默涵,男,硕士研究生;

何家才,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: hejiacai@163.com

皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 抗体 (Abcam 公司, 英国); 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 检测试剂盒、RIPA 裂解液、蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术有限公司, 上海); 慢病毒载体 (和元生物有限公司, 上海); 茜素红 (Sigma 公司, 美国); PVDF 膜 (Invitrogen 公司, 美国); Runx2 和 VEGF PCR 引物 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 上海]。

1.2 方法

1.2.1 犬 BMSCs 体外培养 用 3% 戊巴比妥钠 (1 ml/kg) 对拉布拉多犬进行静脉注射麻醉, 一侧髂骨部位剃毛、消毒、铺巾。在无菌条件下抽取犬髂骨髓约 5 ml, 完全培养基 (含 10% FBS、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的培养基) 制成单细胞悬液, 接种至培养皿中进行原代培养, 待细胞融合达 80% ~ 90% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取生长状态良好的第 2 代细胞用于后续实验。

1.2.2 流式细胞术检测 BMSCs 表面标志物 收集第 2 代对数生长期细胞制成细胞悬液, 调整细胞浓度为 3×10^6 个/ml 分别加入 CD34-PE、CD44-FITC、CD45-FITC、CD90-APC 单克隆抗体各 2 μ l, 室温避光孵育 1 h, PBS 洗 2 次, 加入 500 μ l PBS 重悬细胞, 行流式细胞术分析。

1.2.3 犬 BMSCs 的转染和实验分组 根据预实验结果, 当 MOI = 10 时, 转染效率最高, 且 BMSCs 仍然保持增殖状态, 说明该转染滴度对 BMSCs 扩增状态影响很小; 实验分组为 BMSCs 组、Lenti-LacZ 组和 Lenti-miR-210 组。取对数生长期的细胞按照每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板中, 根据 MOI 值计算所需要的病毒量加入病毒浓缩液及总浓度为 8 μ g/ml 的聚凝胺。12 h 后对细胞进行换液, 加入完全培养液, 观察细胞形态及生长情况, 并在转染后的第 3 ~ 7 天运用倒置荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达情况, 确定病毒转染效率。

1.2.4 ALP 和茜素红钙结节表达的检测 将状态良好的 BMSCs 按照每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板中, 病毒转染及分组同 1.2.3, 完全培养基培养 3 周, PBS 冲洗 2 次, 每次 3 min, 4% 多聚甲醛固定 20 min 后, PBS 冲洗 2 次, 每次 3 min, 在各自的 6 孔板中分别加入 ALP 显色试剂和 2% 茜素红染液染色 40 min, 双蒸水冲洗 2 次, 扫描仪下扫描后置于倒置显微镜下观察钙结节形成情况, 检测 BMSCs 向成骨细胞的分化。

1.2.5 RT-PCR 测定成骨和成血管相关基因 mRNA

的表达 将状态良好的 BMSCs 按照每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板中, 病毒转染同 1.2.3, 分别于转染后的第 0、1、4、7、14、21 天采用 TRIzol 法提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, 并进行 PCR 扩增。为校正标本 RNA 质量及逆转录效率的差异, 将标本检测所得的 CT 值与相应的 GAPDH 基因 CT 值相减, 进行标准化, 实验重复 3 次。

1.2.6 Western blot 检测成血管和成骨相关蛋白的表达 将状态良好的 BMSCs 按照每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板中, 病毒转染同 1.2.3, Western blot 检测成血管和成骨相关蛋白的表达。具体方法: ① 分别于转染后第 0、1、4、7、14、21 天收集细胞, RIPA 蛋白裂解液提取蛋白; ② BCA 法测定蛋白浓度后计算含有 20 ~ 60 μ g 蛋白的溶液体积, 每个样本以 30 μ g 上样进行; ③ 取出上样样品至 200 μ l EP 管中, 加入 4 $\times$ LDS 上样缓冲液使终浓度为 1 $\times$ LDS, 然后将样品置于 95 $^{\circ}$ C 中水浴 10 min, 使蛋白变性; ④ 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 常规转膜、一抗孵育、二抗行抗体杂交, ECL 发光、显影、定影。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 13.0 软件对数据进行 *t* 检验分析和方差分析, 检测结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病毒转染 BMSCs 效率的结果 根据预实验结果, 目的基因转染 5 d 后, 基因转染效率达到最高, 当 MOI = 10 pfu/细胞时, 转染效率最高, 且细胞形态为梭形, 旋涡状生长, 细胞仍维持增殖状态, 表明该转染滴度对细胞的扩增影响很小。基因转染 5 d 后, 荧光显微镜下观察其转染效率达 90% 以上。见图 1。

2.2 流式细胞术对 BMSCs 表面标志物的鉴定结果 流式细胞术分析显示, BMSCs 表面抗原 CD44、CD90 高度表达, 阳性表达分别为 97.2% 和 99.7%, 造血干细胞表面抗原 CD34 和 CD45 表达阴性, 阳性表达分别为 0.288% 和 0.074%。见图 2。

2.3 miR-210 对成骨细胞分泌 ALP 和成骨细胞矿化功能的影响 转染后 21 d, 可见培养的 BMSCs 聚集生长, ALP 染色 Lenti-miR-210/BMSCs 组可见较多的阳性表达, 而 BMSCs 组和 Lenti-LacZ/BMSCs 组很少表达 (图 3A)。茜素红染色显示, 在聚集生长中心可见点状染色阳性的钙化结节, 细胞周围钙盐被染成橘红色。BMSCs 组和 Lenti-LacZ/BMSCs 组仅有较少的钙结节形成, 而 Lenti-miR-210/BMSCs

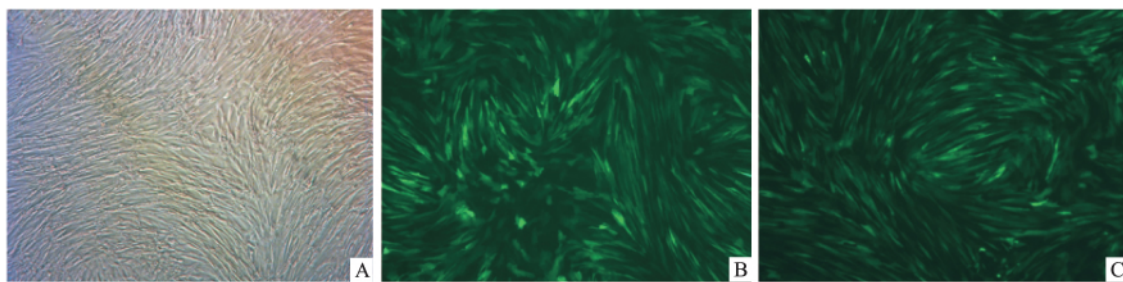


图1 目的基因转染结果 ×100

A: BMSCs; B: Lenti-LacZ/BMSCs; C: Lenti-miR210/BMSCs

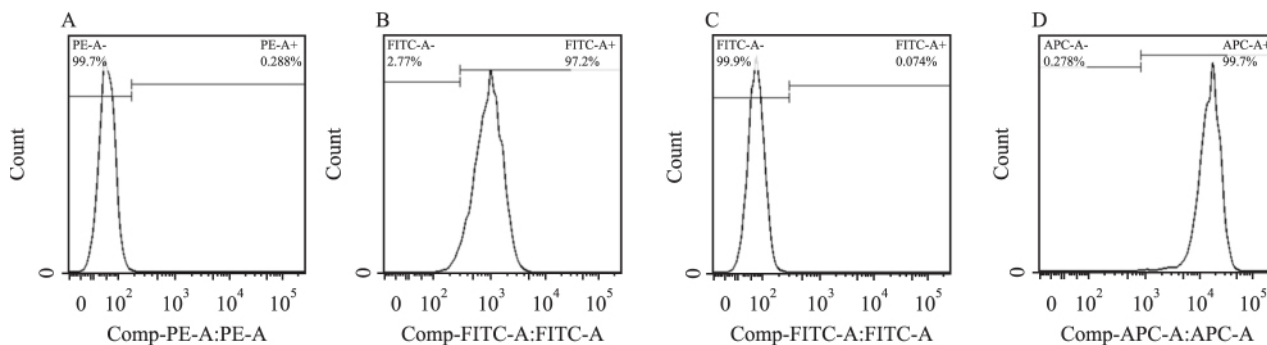


图2 犬 BMSCs 表面标志物阳性表达情况

A: CD34; B: CD44; C: CD45; D: CD90

组可见较多细胞聚集形成结节(图3B)。

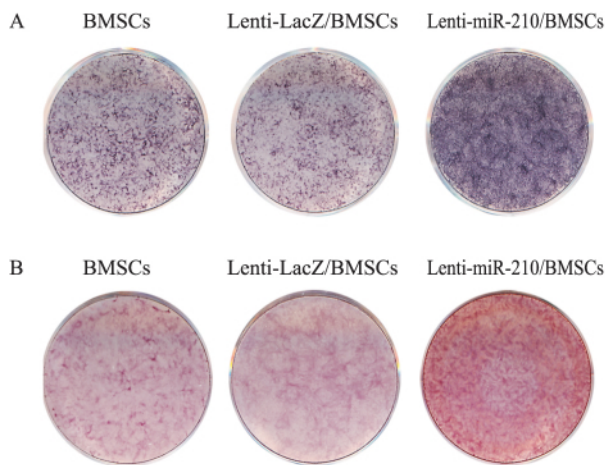


图3 犬 BMSCs 培养 21 d 后 ALP 和茜素红钙染色观察

A: ALP 染色; B: 茜素红染色

2.4 miR-210 介导的 BMSCs 成血管及成骨相关因子 mRNA 的表达 RT-PCR 结果显示, BMSCs 组 VEGF 和 Runx2 mRNA 维持低水平少量表达, Lenti-miR-210/BMSCs 组自目的基因转染后的第 4 天开始, VEGF 和 Runx2 mRNA 表达显著增高, 监测至第 21 天仍维持较高水平, 与蛋白表达趋势几乎一致。转染后第 4、7、14、21 天, BMSCs 组 VEGF 和 Runx2

mRNA 表达均低于 Lenti-miR-210/BMSCs 组 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 miR-210 介导的 BMSCs 成血管和成骨等标志分子检测 目的基因转染后的第 4 天 VEGF 蛋白过表达, 随着时间延长, 蛋白表达持续升高, BMSCs 组的 VEGF 蛋白表达水平和 Lenti-miR-210/BMSCs 组相比有明显差异; Runx2 蛋白在目的基因转染后, 基因表达趋势几乎与 VEGF 蛋白表达一致。见图 5。

3 讨论

本研究显示 miR-210 有促进 BMSCs 骨向和血管向分化的作用, 该因子具有双重调控功能。因为在骨发育和再生过程中, 血管生成与骨形成以耦合的形式存在, 密不可分, 所以在骨组织工程研究中, 血管化问题的重要性日益彰显。当组织工程骨的厚度超过 100 ~ 200 μm 时, 在体内构建能为细胞提供氧、营养及去除代谢废物的功能性血管会面临重大挑战^[1]。因此, 目前血管再生已被认为是骨组织工程继种子细胞、支架材料、细胞因子 3 大要素之后的第 4 大要素。

研究^[6-7]表明 miRNAs 参与了细胞的凋亡、增殖、衰老、自噬及分化等过程, 且能够通过上调或下

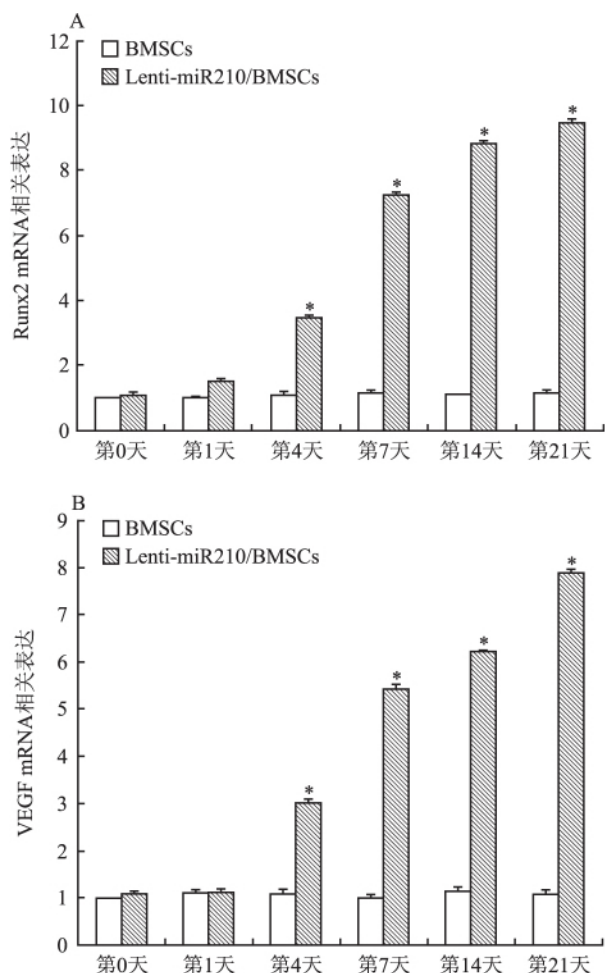


图4 RT-PCR检测目的基因转染BMSCs后
成血管及成骨相关因子的表达
A: Runx2; B: VEGF

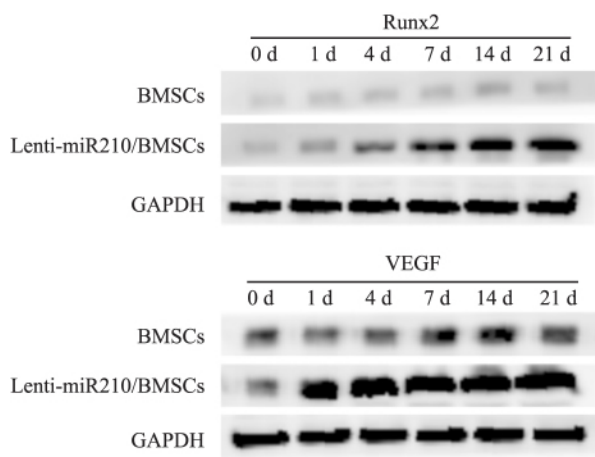


图5 Western blot检测相关蛋白表达

调这些过程来调节细胞的生物学功能。miRNAs在血管发生及形成中起着关键作用。miR-210在细胞低氧时高表达,是低氧诱导因子1 α (HIF-1 α) 的下游靶基因,HIF-1 α 驱动着 miR-210 的过表达和细胞

过程(细胞周期调节、线粒体功能、凋亡和血管生成等)^[8]。而且 HIF-1 α 可以诱导 VEGF 的高表达,VEGF 促进新血管形成后,新生血管为骨缺损区输送大量与骨形成相关的生长因子,生长因子成熟后可以演变为新骨^[9-10]。研究^[11-12]表明,在组织缺血时,miR-210 对调控内皮细胞血管化有决定性作用;且 miR-210 过表达后,其通过抑制 TGF- β /activin 信号通路传导促进成骨细胞的分化^[8]。因此,探索 miR-210 的双重调控作用(成骨和成血管)具有可靠的理论基础,该假说被本研究所证实。

由于慢病毒载体能高效的整合至靶细胞中长期稳定表达,且慢病毒载体不会产生特异性细胞反应^[13],而在预实验的结果中表明,慢病毒的转染对细胞的增殖不会产生显著影响,因此,本研究利用慢病毒构建 miR-210 过表达载体,当 MOI = 10 pfu/时,转染效率最高,且细胞仍维持增殖状态,表明该转染滴度对细胞的扩增影响较小。流式细胞术检测结果表明本实验所用的 BMSCs 符合成体干细胞特性(BMSCs 表面标志物显示,间充质干细胞表面抗原的 CD44 和 CD90 表达为高度阳性,分别为 97.2% 和 99.7%;造血干细胞表面抗原的 CD34、CD45 为高度阴性,分别为 0.288% 和 0.074%)^[14-15]。这为体内外细胞及动物实验提供了可靠的种子细胞来源。

RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,目的基因转染 BMSCs 后的第 4 天,Lenti-miR-210/BMSCs 组的 Runx2 和 VEGF 标志成骨和成血管因子出现过表达,持续到第 21 天。相比 BMSCs 组及 Lenti-LacZ 组,目的基因组的成骨和成血管因子的过表达差异有统计学意义,说明外源性 miR-210 有促进 BMSCs 血管及骨向分化的双重调控作用。ALP 是骨形成的功能性酶,是成骨细胞分化早期标志,并在成骨细胞的钙盐沉积中起关键作用^[16]。为了进一步验证上述结果,在目的基因转染 BMSCs 的第 21 天,利用 ALP 和茜素红染色。结果显示,Lenti-miR-210/BMSCs 在培养第 21 天时,ALP 和茜素红染色及钙结节表达明显高于其它两组(BMSCs 组和 Lenti-LacZ/BMSCs 组)。表明 Lenti-miR-210 能够促进 BMSCs 合成和分泌较多的成骨特异性蛋白及基质。本实验结果进一步证实我们的假说。

参考文献

- [1] Riddle R C, Khatri R, Schipani E, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1 α in angiogenic-osteogenic coupling [J]. J Mol Med,

- 2009, 87(6): 583–90.
- [2] Zou D, Zhang Z, He J, et al. Blood vessel formation in the tissue-engineered bone with the constitutively active form of HIF-1 α mediated BMSCs [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(7): 2097–108.
 - [3] van Rooij E, Olson E N. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(11): 860–72.
 - [4] Patella F, Rainaldi G. MicroRNAs mediate metabolic stresses and angiogenesis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(7): 1049–65.
 - [5] Mizuno Y, Tokuzawa Y, Ninomiya Y, et al. miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(13): 2263–8.
 - [6] Liu K, Huang J, Xie M, et al. MIR34A regulates autophagy and apoptosis by targeting HMGB1 in the retinoblastoma cell [J]. *Autophagy*, 2014, 10(3): 442–52.
 - [7] Zhang F, Cui J, Liu X, et al. Roles of microRNA-34a targeting SIRT1 in mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6(1): 1–13.
 - [8] Dang K, Myers K A. The Role of hypoxia-induced miR-210 in cancer progression [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(3): 6353–72.
 - [9] Voellenkle C, van Rooij J, Guffanti A, et al. Deep-sequencing of endothelial cells exposed to hypoxia reveals the complexity of known and novel microRNAs [J]. *Rna*, 2012, 18(3): 472–84.
 - [10] Zou D, He J, Zhang K, et al. The bone-forming effects of HIF-1 α -transduced BMSCs promote osseointegration with dental implant in canine mandible [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32355.
 - [11] Lou Y L, Guo F, Liu F, et al. miR-210 activates notch signaling pathway in angiogenesis induced by cerebral ischemia [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 370(1–2): 45–51.
 - [12] Alaiti M A, Ishikawa M, Masuda H, et al. Up-regulation of miR-210 by vascular endothelial growth factor in ex vivo expanded CD34+ cells enhances cell-mediated angiogenesis [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(10): 2413–21.
 - [13] D'Costa J, Mansfield S G, Humeau L M. Lentiviral vectors in clinical trials: Current status [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2009, 11(5): 554–64.
 - [14] Mödder U I, Roforth M M, Nicks K M, et al. Characterization of mesenchymal progenitor cells isolated from human bone marrow by negative selection [J]. *Bone*, 2012, 50(3): 804–10.
 - [15] Martins A A, Paiva A, Morgado J M, et al. Quantification and immunophenotypic characterization of bone marrow and umbilical cord blood mesenchymal stem cells by multicolor flow cytometry [J]. *Transplant Proc*, 2009, 41(3): 943–6.
 - [16] 宁寅宽, 李强, 蔡伟良, 等. 绿色荧光蛋白标记兔 BMSCs 体外成骨的定量能谱分析 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(4): 415–8.

miR-210 gene in promoting the formation of bone and blood vessel by canine BMSCs *in vitro*

Wang Mohan, Zou Duohong, Zhou Yong, et al

(Stomatologic College of Anhui Medical University, The Affiliated Stomatological Hospital
of Anhui Medical University, Key Lab of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the function of miR-210 gene in promoting the differentiation of BMSCs into bone and blood vessels *in vitro*. **Methods** The lentiviral vector carrying miR-210 or green fluorescent protein (GFP) gene (Lenti-miR-210 or Lenti-LacZ) was constructed and then transduced into the canine BMSCs. After transduced with targeted gene, expressions of relative osteogenic and angiogenic factors were detected by RT-PCR and Western blot on day 0, 1, 4, 7, 14 and 21. Alkaline phosphatase (ALP) and calcium nodules were detected by ALP staining and alizarin red staining (ARS) on day 21 of transduction. **Results** The BMSCs were successfully transduced with miR-210 and GFP recombinant lentiviral vectors. After the targeted gene was transduced, expressions of VEGF and Runx2 at the mRNA and protein levels were significantly increased ($P < 0.05$). Results of ALP and ARS staining showed that the targeted gene could induce the osteogenic differentiation of BMSCs more than Lenti-LacZ and BMSCs. **Conclusion** The miR-210 gene could promote the overexpressions of osteogenic and angiogenic factors, which could lay a foundation for the relative study *in vivo* in the future.

Key words miR-210; bone marrow mesenchymal stem cells; gene transduction; osteogenesis differentiation; angiogenesis differentiation