

miR-210 促进人牙周膜干细胞血管向分化作用的初步研究

古月, 王银龙

摘要 目的 构建 miR-210 的慢病毒载体 (Lenti-miR-210-Luciferase), 转染人牙周膜干细胞 (hPDLSCs) 后, 检测成血管因子低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 及血管内皮生长因子 (VEGF) 在 hPDLSCs 的表达。方法 分离培养 hPDLSCs, 并根据人 miR-210 基因 (NC_000011.9) 序列行引物设计及序列片段的 PCR 扩增, 将目的基因 PCR 产物连接到载体 pLVX-EGFP-3FLAG-EF1-Luc 上。将目的基因 PCR 产物和目的载体用 EcoR I 和 Xba I 分别进行酶切, 对质粒进行鉴定。采用 LR 重组系统构建慢病毒载体 Lenti-miR-210-Luciferase (Lenti-LacZ-Luciferase 为对照组)。转染 hPDLSCs 后, 通过 qPCR 和免疫组化法检测 HIF-1 α 及 VEGF 的表达。结果 通过对构建质粒克隆进行测序及酶切, 证实 Lenti-miR-210-Luciferase 构建成功。Lenti-miR-210-Luciferase 转染 hPDLSCs, 0、1、4、7、14 d 后行 qPCR 检测, 结果表明第 4 天 HIF-1 α 和 VEGF 明显过表达, 且持续到第 14 天。免疫组化结果显示, miR-210 转染 hPDLSCs 后, 抗 HIF-1 α 和抗 VEGF 染色呈阳性, 对照组呈阴性。结论 成功构建了慢病毒载体 Lenti-miR-210-Luciferase, 并且 miR-210 具有促进 hPDLSCs 血管向分化的作用。

关键词 牙周膜干细胞; miR-210; 低氧诱导因子-1 α ; 血管内皮生长因子; 慢病毒载体

中图分类号 Q 782; Q 342

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)10-1381-05

microRNAs (miRNAs) 是一种内源性非编码的单链小分子 RNA, 长度为 20~22 个核苷酸, 到目前为止, 人类基因组中有超过 1 400 个 miRNA 序列 (1 424 miRbase: 17.0)^[1]。参与血管生成的内皮 miRNAs, 也被称为 angiomiRs^[2], 其中 miR-210 在细胞低氧时高表达, 在组织缺血时, miR-210 对调控内皮细胞血管化具有决定性的作用^[3]。牙周膜干细胞 (periodontal ligament stem cells, PDLSCs) 是牙周组织中的成体干细胞, 具有高度增殖、自我更新能力和多分化潜能^[4-5]。临床上人牙周膜干细胞 (human

PDLSCs, hPDLSCs) 易于获得, 且不会引起额外的创伤。随着组织工程技术的发展, 把 hPDLSCs 作为转基因靶细胞修复受损组织或器官具有重要的临床应用价值。该研究用慢病毒 (Lenti-miR-210-Luciferase) 转染 hPDLSCs 后, 检测低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达, 旨在证明 miR-210 可以促进 hPDLSCs 血管向分化作用, 为 miR-210 介导的 hPDLSCs 进行体内实验研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 DMEM 培养基、胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); 10% 胎牛血清 (美国 HyClone 公司); Real-time PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); 一抗、二抗 (英国 Abcam 公司); NEAA、HEPES、pDONR221、高保真 DNA 聚合酶 (platinum pfx DNA Polymerase)、pLenti6.3/V5-DEST、载体构建试剂盒 (BLOCK-iTTM Pol II miRNAi Expression Vector Kit with EmGFP)、表达载体 pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR、病毒包装细胞系 293T、Packaging Mix 及限制性内切酶 EcoR I 和 Xba I (英国 Invitrogen 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 hPDLSCs 的分离和鉴定 选择 11~18 岁因正畸需要减数拔除前磨牙的患者, 收集前获得患者及其监护人的知情同意。临床取材后, 在超净工作台内, 将牙齿牙冠向下用滴管吸取无血清 DMEM 培养液冲洗牙齿约 30 s, 以冲去牙齿上可能粘附的血液、异物或细菌等。然后将牙冠部分浸入 75% 酒精内消毒约 2 min, 再用无血清 DMEM 培养液冲洗牙齿约 30 s。无菌条件下用锐利手术刀片刮取牙根中部 1/3 的牙周膜组织, 剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的碎块, 以 5 mm 间隔均匀铺于 6 cm 培养皿底, 加入 1 ml 含 20% FBS、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 DMEM 培养液, 倒置于孵箱内, 3 h 后待组织块贴壁完全, 翻转培养皿, 加入 3 ml 上述 DMEM 培养液, 继续培养, 倒置相差显微镜下观察细胞的生长及排列情况。从第 4 天开始, 每 3~5 d 换液 1 次, 7~15 d 左右当细胞从组织块周围游出并

2015-05-08 接收

基金项目: 安徽省科技厅重点课题 (编号: 10021303003)

作者单位: 安徽医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 合肥 230032

作者简介: 古月, 女, 硕士研究生;

王银龙, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wangylah@sina.com

达 70% ~ 80% 融合时, 0.25% 胰酶消化传代, 首次传代比例为 1 : 1。所用的细胞需要经过 2 代扩增。第 3 代细胞接种 24 h 后进行基因转染。

1.2.2 hsa-miR-210 过表达载体构建 载体 pLVX-EGFP-3FLAG-EF1-Luc GENE BANK 中人 miR-210 基因 (NC_000011.9) 位于 11p15.5 染色体上。根据人 miR-210 基因序列信息设计引物及序列片段的 PCR 扩增。引物信息如下: hsa-miR-210-EcoR I: FCTCAAGCTTCGAATTCTGGCTCGGACGCCCAAGTT; hsa-miR-210-Xba I: RCGCAGATCCTTCTAGACAGC-CTCAGCCCCACCAA。下划线处分别为 EcoR I 和 Xba I 酶切位点。

将目的基因 PCR 扩增产物和目的载体 pLVX-EGFP-3FLAG-EF1-Luc 用 EcoR I 和 Xba I 分别进行酶切。电泳分离酶切片段, 切胶回收目的片段。目的基因与载体片段同源重组后转化 *E. coli* 感受态细胞。用菌落 PCR 鉴定转化子, 阳性克隆送测序, 测序无误的克隆进行质粒抽提。

1.2.3 构建慢病毒载体 利用 pLVX-EGFP-3FLAG-EF1-Luc 作为载体, 采用萤火虫的荧光素酶 (Luciferase) 作为报告基因, 为本实验提供特异、稳定、高效的表达标记, 使用 Invitrogen 公司的慢病毒系统 (Lentivirus) 包装, 将慢病毒载体 Lenti-miR-210-Luciferase 和 Lenti-LacZ-Luciferase 分别转染 293T 细胞, 收集病毒液后进行浓缩。

1.2.4 慢病毒液滴度测定 将收集到的慢病毒液冰水浴融化后, 用含有 polybrene 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 2% FBS 的细胞培养液进行 10 倍比滴度稀释后感染 HEK293 细胞, 观察各稀释孔病毒感染情况并计数, 根据可数的最小梯度稀释孔的荧光细胞数目计算慢病毒滴度。经检测本实验制备的病毒滴度为 1×10^8 , 完全满足本实验的需要。

1.2.5 热成像检测实验 hPDLSCs 培养至第 3 代, 根据慢病毒的滴度 (1×10^8), 按照每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板中, 待细胞生长至 70% ~ 80% 融合时, 加入相应体积的慢病毒转染 hPDLSCs, 目的基因转染 hPDLSCs 后, 进行热成像检测试验。

1.2.6 体外检测 miR-210 促进 hPDLSCs 成血管作用

1.2.6.1 qPCR 检测成血管因子 HIF-1 α 及 VEGF 的表达 在培养皿中分别放入 Lenti-miR-210-Luciferase/hPDLSCs、Lenti-LacZ-Luciferase/hPDLSCs 及 hPDLSCs 培养, 后两者为对照组。然后在转染后 0、1、4、7、14 d 提取总 RNA 行 qPCR 检测 HIF-1 α 和

VEGF 表达。

1.2.6.2 细胞免疫组化及细胞核染色检测 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白的表达 将转染成功后的细胞接种于培养皿中, 5 d 后进行免疫组化染色, 4% 多聚甲醛固定 30 min; PBS 洗去固定液; 乙醇溶液梯度水化; 3% 过氧化物消除内源性过氧化物酶; EDTA 修复; 在 1% BSA 封闭液中室温封闭 30 min ~ 1 h; 加入即用型一抗 (鼠抗人 HIF-1 α 单抗, 鼠抗人 VEGF 单抗), 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜; PBS 清洗, 加入二抗, 温育 0.5 h, 冲洗后 DAB 显色, 苏木精对比染色, 中性树脂封片, 显微镜下观察结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。结果采用 ANOVA 方差分析。

2 结果

2.1 原代培养 hPDLSCs 的观察 原代培养 hPDLSCs 5 d 左右, 组织块周围有细胞爬出。细胞大部分呈梭形, 似成纤维样细胞 (图 1)。

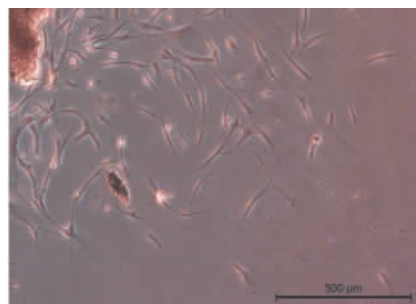


图 1 原代培养 hPDLSCs $\times 40$

2.2 Lenti-miR-210-Luciferase 和 Lenti-LacZ-Luciferase 慢病毒载体构建 利用 pLVX-EGFP-3FLAG-EF1-Luc 作为载体, 目的基因同源重组入表达载体的阳性克隆鉴定 (图 2)。

2.3 目的基因转染 hPDLSCs 后热成像检测 实验结果表明 Lenti-miR-210-Luciferase 转染 hPDLSCs (图 3A) 后, 热成像检测结果表明 Luciferase 高表达 (图 3B)。

2.4 qPCR 检测 miR-210 促进 hPDLSCs 血管向分化作用 采用慢病毒载体, 用 miR-210 转染 hPDLSCs, 在转染后 0、1、4、7、14 d 提取总 RNA 行 qPCR 检测关键成血管因子 HIF-1 α 和 VEGF 表达。在转染后的第 4 天, HIF-1 α 和 VEGF 明显过表达, HIF-1 α 在第 7 天达峰值, 第 14 天时仍维持在较高水平; VEGF 直到第 14 天仍有上升趋势。hPDLSCs 和 Lenti-LacZ-Luciferase 组也有 HIF-1 α 和 VEGF 的表达, 与 Lenti-miR-210-Luciferase 组比较差异有统

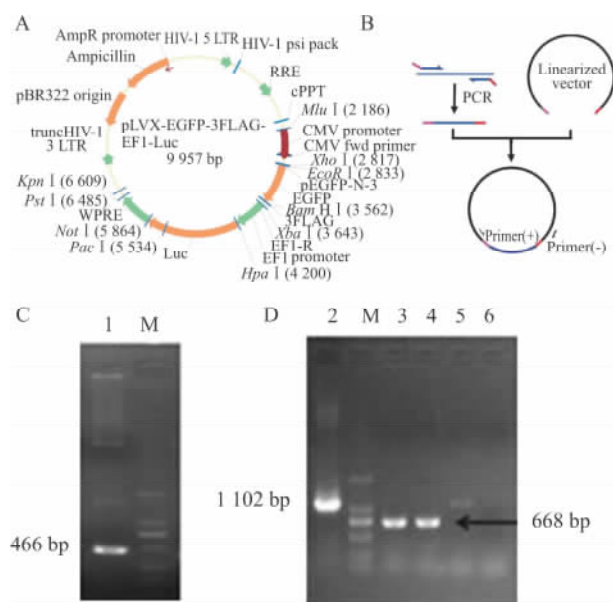


图2 慢病毒载体结构及鉴定示意图

A: 载体图谱; B: 菌落 PCR 鉴定示意图; Primer(+): CMV-F; Primer(-): EFI-R; C: 阳性克隆鉴定; 1: 目的基因: hsa-miR-210 基因; M: DL 2 000 DNA Marker; D: 阳性克隆鉴定; 1: 阴性对照(空载体); M: DL 2 000 DNA Marker; 3~6: 挑取的 4 个转化子

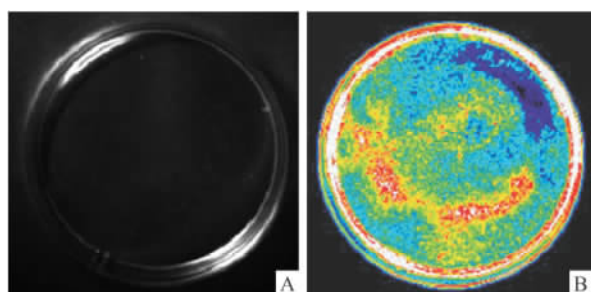


图3 热成像检测

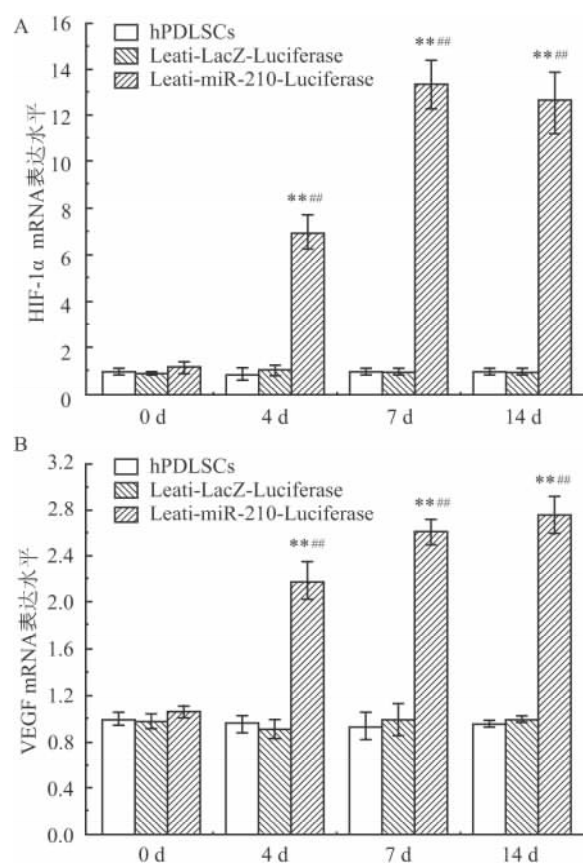
A: Lenti-miR-210-Luciferase 转染 hPDLSCs 后的培养皿; B: Lenti-miR-210-Luciferase 转染 hPDLSCs 后热成像检测

计学意义($P < 0.01$)。见图 4。

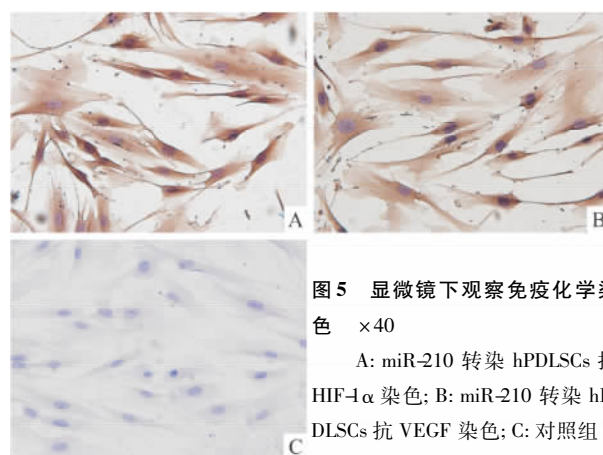
2.5 免疫细胞化学染色 miR-210 转染 hPDLSCs 后进行染色,结果显示,抗 HIF-1 α 和抗 VEGF 染色呈阳性(细胞核有棕色反应),对照组呈阴性(细胞核为蓝色)。见图 5。

3 讨论

节段性骨缺损(segmental bone defect, SBD)的修复是目前临床医学亟待解决的难题之一。随着材料学、分子生物学及基因治疗学的发展,运用基因增强的组织工程技术修复骨缺损成为当前的研究热点^[6-8]。但在修复 SBD 时,组织工程骨的血管化问题是制约其最终治疗效果的关键因素。构建有效的

图4 qPCR 检测不同时间点 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 的表达

A: HIF-1 α ; 2: VEGF; 与 hPDLSCs 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Lenti-LacZ-Luciferase 组比较: ## $P < 0.01$

图5 显微镜下观察免疫化学染色 $\times 40$

A: miR-210 转染 hPDLSCs 抗 HIF-1 α 染色; B: miR-210 转染 hPDLSCs 抗 VEGF 染色; C: 对照组

血管化组织工程骨是当下必须要解决的一个课题,目前的研究重点主要集中在以下几个方面:① 血管化支架材料的构建;② 血管生长因子的应用;③ 血管细胞和干细胞的血管化;④ 显微外科技术修复血管^[9]。在运用基因增强的组织工程技术修复骨缺损的研究中,基因调控种子细胞的成血管作用日益受到关注,并在一系列动物实验中得到满意的效果,如骨形成蛋白-2、核心结合因子 1、碱性成纤维细胞生长因子、VEGF 等^[10-11]。

miR-210 是一种由低氧诱导表达的 miRNA, 已证实 miRNA-210 在低氧导致的血管新生过程中表达量明显上升, 因此被称为低氧特异性 miRNA (hypoxamir), 其表达比较稳定^[12]。采用慢病毒载体可以使 miR-210 在体内稳定表达, 而且在病毒载体上连接 Luciferase 可以体内示踪目的基因在体内表达。所以本实验构建了 Lenti-miR-210-Luciferase 的慢病毒载体, qPCR 结果显示转染目的基因的 hPDLSCs 过表达 HIF-1 α 和 VEGF, Lenti-miR-210-Luciferase 组的表达明显高于 hPDLSCs 和 Lenti-LacZ-Luciferase 组, hPDLSCs 和 Lenti-LacZ-Luciferase 组也有少量表达, 这可能是由于 hPDLSCs 本身具有内源性的 HIF-1 α 和 VEGF 基因。hPDLSCs 转染 miR-210 基因后, HIF-1 α 和 VEGF 的 mRNA 表达明显增加。与 Lenti-miR-210-Luciferase 组比较, hPDLSCs 和 Lenti-LacZ-Luciferase 组 HIF-1 α 和 VEGF 的表达都维持在较低的水平, 说明使用慢病毒载体后并没有影响 HIF-1 α 和 VEGF 基因 mRNA 的合成。miR-210 转染 hPDLSCs 后进行免疫组化染色, 结果显示, 抗 HIF-1 α 和抗 VEGF 染色呈阳性, 对照组染色呈阴性。与对照组比较, 转染 miR-210 的 hPDLSCs 表达 HIF-1 α 和 VEGF。虽然 qPCR 结果显示 Lenti-LacZ-Luciferase 组可少量表达 HIF-1 α 和 VEGF, 但免疫组化染色未能检测出这两种因子, 可能是因为 Lenti-LacZ-Luciferase 组表达的量过少以致染色无法显示。本实验结果揭示了 miR-210 具有促进 hPDLSCs 血管向分化的作用。然而, 由于本实验只是 miR-210 具有促进 hPDLSCs 血管向分化作用的体外实验部分, 在未来的研究中可以构建动物模型研究 miR-210 介导的血管化组织工程骨在修复骨缺损中的作用, 以期为临床上有效解决 SBD 的生物功能重建提供可靠的实验依据。

血运重建被认为是骨组织工程继种子细胞、支架材料、细胞因子三大要素之后的第四大要素, 如何解决组织工程骨的血管化问题是目前需要解决的一个关键问题。miR-210 是血管形成的调控因子, 能

否采用组织工程技术, 以 hPDLSCs 为靶细胞, 利用 miR-210 构建血管化组织工程骨有待进一步研究。本实验旨在为将来应用 miR-210 介导的 hPDLSCs 重建血管和修复骨缺损的体内外研究奠定基础。

参考文献

- [1] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(Database issue): D152-7.
- [2] Caporali A, Emanuelli C. MicroRNA regulation in angiogenesis [J]. *Vascul Pharmacol*, 2011, 55(4): 79-86.
- [3] 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.
- [4] Ge S, Zhao N, Wang L, et al. Bone repair by periodontal ligament stem cellseeded nanohydroxyapatite-chitosan scaffold [J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 5405-14.
- [5] Zhang C, Li J, Zhang L, et al. Effects of mechanical vibration on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells [J]. *Arch Oral Biol*, 2012, 57(10): 1395-407.
- [6] Chen F M, Jin Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010, 16(2): 219-55.
- [7] Hayden R E, Mullin D P, Patel A K. Reconstruction of the segmental mandibular defect: current state of the art [J]. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2012, 20(4): 231-6.
- [8] Jégoux F, Goyenvalle E, Cognet R, et al. Mandibular segmental defect regenerated with macroporous biphasic calcium phosphate, collagen membrane, and bone marrow graft in dogs [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010, 136(10): 971-8.
- [9] Santos M I, Reis R L. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges [J]. *Macromol Biosci*, 2010, 10(1): 12-27.
- [10] Evans C. Gene therapy for the regeneration of bone [J]. *Injury*, 2011, 42(6): 599-604.
- [11] Qu D, Li J, Li Y, et al. Angiogenesis and osteogenesis enhanced by bFGF *ex vivo* gene therapy for bone tissue engineering in reconstruction of calvarial defects [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 96(3): 543-51.
- [12] Chan S Y, Loscalzo J. microRNA-210: a unique and pleiotropic hypoxamir [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(6): 1072-83.

The preliminary research of miR-210 promoting human periodontal ligament stem cells the differentiation of angiogenesis

Gu Yue, Wang Yinlong

(Dept of Oral and Maxillofacial Surger, The Affiliated Stomatology Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct the lentiviral vector Lenti-miR-210-Luciferase, and to detect angiogenic factors

大鼠非酒精性脂肪肝病中细胞色素 P450 酶的分析

余 庆, 许 曼, 赵倩茹, 林元节, 陈 伟, 金 涌

摘要 目的 探讨 4 种主要的细胞色素 P450 酶在非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 发病进程中的表达变化。**方法** 建立大鼠 NAFLD 的病理模型, 并分别测定肝匀浆中谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT) 和三酰甘油 (TG) 等生化指标。采用 Western blot 法检测在各个病理时期 CYP1A2、CYP2D6、CYP2E1 和 CYP3A1 的表达水平的变化。**结果** 随着 NAFLD 严重程度的增加, AST 与 ALT 的活性显著上升 ($P < 0.01$), TG 的水平则在重度脂肪肝时期之前上升, 而后显著下降 ($P < 0.01$)。CYP1A2 和 CYP2D6 的表达水平在发病进程中总体呈下降趋势, CYP3A1 虽总体下调, 但幅度不大, 而 CYP2E1 的表达水平则明显上升 ($P < 0.01$)。**结论** 在 NAFLD 的发病进程中 CYP1A2、CYP2D6、CYP3A1 和 CYP2E1 的表达水平发生明显的改变, 实验结果可以为内科医师针对 NAFLD 患者的用药提供指导。

关键词 非酒精性脂肪肝; 细胞色素 P450 酶; 肝匀浆; 蛋白表达

中图分类号 R 966; R 575.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)10-1385-05

2015-05-08 接收

基金项目: 安徽省高等学校省级自然科学研究重点项目 (编号: KJ2013A153)

作者单位: 安徽医科大学药学院, 合肥 230032

作者简介: 余 庆, 男, 硕士研究生;

金 涌, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: aydyjs@163.com

非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种并非由于过度饮酒、自身免疫、药物感染等因素所导致的一种以弥漫大泡性脂肪为主要特征的临床病理综合征。其包括良性的肝脏脂肪变性、由其演变的非酒精性脂肪性肝炎和肝硬化, 并最终有可能导致肝脏功能障碍^[1-2]。NAFLD 的常见病因有肥胖、药物损伤、高脂血症与糖尿病等。NAFLD 的病理过程非常复杂, 涉及体内的众多角度与层次的生理生化过程, 尚不能以单一的机制解释。对于 NAFLD 的发病机制, 现在比较认同的是“二次打击”学说^[3-4]。细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 是一类主要存在于肝脏和肠道的单加氧酶系, 可参与脂肪酸类固醇激素等内源性底物的氧化和代谢、固醇类的生物合成以及大部分药物和外源物的生物氧化等, 并催化多种内源性物质和外源性物质的代谢^[5]。目前, 针对 NAFLD 发病进程中 CYP450 酶的变化研究尚且很少。该研究主要以 NAFLD 发展进程中各病理阶段的大鼠为研究载体, 利用 Western blot 法探讨与临床药物代谢密切相关几种主要的 CYP450 酶的表达变化, 旨在对 NAFLD 患者进行临床个体化用药, 以提高疗效和减少不良反应。

HIF-1 α and VEGF expression in hPDLSCs transduced by Lenti-miR-210-Luciferase. **Methods** hPDLSCs were isolated and cultured, and according to human miR-210 gene sequence (NC_000011.9), its primer was designed and amplified through PCR. The PCR products of the target gene were connected to the vector pLVX-EGFP-3FLAG-EF1-Luc. To identify the plasmid, target gene PCR product and the purpose vector were digested by EcoR I and Xba I. Lenti-miR-210-Luciferase (the control group was Lenti-LacZ-Luciferase) was constructed using the LR recombination system. After hPDLSCs was transduced by Lenti-miR-210-Luciferase, the analysis of HIF-1 α and VEGF expression was done with qPCR and the immunohistochemistry examination. **Results** The results of plasmid sequencing and digestion confirmed that the vector Lenti-miR-210-Luciferase was successfully constructed. After Lenti-miR-210-Luciferase was transduced to hPDLSCs on 0, 1, 4, 7 and 14 d, the results of qPCR showed that the over-expression of HIF-1 α and VEGF was detected on 4 d, and continued until 21 d. Immunohistochemical results showed that after hPDLSCs were transduced by Lenti-miR-210-Luciferase, hPDLSCs were positive for HIF-1 α and VEGF antibody, and the control group was negative. **Conclusion** The Lenti-miR-210-Luciferase is successfully constructed, and miR-210 can promote hPDLSCs the differentiation of angiogenesis.

Key words periodontal ligament stem cells; miR-210; hypoxia inducible factor-1 α ; vascular endothelial growth factor; lentiviral vector