

Wnt3a 基因沉默对内皮祖细胞增殖的影响

余 涛 杜怡斌 杜公文 张 辉 张 硕 方家刘 高维陆 尹宗生

摘要 目的 探讨 wnt3a 基因沉默对内皮祖细胞(EPCs)增殖的影响。方法 体外分离、培养及鉴定 EPCs。将沉默型 pEGFP-shRNA-wnt3a 重组质粒转染 EPCs; Western blot 法分析 wnt3a 在 EPCs 中的表达变化; MTT 分析 wnt3a 沉默对 EPCs 增殖的影响。结果 鉴定培养的细胞为 EPCs; Western blot 法结果提示 pEGFP-shRNA-wnt3a 转染 EPCs 后明显抑制了 wnt3a 蛋白的表达。MTT 提示沉默型 pEGFP-shRNA-wnt3a 转染组吸光度值明显低于空白对照组。结论 成功分离、培养出 EPCs, wnt3a 有效沉默明显抑制 EPCs 的增殖,为进一步的实验提供了基础。

关键词 内皮祖细胞; wnt3a; 基因沉默; 基因转染; 细胞增殖
中图分类号 R 681.54

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)09-1211-04

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是一群具有游走特性,能进一步增殖分化的幼稚内皮细胞;缺乏成熟内皮细胞的特征性表型,是血管内皮细胞的前体细胞;具有增殖、迁移、分化成内皮细胞和聚集形成新生血管的作用,主要参与出生后缺血组织的血管发生和血管损伤后的修复。Wnt3a 是 wnt 家族的重要成员之一,其对细胞的增殖与分化等过程有重要的调控作用。本实验以大鼠 wnt3a 基因为靶点,构建沉默型 pEGFP-shRNA-wnt3a 重组质粒载体,并用脂质体介导转染大鼠骨髓源性 EPCs,观察 wnt3a 蛋白表达水平的改变及对细胞增殖的影响,为进一步研究 wnt3a 及其下游靶基因调节 EPCs 的功能研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD 大鼠 15 只,90~120 g,SPF 级,雄性,由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 EGM-2 完全培养基购自瑞士

Lonza 公司;淋巴细胞分离液购自天津 TBD 公司;大鼠纤维连接蛋白(rat fibronectin, FN)购自瑞士 Gene Operation 公司;CD133 抗体购自美国 Biorbyt 公司;DiI 标记的乙酰低密度脂蛋白(DiI-ac-LDL)购自美国 Invitrogen 公司;异硫氰酸荧光素荆豆凝集素-4(FITC-UEA-4)购自美国 Sigma 公司;重组质粒(pEGFP-shRNA-wnt3a)购自合肥昊翔生物科技有限公司;脂质体 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;wnt3a 一抗购自美国 Cell Signaling 公司;二抗购于上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 EPCs 的采集、分离和培养 取 90~120 g 大鼠颈椎脱臼法处死,无菌操作台中取股骨及胫骨髓髓血,采用密度梯度离心法分离纯化单核细胞;用含 10% FBS 的 EGM-2 完全培养基,吹打分散细胞,计数细胞并以 1×10^7 /ml 的密度接种预包被 FN 的培养瓶;置于 37℃、5% CO₂ 的恒温细胞培养箱中培养 4 d,弃去未贴壁细胞;以后每隔 2 d 后换液 1 次,每天观察并记录细胞生长形态变化。约 8~10 d 后,细胞铺满瓶底即可传代。

1.2.2 EPCs 的鉴定

1.2.2.1 EPCs 免疫细胞化学 CD133 及 VEGFR-2 双抗体荧光检测 取生长良好的原代 EPCs,用胰酶消化并接种于装有盖玻片的 24 孔培养板中,置于 37℃、5% CO₂ 的恒温细胞培养箱中;次日显微镜下可见 EPCs 生长良好, PBS 漂洗 3 遍,每遍 5 min;加入 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.3% Triton X-100 破膜 10 min, 10% 山羊血清封闭 1 h,吸弃多余血清;滴加小鼠抗 CD133(1:100)及兔抗 KDR(1:100)一抗 4℃ 过夜。次日 PBS 漂洗 3 遍,每遍 5 min。加入二抗(1:500),37℃ 避光孵育 1 h;加入终浓度为 10 μg/ml Hoechst33342 核染 5 min,吸弃多余染料, PBS 漂洗后加入抗荧光淬灭液封片,荧光显微镜观察结果。

1.2.2.2 EPCs 的 DiI-ac-LDL 及 FITC-UEA-4 荧光检测 取生长良好的原代 EPCs,用胰酶消化并接种于装有盖玻片的 24 孔培养板中,置于 37℃、5% CO₂ 的恒温细胞培养箱中;次日显微镜下可见 EPCs 生长良好, PBS 漂洗 3 遍,每遍 5 min。每孔加入 10

2015-05-07 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171173);安徽省自然科学基金(编号:11040606Q25)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院骨科,合肥 230022

作者简介:余 涛,男,硕士研究生;

尹宗生,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: yinzongsheng1961@sohu.com

$\mu\text{g/ml}$ 的 Dil-ac-LDL $500 \mu\text{l}$ 37°C 避光孵育 4 h; PBS 漂洗后加入 4% 多聚甲醛于 4°C 避光固定 10 min, PBS 漂洗 3 遍, 每遍 5 min。每孔加入 $10 \mu\text{g/ml}$ 的 FITC-UEA-I $500 \mu\text{l}$ 37°C 避光孵育 1 h; 吸弃多余染料, PBS 漂洗后加入抗荧光淬灭液封闭, 荧光显微镜观察结果。

1.2.3 pEGFP-shRNA-wnt3a 质粒转染、扩增及抽提

将 pEGFP-shRNA-wnt3a 质粒转染大肠杆菌, LB 培养液摇菌过夜, 用去内毒素质粒大提试剂盒提取, 并于紫外分光光度计中测定质粒浓度, -20°C 保存备用。

1.2.4 pEGFP-shRNA-wnt3a 质粒转染 EPCs

取培养第 7 天生长状态良好的 EPCs, 胰酶消化后, 用含 10% 胎牛血清的 EGM-2 完全培养液重悬成 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 细胞悬液, 按 $500 \mu\text{l}/\text{孔}$ 接种于 24 孔板, 次日细胞生长达 80% ~ 90% 时开始转染。将细胞用无血清培养液 Opti-MEM 洗 2 遍后, 按脂质体 Lipo-fectamine 2000 说明书进行转染, 质粒与脂质体比例为 $2 \mu\text{g} : 3 \mu\text{l}$ 。分为 2 组, 沉默型 pEGFP-shRNA-wnt3a 转染组和空白对照组, 每组 6 孔。以下以一孔计: 取 $2 \mu\text{g}$ 质粒, 加入 Opti-MEM 培养基稀释至 $50 \mu\text{l}$; 另取脂质体 $3 \mu\text{l}$, 加入 Opti-MEM 培养基稀释至 $50 \mu\text{l}$, 室温静置 5 min 后将两者混匀, 室温静置 20 min 形成稳定的脂质体质粒复合物。将上述复合物加入预先滴加 $400 \mu\text{l}$ Opti-MEM 的 24 孔板中, 轻轻混匀, 置于 37°C 、5% CO_2 细胞恒温培养箱中培养, 6 h 后换含 10% 胎牛血清的 EGM-2 完全培养液, 继续培养 48 h 后在荧光显微镜下激发绿色荧光观察细胞形态以及转染是否成功。各组均在相同条件下进行实验。

1.2.5 Western blot 法检测 wnt3a 蛋白表达水平

转染 48 h 后, 提取各组细胞总蛋白, SDS-PAGE 电泳, PVDF 膜转膜, 脱脂奶封闭, 一抗(兔抗 wnt3a 1 : 500; 鼠抗 β -actin 1 : 1 000) 4°C 孵育过夜; 次日 TPBS 洗膜 3 次, PBS 洗膜 1 次, 孵育辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记的二抗(羊抗兔 1 : 10 000; 羊抗鼠 1 : 10 000) 室温孵育 2 h, TPBS 洗膜 3 次, PBS 洗膜 1 次, 加 ECL 显影剂, 于电脑中成像。 β -actin 为内参。

1.2.6 MTT 法检测转染后 EPCs 增殖活性

转染 48 h 后, 消化收集两组 EPCs, 重悬并计数; 再将等量的 EPCs 接种到 96 孔板中, 每组细胞置 6 复孔; 于 37°C 、5% CO_2 的恒温细胞培养箱中培养 72 h, 加入 MTT 溶液, 继续于培养箱中孵育 4 h; 滴加 DMSO $150 \mu\text{l}/\text{孔}$ 并置摇床上低速震荡 10 min 后, 常规 MTT 显色法检测吸光度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间资料比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 EPCs 培养及鉴定结果

新分离的骨髓源性 EPCs 呈圆形, 折光性好, 体积较小。悬浮于培养液中, 第 2 天开始贴壁, 体积逐渐增大, 由圆形逐渐变为短梭形; 培养至第 7 天可观察到由梭形贴壁细胞生长连接而成的条索, 为 EPCs 的特征。收集生长状态良好的 2 代 EPCs 行 CD133、VEGFR-2 双抗体荧光检测及 Dil-ac-LDL、FITC-UEA-I 荧光检测, 可见目的细胞 CD133 及 VEGFR-2 抗原表达阳性, Dil-ac-LDL 及 FITC-UEA-I 表达阳性, 表明该梭形细胞为典型的 EPCs。见图 1。

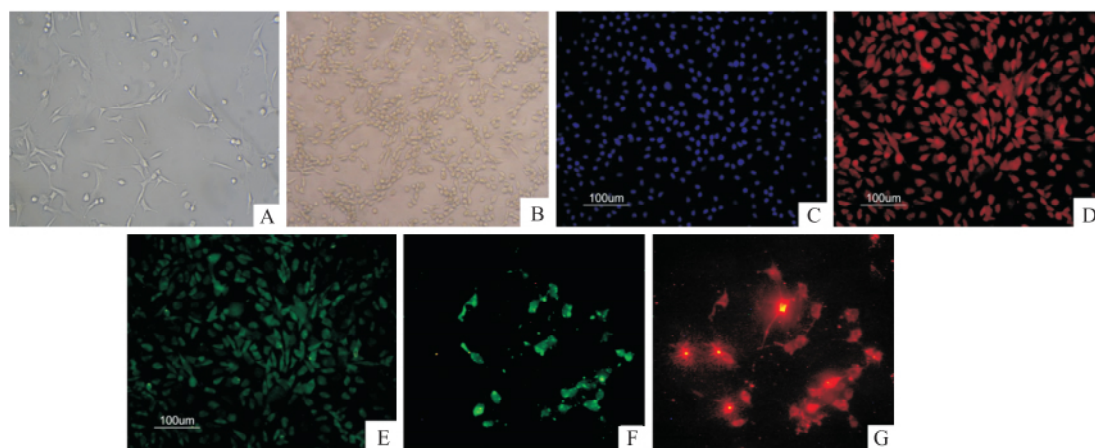


图 1 EPCs 的鉴定 $\times 200$

A: 原代培养至第 7 天梭形 EPCs 贴于孔底, 并成条索状排列; B: 细胞培养约 2 周, EPCs 呈铺路石样外观; C: EPCs 行 Hoechst 核染, 阳性; D: EPCs 行 CD133 免疫荧光染色, 阳性; E: EPCs 行 FLK-1 免疫荧光染色, 阳性; F: EPCs 行 Dil-ac-LDL 内吞能力试验, 阳性; G: EPCs 行 FITC-UEA-I 结合能力试验, 阳性

2.2 pEGFP-shRNA-wnt3a 质粒在 EPCs 中的表达 转染 48 h 后,普通光镜下观察见 EPCs 贴壁牢固,细胞形态规则呈梭形或椭圆形,细胞间隙较小, EPCs 生长状态良好;荧光显微镜下激发绿色荧光观察,见转染组绿色荧光蛋白显著表达,细胞生长状态良好,贴壁牢固,细胞间隙较小,细胞形态规则呈短梭形或椭圆形。见图 2。

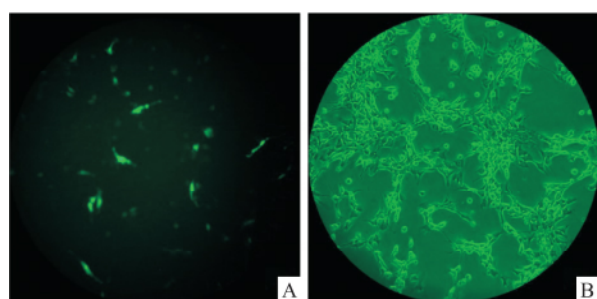


图 2 荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达 $\times 200$
A: 暗场 B: 明场

2.3 Western blot 法分析转染后 EPCs 的 wnt3a 蛋白表达 EPCs 转染 48 h 后,提取细胞总蛋白,经 Western blot 法分析。与空白对照组相比,沉默型 pEGFP-shRNA-wnt3a 转染组 EPCs 中, wnt3a 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$)。见图 3。

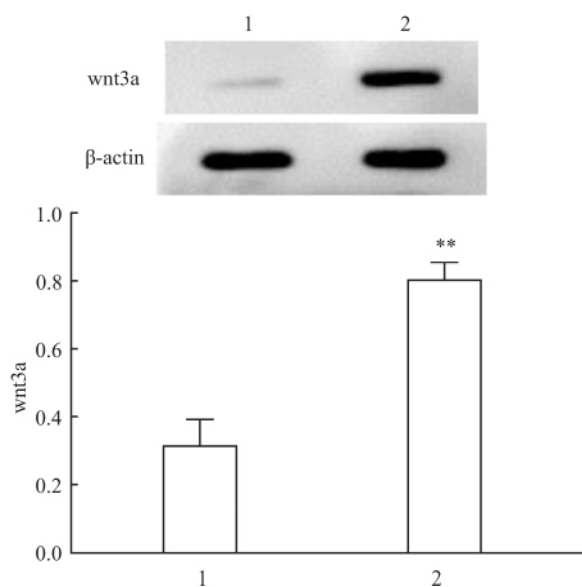


图 3 Western blot 法检测 wnt3a 蛋白表达水平

1: 沉默型 pEGFP-shRNA-wnt3a 转染组; 2: 空白对照组
与沉默型 pEGFP-shRNA-wnt3a 转染组比较: ** $P < 0.01$

2.4 MTT 法分析转染后 EPCs 的增殖活性 MTT 结果表明,与空白对照组相比,沉默型 pEGFP-shR-

NA-wnt3a 转染组中 EPCs 的体外增殖受到明显的抑制 (0.364 ± 0.014 vs 0.402 ± 0.013 , $t = 3.952$, $P < 0.05$)。

3 讨论

血管 EPCs 是一种能直接分化成为血管内皮细胞的前体细胞,近年来,干细胞移植已成为治疗缺血性疾病与损伤的一种重要方法;而 EPCs 因取材方便,在血管再生、创伤愈合、肢体缺血和心血管疾病的细胞治疗和基因治疗有广阔的应用前景,所以成为目前的一个研究热点^[1-3]。自 Asahara et al^[4]在 1997 年首次从外周血中成功分离出 EPCs 后,经不断研究,对 EPCs 的认识不断加深,现在的研究^[5-6]显示成人外周血、脐血及骨髓血中均存在 EPCs,且体外培养过程中能够保持未分化表型增殖达到所需数量,在体外诱导分化可表达内皮细胞特征性抗原。本实验采用大鼠骨髓血密度离心法,并用 EGM-2 完全培养基添加 hEGF、hFGF、VEGF、IGF-1 等生长因子诱导培养,从而获得足够的 EPCs。

Wnt 信号通路作为主要的信号转导途径之一,包括经典信号通路和非经典信号通路,参与胚胎及器官发育以及对细胞尤其是干细胞的增殖、分化、迁徙和凋亡等过程起重要的调控作用。Wnt 蛋白通过自分泌或旁分泌作用与细胞膜上的受体结合,从而激活细胞内的信号传导通路。Wnt3a 是 wnt 蛋白家族中重要的亚型之一,通过经典 wnt/ β -catenin 信号通路发挥作用, wnt 蛋白与细胞表面受体蛋白 Fzd 或 LRP5/6 受体结合形成受体复合物,激活细胞内的 Dsh 蛋白,活化后的 Dsh 蛋白可抑制细胞内 β -catenin 与 APC、GSK-3 β 、Axin 组成的复合物的形成,引起 β -catenin 在细胞内的积累,并进入细胞核与转录因子 TCF/LEF 结合,激活 wnt 信号靶基因 c-myc、cyclin D1、MMP-7、CD-44 及 Claudin-1 等的转录,从而调控细胞的增殖、分化等过程。文献^[7-11]报道 wnt3a 可促进神经干细胞以及间充质干细胞等干细胞的体外增殖,而 EPCs 作为干细胞中的重要成员之一,对目前的实验研究以及心脑血管等疾病的临床应用具有重要的价值, wnt 通路如何调控 EPCs 的增殖与分化等过程却鲜有报道。本实验以此为背景,用大鼠 EPCs 作为研究对象,购买 wnt3a 沉默质粒,并将其转入 EPCs 中,在倒置荧光显微镜观察有绿色荧光蛋白表达,提示转染成功;接下来利用 Western blot 法分析各组 EPCs 内的 wnt3a 蛋白表达水平,结果提示与空白对照组相比,沉默型 pEGFP-

shRNA-wnt3a 转染组 wnt3a 蛋白表达水平显著降低。在此基础上通过 MTT 法观察细胞的增殖能力变化,结果提示沉默型 pEGFP-shRNA-wnt3a 转染组的吸光度值明显低于空白对照组,即增殖能力明显弱于空白对照组。本实验初步揭示了沉默 wnt3a 蛋白对 EPCs 增殖的作用,但是 wnt 信号通路是一个复杂的信号调控网络,wnt3a 以及其他 wnt 家族蛋白对 EPCs 的增殖、分化以及凋亡等过程的调控则需进一步的实验证明。

综上所述,wnt3a 基因沉默可明显抑制 EPCs 的体外增殖,为进一步研究 wnt 通路对 EPCs 的影响提供了基础。

参考文献

- [1] Ichioka S, Kudo S, Shibata M, et al. Bone marrow cell implantation improves flap viability after ischemia-reperfusion injury [J]. *Ann Plast Surg* 2004, 52(4): 414-8.
- [2] McDonald D M, Teicher B A, Stetler-Stevenson W, et al. Report from the society for biological therapy and vascular biology faculty of the NCI workshop on angiogenesis monitoring [J]. *J Immunother* 2004, 27(2): 161-75.
- [3] Oshima H, Rochat A, Kedzia C, et al. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells [J]. *Cell*, 2001, 104(2): 233-45.
- [4] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 275(5302): 964-7.
- [5] Yildirim S, Boehmler A M, Kanz L, et al. Expansion of cord blood CD34⁺ hematopoietic progenitor cells in coculture with autologous umbilical vein endothelial cells (HUVEC) is superior to cytokine-supplemented liquid culture [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2005, 36(1): 71-9.
- [6] Zhang L, Yang R, Han Z C. Transplantation of umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells: a promising method of therapeutic revascularization [J]. *Eur J Haematol* 2006, 76(1): 1-8.
- [7] 丁伯福, 李婵娟, 刘娜, 等. 外源性重组蛋白 Wnt3a 对骨髓间充质干细胞增殖能力的影响 [J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2010, 20(12): 684-8.
- [8] 黄黎亚, 王飞, 曹青, 等. *FOXO3a* 沉默或过表达对内皮祖细胞增殖的影响 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2013, 35(1): 30-5.
- [9] Yin Z S, Zhang H, Wang W, et al. Wnt-3a protein promote neuronal differentiation of neural stem cells derived from adult mouse spinal cord [J]. *Neurol Res*, 2007, 29(8): 847-54.
- [10] Yin Z S, Zu B, Chang J, et al. Repair effect of Wnt3a protein on the contused adult rat spinal cord [J]. *Neurol Res*, 2008, 30(5): 480-6.
- [11] 杜公文, 杜怡斌, 张辉, 等. 共培养下内皮祖细胞对神经干细胞增殖及分化的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2013, 48(12): 1445-9.

Effects of wnt3a silencing on the proliferation of endothelial progenitor cells

Yu Tao, Du Yibin, Du Gongwen, et al

(Dept of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To observe the effects of wnt3a silencing on the proliferation of endothelial progenitor cells (EPCs). **Methods** We used the mature methods of isolation, culture and identification on cells to get EPCs *in vitro*. The endothelial progenitor cells were transfected with the the silent type pEGFP-shRNA-wnt3a recombinant plasmid. The expression changes of wnt3a were detected by Western blot. MTT assay was used to assess the effects of wnt3a silencing on the proliferation of EPCs. **Results** The cultured cells were confirmed to be EPCs. The results of Western blot revealed that wnt3a expression was obviously inhibited in transfected EPCs with pEGFP-shRNA-wnt3a. MTT assay showed that the proliferation of EPCs was significantly inhibited by effective silencing of wnt3a as compared with the control group. **Conclusion** We have successfully isolated and cultured EPCs *in vitro*. Wnt3a effectively silence inhibits the proliferation of EPCs. And this study provides the basis for further experiments.

Key words endothelial progenitor cells; wnt3a; gene silencing; gene transfection; cell proliferation