论著

文章编号:1000-5404(2010)01-0030-03

构建 siRNA 慢病毒载体调控人牙髓干细胞 Delta1 表达的实验研究

王雪飞,张 纲,裘松波,何 飞,谭颖徽,汪 蕾,吴小波 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院口腔科)

[摘要] **目的** 构建 Notch 配体 Delta1 基因慢病毒干扰载体及建立 Delta1 基因稳定干扰的人牙髓干细胞系。**方法** 将 Delta1 基因特异性 siRNA 靶序列与双酶切慢病毒载体 pGCSIL-GFP 连接,转化,挑取阳性克隆进行 PCR 鉴定;利用包装细胞 293T 获得重组的慢病毒,感染人牙髓干细胞,分为 DPSCs/Delta1-RNAi 组、DPSCs/vector 组和 DPSCs/wt 组;RT-PCR 和 Western blot 分别检测 Delta1 mRNA 及蛋白的表达。**结果** 经 PCR 和 DNA 测序鉴定,成功构建 Delta1 特异性 siRNA 的慢病毒载体,并感染牙髓干细胞;经检测 DPSCs/Delta1-RNAi 组 Delta1 mRNA 及蛋白表达较 DPSCs/vector 组和 DPSCs/wt 组明显降低,DPSCs/vector 组和 DPSCs/wt 组之间无明显差异。**结论** 通过成功构建的 Delta1 特异性siRNA 慢病毒载体对人牙髓干细胞的转染实现了对其 Delta1 mRNA 和蛋白的调控。

[关键词] Delta1;Notch 信号通路;RNA 干扰;慢病毒;人牙髓干细胞

[中图法分类号] R322.41; R329.24; R394.1 **[文献标志码]** A

Regulation of Delta1 expression in DPSCs by specific siRNA lentivirus vector

Wang Xuefei, Zhang Gang, Qiu Songbo, He Fei, Tan Yinghui, Wang Lei, Wu Xiaobo (Department of Stomatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] **Objective** To construct a lentivirus vector for RNA interference (RNAi) of Delta1 gene and establish human dental pulp stem cells (DPSCs) with stably inhibited Delta1. **Methods** Delta1 specific siRNA was ligated with double digested lentivirus vector pGCSIL-GFP and the positive colonies were obtained by PCR, DPSCs were interfered and divided into DPSCs/Delta1-RNAi group, DPSCs/vector group and DPSCs/wt group, and the expression of Delta1 was verified by RT-PCR and Western blot analysis. **Results** The ligation of Delta1 specific siRNA to the double digested lentivirus vector pGCSIL-GFP was successful. Delta1 protein and Delta1 mRNA expression of DPSCs/Delta1-RNAi group was significantly higher than the DPSCs/vector group and DPSCs/wt group, but there was no different between the DPSCs/vector group and DPSCs/wt group. **Conclusion** The construction of Delta1 specific siRNA lentivirus vectors is successful and it regulates the expression of Delta1 in DPSCs.

[Key words] Delta1; notch signal; siRNA; lentivirus; human dental pulp stem cells

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BB5016) and the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (2006D136). Corresponding author: Tan Yinghui, Tel:86-23-68755632, E-mail:tanyh1962@yahoo.cn

Notch 信号通路是一条进化上十分保守的信号转导系统,广泛存在于无脊椎动物和脊椎动物的多个物种之中,其在胚胎、心血管、血细胞发育以及肿瘤发生等生理、病理过程中发挥重要作用,通过细胞间相互作用的方式精确地调节着细胞的分化、增殖和凋亡,在生物体发育过程中决定着细胞的不同命运[1-3]。本实验通过慢病毒载体将特异性小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)转入人牙髓干细胞(human dental pulp stem cells, DPSCs)中,以实现对 DPSCs 中 Notch 配体 Delta1 mRNA 转录的干扰作用,在某一水平阻断 Notch 信号通路,从而进一步了解 Notch-Delta 信号通路在 DPSCs 中的重要作用,对揭示牙髓损伤修复的发生、发展和牙髓疾病的防治均有重要意义,为实现牙损伤后修复的基因治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

PCR 试剂 primer、dsDNA oligo、pGCSIL-GFP 载体、*Age* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ酶切、Polybrene(上海吉凯基因技术有限公司),*Taq* polymerase(美国 TaKaRa 公司),T_4 DNA ligase、T_4 DNA ligase buffer(美国 NEB 公司),BSA(上海捷倍思基因技术有限

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5016);第三军医大学科研基金(2006D136)

[通信作者] 谭颖徽,电话:(023)68755632,E-mail: tanyh1962@yahoo.cn

公司),$CaCl_2$(上海越俊生化有限公司),$MgSO_4$(上海吴化化工有限公司),250 bp DNA ladder Marker(上海捷瑞生物工程有限公司),激光共聚焦显微镜(德国 ZEISS 公司),流式细胞仪(FACS Calibur,美国 BD 公司)。

1.2 Delta1 特异性 siRNA 载体的构建

根据 Delta1 基因序列(NM_005618)设计 Delta1 基因特异性 siRNA 序列为:5′-GGAGTTCGTCAACAAGAAG-3′[4],并制备双链 DNA oligo:上游 5′-CCGGGGAGTTCGTCAACAAGAAGTTCAAGAGACTTCTTGTTGACGAACTCCTTTTTG-3′,下游 5′-AATTCAAAAAGGAGTTCGTCAACAAGAAGTCTCTTGAACTTCTTGTTGACGAACTCC-3′。取经内切酶 *Age* Ⅰ/*Eco*R Ⅰ双酶切后回收的载体片段 1 μl,退火的双链 DNA 1 μl, T_4 DNA ligase buffer 1 μl, T_4 DNA ligase 1 μl 混合,反应体系 10 μl,4 ℃连接过夜。将连接产物转化新鲜制备的 *E. coli* DH5α 感受态细胞,转化菌涂布于含 20 mmol/L Mg_2SO_4和 Amp (100 μg/ml) 的 LB 琼脂平板上,倒置平皿,37 ℃培养 16 h。

1.3 PCR 鉴定和 DNA 测序鉴定

挑选 5 个单菌落,使用载体多克隆位点两端的引物进行 PCR 扩增。引物序列:上游 5′-CCTATTTCCCATGATTCCTTCATA-3′,下游 5′-GTAATACGGTTATCCACGCG-3′。PCR 反应体系:Primer(+) 0.4 μl, Primer(−) 0.4 μl,10 × buffer 2.0 μl, $MgCl_2$ 0.5 μl, DNTPs (2.5 mmol/L) 0.8 μl, *Taq* polymerase 0.2 μl,反应体系 20 μl。PCR 反应条件为:94 ℃变性 30 s, 94 ℃ 变性 30 s、60 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 30 s (30 个循环), 72 ℃延伸 6 min。PCR 反应结束后,PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果。选 5 个阳性克隆,ddH_2O、空载体为阴性对照。

1.4 慢病毒感染牙髓干细胞

牙髓组织取自临床因阻生而完整拔除的下颌第 3 磨牙,DPSCs 的培养和鉴定同于前期研究[5]。

1.4.1 选择感染指数(MOI 值) 取 2 ~ 4 代生长旺盛的 DPSCs 消化并计数,将细胞以 5×10^3/孔接种至 96 孔板,每孔加入 10% FBS DMEM 培养基 100 μl 及 0.5 μg/ml 的 Polybrene,分 4 组,每组分别加入 MOI 值为 100、50、20、10 的病毒液;培养 3 d 后观察细胞荧光表达情况,选择细胞状态及荧光表达均较好的一组 MOI 值作为最佳 MOI 值用作以后实验。

1.4.2 慢病毒感染 取 2 ~ 4 代生长旺盛的 DPSCs 消化并计数,以 5×10^4/孔细胞接种至 6 孔板,培养过夜,分别加入最佳 MOI 值慢病毒液及 0.5 μg/ml 的 Polybrene 进行转染,培养 24 h 后加液。观察细胞荧光表达情况,至细胞 80% ~ 90% 汇合,0.25% 胰蛋白酶消化,接种至 50 ml 培养瓶常规扩增培养,细胞 80% ~ 90% 汇合时参照文献[6]使用流式细胞仪测定转染率。

1.5 RT-PCR 检测 Delta1-RNAi 对 Delta1 mRNA 表达的影响

细胞分 3 组,即经特异性慢病毒 Delta1-RNAi 感染的DPSCs 组(DPSCs/Delta1-RNAi 组),经空慢病毒 NC-GFP 感染的阴性对照组(DPSCs/vector 组)和正常细胞对照组(DPSCs/wt 组)。激光共聚焦显微镜观察并摄像。取 3 组细胞, Trizol 提取细胞总 mRNA,RT-PCR 法检测各组 Delta1 mRNA 表达情况。Delta1 的引物序列:上游 5′-GCCTGCCTGGATGTGATGAG-3′,下游 5′-GCCGGCAAGAGCAAGTGTAG-3′, 产物长度 276 bp; β-actin:上游 5′-GAGCTACGAGCTGCCTGACG-3′,下游 5′-CCTAGAAGCATTTGCGGTGG-3′,产物长度 416 bp。退火温度为 61 ℃。PCR 产物于 2.5% 琼脂糖凝胶电泳。

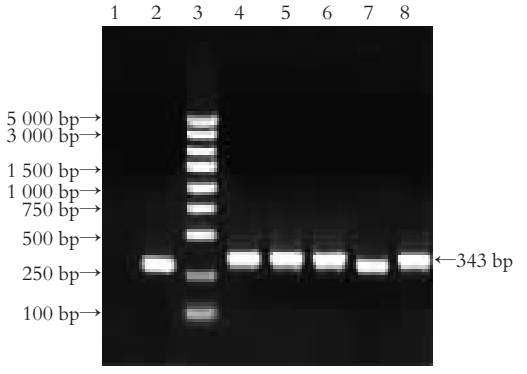
1.6 Western blot 检测 Delta1-RNAi 对 DPSCs Delta1 蛋白表达量的影响

细胞分 3 组,同 1.5。取 3 组细胞, RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,考马斯亮蓝检测试剂盒蛋白定量。聚丙烯酰胺凝胶(4% 浓缩胶、10% 分离胶)电泳,恒流电转移至 PVDF 膜,于 5% TBST 奶粉溶液总封闭 1.5 h。将 PVDF 膜放入 1∶200 Delta1 一抗稀释液中 4 ℃过夜;洗涤后置于二抗稀释液 37 ℃孵育2 h;滴加 ECL 化学发光剂,凝胶扫描仪对蛋白条带进行扫描,β-actin 作为内参。

2 结果

2.1 质粒 DNA 鉴定结果

成功构建人 Delta1 特异性 siRNA pGCSIL-GFP 质粒结构,PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳。连接入 vshRNA 片段的阳性克隆 PCR 片段大小为 343 bp,没有连接入 vshRNA 片段的空载体克隆 PCR 片段大小为 306 bp,符合设计要求(图 1)。重组质粒经 ABI23733 型自动基因测序仪测序,结果与设计序列完全相符,目的基因序列准确无误,重组质粒构建成功。

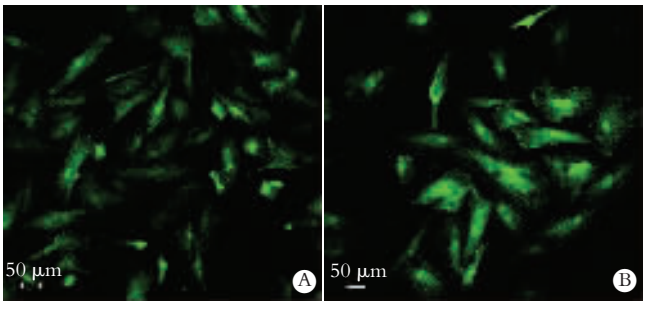


1:阴性对照(ddH_2O);2: 阴性对照(空载组);3: 标准;4 ~ 8:阳性克隆

图 1 阳性克隆凝胶电泳结果

2.2 DPSCs/Delta1-RNAi 的获得

使用倒置荧光显微镜观察,在慢病毒液 MOI 值分别为 100、50、20、10 条件下,当 MOI 值为 50 时细胞状态及感染效果最佳。Delta1-RNAi-LV 感染的 DPSCs 与阴性对照组相比,部分细胞突起变长,胞体变大(图 2)。流式细胞仪测定转染率为 89.47%。

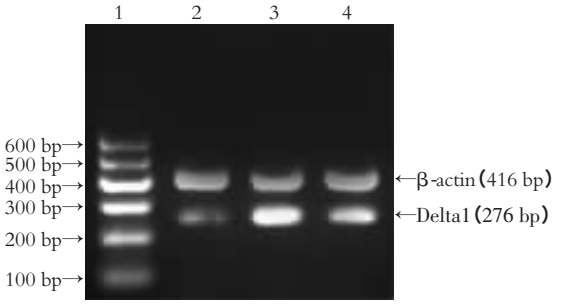


A:DPSCs/vector 组;B:DPSCs/Delta1-RNAi 组

图 2 感染慢病毒后的 DPSCs (激光共聚焦显微镜)

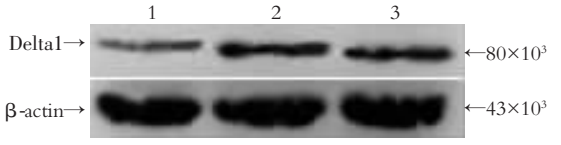
2.3 RNAi 对 Delta1 mRNA 表达的影响

RT-PCR 检测证实,被慢病毒 Delta1-RNAi-LV 感染的 DPSCs 的 Delta1 mRNA 表达量较正常 DPSCs 和 NC-GFP-LV 感染后的 DPSCs 明显降低(图 3)。Western blot 检测证实 DPSCs/Delta1-RNAi 组细胞 Delta1 蛋白表达含量比 DPSCs/vector 组和 DPSCs/wt 组明显降低(图 4)。



1:标准;2:DPSCs/Delta1-RNAi 组;3:DPSCs/wt 组;4:DPSCs/vector 组

图 3 Delta1 PCR 产物凝胶电泳结果



1:DPSCs/Delta1-RNAi 组;2:DPSCs/wt 组;3:DPSCs/vector 组

图 4 Delta1 蛋白 Western blot 检测结果

3 讨论

Notch 信号通路已成为近年来发育生物学、细胞生物学、免疫学、血液学以及肿瘤学等多个领域的研究热点之一。Notch 信号途径最根本,也是最重要的作用体现在:其介导的侧抑制作用可使细胞谱系特异性基因表达受阻,从而使细胞保持未分化状态。在牙髓损伤后早期 (24 ~ 48 h),出现了 Notch 受、配体的表达[7],提示 Notch 信号也参与了成年牙髓组织损伤修复,体外培养的牙髓细胞亦有明确的 Notch、Delta 表达。Notch 配体 Jagged-1 的过度表达可激活具有多项分化潜能的 DPSCs 中 Notch 信号通路,并抑制体外 DPSCs 向成牙本质细胞的分化[8]。本研究组已利用逆转录病毒载体将 Delta1 导入体外培养的 DPSCs,显示 Delta1 能够促进 DPSCs 的体外增殖活性,使其处于较原始的未分化状态,并保持分化潜能[9]。

本实验基于以往研究,采用了慢病毒介导的 RNAi 技术,通过下调人牙髓干细胞 Delta1 基因,进一步探讨 Notch-Delta1 信号通路对 DPSCs 分化的作用,为 DPSCs 分化及牙髓损伤后修复提供理论基础。本实验观察可见,转染了 Delta1 基因特异性 siRNA 的 DPSCs 在 5 ~ 6 代时就从形态学上发生了改变,其中部分细胞突起变长,胞体变大,出现自发性分化特征,说明 DPSCs 向成牙本质细胞分化,符合干细胞分化的生物学特征。与之相比,根据已有研究,正常 DPSCs 约在 10 代后会随传代次数增加逐渐变大、变长,出现自发性分化特征;而同期 Delta1 基因转导细胞在 30 代范围内,始终保持更接近原代 DPSCs 的成纤维样,未出现明显的老化与自发性分化特征[10,11]。由此可见,本实验 DPSCs 转染 Delta1 基因特异性 siRNA 后,Delta1 的表达发生改变,细胞会提前出现自发性分化,DPSCs 维持自我更新的功能下降,证实 Notch-Delta1 信号通路对 DPSCs 的分化具有重要作用。为进一步证实本实验的 Delta1 基因特异性 siRNA 对 DPSCs 的 Delta1 基因表达量的调控作用,我们采用 RT-PCR、Western blot 检测方法对转染后的 DPSCs 进行了验证,结果显示转染后的 DPSCs 中 Delta1 mRNA 及 Delta1 蛋白表达含量均降低。本实验发现,通过降低 DPSCs 中 Delta1 表达量,从而使 Notch-Delta1 信号通路作用下调后,细胞的增殖及分化均受到影响,为进一步研究人牙髓干细胞 Notch-Delta1 对 DPSCs 的增殖、分化的作用,以及牙髓损伤后的修复奠定了理论基础。

参考文献:

[1] Miele L, Golde T, Osborne B. Notch signaling in cancer[J]. Curr Mol Med, 2006, 6(8): 905 - 918.

[2] Louvi A, Artavanis-Tsakonas S. Notch signalling in vertebrate neural development[J]. Nat Rev Neurosci, 2006, 7(2): 93 - 102.

[3] Artavanis-Tsakonas S, Rand M D, Lake R J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development[J]. Science, 1999, 284(5415): 770 - 776.

[4] Stallwood Y, Briend E, Ray K M, *et al*. Small interfering RNA-mediated knockdown of notch ligands in primary CD4⁺ T cells and dendritic cells enhances cytokine production[J]. J Immunol, 2006, 177(2): 885 - 895.

[5] 何飞, 谭颖徽, 杨峥嵘. 人牙髓干细胞的体外培养和鉴定[J]. 华西口腔医学杂志, 2005, 23(1): 75 - 78.

[6] 余慧青, 刘耀. RNA 干扰对 HL-60 白血病细胞株 WT1 基因表达的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(11): 1052 - 1054.

[7] Dorsky R I, Chang W S, Rapaport D H, *et al*. Regulation of neuronal diversity in the Xenopus retina by Delta signalling[J]. Nature, 1997, 385(6611): 67 - 70.

[8] Zhang C, Chang J, Sonoyama W, *et al*. Inhibition of human dental pulp stem cell differentiation by Notch signaling[J]. J Dent Res, 2008, 87(3): 250 - 255.

[9] He F, Yang Z, Tan Y, *et al*. Effects of Notch ligand Delta1 on the proliferation and differentiation of human dental pulp stem cells *in vitro*[J]. Arch Oral Biol, 2009, 54(3): 216 - 222.

[10] 杨雪超, 樊明文. 体外持续培养对人牙髓细胞分化能力的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2003, 13(2): 62 - 65.

[11] 何飞, 杨峥嵘, 谭颖徽. Notch 配体 Delta-1 对人牙髓干细胞体外增殖的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2005, 15(8): 435 - 438.

(**收稿**:2009-06-04;**修回**:2009-07-03)

(编辑 龙 亮)