文章编号:1000-5404(2013)11-1133-04

论著

Smoothened 慢病毒干扰载体的构建及其对人牙周膜干细胞增殖与分化的影响

张 洁[1],常慧君[2],李雨轩[3],舒绍兵[1,4],罗金英[1],徐志玲[5],汤 玲[5],杨彦春[1],周继祥[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院口腔科[1];610041 成都,四川省军区门诊部口腔科[2];618000 四川 德阳,德阳市第二人民医院口腔科[3];401147 重庆,武警重庆总队机关门诊部口腔科[4];400044 重庆,重庆大学生物医学工程学院[5])

[摘要] **目的** 体外构建及筛选人 Smoothened(SMO)基因的慢病毒干扰载体,使用此载体下调人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells,PDLSCs)中 SMO 基因表达并检测其对细胞增殖与分化的影响。**方法** 针对人 SMO 基因设计3条干扰序列,构建 RNA 干扰慢病毒载体,在 293FT 细胞中包装病毒液并转染 293A 细胞,通过实时荧光定量 PCR 检测干扰效率,得到具有最佳干扰效率的病毒后,转染 PDLSCs,用 Western blot 检测其对 PDLSCs 中 SMO 基因的干扰效果及对细胞分化的影响,CCK-8 法检测其对 PDLSCs 增殖的影响。**结果** 成功构建3个 SMO 慢病毒干扰载体(pGP-SMO1、pGP-SMO2、pGP-SMO3),通过转染 293A 细胞并进行实时荧光定量 PCR 检测后,得到 pGP-SMO1 具有最佳干扰效率,转染后 SMO mRNA 水平下降到对照的(28.5±2.5)%。利用此病毒能够很好地转染体外培养的 PDLSCs,并使 PDLSCs 中 SMO 蛋白水平下降 80%。进一步检测细胞增殖发现,与未转染组比较,SMO 下调后 PDLSCs 增殖变慢[(1.09±0.20) *vs* (1.86±0.21), $P<0.01$]。同时也导致成骨分化标志物 Runx2 的蛋白表达下调。**结论** 利用慢病毒介导的干扰病毒载体成功干扰了 PDLSCs SMO 基因的表达,SMO 基因的下调会导致 PDLSCs 增殖减慢,成骨分化能力减弱。

[关键词] Smoothened;RNA 干扰;慢病毒;人牙周膜干细胞
[中图法分类号] R322.41; R329.28; R394-33 [文献标志码] A

Construction of lentiviral RNAi vectors containing human smoothened gene and its inhibitory effect on proliferation and differentiation in human periodontal ligament stem cells

Zhang Jie[1], Chang Huijun[2], Li Yuxuan[3], Shu Shaobing[1,4], Luo Jinying[1], Xu Zhiling[5], Tang Ling[5], Yang Yanchun[1], Zhou Jixiang[1] ([1]Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Stomatology, Out-patient Department of Sichuan Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610041; [3]Department of Stomatology, Deyang Second People's Hospital, Deyang, Sichuan Province, 618000; [4]Department of Stomatology, Authority Clinic of Chongqing Armed Police Force, Chongqing, 401147; [5]College of Biomedical Engineering, Chongqing University, Chongqing, 400044, China)

[**Abstract**] Objective To construct the lentiviral vector of human smoothened (SMO) gene which can down-regulate the SMO expression in human periodontal ligament stem cells (PDLSCs). Methods According to the human SMO gene, 3 sequences were designed to build RNA interference lentiviral vector. All the 3 vectors were packaged in 293FT cells, and then transfected into the 293A cells. The interference efficiency was evaluated by quantitative PCR, and the optimal one were transfected into the PDLSCs. Western blotting were used to detect the interference effect of SMO gene and the effect on differentiation in PDLSCs. CCK-8 assay was used to test the effect of recombinant lentivirus on the proliferation of PDLSCs. Results Three SMO lentiviral RNAi vectors were constructed successfully and the lentiviral vector 1 was considered as the optimal one by quantitative PCR. The mRNA level of SMO was reduced by (28.5±2.5)% by this vector. The protein expression of SMO was decreased by 80% in the PDLSCs after transfected by the lentivector vector 1 when compared with the cells without transfection. This transfection also resulted in a decreased cell proliferation (1.090 9±0.199 2 *vs* 1.863 0±0.206 2, $P<0.01$) and a decreased expression of bone differentiation marker, RUNX2. Conclusion A lentiviral vector of SMO is successfully constructed, and SMO interference suppresses the proliferation in PDLSCs, and inhibits the differentiation of PDLSC to osteoblasts.

[**Key words**] smoothened;RNA interference;lentivirus;human periodontal ligament stem cells

Corresponding author: Zhou Jixiang, Tel:86-23-68754387, E-mail: Zhoujx6518@sina.com

[通信作者] 周继祥,电话:(023)68754387,E-mail:Zhoujx6518@sina.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130321.1423.029.html(2013-03-21)

人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells, PDLSCs)是正畸牙移动过程中骨改建过程的关键细胞,如何调控其增殖与分化目前已成为口腔界研究的重点。分泌型信号分子 Hedgehog(Hh)家族在哺乳动物多器官的正常发育过程中起关键作用,考虑到现阶段国内外研究中该信号通路与成骨分化的密切关系[1]及其在牙胚发育调控中的作用[2],本课题组前期研究并证实了 Hh 信号通路与应力作用下的 PDLSCs 骨向分化过程相关[3],但调控机制尚不明了。Smoothened(SMO)是 Hh 信号通路中的重要受体蛋白,负责 Hh 的信号转导和靶基因的转录,从而激活该信号通路[4]。本实验以 SMO 这一 Hh 信号通路分子为作用靶点,构建慢病毒干扰载体,并将其转染于体外培养的 PDLSCs 中[5],探索其对 SMO 表达水平及细胞增殖分化的影响,旨在为进一步研究 SMO 基因的功能及靶向调控 PDLSCs 应力作用下的成骨分化奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

细胞培养基 α-MEM、DMEM 及胎牛血清、293A 细胞株、293FT 细胞株均购自 Invitrogen 公司;慢病毒载体 pGreenPuro 购自 Systembio 公司;限制性内切酶 *Bgl* Ⅱ、*Bam*HⅠ、*Eco*RⅠ,PCR 试剂购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒购自 Omega 公司;SMO(sc-6366)和 Runx2(sc-101145)抗体购自Santa Cruz。

1.2 人 SMO 基因干扰序列的确定及慢病毒干扰载体的构建

检索 GenBank,获取人 SMO 基因(NM_005631),按照在线设计工具(http://rnaidesigner. invitrogen. com/rnaiexpress/)提供的算法设计 3 条干扰序列,5′-GCGTCATCATCTTTGTCATCG-CGAACGATGACAAAGATGATGACGC-3′,5′-GGGACTCTGTGAG-TGGGATTTCGAAAAATCCCACTCACAGAGTCCC-3′,5′-GCTGCC-ACTTCTACGACTTCTCGAAAGAAGTCGTAGAAGTGGCAGC-3′,其针对的基因靶点分别为 5′-GCGTCATCATCTTTGTCATCG-3′(1 221 ~ 1 241);5′-GGGACTCTGTGAGTGGGATTT-3′(1 428 ~ 1 448);5′-GCTGCCACTTCTACGACTTCT-3′(1 683 ~ 1 703)。将合成的寡聚核苷酸退火后连入 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ酶切后的载体 pGreenPuro,得到的干扰病毒载体命名为 pGP-SMO1、pGP-SMO2、pGP-SMO3。所有构建质粒通过 DNA 测序验证(Invitrogen)。

1.3 慢病毒制备及病毒滴度测定

采用磷酸钙转染法进行慢病毒制备[6]。在 10 cm 培养皿内铺入 3×10^6 293FT 细胞,第 2 天当细胞达到 70% 融合度时进行转染。转染前在培养皿中加入氯喹至终浓度 25 μmol/L。转染体系如下:干扰载体 20 μg、pMD2. G 5 μg、pSPAX2 15 μg 加入灭菌水中至总体积 263 μL,然后加入 2 mol/L $CaCl_2$ 37 μL,混匀,最后再加入 300 μL 2×HBS,边滴加边振荡,滴加完毕后,迅速将混合物加入到细胞培养皿中,轻轻摇晃混匀,7 ~ 11 h 后换新鲜培养基,48 h 后收集病毒上清(500×*g* 离心 10 min),用 0.45 μm 滤器过滤分装,置于 -70 ℃保存。病毒滴度测定采用流式检测法进行检测,将 293A 细胞按 2.5×10^4/孔的密度铺入 12 孔板中,24 h 后加入不同体积的病毒液,转染 72 h 后,收集细胞,通过流式检测转染百分比,计算出原始病毒液的滴度。

1.4 干扰效率鉴定

293A 细胞按 2×10^4/孔铺入 12 孔板中,24 h 后,加入对照病毒和 3 种干扰病毒(MOI = 5)。24 h 后,将上清换为新鲜 DMEM 培养基继续培养 24 h,然后加入终浓度 3 μg/mL 的嘌呤霉素继续培养,细胞生长到约 80% 后,将其传入 6 孔板中,继续培养至融合度约 90%,收集细胞,通过实时荧光定量 PCR 检测 SMO 基因的表达,确定干扰效率。培养 48 h 后用荧光显微镜观察干扰效果。

1.5 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测

总 RNA 使用 RNAiso 试剂提取,cDNA 反转录使用 PrimeScript® RT reagent Kit (TaKaRa)进行,SMO 引物为:上游 5′-GCAAGCTCGTGCTCTGGT-3′;下游 5′-GGCATGTATACGGCACA-CAG-3′;内参 β-actin 引物为:上游 5′-GGCATGTATACGGCACA-CAG-3′;下游 5′-GGCATGTATACGGCACACAG-3′。实时荧光定量 PCR 使用 SYBGreen 法在 Angilent 仪器上完成,所用试剂为 SYBR® Premix DimerEraser™(TaKaRa)。Western blot 使用标准方法进行,内参为 GAPDH。

1.6 PDLSCs 的分离培养、鉴定及转染

取 12 ~ 24 岁因正畸需要或阻生而拔除的牙体、牙周均健康的新鲜牙齿,用含 1% 双抗的 PBS 反复冲洗,刮取牙根中 1/3 的牙周膜,采用酶消化组织块法联合培养,48 h 后首次换液,后每 3 天换液,长至 80% 时传代,经流式细胞分选[7]而获得第 3 代PDLSCs,通过流式细胞术表型分析:收集第 4 代 PDLSCs 加入 PBS 置悬,调整密度为 5×10^6/mL,各取 100 μL 加入 4 支 EP 管,分别加入小鼠抗人 STRO-1、小鼠抗人 CD146 及同型对照单抗,经流式细胞仪检测干细胞表面标志物 STRO-1、CD146 的表达。成骨、成脂诱导分化:收集第 4 代 PDLSCs 置悬并计数,以 2×10^4/孔种于孔底预置无菌玻片的 24 孔板内,细胞融合达 90% 以上时分别更换成骨、成脂诱导液,按说明书诱导培养,3 周后结束诱导,茜素红、油红 O 染色观察。鉴定后进行后续转染:PDLSCs 按 2×10^4/孔铺于 24 孔板中,24 h 后加入对照病毒以及干扰病毒(MOI = 10),24 h 后弃去孔内培养基,加入新鲜的 α-MEM 培养基 500 μL。待细胞生长至约 80% 融合度时将细胞消化并转入 6 孔板中。24 h 后,吸取孔内培养基,换为含有 2 μg/mL 嘌呤霉素的 α-MEM 培养基继续培养。待细胞长满后,消化并收集细胞,用于 Western blot 检测。

1.7 细胞增殖检测

分别将消化培养的未转染细胞、转染对照病毒细胞和转染干扰病毒的细胞按 10^3/孔铺入 96 孔板中,24 h 后,加入 10 μL CCK-8 试剂,孵育 1 h 后,使用酶标仪检测 450 nm 光密度值,确定细胞的增殖情况。

1.8 细胞分化检测

收集未转染和转染干扰病毒的 PDLSCs,提取总蛋白,Western blot 检测成骨分化标志物 Runx2 的表达水平。Western blot 按标准方法进行。

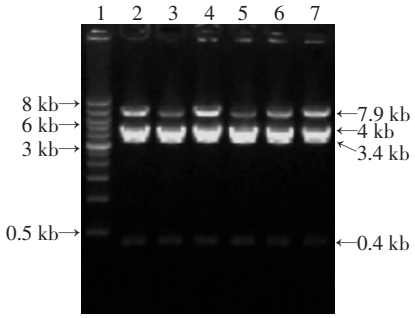
1.9 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件行 *t* 检验。

2 结果

2.1 干扰病毒载体构建

干扰序列连接到载体中后，通过 *Bgl* Ⅱ酶切鉴定，电泳结果显示载体的构建正确（图 1），进一步通过 DNA 测序，证明连入序列完全正确，未发生任何突变，干扰病毒载体可以用于后继实验。

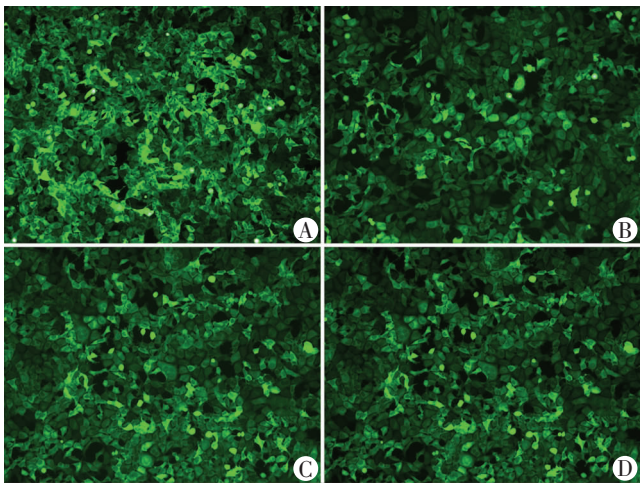


1：标准；2、3：pGP-SMO1 的 2 个克隆；4、5：pGP-SMO2 的 2 个克隆；6、7：pGP-SMO3 的 2 个克隆

图 1 干扰病毒载体构建

2.2 干扰效率鉴定

培养 48 h 后，荧光显微镜下观察到慢病毒能够很好地转染 293A 细胞（图 2），3 条序列都显示出一定的干扰效果。实时荧光定量 PCR 检测结果显示，pGP-SMO1 组具有最佳干扰效率，SMO mRNA 水平为对照组的（28.5 ± 2.5）%；pGP-SMO2 组 SMO mRNA 水平为对照组的（54.5 ± 13.5）%；pGP-SMO3 组的 SMO mRNA 水平为对照组的（59.0 ± 8.0）%。因此选取 pGP-SMO1 用于 PDLSCs 中 SMO 的干扰实验。



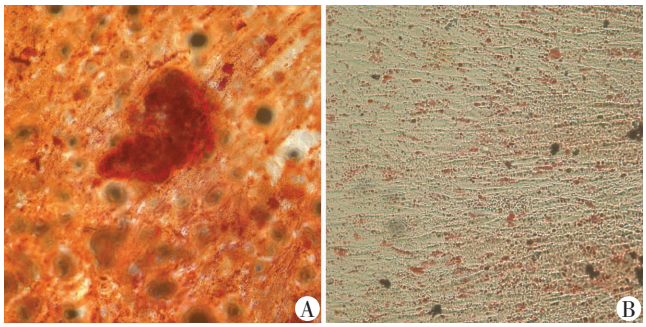
A：对照组；B：pGP-SMO1 组；C：pGP-SMO2 组；D：pGP-SMO3 组

图 2 对照病毒和干扰病毒转染 293A 细胞后培养 48 h 荧光观察（荧光显微镜 ×100）

2.3 PDLSCs 的鉴定

流式细胞仪检测结果显示：表面抗原 STRO-1 单标阳性率为 83.3%，单标 CD146 阳性率为 89.9%，STRO-1 和 CD146 双标阳性率为 87.0%，证明所得 PDLSCs 高表达间充质干细胞早期标志物。

成骨、成脂诱导显示：成骨诱导 3 周后可见矿化结节，茜素红染色阳性；成脂诱导 3 周后可见脂滴形成，油红 O 染色阳性。见图 3。

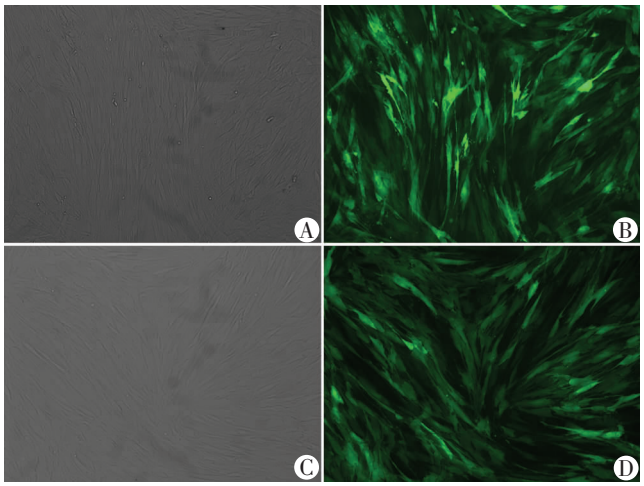


A：茜素红染色；B：油红 O 染色

图 3 成骨、成脂诱导分化鉴定 （×200）

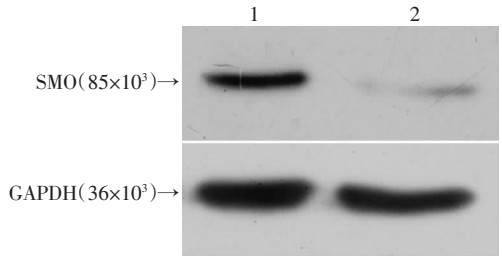
2.4 PDLSCs 中 SMO 基因干扰

按 MOI = 10 转染培养的 PDLSCs，48 h 后荧光显微镜观察可见有较高的转染效率以及较强的荧光表达（图 4），证明慢病毒可以有效地转染 PDLSCs。进一步收集细胞检测 SMO 的蛋白表达，显示慢病毒干扰载体能够在蛋白水平有效下调目的基因的表达（图 5），表达量降低 80%［（pGP-SMO1 组灰度值（0.22 ± 0.04）*vs* 对照组灰度值（1.15 ± 0.13），$P < 0.01$］，证明成功构建了能够在 PDLSCs 中下调 SMO 基因表达的病毒。



A、B：对照组；C、D：pGP-SMO1 组；A、C：光镜；B、D：荧光显微镜

图 4 对照病毒和干扰病毒转染 PDLSCs 后培养 48 h 观察 （×100）



1：对照组；2：pGP-SMO1 组

图 5 Western blot 检测转染干扰病毒后 PDLSCs 中 SMO 蛋白的表达

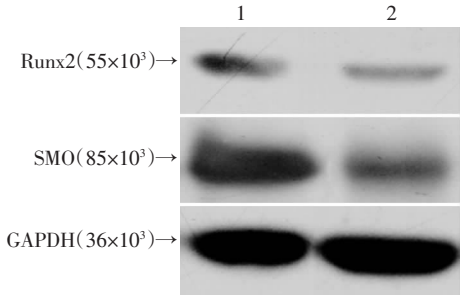
2.5 SMO 基因下调抑制 PDLSCs 增殖

CCK-8 法检测结果显示，pGP-SMO1 组的增殖与未转染组和对照病毒组相比明显下降［（1.09 ± 0.20）*vs*（1.83 ± 0.13），

$P<0.01$;(1.09±0.20) *vs* (1.86±0.21), $P<0.01$],而对照病毒组与未转染组间无明显差别($P=0.81$),说明SMO基因的下调影响了PDLSCs的增殖,导致PDLSCs增殖变慢。

2.6 SMO基因下调抑制PDLSCs向成骨细胞分化

使用干扰病毒转染PDLSCs后,收集细胞用Western blot检测RUNX2基因的变化,发现干扰SMO基因后,Runx2的表达也显著降低[灰度值(0.27±0.03) *vs* (0.61±0.08),$P<0.01$],说明SMO基因的下调也抑制了PDLSCs向成骨细胞的分化。见图6。



1:对照组;2:pGP-SMO1组

图6 Western blot检测PDLSCs中Runx2及SMO蛋白的表达

3 讨论

Hh信号通路在胚胎发育过程中对多种组织和器官的形成有着重要的影响,而近年来在骨形成中的作用受到广泛关注[8]。Hh蛋白在哺乳动物中有3种同源体:Sonic hedgehog (Shh)、Indin hedgehog (Ihh)、Desert hedgehog (Dhh)。其中Shh和Ihh与骨的形成密切相关,既调控软骨祖细胞的定型、增殖与分化,也可通过直接作用于成骨细胞和有成骨潜力的间充质干细胞诱导其向成骨细胞分化,进而影响正常骨组织的形成[9]。Runx2是与骨分化密切相关的重要转录因子,在骨形成的各个阶段均发挥作用。有研究发现小鼠模型中敲除Runx2后没有了膜内成骨与软骨骨化,因此,相对于骨分化和成熟相关的蛋白碱性磷酸酶,Runx2在成骨细胞分化的初始阶段更为重要[10],说明其表达水平的改变可反映一定的成骨分化趋势。本课题组前期研究证实Hh信号通路参与了PDLSCs的成骨分化过程,但这一信号是如何调控的目前尚未了解。

Hh通路中,配体蛋白Hh与受体PTCHED竞争性结合从而将受体SMO释放,被释放的SMO可通过磷酸化激活下游信号分子,其中核转录因子GLI1的激活被认为是Hh信号通路活化的重要标志[11],因此,SMO蛋白是Hh信号通路中最重要的信息转换器,激活SMO即可导致Hh靶基因的活化。

本实验选用慢病毒作为载体,是因为其能够感染分裂期细胞的同时还可感染非分裂期细胞,同时相对于普通真核表达载体而言,构建的载体包装成成熟的病毒颗粒感染靶细胞后,很容易整合入细胞基因组并能长期稳定表达目的基因,干扰效率随着细胞的分裂不会丢失,便于以后进一步研究。本实验通过构建3个人SMO基因慢病毒干扰载体,经PCR鉴定及DNA测序,证实载体构建成功,并获得了较高的病毒滴度。应用定量PCR对SMO基因表达检测结果显示,pGP-SMO1使SMO mRNA水平下降了(28.5±2.5)%,同时将其转染于体外培养的PDLSCs,经荧光显微镜观察及Western blot检测,转染后PDLSCs中SMO基因表达水平显著下调,为进一步研究SMO对PDLSCs的成骨分化作用及其分子机制奠定了良好的实验基础。

鉴于PDLSCs成骨分化的复杂性,可能有多种信号通路及众多的信号分子参与,通过RNAi来抑制SMO基因表达能否特异性调控PDLSCs的骨向分化;能否证明Hh对PDLSCs成骨分化的重要性;对Wnt、BMP等相关成骨信号通路及Hh信号通路中其他信号分子会产生怎样的影响,这些都有待进一步研究。

参考文献:

[1] Kim W K, Meliton V, Bourquard N, *et al*. Hedgehog signaling and osteogenic differentiation in multipotent bone marrow stromal cells are inhibited by oxidative stress[J]. J Cell Biochem, 2010, 111(5): 1199-1209.

[2] Ishida K, Murofushi M, Nakao K, *et al*. The regulation of tooth morphogenesis is associated with epithelial cell proliferation and the expression of Sonic hedgehog through epithelial-mesenchymal interactions [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 405(3): 455-461.

[3] 常慧君, 申涛, 董世武, 等. purmorphamine促进人牙周膜干细胞应力成骨[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(9): 839-842.

[4] Wilson C W, Chuang P T. Mechanism and evolution of cytosolic Hedgehog signal transduction[J]. Development, 2010, 137(13): 2079-2094.

[5] Martinez C, Smith P C, Rodriguez J P, *et al*. Sonic hedgehog stimulates proliferation of human periodontal ligament stem cells[J]. J Dent Res, 2011, 90(4): 483-488.

[6] Zhang J, Zou L, Liu Q, *et al*. Rapid generation of dendritic cell specific transgenic mice by lentiviral vectors [J]. Transgenic Res, 2009, 18(6): 921-931.

[7] Gay I C, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells[J]. Orthod Craniofac Res, 2007, 10(3): 149-160.

[8] Lin A C, Seeto B L, Bartoszko J M, *et al*. Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis[J]. Nat Med, 2009, 15(12): 1421-1425.

[9] Dohle E, Fuchs S, Kolbe M, *et al*. Sonic hedgehog promotes angiogenesis and osteogenesis in a coculture system consisting of primary osteoblasts and outgrowth endothelial cells [J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(4): 1235-1237.

[10] Liu D D, Zhang J C, Zhang Q, *et al*. TGF-β/BMP signaling pathway is involved in cerium-promoted osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. J Cell Biochem, 2013, 114(5): 1105-1114.

[11] Joeng K S, Long F. The Gli2 transcriptional activator is a crucial effector for Ihh signaling in osteoblast development and cartilage vascularization[J]. Development, 2009, 136(24): 4177-4185.

(**收稿**:2013-02-21;**修回**:2013-03-04)

(编辑 张 维)