DOI: 10.16016/j.1000-5404.201509077

大鼠 SLPI 基因 siRNA 重组表达载体构建及其在调控真皮多能干细胞增殖中的作用

蔡 俊,屈纪富 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所急诊医学科)

[摘要] **目的** 观察分泌型白细胞蛋白酶抑制因子(secretory leukocyte protease inhibitor,SLPI)对真皮多能干细胞(dermal multipotent stem cells,DMSCs)的促增殖作用。**方法** 酶消化法分离、纯化、扩增新生大鼠 DMSCs。在前期成功构建 SLPI 基因过表达载体基础上,根据 SLPI 基因 siRNA 的设计挑选出最佳抑制 SLPI 基因表达的干扰载体,RT-PCR、Western blot 鉴定。重组表达载体转染 DMSCs,观察其表达,运用 CCK-8 法和流式细胞术检测细胞周期,观察 SPLI 基因促进 DMSCs 的增殖作用。**结果** 成功分离获得真皮来源、具有细胞干性的 DMSCs;并成功构建 SLPI 基因过表达真核载体及 SLPI 基因 siRNA 表达载体,转染 DMSCs(分为过表达组和干扰组,并以转染空载体者为对照组)。CCK-8 检测显示,48、72、96 h,过表达组增殖较快,干扰组增殖较慢,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$);72、96 h,过表达组与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),说明过表达组增殖较快,即 SLPI 基因有促进增殖作用。流式细胞检测表明,过表达组 G_1 期与干扰组比较差异有统计学意义($P<0.05$),S 期、G_2 期与对照比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** SLPI 基因具有明确的促 DMSCs 增殖作用,促进细胞从 G_1 向 S 和 G_2 期转变,即通过调控细胞周期发挥促增殖作用。

[关键词] 分泌型白细胞蛋白酶抑制因子;重组表达载体;真皮多能干细胞;增殖
[中图法分类号] R322.991;R329.28;R394.2 [文献标志码] A

Construction of SLPI gene siRNA eukaryotic expression vector and its role in modulating proliferation of dermal multipotent stem cells in rats

Cai Jun, Qu Jifu (Department of Emergency Medicine, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] Objective To determine the effect of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) on promoting proliferation of dermal multipotent stem cells (DMSCs). Methods DMSCs were isolated from neonatal rats by enzyme digestion, and then purified and amplified for further research. Based on successful construction of SLPI overexpression vector, SLPI gene siRNA expression vector was picked out according to RT-PCR and Western blot identification. DMSCs were transformed with recombinant expression plasmids of SLPI gene, and the effect of SPLI gene on promoting the proliferation of DMSCs was observed using CCK-8 assay and flow cytometry. Results DMSCs were successfully isolated from the dermis. The eukaryotic expression vector and siRNA expression vector of SLPI gene were constructed. The transformed DMSCs were divided into 3 groups: overexpression group, interference group, and control group (transformation with blank vector). The results of CCK-8 assay showed that, in 48, 72 h and 96 h after transformation, the proliferation of DMSCs in the overexpression group was faster than that in the interference group ($P<0.05$), and in 72 and 96 h after transformation, DMSCs in the overexpression group were significantly different from those in the control group ($P<0.05$), which suggested that SLPI gene might promote the proliferation of DMSCs. The results of flow cytometry showed that the cells in the G_1 phase in the overexpression group were significantly different from those in the interference group ($P<0.05$), meanwhile, the cells in the S phase and G_2 phase

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30370562,81071562)
[通信作者] 屈纪富,E-mail: 1284590786@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151221.0733.001.html(2015-12-21)

were significantly different from those in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** SLPI gene plays a role in promoting the proliferation of DMSCs, and promotes cell cycle transformation from G_1 phase to S phase and G_2 phase, which suggests that SLPI may promote proliferation of DMSCs *via* regulating cell cycle.

[**Key words**] secretory leukocyte protease inhibitor; recombinant expression vector; dermal multipotent stem cells; proliferation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30370562, 81071562). Corresponding author: Qu Jifu, E-mail: 1284590786@qq.com

分泌型白细胞蛋白酶抑制因子(secretory leukocyte protease inhibitor,SLPI)是一种可以对抗各种丝氨酸蛋白酶活性的蛋白,由两个类似的半胱氨酸富集区域构成,其羧基末端具有抑制糜蛋白酶、胰弹性蛋白酶等方面的活性,氨基末端有抗炎、抗细菌、抗真菌、抗逆转录病毒等多方面的活性[1-4]。研究表明,SLPI还具有促细胞增殖作用[2],也参与细胞凋亡和免疫功能的调节作用,具有抑制细胞凋亡和调节免疫反应等功能。SLPI的这些生物学作用与创面修复过程密切相关。本课题组前期研究[5]发现,创面早期伤口液对真皮多能干细胞(dermal multipotent stem cells,DMSCs)增殖具有明显的促进作用。进一步通过抑制消减杂交(SSH)技术和基因芯片检测发现,培养液中加入10%伤后早期伤口液,DMSCs显著高表达SLPI,并且创伤局部组织SLPI同样高表达,提示SLPI可能通过促DMSCs增殖调节创面修复过程[6]。本研究在前期成功构建SLPI基因过表达载体基础上[7],构建SLPI基因siRNA表达载体,进一步证实SPLI促进DMSCs增殖的作用,以期为探讨其详细机制及相关信号通路奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

出生2 d的SD雄性大鼠(第三军医大学实验动物中心),体质量(30±5)g。

1.2 主要试剂

IMDM培养液、胎牛血清购自HyClone公司,地塞米松、Bmp-2、EGF、KGF购自北京博奥森公司。实验用质粒提取试剂盒购自Omega公司,胶回收试剂盒购自Omega公司,限制性内切酶购自New England公司,DNA聚合酶购自TaKaRa公司,DNA连接酶购自Promega公司。Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒购自上海华雅思创生物科技有限公司。LipFectamine 2000试剂盒购自美国Invitrogen公司。

1.3 DMSCs分离、鉴定及纯化

参照史春梦等[8]的方法分离新生大鼠DMSCs,观察鉴定、扩增[9]备用。

1.4 重组SLPI基因表达及干扰载体构建

通过GenBank查找出Rattus norvegicus SLPI基因号:NM_053372,使用全基因合成法获得SLPI基因,使用*Bam*HⅠ和*Xho*Ⅰ酶切位点连入表达慢病毒载体中,使用*Bam*HⅠ和*Acc*65Ⅰ酶切验证,获得构建正确的SLPI表达病毒载体。设计SLPI基因siRNA的3个干扰靶点:SLPI干扰靶点1:5′-GACGGCCAGTGTGATGGCAAAT-3′,SLPI干扰靶点2:5′-AGCAGAGATGCTGCCAAGATAC-3′,SLPI干扰靶点3:5′-CAGTGTAAGTCTGATTCCTGAC-3′。合成相应的干扰DNA序列,连入干扰慢病毒载体的*Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ酶切位点中,使用BglⅡ酶切验证,获得针对3个不同靶点的构建正确的SLPI干扰病毒载体,分别为SLPI干扰病毒载体1,SLPI干扰病毒载体2和SLPI干扰病毒载体3。

1.5 SLPI重组载体转染DMSCs及其鉴定

使用磷酸钙转染法转染293FT细胞,收集上清,获得对照病毒、SLPI表达病毒、SLPI干扰病毒1、SLPI干扰病毒2、SLPI干扰病毒3。按转染复数10加入到6孔板中培养的大鼠DMSCs培养孔内,24 h后换为新鲜培养基继续培养,加入病毒至少72 h后,收集转染的细胞,采用RT-PCR、Western blot检测SLPI基因表达的变化,同时筛选出3个干扰靶点中干扰能力最强的一个干扰病毒,用于后续实验。

1.6 SPLI促DMSCs增殖作用分析

实验分3组:转染SLPI基因表达载体的DMSCs(过表达组)、转染SLPI基因siRNA表达载体的DMSCs(干扰组)和转染空载体的DMSCs(对照组)。转染方法参考Invitrogen公司LipFectamine2000试剂盒说明书。采用CCK-8检测各组DMSCs增殖能力,具体方法参照CCK-8试剂盒说明书:①96孔板中加入细胞悬液100 μL,37 ℃培养箱中培养。②将100 μL空白培养基和样品培养基分别加入培养板。③每孔加入10 μL CCK-8溶液。④培养1~4 h。⑤酶标仪检测450 nm光密度[D(450)]。⑥结果判断:细胞增殖活力=[D(450)样品-D(450)空白]/[D(450)0样品-D(450)空白]×100%。D(450)样品:具有细胞(已转染基因)、CCK-8溶液的孔的光密度;D(450)空白:具

有培养液和 CCK-8 溶液而没有细胞的孔的光密度;*D*(450)0 样品:具有细胞(没有转染基因的原始细胞)、CCK 溶液的孔的光密度。流式细胞术检测各组转染细胞周期,观察不同 SLPI 基因表达对细胞周期的影响。

1.7　统计学分析

资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析和 t 检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

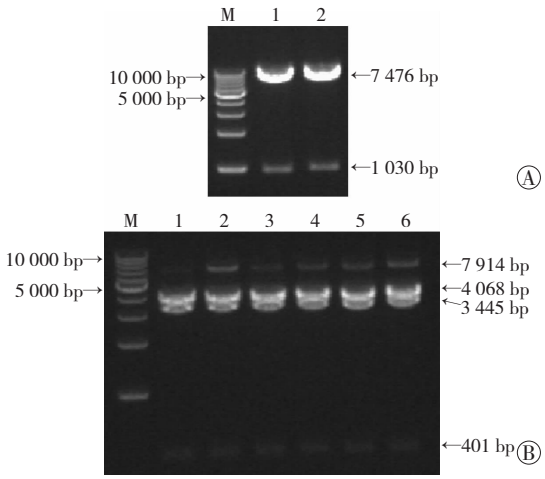
2.1　DMSCs 分离培养及鉴定

本实验获得的 DMSCs,经鉴定具有多向分化和自我更新能力,生长周期平均为 1.5~2 周,传代至 7~10 代仍有较高的分化能力,可用于进一步的实验研究。

2.2　重组 SLPI 基因表达及干扰载体构建和转染

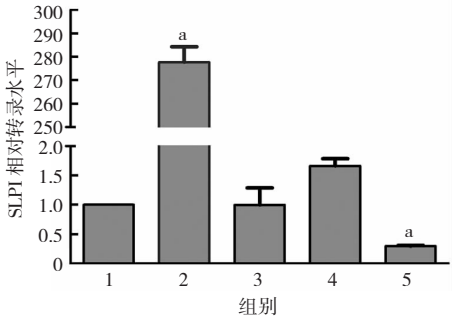
2.2.1　构建鉴定　　构建 SLPI 表达及干扰载体,通过酶切验证载体构建正确,见图 1。

2.2.2　转染观察　　使用病毒转染培养的 DMSC 细胞,在荧光显微镜下可见转染的细胞表达较强的绿色荧光。通过转染 SLPI 基因表达载体的 DMSCs 组、转染 SLPI 基因 siRNA 表达载体的 DMSCs 组(其中 3 组干扰病毒)、转染空载体的 DMSCs 组,对比 RT-PCR、Western blot 检测结果,得到较高干扰能力的 SLPI siRNA 转染病毒(图 2~4)。SLPI 基因过表达病毒转染细胞后,SLPI 转录水平显著上升,为对照病毒转染的 278 倍;而 3#干扰序列能够有效地干扰 SLPI 基因的转录,对 SLPI mRNA 的抑制率可以达到 70%。3#干扰序列能够最有效地抑制 SLPI 蛋白的表达。而转染 SLPI 过表达病毒后,SLPI 蛋白水平升高。



A:表达载体酶切验证　M:1 kb DNA 标准;1:SLPI 表达病毒载体 1#克隆(*Bam*HⅠ+*Acc*65Ⅰ酶切);2:SLPI 表达病毒载体 2#克隆(*Bam*HⅠ+*Acc*65Ⅰ酶切);B:干扰载体酶切验证　M:DNA 标准;1:SLPI 干扰病毒载体 1,1#克隆(*Bgl*Ⅱ酶切);2:SLPI 干扰病毒载体 1,2#克隆(*Bgl*Ⅱ酶切);3:SLPI 干扰病毒载体 2,1#克隆(*Bgl*Ⅱ酶切);4:SLPI 干扰病毒载体 2,2#克隆(*Bgl*Ⅱ酶切);5:SLPI 干扰病毒载体 3,1#克隆(*Bgl*Ⅱ酶切);6:SLPI 干扰病毒载体 3,2#克隆(*Bgl*Ⅱ酶切)

图 1　SLPI 基因重组载体酶切验证



1:转染对照病毒组;2:转染表达病毒组;3:转染 1#干扰病毒组;4:转染 2#干扰病毒组;5:转染 3#干扰病毒组　a:$P<0.05$,与转染对照病毒组比较

图 3　定量 PCR 检测各组真皮多能干细胞基因表达

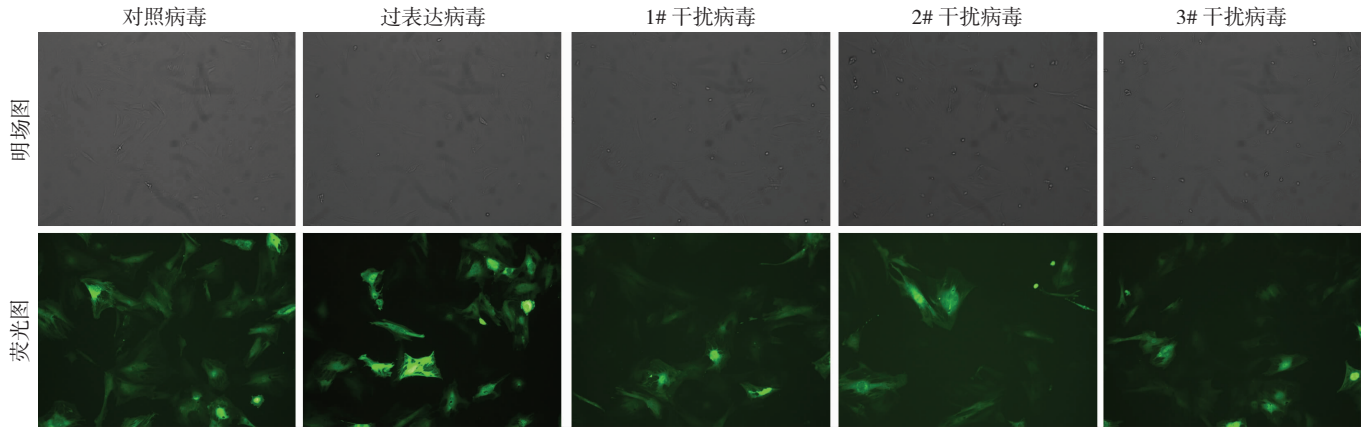
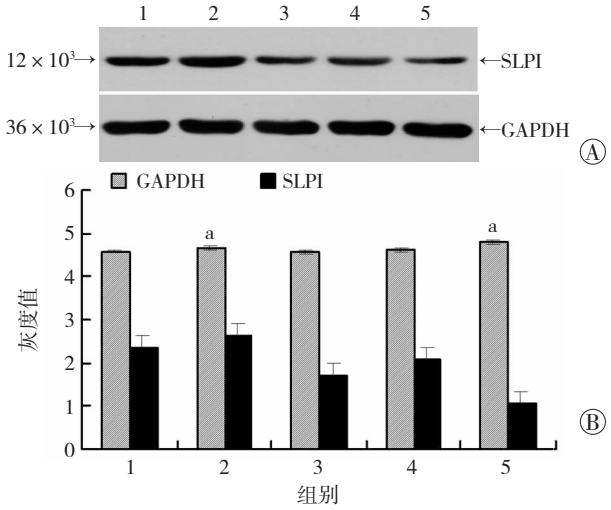


图 2　荧光显微镜下分别用白光和荧光观察不同 SLPI 基因表达载体转染大鼠真皮多能干细胞　(×100)

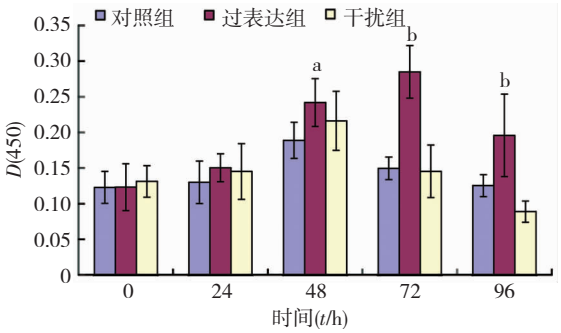


A:Western blot 检测;B:半定量分析　1:转染对照病毒组;2:转染表达病毒组;3:转染 1#干扰病毒组;4:转染 2#干扰病毒组;5:转染 3#干扰病毒组;a:$P<0.05$,与转染对照病毒组比较

图 4　Western blot 检测各组真皮多能干细胞 SLPI 蛋白表达

2.3　SLPI 对 DMSCs 的促增殖作用

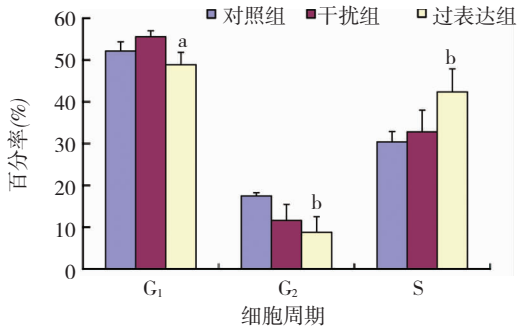
2.3.1　CCK-8 法检测各组 DMSCs 增殖能力　48、72、96 h,SLPI 过表达组与 SLPI siRNA 干扰者比较差异有统计学意义($P<0.05$);72、96 h,SLPI 过表达组与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$,图 5),说明 SLPI 过表达组增殖较快,转染 SLPI 基因的 DMSCs 增殖能力明显较高,即 SLPI 基因有促进增殖作用。



a:$P<0.05$,与同时相点干扰组比较;b:$P<0.05$,与同时相点对照组及干扰组比较

图 5　CCK-8 法检测不同时相点各组真皮多能干细胞增殖能力变化

2.3.2　流式细胞术检测各组转染细胞周期变化　如图 6 所示,SLPI 表达组 G_1 期与 siRNA 干扰组比较有明显差异,S 和 G_2 期与对照组比较有统计学差异,说明 SLPI 过表达后,G_1 期分布减少,S 和 G_2 期分布增加,提示 SLPI 基因过表达可以使细胞从 G_1 向 S 和 G_2 期转变,从而促进细胞增殖。



a:$P<0.05$,与干扰组比较;b:$P<0.05$,与对照组比较

图 6　流式细胞术检测各组真皮多能干细胞周期结果

3　讨论

近年,利用干细胞技术进行创面修复机制及促愈研究已成为创伤领域研究的热点之一[10-12]。皮肤组织更新速度快、再生能力强、取材方便,用于皮肤等软组织创面修复具有相容性好等特点,因此,来自皮肤的成体干细胞在创面修复过程中具有较为明显的优势[13]。研究表明,真皮组织中存在较为原始的来源于间充质的干细胞,这种细胞具有高度的增殖能力,并可分化为神经元、神经胶质、平滑肌细胞、脂肪细胞和成纤维细胞等,它们是一种新的多能成体干细胞,即 DMSCs。本课题组前期成功分离、培养出 DMSCs,分析其生物学特性,发现 DMSCs 参与了创面修复过程[5-7,14],是促进创面愈合的一种重要修复细胞成分,并且 DMSCs 增殖是其促进创面的重要途径。研究表明,SLPI 是创面修复过程中至关重要的调控分子,但其作用仍不清楚。本研究采用基因工程技术成功构建 SLPI 基因过表达载体,设计 SLPI 基因 siRNA 的 3 个干扰靶点,构建了 3 个 SLPI 基因 siRNA 载体,通过 RT-PCR、Western blot 鉴定所构建载体。本研究发现,转染 SLPI 过表达病毒后,SLPI 蛋白水平有所上升。上升幅度不大的可能原因包括[15-16]:①在有内源性蛋白表达的情况下,转染病毒介导的外源蛋白表达量通常会低于内源性表达量,因此转染表达病毒后蛋白变化不明显。这种病毒介导的表达称为 ectopic expression,主要意义在于此基因的表达不再受细胞本身机制的调控,即在任何情况下都能维持这一表达量,因此用于研究基因的功能。②SLPI 是分泌型蛋白,蛋白翻译以后即会通过内质网高尔基体然后运送到细胞外,因此胞内的蛋白是一个动态的过程,无法积累,从而使得表达病毒转染后对 SLPI 细胞蛋白的变化影响不大。本研究构建的 SLPI 基因重组表达载体可用于进一步功能分析,有助于从正反方面证实 SLPI 基因的作用。

为了观察 SLPI 基因对 DMSCs 的调控作用,我们将构建的 SLPI 基因过表达载体及活性最强的 SLPI 重组 siRNA 载体转染 DMSCs,采用 CCK-8 法和流式细胞术观察 SPLI 促进 DMSCs 的增殖作用,并检测细胞周期,发现 SLPI 基因有明确的促 DMSCs 增殖作用[17-18],其作用与细胞调控密切相关,SLPI 基因可使细胞从 G_1 向 S 和 G_2 期转变[19-20],从而发挥促进细胞增殖作用。

本实验初步明确了 SLPI 基因在调控 DMSCs 增殖中的作用,创伤时 SLPI 表达增加,可促进 DMSCs 数量增加,有助于加速肉芽组织形成,最终促进创面修复。但是影响创面修复及创伤修复细胞的因素众多,调控细胞增殖的环节及信息通路也极为复杂,其具体作用环节及详细机制仍有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Curvelo J A, Barreto A L, Portela M B, *et al*. Effect of the secretory leucocyte proteinase inhibitor (SLPI) on Candida albicans biological processes: a therapeutic alternative[J]. Arch Oral Biol, 2014, 59(9): 928-937. DOI:10.1016/j.archoralbio.2014.05.007

[2] Pierce-Campbell C M, Guan W, Sprung R, *et al*. Quantification of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in oral gargle specimens collected using mouthwash[J]. J Immunol Methods, 2013, 400-401: 117-121. DOI:10.1016/j.jim.2013.10.005

[3] Mikami Y, Iwase T, Komiyama Y, *et al*. Secretory leukocyte protease inhibitor inhibits expression of polymeric immunoglobulin receptor *via* the NF-κB signaling pathway[J]. Mol Immunol, 2015, 67(2, Part B): 568-574. DOI:10.1016/j.molimm.2015.07.021

[4] 屈纪富,江德鹏.分泌性白细胞蛋白酶抑制因子在创伤愈合中的潜在应用前景[J].创伤外科杂志,2009,11(5):471-473. DOI:10.3969/j.issn.1009-4237.2009.05.031

[5] 屈纪富, 江德鹏, 郑怀恩, 等. 创伤早期伤口液对体外培养真皮多能干细胞增殖迁移特性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(24): 2393-2395.

[6] 江德鹏, 向静, 文亮, 等. 白细胞蛋白酶抑制因子在真皮多能干细胞中的表达[J]. 中国急救医学, 2006, 26(5): 345-348. DOI:10.3969/j.issn.1002-1949.2006.05.010

[7] 屈纪富, 江德鹏, 史春梦, 等. 大鼠 SLPI 基因真核表达载体的构建及其在真皮多能干细胞中的表达[J]. 中国急救医学, 2010, 30(7): 614-617,封 3. DOI:10.3969/j.issn.1002-1949.2010.07.012

[8] 史春梦, 程天民. 大鼠真皮多能间充质干细胞的分离培养[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(9): 1068-1070.

[9] Toma J G, Akhavan M, Fernandes K J, *et al*. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(9): 778-784. DOI:10.1038/ncb0901-778

[10] Ebrahimi B. Reprogramming of adult stem/progenitor cells into iPSCs without reprogramming factors[J]. Journal of Medical Hypotheses and Ideas, 2015, 9(2): 99-103.

[11] Wu Q, Ji F K, Wang J H, *et al*. Stromal cell-derived factor 1 promoted migration of adipose-derived stem cells to the wounded area in traumatic rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 467(1): 140-145. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.09.097

[12] Broeckx S Y, Borena B M, Van-Hecke L, *et al*. Comparison of autologous versus allogeneic epithelial-like stem cell treatment in an *in vivo* equine skin wound model[J]. Cytotherapy, 2015, 17(10): 1434-1446. DOI:10.1016/j.jcyt.2015.06.004

[13] de-la-Puente P, Ludena D, Lopez M, *et al*. Differentiation within autologous fibrin scaffolds of porcine dermal cells with the mesenchymal stem cell phenotype[J]. Exp Cell Res, 2013, 319(3): 144-152. DOI:10.1016/j.yexcr.2012.10.009

[14] Qu J, Cheng T, Su Y, *et al*. A study on the activity of dermal multipotent stem cells in initiation of wound repair[J]. J Biomed Sci Eng, 2013, 6(2): 109-115.

[15] Yilmaz A, Engeler R, Constantinescu S, *et al*. Ectopic expression of Msx2 in mammalian myotubes recapitulates aspects of amphibian muscle dedifferentiation[J]. Stem Cell Res, 2015, 15(3): 542-553. DOI:10.1016/j.scr.2015.09.012

[16] Quabius E S, Gorogh T, Fischer G S, *et al*. The antileukoprotease secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and its role in the prevention of HPV-infections in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Cancer Lett, 2015, 357(1): 339-345. DOI:10.1016/j.canlet.2014.11.043

[17] Zhao N B, Wang X, Qin L, *et al*. Effect of molecular weight and concentration of hyaluronan on cell proliferation and osteogenic differentiation *in vitro*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 465(3): 569-574. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.08.061

[18] Yu F, Liu Z, Tong Z, *et al*. Soybean isoflavone treatment induces osteoblast differentiation and proliferation by regulating analysis of Wnt/β-catenin pathway[J]. Gene, 2015, 573(2): 273-277. DOI:10.1016/j.gene.2015.07.054

[19] Wen J, Nikitakis N G, Chaisuparat R, *et al*. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) expression and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma[J]. Am J Pathol, 2011, 178(6): 2866-2878. DOI:10.1016/j.ajpath.2011.02.017

[20] 江德鹏, 向静, 文亮, 等. 白细胞蛋白酶抑制因子促进真皮间充质干细胞增殖的机制[J]. 中华创伤杂志, 2007, 23(3): 235-238. DOI:10.3760/j:issn:1001-8050.2007.03.029

(**收稿**:2015-09-15;**修回**:2015-10-11)

(编辑 龙 亮)