DOI: 10.16016/j.1000-5404.201503187

论著

慢病毒介导 shRNA 沉默 E2-2 基因促进内皮前体细胞增殖

刘晓丽[1],马 阳[1],梁 源[1],喻 杨[2],梁云华[1],王 红[1] (650032 昆明,成都军区昆明总医院干部病房[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管病研究所[2])

[摘要] **目的** 构建小鼠转录因子基因 E2-2 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)慢病毒载体,并观测其沉默 E2-2 基因对内皮前体细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)增殖的影响。**方法** SPF 级昆明小鼠 20 只,雌雄不拘,4 周龄,体质量 18~20 g。分离、培养小鼠骨髓 EPCs,并予以鉴定。针对 E2-2 基因 mRNA 序列,筛选 3 个 siRNA 干扰靶点并予以合成;将合成的 siRNA 导入 EPCs,用 RT-PCR 法检测其对靶基因的抑制效果,以确定最佳 siRNA。设计并合成针对最佳 siRNA 靶序列的 shRNA,连入 FT203-PLVX 载体,构建慢病毒载体 FT203-PLVX/E2-2shRNA,并予以测序鉴定。测序正确者经 293 细胞包装,形成具高效感染力的 FT203-PLVX/E2-2shRNA 慢病毒。将该重组慢病毒感染 EPCs,倒置显微镜观测被感染细胞的绿色荧光蛋白(GFP)的表达变化、CCK-8 法检测被感染细胞的增殖情况;在 mRNA 和蛋白水平分别检测并定量分析被感染细胞的 E2-2 及核抗原 PCNA 基因及其编码蛋白的表达变化。**结果** 小鼠骨髓 EPCs 得以分离、培养与鉴定。筛检到 E2-2 基因的最佳干扰靶序列为 CGTCAGCTA-GTGTTTCTAA;测序证实,成功构建 FT203-PLVX/E2-2 shRNA 慢病毒载体。荧光观察显示,被慢病毒感染的 EPCs 明显表达 GFP。CCK-8 检测表明,与对照细胞比较,沉默 E2-2 的 EPCs 的增殖加快,48 h 开始变得更为明显($P<0.01$);mRNA 和蛋白水平检测及定量分析结果显示,E2-2 shRNA 慢病毒能有效沉默 EPCs 的 E2-2,并上调其核抗原 PCNA 基因及其编码蛋白的表达。**结论** 小鼠骨髓 EPCs 得以分离、培养与鉴定;成功构建 E2-2 基因 RNAi 慢病毒载体,该载体能有效沉默 EPCs 的 E2-2 基因,促使 EPCs 的增殖并上调其核抗原 PCNA 的表达。

[关键词] E2-2 基因;RNAi;内皮前体细胞;慢病毒
[中图法分类号] R322.12;R329.28;R394-33 [文献标志码] A

Effect of lentivirus-mediated E2-2 gene silencing on proliferation in endothelial progenitor cells

Liu Xiaoli[1], Ma Yang[1], Liang Yuan[1], Yu Yang[2], Liang Yunhua[1], Wang Hong[1] ([1]Department of Cadre's Ward, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming, Yunnan Province, 650032; [2]Department of Cardiology Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct RNA interference (RNAi) lentiviral vector targeting murine transcription factor E2-2 gene and investigate its effect on the growth and proliferation of endothelial progenitor cells (EPCs). **Methods** Murine EPCs were isolated from bone marrow, cultured and identified. Three potential RNAi sites were screened based on the mRNA sequence of E2-2 gene and synthesized. The 3 synthesized siRNAs were transferred into the EPCs, and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to analyze the inhibitory effect of the target gene so as to identify the optimal siRNA sequence. Then the short-hairpin RNA (shRNA) oligonucleotide targeting the optimal siRNA sequence was designed, synthesized and inserted into FT203-PLVX plasmid to construct FT203-PLVX/E2-2shRNA lentiviral vector. After identifying by sequencing, FT203-PLVX/E2-2shRNA plasmid was transferred into 293 cells to

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270224);第三军医大学青年基金(2012D288)
[通信作者] 王 红,E-mail:wangh43@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151111.1536.004.html

produce lentiviral particles. The EPCs were transfected with the lentiviral particles, and the expression of green fluorescent protein (GFP) in the transfected cells was observed with an inverted microscope. Cell count kit-8 (CCK-8) was used to test the growth and proliferation of the transfected cells. The expression of E2-2, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene and its encoding protein in the transfected cells were quantitatively detected by RT-PCR and Western blotting. **Results** Murine EPCs were isolated from the bone marrow, cultured and identified. The optimal siRNA sequence CGTCAGCTAGTGTTTCTAA was confirmed. Sequencing results showed that lentiviral vector FT203-PLVX/E2-2shRNA was constructed successfully. The transfected cells significantly expressed GFP. The CCK-8 results revealed that the growth and proliferation of EPCs were faster after E2-2 gene silencing, especially from 48 h after transfection ($P<0.01$). The results of RT-PCR, Western blotting and quantitative analysis showed that the lentiviral vector FT203-PLVX/E2-2shRNA effectively silenced E2-2 gene and up-regulated the expression of PCNA in the EPCs. **Conclusion** Murine EPCs are isolated from bone marrow, cultured and identified. The lentiviral vector targeting E2-2 gene can effectively silence E2-2 gene, up-regulate PCNA expression, and promote the growth and proliferation of the EPCs.

[**Key words**] E2-2 gene; RNA interference; endothelial progenitor cells; lentivirus

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81270224) and the Foundation for Young Scholars of Third Military Medical University (2012D288). Corresponding author: Wang Hong, E-mail: wangh43@126.com

内皮前体细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)为损伤性血管重塑的最重要细胞来源。移植 EPCs 可以促进损伤血管的再生修复[1]。但 EPCs 体外扩增难度大,其有限的来源已成为 EPCs 移植促使损伤性血管再生修复的瓶颈[2]。因此,提升 EPCs 的体内、外增殖与分化潜能具有极为重要的意义。EPCs 的增殖与分化主要受外环境因素的影响,但最终还是由基因的选择性表达予以决定。因此,深入研究 EPCs 内在的增殖、分化调控机制显得尤为重要。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是调控 EPCs 增殖、分化的重要因子之一。E2-2 是干细胞分化转录调控的关键因子之一,能与 VEGF 受体 2(VEGFR2)的启动子特异结合,阻止成熟内皮细胞(endothelial cells, ECs) VEGFR2 的表达,抑制成熟 ECs 的增殖与迁移。但 E2-2 与 EPCs 增殖的调控机制尚不完全清楚。

本实验首先分离、培养和鉴定小鼠 EPCs,其次构建小鼠 E2-2 基因的 shRNA 重组慢病毒载体,随后将 E2-2 基因的 shRNA 病毒感染 EPCs,CCK-8 法检测被感染 EPCs 的增殖情况并绘制其增殖曲线。RT-PCR、Western blot 分别检测 EPCs 的 E2-2 及核抗原 PCNA 的表达变化并予以定量分析,进一步研究 E2-2 与 EPCs 的内在关系,以期为深入探讨 EPCs 的内在增殖调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究使用的材料包括 EGM-2 培养基(Clonetics);FITC 标记的 Lectin(SIGMA);DiI-Ac-LDL(Biomedical Technologies Inc);内皮前体细胞分离试剂盒及 F 液(天津灏洋生物);Anti-Mouse CD34 FITC、Anti-Mouse Ly-6A/E (Sca-1) FITC 与 Anti-Mouse CD309 (FLK-1) PE 抗体(Ebioscience);RT-PCR 试剂盒、T_4 DNA 连接酶(大连宝生物);胶回收试剂盒与质粒抽提试剂盒(Roche);寡核苷酸 Oligos、慢病毒载体 FT203-PLVX 及测序(广州辉骏),Lipofectamine® 2000 (Invitrogen);CCK-8 试剂盒(Toyobo);E2-2 鼠单抗(Santa Cruz);PCNA 兔多克隆抗体(Millipore)。

1.2 方法

1.2.1 EPCs 的分离、培养及形态鉴定 20 只昆明小鼠[昆明医学院实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(滇)2005-0008,雌雄不拘,4 周龄,体质量 18~20 g,饲养于恒温 18~20 ℃和恒湿 50%~80% 条件的 SPF 级动物实验,自由摄取标准饮料与无菌水]EPCs 的分离、培养及吞噬荧光染料的形态鉴定参照文献[3-5]进行。

1.2.2 EPCs 的表型流式细胞仪检测鉴定 经胰酶消化后,用 PBS 洗涤原代培养 7~12 d 的 EPCs,并重悬至细胞浓度为 1×10^5/mL。参照各抗体使用说明书,分别用 Anti-Mouse CD34 FITC、Anti-Mouse Ly-6A/E (Sca-1) FITC 或 Anti-Mouse CD309 (FLK-1) PE 抗体与 EPCs 于 37 ℃避光孵育 1~2 h。以未加抗体的细胞作对照,流式细胞仪检测各抗体标记细胞的百分率。

1.2.3 E2-2 最佳 RNA 干扰靶点的序列确定 基于小鼠 E2-2 全长 mRNA 序列,筛选 3 个 RNA 干扰靶序列,分别为:①GCTGAGTGATTTACTGGAT;②CCCAGTACTATCAGTATTC;③CGTCAGCTAGTGTTTCTAA,

并合成其相应的siRNAs。即:①5′-GCUGAGUGAUUU-ACUGGAUUU-3′/3′-UUCGACUCACUAAAUGACCUA-5′;② 5′-CCCAGUACUAUCAGUAUUCUU-3′/3′-UUGGGUCA-UGAUAGUCAUAAG-5′;③ 5′-CGUCAGCUAGUGUUUC-UAAUU-3′/3′-UUGCAGUCGAUCACAAAGAUU-5′。分别用该3个siRNAs转染EPCs,以未转染的EPCs作对照,具体按操作说明进行。然后用RT-PCR检测各siRNAs对E2-2的抑制情况,以确定最佳的siRNA沉默靶序列。

1.2.4 小干扰RNA对E2-2蛋白表达的影响 用Western blot法,将1.2.3中的各细胞总蛋白转置PVDF膜上,置于含E2-2鼠单抗(1∶500)的封闭液中,4 ℃过夜,同辣根过氧化物酶标记的相应二抗(1∶600)共同孵育,室温1.5 h,并与化学发光底物结合5 min。β-actin作内参。

1.2.5 慢病毒载体E2-2 shRNA的构建与鉴定 设计与合成针对最佳siRNA的E2-2的shRNA靶序列(正义链:5′-GATCGCGTCAGCTAGTGTTTCTAATTCTC-GAGAATTAGAAACACTAGCTGACGTTTTT-3′,反义链:5′-AATTAAAAACGTCAGCTAGTGTTTCTAATTCTCGA-GAATTAGAAACACTAGCTGACGC-3′),并克隆至FT203-pLVX-shRNA2-zsGreen-PGK-Puro(FT203-pLVX)载体的*Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ酶切位点间,构建FT203-pLVX/E2-2shRNA重组慢病毒载体。转化感受态菌。测序鉴定FT203-pLVX/E2-2 shRNA重组慢病毒载体构建的正确性。

1.2.6 重组E2-2 shRNA慢病毒的包装与滴度测定

将293T细胞接种于6孔板中,密度为5×10^5/孔,常规培养至70%~80%汇片生长时,在基因转染试剂及包装质粒(PLP1、PLP2、PLP-VSVG)的作用下,将测序正确的FT203-PLVX/E2-2shRNA质粒DNA转染293T细胞,8 h后更换新鲜培养基,继续培养至48 h,在倒置显微镜下观测其绿色荧光蛋白(GFP)的表达变化。继续培养至72 h,4 000×*g* 4 ℃离心10 min,收集细胞上清液。上清液经0.45 μm无菌滤器过滤,收集滤液。经适当浓缩后,将滤液分装,-80 ℃存放备用。

将293T细胞接种于24孔板并用上述滤液予以感染,以倍比稀释法测定其滴度,并予以计算,公式为:滴度=(P×N/100×V)×1/DF,P:GFP阳性克隆数,N:105(每孔细胞数),V:病毒液稀释容量(mL),DF:稀释倍数。

1.2.7 EPCs的FT203-PLVX/E2-2shRNA慢病毒感染

按1∶50(病毒液与培养液体积比)比例感染接种在6孔板中的第1代或原代EPCs,以未感染的细胞为对照,培养24~72 h,倒置显微镜下观测细胞GFP的表达变化。

1.2.8 FT203-PLVX/E2-2shRNA病毒对EPCs增殖的影响 将原代分离或第1代的EPCs以3 000/(150 μL·孔)的密度接种于96孔板中,常规培养7 d,按1∶50(病毒液与培养液体积比)比例加入FT203-PLVX/E2-2shRNA病毒液;以未感染和经空病毒感染的EPCs作对照,单纯培养液作空白对照。感染后24、48、72、96 h分别取出1块96孔板,每孔更换含CCK-8(10 μL/孔)的新鲜培养液,继续培养3.5 h后,酶标仪检测其光密度值[*D*(450)]。以光密度值为纵轴,培养时间为横轴,绘制EPCs生长曲线。该实验重复3次。

1.2.9 沉默E2-2对EPCs核抗原基因PCNA表达的影响 根据小鼠PCNA的mRNA序列设计与合成其检测引物,上游:5′-CTTGGCAATGGGAACA-3′,下游:5′-ACAGTGGAGTGGCTTT-3′。以经FT203-PLVX/E2-2shRNA病毒液感染的EPCs总RNA为模板,RT-PCR法分别检测E2-2与PCNA的表达变化,以经空病毒感染及未经感染的EPCs的同样检测为对照,β-actin基因的相同检测作内参。

1.2.10 沉默E2-2对EPCs的PCNA基因编码蛋白表达的影响 Western blot将1.2.9的各细胞总蛋白转置PVDF膜上,分别置于含E2-2鼠单抗(1∶500)与PCNA兔单抗(1∶700)的封闭液中,4 ℃,24 h后同辣根过氧化物酶标记的相应二抗(1∶600)共同孵育(室温)1.5 h,并与化学发光底物结合5 min。β-actin作内参。

1.2.11 E2-2影响PCNA表达的定量分析 采用Image-Pro Plus图像分析软件(Media Cybernetics Inc,USA)对1.2.9的RT-PCR检测结果中的PCNA基因表达变化行灰度级(gray level,GL)定量分析,对1.2.10的Western blot检测结果中的PCNA蛋白表达情况行光密度值定量分析,以此量化E2-2对PCNA表达的影响。

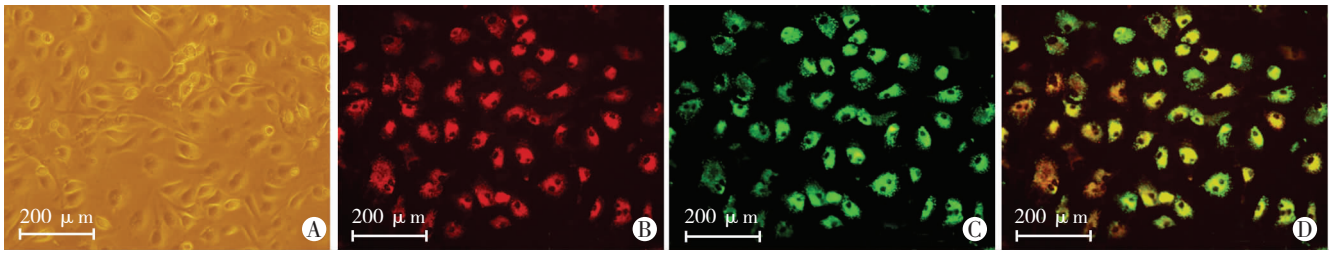
1.3 统计学分析

用SPSS 16.0统计软件对实验数据进行方差分析,结果以$\bar{x}\pm s$表示。

2 结果

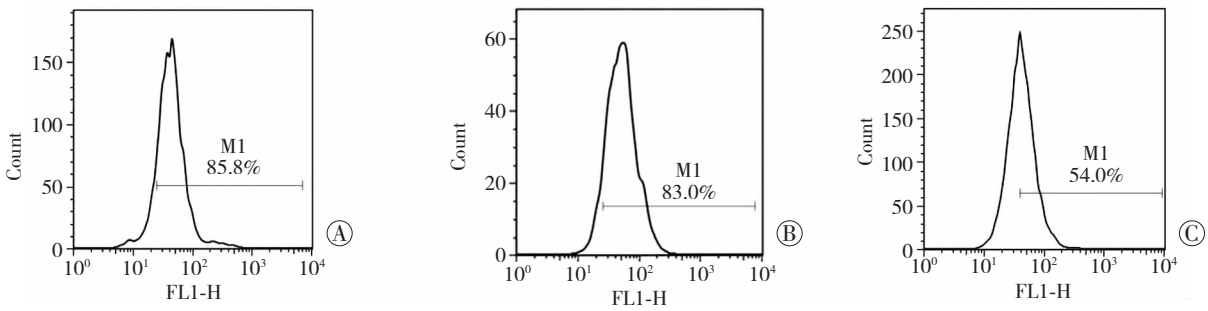
2.1 EPCs的分离、培养及鉴定

骨髓单个核细胞经EPCs分离液分离后,用EPCs培养基EGM-2培养4~6 d,细胞呈"克隆"样生长。原代培养7~12 d与第1代培养48~72 h的EPCs呈三角形、多边形、圆形、椭圆形、少部分呈梭形(图1A)。荧光倒置显微镜下,EPCs摄入DiI-Ac-LDL后,细胞质呈艳红色(图1B);摄入Lectin后,细胞质呈艳绿色(图1C);同时摄入二者时,细胞质呈橙绿色或橙黄色(图1D)。



A:EPCs;B:EPCs + Lectin;C:EPCs + DiI-Ac-LDL;D:MERGE

图 1　内皮前体细胞的 Lectin、DiI-Ac-LDL 荧光染料标记染色的倒置显微镜观察



A:CD34 阳性率;B:Sca-1 阳性率;C:FLK-1 阳性率

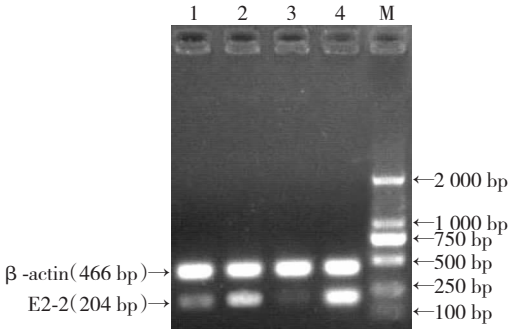
图 2　流式细胞仪检测内皮前体细胞的 CD34、Sca-1 及 FLK-1 的阳性率

2.2　EPCs 的表型流式细胞仪检测鉴定

流式细胞仪检测表明,EPCs 的 CD34、Sca-1 及 FLK-1 的阳性率分别为 85.8%、83.0%与 54.0%(图 2)。

2.3　E2-2 基因最佳干扰靶序的确定

采用 RT-PCR 法从 3 个 siRNA 中筛选出最佳 RNA 干扰靶序列为 CGTCAGCTAGTGTTTCTAA(靶点 3,图 3)。



1:靶点 1;2:靶点 2;3:靶点 3;4:对照;M:DNA 标准(DL 2000)

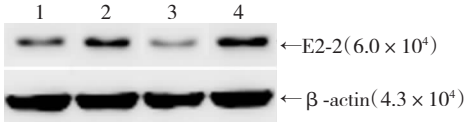
图 3　内皮前体细胞的 E2-2 基因 3 个 RNA 干扰靶点的 RT-PCR 检测分析

2.4　小干扰 RNA 对 E2-2 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示,与对照比较,3 个 siRNA 均可干扰 E2-2 蛋白的表达,其干扰程度依次为靶点 3 > 靶点 1 > 靶点 2(图 4)。

2.5　FT203-PLVX/E2-2shRNA 慢病毒载体的测序鉴定

FT203-PLVX/E2-2shRNA 重组慢病毒载体经测序证实(图 5),携带 E2-2shRNA 的 FT203-PLVX/E2-2shRNA 重组慢病毒载体被成功构建。



1:靶点 1;2:靶点 2;3:靶点 3;4:对照

图 4　内皮前体细胞 E2-2 的 RNA 干扰的 Western blot 检测分析

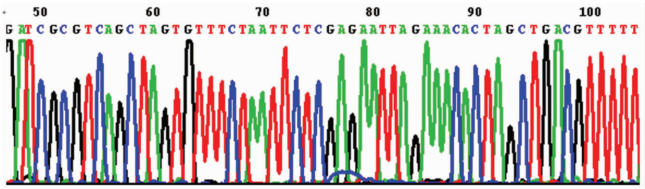


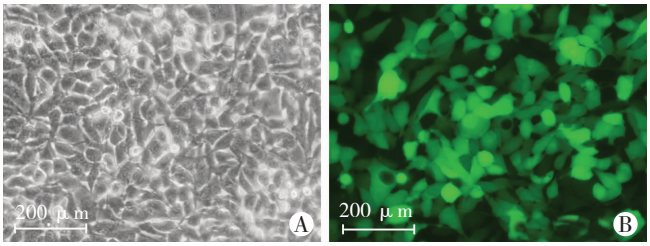
图 5　E2-2 基因重组慢病毒载体发夹结构的序列测定

2.6　慢病毒重组载体 FT203-PLVX/E2-2shRNA 的包装及其滴度测定

将测序正确的重组慢病毒 FT203-PLVX/E2-2shRNA 质粒 DNA 导入 293T 细胞(图 6A),常规培养 48 h 后,荧光倒置显微镜下可见亮绿色荧光蛋白(GFP)表达(图 6B)。倍比稀释法检测证实,其上清液的病毒滴度约为 1×10^8 TU/mL。

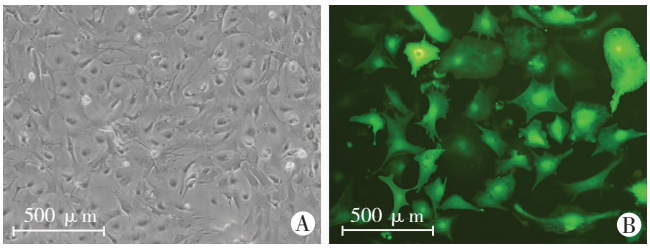
2.7　EPCs 的 FT203-PLVX/E2-2shRNA 慢病毒感染

未经感染的 EPCs 不表达 GFP(图 7A),经重组慢病毒 FT203-PLVX/E2-2shRNA 感染的 EPCs,荧光倒置显微镜下可见亮绿色 GFP 表达(图 7B)。



A:正常 293T 细胞;B:FT203-PLVX/E2-2 shRNA 重组慢病毒包装

图 6　经 E2-2 shRNA 重组慢病毒包装的 293T 细胞中 GFP 表达的荧光倒置显微镜观察

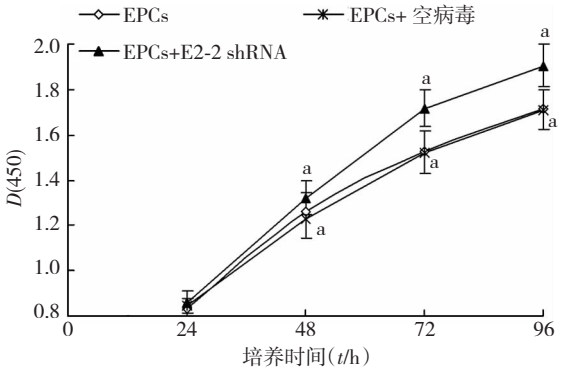


A:未感染组;B:E2-2 shRNA 慢病毒感染组

图 7　经 E2-2 shRNA 重组慢病毒的 EPCs 中 GFP 表达的荧光倒置显微镜观察

2.8　沉默 E2-2 对 EPCs 增殖的影响

CCK-8 法检测表明,经 FT203-PLVX/E2-2shRNA 慢病毒感染的 EPCs 的增殖快于未经感染或经空病毒感染的 EPCs,48 h 开始显得更为明显($P<0.01$,图 8)。

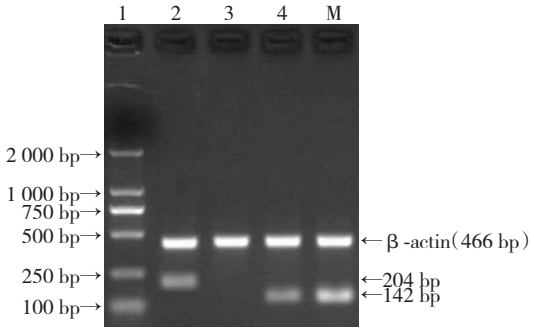


a:$P<0.01$,与 EPCs + E2-2 shRNA 比较

图 8　E2-2 shRNA 重组慢病毒沉默 EPCs 的 E2-2 基因对其增殖影响的 CCK-8 检测分析　($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

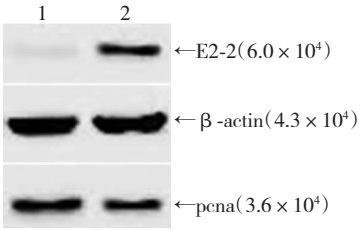
2.9　沉默 E2-2 对核抗原基因 PCNA 及其编码蛋白表达的影响与定量分析

RT-PCR 检测与定量分析结果显示,以经 FT203-PLVX/E2-2shRNA 病毒感染 48 h 的 EPCs 总 RNA 为模板,未观察到 E2-2 基因的表达,可观察到核抗原基因 PCNA 的较强表达,以空病毒感染 48 h 的 EPCs 总 RNA 为模板,均能检测到 E2-2 与 PCNA 基因的表达(图 9,表 1)。Western blot 检测及其定量分析结果表明,与空慢病毒感染的 EPCs 相比,FT203-PLVX/E2-2shRNA 病毒感染 48 h 的 EPCs,能检测到 E2-2 蛋白的微弱表达与 PCNA 蛋白的明显表达(图 10,表 1)。结果提示,FT203-PLVX/E2-2shRNA 病毒能有效沉默 EPCs 的 E2-2 基因并上调其 PCNA 基因的表达。



M:DNA 标准(DL 2000);1,3:空病毒感染的 EPCs;2,4:FT203-PLVX/E2-2shRNA 病毒感染的 EPCs

图 9　E2-2 shRNA 重组慢病毒沉默 EPCs 的 E2-2 基因对其 PCNA 基因表达的 RT-PCR 检测结果



1:FT203-PLVX/E2-2shRNA 病毒感染的 EPCs;2:空病毒感染的 EPCs

图 10　E2-2 shRNA 重组慢病毒沉默 EPCs 的 E2-2 基因对其 PCNA 蛋白表达的 Western blot 检测结果

表 1　E2-2 shRNA 病毒感染的 EPCs 中 PCNA 及 β-actin 表达的 Image-Pro Plus 软件定量分析　($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

被检基因	GL(mRNA 水平)	光密度值(蛋白水平)
空病毒感染 EPCs 的 PCNA	119.84±6.24	0.98±0.09
E2-2 shRNA 病毒感染 EPCs 的 PCNA	168.71±7.36[a]	1.39±0.13[a]
空病毒感染 EPCs 的 β-actin	212.48±8.69	1.70±0.26

a:$P<0.01$,与空病毒感染 EPCs 的 PCNA 比较

3　讨论

血管发生(vasculogenesis)与血管生成(angiogenesis)依赖于成熟 ECs 的增殖、迁移与重塑,是血管形成的两个重要过程。EPCs 是完全分化的血管 ECs 的前体细胞(包括从成血管母细胞到完全分化的 ECs 之间的各阶段细胞),其增殖、分化能力旺盛,可趋化到血管新生部位并分化为成熟 ECs[6]。EPCs 与血管形成

关系密切,在临床的血管损伤、动脉粥样硬化及各种血管性缺血性疾病中有着广泛的应用前景。多种组织,包括骨髓、脐血、外周血与胚胎均蕴含 EPCs。其中骨髓 EPCs 的含量最高。尽管 EPCs 来源广泛,但其增殖能力有限,其体外大量扩增比较困难,严重制约了其临床的广泛应用。

我们采用 EPCs 专用分离试剂,从小鼠骨髓成功分离获得 EPCs。经 EGM-2 培养基(特制培养基)培养 4~7 d,大多 EPCs 呈"克隆"性生长。原代培养 7~12 d 及第 1 代培养 24~72 h 的 EPCs 呈三角形、多边形、圆形、椭圆形、少部分呈梭形。用荧光吞噬染料鉴定证实,EPCs 摄入 DiI-Ac-LDL 后,细胞质呈亮红色,摄入 Lectin 后,细胞质呈亮绿色,两者共同摄入的 EPCs,其细胞质呈橙绿色或橙黄色。EPCs 既表达干细胞标志,如 CD34、Sca-1,又表达内皮细胞标志,如 FLK-1[7]。本实验分离培养的 EPCs,经流式细胞仪检测表明,其 CD34、Sca-1 及 FLK-1 的阳性率分别为 85.8%、83.0% 与 54.0%。

E2-2 属 HLH 转录因子家族一成员,又名 TCF4,在大鼠、小鼠及人均有表达[8]。已有研究显示,E2-2 是促进干细胞分化的关键转录调控因子,在神经系统、淋巴细胞发育等过程中均具重要调控作用[9-10]。E2-2 能使成熟 ECs 的增殖、迁移与管样形成受抑,进而阻碍 ECs 介导的血管生成[11-12]。VEGF 是调控 EPCs 增殖以及 ECs 多种生物学功能的关键生长刺激因子,其受体 FLK-1 是 EPCs 的特异性标记分子,E2-2 与 FLK-1 启动子特异性结合能下调成熟 ECs 中 FLK-1 的表达,但沉默 E2-2 后,EPCs 的将有何变化尚不清楚。

本研究首先分离、培养 EPCs,并对其进行荧光染料标记与表面标志的流式检测鉴定,随后采用慢病毒介导 shRNA 沉默其 E2-2 基因。shRNA 病毒对靶基因的沉默效率通常不会是 100%,本研究中 E2-2 靶基因的表达均会残留一定水平,但图 9 未能观察到靶基因的表达,其原因可能是电泳时间过长消耗掉了本来表达比较弱的 E2-2 基因 DNA 所致。本研究 CCK-8 法检测表明,与对照比较,沉默 E2-2 基因后,EPCs 的增殖明显增强。RT-PCR、Western blot 及定量结果显示,沉默 E2-2 基因后,EPCs 核抗原基因 PCNA 及其编码蛋白表达明显上调。这些结果提示,E2-2 蛋白是阻止 EPCs 增殖的关键因子之一,沉默相关因子基因可能是提升 EPCs 的增殖能力进而实现 EPCs 体外大量扩增的有效途径。

参考文献:

[1] Wassmann S, Werner N, Czech T, *et al*. Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells[J]. Circ Res, 2006, 99(8): e74-e83.

[2] Wohrle J, Birkemeyer R, Markovic S, *et al*. Prospective randomised trial evaluating a paclitaxel-coated balloon in patients treated with endothelial progenitor cell capturing stents for de novo coronary artery disease[J]. Heart, 2011, 97(16): 1338-1342.

[3] Sekiguchi H, Ii M, Jujo K, *et al*. Improved culture-based isolation of differentiating endothelial progenitor cells from mouse bone marrow mononuclear cells[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28639.

[4] Ii M, Nishimura H, Iwakura A, *et al*. Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning *via* "imported" nitric oxide synthase activity [J]. Circulation, 2005, 111(9): 1114-1120.

[5] 刘晓丽, 杨海捷, 苏勇, 等. E2-2 基因腺病毒载体的构建及其对 EPCs 生长、增殖及 ID1 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(16): 1664-1669.

[6] Morris L M, Klanke C A, Lang S A, *et al*. Characterization of endothelial progenitor cells mobilization following cutaneous wounding [J]. Wound Repair Regen, 2010, 18(4): 383-390.

[7] Wang H, Yu Y, Guo R W, *et al*. Inhibitor of DNA binding-1 promotes the migration and proliferation of endothelial progenitor cells *in vitro*[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 335(1/2): 19-27.

[8] Navarrete K, Pedroso I, De-Jong S, *et al*. TCF4 (e2-2; ITF2): a schizophrenia-associated gene with pleiotropic effects on human disease[J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2013, 162B(1): 1-16.

[9] Lazorchak A, Jones M E, Zhuang Y. New insights into E-protein function in lymphocyte development[J]. Trends Immunol, 2005, 26(6): 334-338.

[10] de-Pooter R F, Kee B L. E proteins and the regulation of early lymphocyte development[J]. Immunol Rev, 2010, 238(1): 93-109.

[11] Tanaka A, Itoh F, Nishiyama K, *et al*. Inhibition of endothelial cell activation by bHLH protein E2-2 and its impairment of angiogenesis [J]. Blood, 2010, 115(20): 4138-4147.

[12] Yang W, Itoh F, Ohya H, *et al*. Interference of E2-2-mediated effect in endothelial cells by FAM96B through its limited expression of E2-2[J]. Cancer Sci, 2011, 102(10): 1808-1814.

(**收稿**:2015-03-27;**修回**:2015-05-18)

(编辑 张 维)