Glil 基因对人牙周膜干细胞增殖及成骨分化调控机制的研究

罗金英[1,2],钟建鑫[1],舒绍兵[1,3],张 洁[1],朱 璨[1],张 倩[1],汤 玲[4],周继祥[1] (1. 第三军医大学西南医院口腔科,重庆 400038;2. 重庆市南川区人民医院口腔科,重庆 408415;3. 武警重庆总队机关门诊部口腔科,重庆 401147;4. 重庆大学生物医学工程学院,重庆 400044)

[摘 要] **目的** 通过构建 Glil 基因腺病毒载体,以此上调人牙周膜干细胞(PDLSCs)中 Glil 基因的表达,从而探讨其对人 PDLSCs 增殖及成骨分化的影响。**方法** 将 Glil 目的基因亚克隆至腺病毒载体,并将含目的基因的病毒转染 PDLSCs 细胞。CCK-8 法检测过表达 Glil 对 PDLSCs 增殖的影响,利用 Western blot 检测 PDLSCs 中 Glil 的表达水平及其成骨相关标志物 ALP、Runx2 的表达。**结果** 成功构建了过表达 Glil 目的基因的腺病毒载体并转染 PDLSCs,过表达 Glil 的 PDLSCs 与空载体组比较,增殖速率减慢($P=0.003$),Western blot 检测结果显示 PDLSCs 过表达 Glil 目的基因后可以高表达成骨分化标记蛋白 ALP、Runx2,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 过表达 Glil 基因会导致 PDLSCs 的增殖减慢,成骨相关标志物增加,说明 Glil 基因能使 PDLSCs 成骨分化能力增强。

[关键词] 人牙周膜干细胞;Glil;增殖;成骨分化

[中图分类号] R322.41 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)03-0245-04

Regulatory mechanism of Glil gene on human periodontal ligament stem cells on proliferation and osteogenic differentiation

LUO Jin-ying[1,2], ZHONG Jian-xin[1], SHU Shao-bing[1,3], ZHANG Jie[1], ZHU Can[1], ZHANG qian[1], TANG Ling[4], ZHOU Ji-xiang[1] (1. Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Department of Stomatology, Nanchuan People's Hospital, Chongqing 408415, China; 3. Department of Stomatology, Authority Clinic of Chongqing Armed Police Force, Chongqing 401147, China; 4. College of Biomedical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: Objective To up-regulate the expression of Glil gene in periodontal ligament stem cells (PDLSCs) and to explore the effect of Glil gene on PDLSCs proliferation and osteogenesis differentiation by establishing Glil gene adenovirus vectors. **Methods** Subcloned Glil to viral backbone vector Adtrack-CMV and transfered the established vector to 293T cells, which was to acquire the virus particles. Transfected aim cells, namely PDLSCs, with these virus. Detected its effect on PDLSCs proliferation with CCK-8 assay, and detected the expression of Glil and the bone-related markers ALP and Runx2 through Western blot. **Results** An adenovirus vector, which were over expressed Glil gene, was successfully constructed and transfected to PDLSCs. Compared with the empty vector group and normal group, the over expressed one had a much slower proliferation rate in CCK-8 assay ($P=0.003$). Western blot showed that ALP and Runx2 can be overexpressing osteogenic differentiated after PDLSCs successfully transfected with the Glil gene. **Conclusion** Over expressing Glil gene would lead to a much slower proliferation rate in the PDLSCs and an increase of the bone-related markers. It is concluded that Glil can enhance the osteogenic differentiation capacity in PDLSCs.

Keywords: human periodontal ligament stem cells; Glil; proliferation; osteogenic differentiation

人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells,PDLSCs)是一种间充质干细胞,具有高度增殖、自我更新、多向分化的潜能,是牙齿移动过程中的关键细胞,在矫治力作用下可分化为成骨细胞[1],是矫治性牙槽骨应力改建中成骨细胞的来源之一[2]。Hedgehog(Hh)信号通路对骨髓干细胞应力成骨的调控具有重要作用,多种因素可直接或间接通过调控Hh信号通路从而使间充质干细胞向成骨细胞分化[3]。本课题组前期证实了周期性张应力可促进 PDLSCs 向成骨细胞分化,并通过体外细胞应力实验证实了 Hh 信号通路对 PDLSCs 应力成骨具有直接的调控作用[4-5]。Glil(Gliloma-associated oncogene homoglog)是 Hh 信号通路中重要的转录因子,是该通路激活的最重要标志[6-7],其如何通过调控 Hh 信号通路来影响 PDLSCs 成骨的分子机制还少有研究。本实验拟构建过表达 Glil 基因腺病毒载体,并转染 PDLSCs 细胞,检测其成骨标志物的表达,探讨上调 Glil 基因对 PDLSCs 增殖及成骨分化的影响,为进一步研究 Glil 基因在 Hh 信号通路对人牙

doi:10.11659/jjssx.03E015025

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30870599)

[通讯作者] 周继祥,E-mail:Zhoujx6518@sina.com

[收稿日期] 2015-03-09 [修回日期] 2015-03-25

周膜干细胞应力成骨过程中的作用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Ⅰ型胶原酶购于 Sigma 公司,胎牛血清购于 Gibco 公司,α-MEM培养基、胰蛋白酶均购于 HyClone 公司。KOD-plus 高保真酶,限制性内切酶 EcoRv、Xba Ⅰ、Pme Ⅰ、Pac Ⅰ、连接酶 T4Lignase 均购自 TOYOBO 公司。Marker-DL15000、pAdTrack 腺病毒载体、293T 细胞均购自 invitrogen 公司。Glil、Runx2 和 ALP 抗体购于 Santa Cruz 公司。质粒提取试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购于北京天根生物公司,LipofectaminTM2000 转染试剂盒购于 Invitrogen 公司,CD146 单克隆抗体购于 Biolegend 公司,成骨、成脂诱导液购于赛业生物技术有限公司。

1.2 人牙周膜干细胞分离、培养及鉴定

本实验使用的标本均来自于本科室 12 ~ 24 岁因矫正需要拔除的健康牙。牙齿拔除前,行口腔洁治及常规消毒,用含 1% 青霉素-链霉素的 PBS 冲洗 3 ~ 5 遍,直到冲洗液不再浑浊。手术刀片轻轻单向刮取牙根中 1/3 的牙周膜组织,眼科剪将组织块剪至 1 mm^2 大小,加入Ⅰ型胶原酶消化 45 min,将组织混悬液接种于 6 孔板。37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。48 h 第 1 次换液,待细胞密度达 70% ~ 80% 时传代,传至第 3 代,通过流式分选技术获得牙周膜干细胞。取第 4 代 PDLSCs 用胰蛋白酶消化,重悬,加入 10 μl PBS 制成悬液,加入 EP 管中,EP 管中加入 CD146 抗体,上流式细胞仪进行表型分析。将 4 ~ 6 代细胞以 5×10^4 的密度接种于内置无菌玻片的 24 孔板,制作细胞爬片,用免疫组化 Envisionf 法对其波形蛋白及角蛋白进行检测。成骨诱导:取第 4 ~ 6 代 PDLSCs 以 2.5×10^4 的密度接种于 24 孔板中,培养 4 d 后换液,加入成骨诱导液,诱导 7 d 后,茜素红染色,倒置显微镜下观察是否有矿化结节形成。成脂诱导:PDLSCs 在成脂诱导液下培养 3 周,油红染色后,倒置显微镜下观察是否有脂滴的形成。

1.3 Glil 腺病毒载体的构建及转染牙周膜干细胞

1.3.1 重组质粒 PTA2 /Glil 的构建 采用 Gene Tool 软件设计克隆 Glil 基因引物序列为:上游:5'-GAAGATCTCGACTAC-CGCATCATCACAGC-3',下游:5'-GCTCTAGAATAGGGTTTC-CAATGCTTCACTG-3',RT-PCR 法,以人牙周膜细胞提取 RNA 逆转录成 cDNA 为模板,扩增 Glil 基因的 ORF 序列,克隆至载体 PTA2,采用限制性内切酶(EcoRv、Xba Ⅰ)和菌落 PCR 法对重组子进行初步鉴定,将阳性重组子的质粒行测序鉴定,测序正确者命名为 PTA2/Glil。

1.3.2 pAdTrack-CMV-Glil 重组质粒构建与鉴定 以 PTA2/Glil 为模板,引用 T 载体酶切位点(EcoRv、Xba Ⅰ),双酶切 PTA2/Glil、pAdTrack-CMV,胶回收 Glil 目的基因及 pAdTrack-CMV 线性化条带,纯化后连接,菌液 PCR 和限制性内切酶对重组子行初步鉴定,可疑阳性重组子送予测序,测序正确者被命名为 pAdTrack-CMV-Glil。

1.3.3 腺病毒同源重组穿梭质粒 用 Pme Ⅰ线性化重组 pAdTrack 穿梭质粒并转入 BJ5183 感受态细菌,与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 同源重组,用卡那霉素筛选出单克隆。挑取单克隆菌落并抽提质粒,重组质粒用 Pac Ⅰ酶切鉴定。

1.3.4 腺病毒的包装和扩增 取含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖完全培养液培养 293 T 细胞,将处于对数生长期的细胞用 0.25% 胰酶消化,计数后并将细胞以每孔 1×10^5 细胞接种至 6 孔板,待其达到 60% ~ 70% 融合度,使用脂质体转染方法将 Pac Ⅰ线性化的重组质粒转染 293T 细胞,转染 24 h 后便可观察到绿色荧光。当 293 T 细胞出现明显的细胞病变和 CPE,则收取细胞和上清,在 -80 ℃至室温条件下反复冻融 3 次,使细胞破裂后释放出腺病毒,经 0.45 μm 过滤掉细胞碎片后得到第 1 代腺病毒。用第 1 代腺病毒感染 293T 细胞可得到第 2 代腺病毒。重复 5 次后可得到纯的重组腺病毒。

1.3.5 Glil 腺病毒载体转染牙周膜细胞 将 4 ~ 6 代牙周膜细胞接种至 6 孔板,待细胞长至 70% ~ 80% 时,更换无抗生素无血清培养基,加入 15 μl 左右的病毒液,2 h 后培养基更换含 10% FBS 的 α-MEM 培养基中,转染后培养 48 h 于倒置荧光显微镜下观察,带绿色荧光的细胞为阳性,观察荧光及细胞病变(CPE)以判断转染效率。

1.4 Glil 在感染病毒后的 PDLSCs 中的表达

腺病毒转染 PDLSCs 后 24 h 和 48 h,分别收集 2 瓶密度为 1×10^6 的细胞,加入蛋白裂解液,电泳、转膜后,加入一抗过夜,孵二抗,Western blot 检测 Glil 蛋白在 PDLSCs 中的表达。

1.5 CCK-8 检测腺病毒转染后的 PDLSCs 增殖能力

牙周膜干细胞以 1×10^4 的密度接种于 96 孔板中,分别为 Glil 基因腺病毒载体组、空载体组、对照组(未加病毒),每组 5 个副孔,检测前加入含 10 μl CCK-8 液的培养基共 100 μl,37 ℃、5% CO_2 培养箱孵育 2 h,测定 450 nm 处光密度值 D(450),连续检测 6 d。

1.6 细胞分化能力检测

腺病毒转染 PDLSCs 后,分别培养 24 h、48 h 后提取蛋白,Western blot 检测其中 Glil、ALP 以及 Runx2 的表达。

1.7 统计学分析

数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 软件对数据进行独立样本 t 检验,$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 人牙周膜干细胞鉴定

流式细胞仪表型分析 CD146 阳性率为 94.8%。免疫组化染色角蛋白阴性,波形蛋白阳性(图 1a、图 1b),说明所得细胞为间充质来源。成骨诱导牙周膜干细胞培养 3 周后,镜下观有散在的矿化结节,茜素红染色阳性(图 1c)。成脂诱导实验:成脂诱导牙周膜干细胞 3 周后,胞浆内可见脂滴出现,对其进行油红 O 染色,可见细胞内有大小不一的红色脂滴(图 1d)。

2.2 Glil 病毒载体的构建及鉴定

将目的基因 Glil 亚克隆至 pAdtrack-CMV 载体后,选用 EcoRv + Xba Ⅰ酶切鉴定,电泳显示约 3 300 bp 的目的片段与约 9 200 bp 的 pAdtrack-CMV 骨架片段见图 2,经测序证实,带有

Glil 基因的 pAdtrack-CMV-Glil 载体构建成功。利用脂质法包装 pAdtrack-CMV-Glil 病毒载体,将其感染 293T 细胞 2 d 后,荧光显微镜下观察 90% 以上细胞有荧光,光镜下观察有空斑形成,见图 3。

2.3 腺病毒转染 PDLSCs 及过表达 Glil

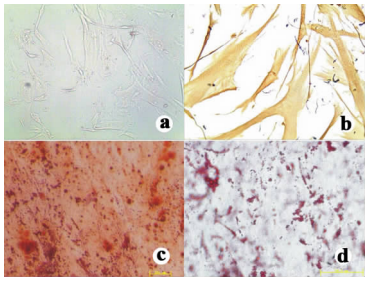
过表达 Glil 腺病毒转染 PDLSCs,培养 48 h 后,显微镜下观察带绿色荧光细胞达 90% 以上。分别在腺病毒转染后的24 h、48 h 收集细胞进行 Western blot 检测,发现转染 24 h 后 Glil 蛋白表达较对照组未增加[灰度值(0.041 ± 0.024)和(0.036 ± 0.017),$P>0.05$],差异无统计学意义;48 h 后 Glil 蛋白表达较对照组增加[灰度值(0.041 ± 0.024)和(0.148 ± 0.017),$P<0.05$],差异有统计学意义,证明该时间点的 PDLSCs 细胞成功过表达 Glil 基因,见图 4。

2.4 上调 Glil 可使 PDLSCs 的增殖能力减弱

腺病毒转染人牙周膜干细胞后,检测 1 ~6 d 人牙周膜干细胞的增殖情况,6 d 后比较空载体组和过表达组的增殖情况,发现过表达组增殖速率明显减慢($P=0.003$),具有统计学差异(图 5),说明上调 Glil 基因可使 PDLSCs 增殖速率减慢。

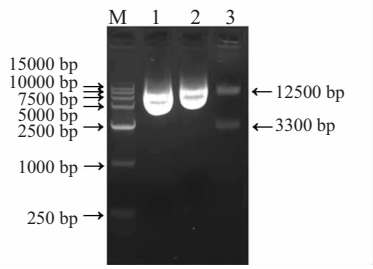
2.5 上调 Glil 基因增强 PDLSCs 成骨分化能力

过表达 Glil 的腺病毒转染 PDLSCs 48 h 后,Western blot 检测成骨标志物 ALP 表达显著升高。空白对照组与 48 h 过表达组[(0.154 ±0.213)和(0.237 ±0.256),$P<0.05$]差异有统计学意义(图 6)。Western blot 检测成骨标志物 Runx2 表达也显著升高。空白对照组与 48 h 过表达组[(0.167 ± 0.008)和(0.223 ±0.090),$P<0.05$]差异有统计学意义(图 6)。说明过表达 Glil 基因可以促进 PDLSCs 向成骨细胞转化。



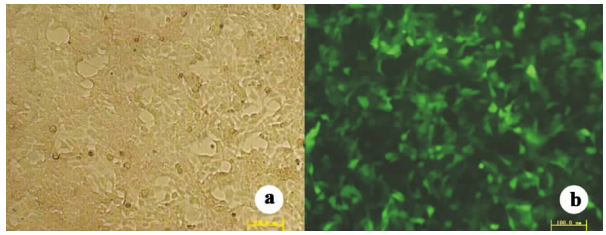
a:角蛋白阴性(×200);b:波形蛋白阳性(×200);c:茜素红染色(×100);d:油红 O 染色(×100)

图 1 人牙周膜干细胞鉴定(倒置显微镜)



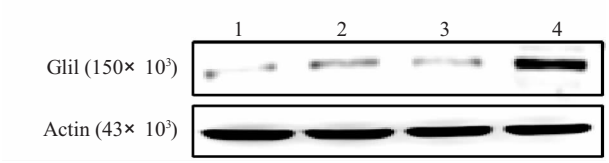
M:标准;1:Adtrack 空载;2:Adtrack-Glil 载体;3:EcoRv + Xba Ⅰ酶切后结果

图 2 腺病毒载体鉴定



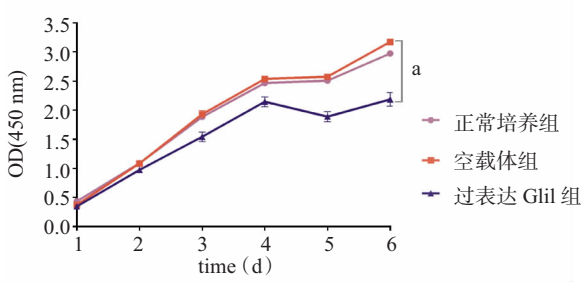
a:Glil 腺病毒感染 293T 细胞(倒置显微镜 ×100);b:Glil 腺病毒感染 293T 细胞(荧光显微镜 ×100)

图 3 Glil 病毒载体的构建



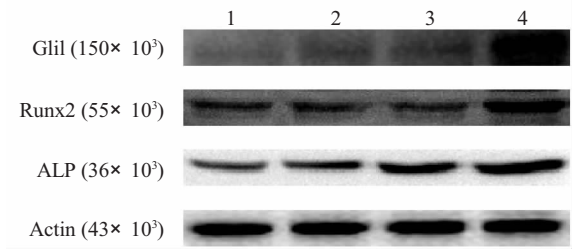
1:对照组;2:空载体组;3:Glil 过表达 24 h;4:Glil 过表达 48 h

图 4 过表达 Glil 腺病毒转染 PDLSCs 后 Glil 蛋白表达增加



a:空载组与过表达 Glil 组比较,$P=0.003$

图 5 上调 Glil 后 PDLSCs 的增殖能力检测结果



1:对照组;2:空载体组;3:Glil 过表达 24 h;4:Glil 过表达 48 h

图 6 上调 Glil 基因 PDLSCs 成骨分化能力检测结果

3 讨论

对于 Hedgehog(Hh)信号通路的早期研究是其在哺乳动物胚胎发育阶段的作用和它的过度激活与众多肿瘤的发生有关,近年来,Hh 信号通路在骨的形成发育中的作用越来越受到学术界重视。激活的 Hh 信号通路主要通过影响干细胞的增殖及分化而实现对成体组织功能稳定的调节[8]。若在胚胎发育过程中缺失 Hh 基因,将会导致严重的骨骼发育畸形[9],Hh 蛋白可以通过促进间充质干细胞增殖分化或直接作用于成骨

细胞而实现成骨细胞分化并参与骨形成[10-11]。ALP 作为成骨细胞分泌的一种糖蛋白,它可破坏钙通道抑制剂,从而启动钙化过程,是成骨分化的开始,是成骨细胞早期分化的重要酶[12-13]。Runx2 在骨形成过程及成骨细胞分化中起着控制作用,尤其是对间充质干细胞骨向分化的调节具有重要作用,是骨形成的关键基因,也是成骨细胞成熟的标志[14-15]。ALP、Runx2 是成骨过程中不同阶段的标志物,它们的表达水平反映了 PDLSCs 向成骨细胞转化的过程。本研究发现,正常组、空载组细胞及含目的基因病毒感染的 PDLSCs 24 h 时均能表达 ALP 及 Runx2,但 Glil 的表达没有明显差异,说明 PDLSCs 本身具有向成骨细胞分化的能力。当 Glil 目的基因病毒感染 PDLSCs 48 h 后,Glil 的表达水平升高,ALP、Runx2 的表达也明显增加,这表明上调 Glil 能促进 PDLSCs 向成骨细胞的转化。

Hh 信号通路主要由 Hh 配体、Smo(Smoothened)跨膜蛋白、Ptch(Patched)受体、Hip、核转录因子 Glil 组成。在没有 Hh 蛋白时,PTCH 与 SMO 结合,抑制了 SMO 的活性,当 Hh 蛋白从分泌细胞分离并转运至效应细胞后,Hh 蛋白与效应细胞膜上的 PTCH 受体结合,将 SMO 释放,从而把 Hh 信号传至效应细胞内,激活胞核内的转录因子 Gli 蛋白,促使目标基因得以表达[16-17]。Glil 是一种锌指蛋白,在哺乳动物中有 3 种 Glil 基因,其中 Glil 不仅与效应细胞的成骨作用相关,而且通过 Hh 蛋白激活表达,对 Hh 起正反馈调节作用。Glil 激活 Hh 信号,进而激活 Hh 信号通路,诱导一系列下游信号分子的释放,从而发挥其调控作用。由此可见 Glil 是 Hh 信号通路最重要的下游转录因子,也是 Hh 信号通路的靶基因,是公认的 Hh 信号通路被激活的重要标志物,在此通路中起着至关重要的承上启下的作用。

本实验构建了过表达 Glil 目的基因的腺病毒载体并转染 PDLSCs,转染效率较高,转染 48 h 后,Western blot 检测 Glil 表达增加,说明成功上调了 Glil 基因在 PDLSCs 中的表达。含目的基因的腺病毒感染 PDLSCs 后,检测其增殖能力有所下降,其成骨相关指标 ALP、Runx2 表达有所增加,说明 PDLSCs 的成骨分化能力增强。

综上所述,本研究通过基因重组技术研究了 Glil 对牙周膜干细胞成骨分化的影响,进一步证实了 Hh 通路对牙周膜干细胞向成骨细胞转化的调控作用,为进一步研究 Hh 信号通路对 PDLSCs 应力成骨调控机制打下基础,也为临床矫治过程中牙的移动及牙周病治疗中骨的再生提供了一定的理论依据。

[参考文献]

[1] Choi JK, Hwang HI, Jang YJ. The efficiency of the in vitro osteo/dentinogenic differentiation of human dental pulp cells, periodontal ligament cells and gingival fibroblasts[J]. Int J Mol Med, 2015, 35(1): 161 – 168.

[2] Zhang C, Li J, Zhang L, et al. Effects of mechanical vibration on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells[J]. Arch Oral Biol, 2012, 57(10): 1395 – 1407.

[3] Kim SY, Yoo JY, Ohe JY, et al. Differential expression of osteo-modulatory molecules in periodontal ligament stem cells in response to modified titanium surfaces[J]. Biomed Res Int, 2014, (2014): 452175. doi: 10.1155/2014/452175.

[4] 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.

[5] 张 洁,常慧君,李雨轩,等. Smoothened 慢病毒干扰载体的构建及其对人牙周膜干细胞的增殖与分化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(11): 1133 – 1136.

[6] Liu Y, Wang H, Cheng G, et al. Experssion analysis of Gli1 and Gli2 in different tissues and muscle-derived cells of Qinchuan cattle[J]. Genet Mol Res, 2014, 13(4): 8767 – 8775.

[7] Kitaura Y, Hojo H, Komiyama Y, et al. Glil haploinsufficency leads to dereased bone mass with an uncoupling of bone metabolism in adult mice[J]. PloS One, 2014, 9(10): e109597.

[8] Deng C, Yu Y. Roles of Hh signaling pathway on injury of bone with fluorosis[J]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 2014, 43(1): 68 – 70.

[9] Choudhry Z, Rikani AA, Choudhry AM, et al. Soinc Hh signaling pathway: a complex network[J]. Ann Neurosci, 2014, 21(1): 28 – 31.

[10] Ohata Y, Ozono K. Bone and stem cells. The mechanism of osteogenic differentiation from mesenchymal stem cell[J]. Clin Calcium, 2014, 24(4): 501 – 508.

[11] 蔡加琴,邓 力. Hh 信号通路对 MSCs 的调控[J]. 中国修复重建外科杂志, 2010, 24(8): 993 – 996.

[12] Yuan SH, Gao CB, Yin CU, et al. Recombinant adeno-associated virus BMP-4/7 fusion gene confers ossification activity in rabbit bone marrow stromal cells[J]. Genet Mol Res, 2012, 11(3): 3105 – 3114.

[13] Sardiwal S, Gardham C, Coleman AE, et al. Bone-specific alkaline phosphatase concentrations are less variable than those of parathyroid hormone in stable hemodialysis patients[J]. Kidney Int, 2012, 82(1): 100 – 105.

[14] Luca Dalle Carbonare L, Innamorati G, Valenti MT. Transcription factor Runx2 and its application to hone tissue engineering[J]. Stem Cell Rev, 2012, 8(3): 891 – 897.

[15] Liu DD, Zhang JC, Zhang Q, et al. TGF-β/BMP signaling pathway is involved in cerium-Promoted osteogenec differentiation of mesenchymal stem cells[J]. J Cell Biochem, 2012, 114(5): 1105 – 1114.

[16] Yao S, Lum L, Beachy P. The ihog cell-surface proteins bind Hedgehog and mediate pathway activation[J]. Cell, 2006, 125(2): 343 – 357.

[17] Vered M, Peleg O, Taicher S, et al. The immunoprofile of odontogenic keratocyst (Keratocystic odontogenic tumor) that includes expression of PTCH, SMO, GLI-1 and bcl-2 is seminal to ameloblastoma but different from odontogenic cysts[J]. J Oral Pathol MED, 2009, 38(7): 597 – 604.

(编辑:周小林)