doi:10.11659/jjssx.10E023055

·基础研究·

BMP7过表达慢病毒载体构建及其对小鼠主动脉平滑肌细胞钙化的影响

付仕林,易雪娇,潘文旭,尹 纯,康华利,钱德慧 (陆军军医大学第二附属医院心血管内科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 构建骨形态发生蛋白7(BMP7)过表达慢病毒载体,分析BMP7过表达对小鼠主动脉内皮细胞Jagged1表达的影响及其对共培养血管平滑肌细胞(VSMCs)钙化的影响。**方法** 根据目的基因信息Mouse-BMP7(NM_007557.3)和质粒信息pLVX-zsGreen-C1进行基因序列合成,构建BMP7过表达慢病毒。qPCR检测BMP7过表达慢病毒感染效率;Western blot检测其感染的小鼠主动脉内皮细胞Jagged1蛋白表达。将过表达BMP7慢病毒感染的内皮细胞与VSMCs共培养,茜素红染色观察共培养后VSMCs钙化情况。**结果** 成功构建BMP7过表达慢病毒载体并转染至小鼠主动脉内皮细胞。qPCR检测结果提示,与正常对照组比较,BMP7过表达组的BMP7 mRNA相对表达量显著升高($P<0.01$),空载体对照组BMP7 mRNA无显著变化($P>0.05$)。Western blot结果显示,BMP7过表达组内皮细胞Jagged1蛋白表达水平较正常对照组显著降低($P<0.01$),而空载体对照组内皮细胞Jagged1蛋白水平较正常对照组无显著改变($P>0.05$)。茜素红染色结果提示,与感染过表达BMP7慢病毒的内皮细胞共培养后,VSMCs的钙化程度明显增加。**结论** 成功构建小鼠BMP7过表达慢病毒载体,并发现过表达BMP7可以降低小鼠主动脉内皮细胞Jagged1表达,并促进共培养的VSMCs钙化。

[关键词] 骨形态发生蛋白7;慢病毒载体构建;Jagged1;血管钙化
[中图分类号] R34;R329.2 [文献标志码] A [收稿日期] 2023-10-13

BMP7 overexpression lentiviral vector construction and its effect on calcification of mouse aortic smooth muscle cells

FU Shi-lin, YI Xue-jiao, PAN Wen-xu, YIN Chun, KANG Hua-li, QIAN De-hui (Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To construct a lentiviral vector for overexpression of bone morphogenetic protein 7 (BMP7) in mice, and the effect of BMP7 overexpression on the expression of Jagged1 in mouse aortic endothelial cells and the calcification of the co-cultured vascular smooth muscle cells (VSMCs) were analyzed. **Methods** According to the target gene information Mouse-BMP7 (NM_007557.3) and plasmid information pLVX-zsGreen-C1, gene sequence synthesis was carried out to construct BMP7 overexpression lentivirus. The efficiency of BMP7 overexpression lentivirus infection was detected by qPCR; the expression of Jagged1 protein in aortic endothelial cells from infected mice was detected by Western blot. The endothelial cells with lentivirus overexpressing BMP7 were co-cultured with VSMCs, and the calcification of VSMCs was observed by alizarin red staining. **Results** BMP7 overexpression lentiviral vector was successfully constructed and transfected into aortic endothelial cells. qPCR test results showed that the expression level of BMP7 mRNA was significantly increased in the BMP7 overexpression group than that in the normal control group ($P<0.01$), while there was no significant difference in the expression of BMP7 mRNA between the empty vector control group and the normal control group ($P>0.05$). Western blot results showed that the expression level of Jagged1 protein in endothelial cells of mouse in the BMP7 overexpression group was significantly lower than that in the normal control group ($P<0.01$), while there was no significant difference in the expression level of Jagged1 protein in endothelial cells between the empty vector control group and the normal control group ($P>0.05$). The results of alizarin red staining showed that the calcification of VSMCs was significantly increased after co-cultured with endothelial cells infected with BMP7 lentivirus. **Conclusion** Mouse BMP7 overexpression lentiviral vector was successfully constructed, and overexpression of BMP7 can reduce the expression of Jagged1 in mouse aortic endothelial cells and promote the calcification of co-cultured VSMCs.

Keywords: bone morphological protein 7; lentiviral vector construction; Jagged1; vascular calcification

近年来,血管外科和介入手术飞速发展,大大优化了狭窄和闭塞性血管疾病的治疗。但合并血管钙化严重影响了上述治疗的效果,同时增加了术后血栓形成风险[1]。传统观念认为血管钙化是被动退化过程,近年来发现血管钙化与骨形成相似,是血管壁微环境内主动可调控的细胞介导过程。多种细胞如血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)、内皮细胞、巨噬细胞等参与了血管钙化的发生发展,也

[基金项目] 重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2023NSCQ-MSX0686);陆军军医大学医院青年博士人才孵化计划项目(2022YQB029)

[通信作者] 钱德慧,E-mail:qiandehui@163.com

包括细胞间对话调节[2],其中VSMCs向成骨细胞样表型转化是这一过程的核心环节[3]。有研究发现,内皮细胞Jagged1在抑制VSMCs向其他表型转化方面具有重要作用[4],而骨形态发生蛋白7(bone morphogenetic protein7,BMP7)是促进VSMCs向成骨表型转化的关键因子[5]。同时,在成骨细胞中BMP7可通过下游信号转导蛋白抑制Jagged1蛋白表达[6]。因此,我们推测内皮细胞Jagged1可能是BMP7调控VSMCs钙化的中间分子。本研究采用基因重组方法,构建BMP7过表达慢病毒载体,分析BMP7过表达对小鼠主动脉内皮细胞Jagged1表达的影响及其对共培养VSMCs钙化的影响,以期为血管钙化的机制研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

20只2~3周龄SPF级KM小鼠购自陆军军医大学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCK(渝)20170002。胎牛血清、DMEM培养基购自美国Gibco公司;RNAiso plus,DH5α感受态,核酸内切酶BamHⅠ、XholⅠ购自日本TaKaRa公司;质粒小量抽提试剂盒购自美国Omega公司;Hifair® Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (gDNA digester plus)、Hieff UNICON® Universal Blue QPCR SYBR Green Master Mix购自上海YEASEN公司。Jagged1抗体(兔来源)购自英国Abcam公司,HRP标记山羊抗兔IgG二抗购自上海碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠主动脉内皮细胞原代培养及鉴定 参考Kobayashi等[7]的方法并改良,将10只KM小鼠采用颈椎脱臼法快速处死后消毒,在无菌操作台上分离完整的主动脉,剥离主动脉血管周围的脂肪组织以及血管外膜,PBS反复冲洗后,将主动脉切成大小为1 mm×1 mm的组织块,并内膜朝下均匀种植在多聚赖氨酸包被后的6孔培养皿上;于37 ℃、5%CO_2细胞培养箱中静置培养3 d后换液;待组织块周围爬出的细胞达到培养皿底面积80%后,用0.25%的胰酶消化传代。通过检测CD31的方法,免疫组化染色后荧光显微镜下观察鉴定血管内皮细胞。本实验使用的是第3代细胞。

1.2.2 小鼠主动脉VSMCs原代培养及鉴定 参考郝思雨等[8]的方法进行VSMCs原代培养及鉴定。按1.2.1中的方法分离10只KM小鼠主动脉后,使用显微弹簧剪沿血管纵轴剪开主动脉,用显微镊子剔除血管外膜层,再翻转至内侧轻轻刮去血管内膜层。用PBS冲洗血管中膜层,眼科剪将组织剪至1 mm×1 mm×1 mm大小。用胶原蛋白酶Ⅰ消化30 min后,加入5 mL含10%胎牛血清的DMEM培养基吹散细胞,移入培养瓶,于37 ℃、5%CO_2细胞培养箱中静置培养3 d后换液。待组织块细胞长满培养皿底面积80%后,用0.25%的胰酶消化传代。通过检测α-SMA的方法,免疫组化染色后荧光显微镜下观察鉴定VSMCs。本实验使用的是传代至第3代的细胞。

1.2.3 BMP7过表达慢病毒载体构建 根据目的基因信息Mouse-BMP7(NM_007557.3)进行序列合成,5′端加上限制性核酸内切酶位点XholⅠ,3′端加上限制性核酸内切酶位点BamHⅠ,并将其连入载体pLVX-zsGreen-C1中(图1)。将合成质粒转化感受态细胞,从平板上挑取克隆菌落,小量抽提质粒并进行鉴定挑出阳性克隆。分别利用限制性核酸内切酶BamHⅠ、XholⅠ双酶切提取的质粒,将酶切产物进行1%琼脂糖电泳,切下片段与目的DNA大小一致的质粒载体,命名为Mouse-BMP7-pLVX-zsGreen-C1,送上海生工测序鉴定。

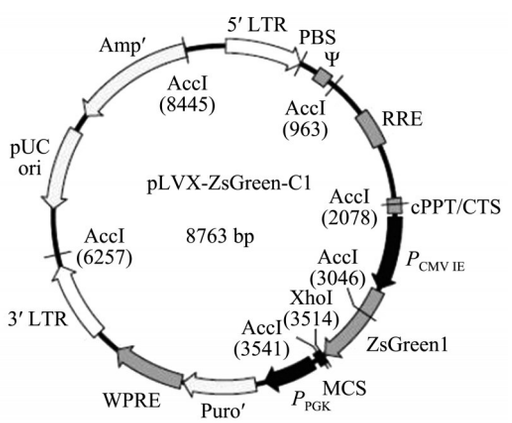


图1 质粒信息

1.2.4 慢病毒包装纯化和滴度测定 制备慢病毒穿梭质粒及其辅助包装原件载体质粒,组成为pLVX-IRES-ZsGreen1、psPAX2、pMD2.G。其中穿梭质粒pLVX-IRES-ZsGreen1上携带有CMV启动的目的基因,且能表达绿色荧光蛋白筛选标记基因;psPAX2、pMD2.G含有病毒包装所必须的元件。3种质粒载体分别进行高纯度无内毒素大量抽提,共转染人胚肾细胞293T细胞,转染后16~24 h更换为完全培养基,继续培养48 h后,多次收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液;最后,Amicon Ultra-15 100 kDa对上清液进行浓缩处理,得到高滴度的慢病毒浓缩液,于-80 ℃冰箱保存备用。通过荧光显微镜或FACS计数荧光细胞,结合稀释倍数计算病毒滴度。

1.2.5 BMP7过表达慢病毒感染 在原代培养的

第3代小鼠主动脉内皮细胞上应用制备完成的BMP7过表达慢病毒感染48~96 h后，通过荧光显微镜检查荧光蛋白表达的情况，以此估算慢病毒对目标细胞的感染效率。提取感染后细胞的RNA，先用随机引物将RNA反转录成cDNA，随后用qPCR法对BMP7过表达慢病毒的感染效率进行检测。内参和目的基因引物如下：GAPDH-F为GGCAAGTTCAACGGCACAG，GAPDH-R为CGCCAGTAGACTCCACGACAT；BMP7-F为CAGCCAGAATCGCTCCAAGA，BMP7-R为TGCAATGATCCAGTCCTGCC。

1.2.6 Western blot检测Jagged1蛋白 设置3组细胞实验：正常内皮细胞为正常对照组，内皮细胞+BMP7过表达慢病毒感染为BMP7过表达组，内皮细胞+慢病毒空载体为空载体对照组，每组重复3次。各组细胞裂解后，转移到1.5 mL离心管中剧烈振荡30 s后放入离心机，于4 ℃下以12 000 r/min离心15 min，吸取上清液用BCA法测定蛋白浓度，取等量预处理的蛋白样品上样进行SDS-PAGE电泳，恒流200 mA电转1 h至PVDF膜，5%脱脂奶粉-PBST室温封闭1 h后，加入Jagged1和内参GAPDH一抗，于4 ℃孵育过夜。用山羊抗兔IgG二抗37 ℃温育1 h。按照ECL发光试剂盒的说明进行操作，并使用凝胶成像装置进行曝光和拍照。

1.2.7 内皮细胞和VSMCs共培养体系建立与诱导钙化 参照Fillinger等[9]的方法建立间接共培养体系。将1.2.6中3组细胞分别接种于Transwell膜上，同时将VSMCs接种于6孔培养板的底部。加入钙化培养基（10 mmol/L β-磷酸甘油、1×10^{-7} mol/L胰岛素及50 μg/L维生素C）以诱导主动脉VSMCs钙化，继续培养14 d，每2~3 d更换培养液。最后用茜素红染色检测VSMCs的钙化情况。每组3枚盖玻片置入6孔培养板制备小鼠主动脉VSMCs爬片。4 ℃冲洗液洗涤细胞爬片2次，冰丙酮固定20~30 min后取出。每个VSMCs爬片加入10 g/L的茜素红S试剂（pH=6.3），室温下染色5~10 min，用蒸馏水冲洗1~2次后，显微镜下观察染色效果。用紫外可见分光光度计测定562 nm波长处的光密度（optical density，OD）值。

1.3 统计学分析

使用SPSS 26.0软件进行数据的统计学分析，呈正态分布且方差齐性的数据2组间比较采用t检验，否则采用校正t检验或秩和检验，多组间比较使用单因素方差分析。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

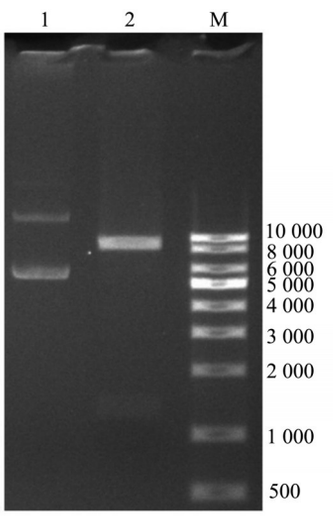
2 结果

2.1 小鼠主动脉内皮细胞及VSMCs培养及鉴定

将分离培养的第3代内皮细胞及VSMCs经免疫组化后在荧光显微镜下观察发现，分离的细胞为内皮细胞及VSMCs，且纯度均在95%以上。

2.2 BMP7过表达慢病毒载体酶切鉴定

分别利用限制性核酸内切酶BamH Ⅰ、Xhol Ⅰ酶切重组质粒，将酶切产物电泳，电泳结果见图2；基因测序证实酶切的重组质粒为实验所需的BMP7过表达慢病毒载体。

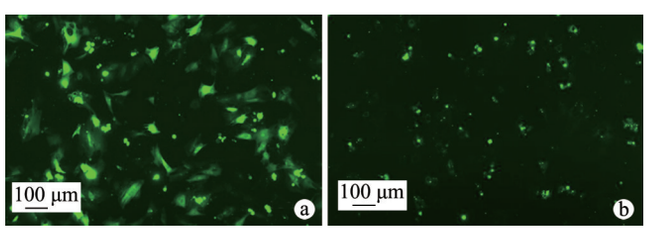


M: KB Ladder; 1: C1003HA040-2 plasmid; 2: C1003HA040-2 plasmid digested by Xhol Ⅰ and BamH Ⅰ

图2 BMP7过表达慢病毒载体酶切鉴定结果

2.3 BMP7过表达慢病毒感染细胞荧光鉴定

荧光显微镜观察结果显示，空载病毒与BMP7过表达慢病毒均成功转染至小鼠主动脉内皮细胞，其转染效率分别约为70%和30%（图3）。



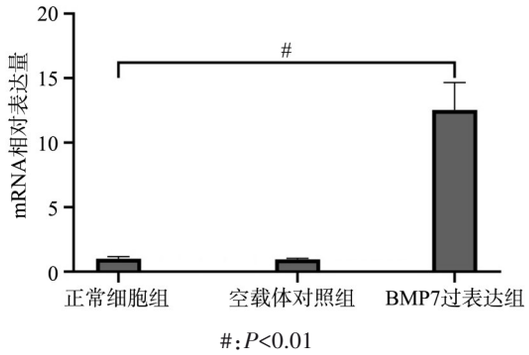
a：空载病毒感染内皮细胞；b：BMP7过表达慢病毒感染内皮细胞

图3 BMP7过表达慢病毒感染细胞与空载病毒感染细胞观察

2.4 BMP7过表达慢病毒感染主动脉内皮细胞后BMP7 mRNA变化

qPCR检测结果显示，与正常对照组比较，BMP7过表达组的BMP7 mRNA相对表达量显著升高

(P<0.01),空载体对照组 BMP7 mRNA 无显著变化(P>0.05),见图4。



#:P<0.01

图4 各组mRNA相对表达量

2.5 BMP7过表达慢病毒感染主动脉内皮细胞后Jagged1蛋白表达变化

Western blot检测结果显示,与正常对照组比较,BMP7过表达组的Jagged1蛋白表达水平明显降低(P<0.01),而空载体对照组的Jagged1蛋白表达水平无明显差异(P>0.05),见图5。

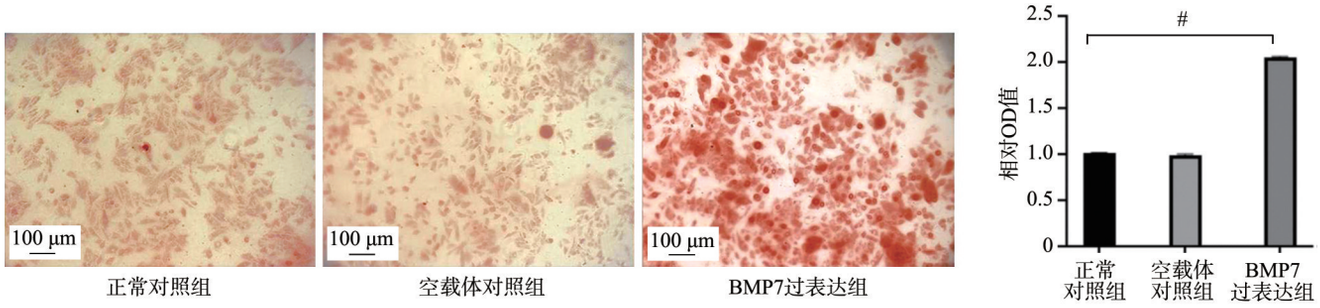
2.6 BMP7过表达内皮细胞对共培养VSMCs钙化的影响

茜素红染色结果显示,与感染BMP7过表达慢病毒的内皮细胞共培养后,BMP7过表达组VSMCs的钙化程度较正常对照组和空载体对照组均明显增加(P<0.01),见图6。



a:Jagged1蛋白电泳图(A:正常细胞组;B:空载体对照组;C:BMP7过表达组);b:Jagged1蛋白定量分析 #:P<0.01

图5 Western blot检测小鼠主动脉内皮细胞Jagged1蛋白的表达



#:P<0.01

图6 各组茜素红染色情况

3 讨论

VSMCs向成骨细胞样表型转化包括VSMCs收缩表型标志物表达降低和成骨细胞标志物表达增高的演化过程,是血管钙化的核心环节[3]。在高龄动脉血管壁中,BMP-Smads、Wnt/β-catenin、Notch、Hedgehog等骨形成关键信号通路的激活以及钙调蛋白、骨保护素等抑制钙化因子的丢失会促使VSMCs向成骨样表型转化[10]。在老年人主动脉中层及高龄小鼠主动脉VSMCs中均发现成骨标志物蛋白高表达,同时VSMCs收缩表型标志物明显降低[11]。因此,血管的钙化与VSMCs的成骨细胞样表型转化密切相关。

既往研究提示,BMP7在血管钙化中可能发挥关键作用。首先,BMP7通过调节血管相关多能祖细胞的表型可塑性来调节血管钙化[12]。在钙化性动脉粥样硬化标本中,BMP7表达上调最为显著[13]。我们前期研究也发现,衰老可以通过下调miR542-3p增加其靶基因BMP7的表达,从而发挥促进VSMCs向成骨细胞样表型转化的作用[14],而上调BMP7是如何导致VSMCs向成骨细胞样表型转化的机制尚不明确。

本实验成功构建了小鼠BMP7过表达慢病毒载体并感染至小鼠主动脉内皮细胞。qPCR检测结果提示:转染BMP7过表达慢病毒的小鼠主动脉内皮细胞中BMP7 mRNA的表达水平显著上调。Notch信号通路在血管的发生发展中发挥了较为重要的调控作用[15]。血管壁组织中的Notch信号系统包括Notch受体(Notch1~4)和配体(Jagged1、2和DLL1、3、4)等,其

中Jagged1是主要分布在内皮细胞的Notch配体[16]。既往研究表明,在多种细胞中BMP7可通过下游信号转导蛋白抑制Jagged1蛋白的表达[6,17]。本研究也观察到BMP7过表达慢病毒转染的内皮细胞中Jagged1蛋白表达水平明显降低。因此,Jagged1可能是内皮细胞中BMP7的下游信号分子。

本研究还发现,感染BMP7过表达慢病毒的内皮细胞与VSMCs共培养后,VSMCs的钙化程度增加了2倍。内皮细胞调控VSMCs功能主要通过细胞间直接接触和旁分泌作用实现。有研究发现,Jagged1-Notch3通路是内皮细胞和VSMCs间交流的关键信号通路[18]。细胞间调控可激活VSMCs的Notch3信号并维持其收缩表型,减少其向成骨细胞样表型转化。提示上调内皮细胞BMP7表达,可降低其Jagged1表达,并促进共培养体系中VSMCs的钙化。

综上所述,本研究成功构建了BMP7过表达慢病毒载体并感染至小鼠主动脉内皮细胞。在细胞实验中,我们发现上调小鼠主动脉内皮细胞BMP7的表达后,其Jagged1的表达降低,并促进了共培养体系中VSMCs的钙化。但目前只是内皮细胞调控VSMCs钙化分子机制的初步探索,内皮细胞Jagged1究竟是通过何种途径影响VSMCs钙化尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] Hill JM, Kereiakes DJ, Shlofmitz RA, et al. Intravascular lithotripsy for treatment of severely calcified coronary artery disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(22): 2635-2646. doi: 10.1016/j.jacc.2020.09.603.

[2] 张玉霞,汤日宁,刘必成. 慢性肾脏病患者血管钙化发生机制研究进展[J]. 中华肾脏病杂志,2021,37(9):779-784. doi:10.3760/cma.j.cn441217-20200817-00115.

[3] Furmanik M, Chatrou M, van Gorp R, et al. Reactive oxygen-forming Nox5 links vascular smooth musclecell phenotypic switching and extracellular vesicle-mediated vascular calcification[J]. Circ Res, 2020,127(7):911-927. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.316159.

[4] Wu X, Zou Y, Zhou Q, et al. Role of Jagged1 in arterial lesions after vascular injury[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31: 2000-2006. doi:10.1161/ATVBAHA.111.225144.

[5] Cao G, Xuan X, Hu J, et al. How vascular smooth muscle cell phenotype switching contributes to vascular disease[J]. Cell Commun Signal,2022,20(1):180. doi:10.1186/s12964-022-00993-2.

[6] Li X, Li K, Yu G, et al. miR-342-5p inhibits expression of Bmp7 to regulate proliferation, differentiation and migration of osteoblasts[J]. Mol Immunol, 2019, 114: 251-259. doi: 10.1016/j.molimm.2019.07.027.

[7] Kobayashi M, Inoue K, Warabi E, et al. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells[J]. J Atheroscler Thromb, 2005, 12(3): 138-142. doi:10.5551/jat.12.138.

[8] 郝思雨,田江天,刘 洋,等. 小鼠主动脉平滑肌细胞的分离培养及鉴定[J]. 现代生物医学进展,2016,16(27):5237-5240. doi:10.13241/j.cnki.pmb.2016.27.009.

[9] Fillinger MF, Sampson LN, Cronenwett JL, et al. Coculture of endothelial cells and smooth muscle cells in bilayer and conditioned media models[J]. J Surg Res, 1997, 67(2): 169-178. doi:10.1006/jsre.1996.4978.

[10] Leopold JA. Vascular calcifification: mechanisms of vascular smooth muscle cell calcifification[J]. Trends Cardiovasc Med, 2015, 25(4): 267-274. doi:10.1016/j.tcm.2014.10.021.

[11] Shi LL, Hao M, Jin ZY, et al. Liraglutide alleviates diabetic atherosclerosis through regulating calcification of vascular smooth muscle cells[J]. Dis Markers, 2022, 25: 5013622. doi: 10.1155/2022/5013622.

[12] Yang P, Troncone L, Augur ZM, et al. The role of bone morphogenetic protein signaling in vascular calcification[J]. Bone, 2020, 141: 115542. doi:10.1016/j.bone.2020.115542.

[13] Oštrić M, Kukuljan M, Markić D, et al. Expression of bone-related proteins in vascular calcification and its serum correlations with coronary artery calcification score[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2019,33(1):29-38.

[14] Liu H, Wang H, Yang S, et al. Downregulation of miR-542-3p promotes osteogenic transition of vascular smooth muscle cells in the aging rat by targeting BMP7[J]. Human Genomics, 2019, 13(1): 67. doi:10.1186/s40246-019-0245-z.

[15] Baeten JT, Lilly B. Notch signaling in vascular smooth muscle cells[J]. Adv Pharmacol, 2017, 78: 351-382. doi: 10.1016/bs.apha.2016.07.002.

[16] 张 清,向 明,陈 杭,等. Notch信号通路在骨关节炎软骨细胞中的表达及意义[J]. 局解手术学杂志,2018,27(4):240-245. doi:10.11659/jjssx.08E017010.

[17] Mao C, Ma Z, Jia Y, et al. Nidogen-2 maintains the contractile phenotype of vascular smooth muscle cells and prevents neointima formation via bridging Jagged1-Notch3 signaling[J]. Circulation, 2021, 144(15): 1244-1261. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.053361.

[18] Zhang Y, Zhang J, Navrazhina K, et al. TGF beta1 induces Jagged1 expression in astrocytes via ALK5 and Smad3 and regulates the balance between oligodendrocyte progenitor proliferation and differentiation[J]. Glia, 2010, 58: 964-974. doi: 10.1002/glia.20978.

(编辑:杨 颖)