

网络出版时间:2021/12/22 15:44 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20211221.1001.021.html

慢病毒介导沉默 *NIPBL* 基因对小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化能力的影响

姜德坤,张惠荣,潘金勇,马雯晴,刘辉,董丽丽

摘要 目的 探讨慢病毒介导沉默 *NIPBL* 基因对小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化能力的影响。方法 将第三代 c57 小鼠骨髓间充质干细胞分为实验组、阴性对照组、空白对照组。将慢病毒载体转染至小鼠骨髓间充质干细胞,倒置荧光显微镜观察慢病毒转染结果,Real-time PCR 检测 *NIPBL* 基因表达情况。成骨诱导培养,检测碱性磷酸酶活性,应用 Real-time PCR、Western blot 技术分别检测成骨相关基因 *OCN*、*BMP-2*、*RUNX-2* 基因转录及蛋白表达水平。结果 实验组 *NIPBL* mRNA 表达量降低 ($P < 0.05$)。实验组碱性磷酸酶活性比阴性对照组及空白对照组低 ($P < 0.05$)。实验组 *OCN*、*BMP-2*、*RUNX-2* 基因转录及蛋白表达水平均较阴性对照组及空白对照组低 ($P < 0.05$)。茜素红染色结果提示阴性对照组和空白对照组较实验组可见更多的红色钙结节。结论 慢病毒介导沉默 *NIPBL* 基因降低小鼠骨髓间充质干细胞增殖能力,抑制成骨分化相关基因的表达,降低成骨分化能力。

关键词 慢病毒;*NIPBL* 基因;骨髓间充质干细胞;成骨分化;德朗热综合征

中图分类号 R 722.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)01-0105-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.020

2021-08-30 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81660260)

作者单位:石河子大学医学院第一附属医院儿科,石河子 832000

作者简介:姜德坤,男,硕士;

张惠荣,女,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:zhr331619@sina.com

德朗热综合征 (Cornelia de Lange syndrome, CdLS) 是一种以生长发育迟缓、严重认知障碍、特征性面容、肢体发育畸形为特点的遗传性疾病^[1]。*NIPBL* 基因为主要致病基因^[2],其表达水平越低则病情越严重,在 CdLS 诊断中首要检测指标是确定 *NIPBL* 基因是否突变^[3]。研究^[4]表明其肢体发育畸形发生率高达 73.1%。前期研究^[5]表明 *NIPBL* 基因低表达会抑制 *shh*、*Wnt5a* 基因及其蛋白的表达,从而影响 Wnt 信号通路相关分子的表达。推测 *NIPBL* 基因可能通过 Wnt 信号通路调控骨髓间充质干细胞的成骨分化,但其具体机制尚未见报道。该研究用慢病毒转染小鼠骨髓间充质干细胞沉默 *NIPBL* 基因,探究成骨相关基因骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2)、骨钙素 (osteocalcin, OCN)、Runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, RUNX-2) 的表达,以揭示 *NIPBL* 基因对骨髓间充质干细胞成骨分化相关基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验对象 原代小鼠骨髓间充质干细胞购于武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 试剂与仪器 DMEM/F-12 培养基(美国 gibco 公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(美国 Thermo 公司);CCK-8 试剂盒(上海东仁化学科技有限公司);碱性

new idea for the study of atherosclerosis. **Methods** Sixteen 8-week-old ApoE^{-/-} mice were randomly divided into control group and PHPS1 group. The aortic root was fixed with formalin and sectioned. The collagen and macrophage contents in the plaque were evaluated by Movat and Sirius red staining. The activity of ERK and the expression of MMP-9 in the descending aorta were detected by Western blot. **Results** The plaque area (0.52 ± 0.05), (0.31 ± 0.03), collagen content (0.062 ± 0.013), (0.136 ± 0.022) and macrophage cell ratio (0.799 ± 0.031), (0.621 ± 0.043) were different between PHPS1 group and control group ($P < 0.01$). The results of western blot showed that PHPS1 inhibited the activity of ERK and decreased the protein expression of MMP-9 ($P < 0.01$). **Conclusion** PHPS 1, an inhibitor of SHP-2, can inhibit ERK activity and decrease the expression of MMP-9, thus reducing the degradation of collagen in fibrous cap and stabilizing vulnerable atherosclerotic plaque.

Key words atherosclerosis; SHP-2; PHPS1; plaque stability; MMP-9

磷酸酶试剂盒(美国 Cyagen 公司);RUNX2 抗体、BMP2 抗体、Osteocalcin 抗体(英国 Abcam 公司); β -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗(武汉博士德生物工程有限公司);慢病毒(上海吉玛基因公司);倒置相差荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 NIPBL 基因慢病毒载体构建 针对 NIPBL 目标基因序列,设计 3 条 NIPBL-siRNA,分别为 siRNA1:5'-GCAGATGCCTGTCTTACAAC-3'; siRNA2:5'-GCATCCGAGTCTAATGTTTGA-3'; siRNA3:5'-GCAGGATACATGCCATATTCC-3'。阴性对照序列为:5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。慢病毒载体的构建由上海吉玛基因股份有限公司完成。

1.3.2 慢病毒转染预实验 接种细胞于 96 孔培养板中培养,设置感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 10、30、60、100。转染后 72 h 在相差荧光显微镜下观察结果(图 1)。转染效率的测定:在 200 倍视野下均匀测定 10 个视野的细胞总数和带荧光细胞数,细胞转染效率 = 10 个视野内带荧光细胞总数/细胞总数。当 MOI = 60 时,细胞转染效率达 94%,设为最适感染复数。

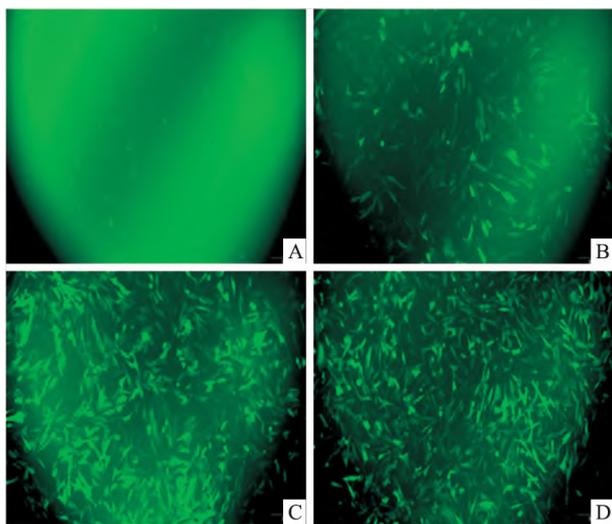


图 1 不同 MOI 转染结果(倒置相差荧光显微镜 $\times 100$)
A: MOI = 10; B: MOI = 30; C: MOI = 60; D: MOI = 100

1.3.3 慢病毒转染 该实验分为 5 组:① siRNA1 组:用携带 NIPBL-siRNA1 的慢病毒载体转染细胞;② siRNA2 组:用携带 NIPBL-siRNA2 的慢病毒载体转染细胞;③ siRNA3 组:用携带 NIPBL-siRNA3 的慢病毒载体转染细胞;④ 阴性对照组:用携带阴性对照的慢病毒载体转染细胞;⑤ 空白对照组:不添加慢病毒载体,其他操作步骤与前各组相同。设置

MOI = 60,转染 72 h 后观察结果。提取各组细胞 RNA,通过 qRT-PCR 检测转染后 NIPBL 基因的 mRNA 表达量,NIPBL、BMP-2、OCN、RUNX-2 和内参基因 β -actin 引物由生工生物工程(上海)有限公司设计与合成,引物序列见表 1。PCR 反应体系(20 μ l):cDNA 2 μ l、上下游引物各 1 μ l、 $2 \times$ PowerUp SYBR Green Master Mix 10 μ l、ddH₂O 6 μ l。反应条件:50 $^{\circ}$ C、2 min,95 $^{\circ}$ C、2 min;95 $^{\circ}$ C、15 s,60 $^{\circ}$ C、1 min,40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 NIPBL 基因的 mRNA 相对表达量,确定各组的抑制效率,抑制效率 = (空白组表达量-siRNA 组表达量)/空白组表达量,选择抑制效率最高的 siRNA 进行后续实验。

表 1 NIPBL、 β -actin、BMP-2、OCN、RUNX-2 引物信息

基因	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)
NIPBL	F:CCATGTCCCATAACTACGCT	137
	R:AGTTCACCTCTTCTGCTATTCTGT	
β -actin	F:CACGATGGAGGGGCCGACTCATC	240
	R:TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT	
BMP-2	F:GGGACCCGCTGTCTTCTACT	154
	R:TCAACTCAAATTCGCTGAGGAC	
OCN	F:CTGACCTCACAGATCCCAAGC	187
	R:TGGCTGATAGCTCGTCACAAG	
RUNX-2	F:ATGCTTCATTCGCCTCACAAA	146
	R:GCACTCACTGACTCGGTTGG	

1.3.4 转染后细胞增殖能力检测 取三组细胞接种于 96 孔板中培养。在第 1、3、5、7、9 天的同一时间加入 CCK-8 试剂,放入培养箱中培养 2 h 后,用酶标仪检测 450 nm 波长吸光度值(optical density, OD),以时间为横坐标,OD 值为纵坐标,绘制细胞的生长曲线。

1.3.5 诱导成骨分化 取三组细胞于 6 孔板中培养。当细胞融合度达到 70% 时,更换培养基为成骨诱导分化完全培养基(含基础培养基 175 ml、专用血清 20 ml、双抗 2 ml、地塞米松 20 μ l、抗坏血酸 400 μ l、 β -甘油磷酸钠 2 ml、谷氨酰胺 2 ml),每隔 3 d 更换培养基。

1.3.6 检测碱性磷酸酶活性 分别于成骨诱导的第 5、7、10、14 天收集细胞培上清液,按照说明书进行检测,使用酶标仪测定 520 nm 波长 OD 值。

1.3.7 qRT-PCR 检测 BMP-2、OCN、RUNX-2 基因的 mRNA 表达量 在成骨诱导的第 7、14、21 天,分别提取 3 组细胞的总 RNA,反转录后,通过 qRT-PCR 检测 BMP-2、OCN、RUNX-2 基因的 mRNA 表达量。反应体系及条件同上文所述。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 BMP-2、OCN、RUNX-2 基因的 mRNA 相对表达量。

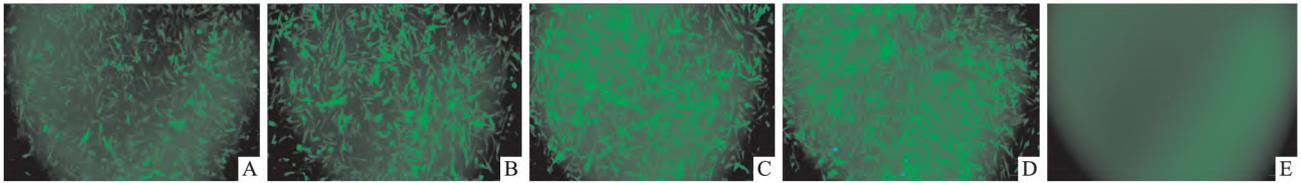


图2 倒置相差荧光显微镜下各组慢病毒转染结果 ×100

A: siRNA1 组; B: siRNA2 组; C: siRNA3 组; D: 阴性对照组; E: 空白对照组

1.3.8 Western blot 检测 OCN、BMP-2、RUNX-2 基因的蛋白表达水平 在成骨诱导的第7、14、21天,提取各组细胞总蛋白,BCA法检测蛋白浓度。加入5×buffer配平后煮沸变性进行电泳,转膜。使用双蒸水浸泡3min、1×电转液浸泡12min活化NC膜。室温摇床上封闭3h,各自加入β-actin(1:400)、Runx2(1:2000)、OCN(1:2000)、BMP2(1:2000)一抗,于4℃冰箱摇床孵育过夜。用TBST洗膜3次后,加入二抗(1:20000)室温摇床孵育2h,用TBST洗膜3次后,加发光试剂(ECL)显色后扫描,使用ImageJ软件进行分析灰度值,目的蛋白表达量=目的蛋白灰度值/β-actin蛋白灰度值。

1.3.9 茜素红染色分析 在成骨诱导21d后,PBS冲洗2次,中性甲醛固定30min,PBS冲洗2次,茜素红染液染色5min,PBS冲洗3次,倒置相差显微镜下观察染色结果。再加入10%氯化十六烷基吡啶脱色30min,每组取3个重复样本,使用酶标仪检测570nm波长OD值。

1.4 统计学处理 使用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析,正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,3组数据之间的比较采用单因素方差分析,两组之间的比较采用SNK检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒转染结果及抑制效率 慢病毒转染后,siRNA1组、siRNA2组、siRNA3组和阴性对照组可见大量荧光,空白对照组无荧光(图2)。siRNA1组、siRNA2组、siRNA3组、阴性对照组、空白对照组的NIPBL基因的mRNA相对表达量为 (0.498 ± 0.015) 、 (0.589 ± 0.250) 、 (0.301 ± 0.025) 、 (1.039 ± 0.214) 、 (1.000 ± 0.011) ,阴性对照组与空白对照组的NIPBL基因的mRNA表达量差异无统计学意义($P > 0.05$),siRNA1组、siRNA2组、siRNA3组的抑制效率分别为51%、42%、70%。NIPBL-siRNA3抑制效率最佳,用其进行后续实验。

2.2 转染后细胞增殖能力比较 实验组和阴性对照组及空白对照组在前5天差异无统计学意义,在第6天后,阴性对照组与空白对照组细胞增殖能力提高,实验组增殖能力增加缓慢,阴性对照组与空白对照组差异无统计学意义。见图3。

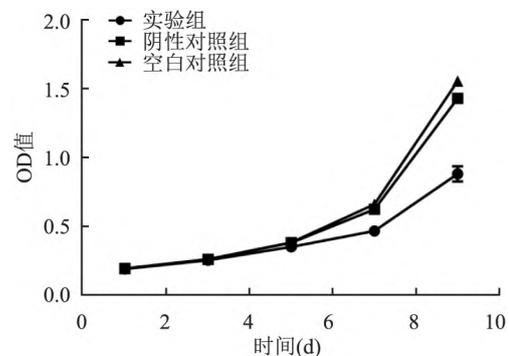


图3 各组细胞的生长曲线

2.3 碱性磷酸酶活性比较 随着时间增加,各组细胞碱性磷酸酶活性均增加,实验组碱性磷酸酶活性在第5天时与阴性对照组和空白对照组无差异,在6d后各时间点较阴性对照组和空白对照组低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。阴性对照组与空白对照组之间,差异无统计学意义。见图4。

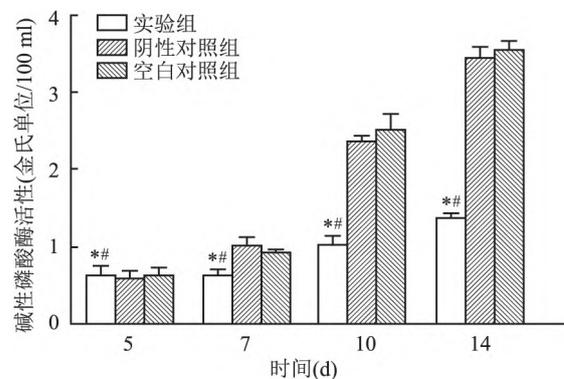


图4 各组细胞的碱性磷酸酶活性

与阴性对照组比较: * $P < 0.05$; 与空白对照组比较: # $P < 0.05$

2.4 BMP-2、OCN、RUNX-2 基因的 mRNA 表达量

实验组 *BMP-2*、*OCN*、*RUNX-2* 基因的 mRNA 表达量在第 7、14 及 21 天均低于阴性对照组和空白对照组,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。阴性对照组和空白对照组在各时间点表达量无差异。见图 5。

2.5 OCN、BMP-2、RUNX-2 基因的蛋白表达水平

实验组 *BMP-2*、*OCN*、*RUNX-2* 基因的蛋白表达量在第 7、14 及 21 天均低于阴性对照组和空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),阴性对照组和空白组在各时间点,蛋白表达量差异无统计学意义。*OCN* 基因的蛋白表达量在第 7、14 天无变化,第 21 天时表达量增加。*BMP-2*、*RUNX-2* 基因的蛋白表达量均随时间增加而增加,在第 21 天表达量最多。见图 6。

2.6 茜素红染色结果

成骨诱导分化的第 21 天,按照说明书进行茜素红染色后观察结果,实验组钙结节低于阴性对照组和空白对照组($P < 0.05$),阴

性对照组和空白对照组差异无统计学意义。见图 7。

3 讨论

CdLS 作为一种遗传异质性疾病,具有广泛的表型变异性,从轻度到重度具有不同程度的面部、肢体畸形。CdLS 发病主要与粘蛋白复合体相关的基因突变有关,其中以 *NIPBL* 基因突变为主,且有研究^[6]表明 *NIPBL* 基因突变所致 CdLS 患者有更严重的面部、肢体骨骼发育畸形。有研究^[7]表明在 S 期、G₁ 期和 G₂ 期,*NIPBL* 基因参与调控将黏蛋白复合物加载到染色质上的过程。因此 *NIPBL* 基因突变引起基因表达调节的异常从而导致 CdLS 的发生,目前公认为 *NIPBL* 基因是 CdLS 的最重要的致病基因,但是其具体分子机制尚不明确,因此研究 *NIPBL* 基因对成骨分化的调控机制具有重要意义。

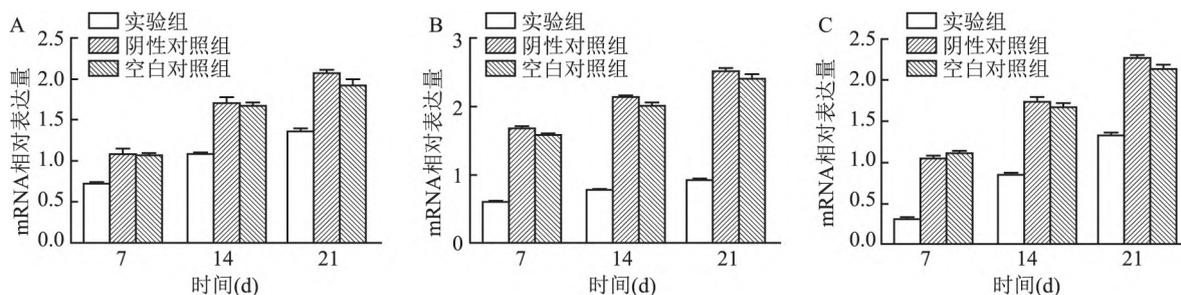


图 5 *BMP-2*、*OCN*、*RUNX-2* 基因的 mRNA 表达量
A: *BMP-2* 基因; B: *OCN* 基因; C: *RUNX-2* 基因

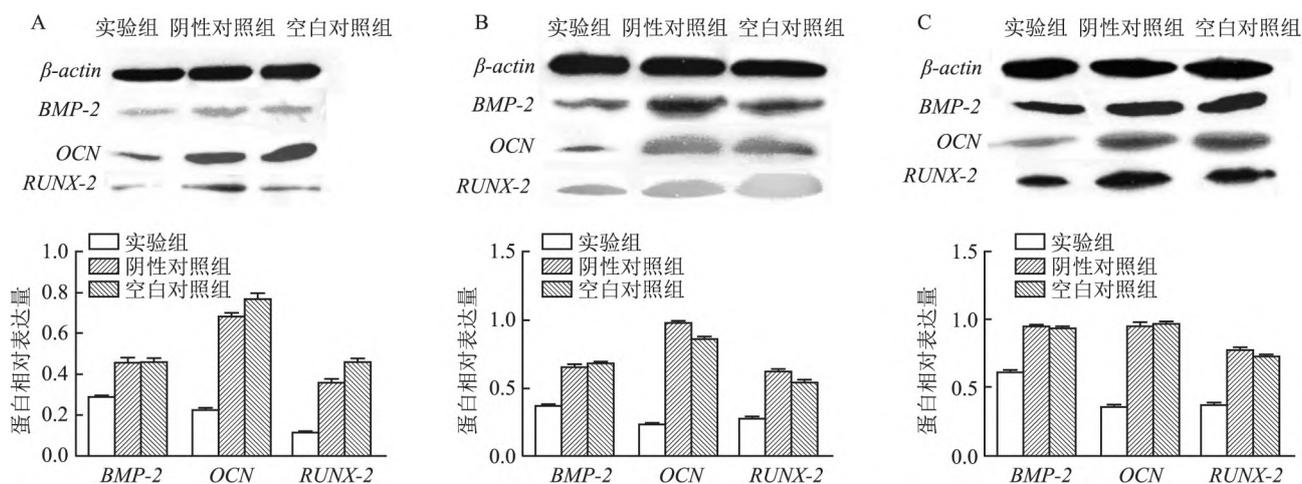


图 6 各组中 *OCN*、*BMP-2*、*RUNX-2* 基因的蛋白表达水平
A: 第 7 天; B: 第 14 天; C: 第 21 天;

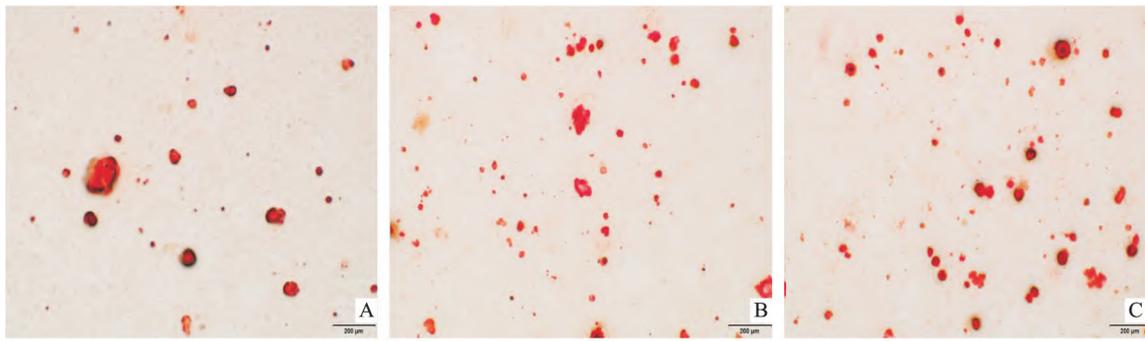


图7 倒置相差显微镜下茜素红染色结果 ×400

A:实验组;B:阴性对照组;C:空白对照组

慢病毒载体可以将外源基因有效的整合到宿主染色体上,从而达到持久性的表达^[8]。因此,该实验采取慢病毒载体将目的基因转染到小鼠骨髓间充质干细胞。该实验通过慢病毒转染抑制 *NIPBL* 基因表达,抑制效率达 70%。通过 CCK-8 法检测转染后细胞增殖能力:空白对照组和阴性对照组的细胞增长曲线没有明显差异,实验组细胞增殖能力降低。PCR 检测转染后 *NIPBL* 基因表达情况:空白对照组与阴性对照组无明显差异,实验组表达量约为空白对照组的 30%。以上实验结果说明慢病毒载体不会影响细胞生长,且能使目的基因有效表达。

碱性磷酸酶是早期反映细胞成骨分化水平的重要标志物^[9]。该实验在成骨诱导过程中,碱性磷酸酶活性随着时间而逐渐增加,在第 5 天后,实验组碱性磷酸酶活性明显低于阴性对照组和空白对照组。*RUNX-2* 是成骨诱导分化过程中关键的一个转录因子,是骨形成的过程中较早和具有明显特征性的标志物之一^[10]。*OCN* 是成骨分化的特异性基因,形成骨基质中的主要非胶原成分,调节控制矿物质形成的方向和速度^[11]。*BMP-2* 是一种酸性糖蛋白,在调控骨形成发育中起着重要作用^[12]。该实验结果显示:在成骨诱导的第 7、14、21 天,实验组 *BMP-2*、*OCN*、*RUNX-2* 的 mRNA 和蛋白表达量均低于阴性对照组和空白对照组,说明通过慢病毒转染沉默 *NIPBL* 基因后,成骨相关基因的表达受到抑制。茜素红染色结果反映成骨分化晚期的钙盐沉积情况,该实验显示在成骨诱导 21 天后实验组、阴性对照组和空白对照组均出现钙盐沉积,但实验组明显少于空白对照组和阴性对照组。有研究^[13]表明 *ALP*、*RUNX-2* 可反映早期的成骨状态,*BMP-2*、*OCN* 可以

反映晚期的成骨状态。该实验结果明确转染后实验组 *ALP*、*RUNX-2*、*BMP-2*、*OCN* 的表达均下降,表明 *NIPBL* 基因在调控成骨分化过程中发挥一定作用。

课题组前期研究^[5]表明敲除 *NIPBL* 基因后 *Wnt5a* 基因的表达水平受到抑制,*Wnt5a* 是 *Wnt* 信号通路的一个重要因子,且能与 *ROR* 蛋白结合,以调节成骨和软骨的形成,从而调控肢体发育形态。*Wnt/β-catenin* 信号通路在成骨过程中发挥作用,而 *OCN*、*RUNX-2* 是该信号通路的靶基因^[14]。该研究显示,用慢病毒沉默 *NIPBL* 基因后,小鼠骨髓间充质干细胞的增殖能力和成骨分化能力会减弱,其机制可能是通过 *Wnt/β-catenin* 信号通路调控成骨的过程。由此推测 *CdLS* 患者的骨骼发育异常可能与 *Wnt* 信号通路的下调有关,其具体调控机制仍待进一步研究。

参考文献

- [1] Latorre-Pellicer A, Ascaso Á, Trujillano L, et al. Evaluating Face2Gene as a tool to identify cornelia de lange syndrome by facial phenotypes[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(3): 1042.
- [2] Kaur M, Mehta D, Noon S E, et al. *NIPBL* expression levels in *CdLS* probands as a predictor of mutation type and phenotypic severity[J]. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2016, 172(2): 163-70.
- [3] Kline A D, Moss J F, Selicorni A, et al. Diagnosis and management of cornelia de lange syndrome: first international consensus statement[J]. Nat Rev Genet, 2018, 19(10): 649-66.
- [4] Maskoen A M, Laksono B, Hajjah R, et al. Cornelia de lange syndrome with thyroid agenesis of an indonesian patient. [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2017, 63(8): 93-4.
- [5] 邢蓬蕊,潘金勇,张惠荣. *Shh* 与 *Wnt5a* 基因在 *Cornelia De Lange* 综合征中的表达及意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2019, 21(5): 485-490.

- [6] Krab L C, Marcos-Alcalde I, Assaf M, et al. Delineation of phenotypes and genotypes related to cohesin structural protein RAD21 [J]. *Hum Genet*, 2020, 139(5): 575–92.
- [7] Avagliano L, Parenti I, Grazioli P, et al. Chromatinopathies: a focus on cornelia de lange syndrome [J]. *Clin Genet*, 2020, 97(1): 3–11.
- [8] Sena-Esteves M, Gao G. Monitoring lentivirus vector stocks for replication-competent viruses [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018(4): 286–8.
- [9] 许敏, 吴婷婷, 何家才. β -TCP 作用 T 淋巴细胞后调控 BMSCs 成骨分化的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(8): 1168–73.
- [10] Xin Y, Liu Y, Liu D, et al. New function of *RUNX2* in regulating osteoclast differentiation *via* the AKT/NFATc1/CTSK axis [J]. *Calcif Tissue Int*, 2020, 106(4): 553–6.
- [11] Choi Y H, Han Y, Jin S W, et al. Pseudoshikonin I enhances osteoblast differentiation by stimulating Runx2 and Osterix [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1): 748–57.
- [12] Rahman M S, Akhtar N, Jamil H M, et al. TGF- β /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation [J]. *Bone Res*, 2015, 3: 15005.
- [13] 俞晨, 杨帆, 李健, 等. 铁蓄积环境对大鼠骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(4): 719–22.
- [14] Vega O A, Lucero C M J, Araya H F, et al. Wnt/ β -Catenin signaling activates expression of the bone-related transcription factor *RUNX2* in select human osteosarcoma cell types [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(11): 3662–74.

Effect of lentivirus mediated silencing of *NIPBL* gene on osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells

Jiang Dekun, Zhang Huirong, Pan Jinyong, Ma Wenqing, Liu Hui, Dong Lili

(Dept of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832000)

Abstract Objective To investigate the effect of lentivirus mediated silencing of *NIPBL* gene on osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** The third generation C57 Mouse Bone marrow mesenchymal stem cells were divided into experimental group, negative control group and blank control group. The lentiviral vector was transfected into mouse bone marrow mesenchymal stem cells, the transfection results were observed by inverted fluorescence microscope, and the expression of *NIPBL* gene was detected by real-time PCR. The cells of each group were cultured by osteogenic induction. The alkaline phosphatase activity was detected. Real-time PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of *OCN*, *BMP-2* and *RUNX-2*. **Results** The expression of *NIPBL* mRNA decreased in the experimental group ($P < 0.05$). The activity of alkaline phosphatase in experimental group was lower than that in negative control group and blank control group ($P < 0.05$). The gene transcription and protein expression levels of *OCN*, *BMP-2* and *Runx-2* in experimental group were lower than those in negative control group and blank control group ($P < 0.05$). Alizarin red staining results showed that the negative control group and blank control group had more red calcium nodules than the experimental group. **Conclusion** Lentivirus mediated silencing of *NIPBL* gene reduces the proliferation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells, inhibits the expression of osteogenic differentiation related genes, and reduces the osteogenic differentiation ability.

Key words lentivirus; *NIPBL* gene; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; Cornelia de Lange syndrome