

· 基础研究 ·

转染音猬因子对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

贾祎佳 孙吉平 刘强 郝海虎 朱剑 吴斗

【摘要】 目的 建立能够持续稳定表达音猬因子(Shh)的骨髓基质干细胞(BMSCs),观察其成骨分化能力,为体内治疗骨质疏松提供可行性依据。**方法** 使用Gateway Technology构建pDown-DsRed-Shh,贴壁培养法获取SD大鼠BMSCs,慢病毒转染法将pDown-DsRed-Shh、pDown-DsRed报告质粒转染进BMSCs,分为DsRed-BMSCs组(A组)和Shh-DsRed-BMSCs组(B组),荧光显微镜下观察DsRed表达,判断转染效率。48 h后使用RT-PCR法和Western印迹法检测Shh基因的表达情况,7 d后检测碱性磷酸酶(ALP)活性,28 d后茜素红染色检测骨髓间充质干细胞的成骨情况。**结果** 慢病毒转染24 h后Shh-DsRed-BMSCs的转染率约为90%。同A组相比,B组能持续稳定高水平表达Shh mRNA和蛋白,同A组相比,B组的ALP活性更强,差异具有统计学意义($t=17.665, P<0.05$),B组的茜素红染色表达情况明显高于A组。**结论** 慢病毒转染音猬因子的骨髓间充质干细胞可以导致Shh的持续稳定高水平表达,并具有很高的成骨细胞分化能力,为骨质疏松的体内治疗提供了理论基础。

【关键词】 间充质干细胞; 骨质疏松症; 转染; 音猬因子

The effects of bone marrow stromal cells transferred with lentiviral-mediated Sonic Hedgehog (Shh) gene in osteoporosis Jia Yijia, Sun Jiping, Liu Qiang, Hao Haihu, Zhu Jian, Wu Dou. Department of Orthopaedics, Shanxi Academy of Medical Sciences, Shanxi Dayi Hospital, Taiyuan 030032, China
Corresponding author: Wu Dou, Email: 13934563692@163.com

【Abstract】 Objective To observe osteogenic differentiation of modified bone marrow stromal cells (BMSCs) which can express Sonic Hedgehog (Shh) stably and provide the treatment of osteoporosis in vivo feasibility. **Methods** BMSCs were infected with lentiviruses using a lentiviral vector containing the DsRed or the Shh-DsRed gene and then divided into Shh-DsRed - BMSCs group (group A) and DsRed - BMSCs group (group B). The transfection efficiency were evaluated by fluorescence microscopy using DsRed expression. The expression of Shh was tested by RT-PCR and Western-blot analysis after 48 hours. The osteogenic differentiation of BMSCs were analysed by ALP testing after 7 days, and tested by alizarin red staining after 28 days. **Results** The transfection efficiency was about 90% after 24 hours in Shh-DsRed-BMSCs. Compared with the group B, the Shh-DsRed-BMSCs can stably secrete Shh mRNA and protein. The ALP activity in Shh-DsRed-BMSCs group was significantly greater than those in DsRed-BMSCs. The alizarin red staining expression in group A was markedly higher than those in group B. **Conclusion** Shh-DsRed-BMSCs can long-term and stably secrete high levels of Shh, has a high ability of osteoblast differentiation and was then the basis for the subsequent treatment for osteoporosis in vivo.

【Key words】 Mesenchymal stromal cells; Osteoporosis; Transfection; Sonic hedgehog

随着人口老龄化趋势的加剧,骨质疏松症(osteoporosis, OP)的发病率越来越高,骨质疏松性骨折也越来越多,其高患病率、致残及死亡率以及高

昂的治疗费用给社会和家庭带来沉重的负担^[1]。但OP的发病机制复杂,目前尚无确切的预防及治疗方法^[2]。在骨组织代谢-骨吸收后,若未分化干细胞未能及时

向成骨细胞分化,可造成骨形成不足,从而引起骨质疏松的发生。因此通过增加其未分化干细胞的储备,在一定条件下,使成骨细胞得到有效补充而促进骨形成,可为骨质疏松的治疗提供一种新方法。

骨髓基质干细胞(bone marrow stmmal cells, BMSCs)是一类来源于骨髓的多潜能分化干细胞,在特定的诱导条件下可分化为成骨细胞。音猬因子(sonic hedgehog, Shh)能够通过Hedgehog机制促进骨髓间充质干细胞向成骨方向分化^[3],但外源性Shh半衰期短,难以发挥持续作用。本实验设想将编码Shh的基因导入到BMSCs中,使BMSCs能够持续稳定地表达Shh,观察其是否能持续诱导BMSCs向成骨方向分化,为下一步体内治疗OP提供可行性。

材料与方法

一、实验材料

健康雌性 Sprague Dawley (SD) 大鼠,体重 160~200 g,由北京军事医学科学院动物实验中心提供(批号:SCXK2007-004)。实验动物的使用遵循实验动物使用和护理指南(NIH出版,80-23号,1978年修订),并得到了山西医科大学实验动物伦理委员会批准。Shh基因的引物由上海生工生物工程有限公司合成。携带音猬因子和红色荧光蛋白(Red fluorescent protein, DsRed)基因慢病毒表达载体由广州赛业生物科技有限公司协助构建。倒置荧光显微镜(OLYMPUS公司),实时荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems小型高速),SD MSC成骨诱导分化完全培养基(广州赛业生物科技有限公司),Anti-Shh多克隆兔抗体(美国CST公司),10%的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(杭州四季清公司),L-DMEM培养液(Hyclone),茜素红染液(上海君瑞生物技术有限公司),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒(南京建成公司)。

二、实验方法

1. BMSCs的分离与培养:暴露大鼠股骨和胫骨骨髓腔,用L-DMEM完全培养基冲洗骨髓腔,收集冲洗液,用贴壁培养法将BMSCs分离后,接种于含10%胎牛血清的L-DMEM培养基,置于37℃、5%CO₂培养箱(美国Nuair公司)中培养,当生长汇合率达到80%~90%时转染。

2. 实验分组与基因转染:实验分2组:DsRed-BMSCs组(A组)和Shh-DsRed-BMSCs组(B组)。

A组与B组均行常规成骨诱导,诱导液为10 mmol/L β-甘油磷酸+1*10⁻⁸ mmol/L地塞米松+50 mg/L维生素C。携带音猬因子和红色荧光蛋白(red fluorescent protein, DsRed)基因慢病毒表达载体通过逐孔滴度稀释法进行病毒滴度测定,把病毒浓缩液按照浓度比例稀释为符合MOI值(MOI=25 pfu)的比例备用,取培养的第3代大鼠BMSCs,在25 cm²培养瓶中将细胞密度调整为1×10⁵,置于37℃、5%CO₂培养箱环境中培养,待细胞融合达60%~70%,PBS洗涤细胞三次,将稀释好的病毒液转至贴壁的大鼠BMSCs培养瓶中,同时补充SD MSC完全培养基补足液面,在37℃、5%CO₂培养箱环境中培养;培养8 h后,倾去培养瓶中液体,换为SD MSC完全培养基继续培养,感染后每天用荧光显微镜观察荧光表达情况。观察5 d,测定转染效率。

3. 实验的主要指标检测:(1)逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测:提取细胞RNA,逆转录成cDNA,以Shh检测引物(上游:5' AGATGCTGCTGCTGCTGG 3'和下游引物5' TCCTRCCGTGCGCTITCC 3')反转录。PCR条件:95℃时5 min变性,92℃~1 min,54℃~1 min,72℃~1 min,30个循环,72℃延伸10 min。在Real-time PCR仪上进行扩增,记录Ct值、扩增曲线以及溶解曲线。并相对定量计算实验结果(2-ΔΔCT)。(2)Western-blot检测Shh蛋白:提取BMSC蛋白,取10 μL蛋白样品进行10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,110 V电压电泳2 h,电泳结束后转硝酸纤维素膜,66 V转膜2 h,加封闭液室温封闭1 h后加封闭液稀释的一抗-Shh多克隆兔抗体(1:1000,美国CST公司),4℃孵育过夜,用含0.1% Triton的PBS洗膜3次,加封闭液稀释的二抗-HRP偶联的抗体IgG(1:1000,美国CST公司)室温孵育2 h,含0.1% Triton的PBS洗膜3次,加发光剂作用2 min,X线片曝光,显影,定影。(3)成骨诱导分化:(待贴壁细胞密度达到80%~90%融合时,弃掉旧培养液,每孔加入2 ml的成骨诱导分化完全培养基。平均三天换液1次,诱导分化3~4 w。诱导结束以后可以进行茜素红染色。小心轻缓弃掉培养液,加入PBS平衡液清洗。加入10%中性甲醛固定30 min。然后加入约1 ml茜素红染色5 min。弃掉染液,加入PBS平衡液清洗。使用倒置显微镜观察并拍照。倒置显微镜拍照以后使用无菌蒸馏水洗涤1遍,在每孔内加入1 mL氯化十六烷基吡啶(100 g/L, pH7.0),室温放置20 min,将溶液移入到

96孔板, 150 μL /孔, 于405 nm处使用紫外分光光度计测量吸光值。(4)ALP测定: 取各组第3代细胞按 1×10^4 /L密度接种入24孔培养板, 于7 d吸净培养基, 各组细胞以0.2% Triton X-100充分裂解, 0.1 mol/L PBS洗涤细胞3次, 12 000 r/min离心10 min, 取上清液按ALP检测试剂盒说明书进行定量检测, 于酶标仪520 nm波长处测定。

三、统计学处理

采用SPSS 15.0统计软件对数据进行统计分析。计量资料采用Kolmogorov-Smirnov检验是否符合正态分布, 符合正态分布的RT-PCR、茜素红染色、ALP检测组间比较采用两独立样本 t 检验, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。检验水准 α 值取双侧0.05。

结 果

一、转染Shh的骨髓间充质干细胞的制备

(一)BMSCs的制备

采用全骨髓贴壁培养法分离培养骨髓间充质干细胞, 倒置显微镜可见: SD大鼠骨髓间充质干细胞原代培养24 h后开始有细胞贴壁, 多呈圆形、梭形和多角形, 大小形态不一, 通过多次换液可以去除未贴壁的杂质细胞。72 h完全换液后贴壁细胞数量增多, 3~4 d可以看到放射状排列的细胞集落。第5天后骨髓间充质干细胞数量迅速扩增, 6~7 d细胞呈成纤维集落生长, 融合80%~90%, 呈长梭形。悬浮细胞多次换液以后, 绝大部分已被清除, 留下相对单一的骨髓间充质干细胞。经过2次传代后, 第3代细胞24 h完全能够贴壁生长。细胞形态单一, 细胞形态以梭形细胞为主, 呈放射状细胞集落单位排列, 细胞生长良好, 细胞生长能力旺盛。5 d左右可传代1次(图1~3)。

(二)DsRed-BMSCs与Shh-DsRed-BMSCs的制备

构建DsRed与DsRed-Shh重组慢病毒载体, 经酶切及测序鉴定完全正确, 能够转染293T细胞并表达, 滴度为 1.2×10^8 TU/ml, 荧光显微镜下观察: 转染

DsRed与DsRed-Shh的BMSCs 5日后红色荧光蛋白表达显著增强(图4~5), 转染效率均为90%以上。

二、Shh基因转染效果的鉴定

1. RT-PCR结果: 转染48 h后各组RT-PCR结果显示, 同未转染Shh的骨髓间充质干细胞($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值为 1.000 ± 0.020)相比, Shh慢病毒感染BMSCs($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 值为 35071 ± 2975)能持续稳定高水平表达Shh mRNA(图6)。

2. Western-blot检测Shh蛋白: 未转染Shh的骨髓间充质干细胞组Shh蛋白几乎不表达, Shh慢病毒感染BMSCs后能持续稳定高水平表达Shh蛋白(图7)。同Shh-BMSCs的mRNA结果一致, 这说明慢病毒Shh转染骨髓间充质干细胞成功。

三、成骨诱导分化效果

1. 茜素红染色: 在成骨诱导分化28 d后, 可以观察到茜素红染色呈红色结节, A组吸光度值为 0.054 ± 0.008 , B组吸光度值为 0.103 ± 0.007 。Shh慢病毒感染BMSCs后的红色结节要明显高于未转染BMSCs组(图8~10), 表明BMSCs在Shh持续作用下成骨分化能力明显高于BMSCs组。

2. ALP检测结果: 培养后7 d, ALP活性定量检测A组为 0.131 ± 0.005 , B组为 0.205 ± 0.008 , 差异有统计学意义($t=17.665$, $P<0.05$), 转染Shh的BMSCs的ALP活性要明显高于未转染的BMSCs(图11)。表明BMSCs在Shh持续作用下已逐步向成骨细胞分化, 成骨能力明显高于BMSCs组。

讨 论

一、骨质疏松的发病机制和筋膜学说

骨质疏松的发病机制非常复杂, 目前学术界普遍认为: 骨质疏松为骨组织的代谢出现平衡问题, 主要为骨吸收增加而骨形成不足导致的一种代谢性疾病^[4]。因此, 如何能促进骨形成, 进而增加骨量, 实现逆转负平衡, 是治疗骨质疏松的关键所在。原林教授最近提出的“筋膜学说”^[5-6]观点认为: 人体是由

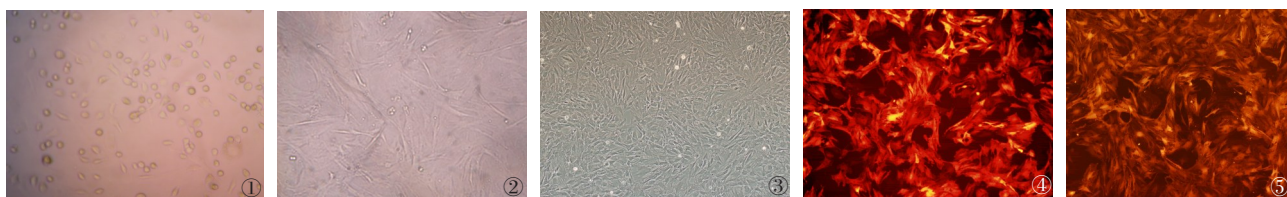


图1~3 BMSCs的形态学观测。图1 原代BMSCs培养72 h(100 \times); 图2 原代BMSCs培养7 d(100 \times); 图3 第3代BMSCs培养5 d(100 \times) 图4~5 慢病毒载体转染BMSCs 5 d后。图4 DsRed-BMSCs($\times 100$); 图5 Shh-DsRed-BMSCs($\times 100$)

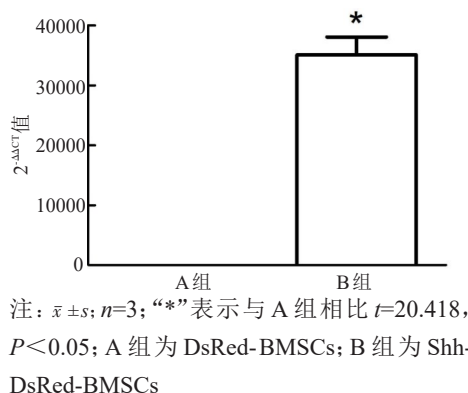


图6 Shh基因的mRNA的表达

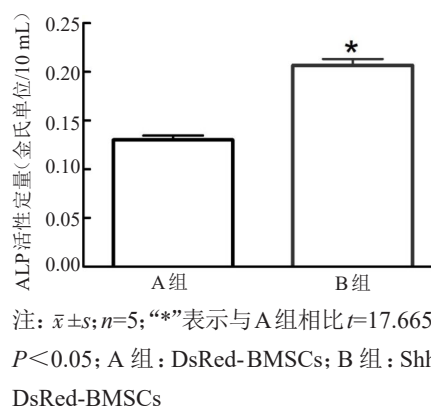


图11 两组ALP活性定量检测比较

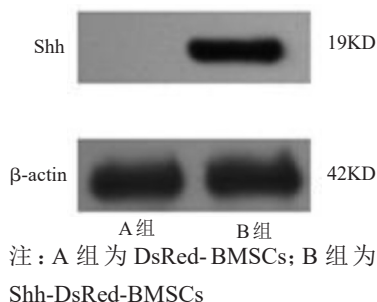


图7 Shh-BMSCs中Shh蛋白的表达情况

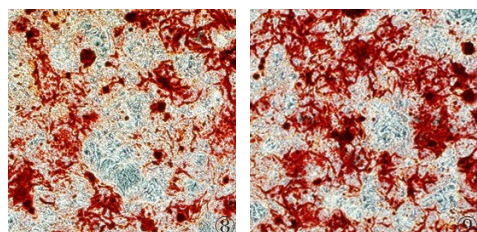


图8~9 两组成骨诱导分化28 d后茜素红染色情况。图8 A组茜素红染色情况($\times 100$); 图9 B组茜素红染色情况($\times 100$)

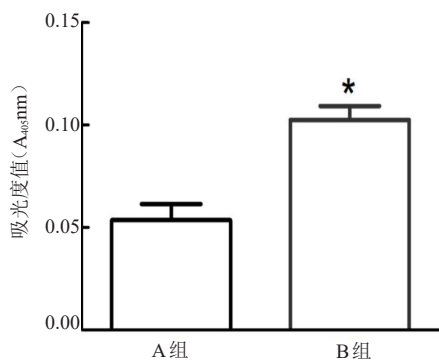


图10 两组成骨诱导分化28 d后茜素红染色吸光度值的比较

支持与储备系统和功能系统所构成。支持与储备系统是由未分化的非特异性结缔组织(筋膜)支架所组成,而功能系统主要是被该支架支持与包绕的已分化的功能细胞。通过动员非特异性结缔组织支架中尚未分化的干细胞,可以为功能系统中功能细胞的更新换代和物质代谢提供源源不断的细胞源泉和营养物质。因此,在成骨条件下,通过增加非特异性结缔组织中未分化的间充质干细胞,促使间充质干细胞向成骨方向定向分化,使成骨细胞数量增加,骨形成增加,可为骨质疏松的治疗提供新的思路和方法。

二、Shh在转基因干细胞中的成骨作用

BMSCs是骨髓内具有多向增殖分化潜能的非造血干细胞,近年来随着骨髓间充质干细胞分离、培养、转染、分化等技术的发展,骨髓间充质干细胞移植治疗骨质疏松是目前医学界研究热点之一。骨髓间充质干细胞具备以下优势:良好的增殖和分化能力,来源非常广泛、容易获得和培养、低免疫排斥反应、不涉及伦理问题。可以作为细胞移植和基因治疗的理想载体^[7]。国外学者Lien等^[8]首次发现了移植异体骨髓间充质干细胞后,可以促使骨质疏松小鼠的骨量和骨强度均恢复明显。BMSCs治疗骨质疏松的机制可能为BMSCs具备成骨分化能力,导致成骨细胞增多,骨量增加。但是BMSCs的成骨分化能力有限,进而极大程度上限制了骨质疏松的治疗效果。

Hedgehog信号通路在调控骨形成以及促进成骨分化方面是一条关键的信号通路,Shh在Hedgehog家族中具有最广泛表达,是Hedgehog通路中的启动因子,在该信号传导通路上起主要作用^[9-10]。Shh可以促进多种细胞的成骨分化,而抑制其成脂作用。Foppiano等^[11]用Shh诱导骨髓间充质干细胞向成骨

细胞转化过程中发现:ALP的活性表达增加,成骨细胞表型为阳性。有实验表明^[12-13]:用Shh处理多能间充质干细胞发现ALP表达增强,同时Hedgehog信号通路中的必需受体Ptc、Smo以及靶基因Gli的表达明显增强,成骨标记基因骨钙素的表达水平升高,这种成骨分化的增强主要是通过上调骨形成蛋白发生的。说明Shh信号通路参与促进多能间充质干细胞成骨分化的过程。在Shh通路出现异常的时候可以导致相关的骨骼疾病,如史李欧综合征等^[14]。Shh是成骨细胞分化早期的关键信号之一,成骨细胞成熟后,Hedgehog信号逐渐减弱并在成骨细胞分化的晚期出现抑制作用^[15]。因此如果在成骨分化的早期,Shh基因能够持续表达,便可以极大程度上促进成骨分化,但是Shh蛋白直接注射治疗半衰期短,很难产生持久的成骨作用。在本实验中使用Shh基因慢病毒稳定转染BMSCs,可以持续稳定的分泌Shh,Shh反作用于BMSCs,极大程度上促进BMSCs的成骨分化能力。此外,Shh不仅可以促进成骨的分化,还可以上调VEGF和bFGF等蛋白的表达^[16],间接增强Shh的成骨作用,在机体成骨过程中,可促进骨形成和新生血管形成,增强骨质疏松的治疗效果。

本实验成功构建了携带Shh和DsRed基因的慢病毒载体,并用其做介导成功将Shh基因整合到SD大鼠的BMSCs染色体上。DsRed示踪转染效果显示,24 h的转染效率约90%。Shh mRNA表达是Shh表达的前提,本实验通过RT-PCR检测到mRNA的表达,有效证明了Shh基因转染成功,随后通过Western-blot成功检测到Shh蛋白的高表达。通过茜素红染色,发现在成骨诱导分化28 d后,可以观察到Shh-DsRed-BMSCs组红色结节要明显高于DsRed-BMSCs组,这说明Shh-DsRed-BMSCs组的成骨分化能力明显高于DsRed-BMSCs。ALP是成骨细胞的功能酶,ALP的高低可反应成骨分化程度,其活性程度越高,成骨分化能力越强。Shh基因成功表达后,ALP检测结果表明,Shh-DsRed-BMSCs组中BMSCs逐步向成骨细胞分化,同传统诱导的BMSCs相比,ALP活性明显增高,进一步说明转Shh基因的BMSCs在成骨分化方面具有明显优势。

参 考 文 献

- 1 Migliaccio S, Brama M, Malavolta N. Management of glucocorticoids- induced osteoporosis: role of teriparatide [J]. Ther Clin Risk Manag, 2009, 5(2): 305-310.
- 2 Adler RA. Glucocorticoid-induced osteoporosis: management update [J]. Curr Osteoporos Rep, 2010, 8(1): 10-14.
- 3 Ma XL, Zhang XE, Jia YF, et al. Dexamethasone induces osteogenesis via regulation of hedgehog signalling molecules in rat mesenchymal stem cells [J]. Int Orthop, 2013, 37(7): 1399-1404.
- 4 Das S, Crockett JC. Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment [J]. Drug Des Devel Ther, 2013, 7: 435-447.
- 5 原林, 王军, 王春雷, 等. 人体内新的功能系统--支持储备及自体监控系统新学说 [J]. 科技导报, 2006, 24(6): 85-89.
- 6 Bai Y, Yuan L, Soh KS, et al. Possible applications for fascial anatomy and fasciaology in traditional Chinese medicine [J]. J Acupunct Meridian Stud, 2010, 3(2): 125-132.
- 7 张晓玲, 戴冠戎, 汤亭亭, 等. 未分化骨髓间充质干细胞的免疫学特性研究 [J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(2): 135-137.
- 8 Lien CY, Ho KC, Lee OK, et al. Restoration of bone mass and strength in Glucocorticoid-Treated mice by systemic transplantation of CXCR4 and cbfa-1 Co-Expressing mesenchymal stem cells [J]. J Bone Miner Res, 2009, 24(5): 837-848.
- 9 Soltanoff CS, Yang S, Chen W, et al. Transient inhibition of the hedgehog pathway in young mice causes permanent defects in bone structure [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2009, 19(1): 1-46.
- 10 Blank U, Karlsson G, Karlsson S. Signaling pathways governing stem-cell fate [J]. Blood, 2008, 111(2): 492-503.
- 11 Foppiano S, Hu D, Marcucio RS, et al. Signaling by bone morphogenetic proteins directs formation of an ectodermal signaling center that regulates craniofacial development [J]. Dev Biol, 2007, 312(1): 103-114.
- 12 Spinella-Jaegle S, Rawadi G, Kawai S, et al. Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation [J]. J Cell Sci, 2001, 114(11): 2085-2094.
- 13 Ingram WJ, Wicking CA, Grimmond SM, et al. Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells [J]. Oncogene, 2002, 21(53): 8196-8205.
- 14 Shefer S, Salen G, Batta AK, et al. Markedly inhibited 7-dehydrocholesterol delta 7-reductase activity in liver microsomes from Smith-Lemli-Opitz homozygotes [J]. J Clin Invest, 1995, 96(4): 1779-1785.
- 15 Beloti MM, Bellesini LS, Rosa AL. Purmorphamine enhances osteogenic activity of human osteoblasts derived from bone marrow mesenchymal cells [J]. Cell Biol Int, 2005, 29(7): 537-541.
- 16 Cai J, Huang Y, Chen X, et al. [Regulation of sonic hedgehog on vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor expression and secretion in bone marrow mesenchymal stem cells] [J]. Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2012, 26(1): 112-116.

(收稿日期:2018-06-19)

(本文编辑:吕红芝)