

环氧酶2基因沉默不影响人骨髓间充质干细胞定向分化的能力

赫天¹, 张海宁¹, 项金瑜², 刘相萍³, 邓继红⁴, 王英振¹ (青岛大学医学院附属医院, ¹山东省创伤骨科研究所, 关节外科, ³中心实验室, 山东省青岛市 266003, ²青岛大学附属烟台毓璜顶医院肿瘤科, 山东省烟台市 264000; ⁴双鸭山市人民医院检验科, 黑龙江省双鸭山市 55100)

文章亮点:

实验的创新性在于应用慢病毒为载体将环氧酶2基因转染人骨髓间充质干细胞, 在基因和蛋白层面证实环氧酶2基因在转染后的人骨髓间充质干细胞中得到抑制并长期、稳定表达, 且对人骨髓间充质干细胞定向分化能力的无明显影响。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 人骨髓间充质干细胞; 重组慢病毒; 环氧酶2基因; 基因沉默; 成脂分化; 成骨分化; 成软骨分化; 国家自然科学基金

主题词:

干细胞; 间质干细胞; 环氧酶2; 基因

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81171774, 81272056)

摘要

背景: 目前环氧酶2基因沉默在干细胞中的研究还处在初级阶段。

目的: 构建携带环氧酶2基因沉默的慢病毒载体, 观察其在人骨髓间充质干细胞中的表达, 以及其定向分化潜能变化情况。

方法: 应用重组慢病毒技术构建携带沉默环氧酶2基因和绿色荧光蛋白的慢病毒载体, 并用其转染体外培养第3代的人骨髓间充质干细胞, 以无目的基因的慢病毒转染人骨髓间充质干细胞的实验组和未做处理的人骨髓间充质干细胞分别作为阴性对照组和空白组进行对比。转染后7d分别提取各组细胞的总RNA和蛋白检测环氧酶2表达量。对环氧酶2基因沉默的人骨髓间充质干细胞和正常人骨髓间充质干细胞定向诱导, 观察环氧酶2基因沉默对人骨髓间充质干细胞成脂、成骨、成软骨能力的影响。

结果与结论: 慢病毒转染3d后, 荧光显微镜下可见人骨髓间充质干细胞发出绿色荧光, 阴性对照组转染效率可达90%以上, 实验组转染效率达85%以上。RT-PCR和Western blot检测结果显示, 环氧酶2基因在人骨髓间充质干细胞中的基因水平和蛋白水平均得到了明显抑制。环氧酶2基因转染对人骨髓间充质干细胞成脂、成骨、成软骨能力无明显影响。

赫天, 张海宁, 项金瑜, 刘相萍, 邓继红, 王英振. 环氧酶2基因沉默不影响人骨髓间充质干细胞定向分化的能力[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(14):2140-2146.

Cyclooxygenase 2 silencing has no effects on oriented differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells

He Tian¹, Zhang Hai-ning¹, Xiang Jin-yu², Liu Xiang-ping³, Deng Ji-hong⁴, Wang Ying-zhen¹ (¹Department of Joint Surgery, Shandong Institute of Orthopaedics and Traumatology, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China; ²Department of Oncology, Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai 264000, Shandong Province, China; ³Central Laboratory, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China; ⁴Department of Clinical Laboratory, Shuang Yashan People's Hospital, Shuangyashan 155100, Heilongjiang Province, China)

Abstract

BACKGROUND: At present, research on cyclooxygenase 2 silencing in human bone marrow mesenchymal stem cells is at preliminary stage.

OBJECTIVE: To construct the lentivirus vector, and then to observe the expression and effects of cyclooxygenase 2 silencing in the oriented differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: In the present study, the recombinant lentiviral vectors carrying silencing of cyclooxygenase 2 gene and green fluorescent protein were constructed with recombinant lentiviral technology, and then we knocked down cyclooxygenase 2 expression in human bone marrow mesenchymal stem cells through lentivirus infection *in vitro* (Lenti-ShCOX-2 group). The human bone marrow mesenchymal stem cells transfected with single lentivirals served as Lenti-Shcontrol group. The human bone marrow mesenchymal stem cells with no treatment served as blank control group. At 7 days after transfection, the total RNA and protein were extracted from each

赫天, 男, 1985年生, 黑龙江省哈尔滨市人, 满族, 2014年青岛大学毕业, 硕士, 主要从事骨科的基础与临床研究。

通讯作者: 王英振, 硕士, 博士生导师, 青岛大学医学院附属医院关节外科, 山东省青岛市 266003

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.14.002
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)14-02140-07

稿件接受: 2014-02-22

He Tian, Master, Department of Joint Surgery, Shandong Institute of Orthopaedics and Traumatology, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Corresponding author: Wang Ying-zhen, Master, Doctoral supervisor, Department of Joint Surgery, Shandong Institute of Orthopaedics and Traumatology, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Accepted: 2014-02-22

group for detection. The adipogenic, osteogenic, chondrogenic differentiation capacities of these cells were assessed *in vitro*.

RESULTS AND CONCLUSION: After transfected with lentivirus vector for 3 days, we observed the green fluorescence from human bone marrow mesenchymal stem cells with cyclooxygenase 2 silencing under the fluorescence microscope, and the transfection efficiency was over 90% in the Lenti-Shcontrol-2 group and over 85% in Lenti-ShCOX-2 group. We confirmed the successful down-regulation of cyclooxygenase 2 at the mRNA and protein levels in human bone marrow mesenchymal stem cells through lentivirus infection. These findings indicate that cyclooxygenase 2 infection cannot inhibit the differentiation capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells.

Subject headings: stem cells; mesenchymal stem cells; cyclooxygenase 2; genes

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81171774, 81272056

He T, Zhang HN, Xiang JY, Liu XP, Deng JH, Wang YZ. Cyclooxygenase 2 silencing has no effects on oriented differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(14):2140-2146.

0 引言 Introduction

基因治疗是随着DNA重组技术的成熟而发展起来的,它是当代医学和生物学的一个新的研究领域^[1-2],可通过一定方式将正常基因或有治疗作用的DNA序列导入靶细胞以纠正基因的缺陷或发挥治疗作用,从而达到治疗疾病的目的。

近年来,基因治疗已成为生物医学和组织工程学重要的研究方向,种子细胞的选择显然是最关键的环节。1966年Friedenstein等^[3]从骨髓中分离出了这种细胞命名为间充质干细胞,并证明其具有多向分化的潜能,可以形成克隆。1999年Pittenger等^[4]从人骨髓中分离出了有多向分化潜能的间充质干细胞,体外实验证实其具有向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞分化的能力。骨髓间充质干细胞增殖能力强,基因修饰后保持原有多潜能性的同时可持续稳定表达外源基因^[5-8];体外转染和培养一段时间移植至体内仍可存活,并能够迁移至病变部位,对恶性肿瘤、自身免疫性疾病到多种难治性遗传性疾病的治疗,移植适用范围也在不断扩大,挽救了大量患者的生命,因而其成为基因治疗研究领域令人关注的靶细胞。

骨性关节炎是一种以关节软骨的变性、破坏及骨质增生为特征的慢性关节病。软骨细胞合成和分解活动的调节失衡,导致了细胞外基质成分的进行性丢失和软骨细胞结构和功能的破坏^[9]。促炎症细胞因子的释放对滑膜炎的发展、软骨基质的破坏具有重要作用,其中最重要的是白细胞介素1、肿瘤坏死因子 α 等细胞因子。软骨细胞可以分泌白细胞介素1、肿瘤坏死因子 α 等细胞因子。白细胞介素1可以通过激活多个激酶系统而活化转录调节因子,促使环氧合酶2 mRNA转录和蛋白质合成,促进花生四烯酸转化成前列腺素E2。肿瘤坏死因子 α 水平升高^[10],可直接诱导软骨细胞表达环氧合酶2,将花生四烯酸转化成前列腺素E2,促进软骨细胞合成前列腺素E2和多种胶原酶,使基质降解加速^[11-13]。在关节软骨组织中环氧合酶2表达增加,前列腺素E2合成增加,伴随的产生自由基、活性氧等毒性物质对关节软骨细胞起了破坏作用。促炎症细胞因子通过调节转录因子活性促进环氧合酶2转录和表达。

越来越多研究结果表明,环氧合酶2的表达在炎症反

应、肾脏功能、血小板聚集、生殖过程、中枢神经系统功能、癌症的发生与发展中发挥重要作用。在炎症反应方面,传统的观念认为环氧合酶2主要与炎症发生有关。然而,最近的一些研究显示环氧合酶2在炎症的开始和治疗阶段均有作用,即早期启动炎症反应而后期有助于炎症恢复。环氧合酶是花生四烯酸合成前列腺素的限速酶,起始因子触发细胞的炎症反应。环氧合酶为异构酶,存在稳定表达型环氧合酶I和可诱导型环氧合酶I两种^[14-16]。近年来的研究证实,环氧合酶2不仅在在在一些损伤性疾病、炎症性疾病以及多种肿瘤细胞中高表达^[17-20],而且在骨性关节炎软骨炎症持续进展和关节的破坏方面起到了重要作用^[21-22]。

目前,利用慢病毒为载体在肿瘤细胞中抑制环氧合酶2基因表达的研究已较为完善,但以人骨髓间充质干细胞为靶细胞,抑制环氧合酶2基因的研究在国内、外同类研究中还数首次,实验利用携带环氧合酶2基因沉默的重组慢病毒转染人骨髓间充质干细胞,应用RT-PCR和Western blot检测转染后人骨髓间充质干细胞中环氧合酶2基因的表达,并观察其对定向分化潜能的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机分组,体外对比观察,细胞学实验。

时间和地点: 于2013年4月至10月在青岛大学医学院附属医院中心实验室完成。

材料:

慢病毒载体介导的环氧合酶2基因沉默对干细胞定向分化能力影响实验用试剂:	
试剂	来源
胎牛血清、无血清 α MEM培养基	Gibco公司
胰蛋白酶、成骨诱导液、成脂诱导液	Sigma公司
Trizol、RT-PCR试剂盒、目的引物、内参引物	TaKaRa 公司提供
环氧合酶2 一抗	Abcam公司
DNA Maker	北京百泰克生物公司
辣根过氧化物酶标记的二抗	北京博奥森公司

骨髓来源: 骨髓捐助者12名, 平均年龄(42.0±11.6)岁, 其中男7名, 女5名, 全部来自青岛大学医学院附属医院。所有的捐赠者经过严格筛选, 否认家族性遗传病、传染病及血液疾病, 研究方案经青岛大学医学院的附属医院伦理委员会批准。所有患者均签署了知情同意书。

实验方法:

人骨髓间充质干细胞的分离与培养: 按标准骨髓穿刺程序, 从自愿捐献者髂后上棘处抽取骨髓10 mL, 用等量的PBS稀释, 按2:1比例加在1.077 g/mL Ficoll淋巴细胞分离液上, 1 500 r/min离心25 min, 取中间白膜层, 用PBS洗涤(800 r/min ×5 min)2遍, 计数, 以 5×10^5 个细胞接种于完全培养液(含体积分数15%胎牛血清的 α -MEM培养液, 终浓度为100 U/mL青、链霉素)中, 吹打均匀, 种植于25 cm²培养皿中, 置于体积分数5%CO₂、37 °C培养箱中培养, 此为原代细胞。24 h半量换液, 48 h全量换液, 去除未贴壁悬浮细胞, 以后每隔1 d换液1次, 7 d后, 细胞融合度达到80%–90%, 用2.5 g/L胰酶消化细胞, 调整细胞浓度至 5×10^5 L⁻¹分瓶接种, 按1:2或1:3比例进行传代接种培养继续培养, 收集第3代细胞^[12]。

人骨髓间充质干细胞鉴定: 人骨髓间充质干细胞表型鉴定参考文献[23]的方法进行。

慢病毒载体构建: 从GenBank中查找人源环氧化酶2序列号(NM_000963), 根据Ambion公司软件设计合成4对环氧化酶2基因shRNA序列(表1)。通过GenBank数据库进行BLAST分析及预实验, 确定干扰靶序列siRNA为shCOX2-2, 设计合成含有酶切粘端正向和互补的两对shRNA序列, 退火后得到的两条含两种shRNA的寡核苷酸双链, 与Hpa I和Xho I双酶切pGCL-GFP载体连接、转化, 挑选阳性克隆行PCR鉴定及测序。

慢病毒包装及滴度测定: 取对数生长期293T细胞, 调整细胞浓度为 5.0×10^8 L⁻¹。Opti-MEM培养基稀释pLV/helper-SL3、pLV/helper-SL4和pLV/helper-SL5载体, 脂质体Lipofectamine2000介导下感染293T细胞, 培养8 h后换完全培养基继续培养48 h, 收集上清液, 过滤, 4 000×g离心15 min浓缩, 分装后-80 °C保存。取其中1支进行浓度滴定, 滴定方法如下: 取出分装冻存的293T细胞接种于96

孔板中, 每孔 5.0×10^4 个细胞, 体积为100 μ L。24 h后将96孔板每孔吸去90 μ L α -MEM培养基, 加入90 μ L 含病毒原液分别为10, 1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ μ L的病毒颗粒稀释液。培养48 h后, 更换为完全培养基, 倒置荧光显微镜下观察带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的细胞数量。每孔绿色荧光蛋白细胞数量除以该孔病毒原液量即为病毒滴度。

实验分组与目的基因转染: 基因转染分为3组: 人骨髓间充质干细胞组(空白组)、不含目的基因的慢病毒载体转染组(阴性对照组)、环氧化酶2基因沉默转染组(实验组)。将第3代人骨髓间充质干细胞将细胞以2.5 g/L胰酶消化分离, 计数, 以相同的细胞数量分别接种于3个6孔板中, 每孔加入相同完全培养液2 mL, 24 h后各孔培养液先予不含胎牛血清的培养基冲洗2遍, 根据每孔细胞数量、感染复数值计算各孔需要加入的带有目的基因或无目的基因的慢病毒量(病毒滴度为 1×10^8 UT/mL), 先在各组中分别加入无血清、无青、链霉素的 α -MEM培养液, 再将所需的病毒分别加入各孔培养液中, 轻微摇匀, 使病毒液与细胞充分接触, 置于37 °C、体积分数5%CO₂饱和湿度的孵箱中培养, 12–24 h移去病毒液, 加入完全培养基, 常规培养, 待细胞达到80%融合时传代。

转染3 d后取各转染组细胞放至荧光显微镜下观察细胞荧光。测算感染复数值及转染效率。

RT-PCR 检测环氧化酶2基因在各组中的表达: 取病毒转染后7 d的各组人骨髓间充质干细胞, Trizol法提取细胞总RNA, 测定RNA浓度, 反转录试剂盒对1 μ g的RNA进行反转录获得cDNA, 以cDNA为模板, PCR扩增目的片段。环氧化酶2基因上游引物: 5'-GGT TGC TGG TGG TAG GAA TGT-3', 下游引物: 5'-GTA TTT CAT CTG CCT GCT CTG GT-3'; 内参GAPDH上游引物: 5'-CTG CAC CAC CAA CTG CTT AG-3', 下游5'-TGA AGT CAG AGG AGA CCA CC-3'。PCR反应条件: 95 °C预变性5 min, 98 °C变性10 s, 62 °C(内参60 °C)退火30 s, 72 °C延伸45 s, 38个循环(内参36个循环)。最后72 °C延伸10 min。扩增产物在琼脂糖凝胶中电泳分离后再用Quantity one 4.6软件测吸光度值来定量。

表1 环氧化酶2 基因 shRNA 序列

Table 1 shRNA sequence of cyclooxygenase 2

名称	基因序列
shCOX2-1	5'-GAT CCG GAA CGT TGT GAA TAA CAT TCT TCA AGA GAG AAT GTT ATT CAC AAC GTT CCT TTT TTG-3' 5'-AAT TCA AAA AAG GAA CGT TGT GAA TAA CAT TCT CTC TTG AAG AAT GTT ATT CAC AAC GTT CCG-3'
shCOX2-2	5'-GAT CCG CTC CGG ACT AGA TGA TAT CAT TCA AGA GAT GAT ATC ATC TAG TCC GGA GCT TTT TTG-3' 5'-AAT TCA AAA AAG CTC CGG ACT AGA TGA TAT CAT CTC TTG AAT GAT ATC ATC TAG TCC GGA GCG-3'
shCOX2-3	5'-GAT CCG CTT TAT GCT GAA GCC CTA TGT TCA AGA GAC ATA GGG CTT CAG CAT AAA GCT TTT TTG-3' 5'-AAT TCA AAA AAG CTT TAT GCT GAA GCC CTA TGT CTC TTG AAC ATA GGG CTT CAG CAT AAA GCG-3'
shCOX2-4	5'-GAT CCG GTT GCT GGT GGT AGG AAT GTT TCA AGA GAA CAT TCC TAC CAC CAG CAA CCT TTT TTG-3' 5'-AAT TCA AAA AAG GTT GCT GGT GGT AGG AAT GTT CTC TTG AAA CAT TCC TAC CAC CAG CAA CCG-3'
阴性对照	GAT CCG TTC TCC GAA CGT GTC ACG TTT CAA GAG AAC GTG ACA CGT TCG GAG AAC TTT TTT G AAT TCA AAA AAG TTC TCC GAA CGT GTC ACG TTC TCT TGA AAC GTG ACA CGT TCG GAG AAC G

Western blot 检测环氧化酶2 蛋白的表达: 取病毒转染后7 d的各組细胞, 用PBS冲洗3遍, PBS重悬洗涤离心, 收获细胞。细胞沉淀加入RIPA裂解液和PMSF蛋白酶抑制剂混合液(100:1)冰上裂解1 h, 超声裂解, 12 000 r/min, 4 °C离心10 min, 取上清液加入上样缓冲液95 °C水浴10 min。-80 °C保存。比色法测定蛋白浓度, 定量上样进行8%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳1.5-2.0 h。转膜后加一抗稀释液(1:500) 4 °C过夜, 第2天PBS-T洗膜, PBS-T洗膜10 min×3次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000)在37 °C孵育1 h, PBS-T洗膜5 min×3次, 1×PBS洗膜5 min×3次, 化学发光试剂显色1 min左右, 置于暗盒内, 显影、定影后曝光。以 β -actin作为内参对照。应用Quantity one 4.6软件测量各条带的吸光度值。

人骨髓间充质干细胞与环氧化酶2基因沉默人骨髓间充质干细胞成脂、成骨、成软骨定向诱导分化的比较:

实验分组: 将不加诱导液的细胞设为空白组, 加入定向诱导液的人骨髓间充质干细胞和环氧化酶2基因沉默的人骨髓间充质干细胞分别设为对照组和实验组。

成脂诱导分化: 待各組细胞达到80%-90%融合时, 使用胰酶消化, 分组接种于96孔板中, 每孔约 1×10^3 个细胞, 加入完全培养液。37 °C、体积分数为5% CO₂孵箱中培养; 待细胞达到70%-80%融合时, 空白组加入完全培养液, 其他各組加入成脂细胞诱导液(基础培养液 α -MEM、体积分数为10%胎牛血清、1%青、链霉素、100 nmol/L 地塞米松、50 mg/L维生素C及60 μ mol/L吡哆美辛), 每周换液2次。2周后吸去诱导液, 以PBS冲洗2次, 各孔加入40 g/L多聚甲醛, 室温固定30 min; 吸去固定液, PBS洗数次, 加入0.5%油红O染色液数滴, 染色30 min; 去除染色液及其残渣, 用PBS清洗2-5次; 倒置显微镜下观察。

成骨诱导分化: 当各組细胞达80%-90%融合时, 胰酶消化接种于96孔板中, 每孔约 1×10^3 细胞, 加完全培养液。待细胞达到70%-80%融合时, 移去旧培养液, 空白组加入完全培养液, 其他组加等量诱导液(基础培养液 α -MEM、体积分数10%胎牛血清、1%青、链霉素、100 nmol/L 地塞米松、50 mg/L维生素C及10 mmol/L β -甘油磷酸钠)。每周换液2次, 诱导3周。3周后, 吸去原诱导液, PBS洗2次; 各孔加入40 g/L多聚甲醛室温固定30 min; 吸去固定液, PBS清洗, 加入0.1%茜素红染色液数滴染色15 min; 用PBS洗2-5次后倒置显微镜观察。

成软骨诱导分化: 当各組细胞达到80%-90%融合时, 胰酶消化接种于96孔板中, 每孔约 1×10^3 个细胞, 加入完全培养液, 24 h后弃去培养液, 除空白组外每孔加入成软骨诱导液(基础培养液 α -MEM、体积分数为10%胎牛血清、1%青、链霉素、10 μ g/L转化生长因子 β 1、100 nmol/L 地塞米松、6.25 mg/L 胰岛素、50 nmol/L 转铁蛋白)。每3 d更换1次培养液, 诱导培养3周, 弃去培养液, 各組40 g/L多聚甲醛固定30 min, 0.1%甲苯胺蓝液浸染20 min, 倒置

显微镜观察。

主要观察指标: 人骨髓间充质干细胞的形态、鉴定, 各組细胞环氧化酶2在基因以及蛋白水平的表达, 慢病毒转染后人骨髓间充质干细胞成脂、成骨、成软骨情况。

统计学分析: 由第一作者采用Quantity one 4.6软件进行吸光度分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有数据在SPSS 19.0中以独立样本t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 分离培养的人骨髓间充质干细胞的形态 干细胞悬液接种至培养瓶内, 在倒置相差显微镜下观察细胞大小不等, 呈圆形, 并伴有大量血细胞, 如沙砾状, 4-6 h后细胞完全贴壁, 24h后半量换液, 可见少部分圆形、椭圆形细胞贴壁, 可见较多漂浮不贴壁细胞(图1)。

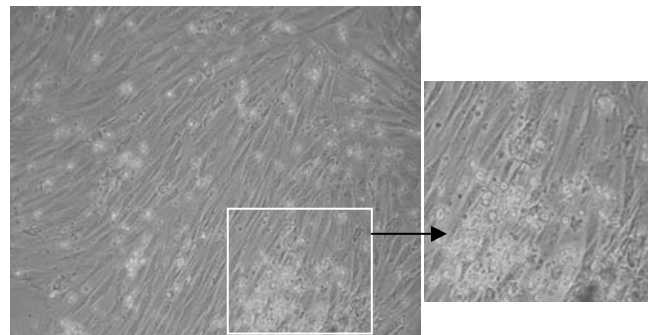


图1 原代培养人骨髓间充质干细胞第6天(倒置显微镜, $\times 100$)
Figure 1 Morphology of primarily cultured human bone marrow mesenchymal stem cells for 6 days (inverted microscope, $\times 100$)
图注: 第2次换液后细胞界限清楚, 呈成纤维样生长, 可见少量杂质。

48 h以后贴壁细胞开始增大, 呈成纤维样, 平行排列或漩涡状生长, 逐渐形成散在独立的集落, 5 d左右即可形成明显集落, 七八天可铺满瓶底。传代1 d后细胞贴壁生长, 细胞为梭形, 类似成纤维细胞, 漩涡状或放射状生长, 平均两三天可传1代。传代3次后, 细胞基本达到纯化, 形态均一, 无杂质, 可用于后续实验。

2.2 环氧化酶2基因shRNA慢病毒载体的鉴定及其滴度 环氧化酶2基因shRNA的Oligo DNA经退火形成3对双链DNA, 经Hpa I 和Xho I 酶切、pFU-GW-siRNA载体连接、转化后, 行PCR鉴定, 挑选阳性克隆送测序, 结果与预期一致, 表明合成的环氧化酶2 shRNA Oligo DNA 序列插入正确。根据各孔的荧光表达量, 滴度为 1×10^8 TU/mL。

2.3 慢病毒载体介导的环氧化酶2基因的转染效率 每孔细胞随机取3个200倍视野对所有细胞和绿色荧光蛋白阳性细胞计数, 计算绿色荧光蛋白阳性细胞百分率, 每个感染复数的转染效率为3个视野的平均绿色荧光蛋白阳性细胞百分率。当阴性对照组、实验组感染复数为50时, 阴性对照组转染效率均可达90%, 实验组转染效率均可达85%(图2)。慢病毒转染后72 h绿色荧光达到最亮, 此后保持恒定, 光镜下细胞饱满、立体感增加, 出现较明显的病毒效应, 少部分细胞漂浮、凋亡, 贴壁细胞胞质内颗粒增多。

2.4 慢病毒转染后人骨髓间充质干细胞环氧酶2基因的表达 于转染后7 d提取各组细胞的总RNA, 进行RT-PCR检测, 结果证明相比于阴性对照组和空白组, 实验组环氧酶2基因在人骨髓间充质干细胞中低水平表达($P < 0.05$), 而空白组和阴性对照组环氧酶2基因表达量差异无显著性意义($P > 0.05$), 这说明环氧酶2基因在实验组人骨髓间充质干细胞中成功敲除(图3A)。

2.5 慢病毒转染后人骨髓间充质干细胞环氧酶2蛋白的表达 转染后7 d行Western blot检测, 在相同的实验条件下, 各组均检测到目的蛋白的表达, 实验组的吸光度明显低于空白组和阴性对照组($P < 0.05$), 结果提示, 与RT-PCR的结果相似, 实验组中环氧酶2蛋白表达量明显减低(图

3B, C)。实验证明相比于正常细胞(空白组)而言, 单纯的慢病毒载体(阴性对照组)转染对人骨髓间充质干细胞内环氧酶2的蛋白表达无影响($P > 0.05$)。

2.6 人骨髓间充质干细胞慢病毒转染前后成骨、成脂细胞诱导分化后形态学变化 成脂细胞诱导分化培养3 d后, 细胞内有少量脂滴出现并随细胞排列方向延伸, 约第10天脂质增加并融合, 细胞逐渐变为圆形, 2周左右可见大量脂质沉积, 油红O染色呈红色。成骨诱导第3周后胞质内充满颗粒, 细胞呈集落样生长, 细胞内可见钙质沉积, 随后大量钙结节形成, 经茜素红染色呈棕红色结节。成软骨诱导培养3周后, 甲苯胺蓝染色显示人骨髓间充质干细胞胞内基质均匀蓝染, 表明诱导后细胞产生了软骨细胞基质糖胺聚糖。

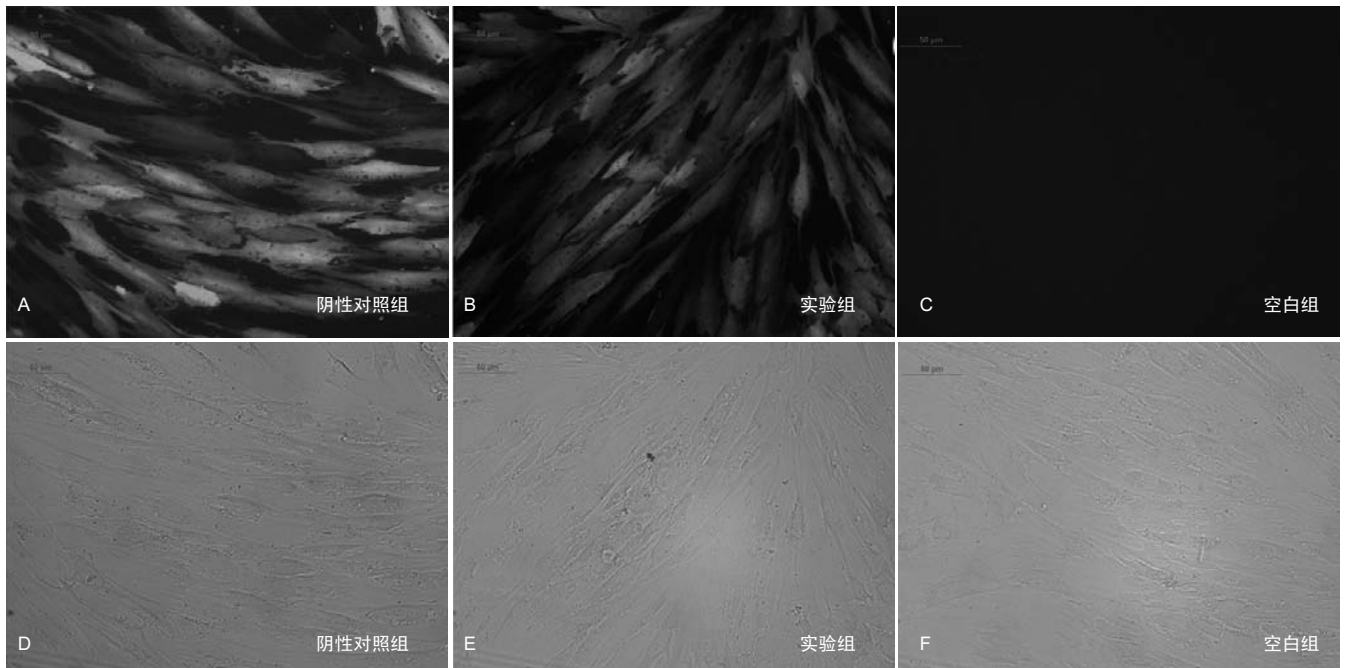


图2 慢病毒转染72 h后观察人骨髓间充质干细胞(荧光倒置显微镜, $\times 200$)

Figure 2 Observation of human bone marrow mesenchymal stem cells under a fluorescence inverted microscope 72 hours after lentiviral transfection ($\times 200$)

图注: 可见绿色荧光在细胞质和细胞核内共同表达, 阴性对照组绿色荧光表达量高于实验组, 空白组无荧光表达。

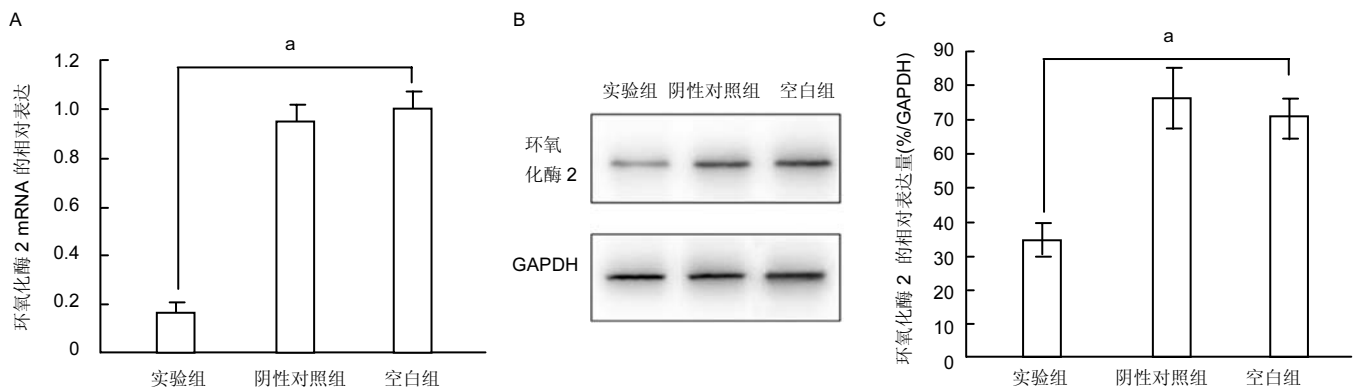


图3 实验组、阴性对照组和空白组人骨髓间充质干细胞环氧酶2 mRNA及蛋白表达结果

Figure 3 Expressions of cyclooxygenase 2 mRNA and protein in human bone marrow mesenchymal stem cells treated with Lenti-shCOX2, Lenti-shcontrol and no treatment

图注: RT-PCR 检测结果显示, 实验组环氧酶2 mRNA 表达量明显低于阴性对照组和空白组($^aP < 0.05$); Western blot 检测结果显示, 实验组环氧酶2 蛋白表达明显低于阴性对照和空白组($^aP < 0.05$)。

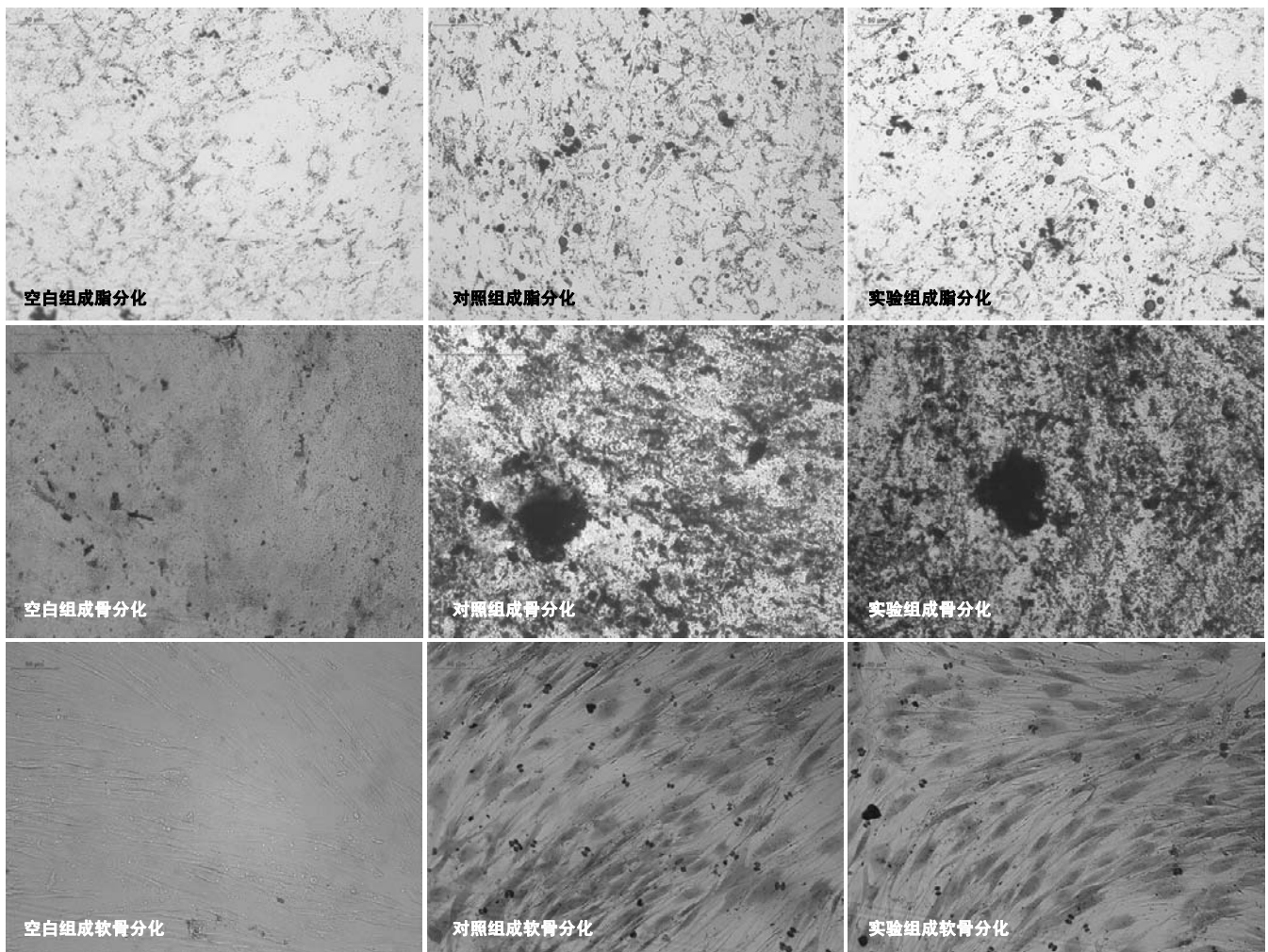


图4 空白组、实验组和对照组人骨髓间充质干细胞向成脂、成骨、成软骨分化结果(倒置显微镜, $\times 200$)

Figure 4 Inverted microscopy images of adipogenic, osteogenic, chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells treated with Lenti-shCOX2, Lenti-shcontrol and no treatment ($\times 200$)

图注: 与空白组比较, 实验组和对照组人骨髓间充质干细胞均可向成脂、成骨、成软骨分化, 两组并无明显差异。

各种诱导方式中实验组与对比组结果相同, 这说明以慢病毒为载体沉默环氧化酶2基因转染人骨髓间充质干细胞, 对其定向分化无影响。见图4。

3 讨论 Discussion

基于环氧化酶2在骨性关节炎患者关节软骨退变中的重要地位, 找到一个合适的载体则显得尤为重要。慢病毒载体用于转基因技术与传统的DNA显微注射相比具有操作简单、整合效率高、成本低廉等优点^[24-26]。高效感染处于分裂期和非分裂期的细胞; 借助慢病毒可将其携带的外源基因高效整合进宿主细胞基因组中, 外源基因可在细胞内长期稳定表达。针对这些优点, 构建了携带沉默环氧化酶2基因的慢病毒载体, 成功转染人骨髓间充质干细胞, RT-PCR和Western blot结果显示: 与对照组相比, 在RNA和蛋白水平环氧化酶2基因在实验组均得到了有效抑制, 转代后仍能稳定表达。稳定长期的基因表达对于组织工程基因治疗具有重要的临床意义。

实验验证在细胞繁殖分化的同时可持续表达目的产物,

在维持稳定的诱导环境下, 沉默的环氧化酶2基因转染人骨髓间充质干细胞后仍具有定向分化能力。这说明以慢病毒为载体的环氧化酶2基因转染对人骨髓间充质干细胞生长、增殖以及定向分化方面无影响。对于基因治疗骨关节炎患者来说, 人源的骨髓供应避免了免疫排斥反应, 环氧化酶2基因沉默的干细胞仍能成软骨分化为控制骨性关节炎患者关节炎, 延缓软骨破坏以及对软骨的修复具有重要临床意义。

根据相关学者的研究, 环氧化酶2在骨肉瘤组织中呈高表达^[27]。沉默环氧化酶2基因对骨肉瘤的抑制、调控作用, 以及肿瘤切除后长段骨缺损或骨不连造成的较为严重的骨缺损是否能利用干细胞修复都将是今后的研究重点。同时, 干细胞定向分化的潜能也可用于其他环氧化酶2高表达的肿瘤疾病, 如: 鼻咽癌、食管癌、胃癌、肝癌、结肠癌、直肠癌等, 在抑制肿瘤细胞生长的同时修复侵蚀组织, 促进组织再生。但环氧化酶2基因沉默在人骨髓间充质干细胞中对其它炎性因子的影响、如何促进组织再生、以及动物实验的可行性均有待于进一步研究。

综上所述, 深入研究环氧化酶2基因沉默的人骨髓间充

质干细胞作为种子细胞在不同组织的生理和病理作用, 尤其在骨性关节炎关节软骨修复以及新的选择性环氧化酶2抑制剂的开发都将是今后本课题重要的发展方向。

致谢: 感谢青岛大学医学院附属医院中心实验室姚如水, 刘相萍等老师在实验过程中的耐心指导及实验仪器方面的大力支持。

作者贡献: 实验设计第一作者, 实施第一、二作者, 实验评估所有作者。资料收集和成文为第一作者, 第二作者审校, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 骨髓为自愿者自愿捐助, 均签署了知情同意书。研究方案经青岛大学医学院附属医院伦理委员会批准。

学术术语: 环氧化酶-又称前列腺素内氧化酶还原酶, 是一种双功能酶, 具有环氧化酶和过氧化氢酶活性, 是催化花生四烯酸转化为前列腺素的关键酶。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Jung HS, Kwon BS, Lee SW. Tumor-specific gene delivery using RNA-targeting Tetrahymena group I intron. *Biotechnol Lett.* 2005;27(8):567-574.
- [2] Wang Y, Zeng B, Li X. Expression of human calcitonin by microencapsulated recombinant myoblasts. *Biotechnol Lett.* 2006;28(18):1453-1458.
- [3] Friedenstien AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966;16(3):381-390.
- [4] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-147.
- [5] Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008;15:109-116.
- [6] Verbruggen G, Wang J, Wang L, et al. Analysis of chondrocyte functional markers and pericellular matrix components by flow cytometry. *Methods Mol Med.* 2004;100:183-208.
- [7] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells.* 2001;19(3):180-192.
- [8] Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol.* 2004;32(5):414-425.
- [9] de Boer TN, Huisman AM, Polak AA, et al. The chondroprotective effect of selective COX-2 inhibition in osteoarthritis: ex vivo evaluation of human cartilage tissue after in vivo treatment. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17:482-488.
- [10] Kumagai K, Kubo M, Imai S, et al. The COX-2 Selective Blocker Etodolac Inhibits TNF α -Induced Apoptosis in Isolated Rabbit Articular Chondrocytes. *Int J Mol Sci.* 2013;14:19705-19715.
- [11] Alvarez-Soria MA, Herrero-Beaumont G, et al. Long-term NSAID treatment directly decreases COX-2 and mPGES-1 production in the articular cartilage of patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;16:1484-1493.
- [12] Alvarez-Soria MA, Largo R, Santillana J, et al. Long term NSAID treatment inhibits COX-2 synthesis in the knee synovial membrane of patients with osteoarthritis: differential proinflammatory cytokine profile between celecoxib and aceclofenac. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:998-1005.
- [13] Depre M, Ehrlich E, Van Hecken A, et al. Pharmacokinetics, COX-2 specificity, and tolerability of supratherapeutic doses of rofecoxib in humans. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000;56:167-174.
- [14] Depboylu C, Weihe E, Eiden LE. COX1 and COX2 expression in non-neuronal cellular compartments of the rhesus macaque brain during lentiviral infection. *Neurobiol Dis.* 2011;42:108-115.
- [15] Harrison JR, Lorenzo JA, Kawaguchi H, et al. Stimulation of prostaglandin E2 production by interleukin-1 alpha and transforming growth factor alpha in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res.* 1994;9:817-23.
- [16] Rodan SB, Rodan GA, Simmons HA, et al. Bone resorptive factor produced by osteosarcoma cells with osteoblastic features is PGE2. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981;102:1358-1365.
- [17] Debnath T, Kim da H, Lim BO. Natural products as a source of anti-inflammatory agents associated with inflammatory bowel disease. *Molecules.* 2013;18:7253-7270.
- [18] Li ZG, Wang XY, Chang JL, et al. The establishment of supramolecular immunobead real-time PCR and the identification of Cox-2 as a metastasis-related marker in colorectal carcinoma. *Oncol Rep.* 2012;28:977-84.
- [19] Wakefield AP, Ogborn MR, Ibrahim N, et al. A dietary conjugated linoleic acid treatment that slows renal disease progression alters renal cyclooxygenase-2-derived prostanoids in the Han: SPRD-cy rat. *J Nutr Biochem.* 2012;23:908-914.
- [20] Reverte V, Tapia A, Moreno JM, et al. Renal effects of prolonged high protein intake and COX2 inhibition on hypertensive rats with altered renal development. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;301:F327-33.
- [21] Ulivi V, Lenti M, Gentili C, et al. Anti-inflammatory activity of monogalactosyldiacylglycerol in human articular cartilage in vitro: activation of an anti-inflammatory cyclooxygenase-2 (COX-2) pathway. *Arthritis Res Ther.* 2011;13:R92.
- [22] Hagmann S, Moradi B, Frank S, et al. Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013;14:223.
- [23] 刘伟, 刘萌, 祝劲松, 等. 人骨髓间充质干细胞的体外培养、鉴定及成骨分化[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(14):2515-2519.
- [24] Wu B, Ma X, Zhu D, et al. Lentiviral delivery of biglycan promotes proliferation and increases osteogenic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. *J Mol Histol.* 2013;44:423-31.
- [25] Ricks DM, Kutner R, Zhang XY, et al. Optimized lentiviral transduction of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2008;17:441-50.
- [26] Lee CI, Kohn DB, Ekert JE, et al. Morphological analysis and lentiviral transduction of fetal monkey bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Ther.* 2004;9:112-23.
- [27] Liu Z, Wu XZ, Song R, et al. RNAi-mediated knockdown of cyclooxygenase2 inhibits the growth and migration of SaOS2 human osteosarcoma cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2013;93:1028-1031.