

NF-κB shRNA 转染骨髓间充质干细胞对炎症因子的影响

吴颖星 杨卿 杨开祥 叶亚平 向威 郭风劲

【摘要】 目的 鉴定 NF-κB/p65-shRNA 质粒并转染入骨髓间充质干细胞,检测靶细胞在 NF-κB 通路激活时磷酸化 NF-κB/p65 的表达。**方法** 用双酶电泳鉴定所得质粒。使用 HP 试剂将 NF-κB/p65-shRNA 质粒转染至小鼠 BMSCs,在荧光显微镜下观察绿色荧光,并且以流式细胞术检测转染效率,最后以 Western Blot 检测转染后靶细胞在炎症环境下对磷酸化 NF-κB/p65 表达的抑制情况。**结果** NF-κB/p65-shRNA 质粒酶切鉴定结果与预期一致;流式细胞术检测转染效率达到 52.76%;Western Blot 检测在炎症环境刺激下,转染后靶细胞磷酸化 NF-κB/p65 表达明显降低。**结论** 成功将 NF-κB/p65-shRNA 质粒转染至 BMSCs 中并有效表达,为进一步实验通过 BMSCs 修复和重建骨关节炎患者的软骨组织奠定基础。

【关键词】 NF-κB ;RNA;间质干细胞;骨关节炎

Effect of NF-κB shRNA transfection on expression of inflammatory cytokines in mesenchymal stem cells. WU Yingxing, YANG Qing, YANG Kaixiang, YE Yaping, XIANG Wei, GUO Fengjin. Department of Orthopaedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: GUO Fengjin, E-mail: fjguo@tjh.tjmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To identify the NF-κB/p65 plasmid and to explore the effectiveness of gene silencing in mouse bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** The plasmid was confirmed by restriction analysis and then transfected into BMSCs by HP. Fluorescence microscope and flow cytometry were used to detect the transfection efficiency. Western blotting was performed to determine the protein level of P-NF-κB/p65. **Results** The result of restriction analysis was consistent with the expected effect. Flow cytometry showed the transfection efficiency was 52.76%. BMSCs expressed a lower level of P-NF-κB/p65 in the inflammatory environment. **Conclusion** The NF-κB/p65-shRNA plasmid has been successfully transfected into BMSCs and well expressed. It will be a useful method to explore the cartilage restoration and regeneration with BMSCs in osteoarthritis patients.

【Key words】 NF-kappa B; RNA; Mesenchymal stem cells; Osteoarthritis

骨关节炎患者关节内部处于炎性环境中,所以应用骨髓间充质干细胞作为种子细胞修复受损的软骨组织异常困难^[1]。研究表明核转录因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 是炎症通路中一个关键的转录因子,介导炎症反应,刺激细胞分泌基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs) 和含血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS)等,破坏关节软骨,对骨关节炎患者软骨修复产生不利影响^[2]。RNA 干扰是一种双链 RNA(double-stranded DNA, dsRNA)分子在

mRNA 水平诱发的转录后基因沉默机制^[3],采用针对特定基因 mRNA 的某一位点设计 RNA 干扰的短发状 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 抑制基因表达。本实验针对 NF-κB 信号通路中的关键因子 p65 干扰 RNA,并重新组装到腺相关病毒载体,制成 NF-κB/p65-shRNA 质粒转染小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs),并检测转染效率以及转染后靶细胞在炎性环境中磷酸化 NF-κB/p65 的表达量,为进一步实验打下基础。

材料和方法

一、实验材料

pAAV-D (+)-U6-NF-κB/p65-shRNA-CMV-ZsGreen 质粒(NF-κB/p65-shRNA 质粒)及空白质粒(由美国匹兹堡大学骨科实验室 Dr. Bing Wang

doi:10.3969/j.issn.1674-8573.2014.02.002

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31070831)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科

通信作者:郭风劲, E-mail: fjguo@tjh.tjmu.edu.cn

惠赠)、小鼠骨髓间充质干细胞(赛业公司)、E. coli DH5 α 菌株、Xho I 内切酶、Xmn I 内切酶、Sma I 内切酶(formentas 公司)、HP 转染试剂(罗氏公司)、兔抗小鼠磷酸化 NF- κ B/p65 一抗(Cell Signaling Technology)、羊抗兔二抗(博士德公司)、胎牛血清以及 DMEM/F12 培养基、OPTIM 无血清培养基(Gibco 公司)。

二、实验方法

(一)质粒的扩增

将 NF- κ B/p65-shRNA 质粒和空白质粒分别加入感受态细菌 DH5 α 中,冰中放置 30 min;42 $^{\circ}$ C 加热 45 s,冰浴 1 min;加入 LB 培养基至 1 mL,于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 60 min;取适量转化液均匀涂于含氨苄抗生素的琼脂糖细菌培养板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

(二)质粒的提取和鉴定

取上述培养板中的单克隆菌落,转至含有 3 mL 带氨苄抗生素的 15 mL 离心管,于 37 $^{\circ}$ C、240 r/min 摇菌 8 h。取 1.5 mL 菌液按照质粒少量提取试剂盒说明书进行质粒少量提取。以 Xho I / Xmn I 双酶切、Sma I 单酶切进行质粒酶切鉴定。取 1.5 mL 菌液加入到 150 mL 含有氨苄抗生素的 LB 培养基中,于 37 $^{\circ}$ C、240 r/min 摇菌过夜,按照试剂盒说明书进行质粒大量提取,并将所得质粒进行酶切鉴定。

(三)BMSCs 培养

将液氮中小鼠骨髓间充质干细胞于 37 $^{\circ}$ C 水中迅速复温转移至 15 mL 离心管中,加入 15%胎牛血清 DMEM/F12 加 1%双抗的培养基至 5 mL,以 1 200 r/min 离心 5 min,弃上清并以上述培养基重悬细胞,转移至细胞培养瓶中,37 $^{\circ}$ C 及 5%CO $_2$ 培养,隔天换液,规律传代。

(四)质粒转染 BMSCs

细胞长至约 80%时,以 0.25%胰酶消化,细胞计数后以 1 \times 10 5 接种于 6 孔板中,并将 BMSCs 分为 NF- κ B/p65-shRNA 组(SI)、空白质粒组(VEC)、未转染组(CTR)三组,观察细胞生长并且在 60%时转染,转染前为细胞换液。取 2.5 μ g NF- κ B/p65-shRNA 质粒和空白质粒分别加入 200 μ L optim 培养基中,并且加入 6 μ L 的 HP 试剂,混匀并室温孵育 25 min 后分别加入至六孔板中。

(五)转染效率检测

转染后的 BMSCs 于 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 环境中培养 24 h,48 h 分别在荧光显微镜下观察各组的荧光表达。并于转染后 48 h 以胰酶消化细胞,以 1 200 r/min 离心 5 min 后以 PBS 重悬细胞,进行流式细

胞术检测绿色荧光表达率。

(六)Western Blot 分析沉默效果

NF- κ B/p65-shRNA 质粒和空白质粒分别感染 BMSCs 后 6 h 以及 48 h 后各换液 1 次,最后 1 次更换培养基后 8 h,加入 1 μ g/mL 的脂多糖(LPS)刺激细胞 15 min,激发 NF- κ B 炎症通道^[4]。收集细胞,以 RIPA 提取总蛋白,以每组 20 μ L 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,后转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉溶液封闭 1 h 后孵育兔抗鼠 NF- κ B/p65、兔抗鼠磷酸化 NF- κ B/p65 以及 GAPDH 抗体过夜后 TBST 洗膜 3 \times 10 min,室温孵育羊抗兔 IgG 二抗(博士德公司)1 h, TBST 洗膜 3 \times 10 min,后加 ECL 于暗室曝光。

结 果

一、双酶切鉴定(图 1)

NF- κ B/p65-shRNA 选取 2 个克隆,分别进行 Xho I 和 Xmn I 双酶切鉴定(第 2 泳道)和 Sma I 单酶切鉴定(第 4 泳道)。空白质粒选取 1 个克隆,进行 Xho I 和 Xmn I 双酶切鉴定(第 5 泳道)。电泳结果(图 1)可见,NF- κ B/p65-shRNA(第 2 泳道)在 2 000 bp 和 3 000 bp 之间出现 2 条条带,与预期 2.3 kb 和 2.7 kb 吻合,而空白质粒组(第 5 泳道)则在 5 kb 处出现 1 条条带,与预期吻合。

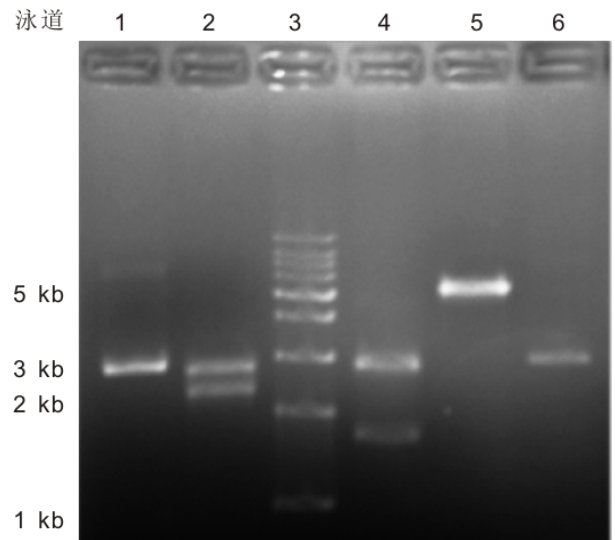


图 1 Xho I 与 Xmn I 双酶切鉴定。第 1、2 泳道分别为未酶切及 Xho I 与 Xmn I 双酶切 NF- κ B/p65-shRNA 质粒,第 3 泳道为 DNA ladder,第 4 泳道为 Sma I 单酶切 NF- κ B/p65-shRNA 质粒,第 5 泳道为 Xho I 与 Xmn I 双酶切空白质粒,第 6 泳道为未酶切空白质粒

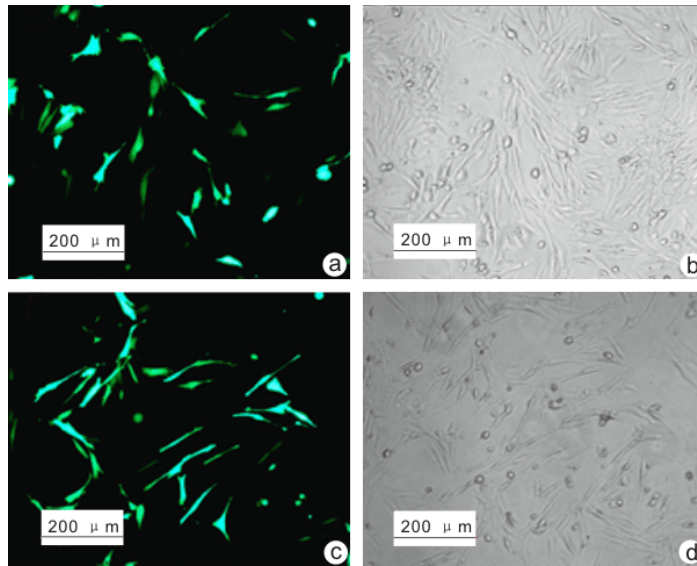


图 2 a、b 分别为转染后 24 h 荧光显微镜和光学显微镜下同一视野；c、d 为转染后 48 h 荧光显微镜和光学显微镜下同一视野

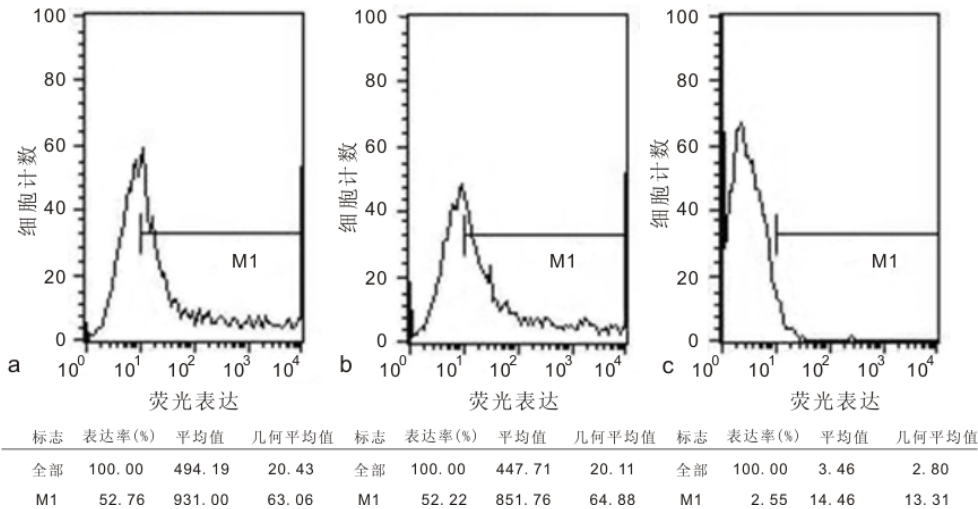


图 3 流式细胞术测定结果 a: NF-κB/p65-shRNA 组; b: 空白质粒组; c: 未转染组的绿色荧光表达阳性率, M1 为绿色荧光表达

二、HP 试剂介导质粒对 BMSCs 的转染率

NF-κB/p65-shRNA 质粒转染 BMSCs 后 24 h、48 h 在倒置荧光显微镜下看到转染 NF-κB/p65-shRNA 组有较亮的绿色荧光(图 2), 而未转染组则无可见荧光。流式细胞仪测得 NF-κB/p65-shRNA 组阳性率为 52.76%, 空白质粒组阳性率为 52.22%, 未转染组为 2.55%(图 3)。

三、Western Blot 检测 BMSCs 中 NF-κB/p65-shRNA 干扰磷酸化 NF-κB/p65 蛋白表达效果

质粒转染 BMSCs 48 h + 8 h 后在 LPS 刺激下, NF-κB/p65-shRNA 组的磷酸化 NF-κB/p65 蛋白表达量明显低于空白质粒对照组和脂质体转染组(图 4)。

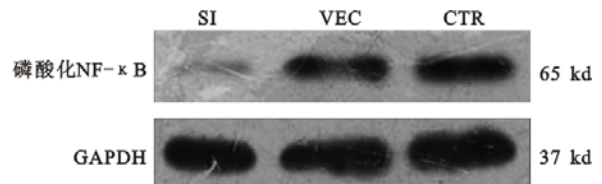


图 4 磷酸化 NF-κB/p65 蛋白量表达 SI 为 NF-κB/p65-shRNA 转染组, VEC 为空白质粒转染组, CTR 为空白对照组

讨 论

骨关节炎是一种退行性的关节疾病, 可累及关节的各个组织, 如骨、肌腱、韧带, 最终的结果是软组织的损害^[5]。软组织没有血供而自身修复能力有限

使得软骨的修复没有有效的药物治疗。手术干预可以缓解患者痛苦,但是不能提供长时间的改善。因而,以生物制品途径修复软骨组织的方法开始引起临床上的注意。在这些生物制品中,有旺盛增殖能力并且能够定向分化为软骨细胞的间充质干细胞,具有着非常广阔的前景^[6]。

在作用于组织工程治疗骨关节炎时,BMSCs 移植到患者受损的软骨组织之后需要在关节内的炎症环境中分化为软骨细胞。但是在炎症环境中炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF- α)能够激活 NF- κ B,进一步抑制 Sox9 的表达,从而抑制 BMSCs 的软骨分化^[7]。同时 IL-1 β 可以通过 NF- κ B 介导刺激细胞分泌 MMPs、ADAMTS 等而引起软骨组织的损害^[2]。所以 NF- κ B 是炎症因子损伤软骨和损害组织工程治疗效果的关键环节。

在经典 NF- κ B 通路中^[8-10],I κ B 和 NF- κ B p50/p65 二聚体结合,当 IL-1 β 、TNF- α 激活 IKK α /IKK β 之后使得 I κ B 磷酸化而与 p50/p65 二聚体分离。随后 p50/p65 经过磷酸化修饰后入核并与相应靶基因结合,启动下游炎症因子的表达。p65 则是 p50/p65 二聚体当中启动炎症反应的关键。由此可见,磷酸化 p65 的表达下调可以有效地下调炎症反应的强度。

pAAV-D(+)-U6-NF- κ B/p65-shRNA-CMV-ZsGreen 质粒利用 RNA 干扰技术,特异性地作用于 p65 靶点,能够精确地下调炎症的发生。本实验以双酶切鉴定 NF- κ B/p65-shRNA 质粒,通过 HP 试剂成功将 NF- κ B/p65-shRNA 质粒转染进小鼠 BMSCs,并证实 shRNA 能够有效干扰 LPS 模拟的炎症环境中 BMSCs 磷酸化 NF- κ B/p65 的表达。shRNA 的瞬时转染也有表达不持久的缺点,后续试验也将进一步制备腺相关病毒,进行体内试验,为进一步探寻低表达磷酸化 NF- κ B/p65 的 BMSCs 在组织

工程中的作用奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Wehling N, Palmer GD, Pilapil C, et al. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha inhibit chondrogenesis by human mesenchymal stem cells through NF-kappaB-dependent pathways. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(3):801-812.
- [2] Torzilli PA, Bhargava M, Park S, et al. Mechanical load inhibits IL-1 induced matrix degradation in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(1):97-105.
- [3] Reynolds A, Leake D, Boese Q, et al. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(3):326-330.
- [4] Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 1998, 16:225-260.
- [5] Sun HB. Mechanical loading, cartilage degradation, and arthritis. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1211:37-50.
- [6] Djouad F, Mrugala D, Noel D, et al. Engineered mesenchymal stem cells for cartilage repair. *Regen Med*, 2006, 1(4):529-537.
- [7] Murakami S, Lefebvre V, de Crombrughe B. Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*, 2000, 275(5):3687-3692.
- [8] Ghosh G, Wang VY, Huang DB, et al. NF- κ B regulation: lessons from structure. *Immunol Rev*, 2012, 246(1):36-58.
- [9] Gilmore TD, Wolenski FS. NF- κ B: where did it come from and why? *Immunol Rev*, 2012, 246(1):14-35.
- [10] Novack DV. Role of NF- κ B in the skeleton. *Cell Res*, 2011, 21(1):169-182.

收稿日期:2013-12-11

增补通信作者信息

《骨科》2014 年第 1 期第 59 页《伤椎置钉短节段内固定治疗胸腰段脊柱骨折的进展》第一作者为邓晓强,该文的通信作者发生遗漏,特增补该文通信作者信息如下:

通信作者:杨勇,E-mail:yy5196@sina.com,工作单位:内蒙古医科大学附属医院骨科。

特此说明!

《骨科》编辑部