

基因与细胞治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000084

携带 siRbpj 重组腺病毒载体的构建及其对 BMP9 诱导骨髓间充质干细胞成骨分化作用影响

张晓艳, 杨伦韵, 谢佳琪, 左国伟, 罗进勇, 唐 敏

(重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:构建并筛选特异性干扰 Notch 信号通路核转录因子 Rbpj 基因的重组腺病毒,探讨通过 Rbpj 的经典 Notch 信号通路在骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)9 诱导骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)成骨分化中的作用。**方法:**设计 3 对针对小鼠 Rbpj 的 siRNA 序列,将其分别亚克隆至 pSES-HUS 穿梭质粒,再与骨架质粒 pAdEasy-1 在大肠杆菌 BJ5183 内同源重组获得重组质粒,经脂质体转染至 HEK293 细胞中包装扩增腺病毒,利用 RT-PCR 及 Western blot 进行筛选、验证有效的干扰腺病毒。该重组腺病毒与 AdBMP9 处理 MSCs 细胞株 C3H10T1/2,采用组织化学和 RT-PCR 检测早期成骨指标碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和晚期成骨指标骨桥蛋白(osteopontin, OPN),骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)及 BMP 下游靶基因 Id 1、Runx 2 等的表达。**结果:**成功构建了 3 个重组腺病毒,并筛选出干扰效率最好的 AdsiRbpj-2 重组腺病毒,转染 C3H10T1/2, AdsiRbpj-2 可以明显下调 BMP9 诱导的早期成骨指标 ALP 的活性及晚期成骨指标 OPN、OCN 的表达,成骨相关基因 Runx 2 等的表达也有下降。**结论:**成功构建了特异性阻断 Notch 经典信号通路腺病毒载体 AdsiRbpj-2,该重组腺病毒能够抑制 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞的成骨分化进程,从而进一步证明 Notch 信号通路在 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化过程中有着重要的作用。

【关键词】Rbpj(CBF1);重组腺病毒;siRNA;Notch;骨形态发生蛋白;骨髓间充质干细胞

【中图分类号】R322.71;R329.21;R394.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-10-15

Construction of small interfering RNAs against mouse nuclear transcription factor Rbpj by recombinant adenovirus and its inhibitory during osteogenesis induced by BMP9 in C3H10T1/2

Zhang Xiaoyan, Yang Lunyun, Xie Jiaying, Zuo Guowei, Luo Jinyong, Tang Min

(Key Laboratory of Medical Diagnostics, Ministry of Education, College of Laboratory, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct recombinant adenovirus against mouse nuclear transcription factor Rbpj, downstream of Notch, with the purpose to provide a powerful molecular tool for exploring the role of bone morphogenetic protein(BMP) 9 signaling in osteogenesis of mesenchymal stem cells. **Methods:** Three pairs of double-stranded DNA sequence targeted mouse Rbpj were designed and sub-cloned to pSES-HUS vector to obtain pSES-HUS-siRbpj using AdEasy system, then reorganized with pAdEasy-1 plasmid in *E. coli* BJ5183. pAd-siRbpj was transfected into HEK293 to package recombinant adenovirus AdsiRbpj after being linearized by *Pac* I and screened by RT-PCR and Western blot. C3H10T1/2 were co-treated with recombinant adenovirus and BMP9 proteins, then the early osteogenic marker alkaline phosphatase(ALP) was detected at the 7th d. Osteopontin(OPN) and osteocalcin(OCN), BMP downstream target genes Id 1 and Runx 2 expression were also detected by RT-PCR. **Results:** Three interference recombinant adenoviruses were successfully constructed, of which AdsiRbpj-2 had the best interference ability and can significantly decrease BMP9-induced osteogenic indexes, including the early osteogenic index ALP, late osteoblastic differentiation indicators OPN, OCN and osteogenic gene Runx 2. **Conclusions:** The siRNA adenovirus vector AdsiRbpj-2, with the ability to specifically block mouse Notch signaling, is suc-

cessfully constructed, future indicating that Notch signaling pathway plays an important role in osteogenic differentiation of BMP9 induced bone marrow mesenchymal stem cells.

【Key words】Rbpj(CBF1); recombinant adenovirus; small interfering RNA; Notch; bone morphogenetic protein; mesenchymal stem

作者介绍: 张晓艳, Email: 993563779@qq.com,

研究方向: Notch 通路在骨发育过程中的作用及机制。

通信作者: 唐 敏, Email: catom@126.com。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(编号: CSTC2012jjA10004);

重庆市教委科学技术研究资助项目(编号: KJ130305)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000084.html>

哺乳动物中的 CBF1(人)/Rbpj(小鼠)是序列特异的 DNA 结合转录因子,与果蝇中的 Su(H)和线虫中的 Lag-1 是同源蛋白,因此总称 CSL^[1]。近来研究表明 CSL 是高度保守的 Notch 信号通路重要组成部分,Notch 受体激活后,释放出 Notch 受体胞内段(the intracellular domain of Notch receptor, NICD),NICD 直接入胞核与转录因子 CSL 相互作用,使与 CSL 相结合的转录共抑制复合物解离,并招募因子形成转录共激活复合物,使 CSL 由转录抑制作用转变为转录激活作用,从而调节下游靶基因的转录活性及表达^[2]。目前,仅有极少一部分 CSL 下游靶基因得到鉴定,如 bHLH 类转录因子 Hes 和 Hey 等^[3]。Notch 信号通路在生物体中胚胎期及出生后发育过程中发挥着重要的功能,其异常导致各种发育综合征及肿瘤^[4-7]。近年来,Notch 在骨发育过程中的作用也备受关注,但存在较大争议。本课题组前期通过细胞密度实验激活 Notch 信号通路,以及 γ 内分泌酶抑制剂抑制该通路两方面证实 Notch 信号通路参与骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)9 诱导的骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的成骨作用^[8-9]。因此,小鼠 siRbpj 重组腺病毒的构建为进一步研究 Notch 在骨发育和骨重建中的作用及其相关分子机制提供有用且实用的技术手段。

1 材料与方法

1.1 菌种、细胞及质粒

大肠埃希菌 DH5 α 、AdEasier 细菌(含有缺失 E1 和 E3 区的野生型腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态大肠埃希菌)、腺病毒穿梭质粒 pSES-HUS[卡那抗性,本身表达红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)],包装细胞系腺病毒 E1 区转化的 HEK293 细胞株、鼠源 MSCs 细胞株 C3H10T1/2、人的结肠癌细胞株 HCT116、表达 RFP 的空载腺病毒 AdRFP、表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的空载腺病毒 AdGFP 及过表达 BMP9 的腺病毒 AdBMP9(重庆医科大学分子医学实验室保存)。

1.2 主要试剂

干扰序列及其他引物(Invitrogen 公司合成);质粒抽提试剂盒和 DNA 纯化试剂盒(Omega 公司);普通 PCR 和 DNA 连接试剂盒(TaKaRa 公司);限制性内切酶 *Sfi* I (环形质粒载体 pSES-1 上含有 *Sfi* I 酶切位点,用此酶可将其线性化,露出黏性末端,便于与干扰寡核苷酸片段连接)、*Pme* I、*Pac* I、*EcoR* I 和 *EcoR* V (New England Biolab 公司);脂质体转染试剂盒 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司);高糖型 DMEM 培养基(HyClone 公司),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) (Gibico 公司);Trizol (Ambion 公司);SYBR Green I (TaKaRa 公司);小鼠 Rbpj 一抗(Abcam 公司),生物素标记山羊抗小

鼠 IgG(H+L)二抗(碧云天公司),辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(碧云天公司);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP) 定量试剂盒(BD 公司),ALP 染色试剂(Sigma 公司)。

1.3 穿梭质粒 pSES-HUS-siRbpj 的构建

Pubmed 查找小鼠 Rbpj 基因 mRNA 序列(GenBank: BC051387.1),利用在线设计软件 siDESIGN 平行设计 3 对干扰序列,3 对序列的两端均添加“5'-A...TTTT-3'”黏性末端后送公司合成(序列信息详见表 1)。每对序列的上下游等体积混合后稀释 10 倍,沸水浴 5 min,自然冷却,再稀释 10 倍即为预插入的干扰片段。*Sfi* I 酶切 pSES-HUS,酶切产物经纯化试剂盒纯化后,用 T4 DNA 连接酶与上述纯化产物 16 ℃ 连接 14 h(连接体系 12.5 μ l:纯化产物 5 μ l,干扰片段 3 μ l, T4 DNA Ligase 0.8 μ l,缓冲液 1.25 μ l,ddH₂O 2.45 μ l),连接产物全部化学方法(氯化钙法)转化 DH5 α ,卡那霉素筛选单克隆,抽提质粒,质粒 PCR(PCR 反应体系 25 μ l:cDNA 模板 1 μ l, 10 μ mol/L siRNA bottom 引物和 U6 promoter 引物各 1 μ l, 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ l, Mg²⁺ 1.5 μ l, 10 nmol dNTP 2 μ l, Traq 酶 0.3 μ l, ddH₂O 15.7 μ l;PCR 反应程序:95 ℃ 5 min;92 ℃ 20 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 28 个循环;72 ℃ 5 min)、*EcoR* I 和 *EcoR* V 双酶切及测序(上海生工)鉴定,证实获得正确的 pSES-HUS-siRbpj 腺病毒穿梭质粒。

1.4 腺病毒质粒 pAdsiRbpj 的构建

将重组穿梭质粒 pSES-HUS-siRbpj 经 *Pme* I 酶切使其线性化,乙醇沉淀后化学方法转化感受态 AdEasier 细菌,接种于含 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 平板,37 ℃ 孵箱培养过夜,次日(由于大质粒在 BJ5183 细菌中重组和重排的频率较高,所以 BJ5183 的培养时间不应超过 24 h)挑取 5~10 个针尖样大小克隆菌落(正确重组的克隆 DNA 拷贝数小,故所形成的克隆小),接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃, 180 r/min 摇床培养 16 h 后提取相应质粒,转化大肠杆菌 DH5 α 扩增,用 *Pac* I 酶切鉴定。

1.5 重组腺病毒 AdsiRbpj 的包装扩增与滴度测定

1.5.1 腺病毒包装、扩增 用 *Pac* I 酶切重组腺病毒质粒 pAdsiRbpj,乙醇沉淀后,由脂质体 Lipofectamine 2000 介导转染 HEK293 细胞,操作按试剂盒说明书进行。于 37 ℃, 5% CO₂, 饱和湿度培养箱中培养,观察荧光表达量,至 80% 以上细胞变圆、少数细胞脱落漂浮后收获病毒,进行逐轮扩增。

1.5.2 滴度的测定 取对数生长期的 HEK293 细胞,以 1×10^4 个/孔的量接种于 96 孔板,病毒样品用含 10% FBS 的 DMEM 作 10 倍系列稀释,加入 96 孔板中,每个浓度设 3 个平行孔,并设 3 个空白对照孔,于 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 36 h(RFP 36 h 表达),荧光显微镜观察,出现荧光的最高稀释倍数即为病毒的滴度(IU/ml)。

1.6 Real-time PCR

用腺病毒 AdRFP 或 AdsiRbpj 处理 C3H10T1/2 细胞 36 h,待红色荧光蛋白表达后提取总 mRNA,逆转录为 cDNA,采用实时荧光定量 PCR 测定 Notch 信号通路靶基因 Hey 1 的表达,引物见表 1,所有样本的结果以内参基因 GAPDH 做相对定量分析。Real-time PCR 条件:预变性 94 ℃ 2 min;变性 92 ℃ 20 s;68 ℃ 30 s;每循环降 2 ℃, 72 ℃ 20 s, 6 个循环;92 ℃ 20 s, 57 ℃ 30 s, 72 ℃ 20 s, 延伸末尾采集荧光, 40 个循环;融解分析(65 ℃~99 ℃)。

表 1 干扰序列及引物信息
Tab.1 Interference sequence and primers

引物名称	引物序列	退火温度 (°C)
小鼠 Rbpj siRNA site-1	5'-AGCATGTAGAAGGAGGGAATTTT-3' 5'-AATTCCCTCCTCTACATGCTTTT-3'	55.0
小鼠 Rbpj siRNA site-2	5'-AGGATAAAGGTCATCTCCAATTTT-3' 5'-ATTGGAGATGACCTTTATCCTTTT-3'	55.0
小鼠 Rbpj siRNA site-3	5'-AGCTTGAACCTACAGGACAATTTT-3' 5'-ATTGTCCTGTAAGTTCAAGCTTTT-3'	55.0
小鼠 Rbpj	5'-GGTCCCAGACATTTCATGTCAT-3' 5'-GGAGTTGGCTCTGAGAATCG-3'	61.4
Hey 1	5'-GGCCTGCTTGGCTTTTCT-3' 5'-CCAAGTGCAGGCAAGGTC-3'	57.0
GAPDH	5'-GGCTGCCCAGAACATCAT-3' 5'-ATGATGTTCTGGGCAGCC-3'	55.0
OPN	5'-ACACTTTCACTCCAATCGTCC-3' 5'-TGCCCTTTCCGTTGTTGTC-3'	59.5
OCN	5'-TCTGACAAAGCCTTCATGTC-3' 5'-AAATAGTGATACCGTAGATGCG-3'	53.4
Id 1	5'-ACGACATGAACGGCTGCT-3' 5'-CAGCTGCAGGTCCCTGAT-3'	54.6
Runx 2	5'-GGTGAAACTCTTGCTCGTC-3' 5'-AGTCCCAACTTCCTGTGCT-3'	53.4
Coll α 1	5'-CGGCTCCTGCTCCTCTTA-3' 5'-TTCATTGCATTGCACGTCAT-3'	55.0
β-actin	5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3' 5'-GGGGTGTGAAGGCTCTCAA-3'	55.0
U6 promoter (Fwd)	5'-CGCGGATCCAAGGTCGGGCAGGAA-GAG-3'	

1.7 Western blot

用腺病毒 AdRFP 或 AdsiRbpj 处理 C3H10T1/2 细胞 36 h, 待红色荧光蛋白表达后收集细胞, 提取总蛋白后进行 Western blot, 检测 AdsiRbpj 对 Notch 下游核转录因子 Rbpj 蛋白的表达有无影响。目的蛋白一抗为鼠抗小鼠 Rbpj 抗体(1:300), 二抗为生物素标记的羊抗鼠 IgG(1:3 000); 辣根过氧化物酶标记的亲本素(1:8 000); 内参蛋白一抗为鼠抗小鼠 β-actin 抗体(1:1 000), 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(1:4 000)。最后按 ECL 试剂盒说明书进行化学发光检测, 并用 Gel Doc 凝胶成像仪进行成像。

1.8 条件培养基的制备

将 HCT116 细胞培养在直径 60 mm 的培养皿中, MEM 培养基培养, 待细胞融合至 60%~70% 后, 加入 AdGFP 或 AdBMP9, 感染量约 40%~50%, 4 h 后换成无血清培养基的 DMEM 高糖培养基, 分别在 24 h 和 48 h 后收集培养基 2 次, 培养基中含有一定浓度的 BMP9, 而 GFP 为对照组, 将培养基离心后取上清液, 置 4 °C 备用。

1.9 RT-PCR

用腺病毒 AdRFP 或 AdsiRbpj 感染 C3H10T1/2 36 h 后加入 GFP 或 BMP9 条件培养基, 处理 1 d 或 11 d 后提取细胞总 mRNA, 逆转录为 cDNA, RT-PCR 检测相关基因的表达,

引物信息见表 1。PCR 反应条件: 预变性 94 °C 5 min; 变性 94 °C 30 s, 退火 (不同基因退火温度不同, 前期已优化, 详见表 1) 40 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物经 2% 的凝胶电泳, 紫外下成像后保存图像, 所有样本的结果以内参基因 β-actin 做相对定量分析。

1.10 ALP 活性和染色

将细胞接种至 24 孔板 (按 2×10^4 个/孔), 待细胞融合至 30% 左右时, 加入 AdRFP 或 AdsiRbpj-2, 8 h 后换液 (主要是换去 polybrene 和没有进入细胞的腺病毒), 换液 24 h 后加入适量的 GFP 或 BMP9 条件培养基, 继续培养 5~7 d 后进行细胞化学染色与 ALP 活性定量分析 (操作方法完全按照试剂盒说明书)。

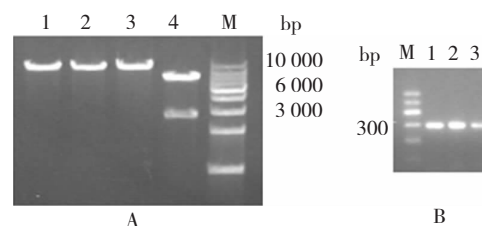
1.11 统计学分析

数据采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 法, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 重组穿梭质粒构建及鉴定

重组穿梭质粒 pSES-HUS-siRbpj-1、pSES-HUS-siRbpj-2、pSES-HUS-siRbpj-3 经 *EcoR* I 和 *EcoR* V 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳分析。未插入干扰片段的阴性对照质粒 pSES-1 经双酶切后可见约 2 500 bp 和 6 000 bp 的基因片段, 已经连上干扰片段的 pSES-1 则不能被切开, 表明 3 个干扰片段已成功插入到各自载体上 (图 1A)。质粒 PCR 扩增 U6, U6 引物 (表 1), 得到约 300 bp 大小的产物, 再次验证了穿梭质粒构建正确 (图 1B)。最后将经 2 次验证的穿梭质粒送测序, 结果亦证实了 3 个穿梭质粒构建完全正确。



1. pSES-HUS-siRbpj-1; 2. pSES-HUS-siRbpj-2;
3. pSES-HUS-siRbpj-3; 4. pSES-1;
M (左). 1 kb Marker; M (右). 600 kb Marker
图 1 穿梭质粒 *EcoR* I 和 *EcoR* V 双酶切 (A) 及
质粒 PCR (B) 鉴定

Fig.1 Identification of shuttle plasmid with *EcoR* I and *EcoR* V double digestion (A) and with plasmid PCR (B)

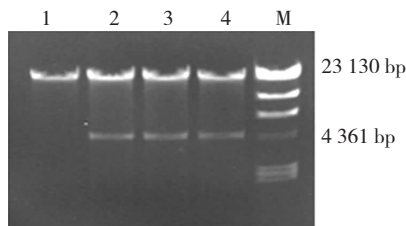
2.2 重组腺病毒质粒构建及鉴定

构建正确的 3 个穿梭质粒化转到 AdEasier 细菌中, 24 h 内挑取多个针尖样大小单克隆, 提取质粒, *Pac* I 酶切鉴定, 正确的重组体通常会得到 1 个大约 30 kb 的大片段和 1 个 3.0 kb 或 4.5 kb 的小片段, 构建正确的 3 个重组腺病毒质粒分别命名为 pAdsiRbpj-1、pAdsiRbpj-2、pAdsiRbpj-3 (图 2)。

2.3 质粒转染与重组腺病毒的包装

pAdsiRbpj-1、pAdsiRbpj-2、pAdsiRbpj-3 分别转染 HEK293

细胞,48 h 后观察转染效率(图 3),约 60%~70%,达到需要转染量。转染 14 d 后,镜下可见大量红色荧光成团爆发,表明病毒在 HEK293 细胞内包装成功(图 3)。用 96 孔板采用倍比稀释测定 AdsiRbpj-1、AdsiRbpj-2、AdsiRbpj-3 的原始病毒滴度分别为 1×10^{10} 、 1×10^9 、 1×10^{12} IU/ml。



1. pAdEasy-1; 2. pAdsiRbpj-1; 3. pAdsiRbpj-2; 4. pAdsiRbpj-3;
M. Hind λ III DNA Marker

图 2 重组腺病毒质粒 Pac I 酶切鉴定

Fig.2 Identification of the recombinant adenovirus plasmid with Pac I

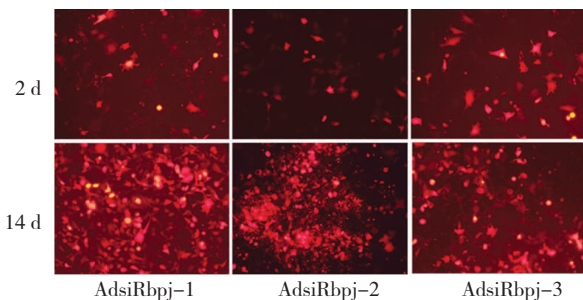
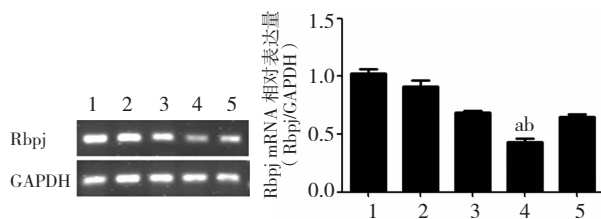


图 3 重组腺病毒质粒 pAdsiRbpj 转染 HEK293 细胞的
荧光显微镜观察 (100 ×)

Fig.3 Fluorescent microscopy of HEK293 cells transfected
with pAdsiRbpj (100 ×)

2.4 重组腺病毒干扰效果验证

2.4.1 mRNA 水平 用 AdsiRbpj 感染 C3H10T1/2 细胞,36 h 后提取各组 RNA,RT-PCR 检测 Rbpj mRNA 表达情况(图 4 左)。结果显示,AdRFP 对 C3H10T1/2 细胞 Rbpj 表达无影响,AdsiRbpj 感染 C3H10T1/2 细胞后 Rbpj 表达量较 AdRFP 组表达下调(表 2)。其中,AdsiRbpj-1、AdsiRbpj-2、AdsiRbpj-3 对 Rbpj mRNA 的抑制率分别为 19%、41%、28%(图 4 右),因此,初步筛选出干扰效果较好的 AdsiRbpj-2。



a,与空白组相比, $P=0.01$;b,与 AdRFP 相比, $P=0.036$

1. 空白组;2. AdRFP;3. AdsiRbpj-1;4. AdsiRbpj-2;5. AdsiRbpj-3

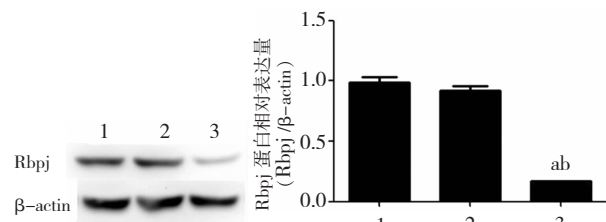
图 4 RT-PCR 检测 C3H10T1/2 不同处理组中 Rbpj mRNA 的表达
Fig.4 Expression of Rbpj mRNA in different groups detected
C3H10T1/2 by RT-PCR

表 2 各处理组 Rbpj mRNA 相对表达量 (Rbpj/GAPDH) 比较

Tab.2 Expression level of Rbpj mRNA in different groups	
组别	Rbpj/GAPDH
空白组	1.024 ± 0.065
AdRFP	0.964 ± 0.020
AdsiRbpj-1	0.684 ± 0.030^a
AdsiRbpj-2	0.430 ± 0.055^{ab}
AdsiRbpj-3	0.646 ± 0.045^a
F 值	6.202
P 值	0.009

注:a,与空白组比较, $P<0.05$;b,与 AdRFP 组比较, $P<0.05$

2.4.2 蛋白水平 用 AdsiRbpj-2 感染 C3H10T1/2 细胞,36 h 后提取总蛋白检测 Rbpj 蛋白表达情况(图 5)。结果显示,AdRFP 对 C3H10T1/2 细胞 Rbpj 蛋白表达无影响,AdsiRbpj-2 感染 C3H10T1/2 细胞后 Rbpj 蛋白表达量较空白组和 AdRFP 组均显著下调(表 3)。



a,空白组相比, $P=0.000$;b,与 AdRFP 相比, $P=0.000$

1. 空白组;2. AdRFP;3. AdsiRbpj-2

图 5 Western blot 检测不同处理组中 Rbpj 蛋白的表达情况

Fig.5 Expression of Rbpj protein in different groups detected
by Western blot

表 3 各处理组中 Rbpj 蛋白相对表达量 (即 Rbpj/β-actin) 和
Hey 1 mRNA 相对表达量 (即 Hey 1/GAPDH) 和比较

Tab.3 Expression of Rbpj protein and Hey1 mRNA in different groups		
组别	Rbpj/β-actin	Hey 1/GAPDH
空白组	0.987 ± 0.079	1.009 ± 0.012
AdRFP	0.922 ± 0.065	0.980 ± 0.036
AdsiRbpj-2	0.167 ± 0.008^{ab}	0.313 ± 0.038^{ab}
F 值	176.475	484.286
P 值	0.000	0.000

注:a,与空白组比较, $P<0.05$;b,与 AdRFP 组比较, $P<0.05$

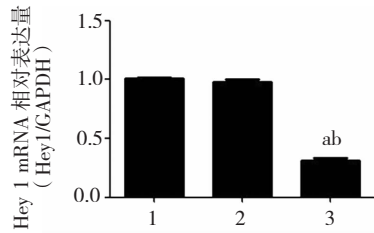
2.4.3 功能验证(重组腺病毒对下游靶基因 Hey 1 的影响)

用 AdsiRbpj-2 感染 C3H10T1/2 细胞,36 h 后提取 mRNA,利用实时荧光定量 PCR 检测 Hey 1 mRNA(图 6),结果显示,AdRFP 对 C3H10T1/2 细胞 Hey 1 mRNA 表达无影响,AdsiRbpj-2 感染 C3H10T1/2 细胞后 Hey 1 mRNA 表达量较空白组和 AdRFP 组均显著下调(表 3)。

2.5 AdsiRbpj-2 对 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞成骨分化的影响及机制

2.5.1 AdsiRbpj-2 对 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞成骨分化早期成骨影响 用 AdRFP 和 AdsiRbpj 感染 C3H10T1/2 细胞,感染效率约 50%,36 h 后加入 GFP 或 BMP9 条件培养

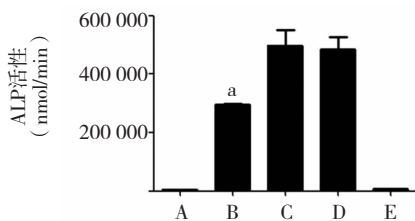
基,诱导分化 7 d 后检测 ALP 活性及染色变化(图 7),结果显示,AdsiRbpj-2 能降低 BMP9 诱导的 ALP 活性(表 4),表明阻断 Notch 信号通路后可抑制 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞早期成骨分化。



a: 与空白组相比, $P=0.000$; b: 与 AdRFP 相比, $P=0.000$

1. 空白组; 2. AdRFP; 3. AdsiRbpj-2

图 6 Real-time PCR 检测不同处理组中 Hey 1 mRNA 的表达
Fig.6 Expression of Hey 1 mRNA in different groups detected by real-time PCR



a: 与 BMP9+AdRFP 相比, $P=0.001$

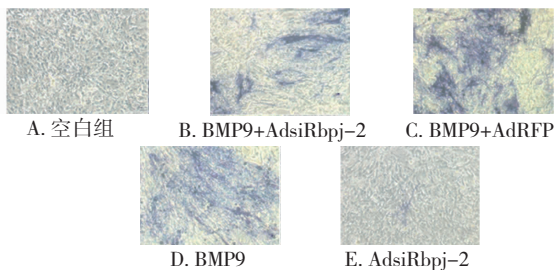


图 7 AdsiRbpj-2 抑制 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞 ALP 的表达

Fig.7 Inhibition of alkaline phosphatase activity induced by BMP9 with AdsiRbpj-2 in C3H10T1/2

表 4 各处理组处理 7 d 后 C3H10T1/2 细胞早期成骨指标 ALP 活性比较

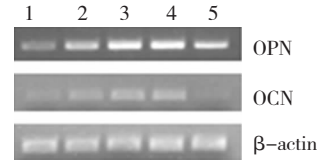
Tab.4 Alkaline phosphatase activity of different groups in C3H10T1/2

组别	ALP活性 (nmol/min)
空白组	$6\,000.330 \pm 233.616^{bcd}$
BMP9+AdsiRbpj-2	$294\,901.000 \pm 7\,977.714^{abc}$
BMP9+AdRFP	$498\,087.000 \pm 92\,405.605^{abc}$
BMP9	$483\,753.000 \pm 75\,381.624^{abc}$
AdsiRbpj-2	$8\,157.000 \pm 636.953^{bcd}$
F 值	61.924
P 值	0.000

注: a, 与空白组比较, $P<0.05$; b, 与 BMP9+AdsiRbpj-2 组比较, $P<0.05$; c, 与 BMP9+AdRFP 组比较, $P<0.05$; d, 与 BMP9 组比较, $P<0.05$; e, 与 AdsiRbpj-2 组比较, $P<0.05$

2.5.2 AdsiRbpj-2 对 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞成骨分化晚期成骨影响 细胞培养在 60 mm 的细胞培养皿中,待

汇合至 20% 左右时,加入 AdRFP 和 AdsiRbpj-2 腺病毒,感染 36 h 后加入 GFP 或 BMP9 条件培养基,诱导分化 11 d 后提取细胞总 mRNA,检测骨桥蛋白(osteopontin, OPN)和骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)的表达情况,结果显示, BMP9+AdsiRbpj-2 组相比 BMP9+AdRFP 组和单 BMP9 组, OCN 和 OPN 都有比较明显的降低(图 8),说明了阻断 Notch 信号通路后可抑制 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞晚期成骨分化。



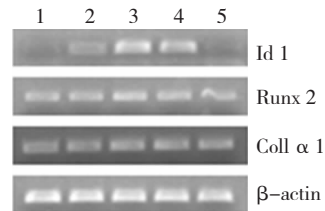
1. 空白组; 2. BMP9+AdsiRbpj-2; 3. BMP9+AdRFP;

4. BMP9; 5. AdsiRbpj-2

图 8 AdsiRbpj-2 抑制 BMP9 诱导的晚期成骨指标

Fig.8 Inhibition of late osteogenic differentiation makers induced by BMP9 with AdsiRbpj-2

2.5.3 AdsiRbpj-2 对 BMP9 诱导的成骨关键转录因子 Runx 2 及其成骨相关靶基因的影响 Runx 2 是成骨过程中非常重要的转录因子, AdRFP 和 AdsiRbpj-2 感染 C3H10T1/2 细胞 36 h 后加入 GFP 或 BMP9 条件培养基,作用 1 d 后提取细胞总 mRNA,检测 Runx 2 及 BMP9 下游成骨相关靶基因 Id 1、Coll α 1 的表达, PCR 结果发现, BMP9 能够上调 Runx 2、Id 1 及 Coll α 1, 而 AdsiRbpj-2 却抑制了这一上调作用(图 9)。



1. 空白组; 2. BMP9+AdsiRbpj-2; 3. BMP9+AdRFP;

4. BMP9; 5. AdsiRbpj-2

图 9 AdsiRbpj-2 抑制 Runx 2 及 BMP9 下游靶基因的表达

Fig.9 Inhibition of expression of Runx 2 and target genes of BMP9 by AdsiRbpj-2

3 讨论

骨重建是一个持续不断的骨组织吸收以及骨形成的过程。骨形成由源自 MSCs 的成骨细胞完成, 而骨吸收则来自多能造血干细胞的破骨细胞完成, 其中血管的形成对其有着重要的作用。目前的研究提示 Notch 信号通路对软骨内骨的形成^[10]、成骨细胞分化^[11]和功能以及破骨细胞的分化和功能^[12]都有重要的影响; 同时, 有报道表明 Notch 与血管的新生也有重要的调控作用^[13], 因此, Notch 信号通路很有可能是相关骨疾病的一个重要的诊断和治疗的关键靶点。另一方面, 关于 Notch 在上述骨重建各方面的作用, 描述不一, 比如有文献提示 Notch 抑制成骨^[14],

而一些学者则提出促进成骨^[11,15],因而进一步明确 Notch 信号通路在骨重建的作用和机制至关重要。本课题组前期^[8-9]研究采用小分子的 Notch 信号通路抑制剂 DAPT(γ -Secretase 抑制剂)研究 Notch 信号通路在骨形成过程中的作用及其机制,然而,DAPT 作为化学抑制剂,其抑制作用不特异,不仅可以抑制 Notch 受体,也可以抑制包括钙黏糖蛋白 E-cadherin、血管内皮生长因子受体、CXCL16 在内的大约五十多种膜蛋白^[16]。因此有必要选择特异性强的 siRNA 进行反向研究,以明确 Notch 在 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化中的作用。

本实验采用 AdEasy 系统^[17]构建 AdsiRbpj,该系统具有以下优点:①细菌体内完成重组,效率高,周期短;②利用重组子的抗性筛选,方法简单;③包装后的腺病毒带有 GFP 或 RFP 荧光标签,便于观察等。该系统中的 pSES-HUS,是一种能够表达小片段 RNA 的穿梭载体^[17],含 U6 和 H1 双启动子,在启动子作用下能够转录出 19~22 nt 的双链 siRNA,并能够与目的基因互补结合,导致靶序列降解发挥 RNA 干扰作用。将 3 对针对小鼠 Rbpj 的干扰序列克隆至 pSES-HUS 上,经酶切、质粒 PCR、及测序 3 种方法鉴定重组子,排除假阳性克隆。最后与骨架质粒 pAdEasy-1 在 BJ5183 内重组,*Pac I* 线性后转 HEK293 细胞成功包装重组腺病毒 AdsiRbpj-1、AdsiRbpj-2、AdsiRbpj-3,病毒感染小鼠 C3H10T1/2 细胞,36 h 后荧光显微镜观察感染率可达 80%~90%,提取各处理组 RNA,RT-PCR 筛选出 AdsiRbpj-2 对 Rbpj mRNA 表达抑制作用最强,抑制率约 41%,后续用 Western blot 和 real-time PCR 进一步证实了其对 Rbpj 蛋白及 Rbpj 下游靶基因 Hey1 mRNA 也有显著的抑制功能。可见,AdsiRbpj 能够抑制 C3H10T1/2 细胞 Rbpj 转录及翻译水平的表达,可以阻断经典的 Notch 信号通路。

后续用构建好的 AdsiRbpj-2 进行了细胞实验,发现其下调 Notch 信号后,对 BMP9 诱导的 MSCs 细胞株 C3H10T1/2 的早晚期成骨指标均有抑制作用,阻碍了 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 向成骨分化的进程,这与前期抑制剂的结果是一致的^[9]。进一步实验发现,AdsiRbpj-2 也下调了 BMP9 诱导的成骨关键转录因子 Runx 2 和 Id 1、Coll α 1 的表达。因此,Notch 在 BMP9 诱导的 MSCs 向成骨分化进程中,参与了 BMP9 下游靶基因的调控而促进成骨,在 BMP9 诱导的 MSCs 向成骨分化过程中有着举足轻重的作用。

综上所述,本实验通过构建能特异沉默小鼠 Rbpj 基因的重组腺病毒 AdsiRbpj,为进一步探讨经典的 Notch 信号通路在 BMP9 诱导的 MSCs 诱导分

化过程中的作用机制提供了有利的分子工具并提供了一定的实验依据。

参 考 文 献

- [1] Zanotti S, Smerdel-Ramoya A, Canalis E. Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) c2 inhibits Notch receptor signaling in osteoblasts[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(1): 624-632.
- [2] Kovall RA. More complicated than it looks: assembly of Notch pathway transcription complexes[J]. *Oncogene*, 2008, 27(38): 5099-5109.
- [3] Iso T, Kedes L, Hamamori Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2003, 194(3): 237-255.
- [4] Tanaka M, Setoguchi T, Hirotsu M, et al. Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth by cell cycle regulation[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(12): 1957-1965.
- [5] Mullendore ME, Koorstra JB, Li YM, et al. Ligand-dependent Notch signaling is involved in tumor initiation and tumor maintenance in pancreatic cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(7): 2291-2301.
- [6] Li Z, Feng L, Wang CM, et al. Deletion of RBP-J in adult mice leads to the onset of aortic valve degenerative diseases[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(4): 3837-3845.
- [7] Serafin V, Persano L, Moserle L, et al. Notch3 signalling promotes tumour growth in colorectal cancer[J]. *J Pathol*, 2011, 224(4): 448-460.
- [8] 刘 强, 翁亚光, 徐道晶, 等. Notch 信号通路在骨形态发生蛋白 9 诱导的多潜能干细胞成骨分化中的作用[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(23): 2492-2496.
- [9] 谢佳瑛, 胥文春, 徐道晶, 等. Notch 信号参与 BMP9 诱导的间充质干细胞成骨分化及其机制的初步探讨[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(11): 14-22.
- [10] Hosaka Y, Saito T, Sugita S, et al. Notch signaling in chondrocytes modulates endochondral ossification and osteoarthritis development[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(5): 1875-1880.
- [11] Ugarte F, Ryser M, Thieme S, et al. Notch signaling enhances osteogenic differentiation while inhibiting adipogenesis in primary human bone marrow stromal cells[J]. *Exp Hematology*, 2009, 37(7): 867-875.
- [12] Rehan J, Long F. Notch signaling and bone remodeling[J]. *Curr Osteoporosis Rep*, 2013, 11(2): 126-129.
- [13] Shimizu T, Tanaka T, Iso T, et al. Notch signaling induces osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells: role of *Msx2* gene induction via Notch-RBP-JK signaling[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(7): 1104-1111.
- [14] Zanotti S, Canalis E. Notch and the skeleton[J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(4): 886-896.
- [15] Nobita M, Tomoo T, Shibata Y, et al. Critical regulation of bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation by Delta1/Jagged1-activated Notch1 signaling[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(16): 15842-15848.
- [16] Beel AJ, Sanders CR. Substrate specificity of gamma-secretase and other intramembrane proteases[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(9): 1311-1334.
- [17] He TC, Zhou S, da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(5): 2509-2514.

(责任编辑: 关蕴良)