

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002385

稳定敲低人脐带间充质干细胞 *EPCR* 基因 对其向成纤维细胞分化能力的影响

苟 好¹, 彭单伊¹, 刘 姜¹, 吴 美¹, 邹 琳², 符 州³

(1. 重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地、重庆市干细胞治疗工程技术研究中心, 重庆 400014; 2. 重庆医科大学附属儿童医院临床分子医学中心, 重庆 400014; 3. 重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心, 重庆 400014)

【摘要】目的:构建稳定敲低人内皮细胞蛋白 C 受体(endothelial cell protein C receptor, EPCR)的人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs), 检测敲低 EPCR 对 hUC-MSCs 向成纤维细胞分化能力的影响。**方法:**根据 EPCR 基因 mRNA 序列, 合成 3 条小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)导入 hUC-MSCs, 通过检测 EPCR 蛋白表达筛选干扰效果最佳的 siRNA。根据最佳 siRNA 序列构建慢病毒载体, 包装重组慢病毒, 感染 hUC-MSCs, Real-time PCR 和 Western blot 验证敲低效率。体外构建转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor beta1, TGF- $\beta 1$)诱导 hUC-MSCs 向成纤维细胞分化模型, Real-time PCR 和 Western blot 检测诱导前后 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)和 I 型胶原(type I collagen, Col I)表达水平, 以反映诱导效果。**结果:**以 EPCR 最佳 siRNA 序列构建 EPCR 基因 RNAi 慢病毒载体, 成功敲低 hUC-MSCs 内 EPCR 的 mRNA ($t=28.86, P=0.000$)和蛋白($t=88.60, P=0.000$)表达水平。EPCR 敲低后, hUC-MSCs 合成的 COL1A1 和 COL1A2 在 mRNA ($P=0.044, P=0.000$)和蛋白($P=0.000, P=0.000$)水平减少。体外 TGF- $\beta 1$ 诱导可增加 hUC-MSCs 内 α -SMA ($F=369.713, P=0.000; F=451.060, P=0.000$)、COL1A1 ($F=42.051, P=0.000; F=759.041, P=0.000$)及 COL1A2 ($F=359.205, P=0.000; F=764.348, P=0.000$)在 mRNA 和蛋白水平的表达, 促进其向成纤维细胞分化。但敲低 EPCR, α -SMA ($P=0.002, P=0.002$)、COL1A1 ($P=0.002, P=0.000$)及 COL1A2 ($P=0.000, P=0.000$)在 mRNA 和蛋白的升高水平明显降低。**结论:**成功获得 EPCR 稳定敲低的 hUC-MSCs, 证实敲低 EPCR 可减少 hUC-MSCs 内 Col I 表达, 并减弱其向成纤维细胞分化的能力。

【关键词】慢病毒载体; 内皮细胞蛋白 C 受体; 人脐带间充质干细胞; 成纤维细胞

【中图分类号】R563.1+3

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-12-26

Effect of knocking down *EPCR* in hUC-MSCs on differentiation to fibroblasts

Gou Hao¹, Peng Danyi¹, Liu Jiang¹, Wu Xian¹, Zou Lin², Fu Zhou³

(1. Department of Pediatric Research Institute, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Engineering Research Center of Stem Cell Therapy; 2. Center for Clinical Molecular Medicine, Children's Hospital of Chongqing Medical University; 3. Respiratory Center of Children's Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct a lentiviral vector that is capable of knocking down EPCR in hUC-MSCs and to explore the effect of knocking down EPCR on differentiative capacity of hUC-MSCs into fibroblasts. **Methods:** Three siRNAs were synthesized according to the mRNA sequence of human EPCR and were transferred into hUC-MSCs. Western blot was conducted to analyze the suppression efficiency of three siRNAs to screen for an optimum siRNA. Then the shRNA targeting the optimum siRNA sequence was synthesized, cloned into lentiviral vector and packaged by lentivirus. hUC-MSCs were infected with the recombinant lentivirus. The efficiency of knocking down was detected both at mRNA and protein levels. hUC-MSCs were stimulated with TGF- $\beta 1$. The expression levels of α -SMA and Col I were detected by Real-time PCR and Western blot for evaluation of differentiative capacity of hUC-MSCs into fibroblasts. **Results:** Lentiviral vector

作者介绍: 苟 好, Email: 355190180@qq.com,

研究方向: 干细胞与肺纤维化。

通信作者: 符 州, Email: fu_zhou79@aliyun.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81670018); 重庆市委
重大专项资助项目(编号: 6Cstc2014yykfC10003)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200330.1326.004.html>
(2020-03-30)

that targeting to the optimal siRNA sequence of EPCR and can down-regulate the mRNA ($t=28.86, P=0.000$) and protein ($t=88.60, P=0.000$) expression of EPCR was constructed successfully. And knocking down of EPCR in hUC-MSCs decreased the mRNA ($P=0.044, P=0.000$) and protein ($P=0.000, P=0.000$) expression of COL1A1 and COL1A2. TGF- β 1 could induce up-expression of α -SMA ($F=369.713, P=0.000; F=451.060, P=0.000$), COL1A1 ($F=42.051, P=0.000; F=759.041, P=0.000$) and COL1A2 ($F=359.205, P=0.000; F=764.348, P=0.000$) in mRNA and protein level and transform hUC-MSCs into fibroblasts. However, knocking down of EPCR in hUC-MSCs significantly decreased the expression of α -SMA ($P=0.002, P=0.002$) and COL1A1 ($P=0.002, P=0.000$) and COL1A2 ($P=0.000, P=0.000$) induced by TGF- β 1 compared with that of control group. **Conclusion:** Knocking down of EPCR in hUC-MSCs are successfully constructed and could decrease the expression of Col I as well as suppress the differentiative capacity of hUC-MSCs into fibroblasts.

[Key words] lentiviral vector; endothelial cell protein C receptor; human umbilical cord mesenchymal stem cells; fibroblasts

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种慢性进行性肺疾病,主要病理表现为炎症和异常修复致肺间质细胞增殖,大量细胞外基质沉积,最终导致肺结构和功能破坏,目前尚无有效疗法^[1]。干细胞疗法是近年来新兴治疗手段。多项研究表明,在博来霉素诱导的肺纤维化动物模型急性肺损伤期给予间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)可减轻肺损伤^[2-5],有效缓解随后发生的肺纤维化,而肺纤维化形成后再予 MSCs 则不能改善纤维化^[6-9]。现有研究结果显示, MSCs 在急性肺损伤期给予有疗效,而肺纤维化期无效可能与肺内微环境有关^[7-8]。MSCs 同时具有抗纤维化和促纤维化的双重作用, MSCs 本身可分泌多种抗纤维化因子,但在肺纤维化微环境中, MSCs 被诱导向成纤维细胞分化,并分泌大量细胞外基质,进而加重肺纤维化。抑制 MSCs 向成纤维细胞分化有望弱化其促纤维化作用,最终使其发挥抗纤维化功效。

内皮细胞蛋白 C 受体是一种多功能 I 型跨膜糖蛋白,属于蛋白 C 系统家族,主要表达于大血管内皮细胞表面,也表达于单核细胞、平滑肌细胞、心肌细胞等^[10]。它参与调节抗凝、炎症、凋亡、造血及免疫等诸多病理过程,影响多种疾病发生发展^[11]。Yu 等^[12]研究发现, EPCR 阳性的血管内皮干细胞具有向间质转化的特性,可能为器官纤维化时成纤维细胞的来源。Wang 等^[13]也指出, EPCR 阳性的乳腺干细胞具有向间质转化的特性。本课题组前期研究发现 hUC-MSCs 高表达 EPCR,但后者对 hUC-MSCs 生物学特性的影响尚无研究报道。因此,本研究构建 EPCR 稳定敲低的 hUC-MSCs 模型,并进一步探索敲低 EPCR 是否会影响 hUC-MSCs 向成纤维细胞分化的能力。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

人胚肾细胞系(293T 细胞)、人脐带间充质干细胞、VSV-G 表达质粒、PAX2 包装质粒(本实验室保存),化学合成 siRNA (上海拓然生物科技有限公司)、pGMLV-SC5 RNAi 载体(上海吉满生物科技有限公司)、BamH I 和 EcoR I 内切酶、T4 DNA 连接酶、T4 DNA 连接酶缓冲液(Fermentas),阳性克隆测序、Lipfectmaine™ 2000(Invitrogen),DH5 α 感受态细胞(NEB),DNA transfection reagent(Neofect),聚凝胺(Sigma),胰酶(Genview),Opti-MEM® I 培养基、DMEM/F12 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Gibco),反转录试剂盒、Real-Time PCR 试剂(Takara),EPCR、GAPDH 引物(华大基因),SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒、RIPA 裂解液和蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),ECL 发光试剂盒(Millipore),EPCR、GAPDH、COL1A2、 α -SMA 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司)、COL1A1 抗体(成都正能生物技术有限公司)、山羊抗兔 IgG 二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司),TGF- β 1(Peprotech),其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 筛选 EPCR 最佳 RNAi 序列 根据 GenBank 中人 EPCR 基因(NM_006404)信息,采用干扰序列设计软件设计 3 条 siRNA 的靶序列(表 1),分别将这 3 个 siRNAs 用 Lipfectmaine™ 2000 导入 hUC-MSCs,以未导入 siRNAs 的细胞为对照,转染浓度为 50 nmol/L, hUC-MSCs 于转染前 1 d 接种于 6 孔板中,每孔细胞数约为 1×10^5 ,每孔加入不含抗生素的完全培养基(20% FBS 的 DMEM/F12)。转染前,用不含血清培养基 Opti-MEM® I 分别稀释 siRNA 和 Lipfectmaine™ 2000 后,轻轻混匀,室温孵育 20 min。将 siRNA-Lip2000 混合液加入 6 孔板中的 hUC-MSCs,正常条件(37 °C 和 5% CO₂)培养 6 h 后,将孔中含 siRNA-Lip2000 混合液培养基移去,更换为不含抗生素完全培养基,继续正常条件培养 48 h 后收细胞沉淀提取蛋白,用 Western blot 检测 3 个 siRNAs 和对

对照组对hUC-MSCs内EPCR表达抑制程度。RIPA细胞裂解法提取总蛋白,BCA法定量蛋白质。30 mg蛋白质上样,8% SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白,250 mA电流条件下转膜60 min,用含5%牛血清白蛋白(BSA)的TBST室温封闭1 h,一抗(EPCR 1:1 000,GAPDH:1:20 000)4℃孵育过夜,洗膜3次后,二抗(1:5 000)室温孵育1 h后再洗膜3次,ECL发光液显色。将得到的条带用Gel-Pro analyzer分析软件分析,得到EPCR和GAPDH的灰度值,EPCR的灰度值比上GAPDH的灰度值即为EPCR蛋白的相对表达量。

表1 合成的EPCR siRNA序列

序列名称	引物序列(5'-3')
siRNA-1	GGCCTCCAAAGACTTCATA
siRNA-2	GAATTAGTCTGATAAGTGA
siRNA-2	GAAACATATTTCCGCGGAA

1.2.2 重组慢病毒载体的构建及鉴定 根据最佳干扰效果siRNA及阴性对照NC(5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3')序列,设计并合成互补的shRNA-DNA序列,将寡聚单链DNA退火成双链。利用BamH I和EcoR I内切酶分别处理pGMLV-SC5 RNAi慢病毒载体或shRNA双链DNA。50 μL酶切体系中含纯化的shRNA载体5 mg、10×Buffer 5 μL、BamH I 2 μL、EcoR I 2 μL、H₂O补足50 μL,37℃酶切30 min。将纯化后的shRNA-DNA双链与pGMLV-SC5 RNAi慢病毒载体在25℃水浴下连接30 min,连接反应体系:退火的双链DNA 1 μL(0.5 μmol/L),线性化的载体3 μL(50 ng),T4 DNA连接酶缓冲液1.5 μL,T4 DNA连接酶1 μL,加ddH₂O至15 μL。将DH5α感受态细胞置于冰上待其自然解冻后,把连接产物全部加入感受态细胞中,于冰上放置20 min,后于42℃水浴中热激90 s。然后迅速置于冰上放置2~3 min。加入1 000 μL不含抗生素的LB培养基,37℃,150 r/min摇床振荡培养45 min。3 000 r/min离心2 min,弃掉约850 μL上清液,将管底的菌液吹打散开,加入到含有氨苄抗性的培养皿中,用灭菌的涂布器涂匀,倒置于37℃恒温培养箱内过夜培养。挑取平板中的转化子,进行小量摇菌培养及PCR鉴定,PCR鉴定出的阳性重组子进一步测序比对验证,筛选出构建成功的shRNA-EPCR和shRNA-NC慢病毒载体。

1.2.3 重组慢病毒的包装及滴度测定 取对数生长期293T细胞,胰酶消化法制备细胞悬液,接种细胞到10 cm细胞培养皿,正常条件(37℃和5%CO₂)下培养24 h,待细胞融合度为60%~70%后进行共转染实验。实验分为空白对照组(不加重组表达载体)、阴性对照组(NC)和敲低组,转染条件如下:重组载体质粒24 mg,VSV-G表达质粒12 mg,PAX2包装质粒18 mg,转染试剂使用量为54 μL,转染过程严格按照转染试剂(DNA transfection reagent)说明书步骤进行。转染后72 h,荧光显微镜下观察转染效果,收集细胞上清液离心10 min(4℃,5 000 g),然后使用0.22 μm的滤器过滤除掉蛋白碎

片,滤液经浓缩后分装至-80℃保存,通过倍比稀释法感染293T细胞,结合荧光显微镜计算病毒滴度。

1.2.4 hUC-MSCs的慢病毒感染 取对数生长期的hUC-MSCs于感染前1 d接种细胞到6孔细胞培养板,使用完全培养基(20% FBS的DMEM/F12),正常条件(37℃、5%CO₂)培养,细胞融合度为60%~70%,在聚凝胺(5 mg/mL)的辅助下按照MOI=20向细胞培养液中添加Lv-shRNA-EPCR病毒(敲低组)、Lv-shRNA-NC病毒(阴性对照组),正常条件下过夜培养,12 h后细胞换液。病毒感染后72 h,在荧光显微镜下观察敲低组和阴性对照组的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP),流式细胞术检测2组细胞的GFP阳性表达率。

1.2.5 hUC-MSCs内EPCR敲低效率检测 ①Real-Time PCR:收集敲低组和阴性对照组细胞,用Trizol法提取总RNA,利用反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA,引物序列见表2。PCR反应条件为:95℃预变性2 min,95℃变性5 s,58℃退火10 s,照相1次,共35个循环。以GAPDH基因作为内参基因,相对定量结果通过2^{-ΔΔCt}进行分析计算。②Western blot:收集敲低组和阴性对照组细胞,用RIPA细胞裂解液提取总蛋白,BCA法定量蛋白质后上样,其余详细步骤同上。

1.2.6 诱导敲低组和阴性对照组细胞向成纤维细胞的分化 将敲低组和阴性对照组细胞各分为2组,实验组用含5 ng/mL TGF-β1的低血清浓度培养基(4% FBS的DMEM/F12)刺激48 h,对照组用不含TGF-β1的低血清浓度培养基培养48 h,收集2组细胞诱导前后的细胞沉淀,提取总RNA和蛋白,以GAPDH基因作为内参基因,Real-Time PCR和Western blot检测α-SMA和Col I表达。Col I是由2条α1链和一条α2链构成的异三聚体,呈三螺旋结构,α1链和α2链的编码基因分别是COL1A1和COL1A2。引物序列见表2。其余详细步骤同上。

表2 引物序列

基因名称	引物序列
EPCR	正义链:5'-GTAGCCAAGACGCTCAGAT-3'
	反义链:5'-GATAGGGCTCGCGGAAGTA-3'
α-SMA	正义链:5'-GACAATGGCTCTGGGCTCTGTAA-3'
	反义链:5'-ATGCCATGTTCTATCGGGTACTT-3'
COL1A1	正义链:5'-GTTTGGATGGTGCCAAGGGA-3'
	反义链:5'-AGCACCATCATTTCCACGAG-3'
COL1A2	正义链:5'-AGCAGGAGGTTTCGGCTAAG-3'
	反义链:5'-GCAACAAAGTCCCGGTATCC-3'
GAPDH	正义链:5'-CAGCGACACCCACTCTCCACCTT-3'
	反义链:5'-CATGAGGTCCACCACCTGTTGCT-3'

1.3 统计学处理

应用SPSS 17.0软件进行统计学分析,实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两独立样本组间分析采用t检验,多组数据间比较采用单因素或双因素方差分析,检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 EPCR 基因最佳 RNAi 序列确定

Western blot 检测结果显示,对照组、siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3 的 EPCR 蛋白相对表达量分别为 1.306 ± 0.005 、 0.913 ± 0.006 、 0.403 ± 0.015 、 0.487 ± 0.038 。方差分析 4 组 EPCR 蛋白表达,差异具有统计学意义 ($F=1\ 208.780$, $P=0.000$)。两两比较结果显示,siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3 与对照组相比均可敲低 hUC-MSCs 中 EPCR ($P=0.000$),且 siRNA-2 与 siRNA-3 之间有统计学差异 ($P=0.001$),因此 siRNA-2 敲低效率最高,最佳 RNAi 序列为 siRNA-2:GAATTAGTCTGA-TAAGTGA(图 1)。

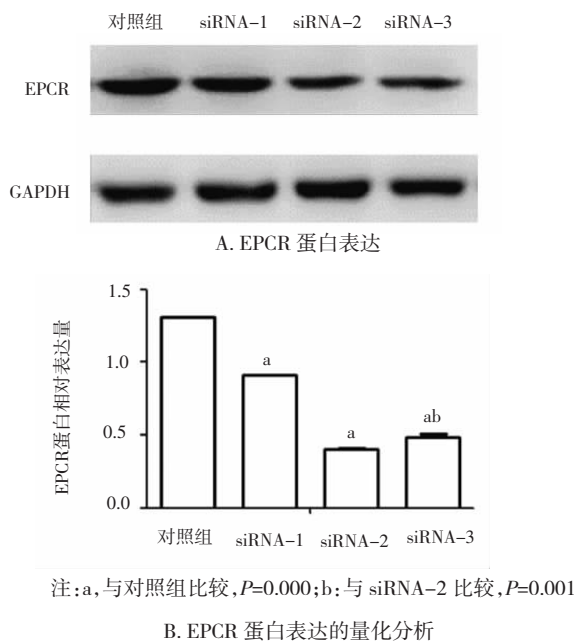


图 1 siRNAs 转入 hUC-MSCs 后 EPCR 蛋白表达的检测

2.2 重组慢病毒载体鉴定

shRNA-EPCR、shRNA-NC 重组慢病毒载体经过测序分析,载体中插入序列(红框标注)与设计完全一致(图 2),证实成功构建 shRNA-EPCR、shRNA-NC 重组慢病毒载体。

2.3 hUC-MSCs 慢病毒感染效率检测

将三质粒转入 293T 细胞 72 h 后,敲低组和阴性对照组在荧光显微镜下可见大量 GFP⁺细胞,而空白对照组细胞无 GFP 表达。倍比稀释法测定敲低组和阴性对照组的病毒滴度分别为 1.1×10^8 TU/mL、 1.4×10^8 TU/mL。按照 MOI=20 进行 hUC-MSCs 慢病毒感染,病毒感染后 72 h,普通光镜下观察敲低组和阴性对照组细胞,形态无明显改变,仍成细长扁平的纺锤型,贴壁生长,融合后集落呈旋涡状(图 3A、C)。荧光显微镜下观察,敲低组和阴性对照组细胞有明显 GFP 表达(图 3B、D),流式细胞术检测显示,敲低组和阴性对照组细胞 GFP 阳性率分别为 99.8%和 99.0%(图 3E)。

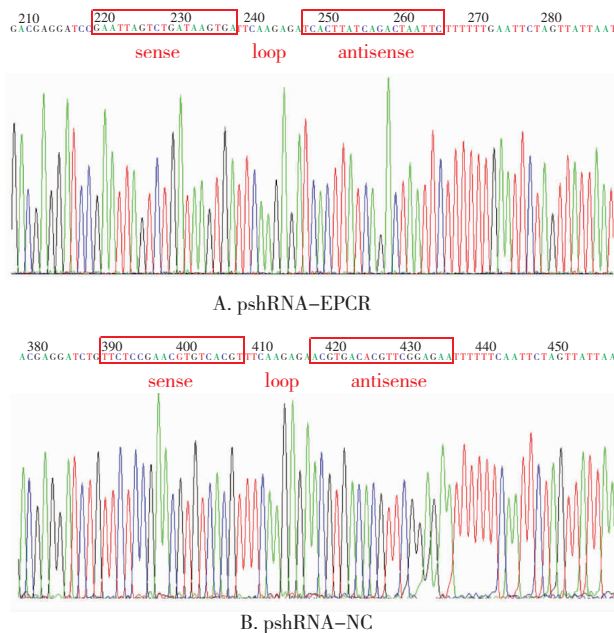


图 2 序列分析

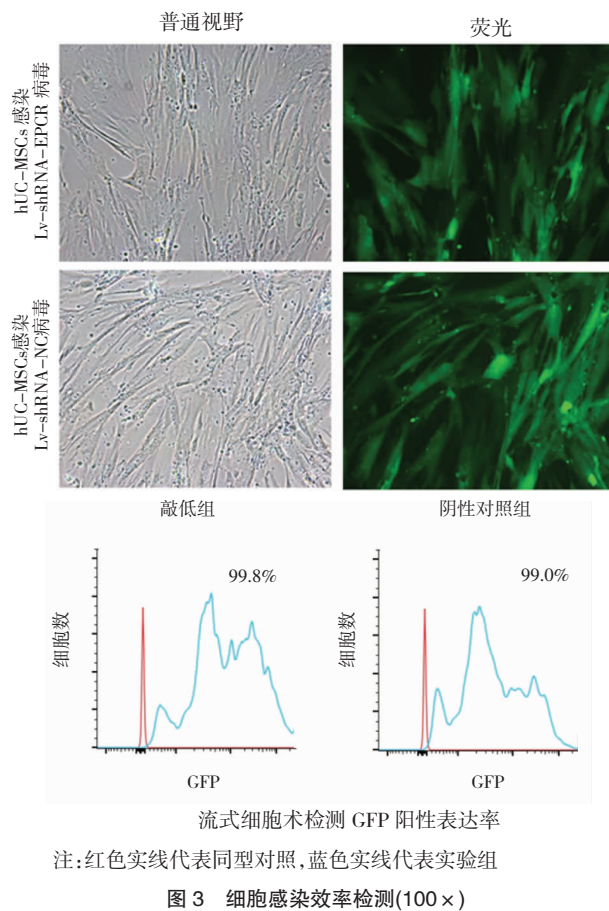
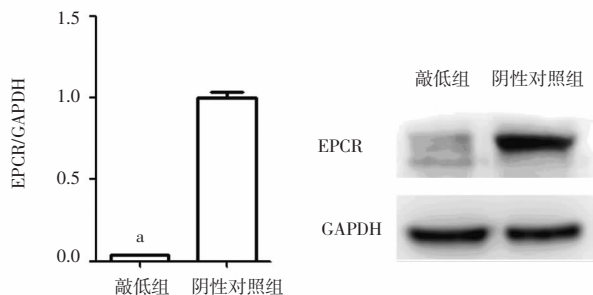


图 3 细胞感染效率检测(100×)

2.4 hUC-MSCs 内 EPCR 敲低效率检测

Real-time PCR 结果显示,敲低组和阴性对照组细胞 EPCR mRNA 相对表达量分别为 0.037 ± 0.006 、 1.003 ± 0.058 。敲低

组细胞 EPCR mRNA 水平低于阴性对照组 ($t=28.86$, $P=0.000$) (图 4A)。Western blot 结果示:敲低组和阴性对照组细胞 EPCR 的蛋白表达水平分别为 0.321 ± 0.010 、 1.668 ± 0.024 。敲低组细胞 EPCR 蛋白表达较阴性对照组明显降低 ($t=88.60$, $P=0.000$) (图 4B)。



注:a,与阴性对照组比较, $P=0.000$

B. EPCR 蛋白表达

A. EPCR mRNA 表达

图 4 病毒感染后 hUC-MSCs 内 EPCR 表达检测

2.5 敲低组细胞自身 Col I 表达减少

Real-time PCR 结果示,敲低 EPCR 会影响 α -SMA ($F=7.651$, $P=0.024$)、COL1A1 ($F=39.579$, $P=0.000$)、COL1A2 ($F=278.800$, $P=0.000$) 的 mRNA 表达 (表 3)。其中,无 TGF- β 1 刺激时,敲低组细胞内 COL1A1 ($P=0.044$) 和 COL1A2 ($P=0.000$) 的 mRNA 表达水平较阴性对照组低 (表 4)。Western blot 检测结果示,敲低 EPCR 会影响 α -SMA ($F=9.275$, $P=0.016$)、COL1A1 ($F=3\ 406.950$, $P=0.000$)、COL1A2 ($F=1\ 283.241$, $P=$

0.000) 的蛋白表达水平 (表 5)。无 TGF- β 1 刺激时,敲低组细胞 COL1A1 ($P=0.000$)、COL1A2 ($P=0.000$) 蛋白表达水平较阴性对照组低。这表明敲低 EPCR 后, hUC-MSCs 合成 Col I 减少。而无 TGF- β 1 刺激时,敲低组细胞与阴性对照组相比, α -SMA ($P=0.2766$, $P=0.6185$) 在 mRNA 和蛋白水平表达差异无统计学意义 (图 5)。

2.6 敲低组细胞向成纤维细胞分化的能力降低

Real-time PCR 结果显示,有无 TGF- β 1 刺激会影响 α -SMA ($F=369.713$, $P=0.000$)、COL1A1 ($F=42.051$, $P=0.000$)、COL1A2 ($F=359.205$, $P=0.000$) 的 mRNA 表达量 (表 4)。TGF- β 1 刺激 48 h 后,敲低组细胞的 α -SMA ($P=0.000$)、COL1A1 ($P=0.042$)、COL1A2 ($P=0.000$) 在 mRNA 水平明显升高,阴性对照组细胞的 α -SMA ($P=0.000$)、COL1A1 ($P=0.002$)、COL1A2 ($P=0.000$) 在 mRNA 水平均明显升高。Western blot 结果提示,有无 TGF- β 1 刺激会影响 α -SMA ($F=451.060$, $P=0.000$)、COL1A1 ($F=759.041$, $P=0.000$)、COL1A2 ($F=764.348$, $P=0.000$) 的蛋白表达水平 (表 5)。TGF- β 1 刺激 48 h 后,敲低组细胞的 α -SMA ($P=0.000$)、COL1A1 ($P=0.015$)、COL1A2 ($P=0.000$) 在蛋白水平明显升高,阴性对照组细胞的 α -SMA ($P=0.000$)、COL1A1 ($P=0.000$)、COL1A2 ($P=0.000$) 在蛋白水平均明显升高。说明敲低组和阴性对照组细胞均具有向成纤维细胞分化的能力。但 TGF- β 1 刺激 48 h 后,敲低组细胞的 α -SMA ($P=0.002$, $P=0.002$)、COL1A1 ($P=0.002$, $P=0.000$)、COL1A2 ($P=0.000$, $P=0.000$) mRNA 和蛋白的升高水平较阴性对照组低,说明敲低组细胞向成纤维细胞分化的能力减弱。

表 3 各组细胞 α -SMA、COL1A1、COL1A2 mRNA 及蛋白的相对表达量

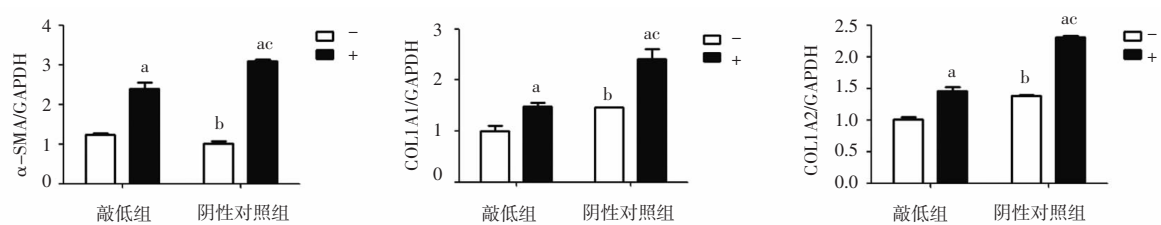
组别	α -SMA	COL1A1	COL1A2
敲低组 (-)	1.242 ± 0.039 (0.524 ± 0.026)	1.009 ± 0.141 (0.115 ± 0.009)	1.001 ± 0.054 (0.216 ± 0.015)
敲低组 (+)	2.394 ± 0.210 (1.008 ± 0.038)	1.483 ± 0.099 (0.151 ± 0.010)	1.465 ± 0.082 (0.373 ± 0.016)
阴性对照组 (-)	1.005 ± 0.098 (0.472 ± 0.036)	1.462 ± 0.013 (0.343 ± 0.011)	1.383 ± 0.016 (0.437 ± 0.004)
阴性对照组 (+)	3.099 ± 0.042 (1.239 ± 0.060)	2.418 ± 0.259 (0.651 ± 0.001)	2.308 ± 0.028 (0.716 ± 0.004)

表 4 各组细胞 α -SMA、COL1A1、COL1A2 mRNA 相对表达量的方差分析结果

变异来源	α -SMA		COL1A1		COL1A2	
	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值
敲低 EPCR	7.651	0.024	39.579	0.000	278.800	0.000
TGF- β 1 刺激	369.713	0.000	42.051	0.000	359.205	0.000
敲低 EPCR $\times$ TGF- β 1 刺激	31.152	0.001	4.800	0.060	39.606	0.000

表 5 各组细胞 α -SMA、COL1A1、COL1A2 蛋白表达水平的方差分析结果

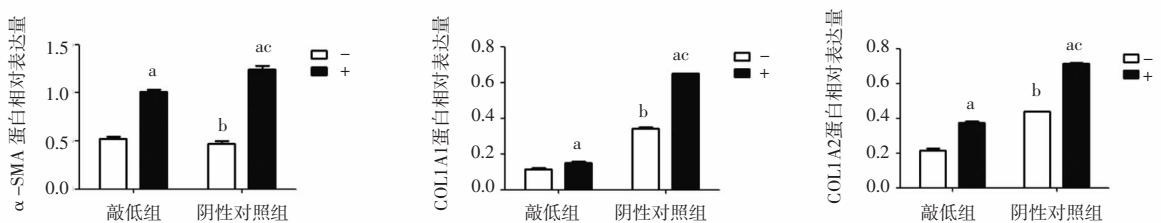
变异来源	α -SMA		COL1A1		COL1A2	
	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值
敲低 EPCR	9.275	0.016	3 406.950	0.000	1 283.241	0.000
TGF- β 1 刺激	451.060	0.000	759.041	0.000	764.348	0.000
敲低 EPCR $\times$ TGF- β 1 刺激	23.098	0.001	473.273	0.060	59.799	0.000



A. α-SMA、COL1A1、COL1A2 mRNA 表达



B. α-SMA、COL1A1、COL1A2 蛋白表达电泳图



注：“+”，TGF-β1 刺激；“-”，无 TGF-β1 刺激；a：与未用 TGF-β1 刺激比较；b：与未用 TGF-β1 刺激的敲低组细胞比较；c：TGF-β1 刺激后的敲低组和阴性对照组细胞比较

C. α-SMA、COL1A1、COL1A2 蛋白表达的量化分析

图 5 real-time PCR 和 Western blot 检测 α-SMA、COL1A1、COL1A2 的表达

3 讨论

目前 MSCs 已广泛应用于多种疾病的治疗研究中。MSCs 来源多样,其中,取材于健康脐带组织的 hUC-MSCs 因取材方便、无伦理学限制、旁分泌功能强大及免疫原性低等特点,成为临床干细胞治疗的主体^[14]。近年来, MSCs 已用于肺纤维化治疗研究。结果显示,急性肺损伤阶段予 MSCs 干预,可有效减轻随后发生的肺纤维化,这可能与 MSCs 强大的免疫调节功能、旁分泌某些细胞因子减轻炎症有关^[4-5]。但在肺纤维化形成后予 MSCs 治疗,则有可能加重肺纤维化。在放射性肺损伤纤维化期,输入肺内的 GFP-MSCs 能够表达成纤维细胞表面标志物——波形蛋白,显示 MSCs 分化为成纤维细胞^[8]。此外, Yan 等^[7]发现骨髓来源的 Flk-1⁺ MSCs 移植到放射线损伤的纤维化小鼠体内在不同时期可以分化为多种功能性肺细胞,其分化方向受肺内微环境调节,纤维

化期时, Flk-1⁺ MSC 在肺纤维化微环境调节下分化为成纤维细胞,而 TGF-β1 是微环境中影响其分化的重要促纤维化因子。随后,成纤维细胞在肺纤维化进程中继续分化为肌成纤维细胞^[5,15],而肌成纤维细胞大量异常聚集与肺纤维化严重程度密切相关,导致细胞外基质大量沉积,损害肺结构和功能,最终威胁生命^[16]。

由于 EPCR 可能与向间质转化的过程相关,本研究首先根据 EPCR 的 mRNA 序列,将设计的 3 个 siRNA 转入 hUC-MSCs 中,通过蛋白水平的检测选出最佳干扰序列。根据最佳 siRNA 序列,构建重组载体,经 DNA 测序,结果显示干扰序列成功整合入慢病毒载体中。将重组质粒在 293T 细胞中包装成重组 siEPCR 慢病毒,感染到 hUC-MSCs 中,流式细胞术检测 GFP 转染效率可达 99.8%, mRNA 及蛋白水平检测结果显示,敲低组细胞 EPCR 的表达被高效抑制,成功实现了细胞水平的基因敲低。进一步在体外构建 TGF-β1 诱导 MSCs 向成纤维细胞分化

的模型,发现敲低组细胞在 TGF- β 1 诱导后, α -SMA、COL1A1、COL1A2 在 mRNA 和蛋白的升高水平较阴性对照组降低,差异具有统计学意义,但敲低组细胞仍具有向成纤维细胞分化的能力。TGF- β 1 是最主要的致纤维化因子,参与多种器官纤维化形成^[17-18],主要通过与其特异性的转化生长因子- β 受体(transforming growth factor- β receptor, TGF- β R)结合,活化胞内 Ser/Thr 激酶,磷酸化的 Smad2、Smad3 诱导细胞向成纤维细胞分化,成纤维细胞进而产生大量的 α -SMA 和 Col I,加重纤维化^[19]。既往研究发现,TGF- β R 是 TGF- β 1 促进细胞向间质转化中最重要的受体^[20],所以敲低 EPCR 后,hUC-MSCs 仍具有向成纤维细胞分化的能力,但是本研究结果表明,敲低 EPCR 后的 hUC-MSCs 向成纤维细胞分化能力降低,说明 EPCR 可能也参与了 TGF- β 1 调控的间质转化过程。既往研究结果中,肺纤维化微环境中诱导 MSCs 分化为成纤维细胞的促纤维化因子可能是 TGF- β 1^[7],而 Bae 等^[21]发现肾的近端小管细胞表达 EPCR,急性肾损伤时,蛋白 C 与 EPCR 结合启动特异的凝血酶信号,进而调节 TGF- β 介导的细胞外基质生成,进一步说明 EPCR 与 TGF- β 介导的间质转化具有一定的相关性。除此之外,本课题组还发现敲低 EPCR 后,hUC-MSCs 本身分泌的 Col I 较阴性对照组明显减少。这与 Wang 等^[13]研究的 EPCR 阳性的乳腺干细胞高表达 Col I 相符合。但是,EPCR 究竟是如何参与间质转化,敲低 EPCR 后的 hUC-MSCs 表达 Col I 为何减少,还有待进一步的实验研究。

综上所述,本研究利用重组 siEPCR 慢病毒基因干扰技术,成功敲低 hUC-MSCs 中 EPCR 表达,证明敲低 hUC-MSCs 中的 EPCR 会降低 Col I 表达,减弱 hUC-MSCs 向成纤维细胞分化的能力。

参 考 文 献

- [1] King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Lancet, 2011, 378(9807): 1949-1961.
- [2] Kumamoto M, Nishiwaki T, Matsuo N, et al. Minimally cultured bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate fibrotic lung injury[J]. Eur Respir J, 2009, 34(3): 740-748.
- [3] Ono M, Ohkouchi S, Kanehira M, et al. Mesenchymal stem cells correct inappropriate epithelial-mesenchyme relation in pulmonary fibrosis using stanniocalcin-1[J]. Mol Ther, 2015, 23(3): 549-560.
- [4] Zhu H, Xiong Y, Xia Y, et al. Therapeutic effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in acute lung injury mice[J]. Sci Rep, 2017, 7: 39889.
- [5] Jun D, Garat C, West J, et al. The pathology of bleomycin-induced fibrosis is associated with loss of resident lung mesenchymal stem cells that regulate effector T-cell proliferation[J]. Stem Cells, 2011, 29(4): 725-735.
- [6] Chen J, Li Y, Hao H, et al. Mesenchymal stem cell conditioned medium promotes proliferation and migration of alveolar epithelial cells under septic conditions in vitro via the JNK-P38 signaling pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37(5): 1830-1846.
- [7] Yan X, Liu Y, Han Q, et al. Injured microenvironment directly guides the differentiation of engrafted Flk-1⁺ mesenchymal stem cell in lung[J]. Exp Hematol, 2007, 35(9): 1466-1475.
- [8] Mora AL, Rojas M. Aging and lung injury repair: a role for bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. J Cell Biochem, 2008, 105(3): 641-647.
- [9] Moodley Y, Vaghjiani V, Chan J, et al. Anti-inflammatory effects of adult stem cells in sustained lung injury: a comparative study[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e69299.
- [10] Gleeson EM, O'Donnell JS, Preston RJ. The endothelial cell protein C receptor: cell surface conductor of cytoprotective coagulation factor signaling[J]. Cell Mol Life Sci, 2012, 69(5): 717-726.
- [11] Mohan Rao LV, Esmon CT, Pendurthi UR. Endothelial cell protein C receptor: a multiliganded and multifunctional receptor[J]. Blood, 2014, 124(10): 1553-1562.
- [12] Yu QC, Song W, Wang D, et al. Identification of blood vascular endothelial stem cells by the expression of protein C receptor[J]. Cell Res, 2016, 26(10): 1079-1098.
- [13] Wang D, Cai C, Dong X, et al. Identification of multipotent mammary stem cells by protein C receptor expression[J]. Nature, 2015, 517(7532): 81-84.
- [14] Toonkel RL, Hare JM, Matthay MA, et al. Mesenchymal stem cells and idiopathic pulmonary fibrosis. Potential for clinical testing[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 188(2): 133-140.
- [15] Badri L, Lama VN. Lysophosphatidic acid induces migration of human lung-resident mesenchymal stem cells through the β -catenin pathway[J]. Stem Cells, 2012, 30(9): 2010-2019.
- [16] Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling[J]. Am J Pathol, 2012, 180(4): 1340-1355.
- [17] Khalil H, Kanisicak O, Prasad V, et al. Fibroblast-specific TGF- β -Smad2/3 signaling underlies cardiac fibrosis[J]. J Clin Invest, 2017, 127(10): 3770-3783.
- [18] Sun YB, Qu X, Caruana G, et al. The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis[J]. Differentiation, 2016, 92(3): 102-107.
- [19] Hameedalddeen A, Liu J, Batres A, et al. FOXO1, TGF- β regulation and wound healing[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(9): 16257-16269.
- [20] Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis[J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(6): 325-338.
- [21] Bae JS, Kim IS, Rezaie AR. Thrombin down-regulates the TGF- β -mediated synthesis of collagen and fibronectin by human proximal tubule epithelial cells through the EPCR-dependent activation of PAR-1[J]. J Cell Physiol, 2010, 225(1): 233-239.

(责任编辑:冉明会)