

# HIF-1 $\alpha$ 基因介导的牙髓干细胞在体外的成血管作用

邓立方, 朱友明, 王银龙

**摘要** 目的 探索低氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 基因诱导牙髓干细胞(DPSCs)在体外的成血管作用。方法 对HIF-1 $\alpha$ 进行基因突变,构建突变型、野生型以及对照组的慢病毒载体;体外培养DPSCs;分别用3种慢病毒转染DPSCs后,检测细胞转染效率、目的基因HIF-1 $\alpha$ 在mRNA及蛋白水平的表达,MTT法检测慢病毒载体对细胞增殖的影响;目的基因转染成功后,qPCR、Western blot法检测HIF-1 $\alpha$ 调控DPSCs成血管因子的表达。结果 MTT结果表明慢病毒载体对DPSCs的增殖几乎无影响。qPCR和Western blot法检测目的基因HIF-1 $\alpha$ 成功表达,HIF-1 $\alpha$ 能够显著上调DPSCs的成血管因子的表达( $P < 0.05$ )。突变组和野生组的成血管作用明显强于对照组( $P < 0.05$ ),而突变组又优于野生组( $P < 0.05$ )。结论 HIF-1 $\alpha$ 基因可以促进DPSCs血管向分化作用。

**关键词** HIF-1 $\alpha$ ; DPSCs; 慢病毒转染; 成血管

**中图分类号** R 782

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2016)08-1120-05

牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)有很强的增殖能力和多向分化的潜能,随着基因工程和组织工程技术的发展,DPSCs越来越多地被用作修复受损组织或器官的转基因靶细胞<sup>[1]</sup>。低氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )是HIF-1的活性单位,调控数百种基因的转录活性,涉及骨髓源性血管细胞生成、血管反应、动脉血管形成等<sup>[2]</sup>。HIF-1 $\alpha$ 蛋白稳定性和转录活性均受细胞内氧浓度的调节<sup>[3]</sup>,为了使其在常氧状态下实现稳定表达并且能够保持高度活性,对HIF-1 $\alpha$ 基因进行抗降解突变和保持活性突变<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>表明血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)可以显著增强DPSCs成血管的活性,而HIF-1 $\alpha$ 作为VEGF的上游靶基因,其在诱导DPSCs成血管作用方面具有更大的优势。骨修复和再生

中,血管与骨形成是相辅相成不可分开的,HIF-1 $\alpha$ 是此生物学过程中必需的关键性因子<sup>[6]</sup>。该研究拟运用基因增强组织工程技术,将HIF-1 $\alpha$ 基因稳定转染至DPSCs中,探索HIF-1 $\alpha$ 在体外的成血管作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** DMEM培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(FBS)(美国Hyclone公司);HIF-1 $\alpha$ 、成血管抗体(英国Abcam公司);qPCR试剂盒(日本TaKaRa公司);PVDF膜(美国Invitrogen公司);细胞裂解液等。

### 1.2 方法

**1.2.1 慢病毒载体 Lenti-MT、Lenti-WT 及 Lenti-LacZ 的构建** 首先将野生型的HIF-1 $\alpha$ 基因(wild type HIF-1 $\alpha$ , WT)进行基因突变为突变型HIF-1 $\alpha$ (mutant type HIF-1 $\alpha$ , MT):402位脯氨酸(Pro 402)突变成丙氨酸(Ala 402),803位天冬酰胺(Asn 803)突变成丙氨酸(Ala 803),564位脯氨酸(Pro 564)突变成丙氨酸(Ala 564)。然后分别合成过表达载体pcDNA6.2-WT及pcDNA6.2-MT,通过BP/LR重组后,构建慢病毒载体Lenti-WT、Lenti-MT和Lenti-LacZ。最后病毒包装后进行滴度测定。

**1.2.2 DPSCs 的培养和分离** 临床收集年轻因正畸需要拔除的健康前磨牙或阻生齿,无菌条件下劈开牙齿取出牙髓,剪碎。先在培养皿中滴入1滴培养液,用消毒过的镊子将剪碎的组织放入培养液中,铺平勿重叠。用无菌凡士林涂于盖玻片四角,将盖玻片轻轻盖在组织上,使其贴壁生长,切勿产生气泡。最后加入适量培养液于恒温培养箱中培养,1周后有细胞爬出,待细胞长满状态良好进行传代。

**1.2.3 HIF-1 $\alpha$  基因转染 DPSCs 最佳感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 值的测定** DPSCs培养至第3代,按 $2 \times 10^5$ /孔将细胞接种于6孔板中,设定MOI值分别为2、4、6、8、10,将病毒转入细胞中。转病毒后每天观察各孔中的荧光表达情况,选择荧光细胞达到一定比例的最低MOI值作为最佳的MOI值。

2016-05-04 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31501103)

作者单位:安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032

作者简介:邓立方,女,硕士研究生;

王银龙,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: wangylah@sina.com

**1.2.4 MTT 比色分析慢病毒对 DPSCs 细胞增殖水平的影响** 将 DPSCs 铺入 96 孔板中,第 2 天弃去培养液和未贴壁的细胞,每个基因分 5 组,每组设 6 孔,转病毒 Lenti-LacZ、Lenti-WT 及 Lenti-MT,常规培养。连续 7 d 每天先向各孔中加入 5 mg/ml 的 MTT 各 20  $\mu$ L,培养箱培养 4 h 后,再分别每孔加入 150  $\mu$ L 的 DMSO 并置于摇床上缓慢震荡 30 min 使结晶物充分溶解。最后用酶标仪测定各孔 490 nm 处的吸光度值。实验重复 3 次,取均值。

**1.2.5 qPCR 法测定目的基因 HIF-1 $\alpha$  以及成血管相关因子(VEGF、SDF-1、Ang-2)的 mRNA 的表达** 选择状态良好、处于对数生长期的 DPSCs 细胞进行铺板。首先用 0.25% 胰酶消化后 1 000 r/min 离心 5 min,用完全培养基将细胞沉淀重悬获得单细胞悬液,细胞计数,按照每孔  $2 \times 10^5$  个细胞传于 6 孔板中。待细胞生长至 60% ~ 70% 融合度时,按照之前测定的最佳 MOI 值加入相应体积的慢病毒转染 DPSCs 细胞,实验分组为 Lenti-LacZ/DPSCs、Lenti-WT/DPSCs、Lenti-MT/DPSCs。分别于转染后 0、1、4、7、14 及 21 d 收集细胞。TRIzol 法提取细胞总 RNA,核酸蛋白测定仪测定 DNA 浓度及纯度, RNA 纯度为 260/280 1.7 ~ 1.9,按照 Invitrogen 试剂说明书反转录 cDNA 置 -20  $^{\circ}$ C 保存备用。最后按 qPCR 仪设定的 PCR 扩增体系进行 PCR 扩增,系统自带软件显示各样本 Ct 值,将标本检测所得的 Ct 值与相应的  $\beta$ -actin 基因 Ct 值相减,进行标准化,校正标本 RNA 质量和反转录效率的差别,实验重复进行 3 次。 $\Delta Ct = Ct_{HIF-1\alpha} - Ct_{\beta-actin}$ 。 $\Delta\Delta Ct$  定义为  $\Delta Ct_{不同处理组} - \Delta Ct_{未转染组}$ ,计算  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行相对定量。

**1.2.6 Western blot 法检测 HIF-1 $\alpha$  蛋白以及成血管相关蛋白(VEGF、SDF-1、Ang-2)的表达** 实验分组同 qPCR,分别于病毒转染后 0、1、4、7、14 及 21 d 收集细胞。加入 2  $\mu$ L 蛋白酶抑制剂及 200  $\mu$ L 细胞裂解液,置于冰袋上,摇床缓慢震荡 15 min,吹打收集细胞中的蛋白。最后于 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min。BCA 法测定蛋白质浓度,确定电泳每孔上样量为 30  $\mu$ L。用 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离胶,湿式电转移法将蛋白转移至 PVDF 膜。TBST 冲洗 3 次,每次 10 min,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液附一抗 4  $^{\circ}$ C 过夜。第 2 天在室温下附二抗 2 h 后 TBST 洗涤 3 次。DAB 显色,暗室曝光、显影。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS 17.0 软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 细胞转染效率检测** DPSCs 转染病毒 7 d 后,病毒转染效果最好。倒置荧光显微镜观察 MOI = 10 pfu/cell 时,转染效率最高,达 90% 以上,DPSCs 保持增殖状态。见图 1。

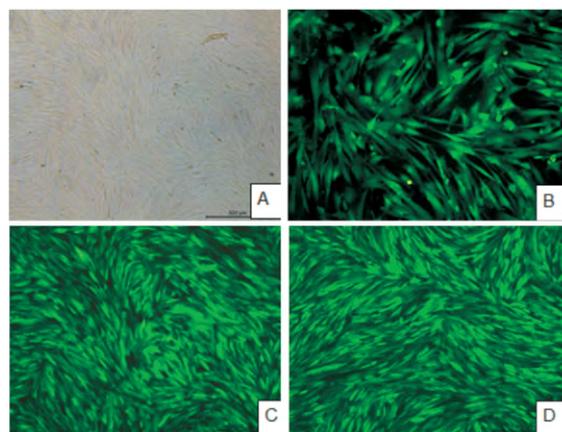


图 1 细胞转染结果  $\times 500$

A: 未转染组; B: Lenti-LacZ 组; C: Lenti-WT 组; D: Lenti-MT 组

**2.2 慢病毒转染对 DPSCs 增殖的影响** 在目的基因转染 DPSCs 后 1 ~ 7 d 进行 MTT 检测,结果显示,转基因组吸光度值高于 LacZ 组,MT 组大于 WT 组(图 2)。这些结果也说明构建的突变型 HIF-1 $\alpha$  基因在体外常氧条件下可以稳定过表达并保持高度活性。另外,MTT 结果表明慢病毒载体对 DPSCs 的增殖几乎没有什么影响,而且 HIF-1 $\alpha$  基因还有促进 DPSCs 增殖的作用。

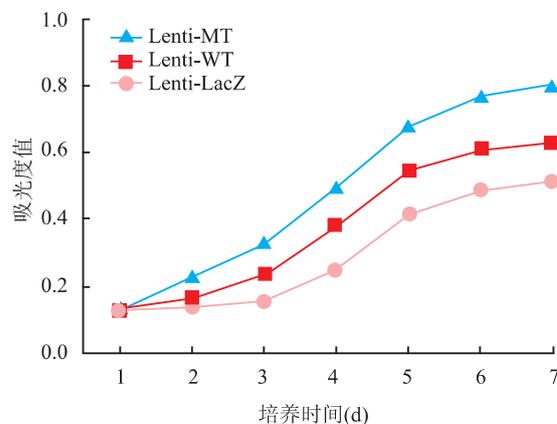


图 2 慢病毒转染对 DPSCs 增殖的影响

**2.3 目的基因检测** 实时定量 PCR 结果显示, Lenti-MT 组目的基因转染 DPSCs 后,第 1 天 HIF-1 $\alpha$

mRNA 的表达开始增高,7 d 后达到高峰,14、21 d 虽有降低但仍维持在很高水平。Lenti-MT 组的 HIF-1 $\alpha$  表达与 Lenti-WT 组转染 1 d 后就出现差异,7 d 及 21 d mRNA 的表达量,Lenti-MT 组几乎比 Lenti-WT 组高出 1 倍 ( $P < 0.05$ ),Lenti-WT 组 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的表达缓慢增长后逐渐降低。Lenti-LacZ 组虽然也有少量 HIF-1 $\alpha$  的表达,但其与目的基因组相比,4、7、14、21 d 差异均有统计学意义 ( $F = 6.167, P < 0.05$ )。蛋白水平的表达趋势与 mRNA 相符,LacZ 组几乎看不到 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达,而 Lenti-MT 组蛋白表达水平不断升高,Lenti-WT 组则相对稳定。见图 3。

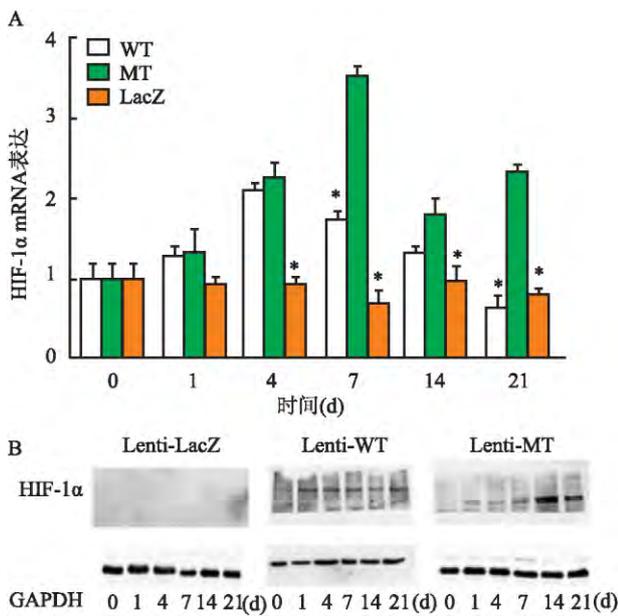


图3 目的基因检测

A: HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达; B: HIF-1 $\alpha$  蛋白表达; 与 Lenti-MT 组比较: \*  $P < 0.05$

### 2.4 HIF-1 $\alpha$ 促进 DPSCs 成血管因子 mRNA 表达的检测

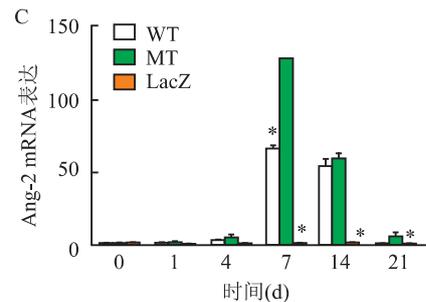
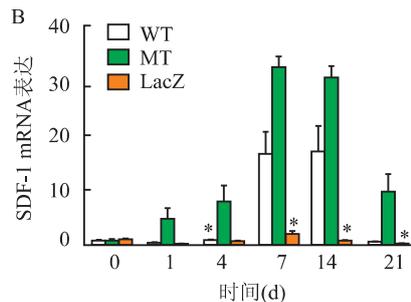
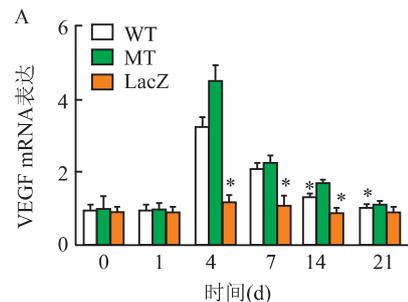


图4 qPCR 分析目的基因转染 DPSCs 后在成血管相关基因的表达

A: VEGF; B: SDF-1; C: Ang-2; 与 Lenti-MT 组比较: \*  $P < 0.05$

作用密切相关的基因。其中,VEGF 基因在第 4 天 Lenti-MT 组的表达量为 Lenti-LacZ 组的 2~3 倍 ( $F = 3.329, P < 0.05$ ) (图 4 A)。SDF-1 基因第 4 天时 Lenti-MT 组为 Lenti-LacZ 组的 4~5 倍,第 7 天为 10~15 倍 ( $F = 6.231, P < 0.05$ ) (图 4 B)。Ang-2 基因第 7 天、第 14 天 Lenti-MT 组为 Lenti-LacZ 组的 20~30 倍 ( $F = 2.457, P < 0.05$ ) (图 4 C)。此外,成血管基因在 Lenti-MT 组的表达水平与 Lenti-WT 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.5 HIF-1 $\alpha$  促进 DPSCs 成血管因子蛋白表达的检测** 基因转染后 0、1、4、7、14、21 d,收集细胞,Western blot 法检测成血管相关蛋白的表达。在目的基因转染后第 1 天,VEGF 和 SDF-1 蛋白表达增高,其过表达持续到第 21 天。Lenti-WT 组和 Lenti-MT 组的 VEGF 蛋白表达水平与 Lenti-LacZ 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),VEGF 蛋白 Lenti-MT 组高于 Lenti-WT 组 ( $P < 0.05$ ),SDF-1 蛋白 Lenti-MT 组与 Lenti-WT 组之间无显著差异。Ang-2 蛋白在目的基因转染后第 4 天出现过表达,第 7~14 天表达水平持续增高,与基因表达趋势几乎一致,Lenti-WT 组和 Lenti-MT 组显著高于 Lenti-LacZ 组 ( $P < 0.05$ ),同时,Lenti-MT 组明显高于 Lenti-WT 组 ( $P < 0.05$ )。见图 5。

### 3 讨论

近年来有关骨组织工程的研究越来越多,其与传统自体骨和自体骨相比有很多的优点。当人体硬组织由于外伤或肿瘤等原因缺损时,可选择组织工程骨加以修复。但当组织工程骨的厚度超过 100~200  $\mu\text{m}$ ,必须在骨中形成血管才能为细胞提供氧及各种营养物质并且运出代谢废物<sup>[7]</sup>。因此,骨组织工程中种子细胞复合支架材料后,除了要有细胞因子的诱导,还需要成功建立血液循环。

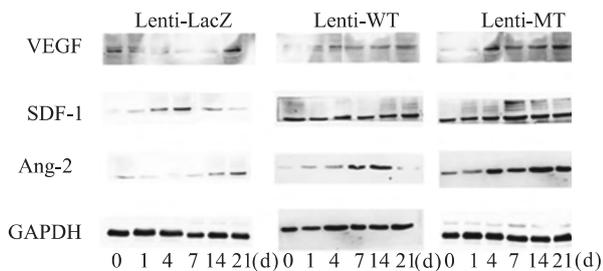


图5 Western blot 法检测成血管相关蛋白的表达

VEGF 是重要的促进血管生成因子,其被低氧激活后,对诱导血管的发生起关键作用。但是仅凭 VEGF 调控不能获得稳定且成熟的血管网<sup>[8]</sup>。HIF-1 $\alpha$  是 VEGF、SDF-1 和 Ang-2 等成血管因子的上游调控基因,其具有更好的促血管生成作用<sup>[9]</sup>。低氧状态下 HIF-1 $\alpha$  是血管发生的中心调控因子,调控其他生长因子的表达,直接参与血管发生的整个生物学过程<sup>[10]</sup>。

DPSCs 作为种子细胞有 4 个优点: ① 获取方便: 可从脱落的乳牙或者拔除的正畸牙、智齿的牙髓中分离得到; ② 细胞扩增后可再植于自体需要修复的组织中,从而避免了免疫抑制剂的使用<sup>[11]</sup>; ③ 多向分化: DPSCs 来源于间叶组织能够分化为脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞、神经元等<sup>[12]</sup>; ④ 高度增殖: DPSCs 的体外培养增殖速度是骨髓间充质干细胞的 30 ~ 50 倍,比骨髓间充质干细胞具有更高的克隆形成能力<sup>[13]</sup>; 目前 DPSCs 的研究是口腔医学领域中的一个热点。

综上所述,本实验采用基因突变技术对 HIF-1 $\alpha$  基因进行区域突变,实现体外常氧条件下 HIF-1 $\alpha$  的稳定表达并保持其高度活性。然后构建 Lenti-WT、Lenti-MT 及 Lenti-LacZ 慢病毒载体,将上述载体成功转染 DPSCs 后,体外检测 HIF-1 $\alpha$  诱导 DPSCs 成血管因子(VEGF、SDF-1 及 Ang-2)的表达情况。初步证实了体外 HIF-1 $\alpha$  基因促进 DPSCs 成血管的作用,体外实验结果为体内动物实验研究奠定了基础。但是 HIF-1 $\alpha$  体外诱导 DPSCs 成血管分化的作用机制以及如何在体内促进血管重建,还需要进一步的

探索。

## 参考文献

- [1] Tirino V, Paino F, d'Aquino R, et al. Methods for the identification, characterization and banking of human DPSCs: current strategies and perspectives[J]. Stem Cell Rev, 2011, 7(3): 608-15.
- [2] Rey S, Semenza G L. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling[J]. Cardiovasc Res, 2010, 86(2): 236-42.
- [3] Kaelin W G Jr, Ratcliffe P J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway[J]. Mol Cell, 2008, 30(4): 393-402.
- [4] Manalo D J, Rowan A, Lavoie T, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1[J]. Blood, 2005, 105(2): 659-69.
- [5] Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells[J]. J Dent Res, 2002, 81(8): 531-5.
- [6] Liu T, Gao Y, Sakamoto K, et al. BMP-2 promotes differentiation of osteoblasts and chondroblasts in Runx2-deficient cell lines[J]. J Cell Physiol, 2007, 211(3): 728-35.
- [7] Jain R K, Au P, Tam J, et al. Engineering vascularized tissue[J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(7): 821-3.
- [8] Blau H M, Banfi A. The well-tempered vessel[J]. Nat Med, 2001, 7(5): 532-4.
- [9] Olsson A K, Dimberg A, Kreuger J, et al. VEGF receptor signaling-in control of vascular function[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(5): 359-71.
- [10] Street J, Bao M, deGuzman L, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(15): 9656-61.
- [11] Mitsiadis T A, Feki A, Papaccio G, et al. Dental pulp stem cells, niches, and notch signaling in tooth injury[J]. Adv Dent Res, 2011, 23(3): 275-9.
- [12] Yan X, Qin H, Qu C, et al. IPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin[J]. Stem Cells Dev, 2010, 19(4): 469-80.
- [13] Huang G T, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine[J]. J Dent Res, 2009, 88(9): 792-806.

## On HIF-1 $\alpha$ gene in promoting the formation of blood vessel by DPSCs *in vitro*

Deng Lifang, Zhu Youming, Wang Yinlong

(Stomatologic Hospital & College, Anhui Medical University, Key Lab. of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To explore the function of HIF-1 $\alpha$  gene in promoting the differentiation of dental pulp stem

## miRNA21 抑制剂对食管癌细胞凋亡的影响

李红霞<sup>1</sup>, 李玉芝<sup>1</sup>, 高峻峰<sup>1</sup>, 刘思涵<sup>1</sup>, 葛磊<sup>1</sup>, 鲍扬漪<sup>1</sup>, 汪正广<sup>2</sup>

**摘要** 目的 探讨 miRNA21 抑制剂对食管癌细胞 EC109 凋亡的影响。方法 实时荧光定量 PCR 法检测 20 例食管癌及癌旁组织中 miRNA21 的表达。转染 miRNA21 抑制剂入人食管癌细胞株 EC109, Caspase 3 活性检测试剂盒分析 Caspase 3 活性变化, DNA 片段检测试剂盒分析 DNA 片段变化, Western blot 法检测 Caspase 3 及 Bcl-2 表达。结果 相对癌旁组织, 食管癌组织中 miRNA21 表达明显升高; miRNA21 抑制剂能显著增加 EC109 细胞凋亡; 同时 miRNA21 抑制剂促进食管癌细胞 EC109 Caspase 3 的表达上调, Bcl-2 的表达下调。结论 食管癌的发生可能与 miRNA21 的高表达有关, miRNA21 抑制剂可能通过下调 Bcl-2 的表达诱导人食管癌细胞 EC109 的凋亡。

**关键词** 食管癌; 细胞凋亡; miRNA21; Bcl-2

**中图分类号** R 735.1

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2016)08-1124-04

食管癌是常见的消化道肿瘤之一<sup>[1]</sup>, 在我国食管癌发病率和死亡率位于前列<sup>[2]</sup>。手术切除术是目前治疗食管癌的主要方法, 但手术切除对患者

有严格的要求, 如已呈恶病质、发生远端转移等的患者均不能行根治性手术治疗。因此, 寻找食管癌进展及转移等病变的特异性指标对其治疗及提高患者的生存率具有重要的理论和实际意义。microRNA (miRNA) 是一类广泛存在于真核细胞中, 长度一般为 21~23 个核苷酸的 RNA 分子<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>显示, miRNA 对真核细胞的基因表达具有调控作用。miRNA 通过与靶标基因转录的 mRNA 分子的 3' 端非编码区互补结合, 阻断蛋白质翻译的过程从而发挥对靶标的调控。miRNA 在肿瘤的发生发展过程中的作用已有相关报道<sup>[5]</sup>, 但在食管癌中研究较少。该实验在研究食管癌组织标本中 miRNA21 表达变化的基础上, 在人食管癌细胞 EC109 中转染 miRNA21 抑制剂, 探讨其对食管癌细胞凋亡的影响及其可能的作用机制。

### 1 材料与方法

**1.1 组织、细胞及主要试剂** 标本来自安徽医科大学第三附属医院胸外科手术切除并经病例证实的食管癌及癌旁组织; 人食管癌细胞株 EC109 (中国科学院上海细胞库); miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒 (HG SYBR Green RNU6B, AP01501, 中国北国海基生物科技有限公司); 小鼠抗人 Bcl-2 及 Caspase 3 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司); 小鼠抗人 GAPDH

2016-05-04 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1608085MH182)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学第三附属医院肿瘤科, 合肥 230061

<sup>2</sup>安徽医科大学第一附属医院普外科, 合肥 230022

作者简介: 李红霞, 女, 副主任医师;

鲍扬漪, 女, 主任医师, 责任作者, E-mail: 1262074653@qq.com

cells (DPSCs) into blood vessels *in vitro*. **Methods** HIF-1 $\alpha$  gene was mutated. The lentiviral vectors of Lenti-WT, Lenti-MT and Lenti-LacZ were constructed. The DPSCs were cultured and treated with three lentiviral vectors. Then the cells transduction efficiency and the expression of target gene at the level of mRNA and protein were detected. The influence on cell proliferation from lentiviral vectors was detected by MTT. After transduction, RNA and protein were extracted, the expression of angiogenic factor was detected by qPCR and Western blot. **Results** MTT showed that there was no effect on DPSCs proliferation from lentiviral vectors. The results of qPCR and Western blot showed that HIF-1 $\alpha$  gene was located in cell nucleus, expression of target gene was detected at both mRNA and protein level. After gene transduction, expression of angiogenic factor at the mRNA and protein levels was significantly increased ( $P < 0.05$ ). The formation of blood vessel in Lenti-MT and Lenti-WT groups was better than that in Lenti-LacZ group ( $P < 0.05$ ), and the best result was found in Lenti-MT group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** HIF-1 $\alpha$  could promote DPSCs to form blood vessels.

**Key words** HIF-1 $\alpha$ ; DPSCs; lentivirus transfection; angiogenesis