

Smad7 转染人骨髓间充质干细胞的初步实验研究*

陈康,蔡晓峰,度瑶,赖佳,李旭清[△]

(解放军第三二四医院眼科,重庆 400029)

摘要:目的 将 Smad7 转染到人骨髓间充质干细胞(BMMSC),并进行绿色荧光标记,将其植入兔青光眼手术模型,观察 BMMSC 存活情况。方法 采用 BP 反应和 LR 反应,将绿色荧光标记的 Smad7 基因片段通过噬菌体插入 BMMSC 中,通过集落筛选,选出阳性表达细胞株。15 只新西兰大耳白兔行小梁切除,局部予以 BMMSC,观察细胞存活情况。结果 BMMSC 的 Smad7 表达稳定,绿色荧光标记成功。BMMSC 在兔活体小梁存活,荧光表达满意,眼压稳定。结论 绿色荧光标记的 Smad7 能稳定转染到 BMMSC,在兔小梁切除手术模型表达稳定。

关键词:受体,转化生长因子- β ;小梁切除术;Smad7;骨髓间充质干细胞

中图分类号:R775.9

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)06-0730-02

Primary research of human bone marrow mesenchymal stem cells transfected by Smad7*

Chen Kang, Cai Xiaofeng, Tuo Yao, Lai Jia, Li Xuqing[△]

(Department of Ophthalmology, PLA 324 Hospital, Chongqing 400029, China)

Abstract: Objective Human bone marrow mesenchymal stem cells were transfected by Smad7 and labeled with green fluorescent mark. BMMSCs were implanted into rabbit glaucoma operational model and observed surviving condition. **Methods** Through BP and LR reaction, Smad7 with green fluorescent mark was inserted into human bone marrow mesenchymal stem cells by bacteriophage, filtered positive colony and picked out cell line. 15 New Zealand white rabbits were enforced trabeculectomy with BMMSC, then following up cell survival condition. **Results** Smad7 expressed stable in human bone marrow mesenchymal stem cells with satisfactory green fluorescent mark. BMMSC survived in rabbit trabecula with stable green fluorescent and effective ocular press. **Conclusion** Smad7 with green fluorescent mark could be inserted into human bone marrow mesenchymal stem cells stably, and has effective results in rabbit model.

Key words: receptors, transforming growth factor bata; trabeculectomy; Smad7; bone marrow mesenchymal stem cells

滤过口堵塞是青光眼手术面临的实际问题,主要原因是局部的成纤维细胞增殖,其与转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 关系密切,如何在滤过口持续有效抑制 TGF- β 是研究的重点^[1-3]。TGF- β 下游细胞信号传递过程中,Smad7 是一种重要的抑制因子,作用于 TGF- β 下游细胞信号的多环节^[4-5]。本实验探讨能否将 Smad7 转染到人骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSC)后植入兔青光眼小梁术后模型,观察 BMMSC 存活情况,希望能将其用于青光眼滤过手术的动物模型研究。

1 材料与方

1.1 材料与动物 人骨髓间充质干细胞(广州赛业), Gateway LR ClonaseTM II Plus Enzyme Mix, Gateway BP ClonaseTM II Enzyme Mix (Invitrogen 公司), QIAquick Gel Extraction 试剂盒(Qiagen 公司), PrimeSTARTM HS DNA Polymerase (Takara 公司), Taq DNA Polymerase (Fermentas 公司), GeneRulerTM dNTP Mix, 100 bp DNA Ladder (Fermentas 公司)。新西兰大耳白兔(重庆大坪动物研究所)。

1.2 设备 PCR 仪(Bio-Rad 公司), UV transilluminator (UVP 公司), 水平电泳槽、电泳仪(北京 61 仪器厂), 全温空气摇床(上海福玛公司), 冰冻切片机(Leica CM 1850UV, 北京中仪光科科技有限公司), 荧光显微镜(奥林巴斯中国有限公司), 手术显微镜、全自动眼压计(拓扑康公司)。

1.3 绿色荧光标记的 Smad7 转染 BMMSC 并鉴定

1.3.1 重叠 PCR 扩增 attB1-gene1-attB2 attB1-gene1-attB2 引物设计,上游引物 5'-GGG ATA CCA CAT GTT CAA GAC CAT ACG A-3', 下游引物 5'-CCT AAG CTT GAG CTA CCG TCT GTT GGA GA-3'。PCR 反应体系: 5 \times Primer STARTM Buffer 10.0 μ L, 上、下游引物各 1.0 μ L, DNA 模板 1.0 μ L, dNTP Mixture 4.0 μ L, Primer STARTM HS DNA Polymerase 0.5 μ L, 加入 ddH₂O 至 50.0 μ L。98 $^{\circ}$ C, 3 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min 终止反应。

1.3.2 通过 Gateway 技术建立 pDown-反应体系 BP clonase 1 μ L, pDonr221, attB1-gene1-attB2 各 100 ng, 加入 TE 至 5 μ L。产物转入大肠杆菌 Stb13 中。电击穿 Stb13 细胞加 BP 反应物 2 μ L, 0 $^{\circ}$ C 反应 30 min; 细胞 42 $^{\circ}$ C 热击 90 s, 0 $^{\circ}$ C 反应 2 min; 加入 S. O. C. 溶液 300 μ L, 225 r/min, 37 $^{\circ}$ C, 摇床孵育 1 h; 含 50 μ g/mL 卡拉霉素(Kan)的 LB 平板上涂 100 μ L 转化后的菌液, 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 阳性克隆菌落通过 PCR 筛选; 取阳性克隆并进行克隆测序。

1.3.3 利用 Gateway 技术构建 pUP 启动子 25 $^{\circ}$ C BP 反应 3 h; 大肠杆菌 Stb13 转入 BP 反应产物; 挑选阳性克隆并进行测序。同样步骤构建 pTail-IRES/gene2。

1.3.4 利用 Gateway 技术构建最终表达载体 少量提取质粒 pDown-和骨架载体; 25 $^{\circ}$ C, LR 反应 3 h。反应体系:

* 基金项目:重庆市卫生局课题(2011-2-588)。 作者简介:陈康(1972-), 副主任医师, 博士, 主要从事青光眼和眼表疾病的临床研究。

[△] 通讯作者, E-mail: lixuqingcq@gmail.com。

pDown-gene1 10 ng; pUP 启动子 12 ng; pTail-IRES/gene2 13 ng; 骨架载体 60 ng; LR clonase 1 μ L; TE buffer 加至 5 μ L; 25 $^{\circ}$ C, BP 反应 3 h; 大肠杆菌 Stbl3 中转入 BP 反应产物; 挑选阳性克隆并进行测序。

1.4 骨髓间充质干细胞动物活体移植及观察 新西兰大耳白兔 15 只, 雄性, 体质量(3.7 \pm 0.4)kg, 静脉注射法按照 1 mg \cdot mL⁻¹ \cdot kg⁻¹ 予以麻醉, 做角膜缘结膜切口, 巩膜瓣 4 cm \times 5 cm, 角巩缘后做 1 cm \times 3 cm 半层巩膜入前房, 巩膜瓣和结膜下滴 1 \times 10⁵/mL 细胞悬液 3 滴, 间断缝合巩膜瓣和结膜, 注意观察动物反应及眼压变化, 1 周后空气栓塞处死动物, 滤过口附近巩膜组织做荧光染色。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行统计分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Smad7 蛋白鉴定 空白 BMMSC 细胞编号 1 组、导入绿色荧光蛋白 BMMSC 细胞编号 2 组、导入 Smad7 与绿色荧光蛋白 BMMSC 细胞编号 3 组。其中 1 组(17 625.33 \pm 6 840.77)和 2 组(19 805.35 \pm 12 442.19)的 Smad7 表达相似, 3 组(30 957.55 \pm 10 324.51) Smad7 表达明显升高, 说明 Smad7 基因导入成功, 表达稳定, 见图 1。

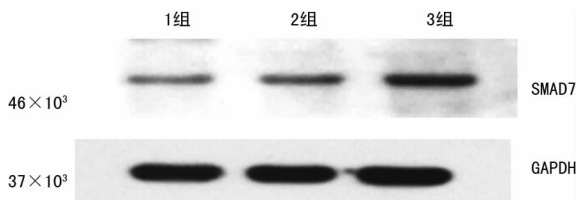


图 1 Smad7 蛋白在各组细胞中的表达变化

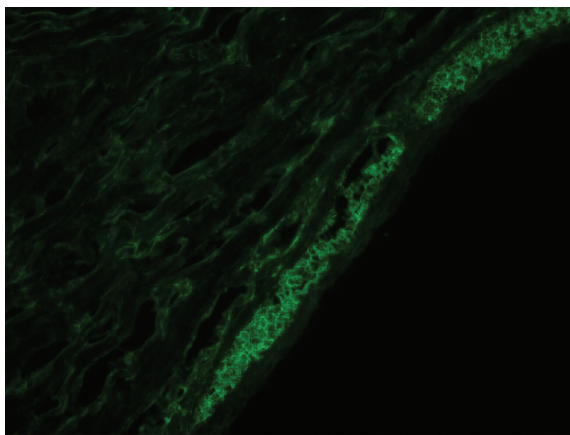


图 2 含绿色荧光蛋白 BMMSC 在兔小梁网组织中的表达(荧光显微镜 $\times 200$)

2.2 动物术后情况 观察过程中动物无死亡, 局部无感染、排斥反应, 无局部肉芽组织形成。术后 1~3 d, 小梁网手术区域局部结膜充血, 角膜透明, 前房无角膜后沉淀物, 眼压稳定, 按压下方眼球见滤过泡隆起; 术后 4~7 d 局部结膜充血逐渐减退, 前节无异常, 眼压稳定, 按压眼球滤过泡扁平隆起。

2.3 动物模型荧光照相结果 术后 7 d, 小梁网表面见密集荧光标记的骨髓间充质干细胞, 说明移植的 BMMSC 在小梁网组织原位存活, 局部细胞聚集浓度较高, 未见周围扩散现象, 见图 2。

2.4 术后眼压 3 组兔术后眼压结果($n = 10$): 第 1 天(13.5 \pm 2.4) mm Hg, 第 3 天(14.8 \pm 1.6) mm Hg, 第 7 天

(15.4 \pm 1.9) mm Hg, 各组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨 论

BMMSC 来源方便, 具有向不同组织分化的潜能, 遗传背景比较稳定是理想的靶细胞^[6-7]。TGF- β /Smad 信号通路是目前研究的热门。TGF- β 亚家族至少发现 6 种结构相似分子 TGF- β I ~ VI, 其生物学作用相似且同源性很高, 人类主要是 TGF- β I ~ III。Smad 家族中 TGF- β 信号通路的下游蛋白有 Smad2, Smad3, Smad4, Smad6, Smad7 等, 参与了成纤维细胞增殖调控的整个环节。Smad 信号蛋白分为 3 种: 限制型(Smad1, Smad2, Smad3, smad5, Smad8); 共有型(Smad4); 抑制型(Smad6, Smad7)。其中抑制型蛋白 Smad7 竞争性结合 TGF- β I 型受体, 核转位至细胞质, 抑制蛋白激酶, 干扰限制型 Smad 蛋白的磷酸化, 导致 TGF- β 信号通路受限^[8-9]。在生理状态下抑制型 Smad7 主要位于细胞核, 受 TGF- β 刺激, 入核发挥生理调节作用。研究发现 TGF- β 限制型信号蛋白能诱导产生抑制型 Smad7, 而 Smad7 通过负反馈调节来抑制 TGF- β 过度作用^[10-11]。

Smad7 对于眼的胚胎发育有重要作用, 敲除 Smad7 导致组织增殖和凋亡异常, 出现组织缺损和小眼症^[12]。通过转染 Smad7 基因, 能有效抑制肾纤维化动物模型的肾间质纤维化的程度。将 Smad7 利用腺病毒转染小鼠肺纤维化动物模型, 发现 I 型胶原和羟脯氨酸的含量降低, 结果动物的肺纤维化程度减轻^[13]。Smad7 与增殖性玻璃体视网膜病变联系密切^[14]; 干扰 Smad7 表达导致小梁网细胞表达 TGF- β 2 水平下降, 抑制细胞外基质过度沉积^[15-16]; 阻断 Smad7 能抑制损伤导致的角膜内皮增殖^[17]。

本研究将 BMMSC 在兔活体小梁存活, 荧光表达满意, 眼压控制稳定, 为下一步动物实验打下基础, 但是观察时间还有限, 还需要不同对照组进行对比研究, 需要延长观察时间了解移植后的最终抗增殖效果, 上述情况还在研究过程中。

参考文献:

[1] Rosentreter A, Schild AM, Jordan JF, et al. A prospective randomised trial of trabeculectomy using mitomycin C vs an ologen implant in open angle glaucoma[J]. Eye, 2010, 24(9):1449-1457.

[2] Palejwala N, Ichhpujani P, Fakhraie G, et al. Single needle revision of failing filtration blebs: a retrospective comparative case series with 5-fluorouracil and mitomycin C[J]. Eur J Ophthalmol, 2010, 20(6):1026-1034.

[3] Sapitro J, Dunmire JJ, Scott SE, et al. Suppression of transforming growth factor- β effects in rabbit subconjunctival fibroblasts by activin receptor-like kinase 5 inhibitor[J]. Mol Vis, 2010, 16(16):1880-1892.

[4] Yu AL, Birke K, Moriniere J, et al. TGF- β 2 induces senescence-associated changes in human trabecular meshwork cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(11):5718-5723.

[5] Kitagawa K, Yanagisawa S, Watanabe K, et al. A hyperdry amniotic membrane patch using a tissue adhesive for corneal perforations and bleb leaks[J]. Am J Ophthalmol, 2009, 148(3):383-389.

[6] Johnson TV, Bull ND, Hunt DP, et al. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem(下转第 735 页)

本研究发现青蒿琥酯对 Hsp47 mRNA 的表达影响并不十分明显,但却能显著降低该蛋白的表达。所以作者推测青蒿琥酯可能在转录后水平影响 Hsp47 的表达,具体作用于哪个环节仍需进一步研究。

综上所述,青蒿琥酯能够通过抑制 Hsp47 表达来下调 I 型胶原表达水平,减轻肺纤维化。这为临床上治疗肺纤维化提供一定的参考。

参考文献:

- [1] 汤艳,郑金旭. HSP47 在肺纤维化中的作用机制[J]. 山东医药,2010,50(49):117-118.
- [2] Kakugawa T, Mukae H, Hayashi T, et al. Pirfenidone attenuates expression of HSP47 in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Eur Respir J*, 2004, 24(1): 57-65.
- [3] Nakayama S, Mukae H, Sakamoto N, et al. Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF- β 1-stimulated human lung fibroblasts [J]. *Life Sciences*, 2008, 82(3/4): 210-217.
- [4] Kakugawa T, Mukae H, Hishikawa Y, et al. Localization of HSP47 mRNA in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Virchows Arch*, 2010, 456(3): 309-315.
- [5] Taguchi T, Nazneen A, Al-Shihri AA, et al. Heat shock protein47: a novel biomarker of phenotypically altered Collagen-Producing cells[J]. *Acta Histochem Cytochem*, 2011, 44(2): 35-41.
- [6] Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, et al. Antisense oligonucleotide inhibition of heat shock protein (HSP) 47 improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. *Respir Res*, 2007, 8: 37.
- [7] Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, et al. An antisense oligonucleotide to HSP47 inhibits paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. *Toxicology*, 2007, 236(3): 199-207.
- [8] Ishida Y, Kubota H, Yamamoto A, et al. Type I Collagen in Hsp47-null Cells Is Aggregated in Endoplasmic Reticulum and deficient in N-Propeptide Processing and Fibrillogenesis [J]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(5): 2346-2355.
- [9] Yagi-Utsumi M, Yoshikawa S, Yamaguchi Y, et al. NMR and mutational identification of the Collagen-Binding site of the chaperone Hsp47 [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45930.
- [10] 王昌明,张孝飞,吕倩,等. 青蒿琥酯对人胚肺成纤维细胞系 HFL-I 细胞胶原合成的影响及机制[J]. 山东医药, 2010, 50(27): 13-14.
- [11] 张伟,姜良铎,张晓梅,等. 肺纤方对博来霉素致肺间质纤维化大鼠肺系数与肺组织病理的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(8): 544-548, 579.
- [12] Chen L, Wang T, Wang X, et al. Blockade of advanced glycation end product formation attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2009, 10: 55.
- [13] Bhaskaran M, Kolliputi N, Wang Y, et al. Trans-differentiation of alveolar epithelial type II cells to type I cells involves autocrine signaling by transforming growth factor beta 1 through the Smad pathway [J]. *J Bio Chem*, 2007, 282(15): 3968-3976.
- [14] Rojas J, Fernandez I, Pastor JC, et al. A genetic case-control study confirms the implication of SMAD7 and TNF locus in the development of proliferative vitreoretinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(3): 1665-1678.
- [15] Su Y, Yang CY, Li Z, et al. Smad7 siRNA inhibit expression of extracellular matrix in trabecular meshwork cells treated with TGF- β 2 [J]. *Mol Vis*, 2012, 18(12): 1881-1884.
- [16] Fuchshofer R, Stephan DA, Russell P, et al. Gene expression profiling of TGFbeta2-and/or BMP7-treated trabecular meshwork cells: Identification of Smad7 as a critical inhibitor of TGF-beta2 signaling [J]. *Exp Eye Res*, 2009, 88(6): 1020-1032.
- [17] Sumioka T, Ikeda K, Okada Y, et al. Inhibitory effect of blocking TGF-beta/Smad signal on injury-induced fibrosis of corneal endothelium [J]. *Mol Vis*, 2008, 14(7): 2272-2281.

(收稿日期:2014-08-21 修回日期:2014-09-27)

(上接第 731 页)

- cell transplantation in experimental glaucoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(4): 2051-2059.
- [7] Johnson TV, Martin KR. Development and characterization of an adult retinal explant organotypic tissue culture system as an in vitro intraocular stem cell transplantation model [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(8): 3503-3512.
- [8] Ghosh AK, Quaggin SE, Vaughan DE. Molecular basis of organ fibrosis: potential therapeutic approaches [J]. *Exp Biol Med*, 2013, 238(5): 461-481.
- [9] Braunger BM, Pielmeier S, Demmer C, et al. TGF- β signaling protects retinal neurons from programmed cell death during the development of the mammalian eye [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(35): 14246-14258.
- [10] Meng XM, Chung AC, Lan HY. Role of the TGF- β /BMP-7/Smad pathways in renal diseases [J]. *Clin Sci*, 2013, 124(4): 243-254.
- [11] Lan HY, Chung AC. TGF- β /Smad signaling in kidney disease [J]. *Semin Nephrol*, 2012, 32(3): 236-243.
- [12] Zhang R, Huang H, Cao P, et al. Sma-and Mad-related protein 7(Smad7) is required for embryonic eye development in the mouse [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(15): 10275-10285.

(收稿日期:2014-10-10 修回日期:2014-12-15)