

腺病毒介导 siRNA 抑制全反式维甲酸诱导的骨髓间充质干细胞 RAR β 表达

毕杨, 龚敏, 何昀, 张赟, 陈洁, 李廷玉

重庆医科大学附属儿童医院 儿童营养研究中心 儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室, 重庆 400014

毕杨, 龚敏, 何昀, 等. 腺病毒介导 siRNA 抑制全反式维甲酸诱导的骨髓间充质干细胞 RAR β 表达. 生物工程学报, 2012, 28(5): 632-642.

Bi Y, Gong M, He Y, et al. Recombinant adenovirus expressing siRNA is generated to inhibit the expression of RAR β in rat mesenchymal stem cells treated by all-trans retinoic acid. Chin J Biotech, 2012, 28(5): 632-642.

摘要: 构建携带针对大鼠维甲酸受体 β (Retinoic acid receptor β , RAR β) 基因的 siRNA 重组腺病毒, 并感染全反式维甲酸 (All-trans retinoic acid, ATRA) 处理的骨髓间充质干细胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs), 检测其对 RAR β 的表达及 MSCs 成神经分化的影响。设计针对大鼠 RAR β 的 4 对 siRNA 的 DNA 序列, 体外退火形成双链, 定向克隆至含有 U6/H1 双启动子的腺病毒穿梭质粒 pSES-HUS, 随后与腺病毒骨架质粒 pAd-Easy1 在 BJ5183 细菌中同源重组, 并在 HEK293 细胞中包装获得重组腺病毒 Ad-siRAR β 。腺病毒感染大鼠 MSCs 后经 ATRA 处理 24 h, Real-time、Western blotting 及免疫荧光检测 RAR β 的表达情况。改良神经诱导培养基 (Modified neuronal induction medium, MNM) 诱导 MSCs 神经分化, Real-time PCR 及免疫荧光检测神经相关蛋白表达。PCR、酶切及测序鉴定均证实 siRNA 正确克隆至腺病毒质粒中, 腺病毒感染大鼠 MSCs 后可观察到 60% 以上的细胞有红色荧光蛋白 (Red fluorescent protein, RFP) 表达。经 ATRA 处理 24 h, Real-time、Western blotting 及免疫荧光检测发现 RAR β 表达定位于细胞核, ATRA 作用后 MSCs 中 RAR β 表达增高 16.5 ± 2.34 倍 ($P < 0.05$), 有 3 组 siRNA 能有效抑制 ATRA 诱导的 RAR β 表达增强, 抑制率分别为 $(66.26 \pm 9.12)\%$ 、 $(48.70 \pm 5.78)\%$ 、 $(64.09 \pm 0.53)\%$ ($P < 0.05$), 且以 pool 组效果最强, 抑制率为 $(78.09 \pm 4.24)\%$ ($P < 0.01$)。ATRA 联合 MNM 诱导 MSCs 成神经样细胞, 表达相关神经特异蛋白 Nestin、NSE、MAP-2、Tau, 免疫荧光结果显示神经标志蛋白 Nestin、NSE、Tju1 表达阳性细胞率为 $(50 \sim 88)\%$, 而腺病毒介导的 siRAR β 能有效抑制 MSCs 的神经标志物表达水平及阳性细胞率 ($P < 0.05$)。成功构建了携带针对大鼠 RAR β 基因的 siRNA 重组腺病毒, 能有效感染 MSCs 并显著抑制 ATRA 诱导的 RAR β 表达增强和 MSCs 的神经分化。

关键词: 维甲酸受体 β , 腺病毒载体, 小干扰 RNA, 骨髓间充质干细胞

Received: October 19, 2011; **Accepted:** December 29, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30830106), Natural Science Foundation of Chongqing, China (No. CSTC2010BB5097), China Postdoctoral Science Foundation (No. 20100480667), Project of Chongqing Municipal Health Bureau, China (No. 2010-2-217).

Corresponding author: Tingyu Li. Tel: +86-23-63630319; E-mail: tyli@vip.sina.com

国家自然科学基金 (No. 30830106), 重庆市自然科学基金 (No. CSTC2010BB5097), 中国博士后基金 (No. 20100480667), 重庆市医学科研计划项目 (No. 2010-2-217) 资助。

Recombinant adenovirus expressing siRNA is generated to inhibit the expression of RAR β in rat mesenchymal stem cells treated by all-trans retinoic acid

Yang Bi, Min Gong, Yun He, Yun Zhang, Jie Chen, and Tingyu Li

Key Laboratory of Developmental Diseases in Childhood of Ministry of Education, Children's Nutritional Research Center, the Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

Abstract: To construct the recombinant adenovirus vector expressing specific siRNA for rat retinoic acid receptor- β (RAR β) gene, and to detect its effect on RAR β expression and neuronal differentiation of all-trans retinoic acid (ATRA) treated mesenchymal stem cells (MSCs). First, we designed four pairs of siRNA sequence for rat RAR β gene and annealed complementary oligonucleotides *in vitro*, then cloned double-stranded DNA in pSES-HUS vector containing U6/H1 double-promoter and recombined with the backbone vector to construct pAd-siRAR β plasmid. We infected MSCs by using adenovirus Ad-siRAR β which was packaged in HEK293 cell line, then performed Real-time, Western blotting and immunofluorescence to detect the expression of RAR β . We used combination of ATRA and MNM to induce MSCs into neural-like cells, then performed Real-time PCR and immunofluorescence to detect neuronal specific markers of induced neural cells. By using PCR, endonuclease cutting and gene sequencing, we confirmed that the target genes were correctly cloned in adenovirus vector. We could observe more than 60% RFP-positive MSCs at 24 h after adenovirus infection. The expression of RAR β was significantly increased to 16.5 \pm 2.34 fold in ATRA treated MSCs ($P<0.05$) and located in nucleus. Three of four pairs siRNA could effectively inhibit the expression of RAR β with inhibition efficacy of (66.26 \pm 9.12)%, (48.70 \pm 5.78)%, (64.09 \pm 0.53)% ($P<0.05$), especially siRNA-pool group with inhibition efficacy of (78.09 \pm 4.24)% ($P<0.01$). Combination of ATRA and MNM induced MSCs into neural-like cells which expressed neuronal specific markers, *Nestin*, *NSE*, *MAP-2*, and *Tau*. Immunofluorescence result showed that about 50~88 percent of cells were positive for Nestin, NSE, Tju1, however, adenovirus medicated expression of siRAR β could effectively inhibit the expression level of neural specific proteins and the ratio of positive stained cells ($P<0.05$). Therefore, we successfully constructed the recombinant adenovirus vector containing siRNA for rat RAR β gene, adenovirus could effectively infect MSCs and inhibit the expression of induced RAR β in ATRA treated MSCs, then inhibit neuronal differentiation of MSCs.

Keywords: retinoic acid receptor- β , adenovirus vector, small interfering RNA, mesenchymal stem cells

全反式维甲酸 (All-trans retinoic acid, ATRA) 是目前公认的能有效诱导干细胞分化的重要因子,它是维生素 A 在体内的重要活性代谢产物,多项研究证实 ATRA 及其信号通路广泛参与了胚胎期和生后早期神经细胞分化、轴向对称生长等神经系统发育过程^[1]。ATRA 主要通过细胞核膜上的维甲酸受体 (Retinoic acid receptor, RAR) 介导信号转导,影响下游基因的转录调控从而发挥其生物学效应^[2]。RARs 包含由不同基

因编码的 α 、 β 与 γ 3 个亚型,其中 RAR β 是一种在神经细胞特异表达的受体,对神经元表型的决定和维持有重要作用^[3]。前期结果显示,骨髓间充质干细胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs) 中几乎不表达 RAR β ,而 ATRA 预处理可以增强 RAR β 的表达,促进骨髓间充质干细胞定向成神经分化^[4],提示 RAR β 可能是维甲酸信号转导途径参与 MSCs 成神经分化的重要因素。siRNA 沉默技术是研究信号转导通路的重要技术方法^[5],

本研究构建并筛选出携带针对大鼠 *RARβ* 基因的 siRNA 重组腺病毒, 感染 MSCs 后能有效抑制 ATRA 诱导的 *RARβ* 表达增高, 为进一步探讨 *RARβ* 是否参与维甲酸信号转导途径调控的 MSCs 成神经分化作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

腺病毒穿梭质粒 pSES-HUS、携带腺病毒骨架质粒 pAd-Easy1 的大肠杆菌 BJ5183 (美国芝加哥大学何通川教授馈赠); 大肠杆菌 DH5 α 、HEK293 细胞 (本实验室保存); 大鼠 MSCs 为本实验室分离培养, 内切酶 *Sfi* I、*Pme* I、*Pac* I (Biolabs 公司); T4 DNA 连接酶、RT-PCR 试剂盒、PCR Premix、Real-time PCR Master Mix (TaKaRa 公司); DNA marker、质粒抽提试剂盒 (Promega 公司); LipofectamineTM 2000 (Invitrogen 公司); DMEM 培养基、胎牛血清 (HyClone 公司); 兔抗大鼠 *RARβ* 多克隆抗体、兔抗大鼠神

经元特异性烯醇化酶 (Neuron-specific enolase, NSE) 抗体 (Abcam 公司); 羊抗大鼠巢蛋白 (Nestin) 抗体、小鼠抗大鼠 β -微管蛋白 (β -tubulin, Tju1) 抗体、小鼠抗大鼠 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体、HRP 标记的羊抗兔二抗 (Santa Cruz 公司); Dylight488 标记的羊抗兔、羊抗小鼠、驴抗羊二抗 (Jackson Immuno Research 公司); PCR 引物 (Invitrogen 公司合成); 基因测序由重庆医科大学感染病重点实验室完成。

1.2 方法

1.2.1 pAd-si*RARβ* 腺病毒载体的构建

设计 4 对大鼠 *RARβ* 基因的 siRNA 序列 (表 1), 体外退火 (10 mmol/L 各 10 μ L 混合, 100 $^{\circ}$ C, 10 min, 自然冷却至室温) 成两端有 *Sfi* I 酶切位点的双链 DNA, *Sfi* I 酶切 pSES-HUS 质粒, 与退火片段 16 $^{\circ}$ C 连接 4 h, 连接产物电转大肠杆菌 DH5 α , 卡那霉素抗性筛选单克隆, 抽提质粒, PCR (反应体系 20 μ L : 2 μ L 质粒模板, 330 mg/L siRNA 反义链和 U6 启动子引物各

表 1 大鼠 *RARβ* 的 siRNA 序列

Table 1 Sequences of siRNA for rat *RARβ*

| Sequence name | Sequence (5'-3') |
|---|----------------------------|
| Rat <i>RARβ</i> siRNA site-1 sense | AGCATTGAGAAGAACATGATTTTT |
| Rat <i>RARβ</i> siRNA site-1 anti-sense | AATCATGTTCTTCTCAATGCTTTT |
| Rat <i>RARβ</i> siRNA site-2 sense | AGACACCATGACTTTCTCTGTTTT |
| Rat <i>RARβ</i> siRNA site-2 anti-sense | ACAGAGAAAGTCATGGTGTCTTTT |
| Rat <i>RARβ</i> siRNA site-3 sense | AGGTGCAGAACGTGTAATTATTTT |
| Rat <i>RARβ</i> siRNA site-3 anti-sense | ATAATTACACGTTCTGCACCTTTT |
| Rat <i>RARβ</i> siRNA site-4 sense | AGGTAAATACACCACGAATTTTTT |
| Rat <i>RARβ</i> siRNA site-4 anti-sense | AAATTCGTGGTGTATTTACCTTTT |
| U6 promoter primer for screening and sequencing | CGCGGATCCAAGGTCGGCAGGAAGAG |

0.5 μL, 2×反应液 10 μL, 加水至 20 μL; PCR 参数: 94 °C 2 min; 94 °C 20 s, 56 °C 20 s, 72 °C 20 s, 30 个循环; 72 °C 2 min) 鉴定后并送测序, 获得 4 组 pSES-siRARβ 质粒。Pme I 酶切 pSES-siRARβ 质粒将其线性化, 纯化后转化入携带 pAd-Easy1 骨架质粒的 BJ5183 感受态细胞内进行同源重组, 卡那霉素和链霉素筛选, PCR (引物及条件同前) 和以 pAd-Easy1 为对照的 Pac I 酶切鉴定获得腺病毒质粒 pAd-siRARβ。

1.2.2 重组腺病毒在 HEK293 细胞中包装并感染大鼠 MSCs

将 Pac I 酶切线性化的重组腺病毒质粒 pAd-siRARβ 用脂质体转染 HEK293 细胞, 每隔 3 d 在倒置荧光显微镜下观察红色荧光蛋白 (Red fluorescent protein, RFP) 的表达变化及细胞状态。继续培养 10~14 d, 离心收集漂浮及贴壁细胞, 1 mL PBS 重悬, -80 °C/37 °C 反复冻融 4 次, 离心取上清, 反复感染 HEK293 细胞数次获得高滴度病毒。计算病毒滴度公式: 病毒滴度 (PFU/mL) = RFP 阳性细胞数 × 病毒液稀释倍数 (PFU) / 稀释后体积 (mL)。MSCs 按 2×10⁵ 细胞/孔接种 6 孔板中, 用 10、20、40、80 感染复数 (MOI: 病毒颗粒/MSCs) 的腺病毒感染, 48 h 后在荧光显微镜下计数 RFP 阳性细胞百分率, 计算病毒的最佳 MOI。

1.2.3 Real-time PCR 筛选 4 组 siRNA 对 ATRA 诱导的 RARβ 表达的抑制效率

MSCs 按 2×10⁵ 细胞/孔接种 6 孔板中, 待细胞贴壁后分别用 4 组 Ad-siRARβ 重组腺病毒感染, 同时设置空白对照组及 Ad-RFP 腺病毒对照组, 病毒感染 3 d 后加入 1 μmol/L ATRA 处理

24 h, 提取各组细胞的 mRNA, 反转录成 cDNA 模板, 用能特异扩增大鼠 RARβ 的引物 (表 2) 进行 Real-time PCR 扩增 (PCR 反应体系 20 μL: 2 μL cDNA 模板, 330 mg/L 引物各 0.5 μL, 2×SYBR Green 反应液 10 μL, 加水至 20 μL; PCR 参数: 94 °C 3 min; 94 °C 10 s, 54 °C 20 s, 72 °C 20 s, 40 个循环; 溶解曲线 65 °C~95 °C 每 5 s 增加 0.5 °C, 读板), 同时以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参平行管。将筛选出的有效果的 3 组 Ad-siRARβ 腺病毒等摩尔比例混合设为 pool 组, 同上方法检测对 RARβ 的抑制效果。后续实验 siRARβ 组均为 3 种有效 Ad-siRARβ 腺病毒混合感染细胞。

表 2 Real-time PCR 引物

Table 2 Primers for Real-time PCR

| Primer name | Sequence (5'-3') |
|-----------------------|-----------------------|
| Rat RARβ sense | AAAGCCCACCAGGAAACC |
| Rat RARβ anti-sense | CTTGCCGAACTCCACGAT |
| Rat GAPDH sense | TGGATGGTCCCTCTGGAA |
| Rat GAPDH anti-sense | GTGAGCTTCCCGTTCAGC |
| Rat Nestin sense | GGGCAAGTGAACGTTAGA |
| Rat Nestin anti-sense | TCCCACCGCTGTTGATTT |
| Rat NSE sense | CTGTTTGCTGCTCAAGGTC |
| Rat NSE anti-sense | TCCCCTACTACGAGGTCTGC |
| Rat MAP-2 sense | GTATCAGGAGACAGGGAGGAG |
| Rat MAP-2 anti-sense | GGGGTAGTAGGTGTTGAGGTG |
| Rat Tau sense | AAAGGTGGCAGTGGTTTCG |
| Rat Tau anti-sense | GGCTGGTGCTTCAGGTTTC |

1.2.4 Western blotting 及免疫荧光检测 siRAR β pool 对 ATRA 诱导的 MSCs 的 RAR β 表达的抑制效果

在 6 孔板中设置对照组、ATRA 组、Ad-RFP+ATRA 组及 Ad-siRAR β pool+ATRA 组, 提取总蛋白, 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 每组蛋白上样量一致, 80 V 转膜 1 h 至 PVDF 膜。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1~2 h, 加入抗 RAR β 抗体 (1 : 200) 或 β -actin 抗体 (1 : 200), 4 °C 过夜; 洗膜, 加入 HRP 标记的二抗 (1 : 2000), 室温 30 min; ECL 发光, 用 Image Pro Plus 6.0 软件分析灰度值。在 24 孔板中同组设置各孔, 吸弃培养基, PBS 洗涤 1 次, 加 500 μ L 甲醇/孔, -20 °C 固定 15 min; 5% 牛血清白蛋白 500 μ L/孔, 室温封闭 1 h; 兔抗大鼠 RAR β 抗体 (1 : 500 稀释于 PBS) 4 °C 摇动孵育过夜; Dylight488 标记的羊抗兔二抗 (1 : 1 000 稀释于 PBS) 室温摇动孵育 30 min; PBS 洗涤 5 min, 重复 3 次, 立即置于倒置荧光显微镜下观察照相, Image J 软件测定荧光强度值。

1.2.5 Real-time PCR 及免疫荧光检测 siRAR β 对 ATRA 诱导的 MSCs 神经分化的影响

MSCs 按 2×10^5 细胞/孔接种 6 孔板中, 待细胞贴壁后用 Ad-siRAR β pool 重组腺病毒感染, 同时设置 MSCs 对照组、ATRA 处理对照组及 Ad-RFP 腺病毒对照组, 病毒感染 3 d 后加入 1 μ mol/L ATRA 处理 24 h, 弃去完全培养基, D-hank's 液洗细胞 2 次, 加入改良神经诱导培养基 (Modified neuronal induction medium, MNM) (含 2% 二甲亚砜, 200 μ mol/L 丁基羟基茴香醚, 20 mmol/L KCl, 1.6 mmol/L 丙戊酸, 8 μ mol/L 福斯高林, 0.8 μ mol/L 氢化可的松, 4 ng/L 胰岛

素的 DMEM/F12 无血清培养基) 诱导细胞 24 h。提取各组细胞的 mRNA, 反转录成 cDNA 模板, Real-time PCR 检测特异性神经标志物 *Nestin*、*NSE*、微管相关蛋白 2 (Microtubule-associated protein 2, *MAP-2*)、*Tau* 蛋白的表达 (引物见表 2, 方法同 1.2.3)。在 24 孔板中同组设置各孔, 同 1.2.4 方法检测神经标志物 *Nestin*、*NSE* 及 *Tju1* 的表达。实验重复 3 次, 每次随机选取 10 个非重叠视野, 计数阳性细胞占总细胞的百分率。

1.3 统计学分析

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表达, 应用 SPSS13.0 软件分析, 采用 *t* 检验比较组间差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pAd-siRAR β 腺病毒载体的构建

4 组 pSES-siRAR β 质粒经上述引物 PCR 可扩出约 300 bp 的条带, 测序结果与所设计的 siRNA 序列完全一致。同源重组后的 pAd-siRAR β 质粒 PCR 同样可获得约 300 bp 的条带, *Pac I* 酶切质粒可见 4 500 bp 的特征性小片段和大于 30 kb 的大片段 (图 1), 表明重组腺病毒质粒 pAd-siRAR β 构建成功。

2.2 重组腺病毒在 HEK293 细胞中包装并感染大鼠 MSCs

pAd-siRAR β 质粒经 *Pac I* 酶切后转染 HEK293 细胞, 24 h 可观察到约 10%~20% 细胞有 RFP 的表达, 10 d 可见 RFP 阳性细胞呈现云雾状聚集, 细胞变圆有病毒空斑形成, 待 1/2 以上细胞脱壁漂浮时收集病毒液, 数次感染 HEK293 细胞, 最终得到的 4 个重组腺病毒滴度

在 $(4.5 \times 10^8 \sim 7.0 \times 10^8)$ PFU/mL 范围。重组腺病毒感染大鼠 MSCs 的 RFP 阳性率在 60%~70% 时, MOI 分别为 20、20、40、20 (图 2)。

2.3 Real-time PCR 筛选 siRNA 对 RAR β 表达的抑制效率

ATRA 处理可显著增强 RAR β 的表达

16.5 \pm 2.34 倍 ($P < 0.05$), 4 组 Ad-siRAR β 处理后 ATRA 诱导 MSCs 的 RAR β 表达量分别下降了 (66.26 \pm 9.12)%、(48.70 \pm 5.78)%、(64.09 \pm 0.53)%、(-19.1 \pm 1.24)%。将有抑制效果的前 3 组 Ad-siRAR β 混合为 pool 后, 对 RAR β 的抑制效率明显增强, 表达量下降 (78.09 \pm 4.24)% ($P < 0.01$) (图 3)。

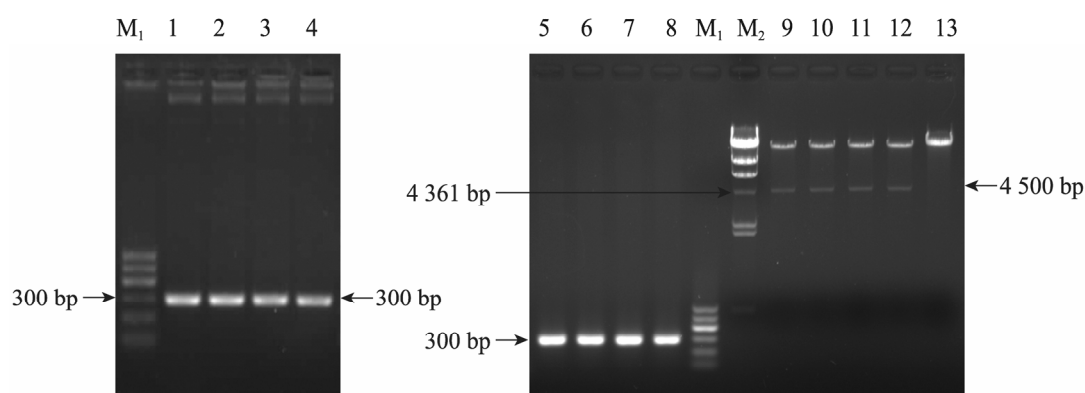


图 1 pAd-siRAR β 腺病毒载体的构建鉴定

Fig. 1 Construction of four pairs of pAd-siRAR β adenovirus recombinant. M₁: DNA marker 1 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp; M₂: λ /Hind III DNA marker 23 130 bp, 9 416 bp, 6 557 bp, 4 361 bp, 2 322 bp, 2 027 bp, 564 bp, 125 bp; 1: pSES-siRAR β 1 U6+site1 anti-sense PCR; 2: pSES-siRAR β 2 U6+site2 anti-sense PCR; 3: pSES-siRAR β 3 U6+site3 anti-sense PCR; 4: pSES-siRAR β 4 U6+site4 anti-sense PCR; 5: pAd-siRAR β 1 U6+site1 anti-sense PCR; 6: pAd-siRAR β 2 U6+site2 anti-sense PCR; 7: pAd-siRAR β 3 U6+site3 anti-sense PCR; 8: pAd-siRAR β 4 U6+site4 anti-sense PCR; 9: pAd-siRAR β 1 Pac I; 10: pAd-siRAR β 2 Pac I; 11: pAd-siRAR β 3 Pac I; 12: pAd-siRAR β 4 Pac I; 13: pAd-Easy1 Pac I.

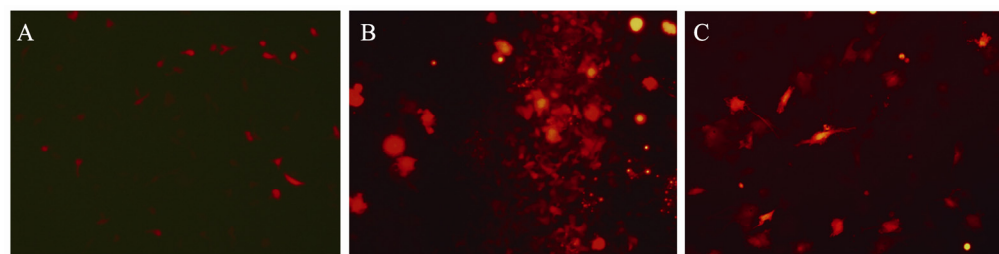


图 2 Ad-siRAR β 腺病毒在 HEK293 细胞中包装及感染大鼠 MSCs (以 Ad-siRAR β 1 为例)

Fig. 2 Package of Ad-siRAR β in HEK293 cells and infection of rat MSCs (take Ad-siRAR β 1 as example). (A) pAd-siRAR β 1 transfected HEK293 cells at 1 d. (B) pAd-siRAR β 1 transfected HEK293 cells at 10 d. (C) Ad-siRAR β 1 infected MSCs at 2 d.

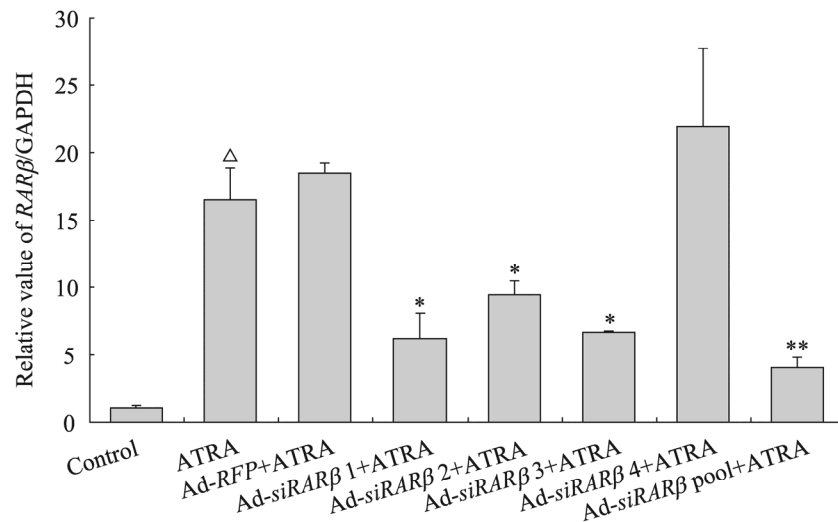


图3 不同处理组 RARβ 的表达水平

Fig. 3 The expression of RARβ in each treated groups. Δ: $P < 0.05$ compared with control group; *: $P < 0.05$ compared with Ad-RFP+ATRA group; **: $P < 0.01$ compared with Ad-RFP+ATRA group.

2.4 siRARβ 可抑制 ATRA 诱导的 MSCs RARβ 表达增高

对照组 MSCs 中几乎无 RARβ 表达, ATRA 处理 24 h 后的 MSCs 有较强的 RARβ 蛋白表达, 并定位于细胞核 (图 4、5), Ad-RFP 腺病毒感染不影响 RARβ 的表达及定位变化, Ad-siRARβ 组 ATRA 诱导的 RARβ 表达明显降低 ($P < 0.05$)。

2.5 siRARβ 可抑制 ATRA 诱导的 MSCs 神经分化

MSCs 中仅有少量的 Nestin 表达, ATRA 联合 MNM 培养可诱导 MSCs 向神经分化, 分化 24 h 后表达 Nestin、NSE、MAP-2 及 Tau 特异性神经细胞标志 (图 7), 免疫荧光结果显示 Nestin、NSE、Tju1 阳性细胞比例为 $(50.37 \pm 5.01)\%$ 、 $(85.45 \pm 6.78)\%$ 、 $(88.02 \pm 15.37)\%$ (表 3)。siRARβ 组相关神经标志物的表达降低, Nestin、NSE、Tju1 阳性细胞比例分别为 $(38.94 \pm 4.26)\%$ 、 $(21.39 \pm 5.19)\%$ 、 $(27.79 \pm 6.54)\%$, 差异有统计学

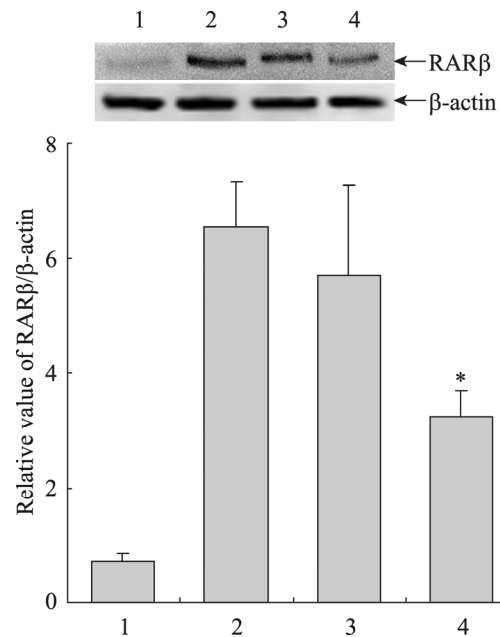


图4 Western blotting 检测 Ad-siRARβ 对 ATRA 诱导的 RARβ 表达的抑制

Fig. 4 Western blotting was performed to detect the inhibition efficiency of Ad-siRARβ to ATRA induced RARβ expression. 1: control group; 2: ATRA group; 3: Ad-RFP+ATRA group; 4: Ad-siRARβ+ATRA group. $n=3$; *: $P < 0.05$ compared with Ad-RFP+ATRA group.

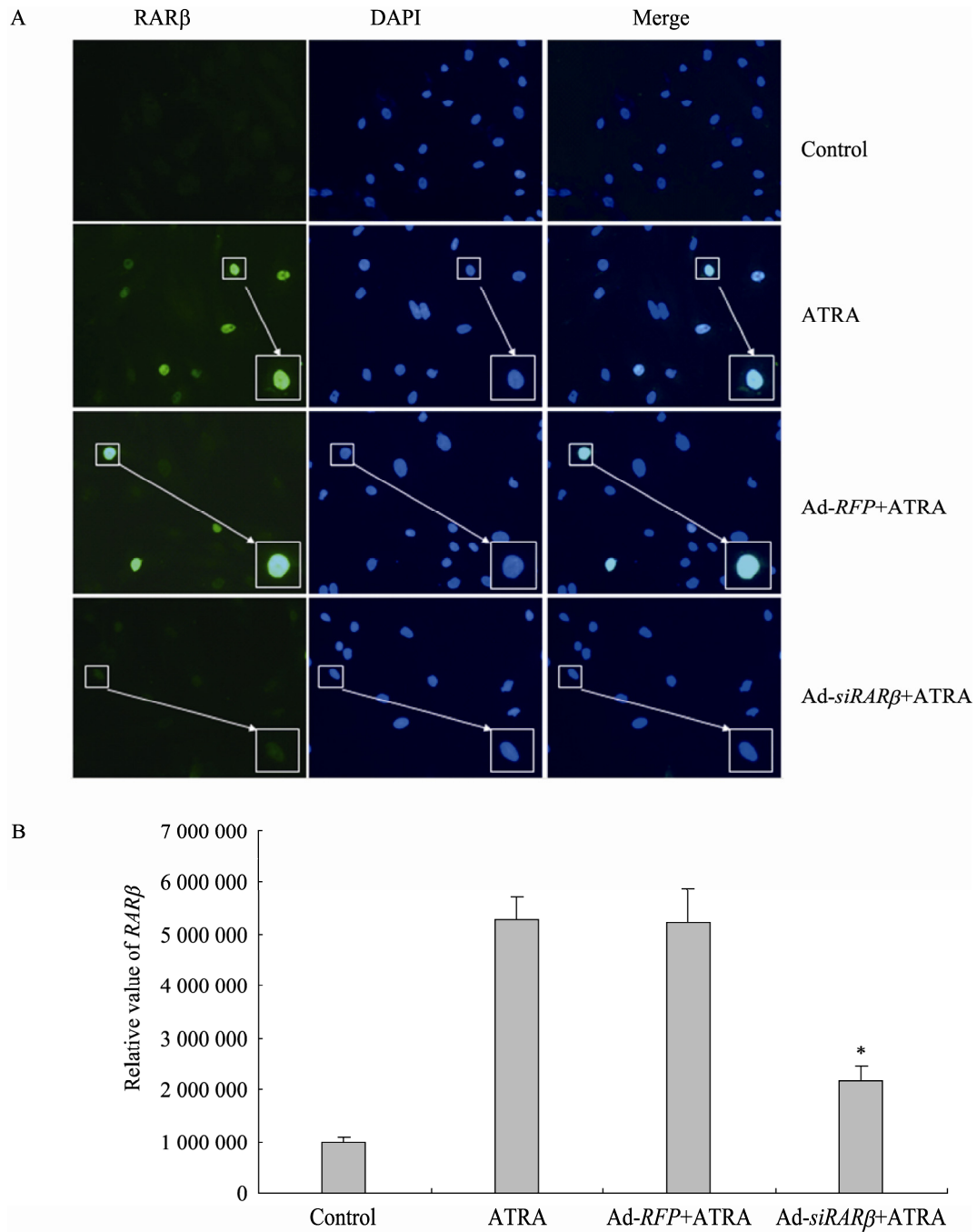


图 5 免疫荧光检测各处理组 RAR β 定位及表达变化

Fig. 5 Localization and expression change of RAR β in each group were detected by immunofluorescence (200 \times). $n=5$; *: $P<0.01$ compared with Ad-RFP+ATRA group. (A) Immunofluorescence staining. (B) Immunofluorescence intensity.

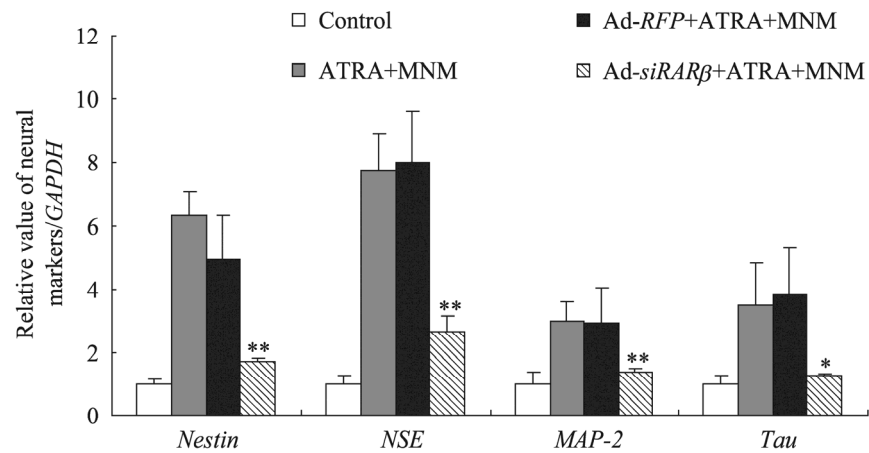


图6 不同诱导组神经特异性标志物的表达水平

Fig. 6 Expression of neural specific markers in each induced groups. $n=3$; *: $P<0.05$ compared with Ad-RFP+ATRA+MNM group; **: $P<0.01$ compared with Ad-RFP+ATRA+MNM group.

表3 免疫荧光检测各神经特异性标志蛋白的阳性细胞比例($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Positive expression ration of neural specific markers of induced neural cells by immunofluorescence ($\bar{x} \pm s$)

| Neural marker positive cells | Control | ATRA+MNM | Ad-RFP+ATRA+MNM | Ad-siRARβ+ATRA+MNM |
|------------------------------|-----------|-------------|-----------------|--------------------|
| Nestin (%) | 1.23±0.18 | 50.37±5.01 | 53.72±12.56 | 38.94±4.26* |
| NSE (%) | — | 85.45±6.78 | 79.34±11.06 | 21.39±5.19* |
| Tju1 (%) | — | 88.02±15.37 | 85.91±12.43 | 27.79±6.54* |

$n=10$; *: $P<0.01$ compared with Ad-RFP+ATRA+MNM group.

意义 ($P<0.01$)。提示腺病毒介导的 siRARβ 可显著抑制 ATRA+MNM 诱导的 MSCs 神经分化。

3 讨论

全反式维甲酸在生物个体发育及维持正常生理状态中有重要作用,可介导对细胞的分化、增殖、凋亡和免疫调节等多种生物学功能^[6]。ATRA 也是诱导神经板生成的重要生物活性物质,能促进多潜能神经嵴前体细胞的生存、增殖及诱导其向神经元分化^[7]。骨髓间充质干细胞是一类具有自我更新及跨胚层分化能力的成体干细胞,在特定诱导环境下可分化为神经样细胞,

移植动物可在中枢神经系统存活并分化为有一定功能的神经样细胞^[8]。本课题组前期研究发现: ATRA 预诱导可显著提高 MSCs 向神经样细胞的转化及存活率^[4],并有效改善 MSCs 对新生大鼠缺氧缺血性脑病的移植治疗效果^[9]。

ATRA 主要通过维甲酸受体 RAR (包括 α、β、γ 3 个亚型) 介导信号转导,影响下游基因的转录调控^[10],其信号调控的多样性取决于组织细胞类型、背景及维甲酸信号通路相关因子的表达状态。ATRA 可通过调控 RAR 亚型的表达,导致神经管的发育缺陷,提示 RAR 的表达模式与神经管的发育密切相关,其中 RARβ 表达的上调是

实现神经管后孔关闭的必要因素^[11]。Goncalves MB 等^[12-13]发现 RAR α 激活状态下,神经祖细胞主要分化为星形胶质细胞和少突神经胶质细胞,而 RAR β 激动主要诱导神经元的形成,并上调神经发育重要转录因子 islet-1/2 的表达,提示 RAR α 调节神经胶质细胞的分化,而 RAR β 决定神经元表型。我们前期检测到大鼠原代 MSCs 中 RAR α 、RAR γ 有低水平的表达,而 RAR β 几乎不表达, MSCs 神经诱导过程中各 RARs 表达均有不同程度上调,细胞向神经元及神经胶质细胞方向分化。而 ATRA 预诱导促进 MSCs 向神经元转化,抑制胶质细胞分化,经不同浓度 (0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$) ATRA 处理 24 h 后 RAR α 、RAR γ 表达没有变化,而 RAR β 表达显著增高,且具有明显的量效关系^[3]。因此我们认为 ATRA 可能通过上调 RAR β 激活维甲酸信号途径,促进 MSCs 向神经方向分化及神经元表型的决定。

为了证实这一假设,我们拟采用 siRNA 抑制 ATRA 处理后 MSCs 中 RAR β 的表达,以便进一步研究 RAR β 对维甲酸信号转导途径促 MSCs 成神经分化的影响及具体的分子机制。腺病毒介导 siRNA 表达是目前基因工程领域常用的技术手段^[14],在本实验中,我们选择带有 U6 和 H1 双启动子的 siRNA 构建系统^[15],构建了 4 组携带针对大鼠 RAR β 的 siRNA 腺病毒,感染 MSCs 能达到 60% 以上的高效率,并从中筛选出 3 组能有效抑制 RAR β 内源性表达的 siRNA。由于 siRNA 具有序列相似性,可能抑制其他具有相似位点的基因表达,为了尽可能地减少这种脱靶 (off-target) 效应^[16],我们采用混合池 (pooling) 的策略,即用等比例的不同位点 siRNA 混合。因为 3 组 siRNA 均是针对 RAR β 这一靶基因,但是

off-target 的非特异性位点却不一样,从而减小了 off-target 几率,而混合后 siRNA 的 knockdown 效率却等同于、甚至超过单独 siRNA 效率的相加^[17]。我们的结果也显示, pool 组的抑制效率明显高于各个单独 siRNA 组。

随后,我们检测了 siRAR β 对 MSCs 神经分化的影响。MSCs 仅表达少量神经干细胞标志 Nestin, ATRA 预诱导联合 MNM 神经诱导是本实验室诱导 MSCs 体外神经分化的成熟模型^[18],诱导后细胞折光性增强,并逐渐伸出突起,呈双极或多极神经元细胞形态,神经元早期及特异性标志蛋白 NSE、Tju1^[19],神经元树突标志物 MAP-2,神经元轴突标志物 Tau 蛋白^[20]的表达显著增高。siRAR β 抑制 RAR β 的表达,从一定程度上阻断了 ATRA 与 RAR β 结合后导致的维甲酸信号转导途径的级联放大反应,减少了与目的基因启动子区域的特异性 RAR 顺式作用元件 (RARE) 结合,抑制神经发育相关基因的转录。然而,我们发现 siRAR β 组 ATRA 联合 MNM 诱导的神经蛋白的表达水平,低于 MNM 单独诱导,可能的原因在于腺病毒介导的 siRAR β ,不仅抑制了 ATRA 诱导的 RAR β 表达增高,在 MSCs 整个体外诱导过程中,包括 MNM 神经诱导阶段, siRNA 的 knock-down 效应仍然有影响。因此,在后续的研究中,可能需要采用 RAR β 的特异性抑制剂 LE135^[21],阶段性地抑制 RAR β 活性。

本实验成功构建并筛选出了针对大鼠 RAR β 的 siRNA 腺病毒,并在大鼠 MSCs 中证实其能有效抑制 ATRA 诱导的 RAR β 内源性表达增高,同时抑制 MSCs 的体外神经分化。为深入研究 RAR β 对维甲酸信号转导途径在 MSCs 成神经分化中的作用及具体分子机制提供了重要的实验基础。

REFERENCES

- [1] Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(10): 755–765.
- [2] Nezzar H, Chiambaretta F, Marceau G, et al. Molecular and metabolic retinoid pathways in the human ocular surface. *Mol Vis*, 2007, 13: 1641–1650.
- [3] Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2006, 46(1): 451–480.
- [4] Bi Y, Gong M, Zhang XJ, et al. Pre-activation of retinoid signaling facilitates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. *Dev Growth Differ*, 2010, 52(5): 419–431.
- [5] Mattila J, Puig O. Insights to transcriptional networks by using high throughput RNAi strategies. *Brief Funct Genomics*, 2010, 9(1): 43–52.
- [6] Lane MA, Bailey SJ. Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog Neurobiol*, 2005, 75(4): 275–293.
- [7] Guan KM, Chang H, Rolletschek A, et al. Embryonic stem cell-derived neurogenesis. Retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells. *Cell Tissue Res*, 2001, 305(2): 171–176.
- [8] Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*, 2004, 8(3): 301–316.
- [9] Liu Y, Zhang X, Dai Y, et al. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on learning and memory functional recovery in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage. *Chin J Pediatr*, 2008, 46(9): 648–653.
刘洋, 张萱, 代英, 等. 骨髓间充质干细胞对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠学习记忆功能的重建作用. *中华儿科杂志*, 2008, 46(9): 648–653.
- [10] Pratt MA, Niu M, White D. Differential regulation of protein expression, growth and apoptosis by natural and synthetic retinoids. *J Cell Biochem*, 2003, 90(4): 692–708.
- [11] Mao GE, Collins MD. Quantification and localization of expression of the retinoic acid receptor- β and - γ mRNA isoforms during neurulation in mouse embryos with or without spina bifida. *Teratology*, 2002, 66(6): 331–343.
- [12] Goncalves MB, Agudo M, Connor S, et al. Sequential RAR β and α signalling *in vivo* can induce adult forebrain neural progenitor cells to differentiate into neurons through Shh and FGF signalling pathways. *Dev Biol*, 2009, 326(2): 305–313.
- [13] Goncalves MB, Boyle J, Webber DJ, et al. Timing of the retinoid-signalling pathway determines the expression of neuronal markers in neural progenitor cells. *Dev Biol*, 2005, 278(1): 60–70.
- [14] Couto LB, High KA. Viral vector-mediated RNA interference. *Curr Opin Pharmacol*, 2010, 10(5): 534–542.
- [15] Luo Q, Kang Q, Song WX, et al. Selection and validation of optimal siRNA target sites for RNAi-mediated gene silencing. *Gene*, 2007, 395(1/2): 160–169.
- [16] Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(1): 57–67.
- [17] Caffrey DR, Zhao J, Song Z, et al. siRNA off-target effects can be reduced at concentrations that match their individual potency. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21503.
- [18] Zhuo BH, Jiang HB, Qu P, et al. Study on the differentiation of marrow stromal stem cells into neural cells *in vitro*. *Chin J Repar Reconstr Surg*, 2005, 19(5): 373–376.
卓本慧, 江和碧, 瞿平, 等. 骨髓间充质干细胞向神经细胞定向分化的体外研究. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19(5): 373–376.
- [19] Dráberová E, Del Valle L, Gordon J, et al. Class III beta-tubulin is constitutively coexpressed with glial fibrillary acidic protein and nestin in midgestational human fetal astrocytes: implications for phenotypic identity. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2008, 67(4): 341–354.
- [20] Wunderlich MT, Lins H, Skalej M, et al. Neuron-specific enolase and tau protein as neurobiochemical markers of neuronal damage are related to early clinical course and long-term outcome in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg*, 2006, 108(6): 558–563.
- [21] Li Z, Yao SJ, Alini M, et al. The role of retinoic acid receptor inhibitor LE135 on the osteochondral differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 2011, 112(3): 963–970.