

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)09-0855-03

低表达 Cbfa1 基因的人牙周膜细胞模型的建立及鉴定

夜文敏,段银钟 (第四军医大学口腔医学院正畸科,陕西 西安 710033)

Establishment and identification of human periodontal ligament cells with decreased Cbfa1 expression

YE Wen-Min, DUAN Yin-Zhong

Department of Orthodontics, Qindu College of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To construct the small interfering RNA (siRNA) expression vector targeting human core binding factor a1 (Cbfa1) gene and to observe its silencing effect in transfected human periodontal ligament cells (hPDLs) so as to establish stable hPDLs model with decreased Cbfa1 expression. **METHODS:** The designed oligos targeting human Cbfa1 gene were cloned into the lineared mU6 vector. The recombinant vectors were confirmed by enzyme digestion analysis and DNA sequencing. The recombinant vector and the empty vector were respectively transfected by liposome-mediated transfection into hPDLs. The stable clones were screened by G418 medium and further identified by RT-PCR. **RESULTS:** The Cbfa1-siRNA expression vector was successfully constructed and confirmed by the enzyme digestion analysis and the DNA sequencing. The stable clones transfected with 2 vectors were respectively constructed. As identified by RT-PCR, the expression of Cbfa1 in hPDLs-siRNA cells were significantly decreased as compared with that in hPDLs-mU6 cells. **CONCLUSION:** The siRNA expression vectors targeting Cbfa1 have been successfully constructed. The expression of Cbfa1 gene is inhibited effectively in hPDLs cells transfected with Cbfa1-siRNA expression vector, which facilitates the further research on the function of Cbfa1.

【Keywords】 Cbfa1 gene; RNAi; hPDLs

【摘要】目的 构建针对核心结合因子 a1(Cbfa1)的 mU6 小干扰 RNA 载体,并将其转染到人牙周膜细胞 hPDLs,观察其干扰效果,以期建立稳定的低表达 Cbfa1 基因的 hPDLs 模型。方法 设计针对 Cbfa1 基因编码区的寡核苷酸链,体外退火后克隆入经双酶切线性化的小干扰载体 mU6 中,对重组质

粒进行酶切分析和 DNA 序列测定。以脂质体法将 mU6 空载体和重组质粒分别导入 hPDLs 细胞系。用含 G418 的培养液筛选,挑取阳性克隆后用 RT-PCR 技术检测各 hPDLs 克隆内 Cbfa1 mRNA 水平的表达情况。结果 经酶切鉴定及 DNA 测序,重组质粒 Cbfa1-siRNA 中插入的目的基因片段与预计片段完全一致。G418 筛选转染细胞 4wk 后获得稳定转染 mU6 空载体的细胞克隆株 hPDLs-mU6 和稳定转染重组质粒的细胞克隆株 hPDLs-siRNA。经 RT-PCR 鉴定,Cbfa1 在 hPDLs-siRNA 细胞中的表达比对照细胞明显降低。结论 成功构建了针对 Cbfa1 的小干扰 RNA 载体,成功建立了稳定的低表达 Cbfa1 的 hPDLs 模型,为进一步研究 Cbfa1 的功能奠定了实验基础。

【关键词】 Cbfa1 基因; RNA 干扰; 人牙周膜细胞

【中图分类号】 R783.5 **【文献标识码】** A

0 引言

核心结合因子 a1(core binding factor a1, Cbfa1)是一种成骨分化特异性转录因子,参与了成骨细胞的发生与分化,对维持骨的生长发育起着关键作用^[1-4]。研究^[5-7]发现,Cbfa1 在牙齿发育过程中呈保守表达,可能是牙齿发育和矿化的重要转录调控因子,在牙齿发育过程中发挥重要作用。我们以人牙周膜细胞(hPDLs)为对象,建立了低表达 Cbfa1 的细胞模型,为进一步研究 Cbfa1 的功能奠定了实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 hPDLs 引自美国典型培养物保存中心(ATCC),mU6 载体为美国 Michigan 大学医学院 Turner 教授赠送,T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶(TaKaRa 公司);脂质体转染试剂 Lipofectamine2000(美国 Invitrogen 公司);RPMI 1640,G418(Gibco 公司);RNA 抽提试剂盒(上海华舜公司)。

1.2 Cbfa1 siRNA 载体的构建 根据 GenBank Cbfa1 基因的已知序列设计其 siRNA 的序列:上游引物:5'-ttgctggagtagtctctcgtcacaatgacgagaactactccgctttt-3',下游引物 5'-ctagaaaaagcggagtagtctctcgtcattgtatgacgaactactccg-3'。上述序列用 BLAST 软件进行同源分析证实为 Cbfa1 高度保守后,由 Sangon 公司合成。退火后酶切 mU6 质粒,行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,回

收稿日期 2006-12-21; 接受日期 2007-01-11

通讯作者:段银钟。Tel (029)84776131 Email:duanyinzhong@fmmu.edu.cn

作者简介:夜文敏,硕士生(导师段银钟)。Tel (029)84776136

Email:nightelfdodo@hotmail.com

收线性化载体,将退火产物和回收产物定量后于16℃连接16 h,将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细菌,37℃培养12~18 h,挑选单克隆扩增后进行酶切鉴定和 DNA 测序。

1.3 细胞培养与转染 将 hPDLCs 常规培养于 100 mL/L RPMI 1640 培养液中。G418 筛选浓度的确定:将 hPDLCs 接种于 6 孔板(2×10^5 /孔)。G418 按 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 mg/L 的终浓度加入各孔细胞,观察细胞生长状况,以第 8 日细胞全部死亡的最低浓度为筛选浓度。确定筛选浓度为 300 mg/L。取对数生长期 hPDLCs,接种于 6 孔板(5×10^5 /孔),在 50 mL/L CO₂ 培养箱中过夜,直至细胞 80% 饱和。在 1 mL RPMI 1640 培养液中加入 10 μ g 质粒(分别加入重组质粒 mU6-Cbfa1 空载体 mU6)振荡混匀,加入 lipofectinamine 脂质体悬液 10 μ L,室温温育 15 min。弃去培养基,用无血清培养基洗 2 次,逐滴缓慢加入预先制备的质粒 DNA/脂质体复合液,37℃,50 mL/L CO₂ 培养箱中温育 5 h 后补充 1 mL 200 mL/L 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液,继续培养。30 h 后改用含 G418 300 mg/L 的培养液筛选,挑取阳性克隆并进行扩增培养。设立 mU6 空载体转染细胞作为对照。阳性克隆株分别命名为 hPDLCs-siRNA 和 hPDLCs-mU6 细胞,以 RT-PCR 进行鉴定。

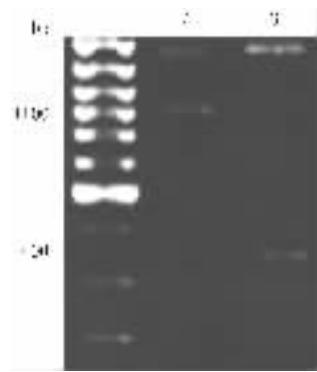
1.4 RT-PCR 用 RNA 抽提试剂盒提取细胞总 RNA 并定量,取 10 μ g 的总 RNA 和 Oligo dT₍₁₅₎ 4 μ L 进行反转录,于 70℃ 10 min 后置于冰上,再依次加入 5 \times Buffer 10 μ L, dNTP 2 μ L, AMV 1 μ L, RNasin 1 μ L,去离子水补至 50 μ L,42℃ 孵育 2 h 后冰冻保存。常规进行 PCR 扩增,反应引物 Cbfa1:5'-cacctoggaact-gaacccat-3' 和 5'-gcctccacgcatcactct-3'; β -actin:5'-agcgggaaatcgtgctg-3' 和 5'-cagggtcatggtgtgccc-3'。将 PCR 反应产物行 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外线灯下观察并照相。

2 结果

2.1 Cbfa1 的小干扰 RNA 载体的构建和鉴定 根据 GenBank 提供的 Cbfa1 基因 cDNA 序列,设计合成发夹样 Cbfa1 siRNA。mU6-Cbfa1 siRNA 真核表达质粒和空载体被 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定,分别形成 400 bp 和 1100 bp 的 DNA 片段,与预计片段长度相同(图 1)。

2.2 Cbfa1 低表达的细胞模型的建立 G418 筛选转染细胞 4 wk 后获得稳定克隆株。经 RT-PCR 鉴定(图 2),Cbfa1 在 hPDLCs-siRNA 细胞中的表达比对照细胞 hPDLCs-mU6 明显降低,说明成功建立了 Cb-

fa1 低表达的细胞模型。



1 DNA marker 2 mU6 质粒 3 Cbfa1 siRNA 质粒。

图 1 Cbfa1 siRNA 表达质粒的酶切鉴定图



1 hPDLCs 2 hPDLCs-mU6 3 hPDLCs-siRNA。

图 2 RT-PCR 鉴定 Cbfa1 低表达的细胞模型

3 讨论

Cbfa1 是近几年发现的与骨发育密切相关的转录因子,在成骨细胞分化和骨形成过程中发挥重要作用。Cbfa1 是调控成骨细胞特异性基因的主控基因,该基因只在与成骨相关的细胞中表达,如果在非成骨细胞中强制表达,则该细胞出现成骨细胞的特性^[2,8-9]。研究表明,敲出 Cbfa1 后小鼠的成骨细胞功能下降,包括成骨细胞数量减少、组织中骨基质蛋白缺乏以及碱性磷酸酶活性降低等^[10-11]。Cbfa1 还参与了乳恒牙替换过程中牙槽骨的改建与乳牙根吸收的过程,在促进成骨分化的同时参与了对破骨细胞的生长及活性的调节。目前,在多个牙齿特异性的基因的启动子上发现了 Cbfa1 的结合位点,推测 Cbfa1 可能通过调控多种分子通路在牙齿发育中发挥着重大作用。迄今为止,Cbfa1 对 hPDLCs 的调控作用尚不清楚。

为了探讨 Cbfa1 的表达对 hPDLCs 的作用,首先要选择一个有效的技术沉默此基因的表达。RNA 干扰是一门具有高效、特异、持久的对目的基因表达进行阻断的技术。与反义核酸相比,RNA 干扰造成的基因抑制效率更高、特异性更好,以致于可以和基因敲除相媲美,但其较基因敲除简便、快速、经济,因此具有广阔的应用前景^[12-13]。我们成功制备了 Cbfa1 的小干扰 RNA 真核表达载体,并建立了稳定低表达

Cbfa1 的细胞亚系, 为深入研究 Cbfa1 在牙齿发育过程中的功能奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Handschin AE, Egermann M, Trentz O, et al. Cbfa-1 (Runx-2) and osteocalcin expression by human osteoblasts in heparin osteoporosis *in vitro* [J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2006, 12(4): 465-472.
- [2] Zhang X, Yang M, Lin L, et al. Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose-derived stem cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Calcif Tissue Int, 2006, 79(3): 169-178.
- [3] Lin L, Chen L, Wang H. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against Runx2/Cbfa1 inhibits the formation of heterotopic ossification in animal model [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 349(2): 564-572.
- [4] Komori T. Molecular mechanisms of the regulation of osteoblast and chondrocyte differentiation and bone formation [J]. Seikagaku, 2006, 78(6): 501-508.
- [5] Ryoo HM, Wang XP. Control of tooth morphogenesis by Runx2 [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2006, 16(2): 143-154.
- [6] James MJ, Jarvinen E, Wang XP, et al. Different roles of Runx2 dur-

- ing early neural crest-derived bone and tooth development [J]. J Bone Miner Res, 2006, 21(7): 1034-1044.
- [7] Komori T. Mechanism of transcriptional regulation by Runx2 in osteoblasts [J]. Clin Calcium, 2006, 16(5): 81-87.
- [8] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. Osf1/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation [J]. Cell, 1997, 89(5): 747-754.
- [9] Selvamurugan N, Jefcoat SC, Kwok S. Overexpression of Runx2 directed by the matrix metalloproteinase-13 promoter containing the AP-1 and Runx/RD/Cbfa sites alters bone remodeling *in vivo* [J]. J Cell Biochem, 2006, 99(2): 545-557.
- [10] Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts [J]. Cell, 1997, 89(5): 755-764.
- [11] Otto F, Thronell AP, Crompton T, et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development [J]. Cell, 1997, 89(5): 765-771.
- [12] Inoue A, Sawata SY, Taira K. Molecular design and delivery of siRNA [J]. J Drug Target, 2006, 14(7): 448-455.
- [13] Kurreck J. siRNA Efficiency: Structure or Sequence-That Is the Question [J]. J Biomed Biotechnol, 2006, 2006(4): 83757.

编辑 王睿

· 经验交流 · 文章编号 1000-2796(2007)09-0857-01

红细胞增多症漏诊 1 例

魏伟, 吴成, 王滨, 李曙红, 崔海宏, 刘丽丽, 赵佳 (解放军第 456 医院干部病房, 山东 济南 250031)

【关键词】红细胞增多症 动脉栓塞 脑梗塞

【中图分类号】R555.1 【文献标识码】B

1 临床资料 男, 47 岁, 因颜面潮红、头晕 1 a, 反复言语迟钝、右手活动不灵 1 wk 入院。1 a 前患者因头晕、颜面潮红, 多次测血压升高, 诊为高血压病 3 mo 前患者出现左手拇指肿胀、皮色紫暗、皮温减低, 上肢血管彩超提示左桡动脉、左大拇指动脉血流明显减低, 诊为肢体动脉栓塞, 经扩血管等治疗后症状消失。其间多次化验血常规红细胞 $6.5 \times 10^{12}/L$, 血红蛋白 176 g/L, 血小板 $423 \times 10^9/L$ 。入院查体: 血压 140/75 mm-Hg, 面部、手、足、结膜充血, 呈醉酒状, 腱反射右膝较左侧活跃。头颅 MRI 提示右侧基底节区、半卵圆区、颞叶、枕叶多发腔隙性脑梗塞。B 超提示副脾。初诊 ①脑梗塞 ②高血压病。给予抗凝、抗血小板凝集、改善脑代谢及供血等治疗 0.5 mo 后患者仍反复头晕、言语迟钝、右手活动不灵, 其间多次化验血常规红细胞 $6.51 \times 10^{12}/L$, 血红蛋白 196 g/L, 血小板

$348 \times 10^9/L$, 红细胞压积 58.7%。血氧饱和度 98%。血流变中度异常。骨髓象提示粒、红及巨核细胞系均增生, 以红系增生显著, 中性粒细胞碱性磷酸酶积分 136。结合患者无严重心肺疾病、肿瘤、高原居住史等, 确诊为红细胞增多症 (PV)。给予羟基脲 0.5 g po, tid; 干扰素 3 MU im, qod, 1 mo 后患者不适症状均消失, 3 mo 后血常规恢复正常。

2 讨论 PV 是一种克隆性干细胞疾病, 以全血容量增多、血黏度增高及脾肿大为主要表现。其合并症有栓塞、出血、肿瘤、急性白血病、高血压等。其中, 栓塞居首位, 脑血管最常见, 其次为心肌梗死、周围血管栓塞、肺栓塞等^[1]。以并发症为主诉的患者极易被漏诊误诊。本病患者 1 a 内先后出现高血压、肢体动脉栓塞、脑梗塞。因颜面潮红可见于高血压病, 而后者可导致血管痉挛、玻璃样变、血管壁重构, 管壁纤维化、管腔狭窄、粥样斑块形成等, 导致肢体动脉栓塞形成, 且患者经常规处理后上述症状均控制, 故一直未考虑到 PV。直至患者出现脑梗塞且治疗效果欠佳方经骨穿确诊, 化疗后病情得以控制。如发现患者有血栓形成及出血病史, 伴有神经系统症状、肝脾大、血压升高、醉酒面容, 且有血常规血红蛋白、红细胞、白细胞、血小板计数升高、红细胞压积增高者, 应考虑骨穿, 排除 PV。

【参考文献】

- [1] 张明珠, 张茂宏. 真性红细胞增多症诊断与治疗的进展 [J]. 国外医学输血与血液学分册, 1987, 10(3): 151.

编辑 王睿

收稿日期 2007-01-26; 接受日期 2007-03-05

作者简介 魏伟, 硕士, 主治医师。Tel (0531) 66153534 Email #56-baojian@sina.com