# 基础研究

# shRNA-Piezo1 对异常机械牵张应力作用下。 髓核细胞凋亡的影响及相关机制。

**谭洪宇,赵 亮,张 扬**ℤ (郑州大学第一附属医院骨科 450052 河南省郑州市)ℤ

 $\swarrow$ 

【摘要】目的:探讨短发夹 RNA 沉默压电离子蛋白 1 编码基因(shRNA-Piezo1)对异常机械牵张应力作用下髓核细胞凋亡的影响及相关机制。方法:取 8 例腰椎间突出症患者术中摘取的椎间盘组织(改良 Pfirmann 分级为 Ⅱ 级或 Ⅲ 级),分别分离培养髓核细胞,取第 2 代髓核细胞构建体外机械牵张应力模型;利用 293T 细胞作为慢病毒感染靶细胞,检测最适慢病毒滴度,用最适滴度慢病毒感染髓核细胞;应用 RT-PCR 和 Westem-Blot 法筛选出有效干扰序列,利用 shRNA 干扰技术构建 shRNA-Piezo1 干扰质粒;根据预实验处理结果,将细胞分成 4 组:空白对照组(取第 2 代髓核细胞不做机械牵张应力处理),牵张应力组(取第 2 代髓核细胞机械牵张应力处 理 24h),shRNA 阴性对照组(空白载体质粒+第 2 代髓核细胞机械牵张应力处理 24h),shRNA 开扰组(shRNA-Piezo1 干扰质粒; 4 组细胞的细胞质 Ca<sup>2+</sup>水平; Cell Meter 检测试剂盒检测 4 组细胞中线粒体膜电位的变化; AnnexinV-FTTC 试剂盒检测 4 组细胞的调 亡率。结果:(1)分离培养的细胞 Ⅱ 型胶原蛋白和 Aggrecan 蛋白表达阳性,符合髓核细胞特征。(2)当髓核细胞转染复数(MOI)=50 时,慢病毒滴度为 1×10°TU/ml 转染效率最高。(3)homo-3201 序列为 shRNA-Piezo1 的有效序列。(4)4 组髓核细胞细胞质 Ca<sup>2+</sup>含量、线粒体膜电位翻转比例和细胞凋亡率有显著性差异(P<0.05),空白组与 shRNA 阴性对照组比较无显著性差异(P>0.05)。结论:shRNA-Piezo1 可以抑制异常机械牵张 应力作用下髓核细胞的过度调亡,而且是通过抑制细胞质 Ca<sup>2+</sup>水平和线粒体膜电位翻转来实现的。*《* 

【关键词】髓核细胞;Piezo1蛋白;shRNA干扰;牵张应力;调亡

**doi**: 10.3969/j.issn.1004-406X.2018.12.11

中图分类号:R681.5,R363.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2018)-12-1125-08∉

Effects and mechanism of shRNA-Piezo1 on apoptosis of nucleus pulposus cells under abnormal mechanical stretch stress/TAN Hongyu, ZHAO Liang, ZHANG Yang//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2018, 28(12): 1125–1132 $\checkmark$ 

**[Abstract] Objectives:** To investigate the effects and mechanism of shRNA-Piezo1 coding gene on apoptosis of nucleus pulposus cells induced by abnormal mechanical stretching stress. **Methods:** The nucleus pulposus cells from 8 cases of intervertebral disc herniation (Pfirrmann II or III) were isolated and cultured, and the second generation nucleus pulposus cells were used to construct the mechanical stretch stress model in vitro. The shRNA-Piezo1 interfering plasmid was constructed by shRNA interfering technique. The cells were divided into four groups according to the results of pretreatment: blank control group(the second generation of nucleus pulposus cells without mechanical stretching stress treatment), stretching stress group (the second generation of nucleus pulposus cells treated with mechanical stretching stress for 24 hours), shRNA negative control group (blank vector plasmid + 2nd generation nucleus pulposus cells with mechanical stretching stress for 24 hours), shRNA negative control group (blank vector plasmid + 2nd generation nucleus pulposus cells with mechanical stretching stress for 24 hours), shRNA negative control group (blank vector plasmid + 2nd generation nucleus pulposus cells with mechanical stretching stress for 24 hours), shRNA negative control group (blank vector plasmid + 2nd generation nucleus pulposus cells with mechanical stretch stress treatment for 24 hours), shRNA interference group(shRNA-Piezo1 plasmid + 2nd generation nucleus pulposus cells with mechanical stretch stress treatment for 24 hours), shRNA interference group(shRNA-Piezo1 plasmid + 2nd generation nucleus pulposus cells with mechanical stretch stress treatment for 24 hours). Fluo 3-AM kit was used to detect the cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> level of the cells. Cell Meter kit was used to detect the mitochondrial membrane of the cells. Annexin V-FITC kit was used to detect the apoptosis rate of the cells. **Results:** (1)Collagen type II and agreean protein expression were positive in the cultured cells, which accorded with the

第一作者简介:男(1973-),医学硕士,副主任医师,研究方向:脊柱外科৶

电话:(0371)67967196 E-mail:tanhongyu5111@163.com

nucleus pulposus cells. (2)Lentiviral titer of  $1 \times 10^8$ TU/ml was the highest when the multiple transfection(MOI) of nucleus pulposus cells was 50. (3)The homo-3201 sequence was an effective sequence of shRNA-Piezo1. (4)There were significant differences in cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> content, mitochondrial membrane potential inversion ratio and apoptosis rate among the four groups(P<0.05); there was significant difference between the mechanical stress group and the blank control group (P<0.05), but there was no significant difference group decreased significantly when compared with the stretch stress group and the shRNA negative control group (P<0.05); but there was no significant difference group decreased significantly when compared with the stretch stress group and the shRNA negative control group (P<0.05), but there was no significant difference between the blank control group (P<0.05), but there was no significant difference between the shRNA negative control group (P<0.05), but there was no significant difference between the shRNA negative control group (P<0.05). **Conclusions:** ShRNA Piezo1 can inhibit excessive apoptosis of nucleus pulposus cells under abnormal mechanical stretching stress by inhibiting cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> level and mitochondrial membrane potential inversion.  $\mathscr{A}$ 

[Key words] Nucleus pulposus cells; Piezo1 protein; shRNA interference; Mechanical stretch stress; Apotosis∉ [Author's address] Orthopedics Department of First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, 450052, China∉

椎间盘源性疼痛是椎间盘退变或纤维环破裂 后刺激椎间盘内疼痛感受器引起的慢性下腰痛, 是最常见的骨科疼痛之一[1.2]。椎间盘退变是椎间 盘源性腰背痛产生的最主要病因闯。异常机械牵 张应力刺激下髓核细胞过度凋亡,但其机制尚未 完全明了。新型机械敏感性离子通道蛋白 Piezo1 是一种与生物力学密切相关的生物大分子,可以 介导生物力学信号的传递[4.5]。有研究表明,Piezo1 可以稳定表达于髓核细胞,并且可因体外机械牵 张应力的加载时间的不同表达会有差别啊。短发 夹 RNA(shRNA)是一种双链 RNA 小分子,可以 和 Agohaute2 蛋白酶结合在一起,产生 RNA 诱导 沉默复合物(RISC),特异性结合目的 DNA,从而 使目的基因转录后,产生基因沉默现象,是分子生 物学领域常用的一种阻断基因表达的手段四。基 于此,本研究利用 shRNA 干扰技术沉默 Piezo1 的 编码基因,探讨其对异常机械牵张应力作用下髓 核细胞凋亡的影响及相关机制,为椎间盘退变性 疾病的治疗提供新的思路。

 $\swarrow$ 

### 1 材料与方法√

1.1 髓核细胞的分离培养

经本院伦理委员会批准,患者及其直系亲属 知情同意,取 8 例[男 3 例,女 5 例,年龄 31~43 岁 (35.8±7.2 岁),术前椎间盘改良 Pfirmann 分级为 Ⅱ级或Ⅲ级] 腰椎间盘突出症患者术中摘除的椎 间盘组织。在无菌条件下取出椎间盘组织后用生 理盐水冲洗 3 遍,利用组织剪和手术刀将组织切 碎至 1×1×1mm,加入 3 倍体积的 0.25%胰蛋白 酶,37℃水浴 0.5h,用磷酸缓冲液(PBS)冲洗 3 遍,再加入 3 倍体积的 0.2% II 型胶原酶,37℃水 浴 4h。经滤网过滤后再离心收集细胞,加入 2ml 含 10%胎牛血清 DMEM 培养基,移至 37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。每 2 天换液 1 次,待细胞融合 率>80%时进行传代,取 P2 代细胞进行实验。√

1.2 髓核细胞的鉴别✓

采用免疫组织化学染色的方法对髓核细胞进行鉴定。将 P2 代髓核细胞用 PBS 洗 3 次, 5min/次;用 BSA 室温处理 10min;加 II 型胶原蛋 白和 Aggrecan 蛋白一抗 (Novus Biologicals, Littleton,美国),4℃过夜;PBS 冲洗 3 次,5min/次; 加辣根酶标记链酶卵白素液,孵育 10min;PBS 冲 洗 3 次,5min/次;孵育 AlexaFouor 488 羊抗兔 IgG 二抗(Novus Biologicals,Littleton,美国),室温放 置 20min;PBS 冲洗 3 次,各 5min;DAB 显色 4min;苏木精复染 2min,倒置光学显微镜下观察 细胞的染色情况。√

#### 1.3 体外机械牵张应力模型构建

利用本院中心实验室平台 Flexcell 机械牵张 应力加载仪器,构建体外机械牵张应力模型。设置 条件如下:细胞形变量为 15%,空气压缩所致形 变周期为 20s。取 P2 代细胞,经消化后均匀铺在 Flexcell公司的无菌膜性 6 孔板上,待细胞融合率 达 80%左右时,加入 Flexcell 机械牵张应力模型 中。结合文献<sup>®</sup>以及本研究的预实验结果,机械牵 张应力组细胞处理设定加力时间为 24h。√

**1.4** shRNA-Piezo1 干扰质粒构建↓ shRNA-Piezo1 载体由上海吉凯公司合成,选

择 pHBLV-U6-ZsGreen-PGK-Puro 作为质粒的克 隆载体,shRNA 慢病毒载体的克隆切入点为 XhoI/BamHI(编号 ENST00000003569),经过基因 测序证明序列的正确性。共构建 3 个 shRNA 干扰 序列(表 1),应用实时荧光定量 PCR 和 Westernblot 检测筛选出有效干扰序列。必

**1.4.1** 慢病毒滴度的检测 利用 293T 细胞作为 病毒的转染靶细胞,以 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup> 和 10<sup>-4</sup>µg/ml 浓度病毒转染 293T 细胞,倒置显微镜下观察。√

**1.4.2** 慢病毒转染率的测定 以人髓核细胞为靶 细胞,加入慢病毒载体后共培养 72h,倒置荧光显 微镜下观察,转染率=荧光视野下细胞数/白光视 野下细胞数×100%。√

1.4.3 实时荧光定量 PCR 检测 将 3 个 shRNA 干扰序列和空载体序列慢病毒转染 293T 细胞 后,经0.25%胰蛋白酶消化,放入15ml离心管,加 入 1ml 的 Trizol RNA iso (Takara,日本)提取总 RNA,根据 Takara 逆转录试剂盒说明书,检测总 RNA 的纯度,在 1.9~2.0 的范围,纯度良好。逆转 录 cDNA 保存在 4℃冰箱中备用。 根据 TaKaRa 荧 光定量 PCR 试剂盒说明书的要求,采用 20µl 的 反应体系,加入 Prime 等试剂,进行荧光定量 PCR 的检测。采用 FS2000 系统对 PCR 进行分析,反应 条件预设为预变性:95℃ 30s;1 个循环。PCR: 95℃ 5s;60℃ 30s,40 个循环。溶解曲线:95℃ 5s: 60℃ 1min。降温:50℃ 30s,1个循环。内参基因 GAPDH、Piezo1 引物由上海生工公司生产(表 2)。 采用 2-AACT 的方法计算目的基因的相对表达量。 **1.4.4** Western-blot 检测 将 3 个 shRNA 干扰序 列和空载体序列慢病毒转染 293T 细胞后,收集 细胞,加入 1ml RIPA 细胞裂解液,各组细胞在冰 上裂解 30min, 收集入 1.5ml 的离心管中, 在预冷 4℃的离心机中离心,预设:5000r/min,5min 后提

取上清,经95℃煮沸后,收集蛋白备用。按照说明 书制备浓缩胶 10ml,分离胶 20ml。上样后电泳分 离,转 PVDF 膜后孵育一抗,在4℃冰箱避光孵育 过夜(>12h)。Piezo1 一抗(ab76424,Abcom 公司, 中国) 经一抗稀释液 1:10000 稀释后加入样本离 子膜。第二天用加入 Tween-20 的 PBS(PBST)稀 释液洗膜,重复3次,加用山羊抗小鼠 IgG 二抗 (P-2771MP,ThermoFisher,中国)经二抗稀释液 1: 1000 稀释后孵育二抗 1.5h,用 PBST 稀释液洗膜, 重复3次,而后用 DAB 显影液处理样本。Image J 软件分析条带的灰度值。√

#### 1.5 实验分组✔

将每1例患者分离培养的髓核细胞分成4 组:空白对照组(髓核细胞不做机械牵张应力处 理),牵张应力组(髓核细胞应用机械牵张应力处 理 24h),shRNA 阴性对照组(转入空白载体质粒 后机械牵张应力处理 24h),shRNA 干扰组(转入 shRNA-Piezo1 干扰质粒后机械牵张应力处理 24h)。√

1.6 髓核细胞质 Ca<sup>2+</sup>水平检测✓

4 组细胞经处理后,根据 Fluo3-AM 试剂盒说 明书要求,每组加入 200µl Fluo3-AM 工作液[1ml Hanks 平衡盐溶液(HBSS)溶液稀释 Fluo3-AM 原 液],反应 10min 后弃掉工作液,用不含 Ca<sup>2+</sup>的 HBSS 冲洗 3 遍,加入 Fluo3-AM 荧光探针检测试 剂。反应 30min 后封片保存,激光共聚焦显微镜观 察细胞质 Ca<sup>2+</sup>含量。设置条件:激发波长 500nm, 发射波长 530nm。用 Image J2X(Rawak,德国)检 测 Ca<sup>2+</sup>荧光的强度。√

#### 1.7 髓核细胞线粒体膜电位的变化检测√

4 组细胞经处理后,根据 Cell Meter 检测试 剂盒说明书要求,每组加入 JC-1 荧光探针工作 液,孵育 30min 后倒置荧光显微镜下观察。红色荧

Table 1 Interference sequence shRNA干扰序列ℓ shRNA interference sequence shRNA-2844 序列↓ 5'-GATCCGCGTCATCATCGTGTGTAAGATTCAAGAGATCTTACACACGATGATGACGCTTTTTTG-3' shRNA-2844 sequence 3'-AATTCAAAAAAGCGTCATCATCGTGTGTAAGATCTCTTGAATCTTACACACGATGATGACGCG-5' shRNA-3201 序列∉ 5'-GATCCGCCTCAAGTACTTCAACACTTTCAAGAGAAGTTGATGAAGTACTTGAGGCTTTTTTG- $3' \mathscr{A}$ shRNA-3201 sequence 3'-AATTCAAAAAAGCCTCAAGTACTTCATCAACTTCTCTTGAAAGTTGATGAAGTACTTGAGGCG-5 -GATCCGCGTCTTCCTTAGCCATTACTTTCAAGAGAAGTAATGGCTAAGGAAGACGCTTTTTTG-3' 🖉 shRNA-4155 序列& 3'-AATTCAAAAAAGCGTCTTCCTTAGCCATTACTTCTCTTGAAAGTAATGGCTAAGGAAGACGCG-5' shRNA-4155 sequence 空载体序列৶ -GATAGCGTCCATCATCGTGTGTAAGATTCAAGAGATCTTACACACGATGATGACGCTTTTTTG-3' Blank sequence 3'-AATAGCGTCAAGCGTCATCATCGTGTGTAAGATCTCTTGAATCTTACACACGATGATGACGCG-5'

表1 干扰序列∉

光说明细胞内线粒体膜电位无变化,绿色荧光说 明细胞内线粒体膜电位出现翻转,表明细胞内线 粒体功能出现异常。用 Image J2X(Rawak,德国) 检测电位变化。√

1.8 髓核细胞凋亡检测√

4 组细胞经处理后,应用 AnnexinV-FITC 试 剂盒(R&D Systems,美国)检测各组的细胞凋亡 率。流式细胞仪分析各组样本,计算凋亡率。 Annexin V+/PI-为早期凋亡细胞,Annexin V+/PI+ 为晚期凋亡和坏死细胞,Annexin V-/PI+为正常 细胞。用 GraphPad prim 5.0 进行统计分析。↓ 1.9 统计学方法↓

应用统计软件 SPSS 15.0(SPSS,美国)进行 统计学分析,数据均用 x±s 表示,每个样本重复 3 次。四组比较采用方差分析(F 检验),组间比较用 q 检验,P<0.05 为有显著性差异。√

## 2 结果√

 $\swarrow$ 

2.1 髓核细胞的鉴定 ✓

分离培养的 P2 代细胞 Ⅱ 型胶原蛋白和 Aggrecan 蛋白染色阳性(图 1),表明分离培养的 细胞是髓核细胞。√

表 2 目的基因的引物序列 ∉

Table 2 Primer sequences for target genes

引物√ Primer	引物序列 ℓ Primer sequences
Piezo1	正义链 Sense 5′-TAACATTTCCTGTCTTCAGAGCG-3′ √ 反义链 Antisense 5′-ATTGTAACCGTTTCCTGGTTTGC-3′
hGAPDH	正义链 Sense 5′-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3′√ 反义链 Antisense 5′-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3′

2.2 慢病毒转染滴度的检测结果

利用 293T 细胞作为慢病毒转染靶细胞,检测最适慢病毒滴度。当髓核细胞转染复数(MOI)= 50 时,慢病毒滴度为 1×10<sup>®</sup>TU/ml(病毒侵染时间 均为 72h,图 2)。√

2.3 慢病毒转染髓核细胞的转染率

选取滴度为 1×10<sup>®</sup>TU/ml 的慢病毒转染髓核 细胞,可见转染效率约为 95%(图 3)。⊄

2.4 干扰序列筛选结果 ✓

利用 RT-PCR 和 Western-Blot 方法定量筛选 3 个序列中有效的干扰序列,结果显示 homo-3201 序列为有效的干扰序列(图 4)。故此,利用 homo-3201 序列为 shRNA-Piezo1 的有效序列,进 行后面的实验。√

2.5 髓核细胞质中 Ca<sup>2+</sup>水平 ✓

如图 5 所示, 空白对照组细胞质 Ca<sup>2+</sup>为 197.23±17.56nm,牵张应力组为 579.23±29.88nm, shRNA 干扰组为 191.37±10.23nm,shRNA 阴性对 照组为 453.44±21.13nm,4 组间比较有统计学差 异 (F=19.892,P<0.05),牵张应力组细胞胞质内 Ca<sup>2+</sup>含量与空白对照组比较显著性增加(q=3.773, P<0.05),shRNA 干扰组与牵张应力组比较显著性 减少 (q=5.159,P<0.05),shRNA 阴性对照组与牵 张应力组比较无统计学差异(P>0.05)。√

2.6 髓核细胞线粒体膜电位变化

如图 6 所示,4 组细胞线粒体膜电位变化有统计学差异(F=21.474, P<0.05)。牵张应力组细胞线粒体膜电位翻转比例与空白对照组比较显著性增加 (q=4.332,P<0.05),shRNA 干扰组与牵张



图 1 分离培养的 P2 代细胞Ⅱ型胶原蛋白和 Aggrecan 蛋白的免疫组织化学染色结果 a 胶原蛋白染色阳性 b Aggrecan 蛋白染色阳性 🖉

Figure 1 Immunohistochemical staining of type II collagen and aggrecan protein of P2 cells **a** The expression of type II collagen protein was positive **b** The expression of aggrecan protein was positive

应力组比较显著性减少 (q =4.974;P<0.05), shRNA 阴性对照组与牵张应力组比较无统计学 差异(P>0.05)。≪

2.7 髓核细胞凋亡情况⊾

如图 7 所示,4 组细胞凋亡率有统计学差异

(F=17.593,P<0.05)。牵张应力组细胞凋亡率与空 白对照组比较显著性增加 (q=6.417,P<0.05)。 shRNA 干扰组与牵张应力组比较显著性减少(q= 3.175,P<0.05),shRNA 阴性对照组与牵张应力组 比较无统计学差异(P>0.05)。√



**图 2** 慢病毒转染滴度检测,结果显示 10<sup>-1</sup>µg/ml 浓度比例时慢病毒转染效率最高,最适滴度为 1×10<sup>s</sup>TU/ml(A, homo-2844 序列模式图;B, 以 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup> 和 10<sup>-4</sup>µg/ml 不同浓度比例慢病毒测定最适滴度;C,homo-3201 序列模式图;D,以 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup> 和 10<sup>-4</sup>µg/ml 不同浓度比例慢病毒测定最适滴度;E,homo-4155 序列模式图;F,以 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup> 和 10<sup>-4</sup>µg/ml 不同浓度比例慢病毒测定最适滴度 **图 3** 采用滴度为 10<sup>s</sup>TU/ml 慢病毒转染髓核细胞的转染率在 80%以上√

**Figure 2** Detection of lentivirus transfection titer, the results showed that LV transfection efficiency was the highest at  $10^{-1}$  concentration ratio, and the optimum titer was  $1 \times 10^{8}$ TU/ml(A, homo-2844 sequence pattern diagram; B, Optimal titer was determined by lentivirus at different concentrations of  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-4}\mu g/ml$ ; C, homo-3201 sequence pattern diagram; D, Optimal titer was determined by lentivirus at different concentrations of  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-4}\mu g/ml$ ; E, homo-4155 sequence pattern diagram; F Optimal titer was determined by lentivirus at different concentrations of  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-4}\mu g/ml$ ; E, homo-4155 sequence pattern diagram; F Optimal titer was determined by lentivirus at different concentrations of  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-4}\mu g/ml$  Figure 3 Nucleus pulposus cells transfection rate over 80% as measured using  $10^{8}$ TU/ml lentivirus transfection







Figure 5 The results of cytoplasmic  $Ca^{2+}$  level as detected by Fluo3–AM Kit **a** Levels of  $Ca^{2+}$  in each group **b**  $Ca^{2+}$  fluorescence intensity in nucleus pulposus cells in each group (Note: # means no significant difference between the tension stress group and the shRNA negative control group, P>0.05; \*\* means statistical difference between the stretch stress group and the blank control group, and between the stretch stress group and the shRNA interference group, P<0.05)

#### 3 讨论

既往研究表明,Piezo1 与骨性关节炎患者的 软骨细胞凋亡有密切关系,在体外构建的细胞机 械牵张应力细胞模型中,Piezo1 蛋白离子通道通 过内质网应激途径和 MAPK/ERK1/2 等信号通路 介导机械牵张应力介导的软骨细胞凋亡<sup>[8,9]</sup>。 Piezo1 蛋白抑制剂 GsMTx4 可以抑制真核细胞中 Piezo1 蛋白的表达<sup>[10]</sup>。王天宝等<sup>[6]</sup>的研究表明, Piezo1 蛋白在髓核细胞中表达,并且与牵张应力 具有相关性。髓核细胞具有与软骨细胞相类似的 生物力学特征,都与人体的生物力学密切相关,具 有一定的生物力学共性问题。本研究立足于临床 热点问题,探究 Piezo1 蛋白在髓核细胞的凋亡机 制中的作用。✔

shRNA 技术与 siRNA 技术比较具有明显的 优势,其可以稳定表达于细胞体系中,并且不会随



**图 6** Cell Meter 检测试剂盒检测细胞线粒体膜电位结果 **a** 各组细胞线粒体膜电位检测结果 **b** 荧光比例统计结果(注: # 表示两组间比较 *P*>0.05;\*\*表示两组间比较 *P*<0.05) **图 7** AnnexinV-FITC 试剂盒检测各组细胞凋亡 **a** 各组细胞凋 亡率 **b** 细胞凋亡率统计结果(注: # 表示两组间比较 *P*>0.05;\*\*表示两组间比较 *P*<0.05) *ℓ* 

Figure 6 Detection of mitochondrial membrane potential results by the Cell Meter detection kit **a** The mitochondrial membrane potential of each group was detected **b** Statistical results of fluorescence ratio (Note: # means there was no significant difference between the tension stress group and the shRNA negative control group, P>0.05); \*\* means there was statistical difference between the stretch stress group and the blank control group, and between the stretch stress group and the shRNA interference group, P<0.05) Figure 7 Annexin V-FITC kit was used to detect apoptosis in each group **a** The apoptosis rate of each group **b** cell apoptosis rate of each group (Note: # means no significant difference between the shRNA negative control group, P>0.05; \*\* means and the shRNA interference group, P<0.05)

着细胞的不断传代表达效价有所降低。shRNA 技术可以更好地针对基因进行沉默,使基因获得更加稳定、更加有效的沉默效果<sup>[11,12]</sup>。鉴于以上优点,shRNA 技术越来越引起注意,为临床上进行基因治疗提供了新的研究方法<sup>[13]</sup>。本研究利用 shRNA 干扰技术,从基因水平阻断 Piezo1 的表达,相较于抑制剂 GsMTx4 更加具有优势和前景。本研究从 GenBank (http://www.ncbi.NLM.NIH. gov/GenBank) 获得 Piezo1 RNA 序列 (nm\_000958.1),根据 shRNA 设计原则,用 Designer 3.0 软件设计 3 组 Piezo1sh RNA 序列,

经 RT-PCR 和 Western Blot 方法从基因和蛋白两 个层面上筛选出有效序列,确定 homo-3201 序列 为 shRNA-Piezo1 的有效序列, 然后进行后面的 实验。✓

Piezo1 蛋白是如何感受机械牵张应力,并且 将感受到的生物力学信号传递到细胞内?利用 shRNA 干扰技术阻断 Piezo1 蛋白的表达后,信号 传递有什么变化? Ge 等<sup>114</sup>利用冷冻电子显微镜技 术研究了 Piezo1 蛋白的三聚体结构,证明 Piezo1 蛋白是一种 7 次跨膜的离子通道,细胞外膜的三 棱锥样结构可以感受机械信号刺激,通过形变将 机械信号传递给 Piezo1 蛋白的孔状核心结构,打 开通道,介导离子内流入细胞内。Piezo1 是一种非 选择性阳离子通道,可以非选择性通过二价离子 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>和 Ba<sup>2+</sup>等<sup>[15]</sup>。本研究利用 Fluo3-AM 试剂盒检测髓核细胞质中 Ca<sup>2+</sup>水平,证实在机械 牵张应力刺激下 Ca<sup>2+</sup>水平明显增高(牵张应力组 细胞内 Ca<sup>2+</sup>水平与空白对照组比较 P<0.05)。表明 Ca<sup>2+</sup>可以作为一种"第二信使"将 Piezo1 蛋白离子 通道感受到的机械信号传递到细胞内,并且 shRNA Piezo1 可以通过阻滞 Piezo1 的表达,降低 细胞内的 Ca<sup>2+</sup>水平,从而阻断机械牵张应力的信 号的传递。√

有研究表明,线粒体膜电位紊乱是细胞过度 周亡的关键机制,而线粒体膜电位紊乱主要的表 现是线粒体膜电位的翻转变化<sup>[16,17]</sup>。本研究利用 Cell Meter 检测试剂盒检测细胞线粒体膜电位的 变化,结果显示,在机械牵张应力刺激下,细胞内 线粒体膜电位变化的比例显著性增高(牵张应力 组与空白对照组比较,P<0.05),说明 Ca<sup>2+</sup>的增加 可以引起线粒体膜电位的变化,进而引起线粒体 膜电位的紊乱。shRNA 干扰 Piezo1 表达后可以通 过降低 Ca<sup>2+</sup>水平,从而稳定线粒体膜电位,对线粒 体膜电位的稳态进行保护,进而抑制牵张应力作 用下髓核细胞的凋亡。√

综上所述,应用 shRNA 干扰 Piezo1 表达后, 通过降低细胞内 Ca<sup>2+</sup>水平,维持线粒体膜电位的 稳态,抑制机械牵张应力作用下髓核细胞的凋亡。⊄ ፈ

#### 4 参考文献↓

- Zhang CC, Cui GP, Hu JG, et al. Effects of adenoviral vector expressing hIGF-1 on apoptosis in nucleus pulposus cells in vitro[J]. Int J Mol Med, 2014, 33(2): 401-405. ✓
- 刘汝银,彭晓艳,岳宗进,等.四环素联合桂枝加葛根汤对髓 核细胞增殖和相关因子表达的影响 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2018, 28(5): 436-469.
- 谢志阳,陈露,张聪,等.内质网应激在酸诱导的人椎间盘髓 核细胞损伤中的作用机制研究[J].中国脊柱脊髓杂志,2018, 28(8):732-740.√
- Coste B, Mathur J, Schmidt M, et al. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels[J]. Science, 2010, 330(4): 55-60.
- 5. Coste B, Xiao B, Santos JS, et al. Piezo proteins are pore-

forming subunits of mechanically activated channels[J]. Nature, 2012, 483(27): 176–181.

- E天宝,李晓飞,冷萍,等. 椎间盘髓核细胞应力模型中 Piezo1蛋白的表达[J]. 青岛大学学报(医学版), 2017, 53(3): 257-260.√
- Song HW, Bettegowda A, Oliver D, et al. shRNA off-target effects in vivo: impaired endogenous siRNA expression and spermatogenic defects [J]. PLoS One, 2015, 10 (3): 18549 – 18511.
- 杨骐宁,曹杨,周勇伟,等. Piezo1 蛋白在人退变软骨细胞应 力模型中的表达特点[J].中国骨伤, 2018, 31(6): 550-555.
- 李晓飞,张钊,李晓东,等.新型机械激活离子通道蛋白 Piezo1 通过 MAPK/ERK1/2 信号通路介导软骨细胞凋亡的机 制[J].中华医学杂志,2016,96(31):2472-2475.
- Bae C, Sachs F, Gottlieb PA, et al. The mechanosensitive ion channel Piezo1 is inhibited by the peptide GsMTx4 [J]. Biochemistry, 2011, 50(5): 6295-6300.
- 邓盎,张宏其,郭超峰,等.利用 RNAi 技术稳定抑制 ERβ 表达的人成骨细胞株 hFOB 1.19 细胞模型的建立[J].中国脊 柱脊髓杂志, 2012, 22(8): 722-728.
- Van Gestel MA, van Erp S, Sanders LE, et al. shRNA-induced saturation of the microRNA pathway in the rat brain [J]. Gene Ther, 2014, 21(2): 205-211.
- Liu YP, Karg M, Herrera-Carrillo E, et al. Towards antiviral shRNAs based on the AgoshRNA design[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0128618.
- Ge J, Li W, Zhao Q, et al. Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel[J]. Nature, 2015, 527(7576): 64-69.
- Gnanasambandam R, Bae C, Gottlieb PA, et al. Ionic selectivity and permeation properties of human Piezo1 channels[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0125503.
- 16. Kim SM, Park HS, Jun DY, et al. Mollugin induces apoptosis in human Jurkat T cells through endoplasmic reticulum stress-mediated activation of JNK and caspase-12 and subsequent activation of mitochondria-dependent caspase cascade regulated by Bcl-xL[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 241(2): 210-220.
- Park GB, Kim YS, Lee HK, et al. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of EBV-transformed B cells by cross-linking of CD70 is dependent upon generation of reactive oxygen species and activation of p38 MAPK and JNK pathway[J]. J Immunol, 2010, 185(12): 7274-7284.

(收稿日期:2018-06-25 末次修回日期:2018-10-08)
(英文编审 唐翔字/贾丹形)
(本文编辑 卢庆霞)