

# RNA 干扰沉默 CTGF 表达对人成骨样 MG63 细胞 I 型胶原、ALP mRNA 表达的影响

隋国良 彭依群 翟木绪 廖二元

**摘要：**目的 本研究将利用 RNA 干扰技术，阻断 CTGF 在人成骨样 MG 63 细胞中的表达，观察 CTGF 降表达后对人成骨样 MG 63 细胞 I 型胶原、碱性磷酸酶 mRNA 表达的影响。方法 针对人 CTGF mRNA 440、875、910 位点设计、合成 3 对 21 核苷酸 siRNA (siRNA 1、siRNA 2、siRNA 3) 在阳离子脂质体介导下转染人成骨样 MG 63 细胞，以空白及非特异性 siRNA 作为对照，转染 48 h 后收集细胞。采用 Northern 杂交研究 CTGF mRNA 表达水平的改变，半定量 RT-PCR 观察 I 型胶原、ALP mRNA 表达的改变，Western blotting 观察 CTGF 蛋白表达的变化。MTT 法测定 RNA 干扰后人成骨样 MG 63 细胞活力的改变。结果 空白对照组相比，转染 siRNA 1、siRNA 3 的 MG 63 细胞 CTGF mRNA 和蛋白表达明显下调，转染 siRNA 2 及非特异性 siRNA 的 MG 63 细胞 CTGF 的表达无明显变化。转染 siRNA 1、siRNA 3 的 MG 63 细胞 I 型胶原、ALP mRNA 表达明显下调，细胞活力明显降低。结论 针对人 CTGF mRNA 设计、合成的 siRNA 可有效抑制人成骨样 MG 63 细胞 CTGF 的转录和表达，CTGF 表达下调可抑制 MG 63 细胞表型标志物 I 型胶原、ALP mRNA 的表达，降低 MG 63 细胞活力，这说明 CTGF 可能在维持骨代谢平衡中具有重要的作用。

**关键词：**RNA 干扰；小干扰 RNA；结缔组织生长因子；I 型胶原；碱性磷酸酶

**Inhibition of connective tissue growth factor expression decreases the expression of type 1 collagen and alkaline phosphatase mRNA in human osteoblastic MG 63 cells** SUI Guoliang, PENG Yiqun, ZHAI Muxu, et al. Institute of Metabolism and Endocrinology, Second Xiangya Hospital, CentralSouth University, Changsha 410011, China

**Abstract : Objective** To investigate the inhibition effect of small interfering RNA (siRNA) on the expression of connective tissue growth factor (CTGF), and to observe the effects of down-regulation of CTGF on the expression of type 1 collagen and alkaline phosphatase mRNA in human osteoblastic MG 63 cells. **Methods** Three pairs of 21-nucleotide CTGF siRNAs directed to human CTGF mRNA 440, 875 and 910 targets were differently transfected into human osteoblastic MG 63 cells with DMR1E-C reagent package. Untreated and transfected scramble siRNA served as the blank control and nonspecific siRNA control respectively. Total RNA and protein of the cells after 48h incubation were extracted. The expression of CTGF in mRNA and protein level were assessed by northern blot and western blot, and the expression of type 1 collagen and alkaline phosphatase mRNA in human osteoblastic MG 63 cells were evaluated by semiquantitative RT-PCR, cell viability was tested by MTT assay. **Results** Compared with blank control group, the expression of CTGF mRNA and protein were markedly down-regulated by siRNA directed to 440 and 910 target of human CTGF mRNA, siRNA directed to 875 target and scramble siRNAs show no effect on the expression of CTGF. The expression of type 1 collagen and alkaline phosphatase mRNA was reduced in human osteoblastic MG 63 cells transfected with siRNAs directed to 440 and 910 targets, and cell viability significantly decreased in human osteoblastic MG 63 cells transfected with siRNAs directed to 440 and 910 targets. **Conclusions** CTGF siRNA can effectively reduced the expression of CTGF mRNA and protein. Inhibition of CTGF expression

基金项目：国家自然科学基金资助项目(30572078、30600661)

作者单位：410011 长沙，中南大学附属湘雅二医院代谢内分泌研究所(第一作者现工作于山东省烟台市烟台山医院)

通讯作者：廖二元, Email: yeliao2003@21cn.com

decreases the expression of type 1 collagen and alkaline phosphatase mRNA as well as cell viability in human osteoblastic MG 63 cells.

**Key words:** RNA interfering; Small interfering RNA; Connective tissue growth factor; Type 1 collagen; Alkaline phosphatase

结缔组织生长因子(connective tissue growth factor CTGF)是一个高度保守的肽类家族的成员,参与了体内多种生理和病理过程,尤其在 TGF- $\beta$  依赖性的纤维化途径中发挥重要作用。有研究表明,CTGF 作为一种重要的效应分子之一,在软骨细胞和成骨细胞的增殖分化方面发挥重要作用。我们以前的研究发现,雌二醇可下调人成骨样 MG 63 细胞 CTGF 的表达<sup>[1]</sup>,但人成骨样 MG 63 细胞 CTGF 表达下调所引起的生物学效应目前尚不清楚。在本研究中,我们将利用针对人成骨样 MG 63 细胞 CTGF 合成的 siRNA,观察不同 siRNA 片断对人成骨样 MG 63 细胞 CTGF 表达的阻断作用,以及 CTGF 降表达后对人成骨样 MG 63 细胞 I 型胶原、碱性磷酸酶(ALP)mRNA 表达的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

MG-63 细胞株购自美国组织培养库(American Type Culture Collection ATCC 号:CRL-1427),小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)由武汉晶赛生物技术有限公司合成,DMR1E-C Reagent、Trizol、optiMEM 购自 Invitrogen 公司,羊 CTGF 抗体购自 santa cruz 公司,培养瓶、培养板购自 nunclon 公司,无酚红 MEM 培养基、胰酶、EDTA、抗坏血酸、牛血清白蛋白购自 Sigma 公司,焦碳酸二乙酯(DEPC)购自 Gibco 公司,胎牛血清购自 Hyclone 公司,逆转录试剂盒购自 Promega 公司,Taq 酶、琼脂糖、溴化乙啶购自上海生工公司, $\phi$ X 174-Hinc II digest DNA Marker 购自 Takara 公司, $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 购自北京亚辉生物制品公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 siRNA 的设计和合成:**按 Elbashir 等<sup>[2]</sup>的 siRNA 设计原则,针对人 CTGF mRNA 440、875、910 靶位通过生物转录方法合成 3 对 siRNA 序列如下:440 位点(siRNA 1):sense strand siRNA 5'-GAU GGU GCU CCC UGC AUC UUU-3', antisense strand siRNA: 5'-UUC UAC CAC GAG GGA CGU AGA-3';875 位点(siRNA 2):sense strand siRNA 5'-GCU GAC CUG GAA GAG AAC AUU-3', antisense strand siRNA:5'-UUC

GAC UGG ACC UUC UCU UGU ;910 位点(siRNA 3): sense strand siRNA 5'-GUG CAU CCG UAC UCC CAA AUU-3', antisense strand siRNA:5'-UUC ACG UAG GCA UGA GGG UUU-3',经 Blast 确定 3 对 siRNA 的特异性。阴性对照 siRNA:sense strand siRNA:5'-GCU UCA UAA GGC GCA UAG CUU-3', antisense strand siRNA 5'-UUC GAA GUA UUC CGC GUA UCG-3',经 Blast 确定其与人 CTGF mRNA 无同源性。

**1.2.2 细胞培养:**从液氮罐中取出第 99 代 MG-63 细胞株复苏,5% CO<sub>2</sub>、95%空气、饱和湿度 37℃培养箱培养,培养液为无酚红  $\alpha$ -MEM 培养液(含 10%胎牛血清、50 mg/L 抗坏血酸,300 mg/L L-谷氨酸),达汇片后按  $5 \times 10^5$  细胞/瓶接种至 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶。

**1.2.3 脂质体转染:**实验共设 5 组,实验组 3 组,分别为 siRNA 1 组(转染时加入 siRNA 1 与脂质体复合物),siRNA 2 组(转染时加入 siRNA 2 与脂质体复合物),siRNA 3 组(转染时加入 siRNA 3 与脂质体复合物),另设空白对照组(转染时只加入脂质体)及阴性对照组(转染时加入阴性对照 siRNA 与脂质体复合物)。3 对 siRNA 及阴性对照 siRNA 均以 100 nmol/L 浓度转染。转染前更换无血清培养基,siRNA 与 DMR1E-C Reagent 按等体积混匀,室温孵育 20~25 min 后加入培养皿,轻轻摇 30 s,混匀置 37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 4 h 后按终体积 5% 加胎牛血清,48 h 后收集细胞,抽提细胞总 RNA 和蛋白质待测。

**1.2.4 RNA 抽提及半定量 RT-PCR 分析 siRNA 干预后 I 型胶原和 ALP mRNA 的变化:**用 Trizol 法(Invitrogen 公司)按说明书抽提总 RNA。在 Gene Amp 2400 PCR 扩增仪上行半定量 RT-PCR。首先取总 RNA 2.0  $\mu$ g,用逆转录试剂盒(Promega 公司),按说明书合成 cDNA,再取 cDNA 行 PCR 扩增。扩增体系:cDNA 50 ng,25 mM MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ l,100 ng/ $\mu$ l 引物各 0.7  $\mu$ l,10 $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu$ l,Taq 酶 1 U,加去离子水至终体积 25  $\mu$ l。I 型胶原和 ALP 扩增条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 50 s,58℃ 30 s,72℃ 45s,最后 72℃ 延伸 7 min,循环 25 个。同时以  $\beta$ -actin 基因作为内部质控。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统测定光密度,分别计算各基因与  $\beta$ -actin 基因的光密度比值。

**1.2.5 Northern blot 检测人成骨样 MG 63 细胞 siRNA 干预后 CTGF mRNA 的表达** :参照分子克隆实验指南进行操作。分别取对照组和实验组总 RNA 20  $\mu\text{g}$  ,1.2% 甲醛琼脂糖变性胶电泳,转尼龙膜,将纯化回收的用  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$  标记 cDNA 探针 ( $\beta\text{-actin}$  为内对照),68 $^{\circ}\text{C}$  杂交,2  $\times$  SSC/0.05% SDS 洗膜 15 min

	正向	反向
$\beta\text{-actin}$	5'-TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT-3'	5'-GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT-3'
CTGF	5'-CCA AGG ACC AAA CCG TGG T-3'	5'-TAC TCC ACA GAA TTT AGC TCG-3'
1 型胶原	5'-ACC AGC ATC ACC CTT AGC AC-3'	5'-CTG GTC CTG ATG GCA AAA CT-3'
ALP	5'-ACC TCG TTG ACA CCT GGA AG-3'	5'-GTG AAG ACG TGG GAA TGG TC-3'

**1.2.7 蛋白质抽提及 Western blot 分析** :蛋白质的提取:倾去培养瓶中培养基, PBS 洗 2 次,每瓶加入三去污蛋白裂解液 400  $\mu\text{l}$  (50 mmol/L Tris-HCl pH8.0), 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 0.2%  $\text{NaN}_3$ , 0.5% 去氧胆酸钠, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PMSF), 冰上放 20 min, 用细胞刮刮取细胞, 转移至 1.5 ml EP 管中。用 Bradford 法测蛋白含量后放 -70 $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

Western blot 分析参照分子克隆实验指南。取细胞 40  $\mu\text{g}$  总蛋白与 4  $\times$  SDS 加样缓冲液混匀, 95 $^{\circ}\text{C}$  加热蛋白变性 5 min, 点样于 10% SDS-PAGE 胶中电泳, 转移至 PVDF 膜上。含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭 1 h 后, 用含羊抗人 CTGF 多克隆抗体 (1:500 稀释) (Santa Cruz 公司) PBS 温育 1 h, PBS 洗膜 5 min  $\times$  3 次, 用含辣根过氧化物酶标记抗羊二抗 (1:2000 稀释) (Santa Cruz 公司) PBS 温育 1 h, 洗膜后, ECL (Santa Cruz 公司) 发光自显影, 洗片显带。同一张膜洗脱后, 用 1:1000 稀释的羊抗鼠  $\beta\text{-actin}$  (sc-1616 Santa Cruz 公司) 一抗, 辣根过氧化物酶标记抗羊二抗 (1:2000 稀释) (Santa Cruz 公司) 重新杂膜, 发光自显影, 洗片显带作为内对照。所有杂交信号在成像分析仪系统测定条带密度。

$\times$  2 次, 0.5  $\times$  SSC/0.5% SDS 50 $^{\circ}\text{C}$  洗膜 15 min  $\times$  2 次, 用 Typhoon 2000 Imagequant 5.1 成像分析系统扫描图像, 并行条带光密度检测。

**1.2.6 引物设计** :用 PCR Designer 软件设计, 引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

引物序列如下:

**1.2.8 细胞活力的测定 (MTT 法)** 将 MG 63 细胞以每孔  $3 \times 10^2$  细胞的浓度接种于 96 孔培养板, 培养 24 h 后, 分别用 3 对 siRNA 及阴性对照 siRNA 均以 100 nmol/L 浓度转染。4 h 后按终体积 10% 加新鲜小牛血清, 继续培养 48 h 后加入 20  $\mu\text{l}$  MTT 溶液 (5 mg/ml), 继续培养 4 h, 吸去培养液, 加入 150  $\mu\text{l}$  DMSO 振荡, 充分溶解结晶, 酶联免疫检测仪测定各孔光吸收值, 测定波长为 570 nm。细胞存活率 = 实验组 OD 值/空白对照组 OD 值。

**1.3 统计学处理**

各实验独立重复 3 次, 重复性好。所选图表为重复实验的结果之一。数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较用方差分析。所有统计分析均采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析。

**2 实验结果**

**2.1 与空白对照组相比, 转染 siRNA 1、siRNA 3 的 MG 63 细胞 CTGF mRNA 和蛋白表达明显下调, siRNA 1 组 CTGF 蛋白抑制率可达 70%, 转染 siRNA 2 及非特异性 siRNA 的 MG 63 细胞 CTGF mRNA 和蛋白的表达无明显变化 (见图 1), 这说明针对 CTGF 不同片断设计的 siRNA 可有效抑制 MG 63 细胞**



图 1 siRNA 干预对人成骨样 MG 63 细胞 CTGF mRNA 和蛋白表达的影响

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.01$ ; 1、2、3、4、5 分别表示空白对照组、非特异性 siRNA、siRNA 1、siRNA 2、siRNA 3 组; 平均光密度比值为 CTGF 光密度/ $\beta\text{-actin}$  平均光密度

CTGF mRNA 和蛋白表达。

2.2 与空白对照组相比,转染 siRNA 1、siRNA 3 的 MG 63 细胞 I 型胶原、ALP mRNA 表达明显下调,尤以 siRNA 1 组下调明显,转染 siRNA 2 及非特异性

siRNA 的 MG 63 细胞 I 型胶原、ALP mRNA 的表达则无明显变化(见图 2),说明 MG 63 细胞分泌的 CTGF 可调节 I 型胶原、ALP mRNA 表达,是促进 MG 63 细胞分化的重要因素。



图 2 siRNA 干预对人成骨样 MG 63 细胞 I 型胶原和 ALP mRNA 的表达的影响

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与空白对照组比较,# $P < 0.05$ ;1、2、3、4、5 分别表示空白对照组、非特异性 siRNA、siRNA 1、siRNA 2、siRNA 3 组;平均光密度比值为 I 型胶原光密度/ $\beta$ -actin 平均光密度或 ALP 光密度/ $\beta$ -actin 平均光密度

2.3 与空白对照组相比,转染 siRNA 1、siRNA 3 的 MG 63 细胞活力明显降低,其中 siRNA 1 组细胞活力的下降最显著,而转染 siRNA 2 及非特异性 siRNA 的 MG 63 细胞活力则无明显改变(见图 3),这说明 CTGF 是维持成骨细胞存活的重要因子。

样 MG 63 细胞 CTGF 基因表达和功能的影响。结果表明,体外转录合成的 siRNA 1(对应于 440 位点)、siRNA 3(对应于 910 位点)转染人成骨样 MG 63 细胞后,能够有效地抑制 CTGF mRNA 和蛋白的表达,其中 siRNA 1 的抑制作用更为显著,可将 CTGF 蛋白抑制达 70% 以上,siRNA 2 对应于 875 位点)则对人成骨样 MG 63 细胞 CTGF 的表达无明显作用。通过本研究,我们筛选出能够高效抑制 CTGF 基因表达的 siRNA,为今后研究 CTGF 在成骨细胞中的功能进一步奠定了实验基础。

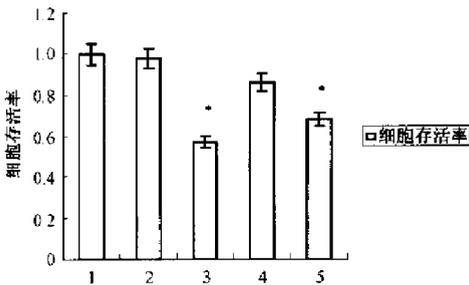


图 3 siRNA 干预对人成骨样 MG 63 细胞细胞活力的影响

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ;1、2、3、4、5 分别表示空白对照组、非特异性 siRNA、siRNA 1、siRNA 2、siRNA 3 组;细胞存活率 = 实验组 OD 值/空白对照组 OD 值

### 3 讨论

RNA 干扰是一种转录后基因沉默机制,即 mRNA 被结合后即被降解或被相应的反义 RNA/蛋白质封闭,从而阻止 mRNA 修饰和翻译,这种 RNA 水平的基因调控比转录水平基因沉默现象更普遍<sup>[3]</sup>。RNA 干扰具有高特异性、高效、持久的特点,目前已广泛应用于基因功能的研究。本研究中,我们针对人 CTGF mRNA 440、875、910 位点设计、合成 3 对 21 核苷酸 siRNA,以 100 nmol/L 浓度在脂质体介导下转染人成骨样 MG 63 细胞,观察其对成骨

结缔组织生长因子是 CCN(为 CTGF、Cyr 61、NOV 第一个字母的缩写)的成员,是一种多功能的生长因子,参与了体内多种病理生理过程。CTGF 不仅可促进诸如成纤维细胞、血管平滑肌细胞、软骨细胞等的增殖,还可增加 I 型胶原、纤黏连蛋白、 $\alpha 5$  整合素的表达,促进细胞外基质的积聚,在胚胎发育、肿瘤形成、动脉粥样硬化、纤维化疾病及骨折愈合中发挥重要作用<sup>[4,5]</sup>。我们以往的研究结果显示,在人成骨细胞整个培养期内均检测到 CTGF mRNA 表达,于增殖期达高峰,其后迅速下调,至基质成熟期其表达水平逐渐上调,并维持至矿化期,提示 CTGF 可能与成骨细胞的增殖、分化有关<sup>[6]</sup>。Nishida 等<sup>[7]</sup>研究表明,rCTGF 轻度促进 SaOS-2 细胞和 MC 3 T 3-E 1 细胞的增殖,却能明显上调骨基质蛋白如 I 型胶原、骨桥素和 OC mRNA 的表达,提示 CTGF 主要与成骨细胞的分化有关。Nakanishi<sup>[8]</sup>对过度表达 CTGF 的转基因小鼠的研究表明,过度表达 CTGF 的转基因小鼠骨密度(尤其是后肢骨密度)明显降低;Xu<sup>[9]</sup>对

骨质硬化的大鼠研究发现,该大鼠的颅骨、股骨 CTGF 表达显著升高,这些研究说明 CTGF 可能在维持骨代谢平衡方面具有重要的作用。此外,我们以前的研究还显示,雌二醇呈时间、剂量依赖性下调增殖期成骨细胞 CTGF 表达<sup>[6]</sup>,因此我们推测,CTGF 可能与雌激素的骨保护作用有关,并参与绝经后骨质疏松症的发生。但成骨细胞中 CTGF 表达下调所引起的生物学效应目前尚不清楚。在本研究中,我们发现,在 siRNA 1 组、siRNA 3 组,随 CTGF 表达下调,成骨细胞的功能基因 I 型胶原、ALP mRNA 表达明显下调,而在 siRNA 2 组 I 型胶原、ALP mRNA 表达则无明显变化。此外,我们还观察到,在 siRNA 1 组、siRNA 3 组,CTGF 表达下调可引起人成骨样 MG 63 细胞存活率显著降低,这说明,CTGF 是维持成骨细胞存活及分化的所需重要因素。CTGF 在人成骨样 MG 63 细胞表达下调,不仅降低 MG 63 细胞的存活率,还可抑制细胞分化相关基因(I 型胶原、ALP)的表达。这一研究结果同时还提示:在人成骨样 MG 63 细胞可能存在一个 CTGF 自分泌环(autocrine loop),CTGF 可能作为一种自分泌细胞生长、存活因子通过作用于自身受体(可能为一种分子量为 28000 的配体-受体复合物<sup>[10]</sup>),影响其自身的增殖、分化。从目前的研究结果来看,CTGF 表达下调可降低人成骨样 MG 63 细胞的存活,下调 I 型胶原、ALP 的表达,但其是否参与雌激素的骨保护作用仍有待进一步研究。

总之,通过本研究,我们发现:针对 CTGF mRNA 440、910 位点合成的 siRNA 可有效抑制人成骨样 MG 63 细胞 CTGF 的表达;CTGF 表达下调不仅降低 MG 63 细胞的存活率,还可下调人成骨样 MG 63 细胞功能基因 I 型胶原、ALP 的表达,这说明 CTGF 在维持骨代谢平衡方面具有重要的作用。

## 【参 考 文 献】

- [ 1 ] 彭依群,廖二元,邓小戈.雌二醇诱导人成骨样细胞差异表达基因筛查.中华内科杂志,2003,42:561-565.
- [ 2 ] Elbashir SM,Harborth J,Weber K,et al. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using a small interference RNAs. Methods, 2002,26:199-213.
- [ 3 ] Leirdal M,Sioud M. Gene silencing in mammalian cells by performed small RNA duplexes. Biochem Biophys Res Commun,2002,295:744-748.
- [ 4 ] Brigstock DR. The Connective Tissue Growth Factor/Cysteine-Rich 61/Nephroblastoma Overexpressed (CCN) Family. Endocrine Reviews,1999,20:189-206.
- [ 5 ] Nishida T,Kubota S,Nakanishi T,et al. CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte specific gene product, stimulates proliferation, and differentiation, but not hypertrophy of cultured articular chondrocytes. J Cell Physiol, 2002,192:55-63.
- [ 6 ] 翟木绪,彭依群,隋国良,等.17 $\beta$ -雌二醇对体外培养人成骨细胞 CTGF 和 PAIP-1 基因表达的作用.中国骨质疏松杂志,2005,11:25-37.
- [ 7 ] Nishida T, Nakanishi T, Asano M, et al. Effects of CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, on the proliferation and differentiation of osteoblastic cells *in vitro*. J Cell Physiol, 2000, 84:197-206.
- [ 8 ] Nakanishi T, Yamaai T, Asano M, et al. Overexpression of connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte-specific gene product 24 decreases bone density in adult mice and induces dwarfism. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 281:678-681.
- [ 9 ] Xu J, Smock SL, Safadi FF, et al. Cloning the full-length cDNA for rat connective tissue growth factor: implications for skeletal development. J Cell Biochem, 2000, 77:103-115.
- [ 10 ] Nishida T, Nakanishi T, Shimo T, et al. Demonstration of receptors specific for connective tissue growth factor on a human chondrocytic cell line (HCS-2/8). Biochem Biophys Res Commun, 1998, 247:905-909.

(收稿日期:2006-12-08)