

# siRNA 沉默 ERK5 基因对 MC3T3-E1 成骨细胞增殖及 BMP2/BMP7 的影响

滕元君 陈少龙 赵良功 姜金 崔兆辉 夏亚一\* 汪静 王翠芳 安丽萍 马靖琳  
兰州大学第二医院骨科, 甘肃省骨与关节重点实验室, 甘肃 兰州 730000

中图分类号: R319 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 09-1055-04

**摘要:** 目的 观察 ERK5 信号通路对 MC3T3-E1 成骨细胞的增殖, 及功能分化蛋白 BMP2/BMP7 的影响。方法 应用小 RNA 分子干扰技术 (siRNA) 沉默 ERK5 基因, 分别将浓度为 20、40、60、80 nmol/L 的 ERK5 siRNA 干预 MC3T3-E1 成骨细胞, 筛选 ERK5 siRNA 转染的最佳浓度。噻唑蓝实验 (MTT) 检测转染后 12 h、24 h、36 h 和 48 h 细胞的增殖情况, 实时荧光定量 PCR 检测 ERK5、BMP2 和 BMP7 mRNA 的表达。Western blot 检测不同干预组 BMP2 及 BMP7 蛋白的表达变化。结果 当 ERK5 siRNA 浓度为 60 nmol/L 时, MC3T3-E1 成骨细胞的 ERK5 mRNA 的表达下降最为显著, 沉默率为  $76.8 \pm 2.2\%$  ( $P < 0.01$ )。ERK5 siRNA 转染后 12 h、24 h、36 h, 成骨细胞的增殖受到明显抑制 ( $P < 0.05$ ), 但 48 h 转染组未发现明显变化 ( $P > 0.05$ )。ERK5 siRNA 转染 24 h 后, 实时荧光定量 PCR 结果显示: 空白组与对照 siRNA 组成骨细胞的 BMP2/BMP7 mRNA 变化水平无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 但 ERK5 siRNA 转染组的 BMP2/BMP7 mRNA 明显降低 ( $P < 0.05$ ); Western blot 结果显示, 空白组与对照 siRNA 组成骨细胞的 BMP2/BMP7 蛋白未发现明显变化 ( $P > 0.05$ ), 但转染组成骨细胞的 BMP2/BMP7 显著降低 ( $P < 0.05$ )。结论 ERK5 siRNA 对 MC3T3-E1 成骨细胞的增殖以及骨形态蛋白 BMP2 和 BMP7 的表达有明显抑制作用。

**关键词:** 成骨细胞; 细胞增殖; 骨形态蛋白; 小 RNA 分子干扰; 细胞外信号调节激酶 5

## Effect of ERK5 siRNA on cell proliferation and BMP2/BMP7 expression in MC3T3-E1 osteoblasts

TENG Yuanjun, CHEN Shaolong, ZHAO Liangong, JIANG Jin, CUI Zhaohui, XIA Yayi, WANG Jing, WANG Cuifang, AN Liping, MA Jinglin

Department of Orthopedics, the Second Hospital of Lanzhou University, Orthopedics Key Laboratory of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: XIA Yayi, Email: xiayayi@126.com

**Abstract: Objective** To investigate the effect of extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) signaling pathway on cell proliferation and BMP2/BMP7 expression in MC3T3-E1 osteoblasts. **Methods** The technique of small interfering RNA (siRNA) was used to silence the gene expression of ERK5. In order to select the optimal silencing effect of ERK5 siRNA, the concentrations of 20, 40, 60, and 80 nmol/L ERK5 siRNA were used to culture MC3T3-E1 osteoclasts, respectively. Cell proliferation at the 12<sup>th</sup> hour, 24<sup>th</sup> hour, 36<sup>th</sup> hour, and 48<sup>th</sup> hour after the transfection was detected using MTT assay. The expression of ERK5, BMP2, and BMP7 mRNA was detected using real-time PCR (RT-PCR). The expression of BMP2 and BMP7 protein was detected using Western blotting. **Results** The expression of ERK5 mRNA reduced significantly with 60 nmol/L siRNA, and the silence rate was  $76.8 \pm 2.2\%$  ( $P < 0.01$ ). After silencing ERK5 gene, the proliferation of MC3T3-E1 osteoblasts was inhibited at the 12<sup>th</sup> hour, 24<sup>th</sup> hour, and 36<sup>th</sup> hour ( $P < 0.05$ ), but no significant difference at the 48<sup>th</sup> hour was observed ( $P > 0.05$ ). After 24h transfection with ERK5 siRNA, the expression of BMP2/BMP7 mRNA and protein decreased significantly in ERK5 siRNA group when compared with that in the blank group and siRNA control groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** ERK5 siRNA can significantly inhibit cell proliferation and the expression of BMP2/BMP7 mRNA and protein in MC3T3-E1 osteoblasts.

**Key words:** Osteoblasts; Cell proliferation; Bone morphogenetic protein; Small interfering RNA; ERK5

基金项目: 国家自然科学基金(81071478); 兰州大学第二医院院内课题(YJ2010-03); 甘肃省卫生行业计划(GSWST-2011-07)

\* 通讯作者: 夏亚一, Email: xiayayi@126.com

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPKs)是一类存在于细胞内的高度保守的丝/苏氨酸蛋白激酶家族, 通过感受外界刺激, 将生

物化学信号传导到细胞质及细胞核内,是生物体内重要的信号转导系统<sup>[1]</sup>。目前,已知的四条 MAPKs 信号通路有:细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK) 1/2、ERK5、p38、c-Jun 氨基末端激酶通路。

ERK5 信号通路是 MAPK 家族的最晚发现的成员,其氨基末端激酶结构域与 ERK1/2 同源,但其分子量约是其他 MAPK 成员的两倍,所以又称为大 MAPK 通路(Big MAPK/BMK)<sup>[2]</sup>。研究发现,ERK5 在促进内皮细胞增殖、神经发育、胚胎生长中起关键作用。Regan 等<sup>[3]</sup>研究发现,敲除 ERK5 基因的小鼠会出现胚胎心脏、血管、脊背神经发育迟缓,说明 ERK5 在胚胎发育中起到重要作用。目前,对 ERK5 信号通路的研究多集中在心血管、神经、泌尿系统<sup>[4]</sup>,对骨骼系统研究较少。

骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2) 和 BMP7 是成骨细胞最重要的骨诱导分化因子,对成骨细胞的增殖分化具有关键的作用<sup>[5]</sup>。该实验采用小 RNA 分子干扰技术(Small interfering RNA, siRNA)沉默 MC3T3-E1 成骨细胞的 ERK5 基因后,观察 MC3T3-E1 成骨细胞的增殖以及其功能分化蛋白 BMP2 和 BMP7 的表达情况。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

细胞株:小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞株购自中国医学科学院细胞库。

主要试剂:低糖 DMEM 培养基(Hyclone, USA),胎牛血清(GIBCO, USA),青霉素-链霉素双抗(武汉博士德), ERK5 siRNA (Sc-35340, Santa Cruze, USA), siRNA 转染试剂(Sc-45064, Santa Cruze, USA),  $\beta$ -actin(中山金桥)、BMP2 (Bioworld, USA)、BMP7 (Bioworld, USA) 一抗,辣根过氧化物酶二抗(中山金桥),总 RNA 提取液(TaKaRa, Japan), PCR 反转录试剂盒(TaKaRa, Japan),  $\beta$ -actin、BMP2、BMP7、ERK5 引物(TaKaRa, Japan)。

主要仪器:细胞培养箱(Heal force, USA),精密蠕动泵(上海金达),倒置相差显微镜(Olympus, USA),PCR 仪(ABI7500, USA)。

### 1.2 细胞培养

成骨细胞 MC3T3-E1 细胞株在温度 37 度、二氧化碳饱和度 5% 的孵育箱中培养传代。用含 10% 胎牛血清,青霉素 100 U/ml,链霉素 100 U/ml 的低糖 DMEM 培养液培养,待细胞融合至 90% 时,用

0.25% 胰酶消化,接种至 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中传代培养。

### 1.3 细胞转染

将对数生长期的成骨细胞按  $3 \times 10^5$ /孔的密度接种到 6 孔培养板上,待细胞生长至 80-90% 时进行转染。按照 Santa Cruze 转染说明书进行转染。

1. 配液,液体 A:2-8  $\mu$ L siRNA + 100  $\mu$ L 转染培养基;液体 B:6  $\mu$ L 转染试剂 + 100  $\mu$ L 转染培养基,将 A 液与 B 液混匀,室温下孵育 30 min,再次加入 0.8 ml 转染培养基充分混匀待用。2. 迅速取 2 ml 转染培养基冲洗成骨细胞两次,加入第一步配好的液体,放入孵育箱中培养 6 h。再加入 1 ml 含有 2 倍正常血清和抗生素的生长培养基,继续培养 12-48 h。实验分为 3 组:空白组(正常细胞)、对照组(Control siRNA 干预)和 siERK5 组(加入 ERK5 siRNA 干预)。

### 1.4 噻唑蓝实验(MTT)测量细胞增殖情况

实验分组情况:空白组、对照 siRNA 组、siERK5 组(12 h、24 h、36 h、48 h)。将成骨细胞悬液按照每孔 200  $\mu$ L ( $2 \times 10^4$  密度)接种于 96 孔板,每组设置 5 个复孔。约 36h 后,细胞处于对数生长期,进行转染。分别在转染后 12 h、24 h、36 h、48 h 后加入 20  $\mu$ L MTT(5 mg/ml)继续孵育 4 h,然后加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砷,室温摇床振荡 10 min。酶标仪检测 OD490 nm 处各孔的吸光值。

### 1.5 实时荧光定量 PCR

使用 Takara 总 RNA 提取液提取总 RNA,并检测 RNA 浓度。按照每 10  $\mu$ L 反转录体系 500 ng 总 RNA 反转录为 cDNA,反转录条件如下:37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s,95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环。引物:内参  $\beta$ -actin 上游,5' CATCCGTAAAGAC CTCTATGCCAAC 3',下游,5' -ATGGAGCCACCG ATCCACA-3'; ERK5 上,5' -CCTGAAGCCTACTG TGCCCTATG-3';下游,5' -CCGAAGCAGCTGGTAC AGGAA-3'; BMP2 上游,5' -TGACTGGATCGTG GCACCTC-3',下游,5' CAGACTCTGCACTATGG CATGGTTA 3'。BMP7 上游,5' -ACATCCGGGAGCG ATTTGAC-3',下游,5' -TCCTCAGAAGCCCAG ATGGTG-3' 先分别获得各组基因 CT 的平均值,然后按照以下公式计算: $\Delta$ CT(1) = (干预组样本基因均值 CT - 干预组  $\beta$ -actin 基因均值 CT);  $\Delta$ CT(2) = (对照组样本基因均值 CT - 对照组  $\beta$ -actin 基因均值 CT),然后两者相减获得  $\Delta\Delta$ CT,即  $\Delta\Delta$ CT =  $\Delta$ CT(1) -  $\Delta$ CT(2),最后按照公式  $2^{-\Delta\Delta$ CT},计算得到干预组

mRNA 的表达水平是对照组的倍数。每组设置 3 个复孔,实验共重复三次。

### 1.6 Western blot 印迹实验

去除六孔板中的培养基,用冷 PBS 冲洗三遍,加入细胞裂解液 100  $\mu$ l(含蛋白酶抑制剂 1  $\mu$ l),提取细胞总蛋白后,用 BCA 法测量蛋白浓度。按照每泳道上样总蛋白 40  $\mu$ g,在浓缩胶为 5% (恒压 80 V),分离胶为 12% (恒压 135 V)的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,恒流 200 mA 湿转至 PVDF 膜,5% 的脱脂奶粉室温封闭 2 h 后,加入 BMP2(1:500)、BMP7(1:500)的一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗(1:10000)常温下孵育 2 h,化学发光测定系统(ECL)检测蛋白印迹。用  $\beta$ -actin 蛋白的表达量作为内参,Quantity One 软件分析各条带灰度值。

### 1.7 统计学分析

所有数据以均数  $\pm$  标准差表示,采用 SPSS19.0 统计软件对数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$  为数据有明显差异。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度 ERK5 siRNA 转染对 MC3T3-E1 成骨细胞 ERK5 mRNA 沉默率的测定

将浓度为:20 nmol/L、40 nmol/L、60 nmol/L 和 80 nmol/L 的 siRNA,转染成骨细胞 24 h 后,观察转染细胞 ERK5 mRNA 的表达情况。结果显示:各浓度转染组与空白组、对照 siRNA 组相比,统计学均有统计学差异( $P < 0.05$ )。但 60nmol/L 与 80nmol/L 两组的 ERK5 mRNA 的下降没有统计学差异,两组的沉默率分别为  $76.8 \pm 3.2\%$  和  $77.5 \pm 1.3\%$  ( $P > 0.05$ ) (图 1)。

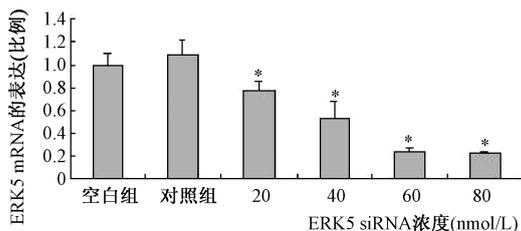


图 1 不同浓度 siERK5 对 ERK5 mRNA 表达的影响

注: \* 与空白组和对照组相比有显著性差异,  $P < 0.05$

Fig. 1 The effect of different concentrations of ERK5 siRNA on the expression of ERK5 mRNA (\*: compared with the blank group and siRNA control groups,  $P < 0.05$ )

### 2.2 MTT 法检测 60 nmol/L ERK5 siRNA 转染对 MC3T3-E1 成骨细胞增殖的影响; MTT 结果显示,与

空白组及阴性对照组相比,12 h、24 h、36 h 的转染组成骨细胞增殖明显受到抑制( $P < 0.05$ ),但 48 h 转染组未发现明显变化( $P > 0.05$ )。

表 1 不同组别酶标仪 490 nm 吸光度值 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 1 The 490 nm absorbance of enzyme microplate reader in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组名	空白组	对照组	siERK5 组
12 h 组	0.371 $\pm$ 0.048	0.366 $\pm$ 0.042 <sup>a</sup>	0.29 $\pm$ 0.034 <sup>b</sup>
24 h 组	0.455 $\pm$ 0.019	0.449 $\pm$ 0.043 <sup>a</sup>	0.371 $\pm$ 0.061 <sup>b</sup>
36 h 组	0.522 $\pm$ 0.023	0.518 $\pm$ 0.029 <sup>a</sup>	0.444 $\pm$ 0.057 <sup>b</sup>
48 h 组	0.634 $\pm$ 0.014	0.631 $\pm$ 0.041 <sup>a</sup>	0.608 $\pm$ 0.028

注: a: 与空白组相比,  $P > 0.05$ ; b: 与对照 siRNA 组相比,  $P < 0.05$ ;

a: Compared with blank group,  $P > 0.05$ ; b: Compared with siRNA control group,  $P < 0.05$ .

### 2.3 ERK5 siRNA 转染对 MC3T3 - E1 成骨细胞 BMP2、BMP7mRNA 表达的影响

RT-PCR 检测 60nmol/L 的 siERK5 转染成骨细胞 24 h 后,结果显示:转染后成骨细胞 BMP2、BMP7mRNA 水平明显下降,且统计学有显著性差异( $P < 0.05$ ) (图 2)。

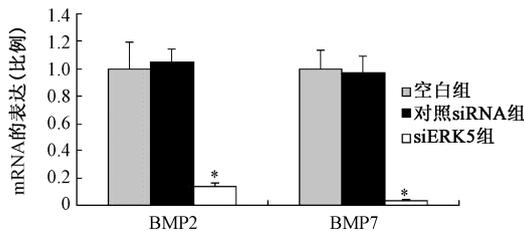


图 2 siERK5 转染成骨细胞 BMP2/BMP7 mRNA 表达的影响

注: \* 与空白组和对照组相比有显著性差异,  $P < 0.05$

Fig. 2 The effect of ERK5 siRNA on the expression of BMP2/BMP7 mRNA in osteoblasts

(\*: compared with the blank group and siRNA control groups,  $P < 0.05$ )

### 2.4 siERK5 转染对 MC3T3-E1 成骨细胞 BMP2、BMP7 蛋白表达的影响

Westernblot 结果显示,空白组与对照 siRNA 组的 BMP2、BMP7 没有显著性变化,而 60 nmol/L 的 siERK5 转染后,MC3T3-E1 成骨细胞的 BMP2、BMP7 明显降低(图 3)。

## 3 讨论

骨形态发生蛋白是最为引人注目的一组新型骨生长因子,能够有效地促进成骨细胞的增殖分化,其在预防骨质疏松、加快骨折愈合、修补骨缺损等领域

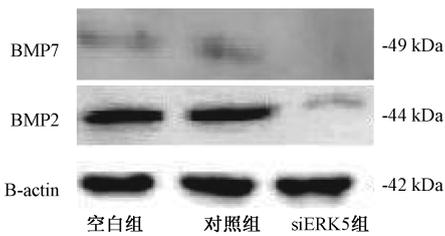


图3 Westernblot 检测不同干预组 BMP2/BMP7 蛋白的表达

Fig. 3 The expression of BMP2/BMP7 protein in different treatment groups using Western blotting

中有较为广泛的应用,目前共分离出 20 余种 BMPs。以往研究表明,BMPs 主要通过经典的 Smad 信号通路传递信号,从而发挥其生物学的功能<sup>[6]</sup>。近年来发现,BMPs 还可以通过 MAPKs、PI3K 等通路进行信号转导,因此称之为 BMPs 的非经典信号通路<sup>[7]</sup>。

ERK5 信号通路是 MAPKs 家族发现最晚的通路,也是目前研究最少的一条通路。ERK5 磷酸化依次通过 MEKK2/3, MKK5 级联反应激活,激活后进入细胞核内,其 C 端的具有转录活性的丝氨酸、苏氨酸与 N 端的共同作用下激活 c-Fos、c-Jun 以及 AP-1 等转化因子,从而促进细胞的增殖分化。目前研究已证实,ERK5 在内皮细胞增生、迁移以及新血管形成中发挥关键作用,ERK5 基因缺失的小鼠将死于胚胎早期脉管内皮组织系统发育障碍<sup>[3, 8]</sup>。

另外,ERK5 不仅调节正常细胞功能中发挥重要作用,也介导病理细胞的增殖和凋亡。Kim<sup>[9]</sup> 研究发现,沉默 ERK5 基因后,骨肿瘤的侵袭性以及金属蛋白酶(MMP9)明显减少。同时,Kato<sup>[10]</sup> 以及 Ramsay<sup>[11]</sup> 分别在宫颈癌 Hela 细胞以及人前列腺癌 PC3 细胞的中,发现了 ERK5 的重要性,并大胆预测了 ERK5 可能是未来治疗恶性肿瘤的一个重要的靶点。该结果同样也在人成骨肉瘤细胞 MG63 中得到证实,程<sup>[12]</sup> 发现,ERK5 信号通路介导了白介素 6 对 MG63 细胞的增殖分化。然而,ERK5 是否调节正常骨细胞的生理功能目前鲜有报道。

siRNA 技术是利用具有同源性的双链 RNA 诱导沉默序列特异的目的基因,并迅速阻断该基因的活性,从而观察该基因对细胞的影响。本研究采用 siRNA 干扰技术,沉默 MARKs 家族中 ERK5 基因的

表达,初步探讨了 ERK5 信号通路对成骨细胞增殖和功能蛋白表达的影响。结果显示,沉默 ERK5 基因后,成骨细胞的增殖受到了明显抑制,同时,BMP2 和 BMP7 基因和蛋白的表达也明显下降。

总之,ERK5 信号通路是调节成骨细胞增殖功能表达的重要信号蛋白,该实验结果为今后加速骨折愈合和预防骨质疏松提供了重要的理论依据。

### 【 参 考 文 献 】

- [ 1 ] Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*, 1999;19(4):2435-2444.
- [ 2 ] Nithianandarajah-Jones GN, Wilm B, Goldring CE, et al. ERK5: structure, regulation and function. *Cell Signal*, 2012;24(11):2187-2196.
- [ 3 ] Regan CP, Li W, Boucher DM, et al. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002;99(14):9248-9253.
- [ 4 ] Nishimoto S, Nishida E. MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *Embo Rep*, 2006;7(8):782-786.
- [ 5 ] Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 2004;22(4):233-241.
- [ 6 ] Islam SS, Mokhtari RB, Kumar S, et al. Spatio-temporal distribution of Smads and role of Smads/TGF-beta/BMP-4 in the regulation of mouse bladder organogenesis. *PLoS One*, 2013;8(4):61340.
- [ 7 ] Katagiri T, Tsukamoto S. The unique activity of bone morphogenetic proteins in bone: a critical role of the Smad signaling pathway. *Biol Chem*, 2013;394(6):703-714.
- [ 8 ] Girio A, Montero JC, Pandiella A, et al. Erk5 is activated and acts as a survival factor in mitosis. *Cell Signal*, 2007;19(9):1964-1972.
- [ 9 ] Kim SM, Lee H, Park YS, et al. ERK5 regulates invasiveness of osteosarcoma by inducing MMP-9. *J Orthop Res*, 2012;30(7):1040-1044.
- [ 10 ] Kato Y, Tapping RI, Huang S, et al. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature*, 1998;395(6703):713-716.
- [ 11 ] Ramsay AK, McCracken SRC, Soofi M, et al. ERK5 signalling in prostate cancer promotes an invasive phenotype. *Brit J Cancer*, 2011;104(4):664-672.
- [ 12 ] Cheng Qun, Zhu Hanmin, Gan Jiemin, et al. Study of ERK5 regulating osteoblast function. *Chin J Osteoporos*, 2008;14(12):845-848.

(收稿日期: 2014-04-03)

# siRNA 沉默 ERK5基因对 MC3 T3-E1成骨细胞增殖及 BMP2 / BMP7的影响

作者: [滕元君](#), [陈少龙](#), [赵良功](#), [姜金](#), [崔兆辉](#), [夏亚一](#), [汪静](#), [王翠芳](#), [安丽萍](#), [马靖琳](#), [TENG Yuanjun](#), [CHEN Shaolong](#), [ZHAO Lianggong](#), [JIANG Jin](#), [CUI Zhaohui](#), [XIA Yayi](#), [WANG Jing](#), [WANG Cuifang](#), [AN Liping](#), [MA Jinglin](#)

作者单位: [兰州大学第二医院骨科](#), [甘肃省骨与关节重点实验室](#), [甘肃兰州730000](#)

刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 

英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年, 卷(期): 2014(9)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zggzsszz201409005.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201409005.aspx)