

兔骨髓间充质干细胞 Runx2 基因特异 siRNA 的设计和沉默作用

唐欢 李章华* 许海甲

武汉大学人民医院骨科, 武汉 430060

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 09-1089-04

摘要: 目的 探讨应用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 特异性抑制兔骨髓间充质干细胞内 Runx2 基因表达, 筛选高效特异性 siRNA。方法 根据 siRNA 设计原则, 针对 Runx2 基因序列特征设计 Runx2 特异 siRNA (1-3), 转染兔骨髓间充质干细胞, 用 QPCR 和 Western blot 方法检测 siRNA 对 Runx2 基因的抑制效果。结果 Runx2 siRNA-2 可有效抑制骨髓间充质干细胞中 Runx2 基因的表达。随 siRNA-2 终浓度由 50 nmol/L 增加到 100 nmol/L 及 200 nmol/L, 抑制效率逐渐增强 ($P < 0.05$); siRNA-2 以终浓度 200 nmol/L 转染后 48 h 抑制效果最强, 72 h 逐渐减弱, 但仍明显抑制 ($P < 0.05$)。结论 应用 RNA 干扰技术可抑制骨髓间充质干细胞中 Runx2 基因的表达, 其抑制作用具有明显的时间、浓度依赖性。

关键词: RNA 干扰; Runx2 基因; 骨髓间充质干细胞; 基因沉默效果

Design of Runx2 specific siRNA and its silencing effect on rabbit bone marrow mesenchymal stem cells

TANG Huan, LI Zhanghua, XU Haijia

Department of Orthopedics, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: LI Zhanghua, Email: lzh999999@aliyun.com

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of Runx2 specific small interfering RNA (siRNA) on Runx2 gene expression in rabbit bone marrow mesenchymal stem cells, and to screen the most efficient Runx2 specific siRNA. **Methods** According to the principle of siRNA design, Runx2 specific siRNA (1-3) was designed and the rabbit bone marrow mesenchymal stem cells were transfected. The expression level of Runx2 gene was detected using real-time quantitative PCR and Western blotting. **Results** Endogenous Runx2 expression was efficiently blocked in bone marrow mesenchymal stem cells by Runx2 siRNA-2 in a dose and time dependent manner. The expression of Runx2 decreased significantly along with the increase of the concentration of siRNA-2 from 50 nmol/L to 100 and 200 nmol/L. After 48h transfection with 200 nmol/L siRNA-2, the inhibitory effect was the strongest. It decreased after 72 hours, but the inhibition was still obvious ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of Runx2 in bone marrow mesenchymal stem cells can be efficiently blocked in a dose and time dependent manner by specific siRNA.

Key words: RNA interference; Runx2 gene; Bone marrow mesenchymal stem cells; Gene silencing efficacy

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 具有多向分化潜能, 可分化为成骨细胞、脂细胞、软骨细胞和肌原细胞等^[1], 因而可以作为组织工程中种子细胞的重要来源。MSCs 向成骨方向的定向诱导分化研究较多, 主要集中于化学药物和生长 (细胞) 因子作用。Runx2 又称核心结合因子 al (core-binding factor al, Cbfa1), 属于 runt 结构域基因家族成员之一。Runx2 作为成骨细胞特异

性转录因子, 具有明确的成骨细胞分化和成骨效应^[2,3], Runx2 超表达可以使非成骨细胞系和成骨前体细胞的骨钙素等成骨细胞标志基因表达上调, 而其对于间充质干细胞的作用如何尚未报道。RNA 干扰 (RNA interfering, RNAi) 是真核生物中普遍存在的抵抗病毒入侵、抑制转座子活动、调控基因表达的监控机制。尤其是可应用于哺乳动物研究的被称为短干扰或小干扰 RNA (siRNA) 的出现, 进一步拓宽了 RNAi 在基因功能、信号转导、基因治疗、抗肿瘤治疗、抗病毒治疗等方面的应用^[4,5]。siRNA 是

*通讯作者: 李章华, Email: lzh999999@aliyun.com

RNAi的起始诱导物,它引导RNA诱导沉默复合物与互补的mRNA分子结合,降解mRNA靶分子,抑制细胞内相应的靶mRNA编码蛋白质的合成。本研究设计针对Runx2基因的小干扰RNA(small interference RNA, siRNA),探讨该siRNA在兔骨髓间充质干细胞中能否产生基因沉默效应,为深入研究Runx2基因的生物学功能提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

LG-DMEM、HG-DMEM、胰酶均为Gibco公司产品;胎牛血清为Hyclone公司产品;Trizol试剂为Sigma公司产品;M-MLV反转录酶为Promega公司产品;dNTP为北京天根公司产品;实时荧光定量PCR试剂盒为北京康为公司产品;Lipofectamin™ 2000为Invitrogen公司产品;siRNA和无关序列RNA(Negative control)由上海吉玛公司合成;引物由上海生工公司合成;BCA蛋白定量试剂盒为北京碧云天公司产品;蛋白抽提试剂为Fermentas公司产品;抗兔Runx2一抗和羊抗兔二抗均为santa Cruz公司产品。

1.2 兔BMSCs原代培养

取成年新西兰兔,6月龄,雌雄不拘,无菌条件下在右胫骨上端髓腔内抽出骨髓,混入肝素抗凝,Percoll分离液梯度离心获取MSCs,按每孔 3×10^4 个细胞的密度接种于6孔培养板内,加入含100%胎牛血清、100 U/ml青、链霉素的LG-DMEM培养液,于37℃、5%CO₂、100%湿度条件下培养,于接种3 d后进行第1次换液,以后隔日换液一次。待85%汇合时行传代培养,流式细胞仪对扩增后的细胞纯度和表型进行鉴定。取第3~4代细胞进行转染实验。

1.3 按照美国Ambion公司(http://www.ambion.com/techib/misc/siRNA_finder.html)和现有文献报道的siRNA设计原则,通过检索NCBI Genebank,查找MSCs的Runx2基因(Gene ID:12393)序列进行设计。依据目的mRNA序列,设计3对Runx2 siRNA,由上海吉玛公司合成。siRNA-1:正义5'-CAG GCG UAU UUC AGA UGA UTT AdTdT-3',反义5'-AUC AUC UGA AAU ACG CCU GTT CdTdT-3'; siRNA-2:正义5'-GAA GCU UGA UGA CUC UAA ATT AdTdT-3',反义5'-UUU AGA GUC AUC AAG CUU CTT CdTdT-3'; siRNA-3:正义5'-CAC GCU AUU AAA UCC AAA UTT AdTdT-3',反义5'-

AUU UGG AUU UAA UAG CGU GTT CdTdT-3'。

1.4 实验分组

空白对照组1, BMSCs非特异干扰组2, siRNA-1干扰组3, siRNA-2干扰组4, siRNA-3干扰组5。

1.5 转染

将BMSCs均等接种于培养瓶,待细胞达70%饱和度时,更换无血清LG-DMEM用于基因转染。用无血清LG-DMEM分别稀释siRNA、Negative control和Lipofectamin™ 2000,各自混匀后室温孵育20 min,以形成siRNA-脂质体混合物,在无血清条件下分别以不同终浓度(50、100、200 nmol/L)转染细胞。转染后4 h添加10%的胎牛血清,继续培养,于不同时间点提取细胞总RNA和总蛋白检测目的基因和蛋白表达量的变化。每组实验重复3次。

1.6 荧光实时定量PCR(QPCR)检测Runx2 mRNA水平表达情况

细胞转染48 h后,收集细胞。 1×10^6 细胞加1 ml Trizol Reagent进行总RNA提取,紫外分光光度仪测定纯度A260/A280比值在1.80~1.90之间。分别取1 μg总RNA行逆转录后进行QPCR检测,按QPCR试剂盒说明进行。引物设计:按照NCBI GenBank的兔Runx2和GAPDH的mRNA序列,排除与兔其他基因的同源性后设计、合成引物。Runx2引物序列:上游5'-GAC TGT GGT TAC CGT CAT GGC-3',下游5'-ACT TGG TTT TTC ATA ACA GCG GA-3'; GAPDH引物序列:上游5'-CTG GGC TAC ACT GAG CAC C-3',下游5'-AAG TGG TCG TTG AGG GCA ATG -3'。QPCR反应体系为20 μl,包含:2 × UltraSYBR Mixture 10 μl,上下游引物各1 μl, cDNA 1 μl,加ddH₂O至总体积20 μl。反应条件:95℃预变性10 min, 95℃变性15 s, 60℃退火30 s, 60℃延伸30 s,反应40个循环,以GAPDH为内参照。

1.7 Western blot法检测Runx2蛋白表达情况

细胞转染48 h之后收集细胞,PBS洗涤2次,加入预冷的含蛋白酶抑制剂的蛋白质抽提试剂(1×10^6 细胞中加入80 μl抽提试剂);常温中冰浴30 min;高速4℃离心机离心15 min;吸取上清用BCA法测蛋白浓度;取上清加入蛋白缓冲液于100℃变性10 min;然后行SDS-PAGE电泳;80 V、80 min条件下转至PVDF膜;5%脱脂牛奶封闭1 h;抗体孵育(加入一级抗体及HRP标记的二级抗体);应用Thermo化学发光试剂盒进行显影,Western blot电泳条带用CLinx公司化学发光成像系统成像,以GAPDH为内参照,每组实验重复3次。

1.8 统计学处理

所有数据均用微软 Excel 软件进行分析,两样本间均数比较行独立样本 *t* 检验,多个样本间比较行单因素方差分析。

2 结果

2.1 BMSCs Runx2 基因 mRNA 表达情况

将 siRNA-1、2、3 分别转染兔骨髓间充质干细胞,以不做任何处理的兔骨髓间充质干细胞做空白对照,以转染无关序列 RNA 做阴性对照。转染后 48h 行 QPCR 检测结果显示,siRNA-2 以终浓度 100nmol/L 转染时与对照组相比有明显抑制效果($P < 0.05$), siRNA-1 抑制效果不明显,siRNA-3 无效果,见图 1。

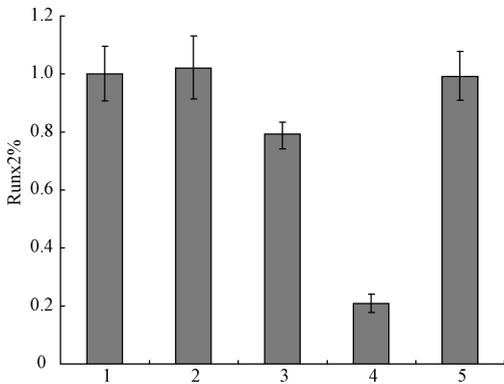


图 1 3 种 siRNA 对 Runx2 基因的不同抑制效果

Fig. 1 Different inhibitory effect of Runx2 siRNA 1-3 on Runx2 expression

1:blank; 2: NC 组; 3: 100 nmol/L siRNA-1; 4: 100 nmol/L siRNA-2; 5:100 nmol/L siRNA-3; * $P < 0.05$ vs blank; $n = 4$

2.2 BMSCs Runx2 基因蛋白表达情况

Western blot 法检测 Runx2 蛋白表达情况显示, siRNA-2 以终浓度 100nmol/L 转染时与对照组相比有明显抑制效果,siRNA-1 抑制效果不明显,siRNA-3 无效果,见图 2。

2.3 siRNA-2 抑制 BMSCs Runx2 基因表达的剂量关系

siRNA-2 分别以终浓度 50、100 及 200 nmol/L 转染 BMSCs,以不加 siRNA-2 的 BMSCs 做空白对照。QPCR 结果表明,siRNA-2 抑制 BMSCs Runx2 基因表达存在良好的剂量依赖性,随 siRNA-2 终浓度增加抑制效率增强,终浓度 100、200 nmol/L 时与对照组相比有明显抑制效果($P < 0.05$),见图 3。

2.4 siRNA 抑制 BMSCs Runx2 基因表达的时效关系

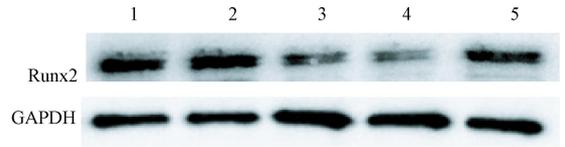


图 2 3 种 siRNA 对 Runx2 基因的不同抑制效果

Fig. 2 Different inhibitory effect of Runx2 siRNA 1-3 on Runx2 expression

1:blank; 2: NC 组; 3: 100 nmol/L siRNA-1; 4: 100 nmol/L siRNA-2; 5: 100 nmol/L siRNA-3 (Runx2 67KDa, GAPDH 36KDa)

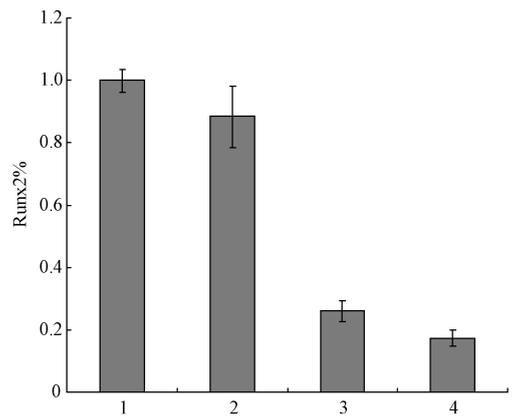


图 3 siRNA-2 转染抑制 Runx2 基因 mRNA 表达的剂量关系

Fig. 3 Transfection of Runx2 siRNA-2 inhibits the mRNA levels of Runx2 in a dose dependent manner

1:blank; 2: 50 nmol/L siRNA-2; 3: 100 nmol/L siRNA-2; 4: 200 nmol/L siRNA-2; * $P < 0.05$ vs blank; $n = 3$

根据 siRNA-2 对 Runx2 基因抑制量效关系的实验结果,200 nmol/L 终浓度 siRNA-2 转染 BMSCs 抑制效果最佳。为明确 siRNA-2 对 Runx2 基因抑制的时效动态变化,以 200 nmol/L 终浓度 siRNA-2 转染 BMSCs,以不加 siRNA-2 的 BMSCs 做空白对照,选取三个时间点,即 24 h、48 h、72 h 为提取细胞总 RNA 时间进行检测。QPCR 结果表明,siRNA-2 抑制 BMSCs Runx2 基因表达存在良好的时间依赖性,转染后 24 h 就已有轻度抑制效果,但无统计学差异;48 h 最强,同对照组相比有显著差异($P < 0.05$);72 h 逐渐减弱,但仍明显抑制($P < 0.05$),见图 4。

3 讨论

Runx2 是骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的特异性转录调节因子^[6]。有实验证明 Runx2 转染骨髓间充质干细胞后细胞增殖不受影响,而成骨细

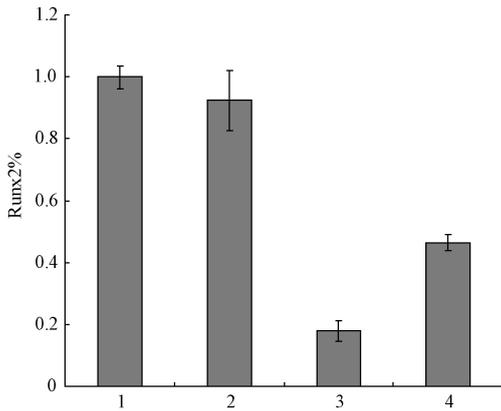


图4 siRNA-2 转染抑制 Runx2 基因 mRNA 表达的时效关系

Fig. 4 Transfection of Runx2 siRNA-2 inhibits the mRNA levels of Runx2 in a time dependent manner
1: blank; 2: 200 nmol/L siRNA-2 24 h; 3: 200 nmol/L siRNA-2 48 h;
4: 200 nmol/L; siRNA-2 72 h* $P < 0.05$ vs blank; $n = 3$

胞特异性基因如碱性磷酸酶、骨钙蛋白 (osteocalcin, OC)、骨桥素 (osteopontin, OPN) 等均上调, 提示 Runx2 对骨髓间充质干细胞具有明显的促成骨效应^[7]。Ducy 等^[8] 研究发现, Runx2 基因与成骨细胞特异顺式作用元件 (osteoblast specific cis-acting elements, OSE) 结合后, 能够激活骨钙蛋白、骨桥素、骨涎蛋白 (bone sialoprotein, BSP) 和 I 型胶原基因的转录和表达。体内外实验表明 Runx2 是 BMSCs 成骨分化和骨发育所必需的关键因子^[9,10]。Runx2 的表达是成骨细胞开始分化的标志, 诱导 MSCs 发育为成骨细胞或软骨细胞, 因此它是骨形成过程中最早和最具特异性的标志基因^[11]。Runx2 对于骨代谢的调控作用专一性很强, 通过多种重要的信号通路和细胞因子来调节骨代谢, 其对成骨细胞定向分化的调控已广为人们认识和接受。但其分子作用机制相当复杂, 目前尚未彻底清楚, 需行 siRNA 干扰 Runx2 基因后, 观察 MSCs 在体内、外的凋亡、存活、增殖、分化和迁移能力, 以明确 Runx2 促进 MSCs 成骨分化的作用机制, 为应用 MSCs 治疗骨科疾病提供新思路 and 理论依据。

RNAi 为双链 RNA (dsRNA) 依赖的基因转录后沉默。dsRNA 被核酸酶切割成 21 ~ 23 nt 的 siRNA, 导致 RNA 诱导的沉默复合体形成, 后者在 siRNA 反义链的介导下识别并靶向切割同源性 mRNA 而发生转录后沉默^[12]。作为一种全新的基因沉默技术, RNAi 具有高特异性、高效性、传递性以及时间剂量

依赖性等特点, 可同时抑制多个不同基因, 且抑制效果互不干扰, 其优势是反义寡核苷酸、核酶或脱氧核酶等基因阻断技术难以比拟的, 为人类基因组功能研究、基因治疗及药物开发等提供了强有力的技术支持^[12-13]。RNAi 的研究发展迅速, 已从细胞水平研究向动物机体水平深入, 从实验室研究向临床试验方向转化, 目前已有多项 RNAi 产品进入临床试验。我们设计并筛选出特异抑制 BMSCs 内 Runx2 基因的 siRNA-2, 并初步明确其作用的时间、剂量依赖性, 为进一步研究 TGF- β 信号转导通路中 Runx2 基因在骨科疾病发生中的作用奠定基础。

【参 考 文 献】

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284 (5411): 143-7.
- [2] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 1997, 89 (5): 747-54.
- [3] Ducy P, Starbuck M, Priemel M, et al. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev*, 1999, 13 (8): 1025-36.
- [4] Guo S, Kempthues KJ. Par 1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 1995, 81 (4): 611-620.
- [5] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391 (6669): 806-811.
- [6] 徐道志, 詹红生, 赵咏芳. 成骨细胞分化与骨骼发育的转录因子 Cbfa1/Runx2. *中医正骨*, 2006, 18: 61-63.
Xu Daozhi, Zhan Hongsheng, Zhao Yongfang. Osteoblasts differentiation and cbfa1 in skeleton formation and growth. *The Journal of Traditional. Chinese Orthopedics and Traumatology*, 2006, 18: 61-63.
- [7] 董世武, 应大君, 段小军, 等. 核心结合因子 $\alpha 1$ 对骨髓间充质干细胞成骨细胞标志基因表达的影响. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19: 746-750.
Dong Shiwu, Ying Dajun, Duan Xiaojun, et al. Effect of core-binding factor $\alpha 1$ on the expression of osteoblast gene marker mesenchymal stem cells. *Chinese J Reparative and Reconstructive Surgery*, 2005, 19: 746-750.
- [8] Ducy P, Starbuck M, Priemel M, et al. A Cbfa1 dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development [J]. *Genes Dev*, 1999, 3: 1025-1036.
- [9] Okazaki K, Sandell LJ. Extracellular matrix gene regulation. *Clin Orthop*, 2004, 427 (Suppl): 123S-128S.
- [10] Saito T, Ogawa M, Hata Y, et al. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein - 2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *J Endod*, 2004, 30: 205-208.
- [11] Xiang Z, Aubin JE, Inman RD. Molecular and cellular biology of new bone formation: insights into the ankylosis of ankylosing spondylitis. *Curt Opin Rheumatol*, 2003, 15: 387-393.
- [12] Hannon GJ. RNA interference. *Nature*, 2002, 418 (6894): 244
- [13] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, 296 (5567): 550.

(收稿日期: 2014-02-14)

兔骨髓间充质干细胞 Runx2基因特异 siRNA 的设计和沉默作用



作者: [唐欢](#), [李章华](#), [许海甲](#), [TANG Huan](#), [LI Zhanghua](#), [XU Haijia](#)
作者单位: [武汉大学人民医院骨科, 武汉, 430060](#)
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_zggzsszz201409013.aspx