

· 论 著 ·

小鼠骨髓间充质干细胞 Osterix 基因特异 siRNA 的设计和沉默作用

杨俊峰* 薛小二 张剑 黄振明

武汉市第九医院骨科, 武汉 430081

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015)12-1469-04

摘要: **目的** 探讨应用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 特异性抑制骨髓间充质干细胞内 Osterix 基因表达, 筛选高效特异性 siRNA。 **方法** 根据 siRNA 设计原则, 针对 Osterix 基因序列特征设计 Osterix 特异 siRNA (1-3), 转染骨髓间充质干细胞, 用 QPCR 和 Western blot 方法检测 siRNA 对 Osterix 基因的抑制效果。 **结果** Osterix siRNA-2 可有效抑制骨髓间充质干细胞中 Osterix 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 Osterix 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; Osterix 基因; 小鼠骨髓间充质干细胞; 基因沉默

Design and silencing of Osterix specific siRNA in mouse bone marrow mesenchymal stem cells

YANG Junfeng*, XUE Xiaoe, ZHANG Jian, HUANG Zhenming

Department of Orthopedics, the Ninth Wuhan Hospital, Hubei Province, Wuhan 430081, China

Corresponding author: YANG Junfeng, Email: thayy77777@sina.com

Abstract; Objective To study the inhibition effect of Osterix specific small interfering RNA (siRNA) on Osterix gene expression in bone marrow mesenchymal stem cells, and to screen the most efficient Osterix specific siRNA. **Methods** According to the principle of siRNA design, Osterix specific siRNA (1-3) was designed and the bone marrow mesenchymal stem cells were transfected. The expression of Osterix gene was detected using real-time quantitative PCR and Western blotting. **Results** Endogenous Osterix expression was efficiently blocked in bone marrow mesenchymal stem cells by Osterix siRNA-2 in a dose- and time-dependent manner. Osterix expression decreased significantly along with the increase of siRNA-2 dose within 50 – 200 nmol/L and it was the lowest at 48h after transfection with 200nmol/L of siRNA-2 ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of Osterix in bone marrow mesenchymal stem cells can be blocked efficiently in a dose and time dependent manner by specific siRNA.

Key words: RNA interference; Osterix gene; Mouse bone marrow mesenchymal stem cells; Gene silencing

骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞、脂细胞、软骨细胞和肌原细胞等^[1], 优良的分化潜能使其可以作为组织工程研究中种子细胞的来源。Osterix 基因是 2002 年科研人员在 C2C12 细胞中通过消减抑制杂交的方法分离出来的^[2]。蛋白质分子量为 46Ku, 由 428 个氨基酸组成^[3]。研究发现在 Osterix^{-/-}的小鼠中缺乏成骨细胞, 没有软骨内成骨和膜内成骨。同时成骨细胞分化的各种标志物的表达水平也严重下降, 或者缺乏, 如 I 型胶原蛋白、骨桥蛋白、骨涎蛋白、骨钙蛋白等^[3]。有人在胚胎干细胞中过表达

Osterix, 骨钙蛋白和 Osterix 的表达量上调, 骨细胞钙结节明显增加, 而其对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 (small interference 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 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

*通讯作者: 杨俊峰, Email: thayy77777@sina.com

计针对 Osterix 基因的 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 Osterix 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

细胞培养基均为 Gibco 公司产品;FBS 为 Hyclone 公司产品;Trizol 试剂为 T 天根公司产品;RNA 反转试剂为 Promega 公司产品;实时荧光定量 PCR 试剂盒为 Promega 公司产品;Lipofectamin™ 2000 为 Invitrogen 公司产品;siRNA 和无关序列 RNA 由上海吉玛公司合成;引物来自上海生工公司;BCA 蛋白定量试剂盒和蛋白抽提试剂为 Fermentas 公司产品;抗体均为 santa Cruz 公司产品。

1.2 小鼠 BMSCs 原代培养

取未成年小鼠,超净工作台上取出长骨,使用注射器抽出骨髓,加入离心管内混入肝素抗凝,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 双抗(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 引物序列

按照现有文献报道的 siRNA 设计原则,通过检索 NCBI Genbank,查找 MSCs 的 Osterix 基因序列进行设计。依据目的 mRNA 序列,设计 3 对 Osterix siRNA,由上海吉玛公司合成。siRNA-1:正义 5'-UAU CAG GCG AGA UUC UGA UTT AdTdT-3',反义 5'-AUC UGA AUC ACG AAU CCU GTT CdTdT-3';siRNA-2:正义 5'-GCU GAA UGA CUC UGA UAA ATT AdTdT-3',反义 5'-AGA UUU GUC AAG AUC CUU CTT CdTdT-3';siRNA-3:正义 5'-GCU CAC AUU UCC AAA AAA UTT AdTdT-3',反义 5'-UGG AUU AUU UAG UAA CGU GTT CdTdT-3'。

1.4 实验分组

分为 5 组:空白组 1, MSCs NC 组 2,使用 siRNA-1 干扰组 3,使用 siRNA-2 干扰组 4,使用 siRNA-3 干扰组 5。

1.5 转染

转染前 24 h 将 MSCs 接种于 6 孔培养板,待细胞长至 70% 饱和度时开始进行转染,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 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L)转染细胞。转染后 6 h 添加 FBS 至其浓度达到 10%,继续培养,于不同时间点检测目的基因和蛋白表达的达量。实验重复检测 3 次。

1.6 荧光实时定量 PCR 检测 Osterix 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 ug 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 Osterix 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。Osterix 引物序列:上游 5'-TCC CTG GAT ATG ACT CAT CCC T-3',下游 5'-CCA AGG ACT AGG TGT GTT GCC-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 ul,包含:2 × UltraSYBR Mixture 10 ul,上下游引物各 1 ul,cDNA 1 ul,加 ddH₂O 至总体积 20 ul。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 Osterix 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 ul 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;80V、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 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 MSCs Osterix 基因 mRNA 表达情况

将 siRNA-1、2、3 分别转染 MSCs,以不做任何处理的 MSCs 做空白对照,以转染 NC RNA 做阴性对照。转染后 48 h 行 QPCR 检测结果显示,siRNA-2 以终浓度 100 nmol/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 效果较明显,见图 1。

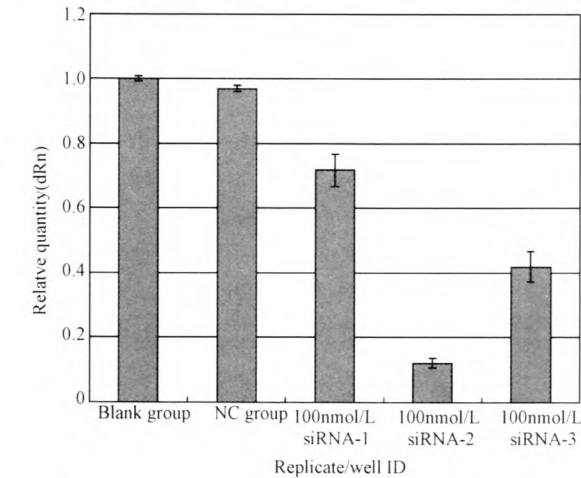


图 1 3 种 siRNA 对 Osterix 基因的不同抑制效果

Fig.1 Different inhibition effect of Osterix siRNA1-3 on Osterix expression

2.2 MSCs Osterix 基因蛋白表达情况

Western blot 法检测 Osterix 蛋白表达情况显示, siRNA-2 以终浓度 100 nmol/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 效果尚可,见图 2。

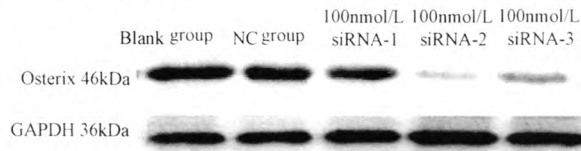


图 2 Western blot 法检测 Osterix 蛋白表达情况

Fig.2 Expression of Osterix protein was detected by blot Western method

2.3 siRNA-2 抑制 MSCs Osterix 基因表达的量效关系

siRNA-2 分别以终浓度 50 nmol/L、100 nmol/L 及 200 nmol/L 转染 MSCs,以不加 siRNA-2 的 MSCs 做空白对照。QPCR 结果表明, siRNA-2 抑制 MSCs Osterix 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 nmol/L、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 MSCs Osterix 基因表达的时效关系

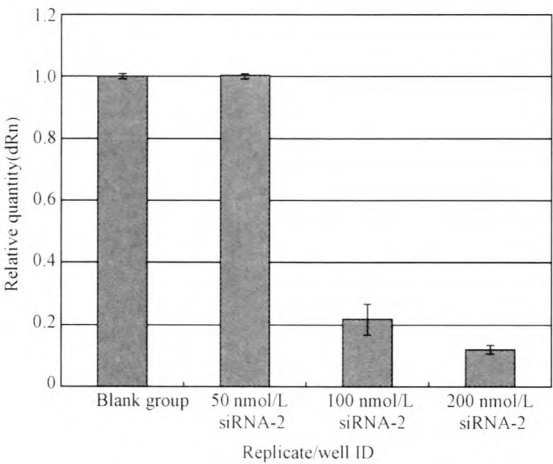


图 3 siRNA-2 转染抑制基因 Osterix mRNA

表达的时效关系

Fig.3 The dose-dependent inhibition of Osterix mRNA by Osterix siRNA-2 transfection

根据 siRNA-2 对 Osterix 基因抑制量效关系的实验结果,200 nmol/L 终浓度 siRNA-2 转染 MSCs 抑制效果最佳。为明确 siRNA-2 对 Osterix 基因抑制的时效动态变化,以 200 nmol/L 终浓度 siRNA-2 转染 MSCs,以不加 siRNA-2 的 MSCs 做空白对照,选取 3 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 MSCs Osterix 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。

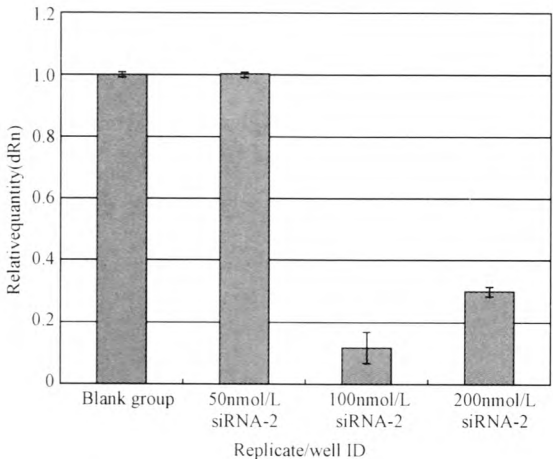


图 4 siRNA-2 转染抑制 Osterix 基因

mRNA 表达的时效关系

Fig.4 The time-dependent of Osterix mRNA by Osterix siRNA-2 transfection

3 讨论

Osterix 基因是成骨细胞分化和骨形成过程中所必需的关键因子^[6],其缺失会直接导致骨形成能力的完全丧失。有实验证明,在 Osterix 基因敲除小鼠中,成骨细胞的发育完全被抑制,但是破骨细胞分化、血管入侵、软骨细胞的分化和软骨的形成均正常。另有研究表明 Osterix^{-/-}细胞具有软骨细胞特有的圆形特征,且表达软骨细胞的标志物。因此, Osterix 可能是软骨细胞的一种负向调控因子,在骨形成过程中阻止具有双向分化潜能的骨/软骨祖细胞选择性的向软骨分化^[7]。研究发现,在 Osterix 基因敲除小鼠胚胎中,各种成骨细胞分化的标志物(I 型胶原、骨钙素、骨桥素、骨涎蛋白等)的表达水平严重降低或者缺乏。其中骨钙素^[8]作为一种高度特异性的晚期成骨细胞标志物,在 Osterix 基因敲除小鼠胚胎的软骨内和膜性骨骼成分中却未见表达,由此可见成骨细胞的分化被完全阻断。而正是由于成骨细胞的分化、成熟受到抑制从而导致了骨形成的缺失。Osterix 基因对 MSCs 的分子作用机制相当复杂,目前尚未彻底清楚,需行 siRNA 干扰后,观察 MSCs 在体内外的凋亡、存活、增殖、分化能力,以明确 Osterix 基因促进 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^[9]。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^[9-10]。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。笔者设计并筛选出特异抑制 MSCs 内 Osterix 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 Osterix 基因在骨科疾病发生中的作用建立一定的基础。

【参 考 文 献】

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- [2] Kazuhisa Nakashima, Zhou X, Gary Kunkel, et al. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell*, 2002, 108(1): 17-29.
- [3] Sun Q, Qiu Y. Transcription factor Runx2, Osterix and osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cell differentiation. *Jiangsu Med J*, 2006, 32(7): 657-659.
- [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] Ohya Y, Nifui A, Maeda Y, et al. Spatiotemporal association and bone morphogenetic protein regulation of sclerostin and osterix expression during embryonic osteogenesis. *Endocrinology*, 2004, 10(145): 4685-4692.
- [7] Karaentz G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev*, 1999, 13(23): 3037-3051.
- [8] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 2002, 108(1): 17-29.
- [9] Hannon GJ. RNA interference. *Nature*, 2002, 418(6894): 244.
- [10] 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: 2015-04-21)