

· 论 著 ·

siRNA 下调 THBS4 对人骨肉瘤 MG63 增殖的影响

谢冰颖 李生强 谢丽华 陈娟 葛继荣*

福建省中医药研究院基础医学研究所 骨质疏松证候基因组学研究室,福建 福州 350003

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018) 09-1171-05

摘要: 目的 探讨小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 抑制血小板反应蛋白 4 (thrombospondin 4, THBS4) 基因的表达对骨肉瘤 MG-63 细胞增殖的影响及其分子机制。方法 将合成的 THBS4 siRNA 转染到人成骨细胞株 MG63, CCK-8 法观察对细胞增殖的影响, 荧光定量 PCR 检测 THBS4 及 TGF- β 1 的 mRNA 表达, Western-blotting 检测 THBS4 及 TGF- β 1 的蛋白表达。结果 Thbs4 siRNA 转染后实验组 48 h, 72 h OD 值高于阴性对照组 ($P < 0.05$), 差异具有显著性; Thbs4 mRNA 和蛋白的表达水平明显低于阴性对照组和空白对照组 ($P < 0.01$); Thbs4 siRNA 转染后 MG63 细胞中 TGF- β 1 mRNA 及蛋白的表达水平提高 ($P < 0.01$)。结论 THBS4 siRNA 转染 MG63 后能够促进细胞增殖, 其机制可能是激活 TGF- β 1 信号通路。

关键词: siRNA; 血小板反应蛋白 4; 骨肉瘤细胞株 MG63

The effect of knock-down of THBS4 by siRNA on the proliferation of human osteosarcoma cell line MG63

XIE Bingying, LI Shengqiang, XIE Lihua, CHEN Juan, GE Jirong*

Key Research Laboratory of Osteoporosis Syndrome Genomics, Institute of Basic Medical Science, Fujian Academy of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China

* Corresponding author; GE Jirong, Email: gjrrjgcy@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect of thrombospondin 4 (THBS4) gene silencing by small interfering RNA (siRNA) on the proliferation of MG63 and to explore its molecular mechanism. **Methods** After THBS4 siRNA was transfected into MG63 cells, the proliferation was detected with CCK-8 method. The mRNA expression THBS4 and TGF- β 1 was measured using real-time fluorescence quantitative-PCR. The protein levels of THBS4 and TGF- β 1 were detected with Western blotting. **Results** The optical density in experimental group at 48 h and 72 h was significantly higher than that in the negative control group ($P < 0.05$). The expression levels of THBS4 mRNA and protein in MG63 cells after transfection with THBS4 siRNA were lower than those in the negative control cells and the blank control cells ($P < 0.01$). The expression levels of TGF- β 1 mRNA and protein in MG63 cells after transfection were up regulated. **Conclusion** THBS4 siRNA transfection promotes MG63 proliferation through the activation of TGF- β 1 signaling pathway.

Key words: siRNA; thrombospondin 4; MG63 cell line

血小板反应蛋白 (Thrombospondin) 是内质网产生的一类机体在受损、重建或重修饰的组织细胞中产生的蛋白, 它能调控其他蛋白的表达, 帮助纠正或清除错误折叠、无功能意义的蛋白。课题组前期的人骨组织芯片检测中, 我们发现骨质疏松症患者股骨血小板反应蛋白 4 (Thrombospondin 4, THBS4) 表

达出现降低^[1], 已有报道 THBS4 在心脏功能^[2,3]、血管新生^[4]、肿瘤^[5]中起着重要作用, 但其在成骨过程中的作用需要进一步研究。本研究采用 siRNA 敲低 MG63 细胞中 THBS4 的表达, 观察其对 MG63 细胞株成骨功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人骨肉瘤细胞株 MG63 购自武汉大学细胞库。DMEM 培养基购自美国 Thermo, 胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司。二甲基亚砜 (DMSO) 购自

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2016J01376); 福建省科技厅省属公益类科研院所基本科研专项 (2015R1038-5); 福建省中医药科研项目 (wzgs201304)

* 通信作者: 葛继荣, Email: gjrrjgcy@163.com

美国 Sigma 公司。鼠抗人 Thbs4、兔抗 β -actin 以及兔抗 TGF- β 1 购自美国 Thermol。Primer Script Rtreagent kit, Real time PCR kit 购自宝生物工程(大连)公司, THBS4-siRNA 及阴性对照, 转染试剂均购自广州市锐博生物科技有限公司。ECL 试剂购自 Thermol。多功能酶标仪(美国赛默飞 Thermol), 实时荧光定量 PCR 仪 ABI 7500fast(美国 ABI 公司), 多功能成像工作站 FluorChem M(美国 Proteinsimple 公司)。

1.2 细胞培养

MG63 培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置于 5% CO₂、37 °C 中传代培养, 并取对数生长期的细胞用于细胞转染实验。

1.3 siRNA 瞬时转染

转染前 24 h 将细胞以每孔 0.8×10^5 的密度接种于 24 孔板中进行培养, 待细胞处于对于生长期并且融合度达 60% 时进行转染。分为实验组, 阴性对照组和空白组。前两组分别转染特异性 Thbs4 siRNA 和阴性对照 siRNA, 空白对照组细胞不做任何处理。转染方法参照厂家说明书进行。实验重复 3 次。转染后 48 h 收集细胞用于定量 PCR 实验, 72

h 收集细胞用于蛋白质印迹实验。

1.4 CCK-8 增殖实验

在 24 孔培养板中进行细胞转染, 在细胞转染后 24、48、72、96 h, 每孔分别加入 2 μ L CCK-8, 放回 CO₂ 细胞培养箱中继续孵育 1 h, 于多功能酶标仪上检测 450 nm 吸光度。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达水平

采用 Trizol 方法抽提总 RNA 后, 逆转录过程按照 SYBR Prime Script™ RT-PCR Kit II 试剂盒说明操作。以 GAPDH 为内参, 并设 3 个重复管, 进行实时荧光定量 PCR 检测。PCR 反应体系的反应步骤: 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环, 并增加熔解曲线程序, 以观察 PCR 产物是否单一。各基因引物序列, 产物大小见表 1。各样品的目的基因和管家基因分别进行定量 PCR 反应。mRNA 相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示, $\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{GAPDH})$; 以对照组作为基线, 采用以下公式计算目的基因 mRNA 表达差异倍数 (folds change) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{GAPDH})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{GAPDH})_{对照组}$ 。

表 1 定量 PCR 实验引物序列

Table 1 Sequences of primers for Real-time PCR

Gene	Primers	Product length (bp)
GAPDH	上游引物: GGAAAGCTGTGGCGTGAT	308
	下游引物: AAGGTGGAAGAATGGGAGTT	
THBS4	上游引物: TGATGTCAGCAACCCTAACCA	296
	下游引物: ACTCACAGATGTCTCCCACTCC	
TGF- β 1	上游引物: TTGCTTCAGCTCCACGGAGA	183
	下游引物: TGGTTGTACAGGGCCAGGAC	

1.6 蛋白表达水平检测

转染 72 h 后, 胰蛋白酶消化 MG63 细胞, 收集细胞, 置冰上采用细胞裂解液进行细胞裂解、提取总蛋白, 以 BCA 法进行蛋白定量。上样 30 μ g/孔, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 100 V 湿转 60 min, 含 5% 脱脂奶粉的 TBST 液封闭 2h, 鼠抗 THBS4 (1: 400)、兔抗 TGF- β 1 (1: 500)、兔抗 β -actin (1: 1000) 4 °C 孵育过夜。第二天, TBST 洗涤 10 min $\times$ 3 次后, 羊抗兔二抗 (1: 1000) 室温孵育 2 h, 洗涤后 Thermol ECL 显色, 置入多功能成像工作站进行曝光记录。

1.7 统计学方法

GraphPad InStat 统计软件处理数据, 计量资料采用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用 One-Way ANOVA 方差分析, 多重比较用 Turkey-Kramer

检验。P < 0.05 被认为检验的差别具有统计学意义。

2 结果

2.1 MG63 的鉴定

在相差显微镜下, 人骨肉瘤细胞贴壁生长, 细胞呈梭形。细胞转染后, 由于转染试剂的毒性, 有少量细胞死亡, 大部分 MG63 仍呈梭形, 见图 1。

2.2 THBS4 siRNA 转染后对细胞增殖的影响

在转染后不同时间点, 采用 CCK-8 检测 3 组吸光度值 (optical density, OD), 结果表明转染后 48 h, 72 h, 实验组 OD 值高于阴性对照组 (P < 0.05), 差异具有显著性。表明 siRNA 转染后能促进骨肉瘤 MG63 增殖, 见图 2。

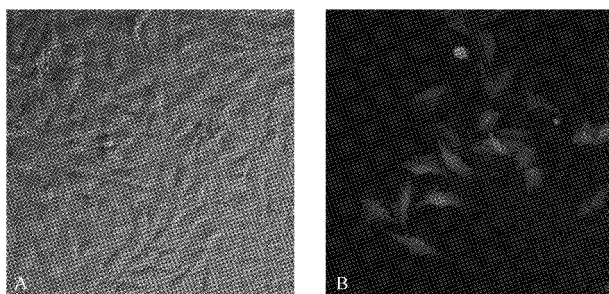


图 1 MG63 鉴定及转染图谱 (200 ×)

图 1 A MG63; 图 1 B MG63 转染后图谱

Fig. 1 Identification and transfection map of MG63 (200 ×)

A MG63; B Transfection map of MG63

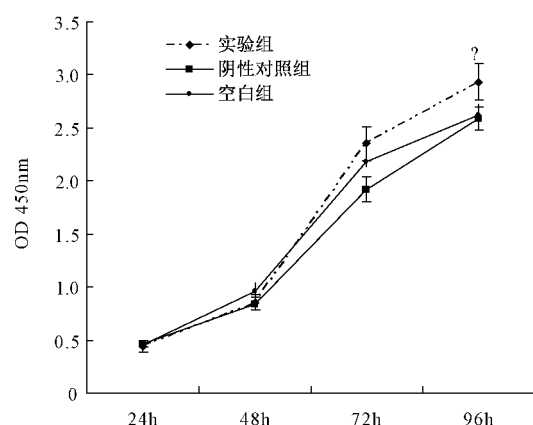


图 2 CCK-8 检测不同阶段对 MG63 细胞增殖的影响

与阴性对照组相比, * $P < 0.05$

Fig. 2 The proliferation of MG63 cells at different stages detected with CCK-8

Compared with negative control group, * $P < 0.05$

2.3 THBS4 siRNA 对 mRNA 表达影响

Real-time PCR 检测结果显示, siRNA 转染后, 与阴性对照组相比, 实验组 THBS4 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。阴性对照组与空白组比较差异无统计学意义。转染后, 实验组 TGF-beta1 mRNA 表达水平显著提高 ($P < 0.01$), 见图 3。

2.4 蛋白质印迹法检测 THBS4 siRNA 转染后蛋白表达

结果显示, siRNA 转染后, 与阴性对照组相比, 实验组 THBS4 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。阴性对照组与空白对照组比较差异无统计学意义。转染后, 实验组 TGF-beta1 蛋白表达水平显著提高 ($P < 0.01$), 比阴性对照组提高 1.7 倍。

3 讨论

血小板反应蛋白家族 (Thrombospondins family,

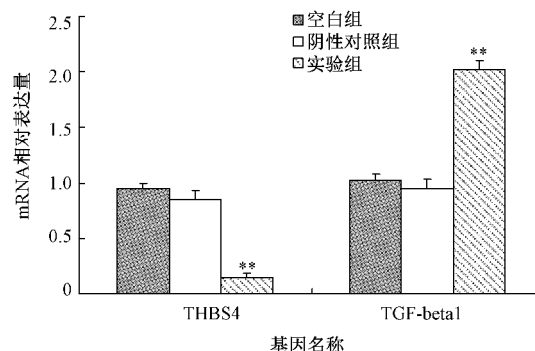


图 3 THBS4 siRNA 对 MG63 细胞 mRNA 表达影响
与阴性对照组相比, ** $P < 0.01$

Fig. 3 Effect of THBS4 siRNA on the expression of mRNA in MG63 cells

Compared with negative control group, ** $P < 0.01$

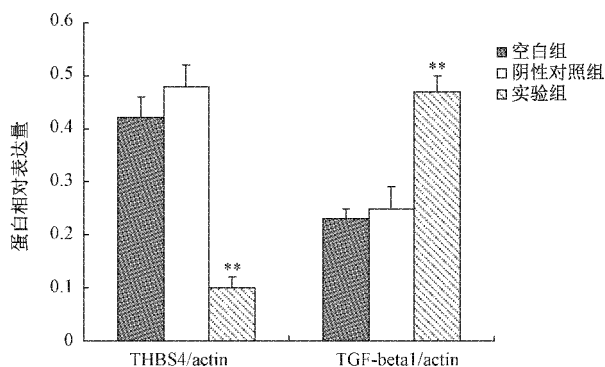
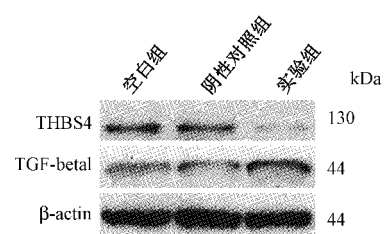


图 4 THBS4 siRNA 对 MG63 细胞蛋白表达影响

与阴性对照组相比, ** $P < 0.01$

Fig. 4 Effect of THBS4 siRNA on the expression of proteins in MG63 cell

Compared with negative control group, ** $P < 0.01$

THBS) 是一组进化保守的, 可以短暂的或长期的与细胞外其他间质发生作用, 需要钙结合的细胞外间质蛋白, 参与众多生物过程, 发挥包括细胞间桥接, 细胞与基质的相互作用^[2]。日前发现的一共有 5 个成员, 分别是 THBS1、THBS2、THBS3、THBS4 和 THBS5^[6]。

THBS4 是一种分泌型蛋白, 最早由 Lawler J^[7] 于 1993 年发现。THBS4 有明显的组织表达差异性, 在心脏、骨骼肌及肌腱^[8] 中大量表达。它能与

胶原和非胶原结合,可以调控细胞迁移、细胞增殖、连接、粘附、血管生成、神经发育、组织架构、器官发育,在疼痛信号传导和肿瘤^[9-11]的发生发展中起到重要作用。近年来,THBS4 在肿瘤中的研究越来越多,它在胃癌^[12,13]、前列腺癌中^[14]高表达,具有识别肿瘤生物学特性的潜能并可能用于临床肿瘤早期诊断和预后判断。课题组前期的人骨组织芯片检测中,骨质疏松症患者股骨 THBS4 表达下调^[11]。在本研究中,THBS4 特异性 siRNA 可以显著降低 THBS4 的 mRNA 及蛋白表达,CCK-8 实验表明对细胞增殖具有促进作用。

转化生长因子 β (TGF- β) 是骨组织中重要的细胞因子^[15],广泛存在于正常组织及转化细胞中,以骨组织和血小板中的含量最为丰富,TGF- β 有 5 种异构体,即 TGF- β 1-5,其中最早发现和研究最充分的是 TGF- β 1。研究证实^[16],TGF- β 1 能促进成骨细胞增殖、分化,刺激细胞外基质合成,同时还能降低骨转换,促进骨与软骨的形成,加快破骨细胞的凋亡。TGF- β 对骨的生长发育及重建都有重要的调节功能,是参与调节骨重建最重要、最基本的细胞因子之一^[17]。Muppala S 等发现 THBS4 参与了 TGF- β 1 诱导的血管新生,说明 THBS4 能够参与 TGF- β 1 信号通路^[18]。本实验中,实验组采用 siRNA 敲低 THBS4 后,TGF- β 1 能显著提高,表明敲低 THBS4 后可以激活 TGF- β 1 信号通路。考虑到 TGF- β 对骨的生长发育的重要性,敲低 THBS4 可能提高 MG63 成骨能力。后期实验可检测成骨过程中的关键基因、蛋白的变化,证实对成骨的影响。

THBS4 作用机制比较复杂,也存在着对立的报道。在肿瘤的研究中,多种肿瘤研究数据显示 THBS4 过表达,至少在转录水平上存在差异。多数数据支持可能起到刺激肿瘤细胞增殖,有利于肿瘤细胞浸润和转移的作用,但也有数据显示可能发挥着抑癌基因的作用^[11]。在最近的报道中,Anke J^[19]等发现基因敲除小鼠 THBS4 并没有影响骨骼的生长,但会引起短暂的软骨厚度减少。这与本文的结果有些不一致。分析原因,可能是基因发挥生物学功能不但取决于细胞类型、细胞内环境,还受到激素的控制^[20]。THBS4 在骨组织中的功能,尤其在软骨发育中的作用还需要进一步研究。

【参 考 文 献】

[1] 李生强,冯尔有,张怡元,等. 原发性骨质疏松症肾虚证骨组织基因表达谱研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19

(12):1215-1218.

- [2] Lynch JM, Maillet M, Vanhoutte D, et al. A thrombospondin-dependent pathway for a protective ER stress response [J]. Cell, 2012, 149(6):1257-68.
- [3] Topol EJ, McCarthy J, Gabriel S, et al. Single nucleotide polymorphisms in multiple novel thrombospondin genes may be associated with familial premature myocardial infarction [J]. Circulation, 2001, 104(22):2641-4.
- [4] Muppala S, Frolova E, Xiao R, et al. Proangiogenic properties of thrombospondin-4 [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015, 35(9):1975-86.
- [5] Su F, Zhao J, Qin S, et al. Over-expression of thrombospondin 4 correlates with loss of miR-142 and contributes to migration and vascular invasion of advanced hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(14):23277-23288.
- [6] Lawler J, Duquette M, Whittaker CA, et al. Identification and characterization of thrombospondin-4, a new member of the thrombospondin gene family [J]. J Cell Biol, 1993, 120(4):1059-67.
- [7] Stenina OI, Desai SY, Krukavets I, et al. Thrombospondin-4 and its variants: expression and differential effects on endothelial cells [J]. Circulation, 108(12):1514-1519.
- [8] Jelinsky SA, Archambault J, Li L, et al. Tendon-selective genes identified from rat and human musculoskeletal tissues [J]. J Orthop Res. 2010, 28(3):289-297.
- [9] Lin X, Hu D, Chen G, et al. Associations of THBS2 and THBS4 polymorphisms to gastric cancer in a Southeast Chinese population [J]. Cancer Genet, 2016, 209(5):215-222.
- [10] McCart Reed AE, Song S, Kutasovic JR, et al. Thrombospondin-4 expression is activated during the stromal response to invasive breast cancer [J]. Virchows Arch, 2013, 463(4):535-545.
- [11] Greco SA, Chia J, Inglis KJ, et al. Thrombospondin-4 is a putative tumour-suppressor gene in colorectal cancer that exhibits age-related methylation [J]. BMC Cancer, 2010, 10:494.
- [12] 严志,郑国荣,王艳,等. 血小板反应素蛋白家族在进展期胃癌中的异常表达及意义 [J]. 华南国防医学杂志 2013, 27(1):13-16,32.
- [13] 祁永清,李菊英,贺菊香,等. THBS4 基因在高原地区胃癌组织中表达的生物学行为及临床意义 [J]. 河北医药, 2014, 36(1):10-13.
- [14] 吴建辉. 血小板反应蛋白-4 在前列腺癌中的表达方式及生物学意义的研究 [D]. 天津医科大学, 2014.
- [15] 聂宇. 转化生长因子 β 与骨质疏松症关系的研究进展 [J]. 安徽医药, 2010, 14(12):1489-1490.
- [16] Faraji A, Abtahi S, Ghaderi A, et al. Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) in the sera of postmenopausal osteoporotic females [J]. Int J Endocrinol Metab. 2016, 14(4):e36511.
- [17] Taha IM, Abdu Allah AM, Hamoudah MAF, et al. Transforming growth factor- β 1 gene polymorphism and osteoporosis in postmenopausal egyptian women [J]. Cell Mol Biol, 2017, 63(11):53-57.

(下转第 1190 页)

- [5] 马淑月,张树峰,佟继铭,等. 大黄不同萃取物对大鼠子宫卵巢形态结构及血清中 P、T、E2 激素水平的影响[J]. 中药药理与临床,2017,33(3):91-94.
- [6] 郝娟,王春莲,王培嵩,等. 雷公藤多甙片致卵巢早衰大鼠动物模型的研究[J]. 中国妇幼保健,2012,27(12):1866-1870.
- [7] 薛志远,赵良功,师志强,等. 红芪和黄芪对去卵巢致大鼠骨质疏松防治作用的研究[J]. 现代中医研究与实践,2017,31(6):21-24.
- [8] 赵素霞,刘会丽,江红. 菟丝子黄酮通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路干预去卵巢大鼠骨代谢的机制研究[J]. 临床和实验医学杂志,2018,17(1):25-28.
- [9] 王东生,韩婧,康文博,等. 植物雌激素防治骨质疏松作用的机制进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2016,22(5):632-639.
- [10] 邹仲之,李继承. 组织学与胚胎学[M]. 北京:人民卫生出版,2008:44-47.
- [11] 朱刚,孙海斌,徐刚. 肉苁蓉醇提取物对去卵巢骨质疏松大鼠的治疗作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版),2018,44(1):68-72.
- [12] Zhao D, Wang J, Liu Y, et al. Expressions and clinical significance of serum bone Gla-protein, bone alkaline phosphatase and C-terminal telopeptide of type I collagen in bone metabolism of patients with osteoporosis [J]. Pak J Med Sci, 2015, 31(1): 91-94.
- [13] 刘红,廖二元,伍贤平,等. 正常女性与年龄相关的骨转换生化指标和骨密度的关系[J]. 中华内科杂志,2004,43(11):805.
- [14] Bettica P, Bevilacqua M, Vago T, et al. High prevalence of hypovitaminosis D among free living postmenopausal women referred to an osteoporosis outpatient clinic in northern Italy for initial screening. Osteoporos Int, 1999, 9(3):226-229.
- [15] 李玲玲,刘蔚霞. 补肾疏肝方对卵巢早衰患者骨代谢及免疫功能的影响[J]. 新中医,2017,49(9):81-85.
- [16] 唐姬辉,刘学武,刘锐,等. 强骨生血口服液对去卵巢致骨质疏松大鼠的治疗作用及其机制[J]. 中草药,2017,48(23):4935-4910.

(收稿日期:2018-04-02;修回日期:2018-05-30)

(上接第 1174 页)

- [18] Muppala S, Xiao R, Krukovets I, et al. Thrombospondin-4 mediates TGF- β induced angiogenesis[J]. Oncogene, 2017, 36(36):5189-5198.
- [19] Jeschke A, Bonitz M, Simon M, et al. Deficiency of Thrombospondin-4 in mice does Not affect skeletal growth or bone mass acquisition, but causes a transient reduction of articular cartilage thickness[J]. PLoS One, 2015, 10(12):e0144272.
- [20] 李传洁,王俊成,刘娜,等. 雌激素缺乏对大鼠成骨细胞细胞形态及增殖的影响[J]. 中华老年口腔医学杂志,2015,13(3):132-137.

(收稿日期:2018-03-12;修回日期:2018-06-25)