

shRNA 沉默 RAGE 基因对骨性关节炎 SD 大鼠软骨细胞外基质代谢的影响

福建省福州市第二医院骨科（福州 350007） 张 驰 周燕芸 翁 艳¹ 陈冬冬

【摘 要】 目的 研究 RAGE 基因在骨性关节炎形成中的作用，探讨其对骨性关节炎 SD 大鼠软骨细胞外基质代谢的影响。**方法** 通过构建 RAGE 基因的 shRNA 表达载体，沉默 RAGE 基因在骨性关节炎 SD 大鼠软骨细胞的表达，采用 Western blot 分别检测空白对照组、空载组、shRNA 沉默组中 RAGE、p-p38 MAPK、MMP-13、ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 的蛋白水平。**结果** 与空白对照组和空载组（Rc）相比，R1、R2、R3、R4 的 RAGE、p-p38MAPK、MMP-13、ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 蛋白表达水平显著下降（ $P<0.05$ ）；RAGE、p-p38MAPK 和 MMP-13 的蛋白水平在空白对照组和空载组（Rc）间差异无统计学意义；RAGE、ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 的蛋白水平在空白对照组和空载组（Rc）间差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）**结论** shRNA 沉默 RAGE 基因表达对骨性关节炎 SD 大鼠软骨细胞外基质代谢有明显的抑制作用。

【关键词】 shRNA；RAGE；SD 大鼠软骨细胞；骨关节炎

【中图分类号】 R34 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2018)06-0131-04

基金项目：福州市卫生计生科技计划项目（2017-S-wq21）；福州市 2015 年市级临床重点专科建设项目

¹ 通信作者，Email: wengyan_fj@126.com

骨关节炎 (OA) 是临床上最常见的一种慢性关节病变性疾病, 其发病率仍在逐步升高, 其中以膝骨性关节炎 (KOA) 发病率最高。由于 OA 的发病机制不是很明确, 因此虽然在临床上存在众多治疗 OA 的方法, 但仍缺乏针对性的特效药物及方法。Rosenzweig 等^[1]发现晚期糖基化终末产物 (AGEs) 及其受体 (RAGE) 能直接或经由不同的细胞内信号转导通路参与包括类风湿关节炎、糖尿病肾病、骨质疏松等多种相关疾病的发生、发展。Neeper 等^[2]首次从牛肺中克隆获得与人和牛的序列同源性达 90% 的 RAGE cDNA。研究表明, RAGE 与其配体的结合在神经系统的发育中以及糖尿病并发的肾病发病中作用显著, 但 RAGE 在 OA 发生、发展中的作用机制尚不清楚, 有研究认为这可能与 AGEs/RAGE 触发活化促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 的信号转导通路有关^[3]。

本研究通过构建 RAGE 基因的 shRNA 表达载体并转染到骨性关节炎 SD 大鼠软骨细胞中, 观察软骨细胞 RAGE 蛋白、细胞外基质代谢因子 p-p38 MAPK、MMP-13、ADAMTS-4、ADAMTS-5 蛋白的表达情况, 研究 RAGE 基因在 OA 形成中的作用, 探讨 OA 的发病机制。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器: 雌雄不限的 SD 大鼠, SPF 级, 体重 160~200 g, 许可证号 SCXK (沪) 2012-0003, 购自凯学生物科技 (上海) 有限公司; 显微摄影系统来自日本 Olympus 有限公司, Image pro Plus 6.0 图像分析系统来自美国 MEDIA CYBERNETICS 公司; TRAP 活性染色试剂盒来自美国 sigma 公司, 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法:

1.2.1 骨性关节炎 SD 大鼠模型的构建及软骨细胞

的培养: 无菌条件下, 采用腹腔注射的方法将水合氯醛注入到大鼠体内进行麻醉, 然后将木瓜蛋白酶溶液注入大鼠双膝关节腔内, 共注射 2 周, 每 2 天 1 次。无菌条件下, 用 10 g/L 戊巴比妥钠对 SD 大鼠经腹腔注射麻醉, 麻醉 SD 大鼠后取大鼠髌关节和膝关节处软骨, 剪成 1 mm³ 小块, 转移至培养瓶内, 加入胰蛋白酶, CO₂ 8%、37 °C 培养箱中孵育 1 h, 弃去胰蛋白酶, 加入 II 型胶原蛋白酶, 继续孵育消化。孵育 2 h 后, 收集消化液后进行离心, 所得细胞接种于含 RMIP 1640P 培养基 (内含 10% FBS), CO₂ 8%、37 °C 培养箱中传代培养。实验用细胞为 1~3 代。

1.2.2 RAGE 基因的 shRNA 表达载体的构建: 根据基因序列数据库 Gen-Bank 中最新的 RAGE 基因的干扰位点来设计合成 4 对 shRNA, 其序列见表 1, 对照组 shRNA (Rc) 引物序列为 5'-CGATACTGAACGAATCGAT-3', 所有的 shRNA 序列均由上海生工生物工程有限公司合成, 其载体为真核表达载体 psi-U6。5 对 shRNA 经过退火后得到双链 DNA, 通过 T4 连接酶将其连接至用核酸内切酶 BamH I 和 EcoR I 双酶切的携带有增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 的表达载体 psi-U6 上, 从而获得 4 个携带有 shRNA 基因的 RAGE-1 (R1)、RAGE-2 (R2)、RAGE-3 (R3) 和 RAGE-4 (R4) 的重组表达载体及阴性对照重组载体 (Rc)。电转化感受态细胞后, 于 37 °C 条件下, 涂布培养在含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上过夜, 然后从培养皿中挑取单克隆菌落重新接种于含 Amp 抗性的 LB 培养液中, 在 37 °C 恒温摇床中培养过夜。用质粒纯化试剂盒提取质粒, 分别采用测序鉴定及紫外分光光度法定量测定。

表 1 shRNA RAGE 序列表

基因		序列
ShRNA RAGE-1	正义链	5'-CATCACGGTCAGGACAGACGCTAGGAtccagagTCGAAGCTACTGTGCGACCTATAT-3'
	反义链	5'-ATATCCATATAAGGTCAGACAGAAGCTAGCActcgtgaTCGAAGCTACTGTCCGGCC-3'
ShRNA RAGE-2	正义链	5'-GAGCAGCCAGGCAATGATCAGCGATtcgagcgATACGTGTTTCATTGGCTGGTTATAT-3'
	反义链	5'-AATTCCATATAACCAGGCAATGAACAGGAATcactcgaATTCGTGTTTCATAGCCAGG-3'
ShRNA RAGE-3	正义链	5'-GATCAGCCGTGTCTACCAGATTTCGTtcatgagGGAATCGTGGTAGACACGGCGTATT-3'
	反义链	5'-AATTCCAATACACGGTGTCTACCAGATTTCATctcttgaAGGAGTCTGGTAGACACGG-3'
ShR NARAGE-4	正义链	5'-GATCCGCTGGTGCCTAATGAGAAGGtcaagcCCTTCTCATTAGGCACAGTTTATT-3'
	反义链	5'-AATTGCAATAAACTGGTGCCTAATGAGAAGGctcatgaCCTACTCATTAGGCACAG-3'

1.2.3 骨性关节炎 SD 大鼠软骨细胞的分组及表达载体的转染: 收集处于对数生长期的骨性关节炎

SD 大鼠软骨细胞, 分别分为 shRNARAGE-1 (R1) 组、shRNARAGE-2 (R2) 组、shRNA-

RAGE-3 (R3) 组、shRNARAGE-4 (R4) 组、空载组及空白对照组。按照组别分别转染 shRNARAGE-1、shRNARAGE-2、shRNARAGE-3、shRNARAGE-4 质粒, 空载组则转染 Rc 质粒, 将未做处理的 SD 大鼠软骨细胞作为空白对照组。按照试剂盒操作说明书进行转染。收集培养得到的转染细胞系后提取蛋白, Western blot 检测相关蛋白的表达量。

1.2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 RAGE、p-p38MAPK、MMP-13、ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 蛋白表达: 收集不同组细胞, 分别加入 100 μ L 细胞裂解缓冲液, 冰上裂解细胞作用 30 min 后, 刮取冰上的细胞碎片和裂解产物, 移入 1.5 mL 的 Eppendorf 管中。放入高速冷冻离心机以 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 吸取上清液, 反复 3 次, 用 BCA 法测定蛋白浓度。按试剂盒操作说明书行 SDS-PAGE 电泳后转至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, 采用 TBS-T 洗液洗膜 3 次, 然后 5% 脱脂牛奶室温封闭转移膜 1 h, 分别加入适当的 p-p38MAPK 一抗、RAGE 兔抗人多克隆一抗、ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 一抗、鼠抗人 MMP13 单克隆一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 漂洗 10 min, 反复 3 次, 和辣根过氧化物酶标记二抗体 (1:5 000 稀释) 室温孵育 1 h, TBST 漂洗 10 min, 反复 3 次, ECL 化学发光法检测, X 线片压片曝光, 凝胶图像分析其积分光密度值。

1.3 统计学分析: 采用 SPSS 13.0 软件对实验结果进行分析。计量资料以均数 \pm 标准差表示, 组间比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组 RAGE 蛋白、p-p38MAPK、MMP-13 蛋白的表达水平: 结果见表 2, 与空白对照组和空载组 (Rc) 相比, R1、R2、R3、R4 的 RAGE、p-p38MAPK 及 MMP-13 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.05$); RAGE、p-p38MAPK 与 MMP-13 的蛋白水平在空白对照组和空载组 (Rc) 间差异均无统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 不同组 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 蛋白的表达水平: 结果见表 3, 与空白对照组和空载组 (Rc) 相比, R1、R2、R3、R4 的 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.05$); 空白对照组和空载组 (Rc) 间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 不同组 RAGE、p-p38MAPK、MMP-13 蛋白的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	RAGE 蛋白	p-p38MAPK 蛋白	MMP-13 蛋白
空白对照组	2.150 \pm 0.251	2.710 \pm 0.115	2.357 \pm 0.212
空载组 (Rc)	1.97 \pm 0.037	2.653 \pm 0.207	1.998 \pm 0.181
R1 组	0.675 \pm 0.037* [#]	0.853 \pm 0.231* [#]	0.562 \pm 0.154* [#]
R2 组	0.787 \pm 0.027* [#]	1.231 \pm 0.101* [#]	0.766 \pm 0.162* [#]
R3 组	0.902 \pm 0.089* [#]	0.995 \pm 0.099* [#]	0.820 \pm 0.147* [#]
R4 组	0.892 \pm 0.046* [#]	1.331 \pm 0.068* [#]	0.992 \pm 0.202* [#]

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与空载组 (Rc) 比较, [#] $P < 0.05$ 。

表 3 不同组 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 蛋白的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ADAMTS-4	ADAMTS-5
空白对照组	1.390 \pm 0.251	1.710 \pm 0.171
空载组 (Rc)	0.897 \pm 0.037*	1.053 \pm 0.219*
R1 组	0.315 \pm 0.037* [#]	0.362 \pm 0.270* [#]
R2 组	0.581 \pm 0.027* [#]	0.521 \pm 0.105* [#]
R3 组	0.492 \pm 0.089* [#]	0.687 \pm 0.098* [#]
R4 组	0.402 \pm 0.046* [#]	0.499 \pm 0.112* [#]

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与空载组 (Rc) 比较, [#] $P < 0.05$ 。

3 讨论

shRNA 是一种具有短发夹结构的小分子 RNA, 它可通过沉默机制诱导实现靶 mRNA 的降解, 使特定基因的表达沉默。shRNA 可构建成相应的载体, 将载体导入细胞之后, 可将基因沉默作用传递到后代细胞或生物体中。虽然已经广泛地将小干扰 RNA 技术应用于部分炎症疾病治疗的研究, 但目前国内外利用 shRNA 沉默 RAGE 基因在骨性关节炎中作用的报道鲜少见到。

近年来, 有相关实验证实骨关节炎患者中 ADAMTS-4 明显高于正常组, 而 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 均有报道表明在 OA 的发生和发展过程中起着十分关键的作用^[4]。p38 丝裂素活化蛋白激酶 (MAPK) 属丝氨酸蛋白激酶, 在大量的炎症反应中都有表达, 调节众多炎症疾病。金属蛋白酶 (MMPs) 是一组具有降解细胞外基质和血管基底膜能力的蛋白酶, 大量资料研究证实, 基质金属蛋白酶中的 MMP-13 在关节滑膜、滑膜液及软骨中均有强表达, 在关节软骨基质的降解过程中起重要作用。以往的研究表明, RAGE 与其配体的结合在氧化应激、炎症反应等多种病理生理过程中起着十分重要的作用^[5], 国外也有文献报道 RAGE 在慢性关节炎中起重要作用, 阻断 RAGE 的信号转导可

抑制关节炎症发生^[6]。因此,观察关节滑膜中 ADAMTS-4 和 ADAMTS-5 以及这些细胞炎性因子的表达对研究 OA 的发生发展有一定的指导意义。

本研究通过构建 RAGE 基因的 shRNA 表达载体并转染到骨性关节炎 SD 大鼠软骨细胞中,观察软骨细胞 RAGE 蛋白、细胞外基质代谢因子 p-p38 MAPK、MMP-13、ADAMTS-4、ADAMTS-5 蛋白的表达情况,研究 RAGE 基因在 OA 形成中的作用,探讨 OA 的可能发病机制。为了避免出现由于只选择一个序列而引起的无效或低效的情况^[7-8],并对可能出现的假阳性结果进行排除,本研究设置了阴性对照,同时选择了 RAGE 基因编码序列中 4 个可能的干扰位点。通过 Western 印迹法检测实验结果表明,骨性关节炎 SD 大鼠软骨细胞转染 shRNA RAGE 后,骨性关节炎 SD 大鼠软骨细胞外基质一些代谢因子的蛋白表达水平受到明显抑制,软骨细胞 RAGE 的蛋白表达水平显著下降,且细胞外基质代谢因子 p-p38 MAPK、MMP-13、ADAMTS-4、ADAMTS-5 的蛋白表达水平也显著下降,与空白对照组和空载组相比,4 个 shRNA 中差异均有统计学意义,说明沉默 shRNA 基因可明显抑制软骨细胞炎症的发生发展。

参考文献

[1] Rosenzweig D H, Quinn T M, Haglund L. Low-frequency high-magnitude mechanical strain of articular chondrocytes activates

p38-MAPK and induces phenotypic changes associated with osteoarthritis and pain [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15 (8): 14427-14441.

- [2] Neeper M, Schmidt A M, Brett J, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins [J]. J Biol Chem, 1992, 267 (21): 14998-15004.
- [3] Rasheed Z, Haqqi T M. Endoplasmic reticulum stress induces the expression of COX-2 through activation of eIF2 α , p38-MAPK and NF- κ B in advanced glycation end products stimulated human chondrocytes [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2012, 1823 (12): 2179-2189.
- [4] Peng S, Zheng Q, Zhang X, et al. Detection of ADAMTS-4 activity using a fluorogenic Peptide-Conjugated Au nanoparticle probe in human knee synovial fluid [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2013, 5 (13): 6089-6096.
- [5] Schmidt A M, Yan S D, Yan S F, et al. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses [J]. Journal of Clinical Investigation, 2001, 108 (7): 949-955.
- [6] Bucciarelli L G, Wendt T, Qu W, et al. RAGE block destabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice [J]. Circulation, 2002, 106 (22): 2827-2835.
- [7] Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32 (3): 936-948.
- [8] Amarzguoui M, Prydz H. An algorithm for selection of functional siRNA sequences [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316 (4): 1050-1058.