

基因沉默 Dickkopf-1 和 Sclerostin 表达对强直性脊柱炎小鼠骨代谢调节蛋白的影响

福建省福州市第二医院骨科研究所（福州 350101） 张 韬 伍林招 刘 岩 吴冬枝 何文慧

【摘 要】 目的 探讨 Dickkopf-1 及 Sclerostin 在强直性脊柱炎病理性成骨中的作用。方法 构建基因沉默 Dickkopf-1 及 Sclerostin 的重组腺病毒载体，并将其转染到强直性脊柱炎小鼠模型体内，采用 ELISA 法检测骨代谢调节相关蛋白骨保护素（OPG）、骨桥蛋白（OPN）、肿瘤坏死因子（TNF- α ）、骨形态发生蛋白-2（BMP-2）、骨保护素配体（RANKL）的表达情况。结果 Dickkopf-1 + Sclerostin 组和 Sclerostin 组的 OPG、OPN、BMP-2 表达量均高于对照组，Dickkopf-1 组和 Sclerostin 组的 OPN 表达量均高于对照组，差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$ ）。Dickkopf-1 + Sclerostin 组、Sclerostin 组和 Dickkopf-1 组 TNF- α 和 RANKL 蛋白的表达水平均低于对照组，Sclerostin 组和 Dickkopf-1 + Sclerostin 组的 TNF- α 蛋白表达水平均低于 Dickkopf-1 组，差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$ ）；Sclerostin 组和 Dickkopf-1 组 RANKL 蛋白表达水平均高于 Dickkopf-1 + Sclerostin 组，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。结论 基因沉默 Dickkopf-1、Sclerostin 均明显抑制强直性脊柱炎症的发生发展，与转染单个基因沉默相比较，共同转染 Dickkopf-1 + Sclerostin 基因在抑制强直性脊柱炎症的发生发展效果更好。

【关键词】 Dickkopf-1；Sclerostin；沉默基因；强直性脊柱炎

【中图分类号】 R 394；R86 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2019)02-0126-04

强直性脊柱炎 (AS) 在慢性炎症性自身免疫系统疾病中, 发病率仅次于类风湿性关节炎, 居于第 2 位。其发病主要是由于肌腱附着点出现了纤维化和骨化, 从而引起了反复循环进展性的骨破坏, 最终导致骨关节强直^[1]。近年来有研究发现, 负调控因子 Dickkopf-1 和 Sclerostin 在调节新骨生成和旧骨代谢中有着重要作用^[2-3], 但具体作用机制尚不十分清楚, 与多种因素有关。本研究通过构建基因沉默 Dickkopf-1 及 Sclerostin 的重组腺病毒载体, 并将其转染到强直性脊柱炎小鼠模型体内, 观察骨代谢调节相关蛋白骨保护素 (OPG)、骨桥蛋白 (OPN)、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、骨形态发生蛋白-2 (BMP-2)、骨保护素配体 (RANKL) 的表达情况, 探讨 Dickkopf-1 及 Sclerostin 在强直性脊柱炎病理性成骨中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料: Elisa 试剂盒 (美国 Elabscience 公司), TMB (武汉双金精细化工有限公司), Image pro Plus 6.0 图像分析系统 (美国 MEDIA CYBERNETICS 公司) 实验动物: 雌雄不限的 6 周龄昆明种小鼠, 体质量 (20.4 ± 2.1) g, 清洁级, 购自成都达硕实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (川) 2008-24, 质量合格证号 0051344。

1.2 方法:

1.2.1 自身免疫性强直性脊柱炎 (AS) 小鼠模型的构建: 取雄性和雌性小鼠各 50 只, 采用无菌注射器往实验小鼠的腹腔中注射蛋白聚糖乳剂 0.15 mL ($75 \mu\text{g} + \text{弗氏佐剂}$), 于第 7 次免疫后 2 周分离小鼠的脊柱、骶髂关节和外周关节标本, 然后行免疫组织化学检查, 同时观察炎细胞浸润、软骨和骨糜烂的情况, 若韧带和椎间盘连接处表现出单个核细胞浸润以及骶髂关节区炎性细胞浸润, 即表明自身免疫性强直性脊柱炎 (AS) 小鼠模型的构建成功。

1.2.2 基因沉默 Dickkopf-1 及 Sclerostin 的重组腺病毒载体的构建: 根据 Gen-Bank 中最新的 RAGE 基因库, 设计 Dickkopf-1 引物、Sclerostin 引物及对照组基因引物 (无相关对照序列), 见表 1。将合成的寡聚核苷酸链悬于双蒸水后加入到 RNase free PCR 管中变性、退火。在 RNase free PCR 管中孵育, 电泳并胶回收线性化的 pAd-GFP-shRNA 质粒并与线性腺病毒载体反应连接。所构建质粒同源重组后感染 HEK 293A 细胞进行包装、扩增后离心, 取上清液即为病毒液。

表 1 引物序列表

基因	序列
Dickkopf-1	
正义链	5'-CATCACGGTCAGGACAGACGCTAGGA-TCGAAGCTACTGTGCGATCTATAT-3'
反义链	5'-GTATCCATATAAGGTCAGACAGAAG-CTAGCATCGAAGCTACTGTCAGGCC-3'
Sclerostin	
正义链	5'-TAGCAGCCAGGCAATGATCAGCGATA-TACGTGTTTCATTGGCTTGGCTATAT-3'
反义链	5'-AATTCCATATAACCAGGCAATGAA-CAGGAATATTCGTGTTTCATAGACAGG-3'
无相关对照序列	
正义链	5'-TATCAGCCCTGTCTACCAGATTCGTG-GAATCGTGGTAGACACGGCGTAAT-3'
反义链	5'-AATTCCAATACACGGTGTCTACCAGA-TTCATAGGAGTCTGGTAGCCACGG-3'

1.2.3 AS 小鼠的分组及病毒转染: 将造模成功的 AS 小鼠平均分为 4 组, Dickkopf-1 组、Sclerostin 组、对照组 [(无相关对照序列 (Scr) 组)、Dickkopf-1 + Sclerostin 组。造模第 2 周后采用关节腔内注射的方法将沉默 Dickkopf-1 重组腺病毒液、沉默 Sclerostin 重组腺病毒液、对照组重组腺病毒液分别转染 Dickkopf-1 组、Sclerostin 组、对照组, 以基因沉默 Dickkopf-1 及 Sclerostin 重组腺病毒液共同转染 Dickkopf-1 + Sclerostin 组, 每隔 2 周重复 1 次至第 10 周。

1.2.4 骨代谢调节相关蛋白表达量检测: 术后 12 周取材切除感染组织细胞培养 48 h, 收集消化细胞, 在 4°C 以 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 提取细胞总蛋白, 加一定稀释的检测蛋白 0.1 mL 于上述已包被之反应孔中, 置 37°C 孵育 1 小时。然后洗涤, 加酶标抗体, 37°C 孵育 0.5 小时, 洗涤。加入 TMB 底物溶液 0.1 mL, 37°C 反应 30 min, 终止反应后, ELISA 检测仪检测检测小鼠外周血中骨代谢调节相关蛋白 OPG、OPN、TNF- α 、BMP-2、RANKL 的表达水平。

1.3 统计学处理: 使用 SPSS 13.0 统计软件对实验结果进行分析。所有均数以均数 \pm 标准差表示, 计量资料采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组 OPG、OPN、BMP-2 蛋白的表达水平: Dickkopf-1 + Sclerostin 组和 Sclerostin 组的 OPG、OPN、BMP-2 表达量均高于对照组, Dickkopf-1 组和 Sclerostin 组的 OPN 表达量均高于对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 而两

组 OPN 表达量差异无统计学意义；Dickkopf-1 组和对照组 OPG 和 BMP-2 表达量差异无统计学意义；Dickkopf-1 组和 Sclerostin 组的 OPG、OPN、BMP-2 表达量差异均无统计学意义（均 $P > 0.05$ ，表 2）。

表 2 不同组 OPG、OPN、BMP-2 蛋白的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	OPG	OPN	BMP-2
对照组	0.79±0.03	0.65±0.02	0.73±0.05
Dickkopf-1 组	0.89±0.03	0.82±0.03*	0.79±0.02
Sclerostin 组	0.93±0.02*	0.95±0.02*	0.84±0.01*
Dickkopf-1 + Sclerostin 组	1.52±0.01*#△	1.00±0.01*#	1.22±0.05*#△

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与 Dickkopf-1 组比较，# $P < 0.05$ ；与 Sclerostin 组比较，△ $P < 0.05$ 。

2.2 不同组 TNF- α 和 RANKL 蛋白的表达水平：结果见表 3，Dickkopf-1 + Sclerostin 组、Sclerostin 组和 Dickkopf-1 组 TNF- α 和 RANKL 蛋白的表达水平均低于对照组，Sclerostin 组和 Dickkopf-1 + Sclerostin 组的 TNF- α 蛋白表达水平均低于 Dickkopf-1 组，差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$ ）；但两组 TNF- α 蛋白表达水平差异无统计学意义；Dickkopf-1 组和 Sclerostin 组的 RANKL 蛋白表达水平差异无统计学意义（均 $P > 0.05$ ）；而两组 RANKL 蛋白表达水平均高于 Dickkopf-1 + Sclerostin 组，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ，表 3）。

表 3 不同组 TNF- α 和 RANKL 蛋白的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α	RANKL
对照组	1.38±0.07	1.58±0.07
Dickkopf-1 组	0.94±0.06*	0.55±0.06*
Sclerostin 组	0.40±0.04*#	0.52±0.04*
Dickkopf-1 + Sclerostin 组	0.33±0.03*#	0.35±0.02*#△

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与 Dickkopf-1 组比较，# $P < 0.05$ ；与 Sclerostin 组比较，△ $P < 0.05$ 。

3 讨论

近年来，随着各类信号通路研究的深入，Dickkopf-1 和 Sclerostin 在促进成骨细胞分化、增殖、成熟的关键调节作用被越来越多地发掘出来。Dickkopf-1 一方面能直接与 LRP5/6 受体结合，另一方面也能间接与 Kremen 蛋白受体和 LRP 受体以三聚体的形式结合，从而导致 Wnt 蛋白活性显著下降，最终破坏骨代谢平衡^[4]。Sclerostin 则主

要是通过与 LRP5/6 受体结合来阻断 Wnt 信号通路从而达到破坏骨代谢平衡的目的^[5]。王吉利等^[6]通过构建沉默 Dickkopf-1 和 Sclerostin 的腺病毒载体并将其转染到骨肉瘤细胞 MG63 中，结果表明抑制 MG63 细胞中 Dickkopf-1 和 Sclerostin 的表达，能增强骨形成相关蛋白并抑制骨吸收相关蛋白的表达的双重作用。

骨保护素 (OPG) 和 RANKL 在成骨细胞和破骨细胞分化、发挥生物活性中起着重要作用；BMP-2 会参与骨和软骨的生长发育及其重建；OPN 会影响骨基质的矿化、吸收、骨重塑；而炎症因子中的 TNF- α 可通过多种途径并促使破骨细胞分化、活化，破坏骨质；在正常情况下，这些骨代谢相关蛋白的共同作用维持着骨代谢的平衡和稳定。

为更好地研究 Dickkopf-1 及 Sclerostin 在强直性脊柱炎病理成骨中的作用，分析 Dickkopf-1 及 Sclerostin 与骨代谢调节蛋白 OPG、OPN、TNF- α 、BMP-2、RANKL 之间的关系，本研究通过构建沉默 Dickkopf-1 和 Sclerostin 的重组腺病毒载体并将其转染到强直性脊柱炎小鼠模型体内，观察骨代谢调节相关蛋白的表达情况，结果表明自身免疫性强直性脊柱炎 (AS) 小鼠转染 Dickkopf-1 和 Sclerostin 以及共同转染 Dickkopf-1 + Sclerostin 基因后，强直性脊柱炎小鼠骨的一些代谢因子在蛋白水平的表达上受到明显促进或抑制，TNF- α 及 RANKL 蛋白水平的表达显著下降，而另一些代谢因子 OPG、OPN、BMP-2 蛋白水平的表达也显著升高，与对照组相比较，3 个转染沉默基因的小组均有显著性差异，而共同转染 Dickkopf-1 + Sclerostin 基因的效果更佳，说明沉默 Dickkopf-1、Sclerostin 基因均明显抑制强直性脊柱炎的发生发展，与转染单个沉默基因相比较，共同转染 Dickkopf-1 + Sclerostin 基因在抑制强直性脊柱炎的发生发展效果更好。

参考文献

- [1] Appel H, Loddenkemper C, Sieper J. Immunopathology of ankylosing spondylitis and other spondyloarthritides [J]. Zeitschrift für Rheumatologie, 2008, 67 (1): 25-31.
- [2] ZHAO Z, WANG G, WANG Y, et al. SAT0432 Correlation between the spinal MRI findings and new bone formation factor (DKK-1) in patients with spondyloarthritis [J]. Clin Rheumatol, 2017, 76 (11): 935.
- [3] 万雷, 黄宏兴, 黄红, 等. 沉默 DKK1、Sost 重组腺病毒载体的构建及其对 MG63 细胞增殖、ALP 活性和钙离子浓度影响研

- 究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22 (11): 1361-1369.
- [4] 兰维娅, 唐芳, 马武开, 等. Wnt/ β -catenin 抑制剂 DKK1 调控类风湿关节炎的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38 (8): 2015-2017.
- [5] 张阳洋, 高艳虹. Sclerostin 单克隆抗体治疗骨质疏松的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23 (10): 1376-1380.
- [6] 王吉利, 万雷, 张志海, 等. 抑制 Dickkopf-1 和 Sclerostin 表达对人成骨肉瘤细胞 MG63 骨代谢调节相关蛋白表达水平的影响 [J]. 中医正骨, 2016, 28 (9): 653-658.
-