

siRNA 抑制转化生长因子- β 1 对小鼠黄韧带骨化的影响

张颖哲, 吴东进, 彭长亮, 李波翰, 宋扬, 张程, 赵杰,
李德全, 杨中雁, 刘鹏, 赵坤, 马胜忠, 高春正
(山东大学第二医院脊柱外科, 山东 济南 250033)

摘要: **目的** 运用 RNA 干扰 (RNAi) 技术抑制转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 在小鼠黄韧带成纤维细胞中的表达, 探讨其对脊柱黄韧带骨化的影响。 **方法** 培养小鼠黄韧带成纤维细胞, 经人重组骨形态发生蛋白-2 (rhBMP-2) 诱导骨化, 对骨化成功的黄韧带细胞 (成骨细胞) 进行形态学观察, 并对其进行碱性磷酸酶 (ALP) 染色及钙结节茜素红染色鉴定; 构建靶向 TGF- β 1 基因的小干扰 RNA (siRNA) 真核表达载体 (siRNA-pSilencer2.0U6-TGF β 1) 并转染成骨细胞, 分为 3 组: 真核表达载体转染后细胞为实验组, 空载体转染后细胞为阴性对照组, 未转染细胞为空白对照组。应用免疫荧光技术检测转染前后细胞中 TGF- β 1、BMP-2 的表达; RT-PCR 检测 TGF- β 1 mRNA 在细胞内表达变化; Western blotting 检测 TGF- β 1 和 BMP-2 蛋白在细胞内表达变化; 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测细胞中 ALP、骨钙素 (OC) 水平的变化。 **结果** 经诱导骨化成功后, 小鼠黄韧带细胞形态学观察可见细胞 ALP 染色、钙结节茜素红染色均呈阳性, 具有典型成骨细胞生物学特征。构建的 siRNA 表达载体对细胞转染后, 免疫荧光检测显示 TGF- β 1 和 BMP-2 荧光强度下降; RT-PCR 检测显示实验组较阴性对照组和空白对照组 TGF- β 1 mRNA 表达分别下降 41.94%、47.82%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); Western blotting 检测显示实验组较阴性对照组和空白对照组 TGF- β 1/ β -action 蛋白表达比值分别下降 35.88%、44.75%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); BMP-2/ β -action 蛋白表达比值分别下降 81.79%、86.06%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); ELISA 检测显示实验组较阴性对照组和空白对照组 ALP 分别下降 24.14%、32.30%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); OC 分别下降 17.01%、21.63%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。 **结论** 构建靶向 TGF- β 1 基因的 siRNA 真核表达载体能够有效抑制成骨细胞中 TGF- β 1 以及内源性 BMP-2 表达, 达到抑制脊柱黄韧带骨化的目的。

关键词: 骨化; 骨钙素; 碱性磷酸酶; 转化生长因子- β 1; 骨形态发生蛋白-2; 小干扰 RNA

中图分类号: R686.5 **文献标志码:** A

Effect of silencing TGF- β 1 expression by small interfering RNA on ossification of the ligamentum flavum in mice

ZHANG Yingzhe, WU Dongjin, PENG Changliang, LI Bohan, SONG Yang, ZHANG Cheng, ZHAO Jie, LI Dequan, YANG Zhongyan, LIU Peng, ZHAO Kun, MA Shengzhong, GAO Chunzheng
(Department of Spinal Surgery, Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, Shandong, China)

Abstract: Objective To inhibit the transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) expression in fibroblasts of mice ligamentum flavum by RNA interference (RNAi) technique, and to investigate the effect of TGF- β 1 on the ossification of ligamentum flavum. **Methods** Fibroblasts of mice ligamentum flavum were cultivated and ossification was induced with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). After that, the osteoblasts were identified with morphological

observation, alkaline phosphatase staining and alizarin red staining of calcified nodules. Eukaryotic expression vector (siRNA-pSilencer2.0U6-TGF β 1) was constructed to transfect the osteoblasts, which were then divided into three groups. The experiment group was transfected with eukaryotic expression vector, the negative control group was transfected with vacant plasmid and the blank control group was not treated. After that, the expressions of TGF- β 1 and BMP-2 were detected by immunofluorescence technique before and after transfection; the expression change of TGF- β 1 mRNA in osteoblasts was determined by RT-PCR; the expression change of protein of TGF- β 1 and BMP-2 was measured with Western blotting; the expression change of ALP and osteocalcin(OC) was assessed with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** After ossification had been induced successfully, ligamentum flavum cell morphological observation showed that alkaline phosphatase staining and alizarin redstaining of calcified nodules were both positive, and those cells had typical biological features of osteoblasts. After the osteoblasts were transfected by siRNA-pSilencer2.0U6-TGF β 1, immunofluorescence detection displayed decline in the fluorescence intensity of TGF- β 1 and BMP-2. Compared with the negative control and bland control, RT-PCR showed that the expression of the TGF- β 1 mRNA in experiment group decreased significantly by 41.94% and 47.82%, respectively ($P < 0.01$). Western blotting showed that the ratio of TGF- β 1/ β -action in experiment group decreased remarkably by 35.88% and 44.75%, respectively ($P < 0.01$), and BMP-2/ β -action decreased significantly by 81.79% and 86.06%, respectively ($P < 0.01$). ELISA displayed that ALP in experiment group decreased notably by 24.14% and 32.30%, respectively ($P < 0.01$), and OC decreased remarkably by 17.01% and 21.63%, respectively ($P < 0.01$). **Conclusion** Eukaryotic expression vector (siRNA-pSilencer2.0U6-TGF β 1) can effectively inhibit the expression of TGF- β 1 in osteoblasts and endogenous BMP-2, thus suppressing spinal ossification of ligamentum flavum.

Key words: Ossification; Osteocalcin; Alkaline phosphatase; Transforming growth factor- β 1; Bone morphogenetic protein-2; Small interfering RNA

脊柱黄韧带骨化性疾病是一种临床上常见的疾病,其发病原因尚不明确。年龄、种族、基因、生长因子、应力改变等诸多因素参与其发病过程^[1]。与骨形成有关系的生长因子、转化生长因子超家族等在其发病机制中也起着非常重要的作用。转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)参与了韧带骨化的不同时期^[2]。有关 TGF- β 1 基因与 BMP-2 表达的相关性,在脊柱黄韧带骨化过程中的作用研究较少。

本实验从病因学入手,模拟脊柱韧带骨化的病理生化过程,通过 siRNA 干扰技术,靶向沉默小鼠黄韧带细胞 TGF- β 1 基因,观察沉默 TGF- β 1 后其对小鼠黄韧带细胞成骨分化的影响,为该病的病因与发生机制提供诊疗思路。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 35 d 雌性小鼠 6 只,昆明种,体质量(20 \pm 5) g,购自山东大学医学院实验动物中心。

1.1.2 主要试剂与仪器 DMEM 高糖培养基、Opti-MEM I、澳洲胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶溶液

和 DMSO 均购自美国 Hyclone 公司;脂质体 Oligofectamine Reagent 和 LipofectmineTM2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司,RT-PCR 试剂盒购自立陶宛 Fermentas 公司;Sybr Green Mix 购自日本 Takara 公司;Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;鼠碱性磷酸酶 ELISA 检测试剂盒、鼠骨钙素 ELISA 检测试剂盒购自北京东亚免疫技术研究所;碱性磷酸酶 ALP 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;TGF- β 1、BMP-2 兔抗鼠单克隆抗体、人骨形态发生蛋白-2 和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.1.3 TGF- β 1 靶序列设计及引物设计 根据 Genebank 提供的 TGF- β 1 基因 mRNA 序列(基因号:NM011577.1),利用 Beacon Designer 7.9 软件设计干扰序列;BMP-2 蛋白及内参 GAPDH、 β -action 基因序列采用 Oligo7.0 软件设计,由 Takara 公司完成。TGF- β 1 引物序列 F: 5'-GTGTGGAGCAACATGTG-GAACTCTA-3',R: 5'-CGCTGAATCGAAAGCCCT-GTA-3'; GAPDH 引物序列: F: 5'-TGTGTCCGTCG-TGGATCTGA-3', R: 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCA-GGAG-3'; BMP-2 引物序列: F: 5'-TTGCTGGA-CACCCGGCTGAT-3', R: 5'-AGACCCTTACTGGT-CACCTT-3'; β -action 引物序列: F: 5'-AGGAGCA-ATGATCTTGATCTT-3',R: 5'-TGCCAACACAGTG-

CTGTCT-3'。

1.1.4 携带针对 TGF- β 1 干扰作用的 siRNA 真核载体的构建 在 siRNA 引物的上下游分别引入酶切位点 *Bam*H I 和 *Eco*R I, 两条寡核苷酸退火产物分别与 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后的质粒载体 pSIREN-RetroQ-DsRed-Express 进行连接, 构建的重组质粒经酶切、测序分析正确后, 经克隆筛选后选择有效的干扰 TGF- β 1 靶基因序列 5'-CTATCACCTACCTTTCCTT-3', 命名为 siRNA-pSilencer2.0U6-TGF β 1, 空载体构建的序列命名为 pSilencer2.0U6-TGF- β 1。质粒合成、转化、鉴定、扩增由日本 Takara 公司完成。

1.2 方法

1.2.1 小鼠黄韧带细胞培养 无菌条件下, 手术显微镜下剪开背部皮肤, 取出小鼠胸椎正常黄韧带, 剔除外周骨质后, 转移到含有 DMEM 的培养皿内。将其剪成 0.1 mm² 的碎块, 均匀贴在直径 10 cm 的培养皿里, 翻转培养皿, 使贴壁的组织块倒置。置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养。放置 7 h 后, 将培养皿翻转, 使组织块浸没在培养基中, 继续培养, 具体参见文献[3]。

1.2.2 黄韧带细胞诱导成骨及纯化 将人重组骨形态发生蛋白-2(recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2) 溶解于含 10% 胎牛血清的 DMEM 中, 调整浓度至 50 μ g/L, 用 0.22 μ m 滤菌膜过滤除菌, 4 °C 保存。将培养至第 4 代黄韧带细胞, 加入成骨诱导液 rhBMP-2^[46]。培养 10 d 并每日观察细胞成骨分化情况, 反复贴壁法^[7]纯化成骨细胞。

1.2.3 成骨细胞的鉴定 ①每日镜下观察细胞培养后的形态变化及生长状况并拍照记录。②成骨细胞碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色: 无菌玻片放入 6 孔板内, 将 1 \times 10⁴ 个/mL 细胞接种于每个孔中, 2 d 换液, 13 d 后取出细胞爬片, 按碱性磷酸酶染色试剂盒提供的实验步骤对成骨细胞进行 ALP 染色。③钙化结节茜素红法染色: 将无菌玻片放入直径 15 cm 培养皿, 将细胞消化后, 加入适当培养液, 调整细胞密度为 1 \times 10⁵ 个/mL, 将 1 mL 细胞接种于培养皿内, 25 d 后按茜素红染色法步骤染色, 低倍镜下观察矿化结节。

1.2.4 TGF- β 1 siRNA 脂质体转染小鼠成骨细胞及免疫荧光检测 TGF- β 1 及 BMP-2 表达 转染前 1 d, 取第 4 代对数生长期的成骨细胞, 调整细胞密度为 1 \times 10⁵ 个/mL, 以 1 mL/孔接种在盛有玻片的 6 孔培养板中, 加入 DMEM, 2 mL/孔, 2 d 后转染。成骨细胞转染, 首先用 250 μ L 无血清 Opti-MEM I 稀释 4 μ g 质粒 DNA, 轻轻混匀, 室温孵育 5 min; 使用 250 μ L 不

含血清的 Opti-MEM I 培养基稀释 10 μ L Lipofectamine2000, 轻轻混匀, 室温孵育 5 min。将两者混匀, 室温孵育 25 min。吸取孔板内培养基并用无血清 DMEM 清洗 3 次, 加入无血清 DMEM, 2 mL/孔。每孔逐滴加入 100 μ L 脂质体/DNA 混合物, 摇匀。37 °C、5% CO₂ 孵育 6 h, 完全培养基换液后继续培养。72 h 后取出玻片, 荧光显微镜下观察转染情况。

1.2.5 免疫荧光检测 TGF- β 1 及 BMP-2 表达 将细胞消化调整密度为 1 \times 10⁴ 个/mL, 以每孔 1 mL 接种于载有载玻片的 12 孔板上, 分为 3 组: siRNA-pSilencer2.0U6-TGF β 1 转染后的细胞为实验组, 空载体 pSilencer2.0U6-TGF β 1 转染后的细胞为阴性对照组, 未转染细胞为空白对照组, 每组 3 个复孔。转染 72 h 后, PBS 冲洗, 多聚甲醛固定细胞。0.5% Triton X-100 破膜, PBS 冲洗细胞。各孔滴入山羊血清, 37 °C 封闭 30 min; 滴加一抗 TGF- β 1 (1:50) [一抗 BMP-2 (1:50) 加入方法同下], 4 °C 湿盒内孵育过夜。第 2 天 PBST 冲洗, 滴入山羊抗兔 FITC 荧光二抗 (1:50), 避光孵育。PBST 冲洗后 DAPI 复染, PBST 浸洗后封片, 荧光显微镜下观察。

1.2.6 RT-PCR 检测 TGF- β 1 mRNA 的表达 转染 48 h 后, Trizol 法提取细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA^[8] 后进行 RT-PCR 反应。反应体系设为 20 μ L, 包括 Sybr Green Mix 10 μ L, cDNA (10 倍稀释) 5 μ L, 上、下游引物各 2.5 μ L。以 GAPDH 为内参, 扩增参数如下: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 56 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环; 72 °C 再延伸 10 min。TGF- β 1 浓度由样品平均值标准化。

1.2.7 Western blotting 检测 TGF- β 1 和 BMP-2 蛋白的表达 转染 72 h 后, 细胞刮子使细胞脱壁, 收集细胞并加入细胞裂解液, 置于冰上超声裂解。取细胞上清加入上样缓冲液, 加热后 PAGE 凝胶电泳。蛋白转膜后封闭, 加入抗体孵育, ECL 发光。应用 Image J 软件测量各条带 OD 值。 β -action 作为内参。

1.2.8 ALP 及骨钙素(osteocalcin, OC) 活性检测 转染 72 h 后, 3 500 r/min 离心 10 min 后重悬, 调整细胞密度为 5 \times 10⁵ 个/mL, 各取 5 mL 反复冻融。3 500 r/min 离心 10 min, 取上清。设 7 个复孔, 按照试剂盒步骤检测细胞 ALP 活性及 OC 活性, 酶标仪下测定样品 OD 值, 计算 ALP 及 OC 含量。

1.3 统计学处理 所得结果采用 SPSS 19.0 进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用两独立样本非配对 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成骨细胞鉴定 脊柱黄韧带细胞诱导骨化成功后,成骨细胞形态多样,随着细胞充分铺展呈梭形、多角形等各种不规则形态;胞质较丰富,有时可见2个

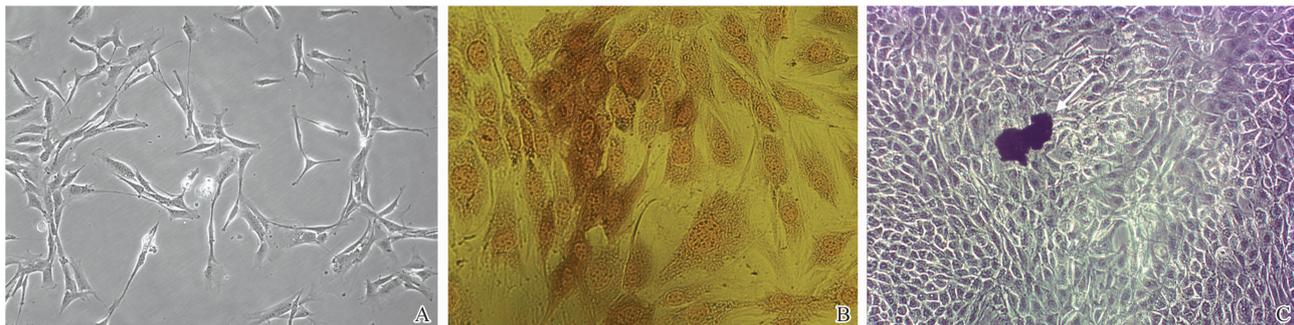


图1 成骨细胞鉴定结果($\times 100$)

A: 第2代成骨细胞培养4 d后的结果; B: 成骨细胞碱性磷酸酶染色结果; C: 成骨细胞钙化结节茜素红染色结果。

Fig. 1 Identification results of osteoblasts($\times 100$)

A: 4 d after culture, the shape of the second passage of osteoblasts; B: The result of osteoblasts by alkaline phosphatase staining; C: The result of calcific nodules by staining of alizarin red.

2.2 转染后成骨细胞生长情况观察及免疫荧光检测 TGF- $\beta 1$ 和 BMP-2 表达 脂质体转染细胞 72 h 后,荧光达到最亮,光镜下可见培养板内细胞胞质出现大量颗粒物质,见图 2A。转染后细胞胞质内可见

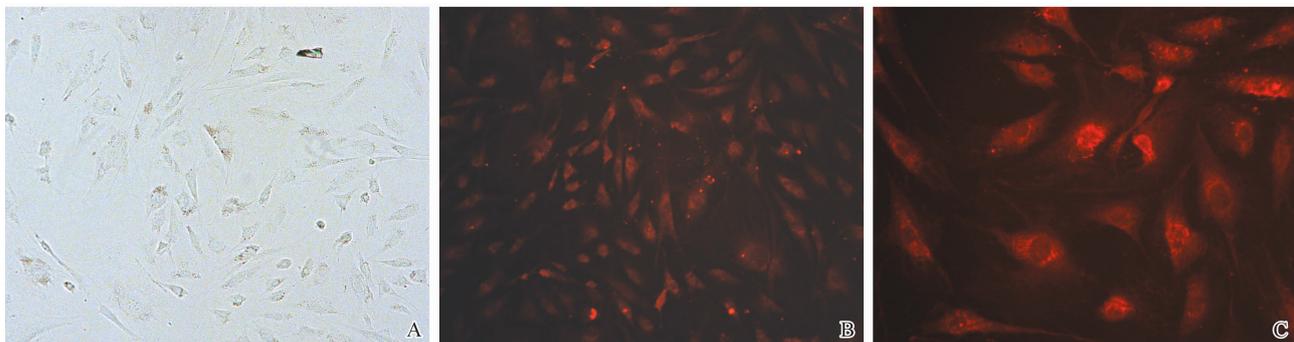


图2 转染后细胞的形态

A: 转染后细胞生长情况($\times 100$); B: 细胞内红色荧光蛋白表达($\times 100$); C: 细胞内红色荧光蛋白表达($\times 200$)。

Fig. 2 The shape of osteoblasts after transfection

A: The growth of osteoblasts after transfection ($\times 100$); B: The red protein expression in osteoblasts after transfection ($\times 100$); C: The red protein expression in osteoblasts after transfection ($\times 200$).

2.3 siRNA 转染成骨细胞后 TGF- $\beta 1$ mRNA 的表达 与阴性对照组和空白对照组相比,实验组 TGF- $\beta 1$ mRNA 表达分别下降 41.94% 和 47.82%,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 4。

2.4 Western blotting 检测干扰后 TGF- $\beta 1$ 蛋白的表达变化 与阴性对照组和空白对照组相比,实验组 TGF- $\beta 1/\beta$ -action 蛋白表达比值分别下降 35.88% 和 44.75%,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 5A、B; 与阴性对照组和空白对照组相比,实验组 BMP-2/ β -action 蛋白表达比值分别下降 81.79% 和 86.06%,

胞核。集落样生长,集落中心细胞排列紧密甚至重叠,随着细胞增多呈复层生长,见图 1A。ALP 染色阳性细胞可见黑色或者棕黑色条状、块状颗粒沉积在细胞活性部位(细胞膜上及胞浆内),见图 1B。钙化结节染色(茜素红法)成骨细胞钙结节染色阳性者呈深橘红色,细胞向钙结节处汇集,见图 1C。

红色荧光,细胞形态由梭形逐渐变为不规则形,细胞立体感增加,部分细胞出现漂浮现象,见图 2B、C。未转染成骨细胞 TGF- $\beta 1$ 、BMP-2 荧光强度较强,而转染后 TGF- $\beta 1$ 、BMP-2 荧光强度下降,见图 3A、B。

差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 6A、B。

2.5 ELISA 检测 ALP 和 OC 的表达结果 实验组 ALP [$(7.25 \pm 0.87) \mu\text{g/L}$] 与阴性对照组 [$(9.55 \pm 0.14) \mu\text{g/L}$] 及空白对照组 [$(10.70 \pm 0.57) \mu\text{g/L}$] 相比,分别下降了 24.14% 和 32.30% ($P < 0.01$); 实验组 OC [$(6.46 \pm 0.16) \mu\text{g/L}$] 与阴性对照组 [$(7.78 \pm 0.11) \mu\text{g/L}$] 及空白对照组 [$(8.24 \pm 0.17) \mu\text{g/L}$] 相比,分别下降了 17.01% 和 21.63%,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

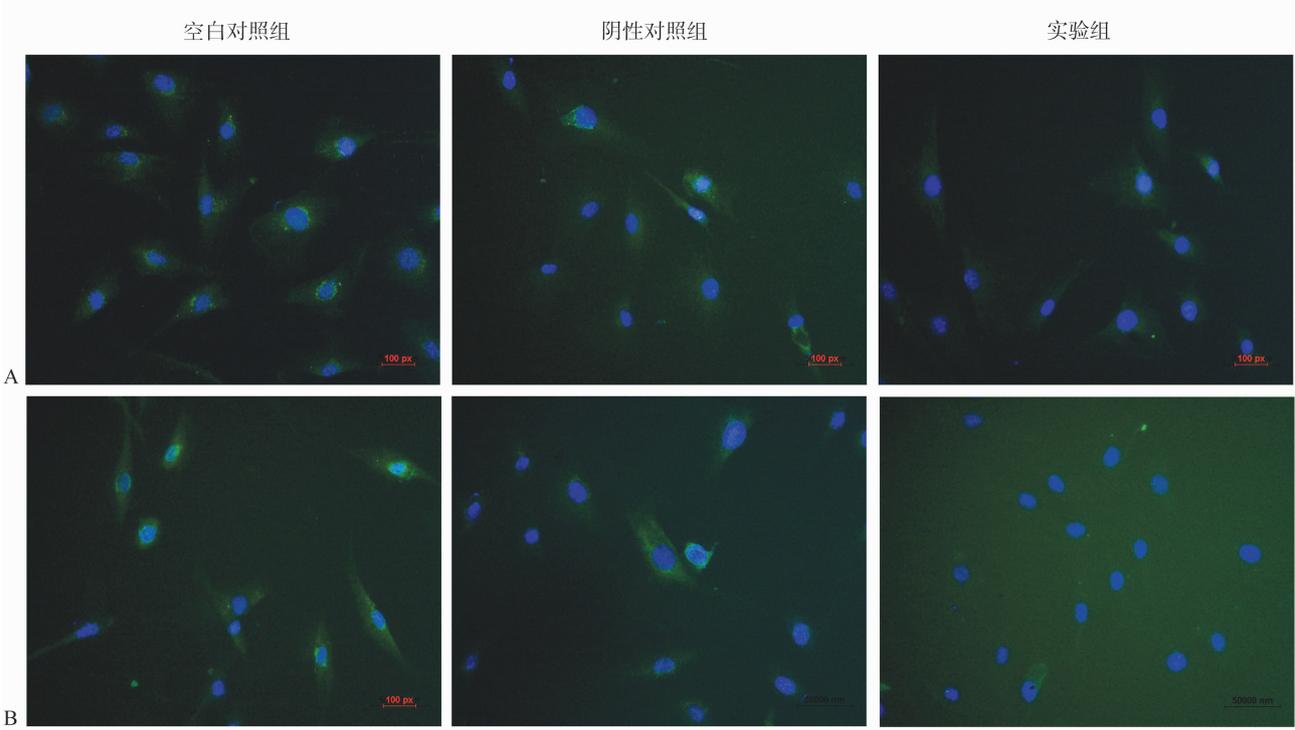


图3 TGF-β1(A)和BMP-2(B)基因在成骨细胞内的表达(×100)

Fig.3 The expression of target gene TGF-β1(A) and BMP-2(B) in osteoblasts(×100)

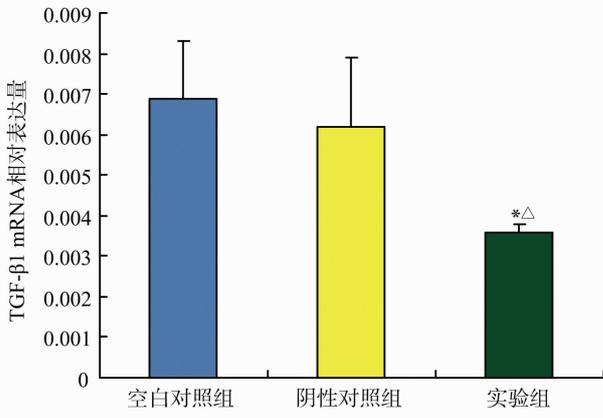


图4 RT-PCR 检测 TGF-β1 所得结果进行数据分析

* $P < 0.01$ vs 空白对照组; $\Delta P < 0.01$ vs 阴性对照组。

Fig.4 Analysis of TGF-β1 gene in RT-PCR results

* $P < 0.01$ vs negative control group; $\Delta P < 0.01$ vs blank control group.

3 讨论

近年 BMP-2 作为诱导成骨能力最强的因子受到人们的广泛关注^[9]。研究表明,脊柱黄韧带细胞经刺激后,可通过自分泌或旁分泌 BMP-2 的方式,诱导周围正常黄韧带细胞向成骨细胞分化^[10],并在其他生长因子的协助下,促进黄韧带骨化的发生与发展。Sekiya 等^[11]研究显示,BMP-2、BMP-4 体外促进骨髓基质干细胞向软骨细胞转化的影响,其中 BMP-2 影

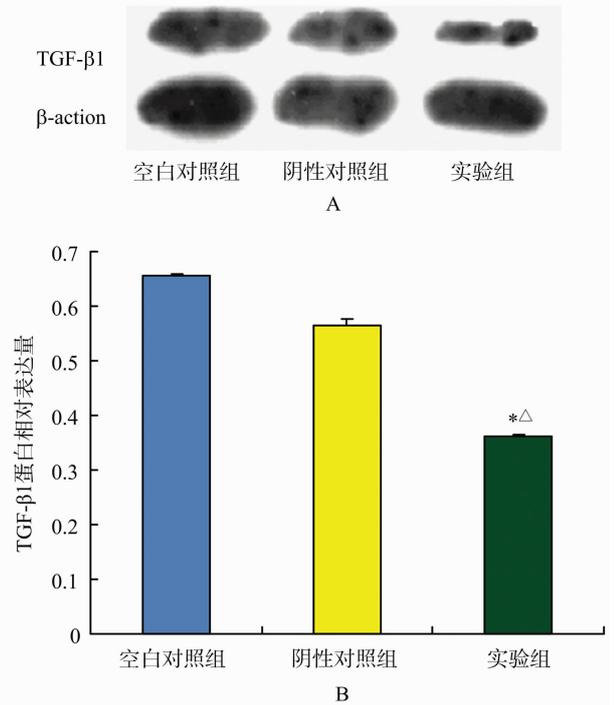


图5 Western blotting 检测目的基因 TGF-β1 的表达

A: TGF-β1 蛋白的表达; B: TGF-β1 所得结果进行数据分析。* $P < 0.01$ vs 空白对照组; $\Delta P < 0.01$ vs 阴性对照组。

Fig.5 The expression of TGF-β1 by Western blotting

A: The expression of TGF-β1 gene by Western blotting; B: Analysis of TGF-β1 gene by Western blotting. * $P < 0.01$ vs negative control group; $\Delta P < 0.01$ vs blank control group.

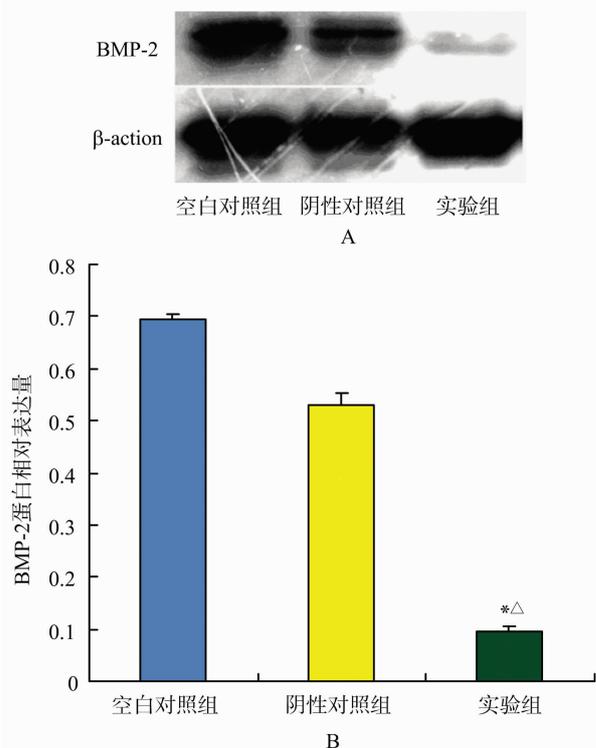


图6 Western blotting 检测 BMP-2 的表达

A: BMP-2 蛋白的表达; B: BMP-2 所得结果数据分析。 $^*P < 0.01$ vs 空白对照组; $^{\Delta}P < 0.01$ vs 阴性对照组。

Fig. 6 Expression of BMP-2 protein detected by Western blotting

A: The expression of BMP-2 gene by Western blotting; B: Analysis of BMP-2 gene by Western blotting. $^*P < 0.01$ vs negative control group; $^{\Delta}P < 0.01$ vs blank control group.

响效率最高。BMP-2 可以调节基因的种类达 60 余种^[12],主要是通过 Smads 通路来影响成骨细胞分化的。Smads 通路中 Msx2 与 Runx2 是两条重要的信号通路,也是诱导成骨分化的重要通路。除此之外,近年 Menin、Cthrc1 及 Smurf1 等更多的调节因子不断被发现,它们或者正、负性调节,或者通过双向调节来影响 BMP-2 成骨信号通路。因此 BMP-2 基因诱导成骨分化是受多种生长因子多种因素调节改变的。

BMP-2 是韧带骨化发生的启动因子,TGF- β 1 在韧带骨化发生与发展中的协助作用不容忽视^[13]。TGF 是影响黄韧带骨化的生长因子超家族中的一员,是一种以 TGF- β 1 前体(latent TGF- β 1, LTGF- β 1)活性形式存在的分泌型的蛋白^[14]。有研究发现,TGF- β 1 通过刺激成纤维细胞 I、III、V 型胶原的分泌来促进韧带的增生与肥厚,但 TGF- β 1 自身并没有诱导异位骨化的能力^[15]。Singhatanadgit 等^[16]通过更加深入的研究发现,TGF- β 1 促进韧带骨化进展的机制是通过调控一种 BMP/BMPR 通

道,进而增强 BMP-2 诱导成骨反应的作用。

近年研究证实,BMP-2 作为成骨诱导分化因子,主要在韧带骨化的早期发挥作用^[17];而 TGF- β 1 主要在后期调节成骨细胞的增殖,促进骨质的形成与发育成熟。本实验结果显示,构建的靶向沉默 TGF- β 1 的真核载体质粒可以有效的抑制 TGF- β 1 的表达。Western blotting 结果显示,转染后 TGF- β 1 与 BMP-2 的表达也出现下降。Elisa 检测显示成骨过程中分泌的 ALP 与 OC 水平转染后也出现不同程度的下降。已有研究显示,ALP 是骨形成的标志酶,出现在细胞成骨分化的早期^[19-21],和 OC 一样随着成骨细胞的成熟不断分泌。因此两者的共同下降说明干扰 TGF- β 1 确实可以起到有效地抑制成骨细胞分化的作用。但是 TGF- β 1 不能起到诱导骨化的作用,它只是对骨化的发展起到协助与促进的作用^[22]。干扰 TGF- β 1 的表达,本质上是减少了 TGF- β 1 在黄韧带骨化过程中的协助作用,从而抑制黄韧带骨化的进展。由此可见,黄韧带骨化的发生过程极其复杂,细胞因子之间的相互作用及反馈调节仍需进一步的研究。

本实验结果显示,通过靶向沉默 TGF- β 1 可以有效抑制内源性 BMP-2 的表达,同时成骨细胞碱性磷酸酶及骨钙素的分泌也出现降低,表明成骨细胞分化的过程受到抑制,而且提示 TGF- β 1 与 BMP-2 信号通路之间存在着密切的联系。由于成骨过程复杂,受数种生长因子、时间条件的制约以及人力物力的限制,本实验未能对沉默 TGF- β 1 而抑制韧带骨化的具体机制做出阐释。但通过深入研究抑制黄韧带骨化过程的重要靶点,为找到一种有效抑制黄韧带骨化的方法奠定理论上的基础。

国内外有关黄韧带骨化方面的研究较多,其具体机制尚不明确。本实验优点在于根据发病机制,从基因水平探讨抑制脊柱韧带向成骨方向分化的可能性,从病因学入手,为临床治疗从治标转向治本提供一个新思路。运用小分子干扰 RNA 技术抑制 TGF- β 1 的表达目前较多应用于肿瘤及炎症免疫性疾患的研究,有关用于脊柱黄韧带骨化的研究报道较少。本实验通过构建 siRNA 真核载体质粒靶向沉默 TGF- β 1 质粒,抑制了 BMP-2 基因的表达,达到抑制韧带骨化的目的。但 TGF- β 1 本身的作用还是激活了其他某些未知的生长因子、炎性介质的作用,尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Sekiya I, Larson B L, Vuoristo J T, et al. Comparison of

- effect of BMP-2, -4 and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma[J]. *Cell Tissue Res*, 2005, 320(2):269-276.
- [2] Wyatt L E, Chung C Y, Carlsen B, et al. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) alter connexin 43 phosphorylation in MC3T3-E1 Cells[J]. *BMC Cell Biol*, 2001, 2:14.
- [3] 王哲, 王全平, 李明全, 等. 体外培养人黄韧带细胞系的建立及细胞学特性分析[J]. *现代康复杂志*, 2001, 5(11):58-59.
- [4] Miyamoto S, Takaoka K, Yonenobu K, et al. Ossification of the ligamentum flavum induced by bone morphogenetic protein[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1992, 74(2):279-283.
- [5] Alpaslan C, Irie K, Takahashi K, et al. Long-term evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 induced bone formation with a biologic and synthetic delivery system[J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 1996, 34(5):414-418.
- [6] Kenley R, Marden L, Turek T, et al. Osseous regeneration in the rat calvarium using novel delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rh-BMP-2)[J]. *J Biomed Mater Res*, 1994, 28(10):1139-1147.
- [7] 鄂玲玲, 刘洪臣, 吴霞, 等. 改良大鼠下颌骨成骨细胞原代培养与鉴定[J]. *中华老年口腔医学杂志*, 2007, 5(4):226-229.
- [8] 卞晓琨, 司元全, 陆楠, 等. 免疫球蛋白样转录子 2 在胃癌细胞中的表达及临床意义[J]. *山东大学学报: 医学版*, 2012, 50(1):118-121.
- [9] Bessa P C, Casal M, Reis R L. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering; the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts)[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2008, 2(1):1-13.
- [10] Peck W A, Birge S J Jr, Fedak S A. Bone cells; biochemical and biological studies after enzymatic isolation [J]. *Science*, 1964, 146(3650):1476-1477.
- [11] Sekiya T, Oda T, Matsuura K, et al. Transcriptional regulation of the TGF-beta pseudoreceptor BAMBI by TGF-beta signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(3):680-684.
- [12] Liu T, Gao Y, Sakamoto K, et al. BMP-2 promotes differentiation of osteoblasts and chondroblasts in Runx2-deficient cell lines[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 211(3):728-735.
- [13] Miura M, Chen X D, Allen M R, et al. A crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(12):1704-1713.
- [14] Michael B, Albro, Alexander D, et al. Shearing of synovial fluid activates latent TGF- β [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, 20(11):1374-1382.
- [15] Nakatani T, Marui T, Hitora T, et al. Mechanical stretching force promotes collagen synthesis by cultured cells from human ligamentum flavum via transforming growth factor-beta1 [J]. *J Orthop Res*, 2002, 20(6):1380-1386.
- [16] Singhatanadgit W, Salih V, Olsen I. RNA interference of the BMPR-IB gene blocks BMP-2-induced osteogenic gene expression in human bone cells[J]. *Cell Biol Int*, 2008, 32(11):1362-1370.
- [17] Moon S H, Park S R, Kim H, et al. Biologic modification of ligamentum flavum cells by marker gene transfer and recombinant human bone morphogenetic protein-2 [J]. *Spine*, 2004, 29(9):960-965.
- [18] Sriram S, Robinson P, Pi L, et al. Triple combination of siRNAs targeting TGF β 1, TGF β 2, and CTGF enhances reduction of collagen I and smooth muscle actin in corneal fibroblasts [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(13):8214-8223.
- [19] de Oliva M A, Maximiano W M, de Castro L M, et al. Treatment with a growth factor-protein mixture inhibits formation of mineralized nodules in osteogenic cell cultures grown on titanium [J]. *J Histochem Cytochem*, 2009, 57(3):265-276.
- [20] Laino G, d'Aquino R, Graziano A, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB) [J]. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(8):1394-1402.
- [21] Tezval M, Tezval H, Dresing K, et al. Differentiation dependent expression of urocortin's mRNA and peptide in human osteoprogenitor cells; influence of BMP-2, TGF-beta-1 and dexamethasone [J]. *J Mol Histol*, 2009, 40(5-6):331-341.
- [22] 张慧, 王贵超, 韩兴龙, 等. 去分化间充质干细胞成骨再分化潜能的实验研究[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(8):1044-1048.

(编辑:徐苗蓁)