

• 基础研究 •

# 敲减 SOX9 基因对骨髓间充质干细胞表达的影响

梁大川, 白洁玉, 杜少华, 程鹏, 王震, 康宁, 杨自权

(山西医科大学第二医院骨科 骨与软组织损伤修复山西省重点实验室, 山西 太原 030001)

**【摘要】** 目的: 构建小鼠 SOX9 基因干扰的慢病毒载体, 体外转染小鼠骨髓间充质干细胞, 观察小鼠 SOX9 基因在小鼠间充质干细胞中的表达影响。方法: 针对小鼠 SOX9 基因序列, 设计 RNA 干扰靶点序列, 合成含干扰序列的双链 DNAoligo 连入酶切后的 RNA 干扰载体上, 构建 Lenti-SOX9-siRNA-EGFP 载体, 鉴定扩增。利用 SOX9 基因沉默载体体外转染小鼠骨髓间充质细胞, 利用倒置荧光显微镜观察转染是否成功, 并通过流式细胞仪测定转染效率。同时利用 RT-PCR 和 Western Blot 检测小鼠 SOX9 基因的表达。结果: 成功构建了 Lenti-SOX9-siRNA-EGFP, SOX9 基因沉默慢病毒载体, 能高效转染小鼠骨髓间充质细胞。RT-PCR 和 Western Blot 检测显示经 SOX9 基因转染的小鼠骨髓间充质细胞基因表达沉默。结论: 利用慢病毒结合 RNA 干扰技术敲减小鼠 SOX9 基因成功地转染小鼠骨髓间充质干细胞, 且 SOX9 基因在小鼠骨髓间充质干细胞中发生了沉默, 这为 SOX9 修复软骨损伤的进一步研究奠定了基础。

**【关键词】** SOX9; 慢病毒属; 转染; 骨髓间充质干细胞细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2013.09.014

## Gene expression of bone mesenchymal stem cells transduced by the lentiviral vector of SOX9 gene knockdown

LIANG Da-chuan, BAI Jie-yu, DU Shao-hua, CHENG Peng, WANG Zhen, KANG Ning, and YANG Zi-quan. Department of Orthopaedics, the Second Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

**ABSTRACT Objective:** To construct one lentiviral vector containing mouse SRY-related silencing group-box gene 9 (SOX9) and to transfect murine bone mesenchymal stem cells (mBMSCs) in vitro and observe the expression of target gene. **Methods:** RNA interference target sequence was designed in connectin with mice SOX9 gene sequence. The double strands DNAoligo containing interference sequence were synthesized and cloned into lentivirus vector. The siRNA lentiviral vector with SOX9 gene silencing was constructed and identified, which was transfected into rat bone mesenchymal stem cells. The expression of target gene was detected by immunofluorescence, RT-PCR and Western blot. **Results:** Lenti-SOX9-siRNA-EGFP was recombined successfully and transduced efficiently into mBMSCs. The expression of SOX9 gene silencing was confirmed by RT-PCR and Western blot. **Conclusion:** Mouse SOX9 gene silencing by RNA interference and Lentiviral vector can transfect-ed successfully into mBMSCs. Meanwhile, SOX9 gene may be silenced in SOX9 transduced mBMSCs. This will provide target cells for the following study about SOX9 gene repairing cartilage injury.

**KEYWORDS** SOX9; Lentivirus; Transfection; Bone mesenchymal stem cells

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(9):760-763 www.zggszz.com

骨性关节炎的发病机制主要是由于软骨损伤引起, 发生损伤后很难发生自我修复, 不少研究者转向组织工程技术<sup>[1]</sup>。本实验立足于 SOX 家族, 其中关键的转录因子 SOX9 对胚胎时期软骨的发育成熟等过程起着重要的调节作用。研究将通过构建 SOX9 基因敲减的慢病毒载体转染小鼠间充质干细胞, 并观察在转染后的目的基因表达状况<sup>[2-3]</sup>。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30973048); 国际科技合作项目(编号: 2010DFA32450); 国家人事部及山西省人事厅留学回国人员科技活动择优资助项目; 山西省留学基金项目(编号: 107); 山西省自然科学基金资助项目(编号: 2010011050-6)  
Fund program: Provided by the National Natural Science Foundation (No. 30973048)  
通讯作者: 杨自权 E-mail: yzqonline@126.com

## 1 材料与方法

**1.1 材料与试剂** 蛋白提取试剂盒购自上海凯基公司。DMEM/F12 培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司。一抗购自 Santa 公司, Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。大肠杆菌、细胞株、293T 细胞、pFU-GW-iRNA、Hpa I/Xho I 酶切, 购自上海吉凯基因化学技术有限公司。限制性内切酶购自 New England Biolab 公司。dsDNAoligo 由上海吉凯基因技术有限公司合成, QIHPA IN Plasmid 大抽 Kit 购自 QIHPA IN。Hpa I、Xho I、T4 DNA ligase、T4 DNA ligase buffer 来源于 NEB。琼脂糖购自赛百盛。

**1.2 主要仪器设备** 超净工作台美国 Airstream 公司生产, 蛋白定量分析仪 NaNoDROP2000, 由 Thermo 公司生产。Western-Blotting 电泳转膜系统由

Bio-Rad 公司生产; 稳压电泳仪购自 BioRad 公司; PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司; 凝胶成像仪由天能公司生产。

**1.3 细胞培养方法与分组** 无菌操作下取出小鼠(雌雄不限, 4~6 周龄)双侧胫骨及股骨, 剪掉两侧骨端, 用完全培养基反复冲洗髓腔至变白, 将冲洗获得的细胞悬液接种于 T25 培养瓶中, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% 饱和湿度的条件下进行培养。传至 3 代时细胞性状稳定后用于基因转染, 分为基因转染组和不转染对照组。

#### 1.4 观测指标与方法

**1.4.1 设计 siRNA** 在 GENE BANK 获得 SOX9 mRNA 序列(LOCUS NM\_011448 4146 bp), 按照 RNA 干扰序列设计原则, 设计多个 RNA 干扰靶点序列, 利用在线 siRNA 设计网站选择最佳的动力学参数靶点, 合成含干扰序列的双链 DNA oligo (上海吉凯基因公司合成), 其两端含酶切位点粘端, 直接连入酶切后的 pFU-GW-iRNA 载体上, 完成 4 条干扰质粒的构建。其序列分别为 pSC-15' -AACGCACATCAA-GACGGAGCA -3'; pSC -25' -GCGGAGGAAGTCG-GTGAAGAA -3'; SC -35' -CTCCACCTTCACTTACATGAA -3'; pSC -4 5' -GCTGCTGAACGAGAGC-GAGAA-3'。

**1.4.2 SOX9 沉默慢病毒载体的构建及鉴定** 将连接好的质粒产物转入制备好的细菌感受态细胞, 转化后对长出的克隆先进行 PCR 鉴定, 在进行测序比对后, 鉴定阳性的克隆即为构建成功的目的基因 RNA 干扰慢病毒载体。

**1.4.3 重组慢病毒载体的包装** 将构建好的基因沉默慢病毒载体及其两种辅助包装原件载体质粒 pHelper 1.0 和 pHelper 2.0 共转染 293T 细胞, 转染 8 h 更换为完全培养基, 培养 48 h 收集富含慢病毒颗粒的细胞上清浓缩并测定滴度。

**1.4.4 SOX9 基因敲减重组体在小鼠骨髓间充质干细胞中的表达** 首先预实验转染发现感染复数 MOI 为 80 时感染效率为最佳, 按 MOI=80 转染细胞作为实验组, 对照组不进行转染。①将处理后的细胞放入培养箱孵育 72 h, 倒置荧光显微镜下观察荧光的结果, 并用流式细胞仪测定转染效率。②将转染 72 h 的细胞分别提取细胞总 RNA 并转录扩增检测 SOX9 基因是否表达沉默。设计引物为 SOX9-F: 5' -GAGCCAGGCCAGTCCCAGCG -3'; SOX9 -R: 5' -CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG-3' (445 bp)。③将处理后的细胞在培养箱孵育 2 周, 然后提取细胞总蛋白, 测定蛋白浓度后调整其终浓度为 2 μg/ul, 于 -70 °C 冰箱保存备用。Western Blot 测定目的基因所

编码蛋白的表达。一抗为小鼠抗小鼠 GFP 单克隆抗体 1:500 稀释, 二抗为羊抗小鼠酶标抗体 1:2 000 稀释。每个样品各取 80 μg 总蛋白上样, 经 10% SDS-PAGE 电泳, 电转移至 PVDF 膜。封闭液(含 5% 脱脂牛奶)室温封闭 1 h 后, 加入一抗室温孵育 2 h, 二抗室温孵育 2 h, 洗膜 3 次后, ECL 显色, 凝胶成像系统扫描显像。

**1.5 统计学处理** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件包处理, 采用组间比较的 *F* 检验进行统计分析, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 小鼠骨髓间充质干细胞的培养结果** 细胞分离传代至第 3 代, 镜下观察细胞呈长梭状, 贴壁生长, 流式细胞仪检测细胞周期显示生长状态正常, 干细胞表面抗原鉴定细胞纯度达到 96% 以上。

**2.2 重组慢病毒干扰载体的鉴定** Hpa I 和 Xho I 酶切 pFU-GW-iRNA 载体以使其线性化并成功连接重组慢病毒质粒, 经测序分析示阳性克隆序列与设计的序列完全吻合, 证实成功构建了基因沉默载体。

**2.3 重组慢病毒的产生与鉴定** 三质粒经 293T 细胞包装后通过逐孔稀释法测定病毒滴度, 滴度为  $2 \times 10^8$  TU/ml。提取病毒总 RNA, RT-PCR 后酶切重组慢病毒。对酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳, 连接入 vshRNA 片段的阳性克隆 PCR 片段大小为 343 bp (从载体中切掉 15 bp), 没有连接入 vshRNA 片段的空载体克隆 PCR 片段大小为 299 bp (图 1)。证明所获得的慢病毒载体为 Lenti-SOX9-siRNA-EGFP。

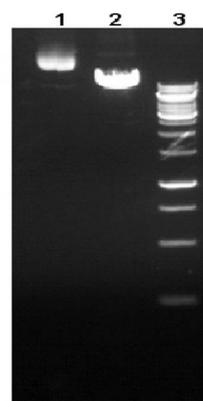


图 1 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳图。1: 没有酶切的载体质粒; 2: Hpa I 和 Xho I 酶切线性化后的载体质粒; 3: Marker 10 kb, 8 kb, 6 kb, 5 kb, 4 kb, 3.5 kb, 3 kb, 2.5 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp

**Fig. 1** The enzyme cutting identification of recombinant lentiviral vector. 1: Ordinary vector plasmid; 2: The enzyme-digested products of recombinant lentiviral vector; 3: Marker 10 kb, 8 kb, 6 kb, 5 kb, 4 kb, 3.5 kb, 3 kb, 2.5 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp

#### 2.4 目的基因沉默载体转染后的基因表达

**2.4.1 荧光显微镜观察** 重组慢病毒 Lenti-SOX9-

siRNA-EGFP 转染小鼠骨髓间充质细胞 72 h 后,置倒置荧光显微镜下观察,发现绿荧光的表达,未转染的细胞作为对照(图 2)。经流式细胞仪测定转染效率为 80.6%。

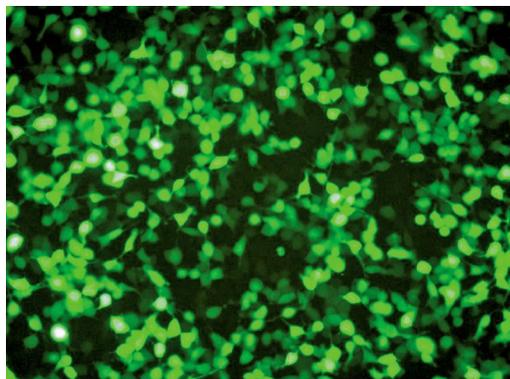


图 2 基因沉默载体转染 72 h 后荧光显微镜观察

Fig.2 Fluorescence microscopic appearance at 72 hours after transfection

2.4.2 RT-PCR 结果 小鼠骨髓间充质细胞被重组慢病毒 Lenti-SOX9-siRNA-EGFP 转染后 72 h,提取细胞总 RNA 进行 RT-PCR 分析。结果显示实验组与对照组的条带都出现在 400 bp 左右,而实验组的条带相对于对照组明显灰暗,符合预期结果(图 3)。

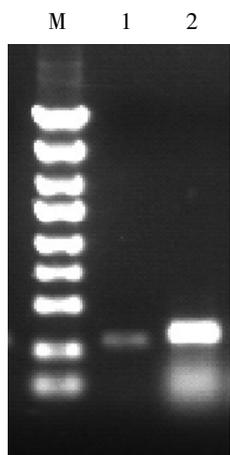


图 3 基因转染 72 h 后 RT-PCR 检测。M:Marker 5 kb,3 kb,2 kb,1.5 kb,1 kb,750 bp,500 bp,250 bp,100 bp;1:实验组;2:对照组

Fig.3 Electrophoresis result of RT-PCR at 72 hours after transfection. M:Marker 5 kb,3 kb,2 kb,1.5 kb,1 Kb,750 bp,500 bp,250 bp,100 bp;1:experimental group;2:control group

2.4.3 Western Blot 结果 转染后 2 周提取细胞总蛋白进行免疫印迹分析,结果显示两组都可检测到阳性条带(72 000~95 000),实验组条带明显暗于对照组。证实 RNA 干扰慢病毒载体对目的基因表达有敲减作用(图 4)。

### 3 讨论

骨性关节炎是中老年人最常见的一种慢性关节疾病。关节运动时为了缓冲震荡、减少摩擦、分散负荷,关节软骨起了至关重要的作用。关节软骨结构特

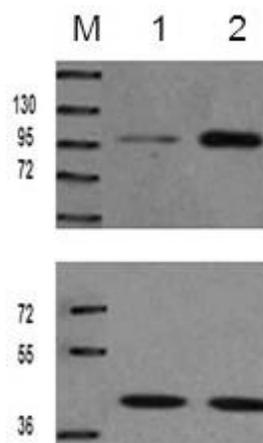


图 4 基因转染 2 周后 Western Blot 检测。M:Marker 250 kd,130 kd,95 kd,72 kd,55 kd,36 kd;1:实验组;2:对照组。内参:GADPH

Fig.4 Electrophoresis result of Western Blotting at two weeks after transfection. M:Marker 250 kd,130 kd,95 kd,72 kd,55 kd,36 kd;1:experimental group;2:control group. Reference:GAOPH

殊,其中软骨细胞被致密的细胞外基质包绕,没有充分的血管、神经分布,所以当发生损伤后很难发生自我修复。目前对于关节软骨损伤临床上缺乏有效治疗手段,由于关节置换手术带来的使用寿命限制和经济负担,不少研究者转向组织工程技术,并利用间充质干细胞作为软骨组织工程的种子细胞来进行探索<sup>[4]</sup>。

研究显示 TGF-beta 可以刺激和诱导间充质干细胞分化为软骨细胞<sup>[5]</sup>。但把这类生长因子直接移植入关节软骨缺损处,长期作用发现 TGF-beta 的高表达导致了关节纤维化和关节周围肌肉水肿等严重并发症的发生<sup>[6]</sup>。因此,应该结合组织工程,运用一些靶基因进行一些新的研究。

SOX 基因家族是一个在胚胎生长发育过程中起着重要作用的基因家族。其中的 SOX9 属于 SOX 基因家族 E 亚族,具有典型的转录因子结构<sup>[7]</sup>。研究证明 SOX9 主要在软骨细胞中表达,是软骨发育形成过程中的关键转录因子,对胚胎时期软骨的发育成熟等过程起着重要的调节作用。在小鼠胚胎软骨发育过程中 SOX9 基因失活可导致前软骨细胞不能聚集和向软骨细胞分化<sup>[8]</sup>。SOX9 可以激活软骨细胞特征分子,如 II 型胶原、aggrecan 蛋白等的表达,从而调控软骨分化<sup>[9]</sup>。而多种生长因子,如 TGF-beta、FGF 等可以促进 SOX9 表达<sup>[10-11]</sup>。还可以对软骨主要基质成分的基因,如 Col9a1 等进行调控。因此,SOX9 是多种生长因子诱导软骨分化过程中的重要环节。

RNA 干扰技术是当细胞中导入与内源性 mRNA 编码区同源的双链 RNA 时,该 mRNA 发生降解而导致转录后基因沉默现象<sup>[12]</sup>。它利用 siRNA 或 shRNA 表达载体快速、经济、简便的以序列特异方式剔除目

的基因表达,具有高度特异性和高效抑制率的特点。RNAi 技术转染效率抑制基因表达的效率极高,甚至可以完全阻断基因表达,效果接近基因敲除技术,目前已成为探索基因功能的重要研究手段<sup>[13-14]</sup>。

基因治疗软骨损伤是传送目的基因至预定靶细胞,并且直接表达该基因的性质,达到修复治疗软骨损伤的目的。其中,基因载体是传递目的基因进入靶细胞的介导工具。慢病毒载体属于一种新型的逆转录病毒基因转染系统,慢病毒载体是以 HIV 病毒为基础,将基因组中的顺式作用元件和反式作用蛋白的序列进行分离,并且去除主要致病基因而成功构建,所以经过上述改造后已具有极高的安全性。与其他病毒载体相比,慢病毒最大的优势在于可以同时感染处于分裂期和非分裂期的细胞,而且转染效率较高,免疫原性低,不易诱发宿主免疫反应,可以容纳较大的外源性基因,目的基因可以整合到宿主细胞的基因组中得到较长时间的稳定表达<sup>[15-16]</sup>。在目前所使用的病毒载体中,慢病毒被认为是进行 RNA 干扰最合适的首先载体<sup>[17]</sup>。

因此,本实验通过构建小鼠 SOX9 基因沉默的慢病毒载体,高效转染小鼠骨髓间充质细胞达到 SOX9 基因被敲减。这为进一步研究 SOX9 基因促进骨髓间充质细胞成软骨分化的作用机制以及为临床治疗骨关节炎奠定了实验基础<sup>[18]</sup>。

#### 参考文献

- [1] 赵建宁,王瑞. 关节软骨损伤的修复和重建[J]. 中国骨伤, 2007, 20(11): 729-731.  
Zhao JN, Wang R. The repair and reconstruction of the articular cartilage injury[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2007, 20(11): 729-731. Chinese.
- [2] Fautrel B, Hilliquin P, Rozenberg S, et al. Impact of osteoarthritis: results of nationwide survey of 10,000 patients consulting for OA [J]. Joint Bone Spine, 2005, 72(3): 235-240.
- [3] Pearle AD, Warren RF, Rodeo SA. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis[J]. Clin Sports Med, 2005, 24(1): 1-12.
- [4] Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, et al. Cartilage tissue engineering: its potential and uses[J]. Curr Opin Rheumatol, 2006, 18(1): 64-73.
- [5] Mehlhorn AT, Schmal H, Kaiser S, et al. Mesenchymal stem cells maintain TGF-beta-mediated chondrogenic phenotype in alginate bead culture [J]. Tissue Eng, 2006, 12(6): 1393-1403.
- [6] Mi Z, Ghivizzani SC, Lechman E, et al. Adverse effects of adenovirus-mediated gene transfer of human transforming growth factor beta 1 into rabbit knees[J]. Arthritis Res Ther, 2003, 5(3): R132-R139.
- [7] Wegner M. From head to toes; the multiple facets of SOX proteins [J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(6): 1409-1420.
- [8] Bi W, Deng JM, Zhang Z, et al. SOX9 is required for cartilage formation[J]. Nat Genet, 1999, 22(1): 85-89.
- [9] Lefebvre V, Smits P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation[J]. Birth Defects Res Embryo Today, 2005, 75(3): 200-212.
- [10] Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis[J]. J Cell Biochem, 2006, 97(1): 33-44.
- [11] Murakami S, Kan M, Mckeehan WL, et al. Up-regulation of the chondrogenic SOX9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(3): 1113-1118.
- [12] Mahmood-ur-rahman, Ali I, Husnain T, et al. RNA interference: the story of gene silencing in plants and humans[J]. Biotechnol Adv, 2008, 26(3): 202-209.
- [13] Agami R. RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy[J]. Curr Opin Chem Biol, 2002, 6(6): 829-834.
- [14] 胡明, 马远征, 李大伟, 等. 慢病毒介导的 RNA 干扰技术构建人胚椎间盘髓核上皮膜蛋白-1 基因低表达细胞模型[J]. 中国骨伤, 2012, 25(10): 842-845.  
Hu M, Ma YZ, Li DW, et al. Construction of epithelia membrane protein 1 gene-deficient in human fetal nucleus pulposus cell model by lentivirus-mediated RNA interference[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(10): 842-845. Chinese with abstract in English.
- [15] Relph K, Harrington K, Pandha H. Recent developments and current status of gene therapy using viral vectors in the United Kingdom[J]. BMJ, 2004, 329(7470): 839-842.
- [16] Pandya S, Klimatcheva E, Planelles V. Lentivirus and foamy virus vectors: novel gene therapy tools[J]. Expert Opin Biol Ther, 2001, 1(1): 17-40.
- [17] Sumimoto H, Kawakami Y. Lentiviral vector-mediated RNAi and its use for cancer research[J]. Future Oncol, 2007, 3(6): 655-664.
- [18] 杨自权, 何俊仁, 李刚, 等. SOX9 基因转染对骨髓间充质干细胞成软骨分化的影响[J]. 中华风湿病学杂志, 2008, 12(7): 445-448.  
Yang ZQ, He JR, Li G, et al. Chondrogenesis of rabbit mesenchymal stem cells by overexpressing SOX9 gene[J]. Zhonghua Feng Shi Bing Xue Za Zhi, 2008, 12(7): 445-448. Chinese.

(收稿日期: 2012-12-18 本文编辑: 连智华)