·论　著·

RNA 干扰 Axin2 对大鼠骨髓基质干细胞的成骨分化表达的影响*

张　磊，张　柳△，高建清，田发明，韩大成，牛军强，刘晓宁
（华北煤炭医学院附属医院骨科，河北唐山 063000）

摘　要：目的　通过对大鼠 Axin2 基因的 RNA 干扰（RNAi），探讨 Axin2 对大鼠骨髓基质干细胞（BMSCs）向成骨细胞分化过程的影响。**方法**　取 6 周龄雌性 SD 大鼠双侧股、胫骨骨髓细胞，采用全骨髓培养法进行原代和传代培养。细胞传 2 代后实验组进行 Axin2 mRNA 干扰质粒转染，对照组进行阴性干扰质粒转染。转染 48 h 后换用成骨诱导分化培养基。诱导分化 28 d 后用 von Kossa 方法进行细胞外基质矿化染色。采用适时定量聚合酶链反应（RQ-PCR）技术检测诱导分化后第 7、14 天 β-catenin、骨钙素（OCN）、frizzled-2、Lef-1、Wnt5a mRNA 的表达水平。**结果**　对照组大鼠 BMSCs 经体外诱导后分化为具备矿化细胞外基质能力的成熟成骨细胞，而实验组 BMSCs 成骨分化不全；RQ-PCR 检测显示，诱导分化后第 7 天实验组 β-catenin、frizzled-2 mRNA 表达水平显著低于对照组，而 OCN、Lef-1、Wnt5a mRNA 表达水平显著高于对照组；诱导分化后第 14 天实验组 frizzled-2、Lef-1 和 Wnt5a mRNA 表达水平均显著高于对照组（$P<0.05$）。**结论**　对大鼠 BMSCs Axin2 进行 RNAi 后，BMSCs 向成骨细胞分化晚期细胞外基质矿化能力减弱。

关键词：成骨细胞；RNA 干扰；干细胞；Wnt 信号转导途径
doi：10.3969/j.issn.1671-8348.2011.22.009　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1671-8348(2011)22-2208-03

Effect of RNAi of Axin2 on osteogenic differentiation and mRNA expression of rat bone marrow stromal cells*

Zhang Lei, Zhang Liu△, Gao Jianqing, Tian Faming, Han Dacheng, Niu Junqiang, Liu Xiaoning
(*Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of North China Coal Medical College, Tangshan, Hebei* 063000, *China*)

Abstract: Objective　To study the effect of Axin2 on osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells (BMSCs) of rats by RNA interference. **Methods**　BMSCs derived from the tibia and femur of 6-week old female SD rats were cultured in vitro. After the second passage, the cells in experimental group were transfected with the RNAi plasmid targeting on Axin2 and the cells in control group were transfected with the negative control plasmid. 48 hours later, all the cells were treated with osteogenic inductive DMEM. Von Kossa staining was applied at 28 days later to assess extracellular matrix mineralization. Real time quantitative-PCR was performed to evaluate the expressions of β-catenin, OCN, frizzled-2, Lef-1 and Wnt5a mRNA at day 7 and day 14 after osteogenic induction. **Results**　Cells in control group were differentiated into osteoblast lineage, as shown by mineralization of extracellular matrix but not in experimental group. Compared with control group, the expressions of β-catenin and frizzled-2 mRNA were significantly lower and OCN, Lef-1 and wnt5a mRNA expression were significantly higher in experimental group at day 7. The expressions of frizzled-2, Lef-1 and Wnt5a mRNA in experimental group were significantly higher than those in control group at day 14 ($P<0.05$). **Conclusion**　When RNAi targeting the mRNA of Axin2 is performed, the ability of extracellular matrix to mineralize decreases in the late process of the osteogenic differentiation of BMSCs.

Key words: osteoblasts; RNA interference; stem cells; wnt signaling

近年随着骨组织工程研究的不断深入，具有多向分化潜能的骨髓基质干细胞（bone marrow stromal cells，BMSCs）因取材容易、增殖能力强越来越受到关注，并逐渐成为骨组织工程中首选的种子细胞，在体外诱导培养具有成骨活性的 BMSCs 是骨组织工程研究的关键。Wnt 信号途径与成骨细胞的分化成熟密切相关，最新报道证实 Wnt 通路参与调控成骨细胞的分化和成熟[1]。本研究利用已建立的大鼠 BMSCs 体外培养模型[2]，在诱导其成骨分化同时对 Axin2 进行 RNA 干扰（RNA interference，RNAi），从而探讨 Axin2 基因沉默对 BMSCs 向成骨细胞分化过程以及 Wnt 信号途径的影响。

1　材料与方法

1.1　材料　6 周龄雌性 SD 大鼠（北京维通利华实验动物养殖中心提供）。

1.2　方法

1.2.1　BMSCs 的培养　将 6 周龄雌性 SD 大鼠颈椎脱位法处死后，于无菌条件下取出双侧股、胫骨，去除双侧干骺端，以 5 mL 注射器针头用高糖 DMEM（美国 GIBCO 公司）冲洗骨髓腔，收集骨髓细胞于 50 mL 离心管中。1 000 r/min 离心 10 min，弃上清液，加入完全培养基[含青霉素 100 μg/mL、链霉素 100 μg/mL 和 10%的胎牛血清（天津 TBD 公司）的普通高糖 DMEM]，重悬后计数有核细胞，并接种细胞于培养瓶中，置37 ℃含体积分数 5% CO_2 的湿化气孵育箱行原代培养。3 d 后换液，以后每 3 天全量换液，红细胞不贴壁死亡或随换液弃去。原代培养至第 10 天细胞汇合成单层后传代。用磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline，PBS）洗 2 次，0.05%胰蛋白酶消化后，加入适量完全培养基重悬细胞接种于培养瓶或培养板中。

1.2.2　BMSCs 的转染与诱导分化　细胞传 2 代后，细胞融汇达到 90%～95%时，实验组用 LipofectMINE 2000（INVITROGEN 公司）介导转染 Axin2 mRNA 干扰质粒（上海吉玛制药技术有限公司），对照组转染阴性干扰质粒（上海吉玛制药技术有限公司），操作步骤按说明书进行。转染 48 h 后，实验组及对照组均换用诱导分化培养基（加入维生素 C 50 μg/mL，β-甘油磷酸钠 10 mmol/L、地塞米松 10^{-8} mmol/L 的完全培养基）。维生素 C、β-甘油磷酸钠和地塞米松均为美国 SIGMA 公司产品。

1.2.3　von Kossa 染色　细胞诱导分化后第 28 天，采用 von Kossa 方法进行细胞外基质矿化染色。取已接种细胞的 6 孔板，用 PBS 冲洗，4%多聚甲醛固定 5 min，加入 5%硝酸银溶液，开盖在紫外灯下照射 1 h，加入 5%硫代硫酸钠溶液中和残

* **基金项目：**河北省自然科学基金资助项目（C200600580）。
△ **通讯作者，**Tel：13313059881；E-mail：zhliu130@sohu.com。

留的硝酸银溶液，室温晾干，4 ℃保存。

1.2.4 适时定量聚合酶链反应（real time quantitative-PCR，RQ-PCR） 细胞于诱导分化后第 7 天和第 14 天，采用 Trizol（美国 INVITROGEN 公司）一步法提取细胞总 RNA。M-MLV 法逆转录合成 CONA，最后在冰上冷却后进行后续试验或于－70 ℃保存备用。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

基因	引物	
Axin2	正义	5′-CAAGGGCCAGGTCACCAA-3′
	反义	5′-CCCCCAACCCATCTTCGT-3′
β-catenin	正义	5′-TGCAGCGACTAAGCAGGA-3′
	反义	5′-TCACCAGCACGAAGGACA-3′
骨钙素(OCN)	正义	5′-AAGCCCAGCGACTCTGAGTCT-3′
	反义	5′-AGGTAGCGCCGGAGTCTATTC -3′
frizzled-2	正义	5′-TGGGCACACGAACCAAG-3′
	反义	5′-AGCGTACATGGAGCACAGG -3′
Lef-1	正义	5′-TCCAGGTTTTCCCATCACA-3′
	反义	5′-CTGTTCGTGCTCAGGCTTC-3′
Wnt5a	正义	5′-GCTTCAACTCCCCAACCA-3′
	反义	5′-CTCGCAGCCGTCCATC-3′
β-actin	正义	5′-TGACGAGGCCCAGAGCAAGA-3′
	反义	5′-ATG GGCACAGTGTGGGTGAC-3′

根据目的基因在 GenBank 中的已知序列，采用 Primer5.0 设计引物，引物序列见表 1，引物均由上海生工公司合成。选择 25 μL PCR 反应体系，加入各反应成分：上、下游引物（10 μmol/L）各 0.5 μL，模板 cDNA 1.5 μL，双蒸水（ddH_2O）10 μL，SYBR Green（日本东洋纺公司）12.5 μL，采用三步法进行 PCR 反应。反应条件均为预变性 95 ℃、3 min，1 个循环；95 ℃、15 s，60 ℃、20 s，35 个循环。反应结束后，使用 Rotor-Gene 6.1.0.81 软件（Corbett Research 公司）分析 PCR 过程，检测样本的循环阈（threshold cycle，Ct）值，Ct 值随模板浓度增大而减少。以 β-actin 为对照内参基因，软件自动得出△Ct、△△Ct 及 2－△△Ct 数值。由熔解曲线判断 PCR 反应的特异性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用单因素方差分析，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞形态学观察 倒置相差显微镜观察诱导分化后第 7 天实验组细胞生长稀疏、增大，实验组与对照组细胞形态相似，长梭形居多，少数是小圆形或三角形，见封 4 图 1。

2.2 细胞外基质矿化染色 BMSCs 诱导分化后第 28 天，对 6 孔板中细胞外基质进行 von Kossa 染色，见封 4 图 2。对照组细胞外基质可见点状及片状钙沉积，而实验组未见细胞外基质矿化。

表 2 BMSCs 诱导分化后第 7 天 RQ-PCR 检测结果（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

组别	β-catenin	OCN	frizzled-2	Lef-1	Wnt5a
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
实验组	0.40±0.10*	2.56±0.33*	0.57±0.14*	11.36±5.07*	2.13±0.74*

*：$P<0.05$，与对照组比较。

2.3 RQ-PCR 检测结果 BMSCs 诱导分化后第 7 天实验组 β-catenin、frizzled-2 mRNA 表达水平显著低于对照组，而 OCN、Lef-1、Wnt5a mRNA 表达水平显著高于对照组；诱导分化后第 14 天实验组 frizzled-2、Lef-1 和 Wnt5a mRNA 表达水平均显著高于对照组，差异均有统计学意义（$P<0.05$），见表 2、3。

表 3 BMSCs 诱导分化后第 14 天 RQ-PCR 检测结果（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

组别	β-catenin	OCN	frizzled-2	Lef-1	Wnt5a
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
实验组	1.11±0.68	0.31±0.29	8.53±3.57*	15.77±6.18*	1.97±1.08*

*：$P<0.05$，与对照组比较。

3 讨 论

BMSCs 具有不断自我增殖和在特定条件下定向分化的特性，在一定条件下可以向成骨细胞、软骨细胞和神经元样细胞等分化[3-4]；而在 BMSCs 向不同的细胞分化过程中均伴有特异性标志物水平的上调。细胞外基质矿化能力是成骨细胞成熟的标志。本实验中对矿化结节的检测提示 BMSCs 的成骨分化诱导成功，这与本课题组先前的研究结果一致[5]。

在 BMSCs 向成骨细胞分化过程中，有若干相关信号转导途径参与，以往的研究多侧重于转化生长因子-β 信号转导途径[6]，而最新研究证实 Wnt 信号途径和成骨细胞的分化以及骨折的愈合密切相关[1,7]。Wnt 蛋白家族是由 Wnt 基因编码的一类信号分子，这类基因编码一组富含半胱氨酸的分泌型糖蛋白，构成 Wnt 分子家族。目前，在脊椎动物中至少发现有 19 种亚型，Wnt5a 就是其中之一。有研究发现，Wnt5a 能够以不依赖 GSK3b 的方式降解 β-catenin，从而调节经典 Wnt 信号途径。Wnt 受体是存在于细胞膜上的一类 7 次跨膜受体，称 frizzled 受体家族，LRP-5 与其组成共受体。Wnt 蛋白与 frizzled 受体结合后，将信号传入细胞内。Wnt/β-catenin 途径称为“经典途径”。β-catenin 是存在于细胞浆内的一类大分子，缺乏 Wnt 信号刺激时，其被降解；当 Wnt 蛋白和 frizzled 受体结合后，Wnt 信号途径激活，通过一系列反应抑制其降解，使其在胞浆内的浓度升高，并进入细胞核内，与转录因子（包括 Lef-1）结合后调控目的基因的转录[8-11]。Axin 可存在于许多生物体内，参与构成 β-catenin 降解复合物，目前发现 Axin 家族有两个成员，即 Axin（Axin1）及其同源物 Axil（Axin like），又称 conductin 或 Axin2[12]。

Wnt 信号途径通过调节成骨细胞的增殖、分化和功能而影响个体出生后的骨组织生长和发育[13]。最新研究显示，同时对 β-catenin 与 LRP-5 进行 RNAi 后，抑制 Wnt 信号途径的活性，下调人 BMSCs 向成骨细胞分化过程中碱性磷酸酶的表达，并上调其他成骨细胞标志物的表达[14]。本实验中，对 Axin2 进行 RNA 干扰后，多种检测基因 mRNA 的表达发生显著改变，且个别基因在两个时间点表达趋势也不一致。诱导分化 7 d，实验组 β-catenin 下调，可能是由于干扰 Axin2 后胞浆内具有功能活性并进入胞核内的 β-catenin 增加导致自身反馈性 mRNA 表达的降低。作为 β-catenin 核内结合位点之一，转录因子 Lef-1 在两个时间点均表达上调，可能也与核内 β-catenin 增加相关。而促进 β-catenin 降解的 Wnt5a 表达在两个时间点均上调可能与 β-catenin 功能活性增加后反馈性引起 Wnt5a mRNA 表达上调有关。OCN 和 frizzled-2 的表达在两个时间点表达趋势相反，说明在 BMSCs 成骨分化的不同阶段，该基因的功能并非完全一致。已有研究表明 Wnt 信号途径在成骨细胞分化的早、中期起不同的作用[15]。

von Kossa 染色结果表明，对照组细胞外基质矿化良好，已分化为成熟的成骨细胞，而实验组细胞外基质矿化不良，提示抑制 Axin2 的表达后能够抑制成骨细胞的成熟。最新研究证实，下调 Wnt 信号途径活性能够促进 BMSCs 向肝细胞分化[16]，本实验对 Axin2 进行 RNAi 后抑制 BMSCs 的成骨分化，也可能与此有关。

当然，本实验仅为 mRNA 水平检测，而非具有生物活性功能的蛋白水平检测，二者的表达时期通常不一致。因此上述检测基因在成骨分化过程中的作用尚有待进一步研究。另外，每个信号途径在调节细胞分化成熟的过程中都存在联系，相互调节。最近研究已经证实转化生长因子-β 信号途径和 Wnt 信号途径密切相关[17-18]，Axin2 基因敲除小鼠的 BMP2 及 BMP6 表达升高[19]。

综上所述，包括 Axin2 在内的多个 Wnt 信号途径部分信号分子和相关基因均可能参与 BMSCs 的成骨分化，如能深入研究并确定有效基因靶点作为骨组织工程学研究的切入点，通过基因沉默或加强个别基因的表达促进 BMSCs 的成骨分化和矿化对骨组织工程学研究及其相关疾病的治疗具有重要意义。

参考文献：

[1] Shahnazari M, Yao W, Corr M, et al. Targeting the Wnt signaling pathway to augment bone formation[J]. Curr Osteoporos Rep, 2008, 6(4): 142-148.

[2] Pettit AR, Ji H, Von Stechow D, et al. TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis[J]. Am J Pathol, 2001, 159(5): 1689-1699.

[3] Derubeis AR, Cancedda R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances[J]. Ann Biomed Eng, 2004, 32(1): 160-165.

[4] 高明勇，郑启新，肖建德，等. 胚胎源脊髓组织诱导骨髓基质干细胞向神经元样细胞的分化[J]. 中华实验外科杂志，2007，24(7)：841-842.

[5] 田发明，张柳，孟亚强，等. 辛伐他汀对大鼠骨量及骨髓基质干细胞增殖、分化的影响[J]. 中国骨质疏松杂志，2007，13(8)：580-584，595.

[6] Wong RW, Rabie AB. Statin-induced osteogenesis uses in orthodontics: a scientific review[J]. World J Orthod, 2006, 7(1): 35-40.

[7] Silkstone D, Hong H, Alman BA. Beta-catenin in the race to fracture repair: in it to Wnt[J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2008, 4(8): 413-419.

[8] Sakanaka C, Leong P, Xu L, et al. Casein kinase iepsilon in the wnt pathway: regulation of beta-catenin function[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(22): 12548-12552.

[9] Behrens J, Jerchow BA, Wuertele M, et al. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC and GSK3beta[J]. Science, 1998, 280(5363): 596-599.

[10] Behrens J, Von Kries JP, Kuhl M, et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1[J]. Nature, 1996, 382(6592): 638-642.

[11] DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2000, 8(5): 309-334.

[12] Thomas DM, Carty SA, Piscopo DM, et al. The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation[J]. Mol Cell, 2001, 8(2): 303-316.

[13] Nakashima K, de Crombrugghe B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation[J]. Trends Genet, 2003, 19(8): 458-466.

[14] Ilmer M, Karow M, Geissler C, et al. Human osteoblast-derived factors induce early osteogenic markers in human mesenchymal stem cells[J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(9): 2397-2409.

[15] Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases[J]. Gene, 2004, 341: 19-39.

[16] Ke Z, Zhou F, Wang L, et al. Down-regulation of Wnt signaling could promote bone marrow-derived mesenchymal stem cells to differentiate into hepatocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 367(2): 342-348.

[17] Guo X, Ramirez A, Waddell DS, et al. Axin and GSK3-control Smad3 protein stability and modulate TGF-signaling[J]. Genes Dev, 2008, 22(1): 106-120.

[18] Dao DY, Yang X, Chen D, et al. Axin1 and Axin2 are regulated by TGF-and mediate cross-talk between TGF-and Wnt signaling pathways[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1116: 82-99.

[19] Liu B, Yu HM, Hsu W. Craniosynostosis caused by Axin2 deficiency is mediated through distinct functions of beta-catenin in proliferation and differentiation[J]. Dev Biol, 2007, 301(1): 298-308.

（收稿日期：2011-03-04　修回日期：2011-04-31）

（上接第 2207 页）

[9] Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, et al. The release of cytochrome C from mitochondria a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis[J]. Science, 1997, 275(5303): 1132-1136.

[10] Han ME, Lee YS, Baek SY, et al. Hedgehog signaling regulates the survival of gastric cancer cells by regulating the expression of bcl-2[J]. Int J Mol Sci, 2009, 10(7): 3033-3043.

[11] Yoo J, Jung JH, Lee MA, et al. Immunohistochemical analysis of non-small cell lung cancer: correlation with clinical parameters and prognosis[J]. J Korean Med Sci, 2007, 22(2): 318-325.

[12] 刁晓源，余红，张程，等. 肺癌 Stat3、bcl-2 表达的临床研究[J]. 重庆医学，2008，37(10)：1072-1074.

[13] Kim HS, Shiraki K, Park SH. Expression of surviving in CIN and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix[J]. Anticancer Res, 2002, 22(2): 805-808.

[14] Tsamandas AC, Kardamakis D, Tsiamalos P, et al. The potential role of bcl-2 expression, apoptosis and cell proliferation (Ki-67 expression) in cases of gastric carcinoma and correlation with classic prognostic factors and patient outcome[J]. Anticancer Res, 2009, 29(2): 703-709.

[15] Wu YL, Zheng JS, Cai QF, et al. Expression of Survivin, Bcl-2, Bax in gastric carcinoma and its clinical significance[J]. World J Gastroenterol, 2008, 29(14): 1292-1294.

（收稿日期：2011-03-09　修回日期：2011-04-22）