

论著·基础研究

# uPA-siRNA 重组慢病毒载体感染兔软骨细胞对 uPA 和 MMP-3 表达的影响\*

史晨辉<sup>1,2</sup>, 王维山<sup>1,2</sup>, 李长俊<sup>2</sup>, 张振东<sup>2</sup>, 郭风劲<sup>1</sup>, 陈安民<sup>1△</sup>

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科, 武汉 430030;

2. 石河子大学医学院附属医院骨科, 新疆石河子 832008)

**摘要:**目的 靶向特异尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)-siRNA 慢病毒表达载体并加载绿色荧光蛋白(GFP)后转染软骨细胞,观察其对软骨细胞表达 uPA 和基质金属蛋白酶 3(MMP-3)的影响。方法 培养软骨细胞并根据实验分为实验组(转染 uPA-siRNA 慢病毒载体)、空载体组(转染空慢病毒载体)、空白对照组(未进行任何处理)和 TIMP 组(加载 MMP 特异性抑制剂 TIMP)。实验组:uPA-siRNA 序列经慢病毒包装并加载 GFP,通过 Lipofectamine 2000 转染入兔软骨细胞;空载体组:将慢病毒载体通过 Lipofectamine 2000 转染入兔软骨细胞;空白对照组正常培养软骨细胞;药物对照组:培养基中加特异性 MMP 抑制剂。所有细胞培养 96 h 后应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)法分别检测软骨细胞 uPA mRNA、MMP-3 mRNA 和蛋白的表达水平。结果 慢病毒载体可成功转染到原代软骨细胞中,在感染复数(MOI)为 100 时转染率达到 85%以上。实验组 uPA mRNA、uPA 蛋白和 MMP-3 mRNA 及 MMP-3 蛋白的表达水平显著低于空载体组和空白对照组( $P < 0.01$ ),而与药物干预组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 uPA-siRNA 慢病毒载体负载 GFP 可稳定转染软骨细胞并高效抑制 uPA 基因、蛋白表达,同时对 MMP-3 基因、蛋白表达也呈现高效抑制作用。抑制 uPA 的水平可降低显著 MMP-3 表达。

**关键词:**RNA, 小分子干扰;慢病毒载体;软骨细胞;尿激酶型纤溶酶原激活物;基质金属蛋白酶 3

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.15.024

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)15-1892-04

## Effect of expression of uPA and MMP-3 in rabbit chondrocyte mediated by uPA-siRNA lentiviral vector\*

Shi Chenhui<sup>1,2</sup>, Wang Weishan<sup>1,2</sup>, Li Changjun<sup>2</sup>, Zhang Zhendong<sup>2</sup>, Guo Fengjing<sup>1</sup>, Chen Anmin<sup>1△</sup>

(1. Department of Orthopaedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China; 2. Department of Orthopaedics,

Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832008, China)

**Abstract:** Objective To construct recombinant lentiviral vector carrying small interfering RNA against uPA gene with expressing reporter gene GFP, and to observe its effect on the expression of uPA and MMP-3 in chondrocytes. **Methods** siRNAs against uPA mRNA were designed and chemically synthesized. Recombinant lentiviral vector with uPA-siRNA and reporter gene GFP was constructed. Rabbit chondrocytes were cultured and randomized into four groups: for uPA-siRNA transfection group: recombinant lentiviral vector with uPA-siRNA and GFP gene was transfected into chondrocytes using lipofectamine 2000; for empty vector transfection group: empty lentiviral vector was transfected into chondrocytes; for non transfection group: chondrocytes were cultured without any treatment; for MMP inhibitor group: chondrocytes were cultured with MMP inhibitor TIMP. The mRNA and protein expression levels of uPA and MMP-3 of chondrocytes were determined by RT-PCR and Western blot after 96 h of treatment in all groups respectively. **Results** Recombinant lentiviral vector carrying uPA-siRNA and reporter gene GFP was constructed and transfected into primary chondrocytes successfully. The transfection efficiency was more than 85% when multiplicity of infection (MOI) was 100. The mRNA and protein expression levels of uPA were significantly decreased in uPA-siRNA transfection group compared to three other groups ( $P < 0.01$ ). MMP-3 mRNA and protein levels were also down-regulated in uPA-siRNA transfection group compared to empty-vector group and non-transfection group ( $P < 0.01$ ). However, only decreased mRNA level of MMP-3 was obtained when compare uPA-siRNA transfection group to MMP inhibitor group ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference of MMP-3 protein level between uPA-siRNA transfection group and MMP inhibitor group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Recombinant lentiviral vector carrying uPA-siRNA and GFP gene can transfect primary chondrocytes successfully and inhibit uPA gene expression and protein level as well as MMP-3 in chondrocytes efficiently. Low level of uPA could down regulate the expression of MMP-3.

**Key words:** RNA, small interfering; lentiviral vector; chondrocytes; urinary plasminogen activator; matrix metalloproteinase 3

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种以关节软骨退行性改变和软骨下骨代谢异常为主要病理特征,伴随有关节周围骨赘

形成、关节周围软组织挛缩、关节滑膜炎性反应的关节疾患,其以关节疼痛、功能障碍为主要临床表现<sup>[1]</sup>。目前研究表明,OA

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30960387, 81260453);兵团医药卫生专项基金(2013BA020);兵团国际交流合作基金(2011BC004, 2012BC002)。作者简介:史晨辉(1961—),教授,博士在读,主要从事骨关节疾病基础与临床研究。△ 通讯作者, Tel: (027) 83662688; E-mail: anminchen@tjh.tjmu.edu.cn。

病变与年龄、性别、肥胖、创伤、遗传等多因素有关,但是软骨组织的降解大于合成造成软骨渐进性退变是其最基本的病理改变<sup>[2]</sup>。在软骨降解过程中,尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator receptors, uPA)和基质金属蛋白酶 3(matrix metalloproteinase, MMP-3)发挥着极其重要的作用<sup>[3-4]</sup>。有研究表明, uPA 可激活软骨组织及滑膜组织分泌的无活性的前体 MMP-3(Pro-MMP-3),然后同活性 MMP-3 共同作用于软骨组织中胶原蛋白的裂解,因此,抑制软骨组织及滑膜组织表达 uPA 可能是 OA 防治的一个途径<sup>[5]</sup>。目前,较为成熟的 RNA 干扰(RNAi)技术可抑制靶基因的表达而达基因沉默效应。但通过 RNAi 技术抑制 uPA 间接降低 MMP-3 表达的研究尚未见文献报道。本课题组在筛选 uPA-siRNA 靶向序列的基础上,通过慢病毒包装并加载 GFP,观察其感染软骨细胞后对细胞表达 uPA、MMP-3 基因和蛋白的影响,以期为进一步研究 uPA 在 OA 病变中的防治作用提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与试剂** 2 月龄新西兰兔取自新疆医科大学实验动物中心, uPA-siRNA 序列由本实验室保存。Lentivirus-NC 病毒液和 pGLV-H1-GFP + Puro 载体购自上海吉玛公司。BamHI、EcoRI 内切酶购自 MBI Fermentas 公司, Lipofectamine 2000 转染试剂、Trizol 试剂、DMEM/F12 培养基均购自 Invitrogen 公司。Taq 酶、质粒抽提试剂盒购自 Takara 公司, uPA 和 MMP-3 抗体均购自 Abcam 公司。引物合成:采用 Oligo6.0 软件设计 uPA、MMP-3 及内参基因  $\beta$ -actin 检测引物,由上海生工生物技术有限公司合成。

**1.2 方法** 取原代生长良好的兔膝关节软骨细胞以每孔  $1.2 \times 10^4$  个细胞传代接种于 24 孔培养板中进行常规培养,当软骨细胞汇合至 50% 以上时,按照感染复数(MOI)值为 1、10 和 100 的病毒细胞比加入慢病毒颗粒液,共同培养 96 h 后在荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况,确定最佳 MOI 值。并用图像分析软件 Image-Pro Plus6.0 分析病毒转染效率。

根据实验以最佳 MOI 值的 uPA-siRNA 转染组设立为实验组(转染 uPA-siRNA 慢病毒载体),同时设立不加病毒的空白对照组(未进行任何处理)、空载体组(转染慢病毒载体)和药物干预组[加载 MMP 特异性抑制剂(TIMP)]。实验组:uPA-siRNA 序列经慢病毒包装并加载 GFP,通过 Lipofectamine 2000 转染入兔软骨细胞;空载体组:将慢病毒载体通过 Lipofectamine 2000 转染入兔软骨细胞;空白对照组正常培养软骨细胞;药物对照组:给予特异性 MMP 抑制剂。所有细胞培养 96 h 后应用实时定量-聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western blot 法分别检测软骨细胞 uPA mRNA、MMP-3 mRNA 和蛋白的表达水平。PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离,应用 Bio-Rad 凝胶成像系统照相,以及 Quantity One 软件分析图像, mRNA 的相对表达量以扩增产物条带的光密度值与  $\beta$ -actin 条带吸光度值之比表示。Western blot 经 X 线片在凝胶成像系统扫描,采用 Quantity one 软件分析图像,以 GAPDH 作为内参。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析和  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 慢病毒转染效率的检测** 利用倒置荧光显微镜观察 4 个序列慢病毒载体在不同 MOI 时对 293T 细胞和软骨细胞的转染效率。随着 MOI 的增加,慢病毒的转染效率也随之增加,当 MOI 为 100 时,转染效率可达 85% 以上,符合后续实验要求,见图 1。

**2.2 软骨细胞 uPA mRNA 和 MMP-3 mRNA 检测** 应用相对 RT-PCR 以  $\beta$ -actin 作为内参照,实验结果采用标准曲线分析法进行数据分析。结果显示,实验组 uPA mRNA 和 MMP-3 mRNA 表达水平显著降低,而空载体组、空白对照组和 TIMP 组 uPA mRNA、MMP-3 mRNA 表达量较高( $P < 0.01$ )。空载体组与空白对照组间 uPA mRNA、MMP-3 mRNA 表达比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 2。

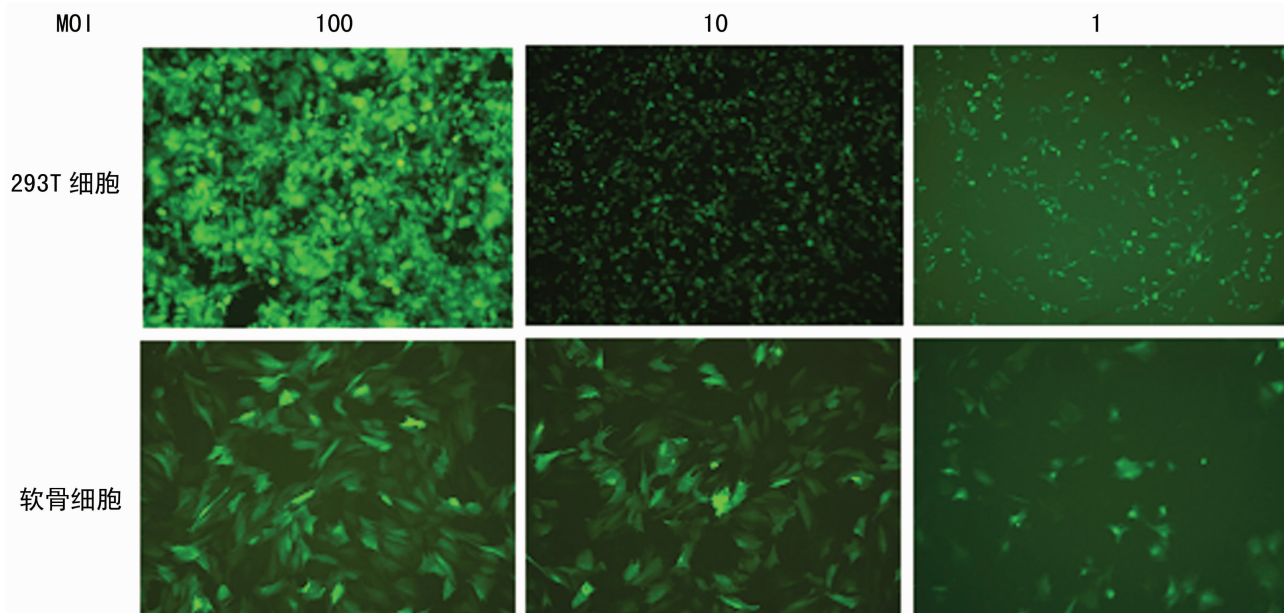


图 1 慢病毒在不同 MOI 值下转染 293T 细胞、软骨细胞 72 h 后的荧光图(免疫荧光法,  $\times 200$ )

**2.3 软骨细胞 uPA 和 MMP-3 蛋白检测** 实验组 uPA 和 MMP-3 蛋白表达水平显著降低,而空载体组和空白对照组

uPA、MMP-3 蛋白表达量较高( $P < 0.01$ ),实验组与 TIMP 组之间 uPA 蛋白表达差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),而 MMP-3 蛋白表达无明显差异统计学意义( $P > 0.05$ ),表明抑制 uPA 表

达可降低 MMP-3 蛋白表达水平,而 TIMP 对 uPA 表达无影响,见图 3、4。

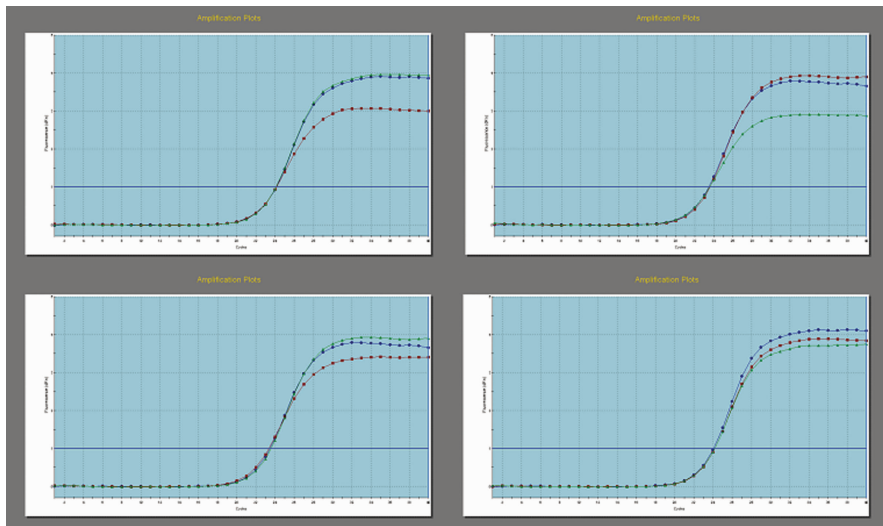
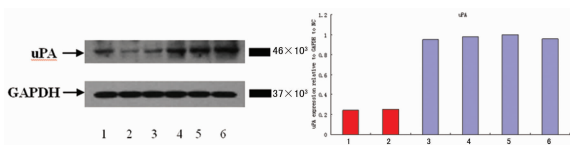
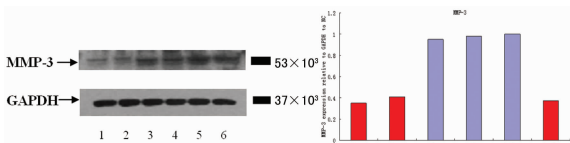


图 2 uPA PCR 扩增曲线及转染后软骨细胞 uPA、MMP-3 基因表达水平



1: TIMP 组; 2: uPA-V-TIMP 组; 3: 实验组; 4: 空载体组; 5: 生理盐水组; 6: 空白对照组。

图 3 uPA 蛋白表达水平



1: TIMP 组; 2: uPA-V-TIMP 组; 3: 实验组; 4: 空载体组; 5: 生理盐水组; 6: 空白对照组。

图 4 MMP-3 蛋白表达水平

### 3 讨论

随着社会老龄化的加重及人口平均寿命的延长,OA 已经成为严重影响中老年生活质量的疾病之一。研究表明,OA 以关节软骨组织的退行性改变伴随有关节周围新生骨的形成成为病理特点,以关节疼痛、功能障碍为临床表现,在 OA 病变过程中,软骨下骨也出现骨硬化、骨质疏松等代谢异常表现,其复杂的病理表现给 OA 的病因学研究带来了一定的困难。目前,人们普遍认为 OA 病理变化涉及软骨组织、软骨下骨及滑膜在内的所有关节结构部分,是组织创伤、代谢、基因、遗传和免疫等多因素作用的结果<sup>[2]</sup>。但是其最根本的病理变化是关节软骨组织的降解大于合成,软骨组织渐进性退化后出现关节疼痛、关节狭窄、关节畸形及功能障碍。在软骨组织的降解过程中,MMPs 由于其能广泛的降解胶原而发挥着主要的作用。MMPs 家族中对胶原裂解起重要的作用的酶是 MMP-3 和 MMP-13,但是在软骨组织收到内源性或外源性刺激后,软骨细胞和滑膜细胞首先分泌的是没有活性的 Pro-MMPs,Pro-MMPs 系统在 uPA 激活 Pro-MMP-3 为活性的 MMP-3 后出现瀑布样阶联放大效应,大量 MMPs 被激活从而参与软骨组

织的降解过程<sup>[6-7]</sup>;而在关节组织中存在天然 TIMP,其可抑制家族的裂解胶原功能,通常二者保持平衡状态,共同调节细胞外基质的降解与合成代谢。但是当内源性和外源性刺激物持续存在的情况下,MMPs 的分泌多于 TIMP 从而出现细胞外基质的降解过程。已有的文献证实<sup>[1,8-10]</sup>,软骨细胞和滑膜细胞分泌的 uPA 在 OA 早期病变中起着至关重要的作用,其不但可以促进滑膜组织大量分泌 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ ,后者参与滑膜炎性反应加重软骨降解代谢过程;也可以直接作用于软骨细胞外基质的降解;尤为重要的是 uPA 可以激活 MMP-3 酶原,使其活化活性增强 20 倍的蛋白降解酶,促进软骨组织胶原的降解,而 MMP-3 作为最好的催化剂,激活 Pro-MMP-1,2,13 等共同参与软骨组织的降解过程。因此,通过抑制滑膜组织和软骨组织中 uPA 的表达,可改善软骨组织中的降解性代谢过程,从而达到缓解或者改善 OA 早期软骨组织的病理变化。

RNAi 技术是近年来发展起来的高效基因沉默技术,当内外源性双链 RNA 进入细胞后可引起与其同源的 mRNA 特异性降解,进而抑制相应基因表达,是一种简单高效的代替基因敲除的新兴生物技术。目前,已经在基因功能的研究及部分基因治疗方面发挥了重要的作用<sup>[11-12]</sup>,研究证实 RNAi 基因沉默效果显著,应用微量的 siRNA 即可使其编码致病基因产物的含量降低 90% 以上,一定条件下甚至可达到基因完全敲除的效果。但目前研究的难度是 RNAi 表达载体在目的细胞中的转染,现有的化学方法、电转染、腺病毒载体法等均有转染效率低,转染稳定性差等问题。而慢病毒载体能够成功克服上述问题,可高效转染宿主细胞,尤其是对原代细胞和悬浮细胞等不易感染的细胞亦有较高的转染效率,且转染稳定,目的基因长时间沉默,能持久的发挥 RNA 干扰效应<sup>[13-14]</sup>。笔者构建的靶向 uPA-siRNA 慢病毒表达载体,转染软骨细胞的效率高达 85%,为进行 OA 病理机制与治疗等相关研究的奠定了重要基础。

Sato 等<sup>[10]</sup>研究证实,通过抑制组织中 uPA 的水平,可间接降低 MMP-3 的表达,从而减缓细胞外基质的降解过程。Korshunov 等<sup>[15]</sup>研究也表明,uPA 可快速高效激活 Pro-MMP-

3 为活性的 MMP-3, MMP-3 又可快速激活 Pro-MMP-9, 大量 MMP-3, 9 又可刺激细胞分泌更多的 uPA, 从而在细胞外基质降解病理过程中形成一个恶性循环, 通过早期干预, 抑制 uPA 的表达水平, 可显著减缓组织胶原的降解。笔者前期构建了靶向 uPA-shRNA 序列并进行慢病毒包装, 本研究在进行慢病毒包装时加载了 GFP, 转染软骨细胞后观察不同分组之间 uPA、MMP-3 基因和蛋白的表达水平, 结果显示 uPA-siRNA 慢病毒载体可高效转染软骨细胞, 其可显著抑制 uPA、MMP-3 基因和蛋白的表达水平, 而同期应用 MMP-3 抑制剂 TIMP 后, 其只抑制了 MMP-3 蛋白的表达, 对 uPA、MMP-3 基因和 uPA 蛋白的表达未产生任何影响, 进一步表明沉默 uPA 在 OA 病变早期基因治疗中的价值, 也间接证明 uPA 作为调控 MMP-3 表达的上游因子, 在 MMP-3 相关分子信号通路中发挥着极其重要的作用。笔者后续将通过动物实验进一步验证此项研究结果, 为进一步研究 uPA 基因在 OA 病变中的作用机制及其治疗作用奠定实验基础。

#### 参考文献:

- [1] Hochberg MC. Osteoarthritis year 2012 in review: clinical [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, 20(12): 1465-1469.
- [2] Loeser RF. Aging processes and the development of osteoarthritis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2013, 25(1): 108-113.
- [3] Abramson SB, Attur M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(3): 227-231.
- [4] Gepstein A, Arbel G, Blumenfeld I, et al. Association of metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, and proteoglycans with development, aging, and osteoarthritis processes in mouse temporomandibular joint [J]. *Histochem Cell Biol*, 2003, 120(1): 23-32.
- [5] Inuzuka K, Ogata Y, Nagase H, et al. Significance of coexpression of urokinase-type plasminogen activator, and matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) and 9 (gelatinase B) in colorectal carcinoma [J]. *J Surg Res*, 2000, 93(2): 211-218.
- [6] Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, et al. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a con-

verging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(19): 13066-13076.

- [7] Dreier R, Grassel S, Fuchs S, et al. Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 297(2): 303-312.
- [8] Murphy G, Atkinson S, Ward R, et al. The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1992, 667: 1-12.
- [9] Massicotte F, Lajeunesse D, Benderdour M, et al. Can altered production of interleukin-1beta, interleukin-6, transforming growth factor-beta and prostaglandin E(2) by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002, 10(6): 491-500.
- [10] Sato T, Tamai H, Kobayashi M, et al. Immunohistochemical properties in the patients with Buerger's disease—possible role of plasminogen activator inhibitor-1 for preservation of vessel wall architecture [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2011, 20(5): 266-271.
- [11] Jorgensen C, Apparailly F. Prospects for gene therapy in inflammatory arthritis [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2010, 24(4): 541-552.
- [12] 季丙元, 关晶. siRNA 抑制人乳腺癌 KLK6 基因表达的实验研究 [J]. *重庆医学*, 2011, 40(1): 33-35.
- [13] Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational [J]. *Biochem J*, 2012, 443(3): 603-608.
- [14] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry [J]. *Circ Res*, 2003, 92(8): 827-839.
- [15] Korshunov VA, Solomatina MA, Plekhanova OS, et al. Plasminogen activator expression correlates with genetic differences in vascular remodeling [J]. *J Vasc Res*, 2004, 41(6): 481-490.

(收稿日期: 2013-10-08 修回日期: 2013-12-11)

(上接第 1891 页)

#### 参考文献:

- [1] Bové J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease [J]. *Neuroscience*, 2012, 211: 51-76.
- [2] Zhang HX, Tao L, Jiao XY, et al. Nitrate thioresoxin inactivation as a cause of enhanced myocardial ischemia reperfusion injury in the aging heart [J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43(1): 39-47.
- [3] 许耀刚, 庞晓峰. MPTP 损伤的小鼠 PD 模型的制作与评价 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33(10): 74-75.
- [4] 李丽波, 王玉祥. 帕金森病 MPTP 模型小鼠两种行为学检测方法的比较研究 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2009, 30(15): 1641-1643.
- [5] Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxi-

dative stress [J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12(10): 1161-1208.

- [6] Rivera-Mancia S, Pérez-Neri I, Ríos C. The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases [J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 186(2): 184-199.
- [7] Jimenez-Del-Río M, Velez-Pardo C. The bad, the good, and the ugly about oxidative stress [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 156: 163-193.
- [8] Zhang HX, Tao L, Jiao XY, et al. Nitrate thioresoxin inactivation as a cause of enhanced myocardial ischemia reperfusion injury in the aging heart [J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43(1): 39-47.

(收稿日期: 2013-12-03 修回日期: 2014-02-07)