

沉默信息调节因子 2 在人骨关节炎软骨组织及细胞中的表达

饶先亮¹, 常俊¹, 方晓², 王涛², 尹宗生¹

摘要 **目的** 检测沉默信息调节因子 2 (SIRT2) 在人软骨中的表达, 探讨其在骨关节炎 (OA) 与正常软骨组织及细胞中表达的差异性。**方法** 选取临床 20 例骨关节炎关节软骨, 为 OA 组; 另取 10 例正常关节软骨, 为对照组。免疫荧光染色法检测 SIRT2 在两组软骨组织的表达分布及表达情况。分离软骨细胞并进行细胞传代培养, 甲苯胺蓝染色进行细胞鉴定, Western blot 法检测软骨组织及细胞中 SIRT2 的表达情况。**结果** 免疫荧光染色结果显示 SIRT2 表达于软骨组织中, 分布在细胞核与细胞质中, OA 组 SIRT2 阳性细胞率较对照组明显降低 ($P < 0.01$); Western blot 结果显示 OA 组软骨组织中 SIRT2 表达显著低于对照组 ($P < 0.01$), 软骨细胞

中 SIRT2 的表达亦显著低于对照组 ($P < 0.01$)。**结论** SIRT2 在人类软骨组织中有表达, 具体表达在细胞核与细胞质中, SIRT2 表达降低可能导致骨关节炎的发生及进展。

关键词 骨关节炎; 软骨组织; 免疫荧光; 沉默信息调节因子 2
中图分类号 R 684.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)08-1104-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.002

骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种较为常见的退行性关节病变, 尤其膝关节受累最为常见, 主要表现为关节疼痛及关节活动障碍, 年龄与肥胖被认为是最主要的危险因素, 随着寿命增加, OA 的发病率呈现显著上升趋势^[1]。虽然 OA 确切的发病机制尚不明确, 但越来越多的证据表明软骨老化及细胞衰老在 OA 发生发展中起着重要作用。沉默信息调节因子 2 (silent information regulator of transcription 2, SIRT2) 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 依赖的组蛋白去乙酰酶, 作为 Sirtuin 家族 (SIRT1 ~ SIRT7) 成员之

2017-04-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81171173); 安徽医科大学校科学研究基金 (编号: 2015xkj042)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第四附属医院骨外科, 合肥 230022

² 安徽医科大学第一附属医院关节与骨肿瘤外科, 合肥 230022

作者简介: 饶先亮, 男, 硕士研究生;

尹宗生, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yinzongsheng1961@sina.com

Construction of lentiviral vector of miR-205 and primarily investigation of its effect on breast cancer cell

Fan Chuling^{1,2}, Zhang Ping¹, Sun Caihong¹, et al

(¹School of Basic Medical, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²West Anhui Health Vocational College, Lu'an 237005)

Abstract Objective To construct a lentivirus vector of microRNA-205 (miR-205), and transfect into MB231 cell line, to establish a stable cell line expressing miR-205. **Methods** Design and synthesis miR-205 primers, the target gene was amplified by PCR, and connect to the lentivirus expression plasmid. Packaging and testing virus drops Lv-miR-205, after the double enzyme digestion of the recombinant plasmid. Infecting MB231 cells with the Lv-miR-205, then detect the expression of miR-205 by Real Time qPCR and access the cell proliferation and migration by MTT assay and wound-healing assay. **Results** The DNA sequencing prove that the lentivirus vector was constructed successfully. Lv-miR-205 stablized infect MB231 cells, the expression of miR-205 elevated apparently, cell proliferation and migration was inhibited sharply. **Conclusion** The miR-205 lentiviral expression vector is successfully constructed and the cell line MB231 stably expressing miR-205 is established, which indicate that it could negatively regulate the malignant biological behavior of breast cancer cells, and laid the foundation for the further study of the function and mechanism of miR-205.

Key words miR-205; lentivirus; breast cancer; cell proliferation

一,显示可以从 SIRT2 解离出具有乙酰化 FoxO1,而乙酰化的 FoxO1 结合 Atg7 可以增强细胞的自噬活动,进而延缓机体和细胞的衰老^[2]。Lin et al^[3]检测药物诱导关节炎的小鼠软骨组织中的 SIRT2 蛋白与 mRNA 含量较正常小鼠明显下降,同时对敲除 SIRT2 小鼠进行建模中发现显现关节炎症状时间明显缩短。该课题组一直致力于 Sirtuin 家族在 OA 发病机制中的研究,前期研究^[4]表明 SIRT1 在 OA 中低表达,并且 SIRT1 可以增强细胞自噬过程延缓软骨细胞的早衰,SIRT2 与 SIRT1 同源性最高,其在人体软骨中的表达却未见报道。该课题收集临床软骨标本,探讨 SIRT2 在两者软骨中的表达差异性,为进一步研究 SIRT2 在 OA 发病中的作用提供资料。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2015 年 10 月~2016 年 6 月在安徽医科大学第一附属医院关节与骨肿瘤病区接受全膝关节或者全髌关节置换的手术患者。① OA 组:按照 2007 年最新 OA 诊治指南的诊断标准^[5],因膝 OA 而行全膝关节置换术标本 20 例,其中男 6 例,女 14 例,年龄 66~75(68.46±4.76)岁;② 对照组:因股骨颈骨折而行全髌关节置换术标本 10 例,其中男 4 例,女 6 例,年龄 61~73(67.42±4.44)岁。纳入标准:根据病史、术前 X 线片、术后肉眼观察可以基本排除关节软骨退行性改变,并在术后送检病理诊断关节软骨无病变。两组年龄经过 *t* 检验比较,差异无统计学意义。两组关节软骨标本在游离后无菌状态下装入有平衡液的无菌标准袋,立即送往实验室处理。

1.2 试剂与仪器 兔抗 SIRT2 多克隆抗体(武汉 Elabscience 生物公司);RIPA 组织裂解液和 SDS-PAGE 上样缓冲液(江苏碧云天生物公司);鼠抗 β -actin 多克隆抗体(英国 Abcam 公司)、山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗、免疫荧光二抗、DAPI(北京中杉金桥生物公司);冰冻切片机(德国 Leica 公司);ECL 显影液(美国 Thermo 公司);凝胶成像分析仪(上海 Tanon 公司);免疫荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 方法

1.3.1 免疫荧光染色法检测 SIRT2 的分布及表达

将 OA 组和对照组软骨组织标本 4% 多聚甲醛固定,脱钙液脱钙后分别行连续 6 μ m 冰冻切片,一部分组织常规 HE 染色,一部分组织山羊血清 37 $^{\circ}$ C 封闭 30 min,吸去血清后用 PBS 洗 2 遍甩干,滴加兔抗

SIRT2 多克隆抗体(1:100 稀释),放入 37 $^{\circ}$ C 湿盒孵育过夜,然后用 PBS 洗 3 遍,一次 5 min。按照说明加入稀释荧光二抗(1:100 稀释),避光,37 $^{\circ}$ C 孵育下 2 h,PBS 洗 2 遍后,加入 DAPI 染料常温染色 5 min 后,PBS 洗 3 遍,转移到载玻片上晾干,滴加荧光淬灭剂,在荧光显微镜下观察并拍照。在显微镜下,每张切片随机选取 10 个不重叠视野,人工计数 SIRT2 阳性细胞率。

1.3.2 软骨细胞的分离、传代培养及鉴定 在无菌超净台对 OA 组及对照组软骨组织用含有双抗的 PBS 洗 3 遍,无菌眼科小剪刀切成 2 mm³ 大小碎粒,PBS 洗 3 遍后收集到 15 ml 离心管中离心弃上清液,加入 0.25% 胰蛋白酶 37 $^{\circ}$ C 培养箱中消化 40 min,离心弃上清液,加入 10% FBS 的 DMEM 培养基终止消化,离心后加入 II 型胶原酶 37 $^{\circ}$ C 培养箱中继续消化 4 h。取出离心管低速离心 5 min 后振荡静置 1 min,吸取上清液至另外 15 ml 离心管中离心后弃上清液,加入 10% FBS 的 DMEM 培养基转入培养皿中于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养,待贴壁细胞融合率达到 80% 左右时,弃掉培养基加入 0.25% 胰蛋白酶消化,按比例进行传代培养。采用玻片进行细胞爬片,使用甲苯胺蓝染色在倒置光镜下随机选取 10 个视野行细胞形态学观察进一步细胞鉴定。

1.3.3 Western blot 法检测 SIRT2 在软骨组织及软骨细胞的表达 用眼科小剪刀把软骨组织剪成碎粒,称取 20 mg,加入 200 μ l RIPA 组织裂解液和 2 μ l PMSF,在研磨器中冰上研磨匀浆,继续在冰上裂解 30 min,收集裂解液至 EP 管中;提取软骨细胞蛋白时,弃去细胞培养基,用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞并离心收集沉淀至 EP 管中,用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 冲洗 1 次,10 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 2 min,弃上清液,加适量同上裂解液,冰上裂解细胞 30 min。将上述 EP 管 14 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,收集 EP 管中上清液至新的 EP 管中,即为蛋白样品。取蛋白样品,将 5 \times SDS 按比例稀释为 1 \times ,水浴锅煮沸 10 min,使蛋白变性。经 SDS-PAGE 电泳后,电转仪将凝胶转至 PVDF 膜上,封闭 2 h,加入兔抗 SIRT2 多克隆一抗(1:1 000 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 振荡 3 次,然后加入相应的二抗室温孵育 2 h,弃去二抗,TBST 振荡漂洗 3 次,加入新鲜配置 ECL 工作液,凝胶成像仪中成像并分析结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据分析结果用柱状图表示,运用 *t* 检验比较

组间资料差异, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫荧光染色检测 SIRT2 的分布与表达 软骨组织常规 HE 染色显示: OA 组关节软骨表面毁损明显, 形态不规则, 各层结构不清晰, 软骨细胞分布不均匀, 排列紊乱或者成簇, 总数减少, 细胞核固缩、裂解、空泡状, 偏向一侧, 符合 OA 的表现特征; 对照组软骨表面平整, 形态规则, 各层排列规律, 软骨细胞分布均匀, 细胞核蓝紫色, 见图 1。免疫荧光染色结果显示: 在两组中均可观察到 SIRT2 表达于细胞核及细胞质中, 在对照组的正常软骨组织中, 可见大量红染颗粒, OA 组的 SIRT2 阳性细胞率较对照组下降明显, 两组比较差异有统计学意义 $[(15.42 \pm 4.26)\% \text{ vs } (42.64 \pm 10.53)\%, t = -5.86, P < 0.01]$, 见图 2。

2.2 软骨细胞鉴定结果 为鉴定体外分离培养的

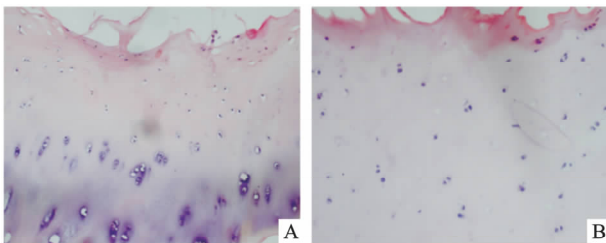


图1 OA组和对照组软骨组织 HE 染色结果 $\times 10$
A: OA组; B: 对照组

为软骨细胞, 采用甲苯胺蓝染色法对细胞进行鉴定, 显微镜下可见: 大部分细胞呈现长梭形和多角形两种形态, 其中长梭形占大多数, 细胞长满后排列紧密, 呈现典型的“铺路石”形状, 细胞核为圆形或者椭圆形, 位于胞体中心, 细胞外基质均匀, 被染成异染的蓝紫色。证明本实验中所培养的两组细胞均为软骨细胞, 见图 3。

2.3 Western blot 法检测 SIRT2 的表达情况 应用 Western blot 法检测两组软骨 SIRT2 的表达情况, 结果显示 OA 组软骨组织的 SIRT2 表达低于对照组, 差异有统计学意义 ($t = -7.61, P < 0.01$), 部分 OA 组和对照组软骨组织显影结果见图 4; OA 组软骨细胞的 SIRT2 表达低于对照组, 差异有统计学意义 ($t = -14.33, P < 0.01$), 软骨细胞 OA 组和对照组显影结果见图 5。

3 讨论

OA 是临床最常见的退行性关节疾病, 随着社会老龄人口增加, OA 在 75 岁以上人群的发病率高达 80%, 因此, OA 又被称为老龄化相关疾病, 并且把衰老视为 OA 主要危险因素之一^[6]。OA 与衰老密切相关, 但并不是所有的老年人都会患有 OA, 但并不代表这个软骨的功能是正常的, 相反老化的软骨会增加罹患 OA 的风险。因此, 抑制软骨老化和软骨细胞衰老可以延缓 OA 发生。

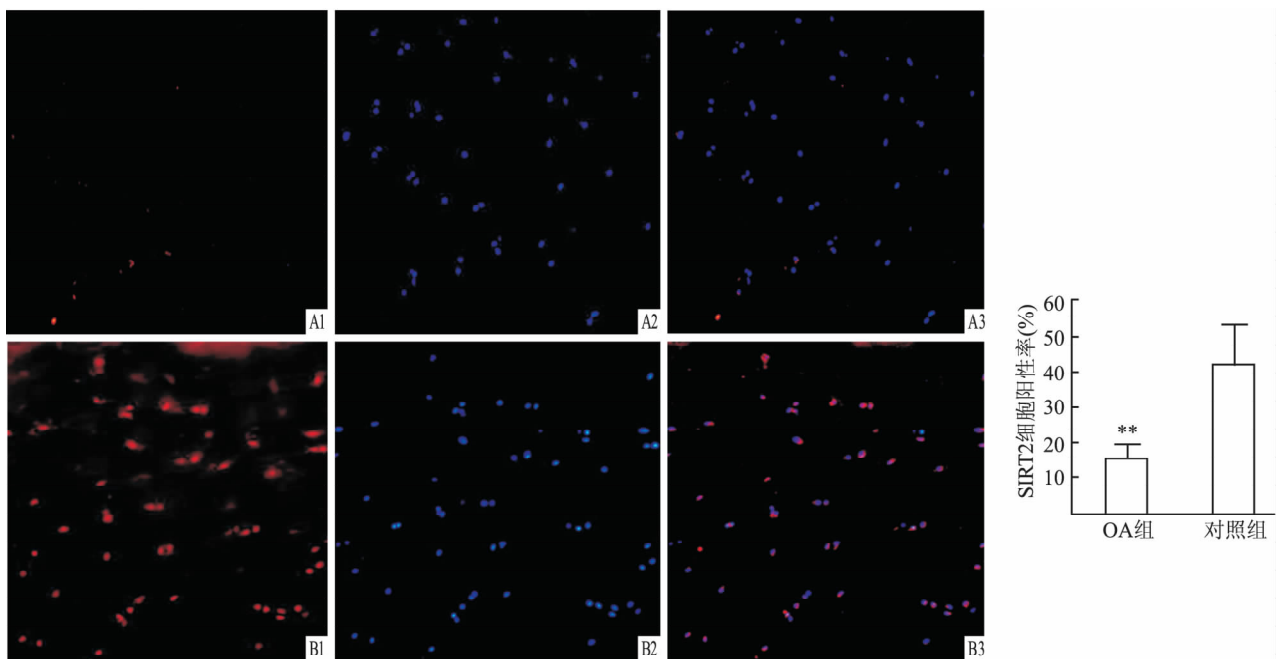


图2 SIRT2 在软骨组织的分布和表达 $\times 10$

A: OA组; B: 对照组; 1: SIRT2 染色; 2: DAPI 染色; 3: SIRT2 和 DAPI 合并图像; 与对照组比较: $** P < 0.01$

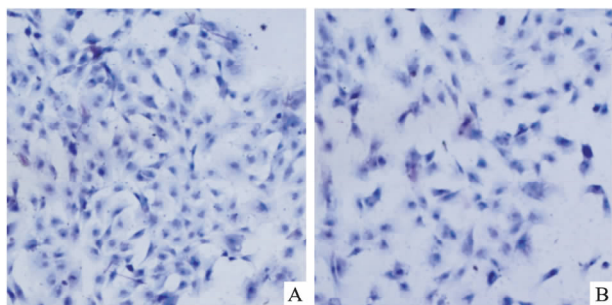


图3 软骨细胞甲苯胺蓝染色 ×10
A: OA组; B: 对照组

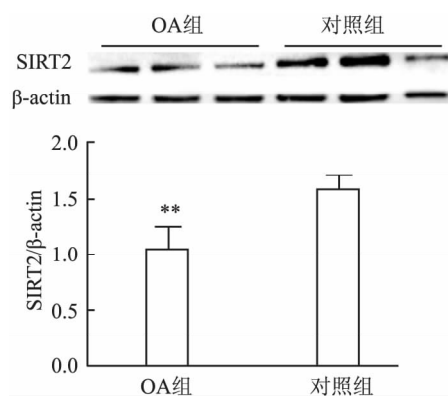


图4 Western blot法检测SIRT2在软骨组织中的表达
与对照组比较: ** $P < 0.01$

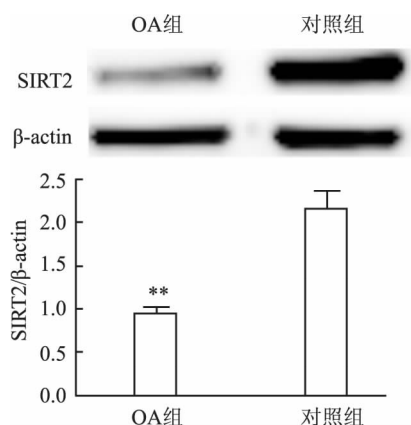


图5 Western blot法检测SIRT2在软骨细胞中的表达
与对照组比较: ** $P < 0.01$

Sirtuin 家族是一组依赖 NAD⁺ 的去乙酰化酶类,被称为“长寿蛋白”。在人类中有 7 个亚型,分别为 SIRT1 ~ SIRT7。研究^[7]表明,SIRT1 参与染色质沉默和维持基因组稳定性,而这一过程涉及端粒延长,提示 SIRT1 可以维持端粒的稳定性。从人 OA 关节软骨获取的软骨细胞通过逆转录端粒酶病毒而不改变软骨细胞其他表型的情况下,发现软骨细胞

端粒长度增加并且明显延缓软骨细胞衰老^[8]。有资料显示^[9],Sirtuin 家族激活剂白藜芦醇可以降低软骨细胞 ROS 含量,而 ROS 含量与细胞衰老呈现正相关,并且 ROS 可以通过激活 MMPs 表达与炎症因子释放促进软骨细胞衰老。课题组前期研究发现,使用 SIRT1 激活剂白藜芦醇增强 SIRT1 活性后,软骨细胞中 LC3 蛋白从 LC-I 向 LC-II 转化增加,自噬活性增加,表明在 OA 早期,SIRT1 与自噬相关蛋白 Atg7 相互作用延缓软骨细胞早衰发生。SIRT2 与 SIRT1 同源性最高,并且在人体绝大多数细胞中都有表达。近期研究^[10]显示,在真皮成纤维细胞早衰过程中伴随着 SIRT1 与 SIRT2 的表达下降,同时 siRNA 抑制 SIRT1 与 SIRT2 表达后,衰老相关表型 β-gal 活性增强、γ-H2AX 磷酸化和 P21、P53、P16 水平增加。North et al^[11] 研究发现体外过表达 SIRT2 或 NAD⁺ 前体 NMN 治疗后小鼠的有丝分裂细胞周期点激酶基因 RubR1 的丰度增加,RubR1H/H 小鼠过表达 SIRT2 后平均寿命将增加。野生型小鼠因缺乏 RubR1 而出现早期衰老征象,提示 SIRT2 可能是哺乳动物衰老潜在靶点。由此得出,SIRT2 与 SIRT1 一样,同样具有延缓细胞衰老的作用。

本研究免疫荧光结果显示,在 OA 关节软骨组织中,SIRT2 广泛存在于正常软骨细胞中,主要表达在细胞核与细胞质中,并且 OA 组软骨组织 SIRT2 阳性细胞率较正常对照组明显降低。免疫荧光染色是一种定性的检测手段,能较直观反映 SIRT2 表达分布,但是并不能准确定量。本研究进而结合免疫荧光、Western blot 两种方法对 SIRT2 的进行定量检测,同时在组织水平和细胞水平同时进行 SIRT2 表达检测,显示 OA 组 SIRT2 明显低表达。这一结果与 Eo et al^[12] 研究内容有偏差,该研究显示过表达 SIRT2 可以促进软骨细胞炎症因子增加,而炎症可以促进关节炎发生,但作者没有在动物实验中进一步验证。而本实验结果与 Lin et al^[3] 研究结果一致。Lin 通过检测小鼠建模前后关节软骨中的 SIRT2 表达水平的变化,同时动物实验也佐证了 SIRT2 抑制关节炎的发生及进展,但该关节炎为药物诱导下关节炎模型,不能完全模拟人类 OA 软骨细胞生存环境,同时也缺乏人类软骨组织及细胞 SIRT2 表达的相关报道。

综上所述,抑制软骨老化和软骨细胞衰老将延缓 OA 进程,SIRT2 与 SIRT1 同样可以参与细胞衰老调节,同时本研究显示 OA 软骨中 SIRT2 有表达,具体在细胞核与细胞质中,且与 SIRT1 同样,SIRT2 表

达量也是降低的,软骨中 SIRT2 的低表达可能与 OA 的发生发展关系密切, SIRT2 表达水平的下降可能促进 OA 的发生及进展。

参考文献

- [1] Goldring M B. Articular cartilage degradation in osteoarthritis [J]. *HSS J*, 2012, 8(1): 7-9.
- [2] Zhao Y, Yang J, Liao W, et al. Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(7): 665-75.
- [3] Lin J, Sun B, Jiang C, et al. Sirt2 suppresses inflammatory responses in collagen-induced arthritis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(4): 897-903.
- [4] Chang J, Wang W, Zhang H, et al. The dual role of autophagy in chondrocyte responses in the pathogenesis of articular cartilage degeneration in osteoarthritis [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(6): 1311-8.
- [5] 邱贵兴. 骨关节炎诊治指南(2007年版) [J]. 中华关节外科杂志电子版, 2007, 42(4): 30-2.
- [6] Arden N, Nevitt M C. Osteoarthritis: epidemiology [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2006, 20(1): 3-25.
- [7] De Bonis M L, Ortega S, Blasco M A. SIRT1 is necessary for proficient telomere elongation and genomic stability of induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 2(5): 690-706.
- [8] Piera-Velazquez S, Jimenez S A, Stokes D. Increased life span of human osteoarthritic chondrocytes by exogenous expression of telomerase [J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(3): 683-93.
- [9] Lei M, Wang J G, Xiao D M, et al. Resveratrol inhibits interleukin 1 β -mediated inducible nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes by activating SIRT1 and thereby suppressing nuclear factor- κ B activity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 674(2-3): 73-9.
- [10] Kilic Eren M, Kilincli A, Eren Ö. Resveratrol induced premature senescence is associated with DNA damage mediated SIRT1 and SIRT2 down-regulation [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124837.
- [11] North B J, Rosenberg M A, Jeganathan K B, et al. SIRT2 induces the checkpoint kinase BubR1 to increase lifespan [J]. *EMBO J*, 2014, 33(13): 1438-53.
- [12] Eo S H, Kim D W, Choi S Y, et al. PEP-4-SIRT2 causes dedifferentiation and COX-2 expression *via* the MAPK pathways in rabbit articular chondrocytes [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 339(2): 351-9.

The research of silent information regulator of transcription 2 expression in cartilage tissues and chondrocytes

Rao Xianliang¹, Chang Jun¹, Fang Xiao², et al

(¹Dept of Orthopaedics, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Joint and Bone Tumors, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expression of silent information regulator of transcription 2 (SIRT2) in human cartilage, and to explore the difference between osteoarthritis (OA) and normal cartilage tissues and chondrocytes. **Methods** The present research was selected 20 cases of osteoarthritic cartilage as OA group and 10 cases of normal articular cartilage as control group. The expression level and distribution of SIRT2 in two groups were detected by immunofluorescence staining. Chondrocytes were isolated and subcultured. The cells were identified by toluidine blue staining. The expression level of SIRT2 in cartilage tissues and chondrocytes was detected by Western blot. **Results** Immunofluorescence staining showed that SIRT2 was expressed in cartilage and distributed in nucleus and cytoplasm. The SIRT2 positive rate in OA group was significantly lower than that in control group ($P < 0.01$). Western blot analysis showed that SIRT2 expression in cartilage tissues in OA group were significantly lower than that in control group ($P < 0.01$), and the expression of SIRT2 in chondrocytes was also consistent with human cartilage tissues ($P < 0.01$). **Conclusion** The distribution of SIRT2 in human cartilage tissues is specifically expressed in the nucleus and cytoplasm. The decrease of SIRT2 expression may lead to the development and progression of osteoarthritis.

Key words osteoarthritis; cartilage; immunofluorescence; SIRT2