

## 小鼠 11 $\beta$ -HSD1 基因过表达的前成骨细胞系的建立

祁寒梅, 吴琳, 王龙, 毕建华, 丁国宪\*

(南京医科大学第一附属医院老年医学科, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探索小鼠 11 $\beta$ -HSD1 基因过表达的前成骨细胞系的建立方法。方法:构建过表达小鼠 11 $\beta$ -HSD1 基因的慢病毒载体,包装、收集、纯化慢病毒,感染小鼠 MC3T3-E1 前成骨细胞系,用 BSD(一种核苷抗生素)筛选出感染成功的细胞,荧光定量 PCR 及 Western blot 检测 11 $\beta$ -HSD1 过表达情况,诱导成骨分化后用茜素红染色法染色矿化结节。结果:成功构建了小鼠 11 $\beta$ -HSD1 基因过表达慢病毒载体,高效感染 MC3T3-E1 细胞系。荧光定量 PCR 及 Western blot 结果显示,11 $\beta$ -HSD1 过表达病毒组细胞 11 $\beta$ -HSD1 mRNA 水平是空载病毒对照组的 17.4 倍,蛋白表达量比空载病毒对照组增加。茜素红染色结果表明慢病毒感染的细胞成骨分化良好,细胞正常成骨分化功能未受影响,11 $\beta$ -HSD1 过表达细胞成骨分化减少。结论:本研究成功建立了过表达小鼠 11 $\beta$ -HSD1 的前成骨细胞系,为研究 11 $\beta$ -HSD1 对成骨细胞的具体作用提供了研究基础。

**[关键词]** 慢病毒载体; 11 $\beta$ -HSD1; MC3T3-E1 前成骨细胞系

**[中图分类号]** Q786

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)05-626-05

## Establishment of mouse 11 $\beta$ -HSD1 gene overexpression model in a MC3T3-E1 pre-osteoblast cell lines

QI Han-mei, WU Lin, WANG Long, BI Jian-hua, DING Guo-xian\*

(Department of Geratology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:**To establish a mouse preosteoblast cell lines overexpressing 11 $\beta$ -HSD1 gene. **Methods:**A lentiviral vector overexpressing mouse 11 $\beta$ -HSD1 was constructed. Lentivirus particles were generated in 293FT cells, followed by concentration and purification. MC3T3-E1 preosteoblast cells were infected by the lentivirus, which were later selected by BSD. The mRNA and protein expression of 11 $\beta$ -HSD1 was analyzed by real-time PCR and Western blot, respectively. MC3T3-E1 osteogenic differentiation was detected using Alizarin red staining. **Results:**The lentiviral vector of mouse 11 $\beta$ -HSD1 overexpression was successfully constructed, and the MC3T3-E1 preosteoblast cell lines were infected efficiently by the lentivirus. The mRNA and protein levels of 11 $\beta$ -HSD1 were higher in MC3T3-E1 cells infected by 11 $\beta$ -HSD1 overexpression lentivirus than that of cells infected by the negative control lentivirus. Alizarin red staining showed that the differentiation ability toward osteoblasts of MC3T3-E1 cells was not influenced by lentivirus infection. **Conclusion:**Our findings showed that 11 $\beta$ -HSD1 gene was effectively overexpressed in MC3T3-E1 preosteoblast cells using lentivirus infection, which provides a useful tool for further studies of 11 $\beta$ -HSD1 function in osteoblasts.

**[Key words]** lentivirus vector; 11 $\beta$ -HSD1; MC3T3-E1 preosteoblast cell lines

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(5): 626-630]

随着世界人口的老齡化,骨质疏松症已经成为一种常见的疾病,严重危害着人类健康。骨质疏松症是由骨形成和骨吸收的失衡引起的,其中,成骨细胞功能不足导致的骨形成减少是主要原因<sup>[1-2]</sup>。因此,体外研究成骨细胞功能在骨代谢的研究中非常

重要,不仅可为筛选骨代谢相关药物提供细胞模型,也是研究骨生理、病理及修复的重要手段。而 MC3T3-E1 Subclone 14 作为一种小鼠颅顶前成骨细胞系,和体外原代培养的小鼠颅顶前成骨细胞行为类似,是体外研究成骨细胞功能简单有效的模型。

糖皮质激素(glucocorticoids, GCs)由于其强效的抗炎及免疫抑制作用被广泛应用于临床,但长期过量使用可导致严重的不良反应如骨质疏松<sup>[3]</sup>。11 $\beta$

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(30900505)

\*通讯作者, E-mail: dinggx@njmu.edu.cn

羟化类固醇脱氢酶 (11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type, 11 $\beta$ -HSD) 是调节 GCs 的关键酶, 有两种亚型 (11 $\beta$ -HSD1 和 11 $\beta$ -HSD2), 催化无活性和有活性的 GCs 之间相互转换。骨骼中存在的主要是 11 $\beta$ -HSD1, 11 $\beta$ -HSD1 是一种具有脱氢酶和还原酶双向作用的酶, 但在骨内主要起还原酶作用, 将无活性 GCs 转化为有生物活性的 GCs, 在受体前水平参与对 GCs 活性的调节, 增强局部骨组织内 GCs 的作用<sup>[4-5]</sup>, 因此, 11 $\beta$ -HSD1 很可能参与 GCs 对骨代谢的调节过程, 影响成骨细胞的功能。

目前, 11 $\beta$ -HSD1 对成骨细胞的具体作用还不清楚。近年来, 慢病毒载体转基因技术的出现, 为研究基因功能提供了强有力的工具。以人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 为基础构建的慢病毒载体具有可感染分裂和非分裂细胞、转移基因片段容量大、免疫反应小、目的基因整合至靶细胞基因组长期表达等优点, 是理想的基因转移载体<sup>[6]</sup>。因此, 本研究构建带有 11 $\beta$ -HSD1 基因片段的慢病毒表达载体, 利用 293FT 细胞成功包装出慢病毒, 感染靶细胞 MC3T3-E1, 为后期在细胞系中研究 11 $\beta$ -HSD1 基因功能奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

小鼠前成骨细胞株 MC3T3-E1 购于中科院上海生命科学研究院细胞资源中心, 包装细胞 293FT、TRIzol、Lipofectamine 2000、BSD (一种核苷抗生素, 产品名 Blastidin S Hcl) 购于美国 Invitrogen 公司,  $\alpha$ -MEM 培养基、DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (FBS)、0.05% Trypsin-EDTA 购自美国 Gibco 公司, Ascorbic acid、 $\beta$ -Glycerophosphate disodium salt hydrate 购于美国 Sigma (上海) 贸易有限公司, 茜素红购于上海国药集团化学试剂有限公司, 逆转录所用试剂 M-MLV 等购于美国 Promega 公司, 受体菌 DH5 $\alpha$  购于北京 TIANGEN 公司, 含小鼠 11 $\beta$ -HSD1 基因片段的载体 pEGFP-N1-HSD11b 购于上海吉凯基因化学技术有限公司, 慢病毒包装质粒 PLP1、PLP2、VSVG、空载质粒 (pLL3.7+CMV+BSD) 由北京军事医学科学院馈赠。BamH I、Xho I、T<sub>4</sub> DNA 连接酶购于深圳 Fermentas 公司。荧光定量 PCR 所用试剂 QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 购于日本 Toyobo 公司, 紫外分光光度仪购于美国 Amersham Biosciences 公司, Rotor-Gene3000 荧光定量 PCR 仪购于澳大利亚 Corbett 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 11 $\beta$ -HSD1 表达载体的构建

将含小鼠 11 $\beta$ -HSD1 的载体 pEGFP-N1-HSD11b 用 BamH I、Xho I 进行双酶切, 电泳并割胶回收 11 $\beta$ -HSD1 片段, 同时用 BamH I、Xho I 双酶切慢病毒表达载体 pLL3.7+CMV+BSD, 电泳并割胶回收线性载体。酶切后的空载片段和 11 $\beta$ -HSD1 片段按 1:4 的比例在 4 $^{\circ}$ C 用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接过夜, 连接产物转化进入 DH5 $\alpha$ , 铺板至含氨苄青霉素的 LB 固体平板, 挑选单克隆鉴定。小提质粒进行双酶切电泳, 电泳条件: 1% 琼脂糖凝胶, 100 V。电泳条带正确的单克隆进行测序鉴定, 筛选出正确重组的阳性克隆, -70 $^{\circ}$ C 冻存备用。

#### 1.2.2 慢病毒的包装、收集与纯化

包装细胞 293FT 在 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 孵育箱中, 培养于含有 10%FBS 的 DMEM 高糖培养基中, 细胞密度达到 80%~90% 时进行慢病毒包装。Lipofectamine 2000 及 4 种质粒 PLP1、PLP2、VSVG、表达体质粒共转染 293FT 细胞, 孵育过夜后更换新鲜 DMEM 培养液。再过 48 h 后收集富含病毒颗粒的上清液, 0.45  $\mu$ mol/L 过滤器过滤至离心管中, 加入 50% PEG8000 至终浓度为 5%, 再加入 5 mol/L NaCl 至终浓度为 0.15 mol/L, 颠倒混匀, 置于 4 $^{\circ}$ C 旋转过夜, 后 4 $^{\circ}$ C 离心 4 100 r/min  $\times$  10 min, 倒掉液体, 管壁的白色沉淀即为病毒-PEG 复合物, 加适量 PBS 重悬, -70 $^{\circ}$ C 冻存备用。

#### 1.2.3 MC3T3-E1 细胞的培养和慢病毒感染

MC3T3-E1 细胞在 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 孵育箱中, 培养于含有 10%FBS 的  $\alpha$ -MEM 培养基中, 常规换液传代铺板, 细胞密度达到 70% 时加入浓缩后的慢病毒液进行感染。感染过夜后更换新鲜  $\alpha$ -MEM 培养基, 48 h 后加入 BSD 筛选, 4~10 d 即可筛选出病毒感染成功的细胞, 实验重复 3 次。

#### 1.2.4 细胞总 RNA 抽提及 cDNA 逆转录

培养板中的细胞吸弃培养液, 每孔加入 1 ml TRIzol 充分裂解细胞后收集裂解液, 按试剂盒方法进行细胞总 RNA 抽提及 cDNA 逆转录。实验重复 3 次。

#### 1.2.5 实时荧光定量 PCR

以上述细胞的 cDNA 为模板, 用相关引物进行 RT-PCR 扩增。实时定量 PCR 总反应体系为 25  $\mu$ l, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火延伸 60 s, 40 个循环, 72~94 $^{\circ}$ C, 每升高 0.5 $^{\circ}$ C 读 1 次制备熔解曲线。以  $\beta$ -actin 基因作为内参照对目

的基因的表达量进行分析。

### 1.2.6 Western blot

培养皿中的细胞吸弃培养液,用预冷的 PBS 冲洗后加入 RIPA 缓冲液裂解细胞,提取细胞总蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳,转印 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,与抗鼠 11 $\beta$ -HSD1 抗体、抗 Tubulin 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,辣根过氧化物酶偶联的二抗 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,充分洗膜后显色拍照,检测细胞内 11 $\beta$ -HSD1 蛋白表达量,用细胞 Tubulin 含量作为对照,实验重复 3 次。

### 1.2.7 MC3T3-E1 细胞成骨诱导和茜素红染色

MC3T3-E1 细胞培养于含有 10%FBS 的  $\alpha$ -MEM 培养基中,细胞达到完全融合时,改用成骨诱导液( $\alpha$ -MEM 培养基,10%FBS,50  $\mu$ mol/L Ascorbic acid,10 mmol/L  $\beta$ -Glycerophosphate)进行成骨诱导,每 3 d 换液,约 2 周后即可见明显矿化颗粒。此时吸弃培养液,用 PBS 冲洗 2 遍,加入 4%多聚甲醛固定细胞 10 min,再用 PBS 冲洗 2 遍,加入茜素红染液染色 5 min 后,用 PBS 冲洗干净。

### 1.3 统计学方法

所有数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,应用 SPSS10.0 软件进行统计分析。经方差齐性检验方差齐,后进行 *t* 检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 重组 11 $\beta$ -HSD1 表达载体的鉴定结果

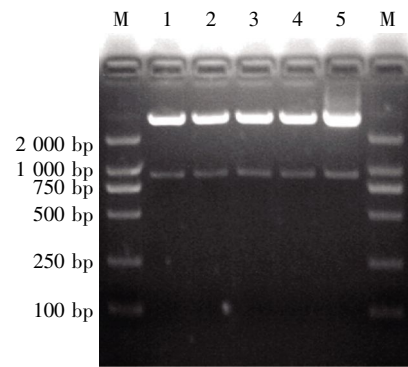
重组后的 11 $\beta$ -HSD1 表达载体挑选出 5 个单克隆,用 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切鉴定。电泳结果表明,双酶切后释放出的片段大小与理论值一致,11 $\beta$ -HSD1 片段大小为 876 bp,具体见图 1。5 个单克隆均送 DNA 测序筛选阳性克隆,DNA 测序结果表明,单克隆 1、5 序列完全正确,为正确重组的 11 $\beta$ -HSD1 表达载体。

### 2.2 慢病毒感染 MC3T3-E1 细胞的效率

用 11 $\beta$ -HSD1 过表达慢病毒感染 MC3T3-E1 细胞后,经 BSD 筛选后,存活细胞达 60%~90%,且细胞形态未受影响,说明病毒可以有效感染 MC3T3-E1 细胞,感染效率在 60%~90%,感染后不影响细胞状态。

### 2.3 慢病毒感染 MC3T3-E1 细胞 11 $\beta$ -HSD1 过表达

将培养的 MC3T3-E1 细胞分为空载病毒对照组、11 $\beta$ -HSD1 过表达病毒组,两组细胞感染病毒后,用 BSD 筛选出有效感染病毒的细胞,继续培养至细胞长满时收细胞。抽提 RNA 进行逆转录,定量 PCR 检测 11 $\beta$ -HSD1 mRNA 表达;同时提取细胞总

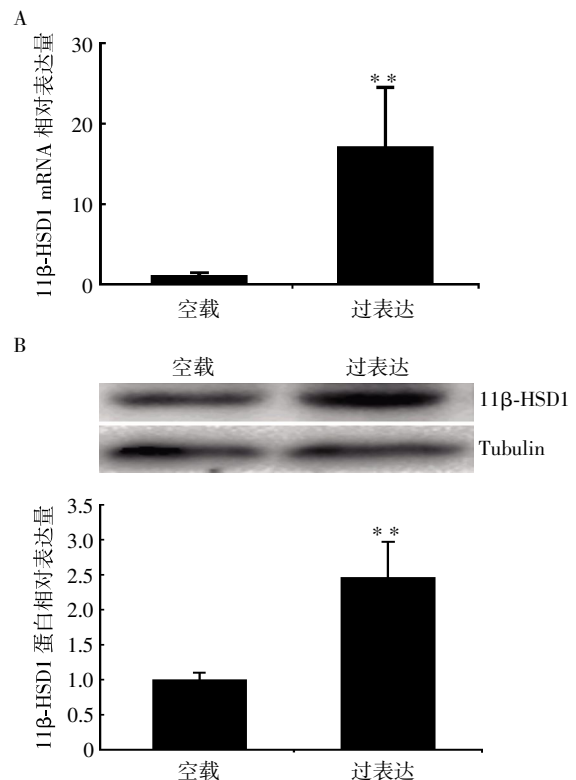


M:DNA Marker; 1~5:5 个单克隆双酶切产物。

图 1 重组 11 $\beta$ -HSD1 表达载体的鉴定结果

Figure 1 Identification of recombinant lentiviral vector overexpressing mouse 11 $\beta$ -HSD1 gene

蛋白,Western blot 检测 11 $\beta$ -HSD1 蛋白表达量。结果显示,11 $\beta$ -HSD1 过表达病毒组细胞 11 $\beta$ -HSD1 mRNA 水平是空载病毒对照组的 17.4 倍( $P < 0.01$ ,图 2A),蛋白表达量是空载病毒对照组的 2.5 倍( $P < 0.01$ ,图 2B)。11 $\beta$ -HSD1 过表达慢病毒感染 MC3T3-E1 细胞后,细胞 11 $\beta$ -HSD1 过表达效应明显。



与空载病毒对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ,  $n = 3$ 。

图 2 定量 PCR(A)及 Western blot(B)检测 MC3T3-E1 细胞感染病毒后的 11 $\beta$ -HSD1 水平

Figure 2 Real-time PCR (A) and Western blot (B) analysis of mRNA and protein levels of 11 $\beta$ -HSD1 in MC3T3-E1 cells infected by lentivirus

## 2.4 慢病毒感染 MC3T3-E1 细胞对细胞分化的影响

MC3T3-E1 细胞分为正常对照组、空载病毒感染组、11 $\beta$ -HSD1 过表达病毒感染组,病毒感染组用 BSD 筛选,待细胞长满时进行成骨诱导,诱导至 14 d

细胞明显矿化,进行茜素红染色。与正常对照组相比,感染慢病毒后细胞能够矿化,说明感染慢病毒不会影响细胞正常成骨分化功能;11 $\beta$ -HSD1 过表达后细胞成骨分化减少(图 3)。

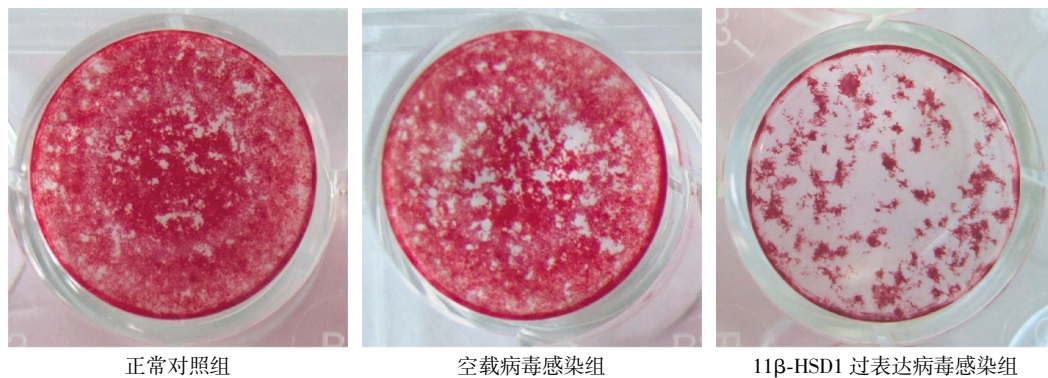


图 3 茜素红染色检测 MC3T3-E1 细胞成骨分化

Figure 3 Detection of MC3T3-E1 osteogenic differentiation by Alizarin red staining

## 3 讨论

随着骨质疏松症发病率的增加,其对社会的危害也越来越大,愈发引起人们的重视。糖皮质激素性骨质疏松症 (glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP) 及老年性骨质疏松症 (senile osteoporosis, SOP) 是引起骨质疏松症的两大重要原因<sup>[7]</sup>。虽然目前人们对 GIOP、SOP 的研究越来越深入,但其具体机制仍不清楚<sup>[3,8-9]</sup>。

GIOP 是临床上最常见的继发性骨质疏松症<sup>[10]</sup>。GCs 对骨骼的作用机制复杂,生理剂量的 GCs 是维持骨骼正常发育所必须的,但大剂量的 GCs 则会抑制骨形成、促进骨吸收。GCs 可以抑制成骨细胞的形成、增殖和分化,促进其凋亡<sup>[3,11]</sup>。而 11 $\beta$ -HSD1 分布广泛,存在于所有 GCs 靶组织中,在骨内主要起还原酶作用,将无活性 GCs 转化为有生物活性的 GCs,增强局部骨组织内 GCs 的作用<sup>[4,12]</sup>,因此,11 $\beta$ -HSD1 很可能在 GIOP 的发生中起重要作用。

11 $\beta$ -HSD1 不仅与 GIOP 的发生有关,近年来的研究也发现,11 $\beta$ -HSD1 在 SOP 的发生中也起着重要作用。早在 2002 年,Cooper 等<sup>[13]</sup>研究即发现,人成骨细胞内,GCs 水平及 11 $\beta$ -HSD1 表达及其还原酶活性均随年龄增长而升高,提示 11 $\beta$ -HSD1 活性增强可能与 SOP 存在内在联系。Weinstein 等<sup>[14]</sup>研究也证明,老年小鼠骨内 11 $\beta$ -HSD1 活性增强,引起骨强度的明显下降及骨量减少等不利作用。这些研究提示,11 $\beta$ -HSD1 活性增强可能是 SOP 发生的一个重要原因。

因此,11 $\beta$ -HSD1 可能在 GIOP、SOP 的发生中起关键作用,11 $\beta$ -HSD1 可能通过增加成骨细胞内 GCs 水平,抑制成骨细胞功能,进而导致骨质疏松,抑制 11 $\beta$ -HSD1 可能是治疗骨质疏松症新的有效途径。

研究 11 $\beta$ -HSD1 对成骨细胞的具体作用机制,对骨质疏松症的防治至关重要。而慢病毒载体的出现,为研究 11 $\beta$ -HSD1 功能提供了有效的工具。慢病毒载体是一种复制缺陷型逆转录病毒载体,具有可感染分裂期与非分裂期细胞、转移基因片段容量大、目的基因长时间稳定表达、不易诱发宿主免疫反应、安全性较好等优点,因此成为携带目的基因的理想载体,该技术在内源性基因功能研究和基因治疗领域已显示了重大作用<sup>[6,15-16]</sup>。本研究成功建立了小鼠 11 $\beta$ -HSD1 过表达前成骨细胞系,11 $\beta$ -HSD1 基因整合入细胞基因组,能够稳定表达,且慢病毒本身不影响成骨细胞正常分化。MC3T3-E1 细胞过表达 11 $\beta$ -HSD1 后,其成骨分化减少,为进一步研究 11 $\beta$ -HSD1 对成骨细胞的具体作用奠定了基础,为骨质疏松症的机制研究提供了有效手段。

### [参考文献]

- [1] Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future [J]. *Lancet*, 2011, 377(9773): 1276-1287
- [2] Boonen S, Dejaeger E, Vanderschueren D, et al. Osteoporosis and osteoporotic fracture occurrence and prevention in the elderly: a geriatric perspective [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2008, 22(5): 765-785
- [3] Rauch A, Seitz S, Baschant U, et al. Glucocorticoids sup-

press bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor [J]. *Cell Metab*, 2010, 11(6):517-531

[4] Canalis E, Delany AM. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, an amplifier of glucocorticoid action in osteoblasts [J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(6):987-990

[5] Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, et al. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response [J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(5):831-866

[6] Follenzi A, Naldini L. HIV-based vectors [M]// Morgan JR. *Gene Therapy Protocols*. 2nd ed. Totowa NJ: Humana Press Inc, 2007: 259-274

[7] 徐 苓, 黄公怡, 朱汉民, 等. 骨质疏松症新进展 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008: 1-103

[8] Kim HJ. New understanding of glucocorticoid action in bone cells [J]. *BMB Rep*, 2010, 43(8):524-529

[9] Kassem M, Marie PJ. Senescence-associated intrinsic mechanisms of osteoblast dysfunctions [J]. *Aging Cell*, 2011, 10(2):191-197

[10] Adachi JD. Glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Osteoporos Int*, 2009, 20(Suppl 3):S239-240

[11] Pierotti S, Gandini L, Lenzi A, et al. Pre-receptorial regulation of steroid hormones in bone cells: Insights on glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008, 108(3-5):292-299

[12] Cooper MS. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase: a regulator of glucocorticoid response in osteoporosis [J]. *J Endocrinol Invest*, 2008, 31(7 Suppl):16-21

[13] Cooper MS, Rabbitt EH, Goddard PE, et al. Osteoblastic 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity increases with age and glucocorticoid exposure [J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(6):979-986

[14] Weinstein RS, Wan C, Liu Q, et al. Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis, vascularity, hydration, and strength in aged mice [J]. *Aging Cell*, 2010, 9(2):147-161

[15] Chang LJ, Zaiss AK. Lentiviral vectors [M]// Morgan JR. *Gene Therapy Protocols*. 2nd ed. Totowa NJ: Humana Press Inc, 2007: 303-318

[16] Cao F, Xie X, Gollan T, et al. Comparison of gene-transfer efficiency in human embryonic stem cells [J]. *Mol Imaging Biol*, 2010, 12(1):15-24

[收稿日期] 2011-12-02

## 本刊来稿题名和作者署名的注意事项

### 1. 题名

- (1) 题名应以简明、确切的词语反映文章中最重要特点内容, 要符合编制题录、索引和检索的有关原则, 并有助于选定关键词。
- (2) 中文题名一般不超过 20 个字, 必要时可加副题名。
- (3) 英文题名应与中文题名含义一致。
- (4) 题名应避免使用非公用的缩写词、字符、代号, 尽量不出现数学式或化学式。

### 2. 作者署名和工作单位

- (1) 文章都应有作者署名, 这是文责自负和拥有著作权的标志;
- (2) 作者姓名署于题名下方;
- (3) 英文摘要中附与中文同样的作者姓名与排列顺序, 写法为: 姓前名后, 姓全部大写, 名的首字母大写, 其余字母小写, 名间加连字符, 如 ZHOU Ping, SHI Hong-lei;
- (4) 作者单位需注明全称(标注到二级或三级单位, 如“南京医科大学第一附属医院心内科”, “南京医科大学公共卫生学院流行病与统计学系”)、所在城市及邮政编码;
- (5) 对于有基金课题资助的论文需在课题负责人的名字后加上标“\*”, 并在论文首页下补充基金的名称、编号, 以及课题负责人的 E-mail。
- (6) 本刊对于没有课题资助的文章一律不标注通讯作者。

(本刊编辑: 接雅俐)