DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20230509.002
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20230509.1159.004.html

siRNA干扰对人软骨细胞Skp2表达的影响

袁长深[1],李彦宏[2],刘晋邑[2],廖书宁[2],梅其杰[1],徐文飞[1],段 戡[1]✉
(1.广西中医药大学第一附属医院四肢骨伤科,广西 南宁 530023;2.广西中医药大学研究生院,广西 南宁 530000)

[摘要] **目的**:研究表达载体介导的siRNA对Skp2在人软骨细胞中表达的抑制效果。**方法**:利用在线siRNA设计工具设计3条*Skp2*序列siRNA-59、siRNA-318、siRNA-504作为靶位点,采用基因重组技术体外成功构建*Skp2* siRNA表达载体,检测重组质粒转染对*Skp2* mRNA表达的影响,并采用DNA电泳对其结果进行验证。**结果**:测序表明*Skp2*干扰序列正确,siRNA-59、siRNA-318、siRNA-504转染组的*Skp2* mRNA表达明显低于空载组和NC组($P<0.05$),*Skp2* mRNA在siRNA-59、siRNA-318、siRNA-504中的抑制率分别为60%、41%、64%,且以siRNA-504转染组抑制率最高。**结论**:成功构建*Skp2*干扰真核表达载体,siRNA重组体能有效抑制人软骨细胞Skp2 mRNA表达,可为骨关节炎治疗提供有力证据。

[关键词] S期激酶相关蛋白2;骨关节炎;小干扰RNA;基因表达
[中图分类号] R684.3 [文献标识码] A [文章编号] 1007-1237(2023)13-0983-05

Effect of small interference RNA on expression of the Skp2 in human chondrocytes cell

YUAN Chang-shen[1], LI Yan-hong[2], LIU Jin-yi[2], LIAO Shu-ning[2], MEI Qi-jie[1], XU Wen-fei[1], DUAN Kan[1]✉
(*1. Orthopedic Department of the Limbs, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China*)

[*Foundation Project*]: *National Natural Science Foundation of China* (*82060875*); *National Natural Science Foundation of China* (*82160912*); *Guangxi Natural Science Foundation* (*2022JJA141229*)

[*Author*]: *YUAN Chang-shen, Chief Physician, E-mail: yuanchangshen0920@126.com.*
[*Correspondence to*]: *DUAN Kan, Ph.D., Chief Physician, E-mail: duankan1001@sina.com.*

Received: 2023-03-04 *Revised*: 2023-05-03 *JHMU*, 2023;29(13):983-987

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective**: To study the inhibitory effect of siRNA mediated by expression vectors on Skp2 expression in human chondrocytes.**Method**: Three Skp2 sequences siRNA-59, siRNA-318 and siRNA-504 were designed as target sites using online siRNA design tools. Skp2 siRNA expression vectors were successfully constructed *in vitro* by gene recombination technology, and the influence of recombinant plasmid transfection on Skp2 mRNA expression was detected. DNA electrophoresis was used to verify the results.**Results**: The sequence of Skp2 interference was correct by sequence analysis. The expression of Skp2 mRNA in siRNA-59, siRNA-318, siRNA-504 transfection group was significantly lower than that in no-load group and NC group ($P<0.05$), the inhibition rates of Skp2 mRNA in siRNA-59, siRNA-318 and siRNA-504 were respectively 60%, 41% and 64%, and the siRNA-504 transfection group had the highest inhibition rate.**Conclusion**: The siRNA eukaryotic expression vector of Skp2 gene was constructed successfully which effectively inhibit Skp2 mRNA expression in human chondrocytes cell, and can provide strong evidence for the treatment of osteoarthritis.

[KEYWORDS] Skp2; Osteoarthritis; SiRNA; Gene expression

[基金项目]国家自然科学基金(82060875);国家自然科学基金(82160912);广西自然科学基金(2022JJA141229)
[作者简介]袁长深,主任医师,E-mail:yuanchangshen0920@126.com。
[通讯作者]段戡,博士,主任医师,E-mail:duankan1001@sina.com。
[收稿日期]2023-03-04 [修回日期]2023-05-03 网络出版时间:2023-05-09 16:45:21

S期激酶相关蛋白2(S-phase kinase associated protein,Skp2)是一种癌症相关蛋白,主要位于细胞核和细胞质中,可在骨髓等组织中广泛表达(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6502#gene-expression)。Skp2作为细胞周期的关键调节剂,可促进细胞从G_1期向S期的转换,对肿瘤的发生、发展密切相关[1,2];甚至认为靶向Skp2通路是癌症治疗的关键靶点[1]。然而,Skp2在非肿瘤中,特别在骨关节炎(osteoarthritis,OA)中的作用机制仍不明确。

RNA干扰(RNA interference,RNAi)可导致靶基因序列中同源双链RNA引起一种特异性转录后的基因沉默现象[3];RNAi具有序列特异性、高效性、药物毒性小等特点,可参与调控细胞增殖、分化、凋亡,影响非肿瘤与肿瘤的发病[4]。RNAi已成为基因功能研究,甚至癌症基因治疗的重要手段。目前小干扰RNA(small interfering RNA,siRNA)技术已被用于食管癌[5]、胰腺癌[6]、喉癌[7]、肺癌[8]等研究,但在OA中的报道鲜为少见。

因此,本研究通过设计合成针对siRNA转染人软骨细胞,观察Skp2在人软骨细胞中蛋白表达情况及基因沉默后对人软骨细胞作用,为OA进一步基因靶向治疗提供依据。

1　材料与方法

1.1　材料

人软骨细胞完全培养基(CM-H107,普诺赛);IL-1β(CG93,novoprotein);FBS(10099-141,Gibco);Lipofectamine 3000 Transfection Reagent(L3000015,Invitrogen);OPTI-MEM培养基(31985-062,Gibco);胰蛋白酶-EDTA消化液(T1300,Solarbio);1×PBS(0.01 mol/L,pH7.4)(KGB5001,凯基生物);CCK-8法细胞增殖检测试剂盒(KGA317,凯基生物);内参:*β-actin*;Skp2 siRNA-318,Skp2 siRNA-504,Skp2 siRNA-59(洪博元分子实验室提供);Trizon Reagent(CW0580S,CWBIO);超纯RNA提取试剂盒(CW0581M,CWBIO);HiScript Ⅱ QRT SuperMix for qPCR(+gDNAwiper)(R223-01,Vazyme);ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(Q711-02,Vazyme);50×TAE缓冲液(T1060,Solarbio);6×DNA Loading Buffer(GH101-01,TRANS);50 bp DNA Ladder(MD108,TIANGEN);Gsafe Red plus核酸染料(GK20002,GLPBIO);琼脂糖粉(75510-019,Invitrogen)。

1.2　方法

1.2.1　siRNA设计及载体构建　根据基因库Genebank中提供人类Skp2(NM_001243120,Gene ID:6502)序列,通过https://www.ncbi.nlm.nih.gov/网站在线siRNA设计工具设计三条siRNA。设计基因靶点是在NS基因的第59、318、504位点,靶点序列分别是:Skp2(human) siRNA-59:CAAAAAACUCAAAUUUAGUTTACUAAAU-UUGAGUUUUUUGTT;Skp2(human) siRNA-318:CCAUCUAGACUUAAGUGAUTTAU-CACUUAAGUCUAGAUGGTT;Skp2(human) siRNA-504:CCUUCAACUGUUAAAGGAAT-TUUCCUUUAACAGUUGAAGGTT;并设置阴性对照siRNA:UUCUCCGAACGUGUCACGUT-TACGUGACACGUUCGGAGAATT和空载组。与任何基因序列均无同源性,以上序列均由江西中洪博元生物技术有限公司合成。模板链两端分别设计*Sac*Ⅰ和*Xho*Ⅰ酶切位点,载体构建名称:YCS-WT-Skp2-Pmi-rGLO,将结合位点进行突变,将突变目的基因片段进行生物合成,与pmirGLO载体相连,载体构建名称为YCS-UMT-Skp2-pmirGLO。使用SacⅠ和XhoⅠ双酶切突变YCS-UMT-Skp2-pmirGLO质粒,在pmirGLO载体上连接目的片段。将2个多聚核苷酸片段置于37 ℃条件下酶切30 min后,进行1%琼脂糖凝胶电泳分离得到条带。紫外灯下切下线性化的条带,应用琼脂糖DNA回收试剂盒,回收线性化的载体并发生连接反应的体系如下:目的质粒(50 ng)1 μL,pmirGLO-F 0.5 μL,pmirGLO-R 0.5 μL,2× ES Taq Master Mix(Dye)12.5 μL,去离子水10.5 μL。连接产物分别命名为:siRNA-59、siRNA-318、siRNA-504和NC(阴性对照质粒)。

1.2.2　细胞转染　本实验分为5组:空载组、NC组、Skp2 siRNA-59组、Skp2 siRNA-318组、Skp2 siRNA-504组。首先,在6孔板上植入细胞,每个孔约2×10^5～10×10^5个细胞,6 cm皿每孔约5×10^5～2×10^6个细胞。当细胞密度达到70%时,准备转染;用容量为1 mL的无血清培养基取代细胞培养基;其次,取2支灭菌EP管,每支加入125 μL Opti-MEM,其中1支加入5 μL lipofectamine 3000,另1支加入12.5 μL siRNA或者miRNA(siRNA或者miRNA干粉使用DEPC水溶解;125 μL/1OD),混匀后室温孵育5 min;最后,将以上2支EP试管混匀,在室温孵育15 min后,把混合溶液滴入6孔板相应小孔中,将细胞移回室温孵育。当转染4～6 h后,将1 mL含20%血清完全培养基加到6孔板中,在48 h后进行后续实验。

1.2.3 RT-PCR检测*Skp2* mRNA表达水平 对人软骨细胞总RNA进行RT-PCR检测，根据TRIzol操作说明书进行总RNA提取，用紫外分光光度仪从38 μL体系的总RNA溶液中抽取1.3 μL，在OD_{260}和OD_{280}下测定数据并记录。RNA浓度和纯度分别由$OD_{260}\times40$=RNAng/μL公式、$1.8\leqslant OD_{260}/OD_{280}\leqslant2.2$公式计算。提取总RNA进行琼脂糖凝胶电泳，进行RNA跑胶，电压200 V，电流180 mA左右，时间13 min左右，取出凝胶，化学发光成像系统仪在显影后进行图像采集。根据HiScript Ⅱ QRT SuperMix for qPCR逆转录试剂盒操作方法获得到单链cDNA。PCR反应体系：2×miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL，cDNA模板1 μL，引物各0.4 μL，去DEPC水8.2 μL总体积20 μL。PCR条件为：95 ℃预变性10 min；95 ℃变性10 s；58 ℃(*β-actin* F、*β-actin* R为58 ℃，*Skp2* F、*Skp2* R为60.5 ℃)退火30 s，72 ℃延伸30 s，40个循环。PCR产物琼脂糖凝胶电泳，超高灵敏度的化学发光成像系统仪所获取的影像，以*β-actin*为内参，引物名称及序列见表1。

表1 引物名称及序列

Tab 1 Names and sequences of primers

引物名称	引物序列(5′-3′)	产物长度(bp)	退火温度(℃)
β-actin F	AGGGAAATCGTGCGTGAC	192	58.0
β-actin R	CATACCCAAGAAGGAAGGCT		
Skp2 F	TGCTAAGCAGCTGTTCCAGACT	195	60.5
Skp2 R	CTAGATGGACAAGATTGGGGCAT		

1.2.4 细胞增殖抑制率检测 先将细胞贴壁后加药24 h，将待测96孔板细胞用相同的培养基，每孔100 μL；并在每个孔中添加10 μLCCK8试剂，然后放入培养箱孵化2 h，酶标仪检测450 nm波长下各孔吸光值(IOD值)。当细胞贴壁后加药24 h，再把待测96孔板细胞用相同培养基，100 μL/孔培养基替换；*Skp2* mRNA表达抑制率(%)计算方法为：1-siRNA组*Skp2* mRNA/NC组*Skp2* mRNA×100%。

1.2.5 统计学处理 运用SPSS 18.0软件进行统计分析，组间用*t*检验和普通单因素方差分析比较均数，实验数据采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，$P<0.05$为差异有统计学意义。

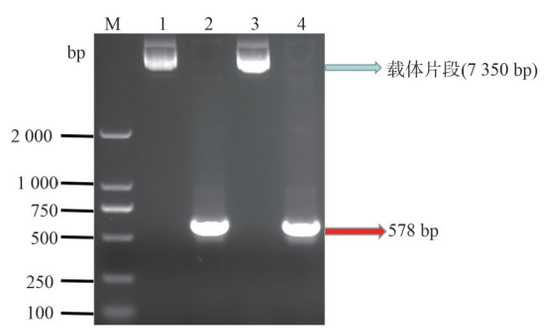
2 结果

2.1 重建质粒的酶切鉴定及测序鉴定

YCS-WT-Skp2-pmirGLO、YCS-MUT-Skp2-pmirGLO载体通过PCR扩增后的条带为578 bp，见图1，电泳检测结果和理论值吻合相似，测序结果和设计的DNA片段序列完全一致，证实均为正确质粒，得到的重组干扰质粒的目的片段完全相符预期。

2.2 重组质粒转染对*Skp2* mRNA表达的影响

重组质粒经转染后，siRNA-59、siRNA-318和siRNA-504转染组*Skp2* mRNA表达明显低于NC组，具有显著性差异($P<0.05$)，且以siRNA-504 *Skp2* mRNA表达最低；而空载组和NC组比较，差异具有统计学意义($P<0.05$)，siRNA干扰后实验各组Skp2 mRNA表达量，见表2；重组质粒转染对*Skp2* mRNA表达的影响见图2。同时，进一步采用DNA电泳对其结果进行验证，其结果与各组重组质粒转染后*Skp2* mRNA结果一致。空载组、NC组、siRNA-59组、siRNA-318组和siRNA-504组表达量从左至右，分组顺序与浓度测定一致，*β-actin*、*Skp2*条带亮度正常且位置正确，为目的产物，见图3。



M：Trans 2K DNA Marker；1：YCS-WT-Skp2-pmirGLO；2：YCS-WT-Skp2-pmirGLO PCR产物；3：YCS-MUT-Skp2-pmirGLO；4：YCS-UMT-Skp2-pmirGLO PCR产物

图1 琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物条带大小

Fig 1 Agarose gel electrophoresis detection of PCR products stripe size

2.3 细胞增殖抑制率检测

细胞增殖抑制率检测：采用1-siRNA组*Skp2* mRNA/NC组*Skp2* mRNA×100%，计算出siRNA-59组、siRNA-318组、siRNA-504组的细胞增殖抑制率，结果分别为：60%、41%、64%，其中以siRNA-504组的细胞增殖抑制率最为显著。

表 2　siRNA干扰后实验各组 *Skp2* mRNA表达量(n=3)

Tab 2　*Skp2* mRNA expression quantity after siRNA interference in all experimental groups(n=3)

分组	*Skp2* mRNA表达($\bar{x}\pm s$)	P
空载组	0.759±0.037	
NC组	1.000±0.009	0.004[a]
siRNA-59组	0.905±0.061	0.015[b]
siRNA-318组	0.926±0.114	0.011[c]
siRNA-504组	0.755±0.021	0.024[d]

注：5组组间比较，F=9.468；a:空载组与NC组间比较；b:siRNA-59组与siRNA-504组间比较；c:NC组与siRNA-59组、siRNA-318组、siRNA-504组间比较；d:空载组与siRNA-59组、siRNA-318组、siRNA-504组间比较；其余各组间，比较P值均＞0.05。

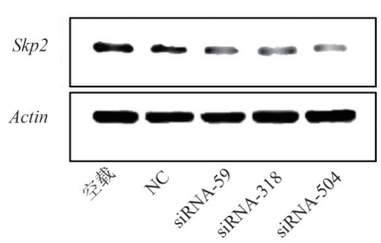


图 2　重组质粒转染对 *Skp2* mRNA表达的影响

Fig 2　Effect of recombinant plasmid transfection on *Skp2* mRNA expression

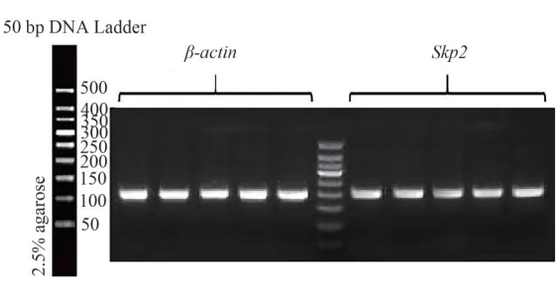


图 3　DNA电泳结果

Fig 3　DNA electrophoresis results

3　讨论

1998年，Fire等[9]首次发现双链RNA(double-stranded RNA，dsRNA)是秀丽隐杆线虫转录后基因沉默的致病因子，并将这种现象称为RNAi。RNAi作为进化过程中高度保守的双链RNA分子之一，可调节几乎人类所有细胞中mRNA的稳定性和翻译[3]。在RNAi中，有个重要的核酸内切酶Dicer，它可与双链RNA分子结合，并从dsRNA钝头或3端有小悬突的dsRNA上进行切割，将其剪切成21-23nt长及3′端突出的片段，即siRNA[10]。siRNA对核苷酸序列具有高度特异性，可有效地对特定基因进行RNAi沉默[3]，这是因为siRNA在细胞内被依附于RNA的RNA聚合酶1、2、6进一步扩增，并以单链的形式与AGO1蛋白结合，从而形成由RNA诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex，RISC)，引导部分或完全互补的mRNA与其相互作用，导致特异的mRNA被降解，产生转录后水平基因沉默(post-transcriptional gene silencing，PTGS)[11]。PTGS存在于自然生物细胞中，是细胞抵抗外来核酸入侵，并维持自身基因组完整性的一种防御手段[12]；PTGS能将特异性同源双链RNA导入细胞内，使靶点基因不表达或者表达水平下降。因此，RNAi也作为一种简单有效的代替基因敲除的方法[11]。随着RNAi技术的不断发展，由于其具有高稳定性、高特异性及高效性等特点，已在基因功能及肿瘤治疗方面被广泛运用[13]，但在OA领域则较为少见。所以，RNAi的发现和应用为生物医学研究提供一个独特且适应性强的工具，成为发展生命科学和药物研发的重要方向[14]。RNAi也有望成为治疗OA的一种有效方法，为防治OA开辟新的途径。

*Skp2*作为Skp1-Cullin-F-box(SCF复合体)E3连接酶中的一种F-box蛋白，可通过泛素介导G1检查点CDK抑制剂-p21和p27、p57和叉头转录因子1降解来靶向细胞周期进程。由于*Skp2*具有调控细胞周期的作用[4]，所以其表达水平影响肿瘤发生、发展、预后等[2,15-17]。目前*Skp2*在肿瘤领域研究较多，但在OA的研究甚少。Wang等[18]通过对GSE48556、GSE46750、GSE32317数据集综合荟萃分析发现，*Skp2*存在于OA中；且认为高糖状态下*Skp2*过表达可促进软骨细胞增殖[19]。同时，研究发现在营养丰富的条件下，*Skp2*的SCFE3泛素连接酶可维持细胞核中精氨酸甲基转移酶共激活因子1(CARM1)稳定性[20]；而在饥饿状态下，*Skp2*则会激活细胞核中的AMP依赖蛋白激酶(AMPK)，激活的AMPK使叉头转录因子O3磷酸化，导致*Skp2*下调并增加细胞核中CARM1蛋白水平；稳定的CARM1作为转录因子EB必要激活因子，进而调控细胞自噬和溶酶体基因的表达。由于*Skp2*在AMPK-Skp2-CARM1信号轴中发挥关键介质作用[21]，所以*Skp2*被认为是自噬相关疾病潜在治疗靶点[19]。生信预测发现*Skp2*是OA的关键基因[18]，而自噬能够清除受损和功能失调的细胞器和大分子，保持OA软骨内环境的稳态[22]，因而推断*Skp2*可能在OA自噬中发挥重要作用。因此，观察*Skp2*在人软骨细胞中的表达情况，为研究*Skp2*在OA中的靶向治疗提供依据。

本实验通过使用在线siRNA设计工具，利用Skp2序列作为靶位点，设计三条序列，采用基因重组技术，成功体外构建*Skp2* siRNA表达载体，然后转染到人软骨细胞。结果发现，siRNA-59、siRNA-318、siRNA-504转染组*Skp2* mRNA表达明显低于NC组，具有显著性差异（$P<0.05$）；进一步采用DNA电泳对其结果进行验证，其结果与各组重组质粒转染后*Skp2* mRNA结果一致。进而观察对*Skp2* mRNA表达抑制率，实验显示*Skp2* mRNA在siRNA-59、siRNA-318、siRNA-504中的抑制率分别为60%、41%、64%，其中以siRNA-504转染组抑制率最高。针对*Skp2*的siRNA，能有效降低*Skp2* mRNA表达，产生基因沉默效应，提示*Skp2*可能成为OA治疗的一个靶基因，而*Skp2*第504位点可能是研究其重要靶点。

本研究通过构建载体，成功介导siRNA对人软骨细胞*Skp2*表达的抑制作用，表明在OA基因治疗领域中具有可行性。随着siRNA技术的日臻完善，该技术可能成为OA基因治疗的重要组成部分。

作者贡献度说明：

袁长深：文章撰写，文章后期审校；李彦宏、刘晋邑、廖书宁、徐文飞：文章内容修改；段戡：文章设计。梅其杰：文章评估。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Cai Z, Moten A, Peng D, et al. The Skp2 pathway: A critical target for cancer therapy[J]. Semin Cancer Biol, 2020, 67: 16-33.

2 Asmamaw MD, Liu Y, Zheng YC, et al. Skp2 in the ubiquitin-proteasome system: A comprehensive review[J]. Med Res Rev, 2020, 40(5): 1920-1949.

3 Setten RL, Rossi JJ, Han SP. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics[J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(6): 421-446.

4 Kara G, Calin GA, Ozpolat B. RNAi-based therapeutics and tumor targeted delivery in cancer[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2022, 182: 114113.

5 Cui Z, Liu J, Sun Q, et al. GPR120 promotes radiation resistance in esophageal cancer via regulating AKT and apoptosis pathway[J]. Anticancer Drugs, 2021, 32(1): 53-60.

6 Mirzaei S, Gholami MH, Ang HL, et al. Pre-clinical and clinical applications of small interfering RNAs (siRNA) and co-delivery systems for pancreatic cancer therapy[J]. Cells, 2021, 10(12): 3348.

7 Miao J, Zhang L, Gao P, et al. Chitosan-based glycolipid conjugated siR-NA delivery system for improving radiosensitivity of laryngocarcinoma[J]. Polymers (Basel), 2021, 13(17): 2929.

8 Gencer A, Duraloglu C, Ozbay S. Recent advances in treatment of lung cancer: Nanoparticle-based drug and siRNA delivery systems[J]. Curr Drug Deliv, 2021, 18(2): 103-120.

9 Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.

10 Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. Nature, 2001, 409(6818): 363-366.

11 Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, et al. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs[J]. Science, 2008, 320(5880): 1185-1190.

12 Marathe R, Anandalakshmi R, Smith TH, et al. RNA viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing[J]. Plant Mol Biol, 2000, 43(2-3): 295-306.

13 Xin Y, Huang M, Guo WW, et al. Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 134.

14 Traber GM, Yu AM. RNAi-based therapeutics and novel RNA bioengineering technologies[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2023, 384(1): 133-154.

15 Thompson LL, Rutherford KA, Lepage C, et al. The SCF complex is essential to maintain genome and chromosome stability[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16): 8544.

16 Thompson LL, Baergen AK, Lichtensztejn Z, et al. Reduced SKP1 expression induces chromosome instability through aberrant cyclin E1 protein turnover[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(3): 531-548.

17 Khan AQ, Siveen KS, Prabhu KS, et al. Curcumin-mediated degradation of S-phase kinase protein 2 induces cytotoxic effects in human papillomavirus-positive and negative squamous carcinoma cells[J]. Front Oncol, 2018, 8: 399.

18 Wang X, Ning Y, Guo X. Integrative meta-analysis of differentially expressed genes in osteoarthritis using microarray technology[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(3): 3439-3445.

（下转第996页）