

## 基础研究

利用 RNAi 技术稳定抑制 ER $\beta$  表达的人成骨细胞株 hFOB 1.19 细胞模型的建立

邓 鑫, 张宏其, 郭超峰, 唐明星, 刘少华, 王昱翔, 高琪乐

(中南大学湘雅医院脊柱外科 湘雅脊柱外科中心 410008 长沙市)

**【摘要】目的:**探讨利用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术稳定抑制雌激素受体  $\beta$  (Estrogen receptor  $\beta$ , ER $\beta$ ) 表达建立人成骨细胞株 hFOB 1.19 细胞模型的可行性。**方法:**设计 3 种特异性 ER $\beta$ -shRNA, 体外合成后将其克隆入 pRNAT-H1.4/Retro 逆转录病毒质粒中, 并包装成逆转录病毒; ER $\beta$ -shRNA 逆转录病毒瞬时感染 hFOB 1.19 细胞后, 通过流式细胞仪检测感染效率, 并使用半定量 RT-PCR 和 Western blot 检测对 ER $\beta$  mRNA 和蛋白表达的抑制效率; 然后取 ER $\beta$  抑制效率最高的 hFOB 1.19 细胞, 通过抗性筛选, 将得到稳定感染的细胞扩大培养, 再通过半定量 RT-PCR 和 Western blot 检测 ER $\beta$  稳定抑制的效率; 并应用 MTT 法检测 ER $\beta$  稳定抑制后对细胞增殖的影响。**结果:**成功构建了 3 种 ER $\beta$ -shRNA 逆转录病毒载体; 流式细胞仪检测结果显示, 瞬时感染效率均高达 70% 以上; ER $\beta$ -shRNA-1、ER $\beta$ -shRNA-2、ER $\beta$ -shRNA-3 逆转录病毒载体对 hFOB 1.19 细胞中 ER $\beta$  mRNA 的抑制率分别为 (54.56 $\pm$ 0.95)%、(69.60 $\pm$ 1.12)%、(76.49 $\pm$ 1.15)%, 蛋白的抑制率分别为 (59.21 $\pm$ 4.44)%、(78.35 $\pm$ 2.00)%、(85.60 $\pm$ 2.66)% (均  $P < 0.05$ ); 成功筛选出稳定感染 ER $\beta$ -shRNA-3 逆转录病毒载体的 hFOB 1.19 细胞, ER $\beta$  mRNA 和蛋白的抑制率分别为 (83.23 $\pm$ 2.45)% 和 (93.11 $\pm$ 0.57)% (均  $P < 0.05$ ), MTT 法检测显示 ER $\beta$  稳定抑制后对细胞的增殖没有明显影响 ( $P > 0.05$ )。**结论:**利用 RNAi 技术可成功建立 ER $\beta$  稳定抑制的 hFOB 1.19 细胞模型。

**【关键词】** RNA 干扰; 雌激素受体  $\beta$ ; 人成骨细胞

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2012.08.12

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2012)-08-0722-07

**Establishment of the cell model of human osteoblast cell line hFOB 1.19 in which ER $\beta$  expression stably inhibited by RNAi/DENG Ang, ZHANG Hongqi, GUO Chaofeng, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2012, 22(8): 722-728**

**【Abstract】Objectives:** To study the establishment of the cell model of human osteoblast cell line hFOB 1.19 in which estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) expression was stably inhibited by RNA interference (RNAi). **Methods:** Three designed ER $\beta$ -shRNA sequences were synthesized and cloned into the expression vectors of pRNAT-H1.4/Retro, then packaged into retrovirus. After transfection of hFOB 1.19 by ER $\beta$ -shRNA retroviral vectors, the transfection rates were measured by flow cytometry, and the inhibition rates of ER $\beta$  mRNA and protein were measured by semi-quantitative RT-PCR and Western-blot respectively. The hFOB 1.19 of the most efficient inhibition of ER $\beta$  was selected by hygromycin and cultured for proliferation. The stable inhibition rates of ER $\beta$  were measured by semi-quantitative RT-PCR and Western-blot respectively. The MTT method was used to measure the influence on the cell proliferation when ER $\beta$  expression was stably inhibited. **Results:** Three ER $\beta$ -shRNA retroviral vectors were constructed successfully and packaged into high efficient retrovirus. The results of flow cytometry showed that the transfection rates were all higher than 70%. By ER $\beta$ -shRNA-1, ER $\beta$ -shRNA-2 and ER $\beta$ -shRNA-3 retroviral vectors, the inhibition rate of ER $\beta$  mRNA in hFOB 1.19 was (54.56 $\pm$ 0.95)%, (69.60 $\pm$ 1.12)% and (76.49 $\pm$ 1.15)% respectively, while the inhibition rate of ER $\beta$  protein was (59.21 $\pm$ 4.44)%, (78.35 $\pm$ 2.00)% and (85.60 $\pm$ 2.66)% respectively (all  $P < 0.05$ ). The hFOB 1.19 stably transfected

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(08JJ3057); 湖南省科技厅科技计划一般项目(08FJ3171)

第一作者简介: 男(1983-), 博士, 医师, 研究方向: 脊柱外科临床及相关基础研究

电话: (0731)89753001 E-mail: deng.aimar@163.com

通讯作者: 张宏其 E-mail: zhq9996@163.com

by ER $\beta$ -shRNA-3 retroviral vector was selected successfully, the stable inhibition rate of ER $\beta$  mRNA and protein was (83.23 $\pm$ 2.45)% and (93.11 $\pm$ 0.57)% respectively(all  $P < 0.05$ ), and the result of MTT method showed that there was no significant influence on the cell proliferation when ER $\beta$  expression was stably inhibited ( $P > 0.05$ ). **Conclusions:** The cell model of hFOB 1.19 was established in which ER $\beta$  expression was stably inhibited.

**【Key words】** RNA interference; Estrogen receptor  $\beta$ ; Human osteoblast cell

**【Author's address】** Department of Spinal Surgery, Xiangya Hospital Affiliated to Central South University, Xiangya Spinal Surgery Center, Changsha, 410008, China

青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)是指脊柱偏离身体中线向侧方凸出伴椎体旋转的三维畸形, 发病率文献报道为 0.5%~1%<sup>[1]</sup>。目前提出的假说包括基因遗传、神经系统平衡功能异常、神经内分泌异常以及躯干生长不平衡等。其中, 遗传因素在 AIS 发展中的作用已经得到广泛认同<sup>[2]</sup>。近年研究发现, AIS 患者常伴有全身性的骨密度降低等骨代谢异常现象<sup>[3]</sup>, 且认为 AIS 患者的低骨量、骨质疏松可能与雌激素受体(estrogen receptor, ER)基因有关<sup>[4]</sup>, 我们的前期研究亦证明, 雌激素受体  $\beta$ (ER $\beta$ )基因多态性与 AIS 发生发展有关<sup>[5]</sup>。因此, 我们拟利用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术建立 ER $\beta$  稳定抑制的人成骨细胞株 hFOB 1.19 细胞模型, 为进一步从细胞水平探索 ER $\beta$  基因在 AIS 骨代谢中的作用及调控机制奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人成骨细胞株 hFOB 1.19 购自中国科学院细胞库, 逆转录病毒质粒 pRNAT-H1.4/Retro (Catalogue No.:SD1253) 及 GP2-293 包装细胞购自南京金斯瑞公司, JM109 大肠杆菌为中南大学医学遗传学国家重点实验室赠送, LA Taq 酶(Takara 公司)、无酚红 DMEM/F-12 培养液(Gibco 公司)、胎牛血清 (Invitrogen 公司)、二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(Sigma 公司)、NucleoBond<sup>®</sup> Xtra Maxi (MACHEREY-NAGEL 公司)、Trizol 裂解液 (Invitrogen 公司)、逆转录试剂盒(Promega 公司)、潮霉素 (Roche 公司)、兔抗人 ER $\beta$  一抗(Santa Cruz 公司)、鼠抗人  $\beta$ -actin 一抗(Sigma 公司)、四氮唑蓝盐 MTT 溶液 (Sigma 公司), 所有引物由上海生物工程公司合成。

**1.2 人 ER $\beta$  特异性短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA)序列的设计**

登陆 Genbank 网获得人 ER $\beta$  基因的 CDS 序列 (编号:32096.1), 根据根据小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)设计原则, 针对所选择的人 ER $\beta$  基因 RNAi 靶序列, 在因特网(网址 <http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA-design.html>)上设计了 3 条长度为 19bp 的 siRNA 片段, 并通过 BLAST 软件验证其正确性。将设计的 19bp 干扰片段反义互补, 中间以 9bp 的 loop 区相隔, 两端为保护碱基以及 Xho I 和 Mlu I 酶切黏性末端, 合成 70bp 的互补 shRNA 序列以备定向克隆人 pRNAT-H1.4/Retro。含无效干扰片段(ER $\beta$ -shRNA-nc)的阴性对照 pRNAT-H1.4/Retro 购自南京金斯瑞公司(表 1)。

**1.3 ER $\beta$ -shRNA 逆转录病毒载体的构建、鉴定及包装**

将合成的互补 ER $\beta$ -shRNA 序列各 18 $\mu$ l、退火 Buffer (10 $\times$ )4 $\mu$ l 混合后, 90 $^{\circ}$ C 水浴 4min, 70 $^{\circ}$ C 10min, 逐渐冷却至室温。然后用 T4 DNA 连接酶对退火产物和线性化的 pRNAT-H1.4/Retro 进行连接, 体系为: 线性化的 pRNAT-H1.4/Retro (100ng/ $\mu$ l)1 $\mu$ l、退火的双链 DNA (100ng/ $\mu$ l)1 $\mu$ l、缓冲液 1 $\mu$ l、T4 DNA 连接酶 1 $\mu$ l、dd H<sub>2</sub>O 6 $\mu$ l, 总体积 10 $\mu$ l, 16 $^{\circ}$ C 进行连接过夜。连接产物转化至 JM109 感受态细菌, 氨苄青霉素抗性平板上筛选重组质粒及扩大培养, 抽提质粒并纯化, 将重组质粒进行测序(华大基因科技公司)。然后 pRNAT-H1.4/Retro 重组质粒 10 $\mu$ g、PVSU-G 载体 10 $\mu$ g 与相应体积的 DMEM 混匀, 总体积 2.5ml, 室温下温育 5min; 同时 100 $\mu$ l Lipofectamine 2000 与 2.4ml DMEM 混合, 室温下温育 5min; 把稀释后的重组质粒与 Lipofectamine 2000 混匀, 室温下温育 20min; 再将上述混合液移至 293 包装细胞的培养液中混匀, 于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 8h 后, 更换为新鲜完全培养基, 继续培养 48h; 收集上清液并离心、过滤及浓缩。

表 1 ERβ-shRNA 序列的设计  
Table 1 Sequence design of ERβ-shRNA

| 逆转录病毒重组质粒<br>Recombinant<br>retroviral vector | 靶序列<br>Target sequence     | 克隆入载体序列<br>Sequence cloned into vector                                                                                                                                     |
|-----------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ERβ-shRNA-1                                   | 5'-GGCCTCTCAAACACTCACCT-3' | F:5'-ACGCGTCGGCCTCTCAAACACTCACCTCAAGAGAGGTGAGTCTTTGA<br>GAGGCGCTTTTTTCCAACCTCGAG-3'<br>R:5'-CTCGAGTTGGAAAAAGCGCTCTCAAACACTCACCTCTCTTGAAGGTG<br>AGTGTCTTGAAGAGGCCGACGCGT-3' |
| ERβ-shRNA-2                                   | 5'-GCAACGATGGAGCACTGAC-3'  | F:5'-ACGCGTCGCAACGATGGAGCACTGACTTCAAGAGAGTCACTGCTCCAT<br>CGTTGCTTTTTTCCAACCTCGAG-3'<br>R:5'-CTCGAGTTGGAAAAAGCAACGATGGAGCACTGACTCTCTTGAAG<br>TCACTGCTCCATCGTTGCGACGCGT-3'   |
| ERβ-shRNA-3                                   | 5'-GACGGATTCTCTTCAGATG-3'  | F:5'-ACGCGTCGACGGATTCTCTTCAGATGTTCAAGAGACATCTGAAGAGAA<br>TCCGCTCTTTTTTCCAACCTCGAG-3'<br>R:5'-CTCGAGTTGGAAAAAGACGGATTCTCTTCAGATGCTCTTGAACA<br>TCTGAAGAGAATCCGTCGACGCGT-3'   |
| ERβ-shRNA-nc                                  | 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'  | F:5'-CCGGTCTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGA<br>GAATTTTTCG-3'<br>R:5'-AATTCAAAAATTCTCCGAACGTGTCACGTTCTCTTGAACGTGACA<br>CGTTCGGAGAA-3'                            |

1.4 人成骨细胞株 hFOB 1.19 的瞬时感染

实验分 5 组:空白对照组(即 hFOB 1.19,未感染任何逆转录病毒)、阴性对照组(即 ERβ-shRNA-nc)、RNAi 组 1~3(即 ERβ-shRNA-1、ERβ-shRNA-2、ERβ-shRNA-3)。取对数生长期的 hFOB 1.19 细胞,接种于 12 孔板,于 34℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 12h,将收集的逆转录病毒加 polybrene 至 5μg/ml,0.45μm 微型滤器过滤,分别加入上述细胞中,24h 后更换为新鲜无酚红 DMEM/F-12 完全培养基,恢复培养 24h 后,通过流式细胞仪检测 GFP 荧光表达情况。

1.5 半定量 RT-PCR 检测瞬时感染后 ERβ mRNA 的表达

Trizol 抽提瞬时感染后细胞的总 RNA,根据逆转录试剂盒(Promega 公司)操作说明进行 RT 反应,然后通过 PCR 反应扩增 ERβ 目的基因。登陆 GeneBank 网,获得 ERβ 和 β-actin mRNA 序列后,在 Primer Premier 5.0 软件设计引物,ERβ 上游引物为 5'-TCCTTTAGTGGTCCATCGC-3',下游引物为 5'-CGCAGAAGTGAGCATCCC-3',扩增长度为 188bp;内参照 β-actin 上游引物为 5'-TGAAGTGTGACGTGGACATC-3',下游引物为 5'-GGAGGAGCAATGATCTTGAT-3',扩增长度为 151bp,扩增条件为 95℃ 5min,95℃ 30s,60℃ 30s,72℃ 60s,以上 10 个循环(-0.8℃/循环),然后 95℃ 30s,52℃ 30s,72℃ 60s,以上 30 个循环,最后 72℃ 10min。反应完成后通过凝胶成像测灰度行数据分析,测定 ERβ 与 β-actin 扩增产物条

带的吸光度值,并算出二者比值,即各实验组 ERβ 的相对表达量;ERβ 的相对表达率=实验组 ERβ 的相对表达量/空白对照组的相对表达量,反之,抑制率=1-相对表达率。每组设置 3 个复孔,实验在相同条件下重复 3 次。

1.6 半定量 Western blot 检测瞬时感染后 ERβ 蛋白的表达

细胞裂解液裂解瞬时感染后细胞,提取总蛋白,经 12% SDS-PAGE 电泳后转移到 PVDF 膜上,封闭后与特异性一抗(兔抗人 ERβ 抗体, Santa Cruz 公司;鼠抗人 β-actin 抗体, Sigma 公司)置于转钴上,100rpm,室温下孵育 1h。洗一抗后再加二抗,室温下孵育 1h,加入 ECL 液,暗室中曝光 2min,X 线片显影,再通过凝胶成像测灰度行数据分析,分析方法与 1.5 半定量 RT-PCR 相同。

1.7 细胞筛选和克隆挑取、扩大及传代

实验分 3 组:空白对照组(即 hFOB 1.19,未感染任何逆转录病毒)、阴性对照组(即 ERβ-shRNA-nc)、最佳 RNAi 组。将瞬时感染后的 hFOB 1.19 细胞加入终浓度为 100μg/ml 的潮霉素进行筛选,直至未感染细胞全部死亡,继续培养至 14d;将培养皿随机放于显微镜下选取待挑克隆,被选取的条件为在 4 倍目镜下大于半个显微镜视野,随机的方法为镜下见到的第一个克隆;将吸取的细胞克隆吹打到已加入维持培养基(潮霉素较原筛选浓度减半,50μg/ml)的 24 孔板中,继续扩大培养、传代。

## 1.8 半定量 RT-PCR 检测稳定感染克隆中 ER $\beta$ mRNA 的表达

检测方法同 1.5。

## 1.9 半定量 Western blot 检测稳定感染克隆中 ER $\beta$ 蛋白的表达

检测方法同 1.6。

## 1.10 MTT 法检测细胞增殖

取对数生长期的各实验组细胞,以 1000 个细胞/孔接种于 96 孔板中,每组设 3 个复孔,于 34 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$  培养箱中培养;分别于 1、2、3、4、5、6、7d 进行检测。每孔加入 MTT(5mg/ml) 20 $\mu$ l,继续培养 4h;吸弃孔内培养基,加入 DMSO 150 $\mu$ l,室温振荡 10min,同时设置调零孔(培养基、MTT、DMSO),酶标仪上 490nm 测定各孔吸光度 OD 值,以 OD 值表示细胞增殖能力大小,各组取 3 孔平均值,相同条件下实验重复 3 次,绘制生长曲线。

## 1.11 统计学处理

采用 SPSS 15.0 统计软件进行分析。数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间差异比较采用单因素方差分析(ANOVA),方差齐性时采用 SNK 检验,方差不齐时采用 Dunnett'C 检验;以  $\alpha=0.05$  为显著性检验水准, $P<0.05$  认为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 构建载体的鉴定

经过测序证实,合成的 ER $\beta$ -shRNA 寡核苷酸链已正确插入 pRNAT-H1.4/Retro 逆转录病毒重组质粒中,且无突变(图 1)。

## 2.2 逆转录病毒的包装

荧光显微镜观察 GFP 荧光表达情况,得知逆转录病毒重组质粒成功、高效地转染入 293 包装细胞(图 2)。

## 2.3 人成骨细胞株 hFOB 1.19 的瞬时感染

经流式细胞仪检测 ER $\beta$ -shRNA-nc、ER $\beta$ -shRNA-1、ER $\beta$ -shRNA-2、ER $\beta$ -shRNA-3 逆转录病毒感染的 hFOB 1.19 细胞,GFP 荧光表达效率分别为 71.12%、70.25%、72.13%、71.04%,说明逆转录病毒具有良好的细胞感染能力。

## 2.4 ER $\beta$ -shRNA 逆转录病毒瞬时感染后对 ER $\beta$ mRNA 的抑制作用

半定量 RT-PCR 的结果显示,RNAi 1~3 组

的 ER $\beta$  mRNA 的表达显著低于 ER $\beta$ -shRNA-nc 组(即阴性对照组)及 hFOB 1.19 组(即空白对照组)( $P<0.05$ )(图 3、表 2),抑制率分别为(54.56 $\pm$ 0.95)%、(69.60 $\pm$ 1.12)%、(76.49 $\pm$ 1.15)%,ER $\beta$ -shRNA-nc 组与 hFOB 1.19 组相比,无显著差别( $P>0.05$ )。

## 2.5 ER $\beta$ -shRNA 逆转录病毒瞬时感染后对 ER $\beta$ 蛋白表达的抑制作用

半定量 Western blot 结果显示,RNAi 1~3 组的 ER $\beta$  蛋白表达均显著低于 ER $\beta$ -shRNA-nc 组及 hFOB 1.19 组( $P<0.05$ )(图 4、表 2),抑制率分别为(59.21 $\pm$ 4.44)%、(78.35 $\pm$ 2.00)%、(85.60 $\pm$ 2.66)%,ER $\beta$ -shRNA-nc 组与 hFOB 1.19 组相比,无显著差别( $P>0.05$ )。

## 2.6 稳定感染克隆中 ER $\beta$ mRNA 的表达

半定量 RT-PCR 检测稳定感染克隆,结果表明 ER $\beta$ -shRNA-3 组的 ER $\beta$ mRNA 的表达显著低于 ER $\beta$ -shRNA-nc 组及 hFOB 1.19 组( $P<0.05$ )(图 5、表 3),抑制率为(83.23 $\pm$ 2.45)%;ER $\beta$ -shRNA-nc 组与 hFOB 1.19 组相比,无显著差别( $P>0.05$ )。

## 2.7 稳定感染克隆中 ER $\beta$ 蛋白的表达

半定量 Western blot 检测稳定感染克隆,结果表明 ER $\beta$ -shRNA-3 组的 ER $\beta$  蛋白的表达显著低于 ER $\beta$ -shRNA-nc 组及 hFOB 1.19 组( $P<0.05$ )(图 6、表 3),抑制率为(93.11 $\pm$ 0.57)%;ER $\beta$ -shRNA-nc 组与 hFOB 1.19 组相比,无显著差别( $P>0.05$ )。

## 2.8 ER $\beta$ 稳定抑制后对 hFOB 1.19 细胞增殖的影响

MTT 法检测各实验组细胞的生长曲线表明:ER $\beta$  稳定抑制后对 hFOB 1.19 细胞的增殖没有明显影响( $P>0.05$ )(图 7)。ER $\beta$ -shRNA-nc 组与 hFOB 1.19 组相比亦无明显差异( $P>0.05$ )。因此,我们成功建立了 ER $\beta$  稳定抑制的 hFOB 1.19 细胞模型。

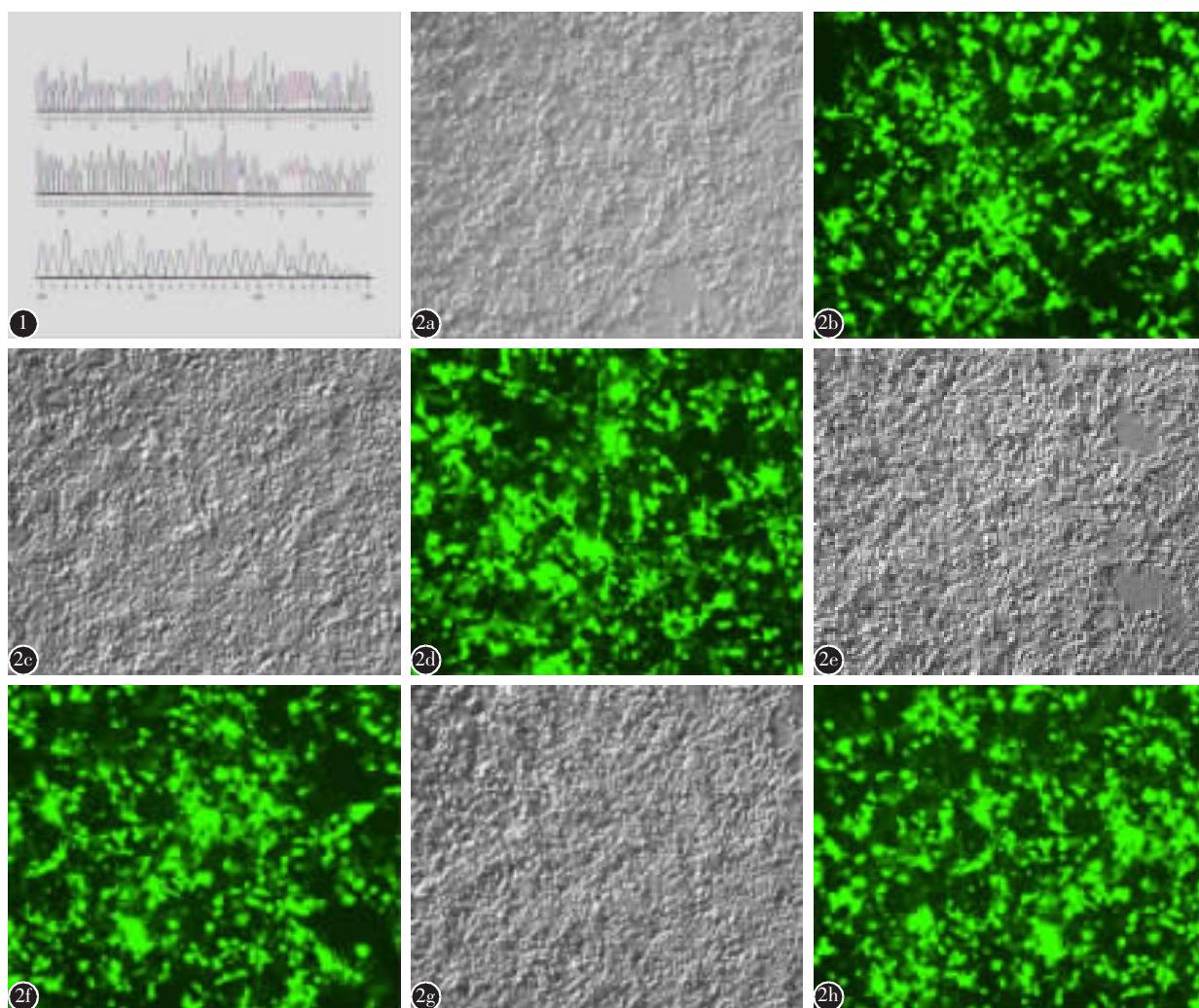
# 3 讨论

目前,RNAi 已成为探索基因功能和细胞信号通路的有效工具,它是通过内源性表达或外源性介导 siRNA,以序列特异性的方式抑制内源性基因的表达<sup>[9]</sup>。而 shRNA 的导入依赖于载体,现主要存在非病毒和病毒载体两大类。非病毒载体转

染效率低,持续时间比较短、难以稳定表达 shRNA;病毒载体主要以腺病毒和逆转录病毒载体最为成熟<sup>[7]</sup>,其中,逆转录病毒宿主范围广,感染效率高,并能使目的基因整合至靶细胞基因组中,达到稳定表达的目的。因此,本研究中我们将 ER $\beta$  靶基因的 shRNA 插入 pRNAT-H1.4/Retro 逆转录病毒质粒中,经测序鉴定表明,我们成功构建了 ER $\beta$ -shRNA 逆转录病毒重组质粒,随后将其高效转染入 293 包装细胞,为包装高效率的逆

转录病毒提供了保障。

hFOB 1.19 是 Harris 等<sup>[8]</sup>于 1995 年建立的人永生化成骨细胞株。他们在 0.6mg/ml G418 存在下,用温度敏感的表达载体 pUCSVtsA58 转染自然流产的胎儿四肢组织,建立了此细胞株,并证实与人成骨细胞有高度同源性,表达碱性磷酸酶、骨钙素、I 型胶原等多种成骨细胞特异性标志,经体内试验证实具有成骨活性;更重要的是 hFOB 1.19 虽为永生化,但并无恶性肿瘤细胞特征,与其



**图 1** ER $\beta$ -shRNA 逆转录病毒重组质粒测序图 **图 2** ER $\beta$ -shRNA 逆转录病毒重组质粒成功、高效地转染 293 包装细胞的荧光表达图( $\times 50$ ) **a, c, e, g** 为普通光镜下, **b, d, f, h** 为荧光显微镜下 **a, b** ER $\beta$ -shRNA-nc 逆转录病毒重组质粒转染图(同一视野) **c, d** ER $\beta$ -shRNA-1 逆转录病毒重组质粒转染图(同一视野) **e, f** ER $\beta$ -shRNA-2 逆转录病毒重组质粒转染图(同一视野) **g, h** ER $\beta$ -shRNA-3 逆转录病毒重组质粒转染图(同一视野)

**Figure 1** Sequencing of ER $\beta$ -shRNA recombinant retroviral vectors **Figure 2** Fluorescence expressions of ER $\beta$ -shRNA recombinant retroviral vectors transfecting into 293 packaging cells successfully and efficiently **a, c, e, g** viewed under ordinary light microscope **b, d, f, h** viewed under fluorescence microscopy **a, b** ER $\beta$ -shRNA-nc(the same visual field) **c, d** ER $\beta$ -shRNA-1(the same visual field) **e, f** ER $\beta$ -shRNA-2(the same visual field) **g, h** ER $\beta$ -shRNA-3(the same visual field)

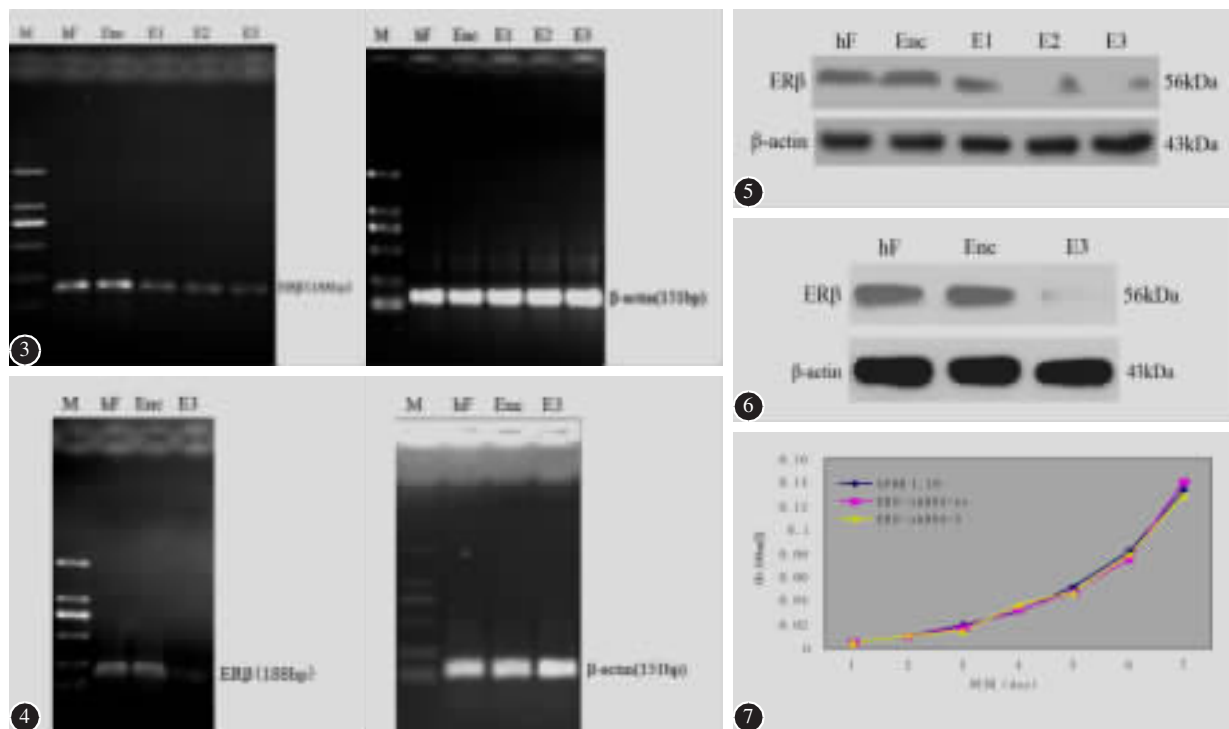


图 3 瞬时感染后 ERβ 及 β-actin mRNA 的 RT-PCR 电泳结果(M: Marker; hF: hFOB 1.19; Enc: ERβ-shRNA-nc; E1: ERβ-shRNA-1; E2: ERβ-shRNA-2; E3: ERβ-shRNA-3) 图 4 瞬时感染后 ERβ 及 β-actin 蛋白的表达(hF: hFOB 1.19; Enc: ERβ-shRNA-nc; E1: ERβ-shRNA-1; E2: ERβ-shRNA-2; E3: ERβ-shRNA-3) 图 5 稳定感染后 ERβ 及 β-actin mRNA 的 RT-PCR 电泳结果(M: Marker; hF: hFOB 1.19; Enc: ERβ-shRNA-nc; E3: ERβ-shRNA-3) 图 6 稳定感染后 ERβ 及 β-actin 蛋白的表达(hF: hFOB 1.19; Enc: ERβ-shRNA-nc; E3: ERβ-shRNA-3) 图 7 三组细胞的生长曲线

**Figure 3** RT-PCR electrophoresis results of ERβ and β-actin mRNA after transient transfection(M: Marker; hF: hFOB 1.19; Enc: ERβ-shRNA-nc; E1: ERβ-shRNA-1; E2: ERβ-shRNA-2; E3: ERβ-shRNA-3) **Figure 4** Expression of ERβ and β-actin protein after transient transfection(hF: hFOB 1.19; Enc: ERβ-shRNA-nc; E1: ERβ-shRNA-1; E2: ERβ-shRNA-2; E3: ERβ-shRNA-3) **Figure 5** RT-PCR electrophoresis results of ERβ and β-actin mRNA after stable transfection(M: Marker; hF: hFOB 1.19; Enc: ERβ-shRNA-nc; E3: ERβ-shRNA-3) **Figure 6** Expression of ERβ and β-actin protein after stable transfection(hF: hFOB 1.19; Enc: ERβ-shRNA-nc; E3: ERβ-shRNA-3) **Figure 7** Growth curves of the three groups

表 2 瞬时感染 hFOB 1.19 细胞后 ERβ mRNA 及蛋白的表达

Table 2 Expression of ERβ mRNA and protein after transient transfecting hFOB 1.19

| 分组<br>Group  | ERβ mRNA 相对<br>表达量<br>ERβ mRNA relative<br>expression level | ERβ 蛋白相对<br>表达量<br>ERβ protein relative<br>expression level |
|--------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| hFOB 1.19    | 0.8858±0.0295                                               | 0.6950±0.0217                                               |
| ERβ-shRNA-nc | 0.8789±0.0251                                               | 0.6898±0.0186                                               |
| ERβ-shRNA-1  | 0.4025±0.0085 <sup>①</sup>                                  | 0.2835±0.0309 <sup>①</sup>                                  |
| ERβ-shRNA-2  | 0.2693±0.0099 <sup>①</sup>                                  | 0.1504±0.0139 <sup>①</sup>                                  |
| ERβ-shRNA-3  | 0.2082±0.0102 <sup>①</sup>                                  | 0.1001±0.0185 <sup>①</sup>                                  |

注: ①与 ERβ-shRNA-nc 组和 hFOB 1.19 组相比,  $P<0.05$

Note: ① compared to Group ERβ-shRNA-nc and Group hFOB 1.19,  $P<0.05$

表 3 稳定感染 hFOB 1.19 细胞后 ERβ mRNA 和蛋白的表达

Table 3 Expression of ERβ mRNA and protein after stable transfecting hFOB 1.19

| 分组<br>Group  | ERβ mRNA 相对<br>表达量<br>ERβ mRNA relative<br>expression level | ERβ 蛋白相对<br>表达量<br>ERβ protein relative<br>expression level |
|--------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| hFOB 1.19    | 0.8259±0.0340                                               | 0.6540±0.0269                                               |
| ERβ-shRNA-nc | 0.8189±0.0272                                               | 0.6486±0.0305                                               |
| ERβ-shRNA-3  | 0.1385±0.0202                                               | 0.0451±0.0037                                               |

注: 与 ERβ-shRNA-nc 组和 hFOB 1.19 组相比,  $P<0.05$

Note: compared to Group ERβ-shRNA-nc and Group hFOB 1.19,  $P<0.05$

他成骨样细胞株(如 MG-63、Saos-2 等)不同。因此 hFOB 1.19 提供了一个同质化的快速增殖模型系统,可用于研究正常人成骨细胞的分化、生理、生长因子,和其他对成骨细胞的功能及分化有影响的细胞因子<sup>[9-11]</sup>。

ER 基因作为影响骨代谢较重要的候选基因之一,与骨骼生长有关,且有研究表明,基因突变可导致骨质丢失和骨骼生长异常等<sup>[12]</sup>。目前关于 ER $\alpha$  基因与骨代谢的关系已有较多研究,而对 ER $\beta$  基因的研究则较少。曾有研究发现 ER $\beta$  基因敲除小鼠的长骨生长板长期保持不闭和状态,且纵向骨和四肢骨均出现相对地快速增长,说明 ER $\beta$  可能存在抑制生长板软骨细胞增殖及促进生长板闭和的作用<sup>[13]</sup>。但在这些动物模型中,ER $\beta$  对骨代谢的具体调节机制仍不清楚。而研究 ER $\beta$  如何参与骨代谢调节的最大障碍是缺少相应的 ER $\beta$  稳定抑制的细胞模型。因此,本研究中我们取最佳 RNAi 组的 hFOB 1.19 (即 ER $\beta$ -shRNA-3 组),使用潮霉素进行筛选,扩大培养后得到稳定感染克隆,通过半定量 RT-PCR 和 Western blot 检测表明,ER $\beta$ -shRNA-3 组的 ER $\beta$ mRNA 和蛋白的表达显著低于 ER $\beta$ -shRNA-nc 组及 hFOB 1.19 组( $P<0.05$ ),而 MTT 法检测显示各实验组细胞的生长无明显差异,表明 RNAi 特异性下调 ER $\beta$  后,未改变 hFOB 1.19 细胞的生物学特性。因此,我们成功建立了 ER $\beta$  稳定抑制的 hFOB 1.19 细胞模型,为进一步研究 ER $\beta$  基因在 AIS 骨代谢中的调节机制打下了良好的基础。

#### 4 参考文献

1. Marosy B, Justice CM, Nzegwu N, et al. Lack of association between the aggrecan gene and familial idiopathic scoliosis[J]. Spine, 2006, 31(13): 1420-1425.
2. Ogilvie JW, Braun J, Argyle V, et al. The search for idiopathic scoliosis genes[J]. Spine, 2006, 31(6): 679-681.
3. Cheng JC, Qin L, Cheung CSK, et al. Generalized low areal and volumetric bone mineral density in adolescent idiopathic scoliosis[J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(8): 1587-1595.
4. 吴洁, 邱勇, 张乐, 等. 青少年特发性脊柱侧凸患者雌激素受体基因多态性与骨密度的关系[J]. 中国骨质疏松杂志, 2006, 12(3): 246-249.
5. Zhang HQ, Lu SJ, Tang MX, et al. Association of estrogen receptor beta gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis[J]. Spine, 2009, 34(8): 760-764.
6. Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2007, 59(2-3): 75-86.
7. Wojtkowiak A, Siek A, Alejska M, et al. RNAi and viral vectors as useful tools in the functional genomics of plants. Construction of BMV-based vectors for RNA delivery into plant cells[J]. Cell Mol Biol Lett, 2002, 7(2A): 511-522.
8. Harris SA, Enger RJ, Riggs BL, et al. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line[J]. J Bone Miner Res, 1995, 10(2): 178-186.
9. Liu X, Lim JY, Donahue HJ, et al. Influence of substratum surface chemistry/energy and topography on the human fetal osteoblastic cell line hFOB 1.19: Phenotypic and genotypic responses observed in vitro [J]. Biomaterials, 2007, 28 (31): 4535-4550.
10. Zhang Z, Zhang L, Hua Y, et al. Comparative proteomic analysis of plasma membrane proteins between human osteosarcoma and normal osteoblastic cell lines[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 206.
11. Verma D, Katti KS, Katti DR. Osteoblast adhesion, proliferation and growth on polyelectrolyte complex-hydroxyapatite nanocomposites [J]. Philos Transact A Math Phys Eng Sci, 2010, 368(1917): 2083-2097.
12. Windahl SH, Norgard M, Kuiper G, et al. Cellular distribution of estrogen receptor  $\beta$  in neonatal rat bone [J]. Bone, 2000, 26(2): 117-121.
13. Chagin AS, Lindberg MK, Andersson N, et al. Estrogen receptor-beta inhibits skeletal growth and has the capacity to mediate growth plate fusion in female mice[J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(1): 72-77.

(收稿日期:2011-10-24 修回日期:2012-02-26)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)