

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.17.005

抑制 RANKL 诱导破骨细胞分化的 DNA 适配子的筛选 *

吴太林¹ 沙 鑫¹ 李 锋¹ 张波波¹ 马文瑞² 陶惠人^{1Δ}

(1 第四军医大学西京医院骨科 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学西京医院心身科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:筛选能高特异性、高亲和力结合 RANKL 蛋白并有效抑制 RANKL 对破骨细胞诱导分化作用的 DNA 适配子。**方法:**首先,采用原核系统表达并纯化 RANKL 蛋白,通过 SELEX(Systematic evolution of ligands by exponential)技术从人工合成的单链随机寡核苷酸文库中筛选能高特异性、高亲和力结合 RANKL 蛋白的 DNA 适配子。然后,用 RNA folding sever software 分析适配子空间结构,以 ELISA 检测 DNA 适配子和 RANKL 亲和力大小并筛选出亲和力最高的一组 DNA 适配子用以验证 DNA 适配子对 RANKL 诱导破骨细胞分化的抑制作用。**结果:**① 成功在原核系统表达并纯化 RANKL 蛋白;② 筛选出能高特异性、高亲和力结合 RANKL 蛋白的 12 个 DNA 适配子。③ 与对照组相比,不同浓度 DNA 适配子能明显抑制 TRAP 阳性破骨细胞数量($P<0.05$),且浓度越高抑制效果越明显。**结论:**成功筛选出的 DNA 适配子能特异性结合 RANKL 蛋白并有效抑制 RANKL 对破骨细胞的诱导分化功能。

关键词:核因子 κ B 受体活化因子配体;指数富集的配基系统进化技术;适配子;破骨细胞

中图分类号:Q75;Q593;R68 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)17-3220-05

Identification of a DNA Aptamer Inhibiting RANKL-induced Osteoclastogenesis in Vitro*

WU Tai-lin¹, SHA Xin¹, LI Feng¹, ZHANG Bo-bo¹, MA Wen-rui², TAO Hui-ren^{1Δ}

(1 Institute of Orthopedic Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Psychosomatic Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To select ssDNA aptamers with high affinity and specificity for RANKL which could efficiently inhibit RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro. **Methods:** Firstly, a 93nt single stranded DNA (ssDNA) random library was subjected to 14 rounds of selection against RANKL expressed and purified from the prokaryotic expression system by SELEX method. And then the structure of ssDNA aptamers was analyzed by RNA folding server software and the affinities of aptamers to RANKL were determined by ELISA. Lastly, the inhibition effects of ssDNA aptamers on RANKL-induce osteoclastogenesis were verified in vitro. **Results:** ① Mouse RANKL was successfully expressed and purified by the prokaryotic expression system. ② Twelve ssDNA aptamers with high affinity and specificity for RANKL were selected out. ③ the numbers of the TRAP⁺ multinucleated osteoclasts were decreased in different groups of ssDNA aptamers comparing with control group($P<0.05$). **Conclusions:** The ssDNA aptamers of RANKL have been successively selected by the SELEX method for the first time and the selected ssDNA aptamers can effectively inhibit RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro.

Key words: RANKL; SELEX; Aptamer; Osteoclasts

Chinese Library Classification(CLC): Q75; Q593; R68 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)17-3220-05

前言

骨组织代谢稳态主要依赖于成骨细胞成骨作用与破骨细胞骨吸收作用之间的平衡。当破骨细胞活动增强,骨吸收活动超过骨形成,骨代谢平衡被打破,就会导致高风险的骨折或关节破坏^[1-4]。近年来研究证实核因子 κ B受体活化因子配体(Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand, RANKL)对破骨细胞的分化、成熟及功能都具有关键性调节作用。阻断 RANKL

与破骨细胞前体细胞 RANK 结合可抑制破骨细胞的分化和成熟^[5,6]。目前,阻断 RANKL-RANK 结合的策略主要围绕诱骗受体 OPG^[7]和抗 RANKL 单克隆抗体^[8]的拮抗以及抗 RANKL 疫苗^[9]的主动免疫等方面。而以上策略除了 RANKL 单克隆抗体狄诺塞麦(Denosumab)进入临床实验外,其他策略均因有效性、安全性等原因未能进入临床应用。而单克隆抗体因其制备工艺复杂、成本较为昂贵的原因限制其广泛应用。因此,探索更为安全、有效、廉价的阻断 RANKL-RANK 结合的方法显得十分重要。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81070698; 81170256);陕西省科技统筹创新工程计划(2015KTCL03-09)

作者简介:吴太林(1990-),男,硕士研究生,主要研究方向:骨质疏松的基础研究,E-mail: wutailin620@163.com

Δ 通讯作者:陶惠人(1967-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:骨质疏松的基础研究,

E-mail: article_wu2016@163.com,电话:18629142521

(收稿日期:2017-02-10 接受日期:2017-02-26)

通过 SELEX^[10,11] 技术筛选获得适配子,具有靶标分子广、高亲和力和高特异性、易于标记和修饰、稳定性好、易于制备等优点^[12],目前已广泛应用于医学、化学、药学、食品安全检测等领域,展现出了良好的应用前景^[13-16]。因此,本研究通过 SELEX 技术,以原核系统表达、纯化的 RANKL 蛋白为靶标进行筛选能特异性结合 RANKL 的适配子,通过细胞实验证实该适配子有效抑制了 RANKL 对破骨细胞的诱导分化,为进一步探究阻断 RANKL-RANK 通路的新方法奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

RT-PCR 试剂盒、T4 DNA 连接酶、*Nhe* I、*Xho* I(TaKaRa, Japan); DNA Marker、Protein Marker、原核表达载体 pET-28a、*E.coli* BL-21 (DE3) 感受态、ELISA 试剂盒 (Tiangen, China); Ni-NTA 亲和层析介质(GenScript, China); Amicon Ultra-15 mL, 10 kDa Centrifugal Filter Unit(Millipore, USA); 单链寡核苷酸文库 (5-CCGTAATACGACTCACTATAGGGGAGCTCGGTACCGAATTC-(N30)-AAGCTTGCAGAGAGGATCCTT-3); 两端为固定序列,中间随机序列为 30 个碱基,库容量大约 1015,上游引物:5'-CCGTAATACGACTCAC TATAGGGGAGCTCGGTACCGAATTC-3',下游引物:5'-AAGGATCCTCTCTGCAAGCTT-3', (Sangon Biotech, China); 酶标仪(Bio-Rad 680, USA); C57BL/6 小鼠 (第四军医大学实验动物中心); RANKL、M-CSF (sigma, USA)。

1.2 方法

1.2.1 RANKL 原核系统表达和纯化 提取 C57BL/6 小鼠骨髓总 RNA,经 RT-PCR 扩增,逆转录合成 cDNA,PCR 扩增小鼠 RANKL 胞外段(70-316 aa)DNA 片段,构建 pET28a-mRANKL 重组表达载体。测序确认序列正确后,提取 pET28a-mRANKL 重组表达载体质粒将其转化至 *E.coli* BL-21(DE3)感受态细胞,然后接种至 LB(Kan⁺)平板筛选阳性转化子。然后挑取单克隆,接种至 LB(Kan⁺)培养基,37 °C,285 r/min 震荡培养过夜,按 1:100 转接至 LB(Kan⁺)培养基,扩增菌液,OD₆₀₀=0.6~0.8 时加入 1 mM IPTG,37 °C,285 r/min 震荡培养 10 h,收集菌液,4 °C 离心,加入 Lysis 平衡缓冲液(50 mM Na₂HPO₄, 0.3 M NaCl, pH=8.0),重新悬浮细胞,之后冰上超声破碎细胞,4 °C 离心,收集上清液进行 Ni-NTA 过柱纯化(参考金斯瑞蛋白纯化操作步骤)。最后,收集纯化蛋白用 Millipore 超滤离心管进行蛋白透析,浓缩。

1.2.2 SELEX 筛选 筛选步骤参考以前文献^[17]并进行部分修改:取 1 nmoL 单链 DNA 溶液,95 °C 中加热 5 min,取出置冰浴 2 min,然后与 Ni-NTA 缓慢震荡混合,室温孵育 30 min 进行负向筛选,收集未结合的单链 DNA 进行正向筛选。将未结合的单链 DNA 与事先结合上 RANKL 的 Ni-NTA 缓慢震荡结合,室温孵育 30 min,去除未结合的单链 DNA,收集与 RANKL 结合的单链 DNA。然后通过对称 PCR 扩增单链 DNA 文库,非对称 PCR 合成新的单链 DNA 文库,进行下一轮筛选,直到完成 14 轮筛选。将最后一轮筛选获得的 ssDNA 文库扩增成 dsDNA 文库后,克隆到 T 载体中,转入 DH5 α 感受态细胞中,随机挑取 25 个克隆。将 25 个克隆进行测序。

1.2.3 ELISA 检测适配子与 RANKL 蛋白的结合 将测序成

功的单适配子序列,合成生物素标记的单适配子(bio-aptamer)。然后用 ELISA 法检测适配子与 RANKL 蛋白的结合:用 RANKL 蛋白包被 96 孔 ELISA 板(5 μ g/mL,100 μ L/孔),4 °C 过夜。洗涤 3 次,1 % BSA(100 μ L/孔)37 °C 封闭 2 h,洗涤 3 次。加入生物素化适配子 (4 μ g/mL,100 μ L/孔,设 PBS 组为空白对照组),37 °C 孵育 2 h,洗涤 3 次,加入 1:1000 稀释的 HRP 标记的链霉亲和素(HRP-streptavidin; 100 μ L/孔),37 °C 孵育 1 h,洗涤 3 次,然后加入 ELISA 底物液(邻苯二胺,100 μ L/孔),37 °C 避光反应 15 分钟。加入终止液(50 μ L/孔),在酶标仪 450 nm 处读取 OD 值。

1.2.4 破骨细胞培养 取 C57BL/6 小鼠骨髓来源的单核巨噬细胞,培养于完全 α -MEM 培养基中(10 %灭活胎牛血清,100 U/mL 青霉素 / 链霉素,2 mL-谷氨酰胺)继续增殖为 BMM 细胞。BMM 细胞(2×10^5 个/mL)以完全 α -MEM 培养基培养,并以 M-CSF(50 ng/mL)和 RANKL (100 ng/mL) 诱导分化,同时加入不同浓度的适配子(0.5, 1 和 5 μ M)进行干预。隔天换液培养直到形成成熟破骨细胞。成熟破骨细胞进行 TRAP 染色,计数大于 3 个核的 TRAP 阳性细胞,记为破骨细胞。

1.2.5 细胞毒性分析 BMM 细胞接种于 96 孔板 (1×10^5 个/mL),以不同浓度的适配子干预 48 h。然后加入 MTT 10 μ L/孔 (5 mg/mL),37 °C 孵育 4 h 后,加入 DMS(150 μ L/孔),溶解 10 min,490 nm 处测吸光度 OD 值。

1.3 统计学分析

数据采用 SPSS13.0 软件处理,多组间计量资料的比较采用单因素方差分析(ANOVA),进一步两组间比较采用 SNK-q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RANKL 蛋白的原核表达和纯化

将 pET28a-mRANKL 重组表达载体质粒转化至 *E.coli* BL-21(DE3)感受态细胞中,经 IPTG 诱导表达的 RANKL,经过 Ni-NTA 亲和层析介质纯化。各蛋白组分经 SDS-PAGE 分析证实,RANKL 蛋白成功表达和纯化(图 1)。

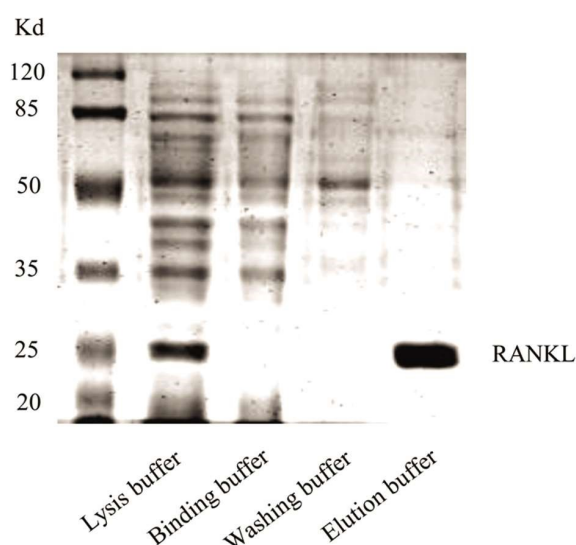


图 1 RANKL 蛋白的原核表达和纯化
Fig. 1 Expression and purification of RANKL

2.2 SELEX 筛选 DNA 适配子

以原核表达纯化的 RANKL 蛋白为靶分子进行筛选 (图 2A), 以未结合 RANKL 的 Ni-NTA 为负向筛选, 以结合上 RANKL 的 Ni-NTA 为正向筛选, 经对称 PCR 和非对称 PCR 扩增单链 DNA 文库(图 2B)。将最后一轮筛选获得的 ssDNA 文

库扩增成 dsDNA 文库后, 克隆到 T 载体中, 转化入 DH5 α 感受态细胞中, 随机挑取 25 个克隆。将 25 个单克隆进行测序, 结果发现有部分空载体或克隆序列中有碱基插入或缺失。经过筛选, 得到 12 个符合要求的适配子并进行同源性分析及序列编号(aptamer1-12)(图 2C)。

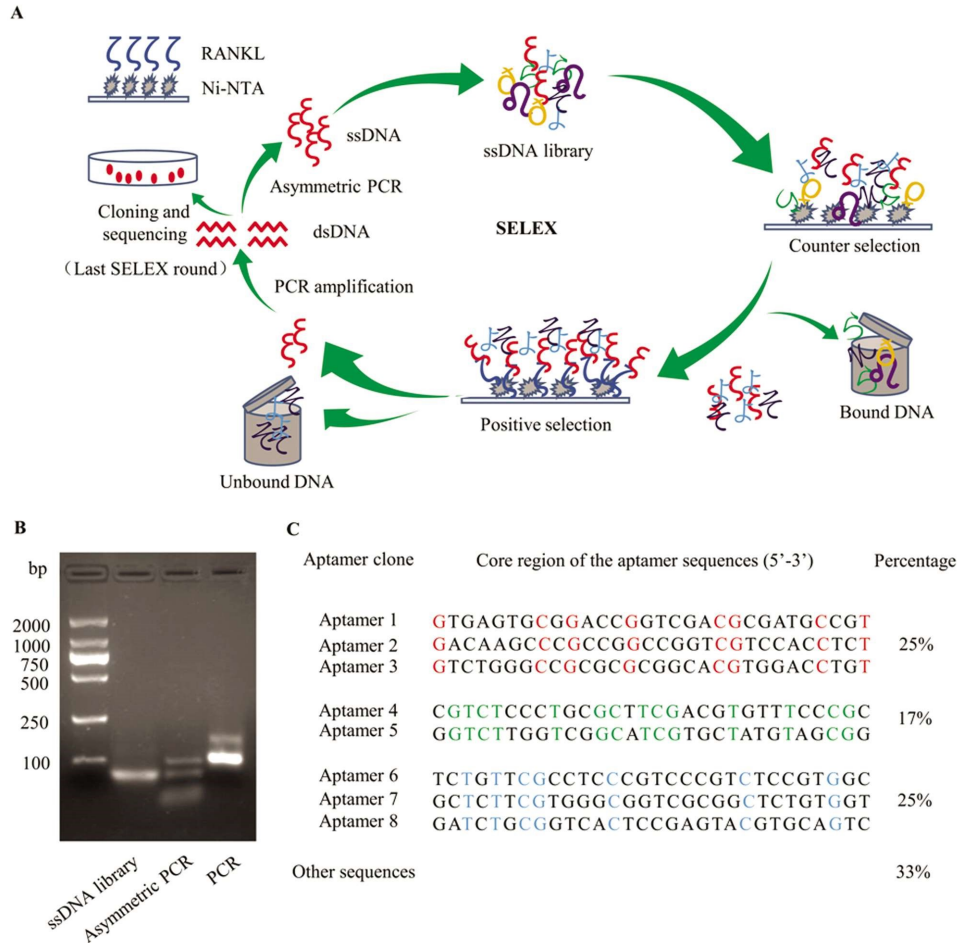


图 2 SELEX 法筛选 RANKL 适配子

Fig. 2 The aptamers of RANKL selected by SELEX method

Note: (A)SELEX method. (B) PCR amplification. (C)Aptamers of RANKL.

2.3 ELISA 检测适配子与 RANKL 蛋白的结合

合成生物素标记的单适配子(aptamer1-8)与 RANKL 蛋白进行 ELISA 检测, 结果可见单适配子与 RANKL 蛋白均有结合能力 (图 3A), 其中 aptamer1 结合能力最强。用 RNAfold web

server software 对结合能力最强的 aptamer1,4,6 和 8 进行二级结构分析(图 3B), 其中结合能力最强的 aptamer1 具有充分的茎环结构。

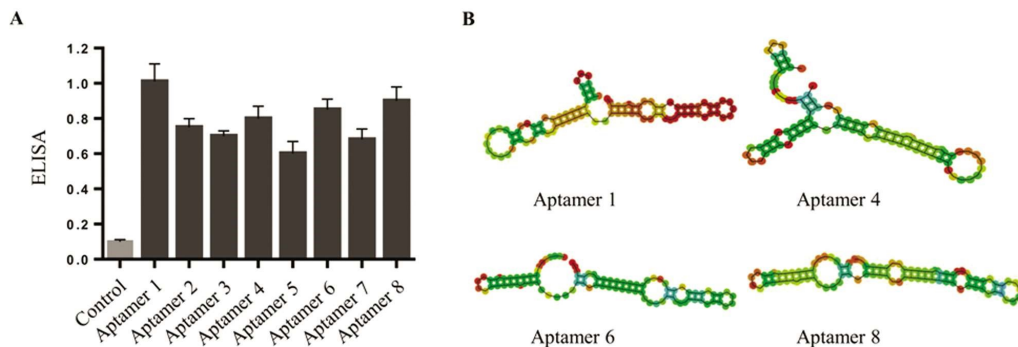


图 3 ELISA 检测适配子与 RANKL 的结合及适配子空间结构预测

Fig. 3 Determination of the affinities by ELISA and the structure by RNAfolding server software

Note: (A) Detection by ELISA. (B) Structure of aptamer.

2.4 适配子对 RANKL 诱导的破骨分化成熟的影响

为了检测适配子对 RANKL 诱导的破骨细胞分化的影响,选取和 RANKL 亲和力最高的 aptamer 1 作为研究对象。分别以不同浓度的 aptamer 1(0.5,1 和 5 μM)干预 RANKL 诱导的破

骨细胞分化。与对照组相比,不同浓度 aptamer 1 处理的干预 RANKL 诱导的破骨细胞存活率比较差异无统计学意义($P>0.05$,图 4B),不同浓度 aptamer 1 均能明显抑制 RANKL 对破骨细胞的诱导分化作用,且浓度越高抑制作用越明显(图 4A 和C)。

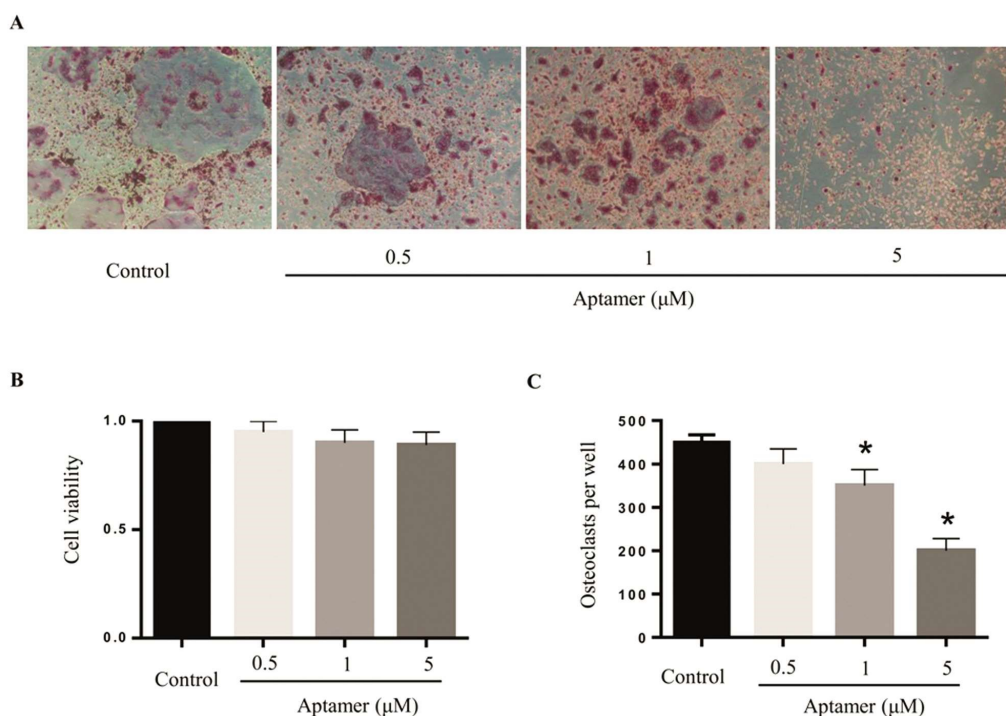


图4 适配子抑制了RANKL诱导的破骨细胞分化

Fig. 4 Aptamer suppresses RANKL-induced osteoclast formation

Note: (A) TRAP staining (40 $\times$). (B) MTT assay. (C) Quantitation of osteoclast number.

Data are expressed as $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n=3$. * <0.05 , compared with control group.

3 讨论

OPG/RANKL-RANK 信号通路在破骨细胞分化、成熟和发挥功能过程中起关键性作用^[18,19]。因而,阻断 RANKL 与 RANK 的结合可以有效抑制破骨细胞的分化和成熟,从而抑制破骨细胞骨吸收作用^[20]。OPG 作为诱骗受体可以竞争性阻断 RANKL-RANK 的结合^[7],抗 RANKL 单克隆抗体狄诺塞麦(Denosumab)通过特异性抗原抗体结合封闭 RANKL,从而阻断破骨细胞分化和成熟,有效提高骨密度^[8,21,22]。但单克隆抗体本身也存在制备工艺复杂、成本昂贵等缺点,而作为主动免疫的抗 RANKL 疫苗也存在效价低、安全性等问题。因此,探索更为有效、便捷的阻断 RANKL-RANK 结合的方法显得十分重要。而 SELEX 技术筛选的适配子在特异性和亲和力上可以和抗体媲美。同时,其具有自己独特的优势:制备工艺简单,性质稳定,便于修饰,免疫原性低以及可以常温运输、长期保存等^[23],已广泛应用于疾病的识别、预防、诊断和治疗^[12]。

本研究首次利用 SELEX 技术筛选能特异性结合并能有效拮抗 RANKL 对破骨细胞诱导分化作用的 DNA 适配子,研究过程中,我们成功表达和纯化了小鼠 RANKL 蛋白胞外段(70-316 aa),并以纯化的 RANKL 蛋白作为靶分子,利用 SELEX 技术成功筛选出 12 个 DNA 适配子,并用 ELISA 检测适配子与 RANKL 的亲和力,发现筛选出的适配子均能和 RANKL 结合。然后,用 RNAfold serve software 对其结构进行预测,

发现亲和力最高的适配子具有充分的茎环结构,可能是和 RANKL 结合的区域,但需进一步实验加以证实。最后验证了适配子对 RANKL 诱导破骨细胞分化的抑制功能。

总之,本研究首次筛选出能特异性拮抗 RANKL 的 DNA 适配子,并在细胞水平验证了适配子的功能,为探索阻断 RANKL-RANK 结合的新方法奠定基础。但本研究也存在需要进一步优化的方面如提高原核表达的 RANKL 蛋白的纯度,优化 SELEX 技术的筛选条件以便获得更优的适配子,进一步探究适配子和 RANKL 结合的分子基础以及需要更为严谨的动物实验来验证适配子在体内对 RANKL 的阻断效果,从而实现骨吸收性疾病的有效治疗。

参考文献(References)

- [1] K. Schroder, NADPH oxidases in bone homeostasis and osteoporosis [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(1): 25-38
- [2] Y Xiu, H Xu, C Zhao, et al. Chloroquine reduces osteoclastogenesis in murine osteoporosis by preventing TRAF3 degradation [J]. J Clin Invest, 2014, 124(1): 297-310
- [3] Z Zhong, NJ Ethen, BO Williams, et al. WNT signaling in bone development and homeostasis[J]. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2014, 3(6): 489-500
- [4] J Lee, BU Youn, K Kim, et al. Mst2 Controls Bone Homeostasis by Regulating Osteoclast and Osteoblast Differentiation[J]. J Bone Miner Res, 2015, 30(9): 1597-1607

- [5] MM Guerrini, H Takayanagi. The immune system, bone and RANKL [J]. Arch Biochem Biophys, 2014, 561: 118-123
- [6] K Kanazawa, A Kudo. Self-assembled RANK induces osteoclastogenesis ligand-independently [J]. J Bone Miner Res, 2005, 20 (11): 2053-2060
- [7] S. Harada, N. Takahashi, Control of bone resorption by RANKL-RANK system[J]. Clin Calcium, 2011, 21(10): 1121-1130
- [8] F Cosman, DB Crittenden, JD Adachi, et al. Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis[J]. N Engl J Med, 2016, 375(16): 1532-1543
- [9] H Yuan, H Qian, S Liu, et al. Therapeutic role of a vaccine targeting RANKL and TNF-alpha on collagen-induced arthritis [J]. Biomaterials, 2012, 33(32): 8177-8185
- [10] M Yuce, N Ullah, H Budak, et al. Trends in aptamer selection methods and applications[J]. Analyst, 2015, 140(16): 5379-5399
- [11] C Tuerk, L Gold. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. Science, 1990, 249(4968): 505-510
- [12] O Kadioglu, AH Malczyk, HJ Greten, et al. Aptamers as a novel tool for diagnostics and therapy [J]. Invest New Drugs, 2015, 33 (2): 513-520
- [13] CM Mattice, MC DeRosa. Status and Prospects of Aptamers as Drug Components[J]. BioDrugs, 2015, 29(3): 151-165
- [14] A Mathew, T Maekawa, D Sakthikumar, et al. Aptamers in targeted nanotherapy[J]. Curr Top Med Chem, 2015, 15(12): 1102-1114
- [15] X Liu, X Zhang. Aptamer-based technology for food analysis [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2015, 175(1): 603-624
- [16] M Famulok, G Mayer. Aptamers and SELEX in Chemistry & Biology [J]. Chem Biol, 2014, 21(9): 1055-1058
- [17] KT Shum, C Chan, CM Leung, et al. Identification of a DNA aptamer that inhibits sclerostin's antagonistic effect on Wnt signalling [J]. Biochem J, 2011, 434(3): 493-501
- [18] MC Walsh, Y Choi. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity[J]. Bone, and Beyond, Front Immunol, 2014, 5: 511
- [19] BF Boyce, Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions[J]. J Dent Res, 2013, 92(10): 860-867
- [20] T Wada, T Nakashima, N Hiroshi, et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease[J]. Trends Mol Med, 2006, 12(1): 17-25
- [21] SR Cummings, J San Martin, MR McClung, et al. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis [J]. N Engl J Med, 2009, 361(8): 756-765
- [22] MR Smith, B Egerdie, N Hernandez Toriz, et al. Denosumab in men receiving androgen-deprivation therapy for prostate cancer[J]. N Engl J Med, 2009, 361(8): 745-755
- [23] C Oelkrug, U Sack, A Boldt, et al. Antibody- and aptamer-strategies for GvHD prevention[J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(1): 11-20

(上接第 3258 页)

- Zhao Jin-min, Qin Yi-wu. Seed cells in culture identification and inducing and preparation of scaffold materials of: the 20th National Traditional Chinese medicine and Western medicine combined with orthopedic academic seminar, the second session of the Chinese Medical Association of traditional Chinese medicine and Western medicine combined with Doctor Association orthopedics surgery annual meeting, the nineteenth session of Zhejiang Province in western medicine combined with orthopedics Professional Committee of academic annual meeting, Hangzhou, Zhejiang Province, China. 2013[C].
- [11] Schiffhauer ES, Luo T, Mohan K, et al. Mechanoaccumulative Elements of the Mammalian Actin Cytoskeleton [J]. Curr Biol, 2005, S0960-9822(16)30329-3
 - [12] 谢雅婷, 显微镜细胞特征提取及识别[D], 2012, 湘潭大学: 77
Xie Ya-ting, A microscope cell feature extraction and recognition[D], 2012, Xiangtan University: 77
 - [13] Xie X, Shan W, Timothy W, et al. Genistein promotes cell death of ethanol-stressed HeLa cells through the continuation of apoptosis or secondary necrosis[J]. Cancer Cell Int, 2013, 13(1): 63
 - [14] Volkmann N. Putting structure into context: fitting of atomic models into electron microscopic and electron tomographic reconstructions [J]. Curr Opin Cell Biol, 2012, 24(1): 141-147
 - [15] Chee SW. Studying localized corrosion using liquid cell transmission electron microscopy [J]. Chem Commun (Camb), 2015, 51 (1): 168-171
 - [16] Sherwood CL, Daines MO, Price TJ, et al. A highly potent agonist to protease-activated receptor-2 reveals apical activation of the airway epithelium resulting in Ca²⁺-regulated ion conductance[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2014, 307(8): C718-26
 - [17] Narita M, Nunez S, Heard E, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence [J]. Cell, 2003, 113(6): 703-716
 - [18] Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(20): 9363-9367
 - [19] Tao Q, Lü B, Qiao B, et al. Characterization of growth and proliferation in a telomerase-immortalized ameloblastoma cell line [J]. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2009, 44(8): 474-478
 - [20] Tao Q, Lv B, Qiao B, et al. Immortalization of ameloblastoma cells via reactivation of telomerase function: Phenotypic and molecular characteristics[J]. Oral Oncol, 2009, 45(12): 239-244