

网络出版时间: 2021-4-2 17:22 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210402.1339.013.html>

miR-205 促进 hASCs

细胞系向软骨细胞方向分化的作用及机制研究

李春亮, 秦 凤, 韩雪来, 齐普良, 孙凯华, 赵子春, 唐保明, 李泽清, 李钊伟, 王 凯

摘要 目的 探讨微小 RNA(miR)-205 通过调控核心结合因子 α -1(Cbfa-1) 表达促进人脂肪干细胞(hASCs) 细胞系向软骨细胞方向分化的作用及机制。方法 慢病毒转染法将 Lenti-miR-205、Lenti-control 慢病毒液分别转染至 hASCs 细胞, 命名为 miR-205 过表达组、miR-NC 组, 另取未处理细胞为对照组; RT-qPCR 法检测转染后 miR-205 基因表达量, MTT 比色法检测细胞增殖; 用甲苯胺蓝染色、免疫细胞染色及免疫荧光染色观察转染后第 3 代 hASCs 细胞诱导分化情况, RT-qPCR、Western blot 法检测诱导分化 2 周后各组 Cbfa-1、Smad3、TGF- β 1、Col II mRNA 和蛋白表达。结果 转染后 miR-205 过表达组 miR-205 基因相对表达量高于 miR-NC 组和对照组 ($P < 0.001$)。miR-205 过表达组转染后 hASCs 细胞培养 3、7 d MTT 试验吸光度(A) 值高于对照组和 miR-NC 组 ($P < 0.05$)。诱导分化 2 周后, 甲苯胺蓝染色显示, miR-205 过表达组细胞染色呈强阳性深蓝色, 对照组和 miR-NC 组为微弱浅蓝色; 免疫细胞化学染色显示, miR-205 过表达组细胞及胞外基质强阳性棕黄色, 对照组和 miR-NC 组为弱阳性淡黄色; 免疫荧光染色显示, miR-205 过表达组红色荧光强度较强, 对照组和 miR-NC 组红色荧光强度较暗淡。miR-205 过表达组诱导分化后 Cbfa-1 mRNA 和蛋白相对表达量低于对照组和 miR-NC 组, Smad3、TGF- β 1、Col II mRNA 和蛋白相对表达量高于对照组和 miR-NC 组 ($P < 0.05$)。结论 miR-205 过表达可促进 hASCs 细胞增殖、促进细胞向软骨细胞方向分化, 可能通过抑制 Cbfa-1、激活 TGF- β 1/Smad3 信号通路发挥调控作用。

关键词 人脂肪干细胞; 软骨细胞分化; 微小 RNA-205; 核心结合因子 α -1

中图分类号 R 687.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)05-0735-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.05.012

外伤或疾病引起的关节软骨缺损或损伤是临床常见病, 关节软骨损伤后自我修复能力十分有限。人脂肪干细胞(human adipose-derived stem cells,

hASCs) 具有向脂肪、软骨等多向分化潜能及分布广泛、易取材等优势, 已成为软骨组织工程理想的种子细胞^[1]。核心结合因子 α -1(core-binding factor α -1, Cbfa-1) 是 hASCs 向软骨细胞分化、肥大成熟过程中重要的特异性转录调控因子, 寻找 Cbfa-1 相对应的基因启动元件进而调控该基因表达, 对 hASCs 细胞的分化至关重要^[2]。研究^[3-4]证实, 微小 RNA(mi-croRNA, miRNA) 可通过靶向调控 Cbfa-1 介导多能干细胞成骨或软骨分化, 其中 miR-205 在调节多能干细胞成骨分化过程中起重要作用, 且可抑制 Cbfa-1 蛋白表达^[5-6]。目前, 关于 miR-205 对 hASCs 软骨细胞分化的调控作用研究较少。为获得可稳定向软骨细胞方向分化的 hASCs 细胞, 该研究采用慢病毒转染法将 miR-205 转染入 hASCs 细胞, 观察过表达 miR-205 对 hASCs 细胞增殖、软骨细胞方向分化的影响及调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 hASCs 购自澳赛尔生物技术(上海)有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器 含 miR-205 序列的重组慢病毒载体(Lenti-miR-205)、阴性对照 Lenti-control 慢病毒载体(由上海基凯基因化学技术有限公司测序及慢病毒包装), 病毒滴度为 1×10^9 CFU/ml; Lenti-miR-205、Lenti-control 慢病毒液(深圳市默赛尔生物医学科技发展有限公司); 兔抗人 Cbfa-1、转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、信号传导蛋白 3(signal transduction protein 3, Smad3)、II 型胶原(type II collagen, Col II) 多抗、辣根过氧化物酶(HRP) 标记的山羊抗兔 IgG(美国 R&D Systems 公司); BCA 蛋白定量试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司); EL \times 800 酶标仪(美国 BioTek 公司); 7900 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司); E-Gel Imager 凝胶成像仪(美国 Invitrogen 公司)。

1.2 方法

2020-12-26 接收

基金项目: 青海省基础科学研究项目(编号: 2019-ZJ-7067)

作者单位: 青海人民医院骨科, 西宁 810001

作者简介: 李春亮, 男, 汉族, 双硕士, 副主任医师, 责任作者, E-mail: dh100611@163.com

1.2.1 细胞培养及鉴定 体外快速复苏 hASCs 细胞系,调整细胞密度接种至 6 孔板内,置于 5% CO₂、饱和湿度、37 °C 条件下培养,汇合至 80% 左右按照 1:3 比例传代,倒置显微镜下观察细胞形态。收集第 3 代细胞,PBS 重悬细胞,加入 CD29、Sca-1、CD34、CD45 各 1 μl,室温避光孵育 30 min,PBS 洗涤后重悬,于流式细胞仪上检测细胞表面标志物表达。

1.2.2 细胞转染及分组 采用慢病毒转染法将 Lenti-miR-205、Lenti-control 慢病毒液分别转染至 hASCs 细胞(感染复数 MOI 为 20),分别命名为 miR-205 过表达组、miR-NC 组、对照组(未处理细胞),每组设置 5 个复孔。miR-205 序列 5'-CAT-GACCGTGACGCTGTCGCA-3',另选 miR-205 无关通用序列即 Lenti-control 为对照,倒置荧光显微镜下观察确认转染效率 > 70%,进行后续实验。

1.2.3 转染后各组 miR-205 基因表达检测 收集转染 48 h 各组细胞,采用 SYBR PCR 试剂盒扩增,进行 RT-qPCR,设置反应条件为:95 °C 预变性 2 min;95 °C、20 s,57 °C、40 s,72 °C、60 s,40 个循环后再延伸 5 min(72 °C),以 U6 为内参对照组,计算 miR-205 相对表达量($2^{-\Delta\Delta CT}$)。引物序列:miR-205: F: 5'-GCGTACTAGCGTATGATG-3', R: 5'-AT-AGGGATGCTCCGTTGC-3'; U6: F: 5'-CTGACTGTTG-CAGTGATG-3', R: 5'-TATTGGATGGCGACTGTA-3'。

1.2.4 双荧光素酶实验验证 miR205 与 Cbfa-1 的靶向关系 由广州锐博生物公司合成和鉴定包含 miRNA 可能结合位点的 Cbfa-1 mRNA 的 3'UTR 质粒,对数生长期 hASCs 细胞,培养至 80% 融合度时,按照 Lipofectamine™2000 说明书,将 Cbfa-1 mRNA 3'UTR 野生型与突变型荧光素酶报告质粒与内参海肾荧光素酶质粒 pRLTK 共转染至 hASCs 细胞(对照组),并分别转染至 miR-NC 组细胞、miR-205 过表达组细胞,孵育 48 h 后采用荧光素酶试剂盒检测荧光素酶强度,计算相对荧光素酶活性值 = 萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性。

1.2.5 转染后 hASCs 细胞增殖情况检测 转染后,分别取第 3 代 hASCs 细胞,以 1.5×10^5 /ml 接种至 96 孔板,于培养第 1、3、7 天时分别加入新下制备 MTT 溶液 20 μl,37 °C 继续孵育 4 h 后,弃去培养基,加入 DMSO 150 μl,充分振荡,于 490 nm 波长处测定吸光度(A)值。

1.2.6 转染后诱导分化 平面培养法直接将第 3 代 hASCs 细胞接种至放有多聚赖氨酸处理的无菌

盖玻片的 6 孔板,微团培养法将细胞先接种至离心管,离心弃去上清液(2 次),将细胞团块重新接种至放有多聚赖氨酸处理的无菌盖玻片的 6 孔板。培养 24 h 后,更换成软骨诱导培养基(DMEM 高糖培养基、5% 胎牛血清、10 μg/L TGFβ1、50 nmol/L 抗坏血酸、0.1 μmol/L 地塞米松、6.25 mg/L 胰岛素、6.25 mg/L 转铁蛋白)继续培养,诱导分化 2 周,倒置相差显微镜观察细胞分化情况。

1.2.7 分化鉴定 诱导分化 2 周后,收集平面培养法诱导的细胞爬片,加入 4% 多聚甲醛固定 10 min,蒸馏水洗涤。① 甲苯胺蓝染色:加入甲苯胺蓝染色 15 min,蒸馏水再次洗涤,晾干后中性树脂封片,显微镜下观察甲苯胺蓝染色情况。② II 型胶原免疫细胞化学染色:加入封闭液室温封闭 10 min,加入兔抗人 II 型胶原多抗 4 °C 孵育过夜,PBS 洗涤后加入生物素标记山羊抗兔 IgG,显色后,苏木精复染,盐酸酒精分化,流动自来水冲洗 10 min 后,脱水、封片,于显微镜下观察,棕黄色染色为阳性。③ 收集微团培养法诱导的细胞爬片,固定方法同甲苯胺蓝染色,PBS 洗涤 3 次后,用 0.5% Triton X-100 进行透化处理 8 min,PBS 再次洗涤后,加入 10% 山羊血清湿盒孵育 30 min,PBS 洗涤 3 次,加入 II 型胶原一抗(1:100)4 °C 孵育过夜,PBS 洗涤 3 次,二抗(1:500)室温避光孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次,加入荧光抗淬灭剂封片,于荧光显微镜下观察。

1.2.8 分化后 Cbfa-1、Smad3、TGF-β1、Col II mRNA 表达检测 用 RT-qPCR 法检测诱导分化 2 周后细胞中 Cbfa-1、Smad3、TGF-β1、Col II mRNA 表达情况,检测方法同 1.4 描述;以 β-actin 为内参对照组,计算目的基因表达强度($2^{-\Delta\Delta CT}$)。引物序列:Cbfa-1: F: 5'-AGATGTGATTCTACGGCCT-3', R: 5'-CTG-CATGTCCAACCTACCAC-3'; Smad3: F: 5'-GTGATGC-CATGATGCTGAT-3', R: 5'-CTGAATGCTGATGC-TACTG-3'; TGF-β1: F: 5'-TCGAATGCTGCTCTATGA-3', R: 5'-GTGCCTGCTGATTGATGC-3'; Col II: F: 5'-ATGCTGATGTCGATGCA-3', R: 5'-CGCATGCTGT-GATTGAG-3'; β-actin: F: 5'-CTCCTGACTGAAGGAT-GC-3', R: 5'-TGATGTGAATGCCTGGTG-3'。

1.2.9 分化后 Cbfa-1、Smad3、TGF-β1、Col II 蛋白表达检测 收集诱导分化 2 周各组细胞,离心后取沉淀,加入 500 μl 细胞裂解液,冰上裂解 25 min,再次离心取上清液,BCA 法进行蛋白定量,取待测样本进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,经电转、封闭后,按照比例稀释一抗(兔抗人 Cbfa-1、Smad3、TGF-β1、

Col II 多抗)、二抗(HRP 标记的山羊抗兔 IgG) 进行孵育,最后曝光、显影;扫描拍照后灰度值分析,以目的蛋白条带灰度值与内参对照的比值代表相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本计量资料比较采用单因素方差分析,两两样本比较采用 SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代 hASCs 细胞形态观察及鉴定 原代 hASCs 细胞培养 1 d 开始贴壁,细胞呈卵圆形;培养至第 3 天,细胞开始增殖,逐渐伸展呈梭形或多角形

生长,细胞体积增大;培养至第 7 天,细胞大量增殖,呈梭形或旋涡状生长,排列有序,见图 1。流式细胞术鉴定第 3 代 hASCs 细胞表面标志物 CD29、Sca-1 表达阳性,阳性率分别为 99.8%、98.4%; CD34、CD45 表达阴性,阳性率分别为 22.0%、4.96%,符合 hASCs 细胞表面抗原表达,见图 2。

2.2 转染后 hASCs 细胞 miR-205 基因表达量 转染后 miR-205 过表达组、miR-NC 组、对照组 miR-205 基因相对表达量分别为 (1.76 ± 0.20) 、 (0.35 ± 0.05) 、 (0.37 ± 0.05) ,组间比较差异有统计学意义 ($F = 217.811, P < 0.001$); miR-205 过表达组 miR-205 基因相对表达量高于 miR-NC 组和对照组 ($q = 15.294, 15.077$, 均 $P < 0.001$), miR-NC 组和对照组

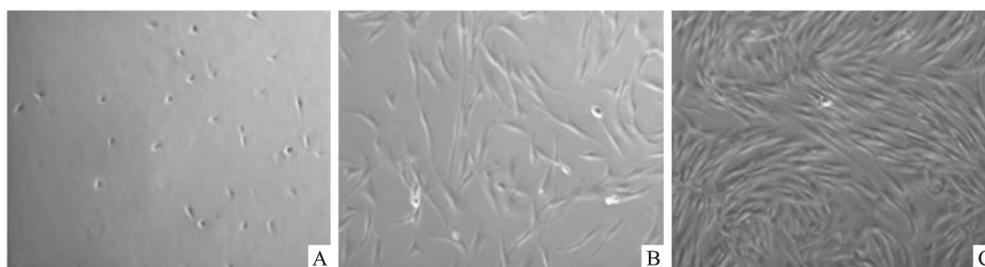


图1 原代 hASCs 细胞形态 $\times 100$

A: 培养 1 d; B: 培养 3 d; C: 培养 7 d

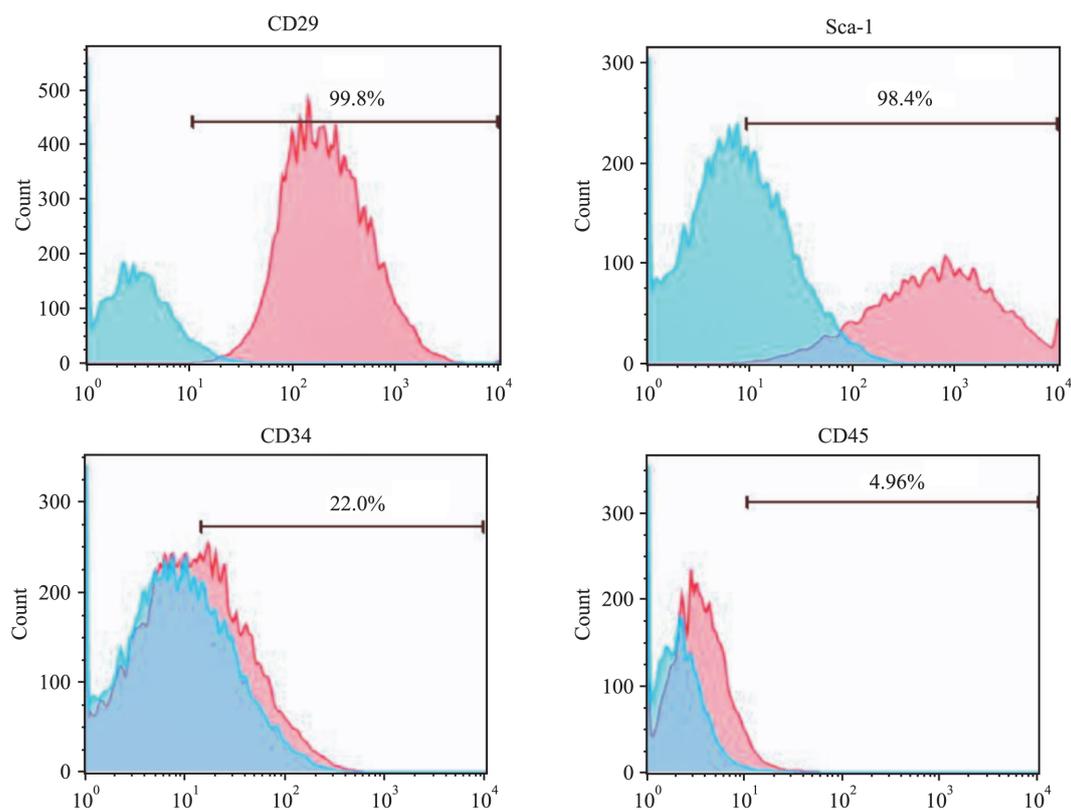


图2 第3代 hASCs 细胞表面标记流式细胞术检测结果

比较差异无统计学意义($q = 0.632$ $P = 0.545$)。

2.3 双荧光素酶实验结果 miR-205 过表达组、miR-NC 组、对照组野生型荧光素酶报告质粒相对活性值分别为(0.56 ± 0.09)、(1.01 ± 0.15)、(1.03 ± 0.13) 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)；与对照组和 miR-NC 组比较 miR-205 过表达组 Cbfa-1 mRNA 3'UTR 野生型荧光素酶报告质粒相对活性值下降,差异有统计学意义($P < 0.001$) ,对照组与 miR-NC 组比较,差异无统计学意义;miR-205 过表达组、miR-NC 组、对照组突变型荧光素酶报告质粒相对活性值分别为(1.02 ± 0.10)、(1.02 ± 0.12)、(0.98 ± 0.11) 组间比较差异无统计学意义。见图 3。

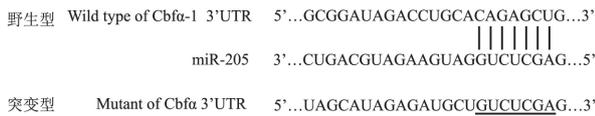


图3 Cbfa-1 mRNA 3'UTR 与 miR-205 互补配对的结合位点

2.4 转染后 hASCs 细胞增殖 miR-205 过表达组培养 3、7 d MTT 试验 A 值高于对照组和 miR-NC 组 ($P < 0.05$) ,而对照组与 miR-NC 组比较,差异无统计学意义;3 组 MTT 试验 A 值随培养时间延长呈升高趋势($P < 0.05$)。见表 1。

表1 转染后 hASCs 细胞不同时刻 MTT 试验 A 值($n = 3 \bar{x} \pm s$)

组别	1 d	3 d	7 d
对照	0.411 ± 0.058	0.470 ± 0.045 [△]	1.062 ± 0.095 ^{△▲}
miR-NC	0.405 ± 0.050	0.469 ± 0.043 [△]	1.030 ± 0.110 ^{△▲}
miR-205 过表达	0.461 ± 0.064	0.554 ± 0.056 ^{* #△}	1.681 ± 0.135 ^{* #△▲}
F 值	1.424	5.093	51.333
P 值	0.279	0.025	<0.001

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 miR-NC 组比较: # $P < 0.05$; 与 1 d 比较: [△] $P < 0.05$; 与 3 d 比较: [▲] $P < 0.05$

2.5 转染后诱导 hASCs 细胞向软骨细胞分化 诱导 hASCs 细胞分化 2 周后,甲苯胺蓝染色显示 miR-205 过表达组细胞染色呈深蓝色,细胞内呈现蓝紫色颗粒,集落生长区域细胞蓝紫色染色尤为明显,呈强阳性(图 4A3),对照组和 miR-NC 组为微弱浅蓝色,呈弱阳性(图 4A1、A2)。免疫细胞化学染色显示 miR-205 过表达组细胞及胞外基质棕黄色,呈强阳性(图 4B3),对照组和 miR-NC 组为淡黄色,弱阳性,II 型胶原表达较少(图 4B1、B2)。免疫荧光染色显示 miR-205 过表达组红色荧光强度较强(图 4C3),对照组和 miR-NC 组红色荧光强度较暗淡(图 4C1、C2)。

2.6 诱导分化后 Cbfa-1、Smad3、TGF-β1、Col II mRNA 表达 miR-205 过表达组诱导分化后 Cbfa-1 mRNA 相对表达量低于对照组和 miR-NC 组, Smad3、TGF-β1、Col II mRNA 相对表达量高于对照组和 miR-NC 组($P < 0.05$) ,而对照组与 miR-NC 组比较,差异无统计学意义。见表 2。

表2 诱导分化后 Cbfa-1、Smad3、TGF-β1、Col II mRNA 相对表达量($n = 3 \bar{x} \pm s$)

组别	Cbfa-1	Smad3	TGF-β1	Col II
对照	1.04 ± 0.13	0.33 ± 0.29	0.44 ± 0.06	0.50 ± 0.08
miR-NC	1.01 ± 0.10	0.31 ± 0.32	0.41 ± 0.06	0.48 ± 0.07
miR-205 过表达	0.41 ± 0.05 ^{* #}	0.92 ± 0.10 ^{* #}	1.02 ± 0.13 ^{* #}	1.23 ± 0.11 ^{* #}
F 值	64.439	9.168	73.589	117.073
P 值	<0.001	0.004	<0.001	<0.001

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 miR-NC 组比较: # $P < 0.05$

2.7 诱导分化后 Cbfa-1、Smad3、TGF-β1、Col II 蛋白表达 miR-205 过表达组诱导分化后 Cbfa-1 蛋白相对表达量低于对照组和 miR-NC 组, Smad3、TGF-β1、Col II 蛋白相对表达量高于对照组和 miR-NC 组 ($P < 0.05$) ,而对照组与 miR-NC 组比较,差异无统计学意义。见表 3、图 5。

表3 诱导分化后 Cbfa-1、Smad3、TGF-β1、Col II 蛋白相对表达量($n = 3 \bar{x} \pm s$)

组别	Cbfa-1	Smad3	TGF-β1	Col II
对照	0.95 ± 0.12	0.54 ± 0.06	0.25 ± 0.04	0.29 ± 0.05
miR-NC	0.94 ± 0.11	0.52 ± 0.06	0.24 ± 0.04	0.30 ± 0.06
miR-205 过表达	0.43 ± 0.06 ^{* #}	1.02 ± 0.12 ^{* #}	1.33 ± 0.17 ^{* #}	1.13 ± 0.14 ^{* #}
F 值	44.070	55.648	183.380	135.661
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 miR-NC 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

关节软骨损伤是骨性关节炎、老年性关节炎等关节软骨退行性疾病的重要病理特征^[7]。随着软骨组织工程学的不断发展,为软骨损伤、缺损的修复带来新的方向。种子细胞的选择、刺激种子细胞软骨细胞分化是软骨组织工程的关键步骤。既往研究^[8]显示,骨髓间充质干细胞受生长分化因子刺激后可向软骨细胞方向分化,但在分化后期存在软骨肥大细胞易凋亡的缺陷,寻找合适的种子细胞,同时维持干细胞向软骨细胞分化的稳定性十分重要。Cbfa-1 是干细胞软骨分化晚期重要的转录调控因子,抑制 Cbfa-1 的表达对维持干细胞软骨细胞分化的稳定性有重要意义^[9]。

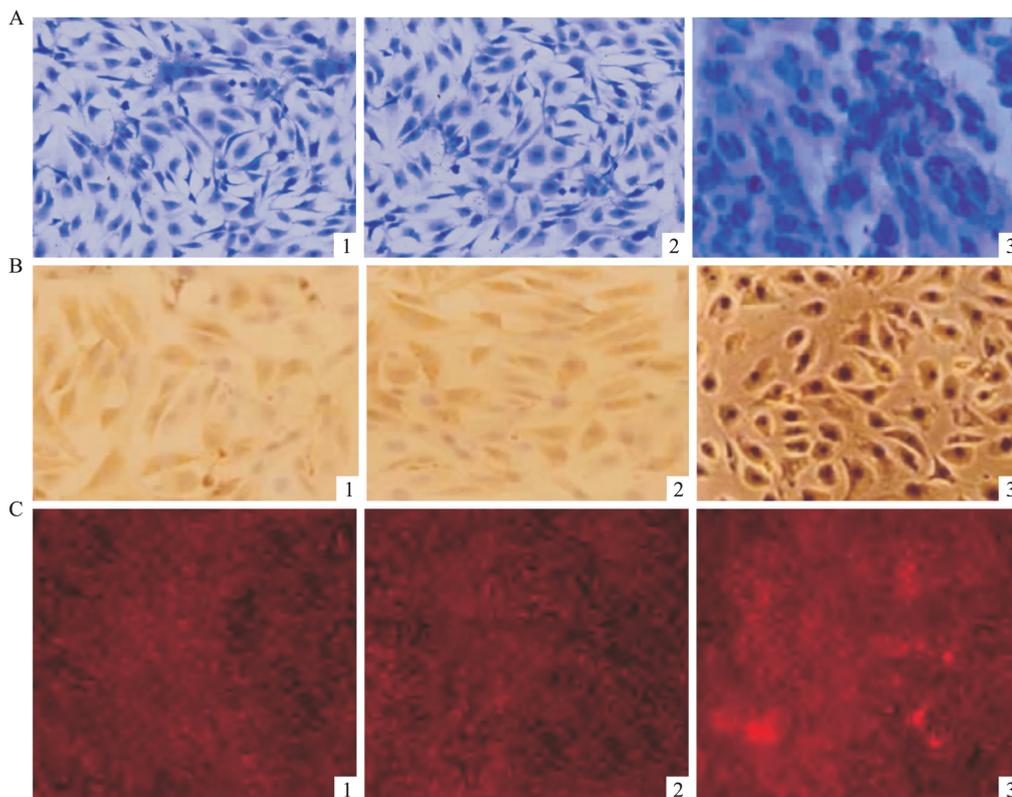


图4 转染后诱导 hASCs 细胞向软骨细胞分化

A: 甲苯胺蓝染色 ×200; B: 免疫细胞化学染色 ×200; C: 免疫荧光观察 ×100; 1: 对照组; 2: miR-NC 组; 3: miR-205 过表达组

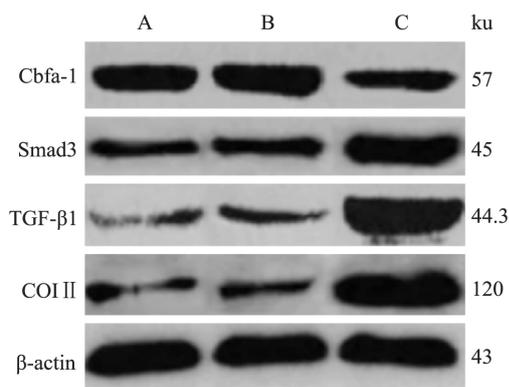


图5 Cbfa-1、Smad3、TGF-β1、Col II 蛋白 Western blot 条带图

A: 对照组; B: miR-NC 组; C: miR-205 过表达组

本研究中显微镜观察 hASCs 细胞形态由卵圆形逐渐呈梭形或多角形,后逐渐增殖为排列有序的长梭形或旋涡状,经历生长停滞期、对数生长期及平台期,与既往报道结果相似。miR-205 是 miRNA 家族成员之一,具有 miRNA 调节细胞增殖、分化、凋亡等多种生理过程的作用^[10]。既往多将 miR-205 作为肿瘤抑制因子广泛研究,近年来研究^[11]显示,miR-205 参与调节间充质干细胞软骨方向分化,但具体机制不明,过表达 miR-205 可靶向抑制 Cbfa-1 基因,从而逆转 miR-205 对人胰腺癌细胞的增殖和

侵袭能力; Zhang et al^[12] 在研究骨肉瘤 MG63、U2OS 细胞抑癌实验中得出了相似的结论。本研究采用慢病毒转染法使 miR-205 基因过表达,结果显示转染后 miR-205 基因相对表达量明显升高,提示转染成功;采用双荧光素酶试验验证了 miR-205 与 Cbfa-1 间的靶向关系; miR-205 过表达组转染后 hASCs 细胞培养 3、7 d MTT 试验 A 值高于对照组和 miR-NC 组,且诱导分化 2 周后,甲苯胺蓝染色、免疫细胞化学染色、免疫荧光染色均显示 miR-205 过表达组细胞向软骨细胞方向分化更为明显,提示抑制 miR-205 表达可促进 hASCs 细胞增殖及软骨细胞方向分化。

此外,miR-205 过表达组诱导分化后 Cbfa-1 mRNA 和蛋白相对表达量低于对照组和 miR-NC 组,Smad3、TGF-β1、Col II mRNA 和蛋白相对表达量高于对照组和 miR-NC 组,提示 miR-205 过表达可能通过抑制 Cbfa-1,激活 TGF-β1/Smad3 信号通路发挥促进 hASCs 细胞增殖及软骨细胞方向分化的作用。Cbfa-1 是软骨细胞发育过程的重要转录因子,可能通过激活细胞内某靶分子而引起 TGF-β1/Smad3 信号通路激活,发挥相应调控作用,但具体调控机制仍需要进一步探索。研究^[13]显示,Cbfa-1 基

因缺失可引起成骨特异性骨钙素基因表达抑制,从而进而避免多能干细胞分化为肥大软骨细胞和成骨细胞。因此可推测,抑制 $Cbfa-1$ 基因表达可为 hASCs 细胞分化为稳定软骨细胞提供条件。TGF- $\beta 1$ 促进多能干细胞向软骨细胞分化多肽类生长因子, Smad3 是其下游重要信号蛋白分子,直接参与 TGF- $\beta 1$ 信号转导过程,参与调控软骨细胞增殖、分化。Col II 是软骨细胞功能基因,是维持软骨网架系统、调节软骨细胞生长代谢的重要因子^[14-15]。本研究通过促进 miR-205 过表达,使 $Cbfa-1$ 基因和蛋白表达抑制,激活 TGF- $\beta 1$ /Smad3 软骨细胞增殖、分化信号通路,从而发挥促进 hASCs 细胞增殖、软骨细胞方向分化作用。

参考文献

- [1] 黄绍代,胡丹,彭江,等. PKH26 荧光素标记脂肪间充质干细胞的生物学特性的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(9): 1343-7.
- [2] Hu L, Su P, Yin C, et al. Microtubule actin crosslinking factor 1 promotes osteoblast differentiation by promoting β -catenin/TCF1/Runx2 signaling axis[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(2): 1574-84.
- [3] Zhang Y, Xie R L, Croce C M, et al. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(24): 9863-8.
- [4] Zhang Y, Xie R L, Gordon J, et al. Control of mesenchymal lineage progression by microRNAs targeting skeletal gene regulators Trps1 and Runx2[J]. *J Biol Chem* 2012 287(26): 21926-35.
- [5] 胡楠. Mir-205 调节骨髓间充质干细胞成骨分化中的机制研究[D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2015.
- [6] Hu N, Feng C, Jiang Y, et al. Regulative effect of mir-205 on osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells(BMSCs): possible role of sATB2/Runx2 and ERK/MAPK pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(5): 10491-506.
- [7] 李向阳,秦苏萍,程万鹏,等. GANT61 通过减缓滑膜细胞增殖抑制 Balb/c 小鼠关节炎发展[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(9): 79-83.
- [8] Li H, Yu S, Hao F, et al. Insulin-like growth factor binding protein 4 inhibits proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and enhances growth of neurospheres derived from the stem cells[J]. *Cell Biochem Funct*, 2018, 36(6): 331-41.
- [9] Yuan B, Wu Z. MMP-2 silencing reduces the osteogenic transformation of fibroblasts by inhibiting the activation of the BMP/Smad pathway in ankylosing spondylitis[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(3): 3281-6.
- [10] Lu Y, Cao J, Napoli M, et al. miR-205 regulates basal cell identity and stem cell regenerative potential during mammary reconstitution[J]. *Stem Cells*, 2018, 36(12): 1875-89.
- [11] Zhuang L, Guo J, Yao Y, et al. miR-205 targets runt-related transcription factor 2 to inhibit human pancreatic cancer progression[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(1): 843-8.
- [12] Zhang C, Long F, Wan J, et al. MicroRNA-205 acts as a tumor suppressor in osteosarcoma via targeting RUNX2[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(6): 3275-84.
- [13] 高博,幸嵘,孔清泉,等. 腺病毒介导 RNA 干扰抑制核心结合因子 $\alpha 1$ 表达阻断软骨细胞的肥大分化[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(2): 187-91.
- [14] Horita M, Nishida K, Hasei J, et al. Involvement of ADAM12 in chondrocyte differentiation by regulation of TGF- $\beta 1$ -induced IGF-1 and RUNX-2 expressions[J]. *Calcif Tissue Int*, 2019, 105(1): 97-106.
- [15] Lazarini M, Bordeaux-Rego P, Giardini-Rosa R, et al. Natural type II collagen hydrogel, fibrin sealant, and adipose-derived stem cells as a promising combination for articular cartilage repair[J]. *Cartilage*, 2017, 8(4): 439-43.

Role and mechanism of miR-205 in promoting hASCs cell line differentiation into chondrocytes

Li Chunliang, Qin Feng, Han Xuelai, et al

(Dept of Orthopaedics, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810001)

Abstract Objective To investigate the role and mechanism of microRNA(miR) -205 in promoting the differentiation of human adipose-derived stem cells(hASCs) cell lines to chondrocytes by regulating the expression of core-binding factor $\alpha-1$ ($Cbfa-1$). **Methods** Lenti-miR-205 and lenti-control lentivirus solution were transfected into the hASCs cells by lentivirus transfection method, which were named miR-205 overexpression group and miR-NC group. The untreated cells were taken as the control groups. The expression of miR-205 gene was detected by RT-qPCR and cell proliferation was detected by MTT colorimetry. The induced differentiation of the third generation hASCs cells after transfection was observed by toluidine blue staining, immunocytochemistry and immunofluorescence staining. The expressions of $Cbfa-1$, Smad3, TGF- $\beta 1$, Col II mRNA and protein were detected by RT-qPCR and Western blot. **Results** The relative expression level of miR-205 gene in miR-205 overexpression group was higher than that in control group and miR-NC group ($P < 0.001$). The absorbance(A) value of MTT test of the miR-205 overexpression group was higher than that of the control group and the miR-NC group ($P < 0.05$). After 2

网络出版时间: 2021-4-2 16:13 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210402.1340.014.html>

下调 PMEPA1 表达对肝癌细胞 HepG2 增殖与转移的影响

张涛¹ 陈强² 杜卫东² 吴正升²

摘要 目的 观察沉默前列腺跨膜雄激素诱导蛋白 1 (PMEPA1) 对肝癌细胞 HepG2 增殖和迁移的影响。方法 应用 qRT-PCR、免疫组化染色和 Western blot 方法检测 PMEPA1 在肝癌细胞 HepG2 中 mRNA 和蛋白表达情况。分析 PMEPA1 在肝细胞性肝癌 (HCC) 组织中的表达及其与临床病理特征的关系。使用 siRNA 干扰肝癌细胞 HepG2 中 PMEPA1 的表达,并应用 MTT 法、Transwell 法检测肝癌细胞 HepG2 的增殖及迁移能力。结果 PMEPA1 蛋白在 HCC 组织中表达高于正常肝组织。肝癌组织内 PMEPA1 蛋白表达与 HCC 患者肿瘤大小 ($P=0.0366$) 和淋巴结转移 ($P=0.0358$) 密切相关。与 HCC 患者性别、年龄、AFP 水平高低、脉管浸润、组织学分级及 TNM 分期等均无相关性。PMEPA1-siRNA 肝癌细胞 HepG2 PMEPA1 蛋白及 mRNA 表达均下调 ($P<0.01$)。siPMEPA1 转染细胞增殖能力及迁移能力均降低 ($P<0.01$)。结论 PMEPA1 表达可能促进 HCC 的增殖和迁移。

关键词 肝细胞癌; PMEPA1; 免疫组化; 细胞增殖; 转移

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)05-0741-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.05.013

2020-08-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81472493、81972472); 安徽省转化医学研究院科研基金项目(编号: 2017zhyx37)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院病理科, 合肥 230032

² 安徽医科大学病理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 张涛, 男, 硕士研究生;

吴正升, 男, 博士, 教授, 责任作者, E-mail: woozson@126.com

肝细胞性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全世界癌症相关死亡的四大死亡原因之一, 也是最常见的恶性肿瘤之一^[1]。尽管目前外科手术、消融治疗等技术日益发展, 但由于肿瘤复发和肝内转移导致 HCC 患者的 5 年生存率仍然很低^[2]。因此, 探索肝癌生物学的发生发展机制, 对寻找新的治疗靶点以改善目前 HCC 的治疗方式有着重要意义。前列腺跨膜雄激素诱导蛋白 1 (prostate transmembrane protein, androgen induced 1, PMEPA1) 是一种 I b 型膜蛋白, 其在细胞内主要定位于溶酶体膜、核内体膜和高尔基复合体膜上^[3]。PMEPA1 最初是在前列腺中被发现, 并证实为雄激素诱导上调基因。相关研究^[4-6]表明, PMEPA1 在乳腺癌、结肠癌和肺癌等多种类型肿瘤中呈高度表达, 因此, PMEPA1 也被称为实体肿瘤相关基因 1 (solid tumor associated gene 1, STAG1)。PMEPA1 对 HCC 发生发展的影响及作用机制目前尚不清楚。该实验通过转染 siRNA 沉默 PMEPA1 在肝癌细胞株 HepG2 中的表达, 并分析对其增殖和转移的影响, 为进一步探讨 HCC 发生发展机制提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 收集来自安徽医科大学第一附属医院病理科 2014 年 1 月—2018 年 12 月 HCC 石蜡包埋标本 112 例, 癌旁非肿瘤肝组织石蜡包埋标

weeks of induction, the toluidine blue staining showed that the miR-205 overexpression group stained strongly positively in dark blue staining, while the control group and miR-NC group were weakly light blue. Immunocytochemical staining showed that the cells and extracellular matrix of miR-205 overexpression group were strongly positive brown-yellow staining, while those of the control group and miR-NC group were weakly positive yellowish staining. Immunofluorescence staining showed that the red fluorescence intensity of miR-205 overexpression group was stronger, and the red fluorescence intensity of control group and miR-NC group was dim. The toluidine blue staining in the control group and miR-NC group was weak light blue. The relative expression levels of Cbfa-1 mRNA and protein in the miR-205 overexpression group were lower than those in the control group and miR-NC group, and the relative expression levels of Smad3, TGF- β 1, Col II mRNA and protein in the miR-205 overexpression group were higher than those in the control group and miR-NC group ($P<0.05$). **Conclusion** MiR-205 overexpression can promote hASCs cell proliferation and differentiation towards chondrocytes, which may play a regulatory role by inhibiting Cbfa-1 and activating TGF- β 1/Smad3 signaling pathway.

Key words human adipose-derived stem cells; chondrocyte differentiation; microRNA-205; core-binding factor α -1