

网络出版时间: 2019-5-30 10:50 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190527.1648.005.html>

miR-145-5p 靶向 FGF5 对缺血/再灌注损伤诱导的神经细胞凋亡和氧化应激的调控作用

闫海清, 岳学静, 贵永堃, 任瑞芳, 王昊亮, 赵君, 张平

摘要 目的 研究 miR-145-5p 对体外缺血/再灌注(I/R)损伤神经细胞模型的调控作用,并探讨其机制。方法 运用氧-葡萄糖剥夺/复氧(OGD/R)建立脑缺血/再灌注损伤细胞模型。采用荧光素酶报告实验验证 miR-145-5p 与 FGF5 的靶向关系;RT-PCR、流式细胞术、Western blot 等方法检测 miR-145-5p 对神经细胞 HT22 的凋亡和氧化应激损伤的影响。结果 结果表明,与未进行 OGD/R 处理组(Normoxia 组)相比,OGD/R 处理 6 h、12 h、24 h 组凋亡率和氧化应激损伤明显增加。在 OGD/R 环境下,miR-145-5p inhibitor 转染减轻 HT22 细胞凋亡和氧化应激损伤。然而,转染 FGF5 siRNA 逆转了这一效应。在 OGD/R 模拟的脑 I/R 损伤过程中,miR-145-5p 通过靶向 FGF5 促进神经细胞凋亡和损伤。结论 研究结果为缺血性脑卒中的治疗提供了一种新的治疗靶点。

关键词 miR-145-5p; FGF5; 缺血/再灌注损伤; OGD/R 模型中图分类号 R 361+.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)06-0887-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.011

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)是全球最具破坏性的神经系统疾病之一,也是全球排名第三的死因。IS 可能导致终身残疾。此外,中国每年约有 250 万人面临中风风险,约 100 万人可能死于中风或引发的后遗症^[1]。脑缺血再灌注(I/R)的特点是最初限制脑的血液供应,然后恢复血流和复氧^[2]。然而,IR 所致的脑血管功能障碍成为一个严重的临床问题。在 I/R 过程中,可能导致神经损伤,尤其是发生缺血性中风的患者^[3]。导致脑 I/R 损伤的确切发病机制尚不完全清楚,因此寻找新的有效预防脑 I/R 损伤的有效措施,对预防 IS 具有重要意义。大多数成熟的 miRNAs 通过结合目标 mRNAs 的 3'-

非翻译区(3'-UTR)来改变 mRNA 的降解或翻译。研究^[4]表明,多种 miRNAs 包括 miR-21、miR-200 和 miR-497 可以作为 IS 潜在的治疗靶点。这些 miRNAs 似乎通过改变脑缺血损伤后大脑皮层高表达的关键信号元件而参与脑 I/R 损伤。最近的研究^[5]表明 miR-145-5p 受长链非编码 RNA SNHG14 调控进而参与脑梗塞的发展,但 miR-145-5p 下游靶点仍不清楚。FGF5 又称巢蛋白(Nestin),是小鼠拟胚体外胚层主要的标志蛋白,是胚胎发育和神经发育中的重要蛋白^[6]。该研究采用氧-葡萄糖剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation and reoxygenation, OGD/R)细胞模型作为脑 I/R 损伤的体外模型。在使用 miR-145-5p 抑制剂后,检测 FGF5 和其他相关蛋白介导的神经凋亡和氧化应激损伤的差异,有助于更好地理解脑 I/R 损伤,并将有助于制定新的改善 I/R 损伤临床治疗的策略。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 小鼠海马细胞系 HT22 来源于中国科学院(上海),在含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 μg/ml 的高糖 DMEM(美国 Gibco 公司)中培养。

1.2 OGD/R 建立脑缺血/再灌注损伤细胞模型 HT22 细胞在 37 °C、5% CO₂ 的无氧培养皿(美国赛默飞世尔公司)中培养,用无糖 DMEM 诱导培养 HT22 海马神经元,加 1% O₂、94% N₂ 和 5% CO₂ 在 37 °C 诱导缺氧缺糖(OGD)模拟局部缺血。OGD 处理 3 h 后,用新鲜的正常培养基代替培养基,在通常条件下(95% 空气和 5% CO₂, 37 °C),复氧 12 h 和 24 h。对照组细胞不受 OGD/R 处理。

1.3 流式细胞术 6 孔板上接种 HT22 海马神经细胞,密度为 2 × 10⁵ 个/孔。按上述 OGD/R 方法处理细胞 6、12、24 h。收集待测细胞,4 °C PBS 清洗 3 次,用 1 × Annexin V 结合溶液重悬细胞,制成密度约 1 × 10⁶ 个/ml 的细胞悬液。取 100 μl 细胞悬液,然后用 5 μl Annexin V-FITC, 5 μl 碘化丙啶(propidium iodide, PI)进行室温避光双染 15 min,加入 400

2019-01-30 接收

基金项目: 河南省科技攻关计划项目(编号: 182102310529); 河南省神经修复重点实验室开放课题(编号: HNSJXF-2018-007)

作者单位: 新乡医学院第一附属医院神经内科、河南省神经修复重点实验室 新乡 453100

作者简介: 闫海清 男 硕士研究生;

张平 女, 主任医师, 责任作者, E-mail: zhangpingsjnk@163.com

μl $1 \times \text{Annexin V}$ 结合溶液。最后利用流式细胞仪对染色的细胞进行检测。完成检测后,用 BD FACSuite 软件作图并统计 Q2 + Q4 区凋亡细胞的数目。

1.4 Western blot HT22 细胞处理同上,用 RIPA 裂解缓冲液(上海碧云天生物技术研究所在所)裂解细胞并用 BCA 试剂盒定量(上海碧云天生物技术研究所在所)。40 μg 总蛋白在 10% 的 SDS-PAGE 中进行电泳分离,转移至 PVDF 膜(美国 Millipore 公司)。用封闭液(5% 脱脂牛奶 TBST)室温孵育 2 h,然后分别加入一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日, TBST 清洗 3 次,然后在室温下与 HRP 偶联的二抗孵育 1.5 h,最后用 ECL 观察印迹并使用化学发光 doc XRS 成像系统检测印迹并拍照。并用 Image J 软件统计灰度值计算相对表达量。GAPDH 作为内参。

1.5 氧化应激标志物检测 细胞损伤是通过测量氧化应激标志物来测定的。简而言之, HT22 细胞处理同上。丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和活性氧(ROS)测定试剂盒均采用商品化(南京建成生物技术研究所在所)MDA 试剂盒、SOD 试剂盒测定。乳酸脱氢酶(LDH)活性用 LDH 细胞毒性检测试剂盒(上海碧云天生物试剂有限公司)测定。按照说明书进行标准操作。MDA 浓度表示为 mmol/ml ; SOD 活性表示为 U/ml ; LDH 活性表示为 U/L 。

1.6 荧光素酶报告实验 将含有预测 miR-145-5p 结合位点或突变结合位点的 FGF5 的 3'UTR 进行 PCR 扩增并插入到 pMIR-control 载体中。在荧光素酶报告基因检测中,使用 Lipofectamine 3000 将 miR-145-5p mimic 和 pcDNA3.0-FGF5 野生型或突变型报告质粒转染到 293T 细胞。转染 48 h 后,采用双荧光素酶报告试验系统(美国 Promega 公司)按照制造商的说明测定荧光素酶活性。

1.7 细胞转染 小干扰 RNA (siRNA) 靶向 FGF5 和对照 siRNA 购自上海 Genechem 公司,序列见表 1。miR-145-5p inhibitor 序列(CAGGTCAAAAGGCTCCTTAGGGA)由广州锐博生物有限公司合成。将上述小 RNA 插入 pcDNA3.0 质粒待转染。将 HT 22 细胞接种到六孔板,密度 1×10^4 细胞/ ml 每孔。正常条件培养 24 h 后, siFGF5 和对照用脂质体 3000 转染到 HT22 细胞。挑选 FGF5 表达量低的细胞株,进行后续实验。

1.8 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR) 使用 TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司)从细胞中提取总 RNA。用 SuperScript 逆转录酶试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)将等量的 RNA 反转录至

表 1 基因序列

基因	引物序列(5'-3')
FGF5 siRNA1	F: CAUAAGUUGUAUAGGCUAA R: CAACAAUAAGCCACGUCAA
FGF5 siRNA2	F: GCAAGUUCAGGGAGCGUUU R: GUAUUGAAGUCACGUCAUU
miR-145-5p mimic	F: GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU R: GGAUCCUGGGAAAACUGGACUU
miR-145-5p	F: ACACTCCAGCTGGGGTCCAGTTTCCC AGGA R: CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAAT TCAGTTGAG AGGGATTG
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACA R: AACGCTTCACGAATTTGCGT

cDNA。然后用 SYBR Green PCR Master Mix (Vazyme) 在 Fast Real-time PCR 7300 系统(美国赛默飞世尔公司)中分析 miR-145-5p 的 mRNA 水平。U6 作为内参。结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析。

1.9 统计学处理 使用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间的比较采用 t 检验;多组之间的比较采用单因素方差分析(ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OGD/R 处理诱导神经细胞凋亡 如图 1A 所示,流式检测凋亡细胞实验表明,与未进行 OGD/R 处理组(Normoxia 组)比较(12.3% $\pm$ 2.1%), OGD/R 处理 6 h、12 h、24 h 组凋亡细胞(Q2 + Q4)明显增加,凋亡率增加,分别为: (21.6% $\pm$ 2.6)%、(32.8% $\pm$ 3.2)%、(43.9% $\pm$ 3.8)% ,差异有统计学意义($F = 293.05$, $P < 0.001$)。Western blot 检测抗凋亡蛋白 Bcl-2,其表达量随 OGD/R 处理时间增加而减少,差异有统计学意义($F = 54.06$, $P < 0.001$)。相反,凋亡蛋白 Bax、caspase-3/9 表达量随 OGD/R 处理时间增加而增加,差异有统计学意义($F = 32.11$, $P < 0.001$; $F = 11.25$, $P < 0.001$; $F = 14.34$, $P < 0.001$)。说明随着 OGD/R 处理时间增加, HT22 神经细胞凋亡被诱导,呈时间依赖特点。

2.2 OGD/R 处理增加氧化应激水平 如图 2A 所示,细胞上清 LDH 含量随 OGD/R 处理时间增加而增加($F = 225.60$, $P < 0.001$),说明 OGD/R 处理诱导损伤导致细胞膜破裂释放 LDH。ROS 和 MDA 含量随 OGD/R 处理时间增加而增加, SOD 明显减少,差异有统计学意义($F = 300.51$, $P < 0.001$; $F = 218.79$, $P < 0.001$; $F = 535.28$, $P < 0.001$) ,见表 2。说明 OGD/R 处理诱导 HT22 细胞产生严重氧化应激。

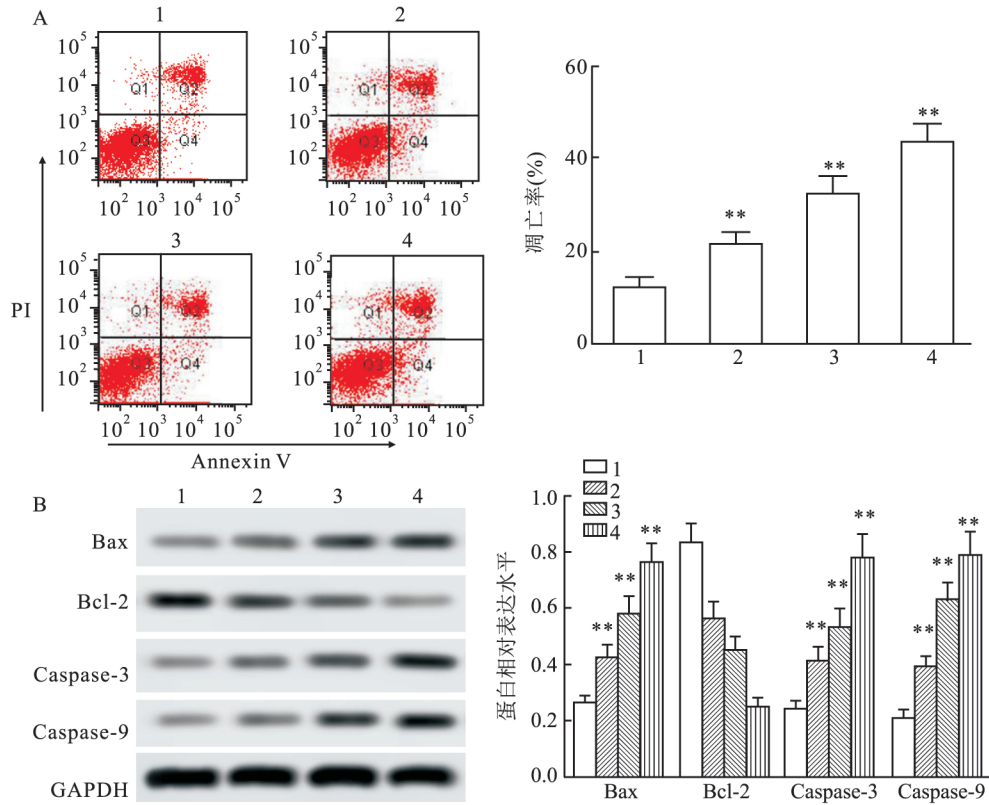


图1 OGD/R 处理诱导神经细胞凋亡

A: 流式检测细胞凋亡; B: WB 检测凋亡相关蛋白表达; 1: Normoxia 组; 2: OGD/R 6 h 组; 3: OGD/R 12 h 组; 4: OGD/R 24 h 组; 与 Normoxia 组比较: ** $P < 0.01$

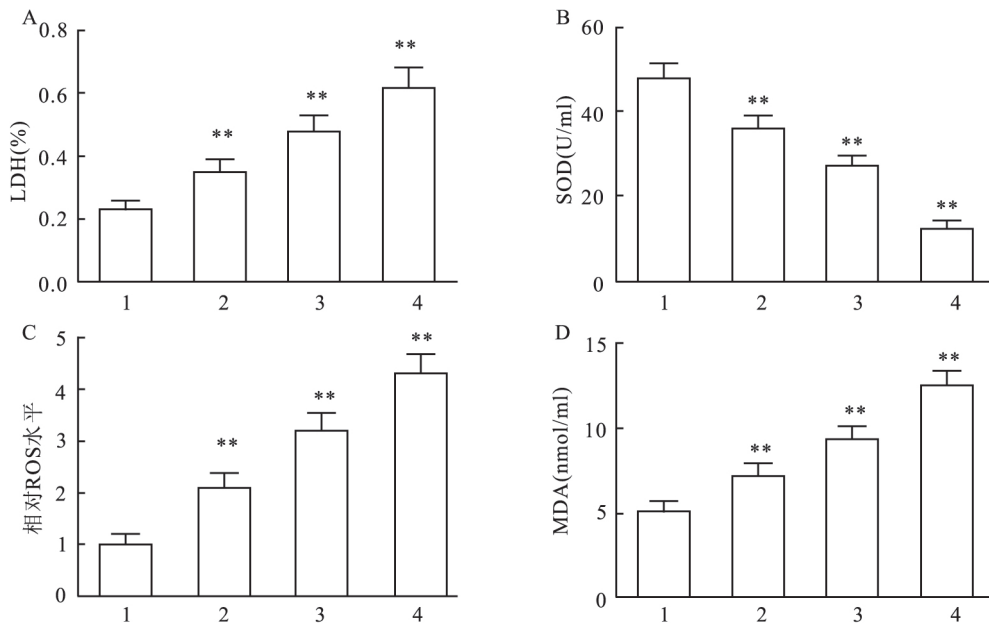


图2 OGD/R 处理增加氧化应激水平

A: LDH 含量; B: SOD 含量; C: ROS 含量; D: MDA 含量; 1: Normoxia 组; 2: OGD/R 6 h 组; 3: OGD/R 12 h 组; 4: OGD/R 24 h 组; 与 Normoxia 组比较: ** $P < 0.01$

2.3 OGD/R 处理增加 miR-145-5p 表达量 如图 3A 所示, 与 (Normoxia 组) 相比, OGD/R 处理 6 h、12 h、24 h 组 miR-145-5p 表达量依次明显增加, 差异有统计学意义 ($F = 77.18$, $P < 0.001$)。如图 3B 所示,

miR-145-5p inhibitor 可以降低 OGD/R 处理组 miR-145-5p 表达量, 反面证明 OGD/R 处理诱导 miR-145-5p 表达量增加。说明 miR-145-5p 高表达与缺血再灌注损伤呈正相关性。

表2 氧化应激标志物水平

指标	Normoxia 组	OGD/R 6 h	OGD/R 12 h	OGD/R 24 h
LDH	0.23 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.48 ± 0.04	0.62 ± 0.06
ROS	1.0 ± 0.21	2.1 ± 0.28	3.2 ± 0.33	4.3 ± 0.38
SOD (U/ml)	48.1 ± 3.51	36.2 ± 2.90	27.3 ± 2.41	12.6 ± 1.84
MDA (nmol/ml)	5.1 ± 0.6	7.2 ± 0.73	9.3 ± 0.89	12.5 ± 0.93

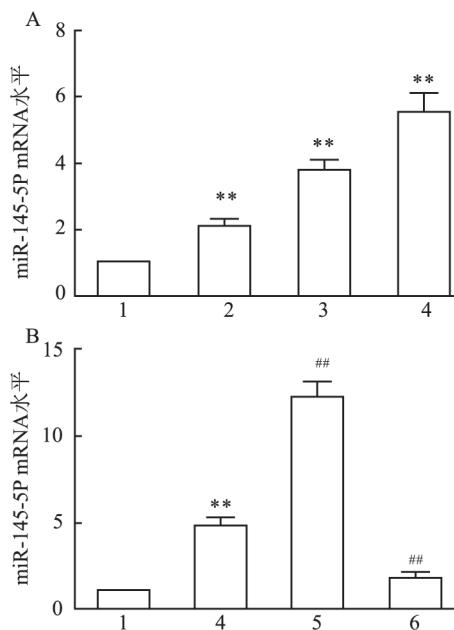


图3 OGD/R处理增加miR-145-5p表达量

A、B: miR-145-5p mRNA水平;与 Normoxia 组比较: ** $P < 0.01$; 1: Normoxia 组; 2: OGD/R 6 h 组; 3: OGD/R 12 h 组; 4: OGD/R 24 h 组; 5: miR-145-5p mimic; 6: miR-145-5p inhibitor;与 OGD/R 24 h 组比较: ## $P < 0.01$

2.4 miR-145-5p 靶向负向调控 FGF5 表达 如图 4A 所示,为了验证 miR-145-5p 与 FGF5 是否有靶向关系,本文采用使用 TargetScan 6.2 进行了生物信息学分析,发现 miR-145-5p 与 FGF5 的 3'-UTR 有互补序列。荧光素酶报告实验表明,miR-145-5p 降低了 wt FGF5 3'-UTR 转染细胞的荧光素酶活性,差异有统计学意义 ($F = 36.31$, $P < 0.001$),但在细胞转染 Mut FGF5 3'-UTR 的细胞中荧光素酶活性没有降低。如图 4B 所示,与 OGD/R 相比,miR-145-5p inhibitor 明显上调 FGF5 表达,而 siFGF5 明显下调 FGF5 表达差异有统计学意义 ($F = 19.47$, $P < 0.001$)。结果表明,miR-145-5p 通过直接结合 FGF5 的 3'-UTR 负调控 FGF5 基因的表达。

2.5 miR-145-5p inhibitor 减轻 OGD/R 诱导的 HT22 凋亡 转染 FGF5 siRNA 和/或 miR-145-5p inhibitor 的 HT22 细胞进行 OGD/R 24 h 处理。检测细胞凋亡情况如图 5A 所示:与 OGD/R 处理组相比,miR-145-5p inhibitor 明显降低细胞凋亡率,FGF5

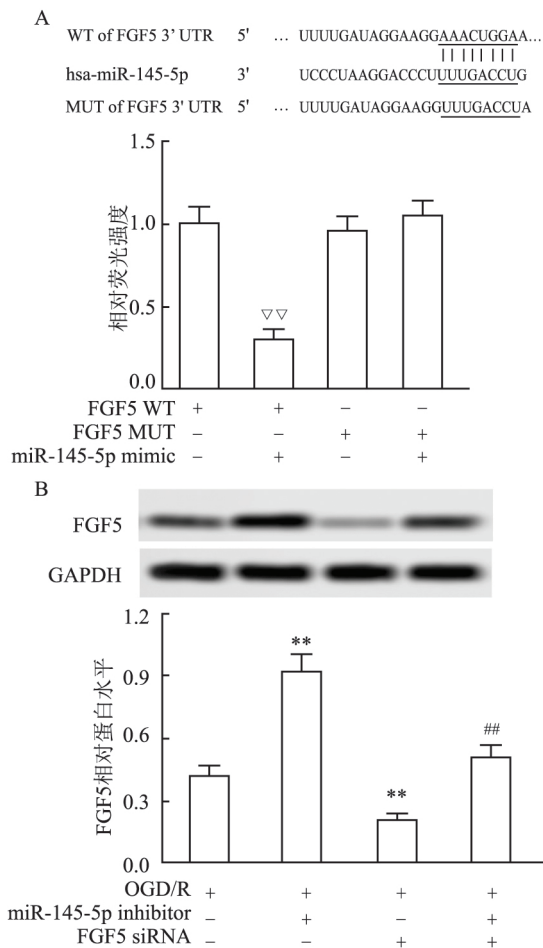


图4 miR-145-5p 靶向负向调控 FGF5 表达

A: 荧光素酶实验检测 FGF5 与 miR-145-5p 靶向关系;与 FGF5 WT 比较: $P < 0.01$; B: FGF5 蛋白表达;与 OGD/R 比较: ** $P < 0.01$;与 OGD/R + FGF5 siRNA 比较: ## $P < 0.01$

siRNA 明显增加细胞凋亡率,共转染相互抵消诱导 (FGF5 siRNA) 或抑制凋亡 (miR-145-5p inhibitor) 的能力,差异有统计学意义 ($F = 75.05$, $P < 0.001$; $F = 15.29$, $P < 0.001$)。检测凋亡相关蛋白 (图 5B) 进一步证实 miR-145-5p inhibitor 减轻 OGD/R 诱导的 HT22 凋亡,FGF5 siRNA 增加 OGD/R 诱导的 HT22 凋亡。

2.6 miR-145-5p inhibitor 减轻 OGD/R 诱导的氧化应激损伤 转染 FGF5 siRNA 和/或 miR-145-5p inhibitor 的 HT22 细胞进行 OGD/R 24 h 处理。检测细胞氧化应激损伤情况如图 6 所示:miR-145-5p inhibitor 减轻 OGD/R 诱导的氧化应激损伤。与 OGD/R 处理组相比,miR-145-5p inhibitor 明显降低 OGD/R 诱导的细胞外 LDH 含量、ROS 含量和 MDA 含量,FGF5 siRNA 明显增加细胞外 LDH 含量、ROS 含量和 MDA 含量,差异有统计学意义 ($F = 13.97$, $P < 0.001$; $F = 42.79$, $P < 0.001$; $F = 62.86$,

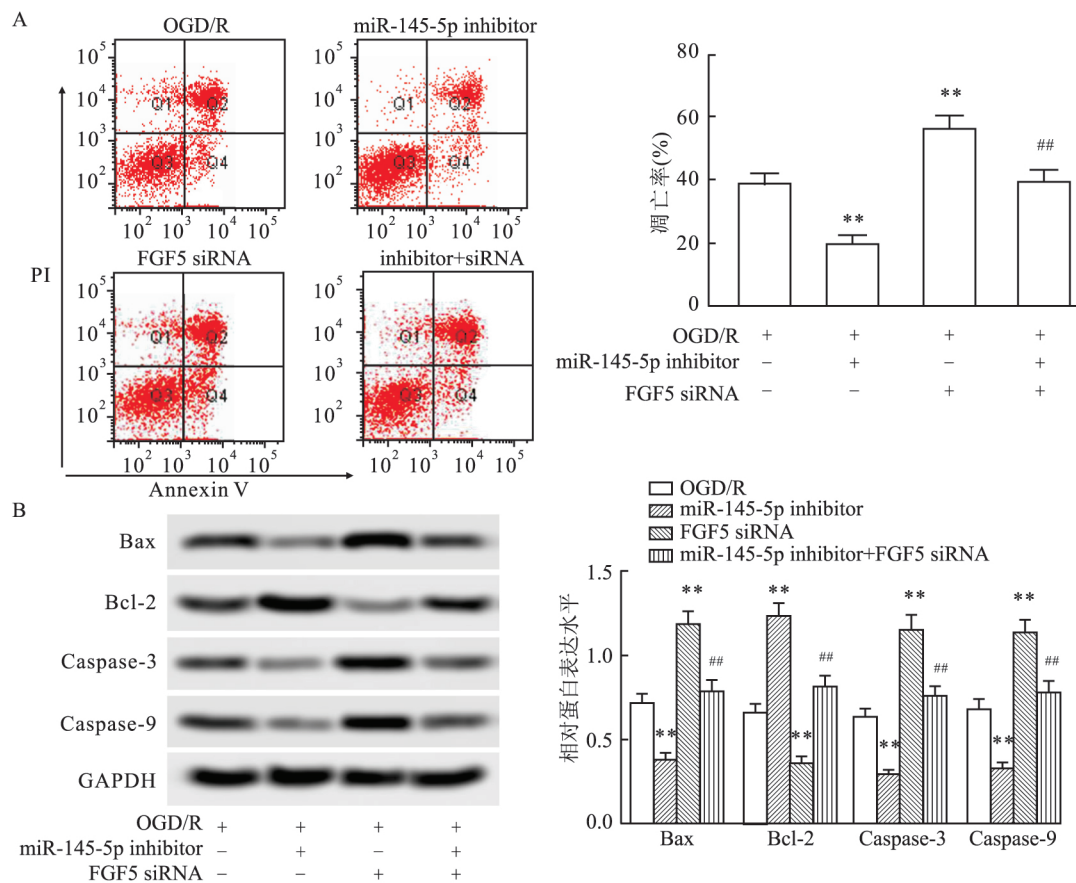


图5 miR-145-5p inhibitor 减轻 OGD/R 诱导的 HT22 凋亡

A: 流式检测细胞凋亡; B: Western blot 检测凋亡相关蛋白表达; 与 OGD/R 比较: ** $P < 0.01$; 与 OGD/R + FGF5 siRNA 比较: ## $P < 0.01$

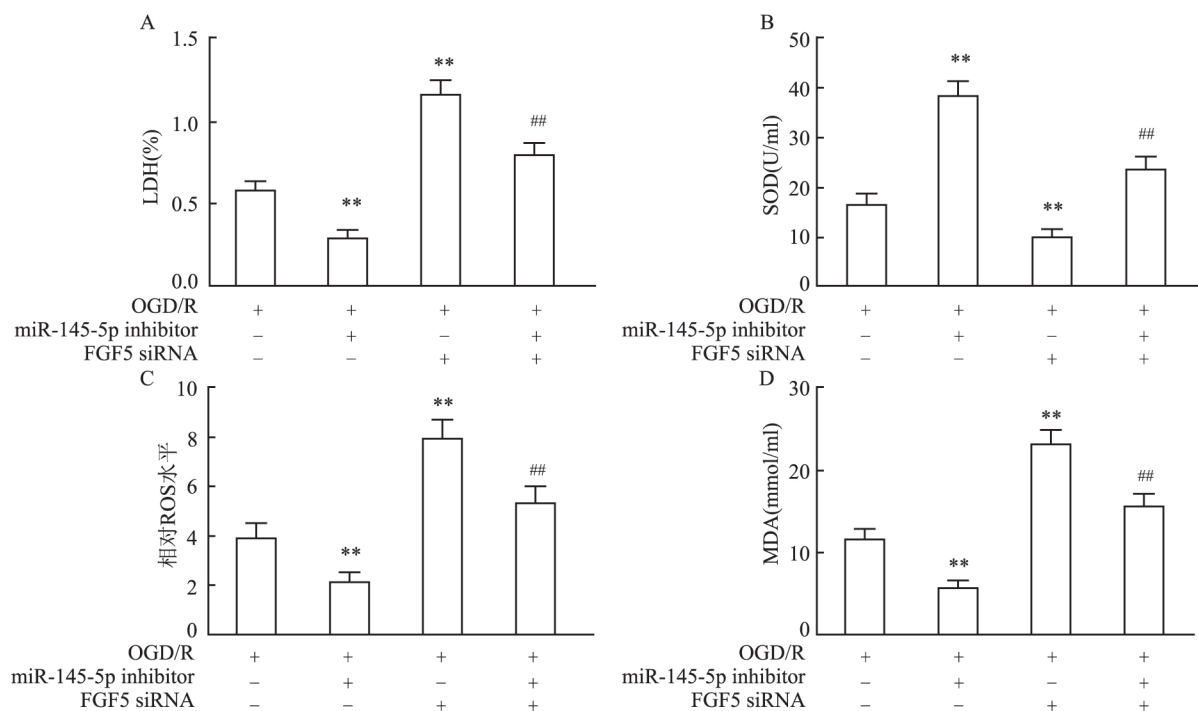


图6 miR-145-5p inhibitor 减轻 OGD/R 诱导的氧化应激损伤

A: LDH 含量; B: SOD 含量; C: ROS 含量; D: MDA 含量; 与 OGD/R 比较: ** $P < 0.01$; 与 OGD/R + FGF5 siRNA 比较: ## $P < 0.01$

$P < 0.001$); 相反, miR-145-5p inhibitor 明显增加 OGD/R 诱导的 SOD 含量, FGF5 siRNA 明显减少 OGD/R 诱导的 SOD 含量 ($F = 103.55$, $P < 0.001$); 共转染相互抵消诱导 (FGF5 siRNA) 或抑制氧化应激损伤 (miR-145-5p inhibitor) 的能力。

3 讨论

I/R 损伤是休克、中风或手术麻醉引起的严重的副反应^[7]。I/R 损伤除了导致组织损伤和功能障碍之外, 还引起多种生物学变化, 包括兴奋性毒性、细胞凋亡、钙超载和神经炎症^[8]。尽管许多研究者致力于 I/R 的改善, 但脑 I/R 损伤的复杂病理机制在很大程度上是未知的, 因此严重阻碍临床有效治疗的发展。因此, 寻求潜在、有前景的干预目标对开发治疗脑 I/R 损伤的有效治疗方案至关重要。根据前人研究结果, miR-145-5p 有许多功能。例如, miR-145-5p 靶向骨保素, 加剧了由胶原诱发的关节炎的骨质流失^[9]; 下调 miR-145-5p 增强了人类卵母细胞的成熟细胞活力^[10]; 相反, 基于它的损伤细胞的作用, 在所种癌症中 miR-145-5p 其抗癌作用, 包括抑制癌细胞增殖、转移, 促进凋亡等^[11]。基于上述研究, miR-145-5p 可能在神经元细胞中起破坏作用。本文研究表明, 在 OGD/R 诱导的脑 I/R 细胞模型中, miR-145-5p 表达增强, 且与处理时间呈正相关。本研究多组证据表明, miR-145-5p inhibitor 可以抑制 OGD/R 诱导的 HT22 细胞凋亡和氧化应激损伤。

FGF5 是纤维母细胞生长因子 (FGF) 家族的成员。FGF5 基因与头发生长表型连锁^[12]。最近研究发现, FGF5 作为 MiR-188-5p 的靶点, 在肝癌中起致癌作用^[13]。FGF5 参与血压、肝纤维化的调控^[14]。此外, FGF5 被报道具有促进人类扁桃体源性间充质干细胞增殖的作用^[15]。与上述研究结果一致, 本文研究结果表明在 OGD/R 诱导的 HT22 中, FGF5 表达减少。同时本文证明了 FGF5 是 miR-145-5p 的下游靶点。miR-145-5p 通过抑制 FGF5 表达从而增加 OGD/R 环境下 HT22 细胞的凋亡和损伤。这一结论可以被 miR-145-5p inhibitor 和 FGF5 siRNA 的反作用证明。miR-145-5p inhibitor 转染 HT22 细胞后, FGF5 蛋白表达增加, 细胞凋亡和氧化应激损伤得到改善。而 FGF5 siRNA 转染 HT22 细胞后, 结果完全相反。进一步说明 miR-145-5p 靶向 FGF5 调节 I/R 损伤诱导的细胞凋亡和氧化应激损伤。

本研究显示, miR-145-5p 诱导细胞凋亡和氧化应激损伤是通过直接靶向结合 FGF5 基因, miR-145-5p 直接绑定到 3' UTR 区域。在 OGD/R 体外细胞

I/R 模型中, 增加 FGF5 表达 (miR-145-5p inhibitor) 可减少细胞凋亡和氧化应激损伤, 而共同转染 FGF5 siRNA 可回救减少的细胞凋亡和氧化应激损伤。结果表明, FGF5 是 miR-145-5p 调控的关键分子。本文研究结果证实, miR-145-5p 可能是 I/R 治疗的靶点, 增加 FGF5 表达可能是有效的治疗策略。

参考文献

- [1] Li F, Shi W, Zhao E Y, et al. Enhanced apoptosis from early physical exercise rehabilitation following ischemic stroke [J]. *J Neurosci Res*, 2017, 95(4): 1017–24.
- [2] Zhai W W, Sun L, Yu Z Q, et al. Hyperbaric oxygen therapy in experimental and clinical stroke [J]. *Med Gas Res*, 2016, 6(2): 111–8.
- [3] Fluri F, Schuhmann M K, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 3445–54.
- [4] Di Y, Lei Y, Yu F, et al. Micromas expression and function in cerebral ischemia reperfusion injury [J]. *J Mol Neurosci*, 2014, 53(2): 242–50.
- [5] Qi X, Shao M, Sun H, et al. Long non-coding rna snhg14 promotes microglia activation by regulating mir-145-5p/pla2g4a in cerebral infarction [J]. *Neuroscience*, 2017, 348: 98–106.
- [6] Xu B, Ji X, Chen X, et al. Effect of perfluorooctane sulfonate on pluripotency and differentiation factors in mouse embryoid bodies [J]. *Toxicology*, 2015, 328: 160–7.
- [7] Donnan G A, Fisher M, Macleod M, et al. Stroke [J]. *Lancet (London, England)*, 2008, 371(9624): 1612–23.
- [8] Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons [J]. *Physiol Rev*, 1999, 79(4): 1431–568.
- [9] Chen Y, Wang X, Yang M, et al. Mir-145-5p increases osteoclast numbers in vitro and aggravates bone erosion in collagen-induced arthritis by targeting osteoprotegerin [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 5292–300.
- [10] Cui L, Fang L, Mao X, et al. Gdnf-induced downregulation of mir-145-5p enhances human oocyte maturation and cumulus cell viability [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103(7): 2510–21.
- [11] Chang Y, Yan W, Sun C, et al. Mir-145-5p inhibits epithelial-mesenchymal transition via the jnk signaling pathway by targeting map3k1 in non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 6923–8.
- [12] Kehler J S, David V A, Schaffer A A, et al. Four independent mutations in the feline fibroblast growth factor 5 gene determine the long-haired phenotype in domestic cats [J]. *J Hered*, 2007, 98(6): 555–66.
- [13] Fang F, Chang R M, Yu L, et al. Microma-188-5p suppresses tumor cell proliferation and metastasis by directly targeting fgf5 in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2015, 63(4): 874–85.
- [14] Hanaka H, Hamada T, Ito M, et al. Fibroblast growth factor-5 participates in the progression of hepatic fibrosis [J]. *Exp Anim*, 2014, 63(1): 85–92.
- [15] Park G C, Song J S, Park H Y, et al. Role of fibroblast growth factor-5 on the proliferation of human tonsil-derived mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(15): 1149–60.

网络出版时间: 2019-5-30 10:50 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190527.1648.006.html>

淫羊藿苷对 MC3T3-E1 细胞增殖分化的影响及机制研究

安 庆^{1,2}, 刘国雄¹, Bikash Kumar Sah¹, 周 霖¹, 虞 伟¹, 曹 洪¹

摘要 目的 研究淫羊藿苷(ICA)对小鼠颅顶前成骨细胞(MC3T3-E1)增殖、分化的影响,以及骨形态发生蛋白2(BMP-2)/Smads信号通路在成骨细胞增殖、分化中的作用。方法 用含不同浓度ICA(0、10、20、40 ng/ml)的完全培养液分别培养MC3T3-E1细胞48、72、96 h。HE染色法观察ICA对MC3T3-E1细胞形态的影响;分别用CCK-8及碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒检测ICA对MC3T3-E1细胞增殖活性和细胞ALP活性的影响;Western blot检测ICA对MC3T3-E1细胞BMP-2、骨形态发生蛋白2受体(BMPR-2)、Smad4和Smad1/5/8蛋白表达水平的影响。向细胞培养液中加入BMP抑制剂头蛋白(Noggin, 100 ng/ml)阻断BMP-2/Smads信号通路后,再次检测上述各实验指标的变化。结果 ICA

对MC3T3-E1细胞形态无明显影响;ICA(10、20 ng/ml)可增强MC3T3-E1细胞增殖活性(P 均 <0.01)。ICA(10、20 ng/ml)可增强MC3T3-E1细胞ALP活性(P 均 <0.01)。阻断BMP-2/Smads信号通路后,ICA促细胞增殖作用($P<0.01$)及促分化作用($P<0.01$)明显下降。ICA(10、20 ng/ml)可提高MC3T3-E1细胞BMP-2、BMPR-2、Smad4和Smad1/5/8蛋白表达水平(P 均 <0.01)。当阻断BMP-2/Smads信号通路后,ICA促BMP-2、BMPR-2、Smad4和Smad1/5/8蛋白表达作用均受到抑制。结论 ICA对MC3T3-E1细胞形态无明显影响,ICA可能是通过上调MC3T3-E1前体成骨细胞BMP-2蛋白的表达,激活BMP-2/Smads信号通路,启动下游成骨相关基因的表达,从而促进细胞的增殖、分化。

关键词 淫羊藿苷; 成骨细胞; BMP-2; Smads

中图分类号 R 336

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)06-0893-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.012

2019-03-05 接收

基金项目 国家自然科学基金(编号:81602867);湖北省自然科学基金面上项目(编号:2018CFB524);湖北省教育厅科学研究计划指导性项目(编号:B2018110)

作者单位: ¹湖北医药学院附属人民医院(十堰市人民医院)创伤骨科,十堰 442000

²利辛县人民医院骨科,利辛 236700

作者简介: 安 庆,男,硕士研究生;

曹 洪,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: 33556511@qq.com

淫羊藿苷(icariin, ICA)分子式: $C_{33}H_{40}O_{15}$, 分子量: 676, 是抗骨质疏松中药淫羊藿的有效成分之一^[1]。研究^[2]表明,ICA可促进骨形成、抑制骨吸收,提高骨密度及影响骨代谢指标,具有明显的抗骨质疏松作用。然而,对其作用机制及分子机制方面

Regulatory effect of miR-145-5p targeting FGF5 on apoptosis and oxidative stress induced by ischemia/reperfusion injury

Yan Haiqing, Yue Xuejing, Gui Yongkun, et al

(Dept of Neurology, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University,
Henan Key Laboratory of Neural Regeneration, Xinxiang 453100)

Abstract **Objective** To investigate the regulatory effects of miR-145-5p on *in vitro* ischemia/reperfusion (I/R) injury of neurons and to explore their mechanisms. **Methods** The cell I/R injury model was established by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R). The target relationship between miR-145-5p and FGF5 was verified by luciferase reporting experiment. The effects of miR-145-5p on apoptosis and oxidative stress in neuronal cell HT22 were detected by RT-PCR, flow cytometry and western blot. **Results** The results showed that the apoptosis rate and oxidative stress injury were significantly increased in the OGD/R treatment for 6 h, 12 h, and 24 h compared with the group without OGD/R treatment (Normoxia). In OGD/R model, miR-145-5p inhibitor transfection reduced apoptosis and oxidative stress of HT22 cells. However, FGF5 siRNA transfected cells reversed this effect. In the process of brain I/R injury simulated by OGD/R, miR-145-5p promoted apoptosis and injury of neuronal cells by targeting FGF5. **Conclusion** This study provides a new therapeutic target for the treatment of ischemic stroke. **Key words** miR-145-5p; FGF5; ischemia/reperfusion injury; OGD/R model