

网络出版时间: 2017-7-29 12:01 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170729.1200.015.html>

miR-210 促进小鼠 BMMSCs 血管内皮生长因子的表达和分泌

孙世林^{1,2}, 周咏^{1,2}, 张雷^{1,2}, 李岩³, 张凯⁴, 何家才^{1,2}, 邹多宏^{1,2}, 王元银^{1,2}

摘要 目的 通过体内与体外的手段验证 miR-210 能够有效的促进骨髓间充质干细胞(BMMSCs)血管内皮生长因子(VEGF)的表达和分泌。方法 构建慢病毒载体,分别转染 BMMSCs 和人脐静脉内皮细胞(HUVEC),Lenti-miR-210/BMMSCs 和 Lenti-LacZ/BMMSCs 培养第 7 天 RT-PCR 法检测 VEGF 表达,第 14 天 Western blot 法检测 VEGF 表达,PKH26 荧光染色 Lenti-miR-210/HUVEC 和 Lenti-LacZ/HUVEC,Matrigel 成管实验 24 h,荧光显微镜观察成管效果; agomir-210 和 agomir-NC 分别与 BMMSCs 复合 HyStem-HP 凝胶缓释系统裸鼠皮下注射 7 d 后取标本 CD31 免疫荧光染色。结果 miR-210 慢病毒载体转染 BMMSCs,第 7 天 RT-PCR 和第 14 天 Western blot 法检测 VEGF 表达,明显高于 Lenti-LacZ/BMMSCs($P < 0.05$); Matrigel 成管实验 24 h 结果显示: Lenti-miR-210/HUVEC 组与 Lenti-LacZ/HUVEC 组相比,端端接触明显且管状结构完整; agomir-210 和 agomir-NC 与 BMMSCs 复合 HyStem-HP 凝胶缓释系统裸鼠皮下注射 7 d 后标本 CD31 免疫荧光染色结果: agomir-210 组 CD31 阳性细胞含量明显高于 agomir-NC 组。结论 通过体内与体外的检测,miR-210 过表达能够有效促进 BMMSCs 血管内皮生长因子的表达和分泌。

关键词 miR-210; BMMSCs; 血管内皮生长因子; 基因转染; HyStem-HP 水凝胶

中图分类号 Q 7; R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1485-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.015

2017-05-03 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31370983); 安徽省杰出青年自然科学基金(编号: 1508085J08); 安徽省高校省级自然科学基金项目(编号: KJ2013Z204); 安徽省科技攻关计划项目(编号: 1401045013、1604a0802082); 高校优秀青年人才支持计划重点项目(编号: gxyqZD2016058)

作者单位: ¹安徽医科大学口腔医学院,合肥 230032

²安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究省级重点实验室,合肥 230032

³第四军医大学口腔医学院,西安 710000

⁴蚌埠医学院附属第一人民医院口腔科,蚌埠 230000

作者简介: 孙世林,男,硕士研究生;

邹多宏,男,教授,硕士生导师,责任作者; E-mail: zouduo-hongyy@163.com;

王元银,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者; E-mail: wyy1970548@sohu.com

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类小分子非编码 RNA,通常约 20~22 个核苷酸组成,可通过与靶基因 mRNA 的完全或不完全结合,通过转录后调控的方式调节蛋白分子的表达^[1]。miRNA 在心血管系统丰富,对于血管的发展、监管和再生起着至关重要的作用^[2],其中低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor, HIF-1 α) 是 miR-210 的下游靶基因,研究^[3]显示上调血管内皮细胞 miR-210 的表达可以激活血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 促进血管新生。但是,单独使用 VEGF 由于打破了组织再生过程中正负向的平衡,可能会引起高血压、组织微渗漏的并发症。而 miRNA 可以通过内源性调节的方式,在保证正负向平衡的基础上促进血管生长。该实验拟通过体内与体外的手段验证 miR-210 促进 VEGF 的表达和分泌。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 实验动物 6~8 周龄 C57B/L6 雄性小鼠,安徽医科大学动物实验中心提供。4 周龄雄性 BALB/c 裸鼠 12 只,约 15 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,饲养于中国科学技术大学实验动物中心 SPF 级实验室;人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 由中国科学技术大学生命科学院提供。

1.1.2 主要试剂和仪器 DMEM (美国 Gibco 公司); 胰酶、Tween-20、TRIzol、PKH26 红色荧光试剂盒 (美国 Sigma 公司); 胎牛血清 (杭州天杭生物科技股份有限公司); 链霉素和青霉素 (华北制药厂); 培养皿、离心管、6 孔板 (美国 TureLine 公司); CO₂ 恒温培养箱 (美国 Thermo 公司); PBS 缓冲液 (武汉博士德生物工程有限公司); Countstar 自动细胞计数仪 (北京博雅创新科技发展有限公司); BT25S 电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); HVE-50 高压蒸汽灭菌锅 (日本 HIRAYAMA 公司); 超净工作台 (苏州净化公司); DMI3000B 倒置荧光显微镜、激光共聚焦显微镜 Leica TCS SP5 (德国 Leica 公司); Ma-

trigel(美国 BD Biosciences 公司); agomir-210(广东瑞博公司); HyStem-HP 水凝胶(美国 Glycosan Biosystems 公司); PVDF 膜(美国 Millipore 公司); 蛋白裂解液(上海碧云天生物科技公司); 电泳仪、湿转仪(美国 BIO-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)分离及培养 脱颈处死小鼠,浸泡于 75% 酒精约 5 min,超净台获取小鼠股骨,仔细剔除表面肌肉及筋膜,剪除两端关节后,使用带 3 号针头的 5 ml 注射器,吸取培养基,自长骨一端插入骨髓腔,将小鼠骨髓冲洗进 10 cm 培养皿内。置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养,7 d 后第一次换液,洗去非贴壁细胞,培养至 80% ~ 90% 融合时,胰蛋白酶消化传代扩增,至 3 ~ 5 代待用。

1.2.2 慢病毒载体构建及目的基因转染 取对数生长期第 3 代 BMSCs,于慢病毒转染前 1 天,按 1 × 10⁵ 个/ml 细胞密度消化接种于 6 孔板,实验分为 Lenti-miR-210/BMSCs 和 Lenti-LacZ /BMSCs 两组。按测定的最佳感染复数值,分别添加慢病毒液,于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养。按同样方法转染 HUVEC 培养待用。

1.2.3 RT-PCR 和 Western blot 法检测 VEGF 的表达 取对数生长期生长状态良好的第 3 代 BMSCs 按照 1 × 10⁵ 个/ml 细胞密度消化接种于 6 孔板中,病毒转染同上,于转染后 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养至第 7 天,采用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,按程序进行 PCR 扩增,按 SYBR premix Ex Taq (日本 TaKaRa 公司)试剂说明进行 RT-PCR 检测。检测的引物序列见表 1。

表 1 检测的引物序列

基因	引物序列(5'-3')
VEGF	F: TCACGAAGTGGTGAAGTTCAT R: GGTGATGTTGGACTCCTCAGT
GAPDH	F: AATGGAATCCCATCACCATC R: AGGCTGTTGCATACACTCTCA

取对数生长期生长状态良好的第 3 代 BMSCs 按照 1 × 10⁵ 个/ml 细胞密度消化接种于 6 孔板中,病毒转染同上,于转染后 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养至第 14 天,使用 RIPA 蛋白裂解液提取蛋白;按 BCA 法测定样本蛋白浓度;以 20 μg 的蛋白量上样。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳,PVDF 膜转膜后,按抗体使用说明稀释,孵育一抗、二抗,洗涤后

使用 ECL 试剂盒发光、显影。以下是使用的一抗种类和稀释比例: β-actin、VEGF(美国 Santa Cruz 公司,1 : 500)。

1.2.4 体外 Matrigel 成管实验 提前将 Matrigel 放置于 4 °C 冰箱过夜,使胶能缓慢融化,实验前将消毒好的枪头、96 孔板、培养液等于 4 °C 环境下预冷;取出 Matrigel,在无菌操作台上放置于冰上,按每孔吸取 10 μl 加入 96 孔板中,放置于 37 °C 培养静置 30 min,使铺于皿底的 Matrigel 充分凝固,将 1.2.2 中转染目的基因 miR-210 的 HUVEC 分别消化,单细胞悬液按 PKH26 红色荧光试剂盒说明进行染色,染色后按每孔 1 × 10⁴ 个细胞接种;37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养,培养 24 h 后荧光显微镜观察两组分别成管效果。

1.2.5 裸鼠皮下 miR-210 缓释凝胶系统血管形成实验 根据说明配制 miRNA 持续缓释系统,这个缓释系统由 HyStem-HP 水凝胶、BMSCs 和 agomir-210 组成;该缓释系统是 20 ml 50 nmol/L 的 agomir-210 与 4 × 10⁶ BMSCs 轻轻混合 250 ml HyStem-HP 水凝胶而成。所使用的 HyStem-HP 水凝胶是严格按照说明要求配制,按 2 : 2 : 1 的比例添加巯基改性透明质酸、巯基修饰的肝素、巯基改性明胶,再与硫醇反应的交联剂聚乙二醇交联而成。

使用 1 ml 注射器吸取混悬液 250 μl,注入裸鼠背部皮下,旋转针头拔出,混悬液缓慢成胶,SPF 条件下饲养 1 周,CO₂ 处死,取标本进行 10% 甲醛固定,脱水后石蜡包埋,切片(4 μm)后行切片 CD31 免疫荧光染色。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析,RT-PCR 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异的比较使用独立样本 *t* 检验,检验水准为 α = 0.05。

2 结果

2.1 小鼠 BMSCs 分离及培养 全骨髓液培养后 5 ~ 7 d,镜下除红细胞外,可见部分细胞呈梭形或多角形,散在分布;7 d 后换液,洗净非贴壁细胞,见原代 BMSCs 生长速度加快,出现细胞集落形成,约 10 ~ 14 d 可长满,细胞多以梭形为主,随着传代培养,细胞贴壁,可呈旋涡状生长,少许悬浮细胞换液后消失,细胞生长状态良好,细胞形态随传代培养逐渐趋于一致(图 1)。

2.2 RT-PCR 和 Western blot 法检测 VEGF 的表达结果 通过构建慢病毒载体,miR-210 转染 BMSCs 后 7 d RT-PCR 结果显示,Lenti-miR-210/

BMMSCs 组、Lenti-LacZ/BMMSCs 组 VEGF 相对表达水平为 (2.29 ± 0.23) 、 (1.00 ± 0.11) ，Lenti-miR-210/BMMSCs 组 VEGF 相对表达水平显著高于 Lenti-LacZ/BMMSCs 组，差异有统计学意义 ($t = -8.76$, $P < 0.01$, 图 2A)。miR-210 转染 BMMSCs 后 14 d Western blot 检测 VEGF 的表达结果显示，Lenti-miR-210/BMMSCs 组 VEGF 表达明显高于 Lenti-LacZ/BMMSCs 组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2B)。

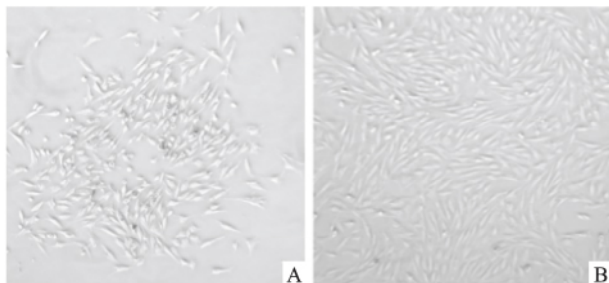


图 1 BMMSC 体外培养 $\times 100$

A: P₀ 代细胞呈集落状生长; B: P₂ 代细胞形态逐渐一致

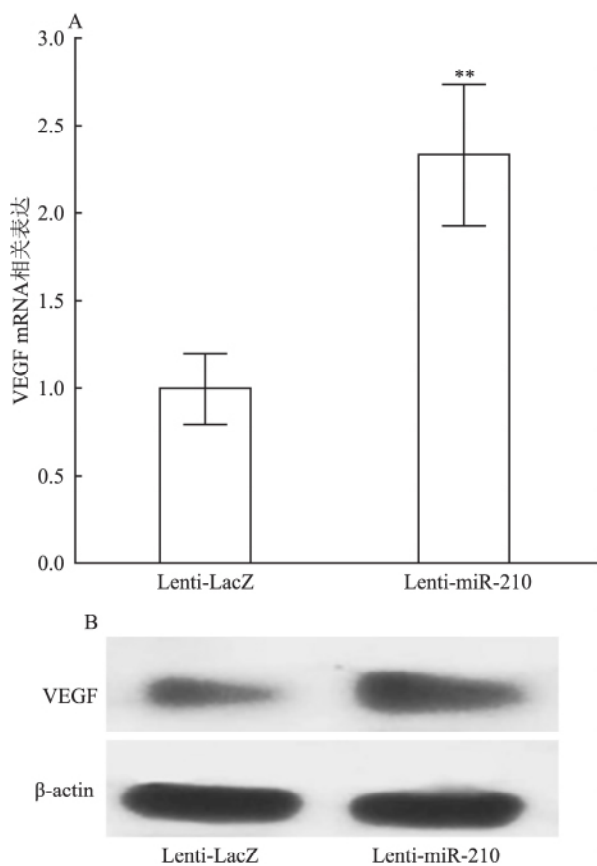


图 2 RT-PCR 和 Western blot 法检测 VEGF 的表达

A: RT-PCR 法检测 Lenti-LacZ/BMMSCs 组和 Lenti-miR-210/BMMSCs 组 VEGF 表达; B: Western blot 法检测 Lenti-LacZ/BMMSCs 组和 Lenti-miR-210/BMMSCs 组 VEGF 蛋白的表达; 与 Lenti-LacZ/BMMSCs 组比较: ** $P < 0.01$

2.3 体外 Matrigel 成管实验结果 体外 Matrigel 实验 24 h 后, 荧光显微镜下观察两组分别成管效果, 可见 Lenti-miR-210/HUVEC 组有明显的环形管状结构, 端端接触明显, 管壁形态完整, 而 Lenti-LacZ/HUVEC 组端端接触和管状结构少于 Lenti-miR-210/HUVEC 组, 管状结构不完整。比较两组间小管长度表明, miR-210 促进管腔形成(图 3)。

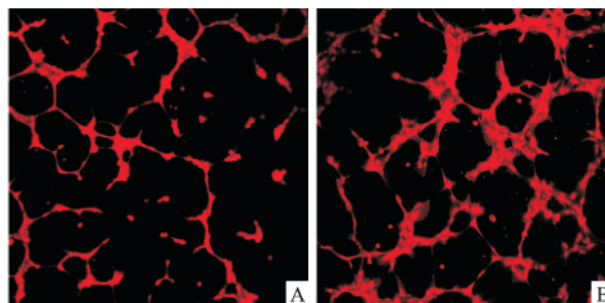


图 3 Matrigel 血管形成实验 PKH26 红色荧光细胞染色 $\times 200$

A: Lenti-LacZ/HUVEC; B: Lenti-miR-210/HUVEC

2.4 裸鼠皮下 miR-210 缓释凝胶系统血管形成实验结果 标本切片进行 CD31 免疫荧光染色, 激光共聚焦 CD31 阳性细胞 (红色) 细胞核 DAPI 染色 (蓝色) 在 agomir-210/BMMSCs 组中 CD31 阳性细胞含量明显高于 agomir-NC/BMMSCs 组, 说明 miR-210 在 HyStem-HP 水凝胶缓释系统中能够促进 BMMSCs 内皮向分化, 有效促进体内微血管的形成(图 4)。

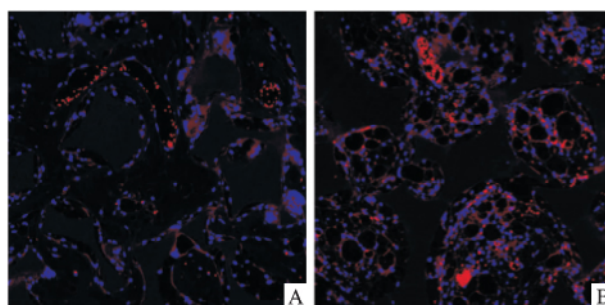


图 4 裸鼠皮下标本 CD31 免疫荧光染色 $\times 200$

红色表示 CD31 阳性细胞; 蓝色表示细胞核 DAPI 染色; A: agomir-NC/BMMSCs; B: agomir-210/BMMSCs

3 讨论

目前自体骨移植被认为是临床修复骨缺损的金标准^[4]。但自体骨移植存在来源有限、二次手术创伤和疼痛等缺点。而异体骨移植的疾病传播的风险和免疫反应的发生同样减少了其临床应用潜能。寻找一种比自体骨移植和异体骨移植更理想的修复骨缺损的方法, 骨组织工程学应运而生。研究^[5]证实, 支架材料周围组织的血管浸润至支架材料的深

度仅为 100 ~ 200 μm ,从而导致支架材料内部营养供应不足 种子细胞无法生存 抑制新骨形成和延误骨愈合。BMMSCs 是具有多向分化潜能的成体干细胞 ,易体外扩增且能定向诱导分化为很多终末分化的细胞 ,如成骨细胞、神经细胞、脂肪细胞、心肌细胞等^[6-8] ,因此常作为种子细胞进行组织工程研究 ,并取得了一定成果。但在体内移植前除了充分考虑种子细胞的类型 ,支架材料氧和营养物质的交换速率 ,缺损的大小 ,还要充分考虑支架材料的预血管化问题 ,血管生长的速度和范围往往决定了新骨形成的效率和效果。

2015 年 Okamoto et al^[9] 利用 miR-210 转染正常子宫内膜间质细胞 ,刺激 STAT3 表达 ,诱导血管内皮生长因子的产生。此外研究^[10] 表明 ,miR-210 过表达 ,可通过抑制转化生长因子-β/激活素信号传导通路促进成骨细胞的分化。王默涵等^[11] 利用 miR-210 诱导犬 BMSCs 体外成血管及成骨向分化的实验也证实 miR-210 是具有双重调控作用的基因 ,不仅可以调控血管的形成 ,而且还具有促进骨再生的作用。本实验通过体外构建慢病毒载体 ,miR-210 目的基因转染小鼠 BMMSCs 后 ,体外培养 7 d ,RT-PCR 检测两组 VEGF 表达结果表明目的基因 miR-210 过表达 ,可有效促进 VEGF 的表达 ,Western blot 结果与 RT-PCR 结果一致 ,且 Matrigel 血管形成实验结果同样验证了 miR-210 过表达具有促血管形成效果。

为了进一步研究 miR-210 在体内对血管生成的影响 ,本研究构建了 agomiR-210 的凝胶缓释体系 ,这个体系由水凝胶、agomiR-210 与 BMMSCs 构成 ,HyStem-HP 水凝胶具有良好的生物相容性和降解率 ,其大孔径也为种子细胞的氧气及营养物质的供给和废弃物的排出提供了通道 ,作为载体支架材料可用于外周动脉缺血性疾病及骨组织工程血管化基因治疗的有效载体。CD31 免疫荧光染色结果 agomir-210/BMMSCs 凝胶组 CD31 阳性率明显高于

agomir-NC/BMMSCs 凝胶组 ,表明 miR-210 在 HyStem-HP 水凝胶中能够有效地促进 BMMSCs 内皮向分化 ,促进微血管形成 ,便于支架材料内快速形成血管网络并与周围宿主脉管系统进行有效的整合。此外 ,因为 miR-210 是具有双重调控作用的基因 ,不仅可以调控血管的形成 ,而且还具有促进骨再生的作用 ,下一步本研究将进行目的基因 miR-210 修复骨组织缺损的相关体内研究。

参考文献

- [1] Kozomara A , Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data [J]. *Nucleic Acids Res* , 2011 , 39(Database issue) : D152 - 7.
- [2] Caporali A , Emanuelli C. MicroRNA regulation in angiogenesis [J]. *Vascul Pharmacol* , 2011 , 55(4) : 79 - 86.
- [3] Potente M , Gerhardt H , Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis [J]. *Cell* , 2011 , 146(6) : 873 - 87.
- [4] Tolstunov L , Chi J. Alveolar ridge augmentation: comparison of two socket graft materials in implant cases [J]. *Compend Contin Educ Dent* , 2011 , 32(2) : e16 - 24.
- [5] Lovett M , Lee K , Edwards A , et al. Vascularization strategies for tissue engineering [J]. *Tissue Eng Part B Rev* , 2009 , 15(3) : 353 - 70.
- [6] Wang C , Meng H , Wang X , et al. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in osteoblasts and adipocytes and its role in treatment of osteoporosis [J]. *Med Sci Monit* 2016 22: 226 - 33.
- [7] Li Y , Ramcharan M , Zhou Z , et al. The role of scleraxis in fate determination of mesenchymal stem cells for tenocyte differentiation [J]. *Sci Rep* 2015 5: 13149.
- [8] Kisiel A H , McDuffee L A , Masoud E , et al. Isolation , characterization , and *in vitro* proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow , adipose tissue , muscle , and periosteum [J]. *Am J Vet Res* 2002 73(8) : 1305 - 17.
- [9] Okamoto M , Nasu K , Abe W , et al. Enhanced miR-210 expression promotes the pathogenesis of endometriosis through activation of signal transducer and activator of transcription 3 [J]. *Hum Reprod* 2015 30(3) : 632 - 41.
- [10] Mizuno Y , Tokuzawa Y , Ninomiya Y , et al. miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b [J]. *FEBS Lett* 2009 583(13) : 2263 - 8.
- [11] 王默涵 , 邹多宏 , 周咏 , 等. miR-210 诱导犬 BMSCs 成血管及成骨向分化的体外实验研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2016 , 51(9) : 1258 - 62.

miR-210 promotes the expression and secretion of vascular endothelial growth factor in mouse BMMSCs

Sun Shilin^{1,2} , Zhou Yong^{1,2} , Zhang Lei^{1,2} , et al

(¹ College of Stomatology , Anhui Medical University , Hefei 230032; ² The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University , Key Lab of Oral Diseases Research of Anhui Province , Hefei 230032)

Abstract Objective To verify miR-210 effectively promoting the expression and secretion of vascular endothelial (下转第 1494 页)

ERK1/2 signaling pathway mediates PDGF-CC-induced rat cardiac fibrosis and its mechanism

Wang Hanzhang, Ma Likun, Wang Lei et al

(Dept of Cardiology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the role and mechanism of ERK1/2 pathway in PDGF-CC-induced cardiac fibrosis in rats. **Methods** The cardiac fibroblasts were isolated and purified from cardiac tissues of SD neonatal rats by differential time attachment, then divided into 3 groups randomly: control group (CON), PDGF-CC group (P) and group of PDGF-CC + ERK1/2 inhibitor U0126 (PU). MTT assay was used to detect the proliferation of cardiac fibroblasts. The mRNA expression levels were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). The protein expressions were detected by Western blot. **Results** MTT showed that the number of cells in P group was significantly higher than that in CON group ($P < 0.01$), while the number of cells in PU group was significantly lower than that in P group ($P < 0.01$). qRT-PCR showed that the mRNA expressions of PDGFR- α (PDGF receptor- α), ERK1, ERK2, collagen type I and type III (Col I, Col III) were significantly higher than CON group ($P < 0.001$), PDGFR- β mRNA expression showed no significant difference between P and CON group, and that PDGFR- α , ERK1, ERK2, Col I and Col III in PU group was markedly reduced as compared to P group ($P < 0.01$). Western blot showed that the protein expressions of phosphorylated PDGFR- α (p-PDGFR- α), ERK1/2, p-ERK1/2, Col I and Col III were significantly higher than that in CON group ($P < 0.001$), and those expressions were significantly decreased in the PU group compared with P group ($P < 0.001$). **Conclusion** PDGF-CC may activate the ERK1/2 signaling pathway by binding to PDGFR- α , leads to excessive proliferation of rat cardiac fibroblasts with collagen synthesis and participate in the development of myocardial fibrosis.

Key words cardiac fibrosis; cardiac fibroblasts; platelet-derived growth factor; extracellular signal-regulated MAP kinases

(上接第 1488 页)

growth factor in BMMSCs by means of *in vivo* and *in vitro*. **Methods** To construct the lentiviral vector, we respectively transfected BMMSCs and HUVEC and cultured Lenti-miR-210/BMMSCs and Lenti-LacZ/BMMSCs. The expression of VEGF was detected by RT-PCR on day 7 and Western blot on day 14. After fluorescent stained by PKH26 red kit, Lenti-miR-210/HUVEC and Lenti-LacZ/HUVEC were cultured on matrigel for 24 h, then observed by fluorescence microscope. Two hydrogel systems (agomir-210, BMMSCs, and HyStem-HP; agomir-NC, BMMSCs, and HyStem-HP) were injected subcutaneously into nude mice. On the seventh day, the nude mice were killed and the sample was immunofluorescence stained by CD31. **Results** The expression of VEGF in Lenti-miR-210/BMMSCs group detected by RT-PCR on day 7 and Western blot on day 14 was much higher than that of the control group ($P < 0.05$). After cultured in matrigel for 24 h, cells on Lenti-miR-210/HUVEC group developed much more vessel-like structures and junction size than those on Lenti-LacZ/HUVEC group. And CD31 positive cells in agomir-210 group were significantly higher than that of agomir-NC group by immunofluorescence stain. **Conclusion** Through *in vivo* and *in vitro* detection, miR-210 overexpression could effectively promote the expression and secretion of vascular endothelial growth factor BMMSCs.

Key words miR-210; bone marrow mesenchymal stem cells; vascular endothelial growth factor; gene transfection; HyStem-HP hydrogel