

# 微小 RNA-21 对人脐血间充质干细胞增殖和转化生长因子- $\beta$ 1 表达的影响

王晓培, 王兴兵, 程家凤, 郑茜茜, 鲁雪, 张薇薇

**摘要** 目的 探讨微小 RNA-21 (miR-21) 对人脐血间充质干细胞 (MSC) 增殖和转化生长因子 (TGF)  $\beta$ 1 表达的影响。方法 体外分离并培养人脐血 MSC, 用 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染 miR-21 模拟物 (60  $\mu$ mol/L)、miR-21 抑制剂 (60  $\mu$ mol/L) 和 miR-21 阴性对照 (60  $\mu$ mol/L), 空白对照组不做任何处理, MTT 法分析对细胞增殖的影响; qRT-PCR 和 Western blot 检测 TGF- $\beta$ 1 的表达。结果 与空白对照组和阴性对照组相比, miR-21 过表达明显抑制 MSC 增殖, 沉默 miR-21 明显促进 MSC 增殖; 此外, 过表达 miR-21 靶向抑制细胞中 TGF- $\beta$ 1 的表达, 而沉默 miR-21 可促进细胞中 TGF- $\beta$ 1 表达。结论 miR-21 能抑制人脐血 MSC 的增殖, 并下调其 TGF- $\beta$ 1 的表达。

**关键词** 微小 RNA-21; 人脐血间充质干细胞; 增殖; 转化生长因子- $\beta$ 1

**中图分类号** R 329.2

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2017)03-0347-04  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.009

间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 具有多向分化的潜能, 可以在体外诱导分化成骨细胞、神经细胞、心肌细胞等, 是组织工程种子细胞的重要来源<sup>[1]</sup>。而相对于人骨髓 MSC, 人脐血 MSC 作为组织工程种子细胞的来源更为理想。微小 RNAs (miRNAs, miRs) 是一类长为 22~25 个核苷酸序列的内源性、非编码、单链小 RNA 分子, 可通过与目的靶蛋白的 mRNA 的碱基特异性配对, 从而引起目的靶蛋白 mRNA 的降解或抑制其翻译表达, 在转录后

水平对目标基因进行调控<sup>[2-3]</sup>。文献<sup>[4]</sup>报道微小 RNA 可通过调控一些特殊的转录因子和相关基因的表达来调控 MSC 的活化增殖。Ryu et al<sup>[5]</sup>证实高糖通过促进转化生长因子- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) 表达刺激人脐血 MSC 活化增殖。已有相关研究<sup>[6]</sup>证实, 促进人脐血 MSC 的增殖活化水平, 有利于提高基于 MSC 的移植治疗的有效性。鉴于微小 RNA 和 TGF- $\beta$ 1 对间充质干细胞增殖的影响, 该研究观察 miR-21 对人脐血 MSC 增殖和 TGF- $\beta$ 1 表达的影响, 有助于为 MSC 临床治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 健康足月剖宫产新生儿脐带血 20 份, 由淮南市妇幼保健院提供, 产妇及其家属均知情同意。Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 Reagent、TRIzol 试剂购于美国 Invitrogen 公司; Opti-MEM<sup>®</sup> I (1 $\times$ ) 购于美国 Life Technologies 公司; miR-21 mimics、EzOmics miRNA qPCR Detection Primer、EzOmics One-Step qPCR 试剂盒购于南通百奥迈科公司; Thermo Fisher Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 和 Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2 $\times$ ) 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 免疫印迹一抗购于南京巴傲得生物公司; 二抗购于北京中杉金桥公司; MTT 实验试剂盒购于上海碧云天公司; 合成引物由上海生工生物公司完成。

## 1.2 方法

**1.2.1 人脐血 MSC 分离与培养** 人脐血 MSC 按文献<sup>[6]</sup>报道的方法进行分离, 并做适当改进。简述如下: 无菌条件下取正常足月剖宫产胎儿的脐血 50~90 ml, 肝素抗凝, 并于 12 h 内将淋巴细胞分离。

2016-12-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81270573)

作者单位: 安徽医科大学附属医院血液科, 合肥 230001

作者简介: 王晓培, 女, 主治医师, 硕士研究生;

王兴兵, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wanxingbing91@hotmail.com

reveal that the integral TG culture is practicable *in vitro*, and will make the study in morphology and molecular biology easy to implement; TNF- $\alpha$  can significantly increase CGRP levels of cultured integral TG.

**Key words** trigeminal neuralgia; trigeminal ganglion; culture *in vitro*; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; calcitonin gene-related peptide

然后将预冷 PBS 与脐带血等体积混合均匀,按照体积 1 : 1 稀释血叠加于淋巴细胞分离液上,以 1 500 r/min 室温离心 15 min。离心管中液体分为 4 层,将介于血清层和液层之间的白色云雾状有核细胞层吸取出来,加入预冷 PBS 再次离心,800 r/min 室温离心 5 min,再反复洗涤 2 次,计数培养基中悬浮细胞。按照  $1 \times 10^{10}$  /L 的细胞密度接种于人脐带血清包被过的塑料培养瓶,培养基采用含体积分数为 5  $\mu$ g/L 粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、10% 人脐带血清和 15  $\mu$ g/L 白介素-3 (IL-3) 的 DMEM/F12,置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。倒置相差显微镜观察 MSC 的生长情况和形态变化。

**1.2.2 细胞转染** 依据 miRbase 数据得知 miR-21 mimic 正义链: 5'-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3'; 反义链: 5'-UCAACAUCAGUCUGAUAAGCUA-3'。转染前 1 d,将转染 MSC 计数后,接种于 6 孔板,用 Opti-MEM 稀释 miR-21 mimics 与脂质体混合物,静置 20 min,室温,转染相应孔细胞,置于 5% CO<sub>2</sub> 保温箱,37  $^{\circ}$ C 孵育 24 h,换新鲜培养基及血清; TGF- $\beta$ 1 组加入 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1。

**1.2.3 总 RNA 提取和一步法 qRT-PCR 检测 miR-21** 采用 TRIzol 一步法抽提细胞总 RNA, RNA 的浓度和纯度用紫外分光光度法测定,选取比值在 1.8 ~ 2.0 的 RNA 样品检测。参照 miR 试剂盒操作步骤检测 miR-21。PCR 扩增条件: 42  $^{\circ}$ C 30 min, 95  $^{\circ}$ C 10 min; 95  $^{\circ}$ C 20 s, 62  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s 共计 40 个循环扩增; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 95  $^{\circ}$ C 15 s。内参用 U6, 参照  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算基因的相对表达水平。

**1.2.4 qRT-PCR 检测 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达** 细胞抽提总 RNA 用 Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒并参照操作手册逆转录合成 cDNA, 然后应用 Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2 $\times$ ) 试剂盒并参照操作手册进行 qRT-PCR 检测。从 GenBank 中查找引物序列并设计合成相应引物。反应条件如下: 50  $^{\circ}$ C 2 min, 95  $^{\circ}$ C 10 min, 接着 95  $^{\circ}$ C 20 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s 共 40 个循环的扩增阶段条件; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 95  $^{\circ}$ C 15 s。内参使用  $\beta$ -actin, 用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算基因的相对表达水平。

**1.2.5 Western blot 检测 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达变化** 细胞总蛋白提取并定量,使用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,应用湿转法将蛋白移至 PVDF 膜上, PVDF 膜封闭 2 h, 洗涤后, PVDF 膜加入分别含 TGF- $\beta$ 1 (1 :

300) 和  $\beta$ -actin (1 : 200) 一抗孵育, 4  $^{\circ}$ C 过夜, 然后再应用相应二抗孵育 1 h, ECL 化学发光法显影, 胶片显影、定影。采用 QuantityOne V 4.6 软件分析结果, 测定蛋白相对表达量。

**1.2.6 MTT 法检测人 MSC 增殖活性** 用胰蛋白酶将对数生长期的各组 MSC 消化后, 用培养基重悬细胞悬液。然后细胞计数。以每孔  $1 \times 10^4$  个/ml 的密度加入 96 孔板中, 每组设置 5 个复孔, 每孔 200  $\mu$ l, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱, 37  $^{\circ}$ C 培养 2 d。培养第 2 天开始, 每孔加入 5 g/L MTT, 孵育 4 h, 吸取细胞上清液, 每孔加入 150  $\mu$ l 二甲基亚砜, 室温振荡 10 min, 使蓝紫色结晶充分溶解, 测定各孔波长 490 nm 处 A 值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组均数比较采用方差分析。所有实验数据分析重复至少 3 次。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 瞬时转染 miR-21 抑制物与模拟物对 miR-21 表达的影响** 检测结果显示, 瞬时转染 MSC miR-21 模拟物和抑制物 48 h 后, 与阴性对照组和空白对照组比较, 模拟物组 miR-21 表达明显增高, 差异有统计学意义 ( $t = 8.647$ ,  $P < 0.05$ )。与阴性对照组和空白对照组比较, 抑制物组 miR-21 表达降低, 差异有统计学意义 ( $t = 5.356$ ,  $P < 0.05$ )。见图 1。

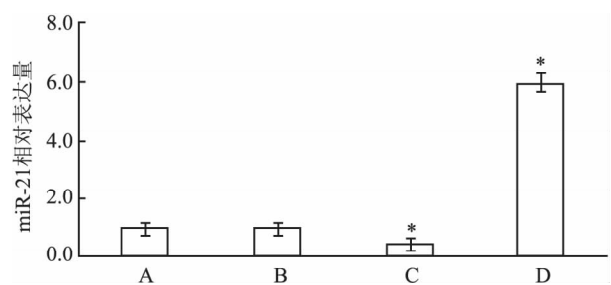


图 1 一步法 qRT-PCR 检测相对表达变化

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: miR-21 抑制物组; D: miR-21 模拟物组; 与空白对照组和阴性对照组比较: \*  $P < 0.05$

**2.2 瞬时转染 miR-21 模拟物和抑制物对 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达的影响** 检测结果显示, 瞬时转染 MSC miR-21 模拟物和抑制物 48 h 后, 与阴性对照组和空白对照组比较, 模拟物组 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达明显降低, 差异有统计学意义 ( $t = 7.13$ ,  $P < 0.05$ )。与阴性对照组和空白对照组比较, 抑制物组 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达明显增高, 差异有统计学意义 ( $t = 6.27$ ,

$P < 0.05$ )。见图 2。

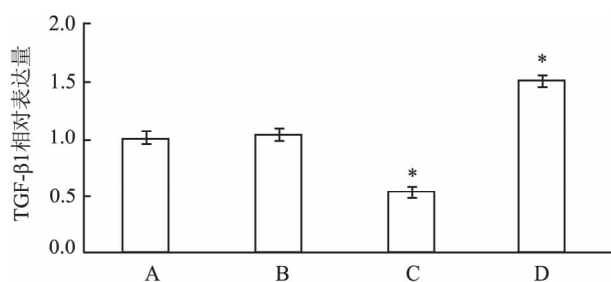


图 2 一步法 qRT-PCR 检测 TGF-β1 mRNA 表达变化

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: miR-21 模拟物组; D: miR-21 抑制物组; 与空白对照组和阴性对照组比较: \*  $P < 0.05$

**2.3 瞬时转染 miR-21 模拟物和抑制物对 TGF-β1 蛋白表达的影响** 检测结果显示,瞬时转染 MSC miR-21 模拟物和抑制物 48 h 后,与阴性对照组和空白对照组比较,模拟物组 TGF-β1 蛋白表达明显降低,差异有统计学意义( $t = 5.06$ ,  $P < 0.05$ )。与阴性对照组和空白对照组比较,抑制物组 TGF-β1 蛋白表达明显增高,差异有统计学意义( $t = 5.45$ ,  $P < 0.05$ )。见图 3。

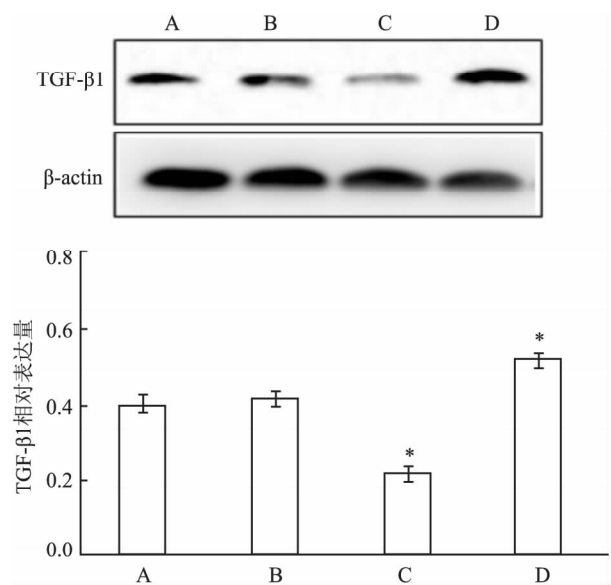


图 3 Western blot 检测 TGF-β1 蛋白表达变化

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: miR-21 模拟物组; D: miR-21 抑制物组; 与空白对照组和阴性对照组比较: \*  $P < 0.05$

**2.4 MTT 法检测结果** 检测结果显示, TGF-β1 刺激 MSC 后,瞬时转染 miR-21 模拟物和抑制物 24 h 和 48 h 后,与阴性对照组和空白对照组比较,模拟物组细胞增殖活性明显降低,差异有统计学意义( $F = 20.23, 23.15$ ,  $P < 0.05$ )。与阴性对照组和空白

对照组比较,抑制物组细胞增殖活性明显增高( $F = 28.05, 26.58$ ,  $P < 0.05$ ),差异有统计学意义。见图 4。

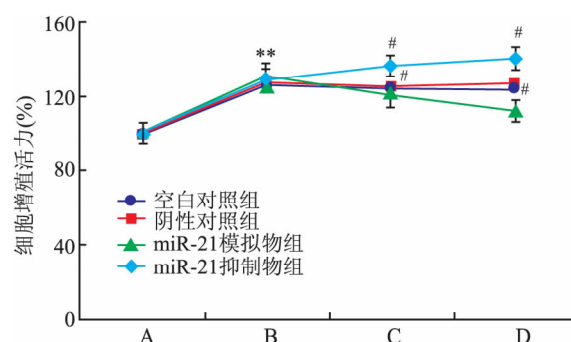


图 4 MTT 实验检测细胞增殖活性变化

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: miR-21 模拟物组; D: miR-21 抑制物组; 与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与阴性对照组比较: #  $P < 0.05$

### 3 讨论

MSC 是成人干细胞移植的有效选择<sup>[7]</sup>。已有文献<sup>[8-9]</sup>报道 MSC 可以使得心脏病患者的心肌灌注增加和心功能增强。因而,如何提高 MSC 的疗效是目前研究的热点。众所周知, TGF-β1 在人体系统的发育过程中发挥着重要的作用<sup>[10-12]</sup>。Fekete et al<sup>[6]</sup>证实 TGF-β1 可以促进 MSC 的增殖活化。

微小 RNA 是一类具有基因转录后调控作用的内源性小分子 RNA<sup>[13]</sup>,可以调控 MSC 的自我更新。陈学斌等<sup>[4]</sup>研究显示 miR-17、miR-19b、miR-20a 等可以抑制 MSC 的自我更新,而 miR-125b、miR-222、miR-302/372 等则促进 MSC 的自我更新。间充质细胞在分化过程中有微小 RNA 参与并伴有微小 RNA 的表达改变,特异性微小 RNA 在其分化过程中发挥着重要的作用。

本实验通过沉默和过表达 miR-21 表达水平,观察 TGF-β1 表达和人脐血 MSC 的增殖,用 miR-21 模拟物和抑制物转染体外培养的 MSC,检测转染后 MSC 的增殖活性改变,以及 miR-21 和 TGF-β1 的表达变化。检测结果显示 miR-21 模拟物可抑制 MSC 增殖,同时降低 TGF-β1 的表达水平; miR-21 抑制物可明显增强 MSC 活化增殖,促进 TGF-β1 的表达水平。鉴于 TGF-β1 在调控 MSC 增殖中的重要作用,推测 miR-21 可能通过调控 TGF-β1 表达水平,从而影响人脐血 MSC 增殖活化。但脐血干细胞活化增殖是一个复杂过程,具体涉及详细的活化增殖途径

还有待进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] 赵春生,王更银,李俊峡. 人脐血间充质干细胞体外分离培养条件的优化及其鉴定 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(27): 5326-30.
- [2] Yang B F, Lu Y J, Wang Z G. MicroRNAs and apoptosis: implications in the molecular therapy of human disease [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009, 36(10): 951-60.
- [3] Valencia-Sanchez M A, Liu J, Hannon G J, et al. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(5): 515-24.
- [4] 陈学斌,徐银胜,张芳,等. 微小RNAs调控间充质干细胞的自我更新与分化 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(49): 9294-300.
- [5] Ryu J M, Lee M Y, Yun S P, et al. High glucose regulates cyclin D1/E of human mesenchymal stem cells through TGF- $\beta$  expression via  $Ca^{2+}$ /PKC/MAPKs and PI3K/Akt/mTOR signal pathways [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 224(1): 59-70.
- [6] Fekete N, Rojewski M T, Lotfi R, et al. Essential components for ex vivo proliferation of mesenchymal stromal cells [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2014, 20(2): 129-39.
- [7] Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte culture and mitogenic response independently of the major histocompatibility complex [J]. *Scand J Immunol*, 2003, 57(1): 11-20.
- [8] Yoo K J, Kim H O, Kwak Y L, et al. Autologous bone marrow cell transplantation combined with off-pump coronary artery bypass grafting in patients with ischemic cardiomyopathy [J]. *Can J Surg*, 2008, 51(4): 269-75.
- [9] Hare J M, Traverse J H, Henry T D, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(24): 2277-86.
- [10] Azhar M, Schultz Jel J, Grupp I, et al. Transforming growth factor beta in cardiovascular development and function [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14(5): 391-407.
- [11] Zhang F, Hong Y, Liang W, et al. Co-culture with Sertoli cells promotes proliferation and migration of umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 427(1): 86-90.
- [12] Agarwal M L, Agarwal A, Taylor W R, et al. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(18): 8493-7.
- [13] 蒋秀敏,刘雨生,许波. miR-483-5p通过靶基因 ERK1 调控人类颗粒细胞增殖凋亡平衡 [J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(11): 1639-44.

## Effect of microRNA-21 on proliferation and TGF- $\beta$ 1 expression of human cord blood mesenchymal stem cells

Wang Xiaopei, Wang Xingbing, Cheng Jiafeng, et al

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

**Abstract Objective** To investigate the effect of microRNA-21 on proliferation and transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) expression of mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods** MSCs was isolated and cultured from cord blood. The transfection group was transfected with microRNA-21 mimic, microRNA-21 inhibitor and microRNA-21 negative control by using Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000, and the blank control group did not do any treatment. MTT assay was used to determine the proliferation influence of the transfected MSCs. qRT-PCR was applied to assess the expression of microRNA-21 and mRNA of TGF- $\beta$ 1; Western blot was applied to assess the expression of protein of TGF- $\beta$ 1. **Results** Compared to negative control and blank control group, the MSCs proliferation activity decreased significantly after transfected miR-21 mimics, MSCs proliferation activity increased significantly after transfected miR-21 inhibitors. The MSCs transfected miR-21 mimics exhibited up-regulated miR-21 expression and attenuated TGF- $\beta$ 1 expression; MSCs transfected miR-21 inhibitors exhibited down-regulated miR-21 expression and up-regulated TGF- $\beta$ 1 expression. **Conclusion** miR-21 mimics can attenuate TGF- $\beta$ 1 expression and suppress the proliferation activity of MSCs significantly.

**Key words** microRNA-21; mesenchymal stem cells; proliferation; transforming growth factor- $\beta$ 1