文章编号:1000-5404(2008)09-0803-04

论著

微小 RNA 分子 miR-21 和 miR-22 对 C2C12 细胞成肌分化影响的研究

王 涛,艾国平,邹仲敏,王军平,冉新泽,徐 辉,粟永萍 (第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨微小 RNA(microRNAs)分子 miR-21 和 miR-22 对于 C2C12 细胞体外成肌分化进程的影响。方法 以C2C12 细胞体外成肌分化为模型,Northern blot 检测 miR-21 和 miR-22 两个分子在分化过程中的表达变化及组织表达谱,转染 DNA/LNA 杂合体反义链进行 loss-of-fuction 功能研究,RT-PCR 分析其对分化相关分子的影响。结果 成功建立 C2C12 细胞体外成肌分化模型,2 个分子在分化过程中均表达上调,且它们具有各自的组织分布特点;建立了以 DNA/LNA 杂合体反义链为手段的 microRNAs 研究的 loss-of-fuction 平台;与对照组比较,抑制这 2 个 microRNAs 对于成肌分化相关的骨骼肌 α-肌动蛋白、成肌素和 MEF-2D 等分子的表达没有影响。结论 抑制 miR-21 和 miR-22 在 C2C12 细胞成肌分化过程中的上调不影响其分化,说明这 2 个分子对于分化的进程影响不大。

关键词:微小 RNA;C2C12;成肌分化
中图法分类号:R322.74;R329.21;R394.1 文献标识码:A

Roles of miR-21 and miR-22 in myogenic differentiation of myoblasts C2C12

WANG Tao, AI Guo-ping, ZOU Zhong-min, WANG Jun-ping, RAN Xin-ze, XU Hui, SU Yong-ping (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the roles of 2 microRNA molecules, miR-21and miR-22, in the myogenic differentiation of C2C12 myoblasts. Methods C2C12 cells was taken as the model since they have a tendency of myogenic differentiation when cultured in differentiation medium. The expression levels of miR-21 and miR-22 in the process of myogenic differentiation and different tissues (the brain, small intestine, skeleton muscle, spleen, kidneys, liver, heart and lungs) were detected by Northern blotting. Loss-of-function about these 2 microRNAs were carried out by transfecting the antisense strands of their DNA/locked nucleic acid (LNA) mixtures respectively and the effects on the expressions of 3 myogenic differentiation related genes, skeletal-α-actin, myogenin and myocyte enhancer factor-2D (MEF-2D) were evaluated by RT-PCR. Results These 2 microRNAs were strongly expressed during the differentiation of C2C12 cells and they had obvious expression profiles in different tissues. Comparing to negative control, inhibiting the up-regulation of miR-21 and miR-22 had no effect on the expressions of above mentioned genes. Conclusion miR-21 and miR-22 have little effects on the myogenic differentiation of the murine myoblast cell line C2C12.

Key words: microRNAs; murine myoblast cell line C2C12; myogenic differentiation

微小 RNA(microRNAs)是一类广泛存在于真核细胞当中,由基因组编码的长度约 20 nt 的高度保守的微小的 RNA 分子,通过与对应的靶 mRNA 的 3′非翻译区(3′UTR)的非完全或完全配对结合,阻止其翻译或破坏其稳定性,实现对基因表达的调控。一系列的研究表明,microRNAs 与细胞的增殖和分化密切相关[1,2],而如何实现多能原始细胞的定向分化,对于基础理论和实际应用都有深远的意义。为此,我们采用肌母细胞 C2C12 体外成肌分化的模型,根据文献[3]的结果,就 C2C12 体外成肌分化过程中明显上调的 miR-21 和 miR-22 分子对于分化进程的影响进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

总 RNA 提取试剂 RNAiso、RNA LA PCR™ Kit、T_4 多核苷酸激酶(PNK)购自日本 TaKaRa 公司。DNA 探针由上海英骏公司合成,序列与对应 microRNA 完全互补。γ-^{32}P-ATP 购自北京

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB522605)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522605)
作者简介:王 涛,男,河北省定州市人,博士研究生,助教,主要从事微小 RNA 与细胞分化方面的研究。电话:(023)68771720, E-mail: wangtmmu@hotmail.com
通信作者:粟永萍,电话:(023)68752279, E-mail: suyp2003@yahoo.com.cn
收稿日期:2008-02-21;修回日期:2008-03-10

福瑞生物工程公司，尼龙膜为 Roche 公司产品，杂交液购自 Clontech。转染试剂（Oligofectamine）购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 C2C12 细胞体外成肌分化模型 肌母细胞 C2C12 购自美国 ATCC（CRL1772）。未分化细胞以含有 20% 类标准胎牛血清的高糖 DMEM 培养基（生长培养基，growth medium，GM），在 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养。当细胞长至 80%～90% 的汇合度时，撤掉含 20% 类标准胎牛血清的培养基，换以含有 2% 马血清的 DMEM 培养基（分化培养基，differentiation medium，DM）诱导其成肌分化。每 2 天换液 1 次，持续诱导 5 d，以倒置显微镜观察肌管形成的过程。收集诱导前和诱导后第 1、3、5 天细胞备用。

1.2.2 获取小鼠各组织脏器 健康雄性 C57 小鼠（购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心），8 周龄，脱颈椎处死后取脑、小肠、骨骼肌、脾、肾、肝、心和肺等新鲜组织，冻存于 -70 ℃ 备用。

1.2.3 Northern blot 检测 采用 RNAiso 提取细胞总 RNA，具体方法参照说明书进行。以 miR-21、miR-22 和 let-7g 分子的反向互补 DNA 序列为探针（miR-21 5′-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3′l；miR-22 5′-ACAGTTCTTCAACTGGCAGCTT-3′；let-7g：5′-AACTGTACAAACTACTACCTCA-3′），采用 γ-^{32}P-ATP 末端转移法标记探针。取 20 μg 总 RNA 上样，行 20% 尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离，半干转印恒流 0.4 A 转尼龙膜 1 h。紫外交联 1 200 μJ/min，而后 80 ℃ 烘烤 1 h。加入放射性探针后于 42 ℃ 杂交过夜，洗膜后，-70 ℃ 放射自显影 48 h。

1.2.4 DNA/LNA 杂合体反义链的细胞转染 DNA/LNA 杂合体反义链由 Sigma 公司合成（LNA，locked nucleic acid，锁核酸），序列如下：anti-miR-21 DNA/LNA，5′-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-3′；anti-miR-22 DNA/LNA，5′-ACAGTTCTTCAACTGGCAGCTT-3′；阴性对照（negative control，NC），5′-CATTAATGTCGGACAACTCAAT-3′（加下划线代表 LNA 序列）。转染前 1 d 将 1.5×10^5 细胞均匀接种于 6 孔板内，转染按照 Oligofectamine 说明书进行，每孔转染 50 nmol 的 DNA/LNA 杂合体反义链。转染后 24 h 对 C2C12 细胞进行诱导分化，诱导 48 h 收取细胞备用。

1.2.5 逆转录 PCR 分析 提取转染 DNA/LNA 杂合体反义链后诱导分化 48 h 的各组细胞总 RNA 后，测定浓度，按照试剂盒说明进行逆转录。引物序列、长度及退火温度如下：骨骼肌 α-肌动蛋白（skeletal-α-actin）正义链 5′-CAGAGCAAGCGAGGTATCC-3′，反义链 5′-GTCCCCAGAATCCAACACG-3′，297 bp，60 ℃；成肌素（myogenin）正义链 5′-TGGAGCTGTATGAGACATCCC-3′，反义链 5′-TGGACAATGCTCAGGGGTCCC-3′，185 bp，63 ℃；肌细胞增强因子（myocyte enhancer factor-2D，MEF-2D）正义链 5′-CAAGCTGTTCCAGTATGCCAG-3′，反义链 5′-AAGGGATGATGTCACCAGGG-3′，364 bp，63 ℃；磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）正义链 5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′，反义链 5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′，491 bp，60 ℃。进行 PCR 扩增，循环数为 28 个。反应结束后，各取 5 μl PCR 扩增产物，行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察，并用凝胶成像系统进行图像采集，计算各条带的灰度值。

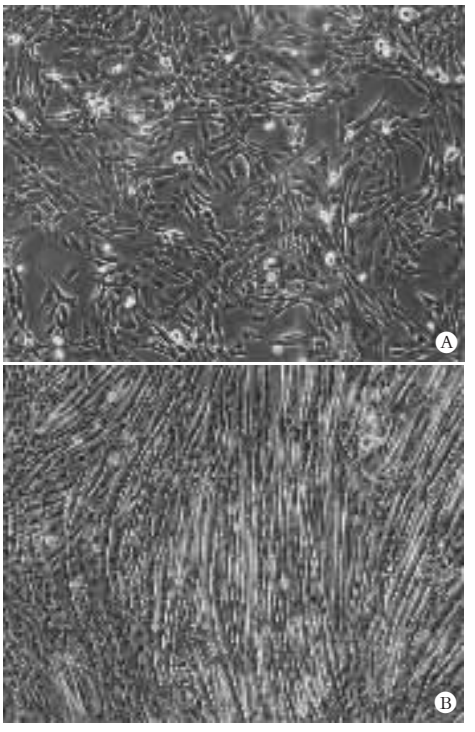
1.3 统计学处理

将所得 PCR 结果用 Quantity One 软件进行灰度扫描，计算目的条带与内参的比值，重复操作 3 次，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 成肌分化模型的建立

增殖期的 C2C12 细胞呈成纤维细胞样，透光性强，增殖旺盛，见图 1A。诱导分化后 2～3 d 细胞即发生明显的形态学改变，表现为胞体伸长，融合形成具有多个细胞核的肌管；继续诱导培养至第 5 天，肌管进一步成熟粗大，见图 1B。

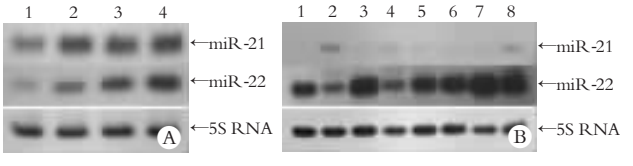


A：分化前；B：诱导第 5 天

图 1 成肌分化前后 C2C12 细胞形态学改变（倒置显微镜 ×100）

2.2 miR-21 和 miR-22 在成肌分化过程中的表达变化及其组织分布

Northern blot 结果显示，miR-21 和 miR-22 两个分子在成肌分化中都存在较为明显的上调，见图 2A。其中 miR-21 的上调主要存在于早期分化的第 1 天，而后维持在该水平；而 miR-22 分子则随着是分化时间的延长持续上调。2 个分子的组织表达谱的检测显示：miR-22 呈现广谱的分布模式，以心肌、肺、脑、骨骼肌和肾脏表达丰度较高；而 miR-21 主要在小肠、肺和脾脏检测到了信号，见图 2B。



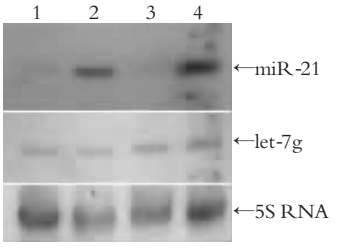
A：2 个分子在成肌分化中的表达变化 1：分化前；2～4：诱导分化第 1、3、5 天

B：2 个分子的组织分布特点 1：脑；2：小肠；3：骨骼肌；4：脾；5：肾；6：肝；7：心；8：肺

图 2 Northern blot 检测 miR-21 和 miR-22 在成肌分化中的表达变化及其组织分布

2.3　DNA/LNA 杂合体反义链对内源性 microRNAs 分子的影响

Northern blot 结果显示,C2C12 细胞转染 DNA/LNA 杂合体反义链后能够有效抑制内源性 miR-21 分子的水平,我们几乎检测不到杂交信号。同时,我们选取了 let-7g 分子检测了这种抑制的特异性,发现其并未影响到该分子的表达,见图 3。

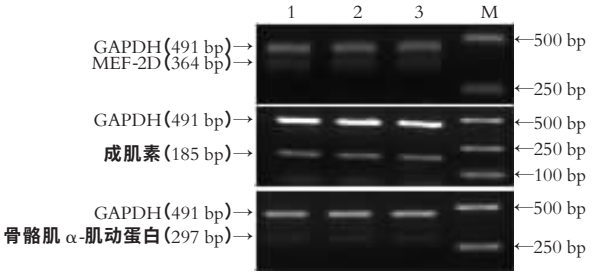


1:anti-miR-21 50 nmol;2,4:阴性对照;3:anti-miR-21 100 nmol

图 3　anti-miR-21 DNA/LNA 导入细胞后对内源性 miR-21 水平的影响

2.4　DNA/LNA 杂合体反义链抑制 miR-21 和 miR-22 上调对成肌分化相关基因表达的影响

RT-PCR 结果显示,通过体外细胞转染导入 miR-21 和 miR-22的 DNA/LNA 杂合体反义链后,对细胞进行分化诱导 48 h,各组在骨骼肌 α-肌动蛋白、成肌素和 MEF-2D 等功能蛋白和转录因子的 mRNA 表达水平与阴性对照组无明显的差异($P>0.05$),见图 4。



1:阴性对照;2:anti-miR-21;3:anti-miR-22;M:DNA 标准(DL 2000)

图 4　成肌分化相关分子 mRNA 表达的 RT-PCR 检测结果

3　讨论

合理利用细胞工程解决组织损伤修复是创伤医学研究的重要课题,而认识特定谱系细胞增殖与分化的分子机制则是实现这一目标的前提。microRNAs 是一种重要的基因表达调控模式,与细胞的增殖和分化密切相关。故而本研究选取 C2C12 细胞体外成肌分化模型,根据国外文献报道,对一些在成肌分化过程中表达变化较为明显的 microRNAs 分子的功能进行了初步探讨。

首先我们对芯片的结果进行了 Northern blot 的检测验证,成功建立了 C2C12 细胞体外成肌分化模型后,我们选取了增殖期 C2C12 和分化第 1、3、5 天 C2C12 细胞进行了检测。结果表明:miR-21 和 miR-22 2 个分子在成肌分化中都存在较为明显的上调。同时,我们对这 2 个分子的组织表达谱也进行了检测,发现 miR-22 在很多组织中均有表达,同时文献[4]报道它们在其他分化过程中也呈现上调,提示其可能具有通用的意义;而 miR-21 分子在成熟的肌肉组织表达很低,提示其可能在特定的阶段中发挥了功能,对于维持成熟肌肉的状态并无必要。

microRNAs 的功能研究模式与常用基因功能研究的思路相似,所不同的是自身的方法学。通常认为,基因的 loss-of-fuction 结果说服力要强于 gain-of-fuction,故而我们采用了前者。对于 microRNAs 的 loss-of-fuction 研究可以通过基因敲除、2-O-甲基化反义 RNA 链和 DNA/LNA 杂合体反义链等方法实现。由于我们不具备基因敲除的条件,而 2-O-甲基化反义 RNA 链具有易于降解,作用周期短的缺点,我们选用了 DNA/LNA 杂合体反义链。它利用了锁核酸亲和力高的特点,使杂合体反义分子具有了抑制效率较高,作用时间较长(4 ~ 10 d)的优点[5]。我们通过体外转染技术将其导入到细胞内后检测其作用的靶分子,发现其可以明显抑制掉内源性 microRNAs;同时我们检测了 let-7g 的水平以观察杂合体反义分子作用的特异性,发现其未对 let-7g 产生影响。由此,我们建立了有效的 microRNAs loss-of-fuction 的细胞干预平台,为后续研究功能打下了基础。

通过上述干预平台,我们对于 miR-21 和 miR-22 等在成肌分化中的作用进行了评价。转染导入 miR-21 和 miR-22 的 DNA/LNA 杂合体反义链后,对细胞进行分化诱导 48 h 收取细胞提取总 RNA 行 RT-PCR。我们检测了成肌分化相关的转录因子成肌素和 MEF-2D 以及功能蛋白骨骼肌 α-肌动蛋白,结果表明各组之间无明显差异。Chen 等[3]和 Naguibneva 等[6]利用相似的平台鉴定出 miR-1、miR-133 和 miR-181 等分子参与了成肌分化的调控。而其他学者在成脂分化模型中发现干预 microRNAs 均未能影响到分化[4],甚至在低等动物,敲除某些 microRNAs 观察不到表型改变。这表明不同 microRNAs 功能定位不同,有的可能在分化等过程当中起关键分子开关的作用,有的则并不那么重要;而某些特定过程则可能受 microRNAs 的影响较小。这些均提示了进行 microRNAs 功能研究的复杂性,这种复杂性的来源可能与众多基因往往存在诸多的 microRNAs 的调控位点,从而造成一种功能上的冗余状态有关。总之,本研究表明,抑制 miR-21 和 miR-22 在 C2C12 细胞成肌分化过程中的上调不影响其分化,

说明这2个分子对于分化的进程影响不大。但是它们相互之间对于分化有无联合作用尚待进一步实验验证;同时限于我们的检测终点评价指标,它们对于分化过程中和成熟肌管的诸如能量代谢、电活动、凋亡等其他事件有无影响还有待探索。

参考文献:

[1] Shivdasani R A. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation[J]. Blood, 2006, 108(12): 3646-3653.

[2] Martinez J, Busslinger M. Life beyond cleavage: the case of Ago2 and hematopoiesis[J]. Genes Dev, 2007, 21(16): 1983-1988.

[3] Chen J F, Mandel E M, Thomson J M. *et al*. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation [J]. Nat Genet, 2006, 38(2): 228-233.

[4] Kajimoto K, Naraba H, Iwai N. MicroRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation[J]. RNA, 2006, 12(9): 1626-1632.

[5] Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Nonne N, *et al*. An LNA-based loss-of-function assay for micro-RNAs [J]. Biomed Pharmacother, 2006, 60(9): 633-638.

[6] Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Polesskaya A, *et al*. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation[J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(3): 278-284.

(编辑 栾 嘉)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)09-0806-01

CT诊断气管腺样囊性癌3例

杨 华[1],向 前[2],王文献[1] ([1]第三军医大学新桥医院放射科,重庆 400037;[2]重庆市九龙坡区第一人民医院放射科,重庆 400050)

原发性气道肿瘤较为罕见,约占呼吸系统肿瘤的2%,其中恶性肿瘤占60%~83%,腺样囊性癌(adenoid cystic carcinoma, ACC)仅次于鳞状细胞癌(48%),在气道恶性肿瘤中发病率居第2位(33%)[1]。尽管ACC为相对低度恶性肿瘤,但手术切除率极低,文献报道不足10%。为了加深对该病CT征象的认识,收集经本院手术病理证实的ACC 3例,探讨CT对ACC的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 病例资料

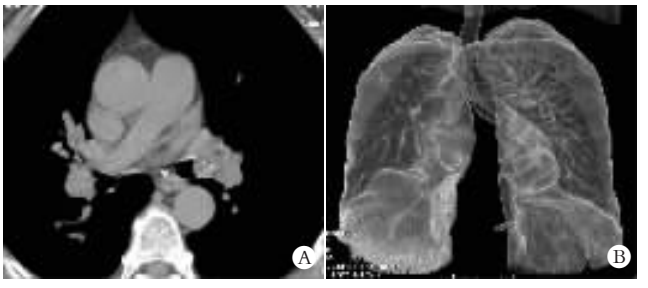
回顾性分析本院经手术病理证实的3例气管ACC患者资料,均为女性,年龄18~71岁。3例均以咳嗽、咳痰、活动后气促,呼吸困难,进行性加重就诊。肺功能检查均提示不同程度的阻塞性通气功能障碍,纤维支气管镜检查发现气管或主支气管新生物,由于管腔狭窄,3例均无法观察气管远端情况。

1.2 设备及参数

2例行16层螺旋CT扫描,设备为美国GE公司LightSpeed 16层螺旋CT机,扫描参数120 kV,120 mA,螺距1.375∶1,层厚1.25 mm,间隔1.25 mm;1例为单层螺旋CT扫描。扫描所得图像传至工作站处理。重建方法为多平面重建、气管支气管树重建及仿真内窥镜技术。1例行增强扫描,采用对比剂为优维显100 ml,注射流率为3.5 ml/s,开始注射对比剂后20 s启动扫描。

2 结果

2例发生于气管,1例发生于左主支气管,3例患者病变主要位于气管侧、后壁,2例表现为气管壁偏心性环壁增厚,1例表现为腔内沿管壁生长的宽基底结节。3例病变节段与正常段节段分界不清,2例病变与纵隔内结构分界清晰,1例表现为部分区域与左颈总动脉及左锁骨下动脉间脂肪间隙显示不清,平扫均表现为均匀低密度,1例做增强扫描表现为明显均匀强化,轮廓显示更清晰,1例可见阻塞性肺气肿征象。多平面重建及气管支气管树重建对病变的范围及气道管腔的狭窄程度显示更加完整,仿真内窥镜可以清楚显示腔内病变的形态及表面情况,与术中所见对比,轴位图像、多平面重建、气管支气管树重建及仿真内窥镜技术的联合应用对病变范围及管腔形态的显示优于纤维支气管镜(图1)。3例患者行气道肿瘤切除后病理提示肿瘤侵犯气管全层,两侧缘均可见肿瘤组织,提示肿瘤呈浸润性生长。



A:轴位图像;B:气管支气管树重建

图1 左主支气管下段腔内结节型腺样囊性癌

作者简介:杨 华,男,重庆市人,硕士,医师,主要从事心血管疾病的CT和MRI诊断方面的研究。电话:13527547568,E-mail:yanghua0819@yahoo.com.cn

通信作者:王文献,电话:(023)68774676,E-mail:WXW745866@yahoo.com.cn

收稿日期:2008-01-09 修回日期:2008-03-18

(下转813页)