论著

文章编号:1000-5404(2012)11-1048-04

miR-125b 调节 C3H10T1/2 间充质干细胞中 Cbfβ 的表达

周 维,谢 肇,许建中 (400038 重庆,第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心)

[摘要] **目的** 研究 miR-125b 对鼠间充质干细胞株 C3H10T1/2 中核心结合因子-β(core-binding factor beta, Cbfβ)表达的调节作用。**方法** 将 microRNA 阴性对照、miR-125b mimic 和 anti-miR-125b 用脂质体转染小鼠间充质干细胞系 C3H10T1/2, Western blot 及 RT-PCR 测定细胞中 Cbfβ 蛋白及 mRNA 表达;以 PicTar 数据库预测的 Cbfβ3′-非翻译区上 miR-125b 靶位点附近约 30 个碱基为基础合成 3 组插入序列(阳性对照、野生型序列、突变序列),连接到经 *Hind*Ⅲ、*Spe*Ⅰ双酶切后的 PmiR-report 载体质粒上,然后与miRNA 阴性对照和 miR-125b mimic 共同转染 293T 细胞,双荧光素酶报告基因检测荧光素酶活性。**结果** 过表达miR-125b 抑制 Cbfβ 蛋白及 mRNA 表达($P<0.05$),转染 anti-miR-125b 可促进 Cbfβ 蛋白及 mRNA 表达($P<0.05$);miR-125b 抑制 Cbfβ3′-非翻译区荧光素活性。**结论** 外源性 miR-125b 可作用于 Cbfβ3′非翻译区从而负性调节 C3H10T1/2 细胞中 Cbfβ 的表达。

[关键词] MiR-125b;间质干细胞;细胞,培养的;核心结合因子 β
[中图法分类号] R322.74; R329.21; R394.1 [文献标志码] A

Effect of miR-125b on expression of Cbfβ in C3H10T1/2 cells

Zhou Wei, Xie Zhao, Xu Jianzhong (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of miR-125b on expression of core-binding factor beta (Cbfβ) in mouse C3H10T1/2 cells. **Methods** Mouse C3H10T1/2 cells were transfected with microRNA negative control, miR-125b mimics and anti-miR-125b, respectively. Expressions of Cbfβ protein and mRNA in C3H10T1/2 cells were detected by Western blotting and RT-PCR, respectively. Inserting sequences of miRNA negative control, wild type and mutation were synthesized according to the 30 bases adjacent to the miR-125b target on the Cbfβ 3′UTR in PicTar database and linked to the PmiR-report plasmids digested by *Hind*Ⅲ and *Spe*Ⅰ. The 293 T cells were co-transfected with miRNA negative control and miR-125b mimics. The activity of luciferase was detected by dual luciferase report assay. **Results** The over-expression of miR-125b inhibited the expression of Cbfβ protein and mRNA in C3H10T1/2 cells ($P<0.05$), while the anti-miR-125b-transfected C3H10T1/2 cells promoted the expression Cbfβ protein and mRNA ($P<0.05$). The miR-125b suppressed the activity of luciferase on the Cbfβ 3′UTR. **Conclusion** Exogenous miR-125b can act on the Cbfβ 3′UTR, and thus down-regulate the expression of Cbfβ in C3H10T1/2 cells.

[**Key words**] MiR-125b;mesenchymal stem cells; cells, cultured;core-binding factor beta

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30973065). Corresponding author: Xu Jianzhong, Tel:86-23-65340297, E-mail:xjzslw@163.com

核心结合因子-β(core-binding factor beta, Cbfβ)又称多瘤病毒蛋白增强子结合蛋白(polyomavirus enhancer binding protein-2β, PEBP-2β),属于 Cbf 基因家族蛋白,与成骨细胞的分化及骨形成有着十分密切的关系[1]。已有报道证实核心结合因子 α1(core-binding factorα1, Cbfα1)是成骨分化不可缺少的转录因子[2],Cbfβ 作为 Cbfα1 的重要辅因子,二者形成二聚体后可增强 Cbfα1 转录活性,促进间充质干细胞向成骨细胞分化[3]。微小 RNA(miRNA)是一类长约 22 个核苷酸的单链非编码小 RNA,作用于靶基因 mRNA 3′非翻译区(un-translational region,UTR),在转录后翻译水平负性调控基因表达[4]。miRNA 的作用涉及多种生理和病理过程,如细胞分化和肿瘤发生等[5-6]。近年研究[7]表明,miRNA 通过下调维持干细胞未分化状态的某些基因,同时激活干细胞谱系特异性基因,促进干细胞定向分化。前期研究间充质干细胞成骨分化后 miRNA 芯片分析结果显示 miR-125b 明显下调。本研究采用双荧光素酶报告基因分析结合 Western blot 及 RT-PCR 的方法,揭示 miR-125b 在间充质干细胞成骨分化中的作用,初步验证其作用靶基因,旨在深入探讨 miR-125b 通过 Cbfβ 通路对间充质干细胞成骨分化

[基金项目] 国家自然科学基金(30973065)
[通信作者] 许建中,电话:(023)65340297,E-mail:xjzslw@163.com

的影响及作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

合成序列及长度如下：miRNA 阴性对照（miRNA negative control）正义链 5′-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3′，反义链 5′-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3′，21 bp；miR-125b 类似物（miR-125b mimics）正义链 5′-UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA-3′，反义链 5′-ACAAGUUAGGGUCUCAGGGAUU-3′，22 bp；miR-125b 抑制剂（anti-miR-125b）5′-UCACAAGUUAGGGUCUCAGGGA-3′，22 bp（上海吉玛制药技术有限公司）。小鼠间充质干细胞系 C3H10T1/2 细胞、转染腺病毒 E1A 基因的人肾上皮细胞系 293T（ATCC），胎牛血清、DMEM（HyClone 公司）。限制性核酸内切酶（TaKaRa 公司）。抗 Cbfβ 的羊抗鼠单克隆抗体（Santa Cruz 公司），质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒（Omega 公司），Lipofectamine™2000 转染试剂盒（Invitrogen 公司），细胞裂解液及预染蛋白质 Marker（Cell Signaling 公司），Dual-luciferase reporter gene system（Promega）载体 pmiR-report™、*E. coli* DH5α（Ambion 公司）等。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 293T、C3H10T1/2 细胞常规培养于添加 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中，37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养，每 3～4 天以 1∶3 比例传代。

1.2.2 Cbfβ 3′UTR 预测位点荧光素酶报告基因载体构建 为了获得足够的最终实验结果信息，根据 Cbfβ 3′UTR 预测结合位点序列合成了与 miR-125b 完全互补序列（Perfect Target，PT）、野生型结合位点序列（microRNA recognition element，MRE）和去掉种子结合区的突变形式结合序列（MRE-mutation，mut）。为增加效能，分别使用 2×PT，2×MRE，2×mut。将合成的 2×PT、2×MRE 及 2×mut 正反义链退火成双链。限制性核酸内切酶 *Hin*dⅢ、*Spe* Ⅰ 37 ℃ 150 min 双酶切 pMIR-report 质粒，经琼脂糖电泳后，胶回收试剂盒回收酶切后的 pMIR-report 质粒。退火片段与酶切后的 pMIR-report 质粒以 10∶1 的量浓度比，在 T_4 连接酶的作用下，16 ℃ 连接过夜 12 h，转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞，均匀涂于氨苄青霉素（Amp）+ LB 平板上，37 ℃ 培养过夜 12 h，随机挑取菌落小量培养，提取质粒后 *Hin*dⅢ 酶切鉴定，并测序。

1.2.3 脂质体介导下的细胞转染 接种 293T 细胞，10% 胎牛血清 DMEM 培养基培养 24 h 后，按照 Lipofectamine™2000 试剂盒说明书进行转染。构建的 3 种荧光素酶报告基因载体 pMIR-REPORT-Cbfβ 和内参质粒 phRL-TK 以 5∶1 转染细胞，同时转入阴性对照和 miR-125b mimic，4 h 后更换新鲜培养液。48 h 后用 PLB 裂解液裂解细胞，裂解液进行双荧光素酶报告基因检测。C3H10T1/2 细胞接种后，分别转染阴性对照、miR-125b mimic、anti-miR-125b，48 h 后行 Western blot 及 RT-PCR 检测。

1.2.4 Western blot 检测蛋白表达 分别提取转染小 RNA 分子后的 C3H10T1/2 细胞总蛋白，Bradford 法定量，与 2×上样缓冲液按 1∶1 比例混匀，100 ℃ 煮 3 min，15% SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维素膜上，5% 脱脂牛奶 4 ℃ 封闭过夜，加入一抗，4 ℃ 孵育过夜，TBST 洗涤 3 次，每次 5 min，加入二抗，37 ℃ 孵育 1 h，TBST 洗涤 3 次，每次 15 min，在暗室中压片，然后显影、定影。图像应用 Quantity One 4.6.2 软件进行分析。

1.2.5 RT-PCR 检测 mRNA 表达 分别提取总 RNA，定量后进行逆转录聚合酶链反应：GAPDH：正义链：5′-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3′，反义链：5′-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3′，123 bp，54 ℃；Cbfβ：正义链：5′-CGGACCAGAGGAGCAAGT-3′，反义链：5′-CCAGGCAACCCATACCAT -3′，360 bp，55 ℃，PCR 扩增，循环数 28 个。反应结束后，各取 5 μl 扩增产物，1.0% 琼脂糖凝胶电泳，用凝胶成像系统采集图像，Quantity one 4.6.2 分析灰度值。

1.2.6 双荧光素酶报告基因检测 将细胞裂解液保存在 EP 管中，取 50 μl 荧光素酶测试试剂加入 10 μl 细胞裂解液中混匀，放入荧光仪中测定萤火虫荧光素酶活性，随即加入 50 μl Stop & Glo Reagent 混匀，测定海肾荧光素酶活性，计算二者比值，分析结果。

1.3 统计学分析

实验均重复 3 次，数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，各样本采用均值比较，采用 SPSS 16.0 统计软件进行 t 检验。

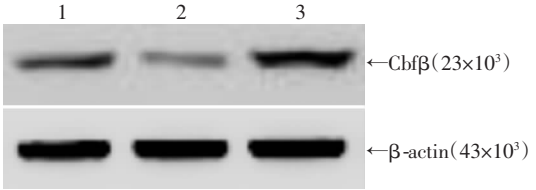
2 结果

2.1 构建 pMIR-REPORT-Cbfβ 质粒测序鉴定

重组质粒 pMIR-Cbfβ-2×PT、pMIR-Cbfβ-2×MRE、pMIR-Cbfβ-2×mut 经酶切分析为正确的克隆，基因测序生物公司的测序结果与合成的 Cbfβ3′UTR 端插入序列一致，证实构建的重组质粒正确。

2.2 Western blot 检测 miR-125b 对 Cbfβ 蛋白表达的影响

与 miRNA 阴性对照（1.030 8 ± 0.076 8）相比，转染了 miR-125b mimic 的细胞中 Cbfβ 蛋白表达量（0.511 5 ± 0.094 4）明显减少，降低了 50.37%（$P < 0.05$），而转染了 anti-miR-125b 的细胞中，Cbfβ 蛋白表达量（1.479 7 ± 0.184 6）升高了 43.55%（$P < 0.05$，图 1）。提示在 C3H10T1/2 细胞中，过表达的 miR-125b 能降低 Cbfβ 蛋白的表达，而 anti-miR-125b 能有效抵抗这种抑制作用。

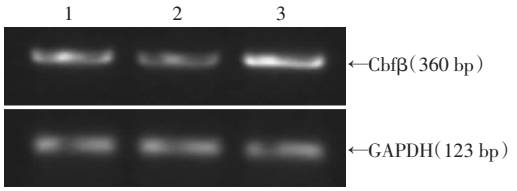


1：阴性对照；2：miR-125b；3：anti-miR-125b

图 1 过表达及干扰表达 miR-125b 后 Cbfβ 蛋白表达

2.3 RT-PCR 检测 miR-125b 对 Cbfβ mRNA 表达的影响

与阴性对照（0.904 8 ± 0.040 5）相比，转染了 miR-125b mimic 的细胞中 Cbfβ mRNA 表达量（0.787 9 ± 0.024 9）有所下降，降低了 12.91%（$P < 0.05$），而转染了 anti-miR-125b 的细胞中，Cbfβ mRNA 表达量（1.312 2 ± 0.017 6）升高了 45.03%（$P < 0.05$，图 2），表明在 C3H10T1/2 细胞中，过表达 miR-125b 能抑制 Cbfβ mRNA 表达，而用 anti-miR-125b 干扰 miR-125b 表达后能促进 Cbfβ mRNA 表达。

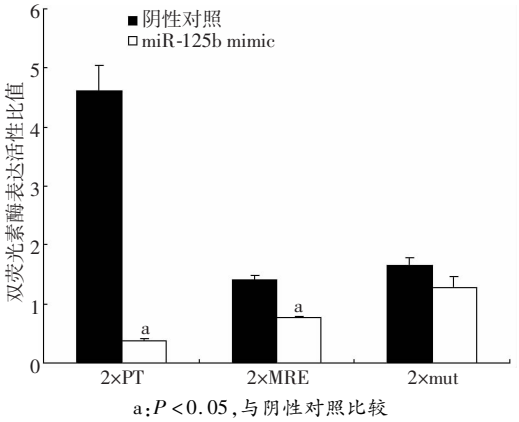


1:阴性对照;2:miR-125b;3:anti-miR-125b

图2 过表达及干扰表达 miR-125b 后 Cbfβ mRNA 表达

2.4 miR-125b 对 pMIR-Cbfβ-3′UTR 预测位点荧光素酶活性的作用

双荧光素酶报告基因检测结果显示,pMIR-Cbfβ-2×PT 组转染 miR-125b mimic 后荧光素酶活性相对于阴性对照下降了91.89%,证实了双荧光素酶报告基因实验体系的有效性。野生序列 pMIR-Cbfβ-2×MRE 在转染 miR-125b mimic 后的荧光素酶活性下降了45.05%($P<0.05$),而突变序列 pMIR-Cbfβ-2×mut 的结果与阴性对照之间的差异无统计学意义($P>0.05$,图3),提示 miR-125b 可抑制 Cbfβ 3′非翻译区预测位点荧光素酶报告基因的荧光素酶活性。



a:$P<0.05$,与阴性对照比较

图3 Cbfβ3′非翻译区预测结合位点双荧光素酶报告基因检测

3 讨论

miRNAs 是长度为22个核苷酸左右的非编码RNA,可通过和靶基因 mRNA 碱基配对引导沉默复合体降解 mRNA 或抑制 mRNA 的翻译,在转录后水平精确调控蛋白表达。相关研究表明,miRNAs 除了参与调控细胞增殖、肿瘤细胞转移外,也参与调控了干细胞定向分化,如 miR-204[8]、miR-17[9]等。miR-125b 是发现较早也是研究较多的 miRNA 之一,多数研究集中在 miR-125b 通过作用于 STAT3、BCL2、ErbB2 等基因调控肿瘤的发生[6,10-11]。

然而关于 miR-125b 在调控细胞分化方面的报道较少。Lee 等[12]通过 RNA 干扰的方法抑制 PC-3 细胞内 miR-125b 表达,发现下调 miR-125b 可抑制成熟分化后细胞的增殖,转染 miR-125b 后,可恢复细胞增殖。Mizuno 等[13]研究发现,在骨髓间充质干细胞 ST2 的增殖过程中,miR-125b 在细胞内的表达逐渐增加;当诱导间充质干细胞向成骨细胞分化时,细胞内 miR-125b 的表达减弱;向细胞内导入外源性 miR-125b 后,细胞的成骨分化受到抑制。另外,我们前期获得的间充质干细胞系 C3H10T1/2 成骨分化 microRNA 芯片结果显示,在细胞分化过程中,miR-125b 表达明显下调。以上结果表明 miR-125b 是调控骨髓间充质干细胞成骨分化的重要因子。

在间充质干细胞向成骨细胞分化过程中存在多水平的调控机制,多种激素及旁分泌和/或自分泌细胞因子被证实参与这一调节。其中,成骨细胞特异性转录因子核心结合因子 Cbfa1 是这一调节锁链上的一个中心环节,在成骨细胞分化和成熟过程中发挥着至关重要的作用[14-15]。而当与广泛存在的 Cbfβ 结合后,Cbfα1 的转录调控活性大为增加。Lien 等[3]发现当 Cbfβ 与 Cbfa1 一起转染时,可以较单纯 Cbfa1 明显提高成骨能力。并证实 Cbfβ 可以通过抑制泛素化介导的蛋白酶体降解,从而增加 Cbfa1 的稳定性,进而增强成骨诱导分化作用。目前对 Cbfβ 与 Cbfa1 结合形成异二聚体后参与下游成骨细胞相关基因的调节的研究较多,Cbfβ 基因的自身调节研究较少,有待进一步探索。因此,通过 PicTar predictions 靶标数据库预测,在 miR-125b 的众多的靶基因中,核心结合因子家族成员 Cbfβ 引起了我们的注意。双荧光素酶报告基因检测表明 miR-125b 可作用于 Cbfβ3′UTR。此外,在 C3H10T1/2 细胞中转染 miR-125b 或 anti-miR-125b,可明显负调控 Cbfβ 基因表达。以上证据提示 Cbfβ 是 miR-125b 的一个靶基因。

人类 Cbfβ 基因定位于16号染色体上,长度大约50 kb,包括6个外显子,作为调节成骨分化的转录因子,其重要性越来越引起许多学者的重视。Yoshida 等[16]的实验表明 Cbfβ 基因完全缺失纯合子小鼠死于胚胎的11.5~13.5 d,原因是肝造血的迟滞及中枢系统内出血,因此,要进行 Cbfβ 在骨发育过程中作用的研究有一定难度。通过转基因技术将 Gata1 启动子(仅表达于胚胎细胞)转染于 Cbfβ 基因完全缺失纯合子小鼠,可使其存活至出生,但会出现典型的侏儒伴四肢短小,体内有骨化的严重迟滞现象,并因无法呼吸而死亡。虽然 Cbfβ 调节成骨的机制研究正在逐步深入,但由于 Cbfβ 缺失后造成的限制(鼠出生后即刻死亡),在体研究结果还很肤浅,因此解决这一问题将成为今后研究的重点之一。

本课题已在体外证实了 Cbfβ 为 miR-125b 的一个靶基因,后续研究主要集中在 miR-125b 调控 Cbfβ 从而影响 Cbfa1 与 DNA 结合能力,下调成骨标志基因表达方面,并利用动物模型观察 miR-125b 对成骨作用的影响,明确相关分子作用机制。研究结果将为间充质干细胞的 micRNA 调控机制积累基础资料,并为干细胞成骨定向分化提供理论和实验依据。

参考文献:

[1] Khan A, Hyde R K, Dutra A, *et al*. Core binding factor beta (CBFB)

haploinsufficiency due to an interstitial deletion at 16q21q22 resulting in delayed cranial ossification, cleft palate, congenital heart anomalies, and feeding difficulties but favorable outcome[J]. Am J Med Genet A, 2006, 140(21): 2349-2354.
[2] Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2[J]. Cell Tissue Res, 2010, 339(1): 189-195.
[3] Lien C Y, Lee O K, Su Y. Cbfb Enhances the osteogenic differentiation of both human and mouse mesenchymal stem cells induced by Cbfa-1 *via* reducing its ubiquitination-mediated degradation[J]. Stem Cells, 2007, 25(6): 1462-1468.
[4] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431(7006): 350-355.
[5] Cordes K R, Sheehy N T, White M P, *et al*. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity[J]. Nature, 2009, 460(7256): 705-710.
[6] Liu L H, Li H, Li J P, *et al*. miR-125b suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells through down-regulation of STAT3[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 416(1/2): 31-38.
[7] Foshay K M, Gallicano G I. Small RNAs, big potential: the role of MicroRNAs in stem cell function[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2007, 2(4): 264-271.
[8] Huang J, Zhao L, Xing L, *et al*. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation[J]. Stem Cells, 2010, 28(2): 357-364.
[9] Liu Y, Liu W, Hu C, *et al*. MiR-17 modulates osteogenic differentiation through a coherent feed-forward loop in mesenchymal stem cells isolated from periodontal ligaments of patients with periodontitis[J]. Stem Cells, 2011, 29(11): 1804-1816.
[10] Willimott S, Wagner S D. miR-125b and miR-155 contribute to BCL2 repression and proliferation in response to CD40 ligand (CD154) in human leukemic B-cells[J]. J Biol Chem, 2012, 287(4): 2608-2617.
[11] Scott G K, Goga A, Bhaumik D, *et al*. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b[J]. J Biol Chem, 2007, 282(2): 1479-1486.
[12] Lee Y S, Kim H K, Chung S, *et al*. Depletion of human micro-RNA miR-125b reveals that it is critical for the proliferation of differentiated cells but not for the down-regulation of putative targets during differentiation[J]. J Biol Chem, 2005, 280(17): 16635-16641.
[13] Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, *et al*. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 368(2): 267-272.
[14] Bae J S, Gutierrez S, Narla R, *et al*. Reconstitution of Runx2/Cbfa1-null cells identifies a requirement for BMP2 signaling through a Runx2 functional domain during osteoblast differentiation[J]. J Cell Biochem, 2007, 100(2): 434-449.
[15] 朱丹, 谢鹏, 康权, 等. 基因芯片分析Wnt刺激后小鼠多潜能分化干细胞C3H10T1/2的差异基因表达[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(17): 1604-1606.
[16] Yoshida C A, Furuichi T, Fujita T, *et al*. Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development[J]. Nat Genet, 2002, 32(4): 633-638.

(**收稿**:2012-02-10;**修回**:2012-02-17)
(编辑 龙 亮)

文章编号:1000-5404(2012)11-1051-01

个案与短篇

2例消化道穿孔的内镜治疗

唐 静,骆 勇,杨 丹,沈文拥,吴 涛,刘爱民 (408000 重庆,重庆市涪陵中心医院消化内科)

[**关键词**] 消化道穿孔;内镜;钛夹
[**中图法分类号**] R570.5 [**文献标志码**] B

消化道穿孔的发生率较高,包括自发性穿孔及医源性穿孔,其中前者常见于消化性溃疡、肿瘤等;后者常见于内镜诊治过程中,因此对于其治疗甚为重要,临床常采用外科手术治疗[1]。近年来发展一些内镜下治疗消化道穿孔的案例,但目前对于消化道穿孔内镜治疗的文献报道较少见,故本研究以内镜下钛夹治疗消化道穿孔2例治疗过程予以报告。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择2010年7月至2011年10月在我院消化内镜中心内镜诊疗过程中发生的消化道穿孔,且穿孔直径<0.5 cm,既往无糖尿病、结核等基础疾病,平均年龄为61岁患者为研究对象,并征求患者及家属意见后给予内镜下穿孔封闭治疗,共2例。其中1例为门诊患者,71岁男性,乙状结肠穿孔发生在结肠镜检查过程中;另1例为住院患者,50岁,女性,胃穿孔发生在胃底间质瘤内镜下黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)中。

1.2 器械与方法

1.2.1 器械 胃镜、肠镜、金属钛夹。

1.2.2 方法 ①出现穿孔后,在暴露病灶同时少注气或者适当吸气;若局部伴出血,可适当反复充气、吸气后较充分地暴露病变组织,同时必要时可予以局部止血治疗。②将金属钛夹安装于可旋式夹闭器上,并插至内镜前端后拉塑料外套管,露出钛夹。③缓慢地收紧,使夹子充分张开至最大角度,并根据病灶具体位置将夹子方向进行旋转,同时调整内镜最终使夹子与病灶呈垂直方向接触,确保夹子接触两侧黏膜后收紧钛夹,取出置放器。④根据病灶大小决定放置钛夹数量及方式。

2 结果

2例患者经内镜下钛夹封闭治疗后(图1)住院给予常规禁食禁饮、抑酸、止血、抗感染、营养支持、补液等治疗。并完善血常规、腹部彩超等检查。两患者平均住院时间为8 d,均好转出院。肠穿孔患者出院后2个月来我院门诊随访并复查肠镜;胃穿孔患者出院后15 d来我院门诊复查胃镜,且两者内镜下均未见明显异常(图2)。

(下转1078页)

[**通信作者**] 刘爱民,电话:(023)72220721,E-mail:aiminliu@medmail.com.cn