论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201501180

miRNA-29b 调控骨髓间充质干细胞来源的软骨细胞肥大化的作用研究

苗 莹[1,2],赵春容[2],康 菲[2],闫演飞[2],董世武[2] (400038 重庆,第三军医大学:基础医学部解剖学教研室[1],生物工程学院生物医学材料学教研室[2])

[摘要] **目的** 探讨 miR-29b 在骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)分化为软骨细胞时,对细胞肥大化进程的调控作用。**方法** 培养 BMSCs 并进行软骨细胞肥大化方向的诱导,检测软骨细胞标志基因Ⅱ型胶原(Col Ⅱ)、肥大化细胞标志基因Ⅹ型胶原(Col Ⅹ和 Runx2),并用特异性染色法确定细胞肥大化诱导成功,再检测 miR-29b 在转录水平的表达情况。然后将实验分为 miR-29b 过表达(miR-29b mimics)和 miR-29b 抑制(miR-29b 抑制剂)两组,每组分别设置空白对照组,分别检测两处理组中上述软骨细胞和肥大化细胞相关标志的表达变化。**结果** miR-29b 过表达组中,Col Ⅱ表达与对照组相比显著降低($P<0.05$),Col Ⅹ和 Runx2 表达显著升高($P<0.05$);而 miR-29b 抑制组中,Col Ⅱ的表达与对照组相比显著升高($P<0.05$),Col Ⅹ和 Runx2 显著降低($P<0.05$)。**结论** miR-29 可以有效促进 BMSCs 向肥大化的软骨细胞分化,而抑制 miR-29b 可降低 BMSCs 来源的软骨细胞的肥大化。

[关键词] miR-29b;间充质干细胞;软骨细胞;肥大化
[中图法分类号] R322.71;R329.21;R329.23 [文献标志码] A

Effect of miRNA-29b on regulating hypertrophy of bone marrow mesenchymal stem cell-derived chondrocytes

Miao Ying[1,2], Zhao Chunrong[2], Kang Fei[2], Yan Yanfei[2], Dong Shiwu[2] ([1]Department of Anatomy, College of Basic Medical Sciences, [2]Department of Biomedical Materials, College of Bioengineering, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of miR-29b on regulating cell hypertrophy in the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) into chondrocytes. **Methods** BMSCs were cultured and induced into hypertrophic chondrocytes. Collagen type Ⅱ (Col Ⅱ, marker of chondrocytes) and collagen type X (Col X, marker of hypertrophic chondrocytes) were detected by qRT-PCR. Safranin O staining was employed to confirm the hypertrophic state of the chondrocytes, and then the expression of miR-29b in the transcriptional level was detected by qRT-PCR. In the experiment, the BMSCs were divided into the following groups: miR-29b over-expression group, miR-29b inhibition group, over-expression negative control group and inhibition negative control group. The expression of the related markers in the 4 groups were detected. **Results** In the miR-29b mimics group, the expression of Col Ⅱ was decreased significantly compared with the control group ($P<0.05$), while the expression of Col X and Runx2 was significantly increased ($P<0.05$). However, the expression of Col Ⅱ in the miR-29b inhibition group was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$), while that of Col X and Runx2 was significantly reduced ($P<0.05$). **Conclusion** MiR-29 can effectively promote hypertrophy of BMSC-derived chondrocytes, and the inhibition of miR-29 can stabilize the phenotype of BMSC-derived chondrocytes.

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81271980);国家重点基础研究发展计划(973 计划,2011CB964701);国家科技支撑计划(2012BAI42G01)
[通信作者] 董世武,电话:(023)68771270,E-mail:dongshiwu@tmmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150327.1431.029.html(2015-03-27)

[**Key words**] miR-29b; mesenchymal stem cells; chondrocytes; hypertrophy

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271980), the National Basic Research Program (973 program, 2011CB964701) and the National Key Technology Research and Development Program of China (2012BAI42G01). Corresponding author: Dong Shiwu, Tel: 86-23-68771270, E-mail: dongshiwu@tmmu.edu.cn

创伤、骨关节炎、肿瘤等多种原因均可导致骨关节表面的关节软骨受损,常进行性加重并严重影响患者的生活质量。但是关节软骨自身缺乏修复能力,因此运用组织工程学结合细胞生物学和生物材料学方法对受损组织进行修复,成为关节软骨缺损修复的理想方案[1-2]。其中,骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells,BMSCs)被认为是修复软骨组织缺损的理想细胞[3]。但BMSCs经诱导生成的软骨细胞难以维持软骨细胞稳态,部分细胞呈现肥大化表型,导致软骨细胞提前进入终末阶段,继而发生细胞凋亡、血管侵入和基质钙化等现象,严重影响BMSCs的软骨修复功能[4]。因此,如何抑制MSCs成软骨分化后的肥大化进程,稳定MSCs来源的软骨细胞表型,已成为进一步推进MSCs用于关节软骨修复中急需解决的问题。

微小RNA(miRNA)参与细胞内基因转录后的正性和负性调控,在BMSCs等干细胞的干性维持和定向分化中发挥重要作用[5]。其中,文献[6]报道已证明miR-29b在BMSCs成骨分化中具有正性调节作用,且组蛋白去乙酰化酶4(histone deacetylase 4,HDAC4)是其下游靶基因之一[7]。鉴于HDAC4对软骨细胞肥大化标志基因Runx2具有抑制效应,我们推测miR-29b很可能通过调节其下游的HDAC4而影响BMSCs成软骨细胞分化的过程,使之向肥大化的软骨细胞分化。因此,本研究拟通过本课题组前期建立的方法诱导BMSCs分化为软骨细胞,应用miR-29b过表达和miR-29b抑制技术,探究miR-29b对BMSCs来源的软骨细胞肥大化的作用机制,既可为BMSCs的miRNA调控机制积累基础资料,又可为成体干细胞成软骨定向分化提供一定的理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠BMSCs细胞株(C3H10T1/2),购自中科院上海细胞库;DMEM/F12培养基、胎牛血清(FBS)及胰酶(HyClone);miR-29b mimics、miR-29b抑制剂及对照(吉玛);脂质体2000、TRIzol(Invitrogen);成软骨诱导培养基(赛业);逆转录试剂盒、RT-PCR(TaKaRa);番红O固绿试剂盒(江莱)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将小鼠BMSCs细胞用含10% FBS的DMEM/F12培养基培养,置于5% CO_2、37 ℃的细胞培养箱中培养。当细胞融合到约80%时,常规消化细胞,并按1∶2传代培养。

1.2.2 BMSCs成软骨细胞肥大化诱导 待细胞长满约80%后经消化离心,用含TGF-β3的完全软骨诱导培养基重悬细胞,并分装于15 mL离心管中,每管0.5 mL含2.5×10^5个细胞,离心成细胞微团,置于培养箱培养。软骨诱导14 d后,实验组换为肥大诱导基:不含TGF-β3的软骨诱导培养基,并将地塞米松浓度由100 nmol/L降为1 nmol/L,并加入100 ng/L的T3。对照组培养基不变。每3天更换培养基。

1.2.3 转染BMSCs 在BMSCs细胞成软骨诱导第10天对miR-29b进行干预,实验分组为:过表达组转染miR-29b mimics;过表达对照组,转染miRNA阴性对照;抑制组,转染miR-29b抑制剂;抑制对照组,转染miRNA抑制剂对照。每组加100 nm干预试剂,首次转染加倍,每3天转染1次。

1.2.4 qRT-PCR检测 按TRIzol法提取总RNA,以U6作为内参检测miR-29b的表达,U6、miR-29b引物由北京旷博设计合成。按miRNA反转录试剂盒以及qRT-PCR检测试剂盒操作。

检测Col Ⅱ、Col Ⅹ和Runx2的mRNA表达,以GAPDH为内参。引物由TaKaRa公司合成,Col Ⅱ:上游引物5′-TCCAGGGCTCCAATGATGTAGA-3′,下游引物5′-TGACGGTCTTGCCCCACTTAC-3′;Col Ⅹ:上游引物5′-CTTTCTGGGATGCCGCTTGT-3′,下游引物5′-GGGTCGTAATGCTGCTGCCTA-3′;Runx2:上游引物5′-CCAACTTCCTGTGCTCCGTG-3′,下游引物5′-ATAACAGCGGAGGCATTTCG-3′;GAPDH:上游引物5′-GACATCAAGAAGGTGGTGAAGC-3′,下游引物5′-GAAGGTGGAAGAGTGGGAGTT-3′。将总RNA反转录为cDNA,反应体系20 μL,反应体系按Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser:42 ℃,15 min;85 ℃,5 s;4 ℃保存。将反转录的cDNA按SYBR Premix *Ex Taq* Ⅱ进行qRT-PCR检测,反应体系为20 μL,反应程序:95 ℃,30 s;95 ℃,5 s,60 ℃,30 s,共40个循环;95 ℃,5 s;55 ℃,30 s;72 ℃,30 s。数据采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行分析。

1.2.5 番红O固绿复染 将1.2.4中的石蜡切片的细胞团,常规脱蜡至水,按番红O固绿染色液说明

书操作:加入新鲜的 Weigert 染液染色 3 ~ 5 min,酸性乙醇分化液分化 15 s。ddH_2O 洗 1 min。固绿液浸染 5 min,番红 O 染色 1 ~ 2 min,ddH_2O 洗 1 min,乙酸溶液浸泡 1 ~ 2 min,ddH_2O 洗 1 min,脱水,透明,封片。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$。

2 结果

2.1 特异性染色确定软骨细胞肥大化程度

本实验采用课题组既往建立的软骨细胞肥大化诱导方法,利用番红 O 固绿复染法来确定 BMSCs 来源的软骨细胞是否被肥大化诱导成功。番红 O 将细胞外基质中的硫酸软骨素染成红色,固绿将细胞核染成绿色。本研究结果显示,肥大化组和对照组中,硫酸软骨素分泌量均随着诱导时间延长而逐渐增多,但在相同诱导时间内,肥大化组中软骨素成分较对照组(软骨化组)明显下调,尤其在 28 d 时差异最为明显(图 1)。

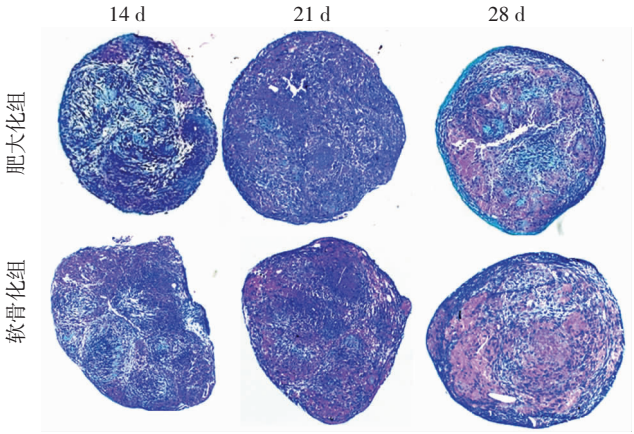


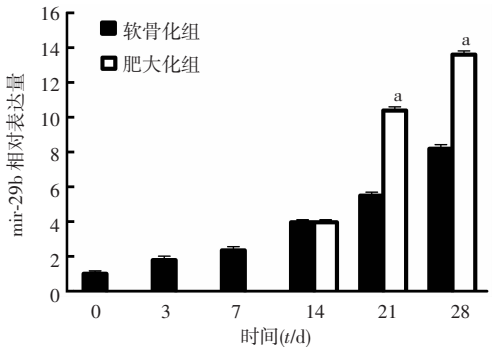
图 1 番红 O 固绿复染法检测软骨肥大化进程中硫酸软骨素的表达量 (×40)

2.2 体外诱导 BMSCs 成软骨肥大化

在软骨细胞分化到肥大化的进程中利用 qRT-PCR 检测发现:Col Ⅱ在软骨分化阶段(第 3 ~ 14 天)呈上升趋势,而在肥大化阶段(第 21 ~ 28 天)呈下降趋势,且在肥大化阶段肥大化组 Col Ⅱ的表达量显著下降($P < 0.05$,图 2A);Ⅹ型胶原 Col Ⅹ的表达量在软骨细胞肥大化过程中随着诱导时间延长而升高,且在肥大化阶段肥大化组 Col Ⅹ的表达量显著升高($P < 0.05$,图 2B);Runx2 在软骨分化阶段表达较低,而进入肥大化阶段,Runx2 的表达量显著升高($P < 0.05$,图 2C)。结合 2.1 部分的结果,提示肥大化组中软骨细胞的肥大化诱导成功。

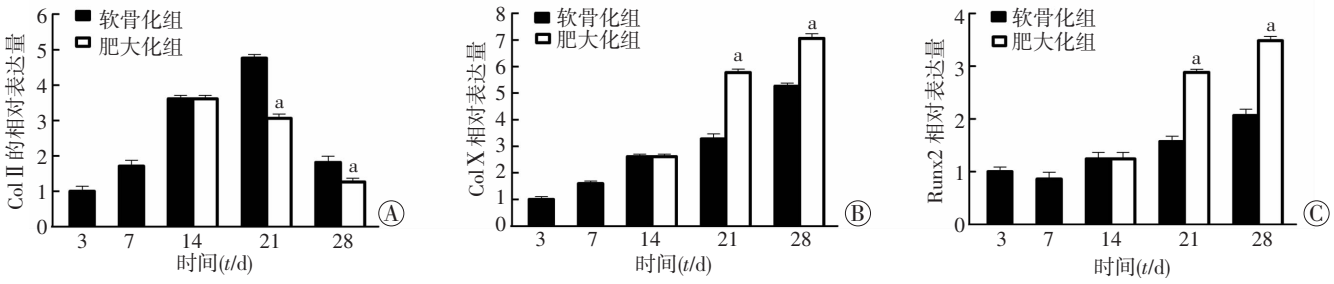
2.3 qRT-PCR 检测 miR-29b 在成软骨肥大化中的表达

运用 qRT-PCR 法检测 BMSCs 来源的软骨细胞在肥大化诱导过程中 miR-29b 的表达情况,发现软骨化组和肥大化组细胞中 miR-29b 均随着诱导时间的延长而升高;而且 miR-29b 在成软骨分化阶段表达较低,但在肥大化阶段显著上调,肥大组的表达显著高于软骨化组($P < 0.05$,图 3)。



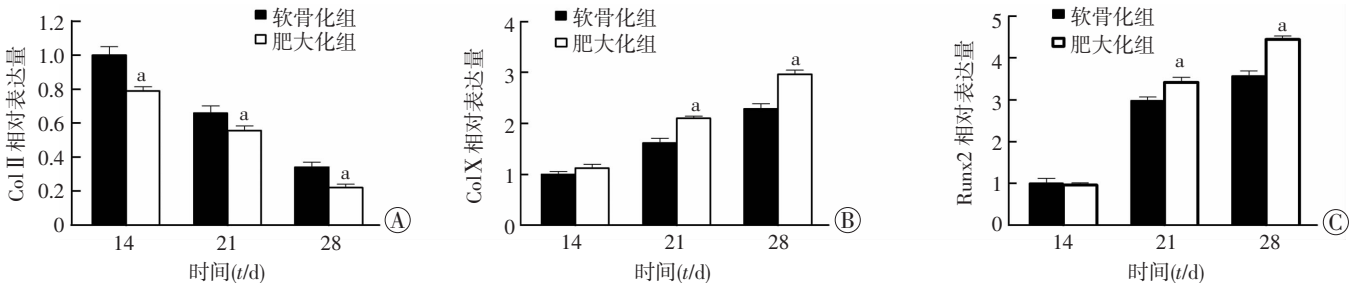
a:$P < 0.05$,与软骨化组(对照组)比较

图 3 qRT-PCR 检测软骨细胞肥大化过程中 miR-29b 的表达情况



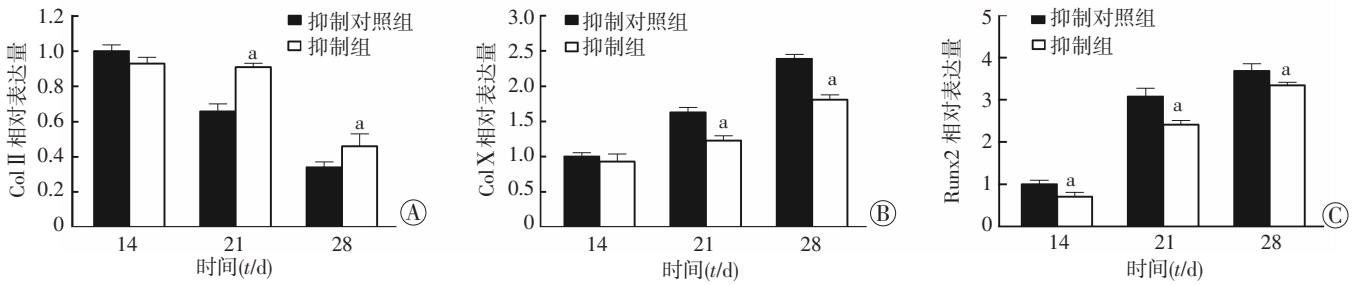
A:Col Ⅱ; B:Col Ⅹ; C: Runx2 a:$P < 0.05$,与软骨化组(对照组)比较

图 2 qRT-PCR 检测诱导软骨细胞肥大化过程中 Col Ⅱ和 Col Ⅹ的 mRNA 相对表达



A:Col Ⅱ;B:Col X;C: Runx2 a:$P<0.05$,与软骨化组(对照组)比较

图 4 qRT-PCR 检测 miR-29b 转染不同时间后的肥大相关基因相对表达情况



A:Col Ⅱ;B:Col X;C: Runx2 a:$P<0.05$,与抑制对照组比较

图 5 qRT-PCR 检测 miR-29b 抑制剂转染不同时间后的肥大相关基因相对表达情况

2.4 miR-29b 过表达后软骨细胞标志基因和肥大化相关基因的表达

将上述进行肥大化诱导的软骨细胞进行 miR-29b 过表达,在肥大化阶段(培养第 14 天以后),软骨细胞标志 Col Ⅱ在转录水平的表达下降,显著低于对照组($P<0.05$,图 4A);而肥大化相关标志 Col X、Runx2 的表达升高,且在第 21 天以后显著高于对照组($P<0.05$,图 4B、C)。

2.5 miR-29b 受抑制后软骨细胞标志基因和肥大化相关基因的表达

将 miR-29b 抑制剂加入到肥大化诱导的软骨细胞培养体系中,在肥大化阶段第 21 天以后,软骨细胞标志 Col Ⅱ在转录水平表达升高,显著高于抑制对照组($P<0.05$,图 5A);而肥大化相关标志 Col X、Runx2 的表达显著低于抑制对照组($P<0.05$,图 5B、C)。

2.6 miR-29b 受抑制后特异性染色

利用番红 O 固绿复染法确定:在 miR-29b 抑制剂干预下,BMSCs 来源的软骨细胞是否会肥大化进程延迟。番红 O 将细胞外基质中的硫酸软骨素染成红色,固绿将细胞核染成绿色。本研究结果显示,抑制组和对照组中,硫酸软骨素分泌量均随着诱导时间延长而逐渐增多,但在相同诱导时间内,抑制组中软骨素成分较对照组明显上调,尤其在 21、28 d 时差异最为明显(图 6)。结合 2.5 结果,提示 miR-29b 抑制剂会抑制软骨肥大化进程。

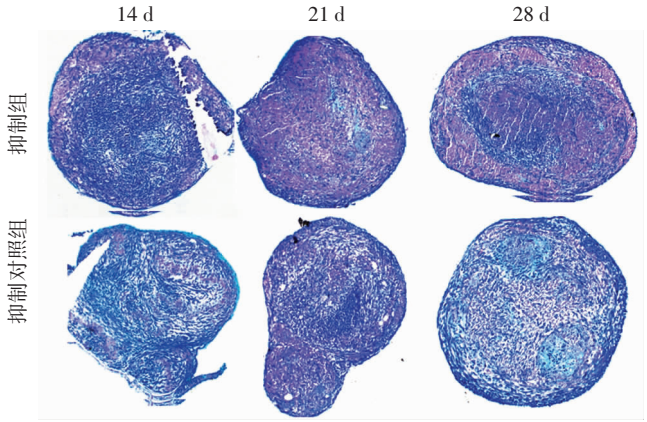


图 6 番红 O 固绿复染法检测 miR-29b 抑制剂干预下软骨肥大化进程中硫酸软骨素的表达量 (×40)

3 讨论

BMSCs 来源的软骨细胞因具有众多优势而在骨组织工程修复研究方面备受关注[8]。在正常的软骨内成骨过程需要经历间充质细胞聚集和增殖,成软骨细胞分化,成熟软骨细胞肥大化,深层基质部分钙化和血管侵入,骨细胞和基质生成等 5 个阶段[3]。但在软骨修复领域中,工程化软骨细胞过早地出现肥大化是影响软骨功能稳定性的重要因素,因此探究如何减缓或消除软骨细胞的肥大化成为 BMSCs 用于软骨组织修复的关键问题[9]。软骨肥大化过程受多种转录因子的影响与调控,其中转录因子 Sox9 和 Runx2 对于干细胞成软骨分化过程十分关键,且两者在表达上呈现明显的负相关,两者形成的 Sox9-Runx2 平衡是调节肥

大化进程的核心[10-11]，HDAC4 在调控 Sox9-Runx2 平衡中居于中心地位[12]。

miRNA 是一类可以精确调节靶基因实时表达的非编码单链 RNA，参与机体多种生理活动和涉及多种疾病，已成为生物医学领域研究的热点[13]。miRNA 的作用机制为研究成软骨分化过程中 Sox9-Runx2 平衡的调控提供了一种全新的思路。最近，miR-29b 因其与纤维化疾病紧密相关而受到关注[14]。miR-29b 含有核定位作用的六核苷酸，该序列使之位于细胞核内发挥功能[15]。有研究显示，在成体干细胞成骨分化的过程中 miR-29b 的表达上调，并可能促进了干细胞的成骨分化，而在此过程中可能对同在细胞核内发挥作用的 HDAC4 进行调节[16]。HDAC4 可以和 Runx2 结合，从而抑制 Runx2 和 DNA 的结合，从而调节包括软骨细胞肥大分化在内的一些生物学功能。因此，研究 miR-29b 在 BMSCs 成软骨分化中，尤其是肥大化进程中的作用具有重要的意义。

本课题组前期已建立了稳定的体外诱导软骨细胞肥大化模型[17]，本研究在此基础上，探讨 miR-29b 对软骨分化过程中肥大化进程的影响。研究发现在 BMSCs 向肥大化的软骨细胞分化过程中，miR-29b 的表达量逐渐增加，提示其可能为肥大化的一种正性调节因子。继而，将进行肥大化诱导的软骨细胞进行 miR-29b 过表达，软骨细胞标志基因 Col Ⅱ的表达较对照组显著下调；而肥大化相关标志基因 Col Ⅹ的表达升高，且在第 21 天以后显著高于对照组，这些结果提示胞内 miR-29b 表达上调可以促进软骨细胞的肥大化进程，表明 miR-29b 是促进肥大化进程的重要因素。抑制 miR-29b 表达时，发现在肥大化阶段第 21 天以后，Col Ⅱ表达较对照组显著升高，而 Col Ⅹ的表达较对照组显著降低，这提示 miR-29b 受抑制后，软骨细胞的肥大化进程可能受阻，即通过抑制 miR-29b，可望推迟软骨细胞的肥大化进程，以期达到稳定细胞表型的目的。但是，miR-29b 抑制剂究竟在软骨肥大化进程中的哪一个阶段开始起抑制效应的，还需要进一步探讨。

总之，本实验证实了 miR-29b 对 BMSCs 来源的软骨细胞的肥大化进程具有重要的正性调控作用，该结果有望为稳定 BMSCs 来源的软骨细胞表型，并应用于调控组织工程软骨种子细胞的分化命运提供实验依据。

参考文献：

[1] Wang C C, Yang K C, Lin K H, *et al*. Cartilage regeneration in SCID mice using a highly organized three-dimensional alginate scaffold[J]. Biomaterials, 2012, 33(1): 120-127.

[2] Madeira C, Santhagunam A, Salgueiro J B, *et al*. Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration[J]. Trends Biotechnol, 2015, 33(1): 35-42.

[3] Baghaban-Eslaminejad M, Malakooty-Poor E. Mesenchymal stem cells as a potent cell source for articular cartilage regeneration[J]. World J Stem Cells, 2014, 6(3): 344-354.

[4] Mueller M B, Tuan R S. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells [J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(5): 1377-1388.

[5] Chen J, Deng S, Zhang S, *et al*. The role of miRNAs in the differentiation of adipose-derived stem cells[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2014, 9(3): 268-279.

[6] Wu K, Song W, Zhao L, *et al*. MicroRNA functionalized microporous titanium oxide surface by lyophilization with enhanced osteogenic activity[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2013, 5(7): 2733-2744.

[7] Trompeter H I, Dreesen J, Hermann E, *et al*. MicroRNAs miR-26a, miR-26b, and miR-29b accelerate osteogenic differentiation of unrestricted somatic stem cells from human cord blood[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 111.

[8] Lu C H, Chang Y H, Lin S Y, *et al*. Recent progresses in gene delivery-based bone tissue engineering[J]. Biotechnol Adv, 2013, 31(8): 1695-1706.

[9] Caldwell K L, Wang J. Cell-based articular cartilage repair: the link between development and regeneration[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(3): 351-362.

[10] Quintana L, zur-Nieden N I, Semino C E. Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis: new paradigms for cartilage tissue engineering[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2009, 15(1): 29-41.

[11] Shintaku Y, Murakami T, Yanagita T, *et al*. Sox9 expression during fracture repair[J]. Cells Tissues Organs, 2011, 194(1): 38-48.

[12] Pei M, Chen D, Li J, *et al*. Histone deacetylase 4 promotes TGF-beta1-induced synovium-derived stem cell chondrogenesis but inhibits chondrogenically differentiated stem cell hypertrophy[J]. Differentiation, 2009, 78(5): 260-268.

[13] Yoo J K, Kim C H, Jung H Y, *et al*. Discovery and characterization of miRNA during cellular senescence in bone marrow-derived human mesenchymal stem cells[J]. Exp Gerontol, 2014, 58: 139-145.

[14] Liu Y, Taylor N E, Lu L, *et al*. Renal medullary microRNAs in Dahl salt-sensitive rats: miR-29b regulates several collagens and related genes[J]. Hypertension, 2010, 55(4): 974-982.

[15] Hwang H W, Wentzel E A, Mendell J T. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import[J]. Science, 2007, 315(5808): 97-100.

[16] Li Z, Hassan M Q, Jafferji M, *et al*. Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation[J]. J Biol Chem, 2009, 284(23): 15676-15684.

[17] 康菲，杨波，闫演飞，等. miR-145 在间充质干细胞来源软骨细胞肥大化中的作用[J]. 第三军医大学学报，2013，35(11)：1058-1061.

（收稿：2015-01-23；修回：2015-03-02）

（编辑 王 红）