DOI:10.16016/j.1000-5404.202101053

miR-370-3P 通过调节 JAK2/STAT5B 信号通路抑制人关节软骨细胞增殖

陈蓝妮,张惠姣,徐雪姣,许 珂,朱 岷 400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院内分泌科,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室

[**摘要**] **目的** 研究非编码单链 RNA(micro RNA,miRNA)miR-370-3P 是否通过调控 JAK2/STAT5B 信号通路调节人关节软骨细胞(human chondrocytes- articular,HC-a)的增殖,并探讨其潜在作用机制。**方法** ①通过脂质体转染 HC-a 细胞构建 miR-370-3P 过表达/低表达人关节软骨细胞模型,分为 5 组:miR-370-3P 模拟物 mimic 组(miR-370-3P 过表达组)、miR-370-3P 遏制物 inhibitor 组(miR-370-3P 低表达组)、正常对照组、mimic 空载体对照组(mimic normal control,mNC)、inhibitor 空载体对照组(inhibitor normal control,iNC)。②miRNA 实时荧光定量 PCR 检测各组 HC-a 细胞 miR-370-3P 的表达。③qRT-PCR 检测各组 HC-a 细胞 JAK2、STAT5B mRNA 表达。④Western blot 检测各组 HC-a 细胞中 JAK2、STAT5B 蛋白表达。⑤MTT 比色法检测各组 HC-a 细胞相对增殖情况。⑥双荧光素酶实验:构建 JAK2、STAT5B 野生型和突变型双荧光素酶报告基因载体,分别与 miR-370-3P 模拟物和阴性对照序列共转染 293T 细胞,检测各组荧光素酶活性。**结果** miRNA 实时荧光定量 PCR 结果显示:与正常对照组相比,mimic 组 miR-370-3P 表达上调($P<0.05$),inhibitor 组 miR-370-3P 表达下调($P<0.05$),且空载体对照组和正常对照组之间的差异无统计学意义,表明 miR-370-3P 过表达/低表达软骨细胞模型构建成功。qRT-PCR 结果显示:相比于正常对照组,JAK2 和 STAT5B 在 mimic 组的 mRNA 相对表达量下调,在 inhibitor 组 JAK2 mRNA 和 STAT5B mRNA 相对表达量上调($P<0.05$)。Western blot 检测结果显示:JAK2 和 STAT5B 蛋白表达在 mimic 组也有显著下调,在 inhibitor 组上调。MTT 检测结果显示:miR-370-3P 的过表达会降低 HC-a 的存活率($P<0.05$),提示 miR-370-3P 的过表达会抑制人关节软骨细胞(HC-a)的增殖。双荧光素酶实验结果显示:miR-370-3P 和 JAK2-WT(野生型)、STAT5B-WT(野生型)质粒共转染后,荧光表达较对照组有显著下调($P<0.05$),提示 miR-370-3P 可与 JAK2-3′UTR、STAT5B-3′UTR 直接结合发挥作用。**结论** miR-370-3P 可通过直接靶向调控 JAK2/STAT5B 信号通路进而抑制人关节软骨细胞(HC-a)的增殖。

[**关键词**] miR-370-3P;JAK2/STAT5B;人关节软骨细胞;细胞增殖
[**中图法分类号**] R322.72; R392.28; R394.3 [**文献标志码**] A

MiR-370-3P inhibits proliferation of human articular chondrocytes by regulating JAK2/STAT5B signaling pathway

CHEN Lanni, ZHANG Huijiao, XU Xuejiao, XU Ke, ZHU Min Department of Endocrinology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing, 400014, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate whether the non-coding single chain RNA miR-370-3P regulates the proliferation of human articular chondrocytes (HC-a) through the JAK2/STAT5B signaling

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81170723)
[**通信作者**] 朱 岷,E-mail:zhumin323@aliyun.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

pathway and to explore its potential mechanism. **Methods** The over-/under-expression of miR-370-3P models were constructed by transfecting HC-a cells, and then the cells were divided into 5 groups: miR-370-3P mimic group (over-expression group), miR-370-3P inhibitor group (under-expression group), mimic normal control group (mNC group), inhibitor normal control group (iNC group), and normal control group (NC group). The mRNA levels of miR-370-3P, JAK2 and STAT5B in each group were detected by qRT-PCR, and the protein levels of JAK2 and STAT5B were determined using Western blotting. In addition, MTT assay was adopted to measure the proliferation of HC-a cells in each group, and the binding of miR-370-3P with JAK2 and STAT5B was detected by dual luciferase assay. **Results** As compared with the NC group, the mRNA expression of miR-370-3P was upregulated in the mimic group and down-regulated in the inhibitor group ($P<0.05$), indicating successful construction of miR-370-3P over-expression/under-expression models. By contrast, the mRNA expression of JAK2 and STAT5B was decreased in the mimic group and increased in the inhibitor group ($P<0.05$), with no significant difference between the empty vector control groups (mNC and iNC groups) and the NC group. Western blotting results also confirmed the down-regulation of JAK2 and STAT5B in the mimic group and upregulation in the inhibitor group ($P<0.05$). MTT assay showed that miR-370-3P overexpression reduced the survival rate of HC-a cells ($P<0.05$), suggesting an inhibitory effect on HC-a cells proliferation. The results of dual luciferase assay displayed that after miR-370-3P was co-transfected with JAK2 (wild type) as well as STAT5B (wild type), the fluorescence intensity was significantly down-regulated compared with the control group ($P<0.05$), indicating that miR-370-3P can directly bind to JAK2-3′UTR and STAT5B-3′UTR to function. **Conclusion** miR-370-3P can inhibit the proliferation of HC-a cells by direct regulation of JAK2/STAT5B signaling pathway.

[**Key words**] miR-370-3P; JAK2/STAT5B; human articular chondrocytes; cell proliferation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81170723). Corresponding author: ZHU Min, E-mail: zhumin323@aliyun.com

矮小症是指身高低于同年龄、同性别健康人身高均值两个标准差以上或处于第3百分位以下。矮小症的病因众多,但目前对于矮小症的治疗方式有限,所以探索矮小症的发生、发展机制成为课题组研究的重要方向。人的身高主要取决于四肢长骨的纵向生长,生长板是位于骨骺和干骺端之间的软骨组织,是四肢长骨纵向生长的关键[1]。人矮小同源盒基因(short stature homobox,SHOX)自胚胎12周起至青春期持续表达于生长板,调节生长板软骨的形成和发育,进而影响肢体骨骼的发育和线性生长[2-3]。且SHOX基因具有剂量依赖性,SHOX基因单倍体剂量不足和多倍体高剂量在临床上分别表现为矮身材和高身材[3],且在临床上SHOX基因单倍体剂量不足(低表达)常常与特发性矮小(idiopathic short stature,ISS)、特纳综合征[4]以及Leri-Weill软骨骨生成障碍[5]密切相关。

越来越多的证据表明非编码单链RNA(micro RNA,miRNA)在调节骨发育的过程中发挥着重要作用[6]。miR-370-3P是本课题组前期在SHOX过/低表达的人关节软骨细胞(human chondrocytes- articular,HC-a)模型中筛选的差异表达的miRNA,在SHOX基因低表达组miR-370-3P较正常对照组表达量升高,提示我们miR-370-3P可能也参与SHOX基因缺陷相关性矮小症以及骨骼发育异常的调节过程[3]。

miRNA靶向预测软件提示JAK2、STAT5B可能为其潜在的靶向分子。生长激素(growth hormone,GH)-胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor 1,IGF1)生长激素轴是调节生长板的重要的神经内分泌轴,其中JAK2/STAT5B是参与生长激素轴的重要信号通路[7]。本研究拟以人关节软骨细胞(HC-a)为研究对象,通过脂质体转染构建miR-370-3P过表达/低表达人关节软骨细胞模型,探讨miR-370-3P是否通过影响JAK2/STAT5B信号通路参与软骨细胞的增殖过程,为进一步理解miR-370-3P参与SHOX基因缺陷相关性矮小症的发生、发展机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

包括:293T细胞(由重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所中心实验室保存),HC-a、CM培养基、软骨细胞生长添加物、青-链霉素、胎牛血清(均订购于美国

ScienCell 实验室),胰蛋白酶(北京百泰克生物技术有限公司),反转录试剂盒、SYBR QPCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司),miR-370-3P mimics/inhibitor/mNC/iNC(上海生工生物工程有限公司),miRNA U6 内参引物、miRNA 引物(北京天根生化科技有限公司),TRIzol、Lipofectamine™ 2000、Opti-MEM(美国 Invitrogen 公司),全蛋白提取试剂盒(江苏凯基生物技术有限公司),5×上样缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司),预染蛋白 marker(美国 Thermo 公司),SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(上海雅酶生物科技有限公司),兔多克隆抗 JAK2、STAT5B 一抗(美国 Abcam 公司),兔多克隆抗 β-actin 一抗、山羊抗兔二抗(北京博奥森生物技术有限公司),PVDF 膜、化学发光 HRP 底物 ECL 发光液(美国 Millipore 公司)。

1.2 *方法*

1.2.1 Targetscan Human7.2 miRNA 靶向预测软件预测靶基因 使用 TargetScan Human7.2 (http://www.targetscan.org)miRNA 的靶基因生物信息学预测软件对 miR-370-3P 的靶基因及其预测结合位点并进行分析预测。

1.2.2 过表达/低表达 miR-370-3P 的 HC-a 细胞模型构建 在无菌条件下,HC-a 细胞置于含 5%胎牛血清、1%青-链霉素、1%软骨细胞生长添加物的 CM 培养基中,于 37 ℃、5%CO_2 恒温孵箱中培养。Lipofectamine 2000、Opti-MEM 进行 miR-370-3P 转染,分为 5 组:miR-370-3P 模拟物 mimic 组(miR-370-3P 过表达组)、miR-370-3P 遏制物 inhibitor 组(miR-370-3P 低表达组)、正常对照组、空载体对照组(mimic normal control,mNC)和空载体对照组(inhibitor normal control,iNC),在无血清培养基中转染 4 h 后,换含有 5%胎牛血清的 CM 培养基继续培养。

1.2.3 RT-PCR 检测 miR-370-3P 转染效率 miR-370-3P 转染 HC-a 细胞 24 h 后,用 TRIzol 提取总 RNA,以 U6 为内参,采用 miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒对 miR-370-3P 进行加尾法反转录及扩增,反转录反应条件:42 ℃ 60 min、95 ℃ 2 min,进行 miRNA 加 A 尾反应和反转录反应,95 ℃ 3 min 酶失活反应;qRT-PCR 反应条件:95 ℃ 15 min(起始模板变性),94 ℃ 20 s PCR(循环中模板变性)、60 ℃ 34 s(退火、延伸)共 40 个循环,检测各组 miR-370-3P 相对表达量。

1.2.4 RT-PCR 检测各组 JAK2、STAT5B mRNA 表达量 miR-370-3P 转染 HC-a 细胞 24 h 后,用 TRIzol 提取总 RNA,以 GAPDH 为内参,采用 RT-PCR 试剂盒对 miR-370-3P 过表达组、miR-370-3P 低表达组、正常对照组、mimic NC 组和 inhibitor NC 组 JAK2、STAT5B 进行反转录和扩增,反转录的条件设定为 42 ℃ 2 min、37 ℃ 15 min、85 ℃ 5 s,实时荧光定量 PCR 条件设定为 95 ℃ 3 min、95 ℃ 10 s、60 ℃ 30 s,共 39 个循环,检测各组 JAK2、STAT5B 的表达量。JAK2 引物序列上游:5′-GCAACAGAGCCTATCGGCATGG-3′,下游:5′-CCGCCACTGAGCAAAGAGGTAAG-3′,92 bp;STAT5B 引物序列上游:5′-GCGGAAGCAGCAGACCATCATC-3′,下游:5′-GCCAACTTCTCACACCAGGACTG-3′,129 bp。

1.2.5 Western blot 检测各组 JAK2、STAT5B 蛋白表达量 miR-370-3P 转染 HC-a 细胞 48 h 后,用全蛋白提取试剂盒提取蛋白,BCA 法测蛋白浓度后,97 ℃ 将蛋白变性 10 min,置于-80 ℃ 冰箱保存待用。以 β-actin 为内参,以 20 μg/孔加样,10%SDS-PAGE 电泳分离蛋白,250 mA 恒流转膜 2 h,快速封闭液室温下摇床封闭 25 min,加入兔单克隆一抗 JAK2、STAT5B、内参 β-actin 4 ℃下摇床孵育过夜,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗室温下孵育 1 h,TBST 洗膜 3 遍并显影,用 Image Lab 软件分析条带灰度值,SPSS 25.0 软件分析各组蛋白灰度值趋势。

1.2.6 MTT 检测各组细胞增殖 miR-370-3P 转染 HC-a 细胞 24 h 后,在 96 孔板中以 3×10^4/孔铺板,每孔加入 100 μL CM 培养基,每组 3 个复孔,分别在铺板 24、48、72 h 后,每孔加入 10 μL MTT 试剂,37 ℃、5%CO_2 恒温孵箱中培养 4 h 后,弃掉培养基,加入 DMSO 150 μL/孔,室温下摇床混匀 10 min,酶标仪 490 nm 下测定光密度值 *D*(490),检测各组细胞存活率情况。

1.2.7 双荧光素酶实验检测 miR-370-3P 和 JAK2、STAT5B 的结合情况 将 293T 细胞以每孔 5×10^5 个铺板于 12 孔板,于 37 ℃、5%CO_2 恒温孵箱中培养 24 h。配制 miR-370-3P 和 JAK2、STAT5B 报告载体转染液,共分为 10 组:①JAK2-3′UTR-野生型(WT)+hsa-miR-370-3P;②JAK2-3′UTR-突变型(MUT)+hsa-miR-370-3p;③JAK2-3′UTR-野生型(WT)+hsa-miR-370-3P-NC;④JAK2-3′UTR-突变型(MUT)+hsa-miR-370-3P-NC;⑤空白对照组 1(对照质粒+hsa-miR-370-3P-NC);⑥空白对照组 2(对照质粒+miR-370-3p);⑦STAT5B-3′UTR-野生型(WT)+hsa-miR-370-3p;⑧STAT5B-3′UTR-突变型(MUT)+hsa-miR-370-3p;⑨STAT5B-3′UTR-野生型(WT)+hsa-miR-370-3p-NC;⑩STAT5B-3′UTR-突变型(MUT)+hsa-miR-370-3p-NC。在无血清 DMEM 培养基中加入转染液后,在 37 ℃恒温培养箱中反应 5 h,换 10%血清的 DMEM 培养基继续培养至转染后 24 h 收样,使用双荧光素酶检测系统检测,并进行统计与分析。

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	P_{CT}
Position 990-996 of JAK2 3' UTR hsa-miR-370-3p	5' ...GCUCAUUAAGAAGUGCAGCAGGU... 3' UGGUCCAAGGUGGGGUCGUCCG	7mer-m8	-0.10	84	-0.10	0.041	N/A
Position 2787-2794 of JAK2 3' UTR hsa-miR-370-3p	5' ...AUAGUAACAGUAAGUCAGCAGGA... 3' UGGUCCAAGGUGGGGUCGUCCG	8mer	-0.14	89	-0.03	0.653	N/A

A

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	P_{CT}
Position 1345-1351 of STAT5B 3' UTR hsa-miR-370-3p	5' ...GGAAGGAAUGGGCUACAGCAGGU... 3' UGGUCCAAGGUGGGGUCGUCCG	7mer-m8	-0.03	57	-0.01	0.460	N/A

B

A:miR-370-3P/JAK2;B:miR-370-3P/STAT5B

图 1 Targetscan Human7.2 靶向基因预测结果

1.3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,GraphPad Prism 7.0 绘图。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数比较采用独立样本 t 检验,$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

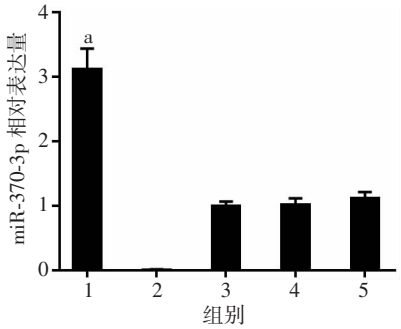
2 结果

2.1 Targetscan Human7.2 miRNA 靶向基因的预测

软件提示 JAK2、STAT5B 可能为 miR-370-3P 靶向基因,并预测其结合位点,见图 1。

2.2 miR-370-3P 转染效率

相比于正常对照组,miR-370-3P mimic 组 miR-370-3P 表达上调,miR-370-3P inhibitor 组 miR-370-3P 表达下调(图 2),提示 miR-370-3P 差异表达的 HC-α 模型构建成功。空载体对照组与正常对照组之间的差异无统计学意义,提示载体对 miR-370-3P 转染软骨细胞的干扰可不计。

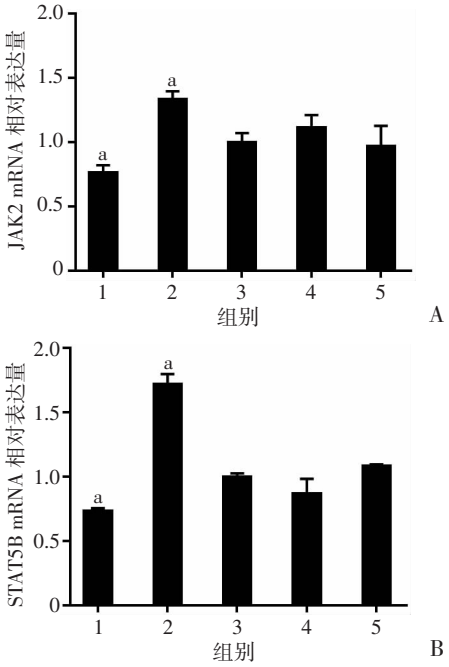


1:miR-370-3P mimic(过表达)组;2:miR-370-3P inhibitor(低表达)组;3:正常对照组;4:mimic 空载体对照组;5:inhibitor 空载体对照组;a:$P<0.05$,与正常对照组比较

图 2 miR-370-3P 在各组 HC-a 细胞中的表达($n=3$)

2.3 miR-370-3P 对 HC-a 细胞中 JAK2、STAT5B mRNA 表达的影响

与正常对照组相比,miR-370-3P mimic 组 JAK2、STAT5B mRNA 表达下调,miR-370-3P inhibitor 组 JAK2、STAT5B mRNA 表达上调($P<0.05$,图 3),提示在转录水平过表达 miR-370-3P 会抑制 JAK2、STAT5B mRNA 的表达。



1:miR-370-3P mimic(过表达)组;2:miR-370-3P inhibitor(低表达)组;3:正常对照组;4:mimic 空载体对照组;5:inhibitor 空载体对照组;a:$P<0.05$,与正常对照组比较

图 3 miR-370-3P 对 HC-a 细胞中 JAK2(A)、STAT5B(B) mRNA 表达的影响($n=3$)

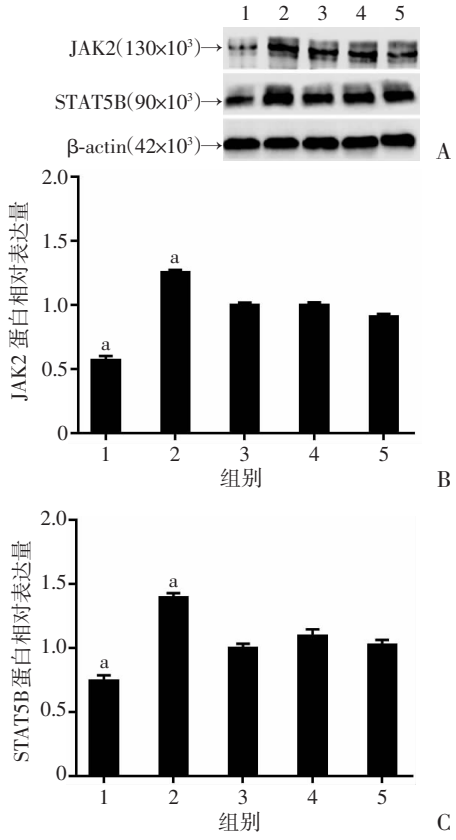
2.4 miR-370-3P 对 HC-a 细胞中 JAK2、STAT5B 蛋白表达的影响

相比于正常对照组,miR-370-3P mimic 组 JAK2、STAT5B 蛋白表达下调,miR-370-3P inhibitor 组 JAK2、STAT5B 蛋白表达上调($P<0.05$,图 4),提示在翻译水平过表达 miR-370-3P 会抑制 JAK2、STAT5B 蛋白的表达。

2.5 miR-370-3P 对 HC-a 细胞存活率的影响

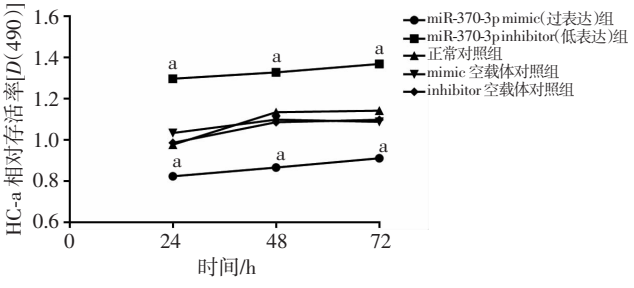
miR-370-3P mimic 组、miR-370-3P inhibitor 组、空载体对照组和正常对照组在转染铺板后 24、48、72 h,

组内各时间点细胞的相对增殖率差异无统计学意义；与正常对照组和空载体对照组相比，miR-370-3P mimic 转染组在 24、48、72 h 细胞的存活率降低，miR-370-3P inhibitor 转染组在 24、48、72 h 细胞的存活率增加，差异具有统计学意义（$P<0.05$，图 5）。提示过表达 miR-370-3P 会抑制 HC-a 细胞增殖。



A：Western blot 检测各组 JAK2、STAT5B 蛋白表达水平；B、C：分别为 JAK2 与 STAT5B 蛋白相对表达量的定量分析（$n=3$） 1：miR-370-3P mimic（过表达）组；2：miR-370-3P inhibitor（低表达）组；3：正常对照组；4：mimic 空载体对照组；5：inhibitor 空载体对照组；a：$P<0.05$，与正常对照组比较

图 4 miR-370-3P 对 HC-a 细胞中 JAK2、STAT5B 蛋白表达的影响

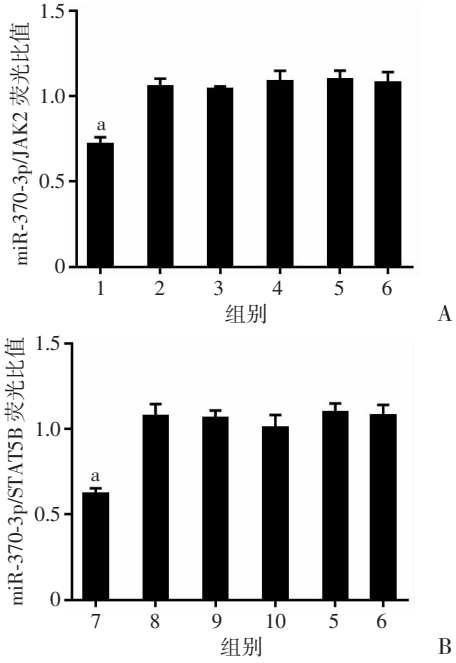


a：$P<0.05$ 与正常对照组比较

图 5 miR-370-3P 对 HC-a 细胞相对存活率的影响（$n=3$）

2.6 miR-370-3P 作用下各组细胞中 JAK2、STAT5B 的荧光表达变化

双荧光素酶实验结果显示：miR-370-3P 和 JAK2-WT（野生型）、STAT5B-WT（野生型）质粒共转染后，荧光表达相比于对照组有显著下调（$P<0.05$，图 6），提示 miR-370-3P 可与 JAK2-3′UTR、STAT5B-3′UTR 直接结合发挥调控作用。



1：JAK2-3′UTR-野生型（WT）+hsa-miR-370-3P；：2：JAK2-3′UTR-突变型（MUT）+hsa-miR-370-3p；3：JAK2-3′UTR-野生型（WT）+hsa-miR-370-3P-NC；4：JAK2-3′UTR-突变型（MUT）+sa-miR-370-3P-NC；5：空白对照组 1（对照质粒+hsa-miR-370-3P-NC）；6：空白对照组 2（对照质粒+miR-370-3p）；7：STAT5B-3′UTR-野生型（WT）+hsa-miR-370-3p；8：STAT5B-3′UTR-突变型（MUT）+hsa-miR-370-3P；9：STAT5B-3′UTR-野生型（WT）+hsa-miR-370-3P-NC；10：STAT5B-3′UTR-突变型（MUT）+hsa-miR-370-3P-NC；a：$P<0.05$，与空白对照组比较

图 6 双荧光素酶实验检测 miR-370-3P 作用下 JAK2（A）、STAT5B（B）的荧光相对变化（$n=3$）

3 讨论

矮小症的发生与骨骼的发育异常密切相关，骨骼的发育主要包括膜内成骨和软骨内骨化两种方式，人的身高主要取决于四肢长骨的生长发育，其中四肢长骨生长发育主要是通过软骨内骨化方式[8-9]，软骨细胞的增殖是参与软骨内骨化的重要过程。且有研究表

明微小 RNA(microRNA, miRNA)在软骨细胞增殖过程中发挥了重要的调控作用[10]。生物信息学提示 miR-370-3P 可能通过作用于 JAK2、STAT5B 信号分子参与软骨细胞生长发育过程的调控。

微小 RNA(microRNA,miRNA)是广泛存在于真核生物体内的约由 22 个核苷酸组成的内源性非编码单链 RNA,通过与 mRNA 的 3′非翻译区的互补序列相结合,对靶基因产生降解或抑制翻译的生物学效应,从而调控基因的表达[11]。有研究发现 miR-370-3P 可通过靶向骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein, BMP2)进而调控成骨细胞的分化[11];miR-370-3P 在人骨髓间充质干细胞中可通过上调 wnt2B,从而促进其成骨作用[12]。但 miR-370-3P 在人关节软骨细胞中的分子调控机制目前尚未探明。本研究通过脂质体转染方法构建了 miR-370-3P 过表达/低表达人关节软骨细胞(HC-α)模型,miRNA 实时荧光定量 PCR 显示:过表达组的 miR-370-3P 表达显著高于正常对照组,低表达组相比于正常对照组 miR-370-3P 表达量降低,且两个空载体对照组与正常对照组之间的差异无统计学意义,提示 miR-370-3P 过表达/低表达 HC-a 模型构建成功。

JAK2 能参与调控细胞的增殖、分化和细胞因子的产生等生物学过程[13],JAK2 通过启动 STAT 通路的信号级联影响其下游信号分子发挥其作用,其中 STAT5 与细胞的增殖密切相关[14]。在 JAK2/STAT5B 信号通路中,STAT5B 被激活后进入细胞核调控靶基因表达,引起软骨细胞增殖,进而刺激骨骼发育以促进生长[15-16],且临床上 STAT5B 缺陷患者表现为生长激素不敏感综合征(growth hormone insensitivity syndrome, GHIS)、严重的胰岛素样生长因子缺陷(insulin-like growth factor deficiency,IGFD) 以及严重的出生后生长迟滞[17]。

本研究双荧光素酶实验提示 miR-370-3P 可与 JAK2-3′UTR、STAT5B-3′UTR 直接结合发挥其调控作用;通过对软骨细胞 miR-370-3P 过表达处理后,JAK2、STAT5B 信号分子在转录水平的 mRNA 表达下调;且通过 Western blot 实验验证了在蛋白水平 miR-370-3P 过表达也会抑制 JAK2、STAT5B 蛋白的表达;在本研究 MTT 细胞增殖实验中,分别在细胞铺板后 24、48、72 h 检测各组细胞存活率,相比于正常对照组,miR-370-3P 过表达组人关节软骨细胞的存活率降低,表明过表达 miR-370-3P 会抑制人关节软骨细胞的增殖。本研究在转录、翻译和细胞水平进一步证实了 miR-370-3P 通过影响 JAK2/STST5B 信号通路进而调控软骨细胞增殖过程的实验设想。但 miR-370-3P 在 SHOX 基因缺陷相关性矮小患儿机体中的具体作用机制尚待进一步研究。

综上所述,miR-370-3P 可通过直接靶向 JAK2、STAT5B 信号分子从而抑制人关节软骨细胞(HC-a)的增殖,进而调节骨骼的发育过程,为阐明 SHOX 基因缺陷相关性矮小症的发生、发展机制提供了新的理论依据。

参考文献:

[1] HALLETT S A,ONO W,ONO N. Growth plate chondrocytes: skeletal development,growth and beyond[J]. Int J Mol Sci, 2019 ,20(23):6009. DOI:10.3390/ijms20236009.

[2] VANNELLI S, BAFFICO M, BUGANZA R, *et al*. SHOX deficiency in children with growth impairment: evaluation of known and new auxological and radiological indicators[J]. Italian J Pediatr,2020,46(1): 163. DOI:10.1186/s13052-020-00927-z.

[3] 许珂, 徐雪姣, 宋萃, 等. 软骨细胞 SHOX 基因过/低表达的差异 miRNA 筛选与验证[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(3): 211-215. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201709050.
XU K,XU X J,SONG C,*et al*. Screening and verification of differential miRNAs in chondrocytes with over-expression and low expression of SHOX[J]. J Third Mil Med Univ,2018, 40(3): 211-215. DOI:10.16016/j.1000-5404.201709050.

[4] GENONI G, MONZANI A, CASTAGNO M, *et al*. Improving clinical diagnosis in SHOX deficiency: the importance of growth velocity[J]. Pediatr Res,2018,83(2): 438-444. DOI:10.1038/pr.2017.247.

[5] BUNYAN D J,BAFFICO M,CAPONE L,*et al*. Duplications upstream and downstream of SHOX identified as novel causes of Leri-Weill dyschondrosteosis or idiopathic short stature[J]. Am J Med Genet A,2016,170A(4):949-957. DOI:10.1002/ajmg.a.37524.

[6] RAZMARA E,BITARAF A,YOUSEFI H,*et al*. Non-coding RNAs in cartilage development: an updated review[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4475. DOI: 10.3390/ijms20184475.

[7] JOUNG Y H,LIM E J,DARVIN P, *et al*. MSM enhances GH signaling *via* the Jak2/STAT5b pathway in osteoblast-like cells and osteoblast differentiation through the activation of STAT5b in MSCs[J]. PLoS One,2012,7(10):e47477.

DOI:10.1371/journal.pone.0047477.

[8] 莫奇非,杨鹏,苏楠,等. 成纤维细胞生长因子受体在成骨细胞中的表达及作用研究[J]. 第三军医大学学报,2019,41(24):2386-2392. DOI:10.16016/j.1000-5404.201907008.
MO Q F, YANG P, SU N, *et al*. Expression of fibroblast growth factor receptor and its role in regulating osteoblast differentiation[J]. J Third Mil Med Univ, 2019,41(24):2386-2392. DOI:10.16016/j.1000-5404.201907008.

[9] BERENDSEN A D, OLSEN B R. Bone development[J]. Bone, 2015, 80: 14-18. DOI:10.1016/j.bone.2015.04.035.

[10] JEE Y H, WANG J, YUE S N, *et al*. Mir-374-5p, mir-379-5p, and mir-503-5p regulate proliferation and hypertrophic differentiation of growth plate chondrocytes in male rats[J]. Endocrinology, 2018, 159(3): 1469-1478. DOI:10.1210/en.2017-00780.

[11] YU L, CEN X, XIA K, *et al*. microRNA expression profiles and the potential competing endogenous RNA networks in NELL-1-induced human adipose-derived stem cell osteogenic differentiation[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(11): 4623-4641. DOI:10.1002/jcb.29695.

[12] JIA B, WANG Z P, SUN X, *et al*. Long noncoding RNA LINC00707 sponges miR-370-3p to promote osteogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells through upregulating WNT2B[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 67. DOI:10.1186/s13287-019-1161-9.

[13] PERNER F, PERNER C, ERNST T, *et al*. Roles of JAK2 in aging, inflammation, hematopoiesis and malignant transformation[J]. Cells, 2019, 8(8): 854. DOI: 10.3390/cells8080854.

[14] JIANG L, ZHAO X H, MAO Y L, *et al*. Long non-coding RNA RP11-468E2.5 curtails colorectal cancer cell proliferation and stimulates apoptosis *via* the JAK/STAT signaling pathway by targeting STAT5 and STAT6[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 465. DOI: 10.1186/s13046-019-1428-0.

[15] SANPAOLO E R, ROTONDO C, CICI D, *et al*. JAK/STAT pathway and molecular mechanism in bone remodeling[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(11): 9087-9096. DOI:10.1007/s11033-020-05910-9.

[16] HWA V. Human growth disorders associated with impaired GH action: defects in STAT5B and JAK2[J]. Mol Cell Endocrinol, 2021, 519: 111063. DOI: 10.1016/j.mce.2020.111063.

[17] KLAMMT J, NEUMANN D, GEVERS E F, *et al*. Dominant-negative STAT5B mutations cause growth hormone insensitivity with short stature and mild immune dysregulation[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2105. DOI: 10.1038/s41467-018-04521-0.

(**收稿**:2021-01-06;**修回**:2021-04-07)

(编辑 栾 嘉)