

miR-21 诱导犬 BMSCs 骨向分化的体外实验研究

王颖^{1,2} 张雷^{1,2} 周咏^{1,2} 张凯³ 王元银^{1,2} 何家才^{1,2} 邹多宏^{1,2}

摘要 目的 体外研究检测 miR-21 诱导拉布拉多犬骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨分化的作用。方法 构建 Lenti-miR-21-Luciferase 与 Lenti-LacZ-Luciferase 慢病毒载体,分别转染犬 BMSCs 将研究分为 miR-21 组与 LacZ 组。利用体外细胞划痕实验来比较转染后 BMSCs 的爬行迁移能力。在转染后的第 0、1、4、7、14 天分别提取 miR-21 组与 LacZ 组 BMSCs 的 mRNAs 和蛋白。通过 Real time-PCR 技术和 Western blot 检测成骨分化关键因子骨钙素(OCN)和骨桥蛋白(OPN)的表达。结果 Lenti-miR-21-Luciferase 与 Lenti-LacZ-Luciferase 慢病毒载体成功转入 BMSCs 后,miR-21 组的 BMSCs 细胞爬行迁移能力显著增强($P < 0.001$);Real time-PCR 和 Western blot 结果显示,miR-21 可以显著上调 BMSCs 成骨分化关键因子 OCN 和 OPN 的表达($P < 0.05$)。结论 miR-21 可以显著促进 BMSCs 的成骨分化,为进一步的体内实验奠定基础。

关键词 miR-21;骨髓间充质干细胞;慢病毒转染;成骨分化
中图分类号 Q 7;R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)09-1318-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.014

干细胞治疗是组织再生中发展迅速的领域之一,有强大的组织再生治疗效果^[1-2]。miRNAs 与成骨细胞和破骨细胞分化相关^[3-4]。miR-21 是一个参与多种生物学过程的 miRNA,主要包括血管形成及再生^[5],而其是否促进骨形成研究较少。因此,了解 miR-21 是否能够促进成体干细胞骨向分化,及其在骨组织再生过程中的作用具有一定的研究意义

和临床应用价值。前期研究^[6]显示 miRNA 在成骨分化过程中高表达,提示 miR-21 可能抑制成骨细胞的干性维持。但有研究^[7-8]指出,miR-21 的过表达与破骨细胞生成、脂肪形成及骨质溶解有关。因此,这些研究的结果不同表明 miR-21 的调节是复杂的。鉴于此,该研究尝试进一步了解 miR-21 在促进骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)骨向分化的作用,希望为其临床应用提供一定实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 拉布拉多犬,12 月龄,雄性,约 15 kg,购自上海新冈实验动物场,于安徽医科大学实验动物中心饲养。

1.1.2 主要试剂和仪器 高糖 DMEM(美国 Gibco 公司);PBS 缓冲剂(美国 Solarbio 公司);胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司);胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);慢病毒载体(上海和元生物技术股份有限公司);PCR 引物(上海生工生物工程股份有限公司);骨钙素(osteocalcin,OCN)抗体、骨桥蛋白(osteopontin,OPN)抗体(美国 Abcam 公司);山羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);CO₂ 恒温孵箱(美国 Thermo 公司);荧光倒置显微镜(德国 Leica 公司);实时荧光定量 PCR 仪(美国 Stratagene 公司)。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 培养 使用 30 g/L 戊巴比妥钠静脉注射麻醉拉布拉多犬。待麻醉后将犬侧卧,髌骨区备皮消毒铺巾,使用骨髓穿刺针套接内含肝素钠注射液的注射器,于髌后上棘穿刺,抽取骨髓 3 ml 注入无菌的 50 ml 离心管内,轻轻振荡混匀。在超净工作台内,向离心管中加入 PBS 缓冲液 15 ml 混匀后离心(1 000 r/min 离心 10 min),弃去漂浮于液面上的脂肪和大部分上清液。加入配制好的 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬沉淀的细胞。混悬均匀后接种于培养皿中,置于 37 ℃、5% CO₂ 恒温恒湿培养箱内培养。接种后第 5 天首次换液,此后

2017-04-11 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31370983);安徽省杰出青年基金(编号:1508085J08);安徽省自然科学基金(编号:1408085 MKL29);安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2013Z204);安徽省科技攻关计划项目(编号:1401045013、1604a0802082);高校优秀青年人才支持计划重点项目(编号:gxxyqZD2016058)

作者单位:¹安徽医科大学口腔医学院,合肥 230032

²安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032

³蚌埠医学院第一附属医院口腔科,蚌埠 233000

作者简介:王颖,女,硕士研究生;

邹多宏,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:zdhy@ahmu.edu.cn

常规每 3 d 换液 1 次,观察细胞形态及生长状况。当细胞增殖融合至 80% 时,使用 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)消化,收集细胞后计数,按 $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 密度传代培养。本研究取生长状态良好的第 2 代和第 3 代 BMSCs 用于后续实验。

1.2.2 慢病毒转染 BMSCs 本实验研究分为两组,即 miR-21 组为 Lenti-miR-21-Luciferase/BMSCs; LacZ 组为 Lenti-LacZ-Luciferase/BMSCs。取生长状态良好的第 2 代拉布拉多犬 BMSCs 进行慢病毒转染。0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)消化收集细胞,细胞计数,然后按 2×10^5 个细胞/孔的密度接种到 6 孔板中。24 h 后,弃去培养液,向 6 孔板的每孔中加入 2 ml 配制好的慢病毒转染液。置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养。2 d 后更换培养液为含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液。转染后第 4 天,使用 D-荧光素钾进行细胞处理,通过体外生物发光成像技术检测 Luciferase 表达量来评估转染效率。

1.2.3 体外迁移实验 将慢病毒转染后的 miR-21 组细胞和 LacZ 组细胞消化传代,按 3×10^4 个细胞/孔接种于 24 孔板上,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内孵育过夜。使用黄色 200 μl 枪头尖端刮擦皿底融合的单层 BMSCs 细胞,以造成一个约 500 μm 宽的无细胞伤口缺损,用 PBS 洗涤 3 次,去除刮下的细胞。加入无血清培养基后,将受损的单层 BMSCs 置于培养箱中培养 24 h,并在 0 h 和 24 h 时通过显微镜拍照测量伤口宽度。

1.2.4 Real time-PCR 检测 慢病毒转染后,分别于 0、1、4、7、14 d 提取细胞总 RNA,进行 Real time-PCR 定量检测 OCN 基因和 OPN 基因表达水平。使用 Trizol 提取试剂盒,按制造商提示操作指南,分别提取 miR-21 组细胞和 LacZ 组细胞的总 RNA。cDNA 合成采用 PrimeScript™ RT-PCR kit 逆转录试剂盒。qPCR 检测 OCN、OPN 和 GAPDH 基因的相对表达量,使用实时定量仪进行检测。所有测定重复 3 次。PCR 所用引物均由上海生工生物工程公司进行设计。见表 1。

1.2.5 Western blot 检测 慢病毒转染后,分别于 0、1、4、7、14 d 消化收集细胞,PBS 液离心漂洗细胞,重复 3 次,使用 RIPA 蛋白裂解液提取蛋白。BCA 测定试剂盒测定各样本蛋白浓度。根据不同蛋白分子的大小,选择浓度不同的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量的蛋白质提取物,其下层胶电压为 120 V,上层为 80 V。根据蛋白分子大小,选

择时间电泳转膜至 PVDF 膜。5% 牛血清白蛋白在室温下封闭 2 h 后,将膜在 OCN 和 OPN 特异性一抗中 4 °C 温育过夜。TBST 液漂洗 3 次后,加入二抗,室温孵育 1 h。使用发光检测仪曝光,收集发光信号,检测分析 miR-21 过表达的犬 BMSCs 的相关蛋白表达。所有测定重复 3 次。

表 1 犬基因扩增引物序列表

目的基因	引物序列 (5'~3')
OCN	上游:GTGGTGCAACCTCCGTGTC
	下游:GCTCGCATACTTCCCTCTTG
OPN	上游:AAGCCTGACCCATCTCAGAA
	下游:CATCGTCATGGCTTTCATTG
GAPDH	上游:AACATCATCCCTGCCTCCAC
	下游:GGCAGGTCAGATCCACCACT

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 对实验数据进行方差检验与 *t* 检验分析,所有定量实验均重复进行 3 次。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 形态观察及慢病毒转染结果 拉布拉多犬 BMSCs 原代培养第 5 天首次换液时,显微镜下观察,可见培养皿中有大量悬浮造血干细胞和血细胞,而皿底散在分布着少量贴壁的并呈集落状生长的 BMSCs 细胞呈半透明状梭形。换液时,PBS 洗涤清除无法贴壁的悬浮造血干细胞和血细胞,待细胞集落接近融合时进行传代。传代时,使用 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)消化后的细胞呈折光性强且均匀的圆形,传代接种后的 3 h BMSCs 即开始贴壁,24 h 后绝大多数细胞均贴壁生长,并重新恢复梭形外观和方向性排列。传代培养后,可见第 1 代 BMSCs 形态较为均一,多呈纺锤形或长梭形,细胞排列呈旋涡状或放射状融合,生长状态良好,分裂增殖旺盛。见图 1。慢病毒转染后第 4 天,通过生物发光成像法检测转染后两组细胞的示踪报告基因 Luciferase 的荧光发光强度,结果提示示踪基因 Luciferase 在 BMSCs 中连接成功。见图 2。

2.2 miR-21 介导 BMSCs 细胞迁移能力结果比较 细胞迁移实验中,观察 LacZ 组与 miR-21 组的 BMSCs 单层细胞 24 h 内在培养皿底爬行迁移的距离。实验结果观察可见,LacZ 组与 miR-21 组在 0 h 时,划痕伤口的宽度分别为 482、484 μm 。24 h 后 miR-21 组的 BMSCs 细胞通过爬行迁移,划痕伤口宽度减小至 98 μm ,而 LacZ 组伤口宽度仍有 309

μm 。重复实验结果计算, miR-21 组划痕宽度减少值为 $(372.33 \pm 12.10) \mu\text{m}$, 而 LacZ 组仅为 $(161.33 \pm 11.06) \mu\text{m}$, 差异有统计学意义 ($F = 0.10, P < 0.001$)。以上结果表明 miR-21 可能增强 BMSCs 的爬行迁移能力。见图 3。

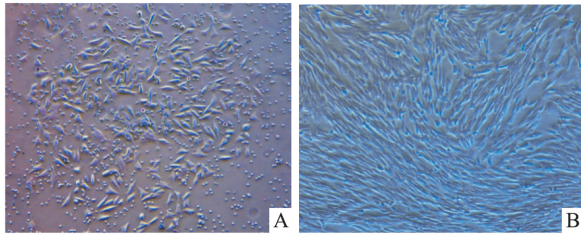


图1 BMSCs 体外培养 $\times 100$
A: 体外原代培养 5 d; B: 体外第 2 代培养 7 d

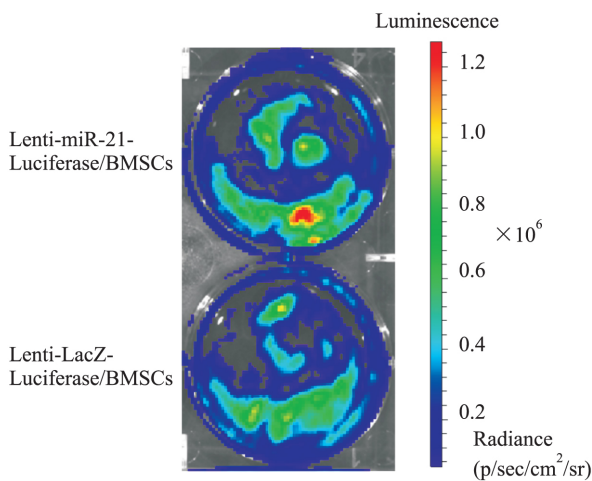


图2 Luciferase 的体外检测

2.3 miR-21 介导 BMSCs 成骨相关因子 mRNAs 的表达 Real time-PCR 检测 miR-21 转染 BMSCs 后, 成骨分化相关 OCN 基因与 OPN 基因在 0、1、4、7、14 d 的相对表达水平。经目的基因的扩增动力学曲线测得 Ct 值, 通过内参 GAPDH 校正计算, 得出目的基因的相对表达量 ΔCt 值。定量结果显示, miR-21 组的 BMSCs 在 miR-21 慢病毒转染后 7 d 即有 OCN 基因和 OPN 基因的显著表达, 而在转染后的 14 d, 两基因仍有较高表达水平。组间比较采用 *t* 检验, miR-21 组的 OCN 基因、OPN 基因的表达量增加水平显著高于 LacZ 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。以上结果表明 miR-21 可能诱导 BMSCs 向成骨方向分化。见图 4。

2.4 miR-21 介导 BMSCs 成骨因子相关蛋白的表达 Western blot 分别检测了 0、1、4、7、14 d 的 miR-21 组与 LacZ 组 BMSCs 中成骨相关蛋白 OCN、OPN

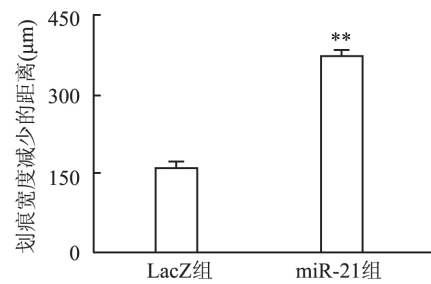
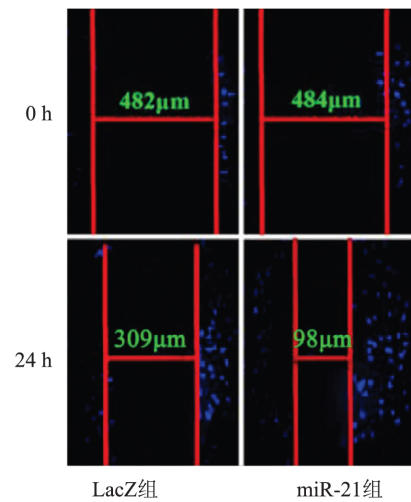


图3 目的基因转染 BMSCs 后细胞迁移能力情况与 LacZ 组比较: ** $P < 0.001$

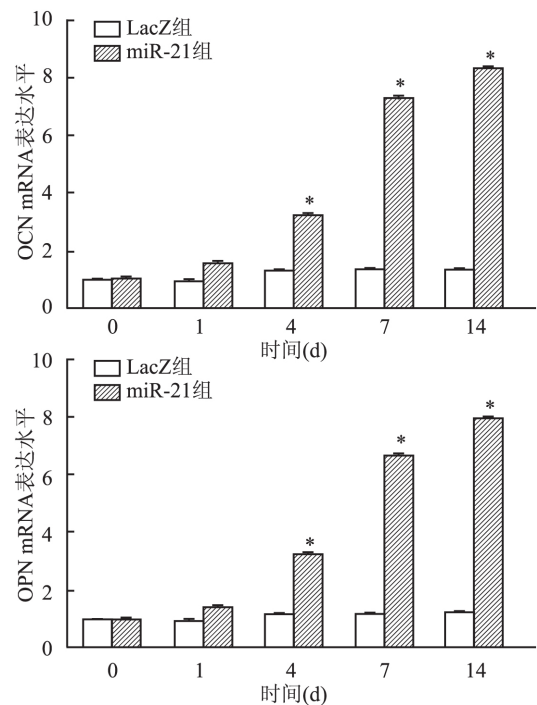


图4 Real time-PCR 检测目的基因转染 BMSCs 后成骨相关因子的表达与 LacZ 组比较: * $P < 0.05$

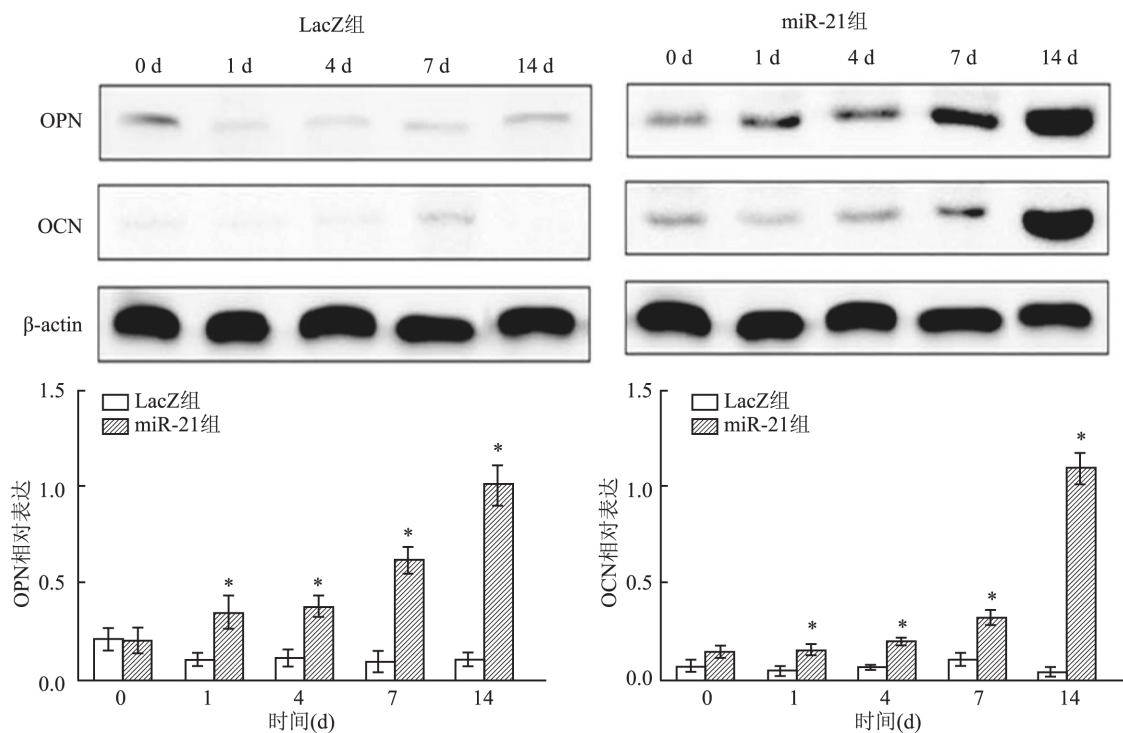


图5 Western blot 检测成骨相关蛋白的表达
与 LacZ 组比较: * $P < 0.05$

的表达。结果显示, miR-21 组的 OCN 和 OPN 于 7 d 时增加显著, 并持续到 14 d。且通过两独立样本 t 检验显示, 两组转染后 1、4、7、14 d 时 OCN、OPN 的表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 5。

3 讨论

间充质干细胞 (MSCs) 是中胚层来源的多能干细胞, 可从多种组织中分离获得, 包括脂肪组织、脐带、皮肤和骨髓。从骨髓获得的 MSCs 称为骨髓间充质干细胞, 具有自我更新能力以及多向分化潜能, 可分化为包括骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、上皮细胞和内皮细胞等多种细胞类型。同时 BMSCs 的免疫原性低, 适合自体移植; 临床研究中已被用于同种异体造血干细胞移植的治疗, 因此具有良好的生物安全性。BMSCs 来源充足、取材方便且成骨能力良好^[9], 也是骨组织工程中研究较多的种子细胞之一, 同时也是生命科学研究的热点。本实验采用髂骨穿刺法抽取骨髓, 通过贴壁法从骨髓中分离 BMSCs, 培养观察可见细胞长梭形或纺锤形, 形态良好, 旋涡状或方向性排列规则, 且生长增殖旺盛。此方法简单易操作, 对动物造成的创伤较小, 且细胞状态良好, 为后续试验奠定了基础。

miRNAs 及其在干细胞特定分化过程中的作用引起了研究人员的强烈兴趣。其中作为一个被广泛研究的 miRNAs, miR-21 参与调节多种生理和病理过程, 包括发育、肿瘤学、干细胞生物学和衰老^[10]。miR-21 的功能与骨骼疾病相关, 如骨质疏松症、骨关节炎及骨肉瘤。Trohatou et al^[10] 研究显示, miR-21 过表达能够促进人 BMSCs 成骨, 抑制成脂。但是, 也有研究^[7-8] 表示 miR-21 的过表达与脂肪形成、破骨细胞生成及骨质溶解有关。由于目前关于 miR-21 在 BMSCs 的骨向分化中的作用尚存争议, 因此本研究通过向拉布拉多犬 BMSCs 中转导 miR-21, 使其过表达来研究 miR-21 在体外诱导 BMSCs 骨向分化的能力。

BMSCs 向骨损伤处迁移作为骨修复过程中的重要环节^[11-12], 本实验通过 miR-21 过表达的单层 BMSCs 细胞划痕伤口愈合实验结果表明, miR-21 过表达可以有效提高 BMSCs 的爬行迁移能力。因此推测 miR-21 可通过促进 BMSCs 迁移从而促进骨损伤修复过程。MSCs 成骨分化开始于前体成骨细胞, 进而分化为成熟的成骨细胞, 最后成为骨细胞。研究^[13] 显示, Runx2 和 Osterix (OSX) 都是前体成骨细胞所必须的, 而后, 当前体成骨细胞向成骨细胞分

化时,OCN与OPN的表达增加。因此,本实验通过检测OCN与OPN的定量表达来检测BMSCs的成骨分化。Real time-PCR检测结果显示,miR-21过表达时BMSCs的成骨分化特异性基因OCN与OPN的表达水平显著升高;同时Western blot检测结果显示,成骨分化特异性蛋白OCN、OPN水平也显著增加,与Real time-PCR结果相同。因此本实验结果表明miR-21可能调节BMSCs的成骨分化过程,促进成骨相关基因的转录和相关蛋白的表达。

关于miR-21对BMSCs成骨的调节机制和通路的研究,有研究^[10]显示miR-21可以通过下调SOX2表达和促进人MSCs的成骨分化。SPRY1可以负调节MSCs的成骨分化,Yang et al^[14]研究证实,miR-21可以通过抑制SPRY1来促进人MSCs的成骨细胞分化。Meng et al^[15]还发现miR-21通过PI3K-AKT-GSK3 β 通路,经由 β -连环蛋白的稳定和积累促进人脐带间充质干细胞的成骨分化。本实验通过在体外研究证明,以慢病毒作为载体的miR-21可成功转染犬BMSCs,并可高效持续表达成骨因子,从而促进体外BMSCs骨向分化过程,为将来体内实验提供基础。但是目前为止,miR-21的靶基因以及其促进BMSCs成骨分化的具体分子作用机制尚不明确,仍需要进一步研究。

参考文献

- [1] Iwata T, Washio K, Yoshida T, et al. Cell sheet engineering and its application for periodontal regeneration[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2015, 9(4): 343-56.
- [2] Garbern J C, Lee R T. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(6): 689-98.
- [3] Zhang J F, Fu W M, He M L, et al. MiRNA-20a promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by co-regulating BMP signaling[J]. *RNA Biol*, 2012, 8(5): 829-38.
- [4] Zhang J F, Fu W M, He M L, et al. MiR-637 maintains the balance between adipocytes and osteoblasts by directly targeting Osterix[J]. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(21): 3955-61.
- [5] Zhou Y, Zhu Y, Zhang L, et al. Human stem cells overexpressing miR-21 promote angiogenesis in critical limb ischemia by targeting CHIP to enhance HIF-1 α activity[J]. *Stem Cells*, 2016, 34(4): 924-34.
- [6] Eguchi T, Watanabe K, Hara E S, et al. OsteoMiR: a novel panel of microRNA biomarkers in osteoblastic and osteocytic differentiation from mesenchymal stem cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58796.
- [7] Mei Y, Bian C, Li J, et al. miR-21 modulates the ERK-MAPK signaling pathway by regulating SPRY2 expression during human mesenchymal stem cell differentiation[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(6): 1374-84.
- [8] Zhou Y, Liu Y, Cheng L. miR-21 expression is related to particle-induced osteolysis pathogenesis[J]. *J Orthop Res*, 2012, 30(11): 1837-42.
- [9] 郑文龙, 吴涛, 邹多宏, 等. 犬牙槽骨干细胞与髂骨骨髓干细胞体外成骨能力的比较[J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(9): 1252-7.
- [10] Trohatou O, Zagoura D, Bitsika V, et al. Sox2 suppression by miR-21 governs human mesenchymal stem cell properties[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2014, 3(1): 54-68.
- [11] Sangani R, Pandya C D, Bhattacharyya M H, et al. Knockdown of SVCT2 impairs *in vitro* cell attachment, migration and wound healing in bone marrow stromal cells[J]. *Stem Cell Res*, 2014, 12(2): 354-63.
- [12] Zhang M, Sun L, Wang X, et al. Activin B promotes BMSC-mediated cutaneous wound healing by regulating cell migration *via* the JNK-ERK signaling pathway[J]. *Cell Transplant*, 2014, 23(9): 1061-73.
- [13] Miron R J, Zhang Y F. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards[J]. *J Dent Res*, 2012, 91(8): 736-44.
- [14] Yang N, Wang G, Hu C, et al. Tumor necrosis factor α suppresses the mesenchymal stem cell osteogenesis promoter miR-21 in estrogen deficiency-induced osteoporosis[J]. *J Bone Miner Res*, 2013, 28(3): 559-73.
- [15] Meng Y B, Li X, Li Z Y, et al. microRNA-21 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by the PI3K/ β -catenin pathway[J]. *J Orthop Res*, 2015, 33(7): 957-64.

miR-21 induced canine BMSCs osteogenic differentiation *in vitro*

Wang Ying^{1,2}, Zhang Lei^{1,2}, Zhou Yong^{1,2}, et al

(¹College of Stomatology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Key Lab of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the effect of miR-21 on the osteogenic differentiation of Labrador dog bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) *in vitro*. **Methods** Lenti-miR-21-Luciferase and Lenti-LacZ-Luciferase lentiviral vector were constructed and then were transfected into canine BMSCs. The study was divided into miR-21

不同扳机方案在卵巢储备功能减退患者中的应用

张雨, 刘雨生, 张娱, 栾红兵, 卢芳汀

摘要 目的 探讨促性腺激素释放激素激动剂(GnRH-a)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)以及两者联合扳机方案在卵巢储备功能减退(DOR)患者中的应用效果。方法 回顾性分析和比较 DOR 患者微刺激方案 912 例和人工黄体期方案 390 例中采用 GnRH-a、hCG 以及两者联合双扳机的临床效果。结果 微刺激方案和人工黄体期方案中 hCG 扳机组与双扳机组间获卵数差异均无统计学意义, 但均高于 GnRH-a 组。微刺激方案中 hCG 扳机组的受精率显著低于 GnRH-a 及双扳机组; 人工黄体期方案中 hCG 及 GnRH-a 扳机组的受精率显著低于双扳机组 ($P < 0.017$); 两种方案中 hCG 联合 GnRH-a 扳机组的优质胚胎率均显著高于 hCG 扳机组和 GnRH-a 扳机组 ($P < 0.017$); 两种促排方案双扳机组的临床妊娠率均高于 GnRH-a 扳机组和 hCG 扳机组, 但差异无统计学意义。结论 DOR 患者的微刺激和人工黄体期方案中, hCG 联合 GnRH-a 双扳机方案优于单纯 hCG 和 GnRH-a 扳机, 可获得更多的卵母细胞和优质胚胎, 改善临床妊娠率。

关键词 卵巢储备功能下降; 促性腺激素释放激素激动剂; 绒毛膜促性腺激素

中图分类号 R 715.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)09-1323-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.015

随着二胎政策的放开及社会、环境等因素的影

响, 卵巢储备功能减退 (decrease ovarian reserve, DOR) 且有生育要求的女性逐渐增多。DOR 患者由于卵巢体积减小, 窦卵泡数目减少, 在促排卵过程中周期取消率高, 获卵数少, 受精率下降, 胚胎质量差, 妊娠率下降, 因此, 有研究者试图通过不同的卵巢刺激方案来提高 DOR 患者的获卵率和胚胎数^[1-4]。微刺激方案、人工黄体期方案因其疗程短、重复率高、费用低近年成为 DOR 患者较常用的方案。但在促排过程中存在黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 不足, 常需添加外源性 LH 或激发内源性 LH 的药物。人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 因其具有与 LH 共同的受体和相似的生物活性一直作为经典的扳机药物, 但其生物学活性为 LH 的 6 倍, 且半衰期长, 发生卵巢过度刺激综合征 (ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS) 的概率显著增加^[5]。促性腺激素释放激素激动剂 (gonadotropin-releasing hormone agonist, GnRH-a) 可触发内源性 LH 的分泌, 且半衰期短, 能降低 OHSS 风险, 但可诱发黄体萎缩, 导致黄体功能不足和黄体中期的 LH 水平不足^[6]。该研究通过回顾性分析 DOR 患者 hCG、GnRH-a 以及 hCG 联合 GnRH-a 扳机在卵泡期和黄体期促排卵方案中的临床效果, 以期临床提供更好的扳机方案。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2013 年 12 月~2015 年 12 月在本院行体外受精-胚胎移植 (*in vitro* fertilization

2017-04-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81601416)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院生殖医学中心, 合肥 230001

作者简介: 张雨, 女, 硕士研究生;

刘雨生, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: shengzhizhongxin@126.com

group and LacZ group. The cell scratch test was used to compare the migration ability of BMSCs after lentiviral vector transfection. The mRNA and protein of BMSCs were extracted on 0, 1, 4, 7, and 14 days. The expression of osteocalcin (OCN) and osteopontin (OPN), the key factors of osteogenic differentiation of BMSCs, were detected by Real time-PCR and Western blot. **Results** After Lenti-miR-21-Luciferase and Lenti-LacZ-Luciferase were successfully transfected into BMSCs, the migration of BMSCs in miR-21 group was enhanced significantly ($P < 0.001$). Expression of OCN and OPN at the mRNA and protein levels were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion**

MiR-21 can significantly promote the osteogenic differentiation of BMSCs, lay the foundation for further *in vivo* experiments.

Key words miR-21; bone marrow mesenchymal stem cells; lentiviral vector transfection; osteogenic differentiation