

miR-98 对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡以及侵袭、迁移能力的影响

高爽 李文成 刘加涛 于瀚卿 范璐璐 孙国平

摘要 目的 研究 miR-98 对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡和侵袭、迁移能力的影响及其可能机制。方法 将 miR-98 mimics、mimics-NC、miR-98 inhibitor、inhibitor-NC 瞬时转入肝癌 HepG2 细胞内,应用噻唑盐(MTT)法、流式细胞仪、Transwell 小室实验检测 miR-98 对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡以及侵袭、迁移能力的影响,进一步用 Western blot 法检测各组 Bcl-2 蛋白的表达水平。结果 MTT 实验表明 miR-98 过表达后,肝癌细胞的增殖能力明显低于对照组;Annexin V-FITC / PI 凋亡实验证实上调 miR-98 表达后,细胞的凋亡率较对照组升高;Transwell 小室实验表明上调 miR-98 可使肝癌细胞的侵袭、迁移能力减弱。而当 miR-98 被抑制后,肝癌 HepG2 细胞的增殖及侵袭、迁移能力则明显增强,凋亡率则下降。Western blot 实验检测发现 miR-98 过表达后,Bcl-2 的表达降低。结论 miR-98 可能在肝癌的发生、发展中发挥着抑癌基因的作用;miR-98 可能通过下调 Bcl-2 的表达,促进肝癌 HepG2 细胞凋亡。

关键词 miR-98; HepG2; 增殖; 凋亡; 侵袭; 迁移

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)05-0594-06

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界范围内常见的恶性消化系统肿瘤之一,在我国尤为高发^[1],目前手术切除仍是主要的治疗手段,但手术切除风险高、有效率低,且肝癌对放疗不敏感,全身化疗总体有效率也 < 10%,因此,发现新的诊断标志物和治疗靶点已经成为探索肝癌治疗和预后的关键^[2-3]。

自 Murakami et al^[4] 首次报道在原发性肝癌中微小 RNA(microRNA, miRNA) 表达异常以来,多项研究均证实了 miRNA 的异常表达与原发性肝癌的发生发展密切相关,因此深入研究 miRNA 在 HCC 中的功能及相关作用机制,或许能为 HCC 的治疗提供新的途径。该研究通过建立瞬时转染模型改变 HepG2 细胞中 miR-98 的表达水平,观察 miR-98 对

HepG2 细胞生物学行为的影响,初步探讨 miR-98 在肝癌的发生发展中发挥的作用,为寻找新的分子靶向治疗靶点奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 肝癌 HepG2 细胞株购自中国科学院上海生命科学院。

1.1.2 主要试剂 miR-98 mimics、miR-98 mimics 阴性对照(mimics-NC)、miR-98 inhibitor、miR-98 inhibitor 阴性对照(inhibitor-NC)、转染试剂 Lipofectamine 3000、RNA 提取试剂 TRIzol 以及逆转录所需相关试剂均购自美国 Invitrogen 公司,miR-98 Taqman 探针荧光定量试剂盒、U6 Taqman 探针荧光定量试剂盒购于上海生工生物有限公司,MTT、抗 β -actin 多克隆抗体、抗 Bcl-2 多克隆抗体、山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Annexin V-FITC 细胞双染凋亡试剂购自上海贝博公司。

1.1.3 主要仪器设备 Acpo-6100 CO₂ 培养箱(美国 DuPont 公司);YJ-1450 型医学净化工作台(苏州净化设备公司);倒置式显微镜、正置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);普通 PCR 仪 K960(杭州晶格科学仪器有限公司);PIKOREAL96 荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司);Elx-800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 仪器公司);EPICS XL/XL-MCL 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)和 ImageQuant™ LAS-4000 型发光成像系统(日本通用电气医疗集团生命科学部)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与传代 将肝癌 HepG2 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,放置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内,隔天换液,待细胞融合度大于 80% 后进行传代,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 建立瞬时转染模型 取生长状态良好并处在对数生长期的细胞,按照一定的细胞密度接种于细胞培养板中,培养 24 h,待细胞贴壁后利用 Lipofectamine 3000 为载体进行转染。实验分 5 组:只加培养基的空白对照组、miR-98 mimics 组、mimics-NC

2015-02-02 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81272739);安徽省科技攻关项目(编号:12010402122)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肿瘤科,合肥 230001

作者简介:高爽,女,硕士研究生;

孙国平,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: sunguoping@ahmu.edu.cn

组、miR-98inhibitor 组以及 inhibitor-NC 组。

1.2.3 运用 Taqman 探针实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)测定转染效率 为了验证 HepG2 细胞在转染 miR-98mimics、miR-98inhibitor 后细胞内 miR-98 的表达是否发生相应地变化,转染 24 h 后,收集细胞,经过提取 RNA,逆转录,进行 Taqman 探针实时荧光定量 PCR, $\Delta Ct = Ct_{miR-98} - Ct_{U6}$, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{miR-98} - Ct_{U6})_{转染组} - (Ct_{miR-98} - Ct_{U6})_{空白对照组}$ 组间 miR-98 的相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

1.2.4 MTT 法检测 miR-98 对肝癌 HepG2 细胞增殖的影响 取对数生长期的 HepG2 细胞,以 5.0×10^3 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μ l 培养 24 h,待细胞贴壁后,用 Lipo-fectamine 3000 转染。实验分 5 组,每组设 5 个复孔。转染 48 h 后,每孔按 1:10 的比例加入 MTT 溶液,37 $^{\circ}$ C 培养箱避光孵育 3~4 h 后加入 DMSO 150 μ l/每孔,用酶标仪测定各孔在 490 nm 波长下吸光度(optical density, OD)值,并计算细胞存活率。细胞存活率(%) = $(OD_{实验组} - OD_{空白组}) / (OD_{对照组} - OD_{空白组}) \times 100\%$ 。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 将转染 48 h 后各组细胞以及只加培养液的空白对照组细胞消化离心,冰 PBS 溶液洗涤 2 次,每孔细胞用 400 μ l 结合缓冲液重悬,滤入流式管后依次加入 5 μ l Annexin V 和 10 μ l PI 染液,上机检测,所有细胞分为 4 组:Q1: Annexin V⁻PI⁺ - 坏死细胞; Q2: Annexin V⁺PI⁺ - 凋亡后继发坏死细胞; Q3: Annexin V⁺PI⁻ - 早期凋亡细胞; Q4: Annexin V⁻PI⁻ - 存活细胞。细胞凋亡率(%) = $(Annexin V^+PI^+ 细胞数 + Annexin V^+PI^- 细胞数) / 10\ 000 \times 100\%$ 。

1.2.6 Transwell 小室迁移实验 转染 48 h 后将 miR-98mimics 组、mimics-NC 组、miR-98inhibitor 组、inhibitor-NC 组以及空白对照组细胞加胰酶消化,吹打成单细胞悬液, PBS 溶液洗涤细胞 2 次后,无血清培养基重悬,调整细胞浓度为 $(1 \sim 2) \times 10^5$ 个/ml,取 100 μ l 接种于 Transwell 小室内,向下室加入 500 μ l 含 10% 胎牛血清的培养基,37 $^{\circ}$ C 培养 10~12 h,取出小室,用棉签轻轻擦掉小室内未穿过膜的细胞,用 95% 乙醇溶液固定 15 min 后以 0.1% 结晶紫染色 10 min, PBS 清洗 2~3 遍,空气中自然风干。将小室倒置于载玻片上,于正置荧光显微镜下随机选取 5 个($\times 200$)视野计数穿过膜的细胞数并进行拍照。

1.2.7 Transwell 小室侵袭实验 用无血清培养基按 1:7 将基质胶稀释,取 50 μ l 于每一个小室内,将铺好基质胶的小室放于 37 $^{\circ}$ C 培养箱内放置 4 h 后方可使用。将各组细胞用胰酶消化后制成单细胞悬液, PBS 洗涤细胞 2 次后,无血清培养基重悬,调整细胞浓度为 $(1 \sim 2) \times 10^5$ 个/ml,取 100 μ l 悬液缓慢滴入铺好基质胶的上室内,向下室加入 500 μ l 含 10% 胎牛血清的培养基,37 $^{\circ}$ C 培养 10~12 h,取出小室,用棉签轻轻擦掉未穿过膜的细胞,95% 乙醇溶液固定 15 min,0.1% 结晶紫染色 10 min, PBS 清洗 2~3 遍,空气中自然风干。将小室倒置于载玻片上,于正置荧光显微镜下随机选取 5 个($\times 200$)视野计数穿过膜的细胞数并进行拍照。

1.2.8 Western blot 法观察凋亡蛋白 Bcl-2 的表达

将转染后 48 h 各组细胞以及只加培养液的空白对照组细胞从培养箱中取出,冷 PBS 洗 2 遍,冰上裂解 30 min 后离心,取上清液,采用 BCA 法蛋白定量后;加入 5 \times 蛋白上样缓冲液,沸水煮 10 min,室温下冷却后置于 -20 $^{\circ}$ C 保存;实验时经过电泳分离蛋白、转膜、封闭、洗膜等操作后,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日,二抗室温孵育 2 h,最后加入电化学发光试剂,利用 ImageQuantTM LAS-4000 型发光成像系统检测蛋白荧光信号并显像,采用 Image J 软件分别测量 Bcl-2 和 β -actin 条带的积分光密度值,以 Bcl-2/ β -actin 的值来反映 Bcl-2 的相对表达量。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析和 LSD 法。

2 结果

2.1 转染后 HepG2 细胞内 miR-98 表达水平的变化 转染 24 h 后,以空白对照组的表达量为基准, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达水平,结果发现 miR-98mimics 组细胞内 miR-98 的表达量约为空白对照组的 (34.81 ± 4.80) 倍,而 miR-98inhibitor 组细胞内 miR-98 的表达量约为空白对照组的 (0.33 ± 0.03) 倍,表明转染 miR-98mimics 可有效上调 HepG2 细胞内 miR-98 的表达水平,而转染 miR-98inhibitor 则能有效下调 miR-98 的表达,为后续进一步试验奠定了基础,见图 1。

2.2 miR-98 对肝癌 HepG2 细胞增殖的影响 转染 48 h 后,空白对照组、miR-98mimics 组、mimics-NC 组、miR-98inhibitor 组及 inhibitor-NC 组之间细胞存活率差异有统计学意义($F = 28.005, P < 0.05$)。

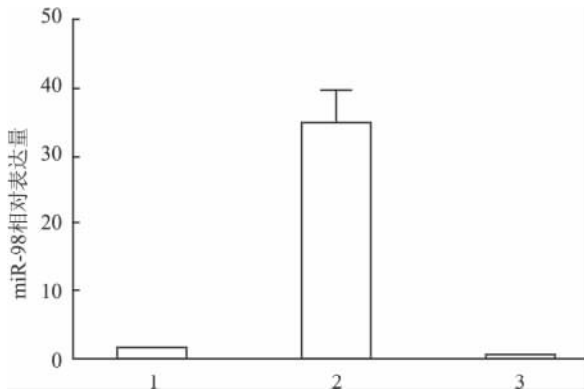


图1 转染后各组 HepG2 细胞内 miR-98 相对表达水平
1: 空白对照组; 2: miR-98mimics 组; 3: miR-98inhibitor 组

miR-98mimics 组与空白对照组、mimics-NC 组相比, 细胞存活率分别下降 24. 31%、20. 07% ($P < 0. 05$); 而 miR-98inhibitor 组与空白对照组、inhibitor-NC 组相比, 细胞活力升高, 细胞存活率分别升高 15. 37%、16. 47% ($P < 0. 05$); 而空白对照组、mimics-NC 组、inhibitor-NC 组间细胞存活率间差异均无统计学意义。以上结果表明, 上调 miR-98 表达可抑制细胞活力, 降低细胞存活率, 见图 2。

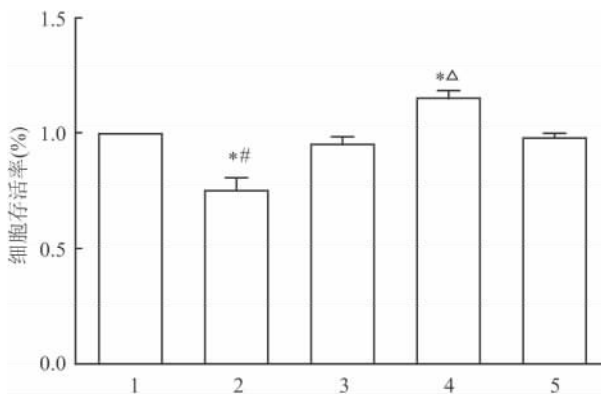


图2 MTT 检测 miR-98 对 HepG2 细胞增殖的影响

1: 空白对照组; 2: miR-98mimics 组; 3: mimics-NC 组; 4: miR-98inhibitor 组; 5: inhibitor-NC 组; 与空白对照组比较: * $P < 0. 05$; 与 mimics-NC 组比较: # $P < 0. 05$; 与 inhibitor-NC 组比较: $\Delta P < 0. 05$

2.3 miR-98 对肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响 转染 48 h 后, 空白对照组、miR-98mimics 组、mimics-NC 组、miR-98inhibitor 组及 inhibitor-NC 组之间细胞凋亡率差异有统计学意义 ($F = 211. 81, P < 0. 05$)。miR-98mimics 组细胞凋亡率显著高于空白对照组、mimics-NC 组 ($P < 0. 05$); miR-98inhibitor 组细胞凋亡率则低于空白对照组以及 inhibitor-NC 组 ($P < 0. 05$); mimics-NC 组、inhibitor-NC 组细胞凋亡率高

于空白对照组 ($P < 0. 05$), 见图 3。

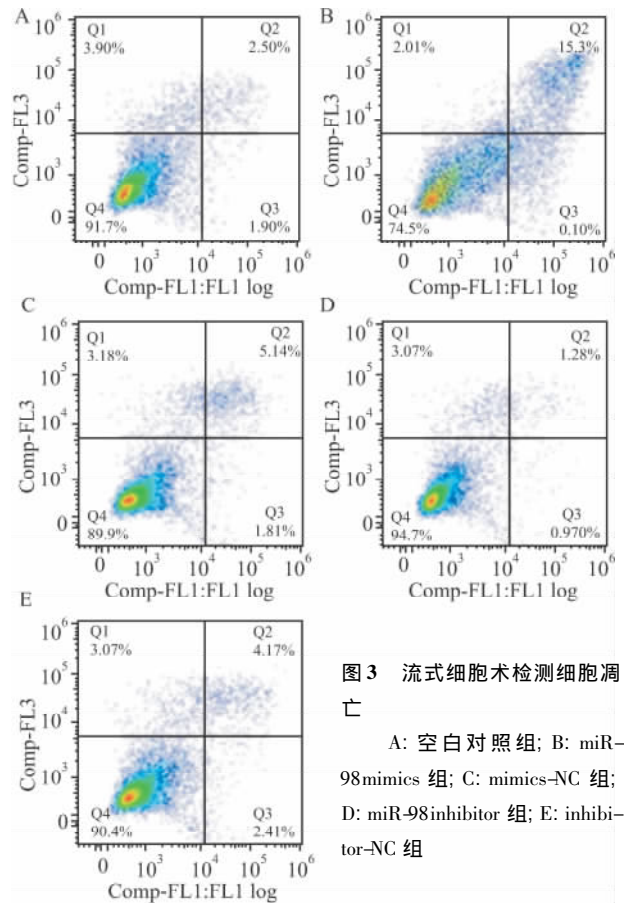


图3 流式细胞术检测细胞凋亡

A: 空白对照组; B: miR-98mimics 组; C: mimics-NC 组; D: miR-98inhibitor 组; E: inhibitor-NC 组

2.4 miR-98 对肝癌 HepG2 细胞迁移能力的影响

空白对照组、miR-98mimics 组、mimics-NC 组、miR-98inhibitor 组及 inhibitor-NC 组之间细胞穿膜数差异有统计学意义 ($F = 67. 02, P < 0. 05$)。过表达 miR-98 的肝癌细胞穿入到下层小室的数目与空白对照组、mimics-NC 组相比分别减少 44. 11%、39. 40% ($P < 0. 05$)。而将 miR-98 干扰后, 穿入到下层小室的肝癌细胞数目明显多于空白对照组以及 inhibitor-NC 组, 分别增加 80. 83%、101. 8% ($P < 0. 05$), 但空白对照组、mimics-NC 组、inhibitor-NC 组间穿膜细胞数差异无统计学意义 ($P > 0. 05$), 见表 1、图 4。

2.5 miR-98 对肝癌 HepG2 细胞侵袭能力的影响

空白对照组、miR-98mimics 组、mimics-NC 组、miR-98inhibitor 组及 inhibitor-NC 组之间细胞穿膜数差异有统计学意义 ($F = 42. 40, P < 0. 05$)。miR-98mimics 组细胞穿过基质胶进入到下层小室的数目与空白对照组、mimics-NC 组相比分别减少 59. 83%、57. 60% ($P < 0. 05$)。miR-98inhibitor 组细胞穿过基质胶进入到下层小室的肝癌细胞数目明显

多于空白对照组以及 inhibitor-NC 组,分别增加 73.80%、88.62% ($P < 0.05$),但空白对照组、mimics-NC 组、inhibitor-NC 组间穿膜细胞数差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1、图 5。

表 1 各组中 Transwell 侵袭迁移实验穿膜细胞数(个/HP $\bar{x} \pm s$)

组别	迁移	侵袭
空白对照	100.2 ± 10.640	45.8 ± 9.039
mimics-NC	92.4 ± 7.128	43.4 ± 8.792
miR-98mimics	56.0 ± 11.235* #	18.4 ± 4.393* #
miR-98inhibitor	181.2 ± 16.634* # Δ	79.6 ± 7.893* # Δ
inhibitor-NC	89.8 ± 15.385	42.2 ± 6.419

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 mimics-NC 组比较: # $P < 0.05$; 与 inhibitor-NC 组比较: $\Delta P < 0.05$

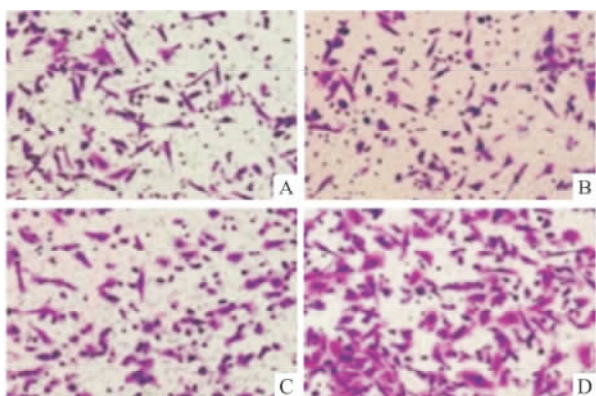


图 4 Transwell 小室迁移实验
A: 空白对照组; B: miR-98mimics 组; C: mimics-NC 组; D: miR-98inhibitor 组; E: inhibitor-NC 组

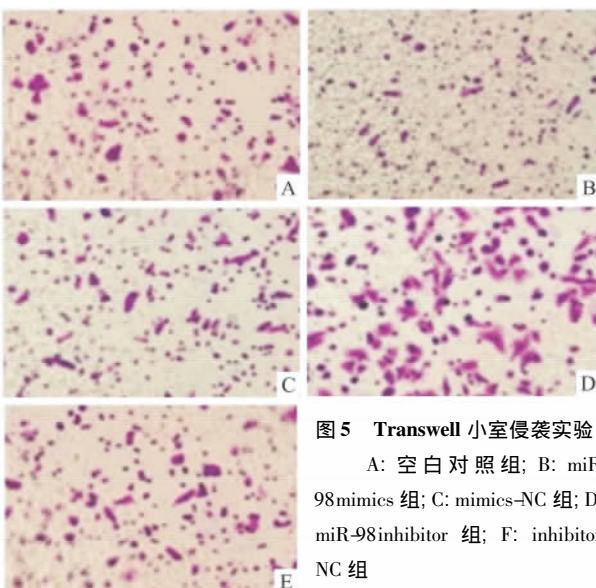


图 5 Transwell 小室侵袭实验
A: 空白对照组; B: miR-98mimics 组; C: mimics-NC 组; D: miR-98inhibitor 组; E: inhibitor-NC 组

2.6 凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达水平 Western blot 法检测显示 转染 48 h 后,miR-98mimics 组 Bcl-

2 的表达水平明显低于空白对照组、mimics-NC 组 ($P < 0.05$)。miR-98inhibitor 组 Bcl-2 的表达水平明显高于空白对照组以及 inhibitor-NC 组 ($P < 0.05$),但空白对照组、mimics-NC 组、inhibitor-NC 组间 Bcl-2 的表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 见图 6。

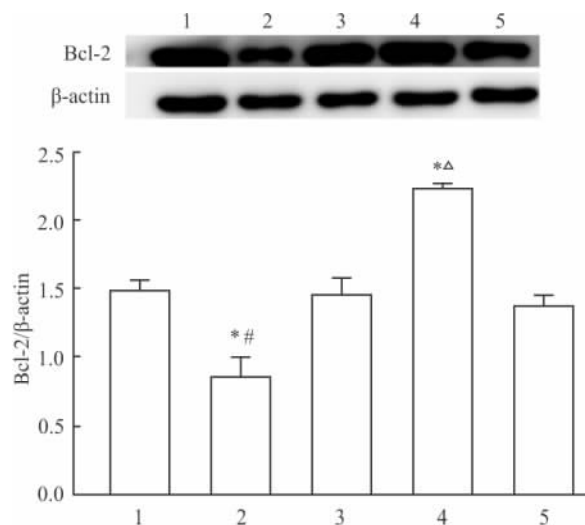


图 6 凋亡相关蛋白 Bcl-2 相对表达水平

1: 空白对照组; 2: miR-98mimics 组; 3: mimics-NC 组; 4: miR-98inhibitor 组; 5: inhibitor-NC 组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 mimics-NC 组比较: # $P < 0.05$; 与 inhibitor-NC 组比较: $\Delta P < 0.05$

3 讨论

miRNA 是一类长度为 21 ~ 25 个核苷酸组成的非编码单链小分子 RNA,广泛存在于各种动植物中,抑制靶 mRNA 翻译,对基因进行转录后翻译和表达的调控,进而参与生物体的生长发育及多种生理病理学过程的调控,包括细胞分化、增殖、凋亡。诸多肝癌相关的研究^[5]表明,多种 miRNA 可通过调控不同的癌基因和抑癌基因的表达实现对肝癌发生发展过程的调控,包括肝癌细胞的增殖、凋亡、侵袭转移等。

let-7 家族已经被证实在肝癌组织中表达下调^[6],let-7 可通过下调 c-myc 和上调 p16(Ink4a) 的表达抑制肝癌细胞增殖^[7],还可通过抑制 Bcl-2 表达来增强索拉非尼诱导的细胞凋亡^[8],此外,let-7 对肝癌的转移有明显的抑制作用,与患者的生存期紧密相关^[9]。miR-98 是 let-7 家族的一员,研究^[10]证实 miR-98 可靶向抑制 ALK4、MMP11 的表达,进而抑制乳腺癌细胞增殖、侵袭以及血管生成。在人耐顺铂肺腺癌细胞株 A549/DDP 中,过表达的 miR-98 可以上调 HMG2 的表达来增加肺腺癌细胞对顺铂的敏感性^[11]。但目前国内仍未有 miR-98 对肝癌

HepG2 细胞系增殖及侵袭能力影响的报道。本研究结果表明上调肝癌 HepG2 细胞内 miR-98 的表达,可以抑制细胞的增殖,促进细胞凋亡,减弱细胞的侵袭迁移能力,对于相关机制,本研究也进行了初步的探索,结果发现,miR-98 可能通过下调 Bcl-2 的表达促进 HepG2 细胞的凋亡。

Bcl-2 属于 Bcl-2 家族,是一种抗凋亡基因 Bcl-2 家族在线粒体凋亡信号的调控中发挥着重要作用。研究^[12-13]表明在 HCC 中 miRNA 主要通过 Bcl-2 家族来影响细胞凋亡。miR-125b 通过抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达促进细胞凋亡; miR-221 则可抑制 Bcl-2 的表达发挥抗凋亡的作用; miR-122 也能通过抑制 Bcl-2 的表达抑制凋亡;此外 miR-224 也可通过直接调节 Bcl-2 的表达发挥抗凋亡的作用^[14-15]。且已有相关研究^[11]表明在人肺腺癌细胞中,上调 miR-98 的表达后,可引起 Bcl-2、Bcl-xL 的表达下调进而促进细胞凋亡,因此本研究对改变 miR-98 的表达后 HepG2 细胞内 Bcl-2 的表达水平进行进一步观察,Western blot 结果显示,上调 miR-98 表达后,可引起 Bcl-2 表达下调,抑制 miR-98 的表达,Bcl-2 表达上调,表明 miR-98 可能通过下调 Bcl-2 的表达,促进细胞凋亡。

综上所述,本研究证实 miR-98 在肝癌的发生发展过程中发挥着抑癌基因的作用,但是 miR-98 影响这些生物学行为相应的靶基因、信号通路仍需进一步研究。

参考文献

[1] 陈建国,张思维,陈万青. 中国 2004-2005 年全国死因回顾抽样调查肝癌死亡率分析[J]. 中华预防医学杂志, 2010, 44(5): 383-9.

[2] Zahreddine H, Borden K L. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer[J]. *Front Pharmacol*, 2013, 4: 28.

[3] Gardner B M, Pincus D, Gotthardt K, et al. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(3): a013169.

[4] Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, et al. Comprehensive analysis

of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues [J]. *Oncogene*, 2006, 25(17): 2537-45.

[5] Law P T, Wong N. Emerging roles of microRNA in the intracellular signaling networks of hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(3): 437-49.

[6] Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, et al. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(13): 6092-9.

[7] Lan F F, Wang H, Chen Y C, et al. Hsa-let-7g inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by downregulation of c-Myc and upregulation of p16(INK4A) [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(2): 319-31.

[8] Shimizu S, Takehara T, Hikita H, et al. The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2010, 52(5): 698-704.

[9] Mott J L. MicroRNAs involved in tumor suppressor and oncogene pathways: implications for hepatobiliary neoplasia [J]. *Hepatology*, 2009, 50(2): 630-7.

[10] Siragam V, Rutnam Z J, Yang W, et al. MicroRNA miR-98 inhibits tumor angiogenesis and invasion by targeting activin receptor-like kinase-4 and matrix metalloproteinase-11 [J]. *Oncotarget*, 2012, 3(11): 1370-85.

[11] Xiang Q, Tang H, Yu J, et al. MicroRNA-98 sensitizes cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma cells by up-regulation of HMGGA2 [J]. *Pharmazie*, 2013, 68(4): 274-81.

[12] Gramantieri L, Fornari F, Ferracin M, et al. MicroRNA-221 targets Bcl-2 in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(16): 5073-81.

[13] Zhang Y, Takahashi S, Tasaka A, et al. Involvement of microRNA-224 in cell proliferation, migration, invasion, and anti-apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(3): 565-75.

[14] Zhao A, Zeng Q, Xie X, et al. MicroRNA-125b induces cancer cell apoptosis through suppression of Bcl-2 expression [J]. *J Genet Genomics*, 2012, 39(1): 29-35.

[15] Lin C J, Gong H Y, Tseng H C, et al. miR-122 targets an anti-apoptotic gene, Bcl-2, in human hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375(3): 315-20.

Effect of miR-98 on proliferation, apoptosis, invasion and migration of hepatocellular carcinoma HepG2 cells

Gao Shuang, Li Wencheng, Liu Jiatao, et al

(Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the potential mechanism of miR-98's effects on proliferation, apoptosis, and invasion/migration of HepG2 hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods** miR-98 mimics, mimics-NC, miR-

条件培养基局部移植对大鼠脊髓损伤的修复作用

张 峰, 申才良, 宋旆文, 章仁杰, 董福龙, 杨 昆

摘要 目的 观察骨髓间充质干细胞的条件培养基(BMSC-CM)局部移植对脊髓损伤修复的作用。方法 采用改良的Allen装置制作大鼠T9脊髓损伤模型,随机分为对照组(脊髓损伤后局部微量注射生理盐水10 μ l)和实验组(脊髓损伤后局部注射BMSC-CM 10 μ l),两组均采用BBB评分、斜板实验法观察大鼠运动功能恢复情况,苏木精-伊红(HE)染色观察脊髓损伤处血管生长及空洞体积的改变情况。结果 实验组大鼠的BBB后肢功能评分、斜板倾斜角度优于对照组($P < 0.05$),脊髓损伤处空洞体积明显小于对照组,血管直径大于对照组。结论 BMSC-CM能够减小脊髓损伤处的空洞体积和促进血管生长,从而促进脊髓损伤后神经功能的恢复。

关键词 脊髓损伤; 间充质干细胞; 条件培养基; 移植

中图分类号 R 651.21

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)05-0599-05

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的特征是原发性机械损伤后迅速触发继发性损伤,损伤区出现缺血、缺氧、炎症反应以及神经元和少突胶质细胞的凋亡。随着时间推移,星形胶质瘢痕和脊髓空洞形成并抑制神经轴突再生,使其损伤平面以下的运动和感觉功能障碍。近年来,随着干细胞技术的发展,干细胞移植治疗SCI已成为热点,其中骨髓间充质

干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)移植已被广泛研究,其能够抑制炎症反应和细胞凋亡,促进神经轴突和血管再生,减少星形胶质瘢痕和空洞,促进运动功能恢复^[1-2]。然而,BMSCs移植也有诸多不利方面:如移植后在宿主体内无法长期存活;不能够有效定植和分化;在不同的损伤环境中,BMSCs移植可引起不同的不良反应。目前直接利用含BMSCs所分泌的细胞因子的条件培养基对于许多疾病的治疗取得积极的疗效^[3-6],本实验假设BMSCs移植对SCI的神经功能恢复并不完全依赖于细胞修复,可能还依赖于其所分泌的各种细胞因子,因此,该研究利用富含BMSCs分泌的各种细胞因子的条件培养基治疗大鼠SCI,观察其疗效。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 4~6周龄、体重(100 \pm 20)g的清洁级SD大鼠2只;普通级健康成年雌性SD大鼠40只,体重(240 \pm 20)g,均由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 DMEM-LG购自美国HyClone公司;胎牛血清、DMEM/F12培养基购自美国Gibco公司;FITC标记的抗大鼠CD34、CD44及PE标记的抗大鼠CD29、CD90抗体购自美国BioLegend公司;胰酶细胞消化液、青/链霉素溶液($\times 100$)购自中国碧云天公司。

1.2 方法

2015-03-11 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81472088)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院脊柱外科,合肥 230022

作者简介:张 峰,男,硕士研究生;

申才良,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:shencailiang1616@163.com

98 inhibitor and inhibitor-NC were transiently transfected into HepG2 cells. Effects of miR-98 on proliferation, apoptosis, invasion/migration of HepG2 cells were determined by MTT assay, flow cytometer, and Transwell assay. Western blot was then performed to determine Bcl-2 expression levels in each group. **Results** MTT assay demonstrated that proliferation rate of HepG2 cells in miR-98 overexpressing group was significantly lower compared with control groups. Annexin V-FITC/PI revealed that apoptosis was more prominent in miR-98 overexpressing group compared with control groups. Transwell assay revealed that invasion and migration were significantly attenuated in miR-98 overexpressing group compared with control groups. Western blot demonstrated that Bcl-2 expression level was lower in miR-98 overexpression group compared with control groups. **Conclusion** miR-98 serves as a suppressor in the development of HCC; miR-98 promotes apoptosis of HCC cells by down regulating expression of Bcl-2.

Key words miR-98; HepG2; proliferation; apoptosis; invasion; migration