

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.14.007

过表达 miR-29a 对人椎间盘退变髓核细胞凋亡的影响

刘晓潭,田林强,王宏伟,郭志豪

(新乡医学院第三附属医院骨二科,河南新乡 453003)

[摘要] **目的** 探讨 miR-29a 在人椎间盘退变髓核(NP)细胞凋亡的调控作用。**方法** 体外培养椎间盘退变 NP 细胞,构建重组真核表达质粒 cherry/miR-29a,脂质体 Lipofectamine 转染进入 NP 细胞,应用反转录实时定量 PCR(RT-qPCR)检测 NP 细胞中 miR-29a 的表达变化,Western blot 法检测凋亡相关蛋白 Caspase-3 前体的表达变化,流式细胞仪检测 NP 细胞凋亡水平变化。**结果** NP 细胞转染重组质粒 cherry/miR-29a 48 h 后,NP 细胞中 miR-29a 的表达水平较 NP 细胞和转染空质粒的 NP 细胞中的 miR-29a 明显升高($P<0.05$);凋亡相关蛋白 Caspase-3 前体的水平则明显下降($P<0.05$);NP 细胞凋亡水平明显升高($P<0.05$)。**结论** 在椎间盘 NP 细胞中过表达 miR-29a 能促进 NP 细胞凋亡,其机制可能是通过 Caspase-3 途径起作用。

[关键词] 椎间盘;细胞凋亡;Caspase-3;过表达;miR-29a;椎间盘退变 NP 细胞

[中图分类号] R34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)14-1893-03

Overexpression of MicroRNA-29a regulates nucleus pulposus cells apoptosis in human intervertebral disc degeneration

Liu Xiaotan, Tian Linqiang, Wang Hongwei, Guo Zhihao

(Second Department of Orthopaedics, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang

Medical College, Xinxiang, Henan 453003, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of MicroRNA-29a (miR-29a) on nucleus pulposus cells apoptosis in human intervertebral disc degeneration. **Methods** Intervertebral disc degeneration nucleus pulposus cells was isolated, cells were transfected with recombinant plasmid cherry/miR-29a by lipofectamine method, and then RT-qPCR was used to measure the expressive level of miR-29; the protein expressive level of Caspase-3 was detected by Western blot and flow cytometry (FCM) was applied to detect the cells apoptosis. **Results** NP cells transfer to the recombinant plasmid cherry/miR-29a. The miR-29a expression level of NP cell was significantly higher compared with the blank and empty plasmid group ($P<0.05$); the apoptosis-related protein Caspase-3 precursor level significantly decreased ($P<0.05$) while the NP cell apoptosis level significantly increased ($P<0.05$) after 48 hours. **Conclusion** The overexpression of miR-29a might regulate nucleus pulposus cells apoptosis of human intervertebral disc degeneration, and the mechanisms among it might be concerned with Caspase-3 pathway.

[Key words] intervertebral disk; apoptosis; Caspase-3; overexpression; miR-29a; intervertebral disc degeneration nucleus pulposus cells

据相关报道,约 80% 的老年人患腰痛疾病^[1]。其中椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)是椎间盘源性腰痛等一系列下腰痛疾病的主要病因,引起负责基质合成的髓核(nucleus pulposus, NP)细胞凋亡,导致髓核细胞数量减少,是这个病变过程的关键原因^[2-4]。所以,通过抑制髓核细胞的凋亡,可能会促进髓核基质的合成,达到延缓椎间盘退变的目的,具有重要的生物学和医学意义。

微小 RNA(miRNA) 是一类长度约 22 bp 的内源性非编码 RNA,为生物体内重要的转录后基因调控因子^[5],在生物体细胞增殖与凋亡中发挥重要作用^[6]。目前已有研究报道微小 RNA-29a(miR-29a) 参与肝癌细胞凋亡的调控^[7],但 miR-29a 调控椎间盘退变髓核细胞凋亡及其相应的靶基因鲜有报道,本研究通过脂质体 lipofectamine 转染法使 miR-29a 成功在体外培养的椎间盘退变 NP 细胞中过表达,观察 miR-29a 对凋亡相关蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)前体表达水平的影响,并通过流式细胞仪检测 NP 细胞的凋亡水平,检测过表达 miR-29a 对椎间盘退变髓核细胞凋亡的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 NP 细胞来源于新乡医学院附属医院的椎间

盘退变患者。其中,男 6 例(50%),女 6 例(50%),患者均签署知情同意书且在未接受治疗前收集样本,包括 NP 细胞。

1.2 方法

1.2.1 试剂及仪器 定量 PCR 用的 SYBR Green PCR Master Mix(日本 TOYOBO 公司);逆转录试剂盒,限制性内切酶、TaqDNA 聚合酶、dNTP(日本 Takara 公司);总蛋白提取试剂盒(BestBio 公司);脂质体 Lipofectamine™ 2000、TRIzol(美国 Invitrogen 公司);Guava 凋亡检测试剂盒(南京凯基生物公司),Caspase-3 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的抗体(santa cruz 公司),反转录实时定量 PCR(RT-qPCR)反应仪为 ABI PRISM® 7500(ABI 公司)。

1.2.2 miR-29a 真核表达载体的构建 由 miRBase 网站查询获得 miR-29a 前体序列(M10000087),应用 primer 5.0 设计引物,上游引物序列 F: 5'-GCG AAT TCA TGG TTA AAG AGC CCA ATG TAT GCT G-3',下游引物序列 R: 5'-CGG GTA ACC AGT ATA ACC ATT CAT GAT ATG CTA A-3',划线处分别为 EcoR I 和 Kpn I 酶切位点,引物由上海 life 公司合成。PCR 反应程序为:95 °C 3 min;95 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 1 min,35 个循环;72 °C 5 min。用 EcoR I 和 Kpn I 双

酶切 PCR 产物及 pmR-mcherry 质粒 3 h, T4 连接酶 16 °C 过夜连接酶切回收产物, 连接产物转化至 DH 5 α 大肠杆菌感受态细胞中, 经 Amp 抗性筛选和挑选阳性克隆提取重组质粒进行双酶切鉴定后测序验证。

1.2.3 细胞培养及转染 将 NP 细胞株于 37 °C, 5% CO₂ 及一定湿度下培养在 RPMI1640 培养液 + 10% 胎牛血清中至 6 孔板中的细胞生长密度达 70%~80%, 用 lipofectamine 转染试剂盒分别将重组质粒 cherry/miR-29a 和空载体 cherry 转染至 NP 细胞, 具体步骤参照转染试剂盒说明书。每孔质粒量为 0.5 μ g, 终浓度为 150 nmol/L。试验分为 3 个组: 重组质粒组、空质粒组和空白组。

1.2.4 RT-qPCR 检测 miR-29a 在椎间盘组织及 NP 细胞中的表达情况 采用 RT-qPCR 来检测 miR-29a 转录水平的差异。Trizol 法提取组织或细胞的总 RNA, oligo dT 法反转录合成 cDNA 后进行 miR-29a mRNA 水平定量 PCR 检测。miRNA 茎环引物为: 上游 5'-ACA CTC CAG CTG GGT TTG GGA GTC T-3', 下游 5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA-3'; U6 基因为内参: 上游 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', 下游 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。RT-qPCR 扩增程序为: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min (1 个循环); 95 °C 15 s, 60 °C 1 min 共 40 个循环。RT-qPCR 反应完成后进行熔解曲线分析, 为单一峰, 目的基因为特异性扩增。为确保 qRT-PCR 结果的准确性, 对每一个样品重复分析 3 次, 包括靶标基因 (miR-29a) 和看家基因 (U6)。观察 IDD 患者椎间盘组织与健康对照组织中 miR-29a 的表达情况。

1.2.5 流式细胞术检测 NP 细胞的凋亡水平 用不含乙二胺四乙酸 (EDTA) 的胰酶消化 NP 细胞; 4 °C、500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 收集 NP 细胞; 将 NP 细胞悬于标记缓冲液中; 加入 Guava 试剂, 避光室温反应 15 min; 加入标记缓冲液, 用流式细胞仪观察细胞凋亡情况。

1.2.6 Western blot 蛋白水平检测细胞凋亡蛋白 Caspase-3 前体的表达 转染 48 h 后收集样品, 细胞去培养基后加入 RIPA 裂解液, 蛋白质定量试剂盒 (BCA 法) 蛋白定量后按一定浓度进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 恒压电泳, 浓缩胶 80 V, 20~30 min, 分离胶 100 V 电泳, 电泳时间根据 Marker 的位置确定; 恒流 276 mA 转膜 2.5 h; 室温封闭 1 h; 1:1000 稀释 I 抗 4 °C 孵育过夜; 1:4000 稀释 II 抗室温孵育 1 h; 暗室曝光。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者椎间盘组织中 miR-29a 的表达情况 miR-29a 在 IDD 患者椎间盘组织中的水平显著高于健康对照组织中的水平 ($P < 0.05$), 见图 1。

2.2 重组质粒 cherry/miR-29a 的构建与鉴定 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 可见到与预期片段大小相符的条带 (图 2A)。对重组质粒 cherry/miR-29a 进行 EcoR I 和 Kpn I 双酶切检测, 获得约 4500 bp 和 400 bp 的条带 (图 2B), 与预期大小相符, miR-29a 前体片段已成功连接至 cherry 空质粒中; 对重组质粒进行测序, 结果也证明插入的片段是 miR-29a 序列。

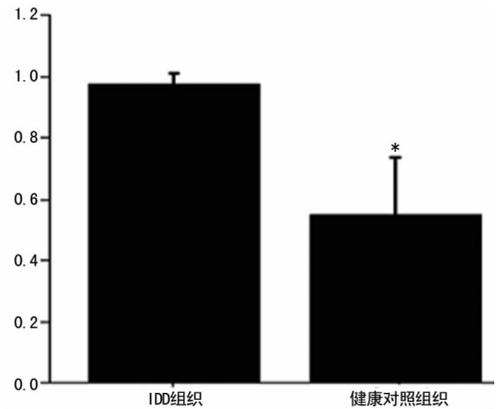
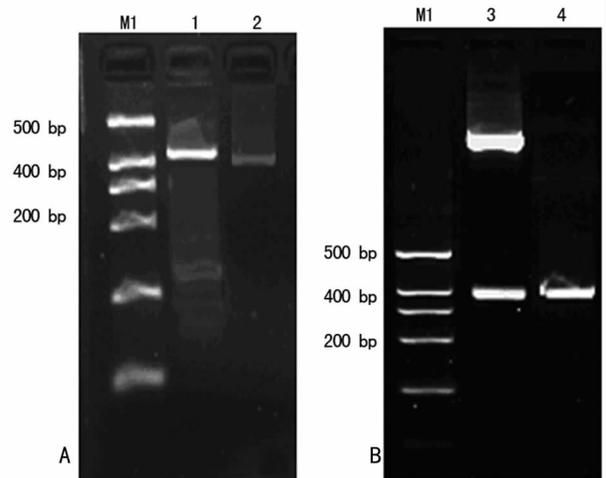


图 1 椎间盘退变患者与健康对照组织中 miR-29a 的水平比较



1、2: miR-29a 前体片段 PCR 产物; 3: miR-29a 前体片段 PCR 产物; 4: cherry/miR-29a 双酶切产物; M1: DL 500 bp Marker。

图 2 PCR 产物及 EcoR I 和 Kpn I 双酶切产物电泳图

2.3 RT-qPCR 检测 miR-29a 的表达水平 cherry/miR-29a 感染 NP 细胞 24 h 后, RT-qPCR 检测结果是 miR-29a 的表达水平较 cherry 空载体的表达显著升高 ($P < 0.01$), 见图 3。

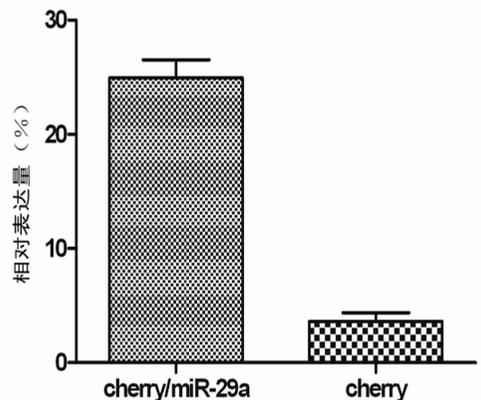
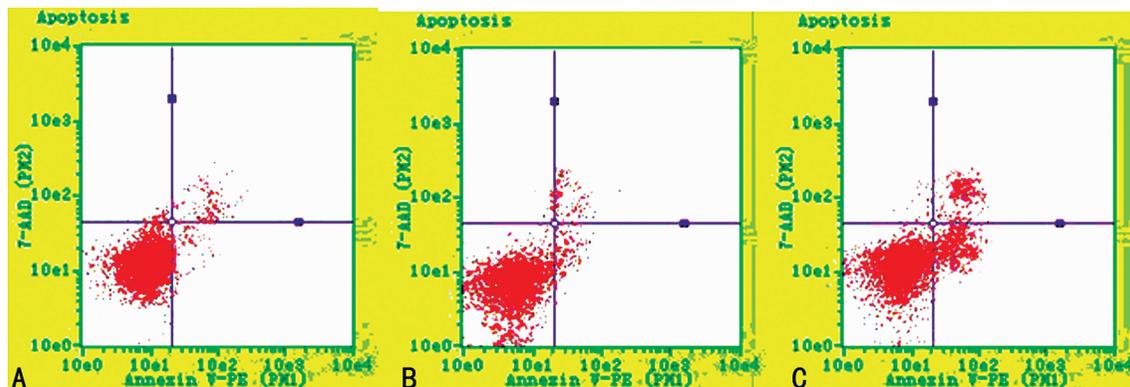


图 3 miR-29a 的相对表达量

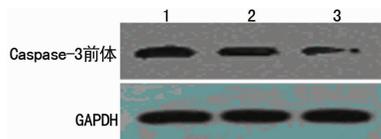
2.4 过表达 miR-29a 对 NP 细胞凋亡的影响 NP 细胞转染 cherry/miR-29a 后, 采用 Guava 流式细胞方法检测, 空白组 [(3.12 ± 0.46)%] 和空质粒组 [(3.33 ± 0.79)%] 与重组质粒组细胞的凋亡率 [(18.32 ± 1.77)%] 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4。



A:空白组;B:空质粒组;C:重组质粒组。

图 4 流式细胞术检测 NP 细胞的凋亡情况

2.5 miR-29a 对 NP 细胞相关凋亡蛋白 Caspase-3 的影响
 空白组与空质粒组中 Caspase-3 前体的表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 重组质粒组中 Caspase-3 前体的表达量均低于空质粒组和空白组 ($P < 0.05$)。如图 5 所示, 过表达 miR-29a 后, Caspase-3 的蛋白水平的表达出现明显的下调。与空白组 (1.12 ± 0.09) 和空质粒组 (1.09 ± 0.11) 相比较, 重组质粒组细胞 (0.50 ± 0.15) 中凋亡相关蛋白 Caspase-3 水平低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



1:空白组;2:空质粒组;3:重组质粒组。

图 5 Western blot 检测 Caspase-3 前体的水平

3 讨 论

人类 miR-29 家族存在不同的亚型, 分别由 miR-29a/29b/29c 组成。近年来, 多项研究证实 miR-29 与细胞增殖及凋亡有着重要的作用。如在间变淋巴瘤激酶 (ALK) 阳性间变性大细胞淋巴瘤中, miR-29a 的表达下调, 从而引起 MCL-1 过表, 促进细胞凋亡; 在神经细胞成熟的过程中, miR-29b 直接靶向 BH3 基因, 抑制细胞凋亡^[8-9]。而有报道显示 miR-29a 参与椎间盘退变的发生和发展, 在本试验结果证实 miR-29a 在椎间盘退变患者椎间盘组织中的表达水平与健康正常组织相比差异有统计学意义。

有报道使用病毒载体感染法使心肌细胞过表达 pre-miRNA (miRNA 的前体), 结果显示细胞内 pre-miRNA 的表达量升高超过 1 000 倍, 而 miRNA 成熟体却只有 1.5~2.0 倍的提升^[10]。本试验中所采用的特异性转染试剂 Lipofectamine 进一步地提高了细胞的转染效率, 转染 miR-29a 的重组质粒 cherry/miR-29a 进入体外培养的原代 NP 细胞, 经 RT-qPCR 验证, NP 细胞中 miR-29a 成熟体的表达量较空白组和空质粒组明显上升, 成功在 NP 细胞内过表达 miR-29a。

综上所述, 通过脂质体转染的方法, miR-29a 的过表达能促进椎间盘 NP 细胞的凋亡, 进一步的机制研究发现 Caspase-3 前体的表达水平也下降, 提示 NP 细胞的凋亡可能是通过降解 Caspase-3 实现的。本研究为证实 miRNA 参与椎间盘 NP 细胞凋亡调控, 阐明椎间盘退变的分子机制和有效治疗椎间盘

退变提供了有利的试验依据。

参考文献

- [1] Takahashi K, Aoki Y, Ohtori S. Resolving discogenic pain [J]. Eur Spine J, 2008, 17(Suppl 4): 428-431.
- [2] Liu G, Cao P, Chen H, et al. MiR-27a regulates apoptosis in nucleus pulposus cells by targeting PI3K [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75251.
- [3] Zhao CQ, Jiang LS, Dai LY. Programmed cell death in intervertebral disc degeneration [J]. Apoptosis, 2006, 11(12): 2079-2088.
- [4] Cui J, Eldredge JB, Xu Y, et al. MicroRNA expression and regulation in human ovarian carcinoma cells by luteinizing hormone [J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21730.
- [5] Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. Nature, 2004, 431(76): 350-355.
- [6] Guehring T, Wilde G, Sumner M, et al. Notochordal intervertebral disc cells: sensitivity to nutrient deprivation [J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(4): 1026-1034.
- [7] Xiong Y, Fang JH, Yun JP, et al. Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2010, 51(3): 836-845.
- [8] Desjobert C, Renalier MH, Bergalet J, et al. MiR-29a down-regulation in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas contributes to apoptosis blockade through MCL-1 overexpression [J]. Blood, 2011, 117(24): 6627-6637.
- [9] Kole AJ, Swahari V, Hammond SM, et al. miR-29b is activated during neuronal maturation and targets BH3-only genes to restrict apoptosis [J]. Genes Dev, 2011, 25(2): 125-130.
- [10] Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, et al. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling [J]. Circ Res, 2009, 104(2): 170-178.

(收稿日期: 2015-11-18 修回日期: 2016-01-06)