

不同年龄小鼠骨髓间充质干细胞中 miR203 的差异及其对细胞增殖的调控

匡威¹ 谭家莉^{2,3*} 段建民¹ 汪维健¹ 李潇¹ 王桥¹ 李洪涛¹ 刘琴瑶¹

1. 广州军区广州总医院口腔科, 广州 510010

2. 中山大学光华口腔医学院附属口腔医院, 广州 510055

3. 广东省口腔医学重点实验室, 广州 510055

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 09-1075-05

摘要: **目的** 探索不同年龄骨髓间充质干细胞中 miR203 的表达变化, 及其对骨髓间充质干细胞自我更新的作用机制。 **方法** 分别分离培养 4 周龄和 18~24 月龄的 Balb/c 小鼠 BMSCs, 对比不同年龄小鼠 BMSCs 增殖潜能的差异, 并检测不同年龄小鼠 BMSCs 中 miR-203 的表达变化差异, 从而探讨 miR-203 在骨髓间充质干细胞增殖调节中的作用机制。 **结果** 根据干细胞贴壁特性获得了稳定的骨髓间充质干细胞, 其在分化诱导条件下可获得经茜素红染色呈红色结节及油红 O 染色显示有脂质沉淀, 且成骨诱导后 I 型胶原蛋白显著表达。在增殖条件下, 与年轻 BMSCs 相比, 老年 BMSCs 增殖(传代)能力明显下降。年轻小鼠(4 周龄)BMSCs 中 miR-203 远低于老年小鼠(18~24 月龄)BMSCs 中 miR-203 表达 ($P < 0.05$)。 **结论** 年轻骨髓间充质干细胞增殖能力优于老年骨髓间充质干细胞, 可能与 miR-203 表达较低有关。

关键词: 骨髓间充质干细胞; miR203; 增殖

The difference of miR203 in mesenchymal stem cells with different age and its regulation effect on cell proliferation

KUANG Wei¹, TAN Jiali^{2,3*}, DUAN Jianmin¹, WANG Weijian¹, LI Xiao¹, WANG Qiao¹, LI Hongtao¹, LIU Qinyao¹

1. Department of Stomatology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010

2. Guanghua School of Stomatology, Hospital of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510055

3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Stomatology, Guangzhou 510055, China

Corresponding author: TAN Jiali, Email: jasminenov@gmail.com

Abstract: **Objective** To investigate the differential expression of miR203 in bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) with different age, and to explore the mechanism of miR203 during the self-renew of BMSCs. **Methods** BMSCs from 4-week and 18-24-month Balb/c mice were isolated and cultured. The proliferation potential of BMSCs in mice with different age was compared. And the different expression level of miR-203 in BMSCs with different age was also detected, in order to identify the mechanism of miR-203 in regulating the proliferation of BMSCs. **Results** BMSCs were acquired and stably cultured *in vitro* using adherent separation method. After the induction of BMSCs, the result of Alizarin red staining showed salmon tubercles in BMSCs, while the result of oil red O staining showed lipid sediment in BMSCs. After the osteogenic induction, the significant expression of type I collagen was observed. The capability of proliferation of aged BMSCs was distinctively decreased compared with that of young BMSCs during proliferation. The expression of miR-203 in BMSCs from young mice (4 weeks) was significantly lower than that in BMSCs from the aged mice (18 - 24 months, $P < 0.05$). **Conclusion** The capability of proliferation in BMSCs from young mice is superior to that in BMSCs from the aged mice, which may be related to the low expression level of miR-203.

Key words: Bone marrow mesenchymal stem cells; MiR203; Proliferation

基金项目: 国家自然科学基金项目(81100240); 广东省自然科学基金(S2012010009495); 广东省科技计划(2012B031800185); 中山大学“985”工程办支持暨中山大学青年教师培育项目(13YKPY42)

* 通讯作者: 谭家莉, Email: jasminenov@gmail.com

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是来源于中胚层的一类非造血系统多能干细胞,现常用于组织工程的种子细胞^[1]。年轻 BMSCs 的细胞干性优于老年 BMSCs,但详细机制不明,本研究以 4 周龄和 18~24 月龄的 Balb/c 小鼠作为年轻和老年 BMSCs 细胞模型,研究其增殖能力的差别,并发现 miR203 在两组细胞中差异显著,从而推测 miR203 可能参与年轻和老年 BMSCs 的调控分子,并为进一步分子机制的探索奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

选用小鼠分 4 周龄组(年轻组)及 18~24 月龄组(老年组),每组各 10 只,由广州军区广州总医院动物中心提供。试剂:DMEM/F-12(1:1)培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司); β -甘油磷酸钠、地塞米松、维生素 C、骨形态发蛋白-2(美国 Sigma 公司);RT-PCR 检测试剂盒(Omega);茜素红(美国 Sigma 公司)。

1.2 BMSCs 的分离培养及鉴定

在无菌条件下,分别取年轻组和老年组小鼠双侧胫骨和股骨细胞。吹打均匀重悬细胞,以 1×10^6 /mL 密度接种于培养瓶;24 h 后更换培养液,至细胞贴壁细胞达 80%~90% 融合后,弃培养液,PBS 清洗 3 次,用 0.25% 胰酶消化;传代至新培养瓶中,置培养箱 30 min 后,轻轻吹打,弃悬浮以及贴壁不牢细胞,加入 10% 胎牛血清以 1:3 比例开始传代培养。取扩增后第 3 代的 BMSCs,检测细胞表面分子,Cell-Quest 软件分析。同样的方法检测年轻小鼠和老年小鼠的 BMSCs。

1.3 茜素红染色

取体外培养年轻和老年的第 3~4 代 BMSCs,培养第 2 天置换成骨细胞诱导培养液(地塞米松 1×10^{-8} mol/L,维生素 C (VitC) 0.05 g/L, β -甘油磷酸钠(β -sodium glycerophosphate, β -GP) 0.01 mol/L + 100 μ g/L BMP-2,10% 胎牛血清)诱导。培养 14 d。

年轻和老年 BMSCs 成骨诱导结束后,用 0.1% 茜素红-Tris-HCl 溶液染色固定细胞,10 min 后 1% 醋酸溶液快速冲洗,不同浓度酒精依次脱水。镜下观察不同年龄个体来源的 BMSCs 成骨分化差异。

1.4 油红 O 染色

油红 O 染色液中染色 15 min 后,用 60% 异丙醇清洗 2 遍后,再用蒸馏水清洗 3 遍。镜下观察并照相。

1.5 细胞增殖检测

取年轻和老年 BMSCs 各 1000 个,培养于 6 cm 培养板,同上述 BMSCs 分离培养步骤;培养 14 d 后观察成纤维样细胞集落形成数目和大小;比较不同个体 BMSCs 数目的差异。

1.6 Western Blot 检测 I 型胶原蛋白

取不同年龄成骨诱导后的 BMSCs,RIPA 冰上裂解 30 min,4 $^{\circ}$ C,15000 r/min,离心 15 min,收集上清液。用等量的蛋白质进行 10% SDS-PAGE,350 mA 转膜 70 min。5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入二抗孵育 1.5 h,TBST 洗 3 次。用 ECL 显影,对蛋白表达进行检测。

1.7 miR203 的检测

收集不同年龄 BMSCs 及其成骨诱导细胞,用 Trizol 法提取 RNA。采用 miScript Reverse Transcription Kit 试剂盒进行反转录,设计 microRNA203 的 PCR 引物,下游引物由试剂盒提供,采用 Sybr Green 荧光 qRT-PCR 的方法。以 U6 作为内参照物,具体引物由试剂盒提供。

1.8 统计方法

所有数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS13.0 统计软件,以方差分析进行统计分析, $P < 0.05$ 被认为有统计学差异。

2 结果

2.1 BMSCs 的形态学鉴定结果

经 3 次传代后即可获得形态均一、贴壁能力强的 BMSCs,呈现典型的“纺锤状”成纤维样细胞形态(图 1)。成骨诱导第 10 天,细胞呈集落样生长,细胞间可见钙质沉积;2 周后细胞结节中心的细胞逐渐融合失去细胞结构,钙结节形成明显,经茜素红染色呈红色结节(图 2)。同期对照组结果为阴性。成脂诱导 72 h 后,细胞内即开始有小脂滴出现,约 10 d 后脂滴数量增加并相互融合,细胞由长梭形变为圆形或多边形,油红 O 染色显示有脂质沉淀(图 3)。

2.2 诱导后的 BMSCs 特异性基因表达

I 型胶原蛋白检测 经成骨诱导培养后第 7 天,I 型胶原蛋白的表达量较对照组明显升高,差异有显著性意义($P < 0.01$),图 4。

2.3 不同年龄 BMSCs 增殖能力的差异

比较了年轻小鼠(4 周龄)BMSCs 和老年小鼠(18~24 月龄)BMSCs 的增殖能力,结果发现:在增



图1 Balb/c 小鼠 BMSCs (OLMPUS 倒置相差显微镜 ×100)

Fig. 1 BMSCs of Balb/c mice (OLMPUS inverted phase contrast microscope ×100)

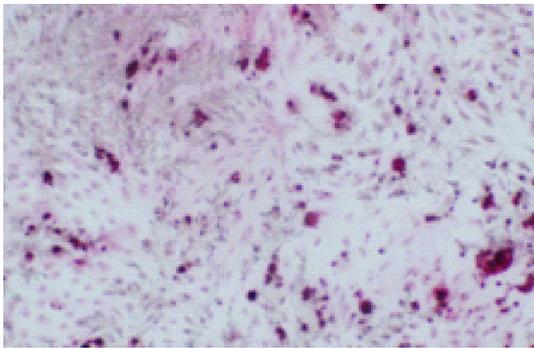


图2 Balb/c 小鼠 BMSCs 第3代成骨诱导分化14天(茜素红染色 ×100)

Fig. 2 The 3rd passage of BMSCs of Balb/c mice after 14-day osteogenic induction (Alizarin red staining ×100)

殖条件下,与年轻 BMSCs 相比,老年 BMSCs 增殖(传代)能力明显下降,图5。

2.4 miR203 在不同年里 BMSCs 中的表达差异

miR-203 在年轻和老年小鼠 BMSCs 中变化显著,年轻小鼠(4 周龄) BMSCs 中 miR-203 远低于老年小鼠(18~24 月龄) BMSCs 中 miR-203 含量($P < 0.05$),图6。

3 讨论

3.1 骨质疏松与 BMSCs

骨质疏松是全世界共同面对的年龄相关“流行”疾病。成年人在骨发育成熟后,通过骨吸收与骨形成两个过程来维持骨的新陈代谢^[2]。老年 BMSCs 增殖能力和成骨分化潜能降低是老年人骨质疏松的一个重要病因,同时也限制 BMSCs 相关治

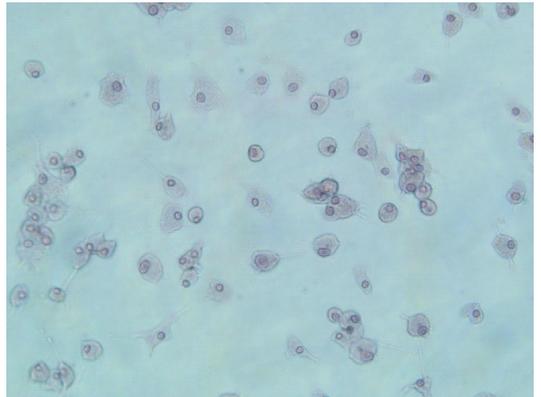


图3 Balb/c 小鼠 BMSCs 第3代成脂诱导分化10天(油红O染色 ×100)

Fig. 3 The 3rd passage of BMSCs of Balb/c mice after 10-day adipogenic induction (oil red O staining ×100)

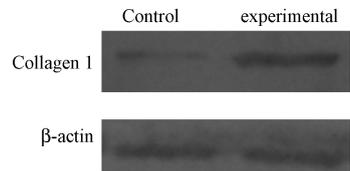


图4 Western Blot 对 I 型胶原蛋白检测

Fig. 4 Detection of type I collagen using Western blotting



图5 老年 BMSCs 的长期增殖能力低于年轻 MSCs

Fig. 5 The capability of long-term proliferation of aged BMSCs was lower than that of young BMSCs

疗策略在老年患者的应用^[3]。阐明老年 BMSCs 增殖能力和成骨分化潜能降低的分子机制,有望发现能够同时增强 MSCs 增殖和成骨分化潜能的分子靶点,对认识老年骨质疏松具有重要意义。

3.2 细胞衰老相关研究

细胞衰老也称细胞老化,一般是指细胞在信号转导作用下不可逆地脱离细胞周期并丧失增生能力后进入的一种相对稳定状态。细胞衰老是生物体中

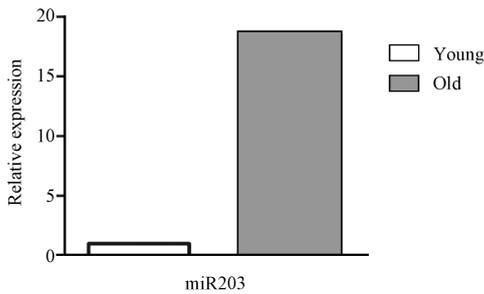


图6 miR-203在老年MSCs中表达显著增高($P < 0.05$)

Fig. 6 The expression of miR-203 in aged MSCs increased significantly compared with that in young BMSCs ($P < 0.05$)

普遍存在的一种不可逆的生长停滞现象,是器官衰老的基础,存在于任何生命的任何时期^[4]。

细胞衰老是由遗传因素与环境因素共同作用的结果。研究表明,miRNAs可以通过调控这些衰老相关蛋白所在的信号通路,促进或延缓细胞衰老^[5]。细胞的复制衰老是生物体生命周期在细胞水平上的重演。细胞复制衰老所经历的群体倍增时间(population double time, PDT)取决于细胞所来源的种属和个体特性,如供体年龄和遗传背景等,而非简单的传代次数和培养时间^[6]。

本研究比较了年轻小鼠(4周龄)BMSCs和老年小鼠(18~24月龄)MSCs的增殖能力,结果发现:在增殖条件下,与年轻BMSCs相比,老年BMSCs增殖(传代)能力明显下降。这就提示了随着年龄的增长,BMSCs作为骨组织工程的瓶颈在于体外增殖能力的局限性。因此,探明如何提高BMSCs的体外增殖能力、使其在一定时间安全有效的扩增为足够数量的干细胞意义重大。

3.3 microRNA在干细胞研究中的应用

微小RNA(miR)是一类在生物进化过程中高度保守的由18~22个核苷酸组成的单链非编码RNA。miR结合于mRNA 3'端的非编码区(3' UTR),通过抑制靶mRNA的翻译或降解靶mRNA起作用,从而调控靶标基因的表达^[7]。研究表明,microRNA参与细胞分化发育和众多生理病理过程^[8]。SIRT1、胰岛素/IGF-1和mTOR的衰老相关通路等,已有更多的衰老相关蛋白及其信号通路被研究发现^[9]。miRNAs如何调控这些衰老相关蛋白的表达及影响其所在的信号通路仍有待深入研究。目前尚未清楚miRNAs如何协同调控各衰老相关信号通路,以及对衰老相关疾病发生和发展的影响。

相信随着对衰老相关miRNAs研究的深入,将进一步揭示它们影响衰老和衰老相关疾病的分子机制,为衰老相关疾病提供新的诊断依据和治疗途径。

microRNA同样是细胞增殖和周期调节的重要分子。miR-15a能调节Cdc25A的表达,抑制细胞进入S期。miR-143也可改变ERK5的表达,调节细胞周期^[10]。综上所述,微小RNA的差异表达在成骨细胞增殖分化中发挥广泛而又重要的作用,但其作用机制、作用靶点还不甚清楚,是近年来的研究热点。

既往研究发现,miR-203在包括食道癌、胃癌、结肠癌、肝癌、前列腺癌在内的多种肿瘤细胞和组织中表达普遍降低,扮演抑癌基因的功能。在转移性的前列腺癌中,miR-203几乎检测不到^[11]。而肿瘤是由于细胞分化障碍,特别是转移性肿瘤细胞更被认为是肿瘤干细胞;从这个角度而言,低水平的miR-203可能是干细胞状态维持的重要分子。Ophir^[12]等研究发现,Bmi1在干细胞调控中发挥着重要作用,其与细胞的干性密切相关,生物信息学分析发现miR203是Bmi1的调控分子,其可能通过调节Bmi1及下游的靶分子实现对细胞干性的调控,因此,miR203对骨髓间充质干细胞衰老中可能发挥着重要作用,同时也可以作为微小RNA药物的筛选奠定理论基础。

【参考文献】

- [1] Wang XS, Li HF, Zhao Y, et al. Radix Astragali-induced differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Neural Regen Res*, 2009, 4(7):497-502.
- [2] 匡威,谭家莉,张红梅,等. miR-146a调控骨髓间充质干细胞成骨分化的机制研究. *生物医学工程与研究*, 2011, 15(5): 413-416.
Kuang W, Tan JL, Zhang HM, et al. MiR-146a down regulates the differentiation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *BME & Clin Med*. 2011, 15(5):413-416.
- [3] Tomé M, López-Romero P, Albo C, et al. MiR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*, 2011, 18(6):985-995.
- [4] Schmitt CA. Cellular senescence and cancer treatment. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1775: 5-20.
- [5] Martinez I, Almstead LL, DiMaio D. MicroRNAs and senescence. *Aging (Albany NY)*, 2011, 3(2):77-78.
- [6] Plaseterk RHA. MicroRNAs in animal development. *Cell*, 2006, 124(5):877-881.

(下转第1096页)

素 D 缺乏,控制血糖的同时,积极补充维生素 D 预防骨质疏松症,是十分必要的。

【参 考 文 献】

- [1] Branch of the Chinese medical association of osteopomsis and bone mineral salt disease. diagnosis and treatment of primary osteoporosis guide (2011). Chinese Journal of Osteopomsis and Bone Mineral Research, 2011(1):2-17.
原发性骨质疏松症诊治指南(2011年). 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2011(1):2-17.
- [2] 王君舒, 仪琼. 2型糖尿病骨质疏松症发病机制研究进展. 中医药临床杂志, 2012, 24(2):183-184.
Wang Junshu, Yi Qiong. The research progress of the pathogenesis of type 2 diabetes and osteopomsis. Clinical journal of traditional Chinese medicine, 2012, (24):183-184.
- [3] 王亮, 马远征, 李平生, 等. 绝经后骨质疏松合并 2 型糖尿病血清 25 羟维生素 D 水平研究. 中国骨质疏松杂志, 2011, 09: 784-786.
Wang Liang, Ma Yuanzheng, Li Pingsheng, et al. Study of 25-OH Vitamin D level in menopausal women with osteopomsis and type 2 diabetes. Chinese Journal of Osteopomsis, 2011(9):784-786.
- [4] Clark EM, Could V, Morrison L, et al. Randomized controlled

trial of a primary care-based screening program to identify older women with prevalent osteoporotic vertebral fractures: Cohort for Skeletal Health in Bristol and Avon (COSHIBA). J Bone Miner Res, 2012, 27(3):664-671.

- [5] 夏维波苏华, 周学瀛. 维生素 D 缺乏与骨质疏松. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2009, 2(3):145-154.
Xia Weiibo, Su Hua, Zhou Xueying. Vitamin D deficiency and osteopomsis. Chinese Journal of Osteoporosis and Bone Mineral Research, 2009, 2(3):145-154.
- [6] Lensmeyer G, Poquette M, Wiebe D, et al. The C-3 Epimer of 25-Hydroxyvitamin D3 Is Present in Adult Serum. J Clin Endocrinol Metab, 2011, [Epub ahead of print].
- [7] 王亮, 马远征, 刘海容, 等. 骨质疏松健康教育新模式探讨. 中华老年多器官疾病杂志, 2011(5):393-396.
Wang Liang, Ma Yuanzheng, Liu Hairong, et al. New model of osteoporosis health education in China. Chinese Journal of Multiple Organ Diseases in the Elderly, 2011(5):393-396.
- [8] 刘忠厚 主编. 骨质疏松诊断. 中国现代文艺出版社, 2011, 615.
Liu Zhonghou. Osteoporosis diagnosis. Hong Kong: Modern Chinese literature and art publishing house, 2011:615.

(收稿日期: 2014-03-16)

(上接第 1078 页)

- [7] 姜徽, 谢兴文, 李宁. MicroRNA 调控成骨分化与骨质疏松症相关性研究进展. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(3):338-342.
Jiang W, Xie XW, Li N. Research progress in micro RNA regulated osteogenic differentiation and osteoporosis. Chin J Osteoporos, 2014, 20(3):338-342.
- [8] Victor V, Elton K, Gen S, et al. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. J Cellphysiol, 2005, 205(2):194-201.
- [9] 周建, 陈克明, 王嘉琪, 等. 骨代谢相关因子研究进展. 中国骨质疏松杂志, 2012, 18(2):175-178.
Zhou J, Chen KM, Wang JQ, et al. Research progress on bone

metabolism-related factors. Chin J Osteoporos, 2012, 18(2):175-178.

- [10] Chiang Y, Song Y, Wang Z, et al. Aberrant expression of miR-203 and its clinical significance in gastric and colorectal cancers. J Gastrointest Surg, 2011, 15(1):63-70.
- [11] Saini S, Majid S, Yamamura S, et al. Regulatory role of miR-203 in prostate cancer progression and metastasis. Clin Cancer Res, 2011, 17(16):5287-98.
- [12] Yamada Y, Nakamura S, Ito K, et al. Injectable bone tissue engineering using expanded mesenchymal stem cells. Stem Cells, 2013, 31(3):572-80.

(收稿日期: 2014-02-16)

不同年龄小鼠骨髓间充质干细胞中 miR203 的差异及其对细胞增殖的调控

作者: [匡威](#), [谭家莉](#), [段建民](#), [汪维健](#), [李潇](#), [王桥](#), [李洪涛](#), [刘琴瑶](#), [KUANG Wei](#), [TAN Jiali](#), [DUAN Jianmin](#), [WANG Weijian](#), [LI Xiao](#), [WANG Qiao](#), [LI Hongtao](#), [LIU Qinyao](#)

作者单位: [匡威, 段建民, 汪维健, 李潇, 王桥, 李洪涛, 刘琴瑶, KUANG Wei, DUAN Jianmin, WANG Weijian, LI Xiao, WANG Qiao, LI Hongtao, LIU Qinyao \(广州军区广州总医院口腔科, 广州, 510010\)](#), [谭家莉, TAN Jiali \(中山大学光华口腔医学院附属口腔医院, 广州 510055; 广东省口腔医学重点实验室, 广州 510055\)](#)

刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 

英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年, 卷(期): 2014(9)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201409010.aspx