

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.29.014

miR-26a 抑制转化生长因子 β 诱导的韧带成纤维细胞增殖 *孙军健¹ 王朝阳^{1△} 贾永鹏¹ 包爱敏¹ 郑林丰^{2△}

(1 中国人民解放军第 98 医院骨科 浙江 湖州 313000; 2 上海交通大学附属第一人民医院放射科 上海 200080)

摘要 目的:研究 miR-26a 对转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β)诱导的韧带成纤维细胞增殖的影响。**方法:**原代分离大鼠肩周韧带成纤维细胞,通过免疫荧光鉴定细胞纯度,应用脂质体细胞转染 miRNA 模拟物的方式过表达 miR-26a,定量 PCR 的方法检测 miR-26a 模拟物的过表达效率,CKK8 法检测细胞增殖能力的变化,生物信息学预测的方法分析 miR-26a 可能的作用靶基因。**结果:**免疫荧光检测发现原代分离细胞中,Vimentin 阳性细胞在 90 %以上;转染 miR-26a 模拟物后,细胞内 miR-26a 水平显著高于阴性对照组($P<0.05$);TGF- β 刺激明显促进韧带成纤维细胞生长($P<0.01$),而 miR-26a 则对 TGF- β 诱导的韧带成纤维细胞增殖具有显著的抑制作用($P<0.01$);生物信息学预测显示 SMAD1/4、EIF4G2、PTEN 和 MARK1 可能是 miR-26a 影响细胞增殖的作用靶基因。**结论:**miR-26a 可抑制 TGF- β 诱导的韧带成纤维细胞增殖。

关键词: MiR-26a; 成纤维细胞; 转化生长因子- β ; 细胞增殖

中图分类号: Q95-3; R686; R34 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)29-5655-03

The Inhibition of miR-26a on Proliferation of Ligament Fibroblasts Induced by Transforming Growth Factor- β *SUN Jun-jian¹, WANG Chao-yang^{1△}, JIA Yong-peng¹, BAO Ai-min¹, ZHENG Lin-feng^{2△}

(1 Department of orthopaedics, the 98th Hospital of PLA, Huzhou, Zhejiang, 313000, China;

2 Department of Radiology, First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of miR-26a on proliferation of Ligament fibroblasts induced by Transforming growth factor- β (TGF- β). **Methods:** Primary culture ligament fibroblasts from ligaments of rat shoulder were identified by immunofluorescence. The expression level of miR-26a was up-regulated by the mimic of miR-26a with liposomes, and determined the efficiency by real-time PCR. The changes of cell proliferation were detected by CKK8 assay. The potential targeted-genes of miR-26a were predicted by bioinformatics. **Results:** Vimentin immunofluorescence assay showed that the positive cells were above 90%. The miR-26a level increased apparently after the transfection with mimic ($P<0.05$). The proliferations of fibroblasts were markedly promoted by TGF- β ($P<0.01$), but miR-26a suppressed the cell proliferation ($P<0.01$). Bioinformatics analyze showed that SMAD1/4, EIF4G2, PTEN and MARK1 were the potential targeted-genes of miR-26a to inhibit the fibroblasts proliferation. **Conclusions:** MiR-26a can inhibit fibroblast proliferation which is induced by TGF- β .

Key Words: MiR-26a; Fibroblasts; TGF- β ; Cell proliferation

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R686; R34 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)29-5655-03

前言

粘连性关节囊炎 (adhesive capsulitis of shoulder) 好发于 50-60 岁的中老年人群,女性多见,发病率在 2-5 %左右,临床表现为肩关节各个方向的主动与被动活动受限^[1]。其发病机制仍未完全阐明,目前普遍认为关节囊纤维化是粘连性关节囊炎发生发展的重要因素^[2]。转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β)是一种多功能细胞因子,对细胞外基质基因表达、基质降解、细胞增殖分化、细胞凋亡及免疫功能均具有明确作用^[3,4]。TGF- β 及其信号通路对成纤维细胞增殖的影响在粘连

性关节囊炎发生发展中具有重要作用。MicroRNA(miRNA)是一类在进化上高度保守的单链非编码 RNA 小分子,主要通过与其靶基因的 3' 非翻译区通过碱基的不完全互补配对结合,在转录后水平抑制靶基因翻译或促进其降解,从而调控基因表达,参与细胞增殖、分化、凋亡等的各种生理病理过程^[5]。研究发现,miR-26a 在组织中的表达水平与免疫应答、组织器官的发育及分化、肿瘤的发生与发展等密切相关^[6-8]。因此,本文采用 TGF- β 诱导的韧带成纤维细胞,观察 miR-26a 对其增殖的影响,从而为阐明粘连性关节囊炎的发生提供依据。

* 基金项目:国家留学基金资助,上海交通大学附属第一人民医院“优秀青年人才”基金资助

作者简介:孙军健(1977-),男,主治医师,研究方向:创伤骨科,电话:0572-3269999, E-mail: zjh98yy@126.com

△ 通讯作者:王朝阳, E-mail:wangcy1228@163.com; 郑林丰, E-mail:zhenglinfeng04@aliyun.com

(收稿日期:2014-04-01 接受日期:2014-04-25)

1 材料与方法

1.1 试剂

DMEM 培养液,胎牛血清,II 型胶原酶和胰蛋白酶等购自 Gibco 公司;RNA 提取试剂及 Lipofectamine™ 2000 细胞转染试剂购自 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒以及定量 PCR 检测试剂盒购自 TAKARA 公司;大鼠 Vimentin 抗体及兔抗鼠 IgG-FITC 及 DAPI 购自 Sigma 公司;miR-26a 模拟物和阴性对照购自上海吉码公司;miR-26a 及内参基因引物由英潍捷基上海贸易公司合成。

1.2 韧带成纤维细胞的原代培养

将 SD 大鼠麻醉后,取下肩周周围韧带组织,先用 PBS 缓冲液清洗标本 2-3 次,仔细剪除脂肪、滑膜和关节囊组织后,将韧带剪切成 1 mm² 的小块,加入含有 II 型胶原酶(1 mg/mL)的 DMEM 培养液消化 4 h,之后再加入 0.25 % 的胰蛋白酶继续消化 15 min,用 200 目筛网过滤收集细胞,加入含有 20 % 胎牛血清的 DMEM 培养基悬浮细胞,并接种于细胞培养瓶中,置于 37℃、5 % CO₂ 及饱和湿度的培养箱内培养。待细胞完全贴壁,24 h 后给予更换新鲜的培养基。

1.3 韧带成纤维细胞的免疫荧光鉴定

将原代分离的韧带成纤维细胞以 5×10^5 个/mL 接种于预先置有无菌细胞爬片的培养板内,以 10 % 胎牛血清的 DMEM 培养液培养 3 天。去除培养液后用无菌 PBS 清洗 3 次,0.4 % 的多聚甲醛(pH7.2)固定细胞 30 min,PBS 清洗 3 次后,加入一抗 Vimentin(1:500)孵育过夜,加入二抗 IgG-FITC(1:1000)孵育 1 h,DAPI 复染细胞核,荧光显微镜观察阳性细胞数。

1.4 细胞转染

取对数生长期的韧带成纤维细胞,调整细胞悬液密度为 1×10^5 个/mL,接种于 96 孔细胞培养板,每孔添加 100 μ L 细胞悬液,置于 37℃、5 % CO₂ 及饱和湿度的培养箱内培养 24 h。按照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂进行 miR-26a 模拟物转染。

1.5 定量 PCR 检测

应用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,以 500 ng 总 RNA 为模板,利用特异性茎环结构引物,合成 cDNA,反应条件:16℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min。再进行实时 PCR 检测,反应条件为 94℃ 30 sec,60℃ 1 min,40 个循环。结果用 Ct 值分析,以 U6 作为内参,折算为相对倍数。

1.6 细胞增殖检测

在 96 孔培养板中接种 100 μ L 的细胞悬液(1×10^5 个/mL),在培养箱中预培养 24 h,经 miR-26a 模拟物转染和 TGF- β 刺激 24 h 后,每孔加入 10 μ L 的 CCK 溶液,将培养板在培养箱内孵育 3 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

1.7 生物信息学预测

通过 miRNA 靶基因在线预测软件(Targetscan、PicTar、miRanda 等),根据 miR-26a 种子序列与基因 3' 非翻译区的互补配对情况,结合细胞增殖的作用机制,筛选 miR-26a 的可能靶基因。

1.8 统计学分析

所有的实验重复三次,数据以平均值 $\pm$ 标准误表示。采用

SPSS16.0 统计学软件进行数据分析,两组样本均数的比较采用 student-t 检验,多组样本均数的比较采用 One-Way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代培养韧带成纤维细胞的免疫荧光鉴定

原代培养至第 3 天,显微镜下可观察到细胞呈长梭形贴壁,更换培养液除去未贴壁细胞,继续培养至第 5 天,细胞基本长满。经免疫荧光检测(图 1),Vimentin 阳性细胞数在 90 % 以上,纯度满足实验需要。

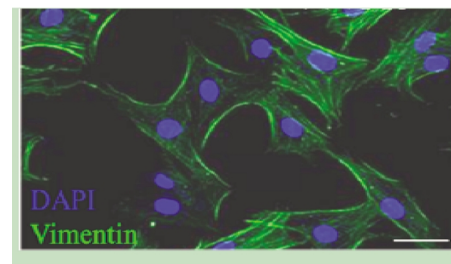


图 1 原代培养韧带成纤维细胞的 vimentin 免疫荧光鉴定(scale bar= 10 μ m)

Fig.1 Evaluation of Primary cultured ligament fibroblasts by immunofluorescence of vimentin(scale bar= 10 μ m)

2.2 韧带成纤维细胞中 miR-26a 模拟物的过表达效率

在韧带成纤维细胞中转染 miR-26a 模拟物,定量 PCR 检测 miR-26a 的过表达效率,结果(图 2)显示转染浓度为 10、20 和 50 nmol/L 时,miR-26a 在细胞内的表达水平分别是对照组的 2.44 倍、4.36 倍和 4.16 倍,具有显著的过表达效应($P < 0.05$)。

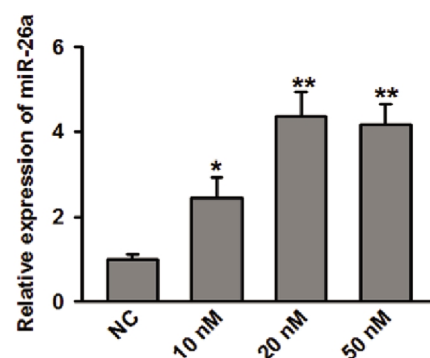


图 2 miR-26a 模拟物对原代培养韧带成纤维细胞过表达效率(* $P < 0.05$ vs NC, ** $P < 0.01$ vs NC)

Fig.2 The overexpression efficiency of miR-26a mimics on primary cultured ligament fibroblasts(* $P < 0.05$ vs NC, ** $P < 0.01$ vs NC)

2.3 miR-26a 对 TGF- β 诱导的韧带成纤维细胞增殖的影响

在韧带成纤维细胞中转染 miR-26a 模拟物的同时,用含 TGF- β (10 ng/mL)的 DMEM 培养液刺激 24 h,细胞增殖能力检测结果显示(图 3),TGF- β 刺激明显促进韧带成纤维细胞生长($P < 0.01$),而 miR-26a 则对 TGF- β 诱导的韧带成纤维细胞增殖具有显著的抑制作用($P < 0.01$)。

2.4 miR-26a 的作用靶基因预测

生物信息学预测发现许多基因的 3' 非翻译区存在 miR-26a 的结合位点,结合 miR-26a 对韧带成纤维细胞增殖的

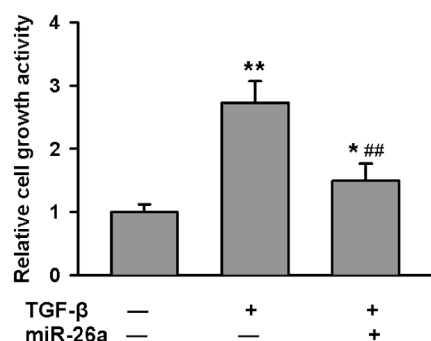


图3 miR-26a对TGF-β诱导的韧带成纤维细胞增殖的抑制作用(*P<0.05 vs control, **P<0.01 vs control, ##P<0.01 vs TGF-β)

Fig.3 The inhibition of miR-26a on proliferation of ligament fibroblasts induced by TGF-β(*P<0.05 vs control, **P<0.01 vs control, ##P<0.01 vs TGF-β)

影响,分析(表1)显示,*SMAD1/4*、*EIF4G2*、*PTEN*和*MARK1*可能是miR-26a影响细胞增殖的作用靶基因。

表1 生物信息学预测的miR-26a潜在靶基因

Table 1 The Potential targeted-genes of miR-26a predicted by bioinformatics

Gene (abbreviation)	Accession	Binding sites
<i>SMAD1</i>	NM_005900	4
<i>EIF4G2</i>	NM_001418	4
<i>PTEN</i>	NM_000314	3
<i>MARK1</i>	NM_018650	3
<i>SMAD4</i>	NM_005359	1

3 讨论

粘连性关节囊炎是一种以进行性发展的肩关节疼痛和关节活动受限为特点的肩关节疾病。研究显示糖尿病、颈椎间盘突出、甲状腺功能亢进、胸腔的病变以及创伤等疾病中并发粘连性关节囊炎的可能性大大提高,而且部分患者在对侧肩关节也会发生粘连性关节囊炎^[9]。尽管患者治疗后关节活动度能得到恢复,但相当多的患者关节活动仍明显受限,对日常生活产生明显影响。关节囊纤维化在粘连性关节囊炎的发生发展过程中具有重要作用,具体表现为关节囊收缩变小,下部皱襞闭塞引起周围组织呈普遍的胶原纤维退行性变^[10]。因此,深入探讨关节囊纤维化的相关机制,探索合适的修复干预策略,积极有效逆转纤维化,对于粘连性关节囊炎的早期防治,提高全民健康水平都具有着重要意义。

TGF-β家族由一类结构、功能相关的多肽生长因子亚家族组成,包括TGF-β、活化素、骨形态发生蛋白、生长分化因子等。TGF-β除了影响细胞的增殖、分化,还在胚胎发育、胞外基质形成、骨的形成和重建等方面起着重要作用。在纤维化形成的过程中,TGF-β可促进细胞外基质的形成,促进成纤维细胞合成胶原蛋白、纤维粘连蛋白及蛋白多糖等细胞外基质,同时促进细胞外基质蛋白特异性表面膜受体的表达,还可促进上皮细胞转变为成纤维细胞^[11]。许多学者发现在多种组织中TGF-β/Smad信号通路与纤维化关系非常密切。Kopp J等研究发现抑制型Smad蛋白Smad7升高可抑制I型胶原和α-SMA

表达,减轻皮肤疤痕增生^[12]。Foster W等直接在小鼠损伤骨骼肌部位注射外源IFN-γ,发现可抑制骨骼肌的纤维化,提高愈合质量^[13]。而研究已证实,IFN-γ可引起TGF-β/Smad信号通路中的抑制型蛋白Smad7的表达升高,通过Smad7来阻断该信号通路的向下传导,从而抑制TGF-β的作用^[14]。

人类miR-26在基因组中有两个来源,分别位于3号和12号染色体上,都具有独立的转录单元。目前的研究发现miR-26a的表达水平主要与肿瘤的发生发展密切相关。Lu等发现miR-26a通过抑制EZH2的表达调控鼻咽癌细胞的生长和转移^[15]。在MYC基因诱导的急性白血病发生发展过程中,MYC刺激EZH2表达升高是通过抑制miR-26a水平实现的^[16]。同时,miR-26a是骨骼肌细胞分化以及骨骼肌损伤后再生过程中必需的分子之一^[17]。在心肌纤维化过程中,NF-κB信号通路介导的miR-26a表达变化是心肌纤维化治疗的新靶点^[18]。我们的研究发现miR-26a对TGF-β诱导的韧带成纤维细胞增殖中也具有调控作用,可能通过抑制*SMAD1/4*、*PTEN*等限制TGF-β的刺激作用,对粘连性关节囊炎发生发展过程中关节囊纤维化的治疗具有重要的提示作用。

总之,本研究显示miR-26a可抑制TGF-β诱导的韧带成纤维细胞增殖,进一步深入研究可能为阐明粘连性关节囊炎的发病机制及进行粘连性关节囊炎的基因治疗探索提供依据。

参考文献(References)

- [1] Nagy MT, Macfarlane RJ, Khan Y, et al. The frozen shoulder: myths and realities[J]. Open Orthop J, 2013, 7: 352-355
- [2] Tamai K, Akutsu M, Yano Y. Primary frozen shoulder: brief review of pathology and imaging abnormalities [J]. J Orthop Sci, 2014, 19(1): 1-5
- [3] Massague J. TGFβ in Cancer[J]. Cell, 2008, 134(2): 215-230
- [4] Gomis RR, Alarcon C, Nadal C, et al. C/EBPβ at the core of the TGFβ cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells[J]. Cancer Cell, 2006, 10(3): 203-214
- [5] Sun K, Lai EC. Adult-specific functions of animal microRNAs[J]. Nat Rev Genet, 2013, 14(8): 535-548
- [6] Ichikawa T, Sato F, Terasawa K, et al. Trastuzumab produces therapeutic actions by upregulating miR-26a and miR-30b in breast cancer cells[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31422
- [7] Witwer KW, Sisk JM, Gama L, et al. MicroRNA regulation of IFN-β protein expression: rapid and sensitive modulation of the innate immune response[J]. J Immunol, 2010, 184(5): 2369-2376
- [8] Icli B, Wara AK, Moslehi J, et al. MicroRNA-26a regulates pathological and physiological angiogenesis by targeting BMP/SMAD1 signaling[J]. Circ Res, 2013, 113(11): 1231-1241
- [9] Jenkins EF, Thomas WJ, Corcoran JP, et al. The outcome of manipulation under general anesthesia for the management of frozen shoulder in patients with diabetes mellitus[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2012, 21(11): 1492-1498
- [10] Xu Y, Bonar F, Murrell GA. Enhanced expression of neuronal proteins in idiopathic frozen shoulder [J]. J Shoulder Elbow Surg, 2012, 21(10): 1391-1397
- [11] Schnaper HW, Hayashida T, Hubchak SC, et al. TGF-β signal transduction and mesangial cell fibrogenesis [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 284(2): F243-252

- nonsurgical periodontal therapy on hemoglobin A1c levels in persons with type 2 diabetes and chronic periodontitis: a randomized clinical trial[J]. JAMA, 2013, 310(23): 2523-2532
- [6] Bharti P, Katagiri S, Nitta H, et al. Periodontal treatment with topical antibiotics improves glycemic control in association with elevated serum adiponectin in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Obes Res Clin Pract*, 2013, 7(2): e129-e138
- [7] 张建全, 马丽, 潘亚萍, 等. 辽宁省 2 型糖尿病患者牙周状况调查研究[J]. *中国实用口腔杂志*, 2009, 2(7): 409-411
Zhang Jian-quan, Ma Li, Pan Ya-ping, et al. Survey on periodontal status in type 2 diabetic patients in Liaoning province [J]. *Chinese Journal of Practical Stomatology*, 2009, 2(7): 409-411
- [8] 李峥, 沙月琴, 张博学, 等. 社区牙周干预对 2 型糖尿病患者牙周健康及血糖代谢水平的影响[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2011, 43(2): 285-289
Li Zheng, Sha Yue-qin, Zhang Bo-xue, et al. Effect of community periodontal care intervention on periodontal health and glycemic control in type 2 diabetic patients with chronic periodontitis [J]. *Journal of Peking University(Health Sciences)*, 2011, 43(2): 285-289
- [9] Wang MX, Wang X, Zhang Z, et al. The salivary factors related to caries and periodontal disease in children and adolescents with diabetes mellitus[J]. *Chinese Journal of Stomatology*, 2013, 48(9): 545-549
- [10] Timonen P, Saxlin T, Knuuttila M, et al. Role of insulin sensitivity and beta cell function in the development of periodontal disease in adults without diabetes[J]. *J Clin Periodontol*, 2013, 40(12): 1079-1086
- [11] Meenawat A, Pun K, Srivastava V, et al. Periodontal disease and type I diabetes mellitus: Associations with glycemic control and complications[J]. *J Indian Soc Periodontol*, 2013, 17(5): 597-600
- [12] Pacios S, Andriankaja O, Kang J, et al. aetial infection increases periodontal bone loss in diabetic rats through enhanced apoptosis[J]. *Am J Pathol*, 2013, 183(6): 1928-1935
- [13] DPTT study group, Engebretson S, Gelato M, et al. Design features of the Diabetes and Periodontal Therapy Trial (DPTT): a multicenter randomized single-masked clinical trial testing the effect of nonsurgical periodontal therapy on glycosylated hemoglobin (HbA1c) levels in subjects with type 2 diabetes and chronic periodontitis[J]. *Contemp Clin Trials*, 2013, 36(2): 515-526
- [14] Grover HS, Luthra S. Molecular mechanisms involved in the bidirectional relationship between diabetes mellitus and periodontal disease[J]. *J Indian Soc Periodontol*, 2013, 17(3): 292-301
- [15] 董刚, 徐欣, 田燕, 等. 2 型糖尿病患者血糖控制水平与种植牙愈合的关系[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2013, 39(1): 143-147
Dong Gang, Xu Xin, Tian Yan, et al. Relationship between glycemic control and implant healing in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Journal of Jilin University(Medicine Edition)*, 2013, 39(1): 143-147
- [16] Strauss SM, Singh G, Tuthill J, et al. Diabetes-Related Knowledge and Sources of Information among Periodontal Patients: Is There a Role for Dental Hygienists?[J]. *J Dent Hyg*, 2013, 87(2): 82-89
- [17] 张芑, 李纲, 杨颖, 等. 牙种植修复在慢性牙周炎患者与牙周健康者的疗效对比分析[J]. *重庆医学*, 2013, 42(11): 1245-1247
Zhang Jiao, Li Gang, Yang Ying, et al. The comparative analysis of the effects of dental transplantation for patients with or without chronic periodontitis[J]. *Chongqing Medicine*, 2013, 42(11): 1245-1247
- [18] Camargo GA, Lima Mde A, Fortes TV, et al. Effect of periodontal therapy on metabolic control and levels of IL-6 in the gingival crevicular fluid in type 2 diabetes mellitus [J]. *Indian J Dent Res*, 2013, 24(1): 110-116
- [19] Yuan T, Zhang Y, Zhou Y, et al. Effect of non-surgical periodontal therapy on level of serum soluble intercellular adhesion molecule-1 and glycated hemoglobin A1c in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis [J]. *West China Journal of Stomatology*, 2013, 31(4): 415-419, 424
- [20] Lin BY. Periodontal and implant therapy for patient with type 2 diabetes: a case report [J]. *Chinese Journal of Stomatology*, 2013, 48(5): 311-316

(上接第 5657 页)

- [12] Kopp J, Preis E, Said H, et al. Abrogation of transforming growth factor-beta signaling by SMAD7 inhibits collagen gel contraction of human dermal fibroblasts[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(22): 21570-21576
- [13] Foster W, Li Y, Usas A, et al. Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle[J]. *J Orthop Res*, 2003, 21(5): 798-804
- [14] Ulloa L, Doody J, Massague J. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway[J]. *Nature*, 1999, 397(6721): 710-713
- [15] Lu J, He ML, Wang L, et al. MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(1): 225-233
- [16] Sander S, Bullinger L, Klapproth K, et al. MYC stimulates EZH2 expression by repression of its negative regulator miR-26a [J]. *Blood*, 2008, 112(10): 4202-4212
- [17] Dey BK, Gagan J, Yan Z, et al. miR-26a is required for skeletal muscle differentiation and regeneration in mice [J]. *Genes Dev*, 2012, 26(19): 2180-2191
- [18] Wei C, Kim IK, Kumar S, et al. NF-kappaB mediated miR-26a regulation in cardiac fibrosis[J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(7): 1433-1442