

· 基础研究 ·

miR-143 通过抑制 PTN 促进人骨髓间充质干细胞成脂分化 *

伊 璨^{1,2} 谢伟东² 吕 青^{1,2} 张雅鸥^{2△}

(1 清华大学生命科学学院 北京 100084 2 清华大学深圳研究生院生命与健康学部 广东 深圳 518055)

摘要 目的 研究 miR-143 调控人骨髓间充质干细胞(hMSCs)成脂分化的新机理。方法 将 NC、miR-143、siPTN、miR-143i 转入 hMSCs 中,诱导成脂分化,检测 miR-143 对成脂分化的影响。经 miRNA 靶点分析软件 Findtar 预测出 miR-143 在人多效生长因子(hPTN)的 3'-UTR 端有靶点。RT-PCR、western blot 研究 miR-143 与 hPTN 的关系。构建 hPTN 3'-UTR 靶位点荧光检测质粒 prltk-PTN 及其突变质粒 prltk-m,验证 miR-143 是否在 hPTN 3'-UTR 上有靶点。结果 miR-143 促进 hMSCs 成脂分化,抑制 hPTN 的 mRNA 和蛋白表达水平。荧光报告实验证实 miR-143 在 hPTN 的 3'-UTR 上有靶点。结论 miR-143 通过与 hPTN 3'-UTR 上的靶点相结合而抑制 hPTN 的表达,从而促进了 hMSCs 成脂分化进程。

关键词 miR-143 hPTN 成脂分化 hMSCs

中图分类号 Q254, Q291, R34 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 18-3401-04

miR-143 Accelerates hMSCs Adipogenesis by Suppressing the Expression of PTN*

YI Can^{1,2}, XIE Wei-dong², LV Qing^{1,2}, ZHANG Ya-ou^{2△}

(1 School of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2 Division of Life Science, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen, 518055, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of miR-143 in the regulation of hMSCs adipogenesis. **Methods:** hMSCs were transfected with NC/miR-143/siPTN/miR-143i and induced into adipogenic differentiation to detect the effect of miR-143 on adipogenesis. The miR-143 target in 3'-UTR of hPTN was predicted by Findtar-software of miRNA. The relationship between miR-143 and hPTN was researched by the methods of RT-PCR and western blot. The target of miR-143 predicted in hPTN 3'-UTR was verified by luciferase expression of prltk-PTN plasmid inserted with hPTN 3'-UTR segment and prltk-m plasmid of mutant target. **Results:** miR-143 promoted adipogenic differentiation of hMSCs, and suppressed the expression level of hPTN mRNA and protein. The experiment of luciferase demonstrated that there was miR-143 target in hPTN 3'-UTR. **Conclusion:** miR-143 suppressed the expression of hPTN by combining with target in hPTN 3'-UTR to accelerate the process of hMSCs adipogenesis.

Key words: miR-143; hPTN; Adipogenesis; hMSCs

Chinese Library Classification (CLC): Q254, Q291, R34 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)18-3401-04

前言

microRNA (miRNA) 是一类内源性的长度约为 20~25 个核苷酸的小分子非编码单链 RNA, 其调控机理为通过与靶基因 mRNA 的 3' 非翻译端 (3'-UTR) 碱基互补配对结合而特异性降解目的 mRNA 或抑制其翻译表达^[1,2]。自 1993 年第一次发现 miRNA Lin-4 后^[3], miRNA 已被发现广泛存在于真核生物中, 并在生物体发育、细胞分化、癌症发生、神经系统疾病、免疫生成等生理病理过程中发挥着重要的调控作用^[4-8]。在成脂分化方面, 已有研究证明 miR-14、miR-278、miR-27、miR-103、miR-17-92、miR-let-7 与之相关^[9-14], 而 Esau C、Kang X 等人发现 miR-143 能通过抑制 ERK5 蛋白促进成脂分化^[15]。

多效生长因子 pleiotrophin (PTN) 是一种 18kd 的肝素蛋白, 在胚胎发育、神经分化、血管生成等方面具有重要作用^[16-18]。本实验室早期研究表明 PTN 可通过 PTN/PI3K/

AKT/GSK-3 β / β -catenin 信号通路抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化进程^[19]。人骨髓间充质干细胞 (hMSCs) 是一种多潜能干细胞, 可分化成脂肪细胞、造骨细胞及软骨细胞, 是临床医学和基础生物学研究中的常用细胞系^[20]。

本研究针对 PTN 对细胞成脂分化进程的作用, 设计实验探讨 miR-143 可否通过调控 hPTN 的表达而影响成脂分化, 而在 miRNA 与成脂分化的关系方面发现一种新机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

hMSCs 购自 Cyagen Biosciences, 培养基为含 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基, 于 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养, 当细胞生长融合至 70-80%, 约 2~3 天时, 用 0.25% 的胰酶消化传代。

cos-7 (非洲绿猴肾细胞) 购自昆明细胞库, 培养基为含

* 基金项目 国家自然科学基金项目 (30871428)

作者简介 伊璨, (1985-), 女, 硕士, 主要从事细胞成脂分化方向的研究, 电话 13510938390, E-mail yican.31@163.com

△通讯作者 张雅鸥, 电话 0755-26036458, E-mail yican.31@163.com

(收稿日期 2011-04-05 接受日期 2011-04-30)

10%胎牛血清的 DMEM (HG) 完全培养基,于 37 °C、5 % CO₂ 的恒温培养箱中培养,当细胞生长融合至 70-80 %,约 2~3 天时,用 0.25 % 的胰酶消化传代。

1.2 成脂分化诱导

将 hMSCs 以 3×10^4 细胞 / 孔的密度种入 24 孔板中,当细胞生长融合至 80 % 时更换成含 10 % FBS、1 μ M 地塞米松 (DXM)、1 μ g/ml 胰岛素、0.5 mM 甲基异丁基黄嘌呤 (Sigma, USA) 的 α -MEM 成脂诱导培养基,每隔 3 天换一次液,持续诱导 10 天。

1.3 油红 O 染色和测定

吸除 hMSCs 板中的培养基,用 1 $\times$ PBS 洗两遍,10 % 福尔马林固定细胞 20 分钟,吸除,1 $\times$ PBS 洗一遍。将异丙醇溶解的 5 mg/ml 油红 O 用去离子水按 7:3 稀释,滤纸过滤后加入孔中 (200 μ l/ 孔,24 孔板),室温染色 1 h,吸除染液,用 1 $\times$ PBS 洗两遍,此时细胞脂滴会被染成红色,显微镜拍照。最后在孔中加入异丙醇,充分溶解脂滴中的油红 O 后取上清液于 510 nm 处测 OD 值。

1.4 细胞转染

实验中所有微小 RNA 均由上海吉玛公司合成,设计 siPTN (PTN-siRNA) 序列,正义链为 5'-GCCCCAACCU-CAAGCAGAAAdTdT-3',反义链为 5'-UUCUGCUUGAGGUU-UGGGC dTdT-3'。用 invitrogen 公司的 Lipofectamine 2000 转染 miRNA,24 孔板每孔转染 1 μ l miRNA,200 ng 质粒,细胞贴壁 12 h 后转染,转染后 6 h 换成成脂诱导培养基。

1.5 RT-PCR

细胞转染 48 h 后吸除培养基,1 $\times$ PBS 洗两遍,用 TRIZOL (Invitrogen,USA) 抽提 RNA,抽提方法参照使用说明书。设计一对 hPTN 检测引物,上游引物 5'-CACGGGAGGGCACT CG-GACT-3',下游引物 5'-GTCTTCTGGCATTGCGCATTG-3'。以 GAPDH 作为内参,上游引物 5'-CGGATTGTCG-TATTGGG-3',下游引物 5'-CGGATTGTCGTATTGGG-3'。

1.6 Western blot

细胞转染 48 h 后吸除培养基,1 $\times$ PBS 洗两遍,用含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液收样,六孔板每孔加入 200 μ l,冰置微摇 30 分钟,收集裂解液,离心去沉淀,蛋白相对定量,变性,做 hPTN (Goat anti-PTN, R&D) 的 western blot,并以 GAPDH (Rabbit anti-GAPDH, Proteintech Group) 为内参。

1.7 prltk-PTN 荧光报告质粒的构建

通过 miRNA 靶点预测软件 FindTar 分析,发现 hPTN 的 3'-UTR 上有 miR-143 的靶位点 (944-970, NM_002825)。根据靶位点位置设计一对引物,上游引物 5'-TAGTCTAGAAA GATGTCACCTGTGG-3',下游引物 5'-GCACTAGTCTTAC-CTCAATTGTCTATC-3',以 hMSCs 的 cDNA 为模板,特异性扩增靶位点处片段 (270bp),胶回收后酶切,连接到单荧光报告载体 pRL-TK 中,然后转化到 E. coli DH-5 α 感受态细胞中,涂板,挑单克隆,菌落 PCR 和测序鉴定。

1.8 prltk-m 突变质粒的构建

设计一对突变引物,上游引物 5'-AATTGTATATAAT-CAAGTACACAA-3',下游引物 5'-TTTGAATACAAAGCC-TACG-3'。以构建好的 prltk-PTN 为模板,将 hPTN 上预测的 miR-143 靶位点 seed 区突变掉 2 个碱基 (ATC-GTA),使用 TaKaRa MutanBEST Kit 试剂盒构建 prltk-m 突变质粒,测序鉴定。

1.9 荧光检测

质粒和 miRNA 共转 48 h 后收样,使用 Promega 的 Dual-Luciferase Reporter Assay System 测定 Renilla 荧光值。

2 结果

2.1 hMSCs 成脂诱导分化结果

已有文献报道在人前体脂肪细胞成脂分化过程中 miR-143 呈上升趋势并促进成脂分化^[15],且本实验室在早期研究中发现 PTN 抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的成脂进程^[19],但在 hMSCs 中尚未有相关报道。为了研究 miR-143 和 PTN 是否对 hMSCs 有同样类似的效果,将 NC、miR-143、siPTN、miR-143i 转入已贴壁 12 h 的 hMSCs 中,6 h 后换成成脂诱导培养基,持续诱导至第十天,细胞油红 O 染色后照相 (图 1)。

其中 NC (negative control) 是无靶位点的微小 RNA,以之为阴性对照,可明显看出转染 miR-143、siPTN 的 hMSCs 中脂滴数量多、体积大、更成熟,成脂启动时间早,在诱导分化第六天即可看到脂滴;而未转染的空白细胞 blank、NC 是诱导分化第八天才看到脂滴出现,miR-143i (抑制 miR-143 的微小 RNA) 则是第九天出现脂滴,用异丙醇褪色后测得的油红 O 的 OD 值也与细胞图观察结果一致 (图 2)。该实验说明 miR-143 能够促进成脂分化,加速成脂进程,而抑制 hPTN 的表达也会对成脂过程起到促进作用。

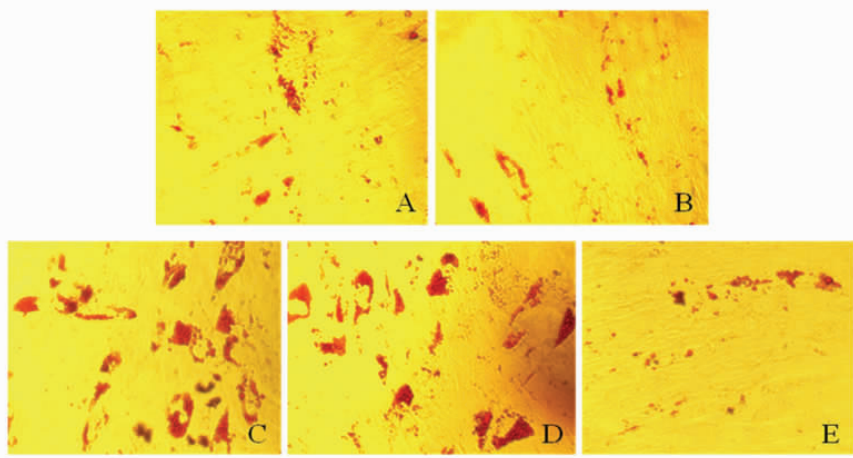


图 1 hMSCs 成脂诱导分化第十天 (40 $\times$)

A blank, B NC, C miR-143, D siPTN, E miR-143i

Fig.1 Adipogenic differentiation of hMSCs after 10 days of induction (40 $\times$)

A blank, B NC, C miR-143, D siPTN, E miR-143i

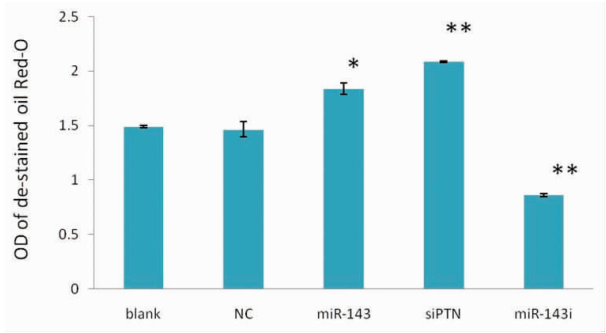


图2 hMSCs 成脂分化第十天油红 O 染色的 OD 值 (*P< 0.05, **P< 0.01)

Fig.2 OD of destained Oil-Red O of hMSCs after adipogenic induction on day 10 (*P< 0.05, **P< 0.01)

2.2 转染 miRNA 后 hPTN 在 mRNA 和蛋白水平上的表达

由细胞实验可知 miR-143 和 siPTN 在成脂分化方面有类似的作用，那么可能在 hPTN 的 3'-UTR 上有 miR-143 的靶位点，从而使 hPTN 的表达受到了 miR-143 的抑制。经 Findtar 靶点预测软件发现 hPTN 的 3'-UTR 上确实可能存在 miR-143 的靶位点。为了进一步研究 miR-143 与 hPTN 之间的关系，我们将 hMSCs 转染 miRNA 48 h 后收样，用 RT-PCR 和 western blot 分别检测 hPTN 的 mRNA 和蛋白表达量，并以 GAPDH 为内参。结果显示，与 NC 相比，转染了 miR-143 的 hMSCs 的 hPTN 表达量在 mRNA 水平 (图 3A) 和蛋白水平 (图 3B) 上均有显著下降。

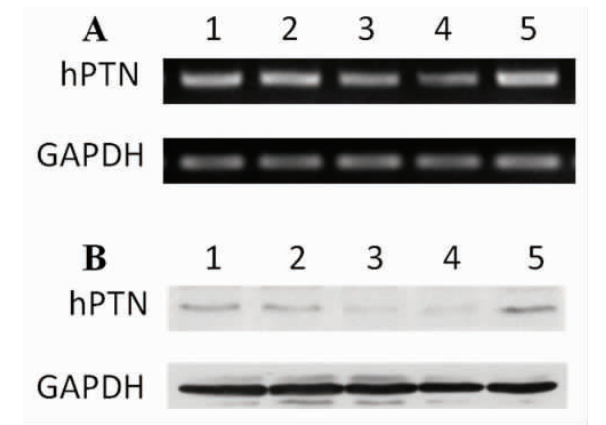


图3 hPTN 在 miRNA 转染 48 h 后表达水平。1 blank, 2 NC, 3 miR-143, 4 siPTN, 5 miR-143i

(A) hPTN mRNA 表达水平 (B) hPTN 蛋白表达水平
Fig.3 Expression of hPTN after 48 h of miRNA transfection. 1 blank, 2 NC, 3 miR-143, 4 siPTN, 5 miR-143i

(A) mRNA expression level of hPTN (B) Protein expression level of hPTN

2.3 hPTN 3'-UTR 上 miR-143 靶位点验证

上述分子实验证明,miR-143 可对 hPTN 的表达起抑制作用，但不确定是否在 hPTN 的 3'-UTR 上有靶点，为了验证该点，首先构建了含有所预测靶位点片段的 prltk-PTN 荧光报告质粒,以及含有对应的靶点突变 (ATC-GTA) 的 prltk-m 突变质粒。然后将 prltk-PTN 质粒、prltk-m 质粒分别与 NC、miR-143、

miR-143i 悬浮共转入 cos-7 中 (8×10^4 cell/well, 24 孔板), 转染 48 h 后收样测 Renilla 荧光表达量。结果显示在转染 prltk-PTN 质粒组中，与 NC 相比，转染 miR-143 的荧光值明显降低，转染 miR-143i 的荧光值升高 (图 4A) 而在 prltk-m 突变质粒组中,NC、miR-143、miR-143i 测得的荧光值基本持平 (图 4B)。

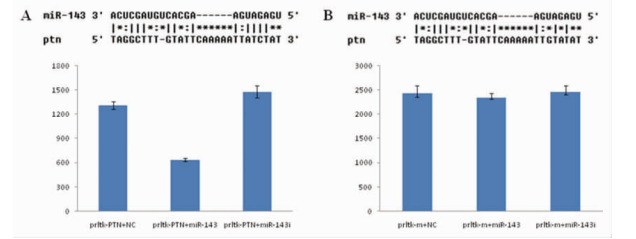


图4 报告质粒荧光检测结果
(A) hPTN 3'-UTR 上 miR-143 预测靶位点,及 prltk-PTN 与 miRNA 共转荧光检测结果 (*P< 0.01)
(B) 预测靶位点突变 (ATC-GTA),及 prltk-m 与 miRNA 共转荧光检测结果

Fig.4 Luciferase expression level of report plasmid
(A) miR-143 target predicted in hPTN 3'-UTR; fluorescence intensity of prltk-PTN cotransfected with miRNA(**P< 0.01) (B) Mutation (ATC-GTA) in target predicted; fluorescence intensity of prltk-m cotransfected with miRNA

3 讨论

成脂分化是一个复杂的过程,涉及到多条信号通路和多种分子调控。近年来,在 miRNA 与成脂分化的关系方面,陆续发现果蝇中 miR-14 和 miR-278 与脂肪代谢相关^[9, 10]; 3T3-L1 细胞中过量表达 miR-27 抑制成脂^[11]; miR-103 过量表达促进 3T3-L1 成脂^[12]; miR-17-92 通过作用于肿瘤抑制因子 Rb2/p130 的 3'-UTR 区,抑制 3T3-L1 细胞增殖,促进成脂分化^[13]; miR-let-7 通过作用于高速泳动蛋白 AT-hook2 (HMG2),促进脂肪生成^[14]。由于一条微小 RNA 可以有多个靶基因,同一微小 RNA 也可能通过其他途径调节成脂分化过程。

之前已有 Esau C、Kang X 等学者证明 miR-143 能通过抑制 ERK5 促进成脂^[15]。BMK1/ERK5 是 MAPK 家族成员,被激活后进入细胞核中,其 C 端的丝氨酸、苏氨酸被自身磷酸化后能在 N 端的共同作用下激活活化蛋白,刺激细胞生长。在前体脂肪细胞中,miR-143 抑制了 ERK5 的表达,从而使细胞生长被抑制,转向成脂分化。有研究证明 miR-143 在成脂诱导下其表达量增高^[15],而本实验室的早期研究发现成脂诱导后 PTN 的表达量迅速下降^[19],因此表明在调控成脂分化方面 miR-143 与 PTN 的作用可能是相反的。本研究中的细胞实验同样证明了这点,发现 miR-143 促进 hMSCs 成脂分化,而抑制 hPTN 的表达同样能加速成脂进程,从而说明 miR-143 可能通过抑制 hPTN 的表达促进成脂。经过 Findtar 软件预测,发现 hPTN 上可能存在 miR-143 的靶位点。分子实验表明,miR-143 不仅在 mRNA 水平上,同时也在蛋白水平上抑制了 hPTN 的表达。而靶位点的荧光验证实验证明,miR-143 确实在 hPTN 的 3'-UTR 上存在

靶位点,该靶位点突变后 miR-143 不再对荧光蛋白的表达起抑制作用。本实验室以前报道过 PTN 在融合状态的前脂肪细胞 3T3-L1 中大量表达,并通过 PTN/PI3K/AKT/GSK-3 β / β -catenin 信号通路抑制成脂分化^[19]。同样在 hMSCs 中,当 miR-143 抑制 hPTN 的表达后,可能通过该信号通路促使 β -catenin 磷酸化,抑制了 hPTN 下游目的基因的表达,从而使细胞趋于稳定不再增殖而转向成脂分化。

上述研究结果表明,miR-143 可以通过与 hPTN 3'-UTR 上的靶位点相结合而特异性地抑制 hPTN 的表达,从而促进了 hMSCs 的成脂分化进程。本研究成果进一步揭示了 miRNA 的成脂分化调控机理,为成脂分化的研究提供了相关的实验素材,同时对肥胖等脂肪代谢相关疾病的治疗也具有一定的指导意义。

参考文献 (References)

- [1] Eulalio A, Rehwinkel J, Stricker M, et al. Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(20): 2558-2570
- [2] Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, et al. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells [J]. *Mol Cell*, 2006, 21(4): 533-542
- [3] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854
- [4] Nakahara K, Carthew RW. Expanding roles for miRNAs and siRNAs in cell regulation [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(2): 127-133
- [5] Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, et al. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(4): 1290-1297
- [6] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 2004, 101(9): 2999-3004
- [7] Abu-Elneel K, Liu T, Gazzaniga FS. Heterogeneous dysregulation of microRNAs across the autism spectrum [J]. *Neurogenetics*, 2008, 9(3): 153-161
- [8] Chen CZ, Li L, Lodish HF, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation [J]. *Science*, 2004, 303(5654): 83-86
- [9] Xu P, Vernoooy SY, Guo M, et al. The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism [J]. *Curr Biol*, 2003, 13(9): 790-795
- [10] Teleman AA, Maitra SN, Cohen SM. *Drosophila* lacking microRNA miR-278 are defective in energy homeostasis [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(4): 417-422
- [11] Lin Q, Gao Z, Alarcon RM, et al. A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis [J]. *FEBS Jour*, 2009, 276(8): 2348-2358
- [12] Xie H, Lim B, Lodish HF. MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development is downregulated in obesity [J]. *Diabetes*, 2009, 58(5): 1050-1057
- [13] Wang Q, Li YC, Wang J, et al. MiR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130 [J]. *Prol Nat Acad Sci*, 2008, 105(8):2889-2894
- [14] Sun T, Fu M, Bookout AL, et al. MicroRNA let-7 regulates 3T3-L1 adipogenesis [J]. *Molecular Endocrinology*, 2009, 23(6): 925-931
- [15] Esau C, Kang X, Peralta E, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation [J]. *J Biol Chem*. 2004, 279(50): 52361-52365
- [16] Zhang N, Zhong R, Deuel TF. Domain structure of pleiotrophin required for transformation [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(19): 12959-12962
- [17] Perez-Pinera P, Chang Y, Deuel TF. Pleiotrophin, a multifunctional tumor promoter through induction of tumor angiogenesis, remodeling of the tumor microenvironment, and activation of stromal fibroblasts [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(23): 2877-2883
- [18] Perez-Pinera P, Berenson JR, Deuel TF. Pleiotrophin, a multifunctional angiogenic factor: mechanisms and pathways in normal and pathological angiogenesis [J]. *Curr Opin Hematol*, 2008, 15(3): 210-214
- [19] Gu D, Yu B, Zhao C, et al. The effect of pleiotrophin signaling on adipogenesis [J]. *FEBS Lett.*, 2007, 581(3): 382-388
- [20] Meirelles Lda S, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells [J]. *Front Biosci*, 2009, 14: 4281-4298