

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.11.011

miR-302a 对叶酸缺乏小鼠胚胎干细胞增殖和凋亡的影响

阳倩, 石伟[△]

(四川省医学科学院/四川省人民医院儿科, 成都 610017)

[摘要] **目的** 探讨 miR-302a 对叶酸缺乏小鼠胚胎干细胞(mESC)增殖和凋亡的影响。**方法** mESC 分为完全培养基组(对照组), 无叶酸培养基组(无叶酸组), 无叶酸培养基+miR-302a mimic 组(miR-302a 组), 通过 RT-PCR 进行检测 miR-302a 在完全培养基及无叶酸培养基中的表达。构建 miR-302a mimic, 后转染到无叶酸培养基 mESC 中, 采用 MTT 法检测 miR-302a mimic 对 mESC 活力的影响, Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测 miR-302a mimic 对 mESC 细胞凋亡的影响; 流式细胞术检测 miR-302a mimic 对 mESC 细胞周期的影响; Western blot 检测及磷脂酰肌醇 3 羟激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路激活情况, 以及下游分子细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)、p21、p27 表达的影响。**结果** RT-PCR 证实无叶酸组中 miR-302a 表达量下降($P<0.01$)。与完全培养基比较, 无叶酸培养基中, mESC 细胞活力下降, 细胞凋亡增加, 细胞周期阻滞在 G₁ 期, Akt 及 mTOR 磷酸化水平下降, CyclinD1 表达下调, p21 及 p27 表达上调, 差异均具有统计学意义($P<0.01$)。与无叶酸组比较, miR-302a 组中, mESC 细胞活力上升, 凋亡下降, G₁ 期缩短, AKT 及 mTOR 磷酸化水平提高, CyclinD1 表达上调, p21 及 p27 表达下调, 差异均具有统计学意义($P<0.01$)。**结论** miR-302a 类似物能显著抑制缺乏叶酸 mESC 凋亡, 能促进其增殖, 与 PI3K/AKT/mTOR 信号通路有关。

[关键词] 叶酸; 小鼠; 胚胎干细胞; 增殖; 凋亡; miR-302a**[中图分类号]** R363**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)11-1477-04**Effect of miR-302a on proliferation and apoptosis in folate deficient mouse embryonic stem cell**Yang Qian, Shi Wei[△]

(Department of Pediatrics, Sichuan Academy of Medical Sciences/Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610017, China)

[Abstract] **Objective** To explore effect of miR-302a on proliferation and apoptosis in folate deficiency mouse embryonic stem cell (mESC). **Methods** The cases were divided into complete culture medium group (control group), folate-deficient culture medium group (folate-deficient group), folate-deficient culture medium plus miR-302a mimic group (miR-302a group). The expression of miR-302a was examined by RT-PCR in control group and folate-deficient group. To construct miR-302a mimic and then was transfected into the folate-deficient culture medium mESC. Effect of miR-302a mimic on mESC viability was detected by MTT assay, the effect of miR-302a mimic on mESC apoptosis was examined by Annexin V-FITC/PI flow dual-staining method, the effect of miR-302a mimic on mESC cycle was examined by flow cytometry. The activation of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR) and expression of CyclinD1, p21 and p27 was assayed by Western blot. **Results** The expression of miR-302a was lower in folate-deficient group($P<0.01$). Compared with control group, the viability of mESC was lower, the apoptosis of mESC was higher, the cell cycle was arrested in G₁ phase, the level of phosphorylation of AKT and mTOR was lower, the expression of CyclinD1 was lower, the expression of p21 and p27 was higher in folate-deficient group, with statistical significance ($P<0.01$). Compared with folate-deficient group, the viability of mESC was higher, the apoptosis of mESC was lower, G₁ phase was shortened, the level of phosphorylation of AKT and mTOR was higher, the expression of CyclinD1 was higher, the expression of p21 and p27 was lower in miR-302a group with statistical significance ($P<0.01$). **Conclusion** These results suggested miR-302a exerted anti-apoptosis and promote cell proliferation in folate-deficient culture medium, which might be related to PI3K/AKT/mTOR signal pathway.

[Key words] folic acid; mice; embryonic stem cells; proliferation; apoptosis; miR-302a

胚胎生长发育涉及胚胎干细胞生长、分化、死亡及至器官形成等过程, 受环境因素、遗传基因及信号通路等的影响。一些微量必需元素的缺乏会导致胚胎生长畸形, 如叶酸, 是一种水溶性 B 族维生素, 只能从食物中摄取, 人体内不能合成, 以其代谢物四氢叶酸来参与一碳单位和 DNA 合成, 间接参与 DNA 甲基化过程^[1]。目前已证实在外周血淋巴细胞系, 我国

仓鼠卵巢细胞等中, 叶酸缺乏会引起全基因组不稳定性 and 低甲基化, 进而引起细胞增殖缓慢及凋亡率上升, 并细胞周期阻滞在 G₁ 期^[2]。梁燕等^[3]也证实叶酸缺乏会抑制小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell, mESC)增殖, 与叶酸缺乏诱导的细胞周期特异性凋亡有关。

MicroRNA(miRNAs)是一类进化上高度保守的内源性非

编码小分子 RNA,它能够结合于靶基因 mRNA 的 3'-UTR 区域,使靶基因降解或阻遏靶基因翻译,从而抑制靶基因表达,具有严格的组织特异性和时序性。miRNA 可调控胚胎干细胞命运,参与一系列胚胎发育重要进程,如早期胚胎发育、细胞增殖、细胞凋亡等^[4]。在胚胎发育过程中,如果 miRNA 加工过程或 Dicer 酶发生突变,导致胚胎干细胞分化异常,使胚胎不能形成正常器官形态,严重影响胚胎发育早期。miR-302 家族是胚胎干细胞特异 miRNA 家族,可以通过调节细胞周期相关蛋白表达,促进 G₁/S 期转化^[5]。因而推测 miR-302 能通过促使 G₁ 到 S 期转化,从而抑制叶酸缺乏引起的胚胎干细胞损伤。胚胎干细胞是从早期胚胎内细胞团和原始生殖细胞中分离出来的全能干细胞,可在体外培养,且具有自我更新及多向分化的特点。mESC 的体外培养目前应用广泛,操作技术成熟,是研究胚胎发育、遗传疾病等的理想模型。因此本文在此基础上探讨 miR-302a 对于叶酸缺乏胚胎干细胞增殖及凋亡的影响及其作用机制。

1 材料与与方法

1.1 主要试剂及仪器 MTT(Sigma 公司);兔抗 CyclinD1、p27、p21 抗体(Epitomics 公司);兔抗 Akt、p-Akt、mTOR 抗体(Cell Signaling Technology);GADPH、Annexin V/PI 双染检测试剂盒(碧云天生物技术研究所);胎牛血清、高糖 DMEM 培养基(含叶酸)、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);DMEM 高糖培养基(不含叶酸)(北京思赛因公司);叶酸(Sigma 公司)。CO₂ 培养箱(Thermo Scientific 公司);生物安全柜(Thermo Scientific 公司);倒置显微镜(Nikon 公司);流式细胞仪(BD 公司);迷你双垂直电泳仪、迷你转印电泳仪、ChemiDoc™ XRS 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 mESC R1 细胞系由中国科学院上海生命科学研究所生物化学与细胞生物学研究所,货号:SCSP-223。饲养层细胞为小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts,MEF),此细胞经过伽马射线辐射后失去分裂能力,接种在含 0.1%明胶处理过的细胞培养皿中,待 24 h 完全贴壁后,将 mESC 细胞接种到此饲养层细胞上,2~3 d 后传代到无 0.1%明胶的皿中,以除去 MEF。mESC 细胞培养基需再加入 1 mL/L β 巯基乙醇,10 μg/L 重组人白血病抑制因子等。

1.2.2 miRNA 合成与转染 在广州市锐博生物科技有限公司订购合成 miR-302a mimic 及对照 negative control。miR-302a mimics;sense 5'-UAA GUG CUU CCA UGU UUU GGY GA-3',anti-sense 5'-ACC AAA ACA CAU GGA AGC ACU UAU U-3'。negative control;sense 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3',anti-sense 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'。

1.2.3 RT-PCR 检测 miR-302 在 mESC 及叶酸缺乏 mESC 中的表达 总 RNA 的提取参考 trizol 试剂盒(Invitrogen)使用说明书,引物设计如下。miR-302a 基因引物序列:5'-GTC GTA TCC AGT GCG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TGC ACT GGA TAC GAC TCA CCA A-3',甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参标记物,引物序列:5'-TGA CTT CAA CAG CGA CAC CCA-3'。通过一步法 RT-PCR 试剂盒将

RNA 逆转录成 cDNA 并进行 PCR 扩增,获取 5 μL 扩增产物用于下一步 2%的琼脂糖胶进行检测。紫外分光光度计检测电泳条带并拍照。

1.2.4 MTT 法测 mESC 增殖率 96 孔板中 MEF 作为饲养层,mESC 接种于饲养层上,当细胞汇合度达到 70%时,分别转染 miR-302a mimic 和 negative control,转染浓度分别为 50 nmol、200 nmol,转染达到 72 h 后,加入 20 μL 5 mg/mL MTT,继续培养 4 h 后吸弃培养液,每孔加入 150 μL DMSO,振荡使结晶物充分溶解,于酶标仪 560 nm 处测 A 值,以 630 nm 作为参比波长计算相对增殖率。

1.2.5 细胞凋亡检测 6 孔板中 MEF 作为饲养层,mESC 接种于饲养层上,当细胞汇合度达到 70%时,分别转染 miR-302a mimic、negative control,转染浓度分别为 50 nmol、200 nmol,24 h 后消化收集细胞,避光染色 30 min 上机检测。按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书的方法,用 0.25%的胰蛋白酶(不含 EDTA)消化,PBS 洗涤,2 000 r/min 离心 5 min,收集细胞;加入 Binding Buffer 500 μL 悬浮细胞,随后加入 Annexin V-FITC 5 μL 混匀后,加入 PI 5 μL,混匀,于室温避光反应 5~15 min,在 1 h 内进行流式细胞仪检测。

1.2.6 细胞周期检测 6 孔板中 MEF 作为饲养层,mESC 接种于饲养层上,当细胞汇合度达到 70%时,分别转染 miR-302a mimic、negative control,转染浓度分别为 50 nmol、200 nmol,24 h 后消化收集细胞,避光染色 30 min 上机检测。

1.2.7 Western blot 6 孔板中 MEF 作为饲养层,mESC 接种于饲养层上,当细胞汇合度达到 70%时,分别转染 miR-302a mimic、negative control,转染浓度分别为 50 nmol、200 nmol,24 h 后消化收集细胞,离心,后加入适量的 RIPA 裂解液,每隔 10 min 置于涡旋仪中振荡 30 s,40 min 后,4 ℃,10 000 r/min 离心 10 min,小心吸取上清液,即可获得总蛋白。根据 BCA 试剂盒对蛋白浓度进行测定。蛋白上样,跑 SDS 凝胶电泳,后湿法转膜。将膜浸入一抗溶液孵育,4 ℃过夜;漂洗后,浸入二抗溶液中室温孵育 1~2 h。将膜取出漂洗,在膜上滴加 ECL 曝光液,在凝胶成像系统中曝光。用“Quantity one”软件对各抗体条带灰度值进行统计。

1.3 统计学处理 所有数据均用 SPSS 17.0 统计分析,数据至少重复 3 次并用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-302a 在 mESC 及缺乏叶酸 mESC 中的表达 RT-PCR 结果显示,无叶酸组中 miR-302a 表达量显著下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.2 miR-302a 对 mESC 活力影响 与对照组比较,无叶酸组细胞活力下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与无叶酸组比较,miR-302a 组能显著提高细胞活力,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

2.3 miR-302a 对 mESC 细胞凋亡的影响 与对照组比较,无叶酸组中细胞凋亡增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与无叶酸组比较,miR-302a 组细胞凋亡减少,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.4 miR-302a 对 mESC 细胞周期的影响 与对照组比较,无

叶酸组细胞周期阻滞在 G₁ 期, 差异具有统计学意义 (P < 0.05); 与无叶酸组比较, miR-302a 组中 G₁ 期缩短, 差异具有统计学意义 (P < 0.05)。见表 2。

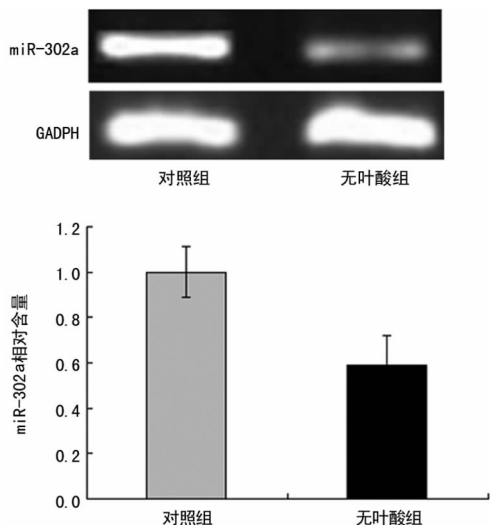


图 1 miR-302a 在 mESC 及缺乏叶酸 mESC 中的表达

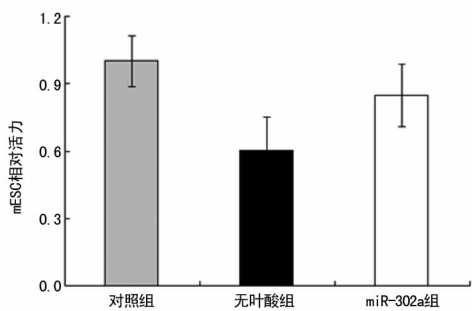


图 2 miR-302a 对 mESC 活力影响

表 1 miR-302a 对 mESC 细胞凋亡的影响 (x̄ ± s)

组别	早期凋亡	晚期凋亡
对照组	3.52 ± 0.49	4.08 ± 0.63
无叶酸组	9.78 ± 1.27	23.47 ± 3.56
miR-302a 组	5.26 ± 0.93	10.87 ± 1.02

表 2 miR-302a 对缺乏叶酸 mESC 细胞周期的影响 (x̄ ± s, %)

组别	G ₁	S	G ₂
对照组	12.49 ± 1.03	70.25 ± 3.39	17.26 ± 2.13
无叶酸组	29.81 ± 4.59	60.21 ± 4.83	9.98 ± 1.34
miR-302a 组	18.37 ± 2.65	68.29 ± 5.57	13.34 ± 1.09

2.5 miR-302a 对 mESC 细胞中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响 与对照组比较, 无叶酸组 Akt 和 mTOR 磷酸化水平下降, 差异均具有统计学意义 (P < 0.05); 与无叶酸组比较, miR-302a 组能提高 Akt 和 mTOR 磷酸化水平, 差异均具有统计学意义 (P < 0.05), 见图 3。

2.6 miR-302a 对 mESC 中细胞周期相关蛋白表达的影响 与对照组比较, 无叶酸组中 CyclinD1 表达下调, p21、p27 表达

上调, 差异均具有统计学意义 (P < 0.05); 与无叶酸组比较, miR-302a 组能上调 CyclinD1 表达, 下调 p21、p27 表达, 差异均具有统计学意义 (P < 0.05), 见图 4。

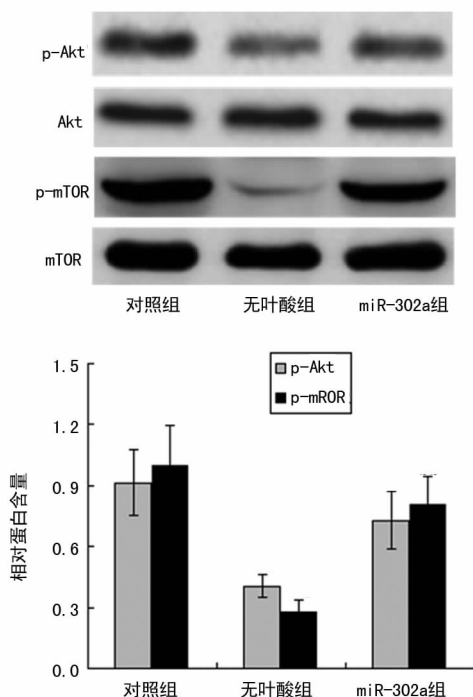


图 3 miR-302a 对 mESC 细胞中 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响

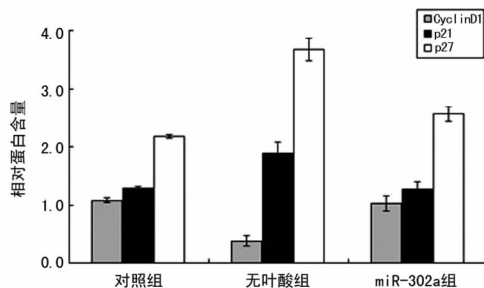


图 4 miR-302a 对缺乏叶酸 mESC 中细胞周期相关蛋白表达的影响

3 讨论

miR-302 家族是胚胎干细胞特异性 miRNA, 能通过调控 CyclinD1 和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂, 促进 G₁ 期向 S 期进展, 进而促进细胞增殖, 保持胚胎干细胞的特性^[5]。miR-302 首先在 mESC 中克隆得到, 在其他的成年细胞中均未克隆到, 且发现 miR-302 只特异性的高表达于未分化的人胚胎干细胞、mESC、犬胚胎干细胞中, 一旦进入分化阶段, 其表达量下降^[5-6]。miR-302 在 ESC 中表达量较高^[6]。miR-302 在未分化 ESC 中表达量较高, 分化后表达量下降^[7]。本实验也发现, 在无叶酸组中, miR-302a 表达量下降。

细胞增殖分裂是细胞重要生命特征之一。胚胎干细胞细胞周期 G₁ 期较短, 与肿瘤细胞相似, 一个细胞周期为 11 h, G₁ 期只有 2 h, 整个细胞周期活跃, 细胞增殖快速。CyclinD1 是 G₁ 期关键蛋白, 最先在 G₁ 期被合成, 并且在 G₀/G₁ 期到 S 期的进程中发挥关键作用。CyclinD1 和细胞周期依赖蛋白激酶

(CDK4)结合,形成 CyclinDa-CDK 复合物,导致 CDK 的蛋白激酶活化,通过一系列调控作用,使细胞通过限制点进入 S 期,引起细胞分裂。p21 和 p27 是细胞周期依赖性激酶抑制剂,与 CyclinD1 竞争可 Cyclin-CDK 复合物或细胞增殖抗原的活性,使细胞不能通过 G₁ 期。miR-294/miR-302 通过快速调节 G₁ 期限制点促进 ESC 细胞增殖,而抑制其分化^[8]。在 hESCs, miR-302a 提高 CyclinD1 表达,从而加快 G₁ 期,延长 S 期^[5]。p21 是 miR-302 的已知报道的靶基因^[9]。本实验也发现,miR-302a mimics 可使缺乏叶酸的 mESC 细胞 CyclinD1 表达量提高,p21 和 p27 表达量下降,G₁ 期缩短。

已有文献报道,未分化状态下 hESCs 的增殖与 PI3K/Akt/mTOR 的高磷酸化水平有关^[10]。PI3K 属于磷脂酰肌醇依赖激酶家族,可通过一系列信号转导以此激活 Akt,而被描述为癌基因的 Akt,参与了包括细胞增殖、细胞凋亡、迁移等在内许多基本的细胞过程。Akt 活化后可以促进 mTOR 磷酸化,使其产生应答效应,调节下游通路,使与细胞周期有关的蛋白表达增加,促进细胞周期跨越 G₁ 期,影响细胞的生长及大小^[11]。激活 PI3K/Akt 信号通路,可明显抑制细胞凋亡,并下调 G₀/G₁ 期比例,从而维持 hESC 的存活和增殖^[12]。miR-302-367 簇通过 PI3K/Akt 信号通路抑制胶质瘤细胞的增殖及转移^[13]。miR-302-367 簇通过降低 Akt1 磷酸化水平,下调 CyclinD1 表达,上调 p27 及 p21 表达,从而抑制宫颈癌细胞增殖^[9]。本研究也发现,miR-302a mimics 能使缺乏叶酸的 mESC 中 Akt 和 mTOR 磷酸化水平提高,并抑制细胞凋亡。

综上所述,在缺乏叶酸的 mESC 中 miR-302a 表达量下降,细胞凋亡增加,细胞周期阻滞在 G₁ 期,CyclinD1 表达量下降,p21 和 p27 表达量上升,Akt/mTOR 磷酸化水平下降,当转染 miR-302a mimics 后,细胞凋亡率下降,G₁ 期缩短,CyclinD1 表达量上升,p21 和 p27 表达量下降,Akt/mTOR 磷酸化水平提高,说明 miR-302a 可通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路来调节细胞增殖和凋亡。

参考文献

- [1] Steele W, Allegrucci C, Singh R, et al. Human embryonic stem cell methyl cycle enzyme expression; modelling epigenetic programming in assisted reproduction? [J]. Reprod Biomed Online, 2005, 10(6): 755-766.
- [2] Kanazawa S, Herbert V. Detection of folate deficiency in alcoholism using the peripheral blood lymphocyte deoxyuridine suppression test[J]. J Nutr Sci Vitaminol(Tokyo), 1986, 32(3): 251-257.
- [3] 梁燕,李正莉,李媛媛,等. 叶酸缺乏对小鼠胚胎干细胞增殖和凋亡影响[J]. 中国优生与遗传杂志, 2012, 20(12): 40-42, 137.
- [4] Parchem RJ, Moore N, Fish JL, et al. miR-302 is required for timing of neural differentiation, neural tube closure, and embryonic viability[J]. Cell Rep, 2015, 12(5): 760-773.
- [5] Card DA, Hebbbar PB, Li L, et al. Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells [J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(20): 6426-6438.
- [6] Zovoilis A, Pantazi A, Smorag L, et al. Embryonic stem cell-related miRNAs are involved in differentiation of pluripotent cells originating from the germ line[J]. Mol Hum Reprod, 2010, 16(11): 793-803.
- [7] Stadler B, Ivanovska I, Mehta K, et al. Characterization of microRNAs involved in embryonic stem cell states [J]. Stem Cells Dev, 2010, 19(7): 935-950.
- [8] Wang Y, Melton C, Li YP, et al. miR-294/miR-302 promotes proliferation, suppresses G1-S restriction point, and inhibits ESC differentiation through separable mechanisms[J]. Cell Rep, 2013, 4(1): 99-109.
- [9] Cai N, Wang YD, Zheng PS. The microRNA-302-367 cluster suppresses the proliferation of cervical carcinoma cells through the novel target AKT1[J]. RNA, 2013, 19(1): 85-95.
- [10] Lee KW, Yook JY, Son MY, et al. Rapamycin promotes the osteoblastic differentiation of human embryonic stem cells by blocking the mTOR pathway and stimulating the BMP/Smad pathway[J]. Stem Cells Dev, 2010, 19(4): 557-568.
- [11] Lee SH, Lee MY, Han HJ. Short-period hypoxia increases mouse embryonic stem cell proliferation through cooperation of arachidonic acid and PI3K/Akt signalling pathways[J]. Cell Prolif, 2008, 41(2): 230-247.
- [12] Alva JA, Lee GE, Escobar EE, et al. Phosphatase and tensin homolog regulates the pluripotent state and lineage fate choice in human embryonic stem cells [J]. Stem Cells, 2011, 29(12): 1952-1962.
- [13] Yang CM, Chiba T, Brill B, et al. Expression of the miR-302/367 cluster in glioblastoma cells suppresses tumorigenic gene expression patterns and abolishes transformation related phenotypes [J]. Int J Cancer, 2015, 20(5): 231-234.

(收稿日期:2015-10-23 修回日期:2015-12-20)

《重庆医学》开通微信公众平台

《重庆医学》已开通微信公众平台(微信号:ChongqingMedicine),《重庆医学》将以微信平台渠道向广大读作者发送终审会动态报道、各期杂志目录、主编推荐文章、学术会议、《重庆医学》最新资讯等消息。欢迎广大读作者免费订阅。读作者可以点击手机微信右上角的“+”,在“添加朋友”中输入微信号“Chongqing Medicine”,或在“添加朋友”中的“查找公众号”一栏输入“重庆医学”,添加关注。