

microRNA-21靶向PDCD4/PTEN对大鼠 ADSCs凋亡的抑制作用

张梦雨 刘玉梅 石珂 孙莹莹 孟冰冰 张自强*

(河南科技大学动物细胞生物学实验室, 洛阳 471000)

摘要 该研究探究miR-21对大鼠ADSCs凋亡的影响, 为提高ADSCs移植存活率提供依据。该研究建立大鼠ADSCs体外凋亡模型, 采用qRT-PCR检测miR-21的表达。在ADSCs中采用Lipofectamine 2000转染miR-21 mimics, qRT-PCR检测miR-21 mimics转染效率。CCK-8、Hoechst 33258检测大鼠ADSCs过表达miR-21对细胞存活率的影响; Western blot检测大鼠ADSCs过表达miR-21后凋亡相关蛋白表达量。结果显示H₂O₂诱导细胞凋亡后, miR-21在ADSCs中的表达明显下调。大鼠ADSCs转染miR-21 mimics后, ADSCs中miR-21的表达量较对照组显著提高了7.4倍。与miR-21 scramble组相比, ADSCs过表达miR-21后, ADSCs存活率显著升高, 促凋亡蛋白Caspase-3和Bax的表达量显著降低, 而抗凋亡蛋白Bcl-2的表达水平明显升高。与对照组相比, miR-21过表达后, *PDCD4*和*PTEN* mRNA无显著变化, 但*PDCD4*和*PTEN*蛋白表达明显下调。利用*PDCD4* siRNA和*Phen*阻断*PDCD4*和*PTEN*的表达后, Caspase-3、Bax的表达水平显著降低, Bcl-2的表达水平显著升高。该研究得出miR-21通过靶向*PDCD4/PTEN*增强大鼠ADSCs对凋亡的抑制作用。

关键词 ADSCs; 凋亡; microRNA-21; *PDCD4*; *PTEN*

microRNA-21 Targets *PDCD4/PTEN* to Inhibit the Apoptosis of ADSCs in Rats

ZHANG Mengyu, LIU Yumei, SHI Ke, SUN Yingying, MENG Bingbing, ZHANG Ziqiang*

(Laboratory of Animal Cell Biology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China)

Abstract This study explored the effect of miR-21 on apoptosis of ADSCs in rats, and provided basis for improving the survival rate of ADSCs transplantation. The apoptosis model of ADSCs was established *in vitro*, and the expression of miR-21 was detected by qRT-PCR. Lipofectamine 2000 was used to transfect miR-21 mimics in ADSCs, and qRT-PCR was used to detect the transfection efficiency of miR-21 mimics. CCK-8 and Hoechst 33258 were used to detect the effect of miR-21 overexpression on the survival rate of ADSCs. Western blot was used to detect the expression of apoptosis-related proteins after the overexpression of miR-21 in ADSCs. After H₂O₂-induced apoptosis, the expression of miR-21 in ADSCs was significantly down-regulated. After rat ADSCs were transfected with miR-21 mimics, the expression of miR-21 in ADSCs was significantly increased by 7.4 times compared with the control group. Compared with the miR-21 scramble group, the survival rate of ADSCs was significantly increased after the overexpression of miR-21 mimics; the expressions of pro-apoptotic proteins Caspase-3 and Bax were significantly decreased, while the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 was significantly increased. Compared with the control group, the mRNA of *PDCD4* and *PTEN* were not significantly changed after

收稿日期: 2021-04-09 接受日期: 2021-06-30

国家自然科学基金(批准号: U1504325、31101779)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15303791931, E-mail: ziqiangzhang@haust.edu.cn

Received: April 9, 2021 Accepted: June 30, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. U1504325, 31101779)

*Corresponding author. Tel: +86-15303791931, E-mail: ziqiangzhang@haust.edu.cn

miR-21 overexpression, but the protein expressions of *PDCD4* and *PTEN* were significantly down-regulated. After blocking the expression of *PDCD4* and *PTEN* with *PDCD4* siRNA and *Phen*, the expression of Caspase-3 and Bax were significantly decreased, while the expression of Bcl-2 was significantly increased. In this study, miR-21 can increase the inhibitory effect of ADSCs on apoptosis by targeting *PDCD4/PTEN*.

Keywords ADSCs; apoptosis; microRNA-21; *PDCD4*; *PTEN*

脂肪间充质干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)是具有自我复制能力和多向分化潜能的成体干细胞,在再生医学领域应用较为广泛。ADSCs可以在特定的诱导条件下分化为脂肪细胞^[1]、成骨细胞^[2]、软骨细胞^[3]、肌细胞^[4]、神经细胞^[5]和其他类型细胞^[6]。与其他类型的干细胞相比,ADSCs体外存活能力强、扩增迅速、免疫原性低^[7],且可以从皮下吸脂手术获得的脂肪组织中分离出来^[8],因此它不涉及伦理问题。这些特征使ADSCs成为多种疾病细胞疗法(例如组织和器官移植)中有效的种子细胞。然而由于受损部位的微环境发生改变,受损部位发生氧化应激反应,且富集大量的炎症因子,导致局部干细胞难以存活^[9]。MARCONI等^[10]发现皮肤干细胞移植至损伤处14天后,其在损伤处的存活率低于10%。TOMA等^[11]建立小鼠心脏缺陷模型并移植干细胞到小鼠心脏4天后,发现细胞在此处的存活率不到0.44%。干细胞移植后最大的障碍是细胞极低的存活率^[12]。因此,提高移植后的ADSCs在体存活率是其临床应用的关键^[13]。当前提高细胞移植率的方式主要有两种:一是改善组织损伤后恶劣微环境包括联合药物,但是这种方式难以让药物在体内保持持续有效的浓度^[13];二是多次在损伤部位注射干细胞,但是这种方式程序繁琐,受外界影响较大^[14]。

miRNA(microRNA)是一类内源性非编码的单链小RNA,由21~23个碱基组成,通过结合靶基因的3'非编码区(3' untranslated region, 3'UTR),抑制mRNA翻译或降解靶mRNA^[15]。越来越多的证据表明,miR-21可以通过多种信号通路调节间充质干细胞的定向分化、增殖和凋亡发生。有报道称,miR-21可以活化MAPK/ERK信号通路,增加过氧化物酶体增殖物激活受体 λ (peroxisome proliferators-activated receptor λ , *PPAR* λ)及其他相关基因的表达,促进干细胞向脂肪干细胞分化^[16]。此外,miR-21可通过调控Spry2的表达,进而激活MAPK/ERK和PI3K/AKT信号通路,促进表皮生长因子诱导的胰腺癌细胞增殖,抑制细胞凋亡并加速细胞周期进程^[17]。研

究表明,miR-21的表达与细胞凋亡的发生有关,SHI等^[18]发现,miR-21可以通过PTEN/PI3K/AKT信号通路有效增加心肌干细胞的存活率,抑制心肌干细胞受H₂O₂诱导的凋亡。有学者发现在卵巢癌细胞中miR-21表达量明显升高,抑制其表达后PTEN表达上调、PI3K/AKT活性受到抑制,从而促进细胞凋亡并减少细胞增殖^[19]。在骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)中,也发现miR-21可以通过PI3K/AKT信号通路下调PTEN的表达来抑制BMSCs的凋亡^[20]。

目前,miR-21在细胞凋亡方面的研究已经有许多文献报道,然而miR-21过表达后是否能够调控ADSCs凋亡发生,尚不明确。本研究运用H₂O₂诱导法建立ADSCs体外凋亡模型,探究miR-21对ADSCs凋亡的影响,为提高ADSCs移植存活率提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

主要试剂和仪器包括:30% H₂O₂(广东恒健制药有限公司),DMEM/F12培养基、PBS(Hyclone, 美国),青/链霉素和0.25%胰蛋白酶(Gibco, 美国),胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司),Lipofectamine 200(Invitrogen, 美国),miR-21 mimics(上海吉玛生物有限公司),CCK-8试剂盒、细胞凋亡-Hoechst 33258染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),Caspase-3一抗、Bax一抗、GAPDH一抗、HRP标记的抗兔二抗、PDCD4一抗、PTEN一抗(武汉三鹰生物技术有限公司),Bcl-2一抗(伊莱瑞特生物科技股份有限公司),*PDCD4* siRNA(Sigma, 美国),*Phen*(Merck, 德国),CO₂培养箱(Thermo, 美国),倒置相差显微镜(Olympus, 日本),pre-miR-21(广州锐博生物技术有限公司),实时荧光定量PCR仪(Bio-Rad, 美国)。

1.2 大鼠ADSCs体外分离培养

所有动物操作均经河南科技大学机构动物护理和使用委员会批准(No.20190619024)。颈椎脱臼

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	序列(5'→3') Sequences (5'→3')
PTEN	Forward: ATC TTG TGC TCA CCC TGA CA
	Reverse: AGC CTC TGG ATT TGA TGG CTC
PDCD4	Forward: TTG AGC ACG GAG ATA CGA AC
	Reverse: GTC CCG CAA AGG TCA GAA AG
miR-21	Forward: TCG CCC GTA GCT TAT CAG ACT
	Reverse: CAG AGC AGG GTC CGA GGT A
GAPDH	Forward: ACA GCA ACA GGG TGG TGG AC
	Reverse: TTT GAG GGT GCA GCG AAC T
U6	Forward: GCG CGT CGT GAA GCG TTC
	Reverse: GTG CAG GGT CCG AGG T

处死大鼠后, 无菌条件下取大鼠腹股沟处脂肪并剪碎, 加入I型胶原酶, 37 °C的水浴锅温育70~90 min, 加入含有血清的培养基终止消化。1 000 ×g离心10 min, 留下沉淀。接种于培养瓶中, 在37 °C、5% CO₂培养箱中培养, 待细胞密度达到90%后进行传代。

1.3 H₂O₂诱导的氧化应激模型

待F2代ADSCs生长至80%时, 用0.25%胰酶进行消化2~3 min, 分别接种于96孔板和6孔板中, 待细胞贴壁后用H₂O₂(0、50、100、150、200和500 μmol/L)孵育4 h, 进行相应检测。

1.4 细胞转染

实验设置对照组(Control)、无意序列对照组(miR-21 scramble)和miR-21 mimics组。ADSCs细胞生长至80%后, 更换为不含青链霉素双抗的DMEM/F12培养液, 待细胞生长至90%后, 参照美国Invitrogen公司的Lipofectamine 2000转染试剂说明书对ADSCs进行miR-21 mimics的转染, 转染24 h后, 检测转染效率。

1.5 细胞增殖实验

采用CCK-8检测ADSCs增殖情况。按照试剂说明书, 细胞以5×10⁴个/mL的密度接种于96孔板中, 每孔加入100 μL。待细胞贴壁后, 每孔加10 μL CCK-8溶液。37 °C孵育4 h后, 使用酶标仪测量波长为450 nm处每孔的吸光度值。常规CCK-8法计算细胞存活率(%)=(实验组吸光度值-空白组吸光度值)/(对照组吸光度值-空白组吸光度值)。

1.6 Hoechst 33258染色

每个样品用0.5 mL 4%多聚甲醛固定15 min, PBS洗2次, 每次3 min。加入0.5 mL Hoechst 33258染色溶液(碧云天) 37 °C孵育5 min。倒置荧光显微

镜观察细胞核, 将200个细胞作为1个视野, 随机选取6个视野, 统计凋亡细胞的数量。大鼠ADSCs凋亡率(%)=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

1.7 RNA提取和qRT-PCR

使用细胞RNA提取试剂盒, 按试剂盒说明书提取各组ADSCs的总RNA。在qRT-PCR系统中定量检测miR-21、PTEN和PDCD4的表达情况。以U6 snRNA和GAPDH作为标准对照(表1)。数据采用2^{-ΔΔCt}法进行分析。

1.8 Western blot分析

提取细胞总蛋白, 使用BCA蛋白定量试剂盒对提取的总蛋白进行定量, 按比例加入蛋白上样缓冲液, 95 °C~100 °C变性5 min。将蛋白加载到12% SDS-PAGE上, 转移到PVDF膜上后, 将其与5%的脱脂牛奶封闭2 h后, 分别加入抗Caspase-3(1:500)、Bax(1:700)、Bcl-2(1:500)、PDCD4(1:500)、PTEN的抗体(1:500)及内参β-actin(1:1 000)、GAPDH(1:1 000), 于4 °C孵育过夜。TBST洗膜, 分别加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3 000), 37 °C孵育2 h。TBST洗膜, 条带显影并使用ImageJ软件对Western blot条带进行量化。

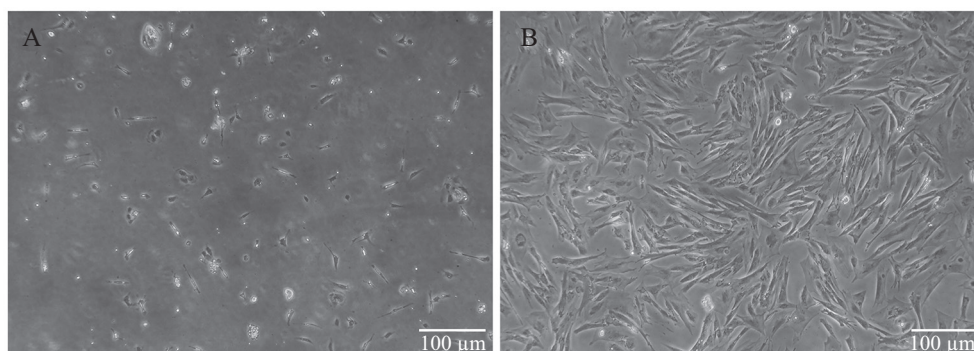
1.9 统计学分析

用SPSS 26软件进行统计学分析, 采用单因素方差分析和独立样本t检验, 分析结果用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, P<0.05为差异显著, 具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠ADSCs的形态观察

将大鼠ADSCs原代细胞培养24 h后, 细胞呈短



A: ADSCs原代培养24 h; B: P3代ADSCs。

A: on the 24 h, primary culture of ADSCs; B: P3 generation of ADSCs.

图1 大鼠ADSCs的形态图

Fig.1 Morphology of ADSCs in rats

梭形, 细胞散在生长, 贴壁细胞数量较少(图1A), 传代后的ADSCs生长状态良好细胞体积增大, 呈长梭形, 增殖速度较快, 成团簇状生长(图1B)。

2.2 H₂O₂对ADSCs凋亡发生的影响

150、200和500 μmol/L H₂O₂组的ADSCs存活率分别为58.80%±8.70%、49.20%±6.06%和19.35%±5.18%, 与对照组比较细胞存活率显著降低($P<0.05$, 图2A)。Hoechst 33258染色显示, H₂O₂处理4 h后, 对照组的细胞核染色均匀; 在50~500 μmol/L浓度范围内, ADSCs随着H₂O₂浓度升高, 细胞核呈致密浓染的数量逐渐减少, 细胞凋亡率显著增加。150、200和500 μmol/L H₂O₂处理4 h后, 细胞凋亡比率为24.9%、40.7%和90.2%, 与对照组比较细胞凋亡率显著降低($P<0.05$, 图2B和图2C)。H₂O₂诱导细胞凋亡后, miR-21在ADSCs中的表达明显下调, 这种作用具有剂量依赖性。与对照组相比, 150、200和500 μmol/L的H₂O₂作用于ADSCs后miR-21的表达显著降低了36.1%、42.2%和49.9%($P<0.05$, 图2D)。

2.3 miR-21 mimics转染ADSCs后miR-21的相对表达量

miR-21 mimics转染ADSCs 24 h后, qRT-PCR显示, 与对照组相比, 转染后大鼠ADSCs中miR-21的表达量提高了7.4倍, 差异具有统计学意义(图3)。

2.4 miR-21对ADSCs凋亡发生的影响

Hoechst 33258染色(图4A)显示, 与对照组相比, 200 μmol/L H₂O₂孵育miR-21 scramble组ADSCs 4 h后, 细胞凋亡率升高了40.28%($P<0.05$, 图4B)。200 μmol/L H₂O₂孵育miR-21 mimics转染的细胞4 h

后, 细胞凋亡率为13.8%±1.57%, 与H₂O₂孵育miR-21 scramble组相比凋亡细胞明显减少了31.8%($P<0.05$, 图4B)。Western blot结果显示, 与对照组相比, H₂O₂孵育miR-21 scramble组的细胞后Caspase-3和Bax蛋白的表达量分别提高了62.9%和68.7%($P<0.05$, 图4D); H₂O₂孵育miR-21 mimics组4 h后, 与H₂O₂孵育miR-21 scramble组相比, 凋亡蛋白Caspase-3和Bax的表达量分别显著降低了58.8%和56.2%, 而抗凋亡蛋白Bcl-2的表达量升高了53.8%($P<0.05$, 图4D)。

2.5 miR-21降低PTEN、PDCD4蛋白表达

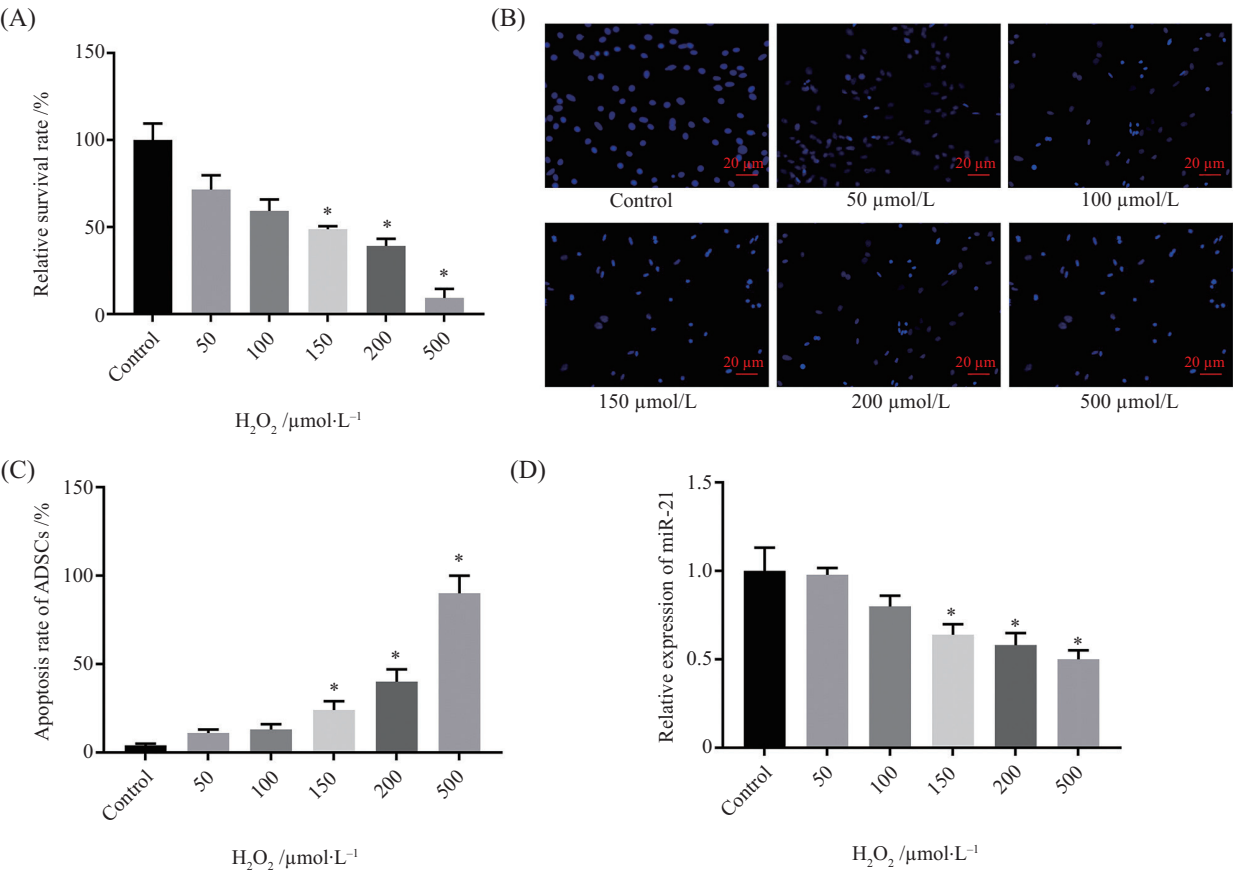
miR-21在大鼠ADSCs中过表达后, *PDCD4*和*PTEN* mRNA与对照组相比无显著变化(图5A)。与对照组相比, miR-21 mimics转染细胞后*PDCD4*和*PTEN*蛋白表达量分别降低了66.1%和81.0%($P<0.05$, 图5B和图5C)。

2.6 miR-21靶基因PDCD4、PTEN对ADSCs凋亡发生的影响

为了研究miR-21介导大鼠ADSCs抗凋亡作用的机制, 我们分别用*PDCD4*和*PTEN*特异性抑制剂*PDCD4* siRNA和*Phen*来阻断其表达。与H₂O₂组相比使用*PDCD4* siRNA和*Phen*后, 凋亡蛋白Caspase-3的表达量分别降低了46.1%和53.8%, Bax的表达量分别降低了40.9%和54.1%, 而抗凋亡蛋白Bcl-2的表达量分别升高了75.0%和73.9%($P<0.05$, 图6A和图6B)。

3 讨论

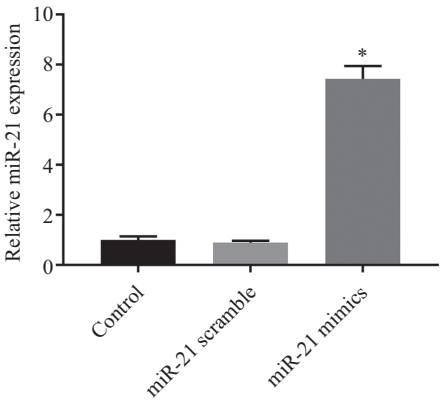
ADSCs具有很高的应用潜力, 然而在大规模实际临床应用方面, 还有很多的问题亟待解决, 例如损伤组织微环境不利于脂肪干细胞的存活, 易发凋亡,



A: CCK-8法检测不同浓度H₂O₂孵育ADSCs 4 h后细胞的存活率; B: Hoechst 33258染色; C: Hoechst 33258染色统计图; D: 不同浓度H₂O₂对ADSCs中miR-21表达的影响; **P*<0.05, 与对照组比较; *n*=3。

A: the survival rate of ADSCs exposed to different concentrations of H₂O₂ for 4 h was measured by CCK-8 assay; B: Hoechst 33258 staining; C: statistical plot of Hoechst 33258 staining; D: H₂O₂ effects on miR-21 expression; **P*<0.05 compared with control group; *n*=3.

图2 H₂O₂对ADSCs凋亡发生的影响
Fig.2 Effects of H₂O₂ on the apoptosis of ADSCs

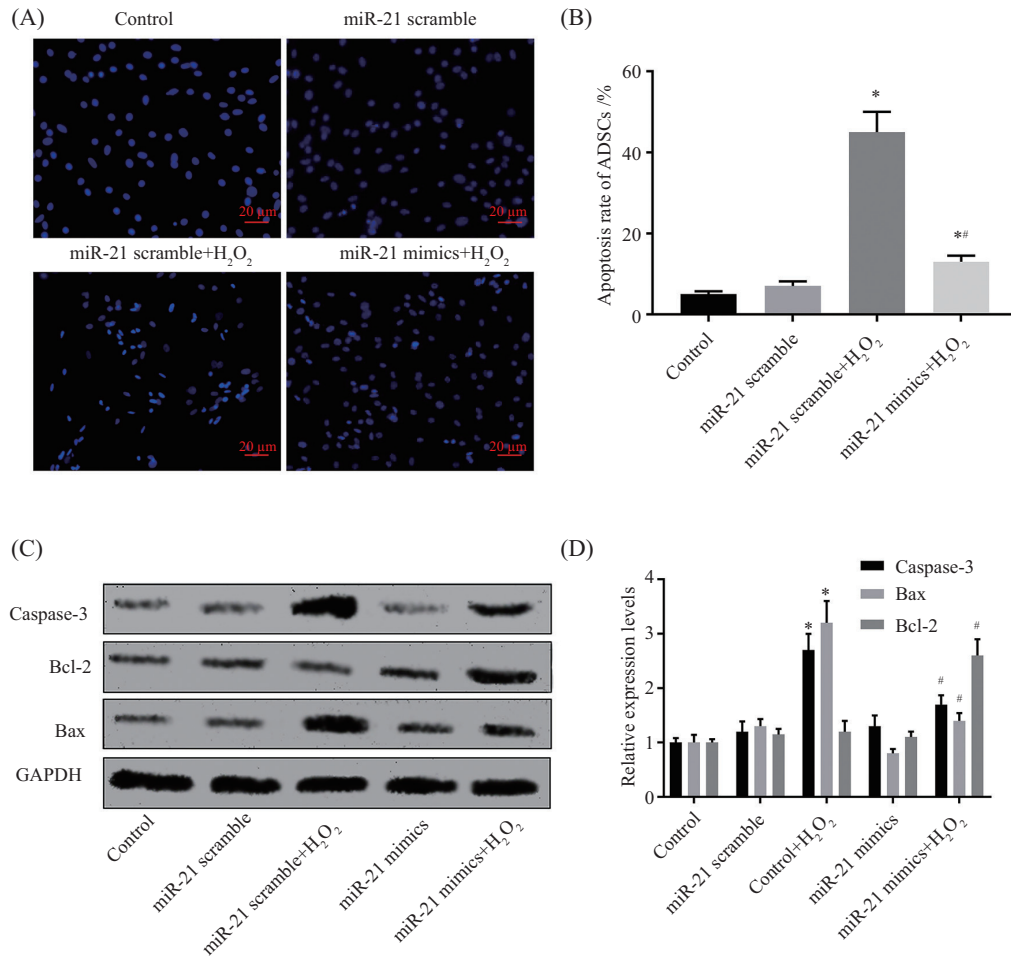


**P*<0.05, 与对照组比较。
**P*<0.05 compared with control group.

图3 ADSCs中miR-21的相对表达量
Fig.3 Relative expression of miR-21 in ADSCs

使得因脂肪干细胞数量不足而影响修复效果, 因此提高ADSCs的移植存活率是其应用于治疗疾病的关键。

H₂O₂是一种强氧化剂, 常用于构建细胞凋亡的模型^[21]。已有研究表明, 不同类型的细胞对H₂O₂氧化的敏感性不同, 细胞的生长速度和衰老受到H₂O₂

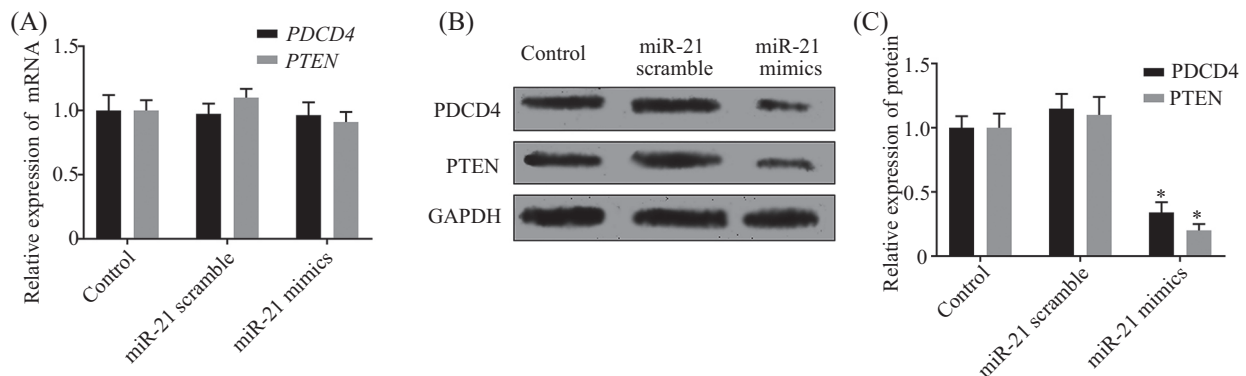


A, B: Hoechst 33258染色实验结果; C, D: Western blot检测miR-21对Bax、Bcl-2和Caspase-3表达的影响; * $P < 0.05$, 与miR-21 scramble组比较; # $P < 0.05$, 与miR-21 scramble+H₂O₂组比较; $n = 3$ 。

A,B: the results of Hoechst 33258 staining; C,D: influences on Bax, Bcl-2, and Caspase-3 of miR-21 mimics was detected by Western blot; * $P < 0.05$ compared with miR-21 scramble group; # $P < 0.05$ compared with miR-21 scramble+H₂O₂ group; $n = 3$.

图4 miR-21 mimics对ADSC凋亡的影响

Fig.4 The effects of miR-21 mimics on ADSC apoptosis

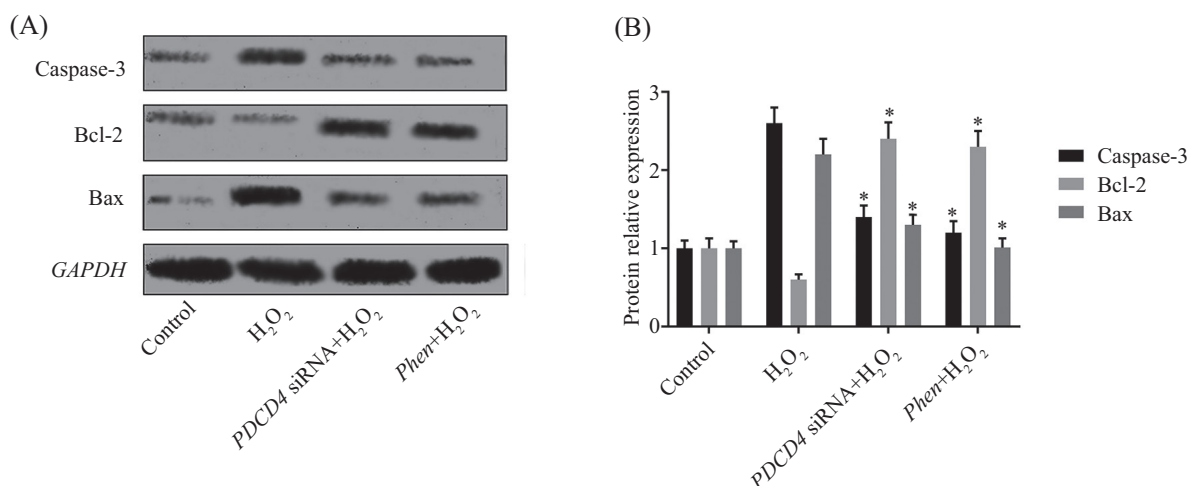


A: miR-21对PDCD4、PTEN mRNA表达影响; B、C: miR-21 mimics组中PDCD4、PTEN蛋白表达; * $P < 0.05$, 与对照组比较; $n = 3$ 。

A: the results showed the effect of miR-21 on the expression of PDCD4 and PTEN mRNA; B,C: the expression of PDCD4 and PTEN protein in miR-21 mimics group; * $P < 0.05$ compared with the control group; $n = 3$.

图5 PDCD4、PTEN在H₂O₂致大鼠ADSCs凋亡中表达量的变化

Fig.5 The expression changes of PDCD4, PTEN in H₂O₂-induced apoptosis of ADSCs in rats



A、B: Western blot检测PDCD4 siRNA和Phen对Bax、Bcl-2和Caspase-3的蛋白表达的影响; * $P < 0.05$, 与对照组比较; $n = 3$ 。

A,B: the effects of PDCD4 siRNA and Phen on the expression levels of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 were detected by Western blot; * $P < 0.05$ compared with control group; $n = 3$.

图6 PDCD4、PTEN在H₂O₂诱导的大鼠ADSCs凋亡中的作用
Fig.6 The role of PDCD4, PTEN in H₂O₂-induced apoptosis of ADSCs in rats

浓度的影响^[22-23]。本文以H₂O₂建立细胞凋亡模型, 探究了miR-21对ADSCs凋亡发生的影响, 为寻找提高ADSCs抗凋亡能力的方法提供了依据。为了建立稳定有效的细胞凋亡模型, 本研究采用不同浓度的H₂O₂作用于大鼠ADSCs, 并采用多种方法检测ADSCs的凋亡情况。我们发现, H₂O₂诱导凋亡相关蛋白Caspase-3和Bax上调, 抗凋亡相关蛋白Bcl-2表达下调。随着过氧化氢浓度的增加, 细胞凋亡率逐渐升高。500 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂诱导凋亡程度最高, 大量细胞漂浮在培养基中, 这导致当H₂O₂浓度为500 $\mu\text{mol/L}$ 时没有足够的细胞以进行后续实验。200 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂诱导ADSCs, 细胞凋亡率约为50%, 更适合后续实验。

与以往研究相似, 我们的研究表明, 当使用200 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂处理24 h后, 大鼠ADSCs中miR-21的表达水平明显降低, 这表明miR-21的表达可能与大鼠ADSCs的凋亡有关^[20,24]。近年来, miR-21被证实具有调节细胞凋亡的潜能。实验发现, miR-21参与去甲肾上腺素介导的大鼠颗粒细胞凋亡, 并通过靶向Smad7阻断颗粒细胞凋亡^[25]。在巨噬细胞中, miR-21是最丰富的miRNA, miR-21的缺失增加了miR-21靶点和促凋亡基因MKK3的表达^[26]。最近的一项研究表明, miR-21在卵巢癌细胞中表达量升高, 但是抑制miR-21的表达后, PTEN表达量升高, PI3K/AKT活性下降, 从而促进细胞凋亡并减少细胞增殖^[19], 在肝癌细胞中, 抑制miR-21后IL-12表达增加, 也会导

致凋亡显著增加^[27]。人脐带间充质干细胞的外泌体主要通过携带miR-21, 减轻内质网应激和抑制p38 MAPK信号通路, 保护细胞免受缺氧诱导的凋亡^[28]。因此, 我们确认miR-21的表达与细胞凋亡相关。本研究转染miR-21 mimics 24 h后, H₂O₂诱导的大鼠ADSCs的凋亡率降低, 且促凋亡相关蛋白Caspase-3和Bax表达量显著下降, 抗凋亡蛋白Bcl-2的表达量显著上升。这些结果表明, miR-21具有抗凋亡的特性, 因此在氧化应激下提高细胞miR-21的表达量可能是一种提高ADSCs存活率的方法。

miRNA通过靶向抑制或降解下游mRNA来影响细胞的凋亡、分化和增殖。我们通过生物信息学网站(NCBI)查找miRNA-21的靶基因, 发现PTEN mRNA第426-431碱基序列GAUAAG可以与miR-21上序列完全匹配; 大鼠PDCD4 mRNA第281-288碱基序列AUAAGCUA可以与成熟miR-21-5p上序列完全匹配。研究发现, 在人黑色素瘤细胞A375细胞中过表达miR-21后, 结果显示miR-21靶向抑制PDCD4和PTEN, 减少细胞凋亡提高增殖能力^[29]。同样, DAMANIA等^[30]得出结论, 乙型肝炎病毒导致肝细胞癌变过程中通过乙型肝炎病毒X蛋白(hepatitis B virus X protein, HBX)诱导的miRNA-21表达和靶向PDCD4和PTEN基因, 在一定程度上促进了细胞增殖。然而, 大鼠ADSCs发生凋亡后, PDCD4和PTEN的表达是否发生变化还未可知。根据以往的报道

和生物学分析,我们推测miR-21 mimics转染ADSCs后,细胞抗凋亡能力升高,可能是通过miR-21抑制靶基因*PDCD4*和*PTEN*的表达来实现的。我们对其进行了验证,结果显示miR-21 mimics转染ADSCs后,ADSCs的*PDCD4*和*PTEN* mRNA的表达量没有改变,但是*PDCD4*和*PTEN*蛋白表达显著下调,使用*PDCD4* siRNA和*Phen*分别抑制*PDCD4*和*PTEN*基因的表达后,大鼠ADSCs的凋亡率显著降低,这与细胞miR-21的作用具有一致性。这表明过表达miR-21的细胞抑制了*PDCD4*和*PTEN* mRNA的翻译,从而使细胞抗凋亡能力升高。

总之,我们的实验结果显示,miR-21通过靶向*PDCD4/PTEN*信号通路阻止H₂O₂诱导的ADSCs凋亡。这一发现表明,miR-21有可能改善ADSCs的生存,从而修复受损组织,为以后miR-21提高细胞存活率提供了理论依据。

参考文献 (References)

- [1] MARTIN E C, QURESHI A T, DASA V, et al. MicroRNA regulation of stem cell differentiation and diseases of the bone and adipose tissue: perspectives on miRNA biogenesis and cellular transcriptome [J]. *Biochimie*, 2016, 124: 98-111.
- [2] FATHI E, FARAHZADI R. Enhancement of osteogenic differentiation of rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by zinc sulphate under electromagnetic field via the PKA, ERK1/2 and Wnt/beta-catenin signaling pathways [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173877.
- [3] GOUDARZI F, MOHAMMADALIPOUR A, BAHABADI M, et al. Hydrogen peroxide: a potent inducer of differentiation of human adipose-derived stem cells into chondrocytes [J]. *Free Radic Res*, 2018, 52(7): 763-74.
- [4] BUDASH G V, BILKO D I, BILKO N M. Differentiation of pluripotent stem cells into cardiomyocytes is influenced by size of embryoid bodies [J]. *Biopolymers Cell*, 2016, 32(2): 118-25.
- [5] ROBALLO K C S, DA SILVEIRA J C, BRESSAN F F, et al. Neurons-derived extracellular vesicles promote neural differentiation of ADSCs: a model to prevent peripheral nerve degeneration [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 11213.
- [6] FU X, TONG Z, LI Q, et al. Induction of adipose-derived stem cells into Schwann-like cells and observation of Schwann-like cell proliferation [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(2): 1187-93.
- [7] KHOJASTEH A, SADEGHI N. Application of buccal fat pad-derived stem cells in combination with autogenous iliac bone graft in the treatment of maxillo-mandibular atrophy: a preliminary human study [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2016, 45(7): 864-71.
- [8] WANG J M, GU Y, PAN C J, et al. Isolation, culture and identification of human adipose-derived stem cells [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(3): 1039-43.
- [9] SVAREN J, MEIJER D. The molecular machinery of myelin gene transcription in Schwann cells [J]. *Glia*, 2008, 56(14): 1541-51.
- [10] MARCONI S, CASTIGLIONE G, TURANO E, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush [J]. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18(11/12): 1264-72.
- [11] GNECCHI M, ZHANG Z, NI A, et al. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy [J]. *Circ Res*, 2008, 103(11): 1204-19.
- [12] 李沙, 李树仁, 郝清卿. 过表达缺氧诱导因子1 α 心肌干细胞能提高心肌梗死后心功能及移植细胞的存活率[J]. 中国组织工程研究(LI S, LI S R, HAO Q Q. Effects of hypoxia inducible factor 1alpha gene modified cardiac stem cell transplantation on cardiac function and survival rate of transplanted cells in rats with myocardial infarction [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*), 2017, 21(1): 7.
- [13] HU C, LI L. Melatonin plays critical role in mesenchymal stem cell-based regenerative medicine *in vitro* and *in vivo* [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 13.
- [14] 钱楠楠, 张潜, 杨睿, 等. 间充质干细胞治疗脊髓损伤细胞治疗及联合新药和生物材料[J]. 中国组织工程研究(QIAN N N, ZHANG Q, YANG R, et al. Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injury: cell therapy and combination of new drugs and biomaterials [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*), 2020, 25(13): 2114-20.
- [15] 韩丽, 刘玉, 楚惠媛, 等. 微小RNA在肝癌的早期诊断、预后监测及治疗中的研究进展[J]. 临床检验杂志(HAN L, LIU Y, CHU H Y, et al. Research progress of microRNA in early diagnosis, prognosis monitoring and treatment of liver cancer [J]. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*), 2015, 33(6): 457-9.
- [16] MEI Y, BIAN C, LI J, et al. miR-21 modulates the ERK-MAPK signaling pathway by regulating SPRY2 expression during human mesenchymal stem cell differentiation [J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(6): 1374-84.
- [17] ZHAO Q, CHEN S, ZHU Z, et al. miR-21 promotes EGF-induced pancreatic cancer cell proliferation by targeting Spry2 [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(12): 1157.
- [18] SHI B, DENG W, LONG X, et al. miR-21 increases c-kit⁺ cardiac stem cell proliferation *in vitro* through PTEN/PI3K/AKT signaling [J]. *PeerJ*, 2017, 5: e2859.
- [19] LIU H Y, ZHANG Y Y, ZHU B L, et al. miR-21 regulates the proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells through PTEN/PI3K/AKT [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(10): 4149-55.
- [20] LV C, HAO Y, HAN Y, et al. Role and mechanism of microRNA-21 in H₂O₂-induced apoptosis in bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *J Clin Neurosci*, 2016, 27: 154-60.
- [21] 李文娣, 吴雷琪, 黄全忠. 白皮杉醇对过氧化氢诱导的血管平滑肌细胞凋亡的影响与机制[J]. 心肺血管病杂志(LI W D, WU L Q, HUANG Q Z. Effect and mechanism of paclitaxel on hydrogen peroxide-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells [J]. *Journal of Cardiovascular and Pulmonary Diseases*), 2020, 39(4): 457-63.
- [22] CHOI E O, JEONG J W, PARK C, et al. Baicalein protects C6 glial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis through regulation of the Nrf2 signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(3): 798-806.
- [23] LIU M H, LI G H, PENG L J, et al. PI3K/AKT/FoxO3a signaling

- mediates cardioprotection of FGF-2 against hydrogen peroxide-induced apoptosis in H9c2 cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 414(1/2): 57-66.
- [24] DENG W, WANG Y, LONG X, et al. miR-21 reduces hydrogen peroxide-induced apoptosis in c-kit⁺ cardiac stem cells *in vitro* through PTEN/PI3K/AKT signaling [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 5389181.
- [25] ZHANG L, GAO J, CUI S. miR-21 is involved in norepinephrine-mediated rat granulosa cell apoptosis by targeting SMAD7 [J]. *J Mol Endocrinol*, 2017, 58(4): 199-210.
- [26] CANFRAN-DUQUE A, ROTLLAN N, ZHANG X, et al. Macrophage deficiency of miR-21 promotes apoptosis, plaque necrosis, and vascular inflammation during atherogenesis [J]. *EMBO Mol Med*, 2017, 9(9): 1244-62.
- [27] YIN D, WANG Y, SAI W, et al. HBx-induced miR-21 suppresses cell apoptosis in hepatocellular carcinoma by targeting interleukin-12 [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(4): 2305-12.
- [28] CHEN J, CHEN J, CHENG Y, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes protect beta cells against hypoxia-induced apoptosis via miR-21 by alleviating ER stress and inhibiting p38 MAPK phosphorylation [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 97.
- [29] MAO X H, CHEN M, WANG Y, et al. MicroRNA-21 regulates the ERK/NF-kappaB signaling pathway to affect the proliferation, migration, and apoptosis of human melanoma A375 cells by targeting SPRY1, PDCD4, and PTEN [J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(3): 886-94.
- [30] DAMANIA P, SEN B, DAR S B, et al. Hepatitis B virus induces cell proliferation via HBx-induced microRNA-21 in hepatocellular carcinoma by targeting programmed cell death protein4 (PDCD4) and phosphatase and tensin homologue (PTEN) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91745.