

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.24.002  
文章编号: 1005-8982(2020)24-0006-07

## MicroRNA-212-3p 与靶基因转化生长因子- $\beta_2$ 基因 3'UTR 的关系研究\*

马文静<sup>1</sup>, 徐浩铨<sup>2</sup>, 白冰心<sup>2</sup>, 吴梦婷<sup>2</sup>, 张亚楼<sup>3</sup>

(1.新疆医科大学 中心实验室,新疆 乌鲁木齐 830011;2.新疆医科大学第五临床医学院,新疆 乌鲁木齐 830011;3.新疆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室,新疆 乌鲁木齐 830011)

**摘要:目的** 构建转化生长因子- $\beta_2$  ( $TGF-\beta_2$ ) 基因 3'UTR 双荧光素酶报告质粒,分析 microRNA-212-3p (miR-212-3p) 与其潜在靶基因  $TGF-\beta_2$  的靶向关系。**方法** 将  $TGF-\beta_2$  3'UTR 片段构建至双荧光素酶报告载体 pYr-MirTarget 上,随后将重组质粒与 miR-212-3p 核苷类、无核苷类及其抑制剂共同转染 Saos-2 细胞(人成骨肉瘤细胞),通过双荧光素酶报告系统检测荧光素酶活性,RT-PCR 检测 Hsa-miR-212 及  $TGF-\beta_2$  基因的 mRNA 相对表达量,Western blotting 检测  $TGF-\beta_2$  蛋白相对表达量。**结果** miR-212-3p-mimics+ $TGF-\beta_2$  3'UTR 共转染组荧光素酶活性较对照组低 ( $P < 0.05$ )。miR-212-3p-mimics+ $TGF-\beta_2$  3'UTR 共转染组 Hsa-miR-212 mRNA 相对表达量最高,miR-212-3p-inhibitor+ $TGF-\beta_2$  3'UTR 共转染组最低 ( $P < 0.05$ )。miR-212-3p-mimics+ $TGF-\beta_2$  3'UTR 共转染组  $TGF-\beta_2$  mRNA 相对表达量最低,miR-212-3p-inhibitor+ $TGF-\beta_2$  3'UTR 共转染组最高 ( $P < 0.05$ )。miR-212-3p-inhibitor+ $TGF-\beta_2$  3'UTR 共转染组  $TGF-\beta_2$  蛋白相对表达量最高,miR-212-3p-mimics+ $TGF-\beta_2$  3'UTR 共转染组最低 ( $P < 0.05$ )。**结论** 该实验成功构建了  $TGF-\beta_2$  基因 3'UTR 荧光素酶重组质粒,而且 miR-212-3p 可以与  $TGF-\beta_2$  基因的 3'UTR 结合,抑制荧光素酶活性,由此推断  $TGF-\beta_2$  是 miR-212-3p 的靶基因。

**关键词:** 微小 RNAs; 成骨细胞; 细胞凋亡; 转化生长因子

**中图分类号:** R68

**文献标识码:** A

## Relationship between miR-212-3p and the 3'UTR of its potential target gene $TGF-\beta_2$ \*

Wen-jing Ma<sup>1</sup>, Hao-quan Xu<sup>2</sup>, Bing-xin Bai<sup>2</sup>, Meng-ting Wu<sup>2</sup>, Ya-lou Zhang<sup>3</sup>

(1. Central Laboratory, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China; 2. The Fifth Clinical Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China;

3. Department of Histology and Embryology, Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

**Abstract: Objective** To construct the dual-luciferase reporter plasmids of the 3'-untranslated region (3'UTR) of transforming growth factor- $\beta_2$  ( $TGF-\beta_2$ ) gene, and to verify the correlation between miR-212-3p and its potential target gene  $TGF-\beta_2$ . **Methods** The 3'UTR of  $TGF-\beta_2$  was cloned into luciferase reporter vector pYr-MirTarget, and the recombinant plasmids were transfected with miR-212-3p mimics, NC mimics or inhibitor into Saos-2 cells (human osteosarcoma cells). The luciferase activity was detected by dual-luciferase reporter assay, and mRNA expression levels of Hsa-miR-212 and  $TGF-\beta_2$  and the protein expression level of  $TGF-\beta_2$  were detected via RT-

收稿日期: 2020-06-21

\* 基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (No: 2018D01C158)

[通信作者] 张亚楼, E-mail: 49669129@qq.com; Tel: 18299065986

PCR and Western blotting, respectively. **Results** The luciferase activity was decreased in Saos-2 cells into which TGF- $\beta_2$  recombinant plasmids and miR-212-3p mimics were transfected compared to that in the control group ( $P < 0.05$ ). The expression level of Hsa-miR-212 mRNA was the highest whereas the expression level of TGF- $\beta_2$  mRNA was the lowest in Saos-2 cells transfected with miR-212-3p mimics and TGF- $\beta_2$  recombinant plasmids among all the groups. However, the expression level of Hsa-miR-212 mRNA was lower and that of TGF- $\beta_2$  mRNA was higher in Saos-2 cells transfected with miR-212-3p inhibitor and TGF- $\beta_2$  recombinant plasmids than those in the other groups ( $P < 0.05$ ). Besides, TGF- $\beta_2$  protein level was the highest in Saos-2 cells transfected with miR-212-3p inhibitor and TGF- $\beta_2$  recombinant plasmids while the lowest in those with miR-212-3p mimics and TGF- $\beta_2$  recombinant plasmids ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The luciferase reporter plasmids of the 3'UTR of TGF- $\beta_2$  gene could be successfully constructed, and miR-212-3p can bind to the 3'UTR of TGF- $\beta_2$  gene to inhibit its luciferase activity, which suggests that TGF- $\beta_2$  is a target gene of miR-212-3p.

**Keywords:** microRNA; osteoblast; transforming growth factor; dual luciferase; TGF- $\beta_2$  3'UTR

MicroRNA (miRNA) 是一种小的非编码内源性 RNA 分子 (19 ~ 25 nt), 通过靶向 mRNA 来控制转录后基因的表达水平<sup>[1-2]</sup>。据推测 >60% 的人类基因编码蛋白质在非编码的 3'UTR 中具有 miRNA 结合位点区域, miRNA 通过与靶基因的 3'UTR 部分序列互补结合后, 抑制该基因的转录和蛋白翻译, 从而实现靶基因的调控<sup>[3]</sup>。

miRNA 在调节成骨细胞的增殖、分化及凋亡过程中发挥了重要作用。在成骨细胞凋亡的发生、发展的过程中, 涉及转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP)、Wnt 等多种转录途径, 且上述转录途径受 miRNA 严格调控。TGF- $\beta_2$  是 TGF- $\beta$  超家族的成员之一, 前期研究发现用氟化钠处理 Saos-2 细胞 48 h 后 miR-212-3p 的表达上调<sup>[4]</sup>, 并且通过生物信息学软件 Targetscan ([http://www.targetscan.org/mamm\\_31/](http://www.targetscan.org/mamm_31/)) 预测发现 TGF- $\beta_2$  基因是 miR-212-3p 的潜在靶基因, 且其 3'UTR 与 miR-212-3p 存在互补结合位点。但是目前尚未有 TGF- $\beta_2$  与 miR-212-3p 靶向关系的研究。因此本研究采用 PCR 扩增 TGF- $\beta_2$  3'UTR, 并将其克隆至荧光素酶报告载体 (pYr-MirTarget) 上, 构建 TGF- $\beta_2$  3'UTR 双荧光素酶报告重组载体, 通过转染 Saos-2 细胞, 采用双荧光素酶报告系统、qRT-PCR 以及 Western blotting 验证 miR-212-3p 与 TGF- $\beta_2$  的靶向关系, 为进一步研究成骨细胞凋亡过程中 miR-212-3p 调控作用的分子机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究材料

人成骨肉瘤细胞株 Saos-2 由中国科学院上海细

胞库提供, 人 TGF- $\beta_2$  克隆质粒由日本 TaKaRa 公司提供。

**1.1.1 主要试剂和仪器** 胎牛血清 (FBS)、细胞培养基 (DMEM) 和转染试剂 (Lipofectamine 2000) 均购自美国 Thermo Fisher 公司, miR-212-3p 核苷类 (mimics)、阴性对照无核苷类 (NC mimics) 和抑制剂 (inhibitor) 成品购自德国 Qiagen 公司, 双荧光素酶检测试剂盒和蛋白酶抑制剂 (PMSF) 购自上海碧云天生物技术有限公司, pYr-MirTarget 购自长沙赢润生物技术有限公司, 蛋白裂解液 (RIPA) 购自杭州弗德生物科技有限公司, TGF- $\beta_2$  (货号: 8406LF) 和 GAPDH (货号: 14C10) 单克隆抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 薄型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司, BCA 蛋白定量试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司, T4 DNA 连接酶 (Ligase)、Not I、Xho I、TaKaRa Taq™ 及 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒和 SYBR 荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。细胞培养箱和 Nanodrop-2000 核酸定量仪购自美国 Thermo Fisher 公司, 高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司, qRT-PCR 仪购自美国 Life Technologies 公司。

**1.1.2 引物设计与合成** U6 (内参) 和 hsa-miR-212 的逆转录引物参照 CHEN 等<sup>[5]</sup> 的方法设计茎环结构逆转录引物, U6、hsa-miR-212、GAPDH (内参) 和 TGF- $\beta_2$  各设计 1 对 qRT-PCR 引物 (见表 1), 引物的设计和合成由德国凯杰公司完成。

### 1.2 方法

**1.2.1 构建荧光素酶报告基因载体** 通过 Targetscan 软件获取 miR-212-3p 与 TGF- $\beta_2$  基因 3'UTR 潜在的互补结合位点 (3'UTR 全长 3 257 bp, 第 746 ~ 753 位

表 1 引物序列

基因	引物序列	长度 /bp
<i>U6-Stem-loop</i>	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAAAATATGGAAC-3'	-
<i>miR-212-Stem-loop</i>	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGGCCGTGA-3'	-
<i>U6</i>	正向: 5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3'	87
	反向: 5'-AAATATGGAACGCTTCACGA-3'	
<i>hsa-miR-212</i>	正向: 5'-TGCCTAACAGTCTCCAGTCA-3'	-
	反向: 5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'	
<i>GAPDH</i>	正向: 5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3'	115
	反向: 5'-TCAAAGCTGGAGGACTGGGT-3'	
<i>TGF-β<sub>2</sub></i>	正向: 5'-GAGTGCCTGAACAACGGATT-3'	207
	反向: 5'-AGCAGGGACAGTCTAAGCTT-3'	

碱基存在 miR-212-3p 的潜在结合位点), 设计成对 PCR 扩增引物 (靶点上下游各 100 bp 左右, 共 208 bp), 在正向和反向引物 5' 端分别引入 *Not* I 和 *Xho* I 限制性内切酶酶切位点, 构建含有 miR-212-3p 应答序列的 TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 片段。miR-212-3p 应答序列的 TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 片段的正向引物 (*Xho* I): 5'-GGCGCTCGAGTATATGACCGAGAAAGTCT-3', 反向引物 (*Not* I): 5'-AATGCGGCCGCTTCAACATTTCTACTGTTTT-3' (下划线为 *Xho* I 和 *Not* I 的酶切位点序列, 其前面的碱基为保护碱基)。

人 TGF-β<sub>2</sub> 克隆质粒经 PCR 扩增后, 将获得的 PCR 产物与 pYr-MirTarget 质粒经限制性内切酶 *Not* I 和 *Xho* I 切胶后回收, 将回收纯化的目的片段 TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 与回收纯化的载体 pYr-MirTarget 用 T4 连接酶连接过夜 (16℃), 连接产物转化 DH5α 感受态细胞, 涂布 LB/ 氨苄青霉素平板, 37℃ 温箱培养过夜, 挑取单个菌落 37℃ 过夜, 采用菌落 PCR 法将鉴定正确的菌液采用通用引物测序, 测序结果比对后将结果正确的菌液克隆于 -80℃ 超低温冰箱保存, 并大量制备 pYr-MirTarget-TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 质粒, 提取质粒并命名为 TGF-β<sub>2</sub>-Luc。

**1.2.2 miR-212-3p 与 TGF-β<sub>2</sub>-Luc 共转染 Saos-2 细胞** 37℃ 水浴复苏 Saos-2 细胞, 加入 DMEM 培养基 (含 10% FBS) 后置于 37℃、50% 二氧化碳培养箱内培养。用 DMEM 培养基 (含 10% FBS) 制备

Saos-2 单细胞悬液, 按照  $2 \times 10^5$  个 / 孔的密度将细胞均匀地接种到细胞培养板 (12 孔), 置于 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养, 待细胞密度达  $1.8 \times 10^5$  个 / 孔时, 使用无血清 DMEM 培养基培养 2 h 后进行转染。使用 Lipofectamine™ 2000 进行转染, 对于每个转染样品均需用 100 μl 无血清 opti-MEM 分别稀释 2 μg 质粒 DNA, 然后取 4 μl Lipofectamine™ 2000 稀释至 100 μl 无血清 opti-MEM 中, 将 Lipofectamine™ 2000 和上述稀释液 (总体积为 200 μl) 轻轻混匀并在室温下静置 20 min, 每个培养孔加混合液 200 μl, 前后轻轻摇动细胞培养板使混合液与培养液中培养液混匀, 最后将细胞放置于细胞培养箱中培养, 6 h 后吸出混合液换入正常培养基, 置于培养箱中继续培养 48 h 后收集细胞。按照以下分组转染细胞: miR-212-3p-mimics+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组、mimics NC+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组 (对照组)、miR-212-3p-inhibitor+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组、inhibitor NC+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组、TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 转染组、pYr-MirTarget 空载质粒转染组、正常细胞组, 每个转染组重复 3 次。

**1.2.3 双荧光素酶报告系统检测荧光素酶活性** 收集上述各转染组的 Saos-2 细胞, 弃去细胞培养液后加入 300 μl 细胞裂解液, 充分裂解细胞后 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液用于测定其双荧光素酶活性。按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书测定萤火

虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性, 各转染组检测相对荧光素酶活性 3 次, 取平均值。对 3 次测定的实验数据进行统计分析, 计算两者相对荧光强度的比值, 以比值作为相对荧光素酶活性的结果。

**1.2.4 qRT-PCR 检测 hsa-miR-212 和 TGF- $\beta_2$  mRNA** 当 Saos-2 细胞密度达到  $1.8 \times 10^5$  个/孔时, 分别转染 NC mimics、miR-212-3p mimics 及 inhibitor, 48 h 后收集细胞, 采用日本 TaKaRa 公司 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit (货号: NO9767) 提取总 RNA, Nanodrop-2000 紫外分光光度仪检测 RNA 的浓度和质量, 每组  $2.0 \mu\text{g}$  RNA 逆转录为 cDNA, U6 和 hsa-miR-212 的逆转录引物采用茎环引物, GAPDH 和 TGF- $\beta_2$  的引物采用 Oligo (dT), 逆转录条件:  $50^\circ\text{C}$  逆转录 mRNA 为 cDNA 15 min,  $85^\circ\text{C}$  灭活逆转录酶 5 min,  $-20^\circ\text{C}$  保存。分别以上述 cDNA (稀释 6 倍) 为模板, 4 个基因的 PCR 引物进行 qRT-PCR 反应, 反应条件:  $50^\circ\text{C}$  热启动 2 min,  $95^\circ\text{C}$  预变性 10 min,  $95^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $60^\circ\text{C}$  退火 30 s (采集荧光), 共 40 个循环。反应结束后根据扩增曲线分析扩增结果, 设定阈值后确定每一管反应的 CT 值, 各个细胞处理组 3 个复孔, 按照  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算目的基因和内参的 mRNA 相对表达量。

**1.2.5 Western blotting 检测 TGF- $\beta_2$  蛋白** 按照 1.2.4 的方法获取细胞后加入 RIPA 裂解 (含 PMSF, 比例为 1 : 100), 提取各转染组细胞蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定各组蛋白含量, 以  $20 \mu\text{g}$ /孔蛋白上样量进行 SDS-PAGE 电泳, 然后将胶转移至同等大小的 PVDF 上, 恒压稳流 (120 V、250 mA) 转膜 2 h, 室温封闭孵育 2 h, 加入一抗后  $4^\circ\text{C}$  过夜孵育, 以 GAPDH 为内参 (TGF- $\beta_2$  和 GAPDH 抗体稀释比例为 1 : 1000,  $1 \times \text{TBST}$  洗涤 4 次, 10 min/次), 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 2 h 后, 最后采用 ECL 化学发光法检测蛋白表达, 采集图像后使用 Image J 软件确定目的蛋白和内参蛋白的灰度值, 使用 TGF- $\beta_2$ /GAPDH 来确定 TGF- $\beta_2$  蛋白在各个转染组细胞中的表达情况。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用方差分析, 进一步的两两比较用 LSD- $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功构建荧光素酶报告基因载体

通过 Targetscan 软件预测 miR-212-3p 与 TGF- $\beta_2$  基因存在互补结合位点 (见图 1)。将 TGF- $\beta_2$  基因 3'UTR 基因片段 (208 bp) 克隆到 pYr-MirTarget 报告载体测序后显示成功构建荧光素酶报告基因载体。见图 2。

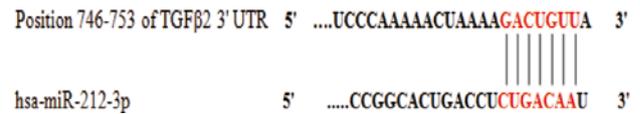


图 1 miR-212-3p 与 TGF- $\beta_2$  基因互补结合的靶位点预测

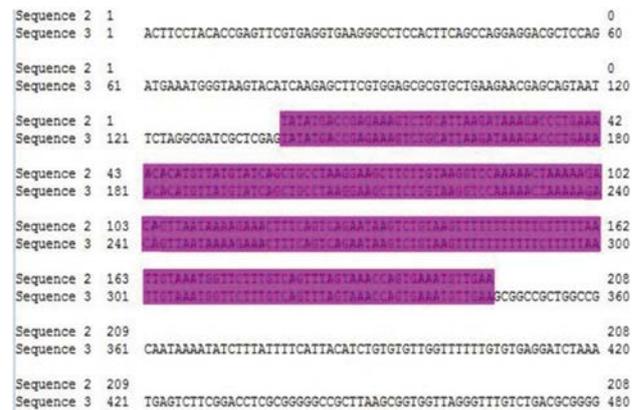


图 2 TGF- $\beta_2$  3'UTR 载体构建测序序列比对

### 2.2 miR-212-3p 靶向结合 TGF- $\beta_2$ 3'UTR 抑制荧光素酶活性

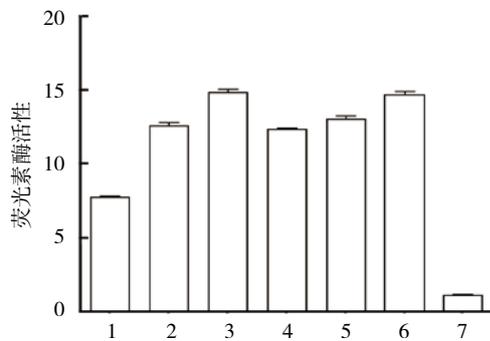
将 TGF- $\beta_2$ -Luc 重组质粒、miR-212-3p mimics、NC mimics 及 inhibitor 片段共转染 Saos-2 细胞, 每个转染组设置 3 组平行实验组, 使用双荧光素酶报告试剂盒检测和分析其荧光素酶活性。双荧光素酶活性检测结果表明, 各组荧光素酶活性比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。进一步两两比较显示, miR-212-3p-mimics+TGF- $\beta_2$  3'UTR 共转染组低于对照组 ( $P < 0.05$ ); inhibitor NC+TGF- $\beta_2$  3'UTR 共转染组和 TGF- $\beta_2$  3'UTR 转染组与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); pYr-MirTarget 空载质粒转染组高于对照组 ( $P < 0.05$ )。见表 2 和图 3。

### 2.3 miR-212-3p 靶向抑制 TGF- $\beta_2$ 基因的表达

qRT-PCR 结果显示, 以 U6 为内参, 各组 hsa-miR-212 mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义

表 2 各组 Saos-2 细胞荧光素酶活性的比较 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	荧光素酶活性
miR-212-3p-mimics+TGF-β <sub>2</sub> 3'UTR 共转染组	7.7524 ± 0.2024
对照组	12.5994 ± 0.3728
miR-212-3p-inhibitor+TGF-β <sub>2</sub> 3'UTR 共转染组	14.8676 ± 0.3569
inhibitor NC+TGF-β <sub>2</sub> 3'UTR 共转染组	12.3573 ± 0.1305
TGF-β <sub>2</sub> 3'UTR 转染组	13.0892 ± 0.2979
pYr-MirTarget 空载质粒转染组	14.7066 ± 0.3697
正常细胞组	1.1264 ± 0.1238
F 值	901.005
P 值	0.000



1: miR-212-3p-mimics+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组; 2: 对照组; 3: miR-212-3p-inhibitor+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组; 4: inhibitor NC+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组; 5: TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 转染组; 6: pYr-MirTarget 空载质粒转染组; 7: 正常细胞组。

图 3 各组 Saos-2 细胞荧光素酶活性比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

( $P < 0.05$ )。miR-212-3p-mimics+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组最高 ( $P < 0.05$ )，miR-212-3p-inhibitor+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组最低 ( $P < 0.05$ )；对照组和 inhibitor NC+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组与正常细胞组比较，差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。以 GAPDH 为内参，各组 TGF-β<sub>2</sub> mRNA 相对表达量比较，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，miR-212-3p-mimics+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组最低 ( $P < 0.05$ )，miR-212-3p-inhibitor+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组最高 ( $P < 0.05$ )。对照组和 inhibitor NC+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组与正常细胞组比较，差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 3 和图 4。

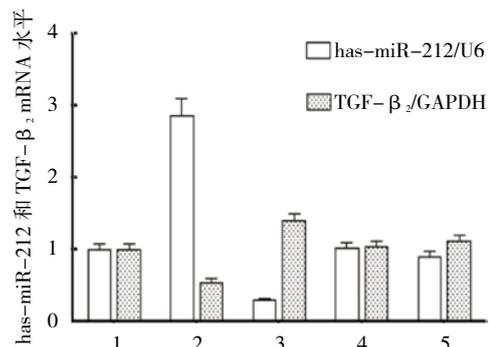
#### 2.4 miR-212-3p 靶向抑制 TGF-β<sub>2</sub> 蛋白的表达

各组 TGF-β<sub>2</sub> 蛋白相对表达量比较，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。miR-212-3p-inhibitor+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组最高 ( $P < 0.05$ )，miR-212-3p-mimics+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组最低 ( $P < 0.05$ )。对照组和

inhibitor NC+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组与正常细胞组比较，差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 4 和图 5。

表 3 各组 has-miR-212 和 TGF-β<sub>2</sub> mRNA 相对表达量比较 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	has-miR-212 mRNA	TGF β <sub>2</sub> mRNA
正常细胞组	1.007 ± 0.148	1.006 ± 0.142
miR-212-3p-mimics+TGF-β <sub>2</sub> 3'UTR 共转染组	2.727 ± 0.245	0.550 ± 0.077
miR-212-3p-inhibitor+TGF-β <sub>2</sub> 3'UTR 共转染组	0.283 ± 0.025	1.398 ± 0.197
对照组	1.022 ± 0.150	1.042 ± 0.147
inhibitor NC+TGF β <sub>2</sub> 3'UTR 共转染组	0.906 ± 0.133	1.115 ± 0.158
F 值	101.587	12.533
P 值	0.000	0.001

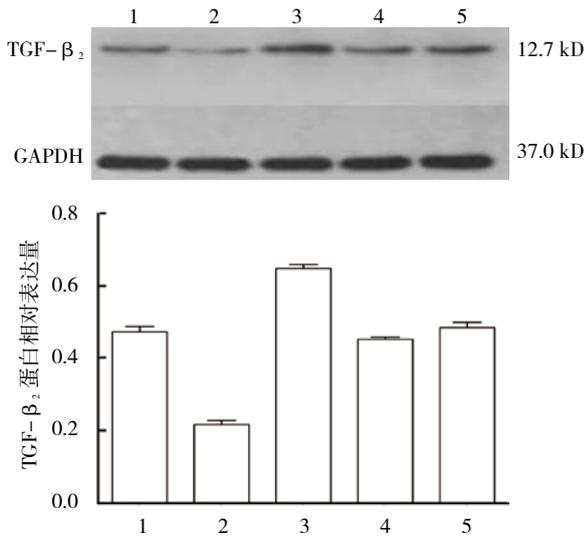


1: 正常细胞组; 2: miR-212-3p-mimics+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组; 3: miR-212-3p-inhibitor+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组; 4: 对照组; 5: inhibitor NC+TGF-β<sub>2</sub> 3'UTR 共转染组。

图 4 各组 has-miR-212 和 TGF-β<sub>2</sub> mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

表 4 各组 TGF β<sub>2</sub> 蛋白相对表达量比较 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	TGF-β <sub>2</sub> 蛋白
正常细胞组	0.475 ± 0.026
miR-212-3p-mimics+TGF-β <sub>2</sub> 3'UTR 共转染组	0.217 ± 0.019
miR-212-3p-inhibitor+TGF-β <sub>2</sub> 3'UTR 共转染组	0.648 ± 0.023
对照组	0.453 ± 0.013
inhibitor NC+TGF-β <sub>2</sub> 3'UTR 共转染组	0.487 ± 0.026
F 值	147.763
P 值	0.000



1: 正常细胞组; 2: miR-212-3p-mimics+TGF- $\beta_2$  3'UTR 共转染组; 3: miR-212-3p-inhibitor+TGF- $\beta_2$  3'UTR 共转染组; 4: 对照组; 5: inhibitor NC+TGF- $\beta_2$  3'UTR 共转染组。

图 5 各组 TGF- $\beta_2$  蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 3 讨论

miRNA 是小的内源性 RNA 分子, 单个 miRNA 可作用于  $\geq 1$  个靶 mRNA, 这依赖于 miRNA 与靶 mRNA 碱基互补配对方式。大多数靶向的 mRNA 通过其 3'UTR 与 miRNA 相互作用, 根据互补程度, miRNA 可以通过切割磷酸二酯键直接破坏 mRNA 或部分互补从而抑制其表达。在哺乳动物中, miRNA 和靶向 mRNA 的 3'UTR 不能完全互补, 通过翻译抑制靶向 mRNA 的表达来发挥作用<sup>[6]</sup>。miRNA 对 mRNA 翻译的抑制作用已经成为人成骨细胞的发育过程, 参与成骨信号通路、成骨细胞生长、分化以及凋亡的重要调控因子。

近年来, 氟中毒对骨骼危害的研究越来越多, 小剂量的氟可以起到预防作用并刺激骨细胞的增殖, 大剂量则可诱导细胞凋亡, 引起骨质疏松或骨质硬化从而导致氟骨症。氟骨症主要的病理变化是成骨细胞发生凋亡, 破坏破骨细胞与成骨细胞转换过程的平衡, 但其具体的分子机制尚不明确。本课题组前期利用与成骨细胞凋亡相关的 miRNA PCR 芯片技术发现氟化钠处理人成骨细胞 48 h 后 miR-212-3p 表达上调<sup>[4]</sup>。最初的研究发现 miR-212-3p 参与神经元的形成、调节昼夜节律、控制药物成瘾和免疫调节<sup>[7]</sup>, 除了上述功能外, 其在癌症的发生、发展中也发挥着重要作用, 其抑制作用与细胞周期阻滞、上皮-间质转化过程和细胞凋亡相关<sup>[8-11]</sup>。例如其通过抑制结缔组织生长因子和转录因子叉头框蛋白 A1 (FOXA1) 在人肝

癌细胞中表达, 从而抑制肝癌细胞的增殖和侵袭<sup>[12-13]</sup>, 靶向结合甲基化 CpG 结合蛋白-2 并下调其表达, 阻止早期神经发生<sup>[14]</sup> 和参与感染诱导的早产<sup>[15]</sup>, 直接靶向有丝分裂原活化蛋白激酶 3 来抑制卵巢癌进一步发展<sup>[16]</sup>, 在膀胱癌中靶向结合核因子 IA 抑制癌细胞增殖并促进细胞凋亡<sup>[9]</sup>。此外, 在骨肉瘤患者中已发现包括 miR-212 在内的特定 miRNA 的失调, LIU 等<sup>[17]</sup> 研究发现 miR-212 可以直接结合 FOXA1 mRNA 3'UTR 序列, 并且在 MG-63 和 Saos-2 骨肉瘤细胞中负调控 FOXA1 蛋白的表达。裴祎等<sup>[18]</sup> 研究证实 miR-212 可以直接作用于锌指蛋白 133, 通过抑制其表达从而抑制骨肉瘤细胞的增殖和迁移。

人们对成骨细胞凋亡过程中 miR-212-3p 的调控机制及其靶基因了解甚少。故本研究前期通过生物信息学软件预测 miR-212-3p 的靶基因时发现 TGF- $\beta_2$  基因的 3'UTR 与其存在潜在的互补结合位点, 并且通过实验证实 miR-212-3p 直接靶向 TGF- $\beta_2$  并抑制其表达。TGF- $\beta_2$  是 TGF- $\beta$  超家族成员之一, TGF- $\beta$  超家族成员除包含 TGF- $\beta$ s (哺乳动物中 TGF- $\beta_1$ 、TGF- $\beta_2$  和 TGF- $\beta_3$ ) 以外, 还包括激活素、BMP 以及生长和分化因子等 40 个成员<sup>[19-21]</sup>。TGF- $\beta$  是由多种细胞产生的, 骨是 TGF- $\beta$  主要的组织来源, 被认为是用于调节成骨细胞和破骨细胞经典的耦合因子之一。可用于成骨细胞, 调节其增殖和分化, 一方面是因为成骨细胞自身可以合成分泌 TGF- $\beta$ , 另一方面是因为成骨细胞细胞膜上有各个亚型的特异性受体。TGF- $\beta$  家族蛋白首先和细胞膜表面特异性的 I 型和 II 型丝氨酸/苏氨酸激酶受体结合形成异源复合物, II 型受体激活后, 使得 I 型受体磷酸化, 活化的 I 型受体通过磷酸化的 Smad 蛋白和 R-Smads 启动细胞内信号传导, 随后活化的 R-Smads 与 co-Smad 和 Smad4 形成复合物, 将信号从膜外传递到细胞核内开启转录应答。TGF- $\beta_2$  通过与骨髓间充质干细胞膜上的 TGF- $\beta_2$ R I 和 TGF- $\beta_2$ R II 结合形成复合物, 激活后的 TGF- $\beta$  R I 通过 Smad 蛋白促进成骨细胞的形成<sup>[22]</sup>。成骨细胞分化早期阶段的体外研究表明, TGF- $\beta$  主要通过促进成骨细胞祖细胞的迁移并刺激其增殖来增加骨形成<sup>[23]</sup>, 在以后的阶段, TGF- $\beta$  以 Smad3 依赖的方式阻断成骨细胞的分化和骨矿化<sup>[24-25]</sup>。TGF- $\beta$  阻断成骨细胞的凋亡, 从而在分化过程中维持成骨细胞的存活, 由此可以推断 TGF- $\beta_2$  参与并调控成骨细胞的凋亡。

综上所述, 本研究通过双荧光素酶报告实验验证

实  $TGF-\beta_2$  是 miR-212-3p 的靶基因, miR-212-3p 可以与  $TGF-\beta_2$  3'UTR 靶向结合发挥负调控作用。此外 Western blotting 和 qRT-PCR 检测结果表明, Saos-2 细胞外源添加 miR-212-3p 后,  $TGF-\beta_2$  的 mRNA 和蛋白相对表达量都明显下降, 这些结果提示 miR-212-3p 负向调控靶基因  $TGF-\beta_2$ , 这一结果为后续研究氟骨症中 miR-212-3p 的作用提供了参考。目前, 发现成骨细胞凋亡过程中 miRNA 的数量逐渐增多, 但仍需发现更多的 miRNA 调控其靶基因中的分子机制, 为成骨细胞的凋亡及过量氟中毒患者的临床治疗提供更多的方法和参考。

#### 参 考 文 献:

- [1] LU T X, ROTHENBERG M E. MicroRNA[J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 141(4): 1202-1207.
- [2] LIU J, DANG L, WU X H, et al. MicroRNA-mediated regulation of bone remodeling: a brief review[J]. JBMR Plus, 2019, 3(9): 1-9.
- [3] VIMALRAJ S, SELVAMURUGAN N. MicroRNAs: synthesis, gene regulation and osteoblast differentiation[J]. Curr Issues Mol Biol, 2013, 15(1): 7-18.
- [4] 邓强, 张亚楼, 周杨俊杰, 等. 氟化钠诱导人成骨细胞凋亡相关 microRNA 差异表达及分析 [J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(8): 1149-1154.
- [5] CHEN C, RIDZON D A, BROOMER A J, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(20): 2-9.
- [6] 沈君颜, 王浩, 刘海亮. microRNA 调控间充质干细胞成骨分化的研究进展 [J]. 同济大学学报 (医学版), 2020, 41(1): 123-135.
- [7] IM H I, HOLLANDER J A, BALII P, et al. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212[J]. Nat Neurosci, 2010, 13(9): 1120-1127.
- [8] CHEN W J, SONG J, BIAN H J, et al. The functions and targets of miR-212 as a potential biomarker of cancer diagnosis and therapy[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(4): 2392-2401.
- [9] WU X M, CHEN H, ZHANG G Y, et al. MiR-212-3p inhibits cell proliferation and promotes apoptosis by targeting nuclear factor IA in bladder cancer[J]. J Biosci, 2019, 44(4): 2-8.
- [10] ZENG J P, FANG M, WANG L X, et al. MicroRNA-212 inhibits proliferation of gastric cancer by directly repressing retinoblastoma binding protein 2[J]. J Cell Biochem, 2013, 114(12): 2666-2272.
- [11] MENG X P, WU J X, PAN C H, et al. Genetic and epigenetic down-regulation of microRNA-212 promotes colorectal tumor metastasis via dysregulation of MnSOD[J]. Gastroenterology, 2013, 145(2): 426-436.
- [12] CHEN J Q, Ou Y L, HUANG Z P, et al. MicroRNA-212-3p inhibits the proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells by suppressing CTGF Expression[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 9820-9830.
- [13] YUAN Z, YE M, QIE J B, et al. FOXA1 promotes cell proliferation and suppresses apoptosis in hcc by directly regulating miR-212-3p/FOXA1/AGR2 signaling pathway[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 5231-5240.
- [14] ZHAO K H, LIU B Y, TENG J F, et al. MicroRNA-212-3p regulates early neurogenesis through the AKT/mTOR pathway by targeting MeCP2[J]. Neurochemistry International, 2020, 137: 1-9.
- [15] TANG Y, JI H J, LIU H Y, et al. Pro-inflammatory cytokine-induced microRNA-212-3p expression promotes myocyte contraction via methyl-CpG-binding protein 2: a novel mechanism for infection-related preterm parturition[J]. Molecular Human Reproduction, 2019, 25(5): 274-282.
- [16] ZHANG L, ZHANG Y, WANG S S, et al. miR-212-3p suppresses high-grade serous ovarian cancer progression by directly targeting MAP3K3[J]. American Journal of Translational Research, 2020, 12(3): 875-888.
- [17] LIU J, CHEN B H, YUE B, et al. MicroRNA-212 suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells by targeting forkhead box protein A1[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(6): 4135-4141.
- [18] 裴祎, 张晓晶, 郑珂, 等. miR-212 抑制骨肉瘤细胞恶性生物学行为的实验研究 [J]. 中国医科大学学报, 2018, 47(10): 66-70.
- [19] THIELEN N G M, van der KRAAN P M, van CAAM A P M. TGF $\beta$ /BMP signaling pathway in cartilage homeostasis[J]. Cells, 2019, 8(9): 1-30.
- [20] DRYNDA S, DRYNDA A, FEUERSTEIN B, et al. The effects of cobalt and chromium ions on transforming growth factor-beta patterns and mineralization in human osteoblast-like MG63 and SaOs-2 cells[J]. J Biomed Mater Res A, 2018, 106(8): 2105-2115.
- [21] NICKEL J, MUELLER T D. Specification of BMP signaling[J]. Cells, 2019, 8(12): 1-30.
- [22] CHEN G, DENG C, LI Y P. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation[J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(2): 272-288.
- [23] JANSSENS K, TEN DIJEK P, JANSSENS S, et al. Transforming growth factor-beta1 to the bone[J]. Endocr Rev, 2005, 26(6): 743-774.
- [24] ALLISTON T, CHOY L, DUCY P, et al. TGF- $\beta$ -induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation[J]. EMBO J, 2001, 20(9): 2254-2272.
- [25] MAEDA S, HAYASHI M, KOMIYA S, et al. Endogenous TGF- $\beta$  signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells[J]. Embo Journal, 2014, 23(3): 552-563.

(李科 编辑)

本文引用格式: 马文静, 徐浩铨, 白冰心, 等. MicroRNA-212-3p 与靶基因转化生长因子- $\beta_2$  基因 3'UTR 的关系研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(24): 6-12.