244	临床与病理杂志 J Clin Pathol Res 2019	9,39(2)	http://lcbl.amegroups.com

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.02.003

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.02.003

MiR-125a靶向GDF11调控缺氧复氧肝细胞损伤修复的机制

张志标1,余伟2,马达2,刘礼军2

(汉川市人民医院 1. 急诊科; 2. 普外科二科, 武汉 431600)

[摘 要] 目的:探究miR-125a靶向生长分化因子11(growth differentiation factor 11,GDF11)调控缺氧复氧 肝细胞损伤修复的机制。方法:建立肝细胞L02的缺氧复氧模型;RT-qPCR和Western印迹检测 miR-125a和GDF11在缺氧复氧肝细胞中的表达;双荧光素报告基因实验验证miR-125a与GDF11的 靶向关系;MTT法和流式细胞技术检测上调miR-125a和敲低GDF11表达对缺氧复氧肝细胞的影 响;Western印迹检测细胞凋亡因子Bax,Bcl-2,caspase-3在缺氧复氧肝细胞中的表达。结果:在缺 氧复氧肝细胞中,miR-125a表达下调,GDF11表达则显著上调;上调miR-125a和敲低GDF11表达 可增强缺氧复氧肝细胞的活力,抑制凋亡;GDF11是miR-125a的靶基因,且miR-125a通过负性调 控GDF11的表达影响缺氧复氧肝细胞的凋亡,GDF11可逆转miR-125a对缺氧复氧肝细胞凋亡相关 分子表达的影响。结论:miR-125a靶向GDF11参与缺氧复氧肝细胞的损伤修复过程。

[关键词] miR-125a; 生长分化因子11; 缺氧复氧; 凋亡; 肝细胞

Mechanism of miR-125a regulates the injury and repair of hypoxia-reoxygenation hepatocytes by targeting GDF11

ZHANG Zhibiao¹, YU Wei², MA Da², LIU Lijun²

(1. Department of Emergency; 2. Second Department of General Surgery, Hanchuan People's Hospital, Wuhan 431600, China)

AbstractObjective: To explore the mechanism of miR-125a regulates the injury and repair of hypoxia-reoxygenation
hepatocytes by targeting growth differentiation factor 11 (GDF11). Methods: The hypoxia-reoxygenation model
of hepatocyte L02 was established; the expression of miR-125a and GDF11 in hypoxia-reoxygenation hepatocytes
was detected by RT-qPCR and Western blot; the targeting relationship between miR-125a and GDF11 was
measured by double fluorescein reporter gene assay; the effects of upregulation of miR-125a and knockdown of
GDF11 on hypoxia-reoxygenation hepatocytes were estimated by MTT and flow cytometry; Western blot was
performed to the expression of apoptosis factors Bax, Bcl-2 and caspase-3 in anoxia reoxygenation hepatocytes.
Results: In hypoxic-reoxygenated hepatocytes, the expression of miR-125a was downregulated, while the
expression of GDF11 was upregulated significantly; upregulation of miR-125a or knockdown of GDF11 enhanced
the viability and inhibited apoptosis of hypoxic-reoxygenated hepatocytes; GDF11 was the target gene of miR-
125a, and miR-125a negatively regulated the expression of GDF11 in hypoxic-reoxygenated hepatocytes. GDF11

收稿日期 (Date of reception): 2018-11-01

通信作者 (Corresponding author): 余伟, Email: 78610726@qq.com

reversed the effect of miR-125a on expression of apoptosis related molecules in anoxia reoxygenation hepatocytes. **Conclusion:** MiR-125a participates in the injury and repair of anoxia reoxygenation hepatocytes by targeting GDF11.

Keywords miR-125a; growth differentiation factor 11; hypoxia-reoxygenation; apoptosis; hepatocyte

在临床上, 肝损伤、肝移植与重要脏器大手 术等常引起肝缺血/再灌注损伤,发生原因与细胞 的凋亡密切相关。防止肝缺血/再灌注损伤和保 护肝功能对于临床患者的恢复具有重要意义。已 经有研究^[1]表明miR-125a在肝癌细胞的增殖、转 移、凋亡和细胞周期等生物学过程中扮演抑癌基 因的作用。近期有学者^[2]发现miR-125a在缺氧肝癌 细胞中表达下调,并调控肝癌细胞的能量代谢, 但关于miR-125a对缺氧复氧所致细胞凋亡的影响 研究较少。生长分化因子11(growth differentiation factor 11, GDF11)又称为骨形成蛋白11(bone morphogenetic proteins-11, BMP11), 是TGF-β超 家族的小分子蛋白。GDF11在缺血/再灌注损伤的 肝细胞中高表达,加重对肝的损伤^[3],促进肺动脉 内皮细胞的异常增殖和血管生成^[4]。本研究通过 TargetScan对miR-125a和GDF11的结合区域进行预 测,发现miR-125a与GDF11结合的可能性很高。 因此,本研究拟通过肝细胞缺氧/复氧损伤模型来 研究miR-125a与GDF11之间的作用对肝细胞缺氧/ 复氧(hypoxia-reoxygenation, H-R)后肝细胞活力和细 胞凋亡的影响及其分子机制,以期为预防肝缺血/ 再灌注损伤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人正常肝细胞L02(美国ATCC公司)。DMEM 培养基、胎牛血清、青霉素和链霉素(美国赛默飞 公司),MTT试剂和胰蛋白酶(美国Sigma公司), mRNA提取试剂盒和RT-qPCR(大连宝生物工程 有限公司);miRNeasyMini试剂盒、TotolRNA 提取试剂盒和miRNA Real-time PCR试剂盒(德 国QIAGEN公司);miR-125amimics,miR-125a inhibitor,miR-con,GDF11干扰RNA(si-GDF11)、 对照干扰RNA(si-NC),pCDA3.1-con和pCDA3.1-GDF11(苏州金唯智生物技术有限公司);GDF11, β -actin,caspase-3,Bcl-2和Bax的一抗(美国Cell Signaling Technology公司);BCA试剂盒、ECL化 学发光试剂盒、辣根过氧化酶标记的二抗(广州碧 云天有限公司)、LipofectamineTM 2000(美国赛默 飞公司); 双荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国 Promega公司); Annexin V/PI细胞凋亡试剂盒购于 (美国BD Biosciences公司)。实验中所需引物由苏 州金唯智生物技术有限公司根据设计合成。

1.2 方法

1.2.1 实验分组、低氧(H)及H-R模型建立

人正常肝细胞L02随机分为常氧组(H0H-R0h)、低氧组(H组)、低氧/复氧组(H-R组)。根据 低氧以及复氧不同时间又分为H12, H12H-R6h, H12H-R2h亚组。H组模型:人正常肝细胞L02以及 人肝癌细胞株Huh7和HepG2常规培养于含10%胎 牛血清、1.5×10⁵ U/L青霉素及100 mg/L链霉素的 DMEM培养基中,置于37 ℃,5%CO₂、相对湿度 为95%的恒温培养箱中培养。待细胞增殖达对数生 长期时均匀接种至培养皿,培养24h后,更换新鲜 培养液,将细胞置于三气培养箱,迅速通入N2和 CO₂,待O₂降至1%时开始计时,在低氧12h收集细 胞进行后续检测。H-R组模型: L02细胞培养方法 同上,将H-R组细胞在低氧培养12h后进行复氧, 分别在复氧6h和12h收集细胞进行后续检测。 Normoxia组: L02细胞培养方法同上,正常氧浓度 (21%O₃)培养24h后收集细胞进行检测。

1.2.2 细胞转染

将H12H-R2h亚组细胞随机分为以下7组: miR-125a组(转染miR-125a mimics)、miR-con组 (转染miR-con)、anti-miR-125a组(转染miR-125a inhibitor)、si-con组(转染si-con)、si-GDF11组(转 染si-GDF11)、Ctrl组(miR-con和pcDNA-con共 转染)、miR-125a+GDF11组(miR-con和pcDNA-GDF11共转染),同时设置相应的对照组(Normoxia 组、con组)。按照LipofectamineTM 2000转染试剂说 明书转染至细胞,48h后收集细胞做后续检测。 1.2.3 RT-qPCR检测GDF11和miR-125a mRNA水平

细胞总RNA和miRNAs分别以TRIzol试剂盒和 miRNeasy Mini试剂盒提取,操作按照说明进行。 参照对应的反转录试剂盒说明书步骤合成cDNA, qPCR试剂盒操作步骤分别检测细胞中GDF11和 miR-125a的表达。以U6和β-actin为内参照,计算 GDF11和miR-125a的相对表达水平。β-actin上游引 物为5'-GGACCTGACTGACTACCTC-3',下游引物 为5'-TACTCCTGCTTGCTGAT-3';GDF11上游引 物为5'-TGCGCCTAGAGAGCATCAAGT-3',下游引 物为5'-CCCAGTTAGGGGTTTC-AGTCGGT-3'。 1.2.4 Western印迹

利用含有蛋白酶抑制剂RIPA缓冲液裂解细 胞提取蛋白,BCA试剂盒检测细胞中的总蛋白浓 度。取20μg变性蛋白上样至10%SDS-PAGE凝胶孔 中进行电泳。采用湿转法将蛋白凝胶转至PVDF 膜后,置于含有5%去脂奶粉的封闭液中4℃下 孵育过夜。以PBST洗膜后,再在4℃下将PVDF 膜转入1:2000倍稀释的一抗(β-actin,GDF11, caspase-3,Bcl-2和Bax)中反应过夜,经TBST洗膜 后,加入1:10000稀释的二抗于37℃下孵育1h后 进行曝光显影,利用凝胶成像仪器对各显色条带 的灰度进行测量,以β-actin为内参计算各个目的蛋 白的相对表达水平。

1.2.5 双荧光素酶报告基因检测miR-125a与GDF11 基因的靶向关系

通过TargetScan预测miR-125a与GDF11的结 合位点,参照转染试剂说明书将构建好的野生型 GDF11-3'-UTR-WT和突变型GDF11-3'-UTR-MUT 的荧光素酶报告质粒及miR-NC,miR-125amimics 转染至缺氧复氧L02细胞中,6h后,换新鲜培养液 并继续培养至24h,按照双荧光素酶报告基因检测 试剂盒操作步骤检测各组细胞荧光素酶活性,实 验重复3次。

1.2.6 MTT法检测细胞增殖

将上述转染细胞或药物处理组细胞分别在 24,48,72及96 h后每孔加入20 μL MTT溶液继续 孵育4 h后,吸弃孔内培养上清液,然后于每孔加 入150 μL DMSO,利用酶联免疫标记分析仪测量每 孔570 nm波长的吸光度来计算细胞活力。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡

收集各组转染48 h后的L02细胞,用PBS洗涤 3次,然后加入70%冷乙醇固定后收集细胞,将收 集的细胞利用PBS洗涤去除固定液,然后加入RNA 酶,反应过夜,再利用Annexin V/PI对细胞进行双 染色,流式细胞仪对细胞凋亡率进行分析。

1.3 统计学处理

应用SPSS 20.0软件进行数据分析,各组数据 均以均数±标准差(x±s)表示,两组间的比较采用独 立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析, P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-125a与GDF11在缺氧复氧(H12H-R6h)L02细胞中的表达

与NC组相比,H和H-R处理组细胞中miR-125a的表达水平显著下调,差异有统计学意义 (P<0.05);GDF11的mRNA和蛋白表达水平则显著 上调,差异有统计学意义(P<0.05;图1,表1)。



图1 GDF11在H和H-R处理的L02细胞中的蛋白表达 Figure 1 Protein expression of GDF11 in H and H-R treated L02 cells

表1 miR-125a与GDF11在H和H-R处理的L02细胞中	コ的表达
----------------------------------	------

Table 1 Expression of mik-125a and GDF11 in L02 cens treated with H and H-K					
组别	miR-125a	GDF11mRNA	GDF11蛋白		
NC组	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.11	0.98 ± 0.10		
H组	$0.21 \pm 0.06^*$	$3.40 \pm 0.23^*$	$3.05 \pm 0.28^{*}$		
H-R组	$0.67 \pm 0.08^{*^{\#}}$	$2.54 \pm 0.17^{*^{\#}}$	$1.84 \pm 0.14^{*^{\#}}$		
F	70.85	257.90	194.50		
Р	<0.001	<0.001	<0.001		

与常氧培养的肝细胞L02组(NC)相比, *P<0.05; 与缺氧处理的肝细胞L02组(H)相比, *P<0.05。

Compared with normal oxygen cultured hepatocytes L02 group (NC), *P<0.05; compared with hypoxia treated hepatocytes L02 group (H), *P<0.05.

2.2 上调miR-125a减少缺氧复氧(H12H-R2h)处理 组细胞的损伤

RT-qPCR检测显示:与miR-con组相比,miR-125a组细胞中miR-125a的表达均显著上调,差异有 统计学意义(P<0.05,表2);MTT和流式细胞术检 测结果显示:与miR-con组相比,miR-125a组细胞 活力显著增强(P<0.05),细胞凋亡率显著降低,差 异有统计学意义(P<0.05;表3,图2)。

表2 miR-125a转染L02细胞后miR-125a的表达

Table 2 Expression of miR-125a in L02 cells transfected with miR-125a

组别	miR-125a
NC组	1.02 ± 0.09
miR-con组	0.95 ± 0.12
miR-125a组	$2.31 \pm 0.18^{*^{\#}}$
F	96.04
Р	<0.001

与NC组相比, *P<0.05; 与miR-con组相比, *P<0.05。 Compared with NC group, *P<0.05; compared with miR-con group, *P<0.05.

2.3 miR-125a靶向调控GDF11

通过TargetScan预测发现miR-125a与GDF11 3'-UTR存在结合位点(图3);双荧光素酶报告基 因实验结果显示:miR-125a能显著降低GDF11-3'-UTR-WT的荧光素酶活性(P<0.05),而不影响 GDF11-3'UTR-MUT的荧光素酶活性(P>0.05, 表4);同时,Western印迹检测结果发现:miR-125a组细胞GDF11蛋白表达量显著降低,而antimiR-125a组细胞GDF11蛋白表达显著上调,差异 有统计学意义(P<0.05,表5),表明miR-125a可负 调控GDF11蛋白表达。

2.4 敲低GDF11降低L02细胞缺氧复氧后的损伤

RT-qPCR和Western印迹检测结果显示:转染 si-GDF11至缺氧复氧处理的L02细胞后发现,与 si-con组相比,si-GDF11组细胞中GDF11mRNA 和蛋白表达水平显著下调,差异有统计学意义 (P<0.05;表6,图4)。MTT法和流式细胞术检测 结果显示:与si-con组相比,细胞凋亡率显著降低 (P<0.05,表6),细胞活力增加,差异有统计学意 义(P<0.05,表7)。

表3 上调miR-125a减少缺氧复氧(H12H-R2h)处理组细胞的损伤	
---------------------------------------	--

Table 3 Upregulated of miR-125a reduced cell injury in anoxia reoxygenation (H12H-R2h) treatment cells

4미 단네	烟光变 (a)	细胞活性/%				
组加	- 何上平/% -	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Normoxia组	5.17 ± 0.81	0.19 ± 0.02	0.36 ± 0.03	0.80 ± 0.03	1.21 ± 0.06	2.13 ± 0.17
NC组	$20.27 \pm 1.14^*$	0.18 ± 0.01	$0.22 \pm 0.03^{*}$	$0.28 \pm 0.04^{*}$	$0.58 \pm 0.08^{*}$	$0.95 \pm 0.14^{*}$
miR-con组	$19.93 \pm 1.33^*$	0.18 ± 0.02	$0.23 \pm 0.03^{*}$	$0.32 \pm 0.02^{*}$	$0.63 \pm 0.06^{*}$	$1.03 \pm 0.11^{*}$
miR-125a组	$9.87 \pm 1.45^{*^{\#\&}}$	0.17 ± 0.02	$0.31 \pm 0.03^{*^{\#\&}}$	$0.56 \pm 0.04^{*^{\# \&}}$	$0.85 \pm 0.09^{*^{\#\&}}$	$1.54 \pm 0.21^{*^{\#\&}}$
F	119.40	0.37	14.31	149.60	44.04	32.43
Р	<0.001	0.78	0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与Normoxia组比较, *P<0.05; 与NC组比较, *P<0.05; 与miR-con组比较, *P<0.05。

Compared with Normoxia group, *P<0.05; compared with NC group, *P<0.05; compared with miR-con group, *P<0.05.



图2上调miR-125a对缺氧复氧(H12H-R2h)处理组细胞凋亡的影响

Figure 2 Effect of upregulation of miR-125a on cell apoptosis in anoxia reoxygenation (H12H-R2h) treatment cells



图3 miR-125a与GDF11的3'-UTR结合位点 Figure 3 3'-UTR of GDF11 has binding site with miR-125a

表4双荧光素酶活性检测结果

Table 4 Results of double luciferase activity test

组别	WT	MUT
miR-con组	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.10
miR-125a组	$0.40 \pm 0.12^*$	0.95 ± 0.09
t	5.78	0.64
Р	0.042	0.55

与miR-con组比较, *P<0.05。

Compared with miR-con group, **P*<0.05.

表5 miR-125a缺氧复氧L02细胞中GDF11蛋白表达的影响 Table 5 Effect of miR-125a on expression of GDF11 in L02 cells after hypoxia reoxygenation

/ L	70
组别	GDF11蛋白
miR-con组	0.99 ± 0.12
miR-125a组	$0.26 \pm 0.1^*$
anti-con组	0.96 ± 0.12
anti-125a组	$2.91 \pm 0.19^{\text{#}}$
F	205.70
Р	<0.001

与miR-con组相比, *P<0.05; 与anti-con组比较, *P<0.05 Compared with miR-con group, *P<0.05; compared with anti-con group, *P<0.05

2.5 miR-125a与GDF11对细胞凋亡相关基因 caspase-3, Bcl-2和Bax的影响

Western印迹检测结果显示:与Ctrl组相比, miR-125a组缺氧复氧L02细胞中GDF11表达下调, 凋亡基因caspase-3和Bax基因的表达显著降低,而 抗凋亡基因Bcl-2则显著上调(P<0.05);与miR-125a 组相比,miR-125a+GDF11组缺氧复氧L02细胞中 GDF11明显增加,凋亡基因caspase-3和Bax基因 的表达显著增加,而抗凋亡基因Bcl-2则显著降低 (P<0.05;表8,图5)。表明GDF11可部分逆转miR-125a对缺氧/复氧过程肝细胞L02凋亡相关蛋白表 达的影响。

		/1	78		
신다. 타네			细胞活性		
纽加	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Normoxia组	0.19 ± 0.02	0.38 ± 0.03	0.79 ± 0.07	1.15 ± 0.09	2.20 ± 0.17
NC组	0.18 ± 0.01	$0.24 \pm 0.03^{*}$	$0.33 \pm 0.02^*$	$0.65 \pm 0.04^*$	$0.87 \pm 0.06^{*}$
si-con组	0.18 ± 0.01	$0.24 \pm 0.03^{*}$	$0.30 \pm 0.03^*$	$0.60 \pm 0.05^*$	$0.92 \pm 0.04^{*}$
si- GDF11组	0.17 ± 0.02	$0.36 \pm 0.03^{*^{\#\&}}$	$0.55 \pm 0.03^{*^{\#\&}}$	$0.90 \pm 0.07^{*^{\#\&}}$	$1.85 \pm 1.13^{*^{\#\&}}$
F	1.10	17.86	238.90	59.69	4.88
Р	0.40	0.001	< 0.001	< 0.001	0.03

表6 si-GDF11对缺氧复氧L02细胞活性的影响

Table 6 Effect of si-GDF11 on the activity of L02 cells after hypoxia reoxygenation

与Normoxia组相比, *P<0.05; 与NC组相比, ^{*}P<0.05; 与si-con组相比, [&]P<0.05。

Compared with Normoxia group, *P<0.05; compared with NC group, *P<0.05; compared with si-con group, *P<0.05.





表7 敲低GDF11对缺氧复氧L02细胞中GDF11蛋白表达和细胞凋亡的影响

T = 11 = T (ODD111 11 OD	NT11 / /	. 1		11 TOA 11
Table 7 Effects of GDELL knockdown on GD	JELL profein exi	pression and apopt	tosis in anovia re	eovygenation LU2 cells
Tuble / Encets of GD1 11 knockdown on GD	JI II protein en	pression and apop	tosis in anoma it	onygenation Dob cene

组别	GDF11mRNA	GDF11蛋白	细胞凋亡率/%
Normoxia组	0.67 ± 0.09	0.56 ± 0.08	5.60 ± 0.87
NC组	$1.00 \pm 0.11^*$	$1.01 \pm 0.10^{*}$	$24.05 \pm 1.28^*$
si-con组	$1.05 \pm 0.1^{*}$	$0.98 \pm 0.05^*$	$23.84 \pm 1.34^*$
si-GDF11组	$0.42 \pm 0.12^{*^{\#\&}}$	$0.36 \pm 0.07^{*^{\# \delta_x}}$	$8.90 \pm 0.63^{*^{\#\&}}$
F	24.74	42.71	301.20
Р	<0.001	<0.001	<0.001

与Normoxia组比较, *P<0.05; 与NC组比较, *P<0.05; 与si-con组比较, *P<0.05。

Compared with Normoxia group a, **P*<0.05; compared with NC group, **P*<0.05; compared with si-con group, **P*<0.05.

	*			
组别	GDF11蛋白	Caspase-3	Bcl-2	Bax
Normoxia组	1.03 ± 0.10	1.06 ± 0.08	1.00 ± 0.87	1.00 ± 0.09
Ctrl组	$1.95 \pm 0.15^{*}$	$1.71 \pm 0.13^*$	$0.65 \pm 0.06^*$	$1.65 \pm 0.15^*$
miR-125a组	$1.21 \pm 0.10^{*\#}$	$1.10 \pm 0.08^{*^{\#}}$	$0.94 \pm 0.14^{*^{\#}}$	$1.24 \pm 0.09^{*^{\#}}$
miR-125a+GDF11组	$1.45 \pm 0.12^{*^{\#\&}}$	$1.36 \pm 0.17^{*^{\#\&}}$	$1.20 \pm 0.13^{*^{\#\&}}$	$1.40 \pm 0.13^{*^{\#\&}}$
F	35.50	29.54	13.53	19.73
Р	<0.001	<0.001	0.002	0.001

表8 miR-125a和GDF11对缺氧复氧L02细胞Bax, Bcl-2和caspase-3表达的影响

Table 8 Effects of miR-125a and GDF11 on the exp	pression of Bax, Bcl-2 and casp	base-3 in L02 cells after hy	ypoxia reoxygenation
--	---------------------------------	------------------------------	----------------------

与Normoxia组相比, *P<0.05; 与Ctrl组相比, *P<0.05; 与miR-125a组相比, *P<0.05。

Compared with Normoxia group, *P<0.05; compared with Ctrl group, *P<0.05; compared with miR-125a group, &P<0.05.



图5 GDF11逆转 miR-125a对缺氧/复氧肝细胞L02凋亡相关 蛋白表达的影响

Figure 5 Effect of GDF11 reversing miR-125a on the expression of L02 related apoptosis proteins in hypoxiareoxygenation hepatocytes

3 讨论

MiRNAs在调节肿瘤细胞生长、细胞周期进程、血管生成和转移中扮演重要角色^[5-7],能够参与缺氧对癌细胞代谢调控过程。已经有研究^[2]表明miR-125a在肝癌的发生发展中发挥重要作用,如miR-125a在缺氧肝癌细胞中表达下调,并调控肝癌细胞的能量代谢。但关于miR-125a与缺氧复氧所致细胞凋亡的影响研究较少。本研究以肝细胞L02为研究对象,对其进行缺氧复氧处理,结果显示:miR-125a在缺氧复氧处理的L02细胞中表达下调,转染miR-125a模拟物至缺氧复氧处理的

L02细胞中,细胞活力和凋亡检测结果表明,与 miR-con组相比,miR-125a组的细胞活力显著增 强,细胞凋亡率显著降低;与Normoxia组相比, 细胞活力略微降低,细胞凋亡率略微增加,表明 上调miR-125a可减少缺氧复氧对肝细胞L02的损 伤,提示miR-125a参与肝细胞L02缺氧复氧的损伤 修复过程。

GDF11是TGF-β超家族中的重要成员^[8]。在早期胚胎发育中,GDF11参与骨骼、肾、胰腺、视网膜、嗅神经等组织器官的形成和分化^[9],是胚胎正常发育的关键信号分子,在调节细胞老龄化中具有极其重要的生物学功能^[10]。有研究^[11]表明GDF11能够抑制肺癌细胞的转移和促进凋亡。也有学者^[3]发现GDF11在缺血/再灌注损伤的肝细胞中高表达,加重对肝的损伤。本研究以缺氧复氧L02细胞为模型,RT-qPCR和Western印迹检测结果发现GDF11在缺氧复氧L02细胞中高表达,与Liu等^[3]的研究结果一致。同时在缺氧复氧L02细胞中敲低GDF11,缺氧复氧L02细胞的细胞活力增加,细胞凋亡率降低,提示GDF11参与调控L02缺氧复氧所引起的损伤修复。

本研究发现miR-125a在缺氧复氧的L02细胞中 表达显著上调,而GDF11表达则显著下调,提示 二者可能存在相互作用。通过TargetScan预测发现 miR-125a与GDF11-3'-UTR存在结合位点。为进一 步验证GDF11与miR-125a的靶向关系,本研究进 行了双荧光素酶报告基因实验,结果证实GDF11 是miR-125a的靶基因。Western印迹检测结果发 现:上调miR-125a可抑制GDF11的表达,而下调 miR-125a可促进GDF11的表达,表明miR-125a可靶 向并负性调节GDF11表达。

有研究^[12-13]表明细胞的凋亡在肝缺血/再灌注 后的病理过程中起重要作用, 日细胞凋亡也是机 体重要的自稳调节机制。在众多的凋亡调控基因 中, Bcl-2基因和Bax基因是目前已知的在凋亡调控 过程中功能相互对立的调控基因^[14-16], caspase-3是 凋亡过程中最关键的凋亡执行蛋白酶^[17-18]。因此为 进一步明确miR-125a靶向GDF11调控缺氧复氧L02 细胞凋亡的分子机制,后续研究对凋亡相关分子 caspase-3, Bcl-2和Bax在缺氧复氧L02细胞中的表 达进行分析。检测结果显示:与Ctrl组相比,miR-125a组细胞促凋亡基因Bax和caspase-3蛋白表达 显著下调,抗凋亡基因Bcl-2则显著上调,与miR-125a组相比, miR-125a+GDF11组促凋亡基因Bax和 caspase-3蛋白表达显著上调,抗调亡基因Bcl-2则 显著下调,进一步表明GDF11可逆转miR-125a对 缺氧复氧L02细胞凋亡相关基因表达的影响,提示 miR-125a可靶向GDF11参与缺氧复氧L02细胞的损 伤修复过程。

综上,本研究初步探索了miR-125a靶向调控 GDF11进而参与缺氧复氧肝细胞损伤修复的机制, 为临床预防肝缺血/再灌注损伤提供了实验依据。

参考文献

- Kim JK, Noh JH, Jung KH, et al. Sirtuin7 oncogenic potential in human hepatocellular carcinoma and its regulation by the tumor suppressors mir-125a-Sp and miR-125b[J]. Hepatology, 2013, 57(3): 1055-1067.
- Jin F, Wang Y, Zhu Y, et al. The miR-125a/HK2 axis regulates cancer cell energy metabolism reprogramming in hepatocellular carcinoma[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 3089.
- Liu A, Dong W, Peng J, et al. Growth differentiation factor 11 worsens hepatocellular injury and liver regeneration after liver ischemia reperfusion injury[J]. FASEB J, 2018, 32(9): 5186-5198.
- Yu X, Chen X, Zheng XD, et al. Growth differentiation factor 11 promotes abnormal proliferation and angiogenesis of pulmonary artery endothelial cells[J]. Hypertension, 2018, 71(4): 729-741.
- Stahlhut Espinosa CE, Slack FJ. The role of microRNAs in cancer[J]. Yale J Biol Med, 2006, 79(3/4): 131-140.
- Fan F, Lu J, Yu W, et al. MicroRNA-26b-5p regulates cell proliferation, invasion and metastasis in human intrahepatic cholangiocarcinoma by targeting S100A7[J]. Oncol Lett, 2018, 15(1): 386-392.
- Chen B, Li H, Zeng X, et al. Roles of microRNA on cancer cell metabolism[J]. J Transl Med, 2012, 10: 228.
- Wu HH, Ivkovic S, Murray RC, et al. Autoregulation of neurogenesis by GDF11[J]. Neuron, 2003, 37(2): 197-207.

- Liu W, Zhou L, Zhou C, et al. GDF11 decreases bone mass by stimulating osteoclastogenesis and inhibiting osteoblast differentiation[J]. Nat Commun, 2016, 7: 12794.
- Egerman MA1, Cadena S, Gilbert JA, et al. GDF11 increases with age and inhibits skeletal muscle regeneration[J]. Cell Metab, 2015, 22(1): 164-174.
- 李素素. GDF11对A549及H1299细胞生长和转移的影响[D]. 苏州: 苏州大学, 2017.

LI Susu. Effects of GDF11 on growth and metastasis of A549 and H1299 cells[D]. Suzhou: Soochow University, 2017.

- Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, et al. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis?[J]. Hepatology, 2001, 33(2): 397-405.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis[J]. Science, 1998, 281(5381): 1309-1312.
- Lindsten T, Ross AJ, King A, et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues[J]. Mol Cell, 2000, 6(6): 1389-1399.
- 15. 石凯峰,张宁,柳诗意,等.补肾活血方通过调节Bcl-2/Bax凋亡相 关蛋白对慢性肾脏病大鼠血管钙化的影响[J].中华中医药杂 志,2017,32(5):2188-2193.

SHI Kaifeng, ZHANG Ning, LIU Shiyi, et al. Effects of regulating Bcl-2/Bax apoptosis related protein on vascular calcification by Bushen Huoxue Decoction in chronic kidney disease rats[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2017, 32(5): 2188-2193.

- Ye Z, Hao R, Cai Y, et al. Knockdown of miR-221 promotes the cisplatin-inducing apoptosis by targeting the BIM-Bax/Bak axis in breast cancer[J]. Tumor Biol, 2016, 37(4): 4509-4515.
- 董雅洁,高维娟. Bcl-2、bax、caspase-3在细胞凋亡中的作用及 其关系[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(21): 4828-4830.
 DONG Yajie, GAO Weijuan. The role and relationship of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in apoptosis[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2012, 32(21): 4828-4830.
- He X, Sun J, Huang X. Expression of caspase-3, Bax and Bcl-2 in hippocampus of rats with diabetes and subarachnoid hemorrhage[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(1): 873-877.

本文引用: 张志标, 余伟, 马达, 刘礼军. MiR-125a靶向GDF11调 控缺氧复氧肝细胞损伤修复的机制[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(2): 244-251. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.02.003

Cite this article as: ZHANG Zhibiao, YU Wei, MA Da, LIU Lijun. Mechanism of miR-125a regulates the injury and repair of hypoxiareoxygenation hepatocytes by targeting GDF11[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2019, 39(2): 244-251. doi: 10.3978/ j.issn.2095-6959.2019.02.003