

# miR-155在低氧环境中对间充质干细胞免疫因子表达的调控及其机制研究

韩潇 白海 尹娇娇 杨柯 韩燕霞 欧剑锋 王存邦 吴涛

**【摘要】** 目的 探讨miR-155在低氧条件下对间充质干细胞(MSC)免疫因子表达的调控以及作用机制。方法 通过Lipofectamine™ 2000转染试剂将miR-155模拟物转染至MSC中,构建miR-155高表达的MSC细胞。在水合氯化钴( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )模拟的化学低氧环境中,用脂多糖(LPS)刺激MSC的免疫作用,采用实时荧光定量PCR方法鉴定其转染效果,并检测IL-6、IL-8、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、TGF- $\beta$ 、低氧诱导因子1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )mRNA的表达。用流式细胞术检测细胞表面抗原,ELISA法检测上清中IL-6、IL-8、TGF- $\beta$ 及SDF-1 $\alpha$ 的表达水平,Western blot法检测iNOS、HIF-1 $\alpha$ 蛋白的表达。结果 较阴性对照组,miR-155转染组的IL-6、IL-8表达上调( $24.201 \pm 1.536$ 对 $1.802 \pm 0.058$ ,  $P < 0.01$ ;  $24.406 \pm 4.611$ 对 $7.407 \pm 1.553$ ,  $P < 0.01$ ),iNOS mRNA表达下调( $0.151 \pm 0.035$ 对 $32.925 \pm 1.632$ ,  $P < 0.01$ )。同时,HIF-1 $\alpha$ 在低氧环境下高表达( $45.093 \pm 3.371$ 对 $2.210 \pm 0.498$ ,  $P < 0.01$ ),且低氧miR-155转染组较低氧对照组上调更为显著( $102.965 \pm 4.449$ 对 $45.093 \pm 3.371$ ,  $P < 0.01$ )。低氧miR-155转染组IL-6、IL-8上调较miR-155转染组更加显著( $65.670 \pm 10.613$ 对 $24.201 \pm 1.536$ ,  $P < 0.01$ ;  $35.537 \pm 2.285$ 对 $24.406 \pm 4.611$ ,  $P < 0.01$ );miR-155下调iNOS表达( $0.235 \pm 0.003$ 对 $0.612 \pm 0.043$ ,  $P < 0.01$ ),低氧条件下更为显著( $0.087 \pm 0.002$ 对 $0.235 \pm 0.003$ ,  $P < 0.01$ )。低miR-155组SDF-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$  mRNA表达均上调( $5.690 \pm 1.655$ 对 $0.841 \pm 0.194$ ,  $P < 0.01$ ;  $6.982 \pm 1.353$ 对 $0.632 \pm 0.184$ ,  $P < 0.01$ ),上清中细胞因子SDF-1 $\alpha$ 表达水平为 $24.609 \pm 2.584$ 对 $25.359 \pm 2.455$  ( $P = 0.760$ ); TGF- $\beta$ 表达水平为 $0.568 \pm 0.019$ 对 $0.345 \pm 0.037$  ( $P = 0.002$ )。结论 低氧条件下,通过上调HIF-1 $\alpha$ 的表达,从而下调iNOS基因及蛋白,由此促进miR-155正向调控MSC免疫因子的表达。

**【关键词】** 间质干细胞; 细胞低氧; 微RNAs; 一氧化氮合酶; 乏氧诱导因子1 $\alpha$

基金项目:甘肃省科技重大专项(1102FKDA005)

**Effect of miR-155 on immune-factors and its mechanism in mesenchymal stem cells under hypoxic environment** Han Xiao, Bai Hai, Yin Jiaojiao, Yang Ke, Han Yanxia, Ou Jianfeng, Wang Cunbang, Wu Tao. Department of Hematology, Center for Hematologic Diseases of Chinese PLA/Lanzhou Military Area General Hospital, Lanzhou 730050, China

Corresponding author: Bai Hai, Email: baihai98@tom.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of miR-155 on immune-factors and its mechanism in mesenchymal stem cells under hypoxia. **Methods** The microRNA sequences targeting miR-155 mimic and mimic NC gene was designed and transfected into MSC by lipofectamine™ 2000. Lipopolysaccharide was used to stimulate the immunity of MSC under hypoxic environment. Transfection efficiency of miR-155 and immune-related genes (IL-6, IL-8, iNOS, TGF- $\beta$ , HIF-1 $\alpha$ ) were detected by real-time RT-PCR. The cell surface antigens (CD29, CD73, CD90, CD105, CD31, CD45) and supernatant cytokines (IL-6, IL-8, TGF- $\beta$ , SDF-1 $\alpha$ ) were analyzed by flow cytometry and ELISA, respectively. Western Blot was applied to evaluate related proteins, iNOS and HIF-1 $\alpha$ . **Result** miR-155 was transfected into MSC effectively ( $53.447 \pm 8.361$  vs  $1.070 \pm 0.174$ ,  $P < 0.01$ ). In miR-155 high-expressed groups, the expressions of IL-6 and IL-8 were up-regulated [ $(24.201 \pm 1.536)$  vs  $(1.802 \pm 0.058)$ ,  $P < 0.01$ ;  $(24.406 \pm 4.611)$  vs  $(7.407 \pm 1.553)$ ,  $P < 0.01$ ] and iNOS was markedly suppressed [ $(0.151 \pm 0.035)$  vs  $(32.925 \pm 1.632)$ ,  $P < 0.01$ ]. Hypoxia up-regulated expressions of HIF-1 $\alpha$  [ $(45.093 \pm 3.371)$  vs  $(2.210 \pm 0.498)$ ,  $P < 0.01$ ] and promoted the regulation of miR-155. MiR-155 and hypoxia had effect on mRNA expression of SDF-1 $\alpha$  and TGF- $\beta$

[(5.690±1.655) vs (0.841±0.194),  $P<0.01$ ; (6.982±1.353) vs (0.632±0.184),  $P<0.01$ ]. However, there was no influence on cytokines of SDF-1 $\alpha$  and TGF- $\beta$  [(24.609±2.584) vs (25.359±2.455),  $P=0.760$ ; (0.568±0.019) vs (0.345±0.037),  $P=0.002$ ]. **Conclusion** Hypoxia environment may promote miR-155 to positively modulate immune factors of MSC through up-regulating the expression of HIF-1 $\alpha$ , which down-regulated iNOS protein.

**【Key words】** Mesenchymal stem cells; Cell hypoxia; MicroRNAs; Nitric oxide synthase; HIF-1 $\alpha$

**Fund program:** Major Scientific and Technological Project of Gansu in China (1102FKDA005)

体外培养的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)具有修复受损组织和调节免疫的潜能,现已广泛应用于临床再生医学领域<sup>[1]</sup>。低氧培养条件可为众多干细胞提供生长优势,能有效阻止干细胞提前衰老且保持未分化状态<sup>[2-4]</sup>。这些干细胞在体内定居于被称作“干细胞壁龛”的局部微环境中,其氧含量相对较低(约1%~9% O<sub>2</sub>)<sup>[5]</sup>。同时,成熟的miR-155通过降解信使RNA从而调控靶基因的表达在MSC的增殖及其免疫调节的调控中发挥着重要作用<sup>[6-7]</sup>。本研究中我们通过转染miR-155于MSC中以提高其表达量,从而研究miR-155在低氧环境中对MSC免疫作用的影响以及可能的调节途径。

### 对象与方法

1. 研究对象:以我院产科连续7例足月顺产健康新生儿脐带标本为研究对象,材料的获得经我院伦理委员会批准且均获产妇知情同意并签署知情同意书。

2. 主要试剂:DMEM/F12培养基、FBS及胰蛋白酶购自美国Gibco公司;has-miR-155模拟物(mimic)及相应的阴性对照(NC)均由上海吉玛制药技术有限公司合成;PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;Lipofectamine™ 2000转染试剂、opti-MEM培养基及TRIzol RNA提取试剂盒均购自美国Invitrogen公司;荧光染料(SYBR Green)实时定量PCR(RQ-PCR)试剂盒购自日本TAKARA生物公司;水合氯化钴(CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O)及脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)均购于美国Sigma公司;RIPA裂解液购于北京普利莱基因技术有限公司;抗鼠HIF-1 $\alpha$ 多克隆抗体及细胞表面抗原均购于美国BD公司;抗鼠NOS2购于美国Santa Cruz公司;抗鼠 $\beta$ -actin购于北京中杉金桥生物技术有限公司;IL-6、IL-8、TGF- $\beta$  ELISA试剂盒购于上海依科赛生物制品有限公司;SDF-1 $\alpha$  ELISA试剂盒购于英国Abcam公司。

3. 细胞制备及培养鉴定:参照文献[8]方法,利用脐带进行间充质干细胞的分离与培养。收获第3代细胞,PBS洗涤后制成细胞密度为 $1\times 10^6$ /ml的单细胞悬液,分别加入CD29-PE、CD73-PE、CD90-PE、CD105-PE、CD31-PE、CD45-PerCP荧光标记的单克隆抗体各5  $\mu$ l,室温孵育30 min,上流式细胞仪进行检测,采用Cellquest软件分析。每个样本至少分析10 000个细胞。

4. 转染及干预:实验分为五组:设①空白对照组:未做任何处理的MSC;②阴性对照组:转染NC至MSC中并加入LPS;③miR-155组:转染miR-155 mimic至MSC中并加入LPS;④低氧对照组:转染NC至MSC中并加入含CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O的培养基和LPS;⑤低氧miR-155组:转染miR-155 mimic至MSC中并加入CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O的培养基和LPS。取第3代对数生长期的MSC,以每孔 $2\times 10^6$ 个细胞接种于6孔板。24 h后弃去原培养基,用250  $\mu$ l无血清opti-MEM培养基稀释5  $\mu$ l Lipofectamine™ 2000两份;同时,分别用250  $\mu$ l无血清opti-MEM培养基稀释终浓度均为40 nmol/L的miR-155 mimic及NC各5  $\mu$ l,室温孵育5 min后,分别将上述两种混合液混匀,室温孵育20 min。将孵育好的转染试剂加入培养孔中(每孔500  $\mu$ l),5 h后更换成原培养基。36 h后分别更换新的培养基和(或)含200  $\mu$ mol/L CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O培养基,并加入1  $\mu$ g/ml LPS刺激MSC的免疫能力。培育24 h后收集细胞及上清。

5. RT-PCR检测miR-155转染效率:按照TRIzol说明书提取各组总RNA,用分光光度法检测RNA的浓度和纯度,按TAKARA说明书进行poly A加尾及PCR扩增。反应条件:95 $^{\circ}$ C变性10 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,共40个循环;95 $^{\circ}$ C 60 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 30 s。以U6为内参照,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算转染效率。每组均设3个复孔,实验重复3次。

6. RT-PCR检测IL-6、IL-8、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、SDF-1、TGF- $\beta$ 、低氧诱导因子1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )DNA的表达:RNA提取同上,按说明书进行

cDNA 逆转录及 PCR 扩增。反应条件:95 °C 变性 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 32 s, 共 40 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min; 95 °C 15 s。以 GAPDH 为内参照, 通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算目的基因相对表达量。所有样本均设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

7. Western blot 检测 iNOS 及 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达: 用 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法进行蛋白定量。每泳道 60  $\mu$ g 蛋白, 100 g/L SDS-PAGE 电泳分离后湿转至 PVDF 膜, 摇床封闭 1 h, 加一抗 4 °C 封闭孵育过夜, 洗膜, 加相应二抗室温封闭孵育 1 h, 漂洗后用 ECL 显色, 图像分析系统灰度扫描, 以  $\beta$ -actin 为内参照。

8. ELISA 检测上清中 IL-6、IL-8、SDF-1、TGF- $\beta$  细胞因子的表达: 根据说明书进行操作, 分别进行 SDF-1 $\alpha$ 、IL-6、IL-8、TGF- $\beta$  的测定。所有样本均设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

9. 统计学处理: 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- $t$  法。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

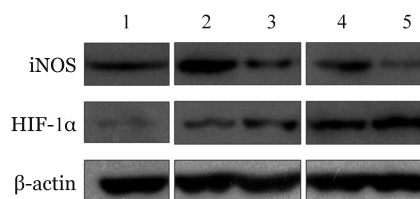
1. MSC 的形态学观察及细胞表面抗原标志鉴定: 从脐带组织中提取出的细胞形态类似于短的成纤维细胞, 胞质丰富, 核偏大, 呈平行排列、旋涡状、网状、辐射状生长, 细胞界限不清楚。CD29、CD73、CD90、CD105 表达阳性, CD31、CD45 表达阴性。证实分离获取的贴壁细胞符合 MSC 的特点。

2. miR-155 的转染效率: miR-155 组与低氧 miR-155 组 miR-155 相对表达量分别为  $54.447 \pm 8.361$ 、 $118.833 \pm 1.845$ , 均明显高于阴性对照组及低氧对照组 ( $1.070 \pm 0.174$  及  $1.577 \pm 0.408$ ), 差异均有统计学意义 ( $P$  值均  $< 0.05$ ), 提示 miR-155 转染有效。低氧 miR-155 组 miR-155 表达水平也明显高于 miR-155 组 ( $P$  值  $< 0.05$ ), 提示在低氧条件下, miR-155 转染效率更高。

3. 各组 MSC 中 IL-6、IL-8、iNOS、SDF-1、TGF- $\beta$ 、HIF-1 $\alpha$  mRNA 的表达: 与阴性对照组比较, miR-155 组中 IL-6、IL-8 mRNA 表达上调 ( $P$  值均  $< 0.01$ ), iNOS mRNA 表达下调 ( $P < 0.01$ )。同时, 低氧对照组中 IL-6、IL-8 mRNA 相对于阴性对照组上调, 但差异均无统计学意义 ( $P$  值分别为 0.096、0.363), 而 iNOS mRNA 表达下调 ( $P < 0.01$ )。低氧 miR-155 组 IL-6、IL-8 mRNA 表达上调程度较 miR-155 组更为

显著, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); iNOS mRNA 表达低于 miR-155 组, 但差异无统计学意义 ( $P = 0.980$ )。同时, 低氧 miR-155 组、低氧对照组 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达均高于阴性对照组 ( $P < 0.01$ ), 且低氧 miR-155 组表达高于低氧对照组。而 miR-155 组 SDF-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$  mRNA 表达与阴性对照组比较差异均无统计学意义 ( $P$  值分别为 0.587 和 0.052); 低氧对照组中 SDF-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$  mRNA 表达与阴性对照组比较差异均无统计学意义 ( $P$  值分别为 0.277 和 0.885); 而与阴性对照组比较, 低氧 miR-155 组 SDF-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$  mRNA 表达均上调, 差异有统计学意义 ( $P$  值均  $< 0.05$ ) (表 1)。

4. 各组 MSC 中 iNOS 及 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达: 结果见图 1。低氧对照组中 HIF-1 $\alpha$  蛋白较阴性对照组上调 ( $0.430 \pm 0.007$  对  $0.164 \pm 0.002$ ,  $P < 0.01$ ), iNOS 表达下调 ( $0.425 \pm 0.004$  对  $0.612 \pm 0.043$ ,  $P < 0.01$ ); 同时, miR-155 组中 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达较阴性对照组上调 ( $0.227 \pm 0.003$  对  $0.164 \pm 0.002$ ,  $P < 0.01$ ), iNOS 蛋白下调 ( $0.235 \pm 0.003$  对  $0.612 \pm 0.043$ ,  $P < 0.01$ ); 而低氧 miR-155 组中 iNOS 蛋白较 miR-155 组下调更为显著 ( $0.087 \pm 0.002$  对  $0.235 \pm 0.003$ ,  $P < 0.01$ ), HIF-1 $\alpha$  蛋白上调更为显著 ( $0.440 \pm 0.006$  对  $0.227 \pm 0.003$ ,  $P < 0.01$ )。



1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: miR-155 组; 4: 低氧对照组; 5: 低氧 miR-155 组

图 1 Western blot 法检测各组间充质干细胞中 iNOS 及 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达

5. 各组上清中 IL-6、IL-8、SDF-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$  细胞因子的表达: miR-155 组中 IL-6、IL-8 细胞因子表达高于阴性对照组 ( $P$  值均  $< 0.01$ ), 同时, 低氧对照组中 IL-6、IL-8 细胞因子表达较阴性对照组差异无统计学意义 ( $P$  值分别为 0.392 和 0.347)。然而, 低氧 miR-155 组 IL-6、IL-8 细胞因子上调较 miR-155 组更为显著 ( $P$  值分别为  $< 0.01$  和 0.021) (表 2)。

与阴性对照组比较, miR-155 组 SDF-1 $\alpha$  细胞因子的表达下调 ( $P = 0.022$ ), 而 TGF- $\beta$  细胞因子表达差异无统计学意义 ( $P = 0.846$ ); 同时, 低氧对照组中 SDF-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$  细胞因子与阴性对照组间差异亦无



统计学意义( $P=0.195$ ),而TGF- $\beta$ 细胞因子上调( $P=0.01$ );低氧miR-155组SDF-1 $\alpha$ 细胞因子的表达仍无明显变化( $P=0.760$ ),而TGF- $\beta$ 细胞因子表达上调( $P=0.002$ ),因此认为低氧培养条件及miR-155对细胞因子SDF-1 $\alpha$ 无明显影响,而低氧条件可以上调细胞因子TGF- $\beta$ 的表达(表2)。

### 讨 论

脐带作为MSC一种新的选择性资源,可大量扩增MSC<sup>[9]</sup>。但MSC在体内环境中与免疫炎症因子之间相互作用的机制还未被完全阐明。

MSC主要通过联系免疫应答方式抑制免疫反应<sup>[10]</sup>。Bartholomew等<sup>[11]</sup>发现,通过联系免疫应答, MSC能抑制淋巴细胞的免疫反应,从而抑制抗原提呈细胞成熟并减弱自然杀伤细胞的免疫功能。Le等<sup>[12]</sup>已成功应用MSC改善严重的移植物抗宿主病。miR-155位于人类21号染色体上原癌基因bic(B细胞集合基因簇)的非编码转录物中,通过结合RNA诱导的沉默复合物致mRNA降解或抑制<sup>[13]</sup>。Xu等<sup>[14]</sup>发现miR-155在接受炎症细胞因子刺激后发生巨大变化,并且通过抑制iNOS的表达来负向调控MSC的免疫抑制能力。然而,外界氧浓度(约20% O<sub>2</sub>)为体内壁氧浓度的4~10倍<sup>[15-16]</sup>。近年大量研究表明,环境中高氧对MSC具有早期衰老、群体倍增时间较长、DNA损伤<sup>[17-18]</sup>和输注后低存活率等负面影响<sup>[19-20]</sup>,揭示了氧浓度能影响MSC的生物学特性,从而影响其生物安全性和治疗效应。而我们之前的研究也证实了CoCl<sub>2</sub>诱导的化学性低氧环境可促进MSC的增殖<sup>[21]</sup>。

根据前期实验结果,本研究我们用200  $\mu$ mol/L CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O模拟化学低氧环境,针对miR-155基因设计模拟物,通过Lipofectamine™ 2000转染入MSC细胞株后,miR-155基因表达上调,说明转染有效。本研究结果显示miR-155高表达组中免疫因子IL-6、IL-8的基因及细胞因子表达均上调,低氧环境下,其表达较miR-155组上调更高;而iNOS基因及蛋白表达在转染组中下调,低氧促进其下调;由此说明miR-155可抑制MSC的免疫抑制作用,低氧环境可促进miR-155的调节作用。一氧化氮是一种生物活性复合物,具有血管扩张效应且在MSC免疫抑制效应中具有重要作用<sup>[22]</sup>。iNOS是炎症刺激下产生的一氧化氮合酶(NOS)的一种亚型。进一步研究表明,iNOS基因上调时,IL-6及IL-8基因及细胞因子均下调,说明miR-155通过抑制iNOS的表达,从而负向调控MSC的免疫抑制能力,这与Xu等<sup>[14]</sup>的研究结果一致。HIF-1 $\alpha$ 的表达受O<sub>2</sub>依赖的羟基化作用调节,其羟基化可阻止HIF-1 $\alpha$ 与共活化剂的相互效应,从而导致HIF-1 $\alpha$ 泛素化与降解<sup>[23]</sup>。本研究中低氧环境HIF-1 $\alpha$ 基因及蛋白表达上调,IL-6及IL-8基因及细胞因子表达亦上调;低氧环境对iNOS亦具有负向调控作用,由此可推断低氧环境通过上调HIF-1 $\alpha$ 的表达,从而下调iNOS,由此促进miR-155的调节作用,这一推断我们将在下一步的研究中进行证明。SDF-1 $\alpha$ 对多种干细胞功能具有调节作用,包括迁移与分化<sup>[24]</sup>,其高表达可促进MSC归巢。TGF- $\beta$ 可诱导MSC迁移至受损组织,并促进这些细胞的动员<sup>[25]</sup>。在本研究中我们发现,当低氧条件与miR-155分别作为单一因素时,对SDF-1 $\alpha$ 、

表1 RT-PCR法检测各组间充质干细胞中IL-6、IL-8、iNOS、SDF-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、HIF-1 $\alpha$  mRNA的表达( $\bar{x}\pm s$ )

组别	IL-6	IL-8	iNOS	SDF-1 $\alpha$	TGF- $\beta$	HIF-1 $\alpha$
阴性对照组	1.802 $\pm$ 0.058	7.407 $\pm$ 1.553	32.925 $\pm$ 1.632	0.841 $\pm$ 0.194	0.632 $\pm$ 0.184	2.210 $\pm$ 0.498
miR-155组	24.201 $\pm$ 1.536 <sup>a</sup>	24.406 $\pm$ 4.611 <sup>a</sup>	0.151 $\pm$ 0.035 <sup>a</sup>	0.547 $\pm$ 0.081	1.817 $\pm$ 0.293 <sup>a</sup>	6.965 $\pm$ 1.301 <sup>a</sup>
低氧对照组	7.304 $\pm$ 1.425	8.858 $\pm$ 0.385	8.187 $\pm$ 1.117 <sup>a</sup>	0.244 $\pm$ 0.117	0.569 $\pm$ 0.063	45.093 $\pm$ 3.371 <sup>a</sup>
低氧miR-155组	65.670 $\pm$ 10.613 <sup>a</sup>	35.537 $\pm$ 2.285 <sup>a</sup>	0.060 $\pm$ 0.032 <sup>a</sup>	5.690 $\pm$ 1.655 <sup>a</sup>	6.982 $\pm$ 1.353 <sup>a</sup>	102.965 $\pm$ 4.449 <sup>a</sup>

注:与阴性对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。每组设3个复孔,实验重复3次

表2 RT-PCR法检测各组培养上清中IL-6、IL-8、SDF-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 细胞因子的表达( $\bar{x}\pm s$ )

组别	IL-6 (ng/ml)	IL-8 (ng/ml)	TGF- $\beta$ (ng/ml)	SDF-1 $\alpha$ (pg/ml)
阴性对照组	2.833 $\pm$ 0.475	9.738 $\pm$ 0.404	0.345 $\pm$ 0.037	25.359 $\pm$ 2.455
miR-155组	4.744 $\pm$ 0.276 <sup>a</sup>	18.396 $\pm$ 0.236 <sup>a</sup>	0.339 $\pm$ 0.048	13.898 $\pm$ 3.353 <sup>a</sup>
低氧对照组	3.140 $\pm$ 0.094	10.357 $\pm$ 0.493	0.462 $\pm$ 0.028 <sup>a</sup>	22.073 $\pm$ 1.524
低氧miR-155组	5.684 $\pm$ 0.716 <sup>a</sup>	23.357 $\pm$ 0.520 <sup>a</sup>	0.568 $\pm$ 0.019 <sup>a</sup>	24.609 $\pm$ 2.584

注:与阴性对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。每组设3个复孔,实验重复3次

TGF- $\beta$ 基因的表达无明显影响;当两者共存时,SDF-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 基因表达上调,由此说明 miR-155 与低氧条件对 SDF-1 $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 基因的调节具有协同作用。

综上所述,我们探讨了 miR-155 在低氧环境中对 MSC 免疫抑制能力的调节作用,实验结果显示,低氧环境可促进 miR-155 上调 MSC 中的免疫因子,从而负向调控 MSC 的免疫抑制作用,其机制可能为通过上调 HIF-1 $\alpha$  而下调 iNOS 的表达,这为 MSC 输注中基因治疗靶点的选择提供了新思路。

#### 参考文献

- [1] Shi Y, Su J, Roberts AI, et al. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses[J]. *Trends Immunol*, 2012, 33(3):136-143. doi: 10.1016/j.it.2011.11.004.
- [2] Bartholomew A, Polchert D, Szilagy E, et al. Mesenchymal stem cells in the induction of transplantation tolerance[J]. *Transplantation*, 2009, 87 (9 Suppl):S55- 57. doi: 10.1097/TP.0b013e3181a287e6.
- [3] Takubo K, Goda N, Yamada W, et al. Regulation of the HIF-1 $\alpha$  level is essential for hematopoietic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(3):391-402. doi: 10.1016/j.stem.2010.06.020.
- [4] Santilli G, Lamorte G, Carlessi L, et al. Mild hypoxia enhances proliferation and multipotency of human neural stem cells[J]. *PLoS One*, 2010, 5 (1):e8575. doi: 10.1371/journal.pone.0008575.
- [5] Moriyama H, Moriyama M, Isshi H, et al. Role of notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions[J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23 (18):2211-2224. doi: 10.1089/scd.2013.0642.
- [6] Tsai CC, Chen YJ, Yew TL, et al. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST[J]. *Blood*, 2011, 117(2): 459-469. doi: 10.1182/blood-2010-05-287508.
- [7] 陈广华, 杨婷, 田斌, 等. 脐带间充质干细胞治疗糖皮质激素耐药的严重型急性移植抗宿主病 19 例分析[J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33 (4):303- 306. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253- 2727. 2012.04.012.
- [8] Han YF, Tao R, Sun TJ, et al. Optimization of human umbilical cord mesenchymal stem cell isolation and culture methods[J]. *Cyetechnology*, 2013, 65 (5):819- 827. doi:10.1007/s10616-012-9528-0.
- [9] Christodoulou I, Kolisis FN, Papaevangelou D, et al. Comparative Evaluation of Human Mesenchymal Stem Cells of Fetal (Wharton's Jelly) and Adult (Adipose Tissue) Origin during Prolonged In Vitro Expansion: Considerations for Cytotherapy[J]. *Stem Cells Int*, 2013, 2013:246134. doi: 10.1155/2013/246134.
- [10] Qin Y, Guan J, Zhang C. Mesenchymal stem cells: mechanisms and role in bone regeneration[J]. *Postgrad Med J*, 2014, 90 (1069):643-647. doi: 10.1136/postgradmedj-2013-132387.
- [11] Bartholomew A, Polchert D, Szilagy E, et al. Mesenchymal stem cells in the induction of transplantation tolerance[J]. *Transplantation*, 2009, 87 (9 Suppl):S55- 57. doi: 10.1097/TP.0b013e3181a287e6.
- [12] Le BK, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study[J]. *Lancet*, 2008, 371 (9624):1579-1586. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60690-X.
- [13] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136 (2):215- 233. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
- [14] Xu C, Ren G, Cao G, et al. miR-155 regulates immune modulatory properties of mesenchymal stem cells by targeting TAK1-binding protein 2[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (16):11074-11079. doi: 10.1074/jbc.M112.414862.
- [15] Antoniou ES, Sund S, Homsy EN, et al. A theoretical simulation of hematopoietic stem cells during oxygen fluctuations: prediction of bone marrow responses during hemorrhagic shock[J]. *Shock*, 2004, 22(5):415-422.
- [16] Chow DC, Wenning LA, Miller WM, et al. Modeling pO<sub>2</sub> distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models[J]. *Biophys J*, 2001, 81(2):685-696.
- [17] Estrada JC, Albo C, Benguria A, et al. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis[J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(5):743-755. doi: 10.1038/cdd.2011.172.
- [18] Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan[J]. *Aging Cell*, 2007, 6 (6):745- 757. doi: 10.1111/j.1474- 9726.2007.00336.x.
- [19] Mohamadnejad M, Pourmasr B, Bagheri M, et al. Transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stromal cell-derived hepatocyte-like cells in homozygous familial hypercholesterolemia[J]. *Cytotherapy*, 2010, 12 (4):566- 568. doi: 10.3109/14653240903511143.
- [20] Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction[J]. *N Engl J Med*, 2006, 355 (12):1210- 1221. doi: 10.1056/NEJMoa060186.
- [21] 宋玮玮, 白海, 王存邦, 等. 低氧对人骨髓间充质干细胞增殖的影响[J]. *中华医学杂志*, 2010, 90 (30):2149- 2152. doi: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2010.30.016.
- [22] Ren G, Su J, Zhang L, et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(8):1954-1962. doi: 10.1002/stem.118.
- [23] Lando D, Peet DJ, Whelan DA, et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch[J]. *Science*, 2002, 295(5556):858-861. doi: 10.1126/science.1068592.
- [24] Jaerve A, Bosse F, Müller HW. SDF-1/CXCL12: its role in spinal cord injury[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(3):452-456. doi: 10.1016/j.biocel.2011.11.023.
- [25] Wan M, Li C, Zhen G, et al. Injury-activated transforming growth factor  $\beta$  controls mobilization of mesenchymal stem cells for tissue remodeling[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(11):2498-2511. doi: 10.1002/stem.1208.

(收稿日期:2016-01-05)

(本文编辑:刘爽)