

miR-21慢病毒载体构建及对骨髓间充质干细胞凋亡的影响

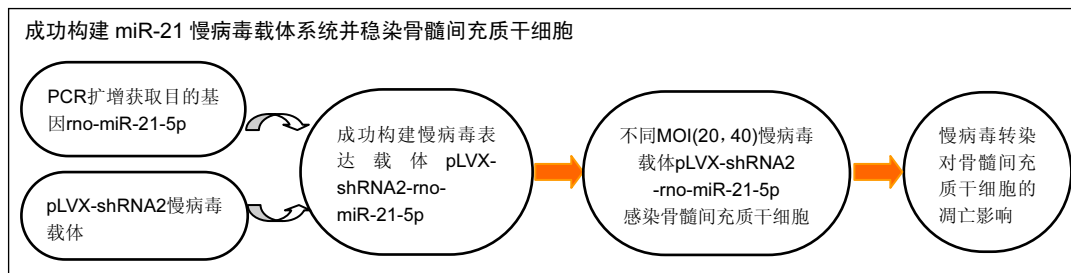
付霞霏, 何援利, 王雪峰, 陈小莹(南方医科大学珠江医院妇产科, 广东省广州市 510282)

引用本文: 付霞霏, 何援利, 王雪峰, 陈小莹. miR-21 慢病毒载体构建及对骨髓间充质干细胞凋亡的影响[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(1):1-5.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.01.001

ORCID: 0000-0002-0344-7620(付霞霏)

文章快速阅读:



付霞霏, 女, 1979年生, 汉族, 2008年南方医科大学毕业, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事女性生殖内分泌及妇科肿瘤研究。

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2017)01-00001-05

稿件接受: 2016-11-04

文题释义:

慢病毒载体: 是指人类免疫缺陷病毒 1(HIV-1)来源的一种病毒载体, 是慢病毒载体系统的主要组成部分。携带有外源基因的慢病毒载体在慢病毒包装质粒、细胞系的辅助下, 经过病毒包装成为有感染力的病毒颗粒, 通过感染细胞或活体组织, 实现外源基因在细胞或活体组织中表达。

MOI: 即感染复数, 一般认为 MOI 是一个比值, 没有单位, 用于病毒感染细胞的研究中, 含义是感染时病毒与细胞数量的比值。每种细胞对慢病毒的敏感性不一样, 因此通常以不同浓度的病毒液感染靶细胞并观察转染效果, 以确定细胞对该病毒载体的最适感染复数。

摘要

背景: 骨髓间充质干细胞移植后凋亡成为治疗化疗性卵巢早衰效果欠佳的主要原因。miR-21 参与细胞增殖与凋亡的调控, 有重要的抗凋亡作用。

目的: 构建 miR-21 慢病毒载体并感染骨髓间充质干细胞, 观察其对化疗药物磷酸胺氮芥诱导的骨髓间充质干细胞凋亡的影响。

方法: 构建携带 miR-21 基因慢病毒表达载体 LVX-shRNA2-rno-miR-21-5p, 双酶切及基因测序鉴定证实载体构建成功。对载体进行包装、测定病毒滴度。将慢病毒颗粒以不同感染复数(20 和 40)感染骨髓间充质干细胞, 检测感染效率, 使用 real-time PCR 法检测骨髓间充质干细胞中 miR-21 的表达。流式细胞仪、Hoechst33342 染色检测骨髓间充质干细胞在磷酸胺氮芥模拟的化疗微环境中的凋亡率。

结果与结论: ①成功构建 miR-21 慢病毒载体, 病毒滴度约为 6×10^{11} CFU/L; ②载体转染骨髓间充质干细胞效率达 90%以上; ③miR-21 组 1(感染复数为 20)、miR-21 组 2(感染复数为 40)miR-21 表达量明显高于骨髓间充质干细胞组及空载组($P=0.000$); ④转染组骨髓间充质干细胞的凋亡率、凋亡指数均低于空载组及骨髓间充质干细胞组($P=0.001$); ⑤实验成功构建大鼠 miR-21 慢病毒载体系统, miR-21 上调能抑制骨髓间充质干细胞凋亡, 促进细胞增殖。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 载体构建; miR-21; 慢病毒; 骨髓间充质干细胞; 基因转染; MicroRNAs; 细胞凋亡; 化疗性卵巢早衰; 国家自然科学基金

主题词:

卵巢疾病; 微 RNAs; 转染; 细胞凋亡; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金(81300462); 广东省科技计划项目(2012B031800123); 广东省科技计划项目(2013B021800145)

Establishment of a lentiviral vector carrying rat miR-21 gene and its effect on apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells

Fu Xia-fei, He Yuan-li, Wang Xue-feng, Chen Xiao-ying (Department of Obstetrics & Gynecology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Apoptosis in bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) occurs after transplantation, which is mainly responsible for unsatisfactory therapeutic effects on premature ovarian failure

Fu Xia-fei, M.D., Associate chief physician, Master's supervisor, Department of Obstetrics & Gynecology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

induced by chemotherapy. miR-21 participates in the regulation of cell proliferation and apoptosis, and has important anti-apoptotic effect.

OBJECTIVE: To construct a lentiviral vector for rat miR-21 and observe its effects on apoptosis of BMSCs induced by phosphoramidite nitrogen mustard.

METHODS: Rat miR-21 gene was synthesized, amplified, and connected with the lentiviral plasmid pLVX-shRNA2. Both double enzyme digestion and gene sequencing were done to identify the successful construction of the vector pLVX-shRNA2-rno-miR-21-5p. The vector was packaged, and the titer was examined. BMSCs were transfected by the vector with different multiplicities of infection (MOI=20 or 40), and the efficiency was observed. miR-21 expression in the transfected cells was detected using real-time PCR. Phosphoramidite nitrogen mustard was added into the cell culture media of BMSCs, then the apoptotic rate of BMSCs was detected by flow cytometry, and apoptotic index was examined by Hoechst33342 staining.

RESULTS AND CONCLUSION: The target gene was successfully connected with the lentiviral vector. The viral titer was 6×10^{11} CFU/L. The vector transfected BMSCs had a high efficiency above 90%. Real-time PCR results showed the expression levels of miR-21 in miR-21 group 1 (MOI=20) and miR-21 group2 (MOI=40) were higher than that in BMSCs group and blank vector group ($P=0.000$). Flow cytometry and Hoechst33342 staining results showed the apoptotic rate and apoptotic index of miR-21 transfected groups were lower than those of blank vector group and BMSCs group ($P=0.001$). Overall, we successfully established rat miR-21 lentivirus vector pLVX-shRNA2-rno-miR-21-5p and transfected it into the BMSCs. Upregulation of miR-21 could reduce BMSCs apoptosis, and enhance cell proliferation.

Subject headings: Ovarian Diseases; MicroRNAs; Transfection; Apoptosis; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81300462; the Scientific Research Plan Projects of Guangdong Province, No. 2012B031800123, 2013B021800145

Cite this article: Fu XF, He YL, Wang XF, Chen XY. Establishment of a lentiviral vector carrying rat miR-21 gene and its effect on apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(1): 1-5.

0 引言 Introduction

间充质干细胞是近年来引人注目的一种成体干细胞, 其有自我更新、诱导分化、来源广泛、自体移植避免免疫排斥等特点^[1], 在多种损伤性疾病的治疗上有着广阔的前景^[2-3]。作者前期研究证实了间充质干细胞在体内外能抑制化疗药物诱导的卵巢颗粒细胞凋亡, 修复化疗所致卵巢损伤, 部分改善卵巢内分泌功能, 但距离正常的卵巢功能还有一定差距^[4]。移植后间充质干细胞的迅速凋亡流失是导致治疗效果不佳的主要因素^[5]。MicroRNAs(miRNAs)是存在于真核生物中的由18-25个核苷酸组成的内源性非编码小分子RNA, 其功能是参与基因转录后水平的调控, 通过与靶mRNA的碱基配对, 导致靶mRNA的降解或翻译抑制, 从而进行基因表达的调控^[6-7]。研究证实miRNAs参与细胞增殖与凋亡、器官发育、分化等重要生物学事件, 发挥着巨大的调控作用^[8-9], 其中miR-21发现较早, 存在相对广泛, 全长22个核苷酸, 位于17号染色体的TMEM49基因编码区域内^[10]。miR-21的靶基因包括PTEN、TPM1、PDCD4、TIMP3等, 具有促进细胞增殖、抑制细胞凋亡的作用^[11-12]。慢病毒载体作为应用最广泛的转基因载体之一, 具有下列优点: ①可实现目的基因高效转染靶细胞并能长期稳定表达; ②慢病毒包装工艺相对简单; ③慢病毒载体经改构后, 不在宿主细胞繁殖, 不易诱发免疫反应, 不会导致宿主细胞死亡, 被它感染的细胞能连续传代, 生物安全性高^[13]。大量研究证实以慢病毒为基因转染载体, 将外源基因导入骨髓间充质干细胞中是一种可靠有效的方法^[14-15]。如能利用miR-21的抗凋亡作用提高移植间充质干细胞的存活率将显著提高疗效。因此, 实验构建miR-21的慢病毒表达载体系统, 并感染间充质干细胞, 获得稳定转染的间充质干细胞系, 加入化疗药物模拟体内卵巢微环境, 检测间充质干细胞的凋亡情况,

为进一步研究miR-21的生物学特性奠定实验基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞对照观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2013年9月至2014年3月在南方医科大学珠江医院中心实验室完成。

1.3 材料 慢病毒表达载体pLVX-shRNA2(Clontech公司); Lip2000脂质体转染试剂盒(Invitrogen公司); 限制性内切酶BamH I 和EcoR I (NEB公司); 质粒提取试剂盒(Omega公司); miR-21定量qPCR检测试剂盒(百奥迈科生物技术有限公司); 293FT细胞、Wistar大鼠骨髓间充质干细胞及其完全培养基(广州赛业生物科技有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 引物的设计与合成 根据大鼠miR-21序列(rno-miR-21-5p, MIMAT0000790, UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A), 结合pLVX-shRNA2质粒载体特点, 并引入酶切位点, 进行设计引物。序列如下: rno-mir-21-F: 5'-CGG GAT CCA GCC ACT ACC AAG GCA TGT T-3'; rno-mir-21-R: 5'-CGG AAT TCA ACC ACG ACT AGA GGC TGA C-3'。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.4.2 PCR扩增 以含有rno-miR-21-5p序列的DNA为模板进行PCR反应。PCR扩增条件: 94 °C预变性5 min, 94 °C变性20 s, 67 °C退火20 s, 72 °C延伸30 s, 共35个循环, 最后72 °C延长3 min, 4 °C保存。将扩增片段用1%琼脂糖凝胶电泳进行分离纯化, 并回收得到目的片段。

1.4.3 慢病毒表达载体pLVX-shRNA2-rno-miR-21-5p的构建与鉴定 纯化后的PCR扩增产物经BamH I 和EcoR I 进行双酶切后, 再次纯化得到rno-miR-21-5p片段。

pLVX-shRNA2空载体用BamH I 和EcoR I 进行双酶切后,回收线性化空载体。将线性化载体与纯化的PCR产物在T₄ DNA连接酶作用下置于16 ℃条件下连接过夜,转化E.coli DH5 α 感受态细胞,均匀涂在含氨苄青霉素的LB平板上,置于37 ℃条件下培养过夜。挑取少许菌落溶于LB培养液中,取1 μ L为模板,进行PCR扩增。PCR扩增条件为:94 ℃预变性5 min, 94 ℃变性20 s, 60 ℃复性30 s, 72 ℃延伸30 s, 循环35次,最后72 ℃延伸6 min。得到的PCR产物采用琼脂糖凝胶电泳法进行初步鉴定;培养阳性克隆,提取质粒,送上海英骏生物技术有限公司进行测序。

1.4.4 miR-21慢病毒载体的包装与滴度测定 转染前消化293FT细胞,重悬后接种,细胞长满70%–80%时进行转染。转染时,制备质粒混合物,加入待转染293FT细胞中,轻轻摇动混匀,37 ℃孵育5 h后弃掉培养基,PBS洗涤3次,再加入新鲜培养基,置37 ℃继续孵育至48 h。收集病毒液,过滤后分装于–80 ℃保存。取其中1管进行滴度测定。测定前1 d,将NIH3T3细胞传代置于6孔板中,细胞浓度为 1×10^8 L⁻¹,每孔2 mL。待细胞生长到大部分融合时,选2孔,分别更换为1 mL含有10 μ L和100 μ L病毒上清的完全培养基,培养箱中温育4 h,再加入不含病毒液的完全培养液3 mL继续培养48 h,将细胞按1:4传代。加入嘌呤霉素(puromycin, 1.5 mg/L)进行筛选14 d,结晶紫染色后计数克隆数。病毒滴度(CFU/mL)=克隆数/病毒原液体积(mL)×稀释度。

1.4.5 慢病毒载体pLVX-shRNA2-rno-miR-21-5p感染骨髓间充质干细胞及miR-21表达的检测 将携带miR-21基因的慢病毒液以不同MOI(分别为20和40)加入至骨髓间充质干细胞培养液中,感染24–48 h后,荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达,计算感染效率,比较两组感染效率的差异。

miR-21检测实验分4组:骨髓间充质干细胞组(不转染病毒液)、空载组(转染空载病毒液)、miR-21组1(miR-21慢病毒载体以MOI=20转染骨髓间充质干细胞)、miR-21组2(miR-21慢病毒载体以MOI=40转染骨髓间充质干细胞)。采用实时荧光定量RT-PCR方法检测各组骨髓间充质干细胞中miR-21的表达量。实验步骤严格按试剂盒说明书进行,按RNA提取试剂盒说明书步骤提取细胞总RNA。取2 ng细胞总RNA作为起始模板进行反转录反应,反应体系为10 μ L,每个指标重复3个复孔。按说明书设置反应条件,分析最终数据。

1.4.6 骨髓间充质干细胞凋亡的检测 实验分3组进行:骨髓间充质干细胞组(不转染病毒液)、空载组(转染空载病毒液)、转染组(miR-21慢病毒载体以MOI=20转染骨髓间充质干细胞)。转染24 h后,更换完全培养基进行培养,并在培养基中加入浓度为30 μ mol/L的磷酸胺氮芥(PM),作用24 h后,收集骨髓间充质干细胞,采用流式细胞仪Annexin-V法检测凋亡率。Hoechst33342染色检测凋亡指

数:骨髓间充质干细胞于37 ℃中与Hoechst 33342(5 mg/L)孵育15 min,离心,PBS漂洗2次,荧光显微镜观察。每个样本随机选取300个细胞进行统计,每组重复5个样本,取平均值。凋亡细胞表现为有蓝染细胞核,染色质凝聚呈多个亮点,凋亡指数=凋亡细胞数目/细胞总数。

1.5 主要观察指标 ①miR-21慢病毒载体滴度;②慢病毒转染骨髓间充质干细胞的效率;③RT-PCR检测转染后间充质干细胞内miR-21的表达;④转染后间充质干细胞的凋亡情况。

1.6 统计学分析 采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 t 检验,多组间比较采用单向方差(One-way ANOVA)分析法,使用多重比较SNK法比较组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 rno-miR-21-5p的扩增和序列测定 设计引物按照既定程序进行PCR扩增,所得到的PCR反应液进行琼脂糖凝胶电泳检测扩增反应产物。电泳结果显示,PCR成功特异性扩增出miR-21,得到大小为117 bp的特异性片段(图1),没有非特异性杂带,且表达量较高,光信号较强,无拖尾及弥散。

2.2 慢病毒载体pLVX-shRNA2-rno-miR-21-5p的构建与鉴定 经EcoR I 及BamH I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳鉴定,得到大小分别为7 888 bp和117 bp的片段(图2)。阳性克隆的测序结果显示重组质粒中插入的rno-miR-21-5p序列与目标序列完全一致。因此,可以证明成功构建了miR-21慢病毒载体系统。

2.3 慢病毒载体pLVX-shRNA2-rno-miR-21-5p包装与滴度测定结果 将构建的慢病毒载体pLVX-shRNA2-rno-miR-21-5p及包装质粒载体,以磷酸钙共沉淀法转染包装细胞(293FT),收集培养上清液中的慢病毒液,采用抗性克隆法测得病毒滴度为 6×10^{11} CFU/L。

2.4 慢病毒载体pLVX-shRNA2-rno-miR-21-5p转染骨髓间充质干细胞 携带miR-21基因的慢病毒液以MOI为20和40感染骨髓间充质干细胞,荧光显微镜下均可见到绿色荧光蛋白的表达(图3),转染效率分别为(93.13 $\pm$ 1.93)%、(94.57 $\pm$ 1.75)%,两组相比差异无显著性意义($t = -1.236$, $P = 0.251$)。

2.5 骨髓间充质干细胞转染载体后miR-21的表达 实时定量PCR结果显示:骨髓间充质干细胞组、空载组、miR-21组1(MOI为20)、miR-21组2(MOI为40)miR-21的表达量分别为 1.07 ± 0.05 , 1.12 ± 0.05 , 4.05 ± 0.07 , 4.06 ± 0.04 ,经单向方差分析,4组间差异有显著性意义($F = 3\ 014.962$, $P = 0.000$)。采用SNK法进行两组间比较,骨髓间充质干细胞组与空载组相比,差异无显著性意义($P > 0.05$),miR-21组1与miR-21组2的表达量高于骨髓间充质干细胞组及空载组($P < 0.05$),但miR-21组1与miR-21组2相比,差异无显著性意义($P > 0.05$),见图4。

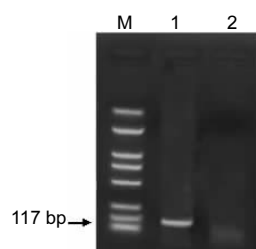


图1 PCR 成功特异性扩增出 miR-21
Figure 1 PCR electrophoresis results for miR-21
图注: M: DNA marker; 泳道 1: PCR 产物; 泳道 2: 空白对照。

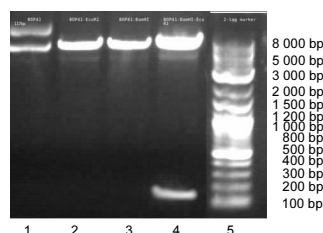


图2 酶切鉴定结果
Figure 2 Identification results of double enzyme digestions
图注: 泳道 1: 原始质粒; 泳道 2: *EcoR* I 消化产物; 泳道 3: *Bam*H I 消化产物; 泳道 4: 双酶切产物, 大小分别为 788 bp 和 117 bp; 泳道 5: 2-log marker。

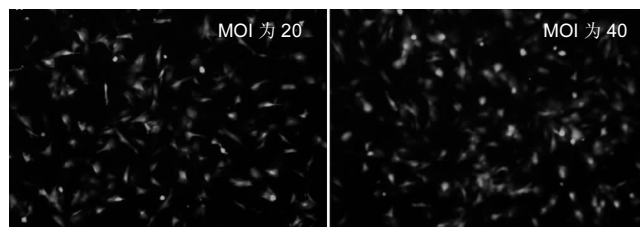


图3 慢病毒载体 pLVX-shRNA2-rno-miR-21-5p 转染骨髓间充质干细胞($\times 40$)
Figure 3 Transfection of bone marrow mesenchymal stem cells by pLVX-shRNA2-rno-miR-21-5p vector ($\times 40$)

图注: 荧光显微镜下观察两组绿色荧光蛋白的表达无显著差异。

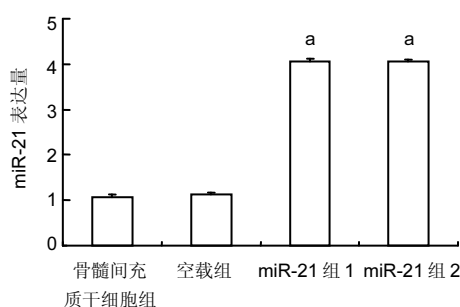


图4 各组骨髓间充质干细胞 miR-21 表达量比较
Figure 4 Comparison of miR-21 expression levels among different groups

图注: 与骨髓间充质干细胞组及空载组相比, $^aP < 0.05$ 。

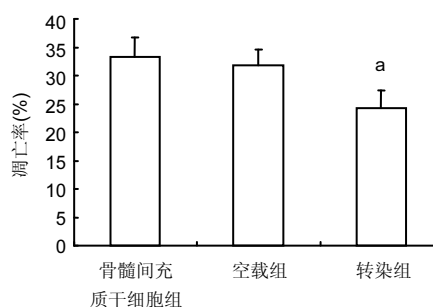


图5 各组骨髓间充质干细胞凋亡率的比较
Figure 5 Comparison of apoptotic rates among different groups
图注: 与骨髓间充质干细胞组及空载组相比, $^aP < 0.05$ 。

2.6 骨髓间充质干细胞的凋亡 流式细胞仪结果显示, 骨髓间充质干细胞组、空载组、转染组的凋亡率分别为 $(33.33 \pm 3.42)\%$, $(31.74 \pm 2.93)\%$, $(29.78 \pm 3.06)\%$ 。经单向方差分析, 3组间差异有显著性意义 ($F=11.777$, $P=0.001$)。采用SNK法进行两组间比较, 骨髓间充质干细胞组与空载组相比, 差异无显著性意义, 转染组的凋亡率低于骨髓间充质干细胞组及空载组, 见图5。

Hoechst33342染色结果显示: 骨髓间充质干细胞组、空载组、转染组的凋亡指数分别为: $(34.36 \pm 4.24)\%$, $(35.73 \pm 3.6)\%$, $(24.48 \pm 3.17)\%$, 经单向方差分析, 3组间差异有显著性意义 ($F=13.144$, $P=0.001$)。采用SNK法进行两组间比较, 骨髓间充质干细胞组与空载组相比, 差异无显著性意义, 转染组的凋亡指数低于骨髓间充质干细胞组及空载组, 与流式细胞仪凋亡结果一致。表明在加入化疗药物诱导模拟卵巢局部微环境, 骨髓间充质干细胞转染miR-21慢病毒载体后, 其凋亡受到抑制, 从而促进细胞的增殖, 提高细胞的存活率, 有利于骨髓间充质干细胞功能的持续发挥与作用。

3 讨论 Discussion

miR-21是一类重要的miRNA分子, 存在广泛, 具有促进细胞增殖、抑制细胞凋亡的作用^[16]。miR-21在多种肿瘤

如胶质瘤、乳腺癌、结肠癌、肝癌等组织中高表达^[11, 17]。由于miRNA与靶mRNA的不完全互补性, 使得一个miRNA可以调控成百上千个靶基因的表达, 构成一个相互联系、相互影响的复杂调控网络。因此, 以miRNA为靶点的治疗效率远高于针对单一靶基因, 而另一方面使得靶基因的验证变得异常困难。纽约大学比较功能基因组中心预测可能受miR-21调控的靶标约190个之多^[18]。目前研究得较多的是PDCD4、PTEN、TPM1, 它们在细胞凋亡与增殖中发挥重要作用^[16, 19]。

病毒载体的选择有多种, 包括慢病毒载体、腺病毒载体、反转录病毒等。慢病毒载体的最大特点在于可以同时感染分裂期和非分裂期的细胞, 感染细胞谱广, 感染效率高, 能在体内长期、稳定、高效表达, 且安全性良好, 应用范围较其他病毒载体更广泛, 在基因治疗中有着广阔的应用前景^[20], 因此实验选择慢病毒载体系统。

实验成功构建了miR-21慢病毒载体系统pLVX-shRNA2-rno-miR-21-5p, 并感染骨髓间充质干细胞, 获得稳定转染miR-21的细胞系(miR-21-MSCs)。首先, 以rno-miR-21-5p序列为模板, 设计合成引物, 采用PCR法扩增目的基因后, 连接到慢病毒表达质粒pLVX-shRNA2中, 对重组质粒进行双酶切鉴定及测序, 证实成功构建了rno-miR-

21-5p慢病毒表达载体, 命名为pLVX-shRNA2- rno-miR-21-5p。获得的载体滴度高, 成功感染骨髓间充质干细胞, 转染效率达90%以上。经real time PCR检测, 转染骨髓间充质干细胞后, miR-21的表达量增加, 差异有显著性意义。

作者前期研究证实了骨髓间充质干细胞在体内外能抑制化疗药物诱导的卵巢颗粒细胞凋亡, 修复化疗所致卵巢损伤, 部分改善卵巢内分泌功能, 但不能达到完全修复的效果, 其主要因素是移植后的骨髓间充质干细胞迅速大量凋亡^[4]。因此实施预处理提高移植细胞的存活率是提高疗效的关键所在。在实验中, 转染miR-21慢病毒载体预处理, 在培养基中加入环磷酸腺苷的活性代谢产物磷酸腺苷芥(PM)模拟化疗性卵巢早衰的局部微环境, 检测转染后骨髓间充质干细胞凋亡情况, 结果发现骨髓间充质干细胞凋亡率显著下降, 表明miR-21表达上调能抑制骨髓间充质干细胞的凋亡, 增强其存活能力。miR-21抑制骨髓间充质干细胞凋亡与其调控的靶基因密切相关^[21]。研究表明, PTEN的脂质磷酸酶活性使细胞周期停滞, 同时可影响PI3K活性、控制Akt磷酸化, 激活其下游信号, 影响细胞黏附、分化及转移, 从而抑制细胞凋亡, 促进细胞增生^[22]。miR-21可能通过调控PTEN等靶基因抑制骨髓间充质干细胞凋亡, 但其具体机制有待进一步研究。

作者贡献: 付霞霏负责研究命题的提出、设计、数据的获取及分析、论文的修改, 是实验过程的主要负责人; 王雪峰、陈小莹参与研究过程的实施; 陈小莹参与论文的起草; 何援利负责论文最终版本确定。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Bianco P. "Mesenchymal" stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:677-704.
- [2] Glavaski-Joksimovic A, Bohn MC. Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2013;247:25-38.
- [3] Mathiasen AB, Qayyum AA, Jørgensen E, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with severe ischaemic heart failure: a randomized placebo-controlled trial (MSC-HF trial). *Eur Heart J.* 2015; 36(27):1744-1753.

- [4] Fu X, He Y, Xie C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage. *Cytotherapy.* 2008;10(4):353-363.
- [5] 林楚伟, 周胜华, 戴海鹰, 等. 骨髓间充质干细胞移植大鼠梗死心肌后的存活状况[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(41):6628-6632.
- [6] Amiel J, de Pontual L, Henrion-Caude A. miRNA, development and disease. *Adv Genet.* 2012;80:1-36.
- [7] Dalmay T. Mechanism of miRNA-mediated repression of mRNA translation. *Essays Biochem.* 2013;54:29-38.
- [8] Mezzanzanica D, Canevari S, Cecco LD, et al. miRNA control of apoptotic programs: focus on ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* 2011;11(3):277-286.
- [9] Virant-Klun I, Ståhlberg A, Kubista M, et al. MicroRNAs: From Female Fertility, Germ Cells, and Stem Cells to Cancer in Humans. *Stem Cells Int.* 2016;2016:3984937.
- [10] Ren J, Zhu D, Liu M, et al. Downregulation of miR-21 modulates Ras expression to promote apoptosis and suppress invasion of Laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 2010;46(18):3409-3416.
- [11] 熊兵红, 马利, 程勇, 等. miR-21在大肠癌中的表达及其靶基因探讨[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2014, 34(3):281-286.
- [12] Sandhir R, Gregory E, Berman NE. Differential response of miRNA-21 and its targets after traumatic brain injury in aging mice. *Neurochem Int.* 2014;78:117-121.
- [13] 张薇, 赵志英, 张坤. 慢病毒载体及应用研究进展[J]. *包头医学院学报*, 2011, 27(5):107-109.
- [14] 赵铁军, 倪伟海, 郑有芳, 等. 慢病毒载体及其介导的RNA干扰在基因治疗中的应用研究[J]. *浙江师范大学学报:自然科学版*, 2014, 37(2):206-211.
- [15] 景黎君, 贾永林, 鲁晶晶, 等. MicroRNA-9-1慢病毒载体的构建及其对小鼠骨髓间质干细胞诱导分化为神经细胞的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(2):326-331.
- [16] Ma WJ, Lv GD, Tuersun A, et al. Role of microRNA-21 and effect on PTEN in Kazakh's esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Biol Rep.* 2011;38(5):3253-3260.
- [17] 方国强, 吴炳礼, 李恩民, 等. miR-21与肿瘤[J]. *癌变·畸变·突变*, 2010, 22(1):65-70.
- [18] Si ML, Zhu S, Wu H, et al. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene.* 2007;26(19):2799-2803.
- [19] Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene.* 2008;27(15): 2128-2136.
- [20] 毛颖佳, 郑源强, 石艳春. 慢病毒载体及其应用的研究进展[J]. *中国生物制品学杂志*, 2009, 28(2):196-200.
- [21] Wu T, Liu Y, Fan Z, et al. miR-21 Modulates the Immunoregulatory Function of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Through the PTEN/Akt/TGF-β1 Pathway. *Stem Cells.* 2015;33(11):3281-3290.
- [22] Xiong B, Cheng Y, Ma L, et al. MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells. *Int J Oncol.* 2013;42(1): 219-228.