分类号：R3 单位代码：10752

密 级：公 开 学 号：20120038

**宁夏医科大学**

**硕士研究生学位论文**

MicroRNA-126 对 INS-1 细胞功能的调控作用

The role of microRNA-126 in regulation of INS-1 cells function

学 位 申 请 人： 张 荣 华

指 导 教 师： 袁 文 俊 教授

申请学位门类级别： 理 学

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 专 | 业 | 名 | 称： 生 理 学 |
| 研 | 究 | 方 | 向： 心 血 管 生 理 学 |

所 在 学 院： 基 础 医 学 院

论 文 完 成 日 期： 二○**一**五年四月

宁夏医科大学研究生院

**Ningxia Medical University Thesis for Application of Master’s Degree**

The role of microRNA-126 in regulation of INS-1 cells function

Student’s Name: Zhang Ronghua

Supervisor: Yuan Wenjun professor Subject Category: Science

Major: Physiology

Specialty: Cardiovascular Physiology

School: Basic Medical College Completion Date: Apr.2015

**宁夏医科大学学位论文独创性声明**

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是个人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果，无抄袭及编造行为。除文中已经特别加以注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体， 均已在文中以明确方式标明并致谢。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

论文作者签名＿＿＿＿＿ 论文导师签名＿＿＿＿＿

年 月 日 年 月 日**宁夏医科大学关于学位论文使用授权的声明**

宁夏医科大学有权保留使用本人学位论文，同意学校按规定向国 家有关部门机构送交论文的复印件和电子版，允许被查阅和借阅。本人授权宁夏医科大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复印手段保存和汇编本学位论文。可以公布（包括刊登）论文的全部或部分内容。

（保密论文在解密后应遵守此规定）

论文作者签名＿＿＿＿＿ 论文导师签名＿＿＿＿＿ 年 月 日 年 月 日

万方数据

**MicroRNA-126对INS-1细胞功能的调控作用**

摘**要**

**研究背景**

糖尿病（diabetes mellitus, DM）是一种常见的内分泌代谢性疾病。其基本病理特点为胰岛素分泌绝对或相对不足，或外周组织对胰岛素不敏感，以糖代谢紊乱为主，包括脂肪、蛋白质代谢紊乱的一种全身性疾病。糖尿病的患病率在全球逐年增长。据世界卫生组织WHO估计，至2030年，全球糖尿病患病人数将达3亿。据估计，中国现有成人糖尿病患者9240万，已成为世界糖尿病人数最多的国家。在糖尿病患者中90%以上是

Ⅱ型糖尿病，严重影响人们的健康。糖尿病发病机理较为复杂，而胰岛素抵抗在Ⅱ型糖尿病的发生过程中扮演重要角色，但胰岛素抵抗的机制尚不明确。

胰岛素是一种蛋白质类激素，由体内胰岛β细胞分泌，体内唯一降血糖激素。胰岛素信号通路涉及多个环节，其中钙离子浓度的变化对胰岛素的分泌有重要影响。有文献报道，在胰岛素信号通路中存在着microRNA(miRNA, miR) -126的作用靶点，且本实验室前期工作证实胰岛素受体底物1（IRS-1）也是其作用靶点。但是miR-126是否影响胰岛β细胞合成和释放胰岛素尚不明确。本课题利用胰岛瘤B细胞（INS-1）模型，研究miR-126对INS-1细胞电压敏感钙通道电流、钙离子浓度及胰岛素分泌量的影响。

**实验方法**

1. 铺种INS-1细胞，24h后转染40nM的不同miRNA,转染时间为48h，人工合成胰岛素100nM刺激细胞12h。荧光定量PCR检测INS-1细胞中miR-126基因的表达水平。

2. 激光共聚焦技术检测INS-1细胞内钙离子浓度变化，分组：①阴性对照组（NC）组，转染nonsense strand；②miR-126过表达（miR-126m）组，转染miR-126 mimic；

③miR-126低表达（miR-126i）组，转染miR-126 inhibitor；④阳性对照（miR-375m）组，转染miR-375 mimic。

Ⅰ

## 3. 穿孔膜片钳技术检测INS-1细胞膜上电压敏感钙通道电流，分组：阴性对照（NC）组和miR-126m组。

4. Elisa实验和流式细胞仪，分别检测INS-1细胞胰岛素分泌量及线粒体膜电位变化，分组：阴性对照（NC）组，miR-126m组，miR-126i组，阳性对照（miR-375m）组。

**实验结果**

1. 荧光定量PCR结果显示：与NC组基因miR-126（107.26±37.88，n=4）的表达量相比，miR-126m组（398.77±53.72，n=4）的基因表达量显著升高（P<0.01）；而miR-126i组（20.26±7.827，n=4）的基因表达量较NC组的明显下降（P<0.05）。

2. 激光共聚焦技术检测INS-1细胞内钙离子浓度，结果显示：基础葡萄糖（5.6mM葡萄糖）刺激细胞，miR-126m组细胞内钙离子浓度较NC组明显升高（P<0.05），miR-126i组细胞内钙离子浓度较NC组显著降低（P<0.05）；高浓度葡萄糖（16.8mM葡萄糖）刺激细胞，miR-126m组细胞内钙离子浓度和NC组无显著差异（P> 0.05）；miR-126i组细胞内钙离子浓度较NC组显著降低（P<0.05）。穿孔膜片钳技术检测细胞膜电压敏感钙通道电流，结果显示：与NC组相比，miR-126m组细胞钙离子内流增加（P<0.05）。

3. Elisa实验检测胰岛素分泌量，结果显示：基础胰岛素分泌量miR-126m组较NC组分泌量增加（P<0.05）；miR-126i组胰岛素分泌量较NC组显著降低（P<0.05）；高浓度葡萄糖刺激细胞，其胰岛素分泌量：miR-126m组胰岛素分泌量和NC组无显著差异

（P> 0.05）；miR-126i组胰岛素分泌量较NC组显著降低（P<0.05）。流式细胞仪检测线粒体膜电位，结果显示：与NC组相比，miR-126m组和miR-375m组细胞凋亡增加（P<0.05），miR-126i组细胞凋亡降低（P<0.05）。

**实验结论**

## 1. 过表达miR-126可以增加INS-1细胞内钙离子浓度，并且使钙离子内流增加；

## 2. 过表达miR-126增加INS-1细胞基础胰岛素分泌量,但能诱导细胞凋亡。

**关键词** Ⅱ型糖尿病； microRNA-126； 钙离子； 胰岛素； INS-1； 细胞

Ⅱ

**The role of MicroRNA-126 in regulation of INS-1 cells function**

**Abstract**

**Background**

Diabetes mellitus (diabetes mellitus, DM) is a common endocrine and metabolic disease, pathologically characterized by absolute or relative deficiency of insulin secretion, or

Insensitivity of the peripheral tissues to insulin, disturbance of glucose metabolism including disorder protein and fat metabolism. The incidence of DM is on the rise yearly worldwide. According to the WHO estimates, the global number of DM will reach 300 million in 2030. It is estimated that China now has 92.4 million diabetic adults, accounting for the largest population of DM in the world. More than 90% DM patients suffer from type 2 diabetes (DM2), seriously affecting their health. The pathogenesis of DM is complex, insulin

Resistance plays an important role in the process of the occurrence of DM2, but the exact

Mechanism of insulin resistance remains unclear.

Insulin, the only hypoglycemic hormone of the human body, is a protein hormone secreted by pancreatic beta cells. Insulin signaling pathway involves a number of physiologic processes, including the change of calcium concentration on insulin secretion. It is reported that there exist MiRNA-126 targets in the insulin signaling pathway. The previous work in our laboratory has also confirmed that insulin receptor substrate 1 (IRS-1) is the target. But whether miR-126 affects insulin synthesis and release of pancreatic beta cells remains unclear. In the present study, we used an insulinoma B cells (INS-1) model to investigate on the

Ⅲ

Impact of MiRNA-126 on the calcium channel current of INS-1 cells, calcium ion concentration and insulin secretion.

**Methods**

1. INS-1 cells were plated on culture plates. Different miRNAs were transfected with 40nM in INS-1 cells after 24h. The transfection time was 48h, INS-1 cells were then stimulated with 100nM synthetic insulin for 12h. miR-126 gene expression in INS-1 cells was detected by fluorescence quantitative PCR.

2. Using confocal laser technology, changes in INS-1 intracellular calcium concentrations were detected in four groups: negative control (NC) group without transfection, miR-126m group transfected with miR-126 mimics (miR126m group), miR-126i group transfected with miR-126 inhibitor (miR-126i group), and the positive control group, transfected with miR-375mimics(miR-375m group).

3. Using the perforated patch clamp technique, INS-1 cell membrane calcium channel currents were detected in NC group and miR-126m group .

4. Using ELISA and flow cytometry, changes in the amount of insulin and secretionmi tochondrial membrane potential were detected in NC group, miR-126m group, miR-126i group, and miR-375m group.

**Result**

1. Compared with NC group (107.26±37.88), the expression level of miR -126m group was significantly increased (398.77±53.72 vs., p<0.05), and significantly decreased in miR-126i group (20.26±7.827, P <0.05).

2. Detection of the INS-1 intracellular calcium concentration by confocal laser technology showed that the basis of glucose (glucose 5.6mM) stimulated the cells: compared with NC

Ⅳ

Group, the calcium ion concentration in miR-126m group was significantly higher (P

<0.05), and significantly lower in miR-126i group (P <0.05); high concentration of glucose (16.8mM) stimulated the cells. There was no difference in the intracellular calcium ion concentration bettween miR-126m group and NC group (P> 0.05), It was significantly low in

MiR-126i group (P <0.05). Detection of INS-1 cell membrane calcium channel currents by the perforated patch clamp technique showed that calcium influx was increased in miR-126m group as compared with NC group (P <0.05).

3. ELISA detection of insulin secretion showed that compared the NC group, basal insulin secretion in miR-126m group was increased, and decreased in miR-126i group significantly. Insulin secretion showed no significant difference in the high glucose concentration between miR-126m group and NC group (P> 0.05), and it was significantly lower in miR-126i group (P

<0.05). Flow cytometry for mitochondrial membrane potential showed that compared with NC group, apoptosis in miR-126m group was increased (P <0.05), and decreased in miR-126i group (P <0.05).

**Conclusion**

1. MiR-126 over-expression could increase the intracellular calcium ion concentration and calcium influx of INS-1 cells .

2. Over-expression of miR-126 could increase basal insulin secretion and induce apoptosis.

**KEYWORDS** microRNA-126; Type 2 diabetes mellitus; Calcium ion; Insulin; INS-1

cell

Ⅴ

**英文缩写说明**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **缩写** | **英文** | **中文** |
| STZ | Streptozotocin | 链脲菌素 |
| VDCC | Voltage-dependent calcium channel | 电压依赖钙通道 |
| KATP | ATP-sensitive K+ channels, KATP | 电压敏感钾通道 |
| 3'UTR | 3'untranslated region | 3'非翻译区 |
| INS-1 | Insulinoma | 大鼠胰岛 β 细胞瘤株 |
| microRNA | MiRNA, miR | 微小 RNA |
| IR | Insulin resistance | 胰岛素抵抗 |
| PBS | Phosphate buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |
| NC | Negative Control | 阴性对照 |
| DMSO | Dimethy1 sulfoxide | 二甲基亚砜 |
| GSIS | Glucose-stimulated insulin secretion | 葡萄糖刺激胰岛素分泌 |
| GLUT-2 | Glucose transporter-2 | 葡萄糖转运蛋白-2 |
| GK | Glucokinase | 葡萄糖激酶 |
| DM | Diabetes mellitus | 糖尿病 |
| Egfl7 | Epidermal growthfactor－likedomain7 | 表皮生长因子样结构域 7 |
| NSCLC | Nonsmall cell lung cancer | 非小细胞肺癌 |
| IRS-1 | Insulin receptor substrate 1 | 胰岛素受体底物 1 |
| Ica,v | Voltage-dePendentealciumeurrents | 电压敏感钙电流 |
| PCR | Polymerase Chain Reaction | 多聚酶链反应 |

Ⅵ

目 录

[摘要](#_Toc686566995) 3

**[Abstract](#_Toc686566996)** 4

[前言](#_Toc686566997) 8

[第一部分 人工干扰INS-1细胞内miRNA-126基因的表达](#_Toc686566998) 10

[前言](#_Toc686566999) 10

[第二部分 MicroRNA-126对INS-1细胞内钙离子浓度及Ica, v的影响](#_Toc686567000) 16

[前言](#_Toc686567001) 16

[第三部分 miR-126对INS-1细胞胰岛素分泌量及凋亡的影响](#_Toc686567002) 23

[前言](#_Toc686567003) 23

[结论](#_Toc686567004) 27

[参考文献](#_Toc686567005) 28

[参考文献](#_Toc686567006) 30

Ⅶ

前**言**

糖尿病是一组由于胰岛素分泌缺陷和或胰岛素作用障碍所致的以高血糖为特征的代谢性疾病，分为Ⅰ型和Ⅱ型糖尿病。据WHO报告估计，目前全球糖尿病患者已达到

### 3.4 亿人，其中90%以上为Ⅱ型糖尿病患者[1, 2]，至2030年全世界将超过5.5亿人受到

Ⅱ型糖尿病的困扰[3]。Ⅱ型糖尿病又称为胰岛素抵抗型糖尿病，胰岛素抵抗（insulin resistance, IR）是指胰岛素作用的靶器官对胰岛素反应性下降，即正常剂量的胰岛素产生低于正常[生物学](http://baike.baidu.com/view/7868.htm)效应的一种状态。据一项调查研究显示，中国20岁—79岁的Ⅱ型糖尿病患者已达0.9亿，预计到2030年将超过1.29亿[3, 4]。Ⅱ型糖尿病严重威胁着

21世纪人类的健康 。

**Ⅱ型糖尿病与microRNA**

近年来的研究发现，在Ⅱ型糖尿病的发生发展中microRNAs(miRNA, miR)扮演非常重要的角色。MicroRNAs是一大类由21-25个核苷酸组成的单链小RNA，具有很高的保守性[5]。MiRNA在RNA聚合酶Ⅱ的作用下转录生成较长的初级miRNA (pri-miRNA)，初级miRNA含有帽子和多聚腺苷酸尾巴（polyA）结构, pri-miRNA经RNA酶Ⅲ核酸内切酶Drosha-DGCR8复合体剪切，形成约70个核苷酸的发夹状RNA，称为前体miRNA (pre-miRNA)[6]. pre-miRNA经转运蛋白exportin-5转运出细胞核进入细胞质，由细胞质中的Dicer酶剪切成为miRNA双链结构，在解螺旋酶的作用下分离为两条单链，一条

miRNA被降解，另外一条形成成熟的单链miRNA[7],成熟的miRNA与Argonaute蛋白家族成员结合形成RNA沉默复合物Risc，从而识别靶基因调控生物体的生命活动[8]。如果

miRNA与靶mRNA的3’UTR不完全匹配，则抑制靶基因的翻译；如果完全匹配则降解靶

mRNA,阻断该基因的翻译过程。

miRNA不仅对调控正常的生命活动十分重要，也已经证实在包括Ⅱ型糖尿病等多种疾病中具有重要意义，而且表现出与健康机体不一致的异常表达。kovacs等[9]发现，STZ诱导的糖尿病大鼠(TZDM)的视网膜和视网膜内皮细胞中有多种miRNA的表达发生变化，其中miR-132, miR-21，miR-155，及miR-146表达上调；miR-20a及miR-18a等表达

1

下调。TZDM和健康对照组血浆中已鉴定出已知395种miRNA,筛选出表达有统计学差异的miRNA有36种。在TZDM组血浆中发现29种miRNA表达上调，7种则表达下调。miR-99b、miR-10b、miR-486-sp和miR-182在转染miR-126模拟物TZDM组血浆中表达上调，经实时荧光PCR实验证实其差异性较稳定。因此，血浆miRNA可做为一种用于TZDM的早期诊断的生物标志物[10]。

miR-375可以抑制肌营养素（Mtpn）的表达，肌营养素是一种能够影响胰岛素颗粒融合细胞膜的蛋白。miR-375对胰岛素的合成无影响，仅仅影响胰岛素的分泌，对胰岛素的分泌调节作用很关键[11]。但是miR-375的调节机制与细胞内钙离子信号传导通路没有关系。

miR-9增加Granuphilin蛋白的表达，抑制葡萄糖诱导的胰岛素分泌[12]。将胰岛

β细胞系MIN6置于不同浓度的葡萄糖环境中，结果发现在高浓度葡萄糖溶液中，大多数miRNA包括miR-124a, miR-107,和miR-30d等表达上调，而miR-296, miR-484和miR-690表达下调[13]。

**胰岛β细胞的胰岛素分泌与凋亡**

胰岛素由胰岛β细胞分泌，由51个氨基酸组成的蛋白质激素，有α、β两条肽链。参与葡萄糖代谢、糖原生成和糖异生等生命活动，维持机体血糖稳定，是体内唯一降血糖激素。影响胰岛素分泌的因素很多，主要因素有葡萄糖浓度、细胞因子及内分泌激素等，机体通过协调整合各种影响胰岛素分泌的因素，使胰岛素的分泌量维持在适当水平。

葡萄糖刺激胰岛素分泌过程(glucose-stimulated insulin secretion, GSIS)：葡萄糖通过葡萄糖转运蛋白-2（glucose transporter-2, GLUT-2）进入胰岛β细胞内，经葡萄糖激酶（glucokinase, GK）磷酸化生成6-磷酸葡萄糖（glucose 6-phosphate, G-6-P），再通过糖代谢过程中一系列酶的作用生成丙酮酸。线粒体接纳丙酮酸后，通过三羧酸循环氧化分解。磷酸化反应催化ADP变成ATP, ADP的减少及ATP的增加导致细胞质内ATP/ADP比率升高，ATP敏感钾离子通道（ATP-sensitive K+ channels, KATP）关闭，K+的外向电流降低，胰岛β细胞发生去极化。去极化使电压依赖性钙通道

2

（voltage dependent Ca2+channel, VDCC）被激活，钙离子内流，触发胰岛素颗粒的胞吐，将胰岛素分泌到细胞外[14, 15]。

在生理环境下，葡萄糖刺激的胰岛素分泌呈双相式，第1相在葡萄糖刺激后1min开始，3-5分钟内达到高峰，持续约10分钟后结束，主要是胰岛β细胞上的分泌颗粒迅速释放胰岛素所致。葡萄糖刺激胰岛素的1相分泌可作为胰岛β细胞功能损伤的最早

标志[16]。胰岛素第2相分泌在1相分泌结束之前就已经缓慢开始，对葡萄糖呈现依赖性，

直至葡萄糖含量降低至基本水平，且2相分泌量远大于1相分泌。

胰岛素的分泌过程比较复杂，电压依赖性钙通道（voltage dependent

Ca2+channel，VDCC）在这个过程占据中心地位[17]。在胰岛β细胞上主要分布着L型钙通道和非L型钙通道，主要是L型钙通道[18]。钙离子调节胰岛素分泌通过四种方式：

（1）Ca2+通道的开放与关闭；（2）细胞内钙库的释放与否；（3）质膜和细胞器膜上的Ca2+泵；（3）胞内Ca2+结合分子，即钙缓冲。胰岛素的1相分泌是由于细胞内钙库的释放，2相分泌由于细胞外钙离子的内流所致。钙离子全程参与胰岛素的分泌过程，对维持胰岛

β细胞的分泌功能十分重要。

线粒体功能损伤以ATP生成减少为主要特征，致使机体能量供需失衡，进而诱发胰岛素抵抗（IR），最终导致Ⅱ型糖尿病的发生[19]。线粒体主要功能是为细胞及机体提供能量，产能过程生成大量自由基，因此是一种比较容易受损的细胞器。线粒体本身就是钙库，参与调节细胞内钙离子的浓度。线粒体通路是细胞凋亡主要通路之一，Ca2+的升高参与线粒体凋亡的早期阶段[20]。线粒体的高渗透性，对钙离子的过量摄取使线粒体内钙离子浓度超过其容纳限度，导致线粒体凋亡通路的启动。在细胞凋亡早期，线粒体出现内膜渗透性改变，通透性增加、Ca2+的摄入、跨膜电位降低、细胞色素C和凋亡诱导因子的释放等[21]。在凋亡小体中miR-126的含量比较丰富，miR-126通过调节CXCL12参与血管内皮细胞凋亡过程[22]。

目前关于miR-126与胰岛素的分泌调节尚不清楚，本课题拟从以下几个方面探讨miR-126与胰岛素分泌的联系：

3

1. 人工干扰INS-1细胞内miR-126基因的表达水平，检测其转染效率，为后续实验提供细胞模型；

2．采用激光共聚焦技术检测INS-1细胞转染miR-126模拟物后细胞内钙离子浓度变化；膜片钳技术检测INS-1细胞膜钙通道电流变化；

3. 应用Elisa法检测各组INS-1细胞胰岛素分泌情况；通过流式细胞仪检测线粒体膜电位变化，观察转染miR-126模拟物后INS-1细胞的早期凋亡情况。

4

# 第一部分 人工干扰INS-1细胞内miRNA-126基因的表达

前**言**

近年来，随着人口老龄化和生活方式的变化，Ⅱ型糖尿病患者越来越多，其病因尚不十分明确，一般药物难以根治，并且需要终身治疗，严重威胁人们的健康。虽然Ⅱ型糖尿病的病因并不十分明确，但胰岛素抵抗（IR）被公认为Ⅱ型糖尿病的主要发病机理。近年来研究发现许多microRNA参与Ⅱ型糖尿病的发病过程，有些microRNAs在糖尿病早期外周血中异常表达，可作为Ⅱ型糖尿病早期诊断和治疗的潜在靶标。

本实验通过向大鼠胰岛瘤B细胞株（INS-1）细胞转染miR-126 mimic/inhibitor，人工干扰细胞内miR-126的表达，再经12h胰岛素刺激后检测INS-1细胞内miR-126的表达水平。

**材料与方法**

## 1. 材料

### 1.1 实验细胞：INS-1（大鼠胰岛B细胞瘤株）上海艾研生物科技有限公司

### 1.2 主要试剂

（1）RPMI-1640培养基：Gibco公司

（2）胎牛血清：Gibco公司

（3）0.25%胰蛋白酶：Gibco公司

（4）Trizol: Invitrogen公司

（5）丙酮酸钠：上海博光生物科技有限公司

（6）磷酸盐缓冲液（PBS）: Hyclone公司

（7）β-巯基乙醇：Gibco公司

（8）青-链霉素: Hyclone公司

（9）DMSO: Solarbio公司

（10）反转录试剂盒：Thermo公司

5

（11）转录试剂lipofectamine2000: Invitrogen公司

（12）转染优化培养基Opti-MEMI: Gibco公司

（13）micRNA-126-3p/ inhibitor: 上海吉玛基因公司

（14）Negative Control: 上海吉玛基因公司

（15）胰岛素：sigma公司

（16）DNA Marker: 北京天根

（17）琼脂糖：上海增健有限公司

（18）SYBR Green Real-time定量PCR: Thermo公司

（19）RNAase-free ddH2O:北京天根

（20）U6反转录引物（随机引物）：Invitrogen公司

（21）U6 Reverse primer: Invitrogen公司

（22）miR-126RT-引物：Invitrogen公司

（23）U6 Foword primer: Invitrogen公司

（24）miR-126 Foword primer: Invitrogen公司

（25）MiR-126 Reverse primer: Invitrogen公司

### 1.3 实验仪器

（1）CO2培养箱：HEAL PORCE

（2）倒置显微镜：日本Olympus公司

（3）无菌超净工作台：苏州智净化设备有限公司

（4）-80℃低温冰箱：中科美菱

（5）电热恒温鼓风干燥箱：上海精宏实验设备有限公司

（6）电子分析天平：梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司

（7）高压锅：TOMY

（8）台式低速离心机：安徽中科中佳科学仪器有限公司

（9）4℃冰箱：青岛海尔

6

（10）高速离心机：长沙平凡仪器仪表有限公司

（11）制冰机：Grant

（12）液氮罐：成都金凤容器

（13）磁力搅拌器：上海泸西仪器厂

（14）移液器：eppendorf

（15）荧光定量PCR仪：美国Bio-Rad公司

（16）琼脂糖凝胶电泳槽：北京六一仪器厂

（17）凝胶图像处理系统：上海天能科技有限公司

### 1.4 主要溶液配制

（1）1640完全培养液：RPMI-1640培养基500ml,10%的胎牛血清，0.11g/L丙酮酸钠，50uMβ-巯基乙醇和1%青-链霉素。

（2）细胞冻存液：1640完全培养基：胎牛血清：DMSO = 5:4.3:0.7

(3)磷酸盐缓冲液(PBS): NaCl 8.0g, NaHPO4•12H2O 2.885g, KCl 0.2g, KH2PO4

0.2g，用ddH2O定容至1000ml。

（4）50³TAE: Na2EDTA²2H2O 37.2g，tris 242g，，加入500ml的去离子水，置于磁力搅拌器上进行溶解，加入57.1ml的醋酸混匀，用ddH2O定容至1000ml，使用时，稀释50倍，常温保存。

## 2. 实验方法

### 2.1 细胞培养：

（1）INS-1细胞株的培养

INS-1细胞株是一种大鼠胰岛瘤B细胞。INS-1细胞用RPMI-1640培养基培养（培养基内含有11.1mM的葡萄糖），另外再加入10%的胎牛血清，0.11g/L丙酮酸钠，50μMβ-巯基乙醇和1%的青-链霉素，于37℃、95%空气和5% CO2培养。

（2）INS-1细胞株的传代

打开培养瓶，吸出或者倒掉培养瓶内旧的培养液；向细胞瓶内加入2-3mlPBS缓冲液清洗2次，清洗后吸除瓶内剩余PBS，加入0.05%胰蛋白酶1-2ml，轻轻摇动，使消

7

化液流变所有细胞，室温消化细胞，观察大量贴壁细胞滑落下来时加入2-4ml完全培养基终止消化（消化时间为2-4min）。用移液器吹打瓶壁细胞，使细胞脱离瓶壁形成细胞悬液，转移至15ml离心管中，1000rmp，离心5min，缓慢弃上清（以免丢失细胞团），于离心管中加入2ml新鲜完全培养基，吹打悬浮细胞，按照1: 2/1:3比例进行细胞传代，轻轻摇晃细胞瓶，使细胞均匀地铺在瓶底。细胞密度不宜过低，保持传代接种后细胞密度在50%左右较好。

（3）INS-1细胞株的复苏

将装有INS-1细胞的冻存管从液氮中取出，迅速放入提前打开的37℃水浴锅中，缓慢摇晃至细胞悬液解冻，将细胞悬液迅速转移到15ml离心管中，加入2-3ml完全培养液，1000rmp，离心5min，缓慢弃上清，在离心管中加入1ml完全培养基，吹打悬浮细胞，接种到培养瓶中，放入CO2培养箱中培养。

（4）INS-1细胞株的冻存

打开培养瓶，吸出或者倒掉培养瓶内旧的培养液；向细胞瓶内加入2-3mlPBS缓冲液清洗2次，清洗后吸除瓶内剩余PBS，加入0.05%胰蛋白酶1-2ml，轻轻摇动，使消化液流变所有细胞，室温消化细胞，得到细胞悬液进行计数，离心弃上清；加入冻存液

（完全培养基：胎牛血清：DMSO=5:4.3:0.7）使细胞密度达到1X106以上；每个冻存管加入1ml细胞悬液，将细胞管放入冻存盒，转移至-80℃低温冰箱，过夜后将冻存管放入液氮中长久保存。

### 2.2 细胞转染：

转染人工合成microRNA（以六孔板为例）序列：

Negative control oligo: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC AGG UTT-3' miRNA-126-3p mimics: 5'-UCG UAC CGU GAG UAA UAA UGC G-3' miRNA-126 inhibitor: 5'-CGC AUU AUU ACU CAC GGU ACG A-3' miRNA-375 mimics: UUU GUU CGU UCG GCU CGC GUG A-3'

Negative control oligo（NC）为阴性对照是无意义的随机序列，miRNA-126-3p mimics

8

（miR-126m）、miRNA-126 inhibitor（miR-126i）和miRNA-375（miR-375m）转染INS-1细胞，转染浓度40nM，转染48h。

（1）接种细胞于培养板中，接种密度为40%-60%，在不含双抗的10%FBS RPMI-1640培养基中培养24h后进行转染；

(2)溶液 A:120ul OPTI-MEM + 5ul lipofectamine2000(lipo2000) per well溶液 B: 120ul OPTI-MEM + 5ul miRNA per well

将溶液A与溶液B混合（两种液体要在5min内混合），室温静置20min。在静置的同时用PBS漂洗2遍六孔板中的细胞，加入1.75ml无血清无双抗的RPMI-1640培养基。

（3）溶液A、B混合液加入到孔中，摇动培养板，轻轻混匀。转染6h后将培养基换成完全RPMI-1640培养基。

（4）转染48h后胰岛素100nM刺激12h,进行后续实验。

### 2.3 细胞内总RNA的提取：

（1）将培养孔中旧的培养基丢弃，加入适量经4℃冰箱预冷的PBS,轻微洗涤2次后吸尽残余液体。直接加入适量Trizol裂解细胞，放置于冰上5min，用枪头吹打底部细胞并收集于1.5ml离心管内；

（2）离心管内加入1/5的氯仿（1ml Trizol加入0.2ml氯仿），剧烈震荡15s，至液体呈现乳白色，静置10min。4℃离心，12000rpm，15min；

（3）离心后发现液体呈3层，分别是上层水相，中间混合相，下层酚相。吸取上层水相于离心管中（至少勿多），加入等体积预冷的异丙醇，混匀，室温放置15min。4℃离心，12000rpm，15min；

（4）离心后可见白色沉淀，弃去上层液体，尽量吸尽液体；

（5）加入0.5ml 75%酒精（DEPC水配制）洗涤，共洗涤2次。4℃离心，7500rpm，5min；

（6）离心后弃去上层液体，吸除多余乙醇，晾干，使酒精完全挥发；

（7）加入30ul DEPC水，使RNA溶解，室温放置15min，保存于-80℃；

（8）检测所提取RNA的浓度及纯度。

9

### 2.4 RNA纯度及质量鉴定：

（1）取出所提RNA，用酶标仪测定其在260nm和280nm处的OD（吸光度）值，用OD

260/OD280比值评价RNA的纯度及质量，比值在1.8-2.0范围内，表明RNA样品纯度较高。

（2）配制琼脂糖凝胶，取5ul RNA + 1ul buffer上样。在TAE电泳液中电泳15min，电压为160mV，观察所提RNA的完整性。

### 2.5 RNA逆转录为cDNA：

以RNA为模板，在逆转录酶的作用下，随机引物、oligodT引物的引导下合成互补的DNA(cDNA)。再以新合成的cDNA为模板，大量扩增。

（1）反应体系及条件（冰上操作）：

dNTP 2ul

DTT 0.1ul

OligodT

Zkq 20160118

2ul

RTase 0.4ul

RT-primer 0.5ul

5XFrist．strand Buffer 2ul

Total RNA 500ng

RNase free dH2O up to 10ul

反应条件为：42℃，lh；70℃，15min。

### 2.6 实时荧光定量PCR

SYBR Green是一种可以和双链DNA分子螺旋小沟结合，且具有绿色激发波长的荧光染料。在PCR反应中，加入SYBR荧光染料后，它会特异性地掺入DNA双链，发射荧光信号，而不掺入链中的SYBR染料分子不会发射任何荧光信号。因此保证了荧光信号的增加与PCR产物的增加完全同步。

10

（1）引物序列：SYBR Green Real-time PCR

|  |  |
| --- | --- |
| MiR-126 Foword primer | 5’-GCT AGC TCG TAC CGT GAG TAA TAA-3’ |
| MiR-126 Reverse primer | 5’-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG T-3’ |
| U6 Foword primer | 5’-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3’ |
| U6 Reverse primer | 5’-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3’ |

（2）将下列成分按照比例配置于Microtube管中

Maxima SYBR Green(2³) 10ul

Forward primer 0.4 ul

Reverse primer 0.4 ul

cDNA模板（RT产物）1 ul

DdH2O 8.2 ul

Total

Zkq 20160118

20 ul

反应条件：94°C 30s；60°C 30; 72°C 30s；35个循环。

11

**实验结果**

## 1. 培养的INS-1细胞

传代培养24h后的INS-1细胞，可见细胞贴壁良好，表面光滑，呈不规则的多边形，细胞成片聚集生长（图1-1）。

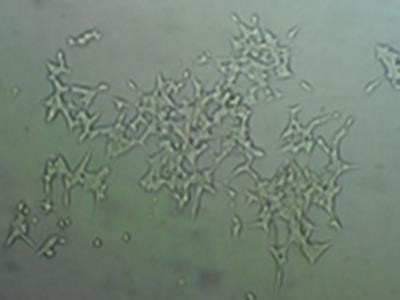


图1-1 培养的INS-1细胞

## 2. RNA纯度及质量鉴定

从INS-1细胞提取的RNA质z量k检q测2可01见6031条18亮带，依次是28S、18S和5.8S，其中28S条带最亮，18S条带次之，5.8S条带较暗，证明所提RNA质量较好（图1-2）。

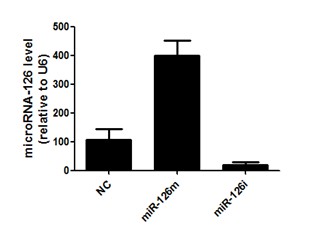


图 1-2 RNA质量检测结果

12

## 3. 荧光定量PCR

荧光定量PCR图1-3所示：miR-126基因的表达量，与NC（107.26±37.88, n=4）组相比较，miR-126m（398.77±53.72, n=4）组miR-126的表达量显著升高（P<0.01），而miR-126i（20.26±7.827, n=4）组miR-126基因的表达量显著降低（P<0.05）。表明miR-126模拟物可以上调miR-126的表达，miR-126抑制物可以抑制基因miR-126的表达。



zkq 20160118

图1-3 荧光定量PCR检测miRNA-126相对定量结果

13

**讨论**

Lipofectamine2000是一种用于向细胞内转染核酸分子的质粒。有研究表明[23]，利用Lipofectamine2000可以成功将anti-miR-31转染进HT29细胞，并能成功干扰miR-31基因的表达水平。

本实验利用Lipo2000转染试剂，予INS-1细胞转染浓度均为40nM的miR-126

mimics、miR-126 inhibitor及NC。通过荧光定量PCR实验检测细胞内miR-126的转染效率。实验结果显示转染人工合成的外源性miR-126 mimics和miR-126 inhibitor，可以干扰INS-1细胞内miR-126基因的表达。与转染miR-126抑制物组（miR-126i组）的相比较，转染miR-126模拟物组（miR-126m组）的基因表达几乎高达20倍；而转染miR-126抑制物组（miR-126i组）的miR-126表达量仅为转染无意义序列NC组的1/5。证明利用转染试剂Lipo2000可以成功将外源性miRNA转染进INS-1细胞，并且能成功干扰基因的表达，为后续实验的开展创造条件。

Zkq 20160118

14

# 第二部分 MicroRNA-126对INS-1细胞内钙离子浓度及Ica, v的影响

前**言**

## 1. 激光共聚焦技术检测INS-1细胞内钙离子浓度

Fluo-3 AM是一种可以穿透细胞膜的荧光染料，Fluo-3广泛用于长波长的荧光钙指示剂。可以被氩离子激发的488nm激光激发，对钙离子浓度变化的检测非常灵敏。Fluo-3在没有同钙结合的情况下，无荧光产生。在与钙结合后，荧光增强至少40倍。Fluo-3 AM的荧光非常弱，其荧光不会随钙离子浓度升高而增强。Fluo-3 AM进入细胞后可以被细胞内的酯酶剪切形成Fluo-3，从而被滞留在细胞内。Fluo-3可以和钙离子结合，结合钙离子后可以产生较强的荧光。

检测时使用的激发波长为488nm左右，发射波长为506nm。负载30min（37℃），选取三个视野，对每个选定视野连续采样、采样间隔为10s，共记录240s，记录INS-1细胞荧光强度变化。胰岛β细胞被Fzlkuqo- 3 /2A0M1负60载11后8，荧光信号来自整个细胞质，呈绿色

荧光，反映了全细胞质的钙离子浓度**。**

## 2. 穿孔膜片钳技术检测INS-1细胞电压敏感钙通道电流

胰岛β细胞有多种离子通道，如ATP敏感钾通道的关闭和钙通道的打开都与胰岛素释放有紧密的关系。β细胞上的Ca2+通道主要是电压依赖性钙通道(VDCC)，分为高电压激活(HVA)通道和低电压激活(LVA)通道[24]。

胰岛素释放前细胞内钙离子浓度会增加，但增加的方式有细胞内钙库的释放和细胞膜钙离子通道开放两种。本实验以INS-1细胞为模型，利用穿孔膜片钳技术研究过表达miR-126对INS-1细胞电压敏感钙通道电流的影响，探讨miR-126对胰岛素分泌功能的作用。

15

**材料与方法**

## 1. 材料：

### 1.1 实验细胞：INS-1（大鼠胰岛B细胞瘤株）上海艾研生物科技有限公司

### 1.2 主要试剂：

（1）RPMI-1640培养基：Gibco公司

（2）胎牛血清：Gibco公司

（3）0.25%胰蛋白酶：Gibco公司

（4）丙酮酸钠：上海博光生物科技有限公司

（5）磷酸盐缓冲液（PBS）: Hyclone公司

（6）β-巯基乙醇：Gibco公司

（7）青-链霉素: Hyclone公司

（8）DMSO: Solarbio公司

（9）转录试剂lipofectamine2000: Invitrogen

（10）转染优化培养基Opti-MEMI: Gibco公司

（11）micRNA-126-3p/ inhibitor: 上海吉玛基因公司

（12）Negative Control: 上海吉玛基因公司

（13）Fluo 3-AM solution: sigma公司

（14）无糖1640培养基：Gibco公司

### 1.3 实验仪器

（1）CO2培养箱：HEAL PORCE

（2）倒置显微镜：日本Olympus公司

（3）无菌超净工作台：苏州智净化设备有限公司

（4）-80℃低温冰箱：中科美菱

（5）电热恒温鼓风干燥箱：上海精宏实验设备有限公司

（6）电子分析天平：梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司

（7）高压锅：TOMY

16

（8）4℃冰箱：青岛海尔

（9）台式低速离心机：安徽中科中佳科学仪器有限公司

（10）高速离心机：长沙平凡仪器仪表有限公司

（11）液氮罐：成都金凤容器

（12）磁力搅拌器：上海泸西仪器厂

（13）移液器：eppendorf

（14）激光共聚焦显微镜：日本OLYMPUS FV100 IX81

（15）电极拉制仪P-97：美国Sutter公司

（16）EPC10 USB放大器：HEAK公司

（17）LEAD-2恒流泵：保定兰格恒流泵有限公司

（18）温度自动调节器：WARNER公司

（19）计算机：Dell公司

（20）抛光仪：美国世界精密仪器

### 1.4 主要溶液配置

（1）5.6mM葡萄糖1640培养基：0.022g葡萄糖（分子量198.17）加入到2ml去离子水，溶解后用0.22um的滤膜过滤。过滤后加入到18ml无糖1640培养基中混匀。

（2）16.8 mM葡萄糖1640培养基：0.066g葡萄糖（分子量198.17）加入到2ml去离子水，溶解后用0.22um的滤膜过滤。过滤后加入到18ml无糖1640培养基中混匀。

（3）钙离子电流记录细胞外液（mM））

N-甲基-D-葡糖胺220, CsCl 5.4, MgCL2 l, glueose 10, HEPES 10；pH值调至7.3 ；

（4）钙离子电流记录细胞内液（mM）

CsCl 130, MgCl2 4, EGTA 10, HEPES 10；pH值调至7.3（2M CsOH调节）；

（5）穿孔剂**—**两性霉素B溶液的配置

储存液：称取两性霉素B粉末10mg加入到50ul DMSO，超声震荡溶解，保存于-20℃；工作液：取1ul储存液于1ml电极内液，至终浓度为200ug/ml，超声震荡溶解。

17

由于两性霉素B见光易分解，因此整个过程要避光，两性霉素B溶液的储存管和含两性霉素 B 的电极內液注射器均用锡箔纸包裹。2。实验方法

### 2.1 细胞培养及转染与第一部分相同。

### 2.2 激光共聚焦检测INS-1细胞内钙离子浓度

（1）将1.3x105个细胞铺种于激光共聚焦专用皿中，24h后进行miRNA的转染，转染48h；

（2）用PBS缓冲液清洗细胞2次，清洗过程要轻柔；

（3）加入含有5.6mM/16.8 mM的葡萄糖1640培养基，在37℃、95%空气和5% CO2培养箱中孵育1h. 孵育结束前30min加入Fluo-3/AM至终浓度为10uM；

（4）孵育负载后，再用PBS缓冲液清洗细胞2次（将细胞液中的Fluo-3/AM除去）；

（5）再分别加入相应5.6mM/16.8 mM的葡萄糖1640培养基；

（6）利用激光共聚焦显微镜检测，分析数据。

### 2.3 穿孔膜片钳技术检测INS-1细胞电压敏感钙通道电流

（1）电极的拉制及抛光

采用南京六合泉水教学实验器材公司的硬质玻璃电极。在进行拉制前：1.用无水乙醇浸泡玻璃电极，再经超声波处理10min；2.倒掉无水乙醇，换成三蒸水冲洗5-8次，并经超声处理3次，每次5min（确保电极内没有酒精）；3.放置于鼓风干燥箱60℃烘干备用。采用美国Sutter公司的P-97型电极拉制仪拉制电极，通过调节拉制温度和速度，找到适合目的细胞的电极（阻值为2-5MΩ）。

抛光是将玻璃电极尖端靠近加热的铂丝，抛光目的：1.使电极尖端变光滑利于封接，更使封接稳定，延长电信号记录时间；2.防止玻璃电极刺入细胞形成细胞内记录方式，也可避免因玻璃电极过于尖锐对细胞形成损伤。根据显微镜下玻璃尖端口径大小变化判断电极抛光效果。

（2）玻璃电极的充灌

充灌电极前，必须将电极内液（充灌液）用微孔滤膜（0.2um）进行过滤，避免实

18

验过程污染物堵塞玻璃电极。首先，将电极尖端伸入已过滤的电极内液10-30s，切记不能靠近装有电极内液离心管壁或者管底；其次，用特制的注射器装置从玻璃电极尾部充灌电极内液，充灌高度距玻璃电极尖端大约1cm左右即可。充灌过多会污染电极夹持器，增大记录噪声；最后，用手指轻轻弹电极杆部数次，排除充灌完成后残留在尖端的气泡。充灌结束用吸水纸将玻璃电极管壁吸附的液体吸干净。整个过程必须小心，避免碰断玻璃电极尖端。

（3）穿孔全细胞电流记录

将铺有细胞的35mm的培养皿放入浴池中内，将灌流管、加热管（温度设置37℃）连接好放置在倒置显微镜载物台上，用细胞外液以1ml/min的流速灌流大鼠胰岛B细胞

（INS-1细胞）。玻璃电极安装在电极夹持器上，利用三维操纵器移动电极，入水前给予正压，入水后移动电极，并轻压在细胞表面，稍加负压形成> 1GΩ的高阻封接，补偿快电容，等待穿孔剂穿孔（穿孔时间为5-20min），补偿电极串联电阻和电容电流，待串联电阻降至30MΩ。信号通过Ag/Agcl电极，经膜片钳放大器（EPC10 USB）放大，通过软件Patch master采集数据，并进行数据分析。

实验过程要进行避光，含有两性霉素B的电极内液使用时间不超过3小时。

19

**实验结果**

## 1.激光共聚焦技术检测INS-1细胞内钙离子浓度

### 1.1 图2-1为INS-1细胞经Fluo-3/AM荧光染料染色的60倍图像。可看到细胞呈现多边形，有1-3个触角，均被染成绿色。



图 2-1 经Fluo-3/AM染色的INS-1细胞(60x)

### 1.2 不同浓度葡萄糖对INS-1细胞内钙离子荧光强度的影响

（1）各组INS-1细胞内钙离子荧光强度如图2-2所示，转染miR-126模拟物的INS-1细胞，在5.6mM的葡萄糖孵育下，细胞内钙离子荧光明显增强：与NC组（654.392±

205.279，n=212）相比较，miR-126m组（847.248±273.363, n=158）INS-1细胞内钙离子荧光强度明显增强（P<0.05），而miR-126in组（477.930±67.453 n= 66）INS-1细胞内钙离子荧光强度明显下降（P<0.05）。miR-375对INS-1细胞内钙离子荧光强度变化无明显影响。以上结果表明，转染miR-126模拟物的INS-1细胞，在5.6m M的葡萄糖孵育下，其细胞内钙离子浓度明显增加。

20



图 2 -2 5.6mM的葡萄糖孵育下INS-1细胞内钙离子荧光强度（\*P<0.05 *vs.* NC Group）

（2）16.8mM的葡萄糖孵育INS-1细胞，细胞内钙离子荧光强度（见图2-3）：与NC组（1058.932±394.811，n=232）相比较，miR-126m组（1005.017±345.67，n=132）

与miR-375m组INS-1细胞内钙离子荧光强度几乎没有变化（P> 0.05）；miR-126i 组

（829.683±311.134, n=212）INS-1细胞内钙离子荧光强度下降（P<0.05）。结果显示在高糖环境下，转染miR-126模拟物并不会增加INS-1细胞内钙离子浓度。



图 2 -3 16.8mM的葡萄糖孵育下INS-1细胞内钙离子荧光强度（\*P<0.05 *vs.* NC Group）

21

### 1.3 INS-1细胞内钙离子荧光强度随时间变化趋势

（1）5.6m M的葡萄糖孵育INS-1细胞1h，观察240s内INS-1细胞随时间变化其钙离子荧光强度的变化。图2-4显示，随着葡萄糖孵育的时间延长，miR-126m组的INS-1细胞的钙离子荧光强度逐渐增高；NC组细胞荧光强度随时间延长而减弱，且在刚开始130s之前荧光强度下降较慢，130s后下降幅度较快，到220s之后看到其下降趋势趋于平缓（数据归一化处理：每个数据点/第一个数据点，处理细胞数每组15个）。



图 2 -4 5.6mM的葡萄糖孵育INS-1细胞，其钙离子荧光强度变化趋势

（2）16.8mM的葡萄糖孵育INS-1细胞1h后，观察240s内INS-1细胞在随时间变化其钙离子荧光强度的变化。2-5显示，NC组细胞荧光强度变化趋势较平缓，前后变化很小；miR-126m组细胞随时间的延长，其荧光强度逐渐增高，且与5.6mM的葡萄糖荧光变化趋势图相比，16.8mM的葡萄糖miR-126m组细胞荧光强度曲线图更加陡峭，表明细胞内钙离子浓度增加较快（数据归一化处理：每个数据点/第一个数据点处理细胞数每组15个）。

22



图 2 -5 16.8mM的葡萄糖孵育INS-1细胞，其钙离子荧光强度变化趋势

## 2. miR-126对INS-1细胞的Ica, v的作用

### 2.1 INS-1细胞的Ica, v的记录

（1）电极拉制采用4步拉制法（见表1），拉制的电极电阻为2-5 MΩ，经抛光使电极尖端平整光滑，有利于高阻封接。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 温度℃ | 495 | 485 | 478 | 473 |
| 速率 | 64 | 64 | 64 | 52 |

表 1 INS-1细胞电极拉制参数

（2）INS-1细胞的钳制电位为-70mV，指令电压从-70mV到+20mV，阶跃10mv，方波宽50ms的刺激参数下，记录不同电压下的电流曲线。图2-6为记录刺激参数，图2-7为INS-1细胞的Ica, v，图2-8为INS-1细胞不同电位下的钙电流密度峰值。

23





图 2-6 Ica, v记录刺激参数

图2-7 INS-1细胞的Ica, v



图 2-8 不同电位下的INS-1细胞钙电流密度峰值（n=4）

### 2.2 miR-126对Ica, v的影响

转染miR-126模拟物后钙峰值变化见图2-9，阴性对照NC组-30mv、-20mv和-10mv的钙峰值分别是（5.92±0.61，n=4）PA/PF、（6.73±1.07，n=4）PA/PF、（5.23±0.74，n=4）PA/PF, miR-126m组钙峰值分别升高至（8.45±1.31，n=4）PA/PF、（8.89±0.69，

24

n=4）PA/PF、(6.96±0.7，n=4) PA/PF，差异有统计学意义（P<0.05）。



图 2-9 miR-126对INS-1细胞钙峰值电流电压的影响（\*P<0.05 *vs.* NC Group）

**讨论**

由激光共聚焦技术检测细胞内钙离子浓度的结果，可以看出，在基础葡萄糖刺激下，转染了miR-126 mimic的细胞，其钙离子浓度显著增加；转染了miR-126 inhibitor的细胞，钙离子浓度较阴性对照组显著下降。然而，在高浓度葡萄糖刺激下，转染了miR-126 mimic的细胞，其钙离子浓度较NC组无明显变化；转染了miR-126 inhibitor的细胞，钙离子浓度较阴性对照NC组显著下降。由此发现，在基础葡萄糖刺激下，干扰INS-1细胞内miR-126基因的表达，对细胞内钙离子浓度的变化有很大影响。而在高糖环境下，过表达的miR-126基因对钙离子浓度并没有影响。

众所周知，细胞内钙离子浓度是触发胰岛素释放的关键，由以上结果提示干扰miR-126基因的表达，影响细胞内钙离子浓度的变化，进而影响胰岛素的释放。细胞内钙离子浓度增加主要是细胞内钙库释放钙离子和细胞外钙离子内流，钙离子内流是胰岛素连续分泌的主要途径。我们利用膜片钳技术检测miR-126表达改变能否影响钙离子通道电流，结果显示，转染miR-126模拟物组的INS-1细胞钙离子通道电流增加。因此，

25

miR-126基因可能通过增加钙离子通道电流，使INS-1细胞内钙离子浓度增加。由图2-9所示：与阴性对照NC组的I-V曲线相比较，转染miR-126模拟物后的I-V曲线形态并未发生偏移，说明miR-126模拟物并未改变钙离子通道的性质。

26

# 第三部分 miR-126对INS-1细胞胰岛素分泌量及凋亡的影响

前**言**

## 1. 胰岛素分泌实验

胰岛素是体内唯一降血糖的蛋白质激素，由胰岛β细胞分泌。胰岛素对维持血糖平衡非常重要。葡萄糖刺激胰岛β细胞分泌胰岛素，其分泌过程包括：①葡萄糖被转运至胰岛β细胞内；②糖代谢产生丙酮酸；③丙酮酸进入线粒体，ATP/ADP比率升高；

④ATP敏感钾离子通道（ATP-sensitive K+channels, KATP）关闭，⑤胰岛β细胞膜去极化；⑥电压依赖性钙通道开放，外钙内流（细胞外钙离子流入胞内）；⑦细胞内钙离子浓度升高，胰岛素分泌[14, 15]。胰岛素呈双相式分泌，第1相分泌在葡萄糖刺激后l min开始，3-5 min达高峰，1相分泌的胰岛素是由于β细胞膜上的分泌颗粒迅速释放所致；2相分泌依赖于血糖水平，只要血糖未恢复到基本水平，胰岛素2相分泌则始终处于高

分泌状态，且分泌率远大于第1相。

本实验将培养的INS-1细胞为模型，观察转染miR-126 mimic、miR-126 inhibitor及miR-375 mimic的细胞，其基础胰岛素分泌量与高糖刺激胰岛素分泌量的情况。

## 2. 流式细胞仪检测细胞凋亡

研究发现[22]，miR-126在凋亡小体含量丰富，miR-126通过调节CXCL12对血管内皮细胞凋亡进行调控。细胞线粒体凋亡途径是细胞早期凋亡的主要途径之一，早期凋亡发生时可伴有线粒体膜电位的下降。

JC-1是检测线粒体膜电位变化的理想探针，线粒体膜电位较高时，JC-1聚集在线粒体基质中，形成复合物呈现红色荧光；当线粒体凋亡发生时，线粒体膜电位下降，JC-1因不能在基质中形成复合物而成单体形态，产生绿色荧光。通过JC-1由红色荧光向绿色荧光的转变，可以检测线粒体膜电位变化情况，从而反映细胞早期凋亡状况。

27

**材料与方法**

## 1. 材料：

### 1.1 实验细胞：INS-1（大鼠胰岛B细胞瘤株）上海艾研生物科技有限公司

### 1.2 主要试剂：

（1）RPMI-1640培养基：Gibco公司

（2）胎牛血清：Gibco公司

（3）0.25%胰蛋白酶：Gibco公司

（4）丙酮酸钠：上海博光生物科技有限公司

（5）磷酸盐缓冲液（PBS）: Hyclone 公司

（6）β-巯基乙醇：Gibco公司

（7）青-链霉素: Hyclone 公司

（8）DMSO: Solarbio 公司

（9）转录试剂lipofectamine2000: Invitrogen公司

（10）转染优化培养基Opti-MEMI: Gibco公司

（11）micRNA-126-3p/ inhibitor: 上海吉玛基因公司

（12）Negative Control: 上海吉玛基因公司

（13）胰岛素：sigma公司

（14）线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1）：贝博生物公司

（15）ELISA KIT试剂盒：武汉华美生物工程有限公司

### 1.3 实验仪器

（1）CO2培养箱：HEAL PORCE

（2）倒置显微镜：日本Olympus公司

（3）无菌超净工作台：苏州智净化设备有限公司

（4）-80℃低温冰箱：中科美菱

（5）电热恒温鼓风干燥箱：上海精宏实验设备有限公司

（6）电子分析天平：梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司

28

（7）高压锅：TOMY

（8）台式低速离心机：安徽中科中佳科学仪器有限公司

（9）4℃冰箱：青岛海尔

（10）高速离心机：长沙平凡仪器仪表有限公司

（11）液氮罐：成都金凤容器

（12）磁力搅拌器：上海泸西仪器厂

（13）移液器：eppendorf

（14）流式细胞仪：美国Becton Dicknson公司

（15）酶标仪：ANTAI公司

### 1.4 主要溶液配制：

（1）KRB溶液（mM）：

NaCl 115; KCl 5; NaHCO3 24; CaC12 2.5; MgC12 1; HEPES 10和0.1% BSA; pH

调至7.4；

（2）磷酸盐缓冲液(PBS): NaCl 8.0g, NaHPO4•12H2O 2.885g，KCl 0.2g, KH2PO4 0.2g，用ddH2O定容至1000ml。

## 2. 实验方法：

### 2.1 细胞培养及转染与第一部分相同。

### 2.2 胰岛素分泌实验

（1）铺种5x105个细胞于6孔板，24h后进行miRNA的转染，转染48h后，胰岛素刺激12h。

（2）PBS清洗细胞2遍，换成KRB液培养箱孵育30min（37℃, 5%CO2），然后加入600ul的含5.6mM/16.8mM葡萄糖的KRB液孵育1h，收集细胞上清，Elisa法测定胰岛素。

（3）胰岛素的测定：

①试剂盒在实验前室温放置30min以上；

②收集细胞上清于1.5ml离心管中，4℃离心，1000³g, 15min取上清（不必稀

29

释）；

③设标准品孔（每次实验都要设置标准品孔）和待测样品孔，每孔加标准品或待测样品100ul，于37℃孵育箱中孵育2h；

④弃去液体，甩干，不用洗涤，每孔加入100ul生物素标记抗体工作液，37℃孵育箱孵育1h；

⑤弃去液体，甩干，洗涤3次，每次2min，每孔200ul，甩干；

⑥每孔加入100ul辣根过氧化物酶标记亲和素工作液，37℃孵育箱孵育1h；

⑦弃去液体，甩干，洗涤5次，每次2min，每孔200ul，甩干；

⑧每孔底物90ul，37℃孵育箱中避光显色20min；

⑨每孔中止液50ul；

⑩反应终止后5min内用酶标仪在450nm波长测量光密度，分析结果。

### 2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

（1）铺种1.5x105个细胞于12孔板, 24h后进行miRNA转染，转染48h后，胰岛素刺激12h；

（2）0.05%胰蛋白酶消化细胞于1.5ml离心管中，1000rpm，5min离心收集细胞；

（3）用PBS清洗细胞2遍，1000rpm，5min离心收集细胞；

（4）预先配制孵育缓冲液和JC-1染色工作液。按照样品数量按以下比例配制溶液，取100ul孵育缓冲浓缩液加入900ul无菌去离子水，混匀并在培养箱中预热至37℃，即成孵育缓冲液；取500ul孵育缓冲液加入5ulJC-1，混匀配成JC-1染色工作液（配制过程注意避光）。

（5）离心收集细胞后加入500ulJC-1染色工作液重悬细胞，37℃，5%CO2的培养箱中孵育15min；

（6）常温离心，1000rpm，5min收集细胞；

（7）加入500ul预热的孵育缓冲液，重悬细胞；

（8）流式细胞仪检测分析结果。

注：整个操作过程，对细胞的吹打重悬一定要缓慢轻柔。

30

**实验结果**

## 1. 胰岛素分泌实验

### 1.1 基础胰岛素分泌量：

转染miR-126m和miR-375m两组的基础胰岛素分泌量较NC组和miR-126i组高。miR-126m组（16.413±1.402 nIU/ml）和miR-375m组（17.781±1.243 nIU/ml）胰岛素分泌量均明显高于NC组（12.337±2.618nIU/ml），(P<0.05)，而miR-126i组（8.598

±1.452 nIU/ml）的胰岛素分泌量则是下降的，低于miR-126m、miR-375m和NC组(P<0.05). miR-126m组和miR-375m组之间基础胰岛素分泌量没有显著差别（P> 0.05）。表明过表达miR-126 mimics和miR-126 inhibitor对INS-1细胞基础胰岛素分泌量分别有增加和降低作用。



图 3-1 miR-126对5.6mM葡萄糖刺激INS-1细胞胰岛素分泌的影响（\*P<0.05 *vs.* NC Group）

### 1.2 高糖刺激INS-1细胞胰岛素分泌量

高糖孵育INS-1细胞1h后, miR-126m、miR-375m、NC和miR-126i组胰岛素分泌量均比各自5.6mM葡萄糖孵育时增多。与NC组（20. 726±0.876 nIU/ml）相比较，miR-126m组（22.651±2.689nIU/ml）和miR-375m组（22.771±2.077 nIU/ml）胰岛素分泌量没有明显增加，无统计学意义(P> 0.05)，而miR-126i组（14.966±1.040nIU/ml）的胰岛素分泌量明显下降(P<0.05). miR-126m组和miR-375m组的胰岛素分泌量没有统计学差别（P> 0.05）。表明转染的miR-126 mimic对高糖刺激INS-1细胞胰岛素分泌量无影响。

31



图3-2 miR-126对高糖刺激INS-1细胞胰岛素分泌的影响(\*P<0.05 *vs.* NC Group)

## 2. 流式细胞仪检测细胞凋亡

（1）INS-1细胞经荧光染料JC-1染色，流式细胞仪检测细胞早期凋亡。图3-3中，FL-1通道检测的是绿色荧光，，FL-2通道检测的是红色荧光。FL-1+，FL-2+为正常细胞，FL-1+，FL-2—是凋亡细胞。如图右上象限(UR)为正常的细胞，右下象限（LR）为早期凋亡细胞。



图3-3 流式细胞仪检测图（JC-1染色）

32

（2）转染miR-126m和miR-375m两组的细胞早期凋亡率较NC组和miR-126i组高，图3-4，与NC组(11.667±0.947)相比，miR-126m组(17.978±0.669)与miR-375m 组

（21.401±1.971）细胞凋亡率明显升高（p<0.05）；较miR-126i组（9.674±1.03），

miR-126m(17.978±0.669)组和miR-375m组（21.401±1.971）的细胞凋亡率明显升高

（p<0.05）。结果显示过表达的miR-126与miR-375促进INS-1细胞凋亡。



图3-4 INS-1细胞的凋亡率（\*P<0.05 *vs.* NC Group）

**讨论**

胰岛素由胰岛β细胞分泌，由51个氨基酸组成的蛋白质激素，有α、β两条肽链，机体内唯一降血糖激素。参与葡萄糖代谢、糖原生成和糖异生等活动，维持机体血糖平衡。影响葡萄糖刺激胰岛素分泌过程的主要环节有：葡萄糖的摄取，糖代谢，三羧酸循环ATP/ADP比率升高，ATP敏感钾离子通道关闭，细胞膜去极化，电压依赖性钙通道打开，钙离子内流，胰岛素分泌[14, 15]。

细胞内钙离子浓度的变化对胰岛素的分泌有重要影响。第二部分实验结果显示，用5.6mM葡萄糖刺激INS-1细胞，过表达miR-126能够让INS-1细胞内钙离子浓度增加，且过表达miR-126使INS-1细胞基础胰岛素分泌量也增加，前后试验结果一致。由此推测，转染miR-126模拟物可能通过增加钙离子内流，使INS-1细胞内钙离子浓度上升，从而促

33

使细胞的胰岛素分泌量增加。当钙离子浓度过高时，对细胞会造成损伤，如细胞会出现早期凋亡。于是我们运用JC-1染色，通过流式细胞仪检测细胞早期凋亡状态。线粒体是细胞内钙库之一，对调节钙离子浓度变化非常重要。线粒体吸收钙离子，使胞浆内的钙离子浓度处于生理范围，保护细胞内其他对钙离子敏感的细胞器，免受高浓度钙离子的损伤。众所周知，线粒体是能量产生的场所，对维持细胞正常状态非常重要。但因三酸梭循环产生氧化自由基对线粒体是一种极大的损害，因此线粒体是非常脆弱的细胞器。当线粒体长期暴露在高浓度钙离子状态下，就会走向凋亡。

本课题前部分试验结果表明，转染miR-126模拟物后，细胞内钙离子浓度很快增加，说明INS-1细胞内的线粒体长期暴露在高浓度钙离子状态，很容易使其发生早期凋亡。猜想转染miR-126模拟物后，INS-1细胞是否也会出现早期凋亡？利用JC-1染料检测线粒体膜电位变化情况，发现转染了miR-126mimics和miR-375mimics的细胞，细胞凋亡数量明显升高，与激光共聚焦显微镜结果相辅相承。

34

结论

1. 过表达miR-126可能通过增加INS-1细胞电压敏感钙电流（细胞钙离子内流增加），使细胞内钙离子浓度增加，进而增加细胞胰岛素分泌量；

2. 过表达miR-126可以增加INS-1细胞基础胰岛素分泌量并且促使细胞凋亡。

35

参考文献

[1] World Health Organizati[on. ht](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/.October)tp: [//www. who. int/mediacentre/factsheets/fs312/en/. October](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/.October) 18, 2013.

[2] Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva, World Health Organization, 1999 (WHO/NCD/NCS/99.2).

[3] D. R. Whiting, L. Guariguata, C. Weil, et al. Idf diabetes atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2011,94(3):311-321.

[4] W. Yang, J. Lu, J. Weng, et al. Prevalence of diabetes among men and women in china [J]. N Engl J Med, 2010, 362(12):1090-1101.

[5] Bartel B, Bartel DP. MicroRNA: at the root of plant development. PlantPhysio, l 2003, 132: 709-717.

[6] Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. NatRevMolCellBio, l 2005, 6: 376-385.

[7] LeeY, JeonK, LeeJT, eta. lMicroRNAmaturation: stepwise processing and subcellular localization. EMBO J,2002,21:4663-4670.

[8] Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turn over RNAi enzyme complex. Science, 2002, 297: 2056-2060.

[9] Kovacs B, Lumayag S, Cowan C, et al. MicroRNA AS in early diabetic retinopathy in streptozotoc induce diabetic rats. Invest Opthalmol Vissci,2011,52:4402-4409.

[10]中华医学会. 第十一次全国内分泌学学术会议论文汇编[C].广东：[出版者不详],2012

[11] Plaisance V, Abderrahmani A, Perret-Menoud V, Jacquemin P, Lemaigre F, Regazzi R, MicroRNA-9 controls the expression of GranuphiUn/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. J Biol Chem. 2006. 281(37):26932-42.

[12] Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, PfefferS, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. Nature. 2004. 432(7014): 226-30.

[13] He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. Overexpression of micro ribonucleic acid 29. highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. Mol EndocrinoL

36

2007.21(11): 2785-94.

[14] Prentki M, Tornheim K, Corkey BE. Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion [J]. Diabetologia. 1997,40 Suppl 2: S32-41.

[15] Huopio H, Shyng SL, Otonkoski T, Nichols CG. K(ATP) channels and insulin secretion disorders[J].

Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002, 283: E207-216.

[16] Gerich JE. Is reduced first-phase insulin release the earliest detectable abnormality in individuals destined to develop type 2 diabetesDiabetes.2002;51Suppl1: S117-S121.

[17] Yang SN, Berggren PO．Beta －cell CaV channel regulation in physiology and pathophysiology

[J]．Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005, 288( 1): E16－E28

[18] Gilbert M, Jung SR, Reed BJ, et al．Islet oxygen consumption and insulin secretion tightly coupled to calcium derived from L－type calcium channels but not from the endoplasmic reticulum[J]．J Biol Chem, 2008, 283( 36): 24334 －24342.

[19] Warren BE, Lou PH, Lucchinetti E, et al. Early mitochondrial dysfunction in glycolytic muscle, but not oxidative muscle, of the fructose-fed insulin-resistant rat [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014, 306(6)：E658-667.

[20] Ravagnan L, Roumier T, Krocmcr G. Mitochondria, the killer organcllcs and their weapons[J]. Journal of Cellular Physiology,2002,192(2):131-137

[21]东方，高世勇，季宇彬. Ca2+介导的细胞凋亡通路研究进展[J].齐齐哈尔医学院学,2008年第29

卷第13期。

[22] Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection [J]. Sci Signal, 2009, 2(100):ra81.

[23]徐瑞斯，niR-31在结肠癌中的功能及作用机制的研究. [D].吉林：吉林大学，2013.

[24]. Yang SN, Berggren PO. Beta-cell CaV channel regulation in physiology and pathophysiology. Am J Physiol Endocrinol Metab 2005;288: E16-E28.

37

**综**述

**miR-126的研究进展**

近年来，关于microRNAs ( miRNAs)的研究受到越来越多研究者的亲睐。1993年Lee等在秀丽隐杆线虫中发现第一个miRNAs后，miRNAs作为转录后调控因子备受关注。miRNAs是内源的，高度保守的小RNA分子，有18-25个核苷酸组成，主要由基因非编码区的核苷酸序列编码而成。miRNAs通过与靶基因mRNA的3'端( 3'-UTR)特异性的碱基互补配对，导致其mRNA降解或者抑制转录后翻译[1]。虽然miRNAs占总编码RNA基因数量的1%，但调控着人类基因组中约20%-30%的基因[2]。miRNAs参与诸多生命活动，如细胞的增殖[3]，分化[4]和凋亡[5]等；在很多疾病的发生发展过程中miRNAs有很重要的作用，如癌症的形成，糖尿病的发生及心血管病的发展等。

miR-126首次在小鼠心脏中被发现[6]，成熟体miR126序列是

5'-UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG-3', miR-126 来源于表皮生长因子样结构域 7

（epidermal growthfactor－likedomain7, Egfl7）基因的第7个内含子[7,8]，miR－126不是通过其本身的启动子进行转录，是作为EGFL7 基因转录本的一部分被转录[9]。miR-126在肝脏、心脏等血管丰富的组织中表达水平较高，尤其在内皮细胞中含量最高

[10]. miR-126参与组织胚胎的发育、肿瘤的形成、血管新生、糖尿病的发生发展及凋亡等生物过程。

**miR-126与肿瘤**在大部分肿瘤中miR-126低表达，发挥抑癌基因的作用。而在部分肿瘤中miR-126呈现高表达，促进肿瘤的发生与发展，表现出其致癌特性。综上两点可看出miR-126对肿瘤的影响是很复杂的[11-13]。

Díaz等[14]首次发现miR-126在结肠癌中呈低表达；也有研究发现，与溃疡性结肠炎病人相比，结肠癌患者癌组织中的miR -126表达较低[15]；Li等[16]向结直肠癌细胞株SW480和SW620转染miR -126后，CXCR4的转录与表达水平降低，抑制癌细胞的侵袭和转移，证明了CXCR4为miR-126的一个靶点基因。有研究[17, 18]称miR-126在结肠癌中的作用与RhoA /ROCK信号通路有关系。由此可以看出miR-126参与结肠

38

癌的发生与发展的过程。miR-126在肺组织中表达较高，但是在肺癌组织中表达下降。研究发现miR-126可作用于EGFL7，下调EGFL7的表达抑制非小细胞肺癌( nonsmall cell lung cancer, NSCLC)细胞的增殖[19, 20]。Wang XC等[21]研究发现miR-126通过PI3K 的

Akt途径可使已扩散的非小细胞肺癌细胞凋亡。hu等[22]进一步发现，miR-126可以抑制VEGF /PI3K /MRP1通路，从而抑制NSCLC的生长侵袭与增殖，并且还可以增强肿瘤对化疗药物的敏感性。

EDMONDS等[23]的研究，证实在乳腺癌中miR－126可抑制癌症的转移。原发性乳腺癌患者miR-126的缺失易导致肿瘤的复发[24]。Zhang等[25]发现miR-126能够抑制乳腺癌细胞的增殖，其原因是miR-126高表达可以延缓癌细胞从G0/G1期向S期转换，进一步研究证明胰岛素受体底物1( insulin receptor substrate 1, IRS-1)是miR-126的一个靶点基因，miR-126可抑制IRS-1受体的表达，提示miR-126通过调节IRS-1而抑制PI3K /Akt信号通路，进而影响乳腺癌细胞的增殖。

miR-126不仅与肺癌、乳腺癌及结肠癌有密切的联系，而且还参与胰腺肿瘤、前列腺肿瘤、白血病和胃癌等的发病过程。miR-126不仅对肿瘤有抑癌作用也有致癌作用，其作用机理非常复杂。只有深入全面了解miR-126的作用靶点和信号通路，才能为未来肿瘤的治疗方式提供新的思路。

**miR-126与心血管系统** 动脉粥样硬化（AS）是一种慢性炎症及疾病，其过程有很多分子的参与。血管细胞黏附分子1 ( VCAM-1)可以将白细胞迁移到炎症部位，miR-126 的表达增加时VCAM-1 的表达降低，参与抑制血管炎症[26]。动脉内皮细胞的损伤、凋亡在动脉粥样硬化过程中起着重要作用，有研究发现miR-126能够抑制内皮细胞凋亡和促进一氧化氮合酶( eNOS) 的释放，进而保护内皮细胞，减缓动脉粥样硬化[27]。

HF是一组综合征，由各种心脏结构或功能性疾病所致心室充盈及（ 或） 射血能力受损而引起的。Jakob等[28]发现与正常人相比较，慢性HF病人miR-126的表达下降，将miR-126转染至患者体内后，发现患者的心脏功能得到明显改善。有学者研究证明[29]，血浆中miR-126的表达水平与HF的心功能NYHA分级呈负性相关。

**miR-126与糖尿病**在Ⅱ型糖尿病的发病过程中，发现一些miRNA与胰岛素的合

39

成、分泌及胰岛的发育有密切联系[30, 31]，这些miRNA存在于人类血清及血浆中，且表达水平稳定[32]。也有研究发现[33]，Ⅰ型糖尿病患者血浆中miR-126水平呈低表达。因此miRNA将很有可能成为糖尿病诊断的标记之一。研究表明miR-126在肝细胞中可以通过靶向抑制胰岛素受体底物（IRS）导致胰岛素抵抗[34, 35]。因此miR-126可能参与糖尿病的发病过程。研究表明PI3KR2是miR-126的靶基因，并证明miR-126可能通过VEGFA/PI3K/AKT通路在调控血管新生及肿瘤生长过程中发挥重要作用[36]。

**展望**miR－126不仅参与调节正常的生命活动，而且在很多疾病的发生过程中也有关键作用。目前对于肿瘤的研究已经进入瓶颈阶段，临床现用的治疗手段对正常细胞损伤很严重。miR-126调控肿瘤的发展过程，通过对靶基因的调节控制肿瘤的侵袭和转移。但miR－126影响肿瘤的发生发展和转移复发的机制研究尚少，还有待进一步的深入探索。miR－126不仅对肿瘤的发生发展有影响。而且还参与调控糖尿病、心血管疾病及胚胎的发育。

miR－126的作用靶点比较复杂，在不同疾病中的调节通路是不一致的。我们对它的认识只限于刚刚开始，研究还处于理论水平。目前的研究仅仅限于miR-126的一个或者两个靶点，很难诠释其调控作用。在肿瘤和糖尿病的研究中，发现患者血清或者血浆中miR-126的表达水平比较稳定，提示miR-126可能作为疾病诊断和治疗的新靶点，为治疗提供新的思路。随着科技的不断进步，miR-126会成为研究的热点话题。相信关于microRNA研究的越来越深入，很多疾病的诊断和治疗将有望突破现有水平，为人类的健康带来莫大的福音。

40

参考文献

[1] Valencia-Sanchez M A, Liu J, Hannon G J, etal． Control of translation and RNA degradation by miRNAs and siRNAs[J]． Genes Dev, 2006, 20( 5): 515.

[2] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P． Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]． Cell, 2005, 120( 1): 15.

[3] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature, 2005, 435(7043): 839–843.

[4] Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA, Maniatis T. The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. Mol Cell, 2007, 27(3): 435–448.

[5] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, NegriniM, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(39): 13944–13949.

[6] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from mouse. Curr Biol, 2002, 12(9): 735–739.

[7] Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. Dev Cell, 2008, 15(2): 261–271.

[8] Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, Ivey KN, Bruneau BG, Stainier DY, Srivastava D. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. Dev Cell, 2008, 15(2): 272–284.

[9] SUITOY, FＲIEDMANJ M, CHIHARAY, et al． Epigenetic therapyupregulatesthetumor suppressormicmRNA－126andits host gene EGFL7inhumancalelcer cells[J]． BiochemBiophys ResCommuu, 2009, 379( 3) : 726－731．

[10] PARKER L H, SCHMIDT M, JIN S W, et al. The endothelial-cell-derived secreted factor Egfl7 regulates vascular tube formation[J]． Nature, 2004, 428(6 984): 754－758.

[11] Otsubo T, Akiyama Y, Hashimoto Y, et al． MicroRNA-126 inhibits SOX2 expression and41

Contributes to gastric carcinogenesis[J]．PLoS One, 2011, 6(1): e16617.

[12] Barshack I, Meiri E, Rosenwald S, et al． Differential diagnosis of hepatocellular carcinoma from metastatic tumors in the liver using microRNA expression[J]． Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(8): 1355－1362．

[13] Powers MP, Alvarez K, Kim HJ, et al． Molecular classification of adult renal epithelial neoplasms using microRNA expression and virtual karyotyping[J]． Diagn Mol Pathol, 2011, 20(2): 63 －70．

[14] Díaz R, Silva J, García JM, et al． Deregulated expression of miR-106a predicts survival in human colon cancer patients[J]． Genes Chromosomes Cancer, 2008, 47(9): 794 －802．

[15] Ahmed FE, Jeffries CD, Vos PW, et al． Diagnostic microRNA markers for screening sporadic human colon cancer and active ulcerative colitis in stool and tissue[J]． Cancer Genomics Proteomics, 2009, 6(5): 281 －295．

[16] Li Z, Li N, Wu M, et al． Expression of miR-126 suppresses migration and invasion of colon cancer cells by targeting CXCR4 [J]． Mol Cell Biochem, 2013, 381(1 /2): 233－242．

[17] Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, et al． Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis [J]． Nature, 2008, 451(7175): 147 －152．

[18] Li N, Tang A, Huang S, et al． miR-126 suppresses colon cancer cell proliferation and invasion via inhibiting RhoA /ROCK signaling 045 JOURNAL OF BASIC AND CLINICAL ONCOLOGY Vol. 27 No. 6 Dec. 2014 pathway[J]． Mol Cell Biochem, 2013, 380(1 /2): 107－119.

[19] Kaira K, Oriuchi N, Imai H, et al． CD98 expression is associated with poor prognosis in resectednon-small-cell lung cancer with lymph node metastases[J]． Ann Surg Oncol, 2009, 16( 12) : 3473－3481．

[20] Sakata T, Ferdous G, Tsuruta T, et al． L-type amino-acid transporter 1 as a novel biomarker for high-grade malignancy in prostate cancer[J]． Pathol Int, 2009, 59(1): 7 －18.

[21] Wang XC, Du LQ, Tian LL, et al. Expression and function of miRNA in postoperative radiotherapy sensitive and resistant patients of non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2011, 72(1): 92-99.

[22] Zhu X, Li H, Long L, et al． miR-126 enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells42

To anticancer agents by targeting vascular endothelial growth factor A[J]．Acta Biochim Biophys Sin ( Shanghai), 2012, 44(6):519 －526.

[23] EDMONDSMD, HUＲSTDR, VAIDYALKS, et al． Breast cancer nletastasis suppressor coordinately regulates nletastasis－as-sociated microＲNA expression[J]． Int JCancer, 2009, 125( 8): 1778－1785

[24] Tavazoie SF, Alarc n C, Oskarsson T, etal. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis[J]. Nature, 2008, 451(7175): 147-152

[25] WANGX, TANGS, LESY, et al． Aberrant expression of oncogenic and tumor suppressive microＲNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth[J]． PLoS One, 2008, 3( 7) : e2557

[26] Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, et al． MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1[J]． Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105( 5): 1516 －1521．

[27] Rippe C, Blimline M, Magerko KA, et al． MicroRNA changes in human arterial endothelial cells with senescence: relation to apoptosis, eNOS and inflammation[J]． Exp Gerontol, 2012, 47( 1): 45 －51．

[28] Jakob P, Doerries C, Briand S, et al． Loss of angiomiR-126 and 130a in angiogenic early outgrowth cells from patients with chronic heart failure[J]． Circulation, 2012, 126( 25): 2962 －2975． [29] Fukushima Y, Nakanishi M, Nonogi H, et al． Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure[J]． Circ J, 2011, 75( 2): 336 －340．

[30] 黄令一, 李季均, 田浩明. 糖尿病并发脑梗死死因探讨及防治对策[J]. 中国糖尿病杂志, 1997, 5(2): 70.

[31] 叶明. 脂联素与动脉粥样硬化性脑梗死的研究进展[J]. 安徽医科大学学报, 2011, 49(8): 811-813. [32] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. Adipose-derived plasma protein adiponectin suppresses lipid

Accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages[J].

Circulation,2001,103(8):1057-1063

[33] 卢佩颖, 谷卫, 陈岳明. 2 型糖尿病患者血清miRNA-126 表达的临床意义[J]. 心脑血管病防治, 2012, 12(1): 10-11.43

[34] Ryu HS, Park SY, Ma D, et al. The Induction of MicroRNA Targeting IRS-1 Is Involved in the Development of Insulin Resistance under Cond-itions of Mitochondrial Dysfunction in Hepatocytes[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17343.

[35] Zhang J, Du YY, Lin YF, et al. The cell growth suppressor, mir-126, targets IRS-1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 377(1): 136-140.

[36] 姬海玉. 高表达MicroRNA-126 诱导INS-1 细胞凋亡的研究[D]. 宁夏: 宁夏医科大学, 2014.

44

致 **谢**

时光如白驹过隙，转眼我的研究生生活即将结束，回首三年的求学历程，首先要衷心地感谢我的恩师袁文俊教授，在学习中，是恩师给予我精心的指导和谆谆的教诲；在生活中，是恩师给予无微不至的照顾和关心。他严谨的治学态度、渊博的知识、敏锐的科研洞察力、缜密的科研思路、忘我的工作精神、豁达谦和的处世原则，将会一直激励我，让我终身受益。

感谢生理教研室扈启宽、李光华教授、陶虹老师在我的实验研究文章撰写中给予的极大支持和关心照顾，也要深深感谢生理系张琳娜、罗彦等所有老师的帮助。感谢科技中心李云鸿和张春老师在实验技术方面给予的指导。

感谢我的师兄、师姐对我实验方面的指导，感谢师妹高婷、尚佳等给予的热情帮助。感谢我的同学刘莉、王萌萌、王玉镯等在学习、实验等各方面的支持。

感谢一直关心、理解和支持我的家人，他们给予我的爱是我勇往直前的不竭动力！感谢宁夏医科大学研究生院全体老师的热心关怀和帮助。

感谢宁夏医科大学对我的培养和教育，我将用我所学的知识和技能回报社会。

45

**攻读硕士学位期间发表的论文**

维生素B1对槐定碱致痫小鼠学习记忆的影响.宁夏医科大学学报2014，第36卷第10期，1082-1085.

46

**个人简历**

一般情况：

姓 名 张荣华

性 别 女

年 龄 25 岁

民 族 汉族

籍 贯 宁夏中卫市

学习经历：

2008年～2012年宁夏医科大学本科

2012年～2015年宁夏医科大学硕士

47