

microRNA - 140 真核表达载体的构建及鉴定

张洋洋 彭效祥 张绪美 赵荣兰

摘要 **目的** 构建 miR - 140 真核表达载体并检测其在兔软骨细胞中的表达情况。**方法** 以人全血标本基因组为模板, PCR 扩增出带有酶切位点的 miR - 140 序列, 将该序列定向克隆入 pBudCE4.1 载体中, 构建 pBudCE4.1 - miR - 140 真核表达载体。将核定位信号肽偶联核激酶底物短肽 (nucleus localization signal linked nucleic kinase substrate short peptide, NNS) 修饰的壳聚糖 (^{NNS}CS) 分别与 pBudCE4.1 - miR - 140 重组质粒及 pBudCE4.1 空质粒形成纳米复合物, 分别瞬时转染体外分离培养的正常兔原代关节软骨细胞, 实时荧光定量 PCR 方法检测 miR - 140 的表达情况。**结果** 构建的 pBudCE4.1 - miR - 140 真核表达质粒酶切鉴定和测序结果均正确, 表明 miR - 140 成功克隆入 pBudCE4.1 载体中。实时荧光定量 PCR 结果表明, 与 ^{NNS}CS/pBudCE4.1 对照组相比, ^{NNS}CS/pBudCE4.1 - miR - 140 转染组软骨细胞中 miR - 140 表达升高约 14.5 倍 ($P < 0.05$)。**结论** 成功构建了 pBudCE4.1 - miR - 140 真核表达载体, 瞬时转染后软骨细胞可以有效地高表达 miR - 140, 为将来探究 miR - 140 在软骨损伤修复中的作用机制奠定了基础。

关键词 microRNA - 140 软骨细胞 真核表达载体 定量 PCR

中图分类号 R34 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.08.010

Construction and Identification of MicroRNA - 140 Eukaryotic Expression Vector. Zhang Yangyang, Peng Xiaoxiang, Zhang Xumei, et al. Institute of Nanomedicine Technology, Department of Laboratory Medicine, Weifang Medical University; Institutional Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics, 12th 5 - Year Project of Shandong Province, Weifang Medical University; Key Discipline of Clinical Laboratory Medicine of Shandong Province, Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Shandong 261053, China

Abstract **Objective** To construct a eukaryotic expression vector of microRNA - 140 (miR - 140) and detect its expression in rabbit articular chondrocytes *in vitro*. **Methods** MiR - 140 amplified from human genomic DNA isolated from whole blood was digested and inserted into pBudCE4.1 vector to generate pBudCE4.1 - miR - 140 eukaryotic expression vector. The nucleus localization signal linked nucleic kinase substrate short peptide (NNS) was conjugated to chitosan to form ^{NNS}CS, then ^{NNS}CS was respectively combined with pBudCE4.1 - miR - 140 and pBudCE4.1 vector to form ^{NNS}CS/pDNA complexes. ^{NNS}CS/pDNA complexes were transfected into primary rabbit articular chondrocytes *in vitro*. The expression of mature miR - 140 was detected by using quantitative real - time PCR (qRT - PCR). **Results** MiR - 140 was successfully cloned into pBudCE4.1 vector confirmed by restriction enzyme digestion and plasmid sequencing. By qRT - PCR, the expression of miR - 140 was significantly increased by about 14.5 times in ^{NNS}CS/pBudCE4.1 - miR - 140 transfection group when compared with ^{NNS}CS/pBudCE4.1 transfection control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The recombinant eukaryotic expression vector pBudCE4.1 - miR - 140 is successfully constructed. qRT - PCR results showed that the mature miR - 140 was effectively expressed in transient transfection of articular chondrocytes. The study lays a foundation for exploring the role of miR - 140 in the repair of cartilage injury in the future.

Key words MicroRNA - 140; Chondrocyte; Eukaryotic expression vector; Quantitative polymerase chain reaction

微小 RNA (microRNA 或 miRNA) 为长约 19 ~ 25bp 核苷酸、高度保守的非编码单链小 RNA 分子,

其主要通过与靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区 (3' - untranslated region, 3' - UTR) 互补序列配对结合, 导致靶基因 mRNA 翻译抑制或者降解, 调控多种基因的表达^[1, 2]。生物信息学预测人类全部信使 RNA 中, 约 1/3 受 microRNA 的调控^[3]。大量研究显示 microRNA 在调节软骨发育和骨关节炎的发生、发展中发挥重要作用^[4, 5]。其中 microRNA - 140 (miR - 140) 在脊椎动物中高度保守, 且在软骨组织中特异性表达, 参与调控软骨分化发育及维持软骨内稳态,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81301737); 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2015HL025, ZR2012HQ034)

作者单位: 261053 潍坊医学院医学检验学系纳米医学技术研究所、潍坊医学院临床检验诊断学山东省“十二五”高校重点实验室、潍坊医学院附属医院山东省临床检验重点专科 (张洋洋、彭效祥、赵荣兰); 261031 潍坊医学院附属医院病理科 (张绪美)

通讯作者: 赵荣兰, 电子信箱: zhaoronglan76@sina.com

同时也与骨关节炎的发生、发展密切相关^[6-8]。关节软骨损伤是临床骨科常见疾病,因其自身修复能力差,损伤后的有效治疗成为医务人员面临的一大挑战。

本研究以人全血基因组为模板,成功克隆构建了含 pri-miR-140 编码序列的真核过表达载体。前期课题组使用核定位信号肽偶联核激酶底物短肽修饰的壳聚糖(^{NNS}CS),荷载报告基因转染小鼠成肌细胞系,明显提高转染细胞内报告基因的表达水平^[9]。本研究中使用^{NNS}CS 介导 miR-140 重组质粒转染兔软骨细胞,结果显示 miR-140 可在软骨细胞内高效、特异性表达,为将来探究 miR-140 在软骨损伤修复中的作用机制奠定了基础。

材料与方法

1. 主要试剂和仪器:pBudCE4.1 真核表达载体、大肠杆菌菌株 *E. coli*. DH5 α 、核定位信号肽偶联核激酶底物短肽(^{NNS}CS)由本实验室保存;KOD-Plus-Ver.2 高保真聚合酶(日本 Toyobo 公司);限制性内切酶、dNTPs、T4DNA 连接酶、DL10000 marker、RNAiso Plus、实时荧光定量 PCR 试剂盒、microRNA 反转录及定量试剂盒(日本 TaKaRa 公司);DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒(中国天根公司);DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(南美 HyClone 公司);博来霉素、壳聚糖(美国 Invitrogen 公司)。PCR 扩增仪、荧光实时定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)、电泳仪、化学发光成像仪(美国 Bio-Rad 公司)、Innova@40 密闭式恒温摇床(德国 Eppendorf 公司)、二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher 公司)、全能台式高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司)。

2. 实验方法:(1)PCR 扩增 miR-140 基因:从 Ensembl(<http://asia.ensembl.org/index.html>)及 GenBank 中搜索到成熟 miR-140 序列及其前体 pre-miR-140 以及其在基因组定位,向其两端侧翼延伸得到一段约 210bp 的序列。根据该段序列设计引物,上游引物:5'-CCCAAGCTTTTCCgTggTgACCTCCTCT-3',下游引物:5'-CgCggATCCTgCTgggCTgTTTgTg-gCTg-3',上游引物中加入 Hind III 酶切位点,下游引物中加入 BamH I 酶切位点。以人全血基因组为模板扩增,普通 PCR 扩增 miR-140,反应条件:94℃ 预变性 5min;94℃ 变性 15s、56℃ 退火 15s、72℃ 延伸 30s,共 35 个循环;72℃ 延伸 5min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物并对产物进行 DNA 序列分析。(2)pBudCE4.1-miR-140 真核表达载体的构建:用

Hind III 和 BamH I 双酶切 miR-140 PCR 产物和载体 pBudCE4.1,电泳纯化后,回收双酶切后的 miR-140 基因及线性化载体 pBudCE4.1,T4DNA 连接酶连接双酶切后的 miR-140 基因和线性化载体 pBudCE4.1,转化大肠杆菌 *E. coli*. DH5 α 。37℃ 培养 16h,挑取单个菌落,过夜摇菌后提取质粒,酶切鉴定及测序分析,成功构建 pBudCE4.1-miR-140 真核表达载体。(3)^{NNS}CS/pBudCE4.1-miR-140 复合物的制备:使用核定位信号肽偶联核激酶底物短肽(nucleus localization signal linked nucleic kinase substrate short peptide, NNS;基序为 PKKRKVREEAIKF-SEEQRFR)修饰壳聚糖形成^{NNS}CS,并将 pBudCE4.1-miR-140 与^{NNS}CS 分别按质量比 1:0.25、1:0.5、1:1、1:1.5、1:2、1:2.5 混合制备纳米粒,1% 琼脂糖凝胶电泳检测混合产物复合情况。根据凝胶电泳阻滞实验,筛选出重组质粒与^{NNS}CS 最佳质量比为 1:2。将 pBudCE4.1-miR-140 和空载体 pBudCE4.1 分别与^{NNS}CS 按照质量比 1:2 制备^{NNS}CS/pDNA 纳米复合物(^{NNS}CS/pBudCE4.1-miR-140 和^{NNS}CS/pBudCE4.1),用于后续研究。具体方法见文献报道^[9]。(4)^{NNS}CS/pBudCE4.1-miR-140 纳米复合物转染兔软骨细胞:取乳兔膝关节软骨,无菌操作分离原代软骨细胞,具体操作方法参见文献报道^[10]。置含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,37℃,5% CO₂ 饱和湿度下培养,细胞贴壁达到 85%~90% 融合后传代,以每孔 1×10⁶ 密度接种至 6 孔板,待细胞接近 75% 融合,加入制备的纳米复合物进行转染(实验组加入^{NNS}CS/pBudCE4.1-miR-140,对照组加入^{NNS}CS/pBudCE4.1),继续培养 72h。(5)实时定量 PCR 检测 miR-140 在软骨细胞中的表达:^{NNS}CS/pDNA 转染兔软骨细胞后 72h,TRizol 法提取细胞总 RNA,使用 microRNA 反转录试剂盒中的 Poly(A) 聚合酶在 miRNA 3'端添加 A 尾,反转录为 cDNA。采用 SYBR-green 荧光染料定量 PCR 法对样品中 miR-140 表达水平进行测定和比较分析。miR-140 下游引物和内参基因 U6 引物均来自试剂盒,miR-140 特异性上游引物委托北京奥科生物技术有限公司合成,序列为 5'-CGCGC-CAGTGGTTTTACCCT-3'。实时荧光定量 PCR 检测上述对照组和实验组 cDNA 样本,20 μ l 反应体系:SYBY Green Mix 10.0 μ l,cDNA 模板 1.0 μ l,上、下游引物(10pmol/ μ l)各 1.0 μ l,灭菌双蒸水 7.0 μ l。扩增参数:95℃ 预变性 30s;95℃ 10s、60℃ 20s、72℃ 20s,40 个循环,在每个循环延伸末进行荧光信号的

检测,计算出各 cDNA 样本的 miR - 140 及 U6 的 CT 值,将 miR - 140 PCR 扩增的 C_t 值与相对应 U6 的 C_t 值相减得到 ΔC_t 进行标准化,以此来校正各样本之间 RNA 质量和反转录效率的差异,以公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算得到 miR - 140 基因的相对表达水平。

3. 统计学方法:应用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,计量资料以均次 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较应用方差分析,两两比较采用 *Student - Newman - Keuls* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. pBudCE4. 1 - miR - 140 真核表达载体的构

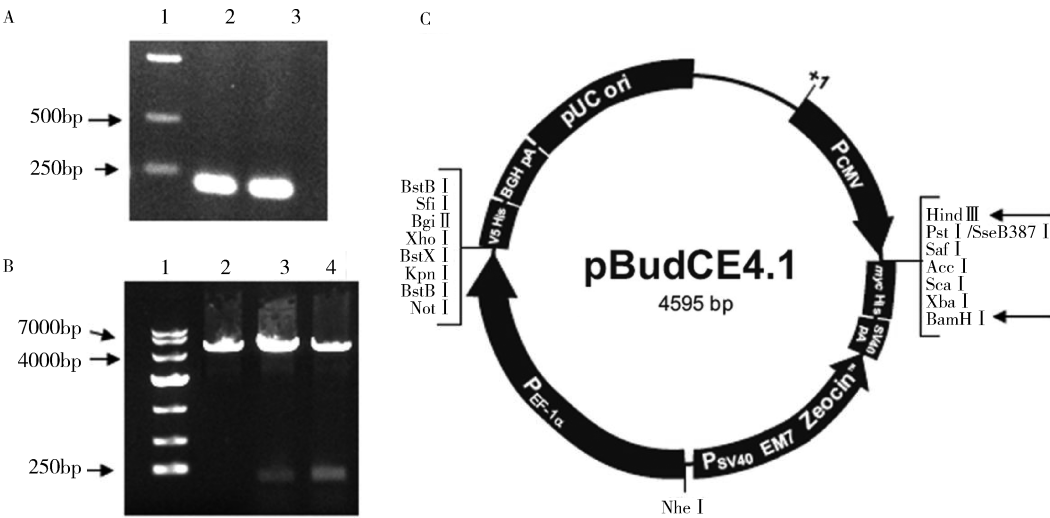


图 1 pBudCE4.1 - miR - 140 重组质粒的构建及鉴定

A. PCR 扩增出 210bp 左右 pri - miR - 140 基因条带;1. DL10000,2 和 3. 扩增条带;B. Hind III 和 BamH I 双酶切鉴定 pBudCE4.1 - miR - 140 重组质粒;1. DL10000,2. pBudCE4.1 空载体酶切,3 和 4. 重组质粒酶切;C. pBudCE4.1 载体图谱;箭头指示处为 pri - miR - 140 插入位置

2. 琼脂糖凝胶电泳鉴定^{NNS}CS 纳米粒电荷阻滞结果:当 pBudCE4.1 - miR - 140 与^{NNS}CS 的质量比等于或小于 1:2 时,^{NNS}CS/ pBudCE4.1 - miR - 140 复合物在电泳时失去向正极泳动能力,表明^{NNS}CS 完全屏蔽 pBudCE4.1 - miR - 140 重组质粒所携带的负电荷(图 2)。

3. 实时定量 PCR 检测 miR - 140 的表达:^{NNS}CS / pBudCE4.1 和^{NNS}CS / pBudCE4.1 - miR - 140 纳米粒复合物分别转染兔原代软骨细胞,72h 后提取总 RNA,miRNA 定量 PCR 检测对照组(空载体)和实验组细胞总 RNA 中 miR - 140 表达,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析样品中 miR - 140 表达差异,结果显示,与对照组相比,^{NNS}CS / pBudCE4.1 - miR - 140 转染组细胞总 RNA 样品中 miR - 140 表达水平升高约 14.5 倍($P <$

建:以人基因组为模版 PCR 扩增出 pri - miR - 140, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳在 210bp 左右的位置出现与预期结果一致的目的条带(图 1A)。将其回收纯化后克隆入 pBudCE4.1 载体中,构建 pBudCE4.1 - miR - 140 真核过表达载体。利用限制性内切酶 Hind III 和 BamH I 双酶切后,琼脂糖凝胶电泳,出现 4600bp 和 210bp 左右的条带,与预期结果一致(图 1B)。酶切鉴定阳性的质粒测序结果证实连入的序列与数据库中提供序列完全一致,载体构建成功。pBudCE4.1 载体图谱及 miR - 140 克隆位置(图 1C)。

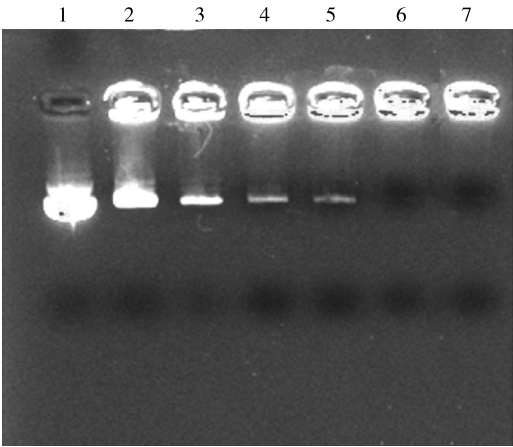


图 2 ^{NNS}CS / pBudCE4.1 - miR - 140 纳米复合物琼脂糖凝胶电泳

1. pBudCE4.1 - miR - 140 重组质粒;2 ~ 7. pBudCE4.1 - miR - 140: ^{NNS}CS = 1:0.25、1:0.5、1:1、1:1.5、1:2、1:2.5

0.05),提示 pBudCE4.1 - miR - 140 能够在软骨细

胞中高效过表达 miR - 140(图3)。

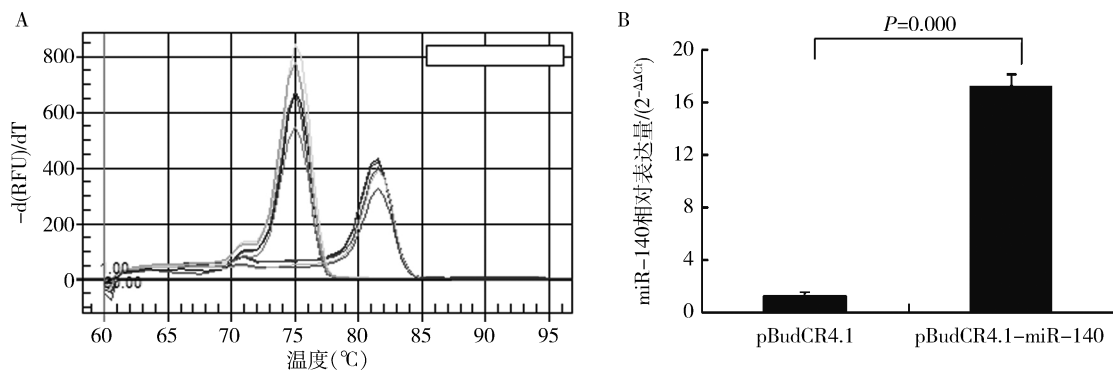


图3 实时定量PCR检测pBudCE4.1-miR-140重组质粒和pBudCE4.1对照质粒转染

72h后软骨细胞中miR-140的表达情况

A. miR-140和U6内参基因的溶解曲线;B. pBudCE4.1-miR-140重组质粒转染组的miR-140表达比对照组的高约14.5倍

讨 论

MicroRNAs是非编码的小RNA分子,在细胞水平发挥着重要的调控功能。在骨关节炎中,多个miRNAs被鉴定出表达水平异常^[11]。其中,miR-140是在软骨与骨关节炎中研究较为广泛的miRNA。miR-140作为软骨组织生物标记基因,在软骨形成过程中发挥着重要作用。人关节炎的软骨组织中,miR-140的表达水平降低,而在正常软骨形成过程中,miR-140的表达水平升高^[12]。另外,在敲除miR-140基因的小鼠模型中,出现骨关节炎样的病理症状^[13]。越来越多的研究表明,miR-140参与调控与软骨的形成和维持其体内稳态相关的多个分子机制^[14]。对于这些分子机制的研究,将有助于阐明骨关节炎的发病机制。

本研究中将长度为210bp的pri-miR-140序列克隆入真核表达质粒pBudCE4.1的人巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子后,成功在软骨细胞中高效表达。miRNA初级转录产物为pri-miRNA,长度约为300~1000bp,将pri-miRNA的部分序列构建到含有CMV等启动子的载体上,不需要特殊的起始序列终止序列等元件即可以实现其表达^[15]。研究表明,以pri-miRNA形式构建的表达载体更接近体内miRNA的加工成熟过程,效率相对更高,并且pri-miRNA形式的重组载体可长期稳定的在细胞内表达发挥作用,适合对细胞功能的长期研究^[16]。本研究使用pri-miR-140序列为目的基因保留了每个miRNA天然原始的独自双臂结构,并将其克隆入pBudCE4.1上的强启动子CMV,非常有利于miRNA的大量表达。除强启动子CMV外,pBudCE4.1质粒

还含有一个独立的启动子——人延伸因子1 α 亚单位(EF-1 α),可使其能同时、独立的表达两个基因,也为将来研究多基因修复软骨损伤奠定了一定的基础。

本研究中选择核定位信号肽偶联核激酶底物短肽修饰的壳聚糖(^{NNS}CS)作为基因运输载体荷载pBudCE4.1-miR-140重组质粒转染软骨细胞,大大提高了^{NNS}CS/pBudCE4.1-miR-140纳米粒的转染效率,实现了miR-140在软骨细胞的高效表达。以往报道显示,病毒载体能够携带治疗基因修复关节软骨损伤^[17,18]。与病毒载体相比,^{NNS}CS具有无抗原性、无致敏、无刺激及无致突变等优点,是一种新型医用生物材料。^{NNS}CS克服了壳聚糖转染效率相对较低的缺陷,且安全系数高,可成为理想的基因运输载体,为将来进一步的基础研究及临床应用奠定了基础。

综上所述,本研究成功构建了pBudCE4.1-miR-140真核过表达载体,并使用^{NNS}CS作为基因运输载体,介导pBudCE4.1-miR-140进入软骨细胞并实现miR-140基因的高效表达,为将来研究miR-140在关节软骨与骨关节炎损伤修复中的作用及其机制创造了前提条件。

参考文献

- Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, *et al.* MicroRNAs in human cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 774: 1-20
- Wahid F, Shehzad A, Khan T, *et al.* MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803(11): 1231-1243
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]. *Cell*, 2005, 120(1): 15-20
- Asahara H. Current status and strategy of microRNA research for cartilage development and osteoarthritis pathogenesis [J]. *J Bone Metab*, 2016, 23(3): 121-127

(转第30页)

到了证实,例如有研究表明,黄芪中黄芪多糖和黄芪皂苷可有效防治 T2DM,其作用机制主要包括改善胰岛素抵抗、增加胰岛素敏感度、抗炎、抗氧化等^[19~21]。

参考文献

- 1 姚东升,孙明瑜,刘平,等. 黄芪汤治疗肝纤维化的研究进展[J]. 山西中医学院学报, 2012,13(3):146-148
- 2 杨庆珍,王增绘,付娟,等. 黄芪化学成分与生态因子的相关性[J]. 应用生态学报, 2015,26(3):732-738
- 3 蒲洁莹,何莉,吴思宇,等. 甘草属植物中三萜类化合物的抗病毒作用研究进展[J]. 病毒学报, 2013,29(6):673-679
- 4 时代音,王锐利,刘晓丹. 黄芪汤对大鼠酒精性肝纤维化的保护作用[J]. 陕西中医, 2011,32(5):623-624
- 5 朱英,刘平. 黄芪汤对肝硬化大鼠肝脏卵圆细胞肝向分化的作用[J]. 中西医结合肝病杂志, 2012,22(5):293-295,324
- 6 张晶. 黄芪汤治疗 2 型糖尿病的实验研究[D]. 唐山:河北联合大学, 2011
- 7 范艳芳. 黄酮类化合物葡萄糖醛酸化和硫酸化代谢机理及其对 P-糖蛋白的作用研究[D]. 广州:南方医科大学, 2012
- 8 Liu Y, He J, Chen X, *et al.* The proapoptotic effect of formononetin in human osteosarcoma cells: involvement of inactivation of ERK and Akt pathways[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014,34(3):637-645
- 9 Sun T, Wang J, Huang LH, *et al.* Antihypertensive effect of formononetin through regulating the expressions of eNOS, 5-HT2A/1B receptors and α 1-adrenoceptors in spontaneously rat arteries[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013,699(1-3):241-249
- 10 Auyeung KK, Law PC, Ko JK. Novel anti-angiogenic effects of formononetin in human colon cancer cells and tumor xenograft[J]. *Oncol Rep*, 2012,28(6):2188-2194
- 11 Tahrani AA, Bailey CJ, Del Prato S, *et al.* Management of type 2 di-

- abetes: new and future developments in treatment[J]. *Lancet*, 2011, 378(9786):182-197
- 12 Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, *et al.* Metabolite profiles and the risk of developing diabetes[J]. *Nat Med*, 2011,17(4):448-453
- 13 Chen T, Zheng X, Ma X, *et al.* Tryptophan predicts the risk for future type 2 diabetes[J]. *PLoS One*, 2016,11(9):e0162192
- 14 Chen T, Ni Y, Ma X, *et al.* Branched-chain and aromatic amino acid profiles and diabetes risk in Chinese populations[J]. *Sci Rep*, 2016,6:20594
- 15 张贵彪,孙明瑜,宋雅楠,等. 基于基因表达谱分析黄芪汤改善大鼠肝纤维化的分子机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2014,29(5):1634-1639
- 16 Holeccek M. Ammonia and amino acid profiles in liver cirrhosis: effects of variables leading to hepatic encephalopathy[J]. *Nutrition*, 2015,31(1):14-20
- 17 Dejong CH, van de Poll MC, Soeters PB, *et al.* Aromatic amino acid metabolism during liver failure[J]. *J Nutrition*, 2007,137(6 Suppl 1):1579S-85S; discussion 97S-98S
- 18 Yu H, Ni Y, Bao Y, *et al.* Chenodeoxycholic acid as a potential prognostic marker for roux-en-Y gastric bypass in Chinese obese patients[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015,100(11):4222-4230
- 19 Lv L, Wu SY, Wang GF, *et al.* Effect of astragaloside IV on hepatic glucose-regulating enzymes in diabetic mice induced by a high-fat diet and streptozotocin[J]. *Phytother Res*, 2010,24(2):219-224
- 20 段炼,李会军,闻晓东,等. 黄芪治疗糖尿病研究进展[J]. 中国新药杂志, 2013,22(7):776-781
- 21 王涛,魏学娟,翁孝刚,等. 黄芪多糖对肥胖大鼠胰岛素敏感性的影响[J]. 中国药学杂志, 2011,46(3):185-188

(收稿日期:2017-01-24)

(修回日期:2017-02-27)

(接第 38 页)

- 5 Sondag GR, Haqqi TM. The role of microRNAs and their targets in osteoarthritis[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2016, 18(8): 56
- 6 Buechli ME, Lamarre J, Koch TG. MicroRNA-140 expression during chondrogenic differentiation of equine cord blood-derived mesenchymal stromal cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(8): 1288-1296
- 7 Gabler J, Ruetze M, Kynast KL, *et al.* Stage-specific miRs in chondrocyte maturation: differentiation-dependent and hypertrophy-related miR clusters and the miR-181 family[J]. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21(23-24): 2840-2851
- 8 Liang Y, Duan L, Xiong J, *et al.* E₂ regulates MMP-13 via targeting miR-140 in IL-1 β -induced extracellular matrix degradation in human chondrocytes[J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18(1): 105
- 9 Zhao R, Sun B, Liu T, *et al.* Optimize nuclear localization and intra-nucleus disassociation of the exogene for facilitating transfection efficacy of the chitosan[J]. *Int J Pharm*, 2011, 413(1-2): 254-259
- 10 赵荣兰,彭效祥. 可磷酸化短肽偶联壳聚糖介导 IL-1RA 与 IGF-1 共转染对兔关节软骨细胞的作用[J]. 中国生化学与分子生物学报, 2014, 30(12): 1250-1256
- 11 Nugent M. MicroRNAs: exploring new horizons in osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartil*, 2016, 24(4): 573-580
- 12 Miyaki S, Nakasa T, Otsfiki S, *et al.* MicroRNA-140 is expressed

- in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(9): 2723-2730
- 13 Miyaki S, Sato T, Inoue A, *et al.* MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis[J]. *Genes Dev*, 2010, 24(11): 1173-1185
- 14 Barter MJ, Tselepi M, Gómez R. Genome-wide microRNA and gene analysis of mesenchymal stem cell chondrogenesis identifies an essential role and multiple targets for miR-140-5p[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(11): 3266-3380
- 15 Sladitschek HL, Neveu PA. Bidirectional promoter engineering for single cell microRNA sensors in embryonic stem cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155177
- 16 Kluijver J, Gibcus JH, Hettinga C, *et al.* Rapid generation of microRNA sponges for microRNA inhibition[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29275
- 17 Chen Y, Caporali E, Stewart M. Bone morphogenetic protein 2 stimulates chondrogenesis of equine synovial membrane-derived progenitor cells[J]. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 2016, 29(5): 378-385
- 18 Griffin DJ, Ortvad KF, Nixon AJ, *et al.* Mechanical properties and structure-function relationships in articular cartilage repaired using IGF-I gene-enhanced chondrocytes[J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(1): 149-153

(收稿日期:2016-11-23)

(修回日期:2016-12-08)