

王幸幸, 黄珍, 周尧, 等. *MiR-100* 基因敲除小鼠的建立及造血表型初步分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(8): 55-67.
Wang XX, Huang Z, Zhou J, et al. Establishment of *miR-100* knockout mice and preliminary analysis of the hematopoietic phenotype [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(8): 55-67.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.08.008

MiR-100 基因敲除小鼠的建立及造血表型初步分析

王幸幸, 黄珍, 周尧, 李桂玲, 阚晨, 郑红*, 汪思应*

(安徽医科大学基础医学院病理生理学教研室, 合肥 230032)

【摘要】 目的 建立 *miR-100* 基因敲除小鼠模型, 初步探索 *miR-100* 基因缺失对小鼠造血系统发育的影响。方法 通过将 *Ella-Cre⁻; miR-100^{fl/fl}* 小鼠和 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 小鼠进行配繁, 培育出 *Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* (*miR-100^{-/-}*) 小鼠, 也就是 *miR-100* 全身敲除小鼠。通过 PCR 技术以及 q-PCR 技术鉴定小鼠基因型并验证 *miR-100* 基因在小鼠骨髓和脾的敲除效率。分离小鼠外周血、骨髓、脾, 制备单细胞悬液, 利用血细胞计数、流式细胞术、甲基纤维素血细胞集落形成实验分析该基因缺失对小鼠造血系统的影响。并通过 q-PCR 和 RNA 结合蛋白免疫沉淀实验 (RIP) 验证 *miR-100* 与 *Mospd2* 之间的关系。结果 PCR 和 q-PCR 结果表明, 成功构建 *miR-100* 基因敲除小鼠。血细胞计数、流式细胞术及甲基纤维素血细胞集落形成实验结果表明, *miR-100* 基因缺失小鼠外周骨髓系细胞比例增多, 但其对小鼠骨髓和脾的髓系细胞, T/B 淋巴细胞、红细胞的比例和绝对细胞计数无影响, 并且 *miR-100* 基因缺失对小鼠骨髓造血干祖细胞群体比例和数量及骨髓单个核细胞集落形成能力无影响。q-PCR 结果表明, *miR-100* 缺失可以促进小鼠骨髓细胞中 *Mospd2* 的表达。RIP 实验表明, *miR-100* 以 AGO2 蛋白复合物的形式与 *Mospd2* 结合在一起, 进而调控 *Mospd2* 的表达。结论 本研究成功建立了 *miR-100* 基因敲除小鼠模型, 发现该基因缺失影响小鼠外周骨髓系细胞占比, 验证了 *miR-100* 与 *Mospd2* 之间的关系。本研究为进一步了解该基因在小鼠造血调控中的作用提供指导。

【关键词】 *miR-100*; 造血干细胞; 髓系细胞; 基因敲除

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 02-0055-13

Establishment of *miR-100* knockout mice and preliminary analysis of the hematopoietic phenotype

WANG Xingxing, HUANG Zhen, ZHOU Jiao, LI Guiling, KAN Chen, ZHENG Hong*, WANG Siying*

(Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

【Abstract】 Objective An *miR-100* knockout mouse model was established to preliminarily explore the effect of *miR-100* gene deletion on the development of the mouse hematopoietic system. **Methods** By putting *Ella-Cre⁻; miR-100^{fl/fl}* mice and *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* mice were bred to produce *Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* (*miR-100^{-/-}*) mice, that is, *miR-100* knockout mice. The genotype of mice was identified by PCR and q-PCR, and the knock-out efficiency of *miR-100* gene in mouse bone marrow and spleen was verified. Peripheral blood, bone marrow, and spleen were isolated, and single-cell suspensions were prepared. The effect of gene deletion on the hematopoietic system of mice was analyzed by blood count, flow cytometry, and methylcellulose colony formation experiments. The relationship between *miR-100* and *Mospd2* was verified by q-PCR and RNA-binding protein immunoprecipitation (RIP). **Results** The PCR and q-PCR result showed that *miR-100*-knockout mice were successfully constructed. The result of the blood count, flow cytometry, and

【基金项目】 国家自然科学基金 (81772988)。

【作者简介】 王幸幸 (1995—), 女, 硕士, 研究方向: 造血调控。E-mail: 1057543624@qq.com

【通信作者】 郑红 (1968—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 激活突变 SHP2 与肿瘤发生的分子机制及其与造血干细胞发育和功能调控的机制。E-mail: hzhen30@126.com

汪思应 (1963—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤分子生物学。E-mail: sywang@ahmu.edu.cn * 共同通信作者

methylcellulose blood cell colony formation experiments showed that the proportion of peripheral blood myeloid cells in *miR-100* gene-deficient mice increased, but mouse bone marrow and spleen myeloid cells, T/B lymphocyte, and the proportional and absolute cell counts of lymphocytes and erythrocytes were unchanged, and deleting *miR-100* had no effect on the proportion or number of bone marrow hematopoietic stem progenitor cells or the ability of bone marrow mononuclear cells to form colonies. The q-PCR result showed that *miR-100* deletion promoted the expression of *Mospd2* in mouse bone marrow cells. RIP experiments showed that *miR-100* binds to *Mospd2* in the form of an AGO2 protein complex and thereby regulates the expression of *Mospd2*. **Conclusions** A *miR-100*-knockout mouse model was successfully established in this study, and the gene deletion affected the proportion of peripheral blood myeloid cells, which verified the relationship between *miR-100* and *Mospd2*. This study has provided further information on the role of this gene in the regulation of hematopoiesis in mice.

【Keywords】 *miR-100*; hematopoietic stem cells; myeloid cells; gene knockout

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)是造血系统的基石,允许单个 HSC 分化并增殖成更定型的祖细胞和前体细胞,然后产生人体所需的各种成熟血细胞。造血干细胞在血液系统疾病和造血干细胞移植已经临床应用多年,HSC 具有巨大的治疗潜力。HSC 移植治疗白血病已经应用临床多年^[1-3]。在哺乳动物造血系统中,有多种不同的成熟细胞类型,主要包括骨髓细胞(单核细胞/巨噬细胞和粒细胞)、红细胞、肥大细胞、巨核细胞/血小板、T/B 淋巴细胞、自然杀伤(natural killer, NK)细胞和树突状细胞(dendritic cells, DC)。HSC 作为它们的祖先,在血细胞整个分化过程中,HSC 首先失去自我更新能力,分化为多潜能祖细胞(multipotent progenitor cells, MPP),继而多潜能祖细胞然后逐步失去谱系潜力发展为寡能祖细胞-共同淋巴祖细胞(common lymphoid progenitors, CLP)和共同髓系祖细胞(myeloid progenitor cell, CMP)。这些寡能祖细胞共同产生造血系统的所有谱系定向效应细胞。例如, CMP 产生巨核细胞/红细胞祖细胞(megakaryocyte-erythroid progenitor cell, MEP)和粒细胞/巨噬细胞祖细胞(granulocytic macrophage progenitor, GMP)。最后,这些谱系定向的效应细胞产生我们的成熟血细胞,并随着时间的推移不断保持自我更新分化潜力以保持造血系统的稳态^[4-6]。在 HSC 自我更新和分化的整个进程中,受到了多种精密而又准确的调控,包括细胞外的信号蛋白,染色质重塑, DNA 甲基化,剪接因子,转录因子, lncRNA, miRNA, 翻译和翻译后蛋白修饰^[7]。

其中,微小 RNA(miRNAs)是小的 RNA 分子,其作用类似于 siRNA,广泛存在于真核生物中(长约 19~25 bp)。miRNA 可以通过多种途径调控生物体的生长发育^[8-9]。在造血干细胞自我更新及其终末

分化的过程中,多种 miRNA 起到了非常重要的调控作用^[10]。研究发现,多种 miRNA 在造血干细胞(HSC)中高表达,包括 miR125a-5p、miR-125b-5p、miR-155、miR-130a、miR-196b、miR-99a、miR-126-3p、miR-181c、miR-193b、miR-542-5p 和 let7e, HSC 中富集的 microRNA 对长期造血输出有着不同的调节作用^[11]。miR-125a 增强小鼠造血干细胞和祖细胞的自我更新、寿命和迁移^[12]。HSC 和急性髓系细胞白血病干细胞的自我更新受到 miR-99 调节。通过抑制造血干细胞分化和调控细胞周期,miR-99 可以维持 HSC 的长期重建活性^[13]。miR-130a 可以调节 HSC 自我更新和谱系规范^[14]。

miR-100 一直是我们课题组研究的一个重要的基因。我们的课题组前期建立了一个小鼠模型(神诱导 *Pttn11*^{D61G/+} 激活突变的小鼠细胞模型),我们发现该小鼠细胞 *miR-100* 的表达显著下降,因此,本实验室展开了对 *miR-100* 的一系列研究。文献^[15]显示,*miR-100* 作为癌基因和抑癌基因在癌症中起着重要作用。此外,*miR-100* 的失调还与多种癌症不良预后相关,*miR-100* 可以作为人类癌症预后生物标志物和潜在治疗靶点^[16]。目前,尚未发现 *miR-100* 在模型小鼠造血调控中的作用。

文献显示,在急性髓系白血病中,*miR-100* 通过靶向 *RBSP3* 调节 G1/S 期过渡和 S 期进入,从而阻断终末分化^[17]。并且与造血祖细胞相比,*miR-100* 在造血干细胞中是高表达的^[13]。提示 *miR-100* 可能在 HSC 发育过程中发挥重要的调控作用。于是我们猜想 *miR-100* 可能调控 HSC 的比例和分化。我们通过使用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术^[18]和重组酶系统——Cre/LoxP^[19]成功构建了 *miR-100* 全身敲除小鼠模型,并通过流式细胞术对其外周血、脾、骨髓细胞进行初步分析,发现 *miR-100* 缺失影响小鼠外周骨髓系细胞的占比。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验使用 SPF 级 *Ella-Cre⁻; miR-100^{fl/fl}* 和 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* C57BL/6 品系小鼠, 购自南京大学模型动物研究中心[SCXK(苏)2018-0008], 均为 6~8 周龄, 体重为 20~26 g, 雌雄各 7 只。均饲养在安徽医科大学基础医学院实验动物中心[SYXK(皖)2020-001], 采用 12 h 交替明暗照明, 自由饮水进食。本研究的动物实验均经安徽医科大学动物伦理委员会(IACUC)批准(LLSC20170259), 本实验严格遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

琼脂糖粉末(A620014, 上海生物工程); TAE (50×)(ST716, Beyotime Biotechnology), DNA ladder marker(100 bp)(MD109, 北京天根生化科技); 小鼠鼠尾 DNA 提取试剂盒(MD109, 成都福际); 2×Taq MasterMix(Dye)(CW0682M, 康为世纪); Hairpin-itTM microRNA&U6 snRNA Normalization RT-PCR Quantitation Kit(E01008, 上海吉玛制药技术公司); 逆转录试剂盒(K1622, 赛默飞); CD3-PE(anti-mouse, 100205)、B220-FITC(anti-mouse, 103205)、Gr-1-PE(anti-mouse, 108407)、CD11b-FITC(anti-mouse, 101205)、Ter119-FITC(anti-mouse, 116205)、CD71-APC(anti-mouse, 113819)、Lin-FITC(anti-mouse, 133301)、c-kit-APC/Cyanine7(anti-mouse, 135135)、Sca-1-PB(anti-mouse, 108119)、CD48-PerCP/Cyanine5.5(anti-mouse, 103421)、CD150-PE(anti-mouse, 115903)、Lin-PE(anti-mouse, 133303)、CD16/32-FITC(anti-mouse, 156613)、CD34-AlexaFluor647(anti-mouse, 128605)、CD127-PE/cyanine5(anti-mouse, 121123)均购自 Biolegend; 甲基纤维素(北京索莱宝, M8070); GibcoTM IMDM(L610KJ)(赛默飞世尔科技, 12440053); Recombinant Mouse GM-CSF(Novoprotein, CK02); Argonaute 2(C34C6) Rabbit mAb(CST, 2897); Protein A/G Agarose Beads(翎因生物, L-1008/L-1008A); NP-40 裂解液(碧云天, P0013F); 兔 IgG(碧云天, A7016); 青链霉素双抗(Hyclone, SV30010); 胎牛血清(Hyclone, SH30401)。普通 PCR 扩增仪(德国 Biometra); 显影仪器(上海博迅实业公司); 实时荧光定量 PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad); Countstar 自动细胞计数仪(上海睿钰生物科

技); Nanodrop(赛默飞世尔科技); CytoFLEX 分析流式细胞仪(美国 Beckman Coulter)。

1.3 实验方法

1.3.1 构建 *miR-100* 基因全身敲除小鼠

Ella-Cre⁻; miR-100^{fl/fl} 小鼠其 *miR-100* 基因两端插入两个同方向的 Loxp 位点, Loxp 位点的存在并不影响该基因的功能。*Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 小鼠是全身表达 Cre 基因的工具鼠, 可以作为广泛细胞组织靶基因完全敲除的工具。当 Cre 酶存在时, 它可以识别两个同方向的 Loxp 位点, 将 Loxp 位点之间的序列切除并将其环化, 同时将 Loxp 两端的剩余序列进行连接, 并保留一个 Loxp 位点。

首先将 *Ella-Cre⁻; miR-100^{fl/fl}* 雌性小鼠和 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 雌性小鼠合笼, 得到 F1 代小鼠, 通过小鼠基因型鉴定, 选取基因型为 *Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* (因为雌性 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 小鼠具有更高的敲除效率, 所以选取雌性 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 小鼠来配繁)。随后将 F1 代小鼠(基因型为 *Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}*) 雌雄合笼, 最终在其子代得到 (*Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* 小鼠、*Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 小鼠和 *Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* 小鼠)。

1.3.2 小鼠鼠尾基因组 DNA 的提取

向每个装有鼠尾的 1.5 mL 的 EP 管加入 100 μ L Buffer MP 和 4 μ L Foregene Protease Plus (为了减少损耗, 可以提前配制 100 μ L Buffer MP 和 4 μ L Foregene Protease Plus 的预混液), 涡旋并将其混匀, 保证组织完全在裂解液里。65°C 金属浴 30 min 后再 95°C 金属浴 5 min。5000 r/min 离心 4 min, 收集上清液(含 DNA)到新 EP 管中, 进行普通 PCR 扩增。

1.3.3 小鼠基因型鉴定

将获得的鼠尾 DNA 进行小鼠基因型鉴定, *miR-100* F1(5'-TCTGGGCTCTCAGCAAGTAAATGTC-3') 和 *miR-100* R1(5'-ACTGAAGGGGATAAGGTTGCCTCTC-3') 引物鉴定 5' - LoxP 位点(WT: 358 bp, floxp: 423 bp), *miR-100* F2(5'-GGATGCCTTTTAGAGTGGTAGACAC-3') 和 *miR-100* R2(5'-CTGTCA GCCAGTCTTCACTTTCTG-3') 引物鉴定 3' - LoxP 位点(WT: 312 bp, floxp: 379 bp), *miR-100* F1 和 *miR-100* R2 引物鉴定 Null 位点(WT = 1453 bp, floxp = 1585 bp, Null = 467 bp), Cre-up(5'-GCCTGCATTA CCGGTCGATGC-3') 和 Cre-low(5'-CAGGGTGTATAAGCAATCCC-3') 引物鉴定 *Ella*

- Cre 位点(481 bp)。PCR 反应体系:2×PCR Mix 10 μL,前后引物(F/R)各 0.5 μL,DNA 4 μL,无菌 ddH₂O 5 μL。PCR 反应程序:EIla-Cre 程序:(1) 95℃、5 min;(2) 95℃、30 s;(3) 63℃、35 s;(4) 72℃、35 s;(5) 72℃、5 min;(6) 16℃ hold。(2)~(4)循环 30 次。Loxp 程序:(1) 95℃、5 min;(2) 95℃、30 s;(3) 62℃、30 s;(4) 72℃、30 s;(5) 72℃、5 min;(6) 4℃ 保存。(2)~(4)循环 30 次。Null 程序:(1) 95℃、5 min;(2) 95℃、30 s;(3) 63℃、30 s;(4) 72℃、60 s;(5) 72℃、5 min;(6) 4℃ 保存。(2)~(4)循环 30 次。将得到的 PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳并成像分析。当 5' Loxp 和 3' Loxp 位点扩增不出来目的条带,5' WT 和 3' WT 都无条带,Null 条带在 467 bp,EIla-cre 条带在 481 bp,则表示为 *miR-100* 全敲小鼠(*EIla-Cre⁺;miR-100^{fl/fl}*)。当 5' Loxp 和 3' Loxp 位点扩增不出来目的条带,5' WT 条带在 358 bp,3' WT 条带在 312 bp,Null 条带在 467 bp,WT 条带 1453 bp,*EIla-cre* 条带在 481 bp,则表示为 *miR-100* 敲除一半的小鼠(*EIla-Cre⁺;miR-100^{+/-}*)。

1.3.4 q-PCR 验证小鼠骨髓和脾 *miR-100* 的敲除效率

提取对照组小鼠(*EIla-Cre⁺;miR-100^{+/+}*)和敲除组小鼠(*EIla-Cre⁺;miR-100^{fl/fl}*)骨髓和脾细胞的 RNA,逆转录为 cDNA,进行 q-PCR 反应。逆转录体系为:5×MMLV RT Buffer 4 μL,dNTP 0.75 μL,miRNA&U6 snRNA RT primer mix 1.2 μL RNasin 0.25 μL,MMLV Reverse Transcriptase 0.2 μL,每次逆转录的量为(1~3 μg),根据 RNA 的浓度计算所要的加样体积,最后用 0.1% DEPC 水补足至 20 μL。逆转录程序为:42℃、60 min、70℃、5 min、4℃ 保存。q-PCR 反应体系为:2×Real-time PCR Master Mix (SYBR)10 μL,miRNA/U6 snRNA specific Primer set (10 μmol/L)0.4 μL,Taq DNA polymerase(5 U/μL)0.2 μL,miR-100 RT product 2 μL,最后用 0.1% DEPC 水补足至 20 μL。q-PCR 程序为(1) 95℃、3 min;(2) 95℃、12 s;(3) 62℃、40 s;(4) 4℃ 保存。(2)~(3)循环 40 次。采用 2^{-ΔΔCt}法对实验数据进行分析。

1.3.5 小鼠外周血血细胞计数

取 6~8 周成年小鼠,取血后滴入抗凝管中(大概 3~4 滴),用血细胞计数仪进行血细胞计数分析。

1.3.6 小鼠外周血、骨髓、脾细胞流式分析

制备小鼠外周血、骨髓和脾单细胞悬液,骨髓

和脾的单细胞悬液吸出 100 μL 测红细胞,其余裂掉红细胞。通过流式细胞术分析小鼠外周血中的髓系细胞、T/B 淋巴细胞的比例,分析小鼠脾中的髓系细胞、T/B 淋巴细胞和红细胞的比例及绝对细胞计数,分析小鼠骨髓中的髓系细胞、T/B 淋巴细胞、红细胞及造血干祖细胞的群体的比例和绝对细胞计数。随后按照表 1 中的流式抗体组合进行染色,上机检测。

1.3.7 小鼠骨髓和脾总的血细胞计数分析

取出 100 μL 上述步骤制备的骨髓和脾的单细胞悬液,并加入 900 μL 的 PBS(吹打混匀)。取出 20 μL 置于细胞计数板中,上机检测(注意此为 10 倍稀释,最终结果要×10)。

1.3.8 甲基纤维素血细胞集落形成实验

无菌原则制备小鼠骨髓单个核细胞(裂掉红细胞即可),并将细胞浓稀释为 2×10⁵/mL。培养体系:胎牛血清 0.88 mL,甲基纤维素 1.4 mL,GM-CSF(终浓度 50 μg/L),根据细胞浓度取 88 000 个细胞,用 IMDM 培养基补足到 4 mL,充分混匀后加入培养皿中,每皿 1 mL,均匀分布,重复 3 皿(甲基纤维素黏稠可以用 1 mL 注射器吸取,加样时可以旋转划圈加样,将气泡留在板孔周围)。为了防止孔内蒸发,其余孔加入 2 mL 无菌 PBS。将六孔板置于 37℃ 5% CO₂ 中,饱和湿度培养 5~7 d。显微镜下计算集落分析(> 50 个细胞为 1 个集落)。

1.3.9 q-PCR 验证小鼠骨髓细胞中 *Mospd2* 的表达

提取对照组小鼠(*EIla-Cre⁺;miR-100^{+/+}*)和敲除组小鼠(*EIla-Cre⁺;miR-100^{fl/fl}*)骨髓的 RNA,逆转录为 cDNA,进行 q-PCR 反应。逆转录体系为:模板 RNA,1~3 μg(根据提取 RNA 的浓度计算体积),Oligo(dT) 1 μL,最后用 0.1% DEPC 水补足至 12

表 1 流式抗体组合

Table 1 Flow antibody combinations

名称 Name	组合 Combination
髓系细胞 Myeloid cells	CD11b ⁺ Gr-1 ⁺
T 淋巴细胞 T lymphocytes	CD3 ⁺
B 淋巴细胞 B lymphocytes	B220 ⁺
红细胞 Erythrocytes	CD71 ⁺ Ter119 ⁺
造血干细胞 LSK	Lin ⁻ Sca1 ⁺ c-Kit ⁺
长期造血干细胞 LT-HSC	Lin ⁻ Sca1 ⁺ c-Kit ⁺ CD48 ⁻ CD150 ⁺
短期造血干细胞 ST-HSC	Lin ⁻ Sca1 ⁺ c-Kit ⁺ CD48 ⁺ CD150 ⁻
多潜能祖细胞 MPP	Lin ⁻ Sca1 ⁺ c-Kit ⁺ CD48 ⁺ CD150 ⁻
髓系祖细胞 CMP	Lin ⁻ c-kit ⁺ Sca-1 ⁻ CD16/32 ⁻ CD34 ⁺
粒系-巨噬系祖细胞 GMP	Lin ⁻ c-kit ⁺ Sca-1 ⁻ CD16/32 ⁺ CD34 ⁺
红核系和红系祖细胞 MEP	Lin ⁻ c-kit ⁺ Sca-1 ⁻ CD16/32 ⁻ CD34 ⁻
共同淋巴细胞祖细胞 CLP	Lin ⁻ c-kit ^{low} Sca-1 ^{low} CD127 ⁺

μL, 4000 r/min 离心 5 min 后放入 65°C 金属浴 5 min。5 min 后, 将样品放在冰上终止反应。随后加入 5× Reaction Buffer 4 μL, RiboLock RNase-inhibitor 1 μL, 10 mmol/L dNTP Mix 2 μL, RevertAid M-MuLV RT 1 μL。逆转录程序为: 42°C、60 min; 70°C、5 min; 4°C hold。Mospd2 F(5'-GAGGTTTAACCGTCTCAGC TC-3'), Mospd2 R(5'-GTGACATCTTAGCCTGTGCT C-3'), Gapdh F(5' AGTTCGCTGTGAACGGATTTG-3'), Gapdh R(5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGG TCA-3')。q-PCR 反应体系为: 2×SYBR® Green Pro Taq HS Premix 10 μL, Primer F/R(10 μmol/L) 0.5 μL, CDNA 2 μL, RNase free water 7 μL。q-PCR 程序: (1) 95°C、5 min; (2) 95°C、30 s; (3) 60°C、30 s; (4) 4°C 保存。(2)~(3) 循环 40 次。用 2^{-ΔΔCt} 法分析数据。

1.3.10 RNA 结合蛋白免疫沉淀验证 miR-100 与 Mospd2 之间的关系

分离小鼠骨髓细胞, PBS 洗 1 遍, 4°C 2000 r/min 离心 5 min。弃上清, 1 mL PBS 重悬沉淀, 各分 3 组: IgG 组、AGO2 组、input 组。4°C 2000 r/min 离心 5 min, 弃上清, input 组加 1 mL TRIzol, 吹打混匀, 暂时放入 -80°C 冰箱保存。其余加入 1 mL 裂解液(裂解液: 蛋白酶抑制剂 = 1 : 100), 于摇床冰上裂解 40 min, 间歇混匀。4°C 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清至新的 EP 管。细胞裂解液与 2.5 μg 抗体 4°C 摇床过夜。用 1 mL RIP 缓冲液洗涤 ProteinA/G beads, 洗 2 遍, 4°C 2000 r/min 离心 5 min, 100 μL RIP 裂解缓冲液重悬, 每样加入

ProteinA/G beads 50 μL, 4°C 摇床 2 h。2 h 后, 4°C 1500 r/min 离心 5 min, 去上清, 用 1 mL RIP 缓冲液洗涤 beads 2 遍。去上清, 加 1 mL TRIzol, 提取 RNA, Real-time PCR 验证 Mospd2 mRNA 表达水平。

1.4 统计学方法

本文中所有实验均重复 3 次以上, 计量数据采平均数±标准差($\bar{x} \pm s$), 利用 t 检验进行组间差异分析, 用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析, P < 0.05 时, 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 实验小鼠基因型的确定

2.1.1 MiR-100 全身敲除小鼠基因型鉴定

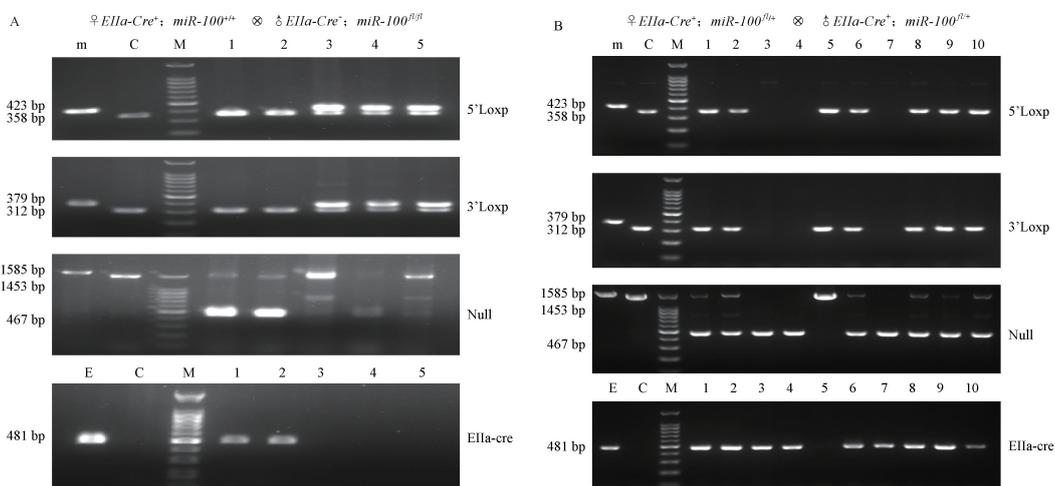
首先我们将 *Ella-Cre⁻; miR-100^{fl/fl}* 雄性小鼠和 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 雌性小鼠合笼, 得到 F1 代小鼠, 通过小鼠基因型鉴定, 选取基因型为 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/fl}* 小鼠(1, 2 号小鼠), F1 代小鼠基因型鉴定结果见图 1A。

随后我们将基因型为 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/fl}* F1 代小鼠雌雄合笼, 最终我们得到子代基因型为 *Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* 小鼠(3, 4, 7 号小鼠), 基因型鉴定结果如图 1B。

2.1.2 验证 miR-100 全身敲除小鼠基因型

(1) 5' Loxp、3' Loxp、Null 和 Ella-cre 位点鉴定

我们通过普通 PCR 鉴定小鼠 5' Loxp 和 3' Loxp 位点是否被切除, 通过琼脂糖凝胶电泳分析, 如果 miR-100 完全敲除, 则扩增不出来目的条带。如果未完全敲除 miR-100, 则可以扩增出目的条带



注: M, DNA 分子量标准; m, *Ella-Cre⁻; miR-100^{fl/fl}* 小鼠; C, C57BL/6 小鼠; E, *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 小鼠。

图 1 F1 和 F2 代小鼠基因型鉴定结果

Note. M, DNA molecular weight marker. m, *Ella-Cre⁻; miR-100^{fl/fl}* mice. C, C57BL/6 mice. E, *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* mice.

Figure 1 Genotyping results of F1 and F2 generation mice

(图 1)。随后再扩增 Null 和 *Ella-cre*, 如果 Null 条带在 467 bp, *Ella-cre* 条带为 481 bp, 则表示 *miR-100* 敲除。因此我们发现 3 号、4 号和 7 号小鼠 *Loxp* 未扩增出条带, Null 目的条带大小为 467 bp, *Ella-cre* 目的条带大小为 481 bp (图 1), 结果证明, 我们成功构建了 *miR-100* 全身敲除小鼠模型。小鼠基因型鉴定工作原理 (图 2)。

(2) qPCR 检测小鼠骨髓和脾中 *miR-100* 的表达

通过 q-PCR, 在小鼠骨髓细胞中, 相较于 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 小鼠 *miR-100* 的表达 (1.003 ± 0.2113), *miR-100* 敲除小鼠 (*Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* 小鼠) 的 *miR-100* 表达明显降低 (0.2270 ± 0.1241), 在小鼠脾细胞中, 相较于 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 小鼠 *miR-100* 的表达 (0.9377 ± 0.1743), *miR-100* 敲除小鼠 (*Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* 小鼠) 的 *miR-100* 表达明显降低 (0.2324 ± 0.2186), 我们成功构建了 *miR-100* 敲除小鼠模型 (图 3)。

2.2 *Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* 小鼠外周血白细胞计数异常

血细胞计数分析结果显示, 与 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 小鼠相比 (6.350 ± 1.254), *miR-100* 敲除小鼠外周血白细胞增多 (9.475 ± 3.458) (图 4A), 但两者的红细胞计数没有明显差异 (图 4B)。

为了进一步验证血细胞计数的结果, 我们又通过流式细胞术分析 6~8 周的 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 和 *Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* 小鼠外周骨髓系细胞 (CD11b⁺ Gr-1⁺ 双阳细胞群体) 和 T/B 淋巴细胞 (CD3⁺ 为 T 淋巴细胞群体, B220⁺ 为 B 淋巴细胞群体) 的比例。通过流式细胞术分析, 可见小鼠外周血细胞分为 3 群, 从左到右依次为淋巴细胞、单核细胞和粒细胞。随后我们圈出所有活细胞, 并通过 FSC-A 和 FSC-H 去除粘连细胞, 最后我们又通过特异性荧光抗体分出目的细胞群体, 统计分析结果 (图 5)。

通过流式细胞术分析, 发现与 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 小鼠相比 (20.35 ± 11.07), *miR-100* 敲除小鼠外周骨髓系细胞比例增多 (31.14 ± 4.606) (图 6A), 但它的 T/B 淋巴细胞占比未见明显差异 (图 6B)。

2.3 *miR-100* 敲除对小鼠骨髓和脾总的血细胞计数及其髓系细胞、T/B 淋巴细胞和红细胞比例及绝对细胞计数无影响

因为骨髓是小鼠主要的造血器官, 外周血细胞

主要来源于骨髓。在特定条件下, 脾也可以参与造血调控。于是, 我们思考造成 *miR-100* 敲除小鼠外周骨髓系细胞比例增多的原因是否是骨髓和脾功能异常造成的。接下来我们将两种小鼠骨髓和脾总的血细胞数计数分析 (图 7)。

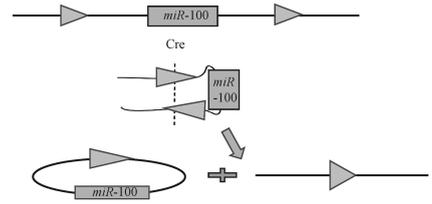
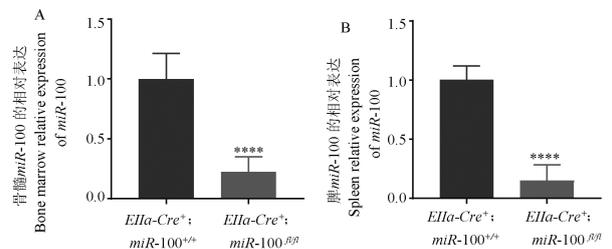


图 2 小鼠基因型鉴定工作原理

Figure 2 How mouse genotyping works

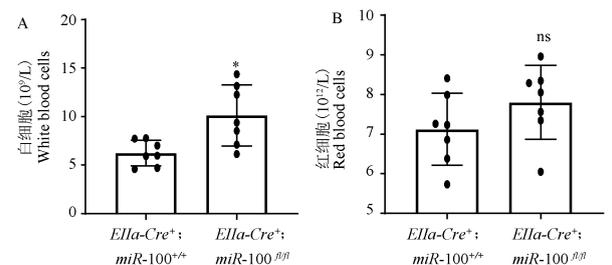


注: A: 两组小鼠骨髓中 *miR-100* 表达验证; B: 两组小鼠脾中 *miR-100* 表达验证。与 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 组相比, **** $P < 0.0001$ 。

图 3 *miR-100* 基因全身敲除的验证

Note. A, Verification of *miR-100* expression in bone marrow of two groups of mice. B, Verification of *miR-100* expression in spleen of two groups of mice. Compared with *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* group, **** $P < 0.0001$.

Figure 3 Validation of systemic knockout of *miR-100* gene



注: A: 与 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 小鼠相比, *Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* 小鼠外周血白细胞计数明显增多; B: *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 小鼠和 *Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* 小鼠外周血红细胞计数无差异。与 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 小鼠相比, * $P < 0.05$ 。

图 4 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 小鼠和 *Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* 小鼠外周血白细胞与红细胞计数情况

Note. A, Compared with *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}*, *Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* mice had significantly increased peripheral blood leukocyte counts. B, There was no difference in peripheral blood red blood cell counts between *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* mice and *Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* mice. Compared with *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* mice, * $P < 0.05$.

Figure 4 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* mice and *Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* mice peripheral blood white blood cell and red blood cell counts

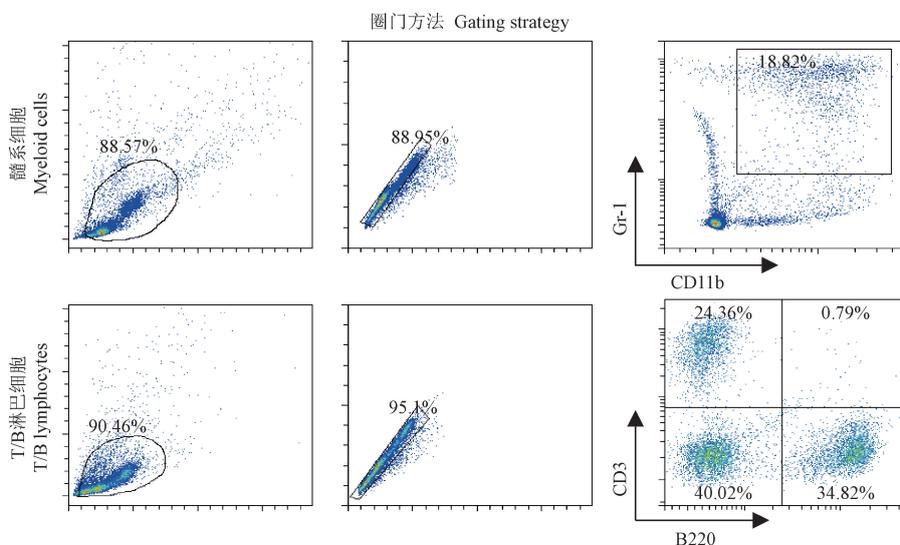
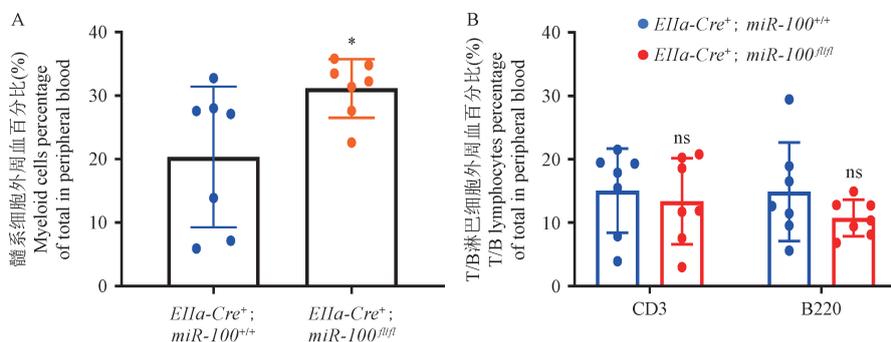


图 5 髓系细胞和 T/B 淋巴细胞圈门方法

Figure 5 Myeloid cells and T/B lymphocyte gating strategy

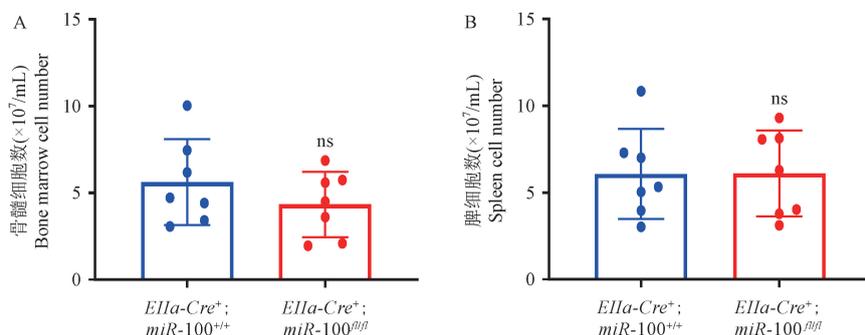


注:A:小鼠外周血髓系细胞比例流式分析结果;B:小鼠外周血 T/B 淋巴细胞比例流式分析结果。与 $EIIa-Cre^+; miR-100^{+/+}$ 组相比, $* P < 0.05$ 。

图 6 $EIIa-Cre^+; miR-100^{+/+}$ 小鼠和 $EIIa-Cre^+; miR-100^{fl/fl}$ 小鼠外周血髓系细胞和 T/B 淋巴细胞差异比较

Note. A, Results of proportional flow cytometry analysis of mouse peripheral blood myeloid cells. B, Flow cytometry results of T/B lymphocyte ratio in mouse peripheral blood. Compared with $EIIa-Cre^+; miR-100^{+/+}$ group, $* P < 0.05$.

Figure 6 Comparison of peripheral blood myeloid cells and T/B lymphocytes between $EIIa-Cre^+; miR-100^{+/+}$ and $EIIa-Cre^+; miR-100^{fl/fl}$ mice



注:A:小鼠骨髓总的血细胞计数结果;B:小鼠脾总的血细胞计数结果。

图 7 $EIIa-Cre^+; miR-100^{+/+}$ 小鼠和 $EIIa-Cre^+; miR-100^{fl/fl}$ 小鼠骨髓和脾总的血细胞计数结果分析

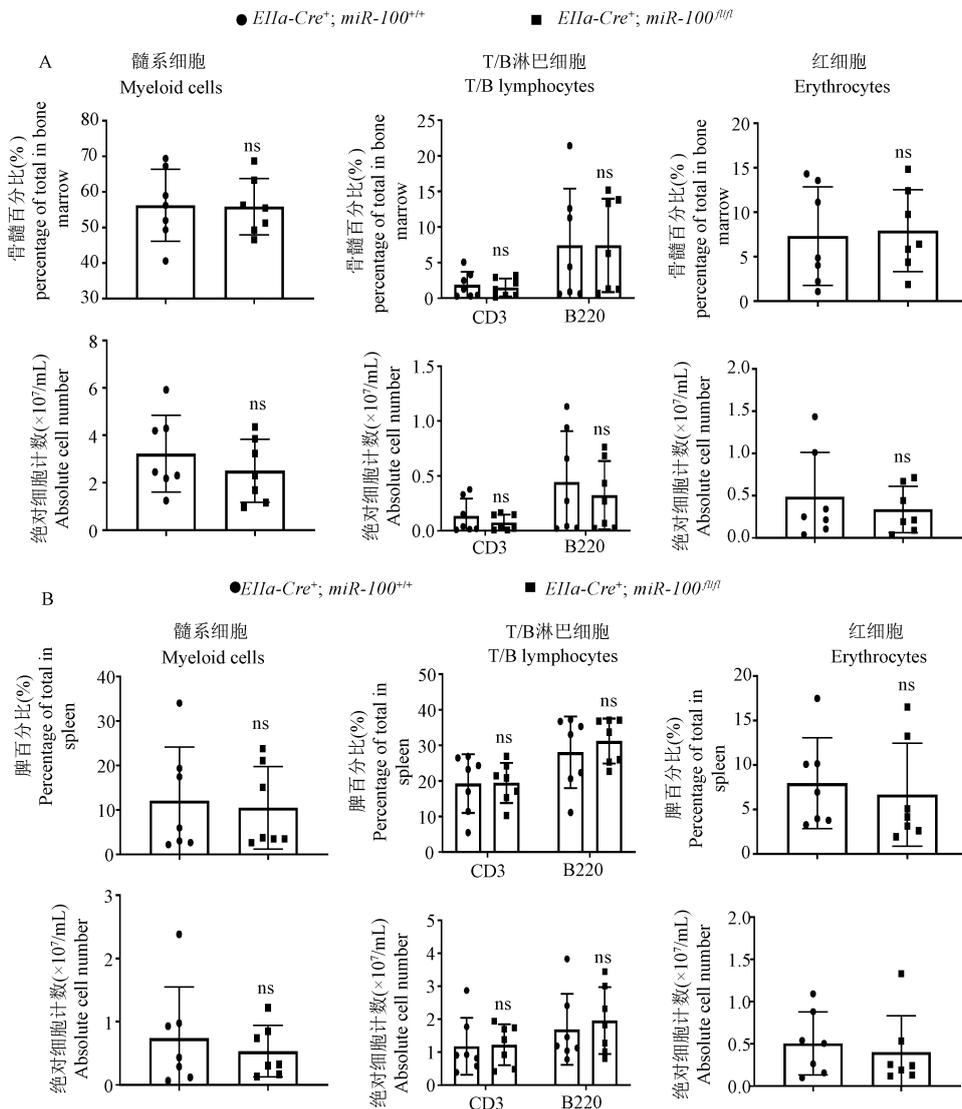
Note. A, Results of total blood counts in mouse bone marrow. B, Total blood counts in mouse spleen.

Figure 7 Analysis of total blood cell count in the bone marrow and spleen of mice $EIIa-Cre^+; miR-100^{+/+}$ and $EIIa-Cre^+; miR-100^{fl/fl}$

通过小鼠骨髓和脾总的血细胞计数,我们发现 $Ella-Cre^+; miR-100^{+/+}$ 小鼠和 $Ella-Cre^+; miR-100^{fl/fl}$ 小鼠骨髓和脾总的血细胞计数并无统计学差异。因为骨髓是外周血所有细胞的主要来源,在特定条件下,脾也可以参与造血调控,那我们考虑造成这种差异的原因是否因为 $miR-100$ 敲除小鼠骨髓和脾的髓系细胞, T/B 淋巴细胞和红细胞占比和绝对细胞计数出现了异常呢? 所以我们又通过流式细胞术分析 $Ella-Cre^+; miR-100^{+/+}$ 小鼠和 $Ella-Cre^+; miR-100^{fl/fl}$ 小鼠骨髓和脾的髓系细胞、T/B 淋巴细胞和红细胞的占比和绝对细胞计数。

小鼠骨髓及脾的髓系细胞和 T/B 淋巴细胞的圈门方法与外周血一致(图 5)。小鼠骨髓和脾红细胞的圈门方法为,先圈出所有活细胞,并通过 FSC-A 和 FSC-H 去除粘连细胞,最后我们又通过特异性荧光抗体分出目的细胞群体($CD71^+Ter119^+$ 双阳细胞群体)(图 8)。小鼠骨髓和脾绝对细胞计数的方法为,用小鼠骨髓和脾的细胞总数乘以其目的细胞群体的占比。

通过流式细胞术分析,我们发现对照组小鼠和实验组小鼠骨髓和脾中的髓系细胞、T/B 淋巴细胞和红细胞的占比及绝对细胞计数的结果没有差异。



注:A:小鼠骨髓流式细胞术分析结果;B:小鼠脾流式细胞术分析结果。

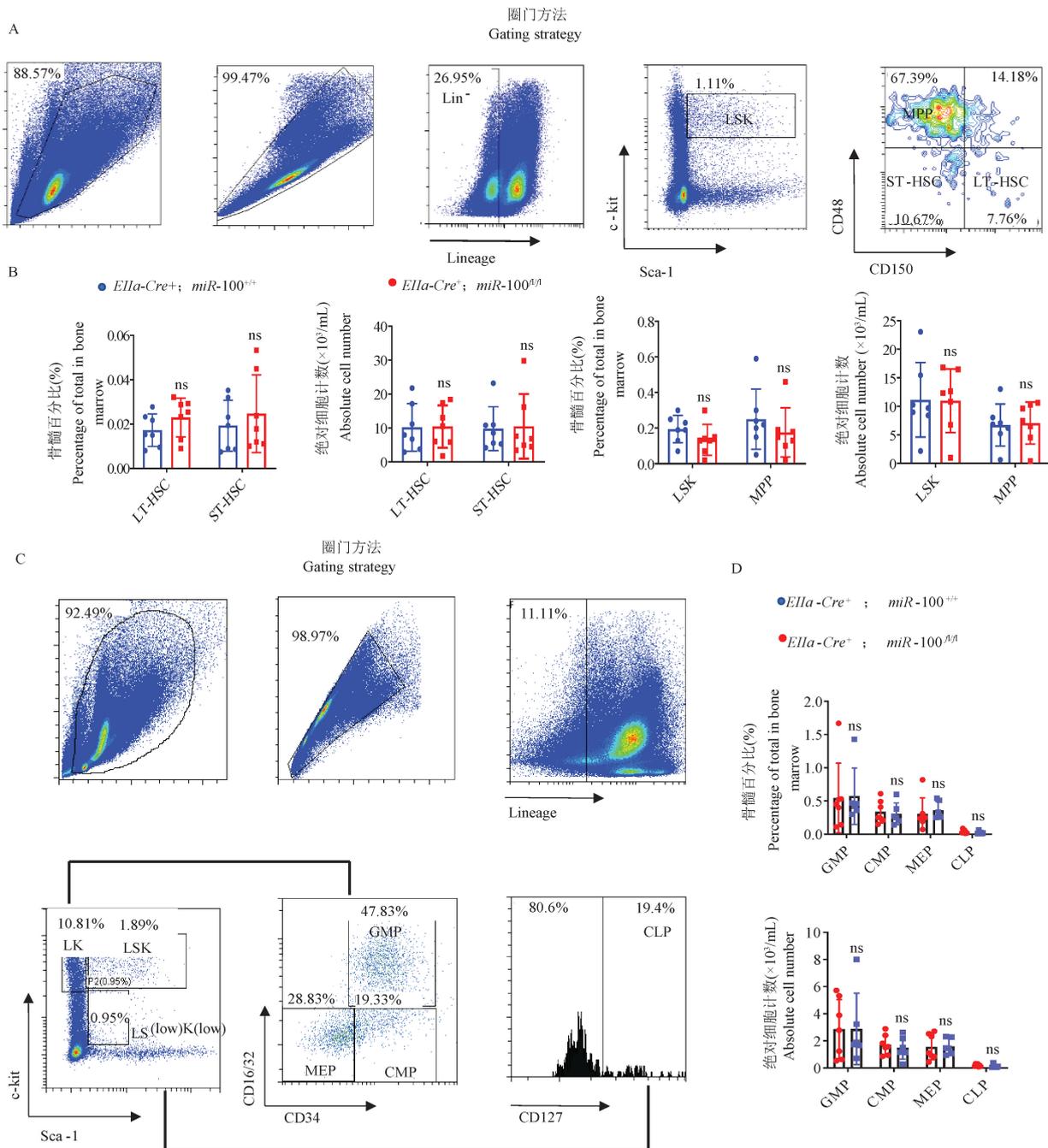
图 8 $Ella-Cre^+; miR-100^{+/+}$ 小鼠和 $Ella-Cre^+; miR-100^{fl/fl}$ 小鼠骨髓和脾髓系细胞、T/B 淋巴细胞和红细胞占比和绝对计数结果分析

Note. A, Results of flow cytometry analysis of mouse bone marrow. B, Flow cytometry analysis of mouse spleen.

Figure 8 Analysis of the proportion and absolute count of myeloid cells, T/B lymphocytes and red blood cells in bone marrow and spleen of mice $Ella-Cre^+; miR-100^{+/+}$ and $Ella-Cre^+; miR-100^{fl/fl}$

miR-100 敲除小鼠外周骨髓系细胞占比增多了,骨髓是小鼠主要的造血器官,是小鼠外周骨髓系细胞的主要来源。但是,小鼠骨髓当中的髓系细胞的占比和绝对细胞计数都没有明显差异。我们思考是否是 *miR-100* 敲除小鼠造血干细胞功能出现了异

常,它向 GMP 分化增多,这样它不仅维持骨髓的稳态,还可以促进一部分细胞迁移到外周血中。所以下一步我们又用流式细胞术分析了 *Ella-Cre⁺* (图 9); *miR-100^{+/+}* 小鼠和 *Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* 小鼠的 HSC 及其各种祖细胞的占比和绝对细胞计数。



注:A:小鼠 LT/ST-HSC、LSK、MPP 细胞群体圈门方法;B:小鼠 LT/ST-HSC、LSK、MPP 细胞流式细胞术结果分析;C:小鼠 GMP、CMP、MEP、CLP 细胞群体圈门方法;D:小鼠 GMP、CMP、MEP、CLP 细胞流式细胞术结果分析。

图 9 *MiR-100* 缺失对小鼠造血干细胞祖细胞的影响

Note. A, Mouse LT/ST-HSC, LSK, MPP cell population gating method. B, Flow cytometry analysis of mouse LT/ST-HSC, LSK and MPP cells. C, Mouse GMP, CMP, MEP and CLP cell population circle-gating method. D, Flow cytometry analysis of mouse GMP, CMP, MEP and CLP cells.

Figure 9 Effect of *MiR-100* deletion on hematopoietic stem progenitor cells in mice

为了进一步研究 *miR-100* 失活对小鼠 HSC 和造血祖细胞群体的影响,我们通过流式细胞术分析了 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 小鼠和 *Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* 小鼠骨髓 LT/ST-HSC、LSK、MPP、GMP、CMP、MEP、CLP 细胞的占比和绝对细胞计数(图 9),结果显示,*miR-100* 缺失对小鼠骨髓造血干细胞及祖细胞的数量、比例无影响。

2.4 *MiR-100* 敲除对小鼠骨髓单个核细胞集落形成能力无影响

MiR-100 敲除小鼠外周骨髓系细胞比例增多了,并且 *miR-100* 失活对小鼠造血干细胞和祖细胞的比例和数量并没有影响。已知骨髓当中的造血干细胞会增殖分化为独立的细胞簇或者是集落,在体外,通过特定的培养基和细胞因子诱导可以研究造血干祖细胞的功能。

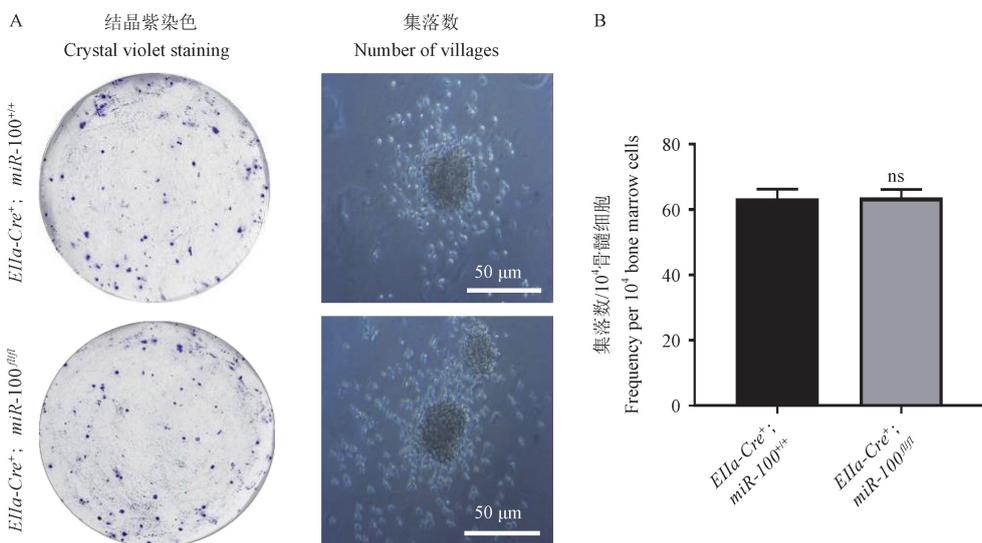
甲基纤维素集落形成实验结果显示,敲除组小鼠(*Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}*),相对于对照组小鼠(*Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}*)所形成的集落大小和数目无差异(图 10)。通过甲基纤维素集落形成实验,我们发现 *miR-100* 失活对小鼠骨髓单个核细胞集落形成能力无影响。

2.5 RNA 结合蛋白免疫沉淀(RIP)实验验证 *miR-100* 以 AGO2 蛋白复合物的形式与 *Mospd2* 结合在一起

MiR-100 敲除小鼠外周骨髓系细胞比例增多,

但其骨髓和脾中的髓系细胞的占比和绝对细胞计数没有明显差异。骨髓中造血干细胞和祖细胞的比例和数量也没有差异。并且,通过甲基纤维素血细胞集落形成实验,我们发现 *miR-100* 失活对小鼠骨髓单个核细胞集落形成能力无影响。于是,我们思考造成 *miR-100* 敲除小鼠外周骨髓系细胞比例增多原因是否是因为细胞迁移造成的。文献显示,在血细胞发育的过程中,血细胞源源不断地从骨髓中迁移到外周血,对维持造血稳态起着至关重要的作用^[20]。文献显示,*Mospd2* 敲除小鼠骨髓造血功能正常,但其外周血中髓系细胞比例降低,并且其可以调控小鼠单核细胞从骨髓中迁移到外周血^[21]。通过 Targetscan 生物信息预测软件,*Mospd2* 可能是 *miR-100* 的下游潜在靶基因之一(图 11A)。在 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 小鼠和 *Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* 小鼠骨髓细胞中,我们通过 qPCR 检测其下游潜在靶基因 *Mospd2* 的相对表达水平,结果显示,相较于对照组小鼠(1.083 ± 0.2289),*miR-100* 敲除小鼠骨髓细胞中 *Mospd2* 表达升高(1.341 ± 0.3815),差异有统计学意义(图 11B)。

本实验我们采用 AGO2 蛋白验证 *miR-100* 与 *Mospd2* 的相互作用关系,结果显示,当 *miR-100* 失活时,*Mospd2* mRNA 表达降低,证实 *miR-100* 以 AGO2 蛋白复合物的形式与 *Mospd2* 结合在一起,从而调控 *Mospd2* 表达(图 11C)。



注:A:细胞集落结晶紫染色及在显微镜下形态图;B:克隆数目统计分析。

图 10 *MiR-100* 失活对小鼠骨髓单个核细胞集落形成能力的影响

Note. A, Crystal violet staining of cell colonies and their morphology under microscope. B, Statistical analysis of the number of clones.

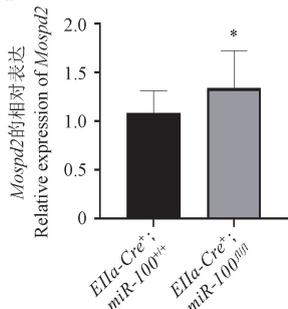
Figure 10 Effect of inactivation of *miR-100* on colony-forming ability of bone marrow mononuclear cells in mice

A

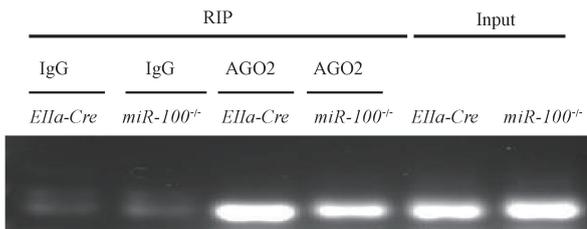
Poorly conserved

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	PCT
Position 2064-2070 of Mospd2 3' UTR	5' ...UAUAAAAGACUUAAGCUUGAU...	7mer-A1	-0.13	84	-0.10	0	N/A
mmu-miR-100-3p	3' ...UAUGGAUUCUGUGUUGGACCA						

B



C



注: A:通过 Targetscan 生物信息预测软件分析, *Mospd2* 可能是 miR-100 的下游潜在靶基因; B: miR-100 缺失促进 *Mospd2* mRNA 的表达; C: RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RIP) 实验验证 miR-100 以 AGO2 蛋白复合物的形式与 *Mospd2* 结合在一起 (图中 *EIIa-Cre* 代表 *EIIa-Cre⁺*; *miR-100^{+/+}* 小鼠, *miR-100^{-/-}* 代表 *EIIa-Cre⁺*; *miR-100^{fl/fl}* 小鼠)。与 *EIIa-Cre⁺*; *miR-100^{+/+}* 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 11 MiR-100 与 *Mospd2* 存在相互作用关系

Note. A, Through Targetscan bioinformatics prediction software analysis, *Mospd2* may be a potential downstream target gene of miR-100. B, Deletion of miR-100 promotes the expression of *Mospd2* mRNA. C, RNA-binding protein immunoprecipitation (RIP) experiments confirmed that miR-100 binds to *Mospd2* in the form of an AGO2 protein complex (*EIIa-Cre* in the figure represents *EIIa-Cre⁺*; *miR-100^{+/+}* mice, *miR-100^{-/-}* represents *EIIa-Cre⁺*; *miR-100^{fl/fl}* mice). Compared with *EIIa-Cre⁺*; *miR-100^{+/+}* group, * $P < 0.05$.

Figure 11 MiR-100 interacts with *Mospd2*

3 讨论

MiR-100 通过转录后调节各种靶基因, 调节细胞周期、增殖、分化、迁移、侵袭和凋亡等多个细胞过程, 在许多人类癌症中异常表达和发挥作用^[22]。在多种血液系统肿瘤中, miR-100 也起到了非常重要的调控作用^[23-28]。并且, miR-100 在造血干细胞 (HSC) 中高度表达的^[13,29]。我们课题组前期构建了 miR-100 肝特异性敲除和全身敲除小鼠模型, 在 miR-100 肝特异性敲除小鼠模型中, 我们发现了在成年小鼠中, 敲除 miR-100 对肝功能和形态没有影响。在老年小鼠中, miR-100 敲除小鼠的肝功能受损。在 miR-100 全身敲除小鼠模型中, 没有发现 miR-100 的敲除和未敲除的小鼠有明显差别^[30-31]。本研究, 将 *EIIa-Cre⁻*; *miR-100^{fl/fl}* 小鼠和 *EIIa-Cre⁺*; *miR-100^{+/+}* 小鼠配繁殖, 得到了 *EIIa-Cre⁺*; *miR-100^{+/+}* 小鼠 (*miR-100* 半敲的小鼠), 随后将 *EIIa-Cre⁺*; *miR-100^{+/+}* 小鼠与 *EIIa-Cre⁺*; *miR-100^{fl/fl}* 小鼠配繁, 最终我们获得了 *EIIa-Cre⁺*; *miR-100^{fl/fl}* 小鼠 (*miR-100* 全敲的小鼠)。首次比较了 miR-100 在 *EIIa-Cre⁺*; *miR-100^{+/+}* 小鼠和 *EIIa-Cre⁺*; *miR-100^{fl/fl}* 小鼠骨髓和脾中的表达情况, 探索了 miR-100 基因

在小鼠造血调控中的作用, 发现了 miR-100 缺失可以促进小鼠外周骨髓系细胞比例增多, miR-100 缺失对小鼠造血干祖细胞群体的比例和绝对细胞计数及小鼠骨髓单个核细胞集落形成能力均没有明显影响。

MiR-100 是 miR-99 家族成员之一, miR-100 在多种实体瘤和血液系统肿瘤中表达异常^[16]。miR-99a/100~125b 三顺反子通过改变 TGFβ 和 Wnt 信号之间的平衡来调节造血干细胞和祖细胞稳态^[29]。MiR-100 通过靶向 RBSP3 和 RB-E2F1 信号通路调节细胞分化和存活^[17]。miR-99 通过抑制分化和细胞周期进入来维持 HSC 的长期重建活性, miR-99 确定为干细胞自我更新的关键调节剂^[13]。miR-100 可以调控多种癌细胞的迁移和侵袭^[32-34]。细胞迁移是涉及许多生物学过程的关键过程, 包括胚胎发育、组织形成、免疫防御或炎症以及癌症进展^[35]。

我们猜测, miR-100 可能调控髓系细胞的迁移。接下来, 我们研究了 miR-100 控制的分子途径, 预测了几个靶标, 值得注意的是, 含有 2 的活动精子结构域 (MOSPD2) 是一种在人类中由 *Mospd2* 基因编码的蛋白质。它是一种内质网驻留蛋白, 参与膜接触位点的形成^[36]。研究发现, 沉默不同乳腺癌细胞

系中的 MOSPD2 可显著抑制癌细胞趋化性迁移^[37]。研究发现, MOSPD2 在体外促进了单核细胞的迁移^[38]。通过构建 *Mospd2* 基因敲除小鼠和针对 MOSPD2 的单克隆抗体, *Mospd2* 基因敲除小鼠中血液中炎性单核细胞的比例显著降低, MOSPD2 是调节炎性单核细胞迁移的关键^[21]。综上所述, *Mospd2* 对髓系细胞迁移起到了重要的调控作用。通过 Targetscan 生物信息预测软件, *Mospd2* 可能是 miR-100 的下游潜在靶基因之一。然而, 关于 miR-100 与 *Mospd2* 之间的关系目前还不清楚。为了验证 miR-100 和 *Mospd2* 之间的关系, 我们通过 qPCR 检测 *Ella-Cre⁺; miR-100^{+/+}* 小鼠和 *Ella-Cre⁺; miR-100^{fl/fl}* 小鼠骨髓细胞中 *Mospd2* 的相对表达水平。结果显示, *miR-100* 敲除小鼠骨髓细胞中 *Mospd2* 表达升高, *miR-100* 缺失可以促进 *Mospd2* 的表达。通过 RIP 实验验证 miR-100 以 AGO2 蛋白复合物的形式与 *Mospd2* 结合在一起。

综上所述, 本研究通过建立 *miR-100* 基因敲除小鼠模型, 发现了 *miR-100* 缺失可以促进小鼠外周骨髓系细胞比例增多, 但 *miR-100* 缺失对小鼠骨髓造血干细胞及祖细胞群体的数量、占比及骨髓单个核细胞集落形成能力没有明显影响。并且, 我们发现 *miR-100* 可以负向调控 *Mospd2* 的表达, 并且两者以 AGO2 蛋白复合物的形式结合, 但两者的具体结合位点我们还没有通过荧光素酶报告基因实验验证, *miR-100* 发挥功能是否通过 *Mospd2* 实现也需要实验来验证, 还需要更多的数据和更深入的研究支持。通过本研究, 我们首次研究了 *miR-100* 失活对模型小鼠造血调控的影响, 为研究 *miR-100* 对模型小鼠造血发育提供指导作用。

参考文献:

- Boisset JC, Robin C. On the origin of hematopoietic stem cells: progress and controversy [J]. *Stem Cell Res*, 2012, 8(1): 1-13.
- Chabannon C, Kuball J, Bondanza A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in its 60s: a platform for cellular therapies [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(436): eaap9630.
- 李博, 高丽娟, 于磊, 等. Marcks1 基因敲除小鼠的建立及造血表型初步分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(5): 108-114.
- Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation [J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2010, 2(6): 640-653.
- Mejia-Ramirez E, Florian MC. Understanding intrinsic hematopoietic stem cell aging [J]. *Haematologica*, 2020, 105(1): 22-37.
- Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells [J]. *Science*, 1988, 241(4861): 58-62.
- Mehta A, Baltimore D. microRNAs as regulatory elements in immune system logic [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(5): 279-294.
- Liu B, Li J, Cairns MJ. Identifying miRNAs, targets and functions [J]. *Brief Bioinform*, 2014, 15(1): 1-19.
- Bartel DP. microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-97.
- Montagner S, Dehó L, Monticelli S. microRNAs in hematopoietic development [J]. *BMC Immunol*, 2014, 15: 14.
- O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, et al. microRNAs enriched in hematopoietic stem cells differentially regulate long-term hematopoietic output [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(32): 14235-14240.
- Wojtowicz EE, Broekhuis MJC, Weersing E, et al. miR-125a enhances self-renewal, lifespan, and migration of murine hematopoietic stem and progenitor cell clones [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 4785.
- Khalaj M, Woolthuis CM, Hu W, et al. miR-99 regulates normal and malignant hematopoietic stem cell self-renewal [J]. *J Exp Med*, 2017, 214(8): 2453-2470.
- Crisafulli L, Muggeo S, Uva P, et al. microRNA-127-3p controls murine hematopoietic stem cell maintenance by limiting differentiation [J]. *Haematologica*, 2019, 104(9): 1744-1755.
- Wang H, Wang L, Wu Z, et al. Three dysregulated microRNAs in serum as novel biomarkers for gastric cancer screening [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(12): 298.
- Qin C, Huang RY, Wang ZX. Potential role of miR-100 in cancer diagnosis, prognosis, and therapy [J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(3): 1403-1409.
- Zheng YS, Zhang H, Zhang XJ, et al. miR-100 regulates cell differentiation and survival by targeting RBSP3, a phosphatase-like tumor suppressor in acute myeloid leukemia [J]. *Oncogene*, 2012, 31(1): 80-92.
- Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- Kim H, Kim M, Im SK, et al. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes [J]. *Lab Anim Res*, 2018, 34(4): 147-159.
- Lautenschläger F, Paschke S, Schinkinger S, et al. The regulatory role of cell mechanics for migration of differentiating myeloid cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(37): 15696-15701.
- Yacov N, Kafri P, Salem Y, et al. MOSPD2 is a therapeutic target for the treatment of CNS inflammation [J]. *Clin Exp Immunol*, 2020, 201(2): 105-120.
- Li C, Gao Y, Zhang K, et al. Multiple roles of microRNA-100

- in human cancer and its therapeutic potential [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(6): 2143-2159.
- [23] Li XJ, Luo XQ, Han BW, et al. microRNA-100/99a, deregulated in acute lymphoblastic leukaemia, suppress proliferation and promote apoptosis by regulating the FKBP51 and IGF1R/mTOR signalling pathways [J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(8): 2189-2198.
- [24] Xue Y, Yang X, Hu S, et al. A genetic variant in miR-100 is a protective factor of childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(5): 2553-2560.
- [25] Hassan NM, Refaat LA, Ismail GN, et al. Diagnostic, prognostic and predictive values of miR-100 and miR-210 in pediatric acute lymphoblastic Leukemia [J]. *Hematology*, 2020, 25(1): 405-413.
- [26] Sun Y, Wang H, Luo C. MiR-100 regulates cell viability and apoptosis by targeting ATM in pediatric acute myeloid leukemia [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 522(4): 855-861.
- [27] Emmrich S, Streltsov A, Schmidt F, et al. LincRNAs MONC and MIR100HG act as oncogenes in acute megakaryoblastic leukemia [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 171.
- [28] Si X, Zhang X, Hao X, et al. Upregulation of miR-99a is associated with poor prognosis of acute myeloid leukemia and promotes myeloid leukemia cell expansion [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(47): 78095-78109.
- [29] Emmrich S, Rasche M, Schöning J, et al. miR-99a/100~125b tricistrons regulate hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis by shifting the balance between TGF β and Wnt signaling [J]. *Genes Dev*, 2014, 28(8): 858-874.
- [30] Yang D, Tang S, Yang Y, et al. Generation and validation of miR-100 hepatocyte-specific knock-out mice [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 535.
- [31] 乔思源, 江文刚, 汪思应. miR-100 基因敲除小鼠模型的构建及基因型鉴定 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(4): 510-513.
- [32] Sun X, Liu X, Wang Y, et al. miR-100 inhibits the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma by targeting IGF1R [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 8333-8338.
- [33] Ge Y, Shu J, Shi G, et al. miR-100 suppresses the proliferation, invasion, and migration of hepatocellular carcinoma cells via targeting CXCR7 [J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021: 9920786.
- [34] Luan Y, Zhang S, Zuo L, et al. Overexpression of miR-100 inhibits cell proliferation, migration, and chemosensitivity in human glioblastoma through FGFR3 [J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8: 3391-3400.
- [35] Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, et al. *In vitro* cell migration, invasion, and adhesion assays: from cell imaging to data analysis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 107.
- [36] Di Mattia T, Wilhelm LP, Ikhlef S, et al. Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites [J]. *EMBO Rep*, 2018, 19(7): e45453.
- [37] Salem Y, Yacov N, Propheta-Meirani O, et al. Newly characterized motile sperm domain-containing protein 2 promotes human breast cancer metastasis [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(1): 125-135.
- [38] Mendel I, Yacov N, Salem Y, et al. Identification of motile sperm domain-containing protein 2 as regulator of human monocyte migration [J]. *J Immunol*, 2017, 198(5): 2125-2132.

〔收稿日期〕2022-07-16