

脂肪源性干细胞成骨分化过程中成骨相关miRNA的表达模式**☆

张浩¹, 康焱¹, 马元琛², 张紫机¹, 黄保丁¹, 廖威明¹

Osteogenesis-specific miRNA expression pattern analysis in osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells

Zhang Hao¹, Kang Yan¹, Ma Yuan-chen², Zhang Zi-ji¹, Huang Bao-ding¹, Liao Wei-ming¹

Abstract

BACKGROUND: miRNAs have emerged as important regulators in various physiological and pathological processes of cell differentiation, and can regulate the osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells.
OBJECTIVE: To screen the osteogenesis-specific miRNAs, and analyze the expression pattern of these miRNAs in osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells.
METHODS: Adipose-derived stem cells were isolated and cultured from human subcutaneous fat. The osteogenesis-specific miRNAs were screened by gene microarray technique. The relative expression of these miRNAs was analyzed on 7, 14, and 21 days by RT-PCR. The osteogenesis-specific proteins were detected on 7, 14, and 21 days by enzyme linked immunosorbent assay kit.
RESULTS AND CONCLUSION: ①The 3rd passage adipose-derived stem cells were homogeneous. Osteogenesis, adipogenesis, and chondrogenesis differentiation of adipose-derived stem cells need specific condition under an inverted microscope. ②Nine osteogenesis-specific miRNAs were picked up by gene microarray technique, five were upregulated and four were downregulated. ③On day 7 in osteogenic differentiation, miR-106a expression was upregulated 1.58 folds ($P < 0.05$). On day 14, nine miRNAs were upregulated. On day 21, five miRNAs were upregulated and four were downregulated. ④The concentration of osteogenesis-specific proteins such as osteocalcin, alkaline phosphatase, collagen I and bone sialoprotein were increased on day 7, peaked on day 14 and slightly decreased on day 21.

Zhang H, Kang Y, Ma YC, Zhang ZJ, Huang BD, Liao WM. Osteogenesis-specific miRNA expression pattern analysis in osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(23):4247-4250. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: miRNA 在细胞分化等众多生理病理过程中起重要调控作用, 可调节脂肪来源干细胞成骨分化。
目的: 筛选成骨分化相关 miRNA, 分析 miRNA 在脂肪来源干细胞成骨分化过程中的表达模式。
方法: 从皮下脂肪组织中分离、培养人脂肪来源干细胞。应用基因芯片技术筛选脂肪来源干细胞成骨诱导前后表达差异显著的 miRNA, 采用 RT-PCR 技术检测所筛选的 miRNA 在成骨诱导第 7, 14, 21 天上调/下调的相对表达强度, 以 ELISA 试剂盒检测相应时间点成骨相关蛋白的表达情况。
结果与结论: ①倒置显微镜下观察, 传 3 代后可获得均一性较高的脂肪来源干细胞, 一定诱导条件下具有成骨、成脂、成软骨分化能力。②基因芯片技术筛选出成骨分化前后表达差异变化明显的 9 个 miRNA, 其中 5 个上调, 4 个下调。③成骨诱导第 7 天, miR-106a 表达上调 1.58 倍($P < 0.05$)。第 14 天时, 9 个 miRNA 均表达上调。第 21 天时, 5 个 miRNA 表达上调, 4 个表达下调。④成骨相关蛋白骨钙素、碱性磷酸酶、I 型胶原及骨唾液酸蛋白的质量浓度在诱导成骨分化第 7 天即明显升高, 第 14 天达到峰值, 第 21 天略有下降。
关键词: 成骨分化; miRNA; 脂肪来源干细胞; 基因芯片; 表达模式
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.23.016

张浩, 康焱, 马元琛, 张紫机, 黄保丁, 廖威明. 脂肪源性干细胞成骨分化过程中成骨相关 miRNA 的表达模式[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(23):4247-4250. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

2001年Zuk等^[1]从人脂肪组织中分离出了具有干细胞性质的细胞群, 可以自我更新能力, 并具有多向分化潜能, 称为脂肪源性干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)。2005年Guilak等^[2]在体外对ADSCs进行了克隆培养, 证实ADSCs是一种具有多向分化潜能的干细胞, 而不是由多种前体细胞混合的细胞群体。ADSCs以其取材方便、来源广泛、易于培养、生物学性质稳定等优点而日益受到组织工程研

究的重视。

微小RNA(microRNAs, miR)最早在线虫基因组中被发现^[3-4], 是一类小分子、非编码、单链RNA, 长度20~25 nt, 广泛存在于多种植物、动物和病毒体内^[5-6]。在转录后水平对基因表达进行调控^[7]。miRNA能够参与调控细胞内多种生理学和病理学过程, 包括胚胎发育^[8]、细胞增殖和凋亡^[9]、脂肪代谢^[10]、细胞分化等等^[11-12]。部分细胞信号通路的调控也依赖miRNA完成^[13-14]。

近年来, 许多研究发现并证实了多个miRNA在间充质干细胞成骨分化过程中的调控作用。上

¹First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China; ²Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China

Zhang Hao☆, Studying for doctorate, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China zhanghao-sysu@163.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30872615*; Denmark Strategy Research Foundation, No. 2101-07-0120*

Received: 2011-03-29
Accepted: 2011-05-06

¹ 中山大学附属第一医院, 广东省广州市 510000; ² 广东省人民医院, 广东省广州市 510000

张浩☆, 男, 1982年生, 河南省安阳市人, 汉族, 中山大学附属第一医院关节外科在读博士, 主要从事脂肪干细胞及骨组织工程研究。zhanghao-sysu@163.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)23-04247-04

收稿日期: 2011-03-29
修回日期: 2011-05-06
(20110329010/G · Q)

调miRNA-206表达可以抑制Cenexin43表达,抑制成骨活动^[15]。miR-2861表达上调可以抑制Runx2降解,促进成骨分化。抑制miR-27a和miR-489表达,可以激活PEX7, ALP, SPP1等基因,在无其他条件诱导下,亦可促进细胞的成骨分化。miR-204作为Runx2的内源性衰减子,miR-204/211上调可以抑制Runx2表达,抑制成骨分化过程,促进成脂。

本文利用基因芯片技术筛选与成人ADSCs成骨诱导分化过程相关的miRNA,并通过RT-PCR检测其在细胞分化不同阶段的表达模式。

1 材料和方法

设计: 体外细胞学对照实验。

时间及地点: 于2010-03/2011-01在中山大学公共卫生学院实验教学中心细胞学实验室完成。

材料: 选取抽脂术或其他腹部手术后丢弃的皮下脂肪组织3例,供者年龄19~45岁,女1例,男2例,排除恶性肿瘤和代谢性疾病,供者均知情同意。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
PBS、胎牛血清、DMEM培养基、青链双抗、胰蛋白酶	美国 Gibco 公司
I 型胶原酶	美国 Sigma 公司
成骨培养基、成脂培养基、成软骨培养基	美国 Cyagen 公司
Trizol	美国 Invitrogen 公司
细胞培养箱	美国 Thermo Forma 公司
miRNA 芯片、LuxScanTM 10K/A 芯片	北京博奥生物有限公司
扫描仪、Bio Mixer II 芯片杂交仪、SlideWasher8 芯片洗干仪	
ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System	美国 ABI 公司
BioPhotometer plus 核酸蛋白测定仪、冷冻桌面离心机、台式微型离心机	德国 Eppendorf 公司
紫外分光光度计	美国 Nanodrop 公司

实验方法:

成人ADSCs的分离、培养: 剪取5~10 g皮下脂肪组织,无菌条件下剔除肉眼可见的残留纤维组织和血管,用20 mL PBS冲洗2次,将脂肪剪碎至乳糜状。按照体积比1:1加入1.5 g/L I 型胶原酶,置恒温摇床37 °C消化60 min后,用100 μm尼龙滤网过滤,加入含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养基中止消化。1 500 r/min离心5 min,小心弃去上层漂浮的脂肪和培养基,加入DMEM培养基吹打冲洗,重悬细胞,1 500 r/min离心5 min,弃去上清液。加入完全培养基(DMEM+体积分数10%胎牛血清+100 U/mL青霉素+100 g/L链霉素),按 $1.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 浓度接种在25 cm^2 细胞培养瓶或100 mm细胞培养皿。置于37 °C,体积分数5%CO₂, 100%饱

和湿度培养箱内培养。原代细胞接种培养24 h后,首次更换培养基,去除未贴壁细胞。之后每3 d更换培养基并观察贴壁细胞数量和形态。待细胞≥80%融合后按0.1 mL/cm²加入2.5 g/L的胰蛋白酶进行传代培养。取第3代细胞进行鉴定及成骨、成脂、成软骨三系诱导分化。

基因芯片筛选成骨相关miRNA: 取第3代ADSCs,按 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种至100 mm 细胞培养皿,对照组加入完全培养基,实验组加入成骨培养基,每3 d换液。21 d诱导完成后,加入Trizol提取总RNA,行基因芯片(北京博奥生物有限公司)检测,筛选差异表达的microRNA,RT-PCR验证结果。

成骨相关miRNA表达检测: 选用第3代ADSCs,按 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种至10cm培养皿,对照组加入完全培养基,实验组加入成骨培养基,每3天换液。分别取培养至第7, 14, 21天细胞,加入Trizol(Invitrogen, USA)提取总RNA, RT-PCR 检测筛选的成骨相关miRNA在不同时间点的表达强度,引物序列见表1。

表 1 成骨相关 miRNA 引物序列
Table 1 Primer sequence of osteospecific miRNA

Name	Sequence
hsa-mir17	5' ACACTCCAGCTGGGCAAAGTGCTTACAGTGCA
hsa-miR-20a	5' ACACTCCAGCTGGGTAAAGTGCTTATAGTGCA
hsa-miR-20b	5' ACACTCCAGCTGGGCAAAGTGCTCATAGTGCA
hsa-mir31	5' ACACTCCAGCTGGGAGGCAAGATGCTGGGCATA
hsa-mir106a	5' ACACTCCAGCTGGGAAAAGTGCTTACAGTGCAGG
hsa-mir-125a-5p	5' ACACTCCAGCTGGGTCCCTGAGACCCCTTTAACC
hsa-mir-125b	5' ACACTCCAGCTGGGTCCCTGAGACCCCTAACT
hsa-mir-193a-3p	5' ACACTCCAGCTGGGAAGTGGCTACAAAGTCCCA
hsa-miR-199b-5p	5' ACACTCCAGCTGGGCCAGTGTTTAGACTATC
miRNA-R *	5' CTCAACTGGTGTCTGTGGA

* miRNA-R: universal downstream primer, each upstream primer matches with it separately

主要观察指标: ①ADSCs鉴定: 细胞形态和成骨、成脂、成软骨三系分化情况。②基因芯片筛选诱导前后差异表达的成骨相关miRNA, 结果经RT-PCR验证。③RT-PCR检测不同时间点成骨相关microRNA的表达。

2 结果

2.1 成人ADSCs鉴定 细胞形态以短梭形为主, 形态类似成纤维细胞。连续培养4~8 d后, 细胞生长旺盛, 呈明显的集落状生长, 集落中心细胞密集, 周围细胞成漩涡状或放射状排列。成人ADSCs成骨、成脂、成软骨三系分化, 见图1。

2.2 成骨诱导前后miRNA基因芯片筛选结果 通过SAM分析筛选ADSCs诱导分化前后差异表达miRNA基因。第1例样品中筛选出差异miRNA基因143个, 其中诱导分化的成骨细胞较ADSC上调表达的72个, 下调表

达的71个; 在第2例样品中筛选出差异miRNA基因122个, 其中诱导分化的成骨细胞上调表达的miR 有67个, 下调表达的miRNA 有55个; 在第3例样品中筛选出差异miRNA基因119个, 其中诱导分化的成骨细胞较ADSC上调表达的61个, 下调表达的58个, 见图2。综合结果, 取3例样本中变化一致, 且表达差异 ≥ 2 倍, 筛选出5个上调miRNA和4个下调miRNA, 见表2。筛选出的miRNA经RT-PCR验证, 表达趋势与芯片结果基本一致, 见图3。

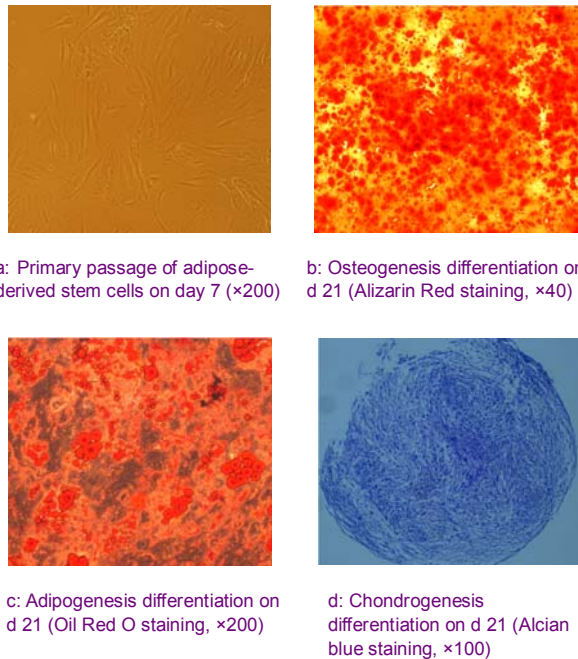


Figure 1 Morphology, osteogenesis, adipogenesis and chondrogenesis differentiation of adult adipose-derived stem cells

图1 成人脂肪源性干细胞形态及成骨、成脂、成软骨三系分化结果

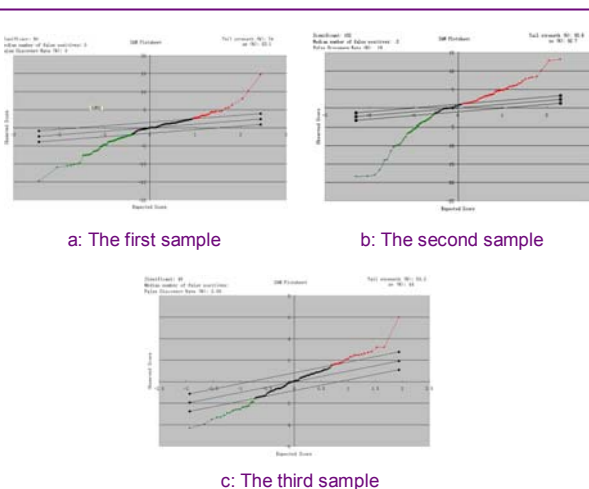


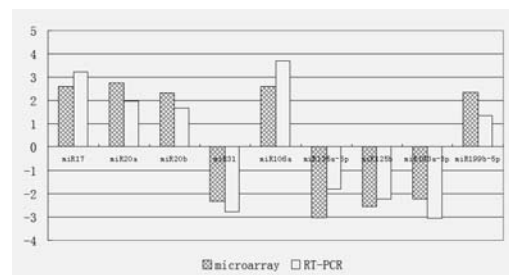
Figure 2 Scatter diagram of three samples of miRNA by SAM software analysis

图2 SAM 软件分析得到3例细胞差异 miRNA 的散点分布图

表2 筛选成骨相关 miRNA
Table 2 Screen osteospecific miRNA

Name	Relative expression intensity*	Chromosomal assignment
hsa-miR17	2.58	13q31.3
hsa-miR-20a	2.73	13q31.3
hsa-miR-20b	2.29	Xq26.2
hsa-miR31	0.43	9q21.3
hsa-miR106a	2.57	Xq26.2
hsa-miR-125a-5p	0.33	19q13.33
hsa-miR-125b	0.39	11q24.1
hsa-miR-193a-3p	0.45	17q11.2
hsa-miR-199b-5p	2.32	9q34.11

* >1: upregulation; <1: downregulation

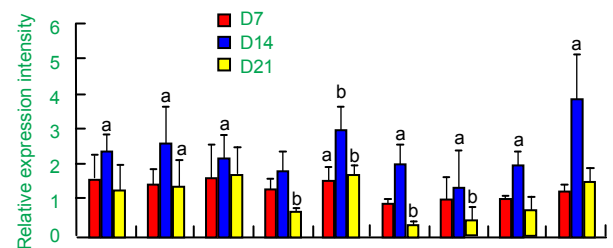


Y-axis: Relative expression intensity

Figure 3 Tendency between gene microarray and polymerase chain reaction are the same

图3 芯片和聚合酶链反应结果趋势一致

2.3 RT-PCR检测成骨诱导第7, 14, 21天成骨相关miRNA的表达差异 见图4。



1: miR-17; 2: miR-20a; 3: miR-20b; 4: miR-31; 5: miR-106a; 6: miR-125a-5p; 7: miR-125b; 8: miR-193a-3p; 9: miR-199b-5p

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; Y-axis: Relative expression intensity

Figure 4 Relative expression intensity of osteospecific miRNA on days 7, 14 and 21

图4 成骨诱导第7, 14, 21天成骨相关miRNA相对表达强度

在诱导成骨分化过程中, miR-106a表达在第7天即上调1.58倍($P < 0.05$), 其余8个miR的表达较对照组差异0.9~1.64倍不等, 差异无显著性意义; 第14天时, miR表达差异最大。全部9个miR的表达均上调, 其中miR-199b-5p上调3.88倍($P < 0.05$), miR-106a上调2.98倍($P < 0.01$), 上调超过2倍的还有miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-193a-3p; 第21天时, miR-17, miR-20a($P < 0.05$), miR-20b, miR-106a($P < 0.01$), miR-193b-5p表达上调, 上调幅度1.30-1.76倍; miR-31,

miR-125a-5p($P < 0.01$), miR-125b($P < 0.01$), miR-193a-3p($P < 0.01$)表达下调, 下调幅度0.32~0.72倍。

3 讨论

了解干细胞成骨分化过程的调节机制, 是治疗骨缺损疾病的基础。随着分子生物学和基因技术的进步, 成骨分化的部分调节机制逐渐被揭示出来^[16-17]。干细胞成骨分化是涉及多个基因表达的级联反应。Runx2, Osterix和β-连环素等转录因子在成骨分化过程中起关键作用^[18]。其他的转录因子也可通过影响这些关键因子的表达, 调控细胞分化。如C/EBPβ, Smad1, 和Smad5可以增强Runx2的活性, Twist则对Runx2起抑制作用^[19]。但是上述编码基因在脊椎动物和无脊椎动物中的表达相近^[20], 提示在转录因子以外还存在其他的调节机制。目前许多研究证实, miRNA在成骨分化和骨形成过程中起着重要的调控作用^[21], 但是成骨相关miRNA的表达模式和具体的调控机制尚不明确。

本文利用基因芯片技术筛选出在成骨分化过程中表达变化明显的miRNA, 并在细胞分化的不同时间点, 检测各个miRNA的相对表达强度。结果显示绝大部分miRNA在成骨诱导第7天表达无明显改变, 只有miR-106a表达上调。第14天时, miRNA表达全部上调, 其中miR-199b-5p, miR-106a上调幅度最大。第21天时, 仍有5个miRNA上调, 但miR-31, miR-125a-5p, miR-125b, miR-193a-3p表达下调, 其中miR-125a-5p下调达3倍, miR-125b下调超过2倍。提示成骨诱导2周左右是miRNA调控的关键时间。

结果提示miR-199b-5p, miR-106a等5个成骨分化全程上调的miRNA在成骨分化过程中起正调节作用, 其中miR-106a可能在成骨分化早期即起作用, 推测miR-106a上调可能早期促进ADSCs向成骨细胞分化; 成骨分化最终的结果是细胞矿化, 形成钙结节, 而第21天下调的miRNA可能在成骨分化过程中起负调节作用, 在成骨分化后期, 可能抑制钙结节形成和Col-1的表达, 其中可能涉及多个miRNA的联合作用。

本实验筛选出9个与成骨分化相关的miRNA, 初步探讨了它们在不同时间点的表达模式。为进一步研究成骨相关miRNA的功能打下基础。miRNA的潜在靶基因很多, 可能与多条信号传导通路相关, 本文未能在转录因子水平更详细地解释相应miRNA的调控机制, 需要进一步探索各个miRNA调控的靶基因及其功能。

4 参考文献

- [1] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-228.

- [2] Guilak F, Lott KE, Awad HA, et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol.* 2006;206(1):229-237.
- [3] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-854.
- [4] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993;75(5):855-862.
- [5] Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Database issue):D140-144.
- [6] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 2009;136(4):642-655.
- [7] Luzi E, Marini F, Sala SC, et al. Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells is modulated by the miR-26a targeting of the SMAD1 transcription factor. *J Bone Miner Res.* 2008;23(2):287-295.
- [8] Lü J, Qian J, Chen F, et al. Differential expression of components of the microRNA machinery during mouse organogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334(2):319-323.
- [9] Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, et al. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell.* 2003;113(1):25-36.
- [10] Xu P, Vernooij SY, Guo M, et al. The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol.* 2003;13(9):790-795.
- [11] Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, et al. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA.* 2003;9(2):180-186.
- [12] Chen CZ, Li L, Lodish HF, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science.* 2004; 303(5654):83-86.
- [13] Lai EC, Tam B, Rubin GM. Pervasive regulation of *Drosophila* Notch target genes by GY-box-, Brd-box-, and K-box-class microRNAs. *Genes Dev.* 2005;19(9):1067-1080.
- [14] Li X, Carthew RW. A microRNA mediates EGF receptor signaling and promotes photoreceptor differentiation in the *Drosophila* eye. *Cell.* 2005;123(7):1267-1277.
- [15] Inose H, Ochi H, Kimura A, et al. A microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(49):20794-20799.
- [16] Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:629-648.
- [17] Rosen CJ. Clinical practice. Postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 2005;353(6):595-603.
- [18] Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem.* 2006;99(5):1233-1239.
- [19] Franceschi RT, Ge C, Xiao G, et al. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1116:196-207.
- [20] Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001;291(5507):1304-1351.
- [21] Hobert O. Gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Science.* 2008;319(5871):1785-1786.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 国家自然科学基金(30872615), 名称: 双层一体 Collagen/TCP 梯度软骨修复材料生物响应特性的机理研究; 丹麦战略研究基金(2101-07-0120), 名称: Individualized Musculoskeletal Regeneration and Reconstruction Network.

作者贡献: 实验设计由第一、六作者完成, 实施由第一、二、三、四作者完成, 评估由第六作者完成, 实施者均经过实验室相关正规培训。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验方法符合医学伦理标准, 批准号: 中山大学附属第一医院医学伦理委员会伦审[2011]11号。

本文创新性: ①实验利用基因芯片技术筛选成骨相关miRNA 9个, 部分为首次报道与成骨分化相关。②实验发现miRNA的表达呈现特定的时序性, 在不同分化阶段, 起到不同的调控作用, 初步确定了筛选的各miRNA的作用阶段。