

miR-3960对成骨细胞分化的影响**☆

李辉¹, 庞雅玲¹, 李晓燕¹, 王欣文², 吴贵福¹, 郭剑¹, 罗湘杭³

Effect of miR-3960 on osteogenic differentiation

Li Hui¹, Pang Ya-ling¹, Li Xiao-yan¹, Wang Xin-wen², Wu Gui-fu¹, Guo Jian¹, Luo Xiang-hang³

Abstract

BACKGROUND: Osteoblast differentiation involves highly regulated processes mediated by a large number of hormones and transcription factors. Emerging evidence reveals an additional level of regulation that is mediated by microRNAs. miR-3960 is preferentially expressed in osteoblasts, which suggests that miR-3960 may take part in the regulation process of osteogenic differentiation.

OBJECTIVE: To investigate the role of miR-3960 in osteogenic differentiation of primary mouse bone marrow stromal cells.

METHODS: The parameters of osteoblast differentiation were measured after transfection of bone marrow stromal cells with pSilencer4.1-miR-3960. Osteoblastic differentiation was induced by the addition of 300 µg/L bone morphogenetic protein 2.

RESULTS AND CONCLUSION: Stable and high expression of miR-3960 was obtained in the cells after transfection with pSilencer4.1-miR-3960. Compared with control cells, the levels of alkaline phosphatase activity, osteocalcin secretion and calcium deposition were increased by transfection of pSilencer4.1-miR-3960. Treatment with anti-miR-3960 attenuated the levels of alkaline phosphatase activity and osteocalcin secretion as well as reduced calcium deposition. All these results suggest that miR-3960 promotes osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells.

Li H, Pang YL, Li XY, Wang XW, Wu GF, Guo J, Luo XH. Effect of miR-3960 on osteogenic differentiation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(15): 2681-2685. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 成骨细胞的分化成熟过程涉及多种激素和细胞因子对成骨细胞分化相关基因表达的调控, 近来发现多个微小RNAs也参与了这一调控过程。

目的: 观察 miR-3960 在小鼠骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程中的作用。

方法: 将 miR-3960 表达载体 pSilencer4.1-miR-3960 转染骨髓基质细胞, 构建 miR-3960 过表达细胞模型, 随后予 300 µg/L 骨形态发生蛋白 2 诱导分化, 观察成骨细胞分化指标变化。

结果与结论: 转染 pSilencer4.1-miR-3960 能够在细胞中稳定地高表达 miR-3960。miR-3960 过表达促进骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程中的碱性磷酸酶活性增高和骨钙素分泌, 增加细胞中的钙沉积量。抑制 miR-3960 降低骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程中的碱性磷酸酶活性, 减少骨钙素分泌, 降低钙沉积量。表明 miR-3960 可以促进成骨细胞分化。

关键词: 微小RNA; 骨髓基质细胞; 成骨细胞; 分化; 过表达; 小鼠; 转染
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.15.005

李辉, 庞雅玲, 李晓燕, 王欣文, 吴贵福, 郭剑, 罗湘杭. miR-3960 对成骨细胞分化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(15): 2681-2685. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

微小RNA是一类内源性的非编码单链RNA分子, 长度多在19~25个核苷酸之间, 通过与靶基因mRNA上的互补序列完全或不完全结合, 在转录后水平调节基因表达^[1]。自1993年在线虫中发现第1个微小RNA——lin4以来, 至今已有数千个微小RNAs被发现, 在多种生理和病理过程如细胞增殖分化、组织发育、糖脂代谢、炎症、免疫应答以及肿瘤发生中扮演着重要的角色^[2-5]。成骨细胞源于骨髓基质干细胞, 经骨祖细胞、骨原细胞、前成骨细胞等阶段不断分化而成, 其分化成熟涉及多个激素及细胞因子等对成骨细胞分化相关基因表达的调控^[6-7], 近年来发现微小RNAs在成骨细胞分化

过程中扮演着极为重要的角色^[8]。miR-3960是一个在成骨细胞高表达的微小RNA, 这种表达特点提示其在成骨细胞分化中可能发挥着重要的作用, 本文选取miR-3960为研究对象, 明确其对骨髓基质细胞向成骨细胞分化的影响。

1 材料和方法

设计: 分子生物学水平的体外实验。

时间及地点: 于2010-11/2011-08在陕西省人民医院中心实验室完成。

材料:

实验动物: 清洁级4~6周C57/B6雄性小鼠8只, 购自西安交通大学医学院实验动物中心。饲养于陕西省人民医院中心实验室动物实验中心, 室温20~25℃, 光线、通风良好, 自由饮水、进食。

¹Department of Endocrinology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China; ²Department of Orthopedics, Xi'an Red-Cross Hospital, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China; ³Institute of Metabolism and Endocrinology, Xiangya Second Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Li Hui☆, Doctor, Attending physician, Department of Endocrinology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China
sxfylh@163.com

Corresponding author: Luo Xiang-hang, Doctor, Researcher, Doctoral supervisor, Institute of Metabolism and Endocrinology, Xiangya Second Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China
xianghangluo@126.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Shaanxi Province for the Youth, No. 2011JQ4006*; the National Youth Science Foundation of China, No. 81100208*

Received: 2011-12-31
Accepted: 2012-02-10

¹ 陕西省人民医院内分泌科, 陕西省西安市 710068; ² 西安市红十字会医院骨科, 陕西省西安市 710054; ³ 中南大学湘雅二医院代谢内分泌研究所, 湖南省长沙市 410011

李辉☆, 男, 1980年生, 山西省汾阳市人, 博士, 主治医师, 主要从事代谢性骨病相关的基础研究。sxfylh@163.com

通讯作者: 罗湘抗, 研究员, 博士, 博士生导师, 中南大学湘雅二医院代谢内分泌研究所, 湖南省长沙市 410011 xianghangluo@126.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2012)15-02681-05

收稿日期: 2011-12-31
修回日期: 2012-02-10
(20111231003/YJ-W)

载体: pSilencer4.1-miR-3960载体由作者所在实验组构建^[9]。

主要试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
无酚红的 α -MEM 培养液、Trizol 以及胎牛血清	Gibco
人重组骨形态发生蛋白 2 蛋白	Peptotech
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Bulge-Loop TM miRNA 定量检测引物	广州锐博生物科技有限公司
SYBR Green Mix	ABI
M-MLV 反转录酶	Fermentas
碱性磷酸酶试剂盒	Sigma
骨钙素放射免疫分析试剂盒	DiaSorin
anti-miR-3960、anti-miR-C	上海吉玛制药技术有限公司
分光光度计	美国 Bio Tek 公司

方法:

细胞培养: 将小鼠处死后置于体积分数75%乙醇中浸泡约10 min, 在无菌条件下分离出小鼠的股骨和胫骨, 注意保留骨两端部分不受损。用手术刀片切去骨两端, 露出骨髓腔, 用含体积分数10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素、0.1%两性霉素的 α -MEM冲洗骨髓腔, 然后用20 G针头反复抽吸骨髓液, 制成单细胞悬液后将接种于10 cm培养皿中, 37 °C, 体积分数5% CO₂培养, 每两三天换液1次去除未贴壁细胞。贴壁细胞继续培养, 至汇片后用0.25%胰酶消化传代。

细胞转染: 骨髓基质细胞经鉴定证实^[10], 随后以 3×10^4 /孔的密度接种24孔板, 加入不含抗生素的 α -MEM培养液培养至细胞汇合达到70%左右时进行转染。取pSilencer-4.1-miR-3960 0.8 μ g, Lipofectamine 2000 2 μ L分别与50 μ L α -MEM稀释, 轻柔混匀, 室温孵育5 min; 将以上液体轻轻混匀, 室温静置20 min, 使脂质体包裹质粒; 轻柔混匀转染液体, 慢慢滴入培养板中, 轻微晃动培养板后放入37 °C, 体积分数5% CO₂培养箱中, 在培养48 h后加入嘌呤霉素(1 mg/L)进行筛选, 待大部分细胞死亡, 并有阳性克隆长出时, 在显微镜下选定抗性克隆并予以标记, 用无菌枪头刮吸克隆生长的细胞, 转入25 mL培养瓶扩大培养。转染空质粒(miR-C)为对照组。

瞬时转染anti-miR-3960及对照质粒时, 骨髓基质细胞以 3×10^4 /孔的密度接种24孔板, 加入不含抗生素的 α -MEM培养液培养至细胞汇合达到70%左右时进行转染。取anti-miR-3960或

anti-miR-C寡核苷酸100 pmol, Lipofectamine 2000 2 μ L分别以50 μ L α -MEM稀释, 轻柔混匀, 室温孵育5 min。将以上液体轻轻混匀, 室温静置20 min, 使脂质体包裹质粒; 轻柔混匀转染液体, 慢慢滴入培养板中, 轻微晃动培养板后放入37 °C, 体积分数5% CO₂培养箱中, 培养6 h。换完全培养基继续培养, 并加入骨形态发生蛋白2 300 μ g/L诱导分化。

实时定量PCR检测miR-3960表达: 用Trizol试剂按操作说明方法提取细胞总RNA。具体步骤如下: 去培养上清液, 加Trizol(0.1 mL/cm²), 吹打后室温静置5 min; 将细胞裂解液移入1.5 mL离心管中, 加氯仿(0.3 L/L Trizol), 振荡摇匀, 4 °C放置5 min; 4 °C, 12 000 r/min离心10 min, 将无色透明上清移入另1个1.5 mL离心管中, 加预冷的异丙醇(0.6 L/L Trizol), 充分摇匀, 4 °C放置10 min; 4 °C, 12 000 r/min离心10 min, 去上清, 管底部和侧壁上有泪滴状沉淀物, 加DEPC水配置的体积分数75%乙醇(1 L/L Trizol)洗涤沉淀; 4 °C, 7 500 r/min离心5 min, 弃上清, 室温干燥5 min, 加0.1%DEPC水充分溶解; 紫外分光光度计测总RNA的A₂₆₀及A₂₆₀/A₂₈₀, 计算其浓度及纯度, -70 °C保存。

取2 μ g总RNA, 用Bulge-LoopTM miRNA定量检测引物按操作说明书合成cDNA。条件及步骤如下: 2 μ g RNA中加入62.5 nmol/L RT Primer Mix 4 μ L, 补水至19 μ L, 混匀后70 °C变性5 min, 迅速冰上冷却2 min, 瞬时离心后再加入10 μ L 5 \times RT缓冲液、dNTP mix 4 μ L、RNase inhibitor 1 μ L、DEPC水15 μ L、反转录酶1 μ L, 混匀, 42 °C 60 min, 70 °C处理10 min以灭活反转录酶, 4 °C冷却。制备的cDNA保存在-20 °C备用。

扩增反应使用20 μ L体系: 特异性引物Bulge-LoopTM miRNA Forward Primer 2 μ L、Bulge-LoopTM miRNA Reverse Primer 2 μ L、SYBR Green Mix 9 μ L、2 μ L的cDNA, DEPC水5 μ L。反应条件: 95 °C 20 s, 95 °C 10 s、60 °C 20 s, 后2步共40个循环, 70 °C 1 min。相对定量的方法采用比较Ct法^[11], 并采用U6 snRNA作为内参。

碱性磷酸酶活性的测定: 取干预后的细胞, 用PBS冲洗2次, 细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、150 mmol/L NaCl、1% Triton X-100、0.02% NaN₃、1 mg/L 抑肽酶、100 mg/h苯甲基磺酰氟)加超声粉碎裂解细胞, 15 000 r/min

4 ℃离心15 min, 取上清液采用对硝基苯酚法测定细胞内碱性磷酸酶活性^[12], 用Bradford方法测出总蛋白含量校正碱性磷酸酶^[12]。

骨钙素的测定: 取细胞培养上清液(取样前将细胞用PBS冲洗2遍后, 更换含体积分数0.25%胎牛血清的无血清 α -MEM培养), 用骨钙素放射免疫法测定试剂盒测定培养上清液中骨钙素含量, 最小测定值为0.2 μ g/L。用Bradford方法测出细胞内总蛋白含量, 校正骨钙素。

钙沉积量测定: 骨髓基质细胞转染后, 用 α -MEM培养液培养于24孔板, 其中含体积分数10%胎牛血清、青霉素 50×10^3 U/L、庆大霉素50 mg/L、骨形态发生蛋白2 300 μ g/L、抗坏血酸50 g/L以及10 mmol/L β -甘油磷酸钠, 培养5 d后进行钙沉积量测定。用不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的PBS洗细胞3次, 每孔细胞加入500 μ L 0.6 mol/L HCl, 4 ℃慢摇过夜, 第2天收集每孔液体, 1 000 g离心5 min, 取上清与1 mL邻甲酚酞络合指示剂混匀后用分光光度计在575 nm波长下测量。

主要观察指标: 实时定量PCR检测miR-3960表达, 对硝基苯酚法测定细胞内碱性磷酸酶活性, 放射免疫法检测细胞上清液中骨钙素活性, 邻甲酚酞络合酮法比色测定细胞中钙沉积量

统计学分析: 实验重复3次。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。所有统计分析均采用SPSS 13.0统计软件进行分析。

2 结果

2.1 转染miR-3960表达载体后miR-3960表达情况 在分别转染miR-3960表达载体pSilencer4.1-miR-3960及miR-C 48 h后, 用实时定量PCR检测两组骨形态发生蛋白2诱导的骨髓基质细胞中miR-3960的表达差异。结果显示, pSilencer4.1-miR-3960组中miR-3960表达较对照组显著升高, 见图1, 表明miR-3960表达载体的转染成功实现miR-3960在骨形态发生蛋白2诱导的骨髓基质细胞中的过表达。

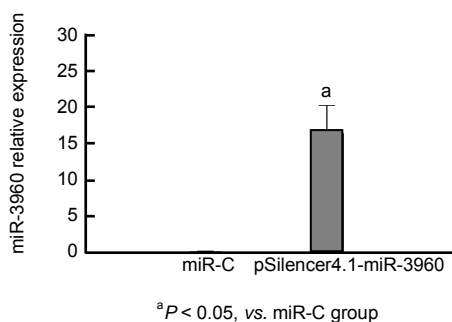


Figure 1 The effect of miR-3960 levels in bone marrow stromal cells after transfection with pSilencer4.1-miR-3960
图1 骨髓基质细胞转染 pSilencer4.1-miR-3960 对 miR-3960 表达的影响

2.2 miR-3960对成骨细胞分化过程中碱性磷酸酶活性及骨钙素分泌的影响 碱性磷酸酶和骨钙素是反映成骨细胞分化的敏感指标, 选取二者来观察骨髓基质细胞向成骨细胞分化的情况。在转染后的骨髓基质细胞培养液中加入300 μ g/L骨形态发生蛋白2诱导分化, 48 h后取细胞培养上清液用放免法测骨钙素分泌, 细胞裂解后离心取上清测碱性磷酸酶活性。结果显示, 与对照组相比, 转染pSilencer4.1-miR-3960能够进一步增加碱性磷酸酶活性和骨钙素分泌, 见图2a, b, 表明miR-3960过表达可以促进成骨细胞分化。

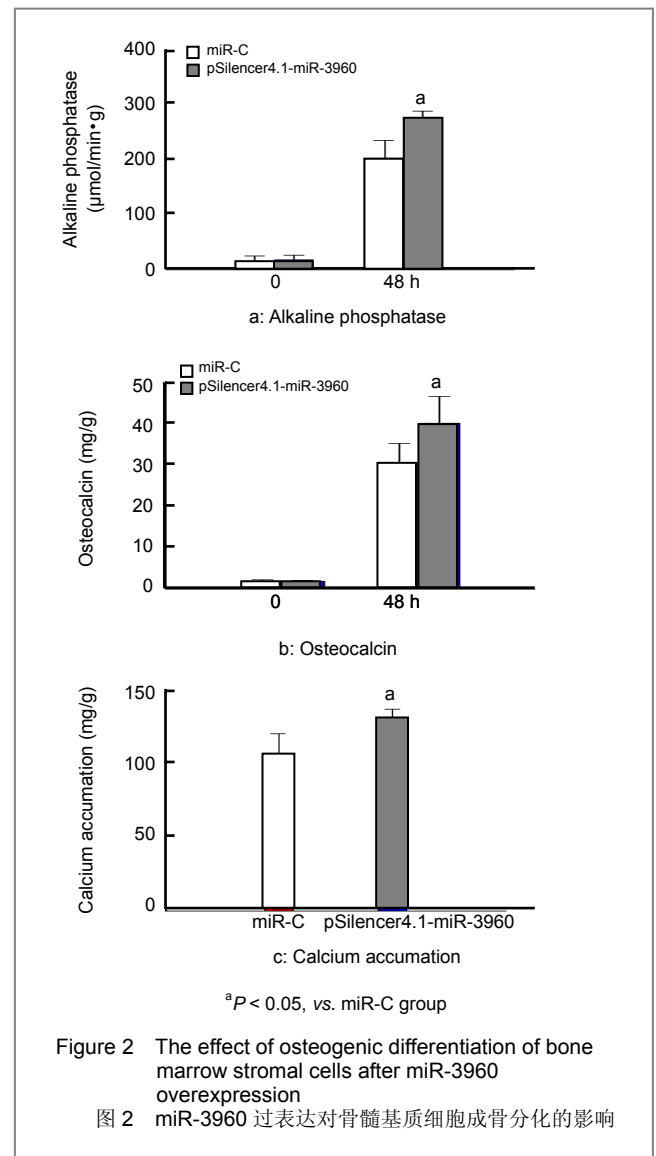


Figure 2 The effect of osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells after miR-3960 overexpression
图2 miR-3960 过表达对骨髓基质细胞成骨分化的影响

2.3 miR-3960对成骨细胞钙化的影响 本次实验采用钙沉积量作为观察成骨细胞钙化的指标。稳定转染pSilencer4.1-miR-3960后用骨形态发生蛋白2持续诱导骨髓基质细胞向成骨细胞分化5 d, 用邻甲酚酞络合酮比色法检测细胞中钙沉积量。如图2c所示, miR-3960过表达的细胞在同样诱导条件下对钙沉积量的增加作用较对照组显著。

2.4 抑制miR-3960对成骨细胞分化的影响 上文证实

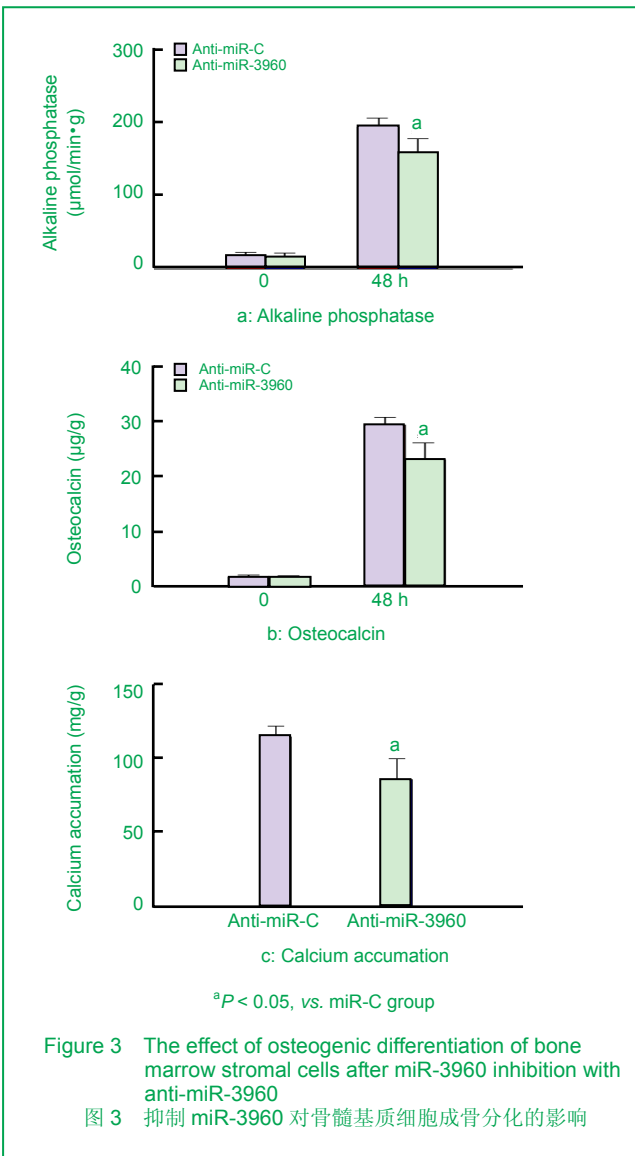
入miR-3960过表达能促进成骨细胞分化,进一步采用抑制miR-3960的方法,观察成骨细胞分化指标的变化,验证miR-3960在分化过程中的作用。实验应用最为广泛的2'-甲氧基修饰的反义寡核苷酸抑制miR-3960转染骨髓基质细胞,在转染后用骨形态发生蛋白2诱导分化48 h,然后取细胞培养上清液用放免法测骨钙素分泌,细胞裂解后离心取上清液测碱性磷酸酶活性。转染后用骨形态发生蛋白2持续诱导分化5 d,裂解细胞,用邻甲酚酞络合铜比色法检测细胞中钙沉积量^[13]。结果表明当抑制miR-3960之后,在同样诱导条件下,该组细胞的碱性磷酸酶活性、骨钙素分泌及钙沉积量均较对照组降低,见图3,表明抑制miR-3960对成骨细胞分化有阻碍作用。

RNA。在此之后的十年间,与微小RNA相关的文章呈几何数量地增长,随着对其研究的不断深入,已发现微小RNA几乎参与了所有的生理和病理过程,并在其中发挥重要的调控作用。成骨细胞源于骨髓间质干细胞,经骨祖细胞、骨原细胞、前成骨细胞等阶段不断分化而成,多个调控基因如Runx2、osterix、SMADs、TCF/LEF、NFATc1、Twist及活化蛋白1等的适时表达^[17-19],以及Wnt/ β -catenin, BMP, JAK/STAT和MAPK等多个信号通路是成骨细胞分化得以顺利进行的保证^[20]。那么微小RNAs是否通过影响这些因子中的一个或多个的表达来参与成骨细胞分化的调控呢?近年来的多个研究已经对这一问题给出了肯定的答复^[21]。本实验选取miR-3960作为研究对象,来观察其对成骨细胞分化的影响。

MiR-3960是最近发现的一个成骨细胞高表达的微小RNA,提示其在成骨细胞分化过程中可能发挥着重要的作用,为验证这一假设,实验从miR-3960对成骨细胞分化的影响进行研究。目前研究微小RNAs功能常用的方法是通过调节其在体内或体外的表达水平,来观察相应指标变化,从而推断其作用。本实验也选用这一方法。通过转染miR-3960真核表达载体来达到使其在细胞内过表达的目的,实验证实转染后可检测到miR-3960在细胞内高表达。抑制微小RNA表达通常使用经过修饰的反义寡核苷酸与微小RNA高亲和力地结合,从而产生特异性的抑制效果,应用最为广泛的是2'-甲氧基修饰的反义寡核苷酸,本次实验使用商品化的2'-甲氧基修饰反义核苷酸序列获得了理想的效果。

碱性磷酸酶是成骨细胞的早期标志酶,在成骨过程中水解磷酸酯,为羟基磷灰石的沉积提供必要的磷酸,有利于成骨,标志成骨分化的开始^[22]。骨钙素是成骨细胞特异性合成和分泌的一种非胶原蛋白,在钙离子存在的条件下,与羟基磷灰石结合并稳定其构象,是向成骨细胞分化的最具特征性的标志物^[23],这二者是反映成骨细胞在体外分化的重要指标^[24]。本文对miR-3960过表达组和对对照组均加用骨形态发生蛋白2诱导骨髓基质细胞向成骨细胞分化,结果发现miR-3960过表达组碱性磷酸酶活性和骨钙素分泌的增加幅度均明显高于对照组,说明miR-3960过表达对成骨细胞分化具有促进作用。此外,通过检测钙沉积量来衡量钙化程度,结果显示miR-3960过表达可明显增加钙沉积量,促进钙化。随后,转染anti-miR-3960,抑制miR-3960作用,结果表明在同样的诱导条件下,anti-miR-3960组碱性磷酸酶活性和骨钙素分泌的增加幅度以及钙沉积量均显著低于对照组,这从反面证实了miR-3960的促成骨分化作用,也从另一角度说明本实验的可靠性。

近年来关于微小RNAs调控成骨细胞分化的研究不断增加,目前已发现有十余个微小RNAs在成骨细胞分化过程中发挥着抑制或促进的作用。miR-26a在促进肌



3 讨论

2001年世界不同国家的3个研究小组在线虫、果蝇和人体中发现了一类长度为21~22 nt的非编码小分子单链RNA^[14-16],被统一命名为microRNA,简称微小

形成的同时,也能在成骨细胞分化的晚期阶段发挥抑制作用^[25]。过表达miR-125b抑制骨形态发生蛋白4诱导的成骨细胞分化,而抑制miR-125b表达则促进成骨分化^[26]。Mizuno等^[27]发现miR-210能够抑制人活化素A受体1B型,进而促进ST2细胞向成骨细胞分化。Kapinas等^[28]发现在基质成熟和矿化的阶段,miR-29a和miR-29c表达增加,抑制骨连接素蛋白表达进而抑制成骨分化。最近,Itoh等^[29]的研究表明miR-141和miR-200a可以通过对骨生成转录因子Dlx5的翻译抑制而抑制前成骨细胞向成骨细胞分化。此外还有一些微小RNAs可以促进成骨细胞分化,Mizuno等^[30]发现miR-210能够促进ST2细胞向成骨细胞分化,其机制是miR-210抑制AcvR1b,从而抑制转化生长因子 β /活化素信号通路。miR-2861在骨形态发生蛋白2诱导的成骨细胞分化中也起着正调控的作用,这是通过抑制其靶基因HDAC5的表达,保护Runx2不被Smurf1降解,间接导致Runx2蛋白水平上调,从而促进骨形态发生蛋白2诱导的成骨细胞分化^[10]。本次研究表明,miR-3960可以促进成骨细胞分化及钙化,是又一个参与调控成骨细胞分化过程的微小RNA,但具体机制尚不明确。

综上,微小RNAs是成骨细胞分化过程中重要的调控因子,其通过影响相应的靶基因来发挥抑制或促进成骨细胞分化的作用。本文研究表明,成骨细胞高表达的miR-3960可以促进成骨细胞分化及钙化,是又一个参与调控成骨细胞分化过程的微小RNA,但具体机制尚不明确。鉴于微小RNA是通过降解相应靶基因mRNA或抑制蛋白的翻译来发挥作用的,将在后续研究中进一步明确其作用的靶基因,阐明其促进成骨细胞分化的机制。

致谢:衷心感谢陕西省人民医院医教研处彭宁老师在实验开展中给予的热心帮助。衷心感谢陕西省人民医院中心实验室胡军主任在实验过程中的无私帮助。

4 参考文献

- Miranda KC, Huynh T, Tay Y, et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell*. 2006;126(6):1203-1217.
- Friedman JM, Jones PA. MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease. *Swiss Med Wkly*. 2009;139(33-34):466-472.
- Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(4):252-263.
- Caruso P, MacLean MR, Khanin R, et al. Dynamic changes in lung microRNA profiles during the development of pulmonary hypertension due to chronic hypoxia and monocrotaline. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(4):716-723.
- Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28(3-4):369-378.
- Canalis E. Growth factor control of bone mass. *J Cell Biochem*. 2009;108(4):769-777.
- Jensen ED, Gopalakrishnan R, Westendorf JJ. Regulation of gene expression in osteoblasts. *Biofactors*. 2010;36(1):25-32.
- Hu R, Li H, Liu W, et al. Targeting miRNAs in osteoblast differentiation and bone formation. *Expert Opin Ther Targets*. 2010;14(10):1109-1120.
- Hu R, Liu W, Li H, et al. A Runx2/miR-3960/miR-2861 regulatory feedback loop during mouse osteoblast differentiation. *J Biol Chem*. 2011;286(14):12328-12339.

- Li H, Xie H, Liu W, et al. A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *J Clin Invest*. 2009;119(12):3666-3677.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.
- Luo XH, Guo LJ, Yuan LQ, et al. Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res*. 2005;309(1):99-109.
- Luppen CA, Smith E, Spevak L, et al. Bone morphogenetic protein-2 restores mineralization in glucocorticoid-inhibited MC3T3-E1 osteoblast cultures. *J Bone Miner Res*. 2003;18(7):1186-1197.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):858-862.
- Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):862-864.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294(5543):853-858.
- Kim YJ, Kim HN, Park EK, et al. The bone-related Zn finger transcription factor Osterix promotes proliferation of mesenchymal cells. *Gene*. 2006;366(1):145-151.
- Bialek P, Kern B, Yang X, et al. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell*. 2004;6(3):423-435.
- Xiao G, Jiang D, Ge C, et al. Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression. *J Biol Chem*. 2005;280(35):30689-30696.
- Osyczka AM, Leboy PS. Bone morphogenetic protein regulation of early osteoblast genes in human marrow stromal cells is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Endocrinology*. 2005;146(8):3428-3437.
- Taipaleenmäki H, Bjerre L, Chen L, et al. Review topic on mechanisms in endocrinology MicroRNAs: Targets for enhancing osteoblast differentiation and bone formation. *Eur J Endocrinol*. in press.
- Aubin JE, Liu F, Malaval L, et al. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*. 1995;17(2 Suppl):77S-83S.
- Levy MM, Joyner CJ, Virdi AS, et al. Osteoprogenitor cells of mature human skeletal muscle tissue: an in vitro study. *Bone*. 2001;29(4):317-322.
- Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*. 1990;143(3):420-430.
- 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.
- Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, et al. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;368(2):267-272.
- Mizuno Y, Tokuzawa Y, Ninomiya Y, et al. miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b. *FEBS Lett*. 2009;583(13):2263-2268.
- Kapinas K, Kessler CB, Delany AM. miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling. *J Cell Biochem*. 2009;108(1):216-224.
- Itoh T, Nozawa Y, Akao Y. MicroRNA-141 and -200a are involved in bone morphogenetic protein-2-induced mouse pre-osteoblast differentiation by targeting distal-less homeobox 5. *J Biol Chem*. 2009;284(29):19272-19279.
- Mizuno Y, Tokuzawa Y, Ninomiya Y, et al. miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b. *FEBS Lett*. 2009;583(13):2263-2268.

来自本文课题的更多信息——

基金声明: 本课题受陕西省自然科学基金青年项目(2011JQ4006)及国家青年科学基金(81100208)资助。

作者贡献: 罗湘杭进行实验设计,实验实施由李辉、庞雅玲、王欣文及李晓燕共同完成,吴贵福及郭剑进行实验及结果评估,李辉成文,罗湘杭审核,李辉对文章负责。

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间接或直接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处理方法符合中国科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关要求。