

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.46.032 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]  
王振恒, 王瑞, 赵建宁. 微小RNA与成骨细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(46): 8709-8715.

## 微小RNA与成骨细胞的分化\*\*\*★

王振恒, 王瑞, 赵建宁

**文章亮点:** 微小RNA在调节正常细胞生长、分化以及凋亡过程中发挥了重要作用, 微小RNA的发现揭示了一种新的生物基因表达调控方式。微小RNA在成骨细胞分化过程中, 通过多种调节因子和信号通路进行调节, 发挥着重要作用。

**关键词:** 微小RNA; 成骨细胞; 转录因子; 调控因子; 信号通路; 干细胞

**缩略语:** 微小RNA: microRNA, miRNA; 核心结合因子 $\alpha 1$ : core binding factor  $\alpha 1$ , Cbfa1; 末梢减少型同源异型盒5: distal-less homeobox 5, Dlx5

### 摘要

**背景:** 近年来研究发现, 微小RNA在成骨细胞分化中发挥了重要作用, 为人们理解成骨细胞分化调控过程提供了新的视野和思路。

**目的:** 分析微小RNA对成骨细胞分化过程中调控因子和相关信号通路的作用。

**方法:** 由第一作者分别以“成骨细胞, 信号通路, 调控因子”和“microRNA, osteoblast, signaling”为检索词进行检索, 电子检索中国知识资源总库(CNKI)系列数据库的检索时限为2000至2011年, Web of Knowledge数据库的检索时限为1995至2011年。筛选微小RNA在成骨细胞分化方面的文献, 排除内容陈旧、重复的文献, 最终纳入37篇文献进行分析。

**结果与结论:** 微小RNA在调节正常细胞生长、分化以及凋亡过程中发挥了重要作用, 微小RNA的发现揭示了一种新的生物基因表达调控方式。微小RNA在成骨细胞分化过程中, 通过多种调节因子和信号通路进行调节, 发挥着重要作用。一个微小RNA可能调节多个靶蛋白的表达, 一个蛋白因子也可能受到多种不同微小RNA的调节, 深入研究微小RNA介导的基因表达还必须考虑不同微小RNA与其各自靶点的相互作用。

### MicroRNA studies on osteoblast differentiation

Wang Zhen-heng, Wang Rui, Zhao Jian-ning

#### Abstract

**BACKGROUND:** MicroRNAs act as key regulators in osteoblast differentiation which show a new insight for us into the osteoblast differentiation progress.

**OBJECTIVE:** To analyze the regulation rules of microRNAs on related regulators and signaling in osteoblast differentiation.

**METHODS:** A computer online search of CNKI database (2000-2011) and Web of Knowledge database (1995-2011) was performed by the first author using “osteoblast, signaling, regulators, microRNA” as the key words in Chinese and English, respectively, to retrieve relevant literatures about microRNA regulating osteoblast differentiation. Articles with stale content and duplicate literatures were excluded, and finally 37 literatures were included for analysis.

**RESULTS AND CONCLUSION:** MicroRNAs play an important role in cell growth, cell differentiation, and cell death which are a novel regulation way to biology. MicroRNAs play critical rules on related regulators and signaling in osteoblast differentiation. The expression of several target proteins may be regulated by the same microRNA, and the expression of one target protein may be regulated by many microRNAs. The interactions between microRNAs and their targets must be considered when making a further research on the regulation of gene expression of microRNAs.

Wang ZH, Wang R, Zhao JN. MicroRNA studies on osteoblast differentiation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(46): 8709-8715.

解放军南京军区  
南京总医院骨科,  
江苏省南京市  
210002

王振恒★, 男,  
1987年生, 江苏  
省徐州市人, 汉  
族, 南京大学在读  
硕士, 主要从事修  
复重建外科、骨病  
的临床基础研究。  
wangzhenheng  
1987@163.com

通讯作者: 赵建  
宁, 硕士, 主任医  
师, 教授, 博士生  
导师, 解放军南京  
军区南京总医院,  
江苏省南京市  
210002  
zhaojianning.020  
7@163.com

中图分类号:R318  
文献标识码:B  
文章编号:2095-4344  
(2012)46-08709-07

收稿日期: 2012-04-05  
修回日期: 2012-04-17  
(20120203014/G·L)

Department of Orthopedics, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Wang Zhen-heng★, Studying for master's degree, Department of Orthopedics, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China wangzhenheng1987@163.com

Corresponding author: Zhao Jian-ning, Master, Chief physician, Professor, Doctoral supervisor, Department of Orthopedics, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China zhaojianning.0207@163.com

Supported by: the National Natural Science Foundation for the Youth, No. 81000792\*; General Program of Jiangsu Provincial Postdoctoral Foundation, No. 0902062C\*; China Postdoctoral Science Foundation, No. 201003793\*

Received: 2012-04-05 Accepted: 2012-04-17

## 0 引言

微小 RNA(microRNA, miRNA)是在动植物中广泛存在的一类小分子非编码单链 RNA, 由 18-24 个核苷酸组成, 可以通过作用于 mRNA 3'非翻译区在转录后水平调节基因的表达。微小 RNA 在调节正常细胞生长, 分化以及凋亡的过程中发挥了重要作用<sup>[1]</sup>。成骨细胞是骨发生和骨形成的前提, 对骨的代谢平衡、生长发育和损伤修复起关键作用。成骨细胞的骨形成与破骨细胞的骨吸收两者之间的动态平衡维持着骨骼的不断更新。体内的成骨细胞主要由多向分化功能的骨髓间质干细胞经骨祖细胞、前成骨细胞等多个独立阶段分化而来<sup>[2]</sup>。间质干细胞除了分化成成骨细胞外, 还可以分化成软骨细胞、成纤维细胞、脂肪细胞和肌细胞等。骨髓间充质干细胞等在分化为成熟的骨细胞过程中受到一系列信号通路、信号蛋白、转录因子以及它们共同调节蛋白的作用<sup>[3]</sup>。本文主要分析微小 RNA 对成骨细胞分化过程中调控因子和相关信号通路的作用, 为今后成骨细胞分化的研究提供参考。

## 1 资料和方法

**1.1 资料来源** 由第一作者分别以“成骨细胞, 信号通路, 调控因子”和“microRNA, osteoblast, signaling”为检索词进行检索, 电子检索中国知识资源总库(CNKI)系列数据库的检索时限为 2000 至 2011 年, Web of Knowledge 数据库的检索时限为 1995 至 2011 年。

### 1.2 入选标准

**纳入标准:** ①微小 RNA 对成骨细胞分化过程中调控因子调节作用的相关文献。②微小 RNA 对成骨细胞分化过程中信号通路作用的相关文献。③观点明确, 论点论据可靠的文献。④尽量选择近期在 SCI 杂志上发表的高质量文献。

**排除标准:** 重复研究或与上述研究目的关

系不密切的文献。

**1.3 数据的提取** 初检得到 220 余篇, 通过阅读标题和摘要进行初筛, 再通过阅读全文内容, 排除内容陈旧、重复的文献, 保留其中 37 篇文献进行归纳, 总结微小 RNA 在成骨细胞分化过程中对多种调节因子和信号通路的调节作用。

## 2 结果

**2.1 miRNA 与调控因子** 成骨细胞的分化成熟受多种因素的调控, 如遗传因素、激素水平及细胞调控因子。骨形成相关调控因子核心结合因子  $\alpha 1$ (core binding factor  $\alpha 1$ , Cbfa1, Runx2)、Osterix(OSX)、末梢减少型同源异型盒 5 (distal-less homeobox 5, Dlx5)、HOXC8 等在促使间充质干细胞向功能性成骨细胞的转化过程中发挥重要作用。

**2.1.1 miRNA 与 Runx2** Runx2 又称核心结合因子  $\alpha 1$ (Cbfa1), 是调控骨形成的关键因子, 属于 Runt 结构域基因家族的转录因子<sup>[4]</sup>, 其分子结构中含有一个由 128 个氨基酸组成的 DNA 结合区, 因与果蝇配对基因 Runt 同源, 故称为 Runt 结构域。Runx2 可以特异性识别并结合靶基因的 PyGPyGGTPy 序列, 影响靶基因转录。Runx2 在成骨干细胞、其他间充质细胞和前成骨细胞中表达, 对成骨细胞的分化起着重要作用。

近年来的研究显示, 微小 RNA 参与了 Runx2 的调节。Li 等<sup>[5]</sup>在研究 C2C12 间充质干细胞向成骨细胞分化过程中微小 RNA 表达谱的变化时发现, 有 25 个微小 RNA 的表达发生了显著改变, 其中 22 种下调, 3 种上调。对表达下调的 miR-133 进一步研究显示, 它可以下调 Runx2 蛋白的表达, 但是 Runx2 的 mRNA 的表达并未受到抑制, 这说明 miR-133 只是抑制翻译, 并未降解 mRNA。Li 等<sup>[6]</sup>在用骨形态发生蛋白 2 诱导 ST2 基质细胞向成骨细胞分化时发现了 miR-2861 的转录。过表达 miR-2861 增强了骨形态发生蛋白 2 诱导的成骨细胞分化; 抑制 miR-2861 则减少了成骨细胞的发生。研究人员还发现,

miR-2861 作用靶点是组蛋白去乙酰化酶 5, 而组蛋白去乙酰化酶 5 可以增加 Runx2 的降解。通过小鼠尾静脉注射靶向作用于 miR-2861 的反义寡核苷酸链, 沉默小鼠体内 miR-2861 的表达, 可以导致组蛋白去乙酰化酶 5 的上升, Runx2 蛋白的表达下降, 抑制了骨形成, 降低骨量。在临床上还发现, 2 例患有原发性骨质疏松症的青少年姐弟 pre-miR-2861 的纯合子变异阻断了 miR-2861 的表达。与小鼠实验结果一致, 2 例患者的骨样品中组蛋白去乙酰化酶 5 水平增加, Runx2 的水平降低, 而这一家族成员中所有同一位点发生变异的人均罹患骨质疏松症。研究者还对 357 例正常儿童、396 例健康成人以及 369 例成人骨质疏松症患者进行研究, 未发现同一位点的变异。据此推测 pre-miR-2861 的纯合子变异可能引起了原发性骨质疏松症, 这一研究显著加深了人们在基因水平对原发性骨质疏松症病因的认识。Hu 等<sup>[7]</sup>在此研究的基础上发现 miR-3960 与 miR-2861 一起组成了调节成骨细胞分化的环路。miR-3960 的转录是发生在骨形态发生蛋白 2 诱导的 ST2 干细胞向成骨细胞分化期间。过表达 miR-3960 促进骨形态发生蛋白 2 诱导的成骨细胞分化; 相反, 抑制 miR-3960 的表达则减低了成骨细胞分化。实验证实一个抑制 Runx2 表达的蛋白 Homeobox A2(Hoxa2) 是 miR-3960 的作用靶点。过表达 Runx2 诱导了 miR-3960 和 miR-2861 的转录, 阻断 Runx2 的表达则减少了骨形态发生蛋白 2 诱导的微小 R-3960 和 miR-2861 转录。这一研究表明, 从同一个微小 RNA 多顺反子转录的 miR-3960 和微小 R-2861, 在成骨细胞分化中均通过 Runx2/miR-3960/miR-2861 调节反馈回路发挥作用。此发现对微小 RNA 在成骨细胞分化的作用为人们提供了新的认识。Li 等<sup>[8]</sup>利用微小 RNA 芯片技术分析 MC3T3-E1 成骨细胞分化过程中微小 RNA 表达谱改变时发现, miR-29b 显著上调。在 MC3T3 细胞中过表达 miR-29b, 诱导了 Runx2 和碱性磷酸酶的 mRNA 及蛋白的表达升高; 而抑制了 miR-29b 后, 结果相反。此外, miR-29b 还可以直接下调已知的成骨细胞分化抑制因子, 如组蛋白去乙酰化酶 4、转化生长因子  $\beta$ 3、ACVR2A、CTNBP1 和 DUSP2 等。这表明 miR-29b 促进成骨细胞分化是通过多种机制实现的。

骨质疏松症患者的脂肪细胞聚集增加, 但机制尚未明确, Huang 等<sup>[9]</sup>研究了骨髓基质细胞分化中微小 RNA 与 Runx2 的关系。当骨髓基质细胞向脂肪细胞

分化时诱导了 miR-204 和 miR-211 的产生, 同时 Runx2 蛋白的表达下降。扰乱 miR-204 的表达, 可以改变骨髓基质细胞的分化方向: 用反转录病毒过表达 miR-204, 成骨细胞分化受到抑制, 而促进了脂肪细胞的分化, 同时 Runx2 蛋白水平下降; 用 anti-miR-204 的寡核苷酸链抑制 miR-204, 成骨细胞分化增加, 脂肪细胞分化减少, 同时 Runx2 的水平显著提高。Gao 等<sup>[10]</sup>研究骨髓基质干细胞向成骨细胞分化时, 用微小 RNA 芯片技术发现 miR-31、miR-106a、miR-148a、miR-424 表达降低, miR-30c、miR-15b、miR-130b 表达升高。用 TargetScan 和 PicTar 软件预测, 4 种下调的微小 RNA 作用靶点可能是 Runx2、CBFB 和骨形态发生蛋白, 研究者对 miR-31 对预测靶点进行验证, 证实 miR-31 作用于 Runx2 和骨形态发生蛋白受体 2 促进骨髓基质干细胞向成骨细胞分化。

**2.1.2 微小 RNA 与 Osterix** Osterix(OSX)定位于细胞核内, 是一种由 428 个氨基酸组成的含有锌指结构的成骨细胞分化关键转录因子<sup>[11]</sup>。其 C 端存在的 3 个 C2H2 型的锌指结构域是 DNA 的结合区域, 可与真核细胞启动子结合调控基因的转录。有研究显示, Osterix 基因的突变可以导致成骨细胞分化的各种标志物的表达水平显著降低甚至缺如, 如 I 型胶原、骨钙素、骨涎蛋白和骨桥素等, 同时成骨细胞的分化也被完全阻断<sup>[12]</sup>。这些证据表明 Osterix 是成骨细胞分化所必需的调控因子。

Eskildsen 等<sup>[13]</sup>发现在骨髓基质干细胞成骨细胞分化时, miR-138 下调。体外过表达 miR-138 抑制了成骨细胞分化; 而用 anti-miR-138 的寡核苷酸链抑制 miR-138 的功能后, 促进了 Osterix、骨钙素的表达, 碱性磷酸酶活性的升高和基质的矿化。把 miR-138 和 anti-miR-138 分别转染到骨髓基质干细胞, 再把骨髓基质干细胞装载到羟基磷灰石磷酸三钙支架上, 植入小鼠体内发现: 过表达 miR-138, 减少了 85% 的异位骨形成; 相反, 抑制 miR-138 增加了 60% 的骨形成。这说明开发出抑制 miR-138 的药物制剂可能成为增强骨形成的治疗策略。

骨代谢疾病, 如骨质疏松症等的发生与骨发育内环境失调, 以使脂肪细胞和成骨细胞之间平衡被打破有关。最近有研究发现, 灵长类动物特有的 miR-637 与人类间充质干细胞的分化相关。Zhang 等<sup>[14]</sup>发现 miR-637 抑制了人类间充质干细胞的生长, 诱导了其 S 期分化停滞。且当间充质干细胞向脂肪细胞分化时

miR-637表达增加;然而,当它向成骨细胞分化时,miR-637表达下降。这表明,miR-637扮演了脂肪细胞-成骨细胞分化调节因子的作用。Osterix是miR-637的直接作用靶点,miR-637在人类间充质干细胞中通过直接抑制Osterix的表达,显著增强脂肪细胞分化,抑制成骨细胞分化。

**2.1.3 微小 RNA 与 Dlx5** Dlx5 与 Dlx6 是存在同源结构域的 Dll(Drosophila distal-less gene)转录家族成员,二者在基因组中连锁结合,在成骨细胞分化晚期表达<sup>[15]</sup>,调控胶原蛋白和骨钙素的产生,调节骨的发育和骨折的愈合。

Dlx5 在骨分化过程中促进骨钙素的表达和骨基质矿化<sup>[16]</sup>。Dlx5 是骨形态发生蛋白 2 的直接靶点,是骨形态发生蛋白 2 诱导 Runx2 和 OSX 表达所必须的中间介质<sup>[17]</sup>。Itoh 等<sup>[18]</sup>用微小 RNA 芯片筛选加入或不加入骨形态发生蛋白 2 诱导的小鼠 MC3T3-E1 细胞分化过程中微小 RNA 表达的变化,发现了 9 种微小 RNA 表达有显著差异,其中 2 种下调的微小 RNA,即 miR-141 和 miR-200a。这 2 个微小 RNA 的核苷酸序列仅有 2 个碱基不同,它们进行进一步的研究,通过转染成熟的 miR-141 和 miR-200a 到 MC3T3-E1 细胞,在加或不加骨形态发生蛋白 2 诱导的情况下,均发现碱性磷酸酶活性明显受到抑制;而把 miR-141 和 miR-200a 的反义抑制剂转染到有骨形态发生蛋白 2 诱导的 MC3T3-E1 细胞中,发现碱性磷酸酶活性明显增强。用软件预测分析和荧光素酶报告分析等手段,证实 miR-141 和 miR-200a 均通过抑制 Dlx5 的翻译,减少骨形态发生蛋白 2 诱导的成骨细胞前体细胞向成骨细胞的分化。

**2.1.4 微小 RNA 与 HOXC8** 脊椎动物的 HOX 基因群与果蝇同源盒复合物的结构和功能都很类似。现在确认的 39 个 HOX 基因存在于 4 个大的基因群里,即 HOXA、HOXB、HOXC 和 HOXD 基因群。每个基因群长约 120 kb,含有 9-11 个基因<sup>[19]</sup>。HOX 基因在胚胎发育,尤其是神经的发育过程中十分重要<sup>[20]</sup>。

HOXC8 是动物生长发育过程中关键的转录抑制因子<sup>[21]</sup>。HOXC8 基因与软骨的缺陷有关<sup>[22]</sup>,HOXC8 蛋白还是 Smad1 的负性调节因子。Kim 等<sup>[23]</sup>研究了 miR-196a 在人类脂肪组织来源的干细胞增殖和成骨细胞分化过程中的作用,发现 miR-196a 的靶点是 HOXC8,实验中也证实过表达 miR-196a 减少了 HOXC8 的蛋白和 mRNA 水平。慢病毒过表达

miR-196a 抑制了人类脂肪组织来源的干细胞的增殖,促进了成骨细胞分化,但并未影响其向脂肪细胞分化。在人类脂肪组织来源的干细胞向成骨细胞分化过程中 HOXC8 的表达降低,并与 miR-196a 的水平上升相一致。用反义 RNA 抑制 hASC 细胞中 miR-196a 的表达,提高了 HOXC8 蛋白水平,但同时人类脂肪组织来源的干细胞向成骨细胞的分化减少。

**2.1.5 微小 RNA 与连接蛋白 43** 连接蛋白是膜嵌合蛋白,由 4 个跨膜螺旋、2 个小的胞外环、1 个胞内环、胞内的 1 个羧基端和 1 个氨基端组成。6 个连接蛋白相互锚定形成连接子,相邻细胞的 2 个链接子嵌合成缝隙连接,并允许离子代谢产物和小的信号分子通过,从而影响细胞的增殖、分化、生长和代谢<sup>[24]</sup>。骨组织中广泛存在着由连接蛋白构成的缝隙连接,而连接蛋白 43 可能是骨骼组织中最重要连接蛋白,与骨骼的正常生长发育关系密切<sup>[25]</sup>。

Inose 等<sup>[26]</sup>全面分析了 C2C12 细胞成骨细胞分化过程中微小 RNA 的表达,发现原来被视作肌肉特异性的 miR-206,不仅在成骨细胞中表达,而且是成骨细胞分化过程的关键调节因子。在 C2C12 细胞成骨细胞分化过程中其表达量下降。过表达 miR-206 则抑制成骨细胞分化;减少 miR-206 的表达,可以促进成骨细胞分化。成骨细胞中一个主要的缝隙连接蛋白连接蛋白 43 是 miR-206 的一个靶点:过表达 miR-206 降低了连接蛋白 43 的表达,抑制了成骨细胞分化;而恢复连接蛋白 43 的表达,则可以解除 miR-206 对成骨细胞分化的抑制。作者用  $\alpha 1(I)$  collagen promoter 培育了特异表达 miR-206 的转基因小鼠,这些小鼠因成骨细胞分化受损而发生骨量下降。这是首次在小鼠体内试验中证明 miR-206 有调节成骨细胞分化的作用。

**2.1.6 微小 RNA 与其他成骨细胞调节因子** Kahai 等<sup>[27]</sup>研究了微小 RNA-378 在肾连蛋白(nephronectin)介导的 MC3T3-E1 成骨细胞分化中起作用。肾连蛋白一种新提取的细胞外基质蛋白。肾连蛋白的表达促进破骨细胞分化和骨结节的形成。他们发现肾连蛋白 3'UTR 包含有一个 miR-378 的结合位点,而且在 MC3T3-E1 分化的不同阶段,miR-378 发挥的作用不同。

Mizuno 等<sup>[28]</sup>研究了 miR-125b 在间充质干细胞 ST-2 向成骨细胞分化中的作用:无骨形态发生蛋白 4

诱导时, 自然增殖的 ST-2 细胞中 miR-125b 随时间而增加; 当用骨形态发生蛋白 4 诱导 ST-2 向成骨细胞的分化时, 则抑制了 miR-125b 的增加。转染外源性的 miR-125b 抑制 ST-2 的增殖, 并引起向成骨细胞分化的抑制; 相反, 通过转染反义 RNA 分子阻断内源性 miR-125b, 骨形态发生蛋白 4 诱导的碱性磷酸酶活性升高。因而 miR-125b 可能通过调节细胞增殖来调节成骨细胞分化。Itoh 等<sup>[29]</sup>发现 miR-208 与前成骨细胞分化密切相关。增强成熟 miR-208 在 MC3T3-E1 细胞的表达显著减少了骨形态发生蛋白 2 诱导的前成骨细胞分化。在骨形态发生蛋白 2 诱导的成骨细胞分化中下调 miR-208 是早期成骨调节机制的重要方面, 而 Ets1 是其靶点之一。

**2.2 微小 RNA 与信号通路** 各种信号通路通过调节成骨细胞的增殖、分化和功能来影响个体出生后的骨组织生长和发育, 上调或下调通路中各个因子的表达能够明显的影响成骨细胞的分化和功能, 并改变整个骨量的变化<sup>[30]</sup>。

**2.2.1 微小 RNA 与 Smad 信号通路** 目前为止哺乳动物的 Smad 蛋白 (drosophila mothers against decapentaplegic protein) 共发现 8 种, 用 Smad1-Smad8 表示, 相对分子质量为 40 000-60 000, 其一级结构可分为 3 个功能区, 高度保守的 N 区和 C 区, 以及序列长度不均一的中间连接区 L。依赖 Smad 蛋白的 Smad 通路是转化生长因子  $\beta$  超家族 (包括 BMP、转化生长因子  $\beta$ 、生长分化因子等) 进行信号转导的机制之一。Smad1 和 Smad5 是成骨细胞分化的关键信号分子, 在骨形态发生蛋白诱导的成骨细胞定向分化中起重要作用<sup>[31]</sup>。Li 等<sup>[5]</sup>的研究就显示, 在骨形态发生蛋白 2 诱导的 C2C12 间充质细胞向成骨细胞分化时表达下调的 miR-135, 可以通过作用于 Smad5 mRNA 3'UTR, 抑制其翻译, 下调 Smad5 蛋白的表达, 抑制成骨细胞分化。Luzi 等<sup>[32]</sup>在用地塞米松, 维生素 C 和  $\beta$ -磷酸甘油来诱导人类脂肪组织来源干细胞向成骨细胞分化过程中发现, miR-26a 的表达逐渐增高, 而细胞 Smad1 蛋白表达逐渐降低; 在脂肪干细胞停止向成骨细胞分化时, miR-26a 的表达达到最高点, 细胞内 Smad1 蛋白表达也降到了最低点; 在脂肪干细胞向成骨细胞分化的最后阶段, 利用反义 RNA 干扰技术抑制 miR-26a 的表达后, 成骨细胞的 Smad1 蛋白的表达则显著增加。这说明 miR-26a 可能靶向作用于 Smad1 参与脂肪干细胞向成骨细胞分化的调控。

**2.2.2 微小 RNA 与 Wnt 信号通路** Wnt 蛋白是由原癌基因 Wnt 编码的一类富含半胱氨酸的分泌性糖蛋白, 长 350-380 个氨基酸, 起始为疏水信号序列, 后面包含多个糖基化位点, 目前发现在脊椎动物中至少有 20 种 Wnt 蛋白, 其中人类有 16 种<sup>[33]</sup>。Wnt 信号不仅可以促进间充质细胞向成骨细胞分化, 还可以减少破骨细胞的生产, 增加骨量<sup>[34]</sup>。Kapinas 等<sup>[35]</sup>发现骨连接素 3'UTR 包含有一个高度保守的优势调节序列, 可以与 miR-29a 和 miR-29c 相互作用。用 miR-29a 的抑制剂转染 MC3T3-E1, 增加了骨连接素的水平; 转染 miR-29a 抑制了骨连接素的生产。当在细胞中加入 Wnt 信号通路的抑制剂 Dickkopf-1 (Dkk-1) 后, miR-29a 和 miR-29c 的表达受到抑制。这说明经典的 Wnt 信号通路诱导了 miR-29a 和 miR-29c 的表达。后来, Kapinas 等<sup>[36]</sup>又用人类基质干细胞 hFOB1.19 进行研究, 发现 miR-29a 为人类成骨细胞分化所必需。hFOB1.19 和培养的原代人类成骨细胞分化时 miR-29a 增加, 包含有 miR-29a 基因的序列启动子由经典的 Wnt 信号通路诱导; 转染了 miR-29a 抑制剂的细胞, 内源性的 Wnt 信号通路抑制剂 Dickkopf-1 (Dkk1) 水平上升; 相反, 转染 miR-29a 的类似物下调了 Dkk-1 的表达。miR-29a 的直接靶点是 Dkk-1, miR-29a 和 Wnt 信号系统参与了调节成骨细胞分化的环路: 经典的 Wnt 信号通路诱导了 miR-29a 的转录, 随后的通过 miR-29a 下调 Wnt 信号途径关键的抑制因子 Dkk-1, 加强 Wnt 信号通路, 这一基因表达程序对成骨细胞分化很重要。考虑到细胞内复杂的精细调节, 这一调节环路的发现加深了人们对成骨细胞分化时微小 RNA 与信号通路分子的相互作用的认识。

### 3 讨论

随着对各种调节因子的不断发现及认识程度的加深, 控制着成骨细胞分化的复杂的分子机制正在逐渐被人们了解。微小 RNA 的发现揭示了生物一种新的基因表达调控方式, 虽然微小 RNA 仅占有 RNA 的 1% 左右, 但是却调节了人类 30%-50% 的基因表达<sup>[37]</sup>。越来越多的证据表明微小 RNA 在成骨细胞分化过程中, 通过骨形成相关调控因子核心结合因子 1、末梢减少型同源异型盒 5、Osterix、HOXC8 和 Smad 信号通路以及 Wnt 信号通路等进行调节, 发挥了重

要作用。特定的微小 RNA 通过这些调节因子可以促进骨髓基质干细胞等多向分化细胞向成骨细胞分化, 同时抑制其向其他细胞(如脂肪细胞)的分化, 另一些微小 RNA 作用则相反。微小 RNA 与 Smad 和 Wnt 信号通路的作用, 表现在上调或下调通路中的某些关键调节蛋白, 发挥正性或负性的成骨细胞分化调节作用。起不同作用微小 RNA 的精细调节和密切配合, 才使得成骨细胞的分化与其他细胞的分化保持着平衡, 一旦平衡被打破, 特定的微小 RNA 表达升高或者降低, 都可能导致潜在疾病的发生。此外, 在众多的调节成骨细胞分化的微小 RNA 中, 是否存在一种或几种对成骨细胞分化起到决定性作用? 哪些微小 RNA 有潜力成为未来治疗骨质疏松症等疾病的药物? 现在的临床常用药物是否也通过了微小 RNA 发挥作用? 这些都可能成为未来的研究方向。目前, 在成骨细胞分化中微小 RNA 的研究才刚刚起步, 一个微小 RNA 可能调节多个靶蛋白的表达, 一个蛋白因子也可能受到多种不同微小 RNA 的调节, 深入研究微小 RNA 介导的基因表达还必须考虑不同微小 RNA 与其各自靶点的相互作用, 而这些都有待于进一步的探索。

#### 4 参考文献

- [1] Ciesla M, Skrzypek K, Kozakowska M, et al. MicroRNAs as biomarkers of disease onset. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 401(7): 2051-2061.
- [2] 孙强. 转录因子Runx2、Osterix与骨髓间质干细胞的成骨分化[J]. *江苏医药*,2006,32(7):657-659.
- [3] Lian JB, Javed A, Zaidi SK, et al. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: Role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukar Gene.* 2004;14(1-2):1-41.
- [4] Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* 2000;289(5484):1501-1504.
- [5] Li Z, Hassan MQ, Volinia S, et al. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *P Natl Acad Sci Usa.* 2008;105(37):13906-13911.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Li ZY, Hassan MQ, Jafferji M, et al. Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2009;284(23):15676-15684.
- [9] Huang J, Zhao L, Xing LP, et al. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells.* 2010;28(2):357-364.
- [10] Gao J, Yang TT, Han JW, et al. MicroRNA expression during osteogenic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow. *J Cell Biochem.* 2011;112(7): 1844-1856.
- [11] Okazaki K, Sandell LJ. Extracellular matrix gene regulation. *Clin Orthop Relat R.* 2004;427:S123-S128.
- [12] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 2002; 108(1): 17-29.
- [13] Eskildsen T, Taipaleenmaki H, Stenvang J, et al. MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo. *P Natl Acad Sci USA.* 2011;108(15):6139-6144.
- [14] Zhang J, Fu W, He M, et al. MiR-637 maintains the balance between adipocytes and osteoblasts by directly targeting Osterix. *Mol Biol Cell.* 2011;22(21):3955-3961.
- [15] Lee MH, Kwon TG, Park HS, et al. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Bioph Res Co.* 2003;309(3):689-694.
- [16] Tadic T, Dodig M, Erceg I, et al. Overexpression of Dlx5 in chicken calvarial cells accelerates osteoblastic differentiation. *J Bone Miner Res.* 2002;17(6):1008-1014.
- [17] Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, et al. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J Biol Chem.* 2003;278(36): 34387-34394.
- [18] 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.
- [19] Ruddle FH, Bartels JL, Bentley KL, et al. Evolution of Hox genes. *Annu Rev Genet.* 1994;28:423-442.
- [20] Suemori H, Takahashi N, Noguchi S. Hoxc-9 mutant mice show anterior transformation of the vertebrae and malformation of the sternum and ribs. *Mech Develop.* 1995; 51(2-3):265-273.
- [21] Yueh YG, Gardner DP, Kappen C. Evidence for regulation of cartilage differentiation by the homeobox gene Hoxc-8. *P Natl Acad Sci USA.* 1998;95(17):9956-9961.
- [22] Wan M, Shi XM, Feng X, et al. Transcriptional mechanisms of bone morphogenetic protein-induced osteoprotegerin gene expression. *J Biol Chem.* 2001;276(13):10119-10125.
- [23] Kim YJ, Bae SW, Yu SS, et al. miR-196a regulates proliferation and osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *J Bone Miner Res.* 2009;24(5):816-825.
- [24] Li ZY, Zhou ZY, Saunders MM, et al. Modulation of connexin43 alters expression of osteoblastic differentiation markers. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290(4):C1248-55.
- [25] 郑创义. 缝隙连接蛋白43在骨骼发育和塑形中的作用[J]. *国际骨科学杂志*,2009,30(2):134-136.
- [26] Inose H, Ochi H, Kimura A, et al. A microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation. *P Natl Acad Sci Usa.* 2009;106(49):20794-20799.
- [27] Kahai S, Lee SC, Lee DY, et al. MicroRNA miR-378 Regulates Nephronectin Expression Modulating Osteoblast Differentiation by Targeting GalNT-7. *PLoS ONE.* 2009;4(10): e7535.

- [28] Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, et al. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem Bioph Res Co.* 2008; 368(2): 267-272.
- [29] Itoh T, Takeda S, Akao Y. MicroRNA-208 Modulates BMP-2-stimulated Mouse Preosteoblast Differentiation by Directly Targeting V-ets Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog 1. *J Biol Chem.* 2010;285(36): 27745-27752.
- [30] 韩大成. Wnt信号途径与成骨细胞[J]. 华北煤炭医学院学报, 2007, 9(1):39-41.
- [31] Liu ZY, Shi WB, Ji XH, et al. Molecules mimicking Smad1 interacting with hox stimulate bone formation. *J Biol Chem.* 2004;279(12):11313-11319.
- [32] 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.
- [33] Rao TP, Kuehl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res.* 2010;106(12): 1798-1806.
- [34] Kennell JA, Macdougald OA. Wnt signaling inhibits adipogenesis through beta-catenin-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem.* 2005;280(25): 24004-24010.
- [35] 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.
- [36] Kapinas K, Kessler C, Ricks T, et al. miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. *J Biol Chem.* 2010;285(33):25221-25231.
- [37] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005;120(1): 15-20.

#### 来自本文课题的更多信息—

**基金资助:** 国家自然科学基金青年科学基金项目(81000792); 江苏省博士后基金面上项目(0902062C); 中国博士后基金特别资助项目(201003793)。

**作者贡献:** 由第一作者进行资料收集、成文, 第二、三作者审校, 第一作者对本文负责。

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

**伦理要求:** 无涉及伦理冲突的内容。

**此问题的已知信息:** 成骨细胞的分化成熟受多种因素的调控, 如遗传因素、激素水平及细胞调控因子。骨形成相关调控因子 Runx2、Osterix、Dlx5、HOXC8 等在促使间充质干细胞向功能性成骨细胞的转化过程中发挥重要作用。此外, Smad 信号通路和 Wnt 信号通路在成骨细胞分化过程中也起到重要作用。

**本综述增加的新信息:** 微小 RNA 在成骨细胞分化过程中, 通过上述多种调节因子和信号通路调节分化。一个微小 RNA 可能调节多个靶蛋白的表达, 一个蛋白因子也可能受到多种不同微小 RNA 的调节。

**临床应用的意义:** 对成骨细胞分化过程和机制, 以及临床骨质疏松症等疾病诊断、预防和治疗的研究提供了新思路。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。