

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.28.002 [http://www.crter.org/crter-2013-qikanquanwen.html]  
耿倩倩, 余守和, 张越, 王红梅, 孙奋勇. miR-376b-3p 可促进 Runx2 诱导 C2C12 细胞进行成骨细胞早期分化[J].  
中国组织工程研究, 2013, 17(28):5108-5112.

## miR-376b-3p可促进Runx2诱导C2C12细胞进行成骨细胞早期分化\*★

耿倩倩<sup>1</sup>, 余守和<sup>1</sup>, 张越<sup>1,2</sup>, 王红梅<sup>1</sup>, 孙奋勇<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>暨南大学生物工程研究所, 广东省广州市 510632; <sup>2</sup>同济大学附属第十人民医院, 上海市 200072)

### 文章亮点:

文章首次发现 miR-376b-3p 在 Runx2 诱导 C2C12 分化为成骨细胞过程可被明显激活, 且可促进 Runx2 诱导的成骨细胞早期分化。并揭示该 miRNA 调控这一分化过程是通过调节与骨骼系统发育有关基因表达实现的。

### 关键词:

组织构建; 骨组织构建; Runx2; C2C12 细胞; miR-376b-3p; 成骨分化; 强力霉素; 国家自然科学基金

### 摘要

**背景:** 转录因子 Runx2 是调节成骨分化及骨发育的关键因子, 过表达 Runx2 可诱导间质细胞 C2C12 分化为成骨细胞, 但相关诱导分化分子机制并不清楚。

**目的:** 分析 miR-376 家族成员在 Runx2 诱导 C2C12 细胞进行成骨分化过程中的作用。

**方法:** 利用可诱导表达 Runx2 的细胞系 C2C12/Runx2<sup>Dox</sup>, 在不同的时间点通过荧光定量 PCR 方法检测 miR-376 家族成员表达情况。C2C12/Runx2<sup>Dox</sup> 细胞转染 miR-376b-3p mimic 后利用荧光定量 PCR 检测成骨细胞标记基因碱性磷酸酶及骨钙素表达情况, 并利用碱性磷酸酶染色法分析碱性磷酸酶活性。利用在线工具 miRanda, miRWalk 与 TargetScan 共同预测 miR-376b-3p 潜在靶基因。利用 DAVID Bioinformatics Resources 数据库对得到的靶基因进行功能聚类分析。

**结果与结论:** 在 Runx2 诱导 C2C12 进行成骨分化过程中 miR-376b-3p 表达显著增加, 其他成员表达无明显变化。转染 miR-376b-3p mimic 可上调碱性磷酸酶表达, 但对骨钙素表达无影响; 转染 miR-376b-3p mimic 也可增加碱性磷酸酶活性。靶基因功能聚类分析结果表明 miR-376b-3p 可参与机体骨骼发育过程, 表明其在成骨分化过程中的作用。研究结果表明, Runx2 通过上调 miR-376b-3p 的方式对与成骨分化相关基因的表达进行调节, 以促进 C2C12 进行成骨细胞的早期分化。

## miR-376b-3p promotes Runx2-induced early osteogenic differentiation of C2C12 cells

Geng Qian-qian<sup>1</sup>, Yu Shou-he<sup>1</sup>, Zhang Yue<sup>1,2</sup>, Wang Hong-mei<sup>1</sup>, Sun Fen-yong<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Institute of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** The transcription factor Runx2 is the key factor that regulates osteogenic differentiation and bone development. It has been reported that the C2C12 mesenchymal cells can be induced to differentiate into osteoblasts by Runx2 overexpression, but the molecular mechanism of induction is still largely unclear.

**OBJECTIVE:** To investigate the role of the members of the miR-376 family during Runx2-induced osteogenic differentiation in C2C12 cells.

**METHODS:** The expression of the members of the miR-376 family was detected by real-time quantitative PCR at different time points using C2C12/Runx2<sup>Dox</sup> sub-line with conditional Runx2 expression. In miR-376b-3p-transfected C2C12/Runx2<sup>Dox</sup> cells, the expression of osteoblast markers, such as alkaline phosphatase and osteocalcin, was detected by real-time quantitative PCR, and the alkaline phosphatase activity was also examined by alkaline phosphatase staining. The putative miR-376b-3p targets were commonly predicted by online tools (miRanda, miRWalk and TargetScan). The functional classification of these putative targets was performed by DAVID Bioinformatics Resources database.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The expression of miR-376b-3p was significantly increased during Runx2-induced osteogenic differentiation of C2C12 cells, but the expression of other members was not changed. Transfection of miR-376b-3p mimic upregulated alkaline phosphatase expression, but had no effect on osteocalcin expression. The alkaline phosphatase activity was also increased by transfection of miR-376b-3p. The functional classification of miR-376b-3p putative targets showed that miR-376b-3p is involved in the skeleton development, indicating the role of miR-376b-3p in osteoblast differentiation. Taken together, these results suggest that Runx2 promotes early osteogenic differentiation in C2C12 cells by regulating the expression of genes related to

耿倩倩★, 女, 1985年生, 山东省邹平县人, 汉族, 硕士, 主要从事遗传学方面的研究。  
mimiqianqian@126.com

通讯作者: 孙奋勇, 博士, 博士生导师, 同济大学附属第十人民医院, 上海市 200072  
sunfenyong@263.net

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 2095-4344  
(2013)28-05108-05

收稿日期: 2012-04-06  
修回日期: 2012-07-06  
(20120406013/W-W)

Geng Qian-qian★, Master, Institute of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China  
mimiqianqian@126.com

Corresponding author: Sun Fen-yong, Doctor, Doctoral supervisor, Institute of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou, 510632, Guangdong Province, China; Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China  
sunfenyong@263.net

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81071524\*

Received: 2012-04-06  
Accepted: 2012-07-06

osteogenic differentiation through upregulation of miR-376b-3p.

**Key Words:** tissue construction; bone tissue construction; Runx2; C2C12 cells; miR-376b-3p; osteogenic differentiation; doxycycline; National Natural Science Foundation of China

Geng QQ, Yu SH, Zhang Y, Wang HM, Sun FY. miR-376b-3p promotes Runx2-induced early osteogenic differentiation of C2C12 cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(28): 5108-5112.

## 0 引言

Runx2在成骨细胞分化, 软骨细胞成熟, 骨基质蛋白的产生及骨发育等方面发挥着重要作用。生物体正是通过调控Runx2的适度表达, 从而对骨髓间充质干细胞向成骨细胞的分化及骨骼的正常发育过程进行调节<sup>[1-2]</sup>, 但对相关分子机制了解较少。在前期的研究中, 作者利用Tet-on advanced基因表达系统构建了单因子诱导成骨细胞分化的C2C12/Runx2<sup>Dox</sup>模型<sup>[3]</sup>, 在该模型中通过施加外源诱导剂强力霉素以实现Runx2的可控表达。利用该模型作者已经对成骨分化分子机制进行了初步的分析, 这些成果可为临床上对由Runx2引发的相关疾病的针对性治疗提供理论基础与依据。

MiRNA是一类单链形式的内源小非编码RNA, 进化上高度保守, 可调控基因表达, 参与众多生物学过程。研究表明, miRNAs对成骨细胞分化及骨发育也具有重要调节作用<sup>[4-5]</sup>。Mir-376家族有3个成员, 即miR-376a (-3p与-5p), miR-376b(-3p与-5p)和miR-376c(-3p与-5p)。研究发现该家族成员可参与众多生物学过程, 如细胞自噬, 参与心肌保护及红细胞分化<sup>[6-7]</sup>, 但并不清楚该家族成员在Runx2诱导C2C12进行成骨分化过程中的作用。在这次实验中, 发现Runx2可通过上调miR-376b-3p的方式对与成骨分化相关基因的表达进行调节, 以促进C2C12细胞进行成骨细胞的早期分化。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞分子水平实验。

**时间及地点:** 于2011年3月至2012年1月在暨南大学生物工程研究所实验室完成。

**材料:**

**细胞系:** C2C12/Runx2<sup>Dox</sup>细胞是利用Tet-on advanced基因表达系统在小鼠成肌细胞C2C12中建立的由强力霉素调节Runx2表达的单因子诱导成骨分化模型, 为作者所在实验室自己构建。

**方法:**

**细胞培养:** C2C12/Runx2<sup>Dox</sup>细胞培养在含体积分数10%胎牛血清, 800 mg/L G418, 500 mg/L潮霉素的DMEM培养液中, 并置于37℃, 体积分数5%的CO<sub>2</sub>培养箱中, 隔日换液1次, 细胞经传代和收获, 取对数生长期细胞进行实验。

### 试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
Lipofectamine 2000 脂质体, G418, Trizol, DMEM 培养基, 胰蛋白酶、潮霉素	美国 Invitrogen 公司
Tet-on system 专用胎牛血清、强力霉素	美国 Clotech 公司
miR-376b-3p mimic, miR-NC	上海吉玛制药技术有限公司
SYBR Green PCR Master Mix	日本 TOYOBO 公司
倒置显微镜及拍照系统	日本 Olympus 公司
CO <sub>2</sub> 细胞培养箱	德国 Heraeus 公司

**总RNA提取:** 取对数生长期的C2C12/Runx2<sup>Dox</sup>细胞以 $1 \times 10^5/cm^2$ 细胞的接种于六孔培养板上, 并加入G418(800 mg/L)和潮霉素(500 mg/L)。待24 h细胞完全贴壁以后, 加入强力霉素(10 mg/L)对细胞按照0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 h 8个不同时间段分别进行诱导。诱导结束后弃培养基, 用PBS洗3次后, 每孔加入500  $\mu$ L的Trizol裂解细胞, 混匀, 冰上孵育5 min后收集于1.5 mL Eppendorf管中。每孔加入100  $\mu$ L氯仿, 剧烈震荡混匀30 s, 室温静置10 min, 4℃下, 12 000 r/min, 室温离心15 min。取上清液至新的Eppendorf管, 加等体积异丙醇, -20℃静置15 min。4℃下, 12 000 r/min, 离心15 min, 弃上清, 75% DEPC水配制的乙醇0.5 mL洗涤沉淀1次, 12 000 r/min, 离心10 min。弃上清, 空气干燥10 min, 加0.1% DEPC水50  $\mu$ L溶解RNA沉淀, 置于-20℃冰箱保存备用。

**反转录:** 取1  $\mu$ g的总RNA并加入DEPC水到总体积为12  $\mu$ L, 65℃保温5 min, 使RNA变性。随后立即冰上制冷, 以防变性。在该PCR管中分别加入0.5  $\mu$ L的相应miRNA RT primer(或随机引物), U6下游primer(或oligo dT引物), RNase inhibitor, 反转录酶M-MLV, 2.0  $\mu$ L的10  $\mu$ mol/L dNTP, 4  $\mu$ L的5 $\times$ buffer, 将上述20  $\mu$ L反应溶液30℃保温10 min, 42℃保温60 min, 72℃保温10 min, 最终逆转为所需的cDNA溶液。在检测基因表达水平时进行反转录所用引物是随机引物与oligo dT。在检测miRNA表达水平时进行反转录所用引物是相应miRNA的特异性反转录引物与U6下游引物。

**实时定量PCR:** 采用SYBR Green PCR Master Mix试剂, 在基因公司的扩增仪上进行反应, PCR反应体系为: cDNA 1  $\mu$ L, 基因或miRNA上下游10  $\mu$ mol/L引物各0.8  $\mu$ L, SYBR Green PCR Master Mix 10  $\mu$ L, 加H<sub>2</sub>O补至20  $\mu$ L。同时按照相同方式准备检测内参表达水平

的反应液。每个样品设3个复孔。反应条件为：预变性，95 °C 10 s；变性，95 °C 5 s；退火延伸，60 °C 30 s；延伸，72 °C 15 s，40个循环。操作步骤按照说明书进行。整个过程都收集荧光，每分钟读1次信号。反应结束后，使用系统软件分析PCR过程各检测样本的Ct (Threshold cycle) 值，Ct值随模板浓度增大而减少。由熔解曲线判断PCR反应的特异性，用基于 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行相对定量分析。进行miRNA表达水平检测时所用内参是U6 small nuclear RNA，进行基因表达水平检测的时候所用内参是18s rRNA。所用PCR引物都由上海生工合成。

#### PCR引物:

Gene	Primers sequence(5'→3')
Alp-F	CCA GCA GGC TTA CCA AGA AG
Alp-R	TTT ATC GCA CAA AGG GAA CA
18S-F	CCT GGA TAC CGC AGC TAG GA
18S-R	GCG GCG CAA TAC GAA TGC CCC
U6-F	CTC GCT TCG GCA GC ACA
U6-R	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT
pOC-F	GCT ACC TTG GAG CCT CAG TC
OC-R	GAT CAA GTC CCG GAG AGC AG
miR-376b-3p-F	ACA CTC CAGCTG GGA TCA TAG AGG AAC ATC CAC T
miR-376b-3p-R	CTC AAC TGG TGT CGT GGA
U6 反转录引物	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT
miR-376b-3p 反转录引物	CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GAG AAG TGG A

**miR-376b-3p mimic 转染实验:**将 miR-376b-3p mimic 冻干粉用 DEPC 水溶解为 10  $\mu\text{mol/L}$  的母液保存备用。取对数生长期的 C2C12/Runx2<sup>Dox</sup> 细胞以  $1 \times 10^4/\text{cm}^2$  (24 孔板)或  $1 \times 10^5/\text{cm}^2$  (6 孔板)密度接种于培养板中。待细胞汇合至 50%时弃培养基，并用 PBS 洗 3 次，吸干，取 200  $\mu\text{L}$  的 OPTI-MEM 培养基并加入相应体积的 Lipofectamine2000 脂质体(24 孔板加 1  $\mu\text{L}$ ；6 孔板加 4  $\mu\text{L}$ )混匀后静置 5 min，再取 200  $\mu\text{L}$  的 OPTI-MEM 培养基并加入相应体积的 miR-376b-3p mimic(转染终浓度为 50 nmol/L)后混匀，然后将两管混合液加在一起混匀后室温静置 20 min。最后将混合液加入培养板中于 37 °C，体积分数 5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 5 h。5 h 后更换为含体积分数 10%胎牛血清的 DMEM 培养基，并加入 G418(800 mg/L)、潮霉素(500 mg/L)和强力霉素(10 mg/L)进行培养。MiR-NC 的转染方式与 miR-376b-3p mimic 相同。

**碱性磷酸酶染色:**将培养好的细胞用 PBS 洗 3 次以去除培养基，而后用体积分数 95%的乙醇固定细胞 10 min，晾干，然后加入碱性磷酸酶反应底液在 37 °C 条件下孵育 4 h，1%的硝酸钴处理 2 min，冲洗 1.0-

2.0 min。1%的硫化铵处理 1.0-2.0 min，水洗 5 min 后晾干拍照。

**靶基因预测与功能分类:**利用在线预测 miRNA 靶基因的数据库 miRanda, miRWalk 与 TargetScan 共同预测 miR-376b-3p 潜在靶基因，然后用 DAVID Bioinformatics Resources 数据库将预测得到的靶基因进行功能分类。

**主要观察指标:**miR-376b-3p 表达水平，成骨分化标记基因碱性磷酸酶与骨钙素表达水平，碱性磷酸酶活性。

**统计学分析:**用 SPSS 13.0 软件进行统计分析处理，并作组间独立 t 检验，实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，以  $P < 0.05$  表示差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 Runx2 可激活 miR-376b 家族成员 miR-376b-3p 的表达 见图 1。

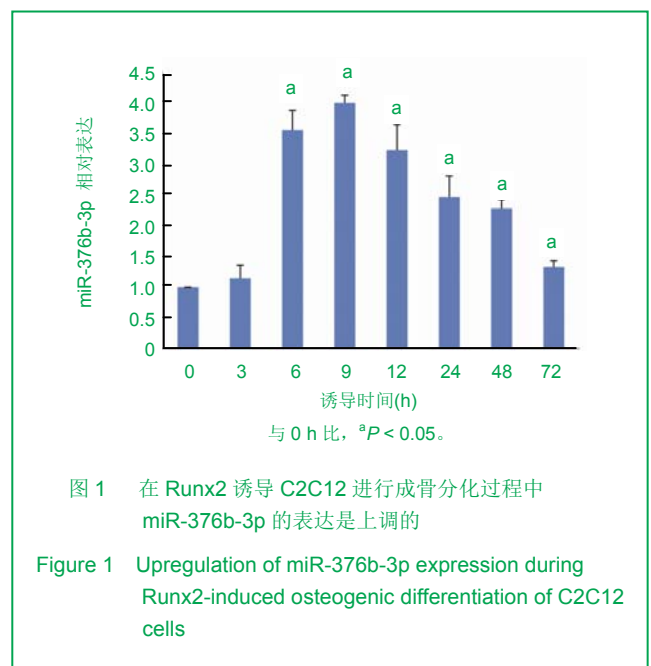
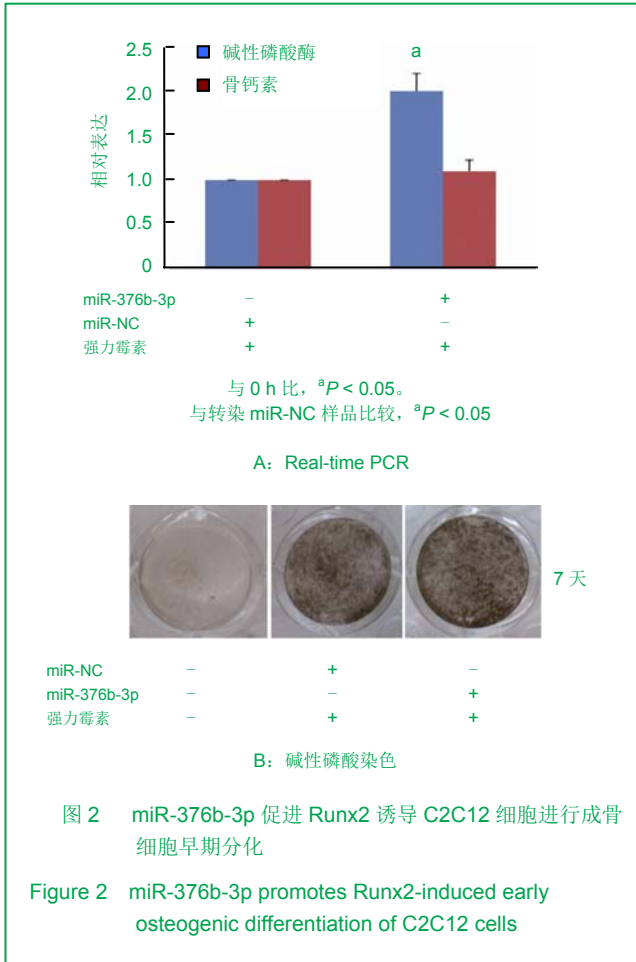


图 1 在 Runx2 诱导 C2C12 进行成骨分化过程中 miR-376b-3p 的表达是上调的

Figure 1 Upregulation of miR-376b-3p expression during Runx2-induced osteogenic differentiation of C2C12 cells

为分析 miR-376 家族成员在 Runx2 诱导 C2C12 细胞进行成骨分化过程中的作用，首先利用实时定量 PCR 的方法对相关成员的表达水平进行分析。检测结果表明在 C2C12/Runx2<sup>Dox</sup> 细胞用强力霉素(10 mg/L)诱导 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 h 后，miR-376b-3p 的相对表达量依次为 1, 1.144±0.213, 3.549±0.321, 3.991±0.124, 3.222±0.415, 2.457±0.34, 2.277±0.141, 1.329±0.102，由此可见在诱导 C2C12 细胞进行成骨分化过程中，Runx2 可激活 miR-376b-3p 表达，见图 1。对其他成员，即 miR-376a(-3p 与-5p)、miR-376b-5p、miR-376c(-3p 与-5p)，则无明显调节作用(未提供数据)。

### 2.2 MiR-376b-3p 可促进成骨细胞早期分化 见图 2。

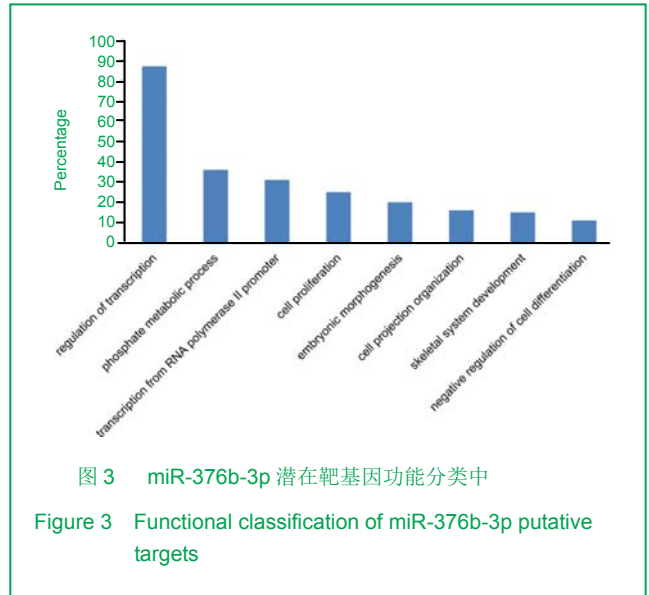


在诱导分化过程中, Runx2 可显著上调 miR-376b-3p 的表达水平, 暗示该 miRNA 对此分化过程可能具有正向调节作用。将 miR-NC 和 miR-376b-3p mimic 分别转染 C2C12/Runx2<sup>Dox</sup> 细胞后用强力霉素 (10 mg/L) 诱导培养 3 d, 并通过荧光定量 PCR 方法分析成骨细胞早期分化标记基因碱性磷酸酶与晚期分化标记基因骨钙素表达情况, 结果发现与转染 miR-NC 样品相比, 转染 miR-376b-3p 可明显上调碱性磷酸酶表达, 但对骨钙素表达无明显影响, 见图 2A。同时也发现, 与转染 miR-NC 样品相比, 转染 miR-376b-3p 可明显增强碱性磷酸酶活性, 见图 2B。以上结果说明 miR-376b-3p 可促进 Runx2 诱导 C2C12 细胞进行成骨细胞早期分化, 但对成骨细胞晚期分化没有调节作用。

**2.3 miR-376b-3p 可调节与骨骼发育有关基因的表达**

为解析 miR-376b-3p 调节成骨细胞早期分化的可能分子机制, 需要对其潜在靶基因进行分析。通过利用 miRanda, miRWalk, TargetScan 三个在线软件共同预测 miR-376b-3p 靶基因, 一共得到可信度较高的靶基因 604 个, 随后用 DAVID Bioinformatics Resources 数据库对这些靶基因进行功能分类, 分析结果表明 miR-376b-3p 的潜在靶基因主要与转录调控, 磷酸盐代谢, 细胞分化, 骨骼系统发育等过程有关, 见图 3。结

合 miR-376b-3p 具有的促成骨细胞早期分化的作用, 参与骨骼系统发育 (skeleton system development) 过程的潜在靶基因可能是该 miRNA 调节的靶基因。有关这一类群的基因有: Bmi1, Ibsp, Zbtb7a, Twsg1, Impad1, Tbx3, Ndst1, Edn1, Gas1, Six4, Wwtr1, Mmp2, Alox15, Pbx1, Paps2。后续的研究需要通过一系列实验方法来证明 miR-376b-3p 与这些潜在靶基因的关系。



### 3 讨论

Runx2 是调节成骨分化与骨发育的关键转录因子, 有研究表明在小鼠原代骨骼肌细胞及 3T3-L1 前脂肪细胞单独过表达 Runx2 可促进其分化为成骨细胞<sup>[8]</sup>。Runx2 缺陷型的纯合体小鼠缺乏骨骼矿化的能力, 产后立即死亡; 杂合体则可以存活, 但骨骼系统存在发育缺陷<sup>[9]</sup>。Runx2 过表达的转基因小鼠出现骨质疏松的症状<sup>[10]</sup>。在人体中出现 Runx2 杂合突变会引发常染色体遗传性疾病 CCD<sup>[11-12]</sup>, 由此可见 Runx2 在成骨细胞分化及骨发育过程中具有重要作用。作为转录因子的 Runx2 是通过调节其下游的编码蛋白基因及 miRNA 基因来实现其生物学功能的, 全面解析这些调控对象可系统阐述其调控成骨分化及骨发育的分子机制。

在成骨细胞分化中, 存在与该过程密切相关的 miRNA, 即 “osteomiRs”<sup>[13-14]</sup>, 这些 microRNA 可以通过多种途径对分化过程进行调控, 如在成骨细胞分化后期, 即骨基质沉积矿化阶段 miR-29a 与 miR-29c 可抑制标记基因 osteonectin 的表达, 进而对骨重塑过程进行调节<sup>[15]</sup>。对转录因子表达的调控, 在 BMP2 诱导小鼠成肌细胞 C2C12 成骨细胞分化时则是通过下调 miR-133 与 miR-135 的表达, 维持转录因子 Runx2 和 Smad5 正常表达达到促细胞分化的目的<sup>[16]</sup>。miR-26 则可通过调控转录因子

Smad1的表达来调节人脂肪组织来源的干细胞向成骨细胞的分化<sup>[17]</sup>。对激酶活性的调节,如miR-138对人基质干细胞向成骨细胞的分化调节依赖于对FAK的抑制作用<sup>[18]</sup>。

实验中发现Runx2诱导C2C12进行成骨分化时可明显上调miR-376b-3p的表达,且发现该miRNA具有协同促进Runx2诱导C2C12进行成骨细胞早期分化的作用,即促进早期分化标记基因碱性磷酸酶的表达,此结果揭示该miRNA在介导Runx2诱导早期成骨分化的功能方面具有重要意义,因此可将其看作是一种“osteomiR”。后续研究需要在不同时间点采用miRNA芯片的方法对参与此过程的miRNA种类进行系统分析,以求全面解析miRNA网络调控Runx2诱导C2C12进行成骨分化的分子机制。

实验发现miR-376b-3p具有促进Runx2诱导C2C12进行成骨细胞早期分化的作用,此功能是通过调控靶基因表达的方式实现的。作者将在线预测得到的靶基因在DAVID Bioinformatics Resources数据库进行功能分类,结果发现有15个miR-376b-3p潜在靶基因可参与骨骼系统发育过程。结合miR-376b-3p功能特征,及有关15个潜在靶基因的研究进展,作者推测在Runx2诱导成骨分化过程中,miR-376b-3p可能是通过靶向调控Tbx3表达的方式来实现其生物学功能的,这是因为Tbx3对成骨分化具有显著的负调控作用<sup>[19]</sup>。由于miRNA的理论靶基因不止一个,因此在此分化过程中可能还存在其他可被miR-376b-3p靶向调控的基因,而且这些基因所参与的生物学过程可能不是骨骼系统发育过程,而是参与如细胞增殖过程,从而对Runx2诱导C2C12进行成骨分化的过程进行调节。

**基金资助:** 国家自然科学基金项目(81071524)资助。

**作者贡献:** 实验设计为通讯作者,实施为第一、二作者,评估为第一作者,资料收集为第一、二作者,第一作者成文,通讯作者审校,第一作者和通讯作者对文章负责。

**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直接或间接的经济或利益的赞助。

**学术术语:** MiRNA是一类单链形式的内源小非编码RNA,进化上高度保守,可调控基因表达,参与众多生物学过程。

**伦理要求:** 未涉及与相关伦理道德冲突的内容。

**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。

#### 4 参考文献

[1] Otto F, Kanegane H, Mundlos S. Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia. Hum Mutat. 2002;19(3):209-216.

[2] Zhang C, Zheng S, Wang Y, et al. Mutational analysis of RUNX2 gene in Chinese patients with cleidocranial dysplasia. Mutagenesis. 2010; 25(6):589-594.

[3] 李萍,余守和,高忠平,等.过表达Runx2促进C2C12细胞成骨分化[J],中国生物化学与分子生物学报,2010,26(3):236-242

[4] Hassan MQ, Gordon JA, Beloti MM, et al. A network connecting Runx2, SATB2, and the miR-23a-27a-24-2 cluster regulates the osteoblast differentiation program. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(46): 19879-19884.

[5] Crist CG, Montarras D, Pallafacchina G, et al. Muscle stem cell behavior is modified by miRNA-27 regulation of Pax3 expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106 (32):13383-13387

[6] Pan Z, Guo Y, Qi H. M(3) Subtype of Muscarinic Acetylcholine Receptor Promotes Cardioprotection via the Suppression of miR-376b-5p. PLoS One. 2012;7(3):e32571.

[7] Wang F, Yu J, Yang GH. Regulation of erythroid differentiation by miR-376a and its targets. Cell Res. 2011;21(8):1196-1209.

[8] Pan K, Sun Q, Zhang J, et al. Multilineage differentiation of dental follicle cells and the roles of Runx2 over-expression in enhancing osteoblast/cementoblast-related gene expression in dental follicle cells. Cell Proliferation, 2010; 43(3): 219-228.

[9] Otto F, Kanegane H, Mundlos S. Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia. Human Mutation. 2002; 19(3):209-216.

[10] Xuan D, Li S, Zhang X, et al. Mutational analysis of RUNX2 gene in Chinese patients with cleidocranial dysplasia. Mutagenesis. 2008; 38(1):15-24.

[11] Liu W, Toyosawa S, Furuchi T. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. J Cell Biol. 2001; 155(1):157-166.

[12] Geoffroy V, Kneissel M, Fournier B, et al. High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing Cbfa1/Runx2 in cells of the osteoblastic lineage. Mol Cell Biol. 2002;22(17): 6222-6233.

[13] Kapinas K, Delany AM. MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. Arthritis Res Ther. 2011;13(3): 220.

[14] Hu R, Li H, Liu W, et al. Targeting miRNAs in osteoblast differentiation and bone formation. Expert Opin Ther Targets. 2011;14(10):1109-1120.

[15] Kapinas K, Kessler CB, Delany AM. miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: Regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling. J Cell Biol. 2009;108(1): 216-224.

[16] Li Z, Hassan MQ, Volinia S, et al. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(37): 13906-13911.

[17] 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. 2007; 23(2):287-295.

[18] Eskildsen T, Taipaleenmaki H, Stenvang J, et al. MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108(15): 6139-6144.

[19] Govoni KE, Linares GR, Chen ST, et al. T-box 3 negatively regulates osteoblast differentiation by inhibiting expression of osterix and runx2. J Cell Biochem. 2009; 106(3):482-490.