

淫羊藿苷对激素诱导损伤骨微血管内皮细胞微小RNA表达的影响

赵丁岩^{1,2}, 郭万首^{1,2}, 俞庆声², 程立明², 王佰亮²(¹北京中医药大学, 北京市 100029; ²中日友好医院骨关节外科, 骨坏死与关节保留重建中心, 北京市 100029)

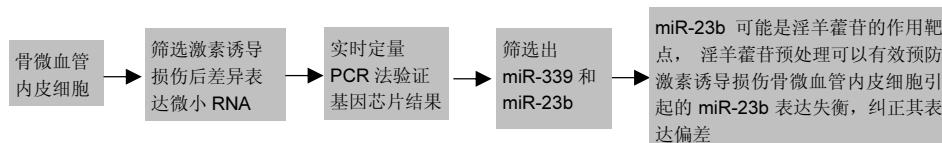
引用本文: 赵丁岩, 郭万首, 俞庆声, 程立明, 王佰亮. 淫羊藿苷对激素诱导损伤骨微血管内皮细胞微小RNA表达的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(15):2140-2147.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.15.002

ORCID: 0000-0002-5835-6144(郭万首)

文章快速阅读:

淫羊藿苷可能通过介导骨微血管内皮细胞 miR-23b 表达参与激素性股骨头坏死的调控



赵丁岩, 男, 1986年生, 山西省侯马市人, 汉族, 北京中医药大学在读博士, 主要从事股骨头坏死及关节外科的研究。

通讯作者: 郭万首, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 中日友好医院骨关节外科, 骨坏死与关节保留重建中心, 北京市 100029

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)15-02140-08

稿件接受: 2016-02-10

http://www.crter.org

文题释义:

微小RNA: micro-RNA, 简称为 mi-RNA, 是细胞内源性合成的小分子非编码 RNA, 通过阻抑蛋白的翻译或者诱导靶 mRNA 的降解调控基因的表达, 在调节生物体生长、发育和疾病发生相关基因表达过程中起到重要作用, 既可以通过一个 mi-RNA 来调控多个靶基因的表达, 也可以通过几个 mi-RNA 的组合来精细调控某个靶基因的表达。据推测 mi-RNA 调节着人类 1/3 的基因表达, 具有广阔的研究前景。
miR-23b: 是一种多功能的非编码 mi-RNA, 属于 miR-23b/27b/24-1 基因簇, 位于 9 号染色体 9q22.32, 本身是基因 C9orf3 的一部分, 该基因簇在多种组织器官中呈现高表达, 尤其在肺、心脏等富含血管内皮细胞的组织器官中呈现高表达, 参与细胞生长及凋亡、血管形成和干细胞分化等生理过程。

摘要

背景: 近年来研究证实微小 RNA 广泛参与调控人体发育、细胞增殖分化及凋亡、血管生成、脂质代谢等生理过程, 同样微小 RNA 在股骨头坏死的病理过程中也具有重要的作用。作者所在实验室前期研究证实淫羊藿苷具有抑制激素诱导骨微血管内皮细胞凋亡的作用, 并且可以显著提高骨微血管内皮细胞促血管生成蛋白粒集落刺激因子的表达。但目前关于淫羊藿苷对骨微血管内皮细胞微小 RNA 的研究仍处于探索阶段, 其具体作用靶点、可能的调节机制及信号通路尚不明确。

目的: 探索淫羊藿苷对激素诱导人股骨头骨微血管内皮细胞微小 RNA 表达的影响及其可能的机制。

方法: 采用作者所在实验室建立的方法分离、培养及鉴定人股骨头骨微血管内皮细胞, 取第 3 代骨微血管内皮细胞, 建立激素诱导损伤模型及淫羊藿苷预处理模型, 采用微小 RNA 基因芯片对激素组和正常组进行差异性转录, 运用实时定量 PCR 法对明显表达差异 miR-339 及 miR-23b 进行验证, 同时探讨淫羊藿苷对 miR-339 及 miR-23b 表达的影响。

结果与结论: ①对微小 RNA 基因芯片结果进行差异性分析, 与正常组相比较, 激素组中差异倍数 > 2 的微小 RNA 共有 5 个, 其中 1 个表达上调, 4 个表达下调; ②实时定量 PCR 检测结果显示: 与正常组相比, 激素组中 miR-339 及 miR-23b 出现明显变化, 与基因芯片结果一致。与激素组相比, 淫羊藿苷预处理可以显著提高 miR-23b 的表达; ③结果表明: 淫羊藿苷可以有效预防激素诱导骨微血管内皮细胞损伤引起的 miR-23b 表达失衡, 推测淫羊藿苷可能通过介导骨微血管内皮细胞 miR-23b 的表达参与激素性股骨头坏死病理过程的调控。

关键词:

组织构建; 血管内皮细胞; 淫羊藿苷; 激素性股骨头坏死; 骨微血管内皮细胞; 微小 RNA 基因芯片; 微小 RNA; miR-23b; miR-339; 国家自然科学基金

主题词:

微血管; 内皮细胞; 芯片分析技术; 组织工程

Zhao Ding-yan, Studying for doctorate, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; Center for Osteonecrosis and Joint Preserving and Reconstruction, Department of Bone and Joint Surgery, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Corresponding authors: Guo Wan-shou, M.D., Chief physician, Professor, Doctor's supervisor, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; Center for Osteonecrosis and Joint Preserving and Reconstruction, Department of Bone and Joint Surgery, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

基金资助:
国家自然科学基金资助项目(81273972)

Effects of icariin on microRNAs expression in bone microvascular endothelial cells in steroids-induced femoral head lesions

Zhao Ding-yan^{1, 2}, Guo Wan-shou^{1, 2}, Yu Qing-sheng², Cheng Li-ming², Wang Bai-liang² (¹Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; ²Center for Osteonecrosis and Joint Preserving and Reconstruction, Department of Bone and Joint Surgery, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract

BACKGROUND: MicroRNAs (miRNAs) are widely involved in regulation of physiological processes, such as human development, cell proliferation, differentiation, and apoptosis, angiogenesis and lipid metabolism. MiRNAs also play an important regulating role in the pathological process of femoral head necrosis. At present, the research about the effect of icariin on miRNA expression in glucocorticoid-induced avascular necrosis is still in the exploratory stage, and the specific targets, possible regulation mechanism and signaling pathway remain unclear.

OBJECTIVE: To explore the effect of icariin on miRNA expression of bone microvascular endothelial cells in steroids-induced human femoral head lesions *in vitro*.

METHODS: Bone microvascular endothelial cells in cancellous bone of the femoral head were isolated and harvested *in vitro*. Icariin preconditioning preceded establishment of models of glucocorticoid-induced bone microvascular endothelial cell injury. Differential expression profiles and transcriptomes in glucocorticoid and normal groups were tested by miRNA microarrays. The most differentially expressed miR-23b and miR-339 in microarray analysis were further confirmed by real-time quantitative PCR. Meanwhile the effects of icariin on the expression of miR-23b-5p and miR-339-5p were detected.

RESULTS AND CONCLUSION: According to the microarray analysis, one miRNA was up-regulated and four miRNAs were down-regulated in the glucocorticoid group (fold > 2, $P < 0.05$). Results of RT-qPCR revealed that miR-23b was down-regulated and miR-339 up-regulated in the glucocorticoid group, which were in agreement with the microarray analysis ($P < 0.05$). Icariin pretreatment effectively prevented the imbalances of miR-23b expression induced by glucocorticoid ($P < 0.01$). These findings indicate that Icariin may participate in the pathological process of steroid-induced femoral head necrosis through regulating the expression of miR-23b.

Subject headings: Microvessels; Endothelial Cells; Microchip Analytical Procedures; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81273972

Cite this article: Zhao DY, Guo WS, Yu QS, Cheng LM, Wang BL. Effects of icariin on microRNAs expression in bone microvascular endothelial cells in steroids-induced femoral head lesions. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;200(15):2140-2147.

0 引言 Introduction

股骨头坏死是由各种原因引起的股骨头血液循环障碍性疾病, 是一种难治性髋关节疾病, 致残率极高, 其发病原因复杂, 目前多认为与长期服用皮质类固醇激素药物、大量饮酒、高凝血状态、创伤等相关, 其中激素性股骨头坏死发病率位于首位^[1]。近期研究认为激素性股骨头坏死与股骨头骨微血管内皮细胞损伤密切相关, 但具体发病机制不是十分明确^[2], 其中micro-RNAs (mi-RNAs)可能参与调控股骨头坏死发生发展的病理过程^[3]。

mi-RNAs是一类长度为18–25 nt的内源性非编码短链RNA, 当前发现的人类细胞中存在超过1 400种

mi-RNAs^[4], 广泛参与调控体内细胞增殖、凋亡、分化及血管形成、脂肪代谢等生理过程, 它通过碱基互补配对原则与靶mRNA结合, 直接降解靶基因或间接阻遏靶基因的蛋白翻译^[5-6], 在各种蛋白质的转录后阶段参与调控, 保证细胞稳态^[7]。很多研究表明mi-RNAs参与骨细胞的代谢和骨骼疾病的发生发展过程^[8-9], 目前已经证实mi-RNAs广泛参与调控体内血管形成和血管内皮细胞增殖、分化、凋亡等病理生理过程^[10-11], 提示mi-RNAs对激素性股骨头坏死的发生、发展可能起着重要的作用。

淫羊藿苷是中药淫羊藿的有效活性成分, 作者所在团队前期研究证实淫羊藿苷具有抑制激素诱导骨微血管内皮细胞凋亡和上调促血管生成蛋白表达的作用^[12]。

近期研究证实, 白藜芦醇、姜黄素、大豆异黄酮、丹参酮IIA, 人参皂苷、延胡索总生物碱、王不留行等对mi-RNAs具有广泛调节作用^[13-14], 但淫羊藿苷是否具有调节mi-RNAs表达的作用, 国内外目前还未见有相关报道。实验采用人股骨头骨微血管内皮细胞, 分别建立激素诱导骨微血管内皮细胞损伤模型和淫羊藿苷预处理模型, 采用mi-RNAs基因芯片筛选明显表达差异mi-RNAs, 并对明显表达差异mi-RNAs进行实时定量PCR验证, 同时探讨淫羊藿苷对明显表达差异mi-RNAs的影响, 利用生物信息学软件预测它们可能作用的靶基因及信号通路, 为进一步深入研究淫羊藿苷对骨微血管内皮细胞mi-RNAs的调控作用奠定基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 生物信息学实验。

1.2 时间及地点 实验于2015年2至12月在北京中日友好医院临床研究所骨循环与骨坏死实验室完成。

1.3 材料 细胞标本来源于2015年2至7月期间, 共8例因股骨颈骨折在中日友好医院骨关节外科住院接受髋关节置换患者的股骨头, 无激素使用史及长期饮酒史, 排除股骨头缺血性坏死、强直性脊柱炎累及髋关节、类风湿性髋关节炎、糖尿病等可能影响骨微血管内皮细胞的疾病。所有患者均对实验知情同意, 并在中日友好医院伦理委员会指导下进行研究。

淫羊藿苷对骨微血管内皮细胞mi-RNAs的调控作用主要使用的试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
淫羊藿苷	美国Sigma-Aldrich公司
氢化可的松	天津金耀药业有限公司
血管内皮细胞生长因子	北京义翘神州生物技术有限公司
mirVana™ mi-RNAs Isolation Kit(AM1561), mi-RNAs Complete Labeling and Hyb Kit, Agilent芯片扫描仪(G2565CA)	Agilent公司
miRcute mi-RNA First-Strand cDNA Synthesis Kit, mi-RNA qPCR Detection Kit(SYBR Green)	TIANGEN公司
分光光度计	美国Thermo Scientific公司
ABI 7900荧光定量PCR仪	德国Eppendorf公司

1.4 方法

1.4.1 骨微血管内皮细胞的分离培养及鉴定 采用作者所在实验室前期建立的人股骨头骨微血管内皮细胞

分离培养方法获取细胞^[15], 采用免疫荧光细胞化学染色方法证实该细胞为骨微血管内皮细胞^[16-17], 可在完全内皮细胞培养基(成分为M199培养基, 含100 mg/L链霉素, 1×10^5 U/L青霉素, 10 μ g/L血管内皮细胞生长因子, 4×10^4 U/L肝素, 体积分数20%胎牛血清)内于37℃、体积分数5%CO₂环境培养条件下传代培养。

1.4.2 实验分组与干预 取上述8例患者生长状态良好的第3代骨微血管内皮细胞, 在37℃, 体积分数5%CO₂的培养环境中生长至70%–80%细胞融合, 数字法随机分为正常对照组、激素组和淫羊藿苷预处理组。正常对照组细胞不加任何干预; 激素组细胞加入0.1 g/L氢化可的松培养24 h; 淫羊藿苷预处理组细胞以 1×10^{-5} mol/L淫羊藿苷处理24 h后, 加入0.1 g/L氢化可的松继续培养24 h。

1.4.3 mi-RNAs基因芯片检测 and 数据分析 筛选激素诱导骨微血管内皮细胞损伤后差异表达mi-RNAs。采用Trizol法提取细胞样品的总RNA, 用分光光度计定量, 甲醛变性胶电泳质检total RNA的质量。使用mirVana™ mi-RNAs Isolation Kit对total RNA进行纯化, 纯化后重新定量。使用mi-RNAs Complete Labeling and Hyb Kit对纯化后总RNA进行去磷酸化及标记反应, 杂交结束后, 清洗芯片, 使用Agilent芯片扫描仪对清洗后的芯片进行扫描, 得到杂交图片。

使用Agilent Feature Extraction(v10.7)软件对杂交图片进行分析并提取数据, 然后使用Agilent GeneSpring软件对数据进行归一化, 并采用GeneSpring软件进行组间的差异分析和相关性分析。常规筛选标准为 $P < 0.05$, 同时FC(abs)在2.0倍以上, FC(abs)值差异倍数越大, 说明2组样品之间的差异越大, 以上筛选差异mi-RNAs方法是较为严谨的筛选方法。

1.4.4 实时定量PCR检测操作步骤 根据筛选出的差异表达mi-RNAs基因, 对研究中上调、下调最为明显的miR-339和miR-23b分别进行实时荧光定量PCR(RT-PCR)验证, 并检测淫羊藿苷对miR-339和miR-23b表达的影响。

实验使用U6作为mi-RNAs实时荧光定量PCR反应中的内参基因, 分别检测正常对照组、激素组及淫羊藿苷预处理组总RNA中miR-339和miR-23b含量。具体实验方法: 采用合适方法提取细胞总RNA, 将提取好的总RNA从-80℃冰箱取出, 放在冰上溶解, 然后用分光光度计定量, 用琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。对总RNA使用miRcute mi-RNA First-Strand cDNA Synthesis

表 1 目的基因及管家基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of target and housekeeping genes

基因	引物	
	上游引物	下游引物
miR-339-5p	5'-GCTCCCTGTCCTCCAGGAG-3'	5'-TCGTATCCAGTGCAGGGTC-3'
miR-23b-5p	5'-TGGGTTCTGTCATGC-3'	5'-TCGTATCCAGTGCAGGGTC-3'
U6	5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3'	5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC-3'

表 2 激素组和正常对照组股骨头骨微血管内皮细胞明显差异表达 micro-RNAs

Table 2 Differential microRNA expression of bone microvascular endothelial cells in the femoral head in glucocorticoid and control groups

mi-RNAs 数据库登录号	FC(abs)	基因	差异情况	P
MIMAT0000764	2.57	miR-339	上调	0.048
MIMAT0004587	4.35	miR-23b	下调	0.011
MIMAT0004512	3.89	miR-100	下调	0.015
MIMAT0004569	4.28	miR-222	下调	0.002
MIMAT0004976	3.64	miR-933	下调	0.034

表注: FC (abs)为两组样品的差异倍数。

表 3 淫羊藿苷对激素诱导损伤的骨微血管内皮细胞中 mi-RNAs 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $2^{-\Delta Ct}$)

Table 3 Effects of icariin on the relative expression of differential microRNAs of steroids-induced injured bone microvascular endothelial cells

基因	正常对照组	激素组	淫羊藿苷预处理组
miR-339	0.033±0.006	0.064±0.009 ^a	0.066±0.012
miR-23b	181.82±7.01	120.12±7.17 ^a	547.00±8.14 ^b

表注: 与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与激素组相比, ^b $P < 0.01$ 。

Kit试剂盒合成第一链cDNA, 其方法为对mi-RNA 3'末端进行加Poly(A)处理后, 控制温度在37℃, 孵育60 min。接着对Poly(A)修饰的mi-RNA进行逆转录反应, 继续控制温度在37℃, 孵育60min, 取出后保存在-20℃备用。然后对已经合成的cDNA使用miRcute mi-RNA qPCR Detection Kit (SYBR Green) 试剂盒进行 Real-Time PCR System qPCR反应检测。最后使用ABI 7900荧光定量PCR仪进行定量PCR检测。上述实验均重复3次。数据分析采用采用相对定量分析法, 取3个重复的CT值平均值, 并以U6基因Ct值作为内参基因值, $2^{-\Delta Ct}$ 法标准化目标基因的相对量。所涉及的引物见表1。

1.4.5 Mi-RNAs靶基因预测 采用生物学信息方法预测靶基因。选用国内外最常用也是最权威的4个软件进行预测: miRanda(MemorialSloan-Kettering 癌症研究中心)、PicTar(Rajewsky实验室)、miRDB(美国宾夕法尼亚州匹兹堡大学)、TargetScan(Bartel实验室), 结合文献查询和基因芯片研究结果, 筛选miR-23b可能作用的靶基因及可能涉及的信号通路。

1.5 主要观察指标 ①激素诱导骨微血管内皮细胞损伤后明显差异表达mi-RNAs。②实时定量PCR验证明显差异表达miR-339和miR-23b。③淫羊藿苷对miR-339和miR-23b表达的影响。④miR-23b可能作用的靶基因及涉及的信号通路。

1.6 统计学分析 所有数据应用SPSS 18.0统计软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间数据差异比较采用最小方差比较法, 多组间数据比较采用方差分析法(ANOVA方法), $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 细胞形态 倒置相差显微镜下, 原代细胞培养7-10 d, 出现部分融合生长, 细胞呈铺路石或鹅卵石状(图1A)。正常对照组第3代骨微血管内皮细胞形态多呈梭形, 增殖速度快, 细胞排列均一有序(图1B)。激素组骨微血管内皮细胞呈收缩细长状态, 体积变小, 密度降低, 排列紊乱, 失去典型的单层铺路石状排列形态, 细胞出现生长抑制, 状态差(图1C)。淫羊藿苷预处理组骨微血管内皮细胞生长状态较单纯激素损伤组有所改善(图1D)。

2.2 mi-RNAs基因芯片筛选结果 mi-RNAs基因芯片结果显示有368个差异表达基因, 与正常组相比, 激素组中193个基因表达上调, 175个基因表达下调。其中差异倍数超过2倍有5个, 其中miR-339表达上调, miR-23b、miR-100、miR-222和miR-933表达下调, mi-RNAs表达上调、下调最为显著分别是miR-339和miR-23b(表2, 图2, 3)。

2.3 差异表达基因的定量分析 结果荧光实时定量PCR结果证实, 与正常对照组相比, 激素组miR-23b表达显著

表 4 预测的 miR-23b 靶基因

Table 4 Prediction of miR-23b target genes

靶基因	基因描述
ADAMTSL4	ADAMTS-like 4
STAT5A	signal transduction and activators of transcription
TBX15	T-box 15
PRICKLE2	Prickle 2
NRCAM	Neuronal cell adhesion molecule
PPAR-γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
STON1	stonin 1
TCEAL4	transcription elongation factor A (SII)-like 4
GPHN	gephyrin
CISH	cytokine inducible SH2-containing protein
CLCN2	chloride channel-2
MAN1C1	mannosidase, alpha, class 1C, member 1
SMIM3	small integral membrane protein 3
ST3GAL6	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6
SMPDL3A	sphingomyelinphosphodiesterase acid-like 3A
FAM117B	family with sequence similarity 117 member B
Sprouty2	sprouty RTK signaling antagonist 2
Sema6A	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A
Sema6D	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
TNFAIP1	TNF alpha induced protein 1
TNFAIP2	TNF alpha induced protein 2
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3

减少, miR-339表达显著增加($P < 0.05$), 结果与基因芯片结果一致; 而与激素组相比, 淫羊藿苷预处理可以显著提高miR-23b表达, 纠正其表达偏差($P < 0.01$)。见表3。

2.4 生物学信息学结果 分析得出的miR-23b可能作用的靶基因通过miRanda、PicTar、miRDB、TargetScan数据库进行生物学信息检测, 以上4个数据库中均出现的mi-RNA靶基因作为预测的靶基因, 并结合既往文献报道, 共筛选出23个miR-23b可能作用的靶基因。

通过靶基因通路分析和初步基因功能分类的方法发现, miR-23b作用的相关信号通路可能包括: JAK-Stat5通路、Notch通路、Wnt/JNK通路、RPTPβ通路、PPAR γ 通路、PI3K/Akt/mTOR通路、ERK1/2通路、RTK通路、MAPK通路, 可能的基因功能包括: 调控细胞增殖、分化、凋亡, 促进血管形成, 参与免疫调节, 介导炎症反应等(表4)。

3 讨论 Discussion

mi-RNAs 是当今生物医学领域研究热点, 属于内源性的具有一定调控功能的非编码 RNA, 通过与特定靶 mRNA 结合, 抑制 mRNA 翻译或者直接降解靶 mRNA,

调控转录后 mRNA 的表达, 参与调控细胞增殖、分化、凋亡, 脂肪代谢、器官生成等生理病理过程。目前已鉴定的 mi-RNA 数目有 1 400 多条, 但绝大部分 mi-RNA 的功能、信号通路及调节机制尚不明确。经大量研究证实 mi-RNA 在骨代谢, 骨细胞分化、凋亡及血管形成中发挥关键的调控作用, 近年来研究提示某些特异性 mi-RNA 可能与股骨头坏死有关。Wang 等^[18]通过检测股骨头坏死患者血清 mi-RNA 表达谱发现股骨头坏死患者血清中存在表达异常的 mi-RNA。Suzuki 等^[19]发现 miR-210 在股骨头坏死患者血浆中呈现高表达, 认为 miR-210 可能参与了股骨头坏死的病理过程。Yamasaki 等^[20]进一步研究证实上调 miR-210 的表达可以促进血管内皮生长因子和血管内皮细胞的生成, 促进股骨头坏死区血管生成及骨修复。虽然与股骨头坏死相关 mi-RNA 的研究仍处于探索阶段, mi-RNA 在股骨头坏死病理过程中的具体调控机制及信号通路尚不完全明确, 但 mi-RNA 在股骨头坏死的研究已显示出广阔的前景, 对股骨头坏死的早期诊断、治疗具有重大的临床意义。

激素性股骨头坏死目前已占到非创伤性股骨头坏死的首位, 其发病机制仍不清楚, 激素及其代谢产物损伤

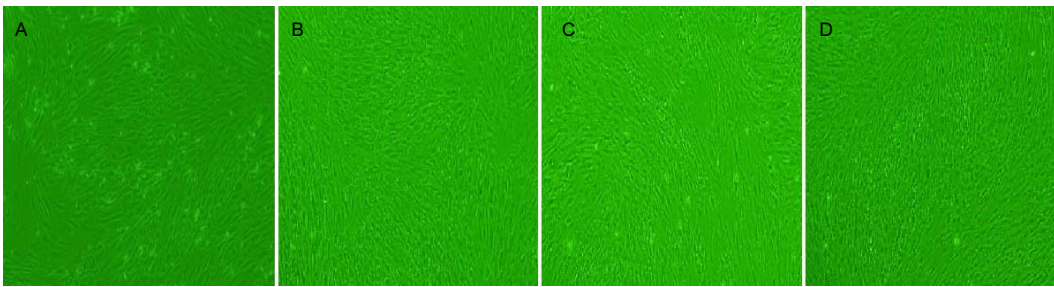


图 1 淫羊藿苷对激素诱导损伤骨微血管内皮细胞形态的影响($\times 100$)

Figure 1 Effects of icariin on morphology of steroids-induced bone microvascular endothelial cells($\times 100$)

图注: 图中 A 为原代细胞培养 7-10 d 后呈梭形或多角形; B 为第 3 代骨微血管内皮细胞, 呈典型的鹅卵石或铺路石样; C 为激素组骨微血管内皮细胞, 密度降低; D 为淫羊藿苷预处理组骨微血管内皮细胞, 形态和数量有所改善。

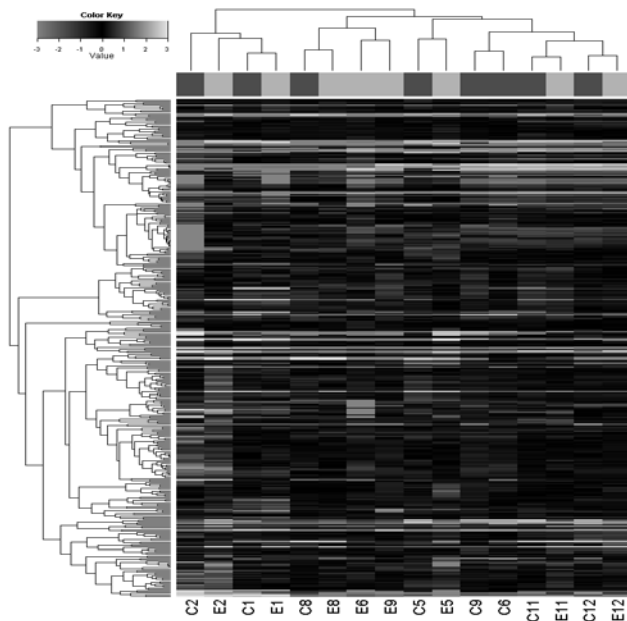


图 2 激素组与正常组骨微血管内皮细胞差异表达的 mi-RNAs 聚类分析

Figure 2 Cluster analysis of differential microRNA expressions in glucocorticoid and control groups

图注: 首先采用 mi-RNA 芯片筛选激素诱导骨微血管内皮细胞损伤后明显差异表达 mi-RNAs, 其中 C 代表正常对照组, 颜色为红色, E 为激素组, 颜色为浅蓝色, 共 8 例患者各分成 2 组, 共 16 组, 编号为 C1, E1, C2, E2, C8, E8, E6, E9, C5, E5, C9, C6, C11, E11, C12, E12。颜色表示信号值(mi-RNA 基因表达荧光强度值)的强度, 其中黄色显示高表达, 蓝色显示低表达, 黑色为无明显差异。

骨微血管内皮细胞引起的股骨头微循环障碍可能是激素性股骨头坏死发生发展的重要原因。由于激素特殊的生物学功能, mi-RNAs 很可能是激素作用的目标^[21], 本实验采用高通量 mi-RNAs 基因芯片分析了激素诱导骨微血管内皮细胞损伤后差异表达的 mi-RNAs, 共发现 5 个明显表达差异 mi-RNAs, 其中表达上调的 1 个, 表达下调的 4 个。为了证实基因芯片数据的真实性和可靠性, 确定与激素性股骨头坏死发病至关重要的 mi-RNAs, 本实验采用荧光实时定量 PCR 的方法验证 miR-23b 和

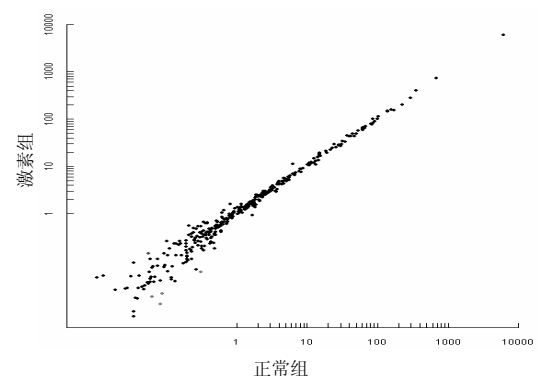


图 3 激素组和正常组 micro-RNA 基因表达荧光强度值的散点图

Figure 3 Scatterplot of signal ratio of microRNA expressions in glucocorticoid and control groups

图注: X 轴和 Y 轴分别代表激素组和正常组荧光信号强度为坐标, 图中每个点代表芯片上一个探针集(基因)的荧光信号强度, 红色代表激素组/正常组的 Ratio 值 > 2 , 即: 激素组/正常组发生上调的基因, 可以看出只有一个基因出现表达上调; 绿色代表正常组/激素组的 Ratio 值 < 0.5 , 即: 正常组/激素组发生下调的基因, 可以看出有 4 个基因出现表达下调; 黑色代表激素组/正常组的 Ratio 值在 0.5 和 2 之间, 两者表达基本无差异。

miR-339 两个最具差异的、表达刚好相反的 mi-RNAs, 结果显示 miR-23b 表达显著减少, miR-339 表达明显增加, 与正常组相比差异有显著性意义($P < 0.05$), 证实基因芯片的结果是可信的, 因此作者推测 miR-23b 和 miR-339 有可能在激素性股骨头坏死的骨微血管内皮细胞转录后水平调节机制中扮演着重要的角色。与此同时本实验运用荧光实时定量 PCR 法检测了淫羊藿苷预处理后对骨微血管内皮细胞 miR-23b 和 miR-339 表达的影响, 结果发现淫羊藿苷可以有效预防激素导致的 miR-23b 表达失衡, 纠正其表达偏差, 与激素组相比差异有显著性意义($P < 0.01$), miR-23b 极有可能是淫羊藿苷的作用靶点, 目前国内外对此尚无文献报道。

近年来研究表明, miR-23b 是一种多功能的非编码 mi-RNA, 属于 miR-23b/27b/24-1 基因簇, 该基因簇在多种组织器官中呈现高表达, 尤其在肺、心脏等富含血

管内皮细胞的组织器官中呈现高表达^[22-23]。该基因簇拥有独立的启动子,能够表达 3 种成熟 mi-RNA: miR-23b、27b、24-1,通过调控多种靶基因及信号通路发挥相同的调节作用。目前已发现超过 20 余种 miR-23b 的靶基因及多条相关信号通路,在细胞凋亡、增殖、分化,促血管形成及干细胞分化方面具有重要的调节作用^[24-28]。Zhou 等^[27]研究发现 miR-23b 具有促血管生成的作用,可能与抑制其靶基因 *Sprouty2* 和 *Sema6A* 的表达有关,抑癌分子 *Sprouty2* 和信号素 *Sema6A* 作为 MAPK 信号通路上游蛋白,具有抑制血管生成信号通路激活的作用,此外 *Sprouty2* 和 *Sema6A* 还具有调节细胞凋亡的作用^[29]。有研究者发现 miR-27b 可以通过调节抗凋亡蛋白 *Bcl-2* 和促凋亡蛋白 *Bax* 的平衡,抑制细胞线粒体凋亡途径,从而抑制血管内皮细胞及平滑肌细胞凋亡^[30]。同时 Griffiths-Jones 等^[31]认为 miR-23b 很可能通过调节其他与凋亡相关的靶基因来影响细胞的命运。因而可以推测淫羊藿苷可能通过上调 miR-23b 的表达发挥抑制骨微血管内皮细胞凋亡和促进新生血管形成的作用,可能对激素性股骨头坏死的防治具有正向作用。

此次实验前期通过 MTT 法、锥虫蓝染色法、Tunel 实验及蛋白芯片方法证实淫羊藿苷具有阻断激素诱导骨微血管内皮细胞损害的作用,可以显著抑制骨微血管内皮细胞凋亡,且可以显著提高促血管生成蛋白粒细胞集落刺激因子的表达。淫羊藿苷的抗凋亡及促血管生成机制是否通过调控 miR-23b 的表达来实现,本实验进行了初步探讨。在实验中,miR-23b 在激素组的表达是明显下调的,与正常组有显著性差异,而淫羊藿苷预处理后,miR-23b 表达显著上升。因此,推测淫羊藿苷可能通过调控 miR-23b 的表达,在激素诱导骨微血管内皮细胞凋亡和新生血管形成的转录后水平中扮演着重要的角色,其作用机制可能是通过上调 miR-23b 表达,抑制或降解某些促细胞凋亡或抑制血管生成靶 mRNA 的表达,发挥拮抗骨微血管内皮细胞凋亡和促血管生成的作用。为了更清楚的阐明淫羊藿苷介导 miR-23b 的调控作用,尚需继续深入研究 miR-23b 发挥抗凋亡及血管形成作用所调控的靶 mRNA 基因及胞内信号传导通路,有助于进一步揭示淫羊藿苷防治激素性股骨头坏死的治疗提供更多选择。

实验结果提示淫羊藿苷可能通过介导骨微血管内皮细胞 miR-23b 的表达参与激素性股骨头坏死病理过程的调控,考虑到 mi-RNAs 本身不编码蛋白质,而是

在转录后水平通过调控靶基因表达,调节细胞功能,作者推测淫羊藿苷可能通过调节 miR-23b 的表达,调控凋亡或血管形成相关靶 mRNA 基因的表达,进而上调(或下调)凋亡或血管形成相关蛋白质的合成,最终影响细胞功能、干预激素性股骨头坏死的病理过程。miR-23b 介导的治疗作用可能是淫羊藿苷防治激素性股骨头坏死的新机制,为研究激素性股骨头坏死的发病机制及早期防治提供了新的切入点,值得进一步深入研究。

作者贡献: 第一作者进行实验实施和成文,第二作者设计课题、修改审校,经第三、四、五作者进行实验评估,第一作者对文章负责。

利益冲突: 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度,文章经国内小同行外审专家审核,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Ikeuchi K, Hasegawa Y, Seki T, et al. Epidemiology of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head in Japan. *Mod Rheumatol*. 2015;25(2):278-281.
- [2] Mont MA, Cherian JJ, Sierra RJ, et al. Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head: Where Do We Stand Today? A Ten-Year Update. *J Bone Joint Surg Am*. 2015;97(19):1604-1627.
- [3] Yuan HF, Von Roemeling C, Gao HD, et al. Analysis of altered microRNA expression profile in the reparative interface of the femoral head with osteonecrosis. *Exp Mol Pathol*. 2015;98(2):158-163.
- [4] Nicoli S, Standley C, Walker P, et al. MicroRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signalling during angiogenesis. *Nature*. 2010;464(7292):1196-1200.
- [5] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-297.

- [6] Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431(7006):350-355.
- [7] Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(4):252-263.
- [8] Gámez B, Rodríguez-Carballo E, Ventura F. MicroRNAs and post-transcriptional regulation of skeletal development. *J Mol Endocrinol*. 2014;52(3):R179-197.
- [9] 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.
- [10] Rippe C, Blimline M, Magerko KA, et al. MicroRNA changes in human arterial endothelial cells with senescence: relation to apoptosis, eNOS and inflammation. *Exp Gerontol*. 2012;47(1):45-51.
- [11] Kane NM, Thrasher AJ, Angelini GD, et al. Concise review: MicroRNAs as modulators of stem cells and angiogenesis. *Stem Cells*. 2014;32(5):1059-1066.
- [12] 赵丁岩, 俞庆声, 郭万首, 等. 淫羊藿苷对激素诱导损伤人股骨头骨微血管内皮细胞蛋白质表达谱的影响[J]. *中华医学杂志*, 2016, 96(13):1026-1030.
- [13] Montgomery RL, van Rooij E. Therapeutic advances in MicroRNA targeting. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;57(1):1-7.
- [14] Nagpal JK, Rani R, Trink B, et al. Targeting miRNAs for drug discovery: a new paradigm. *Curr Mol Med*. 2010;10(5):503-510.
- [15] 路玉峰, 俞庆声, 郭万首, 等. 人股骨头骨微血管内皮细胞的分离培养方法[J]. *中国骨伤*, 2014, 27(10):843-847.
- [16] Hashemipour M, Dehkordi EH, Javanmard SH, et al. Von Willebrand factor, and soluble intercellular and vascular cell adhesion molecules as indices of endothelial activation in patients with congenital hypothyroidism. *Horm Res Paediatr*. 2011;76(2):99-103.
- [17] Gregg AJ, Schenkel AR. Cloning and structural analysis of equine platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM, CD31) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1, CD106). *Vet Immunol Immunopathol*. 2008;122(3-4):295-308.
- [18] Wang X, Qian W, Wu Z, et al. Preliminary screening of differentially expressed circulating microRNAs in patients with steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. *Mol Med Rep*. 2014;10(6):3118-3124.
- [19] Suzuki O, Bishop AT, Sunagawa T, et al. VEGF-promoted surgical angiogenesis in necrotic bone. *Microsurgery*. 2004;24(1):85-91.
- [20] Yamasaki K, Nakasa T, Miyaki S, et al. Angiogenic microRNA-210 is present in cells surrounding osteonecrosis. *J Orthop Res*. 2012;30(8):1263-1270.
- [21] Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, et al. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg*. 2002;109(7):2384-2397.
- [22] Suárez Y, Fernández-Hernando C, Pober JS, et al. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res*. 2007;100(8):1164-1173.
- [23] Kuehbach A, Urbich C, Zeiher AM, et al. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res*. 2007;101(1):59-68.
- [24] Wang KC, Garmire LX, Young A, et al. Role of microRNA-23b in flow-regulation of Rb phosphorylation and endothelial cell growth *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(7):3234-3239.
- [25] Zhang H, Hao Y, Yang J, et al. Genome-wide functional screening of miR-23b as a pleiotropic modulator suppressing cancer metastasis. *Nat Commun*. 2011;2:554.
- [26] Majid S, Dar AA, Saini S, et al. miR-23b represses proto-oncogene Src kinase and functions as methylation-silenced tumor suppressor with diagnostic and prognostic significance in prostate cancer. *Cancer Res*. 2012;72(24):6435-6446.
- [27] Zhou Q, Gallagher R, Ufret-Vincenty R, et al. Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(20):8287-8292.
- [28] Ham O, Song BW, Lee SY, et al. The role of microRNA-23b in the differentiation of MSC into chondrocyte by targeting protein kinase A signaling. *Biomaterials*. 2012;33(18):4500-4507.
- [29] Ma Y, Yu S, Zhao W, et al. miR-27a regulates the growth, colony formation and migration of pancreatic cancer cells by targeting Sprouty2. *Cancer Lett*. 2010;298(2):150-158.
- [30] Walker JC, Harland RM. microRNA-24a is required to repress apoptosis in the developing neural retina. *Genes Dev*. 2009;23(9):1046-1051.
- [31] Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, et al. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Database issue):D154-158.