

miR-98-5p 促进成骨细胞增殖和分化的可能及机制

<https://doi.org/10.12307/2021.107>

郑峰, 张富财, 许喆

投稿日期: 2020-09-11

送审日期: 2020-09-12

采用日期: 2020-10-30

在线日期: 2021-01-18

中图分类号:

R446; R363; R683

文章编号:

2095-4344(2021)26-04112-06

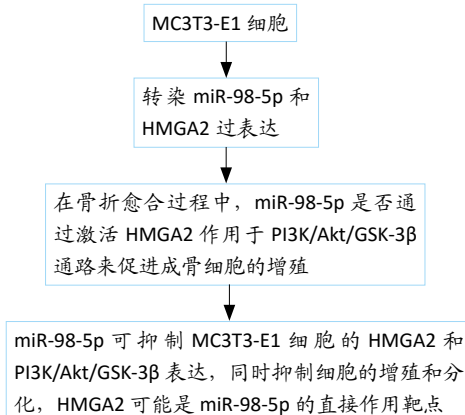
文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点一

△ miR-98-5p 可能通过抑制 HMGA2 及下游 PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路, 减弱成骨细胞的增殖和分化, 抑制 miR-98-5p 是促进骨折愈合的重要靶点;

△ 但 miR-98-5p 及其调控 HMGA2 在成骨细胞增殖分化过程中调控的信号通路仍需深入研究。



文题释义:

骨折愈合: 成骨细胞和破骨细胞在骨折愈合及重塑中发挥重要作用, 成骨细胞为间充质细胞, 在骨折愈合的骨形成中参与形成新的骨骼, 破骨细胞可分泌蛋白酶参与软骨的吸收和重塑。细胞因子和生长因子的释放均可影响成骨细胞和破骨细胞活性, 进而影响骨折愈合过程。

磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/糖原合成酶激酶3 β (PI3K/AKT/GSK-3 β)信号通路: PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路在细胞的生长、增殖和分化中起着重要作用, 其中PI3K/AKT可通过下游mTOR途径促进细胞存活, 参与细胞的代谢、增殖和血管生成。GSK-3 β 是一种多功能丝氨酸/苏氨酸激酶, 可调节能量代谢、细胞生长和凋亡, 是PI3K/AKT的下游底物和效应器。机械应力通过介导PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路可调节骨髓间充质干细胞的成骨过程。

摘要

背景: miRNA-98-5p可抑制高迁移率族AT HOOK蛋白2(high mobility group AT-HOOK 2, HMGA2)。磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/糖原合成酶激酶3 β (phosphatidylinositol 3-kinase/alkaline phosphatase/glycogen synthase kinase-3 β , PI3K/AKT/GSK-3 β)信号通路参与细胞增殖过程。骨折愈合过程中, miR-98-5p是否通过激活HMGA2作用于PI3K/Akt/GSK-3 β 通路来促进成骨细胞的增殖仍不清楚。

目的: 探讨miR-98-5p调控HMGA2和PI3K/AKT/GSK-3 β 通路促进成骨细胞增殖和分化的机制。

方法: 取MC3T3-E1细胞, 通过Lipofectamine 2000分别转染miR-98-5p模拟物和HMGA2质粒到MC3T3-E1细胞, 分别为miR-98-5p转染组和HMGA2过表达组; 用二甲亚砜处理的MC3T3-E1细胞及Scramblez乱序质粒转染至MC3T3-E1, 分别为转染对照组和空白质粒组; 采用脂质体瞬时转染miR-98-5p抑制剂, 作为miR-98-5p抑制剂组; 不做任何处理的MC3T3-E1细胞作为空白对照组。

结果与结论: ①空白对照组和转染对照组的HMGA2、PI3K/Akt/GSK-3 β 、碱性磷酸酶活性及mRNA水平差异无显著性意义, 与转染对照组比, miR-98-5p转染组HMGA2和PI3K/Akt/GSK-3 β 蛋白表达、细胞分化、细胞增殖, 碱性磷酸酶活性及mRNA均显著降低; ②Targetscan7.1预测miR-98-5p与HMGA2相互作用结果显示, 与转染对照组比, miR-98-5p转染组的HMGA2蛋白和mRNA均降低; 与miR-98-5p转染组比, miR-98-5p抑制剂组的HMGA2蛋白和mRNA均增加; ③空白对照组和空白质粒组的成骨细胞增殖、碱性磷酸酶活性及mRNA水平差异无显著性意义, 与空白质粒组比, HMGA2过表达组的PI3K/Akt/GSK-3 β 表达、细胞分化程度、MC3T3-E1细胞增殖、碱性磷酸酶活性及mRNA水平均显著增加; ④结果显示miR-98-5p可抑制MC3T3-E1细胞的HMGA2和PI3K/Akt/GSK-3 β 表达, 同时抑制细胞的增殖和分化, HMGA2可能是miR-98-5p的直接作用靶点。

关键词: 成骨细胞; 小微RNA98-5p; HMGA2; 磷脂酰肌醇3-激酶; 蛋白激酶B; 糖原合成酶激酶3 β ; 转染; MC3T3-E1细胞; 增殖; 分化

缩略语: 高迁移率族AT HOOK蛋白2: high mobility group AT-HOOK 2, HMGA2; 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/糖原合成酶激酶3 β : phosphatidylinositol 3-kinase/alkaline phosphatase/glycogen synthase kinase-3 β , PI3K/AKT/GSK-3 β

青海省人民医院骨科, 青海省西宁市 810007

第一作者: 郑峰, 男, 1978年生, 黑龙江省庆安县人, 2014年哈尔滨医科大学毕业, 硕士, 主任医师, 主任, 主要从事创伤后骨再生机制以及骨质疏松性骨折方面的研究。

通讯作者: 郑峰, 青海省人民医院骨科, 青海省西宁市 810007

<https://orcid.org/0000-0003-1033-8059> (郑峰)

基金资助: 青海省基础研究计划项目 (2020-ZJ-755), 项目负责人: 郑峰

引用本文: 郑峰, 张富财, 许喆. miR-98-5p 促进成骨细胞增殖和分化的可能及机制 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(26):4112-4117.



MicroRNA-98-5p promotes osteoblast proliferation and differentiation: possibilities and mechanisms

Zheng Feng, Zhang Fucai, Xu Zhe

Department of Orthopedics, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007, Qinghai Province, China

Zheng Feng, Master, Chief physician, Department of Orthopedics, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007, Qinghai Province, China

Corresponding author: Zheng Feng, Department of Orthopedics, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007, Qinghai Province, China

Abstract

BACKGROUND: MicroRNA-98-5p (miR-98-5p) can inhibit the high mobility group AT-HOOK 2 (HMGA2). The phosphatidylinositol 3-kinase/alkaline phosphatase/glycogen synthase kinase-3 β (PI3K/Akt/GSK-3 β) signaling pathway is involved in cell proliferation. During the fracture healing process, it is unclear whether miR-98-5p can act on the PI3K/Akt/GSK-3 β pathway by activating HMGA2 to promote the proliferation of osteoblasts.

OBJECTIVE: To investigate the mechanisms of microRNA-98-5p (miR-98-5p) in promoting osteoblast proliferation and differentiation by regulating HMGA2 and PI3K/Akt/GSK-3 β pathway.

METHODS: MC3T3-E1 cells transfected with miR-98-5p mimics and HMGA2 plasmid by Lipofectamine 2000 were divided into a miR-98-5p mimics group and a HMGA2 overexpression group, respectively. MC3T3-E1 cells transfected with dimethyl sulfoxide and scrambled plasmids were divided into a mimic control group and a scramble group. Cells transiently transfected with miR-98-5p inhibitor using liposomes were as a miR-98-5p inhibitor group. Normal MC3T3-E1 cells without treatment were used as a blank control group.

RESULTS AND CONCLUSION: There were no significant differences in HMGA2, PI3K/Akt/GSK-3 β , alkaline phosphatase activity and mRNA level between the blank control group and the mimic control group. Compared with the mimic control group, the HMGA2 and PI3K/Akt/GSK-3 β protein expression, cell differentiation and proliferation, alkaline phosphatase activity and mRNA level were significantly reduced in the miR-98-5p mimics group. The interaction between miR-98-5p and HMGA2 predicted by Targetscan7.1 showed that compared with the mimic control group, the HMGA2 protein and mRNA were reduced in the miR-98-5p mimic group, while compared with the miR-98-5p mimic group, the HMGA2 protein and mRNA had an increase in the miR-98-5p inhibitor group. There were no significant differences in osteoblast proliferation, alkaline phosphatase activity and mRNA between the blank control group and the scramble group. Compared with the scramble group, the PI3K/Akt/GSK-3 β expression, cell differentiation and proliferation, alkaline phosphatase activity and mRNA in the HMGA2 overexpression group were significantly increased. To conclude, miR-98-5p can inhibit the HMGA2 and PI3K/Akt/GSK-3 β expressions in MC3T3-E1 cells, inhibit cell proliferation and differentiation. HMGA2 is possible the direct target of miR-98-5p.

Key words: osteoblasts; microRNA-98-5p; high mobility group AT-HOOK 2; phosphatidylinositol 3-kinase; protein kinase B; glycogen synthase kinase 3 β ; transfection; MC3T3-E1 cells; proliferation; differentiation

Funding: the Basic Research Plan of Qinghai Province, No. 2020-ZJ-755 (to ZF)

How to cite this article: ZHENG F, ZHANG FC, XU Z. MicroRNA-98-5p promotes osteoblast proliferation and differentiation: possibilities and mechanisms. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2021;25(26):4112-4117.

0 引言 Introduction

骨折愈合是一个复杂的动态过程，多种类型的细胞及其细胞因子参与调控这一过程^[1-2]，其中成骨细胞和破骨细胞在骨骼重塑中发挥重要作用^[3-4]。成骨细胞属于间充质细胞，可通过参与形成新的骨骼在骨折愈合的骨形成中起主要作用^[5-7]；破骨细胞则通过分泌蛋白酶参与软骨的吸收和重塑。骨折后细胞迁移、分化、组织愈合以及细胞因子和生长因子的释放等恢复过程主要取决于成骨细胞的活性^[8]。

微小RNA(MicroRNA, miRNA)是一种小的非编码RNA分子，参与增殖、迁移、分化和凋亡等多种细胞的生理病理过程^[9-11]。miR-98-5p是miRNAs家族近年来在肿瘤和骨骼重塑研究领域较为热门的成员之一，其可通过抑制高迁移率族AT HOOK蛋白2(high mobility group AT-hook 2, HMGA2)表达来促进甲状腺乳头状癌细胞凋亡，抑制细胞迁移和生长^[12]。磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/糖原合成酶激酶3 β (phosphatidylinositol 3-kinase/alkaline phosphatase/glycogen synthase kinase-3 β , PI3K/Akt/GSK-3 β)信号通路参与细胞增殖、分化、侵袭和凋亡相关的信号转导过程^[13]，而HMGA2可促进PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路激活来促进急性髓系白血病细胞的增殖^[14]。那么，在骨折愈合过程中，miR-98-5p是否通过激活HMGA2作用于PI3K/Akt/GSK-3 β 通路来促进成骨细胞的增殖，目前尚不清楚。此次实验拟探讨miR-98-5p

促进成骨细胞增殖分化的可能及其机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外观察细胞实验。

1.2 时间及地点 实验于2019年9月至2020年7月在青海省高原医学应用基础重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞 小鼠颅顶前成骨细胞亚克隆14(MC3T3-E1 subclone 14)细胞，购于上海盈湾生物科技有限公司。

1.3.2 实验使用的主要试剂 α -MEM培养基购自上海慧颖生物科技有限公司；胎牛血清购自杭州四季青公司；L-甘油磷酸酯、地塞米松、抗坏血酸均购自美国Sigma公司；Lipofectamine 2000、TRIzol试剂、TaqMan MicroRNA反转录试剂盒、荧光(RiboGreen)定量检测试剂盒均购自美国Invitrogen公司；HMGA2质粒购自湖南丰晖生物科技有限公司；二甲基亚砜、多聚甲醛和茜素红均购自海信帆生物科技有限公司；CCK-8购自上海翊圣生物科技有限公司；碱性磷酸酶活性试剂盒购自美国赛默飞世尔科技公司；RIPA裂解液购自北京普利莱基因技术有限公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 MC3T3-E1采用 α -MEM培养基(含体积分数10%胎牛血清、青霉素 1×10^5 U/L, 链霉素 1×10^5 U/L)

在无菌条件下培养, 培养箱环境为 37 °C、体积分数 5% CO₂。

1.4.2 成骨分化及转染 当 MC3T3-E1 细胞处于对数生长期时, 重悬细胞并种入 6 孔板中 (每孔约 6×10⁶ 细胞)。当细胞生长到 80% 的融合度时, 使用体积分数 10% 胎牛血清、5 mmol/L L- 甘油磷酸酯、100 nmol/L 地塞米松和 50 g/L 抗坏血酸配制的成骨诱导培养基培养 14 d。通过 Lipofectamine 2000 分别转染 50 nmol/L 的 miR-98-5p 模拟物或 50 nmol/L 的 HMGA2 质粒到 MC3T3-E1 细胞, 在 MC3T3-E1 细胞过表达 miR-98-5p 或 HMGA2, 分别为 miR-98-5p 转染组和 HMGA2 过表达组; 用二甲基亚砷处理的 MC3T3-E1 细胞或 Scramblez 乱序质粒转染至 MC3T3-E1 作为对照, 分别为转染对照组和空白质粒组。

1.4.3 细胞活力检测实验 将成骨分化诱导后的 MC3T3-E1 细胞接种到 96 孔板中 (每孔约 4×10⁴ 个细胞), 设置转染对照组、miR-98-5p 转染组及 HMGA2 过表达组, 培养 48 h 后, 用 100 μL α-MEM 培养基与 10 μL CCK-8 溶液在 37 °C 下孵育细胞 30 min, 采用荧光分光光度计检测各组 450 nm 的吸光度值, 所有组别设 5 个复孔。

1.4.4 成骨细胞增殖检测实验 将成骨分化诱导后的 MC3T3-E1 细胞接种到 96 孔板中 (每孔约 4×10⁴ 个细胞), 设置转染对照组、miR-98-5p 转染组及 HMGA2 过表达组, 培养 48 h 后, 用冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 40 g/L 多聚甲醛固定 10 min, 室温下用 50 mmol/L 茜素红 (pH 4.2) 染色 10 min, 获得图像, 测量上清液 570 nm 波长处的吸光度, 所有组别设 5 个复孔。

1.4.5 成骨细胞分化检测实验 成骨分化诱导后的 MC3T3-E1 细胞接种到 96 孔板中 (每孔约 4×10⁴ 个细胞), 设置转染对照组、miR-98-5p 转染组及 HMGA2 过表达组, 取各组细胞培养上清液, 严格按照碱性磷酸酶活性试剂盒说明书操作, 利用微板法于 520 nm 处测定碱性磷酸酶活性, 所有组别设 5 个复孔。

1.4.6 免疫印迹分析 在细胞处理结束后, 使用 RIPA 裂解液提取 MC3T3-E1 成骨分化细胞的蛋白质, 使用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒对蛋白质进行定量和变性, 将蛋白样品加入到 10% SDS-PAGE 凝胶上来分离等量的蛋白质, 结束后把蛋白电转到 PVDF 膜上, 在室温下用 5% 的脱脂牛奶封闭聚偏氟乙烯膜 1 h, 在 4 °C 下使用 0.01 mol/L PBS 稀释的一抗溶液孵育过夜, 孵育完成后用辣根过氧化物酶结合的二抗孵育, 滴加 ECL 显色液, 在暗室中使用曝光夹和胶片让蛋白条带显影, 使用 Image J 软件对蛋白条带进行定量分析, 所有组别设 5 个复孔。

1.4.7 实时荧光定量聚合酶链反应 严格按照 TRIzol 试剂说明书从处理结束后的细胞中提取总 RNA, 采用 TaqMan MicroRNA 反转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA, 合成的 cDNA 采用荧光 (RiboGreen) 定量检测试剂盒进行定量检测。蛋白激酶 B 正

义链: 5'-CCG AAT TCA TGT TGG CCT GTT CAA CT-3', 反义链: 5'-ATG TCG ACT TAG TTA TTT TCA TAA TAC CAA ATT CC-3'; HMGA2 正义链: 5'-TCC CTC TAA AGC AGC TCA AAA-3', 反义链: 5'-ACT TGT TGT GGC CAT TTC CT-3'; GAPDH 正义链: 5'-CTT TGG TAT CGT GGA AGG ACT C-3', 反义链: 5'-GTA GAG GCA GGG ATG ATG TTC T-3'。引物均由南京金斯瑞公司合成。所有组别重复检测 5 次。

1.4.8 miR-98-5p 靶点预测 采用 TargetScan7.1 在线工具 (http://www.targetscan.org/vert_71/) 预测 miR-98-5p 靶点, 物种选项选择 “Mouse”, 以 microRNA 名进行比对分析, 预测靶基因序列中 miR-98-5p 与 HMGA2 的 mRNA 3'UTR 配对位点。

1.5 主要观察指标 MC3T3-E1 细胞的增殖、分化、HMGA2 和 PI3K/Akt/GSK-3β 蛋白表达。

1.6 统计学分析 数据分析采用美国 GraphPad Software 公司 GraphPad Prism 7.0 软件。所有结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间差异比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 miR-98-5p 模拟物对 MC3T3-E1 细胞 HMGA2 和 PI3K/Akt/GSK-3β 通路的影响 为研究 miR-98-5p 在 MC3T3-E1 细胞中对 HMGA2 和 PI3K/Akt/GSK-3β 通路的影响, 采用 miR-98-5p 模拟物, 在诱导成骨细胞 MC3T3-E1 分化后, 空白对照组和转染对照组的 HMGA2 和 PI3K/Akt/GSK-3β 差异无显著变化 ($P > 0.05$), 与转染对照组相比, miR-98-5p 转染组的 HMGA2 和 PI3K/Akt/GSK-3β 蛋白显著降低 ($P < 0.05$), 见图 1。表明 miR-98-5p 可显著抑制成骨细胞 MC3T3-E1 的 HMGA2 蛋白表达, 同时抑制 PI3K/Akt/GSK-3β 通路。

2.2 miR-98-5p 模拟物可显著抑制 MC3T3-E1 细胞的增殖和分化 为探讨 miR-98-5p 对 MC3T3-E1 细胞的增殖和分化的影响, 成功构建了 miR-98-5p 转染细胞。用 CCK-8 检测细胞增殖, 空白对照组和转染对照组细胞数量差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 与转染对照组相比, miR-98-5p 转染组细胞数量显著降低 ($P < 0.05$), 见图 2。荧光显微镜下观察成骨细胞分化, 发现 0 h 和 24 h 时各组细胞分化程度差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 空白对照组和转染对照组 48 h 和 72 h 细胞分化程度差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 与转染对照组相比, miR-98-5p 转染组的分化程度显著降低 ($P < 0.05$)。空白对照组和转染对照组 MC3T3-E1 细胞的增殖差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 与转染对照组相比, miR-98-5p 转染组 MC3T3-E1 细胞的增殖明显降低 ($P < 0.05$)。空白对照组和转染对照组成骨细胞增殖标记物碱性磷酸酶活性及 mRNA 差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 与转染对照组相比, miR-98-5p 转染组碱性磷酸酶活性及 mRNA 显著降低 ($P < 0.05$)。见图 3。这些研究表明 miR-98-5p 可显著抑制成骨细胞 MC3T3-E1 的增殖和分化。

2.3 miR-98-5p 模拟物和抑制剂对 HMGA2 的靶点调控作用
TargetsCan7.1 在线工具预测了 miR-98-5p 与 HMGA2 相互作用, 结果验证了 miR-98-5p 对 HMGA2 的调控作用。与转染对照组相比, miR-98-5p 转染组的 HMGA2 蛋白和 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$), 与 miR-98-5p 抑制剂组相比, miR-98-5p 抑制剂组的 HMGA2 蛋白和 mRNA 表达显著增加 ($P < 0.05$), 见图 4。这表明 miR-98-5p 可特异性抑制 HMGA2 蛋白表达, HMGA2 是 miR-98-5p 的直接作用靶点且直接抑制 HMGA2 蛋白表达。

2.4 HMGA2 过表达可促进 MC3T3-E1 细胞 PI3K/Akt/GSK-3 β 通路
研究表明, miR-98-5p 可抑制 HMGA2 蛋白表达, 下调 PI3K/Akt/GSK-3 β 通路^[15-16], 因此有必要考察 HMGA2 对 PI3K/Akt/GSK-3 β 通路的影响。在 MC3T3-E1 细胞中过表达 HMGA2, 空白对照组和空白质粒组 PI3K/Akt/GSK-3 β 差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 与空白质粒组相比, HMGA2 过表达组的 PI3K/Akt/GSK-3 β 表达水平显著增加 ($P < 0.05$), 见图 5。这表明 miR-98-5p 通过抑制 HMGA2 来下调 PI3K/Akt/GSK-3 β 通路。

2.5 HMGA2 过表达可显著抑制 MC3T3-E1 细胞的增殖和分化
研究表明, miR-98-5p 可抑制 HMGA2 蛋白表达, HMGA2 可增强 PI3K/Akt 通路^[15], 同时还可抑制成骨细胞的增殖分化^[16]。MC3T3-E1 细胞过表达 HMGA2 可增强 PI3K/Akt/GSK-3 β 通路。为考察 HMGA2 过表达对成骨细胞增殖和分化的影响, 以荧光显微镜观察, 在 0 h 和 24 h 各组成骨细胞分化差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 空白对照组和空白质粒组 48 h 和 72 h 时成骨细胞分化接近 ($P > 0.05$), 与空白质粒组相比, HMGA2 过表达组细胞的分化程度显著升高 ($P < 0.05$)。成骨细胞增殖检测结果表明, 空白对照组和空白质粒组增殖程度差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 与空白质粒组相比, HMGA2 过表达组细胞增殖明显增加 ($P < 0.05$)。空白对照组和空白质粒组的碱性磷酸酶活性和 mRNA 差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 与空白质粒组相比, HMGA2 过表达组碱性磷酸酶活性和 mRNA 表达明显增加 ($P < 0.05$), 见图 6 和 7。

3 讨论 Discussion

骨再生是许多骨骼疾病修复过程中必不可少的步骤, 如骨折和骨质疏松症^[17]。虽然有许多研究探索了多种治疗手段来治疗这些疾病, 但疗效仍然有诸多局限性^[18]。有研究表明 miRNAs 在细胞增殖、分化和凋亡中起重要的调控作用^[19-21], 其中 miRNAs 参与调控成骨细胞分化、骨代谢和骨形成是近年来的研究热点^[22-24], 例如抑制 miR-467g 表达可显著促进新生骨的再生能力, 同时 miR-467g 可通过抑制 Runx2 信号通路来阻止新骨再生^[25]; miR-221 可通过下调 Runx2 表达抑制成骨细胞分化和骨形成^[26]。因此, miRNAs 或可成为治疗骨退行性疾病和其他异常骨形成障碍的新靶点。

PI3K/AKT 信号通路在细胞的生长、增殖和分化中起着

重要作用^[27], PI3K/AKT 通过下游 mTOR 途径促进细胞存活, 参与细胞的代谢、增殖和血管生成^[28-29]。抑制 PI3K/AKT 信号通路可逆转 Mg²⁺ 对大鼠成骨细胞的保护作用^[30], 激活 PI3K/AKT 信号通路可介导大鼠成骨细胞增殖和分化^[31]。GSK-3 β 是一种多功能丝氨酸 / 苏氨酸激酶, 最初被认为是糖原代谢的调节因子^[32], 可调节能量代谢、细胞生长和凋亡^[33], 是 PI3K/AKT 的下游底物和效应器^[34], GSK-3 β 参与了地塞米松诱导的胰腺 β 细胞凋亡^[35]。机械应力通过介导 PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路调节大鼠骨髓间充质干细胞的成骨过程^[36]。

此次研究以 MC3T3-E1 为研究对象, 经 TargetsCan7.1 在线工具预测 miR-98-5p 的靶点是 HMGA2, 进一步取 MC3T3-E1 细胞通过转染 miR-98-5p 模拟物和 HMGA2 质粒, 结果显示, 与转染对照组相比, miR-98-5p 转染组可显著抑制 HMGA2 和 PI3K/Akt/GSK-3 β 蛋白表达, 与转染对照组相比, miR-98-5p 转染组可显著抑制 MC3T3-E1 细胞的增殖, 与转染对照组相比, miR-98-5p 转染组可显著抑制碱性磷酸酶活性, 与转染对照组相比, miR-98-5p 转染组可显著抑制碱性磷酸酶 mRNA 表达。与 miR-98-5p 转染组相比, miR-98-5p 抑制剂组的 HMGA2 蛋白和 mRNA 表达显著增加。与空白质粒组相比, HMGA2 过表达组的 PI3K/Akt/GSK-3 β 表达显著增加。与空白质粒组相比, HMGA2 过表达组细胞的分化程度显著升高。与空白质粒组相比, HMGA2 过表达组可显著促进 MC3T3-E1 细胞增殖。与空白质粒组相比, HMGA2 过表达可显著增强碱性磷酸酶活性和上调碱性磷酸酶 mRNA 表达, 可见下调 miR-98-5p 可以显著增强下游 HMGA2 表达, 激活 PI3K/Akt/GSK-3 β 通路, 参与成骨细胞的增殖和分化, 即 miR-98-5p 可能通过抑制 HMGA2 及下游 PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路, 减弱成骨细胞的增殖和分化, 抑制 miR-98-5p 是促进骨折愈合的重要靶点。类似的文献也显示, 在骨折愈合过程中, miR-98-5p 可抑制被诱导的成骨细胞的分化和增殖, HMGA2 过表达可逆转 miR-98-5p 的作用, 提示 miR-98-5p 可能通过靶向 HMGA2 抑制成骨分化和成骨细胞生长来阻止骨再生^[37-38]。miR-98-5p 转染能够抑制 Hep-2 细胞的增殖, 抑制肿瘤的生长, 与 miR-98-5p 抑制 HMGA2 而抑制喉鳞癌的进程类似, miR-98-5p 可能成为喉鳞癌诊治的新靶点^[39], 但 miR-98-5p 及其调控 HMGA2 在成骨细胞增殖分化过程中调控的信号通路仍需深入研究, 例如下一步研究有必要将 miR-98-5p 及 HMGA2 共转染, 考察 miR-98-5p 对 HMGA2 蛋白表达的影响。

综上所述, miR-98-5p 可抑制 HMGA2 及 PI3K/Akt/GSK-3 β 通路, 干扰 miR-98-5p 可促进 HMGA2 蛋白表达, 增强 PI3K/Akt/GSK-3 β 通路, 参与促进成骨细胞增殖和分化的作用。此次研究为骨折愈合的研究和治疗提供了新思路。但 HMGA2 调控 PI3K/Akt/GSK-3 β 通路参与保护软骨细胞的具体作用机制仍然需要进一步研究。

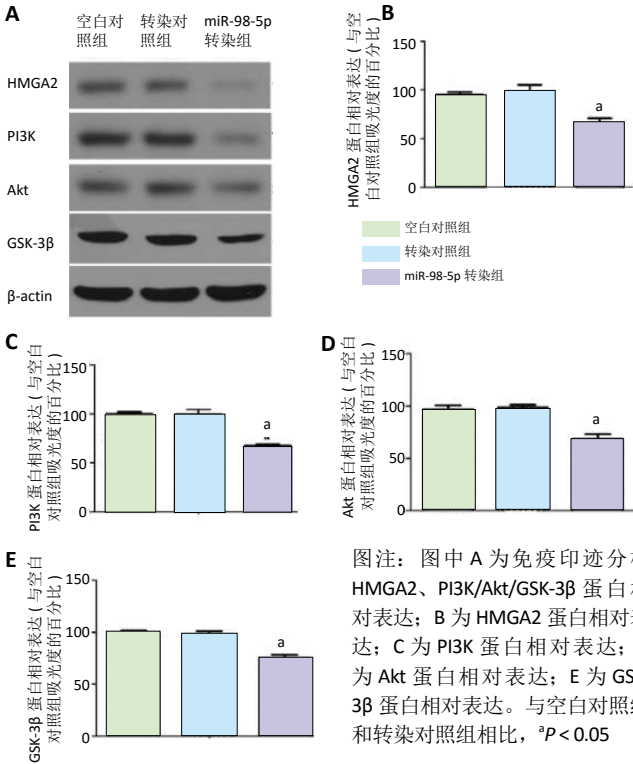
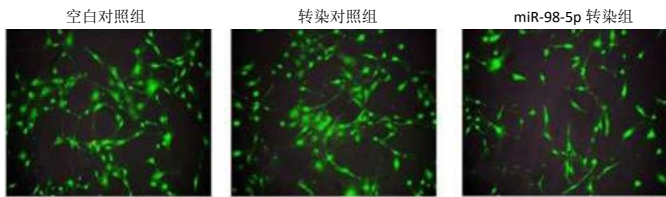


图 1 | MC3T3-E1 细胞中 miR-98-5p 对 HMGGA2 和 PI3K/Akt/GSK-3β 通路的抑制作用 (n=5)

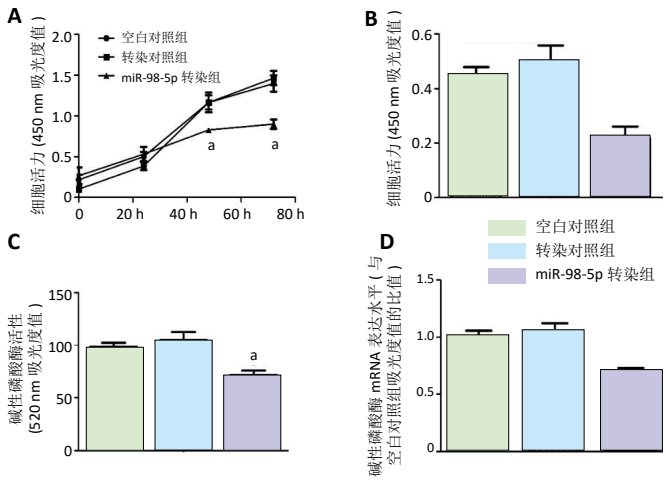
Figure 1 | Inhibitory effect of microRNA-98-5p on HMGGA2 and PI3K/Akt/GSK-3β pathways in MC3T3-E1 cells (n=5)



图注: 图中空白对照组和转染对照组细胞数量相似, 与转染对照组相比, miR-98-5p 转染组细胞数量明显减少

图 2 | miR-98-5p 对 MC3T3-E1 细胞的增殖影响 (×200)

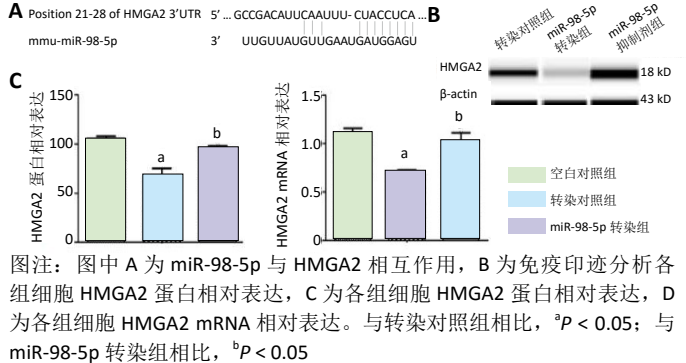
Figure 2 | Inhibitory effect of microRNA-98-5p on proliferation of MC3T3-E1 cells (×200)



图注: 图中 A 为各组细胞不同时间的细胞活力, B 为各组细胞 24 h 的细胞活力, C 为各组细胞碱性磷酸酶活性, D 为各组细胞碱性磷酸酶 mRNA 表达。与转染对照组相比, $^aP < 0.05$

图 3 | miR-98-5p 对 MC3T3-E1 细胞的增殖和分化的抑制作用 (n=5)

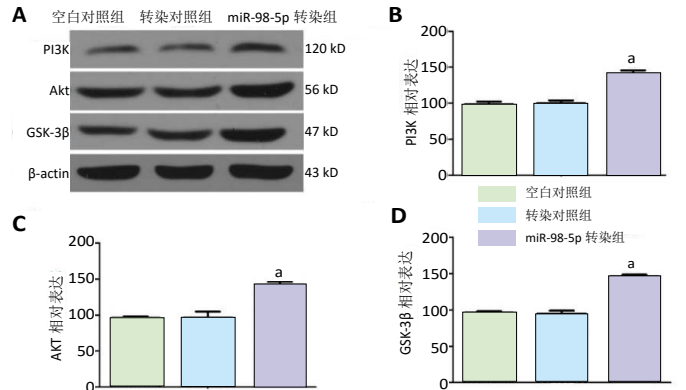
Figure 3 | Inhibitory effect of microRNA-98-5p on proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells (n=5)



图注: 图中 A 为 miR-98-5p 与 HMGGA2 相互作用, B 为免疫印迹分析各组细胞 HMGGA2 蛋白相对表达, C 为各组细胞 HMGGA2 蛋白相对表达, D 为各组细胞 HMGGA2 mRNA 相对表达。与转染对照组相比, $^aP < 0.05$; 与 miR-98-5p 转染组相比, $^bP < 0.05$

图 4 | miR-98-5p 对 HMGGA2 的 mRNA 直接调控作用 (n=5)

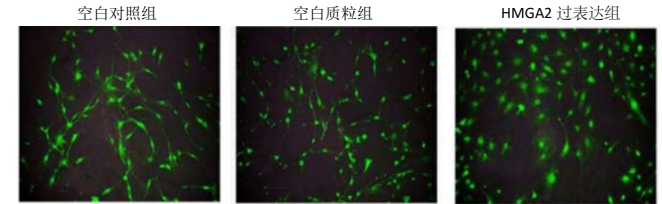
Figure 4 | Direct regulation of HMGGA2 mRNA by microRNA-98-5p (n=5)



图注: 图中 A 为免疫印迹分析 PI3K、Akt 和 GSK-3β 蛋白相对表达, B-D 分别为 PI3K、Akt 和 GSK-3β 的蛋白相对表达情况。与空白质粒组相比, $^aP < 0.05$

图 5 | HMGGA2 过表达对 MC3T3-E1 细胞 PI3K/Akt/GSK-3β 通路的促进作用 (n=5)

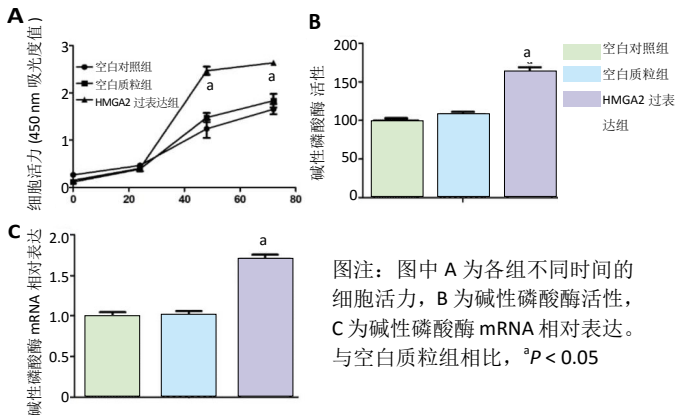
Figure 5 | Overexpression of HMGGA2 promotes the expression of PI3K/Akt/GSK-3β pathway in MC3T3-E1 cells (n=5)



图注: 图中空白对照组和空白质粒组细胞的分化程度相当, 与空白质粒组相比, HMGGA2 过表达组细胞的分化程度显著升高

图 6 | HMGGA2 过表达对 MC3T3-E1 细胞的增殖影响 (×200)

Figure 6 | Inhibitory effect of HMGGA2 overexpression on proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells (×200)



图注: 图中 A 为各组不同时间的细胞活力, B 为碱性磷酸酶活性, C 为碱性磷酸酶 mRNA 相对表达。与空白质粒组相比, $^aP < 0.05$

图 7 | HMGGA2 过表达可促进 MC3T3-E1 细胞的增殖和分化 (n=5)

Figure 7 | Overexpression of HMGGA2 can promote the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells (n=5)

作者贡献: 所有作者共同进行此次实验的设计、实施和评估。

经费支持: 该文章接受了“青海省基础科研项目(2020-ZJ-755)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

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。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] QIAO Z, GREVEN J, HORST K, et al. Fracture Healing and the Underexposed Role of Extracellular Vesicle-Based Cross Talk. *Shock*. 2018;49(5):486-496.
- [2] BERGDOLT S, KOVTUN A, HÄGELE Y, et al. Osteoblast-specific overexpression of complement receptor C5aR1 impairs fracture healing. *PLoS One*. 2017;12(6):e0179512.
- [3] SEKIGUCHI Y, MANO H, NAKATANI S, et al. Mangiferin positively regulates osteoblast differentiation and suppresses osteoclast differentiation. *Mol Med Rep*. 2017;16(2):1328-1332.
- [4] CHEN X, WANG Z, DUAN N, et al. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res*. 2018;59(2):99-107.
- [5] JIAO H, XIAO E, GRAVES DT. Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep*. 2015;13(5):327-335.
- [6] PRIDEAUX M, FINDLAY DM, ATKINS GJ. Osteocytes: The master cells in bone remodelling. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;28:24-30.
- [7] LEE WC, GUNTUR AR, LONG F, et al. Energy Metabolism of the Osteoblast: Implications for Osteoporosis. *Endocr Rev*. 2017;38(3):255-266.
- [8] GHIASI MS, CHEN J, VAZIRI A, et al. Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. *Bone Rep*. 2017;6:87-100.
- [9] PICCOLI MT, GUPTA SK, THUM T. Noncoding RNAs as regulators of cardiomyocyte proliferation and death. *J Mol Cell Cardiol*. 2015; 89(Pt A):59-67.
- [10] HAN T, WU N, WANG Y, et al. miR-16-2-3p inhibits cell proliferation and migration and induces apoptosis by targeting PDPK1 in maxillary primordium mesenchymal cells. *Int J Mol Med*. 2019;43(3):1441-1451.
- [11] ZHANG M, WANG F, ZHANG X. miRNA-627 inhibits cell proliferation and cell migration, promotes cell apoptosis in prostate cancer cells through upregulating MAP3K1, PTPRK and SRA1. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018;11(1):255-261.
- [12] QIU K, XIE Q, JIANG S, et al. miR-98-5p promotes apoptosis and inhibits migration and cell growth in papillary thyroid carcinoma through Bax/Caspase-3 by HMGA2. *J Clin Lab Anal*. 2020;34(2):e23044.
- [13] MA P, GU B, XIONG W, et al. Glimepiride promotes osteogenic differentiation in rat osteoblasts via the PI3K/Akt/eNOS pathway in a high glucose microenvironment. *PLoS One*. 2014;9(11):e112243.
- [14] MAJIDINIA M, SADEGHPOUR A, YOUSEFI B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *J Cell Physiol*. 2018;233(4): 2937-2948.
- [15] ZHU Y, XU J, LIANG W, et al. miR-98-5p Alleviated Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Renal Fibrosis via Targeting Hmga2 in Diabetic Nephropathy. *Int J Endocrinol*. 2019;2019:4946181.
- [16] YUAN H, ZHAO H, WANG J, et al. MicroRNA let-7c-5p promotes osteogenic differentiation of dental pulp stem cells by inhibiting lipopolysaccharide-induced inflammation via HMGA2/PI3K/Akt signal blockade. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2019;46(4):389-397.
- [17] HU C, ZHANG T, REN B, et al. Effect of vacuum-assisted closure combined with open bone grafting to promote rabbit bone graft vascularization. *Med Sci Monit*. 2015;21:1200-1206.
- [18] HAMMOND SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015; 87:3-14.
- [19] SOIFER HS, ROSSI JJ, SAETROM P. MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications. *Mol Ther*. 2007;15(12):2070-2079.
- [20] KROL J, LOEDIGE I, FILIPOWICZ W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. 2010;11(9): 597-610.
- [21] TANG J, ZHANG Z, JIN X, et al. miR-383 negatively regulates osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats by targeting Satb2. *Bone*. 2018;114:137-143.
- [22] ARFAT Y, BASRA MAR, SHAHZAD M, et al. miR-208a-3p Suppresses Osteoblast Differentiation and Inhibits Bone Formation by Targeting ACVR1. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018;11:323-336.
- [23] ZHANG L, TANG Y, ZHU X, et al. Overexpression of MiR-335-5p Promotes Bone Formation and Regeneration in Mice. *J Bone Miner Res*. 2017; 32(12):2466-2475.
- [24] KUREEL J, JOHN AA, DIXIT M, et al. MicroRNA-467g inhibits new bone regeneration by targeting Lhh/Runx-2 signaling. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017;85:35-43.
- [25] ZHANG Y, GAO Y, CAI L, et al. MicroRNA-221 is involved in the regulation of osteoporosis through regulates RUNX2 protein expression and osteoblast differentiation. *Am J Transl Res*. 2017;9(1):126-135.
- [26] CHEN G, DENG C, LI YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*. 2012;8(2):272-288.
- [27] BERTACCHINI J, HEIDARI N, MEDIANI L, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR network for treatment of leukemia. *Cell Mol Life Sci*. 2015; 72(12):2337-2347.
- [28] MANFREDI GI, DICITORE A, GAUDENZI G, et al. PI3K/Akt/mTOR signaling in medullary thyroid cancer: a promising molecular target for cancer therapy. *Endocrine*. 2015;48(2):363-370.
- [29] WANG J, MA XY, FENG YF, et al. Magnesium Ions Promote the Biological Behaviour of Rat Calvarial Osteoblasts by Activating the PI3K/Akt Signalling Pathway. *Biol Trace Elem Res*. 2017;179(2):284-293.
- [30] MA P, GU B, MA J, et al. Glimepiride induces proliferation and differentiation of rat osteoblasts via the PI3-kinase/Akt pathway. *Metabolism*. 2010;59(3):359-366.
- [31] PHUKAN S, BABU VS, KANNOJI A, et al. GSK3beta: role in therapeutic landscape and development of modulators. *Br J Pharmacol*. 2010; 160(1):1-19.
- [32] GUO B, ZHANG W, XU S, et al. GSK-3 β mediates dexamethasone-induced pancreatic β cell apoptosis. *Life Sci*. 2016;144:1-7.
- [33] SHARMA M, CHUANG WW, SUN Z. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt stimulates androgen pathway through GSK3beta inhibition and nuclear beta-catenin accumulation. *J Biol Chem*. 2002;277(34):30935-30941.
- [34] YAO CJ, LV Y, ZHANG CJ, et al. MicroRNA-185 inhibits the growth and proliferation of osteoblasts in fracture healing by targeting PTH gene through down-regulating Wnt/ β -catenin axis: In an animal experiment. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;501(1):55-63.
- [35] SONG F, JIANG D, WANG T, et al. Mechanical Stress Regulates Osteogenesis and Adipogenesis of Rat Mesenchymal Stem Cells through PI3K/Akt/GSK-3 β / β -Catenin Signaling Pathway. *Biomed Res Int*. 2017;2017:6027402.
- [36] ZHENG X, DAI J, ZHANG H, et al. MicroRNA-221 promotes cell proliferation, migration, and differentiation by regulation of ZFPM2 in osteoblasts. *Braz J Med Biol Res*. 2018;51(12):e7574.
- [37] ZHENG F, WANG F, XU Z. MicroRNA-98-5p prevents bone regeneration by targeting high mobility group AT-Hook 2. *Exp Ther Med*. 2019;18(4): 2660-2666.
- [38] 刘珍星, 张山锋, 杨钟华. IL-38 通过调控 PI3K/Akt/GSK3 β /NFATc1 信号通路抑制骨质疏松的机制研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2018,34(2): 251-255.
- [39] GUO Z, HE C, YANG F, et al. Long non-coding RNA-NEAT1, a sponge for miR-98-5p, promotes expression of oncogene HMGA2 in prostate cancer. *Biosci Rep*. 2019;39(9):BSR20190635.

(责任编辑: YJ, ZN, DL)