

· 综述 ·

miRNA 在骨发育和形成过程中作用的研究进展

田攀 董世武

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2010)01-0053-04

摘要: miRNA 是一类通过抑制翻译和降解 mRNA 来调控基因表达的非编码的单链 RNA, 参与细胞增殖、分化、凋亡等过程。其中一些 miRNA 作用于特定靶目标, 调节成骨细胞、破骨细胞和软骨细胞的增殖分化, 进而影响骨的新陈代谢, 参与骨的发育和形成。

关键词: MiRNA; 成骨细胞; 破骨细胞; 软骨细胞; 调节

miRNA and its roles in the bone development and formation TAN Pan, DONG Shiwu Third Military Medical University, Chongqing 400038 China

Abstract MiRNAs (mRNAs) are non-coding single-stranded RNAs that regulate gene expression via leading to translational arrest or mRNA degradation, and involved in cell proliferation, differentiation and apoptosis. Some of these miRNA bind to special target mRNA, regulating cell proliferation and differentiation of osteoblast, osteoclast and chondrocyte, and then exert an influence on bone metabolism and the whole process of bone development and bone formation.

Key words MiRNA; Osteoblast; Osteoclast; Chondrocyte; Regulation

MiRNA (mR) 是一类由 18~22 个核苷酸组成的起源于内源性转录物的单链非编码 RNA, 其首先由 RNA 聚合酶 II 转录成初级 mR, 再由核糖核苷酸酶 III 剪切, 最终由 Dicer 完成 mR 前体到成熟 mR 的转化^[1]。成熟的 mR 双链中的一条则与含 Argonautes 的 RNA 沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 形成 RISC-mRNA 复合物^[2]。mR 的主要作用是对翻译后期的基因进行调控, 根据互补原则靶向结合于 mRNA 3'端的非编码区 (3' UTR), 通过抑制靶 mRNA 的翻译或降解靶 mRNA 起作用, 从而调控靶标基因的表达^[3]。mR 在进化中高度保守, 其表达既具有时空特异性, 也具有组织和细胞特异性, 在干细胞的干性维持和分化过程中也具有重要的作用。mR 主要参与细胞增殖、分化、凋亡等过程, 涉及到动物的发育、内环境的

稳态、骨的代谢等方面。本文就 mR 在骨发育和形成过程中的作用进行综述。

1 骨新陈代谢的平衡

脊椎动物的骨骼由骨和软骨构成, 其中常见的 3 种细胞: 骨中的成骨细胞和破骨细胞, 软骨中的软骨细胞。骨的新陈代谢主要是由破骨细胞吸收旧骨和成骨细胞形成新骨的组织有效的动态平衡来维持的。成骨细胞—骨形成细胞是从多能间充质干细胞分化而来的。多能造血干细胞分化成髓样干细胞, 后者继续分化成单核巨噬细胞。破骨细胞则是由单核巨噬细胞前体融合而形成的多核破骨细胞^[4]。

2 MiRNA 对成骨细胞的调节作用

2.1 mR-125b 通过下调 ST2 细胞增殖抑制成骨细胞分化

近年有学者研究了 mR-125b 在乳腺癌细胞和神经分化中的作用, 认为 mR-125b 可调节细胞的增殖和分化^[5,6]。2005 年, Lee 等^[7]利用基因敲除技术证明 mR-125b 是调控干细胞定向分化的重要因子。在间充质干细胞成骨分化方面, 2008 年,

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (2006AA02A125); 国家自然科学基金项目 (30872636)

作者单位: 400038 重庆, 第三军医大学学员旅一队 (田攀); 第三军医大学解剖学教研室生物力学实验室 (董世武)

通讯作者: 董世武, Email: dongshiwu@163.com

Mizuno等^[8]研究了 mR-125b在间充质干细胞 ST2 分化为成骨细胞的过程中的调节作用。发现在未经骨形成蛋白 4(BMP-4)诱导的 ST2增殖过程中 mR-125b的表达逐渐增加;然而,经过骨形成蛋白 BMP4 诱导 ST2的向成骨细胞分化时,增殖过程中 mR-125b的表达是逐渐减弱的。

正常情况下当细胞增殖至互相接触时,其增殖逐渐减弱。在 Mizuno等的实验中发现,经过 BMP-4 处理后的 ST2增殖过程中即使细胞彼此接触,但细胞仍旧保持高度增殖,表明 BMP-4在 ST2细胞的增殖过程中起到了积极的作用,也表明在高密度培养的细胞中,成骨细胞的分化诱导亦可有效完成。实验证实了经过 BMP4 诱导后 ST2的增殖过程,细胞的正常增殖是通过削弱 mR-125b的作用来维持的。因此认为 mR-125b在 ST2的增殖分化过程中起着负调节作用。在进一步实验中向细胞内导入外源性 mR-125b后,碱性磷酸酶和骨钙素被抑制,表明 mR-125b的过表达抑制 ST2细胞内的成骨细胞分化。这提示 mR-125b是 ST2细胞向成骨细胞分化过程中的重要因素^[8]。但是该过程中 mR-125b作用的靶基因位点在哪里?其又是如何参与成骨分化?

通过 Targetscan 靶标数据库预测,在核心结合因子家族成员 Cb β 的 3' UTR 921-927 具有 mR-125b的结合位点,因此显示 Cb β 可能为其潜在靶基因,Cb β 无核结合位点,不能与 DNA 直接结合,但是可以增强成骨特异性转录因子 Cbfa1与 DNA 结合的能力。因此需要实验证实 mR-125b可能通过抑制 Cb β 表达,影响 Cb β 与 Cbfa1的结合,继而引起 Cbfa1的 DNA 结合能力变化,最终导致影响后序的成骨分化。

2.2 mR-26a、mR-196a 分别作用于 Smad1 和 HoxC8调节脂肪源干细胞向成骨细胞分化

Smads蛋白是在 TGF- β 家族成员的细胞内信号传导中起重要作用的转录因子,传导 I 型和 II 型丝/苏氨酸激酶受体下游的信号。BMP 在体外能通过 I 型和 II 型丝/苏氨酸激酶受体形成的异聚体发挥作用诱导成骨细胞的分化。

和骨髓一样,脂肪组织也是由中胚层衍生而来的,脂肪组织中含有多种表型的间质细胞成分,比如内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞等。已经实验证实脂肪组织中存在干细胞,即脂肪源性基质细胞(adipose-derived stromal cells, ADSCs)。众多实验表明人 ADSCs 有较高的向成骨细胞分化的潜能。最

近研究表明 mRs 在 ADSCs 的转录后水平负向调节基因的表达而影响细胞分化^[9-10]。Lewis 等^[11]利用荧光素酶报告系统在 HeLa 细胞中证实了 Smad1 是 mR-26a 可能靶基因。Luzi 等^[12]利用人 ADSCs 证实了这一结果,在未分化的人 ADSCs 中 mR-26a 几乎不表达,一旦 ADSCs 开始分化, mR-26a 的表达水平逐渐增强并在成骨细胞分化成熟时达到最高水平。同时,在低水平 mR-26a 的细胞中, Smad1 转录因子呈现高表达。在细胞终端分化中, mR-26a 高水平表达和 Smad1 表达下调同时出现。应用 2-O-甲基反义核苷酸链抑制 mR-26a 表达,显著提高 Smad1 蛋白表达。这些显示在 hADSCs 向成骨细胞分化的最终阶段, mR-26a 是一个非常必要的负向调节因子。

同源异型基因相关蛋白,例如 HoxC8 是众多动物发育过程中十分必要的转录抑制物。Kim 等^[13]在实验中发现 mR-196a 的过表达可以在蛋白质和 mRNA 水平下调 HoxC8 的表达,运用 2-O 甲基 RNA,可抑制 mR-196a 的表达,同时增强 HoxC8 表达,增强人脂肪源的间充质干细胞(human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, hASCs)的增殖增强并削弱其向成骨细胞的分化。此外在 hASCs 的成骨分化过程中 HoxC8 的表达水平下降,并伴随 mR-196a 表达水平的上调。这些都表明 HoxC8 是 mR-196a 调节 hASCs 的分子机制中的靶目标,即 mR-196a 通过与 HoxC8 的 mRNA 的 3' UTR 互补序列相结合而抑制 HoxC8 的表达,削弱 hASCs 的增殖促进其向成骨细胞的分化。

2.3 mR-133 和 mR-135 分别靶向作用于 Runx2、Smad5 抑制 C2C12 的成骨分化

Runx2 和 Smad5 是成骨分化和成骨特异基因激活过程所必需的^[14-15]。Li 等^[16]在经过 BMP-2 诱导的间充质干细胞 C2C12 中发现了 22 个下调的 mR,其中包括 mR-133 和 mR-135。Li 的实验发现 mR-133 是 Runx2 转录因子的负向调节因子,根据碱基互补配对原则, mR-133 直接与 Runx2 转录因子 mRNA 的 3-UTR 预测的结合序列结合,抑制 C2C12 细胞中 Runx2 的翻译,从而抑制 BMP-2 诱导的 C2C12 细胞成骨分化;而 mR-135 则靶向作用于 Smad5 抑制 C2C12 的成骨分化。

3 m microRNA 对破骨细胞的调节作用

巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)也称为 CSF-1,由巨噬细胞、内皮细胞和成纤维细胞产生,也可由

成骨细胞与间充质细胞产生,形成稳定的二聚体发挥功能。M-CSF主要作用于单核细胞的祖细胞。M-CSF与核因子 κ B受体激活子配体(RANKL)一起调节破骨细胞的形成,抗M-CSF抗体与抗M-CSF受体抗体均能抑制破骨细胞形成。因此M-CSF是破骨细胞分化形成过程中的重要细胞因子^[17]。

Sugatani等^[4]通过实验发现DGCR8、Dicer和Ago2是维持mR稳定所必需的因子。利用小RNA干扰沉默DGCR8、Dicer和Ago2基因表达,显示对破骨细胞转录因子表达和功能的广泛抑制,进而降低了破骨细胞分化和骨的吸收。在CD11b-cre/Dicer-null小鼠体内发现由于破骨细胞数目减少和骨吸收减少所造成的轻度骨硬化症。该实验并且发现PU.1、mR-223、NF- κ B和M-CSFR相联系的正反馈通路介导了上述结果。PU.1促进mR-223表达,mR-223表达上调使得NF- κ B的水平下降。NF- κ B的过度表达会通过降低M-CSFR的表达水平减弱破骨细胞的形成和功能。在Dicer不足的小鼠体内,骨髓巨噬细胞中M-CSFR的过表达通过上调PU.1的水平可激活破骨细胞的分化。这些结果表明mR在破骨细胞分化功能方面起着重要作用。

4 microRNA对软骨细胞的调节作用

4.1 mR-140对软骨细胞肥大过程的调节作用

脊椎动物的骨骼的形成和纵向生长主要依赖于由软骨细胞协调进行的软骨内成骨作用。组蛋白脱乙酰基酶HDACs是一类广泛调节细胞增殖分化和凋亡的转录协同抑制物,其中HDAC4特异的表达于未肥大的软骨细胞中,可能通过抑制软骨肥大过程中的中重要转录因子Runx2的活性来调节软骨细胞的肥大^[18]。Tuddenham等^[19]通过WMISH的方法发现在小鼠的胚胎发育过程中mR-140特异性在软骨组织中表达,mR-140中的序列5-GTGTTT-3与HDAC4基因的3'UTR第5000~5006的核苷酸序列结合,干扰HDAC4mRNA的翻译。因此推断mR-140可能通过抑制HDAC4的表达,消除后者对转录因子Runx2的抑制作用,进而促进软骨细胞的肥大和成骨细胞的分化。

4.2 mR-146a在骨关节炎软骨中的调节作用

骨关节炎是一种由于维持关节软骨平衡的合成和分解因子之间平衡被打乱后所引起关节软骨进行性变性的广泛流行的疾病。已有实验证明mR-146a在类风湿性关节炎的滑液中表达,因此mR-146a很有可能在骨关节炎软骨中表达^[20]。Yamasaki等^[21]

对临床骨关节炎患者的关节软骨进行了研究发现mR-146a在骨关节炎软骨的表层、中层和深层组织中均有表达并且集中表达于表层和中层,而且mR-146a在低度骨关节炎软骨中的表达尤为集中并随着软骨的进行性变性表达水平逐渐降低。同时实验还发现mR-146a在骨关节炎软骨中的表达经由炎症细胞因子IL-1诱导。当mR-146a高水平表达时,分解代谢因子MMP-13的表达水平低。因此mR-146a可能通过靶向作用于相关基因下调RAK1和TRAF6的表达水平,进而抑制诸如MMP-13等分解代谢因子,即在骨关节炎中mR-146a可能是代谢因子MMP-13的负反馈调节因子。

目前针对组织干细胞中mRNAs的研究尚处于起步阶段,还有大量的相关mRNAs有待发现,同时对已经发现的mRNAs的具体功能还需要大量的实验去研究解决。目前对mRNAs的研究主要运用下面两种方法(1)缺失/突变干细胞中mRNAs合成途径必需酶(包括Dicer1、Loqs、DGCR8、Agnate蛋白等),通过细胞特性变化来研究其功能;(2)直接筛选干细胞中的特异性mRNAs并研究其功能。对mR在成骨过程中的研究甚少,且mR调节成骨细胞、破骨细胞以及软骨细胞分化的靶向基因和具体机制尚不清楚,这需要大量实验进行研究和证实。mRNAs靶基因偏少和靶基因预测、鉴定的难度大是目前制约mRNAs研究的两大问题。进一步加深对microRNA在成骨事件中作用的研究,可以为临床治疗骨代谢病如骨质疏松症、骨硬化症以及骨愈合等提供一种新的选择和思路。

【参考文献】

- [1] Hutvagner G, McLachlan J, Pasquelli AE, et al. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001; 293(5531): 834-838
- [2] Du T, Zamore PD. MicroPrimer: the biogenesis and function of mRNA. *Development* 2005; 132(21): 4645-4652
- [3] Nakajima N, Takahashi T, Kitamura R, et al. MicroRNA-1 facilitates skeletal myogenic differentiation without affecting osteoblastic and adipogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350(4): 1006-1012
- [4] Sugatani T, Hruska KA. Impaired MicroRNA pathways diminish osteoclast differentiation and function. *J Biol Chem* 2009; 284(7): 4667-4678
- [5] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65(16): 7065-7070

- [6] Scott GK, Goga A, Bhaumik D, et al Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of microRNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem*, 2007, 282(2): 1479-1486
- [7] Lee YS, Kim HK, Chung S, et al Depletion of human microRNA miR-125b reveals that it is critical for the proliferation of differentiated cells but not for the down-regulation of putative targets during differentiation. *J Biol Chem*, 2005, 280(17): 16635-16641.
- [8] 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
- [9] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(12): 4279-4295
- [10] Oakley EJ, Vanzant G. Unraveling the complex regulation of stem cells: Implications for aging and cancer. *Leukemia*, 2007, 21(4): 612-621.
- [11] 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
- [12] 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
- [13] 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
- [14] Lian JB, Stein GS, Stein JL, et al Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord*, 2006, 7(1-2): 1-16
- [15] Javed A, Bae JS, Afzal F, et al Structural coupling of Smad and Runx2 for execution of the BMP2 osteogenic signal. *J Biol Chem*, 2008, 283(13): 8412-8422
- [16] Li Z, Hassan MQ, Volinia S, et al A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *PNAS*, 2008, 105(37): 13906-13911.
- [17] Haynes DR, Crotti TN, Zreiqat H, et al Regulation of osteoclast activity in perimplant tissues. *Biomaterials*, 2004, 25(20): 4877-4885
- [18] Cohet C. Cellular and molecular interactions regulating skeletogenesis. *J Cell Biochem*, 2005, 95(4): 688-697.
- [19] Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, et al The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS Letters*, 2006, 580(17): 4214-4217.
- [20] Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, et al Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(5): 1284-1292
- [21] Yamasaki K, Nakasa T, Miyaki S, et al Expression of microRNA-146a in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(4): 1035-1041

(收稿日期: 2009-11-11)