

miRNA 调控破骨细胞分化研究进展

韩俊 郑苏阳 郭杨 马勇*

南京中医药大学骨伤研究所, 南京中医药大学骨伤修复与重建新技术实验室, 南京 210023

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 11-1393-04

摘要: 随着 miRNA 的发现, 其生理、病理作用逐渐被认识, 在骨代谢方面, miRNA 在破骨细胞的分化中扮演重要角色, 本文将近 3 年 miRNA 与破骨细胞分化的研究进行总结, 阐述正常机体 RANK 通路中的 miRNA, 以及骨代谢疾病状态下改变的 miRNA, 探讨 miRNA 在骨质疏松症中的作用, 从细胞分子水平揭示骨质疏松症发病机制, 并讨论 miRNA 相关制剂在骨质疏松症治疗方面的应用前景。

关键词: miRNA; RANK; 破骨细胞; 骨质疏松症

Research progress in miRNA regulation of osteoclast differentiation

HAN Jun, ZHENG Suyang, GUO Yang, MA Yong

Institute of Bone Trauma, Nanjing Traditional Chinese Medicine University, Nanjing 210023, China

Corresponding author: MA Yong, Email: zhongyi-my@263.net

Abstract: With the discovery of microRNAs, their physiological and pathological role has been gradually known. In terms of bone metabolism, miRNA plays an important role in osteoclast differentiation. miRNA as a mediator in RANK pathway of osteoclast differentiation, can modulate many factors that influence the process rather than directly induce differentiation of osteoclast precursors. In this article we summarize the research about osteoclast differentiation in recent 3 years, explore miRNAs in normal RANK pathway in the body, and discuss the change of miRNAs in bone metabolic diseases to explore the role of miRNAs in osteoporosis. We reveal the pathogenesis of osteoporosis at cellular and molecular level, and discuss the application prospect of miRNA-related compounds in treatment of osteoporosis.

Key words: miRNA; RANK; Osteoclast; Osteoporosis

1 概述

骨是一个代谢活跃的器官, 整个生命周期中都在不断的进行吸收与重建。骨的吸收和重建由两个对立统一的过程所控制: 即破骨细胞 (osteoclast, OC) 介导的骨吸收和成骨细胞 (osteoblast, OB) 介导的骨基质形成过程。正常情况下两者保持动态平衡, 但随着年龄的增大, 女性绝经后雌激素的减少, 创伤, 或者其他疾病等因素, OC、OB 之间的动态平衡被破坏, 产生骨代谢性疾病, 对于以骨量减少为特征的骨质疏松症来说, 其根本原因是骨吸收大于骨形成, 近年来随着发病机制研究的不断深入, 不仅发

现多种 miRNA 如 miR-27, miR-138, miR-206 等在成骨细胞的分化, 活性上发挥重要作用^[1], 也发现多种 miRNA 参与了破骨细胞的分化, 如 miR-223, miR-21, miR-503 等等。这为阐明骨质疏松症的分子机制创造可能, 并提供了一种新的治疗方法。

2 miRNA 与破骨细胞

破骨细胞是一种大型的多核细胞, 来源于单核或巨噬细胞前体细胞, 它是体内唯一与骨吸收相关的细胞, 其功能失调可导致骨吸收不足或骨吸收增加。既往研究证实, 破骨细胞的分化受细胞因子 (M-CSF、RANKL、TNF、IL-6 等), 内分泌激素 (雌激素、降钙素、PTH 等) 和转录因子 (c-Fos、Pu. 1、NFkB、NFATc1 等) 调控^[2,4]。miRNA 是一种在细胞分化、组织发育阶段特异性表达, 主要参与基因转录后调节的内源性非编码单链小分子 RNA, miRNA 与

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473692); 康缘中医药科技创新与奖励基金项目 (HZ1004KY)

* 通讯作者: 马勇, Email: zhongyi-my@263.net

目的 mRNA 结合,导致目的 mRNA 降解或抑制翻译,从而抑制目的基因蛋白的表达^[5-6],miRNA 在多种因子调控破骨细胞分化的具体机制中都发挥了重要作用。

2.1 正常机体与破骨细胞分化相关 miRNA

正常机体在 M-CSF 与 RANKL 诱导的破骨细胞形成通路中,有多种 miRNA 参与。研究这些 miRNA 有助于我们了解正常机体对破骨细胞的调控。目前的研究人体集中在外周血单核细胞和骨髓巨噬细胞,而小鼠则以破骨前体细胞株 RAW264.7 为主。

miR-148a、miR-2、miR-31 表达增高可促进人破骨前体细胞向破骨细胞分化,Peng Cheng 等在用 M-CSF 与 RANKL 诱导 CD14 + PBMCs 向破骨细胞分化过程中,发现 miR-148a 表达明显上调。进一步研究发现 miR-148a 靶点为抑制破骨细胞分化的转录因子 MAFB,miR-148a 与 MAFBmRNA 的 3' UTR 结合,在转录后水平抑制 MAFB 翻译,从而促进破骨细胞分化^[7]。Sugatani 等发现在用 RANKL 诱导破骨细胞分化时 miR-21 表达显著上调,进一步的研究揭示了调控破骨细胞分化的 c-Fos/miR-21/PDCD4 正反馈调控环路——RANKL 介导 c-Fos 表达上调,转录因子 c-Fos 促进 miR-21 表达,而上调的 miR-21 抑制 PDCD4 基因的表达,减少的 PDCD4 减弱了对 c-Fos 的抑制,从而促进破骨细胞分化^[8]。Fumitaka Mizoguchi 等分析 RANKL 诱导骨髓巨噬细胞 (BMM) 分化过程中 miRNA 的表达变化,发现 miR-31 是上调的 miRNAs 之一。而用 miRNA 抑制剂转染 BMM,发现抑制 miR-31 表达抑制了 RANKL 诱导的破骨细胞形成和骨吸收,破骨细胞周围肌动蛋白成环被损害,被簇状小环状伪足替代,RhoA (miR-31 作用的靶点) 表达上调。而用 RhoA 的抑制剂包酶 C3 可以修复抑制 miR-31 导致的破骨细胞形成损害。从而验证了 miR-31 的靶点即是 RhoA^[9]。

miR-125a 过表达抑制人破骨细胞形成,Li-Juan Guo 等研究发现 miR-125a 在 M-CSF 和 RANKL 诱导 CD14 + PBMCs 分化破骨细胞中显著下调。实验表明 miR-125a 过表达抑制破骨细胞形成,抑制 miR-125a 表达则促进破骨细胞形成,证实 miR-125a 抑制破骨细胞形成。进一步研究发现了破骨细胞分化中的 TRAF6/NFATc1/miR-125a 轴,NFATc1 抑制 miR-125a 表达,从而削弱其对肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6)——RANKL/RANK/NFATc1 信号通路中的一种转导因子的抑制^[10]。

miR-9718 促进小鼠破骨细胞分化,Tingliu 等发现在 M-CSF 和 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞形成破骨细胞过程中 miR-9718 转录,在 RAW264.7 细胞中 miR-9718 过度表达促进 M-CSF 和 RANKL 诱导的破骨细胞形成,相对的抑制 miR-9718 表达则抑制上述过程,说明 miR-9718 促进破骨细胞分化,深入研究其机制发现,miR-9718 通过抑制 PIAS3 表达促进 NFATc1, MITF, c-Fos 和 NF- κ B 等转录因子表达,进而达到促进破骨细胞分化的作用。这一结论在体内和体外实验都得到了验证^[11]。Sugatani 等发现在 RAW264.7 中存在 miRNA-223 表达,研究发现抑制 miRNA-223 表达 RAW264.7 向破骨细胞分化受阻,这一结论在生物体和细胞水平都得到了验证,进一步研究发现破骨细胞中 PU.1—miRNA-223—NFI-A—M-CSF 正反馈环路——PU.1 促进 miRNA-223 表达从而抑制 NFI-A 表达,进而导致 M-CSF 和 PU.1 表达上调。说明 miRNA-223 在破骨细胞分化中扮演重要角色^[12]。同时其在 2007 年的研究中发现 pre-miRNA-223 的超表达抑制破骨细胞形成^[13]。表明 miRNA-223 是一种双向的调节,适度表达促进,过度表达抑制,但其复杂过程尚需研究。

miR-155、miR-7b 抑制小鼠破骨细胞分化,MANN 等研究表明诱导 RAW264.7 向破骨细胞分化时,miR-155 表达水平明显下降。进一步研究发现 miR-155 在细胞株内高表达可使靶基因 M-CSF 和 PU.1 蛋白水平明显降低,进而导致 TRAP 蛋白的水平下降,使得破骨细胞分化受到抑制,同时导致巨噬细胞分化增加,因此 miR-155 表达增高能抑制 RAW264.7 向破骨细胞分化,促进 RAW264.7 向巨噬细胞分化^[14]。而 Zhang J 等研究发现 INF- β 抑制破骨细胞分化的机制为 INF- β 诱导产生的 miR-155 能够抑制转录因子 SOCS1 和 MITF 的表达从而抑制破骨细胞的分化^[15]。表明 miR-155 的作用可能是多靶点的。Ce Dou 等通过微分析,发现在用 M-CSF 和 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞分化时 miR-7b 明显下降,研究发现 miR-7b 抑制破骨细胞分化,深入研究发现 miR-7b 靶点是 DC-STAMP,DC-STAMP 是破骨细胞形成和破骨细胞前体 (OCP) 融合的重要调节分子,miR-7b 抑制 DC-STAMP 表达抑制了其他融合基因和关键调节因子如 Nfatc1, c-Fos, Akt, Irf8, Mapk1, 和 Traf6 的表达从而调控破骨细胞形成和前体细胞融合^[16]。

转录因子 NFATc1 在 RANKL 诱导的破骨细胞分化中发挥重要作用。Youngkyun Lee 等研究发现

miR-124 通过抑制 NFATc1 的表达调控小鼠骨髓巨噬细胞向破骨细胞分化。实验证实 miR-124 的抑制剂增强 NFATc1 表达和破骨细胞分化,而促进 NFATc1 的表达会掩盖 miR-124 对破骨细胞分化的抑制效应。他们还发现 miR-124 影响破骨细胞前体细胞的增殖和活性,这与 RhoA 和 Rac1 表达减少有关^[17]。

这些研究我们可以发现,正常机体 RANK 通路启动后会通过一系列的保护机制促进破骨细胞分化,抑制不利因素达到“顺我者昌,逆我者亡”,而 miRNA 就是达到这种目的的手段。Kuo-Ting Sun 等发现引起吞噬反应和破骨细胞分化标志在 M-CSF 和 RANKL 刺激的 RAW264.7 细胞中形成的原因是低氧。他们发现在低氧微环境下 miR-20a 被显著抑制,推测这可能与低氧诱导破骨细胞分化机制有关^[18]。但 RANK 通路中究竟如何调控 miRNA 的表达尚无定论。

2.2 骨代谢疾病中表达发生改变的 miRNA

绝经后女性大多会发生骨质疏松,hsa-miR-503 可能与此相关,Chao Chen 等通过比较绝经后骨量正常妇女和骨质疏松症妇女 CD14 + PBMCs 中 miRNA 水平变化,发现在绝经后骨质疏松症患者中多种 miRNA 表达发生改变,其中 hsa-miR-503 表达下调最为明显。细胞和动物实验表明 miR-503 抑制破骨细胞分化,进一步研究 hsa-miR-503 抑制 CD14 + PBMCs 向破骨细胞分化的具体机制,发现 miR-503 抑制 RANK 蛋白表达,从而抑制破骨细胞分化^[19-20]。

miR-146a、miR-155 与风湿性关节炎(RA)相关,Tomoyuki Nakasa 等研究发现 miR-146a 在类风湿性关节炎(RA)患者的滑膜和外周血单核细胞(PBMCs)中显著表达,他们通过实验证实 miR-146a 抑制破骨细胞分化,阻止关节损伤,并提出 miR-146a 将会是治疗 RA 骨吸收新的方法^[21]。Blüml S 等发现 miR-155 在自身免疫性关节炎中发挥重要作用。他们分别在野生型和 miR-155 阴性小鼠中造胶原诱导的关节炎和 K/BxN 血清转移关节炎模型,发现 miR-155 阴性小鼠没有形成 CIA,研究发现 miR-155 涉及导致自身免疫性关节炎的先天和获得性免疫反应,影响 T 细胞从而影响破骨细胞介导的骨吸收,因此他们提出 miR-155 可能提供风湿性关节炎一个新的治疗靶点^[22]。

miR-34a、miR-33a、miR-335、miR-29a、miR-126-5p 参与调节恶性肿瘤骨转移进程,近来也有许多肿瘤与 miRNA 的相关性的研究,Jing Y. Krzeszinski 等发现 miR-34a 抑制破骨细胞形成,骨吸收和肿瘤骨

转移。他们首先发现在破骨细胞分化中 miR-34a 表达下调,进一步研究 miR-34a 作用机制,发现 miR-34a 通过抑制 Tgif2 表达抑制破骨细胞形成^[23]。Po-Lin Kuo 等发现在肺癌细胞中 miR-33a 表达下调,他们发现在人类正常支气管细胞和肺癌细胞中 miR-33a 水平与 PTHrP 表达成负相关,PTHrP 是破骨细胞骨吸收的刺激剂。进一步研究发现 miR-33a 调节 PTHrP 下调导致 IL-8 分泌减少,降低破骨细胞分化和骨吸收。他们认为 miR-33a 是有效的肿瘤骨转移抑制剂并指出 miR-33a 的下调预示着肺癌的不良预后^[24]。Meng Gong 等比较人 SCLC(小细胞肺癌)SBC-5 细胞与 SBC-3 细胞的 miRNA 表达发现,SBC-5 细胞可以在小鼠异体移植模型中骨骼种植而 SBC-3 不可以的原因与 SBC-5 细胞中 miR-335 和 miR-29a 表达减少有关,研究发现与 SBC-3 相比在 SBC-5 中 IGF-IR 和 RANKL 等骨转移的重要调节因子表达上升。进一步实验证实 SBC-5 细胞 miR-335 过表达抑制 IGF-IR 和 RANKL 的表达,这表明 miR-335 的丢失促进 IGF-IR 和 RANKL 表达从而促进 SCLC 骨转移与骨吸收^[25]。Zhipeng Wu 等发现在骨巨细胞瘤基质细胞中 miR-126-5p 明显下降,骨巨细胞瘤基质细胞中 miR-126-5p 过表达能够抑制破骨细胞分化和减少骨质溶解形成,同时发现 miR-126-5p 下调 MMP-13 水平,由此他们推测 miR-126-5p 的抑制效应与 MMP-13 下调有关^[26]。

骨折后多种 miRNA 发生变化,Shilong Wang 等观察胫骨平台骨折损伤鼠模型 SF 细胞中 7 个可能相关的 miRNA 表达情况,发现胫骨平台骨折损伤后五天 miR-9 和 miR-181a 表达下降,进一步研究发现 miR-9 和 miR-181a 抑制 Cbl 一种泛素连接酶的表达同时抑制破骨细胞活性。实验证实,抑制 miRNA 表达,泛素 Bim 的数目会上升而总 Bim 会减低,在体外抑制 miR-9 和 miR-181a 表达能够激活 RAW264.7 细胞活化能力和增加原始小鼠破骨细胞存活率。表明 miR-9 和 miR-181a 对破骨细胞和破骨细胞前体均有抑制作用^[27]。

以上在疾病机体的研究,我们可以发现病态下有多种 miRNA 调控破骨细胞分化,在骨代谢病理过程中发挥重要作用,多途径,多水平,其过程相当复杂,对其充分认识还需大量工作。

3 讨论

miRNA 调控破骨细胞分化,那么 miRNA 是否可以用来治疗骨质疏松症?骨质疏松症是以骨量减

少,骨小梁变细、断裂、数量减少,皮质骨多孔、变薄为特征,以致骨的脆性增加以及骨折危险性增加的一种全身性骨病^[28]。破骨细胞与骨质疏松关系密切,破骨细胞主导的骨吸收作用相对增强是骨质疏松的根本原因,所以从破骨细胞层面治疗骨质疏松将会是发展的方向也是从根本上治疗骨质疏松症的方法。而 miRNA 作为调控破骨细胞分化 RANK 通道的中间物质,其本身并不诱导破骨细胞前体细胞分化,但可调控影响分化的其他分子,包括多种转录因子等。形象的说 miRNA 就像是马路中心的转盘,这种中间物质的多作用将是治疗骨质疏松症可利用之处,相比现在的治疗方法,其副作用将更小,也更加有效,其治疗潜力将非常的大。长久以来相对于成骨细胞,我们对破骨细胞的研究较少,此文也只是综述列举了在破骨细胞的分化中表达发生改变的 miRNAs 及其作用,但 miRNA 在破骨细胞的增殖和凋亡的作用并不清楚,有待进一步研究。这样的研究将促进我们进一步了解和治疗骨质疏松症。

【参 考 文 献】

- [1] 姜徽,谢兴文,李宁. MicroRNA 调控成骨分化与骨质疏松症相关性研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2014,20(3):338-342+346.
- [2] Del Fattore A, Teti A, Rucci N. Osteoclast receptors and signaling [J]. Arch Biochem Biophys, 2008, 473(2):147-160.
- [3] Tanaka S, Nakamura K, Takahasi N, et al. Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL-RANK signaling system [J]. Immunol Rev, 2005, 208:30-49.
- [4] Soriano P, Montgomery C, Geske R, et al. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice [J]. Cell, 1991, 64:693-702.
- [5] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2):281-297.
- [6] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. Cell, 2009, 136(2):215-233.
- [7] Cheng P, Chen C, He HB, et al. miR-148a regulates osteoclastogenesis by targeting V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B [J]. J Bone Miner Res, 2013, 28(5):1180-90.
- [8] Sugatani T, Vacher J, Hruska KA. A microRNA expression signature of osteoclastogenesis [J]. Blood, 2011, 117(13):3648-57.
- [9] Mizoguchi F, Murakami Y, Saito T, et al. miR-31 controls osteoclast formation and bone resorption by targeting RhoA [J]. Arthritis Res Ther, 2013, 15(5):R102.
- [10] Guo LJ, Liao L, Yang L, et al. MiR-125a TNF receptor-associated factor 6 to inhibit osteoclastogenesis [J]. Exp Cell Res, 2014, 321(2):142-52.
- [11] Liu T, Qin AP, Liao B, et al. A novel microRNA regulates osteoclast differentiation via targeting protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3) [J]. Bone, 2014, 67(10):156-65.
- [12] Toshifumi Sugatani, Keith A. Hruska. Impaired Micro-RNA Pathways Diminish Osteoclast Differentiation and Function [J]. The Journal of biological chemistry, 2009, 284(7):4667-4678.
- [13] Sugatani T, Hruska KA. MicroRNA-223 is a key factor in osteoclast differentiation [J]. J Cell Biochem, 2007, 101(4):996-9.
- [14] Mann M, Barad O, Agami R, et al. miRNA-based mechanism for the commitment of multipotent progenitors to a single cellular fate [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(36):15804-15809.
- [15] Zhang J, Zhao H, Chen J, et al. Interferon- β -induced miR-155 inhibits osteoclast differentiation by targeting SOCS1 and MITF [J]. FEBS Lett, 2012, 586(19):3255-62.
- [16] Dou C, Zhang C, Kang F, et al. MiR-7b directly targets DC-STAMP causing suppression of NFATc1 and c-Fos signaling during osteoclast fusion and differentiation [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1839(11):1084-96.
- [17] Lee Y, Kim HJ, Park CK, et al. MicroRNA-124 regulates osteoclast differentiation [J]. Bone, 2013, 56(2):383-9.
- [18] Sun KT, Chen MY, Tu MG, et al. MicroRNA-20a regulates autophagy related protein-ATG16L1 in hypoxia-induced osteoclast differentiation [J]. Bone, 2014. pii: S8756-3282(14)00450-5. [Epub ahead of print]
- [19] Chen C, Cheng P, Xie H, et al. MiR-503 regulates osteoclastogenesis via targeting RANK [J]. J Bone Miner Res, 2014, 29(2):338-47.
- [20] 谢亘青. MiR-503 调控破骨细胞分化及其在绝经后骨质疏松症中作用机制 [D]. 中南大学, 2013.
- [21] Nakasa T, Shibuya H, Nagata Y, et al. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(6):1582-90.
- [22] Blüml S, Bonelli M, Niederreiter B, et al. Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice [J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(5):1281-8.
- [23] Krzeszinski JY, Wei W, Huynh H, et al. miR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgfr2 [J]. Nature, 2014, 512(7515):431-5.
- [24] Po-Lin Kuo, Szi-Hui Liao, Jen-Yu Hung, et al. MicroRNA-33a functions as a bone metastasis suppressor in lung cancer by targeting parathyroid hormone related protein [J]. Biochimica. Biophysica. Acta 2013, 1830(6):3756-66.
- [25] Gong M, Ma J, Guillemette R, et al. MiR-335 Inhibits Small Cell Lung Cancer Bone Metastases via IGF-IR and RANKL Pathways [J]. Molecular Cancer Research 2014, 12(1):101-10.
- [26] Zhipeng Wu, Huabin Yin, Tielong Liu, et al. MiR-126-5p regulates osteoclast differentiation and bone resorption in giant cell tumor through inhibition of MMP-13 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 443(3):944-949.
- [27] Wang S, Tang C, Zhang Q, et al. Reduced miR-9 and miR-181a expression down-regulates Bim concentration and promote osteoclasts survival [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(5):2209-2218.
- [28] 胥少汀,葛宝丰,徐印坎主编. 实用骨科学 [M]. 第4版,北京:人民军医出版社,2012:1517-1529.

(收稿日期:2015-03-14)