

· 论 著 ·

葛根素对成骨细胞中 miRNA-204 的调控及其与 Runx2 基因表达的关系

张莹莹 周建斌 赵凤鸣 詹秀琴*

南京中医药大学基础医学院生物教研室, 江苏 南京 210023

中图分类号: R31 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 06-0677-06

摘要: **目的** 研究葛根素作用于成骨细胞 MC3T3-E1 后 miRNA 表达的变化以及与 Runx2 基因表达的关系。**方法** RT-PCR 和 western blot 法检测 Runx2 的 mRNA 表达水平和蛋白表达水平; miRNA 表达谱检测葛根素作用于成骨细胞后可能靶向 Runx2 的 miRNA; Target Scan、PicTar 等靶点预测软件预测靶向 Runx2 的 miRNA; RT-PCR 测定 miRNA-204 表达量; 构建 Runx2 3' UTR/突变型 Runx2 3' UTR 重组质粒、合成 miRNA-204 mimics 和 miRNA-204 NC 共转染 MC3T3-E1 细胞, 双荧光素酶报告基因系统验证靶基因; miRNA-204 mimics 和 miRNA-204 inhibitor 转染 MC3T3-E1 细胞, RT-PCR 和 western blot 检测转染前后 Runx2 的 mRNA 表达量和蛋白表达量的变化。**结果** 与空白组比较葛根素作用后 Runx2 的 miRNA 和蛋白表达均上升; miRNA-204 表达水平下降; 表达谱和靶点预测软件预测靶向 Runx2 的 miRNA 共同有 miR-204、miR-3072-3p 等; 过表达 miRNA-204 后 Runx2 的蛋白表达水平下降, 干扰 miRNA-204 表达后 Runx2 的蛋白水平上升。**结论** 葛根素在成骨细胞中可通过调节靶向 Runx2 基因的 miRNA-204 来促进细胞增值分化。

关键词: 成骨细胞; 葛根素; Runx2; miRNA-204; 靶基因; 转染; 过表达; 干扰

The effect of puerarin on the regulation of miRNA-204 and the expression of Runx2 gene in osteoblasts

ZHANG Yingying, ZHOU Jianbin, ZHAO Fengming, ZHAN Xiuqin

Biology Teaching and Researching Section, Basic Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Corresponding author: ZHAN Xiuqin, Email: xqzhan14@sina.com

Abstract: **Objective** To study the effect of puerarin on expression of miRNA and the relationship with the Runx2 expression level in MC3T3-E1 osteoblasts. **Methods** The mRNA and protein expression levels of Runx2 were detected using real-time quantitative PCR and Western blotting. The miRNAs which may target to Runx2 was detected using miRNA expression spectrum after addition of puerarin in osteoblasts. Target Scan and PicTar software were used to predict miRNAs which may target to Runx2. The expression level of miRNA-204 was detected using real-time quantitative PCR. The RhoE 3' UTR vector and RhoE mut 3' UTR vector were constructed. miRNA-204 mimics and miRNA-204 NC were synthesized. The target gene was verified with dual luciferase report gene assay. After transfecting the MC3T3-E1 cells with miRNA-204 mimics and miRNA-204 inhibitor, the mRNA and protein expression levels of Runx2 were detected using real-time quantitative PCR and Western blotting. **Results** Comparing to those in blank control, the mRNA and protein expression level of Runx2 increased, but the expression of miRNA-204 decreased after addition of puerarin. miRNAs which may target to Runx2 were miR-204 and miR-3072-3p, as both predicted by miRNA expression spectrum and target predicted software. After transfection of the miRNA-204 mimics, the protein expression level of Runx2 increased. The expression decreased after transfection of the miRNA-204 inhibitor. **Conclusion** Puerarin promotes cell proliferation and differentiation by regulation of miRNA-204 which targets to Runx2.

Key words: Osteoblasts; Puerarin; Runx2; miRNA-204; Target gene; Transfection; Overexpression; Interference

基金项目: 江苏省科技厅项目(BK20131417)

* 通讯作者: 詹秀琴, Email: xqzhan14@sina.com

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种因骨量低下、骨微结构破坏,导致骨脆性增加、易发生骨折为特征的全身性骨病(世界卫生组织,WHO)^[1],是由

于成骨细胞(OB)形成的新骨量少于被破骨细胞(OC)吸收的旧骨量,骨代谢从而发生负平衡,导致骨总量丢失所致。Runx2是骨发育过程中激活与启动骨髓基质干细胞(BMSCs)向OB分化并调节OB成熟的重要转录因子,上调多种成骨相关基因的表达,对膜内和软骨内骨化成骨均有控制作用,因此,其表达、活性下降与OP发病密切相关。miRNA是一类机体内源性表达的、长度在18到25个核苷酸的非编码小分子RNA,这些仅占人类基因1%的miRNA分子,却可控制人类三分之一以上基因的表达、修饰、转录和翻译过程。它能够在转录后调节基因表达,从而影响多种生物学过程,包括细胞的增殖^[2]、分化^[3]、凋亡^[4]、发育^[5]。miRNA的发现可能成为极有应用价值的分子标志物,为骨质疏松症的治疗提供新的靶标。我们以前的研究发现,葛根素可促进成骨细胞增殖和分化,但其机制是否与细胞内的Runx2和miRNA分子有关,且二者之间是否有关联,是本文要研究的问题。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞:MC3T3-E1细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 药物:葛根素标准品:购自中国药品生物制品检定所,20 mg/支,纯度为96.0%,性状:白色粉末,干燥密封保存。

1.1.3 试剂: α -MEM培养基(维森特生物技术有限公司,货号:310010008);含EDTA的25%胰蛋白酶(GIBCO, USA);胎牛血清(GIBCO, USA);miRNA逆转试剂盒(Takara 036A);Trizol(Invitrogen, USA);Realtime PCR SYBR premix 2 $\times$ (Takara RR420A, Japan);目的基因一抗(rabbit Runx2)(Cell Signaling Technology);内参一抗(rabbit β -actin)(Cell Signaling Technology);二抗(Anti-Rabbit IgG HRP)(Cell Signaling Technology);Trizol(RNAiso for Small RNA)(Takara);miRNA反转录试剂盒(VaZyme公司);Lipofectamine TM2000(Invitrogen, USA);miRNA所有相关引物由上海生物工程有限公司合成;野生型Runx2 3' UTR/突变型Runx2 3' UTR重组质粒、miRNA-204 mimics及阴性对照由上海吉马公司合成;miRNA-204扩增采用茎环引物;Runx2和 β -actin PCR扩增引物由南京金斯瑞公司合成。

1.1.4 主要仪器:二氧化碳细胞培养箱(SANYO, Japan);相差倒置显微镜(Olympus, Japan);光镜

(Motic);低温高速冷冻离心机(Eppendorf, USA);荧光实时定量PCR仪(Agilent Technologies Mx3000P);紫外分光光度计(BioDrop, USA);凝胶成像仪(Bio-Rad, USA 型号: GelDoc2000);酶标仪(BioTek, USA);常温 mini 离心机(Eppendorf, USA);6孔、24孔、96孔细胞培养板(Corning, USA)。

1.2 实验方法

1.2.1 荧光实时定量PCR检测Runx2转录水平:按 1×10^5 密度在六孔板里接种MC3T3-E1细胞,用含胎牛血清的 α -MEM培养液进行培养,设置葛根素处理组和空白对照组,在葛根素组细胞中加入终浓度为0.01 mg/mL的葛根素,将两组细胞置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养72 h。使用Trizol法对细胞进行总RNA的提取,用核酸蛋白分析仪测其浓度和纯度。使用mRNA逆转试剂盒(Takara 036A)逆转录,反应体系参考说明书。荧光实时定量PCR反应体系为:cDNA样品2 μL , Realtime PCR SYBR premix 2 $\times$ 12.5 μL ,上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各0.5 μL , Runx2 Forward: CGGACGAGGCAAGAGTTTCA, Reverse: GGATGAGGAATGCGCCCTAA, 扩增片段长度为192bp; β -actin Forward: GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG, Reverse: ATGCCACAGGATTCCATACC, 扩增片段长度为174bp。加蒸馏水补充至25 μL 。每组设置三个复孔。PCR的反应采用二步法:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 预变性, (95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s,) $\times$ 40个循环,做熔解曲线分析。

1.2.2 Western blot检测蛋白表达水平:按全蛋白抽提试剂盒说明书提取处理72h后的各组细胞总蛋白,并用BCA法进行蛋白定量, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。取各组样本25 μg 进行SDS-PAGE聚丙烯酰胺凝胶电泳,将分离后的蛋白质电转移到PDVF膜上,放入少量封闭液,室温下,摇床上封闭1 h。TBST漂洗滤膜3次,每次5 min。按约0.1 mL/ cm^2 的量加入一抗抗体和封闭液(1:1000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后, TBST漂洗滤膜3次,每次5 min。将膜与HRP结合的二抗(二抗用封闭液稀释1:3000), 室温下摇荡孵育1 h, TBST漂洗滤膜3次,每次5 min。配制显色液:按0.1 mL/ cm^2 显影液计算用量,在正面加混匀的显色液,放入凝胶成像仪中显影,调整曝光时间,直至出现最佳条带。

1.2.3 microRNA表达谱检测:利用microRNA表达谱检测葛根素作用于成骨细胞72h后发生变化的可能靶向Runx2的miRNA(实验过程由康成生物公司完成)。

1.2.4 软件预测靶向 Runx2 的 miRNA: 采用 miRNA 靶基因预测软件 TargetScan、PicTar、miRBase 和 miRDB 进行预测,找出可能靶向 Runx2 的 miRNA。同时,将软件预测的 miRNA 与表达谱测定结果进行比对,确定靶向 Runx2 的 miRNA。

1.2.5 PCR 验证葛根素作用后靶向 Runx2 的 miRNA 变化: 细胞培养方法及葛根素作用时间同前,miRNA 用 Trizol(RNAiso for Small RNA)提取,方法同普通 RNA 提取。逆转录反应体系:5 × Reverse Transcription Mix 10.0 μL、Stem-loop 反转录引物 1.0 μL、miRNA 500 ng、hiscript Enzyme Mix 2.0 μL、加 RNA free H₂O 至总体积 20 μL。反应条件为:25℃,5 min;45℃,50 min;85℃,5 min;4℃,反应结束后,将其放入 -20℃ 保存。

引物序列:miRNA-204 RT Primer:

GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-

TCGCACTGGATACGACAGGCAT, Reverse: ATC-CAGTGCAGGGTCCGAGG; U6 RT Primer: AACGCTTCACGAATTTGCGT, Forward: CTCGCTTCGGCAG-CACA, Reverse: AACGCTTCACGAATTTGCGT。

Real-time PCR 检测反应体系条件方法同前。

1.2.6 构建重组质粒: 先合成不含有 Runx2 基因的空载体(载体序列结构见图),将空载体(图 1)进行单酶切,酶切位点是 XbaI,酶切后分别插入野生型 Runx2 3' UTR 和突变型 Runx2 3' UTR,组合成重组质粒。Runx2 WT 3' UTR 序列为: ttctatgcacgtattgtacaaattgtgctttgtgccacaggtcatgatcggtgatgatgtttactctgaacttcaaagggaactattgtattgtatgttgcaactgtaattgaattatttggcatttccccctctcatgattgtaatt; Runx2 MT 3' UTR: ttctatgcacgtattgtacaaattgtgctttgtgccacaggtcatgatcggtgatgatgtttactctgaacttcaaactcactattgtattgtatgttgcaactgtaattgaattatttggcatttccccctctcatgattgtaatt。

1.2.7 双荧光素酶报告基因法验证靶基因: 取对数生长期细胞 MC3T3-E1,以每孔 2×10^4 细胞种于 24 孔培养板中,充分混匀,置于 37℃ 培养箱培养 24 h。当融合度接近 90% 时进行转染。取 1.5 mL EP 管 4 个,均加入无血清双抗的 α-MEM 培养液(按 50 μL/孔)和 Lipofectamine 2000 脂质体(按 1 μL/孔),使其充分混匀,静置 5 min。向新的 EP 管中加入无血清双抗的 α-MEM 培养液(按 50 μL/孔)和 Runx2 3' UTR/突变型 Runx2 3' UTR 重组质粒(100 ng/孔)、miRNA mimics/阴性对照 NC(2 μM/孔),并充分混匀,共分成四组,即 Runx2 3' UTR + miRNA mimics、Runx2 3' UTR + miRNA NC、Runx2mut3'

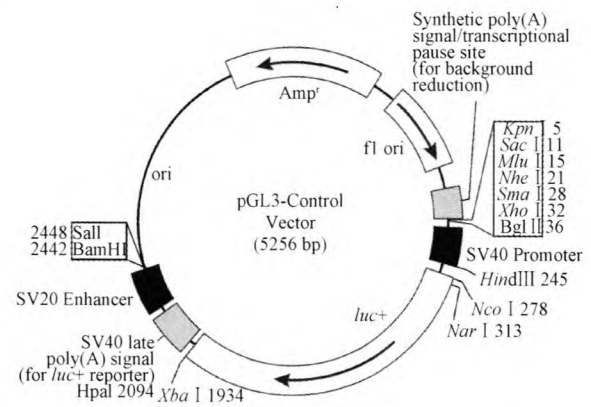


图 1 空载体结构

Fig.1 Structure of empty vector

UTR + miRNA mimics、Runx2mut3' UTR + miRNA NC。将混有脂质体的 α-MEM 培养液和上述四组 α-MEM 培养液分别相混合(100 μL/孔),并充分混匀,室温下静置 20 min,分别加到 24 孔培养板相应的实验组中(每组设定三个复孔),混匀放置于 37℃ CO₂ 培养箱中培养 48 h。

每孔用 1 × PBS 轻柔洗涤 1 次,每孔加 1 × PLB(裂解液),反复吹打,冻融 3 次,以充分裂解细胞。13000 × g,4℃ 离心 15 s,取上清。用荧光检测仪中进行测定,设置 2 s 的预测延迟和 10 s 的测定用时,在测量管中加入 5 μL 样本充分混匀 10 s,再加入 100 μL Luciferase Reporter Assay Reagent II(LAR II,萤火虫荧光素酶底物)测定萤火虫荧光 1,而后加入 100 μL Stop&Glo © substrate(海肾荧光素酶底物)测定海肾荧光 2。以荧光 1/荧光 2 的值作为相对荧光素酶活性。

1.2.8 miRNA-204 基因的过表达和干扰: 在 6 孔培养板中每孔接种 1×10^5 细胞,充分混匀,置于 37℃ 培养箱培养 24 h,当融合度接近 90% 时进行转染。取 1.5 mL EP 管 4 个,均加入无血清双抗的 α-MEM 培养液(按 200 μL/孔)和 Lipofectamine 2000 脂质体(按 4 μL/孔),使其充分混匀,静置 5 min。向新的 EP 管中加入无血清双抗的 α-MEM 培养液(按 200 μL/孔)和 miRNA mimics 或 miRNA inhibitor 或阴性对照 NC(8 μM/孔),并充分混匀,共分成 3 组,将混有脂质体的 α-MEM 培养液和上述两组 α-MEM 培养液分别相混合(400 μL/孔),并充分混匀,室温下静置 20 min,分别加到 6 孔培养板相应的实验组中,分别为加等量 Lipofectamine 2000 脂质体孔,加入 miRNA mimics 组、miRNA inhibitor 和阴性对照 NC 组,混匀放置于 37℃ CO₂ 培养箱中培养 48 h。

1.3 统计学处理

实验数据利用 GraphPad Prism5 软件进行数据统计,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组之间采用 *t* 检验,多组之间采用单因素方差分析,所有统计以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 葛根素对成骨细胞 MC3T3-E1 Runx2 mRNA 表达水平的影响

葛根素作用 72h 后,Runx2 mRNA 表达量与空白对照组比较具有显著性差异,上升了 1.47 倍。见图 2。

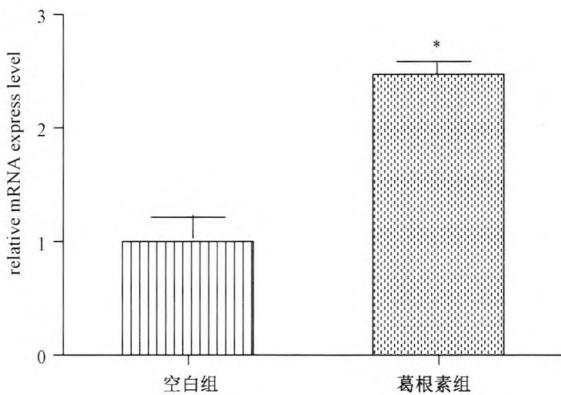


图 2 葛根素作用前后 Runx2 mRNA 表达水平 (* $P < 0.05$)

Fig. 2 The mRNA expression level of Runx2 before and after the addition of puerarin

2.2 葛根素对成骨细胞 MC3T3-E1 Runx2 蛋白表达水平的影响

同空白组相比,葛根素作用后 Runx2 的蛋白水平上升。见图 3。

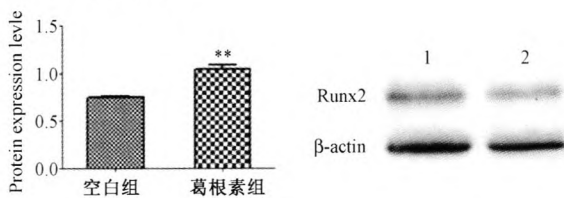


图 3 葛根素作用前后 Runx2 蛋白的比值

Fig. 3 The protein ratio of Runx2 before and after the addition of puerarin

1. Puerarin group 2. Blank control group

2.3 靶向 Runx2 的 miRNA 预测结果

综合利用 TargetScan、PicTar、miRBase 和 miRDB 这四个软件预测结果显示靶向 Runx2 的 miRNA 有 miR-204、miR-128、miR-135b-5p、miR-3072-3p、miR-

2861、miR-770-5p。microRNA 表达谱检测结果显示 miR-204、miR-3072-3p、miR-2861 等 119 个 microRNA 葛根素作用前后发生变化。其中共同交集有 miR-204、miR-3072-3p 等 4 个,我们选择 miR-204 作为研究对象验证靶基因预测的正确性。

序列 (5' TO 3') mmu-miR-204 mimics: UUUUUUUUGUCAUCCUAUGCCU; mmu-miR-204 Inhibitor: AGGCAUAGGAUGACAAAGGGAA; mmu-miR-204NC: GCGACGAUCUGCCUAAGAU。

2.4 葛根素作用后 miRNA-204 表达量的变化

荧光实时定量 PCR 结果显示(图 4),葛根素作用后 miRNA-204 在成骨细胞中的表达显著低于空白对照组,表达差异有显著的统计学意义 ($P < 0.05$)。初步说明了 Runx2 可能为 miRNA-204 的靶基因。

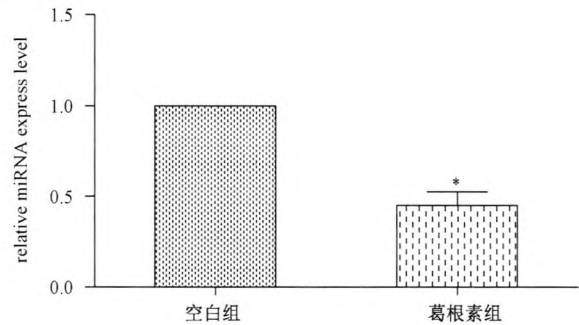


图 4 miRNA-204 表达水平 (* $P < 0.05$)

Fig. 4 The expression level of miRNA-204

2.5 双荧光素酶报告基因法结果

双荧光素酶报告基因法结果显示(图 5),细胞转染 48 h 后,只有 Runx2 3' UTR + miRNA-204 mimics 组荧光素蛋白的表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

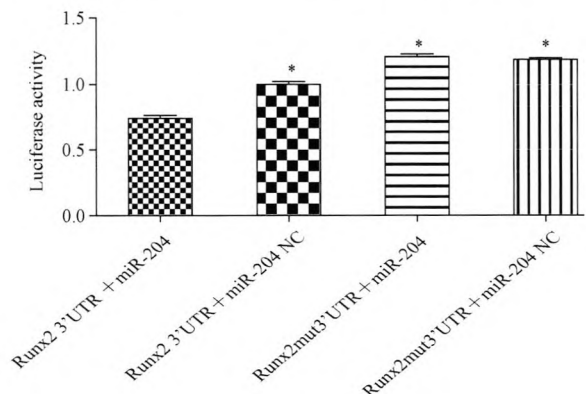


图 5 miRNA-204 对 Runx2 3' UTR 表达的影响 (* $P < 0.05$)

Fig. 5 Effect of miRNA-204 on expression of Runx2 3' UTR

0.05),说明只有 miRNA-204 可抑制 Runx2 3' UTR 报告基因的表达,miRNA-204 + Runx2mut3' UTR 组、miRNA-204NC + Runx2 3' UTR 组和 miRNA-204NC + Runx2mut3' UTR 组荧光素蛋白的表达水平均变化不显著($P > 0.05$),表明了 Runx2 为 miRNA-204 的靶基因。

2.6 过表达或干扰 miRNA-204 对 Runx2 蛋白表达的影响

与空白对照组相比,转染试剂组 Runx2 蛋白表

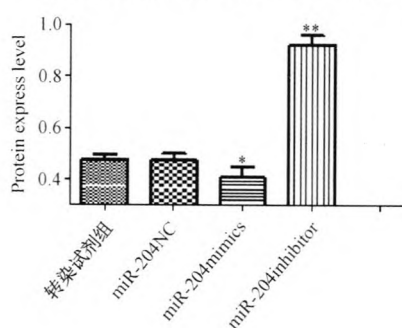


图6 过表达或干扰 miRNA-204 后 Runx2 蛋白表达的水平(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

1 转染试剂组 2 NC 对照组 3 miR-204mimics 组 4 miR-204inhibitor 组

Fig.6 The protein level of Runx2 after overexpression or interference of miRNA-204

1, Transfection reagent group; 2, NC control group; 3, miR-204mimics group; 4, miR-204inhibitor group



2.7 过表达或干扰 miRNA-204 对 Runx2 mRNA 表达的影响

与转染试剂组相比,miRNA-204 过表达以及干扰表达后 Runx2 mRNA 表达水平均没有明显差异,说明 miRNA-204 对 Runx2 mRNA 表达没有明显作用,不参与 Runx2 的转录过程,而参与翻译调节。

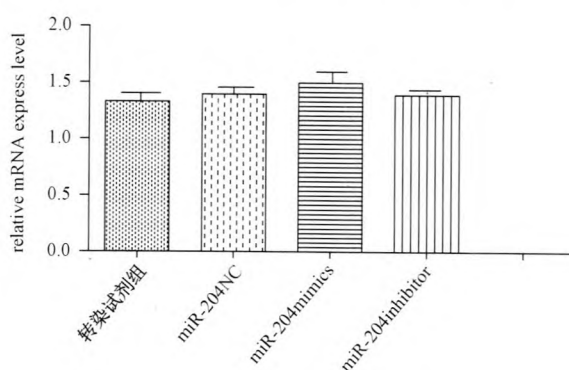


图7 过表达或干扰 miRNA-204 后

Runx2 mRNA 表达的水平

Fig.7 The mRNA level of Runx2 after overexpression or interference of miRNA-204

3 讨论

Runx2 的表达是成骨细胞分化的开始,它使骨髓基质干细胞只发育成成骨细胞或软骨细胞^[6],因此是骨形成过程中最早和最具特征性的标志^[7],Runx2 亦是骨发育过程中激活与启动骨髓基质干细胞向成骨细胞分化并调节成骨细胞成熟的重要转录因子,它能上调多种成骨相关基因的表达,对膜内和软骨内骨化成骨均有控制作用,参与正常骨骼发育的全过程,对防治骨质疏松症具有重要意义。

miRNA 是细胞内的一类小分子 RNA,能够在转录后调节基因表达,从而影响多种生物学过程,包括细胞的增殖、分化、凋亡、发育。它的发现可能成为极有应用价值的分子标志物,为骨质疏松症的治疗提供新的靶标。

前期研究发现葛根素能促进成骨细胞增殖与分化,对骨量保持具有正向意义从而达到防治骨质疏松的目的^[8,9]。本实验表明,葛根素作用于成骨细胞后,能上调成骨细胞 Runx2 的表达,同时,miRNA 表达谱也有很大的改变,推测葛根素对 Runx2 蛋白表达的影响可能与 miRNA 有关。

Wang 等^[10] 体外实验表明, miR-204 负调节 Runx2 抑制成骨分化, 从而抑制成骨细胞相关基因的表达, 包括碱性磷酸酶 (ALP)、骨钙素, 这些都是由 BMP-2 诱导产生的。Huang 等^[11] 也发现, miR-204 作为重要的内源性衰减器负调控 Runx2, 抑制间充质祖细胞系和骨髓间充质干细胞中骨生成和促进脂肪生成。说明 Runx2 可作为 MiR-204 的直接靶标^[12]。

我们的实验表明, miRNA 表达谱和 PCR 结果都发现葛根素作用后 miRNA-204 表达下降, 说明了 Runx2 和 MiR-204 的表达呈负相关。我们采用生物信息学分析发现, miR-204 能与 Runx2 的 3' 非翻译区特异性结合从而抑制其翻译。

为进一步验证 miR-204 和 Runx2 之间的关系, 我们构建了 Runx2 3' UTR 和突变型 Runx2 3' UTR 的表达载体, 采用荧光素酶报告基因法证实了 Runx2 是 miRNA-204 的靶基因, 而且, 过表达 miRNA-204 可使 Runx2 蛋白表达下降, 干扰 miRNA-204 则使 Runx2 蛋白表达上升, 这些结果都说明在成骨细胞中, miRNA-204 直接抑制 Runx2 表达, Runx2 可作为 miRNA-204 的直接靶标。葛根素可通过下调 miRNA-204 来促进 Runx2 表达、促进成骨细胞增殖和分化, 实现预防和治疗骨质疏松症的作用。

【参 考 文 献】

- [1] Hosking SM, Dobbin AG, Ju LA. Knowledge change regarding osteoporosis prevention; translating recommended guidelines into user-friendly messages within a community forum. BMC Research Notes, 2015, 8(1):1-5.
- [2] Wang Y, Zou XQ, Guo Y, et al. Mechanical strain affects some microRNA profiles in pre-osteoblasts. Cellular & Molecular Biology Letters, 2015, 20(4):586-596.
- [3] Jin T, Lu Y, He QX, et al. The Role of MicroRNA, miR-24, and Its Target CHI3L1 in Osteomyelitis Caused by Staphylococcus aureus. Journal of Cellular Biochemistry, 2015, 116(12):2804-2813.
- [4] Xu B, Huang YQ, Niu XB, et al. Hsa-miR-146a-5p modulates androgen-independent prostate cancer cell apoptosis by targeting ROCK1. The Prostate, 2015, 75(16):1896-1903.
- [5] Ambros V, Bartel B, Bartel DP, et al. A uniform system for microRNA annotation[J]. RNA, 2003, 9(3):277-279.
- [6] Zhang K, Wang CY, Chen YX, et al. Preservation of high-fat diet-induced femoral trabecular bone loss through genetic target of TNF-alpha[J]. Endocrine, 2015, 50(1):239-249.
- [7] Fu SP, Yang L, Hong H, et al. Icarin promoted osteogenic differentiation of SD rat bone marrow mesenchymal stem cells; an experimental study. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 2015, 35(7):839-848.
- [8] 董必晨, 詹秀琴, 孙玉明. 葛根素对于体外培养成骨细胞 OPG-RANKL 基因系统表达的影响[J]. 吉林中医药, 2012, 32(4):388-390.
- 董必晨, 詹秀琴, 孙玉明. 葛根素对成骨细胞 OPG/RANKL 系统的影响[J]. 吉林中医药, 2012, 32(4):388-390. (in Chinese)
- [9] 钱康琦, 詹秀琴, 孙玉明. 蛋白免疫印迹杂交法研究葛根素对成骨细胞 TGF-β1 及 Smad2/3 蛋白表达的影响[J]. 长春中医药大学学报, 2013, 29(1):18-20.
- 钱康琦, 詹秀琴, 孙玉明. 葛根素对成骨细胞 TGF-β1 及 Smad2/3 蛋白表达的影响[J]. 长春中医药大学学报, 2013, 29(1):18-20. (in Chinese)
- [10] Wang Y, Chen S, Deng C, et al. MicroRNA-204 targets Runx2 to attenuate BMP-2-induced osteoblast differentiation of human aortic valve interstitial cells[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2015, 66(1):63-71.
- [11] Huang J, Zhao L, Xing L, et al. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. [J]. Stem Cells, 2010, 28(2):357-364.
- [12] Cui RR, Li SJ, Liu LJ, et al. MicroRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo [J]. Cardiovasc Res, 2012, 96(2):320-329.

(收稿日期: 2015-11-25, 修回日期: 2016-02-06)