

# miR-181a调控骨髓间充质干细胞中OPG水平及对破骨细胞活性的影响

高 敬<sup>1,2,3</sup> 邵秉一<sup>1,2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>重庆医科大学附属口腔医院牙体牙髓科, 重庆 401147; <sup>2</sup>口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆 401147; <sup>3</sup>重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室, 重庆 401147)

**摘要** 该研究预测并验证骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)中miR-181a对靶分子骨保护素(osteoprotegerin, *OPG*) mRNA水平的调控作用, 探讨其在骨质疏松发病过程中对破骨细胞活性的影响。通过生物信息学预测miR-181a可能调控的靶基因*OPG*, 构建含miR-181a结合位点的*OPG* mRNA 3'UTR(3' untranslated regions)荧光素酶报告载体。通过双荧光素酶载体系统检测miR-181a与*OPG* mRNA 3'UTR相互作用对荧光素酶活性的影响; 转染miR-181a进入BMMSCs并与破骨细胞共培养, TRAP(tartrate resistant acid phosphatase)染色检测共培养体系中破骨细胞数目的改变。结果表明, 双荧光素酶报告提示, miR-181a的靶分子为*OPG* mRNA, 上调miR-181a(mimics组)水平后, 破骨细胞数目较对照组显著增多( $P<0.05$ ); 下调miR-181a(inhibitor组)水平后, 破骨细胞数目较对照组显著降低( $P<0.05$ )。研究结果显示, miR-181a可以负调控OPG的蛋白水平, 进而影响破骨细胞活性。

**关键词** miR-181a; 骨髓间充质干细胞; 破骨细胞

## miR-181a Regulates the Levels of OPG Protein and Its Effect on the Survival of Osteoclast

Gao Jing<sup>1,2,3</sup>, Shao Bingyi<sup>1,2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Endodontics, Affiliated Stomatological Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 401147, China;

<sup>2</sup>Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing 401147, China;

<sup>3</sup>Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education, Chongqing 401147, China)

**Abstract** The research group predict and verify the target molecule osteoprotegerin (*OPG*) mRNA of miR-181a in BMMSCs and investigate the effect of *OPG* on osteoclast activity in the pathogenesis of osteoporosis. The putative target mRNA of miR-181a were predicted by bioinformatics approach. The dual luciferase vector containing 3' untranslated regions (3'UTR) of *OPG* mRNA was constructed, and the 3'UTR was regarded as the binding site of miR-181a. The interaction between miR-181a and target mRNA was verified by dual luciferase activity analysis. miR-181a was transfected into BMMSCs and co-cultured with osteoclast, and TRAP staining was used to detect the number of osteoclast in co-culture system. The results of dual luciferase reporter gene

收稿日期: 2016-08-15 接受日期: 2016-11-02

国家自然科学基金面上项目(批准号: 31571508、31371473)和重庆市医学重点学科建设经费基金《牙体牙髓病学》(2011)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-88860063, E-mail: shaobingyi1986@126.com

Received: August 15, 2016 Accepted: November 2, 2016

This work supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (Grant No.31571508, 31371473) and the Project of Medical Key-Discipline Construction Program of Chongqing (2011)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-88860063, E-mail: shaobingyi1986@126.com

网络出版时间: 2017-01-05 10:46:20

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170105.1046.002.html>

assay indicated that miR-181a regulated *OPG* by binding to the 3'UTR of *OPG* mRNA. *In vitro* co-culture assays confirmed that BMMSCs transfected with an miR-181a/mimics increased osteoclast number, whereas BMMSCs/inhibitor reduced osteoclast number. We concluded that miR-181a down-regulates the level of OPG protein which might be an important factor to affect the activity of osteoclast.

**Keywords** miR-181a; BMMSCs; osteocalst

骨代谢是一个动态过程,并随着机械应力、激素及细胞因子等的改变而维持动态的重建,包括骨形成与骨吸收,因此,骨组织才能具有正常的形态<sup>[1]</sup>。骨保护素(osteoprotegerin, OPG),又称为破骨细胞生成抑制因子,对破骨细胞生成具有重要的调控作用。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)是存在于骨髓中的多能干细胞,其作为成骨细胞的前体细胞在骨代谢中发挥着重要的作用<sup>[2-3]</sup>。越来越多的证据表明,细胞因子直接或间接地调节RANK(receptor activator of nuclear factor kappa-B)/RANKL(RANK ligand)/OPG系统,从而介导破骨细胞的分化和功能,导致骨代谢疾病。在炎症环境下, BMMSCs表达RANKL/OPG激活破骨细胞促进骨吸收,同时 BMMSCs向成骨细胞分化促进骨形成。近年来,微RNA(microRNA, miRNA)已成为研究的热点,其在调控干细胞的增殖分化过程中发挥着重要的作用<sup>[4-6]</sup>。细胞自身miRNA表达的改变将影响其状态及生物学功能<sup>[7-8]</sup>。课题组前期研究发现, miR-181a在骨质疏松小鼠骨髓间充质干细胞中表达显著升高<sup>[9-10]</sup>。为证明miR-181a的靶向基因及对破骨细胞活性的影响,我们通过生物信息学方法预测miR-181a的靶mRNAs,并筛选出与破骨细胞活性密切相关的 *OPG*的mRNA。本研究旨在探讨miR-181a在骨髓间充质干细胞中调控OPG水平而影响破骨细胞活性的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

$\alpha$ -MEM培养基、胰蛋白酶购自Gibco公司;胎牛血清购自四季青天杭生物科技有限公司;细胞总RNA提取试剂盒、一步法RT-PCR试剂盒、限制性内切核酸酶 *EcoR* I和 *Pst* I、 $T_4$  DNA连接酶购自TaKaRa公司; siPORT<sup>TM</sup>NeoFX<sup>TM</sup>转染试剂购自Ambion公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自Promega公司; Lipofectamine 2000购自Invitrogen公

司; DH5 $\alpha$ 感受态大肠杆菌购自天根生化科技北京有限公司;质粒pmiR-REPORT<sup>TM</sup>、化学合成miR-181a由广州市锐博生物科技有限公司提供; TRAP(tartrate resistant acid phosphatase)染色试剂盒购自Sigma公司;体视显微镜、倒置相差显微镜以及照相系统购自Olympus公司; RT-PCR仪器购自Applied biosystems公司。

### 1.2 靶mRNA预测

通过miRNA常用的生物信息学分析和靶点预测软件 TargetScan、PicTar、MicroRNA.org对 miR-181a可能作用的靶mRNA进行预测,选择标准为该mRNA具有物种保守性, miR-181a序列2~8位种子区与其3'UTR(3' untranslated regions)区完全互补配对。

### 1.3 miRNA *OPG*基因荧光素酶报告基因载体的构建

根据 GenBank中 *OPG*(NM-002546.3)基因序列信息设计其3'UTR的基因序列,设计合成扩增引物,使用已有cDNA模版,扩增得到 *OPG*的mRNA 3'UTR目的片段,将其克隆到pmiR-REPORT<sup>TM</sup>双荧光素酶报告载体中,所用载体的报告荧光为萤火虫荧光素(hRluc),校正荧光为海肾素荧光素(hluc)。荧光素酶报告载体的构建根据 *OPG* mRNA 3'UTR序列设计合成引物,上下游引物分别引入限制性内切核酸酶 *Xba* I和 *Pst* I双酶切后,经琼脂糖电泳鉴定,设计合成扩增引物 *OPG*,上游: 5'-CCA CGG GTG AAT CCT TAA TATT GGT TTC-3';下游: 5'-ACC ATT TCC CTT GCT CCC AAC GGT TA-3'。以DNA为模版进行PCR扩增,回收产物及pmiR-REPORT<sup>TM</sup>载体经限制性内切核酸酶 *Xba* I和 *Pst* I双酶切,酶切产物纯化回收,二者经  $T_4$  DNA连接酶连接,转化DH5 $\alpha$ 感受态大肠杆菌,提取质粒,质粒命名为pMir-OPG-REPORT<sup>TM</sup>,将重组质粒送Invitrogen公司测序,测序结果经Blast比对显示扩增区域并无突变。

### 1.4 双荧光素酶报告载体验证

基因转染按照美国Invitrogen公司Lipofectamine

2000转染试剂盒进行,双荧光素酶活性检测严格按照Promega提供的方法。数据分析:取各样品的相关荧光素酶活性,以 $pRL-TK$ 为内参照。相对荧光素酶活性设定为萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶比值(firefly luciferase/fenilla luciferase),比较分析miRNA对荧光素酶活性的影响,判断miR-181a对靶基因的调控能力,采用各组相对荧光素酶活性作直方图。

### 1.5 小鼠骨髓间充质干细胞原代培养及纯化

取C57小鼠断颈处死,酒精浸泡5 min,超净台内无菌分离其胫骨和股骨,用完全培养基冲刷出全骨骨髓,轻柔吹打冲洗液制成单细胞悬液,加30 mL  $\alpha$ -MEM(含20% FBS),平分至3个9 cm培养皿,培养24 h候后弃去未贴壁细胞。之后每3 d换液1次,待细胞汇合达80%时进行传代,取筛选培养的第3代细胞备用。

### 1.6 转染miR-181a(mimics-181a、inhibitor-181a)至BMMSCs

稀释siPORT<sup>TM</sup>NeoFX<sup>TM</sup>转染试剂:用50  $\mu$ L不含血清培养基稀释1  $\mu$ L,轻轻混匀并室温孵育5 min;用50  $\mu$ L不含血清培养基稀释0.25  $\mu$ L 20  $\mu$ mol/L的miRNA模拟物(mimics)以及0.5  $\mu$ L 20  $\mu$ mol/L抑制剂(inhibitor)存储液来稀释miRNA,轻轻混匀,室温孵育5 min,将稀释后的siPORT<sup>TM</sup>NeoFX<sup>TM</sup>转染试剂与稀释后的miRNA轻轻混匀,室温10 min静置后加入含有细胞的96孔板,置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱48 h后收集备用。

### 1.7 RT-PCR检测OPG mRNA表达

收集转染48 h后的细胞用PBS洗2次,加入1 mL Trizol,提取细胞总RNA,琼脂糖凝胶电泳检测RNA纯度。将获取的RNA用反转录试剂盒合成cDNA, $\beta$ -actin为内参,参照GenBank数据库,采用Primer premier 5.0计算机软件设计引物,由TaKaRa公司合成基因序列(表1)。采用RT-PCR进行检测OPG mRNA

水平,反应体系(Premix 10  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu$ L、上下游引物各0.8  $\mu$ L、样本模板2  $\mu$ L),反应条件参照产品说明。

### 1.8 Western blot检测OPG蛋白质水平

收集转染48 h后的细胞,用PBS洗涤细胞2次,加入细胞裂解液裂解细胞。用Bradford蛋白质浓度测试试剂盒进行蛋白质定量测试;SDS-PAGE电泳,转膜,封闭,免疫反应,最后进行化学发光反应,分析各组间OPG蛋白质水平的差异。

### 1.9 TRAP染色计数

将各组转染48 h后的细胞分别与破骨细胞共培养3 d,通过TRAP染色检测破骨细胞数目的变化。TRAP染色按Sigma TRAP染色试剂盒说明进行<sup>[11]</sup>。破骨细胞是含有3个细胞核以上的染色阳性的多核巨细胞。400 $\times$ 光镜下任选10个视野,计破骨细胞数量。

### 1.10 统计学分析

实验重复至少3次以上,实验数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,所有资料采用SPSS 17.0软件行 $t$ 检验及单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 靶mRNA预测

通过对miRNA数据库的查询,找到miR-181a的成熟序列和其种子序列。运用在线预测软件TargetScan、PicTar、MicroRNA.org对其靶mRNA进行分析,其中,OPG mRNA为其可能的靶mRNA(图1)。

### 2.2 含有OPG的mRNA 3'UTR序列双荧光素酶报告载体成功构建

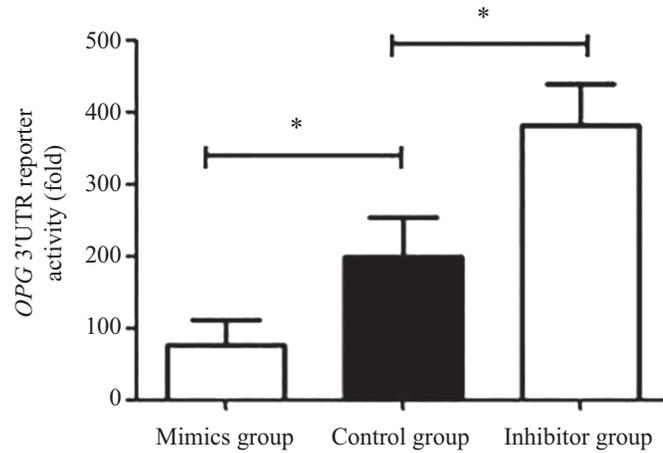
将OPG mRNA 3'UTR序列(1 508 bp)将该片段连入双荧光素酶报告载体(pmiR-REPORT<sup>TM</sup>),双酶切后再琼脂糖凝胶电泳,得到1 508 bp的OPG mRNA 3'UTR

表1 引物基因序列

Table 1 Primer gene sequence

基因	引物序列
Gene	Primer sequence
$\beta$ -actin	Upstream primer: 5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGAA-3' Downstream primer: 5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3'
OPG	Upstream primer: 5'-TGG CTG ACT GTT TTG GTG GAC-3' Downstream primer: 5'-TGA CAG TTT TGG GAA AGT GGG ATG-3'





\* $P < 0.05$ .

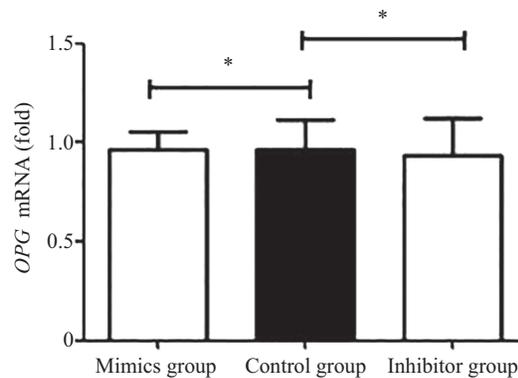
图3 双荧光素酶报告酶验证

Fig.3 Verification by Dual luciferase reporter gene assay



图4 第三代骨髓间充质干细胞

Fig.4 The third passage of bone marrow mesenchymal stem cells



\* $P < 0.05$ .

图5 RT-PCR检测转染后OPG基因表达

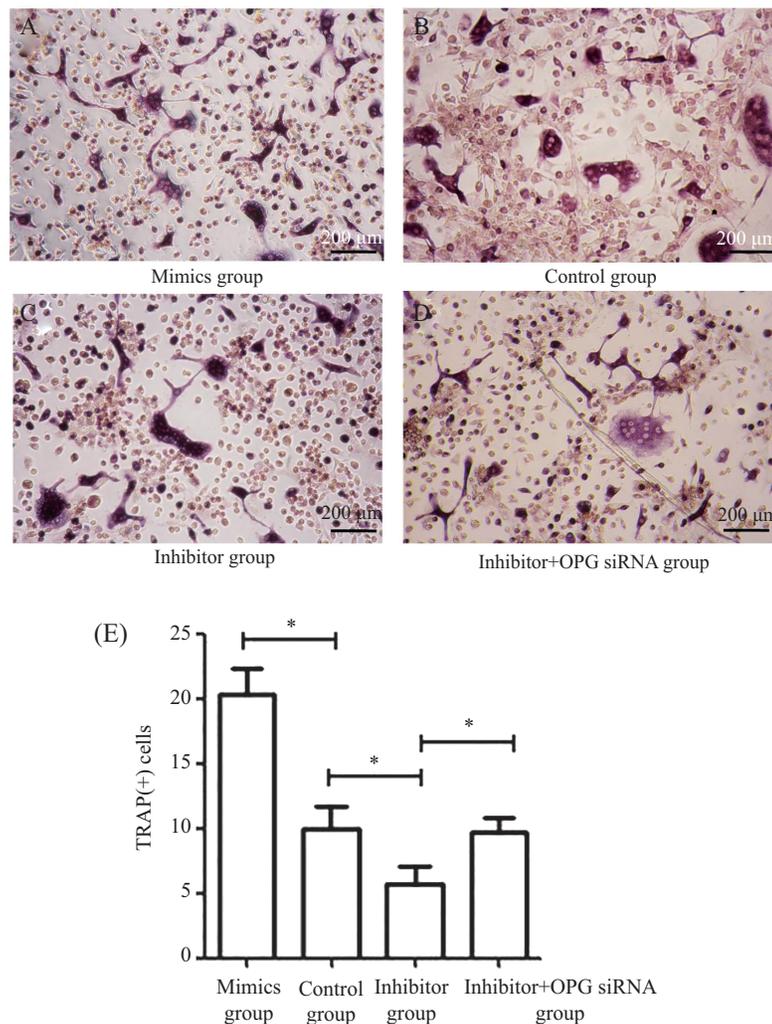
Fig.5 The levels of OPG mRNA detected by RT-PCR after transfected with miR-181a

蛋白质水平(图7)。

### 3 讨论

骨髓间充质干细胞在适宜条件下通过表达多种细胞因子参与维持骨的动态平衡,其在骨质疏松发病过程中发挥着重要的作用<sup>[12]</sup>。细胞因子网络的表达调控机制十分复杂,大量研究工作证实,

miRNA参与了生命过程中的许多重要过程,包括细胞增殖、凋亡、免疫功能等。mirBase、miRand和TargetScan作为经典的miRNA预测软件,在多种疾病模型中得到广泛应用。本研究利用这3款软件,对miR-181a的靶mRNA进行了初步预测,结果发现,不同的软件均预测miR-181a可以与OPG的mRNA 3'UTR特异性结合,miR-181a高表达于骨髓与胸腺



A: TRAP染色计数mimics组中破骨细胞数量; B: TRAP染色计数control组中破骨细胞数量; C: TRAP染色计数inhibitor组中破骨细胞数量; D: TRAP染色计数inhibitor+OPG siRNA组中破骨细胞数量; E: 各实验组中破骨细胞数量统计结果, \* $P < 0.05$ 。

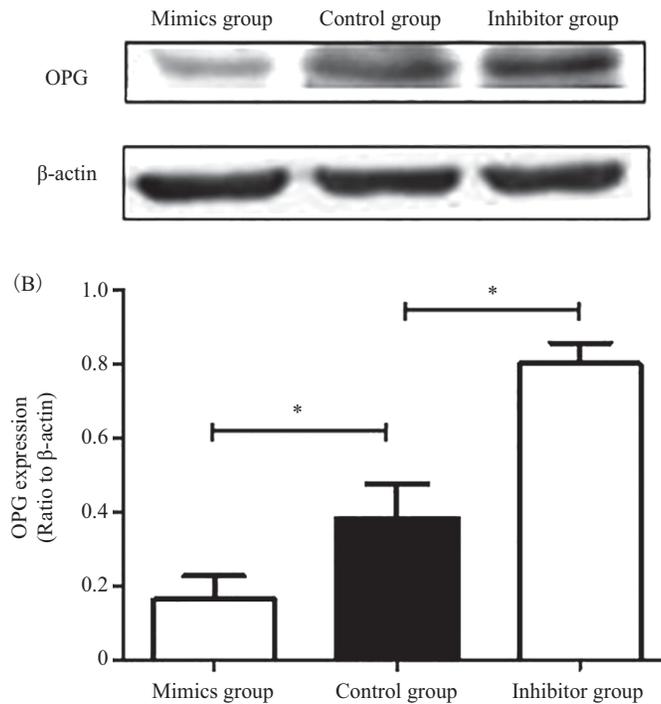
A: the number of osteoclasts in mimics group counted by TRAP staining; B: the number of osteoclasts in control group counted by TRAP staining; C: the number of osteoclasts in inhibitor group counted by TRAP staining; D: the number of osteoclasts in inhibitor+OPG siRNA group counted by TRAP staining; E: statistical results of the number of osteoclast in each experimental group, \* $P < 0.05$ .

图6 破骨细胞TRAP(+)染色计数

Fig.6 The number of osteoclast was measured by TRAP(+)

中并参与调控造血干细胞的增殖与分化<sup>[13-14]</sup>。研究发现, miR-181a在多种肿瘤中表达异常, 功能主要涉及细胞周期控制、细胞侵袭以及细胞凋亡等病理生理过程。miR-181a可通过TGF- $\beta$ 通路影响MSC细胞的增殖<sup>[15-16]</sup>。OPG通过阻断RANKL与RANK结合而抑制破骨细胞前体的分化, 抑制成熟破骨细胞活化及骨吸收活性, 导致破骨细胞凋亡。尽管在正常和病理情况下, OPG在骨代谢过程中对破骨细胞活性作用已经被阐明, 但是目前对OPG的上游调控基因尚不明确。本课题组前期工作中发现, 骨质疏松小鼠骨髓间充质干细胞中miR-181a水平显著上升, 通过生物信息学技术以及芯片分析, 推论miR-

181a可能是OPG的上游调控者。由于miR-181a可以通过与OPG的mRNA 3'UTR结合直接调控OPG蛋白质水平, 也可以通过作用于其他靶基因来间接调控OPG的表达。因此, OPG mRNA是否是miR-181a直接的靶分子需要通过进一步实验验证。本实验中, 这一推论在Western blot和荧光素酶报告基因载体实验中得以证实, 即miR-181a直接负调控细胞因子OPG蛋白质水平。目前, 关于miRNA对预测靶mRNA的调控作用机制尚不清楚。文献证实, 经软件预测得到的某个miRNA的若干个靶位点, 在匹配度相类似的情况下, 受抑制的程度差别巨大<sup>[17]</sup>。这说明, miRNA对其靶分子的调节作用还受到其他机



A: Western blot检测3组BMMSCs细胞中OPG蛋白质水平,  $\beta$ -actin为内参; B: 各组细胞中OPG蛋白质的相对水平, \* $P < 0.05$ 。

A: the protein levels of OPG in three group of BMMSCs measured by Western blot, normalized to  $\beta$ -actin; B: the relative levels of OPG protein was analysed by statistics, \* $P < 0.05$ .

图7 Western blot检测转染miR-181a后OPG蛋白质水平变化

Fig.7 The levels of OPG protein detected by Western blot after transfected with miR-181a

制的影响。

综上, 通过调控骨髓间充质干细胞中OPG基因, 从而抑制破骨细胞的活性可能是miR-181a阻止骨质疏松发生发展的重要机制, 因此, 本研究为骨质疏松的生物学治疗提供了一个新的潜在靶标。

### 参考文献 (References)

- Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: Now and the future. *Lancet* 2011; 377(9773): 1276-87.
- Teitelbaum SL. Stem cells and osteoporosis therapy. *Cell Stem Cell* 2010; 7(5): 553-4.
- 邵秉一, 于洋, 傅潇慧, 廖立, 金岩, 杨德琴, 等. 雌激素缺乏导致的骨质疏松发病过程中T淋巴细胞对骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化的影响及与TNF- $\alpha$ 的关系. *中国细胞生物学学报* (Shao Bingyi, Yu Yang, Fu Xiaohui, Liao Li, Jin Yan, Yang Deqin, *et al.* Effect of T-lymphocytes on cell proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2014; 36(4): 476-82.
- Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
- Khraiwesh B, Arif MA, Seumel GI, Ossowski S, Weiqel D, Reski R, *et al.* Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell* 2010; 140(1): 111-22.
- Plasterk RH. MicroRNAs in animal development. *Cell* 2006; 124(5): 877-81.
- Kosik KS. MicroRNAs and cellular phenotypy. *Cell* 2010; 143(1): 21-6.
- Stadler BM, Ruohola-Baker H. Small RNAs: Keeping stem cells in line. *Cell* 2008; 132(4): 563-6.
- Shao B, Liao L, Yu Y, Shuai Y, Su X, Jing H, *et al.* Estrogen preserves Fas ligand levels by inhibiting microRNA-181a in bone marrow-derived mesenchymal stem cells to maintain bone remodeling balance. *FASEB J* 2015; 29(9): 3935-44.
- 杨其芬, 邵秉一, 杨德琴, 郑玉琪. miR-181a对骨质疏松小鼠骨髓贴壁基质细胞体外增殖活性的影响. *第三军医大学学报* (Yang Qifen, Shao Binyi, Yang Deqin, Zheng Yuqi. Effect of miR-181a on proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells from mouse osteoporosis model. *Journal of Third Military Medical University*) 2015; 19(10): 1966-71.
- 邵秉一, 于洋, 杨德琴, 郑玉琪. 雌激素缺乏导致的骨质疏松发病过程中BMMSC的Fas表达增强后受破骨细胞凋亡的影响. *免疫学杂志* (Shao Bingyi, Yu Yang, Yang Deqin, Zheng Yuqi. Effects of Fas on osteoclast-mediated apoptosis of bone marrow-derived mesenchymal stem cell during estrogen deficiency induced osteoporosis. *Immunological Journal*) 2016; 32(10): 853-6.
- Xu XH, Dong SS, Guo Y, Yang TL, Lei SF, Papasian CJ, *et al.* Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: the update. *Endocr Rev* 2010; 31(4): 31447-505.
- Li Y, Li D, Yan Z, Qi K, Chen L, Ziang Z, *et al.* Potential

- relationship and clinical significance of miRNAs and Th17 cytokines in patients with multiple myeloma. *Leuk Res* 2014; 38(9): 1130-5.
- 14 Chen G, Zhu W, Shi D, Lü L, Zhang C, Liu P, *et al.* MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting Bcl-2. *Oncol Rep* 2010; 23: 997-1003.
- 15 Liu L, Wang Y, Fan H, Zhao X, Liu D, Hu Y, *et al.* MicroRNA-181a regulates local immune balance by inhibiting proliferation and immunosuppressive properties of mesenchymal stem Cells. *Stem Cell* 2012; 30: 1756-70.
- 16 Sang W, Zhang C, Zhang D, Wang Y, Sun C, Niu M, *et al.* MicroRNA-181a, a potential diagnosis marker, alleviates acute graft versus host disease by regulating IFN- $\gamma$  production. *Am J Hematol* 2015; 90(11): 998-1007.
- 17 Yang C, Zheng SD, Wu HJ, Chen SJ. Regulatory mechanisms of the molecular pathways in fibrosis induced by microRNAs. *Chin Med J* 2016; 129(19): 2365-72.