论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201501230

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

杨其芬[1,2],邵秉一[1],杨德琴[1,2],郑玉琪[1,3] (401147 重庆,重庆医科大学附属口腔医院牙体牙髓科[1],口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室[2],重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室[3])

[摘要] **目的** 探讨骨质疏松发生过程中 miR-181a 对骨髓贴壁基质细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)增殖能力的影响。**方法** 选用 8 周龄健康的 20 只雌性小鼠,并进行双侧卵巢切除(OVX 组),建立雌性小鼠绝经后的骨质疏松模型。另选用同一周龄,体质量相近的 20 只健康小鼠行双侧卵巢附近脂肪组织部分切除,建立假手术组(Sham 组)。2 个月后 Micro-CT 检测 2 组小鼠松质骨中骨小梁微观结构参数及骨密度指标,MTT 检测 2 组细胞增殖能力的差异。RT-PCR 检测 2 组细胞中 miR-181a 的表达差异,上调(下调)细胞内 miR-181a 水平后 MTT 检测骨髓贴壁基质细胞增殖情况。**结果** Micro-CT 显示 Sham 组与 OVX 组骨小梁微观结构参数及骨密度有显著差异($P<0.05$)。MTT 显示 Sham 组 MSCs 增殖能力高于 OVX 组($P<0.05$)。RT-PCR 显示 Sham 组中 miR-181a 较 OVX 组表达显著降低($P<0.05$)。上调(下调)miR-181a 后,MSCs 增殖能力下降(上升)。成骨成脂能力检测发现 OVX 组 MSCs 成脂能力强于 Sham 组,而其成骨能力弱于 Sham 组($P<0.05$)。**结论** 雌激素缺乏所导致的骨质疏松症中,miR-181a 高表达可抑制 MSCs 的增殖,可能是影响骨质疏松发病的重要因素之一。

[关键词] 雌激素;增殖;miR-181a; 骨髓贴壁基质细胞

[中图法分类号] R-332; R329.25; R681.02 [文献标志码] A

Effect of miR-181a on proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells from mouse osteoporosis model

Yang Qifen[1,2], Shao Bingyi[1], Yang Deqin[1,2], Zheng Yuqi[1,3] ([1]Department of Endodontics, [2]Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences, [3]Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Chongqing Colleges and Universities, the Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 401147, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of miR-181a on the proliferation of mouse bone mesenchymal stem cells (MSCs) derived from mouse model of osteoporosis (OP). **Methods** Animal model of OP was established by bilateral ovariectomy (OVX) in 20 8-week-old healthy female C57BL/6 mice, and the mice undergoing sham operation served as control. In 2 months later, micro-CT scanning was employed to detect the parameters of trabecular microstructure and the indicators of the bone mineral density of both groups. The mice were then sacrificed to isolate MSCs, which were then identified by flow cytometry for their phenotypes and by Alizarin red staining and Oil red 0 staining for osteogenic and adipogenic capacities. MTT assay was used to measure the proliferation capacity of the MSCs derived from 2 groups of mice. The mRNA expression of miR-181a was measured by RT-PCR. The proliferation of MSCs after up-regulating/down-regulating the expression of miR-181a was detected by MTT assay. **Results** The results of micro-CT scanning showed significant differences in the parameters of trabecular microstructure and the indicators of the bone mineral density between 2 groups ($P<0.05$). The proliferation capacity of MSCs was declined, and the

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31371473);重庆市渝中区科委科学研究资助项目(2012);重庆市医学重点学科建设经费基金(2011)

[通信作者] 郑玉琪,E-mail:251497712@qq.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150617.0848.002.html (2015-06-17)

expression of miR-181a was significantly increased in the cells from OVX group ($P<0.05$). Up-regulation/down-regulation of miR-181a resulted in significantly decreased/increased proliferation in MSCs. And the adipogenic capacity of MSCs was stronger in OVX group than in sham group, whereas the osteogenic capacity was weaker ($P<0.05$). MTT assay showed the proliferation capacity was better in the MSCs from sham operation group than from OVX group ($P<0.05$). **Conclusion** In the process of osteoporosis induced by estrogen deficiency, the high expression of miR-181a inhibits the proliferation of MSCs, which may play an important role in the pathogenesis of postmenopausal osteoporosis.

[**Key words**] estrogen; proliferation; miR-181a; mesenchymal stem cells

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31371473), the Project of Science and Technology Commission of Yuzhong District, Chongqing (2012) and the Project of Medical Key-discipline Construction Program of Chongqing (2011). Corresponding author: Zheng Yuqi, E-mail: 251497712@qq.com.

骨质疏松(osteoporosis, OP)是以骨量丢失且易发骨折的一种全身代谢性疾病,约50%绝经后妇女的骨折与骨质疏松有关[1]。骨髓贴壁基质细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)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OP发病过程中发挥着重要的作用[2]。研究表明MSCs增殖能力的降低会导致OP的发生[3]。MSCs存在雌激素受体,在雌激素缺乏所导致的骨质疏松症的病理环境下,MSCs的生物学特性发生改变,进而加剧了骨质疏松症的发生和发展,然而其中的机制仍不明确。近年来,microRNA已成为研究的热点,其在调控干细胞的增殖与分化过程中发挥着重要的作用[4-6]。细胞自身microRNA表达的改变将影响其状态及生物学功能[7-8]。有研究报道miR-181a参与调控细胞的增殖[9-10]。那么miR-181a是否能够调控MSCs的增殖?本实验采用雌激素缺乏下骨质疏松症小鼠为模型,将骨质疏松症的MSCs与正常小鼠的MSCs中miR-181a的表达进行对比,探寻miR-181a能否调控骨髓贴壁基质细胞的增殖,进而在骨质疏松症的发生、发展中发挥作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物模型建立 选取8周龄健康C57BL/6雌性小鼠(第四军医大学实验动物中心提供)20只,1%戊巴比妥钠腹腔麻醉后,经双侧腹下区手术切口摘除双侧卵巢,为OVX组;另选20只行腹腔麻醉后,于其双侧腹下区取少量脂肪组织,为假手术组(Sham组)。小鼠在无特殊致病源(SPF)级动物房饲养8周。

1.1.2 实验材料 α-MEM培养基和胰蛋白酶购于美国Gibco公司;胎牛血清购于浙江天杭生物科技有限公司;细胞总RNA提取试剂盒和一步法RT-PCR试剂盒购于大连TaKaRa公司;siPORT™NeoFX™转染试剂购于美国Ambion公司;化学合成miR-181a购于广州锐博生物科技有限公司;CD3及CD28抗体购于美国Ambion公司。

1.2 实验方法

1.2.1 Micro-CT扫描鉴定骨质疏松模型 将术后2个月的C57BL/6小鼠用1%戊巴比妥钠麻醉(依据小鼠体质量,麻药浓度比例为0.3 mL/100 g),待小鼠处于麻醉状态时,用胶带固定小鼠前后肢,进行Micro-CT(GE公司,美国)扫描,观察小鼠股骨骱骺端骨密度变化。

1.2.2 血清雌二醇水平检测 小鼠在处理前采眼眶血,分离出血清,用小鼠雌激素酶联免疫吸附测定试剂盒测定血清雌二醇水平。

1.2.3 小鼠骨髓贴壁基质细胞原代培养及纯化 将断颈处死后的C57BL/6小鼠酒精浸泡5 min,超净台内分离其股骨,用培养液冲出骨髓,轻柔吹打并制成单细胞悬液,置于培养皿中,加入10 mL α-MEM(含20% FBS),隔2 d换液,待细胞密度至80%传代。

1.2.4 MSCs细胞表型鉴定 将生长状态较好的P3代细胞消化后,用含3% FBS的PBS清洗1次后重悬,分别加入CD29、CD34、CD105、CD45,4 ℃避光1 h,1 000 r/min离心5 min,弃上清,用含3% FBS的PBS清洗2次,再次重悬,流式细胞仪检测。

1.2.5 MSCs成骨诱导及茜素红染色 取P3代细胞,接种于6孔板中(2×10^5/孔),成骨诱导液诱导,隔2 d换液1次,21 d后,PBS清洗2遍,多聚甲醛室温固定20 min,PBS清洗2遍,加入茜素红染液,37 ℃染色1 h,PBS清洗2遍,拍照。

1.2.6 MSCs成脂诱导及油红O染色 取P3代细胞,接种于6孔板中(2×10^5/孔),成脂诱导液培养,隔2 d换液1次,14 d后,PBS清洗2遍,多聚甲醛室温固定20 min,PBS清洗2遍,用油红染色,室温1 h,PBS清洗2遍,拍照。

1.2.7 MTT检测MSCs的增殖能力 取P3代细胞常规消化离心,计数,以2 500/孔设置7组,每组7孔(6个复孔,1个对照孔)接种于96孔板,180 μL培养液培养7 d,每天定时检测细胞增殖能力。检测时每孔加20 μL MTT(5 g/L) 37 ℃孵育4 h后,弃上清液,加入150 μL二甲基亚砜,避光充分振荡10 min,酶标仪选取490 nm测定光密度值[D(490)],以时间为横轴,D(490)值为纵轴绘制生长曲线。

1.2.8 Real-time PCR检测miR-181a miRNA表达

分别收集去势小鼠组和假手术组P3代细胞用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,参照GenBank数据库及软件设计引物(表1);RT-PCR检测miRNA-181a的表达(反应体系及反应条件)参照产品说明。

表1 引物基因序列

基因	引物序列
U6	上游:5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′
	下游:5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′
miR-181a	上游:5′-AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT-3′
	下游:5′-CTCCTTAGAATCTGTTTGCTCTCATA-3′

1.2.9 转染miR-181a(pre-181a、ant-181a)于MSCs

稀释siPORT ™NeoFX™转染试剂:用50 μL不含血清培养基稀释1 μL,轻轻混匀并室温孵育5 min;稀释miRNA用50 μL不含血清培养基稀释0.25 μL、20 μmol的miRNA mimic(0.5 μL 20 μmol的inhibitor)存储液,轻轻混匀,室温孵育5 min。将稀释后的siPORT ™NeoFX™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 ℃的CO_2培养箱48 h。

1.3 统计学分析

实验重复3次以上,采用SPSS 11.0统计软件进行分析,多组间总体比较用方差分析,两两独立样本比较用t检验。

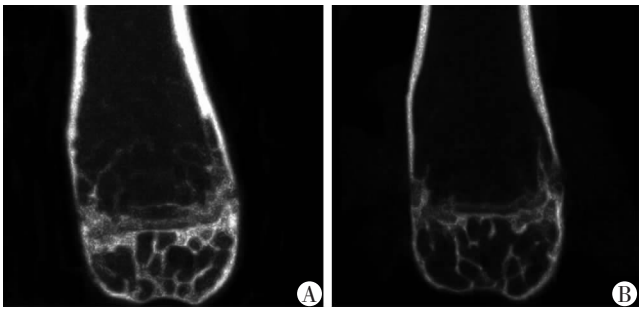
2 结果

2.1 血清雌二醇水平测定

小鼠术后2个月,对2组小鼠血清雌二醇水平进行检测,发现OVX组20只小鼠血清雌二醇水平为(48.88 ± 17.89) pg/mL,Sham组20只小鼠血清雌二醇水平为(10.44 ± 3.80) pg/mL,OVX组显著低于Sham组(P < 0.05)。

2.2 Micro-CT分析骨参数结果

小鼠术后2个月,为了验证骨质疏松症模型是否构建成功,进而分析了OVX组与Sham组小鼠骨体积分数(BV/TV)、骨表面积体积比(BS/BV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)及骨小梁分离度(Tb.Sp),结果表明2组差异均有统计学意义(P < 0.05,图1、表2)。



A:假手术组;B:去势组

图1 OVX及Sham组Micro-CT二维表现

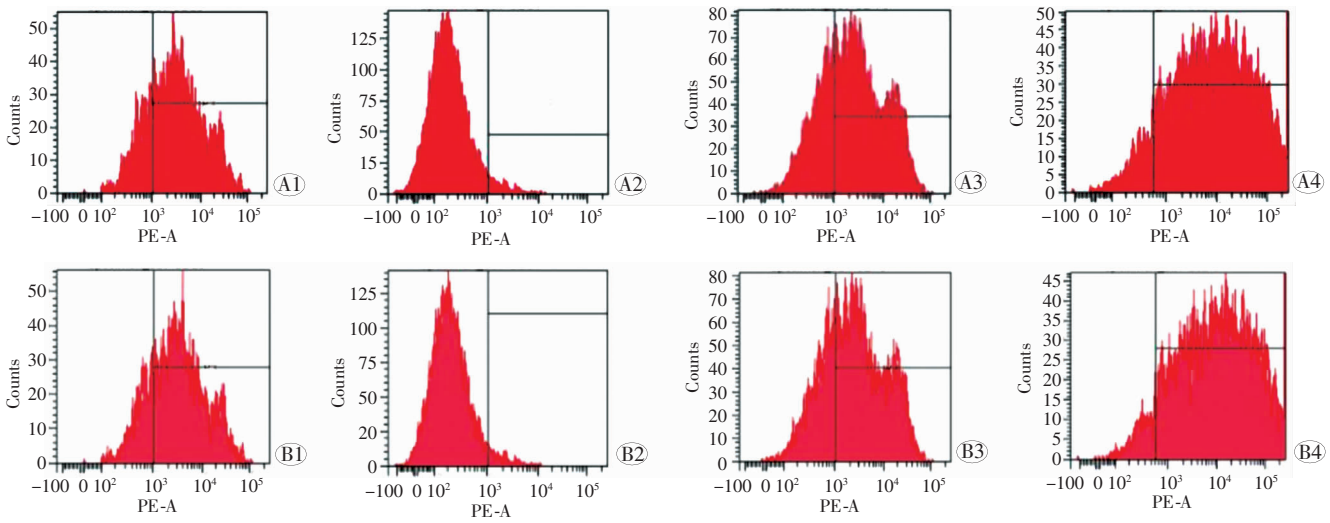
2.3 MSCs的鉴定

2.3.1 MSCs表型鉴定 为了验证实验培养的细胞为MSCs,进行了细胞表面标志及多向分化能力的鉴定。P3代MSCs表型鉴定结果见图2,结果表明Sham组细胞CD34表达率为4.3%,CD29表达率为76.6%,有68.5%的细胞表达CD73,有90.7%表达Sca-1(图2A);OVX组细胞CD34表达率为4.6%,CD29表达率为77.1%,69.1%的细胞表达CD73,92.3%表达Sca-1(图2B),提示分离培养的细胞为MSCs。

2.3.2 MSCs向成骨及成脂分化能力鉴定 MSCs成骨诱导21 d,镜下见钙盐沉淀,茜素红染色呈橘红色,中央区呈褐色,周边偏黄发亮。可见Sham组的矿化结节多于OVX组,经过十六烷基吡啶溶解钙化结节进行定量检测,Sham组光密度值高于OVX组。成脂诱导14 d后,镜下可见较多脂滴位于细胞内,脂滴成串珠样结构,油红O染色可见透亮的红色。经过异丙醇溶解脂滴进行定量检测,OVX组光密度值高于Sham组(图3)。

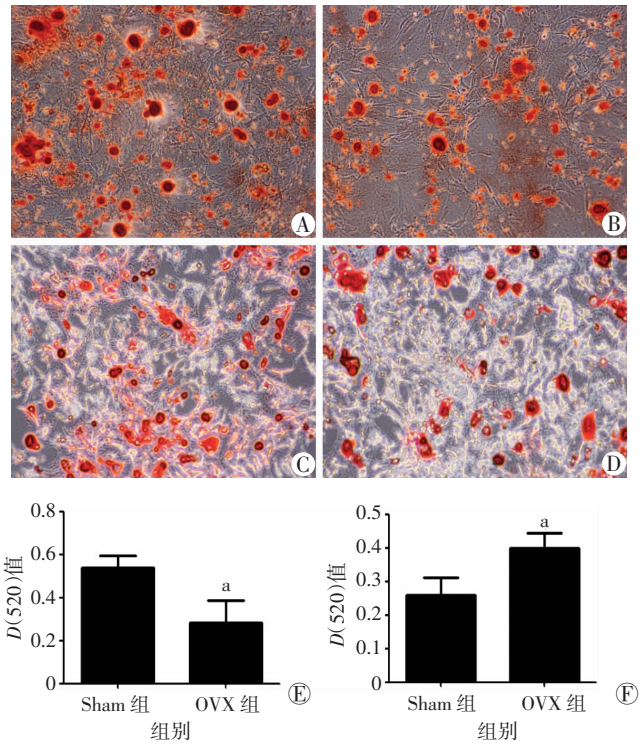
表2 OVX及Sham组Micro-CT检测结果(n = 20, $\bar{x} \pm s$)

组别	BV/TV(%)	BS/BV(1/mm)	Tb.Th(mm)	Tb.N(1/mm)	Tb.Sp(mm)	BMD(mg/cc)
Sham组	19.25 ± 3.42	26.34 ± 2.22	0.821 ± 0.07	2.21 ± 0.3	0.33 ± 0.11	435.78 ± 19.45
OVX组	6.34 ± 2.69	36.38 ± 3.15	0.042 ± 0.02	4.32 ± 0.6	0.81 ± 0.11	267.33 ± 17.33



A：Sham 组　A1：CD29；A2：CD34；A3：CD73；A4：Sca-1；B：OVX 组　B1：CD29；B2：CD34；B3：CD73；B4：Sca-1

图 2　P3 代 MSCs 表型鉴定结果

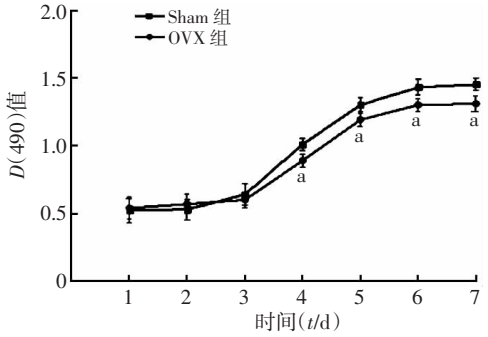


A：Sham 组成骨诱导（茜素红 ×100）；B：OVX 组成骨诱导（茜素红 ×100）；C：Sham 组成脂诱导（油红 ×100）；D：OVX 组成脂诱导（油红 ×100）；E：两组 MSCs 成骨分化能力比较；F：两组 MSCs 成脂分化能力比较　a：$P<0.05$，与 Sham 组比较

图 3　骨髓贴壁基质细胞的鉴定

2.4　MSCs 的增殖情况

MTT 结果显示，Sham 组与 OVX 组中的 MSCs 增殖活性在第 4 天起出现显著差异，Sham 组 MSCs 的增殖能力显著高于 OVX 组（$P<0.05$，图 4）。



a：$P<0.05$，与 Sham 组比较

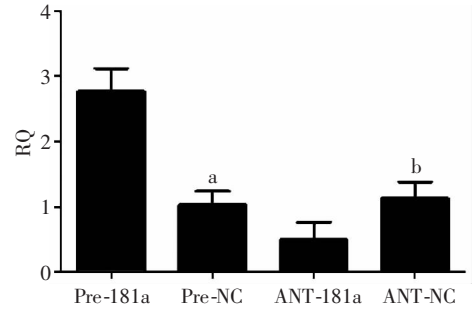
图 4　Sham 组与 OVX 组小鼠 MSCs 生长曲线比较

2.5　Real-time PCR 结果

结果显示，OVX 组 MSCs 中 miR-181a 的表达水平为（1.38 ±0.09），Sham 组为（0.91 ±0.05），OVX 组 MSCs 中 miR-181a 表达水平显著高于 Sham 组（$P<0.05$）。

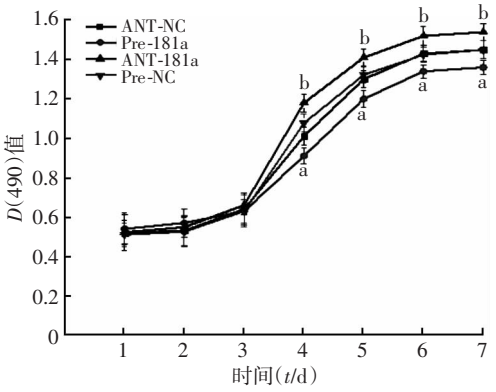
2.6　转染 miR-181a 后 MSCs 的增殖情况

将 Pre-181a、Pre-NC、ANT-181a、ANT-NC 分别转染入 MSCs，对各组转染后 MSCs 进行 RT-PCR 检测，发现 Pre-181a 组 MSCs 中 miR-181a 的表达水平较 Pre-NC 组高，ANT-181a 组 MSCs 中 miR-181a 的表达水平较 ANT-NC 组高，差异均有统计学意义（$P<0.05$，图 5）。MTT 结果显示，Pre-181a 组与 Pre-NC 组，ANT-181a 组与 ANT-NC 组 MSCs 的增殖能力在第 4 天时差异有统计学意义（$P<0.05$）。其中 Pre-181a 组较 Pre-NC 组显著降低（$P<0.05$），而 ANT-181a 组较 ANT-NC 组显著增高（$P<0.05$，图 6）。



a:$P<0.05$,与 Pre-181a 组;b:$P<0.05$,与 ANT-181a 组比较

图5 转染 miR-181a 后各组 miR-181a 的表达



a:$P<0.05$,与 Pre-NC 组比较,b:$P<0.05$,与 ANT-NC 组比较

图6 转染 miR-181a 后各组 MSCs 的增殖能力比较

3 讨论

绝经后骨质疏松是由于雌激素缺乏引起的骨形成障碍的结果,雌激素能通过影响成骨细胞与破骨细胞的活性来维持骨形成与骨吸收的动态平衡[11]。骨髓贴壁基质细胞在适宜条件下能够通过分化形成多种中胚层组织,包括骨及骨髓基质结缔组织,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[12]。近年来,microRNA 其在骨质疏松症中所发挥的作用受到了越来越多的关注。所以本实验探讨雌激素缺乏所致骨质疏松中雌激素水平降低对 MSCs 中 miR-181a 表达的影响,并调控相关靶基因影响 MSCs 的增殖能力。

本实验发现,将小鼠双侧卵巢摘除后 2 个月,其骨小梁数量、骨密度及骨体积分数与假手术组小鼠相比,均存在不同程度的降低,该结果与 Kovacic 等[13]发现的相一致。MSCs 以多向分化和自我更新的能力为特征。目前,大多的研究主要聚焦于骨质疏松症病理环境下 MSCs 分化能力的改变,而对 MSCs 增殖能力的改变研究较少。Garcia-Moreno 等[14]发现,在雌激素缺乏所致骨质疏松症中,MSCs 能够表达 Fas 蛋白从而抑制其向成骨细胞放向分化,进一步加剧骨质疏松症的产生。Santiago-Mora 等[15]发现骨质疏松症中 MSCs 的成骨能力较弱,而成脂能力较强。Yang 等[16]发现,在雌激素缺乏所致骨质疏松症小鼠中存在某种因子导致 MSCs 的骨形成能力受损。并且在骨质疏松症小鼠中,MSCs 在骨受损部位的成骨能力也有一定程度的降低,导致骨质疏松症骨损伤的加剧[17]。本实验发现,来源于骨质疏松症小鼠的 MSCs 成骨能力明显低于假手术组,而成脂能力明显强于假手术组,则进一步证明了该结论。更加令人感兴趣的是,本实验发现在骨质疏松症中 MSCs 的增殖能力弱于正常小鼠来源的 MSCs,说明存在某种因素能够影响 MSCs 的生物学性能,进而影响骨质疏松症的发生和发展。miR-181a 高表达于骨髓与胸腺中并参与调控造血干细胞的增殖与分化[18-19]。miR-181a 能调控间充质细胞中的 TGF-β 通路,TGF-β 信号通路可影响大多数细胞的增殖,迁移及分化[20-21]。研究发现 miR-181a 通过抑制 TGF-β 通路中的 TGFBR1 和 TGFBRAP1 两个靶基因调控间充质细胞的增殖[22]。本实验发现 miR-181a 在雌激素缺乏的骨质疏松症中其表达增高,表明雌激素缺乏的骨质疏松症的病理环境下,MSCs 中 miR-181a 表达的改变,可能对 MSCs 的生物学特性产生一定作用。近期有研究发现,在人类骨质疏松症的病理环境中,存在某种 microRNA 能够调控成骨细胞的分化和增殖,进而可能对骨质疏松症的发生和发展产生影响[23]。而 MSCs 作为成骨细胞的前体细胞,miR-181a 表达的改变影响 MSCs 的生物学性能,则更加可能加剧骨质疏松症的发生[24]。在本实验中人为上调或下调 MSCs 中的 miR-181a 的水平后,MSCs 的增殖出现抑制或增强,提示 miR-181a 可能调控了促进细胞增殖的靶基因,miR-181a 上调抑制了这些靶基因的转录后表达,减慢了 MSCs 的增殖过程。这与实验中 OVX 组 MSCs 中 miR-181a 表达增高,增殖能力降低相一致。值得思考的是在本实验中上调 miR-181a 后细胞增殖能力提高但仍不显著,对于这种轻度改变可能是因为生物体内与细胞增殖相关的靶基因会受到多个 miroRNA 共同调控。或者是一个 microRNA 调控一系列功能相互协同的 microRNA 来实现的[25]。因此后续实验将进一步探索 miR-181a 在 MSCs 中与增殖相关的靶基因。

综上所述,本实验证明了雌激素缺乏所致的骨质

疏松症中 miR-181a 表达的改变能够影响 MSCs 自身增殖能力,为后续实验探讨绝经后骨质疏松的发生、发展提供了有力依据。

参考文献:

[1] Rachner T D, Khosla S, Hofbauer L C. Osteoporosis: now and the future[J]. Lancet, 2011, 377(9773): 1276 - 1287.

[2] Teitelbaum S L. Stem cells and osteoporosis therapy[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(5): 553 - 554.

[3] Rodriguez J P, Rios S, Fernandez M, *et al*. Differential activation of ERK1,2 MAP kinase signaling pathway in mesenchymal stem cell from control and osteoporotic postmenopausal women[J]. J Cell Biochem, 2004, 92(4): 745 - 754.

[4] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281 - 297.

[5] Khraiwesh B, Arif M A, Seumel G I, *et al*. Transcriptional control of gene expression by microRNAs[J]. Cell, 2010, 140(1): 111 - 122.

[6] Plasterk R H. micro RNAs in animal development[J]. Cell, 2006, 124(5): 877 - 881.

[7] Kosik K S. MicroRNAs and cellular phenotypy[J]. Cell, 2010, 143(1): 21 - 26.

[8] Stadler B M, Ruohola-Baker H. Small RNAs: keeping stem cells in line[J]. Cell, 2008, 132(4): 563 - 566.

[9] Chen G, Zhu W, Shi D, *et al*. MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting Bcl-2[J]. Oncol Rep, 2010, 23(4): 997 - 1003.

[10] Li Q J, Chau J, Ebert P J, *et al*. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection[J]. Cell, 2007, 129(1): 147 - 161.

[11] Riggs B L, Khosla S, Melton L J 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton[J]. Endocr Rev, 2002, 23(3): 279 - 302.

[12] Hofer E L, La-Russa V, Honegger A E, *et al*. Alteration on the expression of IL-1, PDGF, TGF-beta, EGF, and FGF receptors and c-Fos and c-Myc proteins in bone marrow mesenchymal stroma cells from advanced untreated lung and breast cancer patients[J]. Stem Cells Dev, 2005, 14(5): 587 - 594.

[13] Kovacic N, Grcevic D, Katavic V, *et al*. Fas receptor is required for estrogen deficiency-induced bone loss in mice[J]. Lab Invest, 2010, 90(3): 402 - 413.

[14] Garcia-Moreno C, Catalan M P, Ortiz A, *et al*. Modulation of survival in osteoblasts from postmenopausal women[J]. Bone, 2004, 35(1): 170 - 177.

[15] Santiago-Mora R, Casado-Diaz A, De-Castro M D, *et al*. Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow[J]. Osteoporos Int, 2011, 22(2): 675 - 684.

[16] Yang N, Wang G, Hu C, *et al*. Tumor necrosis factor α suppresses the mesenchymal stem cell osteogenesis promoter miR-21 in estrogen deficiency-induced osteoporosis[J]. J Bone Miner Res, 2013, 28(3): 559 - 573.

[17] Wu X, Pang L, Lei W, *et al*. Inhibition of Sca-1-positive skeletal stem cell recruitment by alendronate blunts the anabolic effects of parathyroid hormone on bone remodeling[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(5): 571 - 580.

[18] Liu G, Min H, Yue S, *et al*. Pre-miRNA loop nucleotides control the distinct activities of mir-181a-1 and mir-181c in early T cell development[J]. PLos One, 2008, 3(10): e3529.

[19] Ebert P J, Jiang S, Xie J, *et al*. An endogenous positively selecting peptide enhances mature T cell responses and becomes an autoantigen in the absence of microRNA miR-181a[J]. Nat Immunol, 2009, 10(11): 1162 - 1169.

[20] Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling[J]. Nature, 2003, 425(6958): 577 - 584.

[21] Yoshimura A, Wakabayashi Y, Mori T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta[J]. J Biochem, 2010, 147(6): 781 - 792.

[22] Liu, Wang Y, Fan H, *et al*. MicroRNA-181a regulates local immune balance by inhibiting proliferation and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2012, 30(8): 1756 - 1770.

[23] Li H1, Xie H, Liu W, *et al*. A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans[J]. J Clin Invest, 2009, 119(12): 3666 - 3677.

[24] Cohen A, Shmoish M, Levi L, *et al*. Alterations in micro-ribonucleic acid expression profiles reveal a novel pathway for estrogen regulation[J]. Endocrinology, 2008, 149(4): 1687 - 1696.

[25] Check-Hayden E. Thousands of proteins affected by miRNAs[J]. Nature, 2008, 454(7204): 562.

(**收稿**:2015-01-29;**修回**:2015-03-06)

(编辑 张 维)