doi:10.11659/jjssx.05E022007

·基础研究·

miR-27b-3p 通过靶向抑制 HIF1AN 调控颈脊髓损伤后骨质疏松症大鼠的成骨分化

王 汉,黄友华,符林雄,王 乐 (海口市人民医院骨科中心,海南 海口 570208)

[摘 要] **目的** 探讨 miR-27b-3p 在颈脊髓损伤后骨质疏松症(CSCI-OP)发展中的作用与机制。**方法** 定量 PCR 检测 30 例CSCI-OP 患者及 50 例健康体检者外周血中 miR-27b-3p 的表达。BMP2 诱导骨髓间充质干细胞(MSCs)成骨,采用定量 PCR 检测 MSCs 中 miR-27b-3p 和成骨相关基因的 mRNA 水平。使用 miR-27b-3p mimic 过表达或使用 miR-27b-3p inhibitor 下调 miR-27b-3p 后检测 miR-27b-3p 的 mRNA 水平,探讨 miR-27b-3p 对 MSCs 成骨相关基因的调控作用。用茜素红染色检测过表达 miR-27b-3p 后 MSCs 的成骨能力。双荧光素酶报告基因检测验证 miR-27b-3p 与 HIF1AN 的结合情况。通过挽救实验验证 miR-27b-3p 是否可以通过靶向 HIF1AN 调控骨质疏松症的发展。建立 CSCI-OP 大鼠模型验证 miR-27b-3p 和 HIF1AN 的表达,micro-CT 观察 miR-27b-3p mimic 对 CSCI-OP 大鼠股骨组织骨量的影响。**结果** CSCI-OP 组患者外周血中 miR-27b-3p 的表达低于对照组($P<0.05$)。miR-27b-3p的表达随着成骨诱导时间的延长而上调($P<0.05$)。过表达 miR-27b-3p 可促进 MSCs 成骨相关基因 ALP、Runx2、OPN 的 mRNA 表达($P<0.05$)。MSCs 过表达 miR-27b-3p 后,钙化结节数量增加($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因检测证实 HIF1AN 与 miR-27b-3p 具有多个结合位点。HIF1AN 的 mRNA 和蛋白水平均受到 miR-27b-3p 的负调控。挽救实验表明,过表达 HIF1AN 抑制了 miR-27b-3p 对 MSCs 成骨的促进作用($P<0.05$)。CSCI-OP 大鼠中 HIF1AN 的表达上调($P<0.05$),体内 micro-CT 观察到 miR-27b-3p mimic 促进了 CSCI-OP 大鼠 ALP、Runx2 和 OPN 的表达,增加了 BV/TV($P<0.05$),而这些作用都被 HIF1AN 过表达所抑制($P<0.05$)。**结论** miR-27b-3p 在骨质疏松症患者外周血中高表达,其可通过靶向抑制 HIF1AN 促进成骨分化并抑制CSCI-OP 的发生和进展。

[关键词] miR-27b-3p;HIF1AN;脊髓损伤;骨质疏松症;成骨分化

[中图分类号] R651.2;R34;R493 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-05-04

miR-27b-3p regulates the osteogenic differentiation of rats with cervical spinal cord injury caused osteoporosis by targeted inhibition of HIF1AN

WANG Han,HUANG You-hua,FU Lin-xiong,WANG Le (Orthopedic Center,Haikou People's Hospital,Haikou Hainan 570208,China)

Abstract: Objective To explore the role and mechanism of miR-27b-3p in the development of cervical spinal cord injury caused osteoporosis(CSCI-OP). **Methods** Quantitative PCR (qPCR) was used to detect the expression of miR-27b-3p in peripheral blood of 30 patients with CSCI-OP and 50 healthy individuals. BMP2 induced bone formation of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs),and qPCR was used to detect the mRNA levels of miR-27b-3p and osteogenic related genes in MSCs. miR-27b-3p mimic or miR-27b-3p inhibitor was used to regulate miR-27b-3p,the mRNA level of miR-27b-3p was detected to explore the regulation effect of miR-27b-3p on MSCs osteogenic genes. Alizarin red staining was used to detect the osteogenic ability of MSCs after overexpression of miR-27b-3p. Dual luciferase reporter gene test was used to verify the binding of miR-27b-3p and HIF1AN. Rescue experiments was used to verify whether miR-27b-3p could regulate the development of osteoporosis by targeting HIF1AN. The CSCI-OP rats model was established to verify the expression of miR-27b-3p and HIF1AN. The effect of miR-27b-3p mimic on the bone mass of femur in CSCI-OP rats was observed by micro-CT. **Results** The expression of miR-27b-3p in peripheral blood of patients in the CSCI-OP group was lower than that in the control group($P<0.05$). The expression of miR-27b-3p increased with the prolongation of osteogenic induction time ($P<0.05$). Overexpression of miR-27b-3p could promote the mRNA expression of bone formation related genes such as ALP, Runx2 and OPN of MSCs ($P<0.05$). Overexpression of miR-27b-3p in MSCs increased the number of calcified nodules ($P<0.05$). Dual luciferase reporter gene detection confirmed that there were multiple binding sites between HIF1AN and miR-27b-3p. The mRNA and protein levels of HIF1AN were negatively regulated by miR-27b-3p. Rescue experiments showed that overexpression of HIF1AN inhibited the promotion of miR-27b-3p for the osteogenesis of MSCs ($P<0.05$). The expression of HIF1AN was up-regulated in CSCI-OP rats ($P<0.05$). micro-CT in vivo observed that miR-27b-3p mimic promoted the expression of ALP,Runx2,and OPN in CSCI-OP rats,and increased BV/TV($P<0.05$),however,these effects were inhibited by HIF1AN over-

[基金项目] 海南省卫生健康行业科研项目(20A200130)

expression ($P<0.05$). **Conclusion** miR-27b-3p was highly expressed in peripheral blood of CSCI-OP patients, which promotes osteogenic differentiation and inhibits the occurrence and progression of CSCI-OP by targeted inhibition of HIF1AN.

Keywords: miR-27b-3p; HIF1AN; spinal cord injury; osteoporosis; osteogenic differentiation

颈脊髓损伤是世界难治性病症,呈高发生率和高致残率等特点[1-2]。骨质疏松症是颈脊髓损伤的常见并发症和主要危险因素[3-4]。因此,急需探讨颈脊髓损伤后骨质疏松症(cervical spinal cord injury caused osteoporosis,CSCI-OP)的发病机制并探索针对性治疗方法以避免颈脊髓损伤后发展为骨质疏松症。微小RNA(microRNA,miRNA)普遍存在于生物体内,在结构、功能和进化上具有高度保守性,是调节其他功能基因表达的重要分子。miRNA 还可以调控骨质疏松症中间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)的成骨分化[5],但具体机制的研究尚处于初始阶段。miR-27b-3p 是一种重要的干细胞分化和细胞凋亡调节 miRNA,研究已证实 miR-27b-3p 能通过特异性下调过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 促进 MSCs 的成骨分化[6]。然而,miR-27b-3p 在 CSCI-OP 中的调控作用并不明确。本研究在体外和体内研究 miR-27b-3p 对 MSCs 成骨分化的调节,并通过 CSCI-OP 大鼠模型验证 miR-27b-3p 及其靶基因缺氧诱导因子 1α 抑制剂(hypoxia-inducible factor 1 α inhibitor,HIF1AN)对成骨分化的影响,并探讨其机制,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 试剂与耗材

大鼠 MSCs(CP-R131 细胞)购于武汉普诺赛生命科技有限公司。DMEM、青霉素、链霉素购于美国 GIBCO公司。胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)购于美国 Merck Millipore 公司。重组大鼠骨形成蛋白 2(bone morphogenetic protein,BMP2)购于美国 Sigma 公司。miR-27b-3p 抑制剂(miR-27b-3p inhibitor)及其阴性对照(NC inhibitor)、miR-27b-3p 拟似物(miR-27b-3p mimic)及其阴性对照(NC mimic)均购于上海吉玛公司。HIF1AN 过表达质粒(HIF1AN-OE)及其阴性对照(NC-OE)构建于上海吉玛公司。茜素红染色试剂盒购于上海 Beyotime 公司。Lipofectamine 2000 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司。RIPA 裂解缓冲液购于上海 Beyotime 公司。TRIzol 试剂购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司。TransScript 和 cDNA 合成试剂盒购于北京天根生物有限公司。Universal SYBR Green Fast qPCR Mix Kit 购于美国 ABclonal 公司。双荧光素酶报告基因检测试剂盒(RG027)购于上海 Beyotime公司。GAPDH(#97166)购于美国 Cell Signaling Technology 公司。HRP 偶联的亲和山羊抗小鼠 IgG(H+L)和山羊抗兔 IgG(H+L)二抗(SA00001-1)购于美国 Protein Tech Group 公司。PVDF 膜购于美国 MedChemExpress 公司。Runx2(8486S)的一抗购于美国 Cell Signaling Technology 公司。HIF1AN(批号:20210307)、ALP(批号:202107007)、OPN(批号:20211028)的一抗购于北京生工生物公司。60 只 SD 大鼠购于海南药物研究所有限责任公司(许可证号:SCXK2020-0007)。

1.2 CSCI-OP 患者的临床标本

本研究纳入 CSCI-OP 患者 30 例作为 CSCI-OP 组,同时纳入健康体检者 50 例作为对照组,收集研究对象的外周血标本。经统计学分析 2 组性别、年龄、体质量、身高等一般资料比较差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。临床标本的研究经我院伦理委员会审批通过(2020-1595LC),受试者均对本研究知情同意。CSCI-OP 组患者纳入标准:符合颈脊髓损伤后骨质疏松症的临床诊断标准;伴不同程度的颈椎节段疼痛表现;经 X 射线骨密度测定仪检测颈椎骨密度 T-Score≤ −2.5 SD;碱性磷酸酶、钙、磷值经生化检测在正常范围内。排除标准:有内分泌疾病、类风湿性关节炎等;长期服用糖皮质激素、孕激素、雄激素、雌激素、异黄酮、双膦酸盐以及降钙素等影响骨代谢的药物;患有严重神经系统、心脏系统或消化系统疾病;血压 >160/95 mmHg;存在糖尿病史;过敏体质以及对雷奈酸锶等药物过敏;其他继发性骨质疏松症;患有严重精神疾病。

1.3 MSCs 培养

将 MSCs 置于含 10% FBS、1% 青霉素和 1% 链霉素的 DMEM 培养基中,在 37 ℃、含有 95% 空气和 5% CO_2 的湿润培养箱中培养,每 2 d 换液 1 次。将汇合率达到 70% 的对数生长期细胞用于后续实验。

1.4 成骨分化诱导

在含有 10% FBS 的完全 DMEM 培养基中加入 BMP2(300 ng/mL)培养 MSCs,以诱导 MSCs 成骨分化,每 3 d 更换 1 次培养基。诱导成骨 1 d、3 d、7 d 后用茜素红染色检查基质矿化或钙沉积,通过倒置显微

镜观察细胞,并用 Western blot 检测成骨分化标志物 ALP、OPN、Runx2 的表达。

1.5 细胞转染

从 miRBase(http://www.mirbase.org/)获得成熟的 miR-27b-3p 序列。当细胞汇合率达到 70%时,加入 BMP2(300 ng/mL)并联合转染 10 nmol/L 的 miR-27b-3p mimic 或 10 nmol/L 的 miR-27b-3p inhibitor,并于 37 ℃下孵育 24 h。

1.6 茜素红染色

MSCs 细胞培养 14 d 后矿化形成不透明的钙化结节。细胞样品用 PBS 洗涤 1 ~ 2 次,95% 乙醇固定 10 min,再用 PBS 洗涤 1 ~ 2 次,用 0.1% 茜素红溶液染色 10 min。最后用 PBS 冲洗,倒置光学显微镜下观察细胞中的钙结节。

1.7 双荧光素酶报告基因检测

使用 TargetScan 数据库版本 7.1(http://www.targetscan.org/vert_71/)预测 miR-27b-3p 的靶基因。设计野生型(WT)和突变型(MUT)HIF1AN 3'-UTR 荧光素酶报告载体,使用 Lipofectamine™ 2000 将 miR-27b-3p mimic 或 NC mimic 与构建的 WT 或 MUT 荧光素酶报告载体共转染到 MSCs 细胞中;24 h 后使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒评估荧光素酶活性。

1.8 定量 PCR

诱导 MSCs 成骨 1 d、3 d、7 d 后,根据说明书,使用 TRIzol 试剂分离总 RNA。然后使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA。使用 iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad)进行定量 PCR。miR-27b-3p 的序列是 5'-UAUGGCUUUCUUUUCCUGUGUG-3'。所用引物为:miR-27b-3p,正向 5'-AGCATAATACAGCAGGCACAGAC-3',反向 5'-AAAGGTTTGTTCTCCACTCTCTCAC-3';HIF1AN,正向 5'-GTACTGGTGGCATCACATAGAG-3',反向 5'-CTGATGGGCTTTGAGAGGATATT-3';GAPDH,正向 5'-AGCTTCGGCACATATTTCATCTG-3',反向 5'-CGTTCACTCCCATGACAAACA-3';U6,正向 5'-TTGACTCCACAAAAGGGAAGAAG-3',反向 5'-TCCAGAGGTCTGTTGAATCCG-3'。GAPDH 或 U6 用作内部对照。HIF1AN 的表达采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析。

1.9 CSCI-OP 大鼠模型

60 只 SPF 级成年雄性 SD 大鼠,鼠龄 7 周,体质量(225 ± 11)g,在正常明/暗(12 h/12 h)循环的温控室中饲养,室温(23 ± 2)℃,自由进食和饮水。将 60 只 SD 大鼠随机分为 Control 组、OP 组、NC mimic + OP 组、miR-27b-3p mimic + OP 组、NC-OE + miR-27b-3p mimic + OP 组、HIF1AN-OE + miR-27b-3p mimic + OP 组,每组 10 只。其中,HIF1AN-OE + miR-27b-3p mimic + OP 组大鼠使用戊巴比妥钠(2% 戊巴比妥钠 0.3 mL/100 g体质量,腹腔注射)全身麻醉,经尾静脉注射 HIF1AN-OE(200 nmol/100 g)和 miR-27b-3p mimic(100 nmol/100 g)后行 $C_5 \sim C_7$ 椎板切除,以锐刀横切下暴露该颈段脊髓后止血缝合,每日辅助排尿排便 2 ~ 3 次,每隔 3 d 尾静脉同时注射 HIF1AN-OE(200 nmol/100 g)和 miR-27b-3p mimic(100 nmol/100 g)。NC-OE + miR-27b-3p mimic + OP 组大鼠除尾静脉注射 NC-OE(200 nmol/100 g)和 miR-27b-3p mimic(100 nmol/100 g)外,其余操作与 HIF1AN-OE + miR-27b-3p mimic + OP 组一致。miR-27b-3p mimic + OP 组大鼠除尾静脉只注射 miR-27b-3p mimic(100 nmol/100 g)外,其余操作与 HIF1AN-OE + miR-27b-3p mimic + OP 组一致。NC mimic + OP 组大鼠除尾静脉只注射 NC mimic(100 nmol/100 g)外,其余操作与 HIF1AN-OE + miR-27b-3p mimic + OP 组一致。OP 组大鼠不进行药物注射,全身麻醉后行 $C_5 \sim C_7$ 椎板切除,其余操作与 NC mimic + OP 组一致。Control 组大鼠使用戊巴比妥钠(2%戊巴比妥钠0.3 mL/100 g 体质量,腹腔注射)全身麻醉后仅切开 $C_5 \sim C_7$ 椎板对应的皮肤,随后止血缝合。每组大鼠于 28 d 后行 micro-CT分析,随后进行安乐死并收集股骨组织。所有动物实验程序均经我院伦理委员会批准(2020-031602DW)。

1.10 Western blot 分析

收集各组 MSCs 或研磨后的大鼠股骨组织匀浆,在冰上于 RIPA 裂解缓冲液中裂解。BCA 试剂盒测定蛋白的浓度。使用 SDS-PAGE 分离 50 μg 蛋白,随后转移蛋白到 PVDF 膜上。将 PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶封闭,并与抗 ALP(1∶600)、抗 HIF1AN(1∶800)、抗 OPN(1∶500)、抗 Runx2(1∶400)的一抗在 4 ℃下孵育过夜。用含 0.1% Tween20 的 PBS 洗膜 3 次,每次 10 min,并与 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(H + L)的二抗(1∶2 000)在室温下孵育 2 h。随后用增强的化学发光试剂显色,并使用 ImageJ 软件进行分析。

1.11 micro-CT 分析

使用 Inveon 微正电子发射断层扫描(PET)/CT 仪器(德国西门子)进行骨扫描。用微型 CT 从股骨头到股骨髁扫描股骨和股骨头结构。使用 Inveon 分析工作站软件分析并获得骨体积分数(BV/TV)。

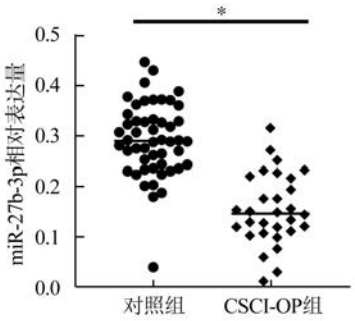
1.12 统计学分析

本研究的数据都使用 GraphPad PRISM 5.01 进行数据录入和统计学分析,正态分布的数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析(*ANOVA*),两两比较行 *LSD-t* 检验。检验水准为 $\alpha = 0.05$,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CSCI-OP 患者中 miR-27b-3p 的表达下调

与对照组比较,CSCI-OP 组外周血中 miR-27b-3p 的表达显著下调,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。



*:与对照组比较,$P < 0.05$

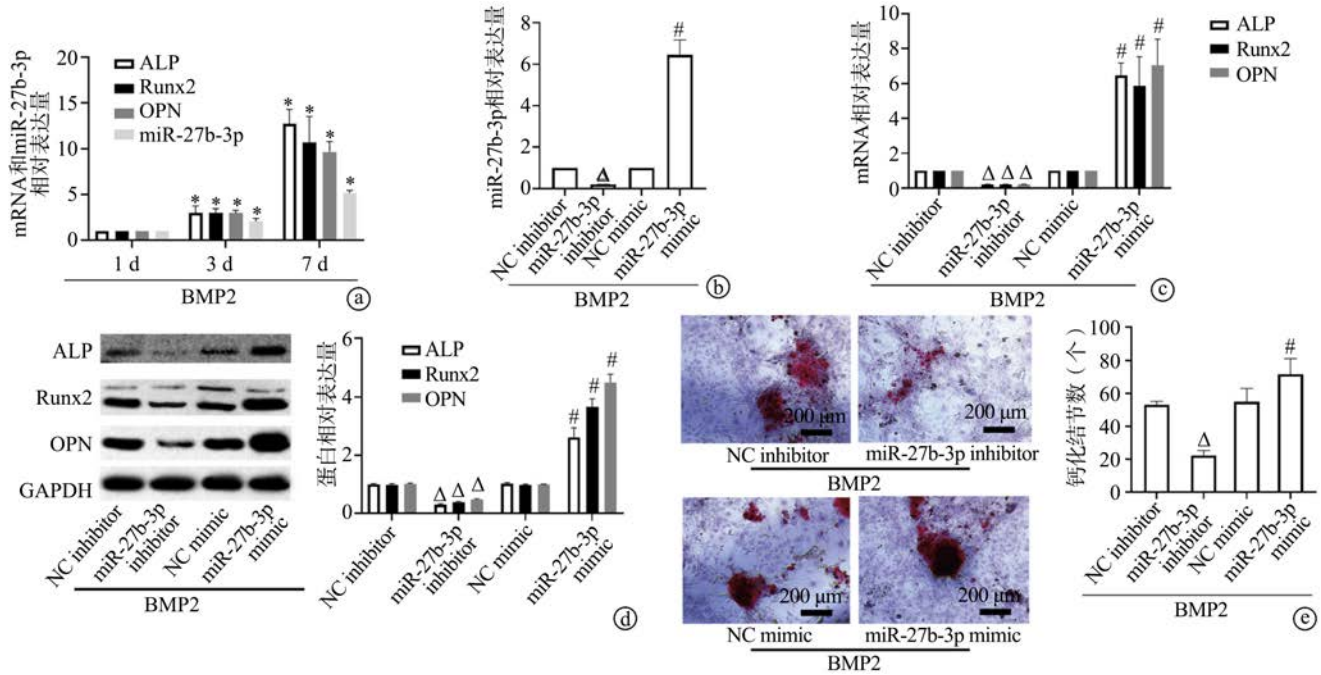
图 1 对照组和 CSCI-OP 组 miR-27b-3p 表达水平

2.2 miR-27b-3p 参与 MSCs 的成骨分化

采用定量 PCR 检测成骨相关基因的 mRNA 表达,结果显示,随着成骨诱导时间的延长,ALP、Runx2 和 OPN 的 mRNA 表达逐渐升高($P < 0.05$),miR-27b-3p 表达逐渐上调($P < 0.05$),见图 2a。成骨诱导 7 d 后,与 NC mimic 组相比,转染 miR-27b-3p mimic 的 MSCs 中 miR-27b-3p 表达及 ALP、Runx2 和 OPN mRNA 水平显著增加($P < 0.05$);转染 miR-27b-3p inhibitor 则得到相反的结果($P < 0.05$),见图 2b、c。Western blot 进一步证实了 miR-27b-3p 对 ALP、Runx2 和 OPN 蛋白表达的调控作用($P < 0.05$),见图 2d。MSCs 过表达 miR-27b-3p 后,钙化结节数量增加($P < 0.05$),说明矿化能力增强;MSCs 抑制 miR-27b-3p 后,钙化结节数量减少($P < 0.05$),说明矿化能力下降,见图 2e。

2.3 HIF1AN 是 miR-27b-3p 在 MSCs 中的靶基因

构建野生型 HIF1AN(WT-HIF1AN-3'UTR)和突变型 HIF1AN(MUT-HIF1AN-3'UTR),双荧光素酶报告基因检测显示,HIF1AN 与 miR-27b-3p 具有多个结合位点(图 3a)。miR-27b-3p mimic 和 WT-HIF1AN-3'UTR 共转染后 MSCs 的荧光素酶活性显著降低($P < 0.05$),而 miR-27b-3p mimic 和 MUT-HIF1AN-3'UTR 共转染后,荧光素酶活性无显著变化($P > 0.05$),见图 3b。随后发现,HIF1AN 的 mRNA 和蛋白水平均受到 miR-27b-3p的负调控($P < 0.05$),见图 3c、d。

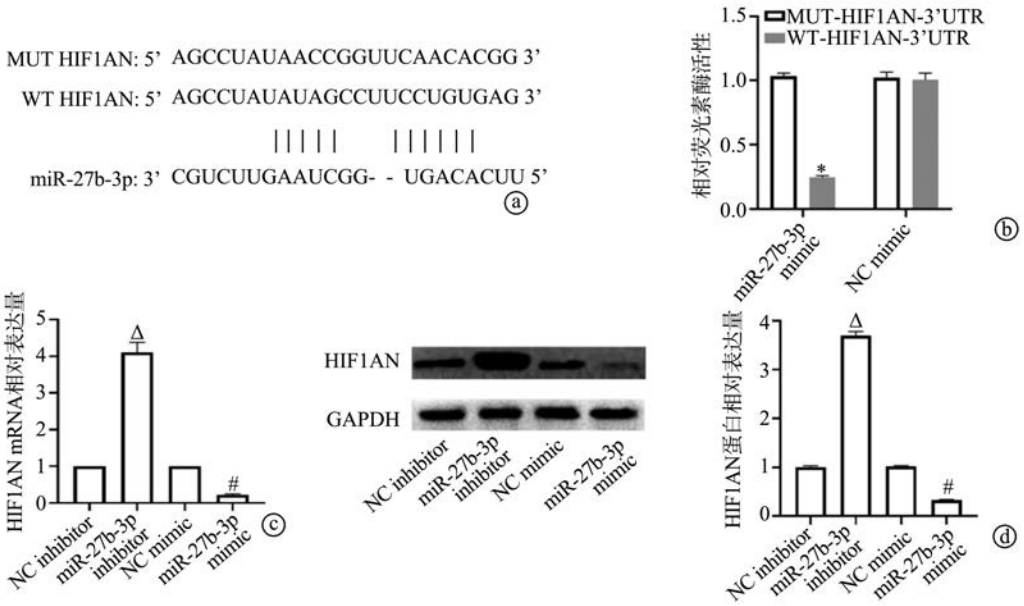


a:定量 PCR 检测 BMP2 诱导 MSCs 后 ALP、Runx2、OPN mRNA 水平和 miR-27a-3p 表达;b、c:定量 PCR 检测 BMP2 处理 MSCs 的条件下 miR-27b-3p mimic 和 miR-27b-3p inhibitor 对 miR-27a-3p 和 ALP、Runx2、OPN mRNA 水平的影响;d:Western blot 检测 BMP2 处理 MSCs 的条件下 miR-27b-3p mimic 和 miR-27b-3p inhibitor 对 ALP、Runx2、OPN 蛋白表达的影响;e:茜素红染色检测 BMP2 处理 MSCs 的条件下 miR-27b-3p mimic 和 miR-27b-3p inhibitor 对钙化结节的影响 *:与 1 d 相比,$P < 0.05$;△:与 NC inhibitor 组相比,$P < 0.05$;#:与 NC mimic 组相比,$P < 0.05$

图 2 miR-27b-3p 对 BMP2 诱导 MSCs 成骨分化的影响

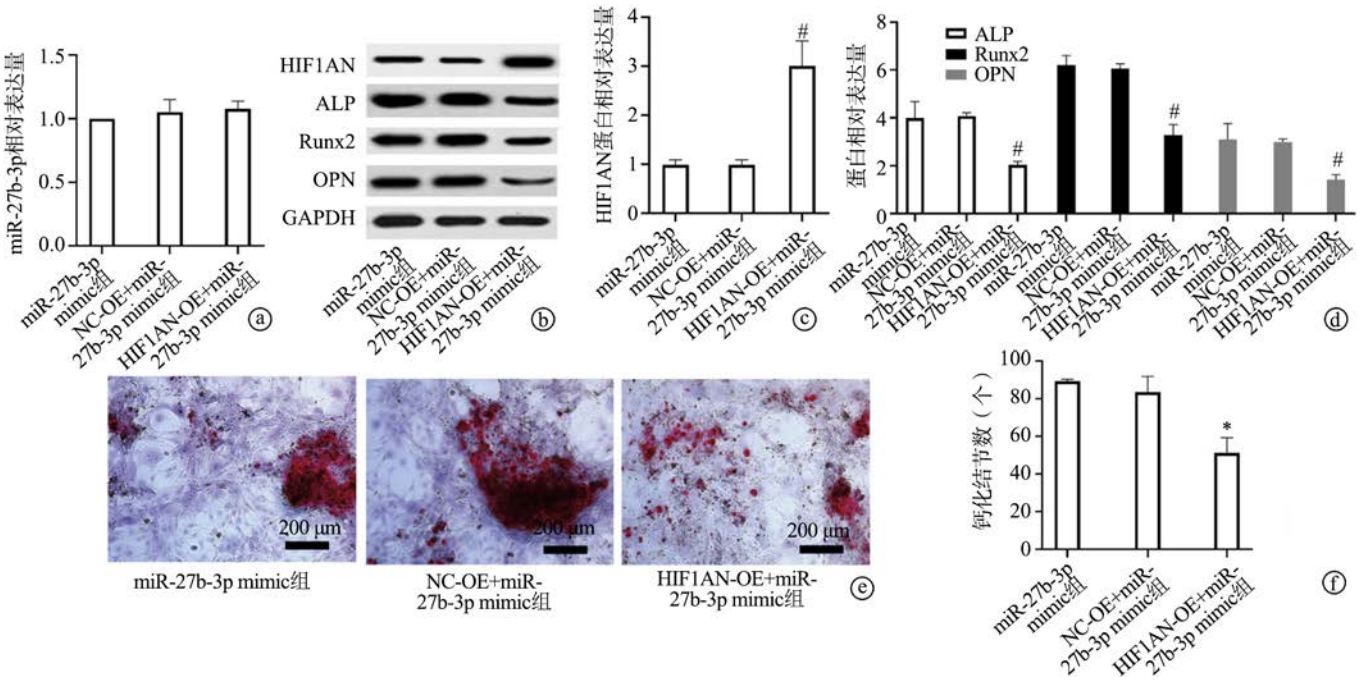
2.4 miR-27b-3p 通过 HIF1AN 调控 MSCs 的成骨分化

为进一步探究 miR-27b-3p 和 HIF1AN 在调节 MSCs 成骨过程中的作用,本研究使用 HIF1AN-OE 进行挽救实验。结果显示,与 NC-OE + miR-27b-3p mimic 组比较,HIF1AN-OE + miR-27b-3p mimic 组中 HIF1AN 的蛋白表达上调($P<0.05$),但 miR-27b-3p 的表达变化无统计学意义($P>0.05$),见图 4a ~ c。与 NC-OE + miR-27b-3p mimic 组比较,HIF1AN-OE + miR-27b-3p mimic 组中 ALP、Runx2 和 OPN 蛋白水平降低(均 $P<0.05$),见图 4b、d。与 miR-27b-3p mimic 组比较,HIF1AN-OE + miR-27b-3p mimic 组的钙化结节数量显著减少($P<0.05$),见图 4e、f。



a:HIF1AN 和 miR-27b-3p 序列的结合图;b:双荧光素酶报告基因检测 HIF1AN 和 miR-27b-3p 直接结合;c:定量 PCR 检测 HIF1AN mRNA的表达;d:Western blot 检测 HIF1AN 蛋白的表达 *:与 MUT-HIF1AN-3'UTR 相比,$P<0.05$;△:与 NC inhibitor 组相比,$P<0.05$;#:与 NC mimic 组相比,$P<0.05$

图 3 MSCs 中 HIF1AN 是 miR-27b-3p 的靶基因

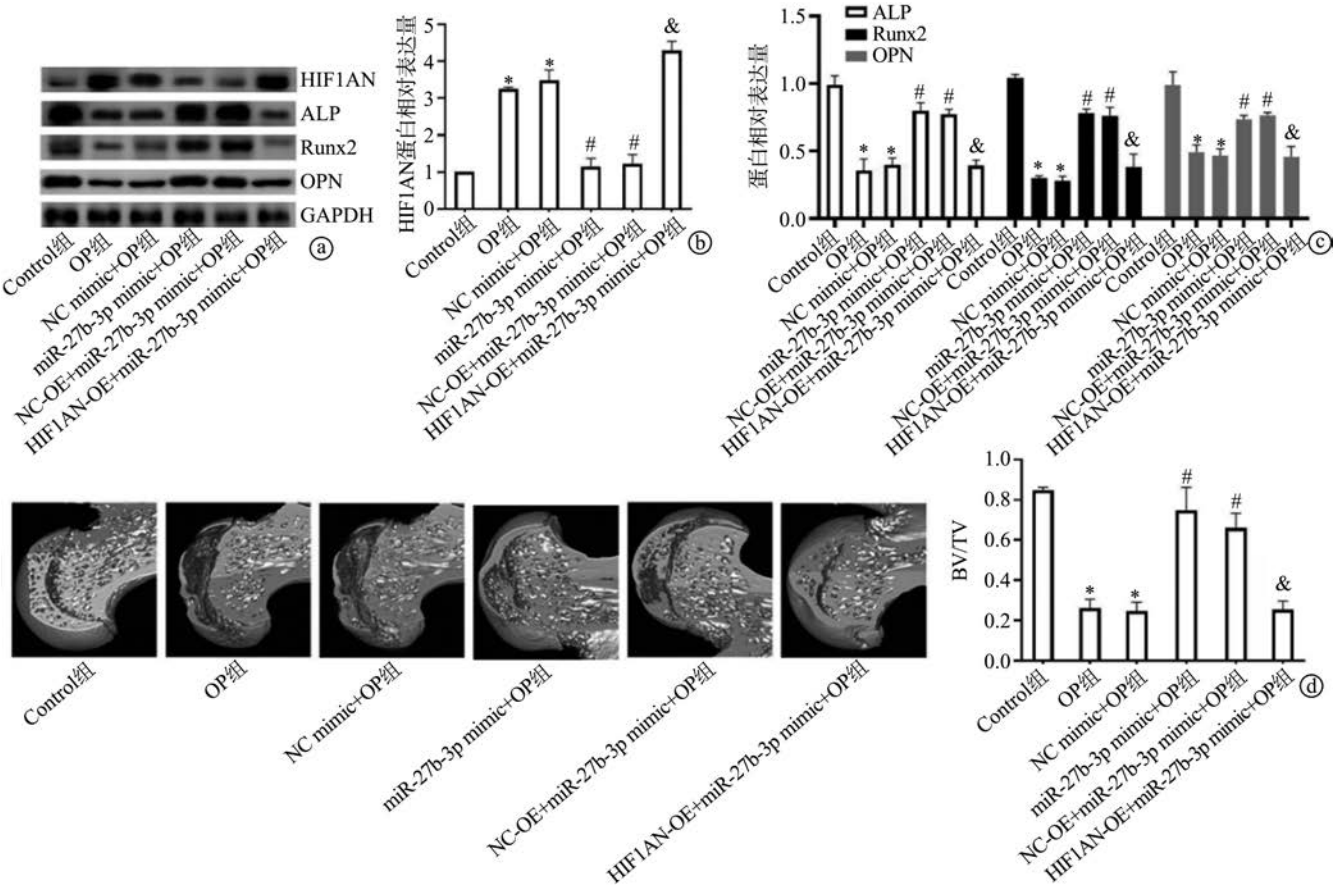


a:定量 PCR 检测 HIF1AN 过表达联合 miR-27b-3p mimic 对 miR-27a-3p 表达的影响;b ~ d:Western blot 检测 HIF1AN 过表达联合 miR-27b-3p mimic 对 MSCs 中 HIF1AN 和 ALP、Runx2、OPN 表达水平的影响;e、f:茜素红染色检测 HIF1AN 过表达联合 miR-27b-3p mimic 对 MSCs 中钙化结节的影响 *:与 miR-27b-3p mimic 组相比,$P<0.05$;#:与 NC-OE + miR-27b-3p mimic 组相比,$P<0.05$

图 4 miR-27b-3p 通过 HIF1AN 调控 MSCs 的成骨分化

2.5 miR-27b-3p 通过 HIF1AN 调控 CSCI-OP 大鼠的成骨分化

与 Control 组比较,OP 组大鼠股骨组织中 ALP、Runx2 和 OPN 蛋白表达降低,且 BV/TV 明显降低,而 HIF1AN 上调,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 NC mimic + OP 组比较,miR-27b-3p mimic + OP 组中 ALP、Runx2 和 OPN 蛋白表达明显增加,且 BV/TV 明显增加,而 HIF1AN 明显下调,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 NC-OE + miR-27b-3p mimic + OP 组比较,HIF1AN-OE + miR-27b-3p mimic + OP 组中 ALP、Runx2 和 OPN 蛋白表达降低,且 BV/TV 明显降低,而 HIF1AN 蛋白明显上调,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 5。



a~c:Western blot 检测 HIF1AN 过表达联合 miR-27b-3p mimic 对大鼠股骨组织中 HIF1AN 和 ALP、Runx2、OPN 蛋白表达的影响;d:micro-CT分析 HIF1AN 过表达联合 miR-27b-3p mimic 对股骨的骨体积分数的影响 *:与 Control 组相比,$P<0.05$;#:与 NC mimic + OP 组相比,$P<0.05$;&:与 NC-OE + miR-27b-3p mimic + OP 组相比,$P<0.05$

图 5 miR-27b-3p 通过 HIF1AN 调控 CSCI-OP 大鼠的骨生成

3 讨论

本研究结果显示,miR-27b-3p 通过与 HIF1AN mRNA 的 3'-UTR 位点结合,阻碍 HIF1AN 表达,从而促进 MSCs 的成骨细胞分化,表明 miR-27b-3p 在成骨过程中具有重要作用。大量研究表明,miRNA 可以作为成骨细胞分化的关键调节剂。miR-141 和 miR-200a 可通过靶向 MSCs 中的 Dlx5 参与成骨分化[7];miR-378 可以通过靶向 BMP2 促进成骨细胞分化[8];此外,miR-764-5p可通过抑制 CHIP/STUB1 表达促进成骨细胞分化[9]。miR-27b 是一种与成骨相关的 miRNA,其表达水平在大鼠脂肪干细胞成骨过程中下调[10-11]。本研究发现,与对照组相比,CSCI-OP 组患者外周血中 miR-27b-3p 的表达下调,而在 MSCs 受 BMP2 诱导后 miR-27b-3p 表达上调;miR-27b-3p 过表达显著增加了 ALP 的活性和细胞外基质钙沉积,而 miR-27b-3p 敲低则抑制了上述过程。这些发现与先前研究结果一致[6]。

越来越多的证据支持 Runx2 作为关键的成骨细胞谱系决定转录因子参与指导成骨细胞分化这一观点[12-13]。Runx2 是成骨中的主要基因,其能够诱导 OPN 和骨钙素等骨相关标志物的表达。本研究中,miR-27b-3p 过表达上调了 Runx2、OPN、ALP 的表达,miR-27b-3p 敲低则下调了上述蛋白的表达,表明 miR-27b-3p可以促进成骨分化,与文献结果一致[6]。

据报道,HIF-1α 信号通路的激活可上调 MSCs 中的成骨分化相关基因的表达[14]。研究还表明,增加 HIF-1α 的表达可以促进骨髓干细胞的成骨细胞分化[15]。HIF1AN 被认为是一种可以与 HIF-1α 相互作用的重要抑制剂。大量证据表明,HIF1AN 在多种组织的分化中起着关键作用。例如,HIF1AN 受 miR-455 的靶向调控,从而调节棕色脂肪细胞分化[16];HIF1AN 还受到 miR-31 的靶向调控,可促进表皮和角膜上皮中的促分化表型增加[17-18]。研究表明,miR-27b-3p 能影响 HIF1AN 的蛋白水平,其可与 HIF1AN3'-UTR 结合并促进视网膜血管的生成[19]。然而,目前尚未见关于 miR-27b-3p 通过靶向 HIF1AN 调节成骨分化的报道。本研究发现,在 MSCs 中 HIF1AN 是 miR-27b-3p 的直接靶标,HIF1AN 的过表达降低了 MSCs 中的 ALP、OPN 和 Runx2 的表达以及钙沉积,还逆转了 miR-27b-3p mimic对成骨分化的正向影响。另外,我们在颈脊髓损伤后骨质疏松症动物模型中观察到 miR-27b-3p 可以通过抑制 HIF1AN 促进颈脊髓损伤后骨质疏松症大鼠的成骨分化,颈脊髓损伤后骨质疏松症大鼠的股骨组织中 ALP、Runx2 和 OPN 下调,且 BV/TV 明显降低,而 HIF1AN 表达上调。miR-27b-3p mimic 则可以明显促进 ALP、Runx2 和 OPN 蛋白的表达和 BV/TV 的增加,并明显抑制 HIF1AN 的表达;然而过表达 HIF1AN 后上述指标变化都被逆转。表明 miR-27b-3p 可通过靶向 HIF1AN 促进 SCI-OP 大鼠 MSCs 的成骨分化。

综上所述,本研究的体外实验证实,miR-27b-3p 通过靶向抑制 HIF1AN 促进 MSCs 的成骨分化;而体内实验证实,miR-27b-3p 可通过靶向抑制 HIF1AN 促进骨生成,进而改善 CSCI-OP 大鼠的骨质疏松症。这为 miRNA 在成骨分化中的作用和调控机制提供了新的见解,提示靶向 miR-27b-3p 的治疗方法可用于增强新骨形成和治疗颈脊髓损伤诱导的骨丢失。

[参考文献]

[1] Ahuja CS,Wilson JR,Nori S,et al. Traumatic spinal cord injury[J]. Nat Rev Dis Primers,2017,3(1):17018. doi:10.1038/nrdp.2017.18.

[2] Khan A,Pujol C,Laylor M,et al. Falls after spinal cord injury:a systematic review and meta-analysis of incidence proportion and contributing factors[J]. Spinal Cord,2019,57(7):526 - 539. doi:10.1038/s41393 - 019 - 0274 - 4.

[3] Soleyman-Jahi S,Yousefian A,Maheronnaghsh R,et al. Evidence-based prevention and treatment of osteoporosis after spinal cord injury: a systematic review[J]. Eur Spine J,2018,27(8):1798 - 1814. doi:10.1007/s00586 - 017 - 5114 - 7.

[4] Zamarioli A,Andrade Staut C,Volpon JB. Review of secondary causes of osteoporotic fractures due to diabetes and spinal cord injury[J]. Curr Osteoporos Rep,2020,18(3):148 - 156. doi:10.1007/s11914 - 020 - 00571 - w.

[5] Yang Y,Wang Y,Wang F,et al. The roles of miRNA,lncRNA and circRNA in the development of osteoporosis[J]. Biol Res,2020,53(1):40. doi:10.1186/s40659 - 020 - 00309 - z.

[6] Seenprachawong K,Tawornsawutruk T,Nantasenamat C,et al. miR-130a and miR-27b enhance osteogenesis in human bone marrow mesenchymal stem cells via specific down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ[J]. Front Genet,2018,9:543. doi:10.3389/fgene.2018.00543.

[7] Itoh T,Nozawa Y,Akao Y. MicroRNA-141 and-200a are involved in bone morphogenetic protein-2-induced mouse pre-osteoblast differentiation by targeting distal-less homeobox 5[J]. J Biol Chem,2009,284(29):19272 - 19279. doi:10.1074/jbc.M109.014001.

[8] Hupkes M,Sotoca AM,Hendriks JM,et al. MicroRNA miR-378 promotes BMP2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells[J]. BMC Mol Biol,2014,15:1. doi:10.1186/1471 - 2199 - 15 - 1.

[9] Guo J,Ren F,Wang Y,et al. miR-764-5p promotes osteoblast differentiation through inhibition of CHIP/STUB1 expression[J]. J Bone Miner Res,2012,27(7):1607 - 1618. doi:10.1002/jbmr.1597.

[10] Peng W,Zhu S,Li X,et al. miR-27b-3p suppressed osteogenic differentiation of maxillary sinus membrane stem cells by targeting Sp7[J]. Implant Dent,2017,26(4):492 - 499. doi:10.1097/ID.0000000000000637.

[11] Lv H,Yang T,He A,et al. miR-27b attenuates dexamethasone-inhibited proliferation and osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells by targeting PPARγ2[J]. Exp Ther Med,2022,23(2):127. doi:10.3892/etm.2021.11050.

[12] Sun M,Chi G,Li P,et al. Effects of matrix stiffness on the morphology,adhesion,proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Int J Med Sci,2018,15(3):257 - 264. doi:10.7150/ijms.21620.

[13] 胡晓青,张 辛,代岭辉,等. 骨髓间充质干细胞成骨分化过程中 Runx2 的表观遗传学修饰[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2014,30(2):150 - 155. doi:10.13865/j.cnki.cjbmb.2014.02.011.

[14] Ran Q,Yu Y,Chen W,et al. Deferoxamine loaded titania nanotubes substrates regulate osteogenic and angiogenic differentiation of MSCs via activation of HIF-1α signaling[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl,2018,91(1):44 - 54. doi:10.1016/j.msec.2018.04.098.

[15] Yang C,Liu X,Zhao K,et al. miRNA-21 promotes osteogenesis via the PTEN/PI3K/Akt/HIF-1α pathway and enhances bone regeneration in critical size defects[J]. Stem Cell Res Ther,2019,10(1):65. doi:10.1186/s13287 - 019 - 1168 - 2.

[16] Zhang H,Guan M,Townsend KL,et al. MicroRNA-455 regulates brown adipogenesis via a novel HIF1an-AMPK-PGC1α signaling network[J]. EMBO Rep,2015,16(10):1378 - 1393. doi:10.15252/embr.201540837.

[17] Peng H,Kaplan N,Hamanaka RB,et al. microRNA-31/factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1 nexus regulates keratinocyte differentiation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2012,109(35):14030 - 14034. doi:10.1073/pnas.1111292109.

[18] Peng H,Kaplan N,Yang W,et al. FIH-1 disrupts an LRRK1/EGFR complex to positively regulate keratinocyte migration[J]. Am J Pathol,2014,184(12):3262 - 3271. doi:10.1016/j.ajpath.2014.08.014.

[19] Lazzara F,Trotta MC,Platania CBM,et al. Stabilization of HIF-1α in human retinal endothelial cells modulates expression of miRNAs and proangiogenic growth factors[J]. Front Pharmacol,2020,11(2):1063 - 1076. doi:10.3389/fphar.2020.01063.

(编辑:杨 颖)