

模拟失重下 miR-138-5p 靶向 SIRT1 负调控成骨细胞分化的研究

徐丽群, 张丽君, 李高志, 张晓雁, 王艺璇, 胡泽兵, 曹新生, 石 菲, 张 舒

空军军医大学 航空航天生物动力学教研室, 航空航天医学教育部重点实验室, 陕西西安 710032

摘要: **背景** 机械刺激对于维持骨骼重塑和平衡至关重要, 机械卸载引起的骨骼系统损伤是长期航天飞行的主要局限性之一。研究表明微小 RNA(miRNA) 可通过调控与骨形成相关的基因和信号通路调节成骨细胞功能。**目的** 探究模拟失重下 miR-138-5p/SIRT1 信号通路对成骨细胞分化的影响, 为失重性骨质丢失的在体靶向干预寻求治疗靶点。**方法** 利用 2D 回转器对前成骨细胞 MC3T3-E1 进行模拟失重处理, 验证沉默信息调节因子 2 相关酶 1(SIRT1) 及 miR-138-5p 在模拟失重下的表达发生变化; 向 MC3T3-E1 细胞中转染 miR-138-5p mimic、inhibitor、pcDNA3.1(+)-SIRT1 及相应的阴性对照进行功能验证; 向 MC3T3-E1 细胞中转染 inhibitor-NC、miR-138-5p inhibitor 后模拟失重处理 48 h 进行挽救实验; 采用 qRT-PCR 方法检测 miRNA 及 SIRT1、Runx2、Osx 的 mRNA 表达变化; 采用 Western blot 方法检测 SIRT1、Runx2、Osx 的蛋白表达变化; 采用碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性检测和 ALP 染色方法检测成骨细胞分化能力的变化。**结果** 模拟失重下, MC3T3-E1 细胞中 Runx2、SIRT1 的 mRNA 及蛋白均表达下降 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 转染 miR-138-5p mimic 和 inhibitor 后, qRT-PCR、Western blot、ALP 活性及 ALP 染色检测均表明过表达 miR-138-5p 能够显著抑制成骨细胞分化, 而抑制 miR-138-5p 能够促进 MC3T3-E1 细胞分化 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。miR-138-5p mimic 与 pEX-SIRT1 共转染实验表明 miR-138-5p 通过抑制 SIRT1 负调控成骨细胞分化 ($P < 0.01$)。此外, 抑制 miR-138-5p 可以降低模拟失重对成骨细胞的分化抑制, 表现为促进 SIRT1、Runx2、Osx mRNA 和蛋白表达 ($P < 0.01$)。**结论** SIRT1 表达在模拟失重下调, 而 miR-138-5p 表达上调; miR-138-5p 通过直接靶向 SIRT1 调控 Runx2、Osx 的 mRNA 及蛋白表达, 抑制成骨细胞分化; 此外, 抑制 miR-138-5p/SIRT1 通路可以部分降低模拟失重对成骨细胞的分化抑制, miR-138-5p 可以作为潜在的干预靶点。

关键词: miR-138-5p 基因; SIRT1 基因; 模拟失重; 成骨细胞分化; MC3T3-E1 细胞

中图分类号: R 852.22 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-5227(2021)10-1074-07 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-5227.2021.10.014

网络出版时间: 2021-09-01 17:39

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/10.1117.R.20210901.1635.008.html>

引用本文: 徐丽群, 张丽君, 李高志, 等. 模拟失重下 miR-138-5p 靶向 SIRT1 负调控成骨细胞分化的研究 [J]. 解放军医学院学报, 2021, 42 (10): 1074-1080.

miR-138-5p inhibits osteoblast differentiation by downregulating SIRT1 expression under simulated weightlessness

XU Liqun, ZHANG Lijun, LI Gaozhi, ZHANG Xiaoyan, WANG Yixuan, HU Zebing, CAO Xinsheng, SHI Fei, ZHANG Shu

Department of Aerospace Biodynamics, The Key Laboratory of Aerospace Medicine, Chinese Ministry of Education, Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Corresponding author: ZHANG Shu. Email: shuzhang@fmmu.edu.cn

Abstract: **Background** Mechanical stimulation plays a vital role in maintaining bone remodeling and homeostasis, and mechanical unloading-induced skeletal system damage is one of the main limitations for long-term space flight. miRNA and SIRT1 can regulate osteoblasts functions via regulating signaling pathways related to bone formation. **Objective** To explore the effect of miR-138-5p/SIRT1 signaling pathway on osteoblast differentiation under simulated weightlessness condition, and provide a therapeutic target for intervention of weightlessness-induced bone loss. **Methods** 2D clinostat was used to culture MC3T3-E1 under simulated weightlessness to verify the changes of expression of SIRT1. miR-138-5p mimic, miR-138-5p inhibitor, pcDNA3.1(+)-SIRT1 and the corresponding negative control were transfected into MC3T3-E1 cells for functional experiments, MC3T3-E1 cells were treated with simulated weightlessness for 48h after transfecting with inhibitor-NC or miR-138-5p inhibitor, and qRT-PCR was used to detect the mRNA expressions of miRNA and SIRT1, Runx2, Osx mRNA. The protein expression of SIRT1, Runx2 and Osx were detected by Western blot, and Alkaline phosphatase (ALP) activity and ALP staining were used to detect osteoblast differentiation. **Results** The expressions of Runx2, SIRT1 mRNA and protein in MC3T3-E1 cells decreased under simulated weightlessness ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); After transfecting miR-138-5p mimic or inhibitor into MC3T3-E1 cells, qRT-PCR, Western Blot, ALP

收稿日期: 2021-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31971171; 81701856)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31971171; 81701856)

作者简介: 徐丽群, 女, 在读硕士。研究方向: 航空航天医学。Email: 913349205@qq.com

通信作者: 张舒, 男, 博士, 教授, 博士生导师。Email: shuzhang@fmmu.edu.cn

activity and ALP staining detection showed that miR-138-5p significantly inhibited osteoblast differentiation ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). After miR-138-5p mimic and pEX-SIRT1 being co-transfecting into MC3T3-E1 cells, the result showed that miR-138-5p negatively regulated osteoblast differentiation via inhibiting SIRT1 ($P < 0.01$). Furthermore, knockdown of endogenous miR-138-5p could alleviate the suppression of SIRT1 expression and osteoblastic differentiation under simulated weightlessness ($P < 0.01$). **Conclusion** SIRT1 is downregulated while miR-138-5p is upregulated under simulated weightlessness. miR-138-5p regulates the protein expression level of Runx2 and Osx via targeting SIRT1 and inhibits osteoblast differentiation. In addition, silencing miR-138-5p/SIRT1 alleviates the suppression effect of simulated weightlessness on osteoblast differentiation, indicating miR-138-5p may be a potential target for weightlessness-induced bone loss.

Keywords: miR-138-5p; SIRT1; simulated weightlessness; osteogenic differentiation; MC3T3-E1 cells

Cited as: Xu LQ, Zhang LJ, Li GZH, et al. miR-138-5p inhibits osteoblast differentiation by downregulating SIRT1 expression under simulated weightlessness [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2021, 42 (10) : 1074-1080.

机械刺激在维持骨骼重塑和平衡中起着至关重要的作用^[1-2]。长期卧床休息或太空飞行会导致严重的骨质流失,引发骨质疏松症和骨折^[3-4]。成骨细胞可以响应机械刺激的变化,并转导细胞内的生化信号调节基因表达,影响成骨细胞的增殖、分化和凋亡^[5-6]。沉默信息调节因子 2 相关酶 I (silent information regulator 1, SIRT1), 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide +, NAD+) 依赖性组蛋白去乙酰化酶参与调控多种细胞功能,如细胞周期、昼夜节律、细胞衰老、血管生成、能量代谢等^[7]。大量研究已表明 SIRT1 通过调控成骨细胞的增殖、分化及凋亡在骨骼发育和重塑中发挥至关重要的作用^[8-9]。但其能否在模拟失重下影响成骨细胞功能及上游调控机制尚不完全清楚。微小 RNA(miRNA) 是一类内源性非编码小 RNA,通过靶向 mRNA 抑制基因转录和蛋白翻译发挥作用^[10-11]。研究表明 miRNA 对骨稳态和骨骼重塑至关重要,可通过激活或抑制大量与骨形成相关的基因和信号通路调节成骨细胞的增殖、分化和凋亡^[5, 10, 12]。此外,已报道大量 miRNA 对失重敏感,并且对成骨细胞功能有显著影响,如 miR-132-3p、miR-139-3p、miR-320-3p 等^[13-15]。最近研究表明,miR-138-5p 是一种机械敏感的 miRNA,可以调节成骨细胞功能^[16]。本研究以 MC3T3-E1 前成骨细胞为研究对象,检测了 SIRT1 和 miR-138-5p 在模拟失重下的表达,探究失重性或废用性骨质疏松症发生机制,为治疗靶点的选择提供实验依据。

材料与方法

1 材料 小鼠前成骨细胞系 MC3T3-E1(中国科学院上海细胞库), α -MEM 培养基 (Gibco 公司), 胎牛血清 (四季青公司), 青-链霉素双抗 (Gibco 公司), 胰蛋白酶 (Gibco 公司), 2D 回转器 (中国航天员科研训练中心), mimic-138-5p、inhibitor-138-

5p、si-SIRT1、pcDNA3.1(+)-SIRT1 及相应的阴性对照 (上海吉玛制药技术有限公司), RNAiso Plus 细胞裂解液, SYBR®Premix Ex Taq™、Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit、Prime Script®RT reagent Kit(TaKaRa 公司), PCR 引物 (上海生工生物工程股份有限公司), M-PER 哺乳动物蛋白抽提试剂 (Thermo Fisher Scientific 公司), 预制胶 (美国 Invitrogen 公司), PVDF 膜 (美国 Invitrogen 公司), BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Sigma 公司), 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所), BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色试剂盒 (中国 Beyotime 公司), qRT-PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司), ECL 发光检测试剂盒 (Merck Millipore 公司), PBS 缓冲溶液 (Gibco 公司), 酶标仪 (Bio-Rad 公司), 化学发光仪 (Tanon-4200, 上海天能科技有限公司)。

2 细胞培养和体外分化 用含有 10% 胎牛血清 (Gibco)、1% 青霉素和 1% 链霉素 (Gibco) 的 α -MEM 培养基, 在 37℃ 培养箱 (5% CO₂, 95% 湿度) 中常规培养小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 细胞系。为了研究成骨细胞分化, 用成骨诱导培养基常规培养 MC3T3-E1 细胞 (成骨诱导培养基成分: 10% 胎牛血清, 1% 青霉素, 1% 链霉素, 100 nmol/L 地塞米松, 50 μ g/mL 抗坏血酸, 10 mmol/L β -甘油磷酸)。实验均用第 8~12 代的细胞, 所有实验重复 3 次。

3 细胞模拟失重实验 2D 回转器用于模拟地面细胞的失重环境, 将 MC3T3-E1 细胞以 5×10^5 /瓶的密度接种在 25 cm² 专用回转培养瓶中常规培养。细胞贴壁并融合后, 在培养瓶中灌满培养基并加塞, 此过程确保完全去除气泡。最后, 将培养瓶置于 2D 回转器, 围绕其水平轴以 24 r/min 旋转 24 h、48 h 和 72 h, 获得的细胞为失重组 (Clino)。对照组 (Con) 置入 37℃ 孵箱中普通培养。

4 细胞转染 将 MC3T3-E1 细胞以适当的密度传

至六孔板,并用有血清无双抗的培养基常规培养过夜,当细胞密度为60%~80%时转染。使用Lipofectamine2000将miR-138-5p mimic(40 nmol/L)、miR-138-5p inhibitor(80 nmol/L)及其相应的阴性对照转染到MC3T3-E1细胞中;使用Lipofectamine 3000,将pEX-SIRT1(100 ng/ μ L)及阴性对照pEX分别转染至细胞,无血清无双抗培养基培养6~8 h后更换为有血清无双抗培养基。

5 挽救实验 将MC3T3-E1细胞以适当的密度传至25 cm²专用回转培养瓶,并用有血清无双抗的培养基常规培养过夜,当细胞密度为60%时转染。转染12 h后在培养瓶中灌满培养基并加塞,将培养瓶置于2D回转器并围绕其水平轴以24 r/min旋转48 h,获得的细胞为失重组(Clino)。对照组(Con)置入37℃孵箱中普通培养。

6 实时荧光定量PCR 用RNAiso Plus裂解细胞并提取MC3T3-E1细胞的总RNA,然后逆转录为互补DNA(cDNA)。使用Prime ScriptTM RT Master Mix Kit按照以下步骤对mRNA进行逆转录:37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃保存;使用Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit按照以下步骤对miRNA进行逆转录:37℃ 1 h, 85℃ 5 min, 4℃保存。以GAPDH或U6作为内参。使用SYBR®Premix Ex TaqTM II和CFX96实时PCR检测系统通过qRT-PCR检测mRNA的表达。PCR引物序列见表1。

7 蛋白质印迹分析 胰酶消化收集细胞后加入含有10%蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液提取MC3T3-E1细胞总蛋白。超声裂解后在4℃下12 000 r/min离心10 min,吸取上清即为蛋白样品。使用PierceTM

BCA蛋白质检测试剂盒和紫外分光光度计进行蛋白定量。按照Western blot常规操作进行电泳,然后转移到PVDF膜上。在室温下,用5%脱脂奶将膜封闭2 h,并在4℃下与特异性一抗孵育过夜。使用一抗如下:GAPDH(1:1 000; Cell Signaling Technology, 美国), Runx2(1:1 000; Cell Signaling Technology, 美国), Osx(1:1 000; Cell Signaling Technology, 美国), SIRT1(1:1 000; Proteintech, 美国)。然后,将膜与二抗孵育2 h(1:5 000; ZS-GB-BIO公司),并使用凝胶成像系统拍照。使用Image J软件进行灰度值分析。

8 碱性磷酸酶活性测定 将MC3T3-E1细胞胰酶消化收集后加入含有10%蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液,超声裂解后在4℃下12 000 r/min离心10 min吸取上清。使用ALP检测试剂盒检测上清液中的ALP活性。上清液加入显色剂37℃孵育15 min后,以苯酚为标准溶液,ddH₂O作为空白对照溶液测定溶液520 nm处的吸光度值。

9 碱性磷酸酶染色 使用BCIP/NBT碱性磷酸酶显色试剂盒进行碱性磷酸酶染色。细胞用PBS冲洗后用4%多聚甲醛固定15 min。将固定的细胞再次用PBS冲洗3次,然后将BCIP/NBT染色工作液加到每个孔中,室温避光孵育30 min后用ddH₂O洗涤终止显色反应。数码相机拍照。

10 统计学分析 统计分析均使用SPSS22.0软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验用于两样本间比较,One-way ANOVA用于多样本间比较,两两比较采用LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,所有实验均重复3次。

结果

1 SIRT1在模拟失重下的表达 与Con组相比,模拟失重24 h、48 h、72 h后,qRT-PCR结果表明MC3T3-E1细胞中Runx2、SIRT1 mRNA的表达显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(图1A),Western blot结果也显示模拟失重48 h后SIRT1蛋白水平下调($P < 0.01$)(图1B)。

2 miR-138-5p在模拟失重下表达上调并抑制骨分化 为了验证miR-138-5p是否在模拟失重下差异表达且发挥作用,将MC3T3-E1细胞在2D回转器中培养24 h、48 h和72 h后进行检测。qRT-PCR结果表明,在模拟失重过程中,miR-138-5p水平升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(图2A)。为了探究miR-138-5p在成骨细胞分化中的作用,向成骨细胞中转染miR-138-5p mimic、inhibitor或阴性对

表1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

Gene	Sequences (5'-3')
U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6-R	AACGCTTCACGAATTTGCGT
mmu-miR-138-5p	AGCTGGTGTGTGAATCAGGCC
mRQ 3' Primer	TGGTGTCTGTGGAGTCG
GAPDH-F	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
GAPDH-R	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG
Runx2-F	GAACCAAGAAGGCACAGACAGA
Runx2-R	GGCGGGACACCTACTCTCATAC
Osx-F	AAGAGGTTACCCGCTCTGA
Osx-R	TGATGTTTGCTCAAGTGGTCG
Alp-F	GCAGTATGAATTGAATCGGAACAAC
Alp-R	ATGGCCTGGTCCATCTCCAC
SIRT-F	CGCTGTGGCAGATTGTTATTA
SIRT1-R	TTGATCTGAAGTCAGGAATCCC

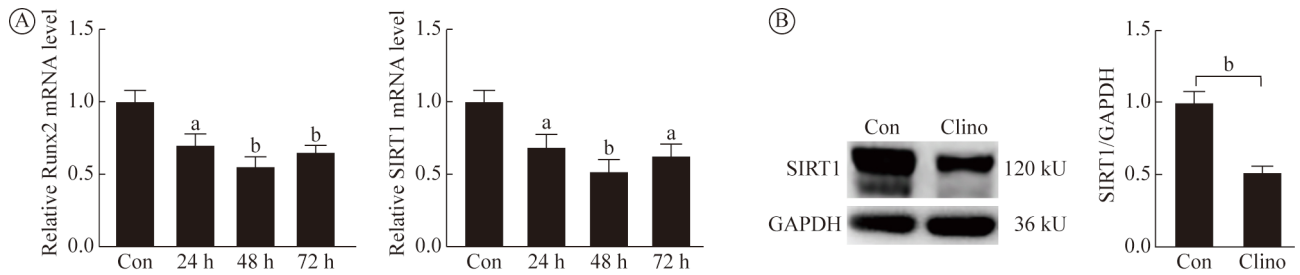


图 1 模拟失重下 MC3T3-E1 细胞 SIRT1 的表达 ($^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$, vs Con 组)

A: 模拟失重 24 h、48 h、72 h 后 MC3T3-E1 细胞的 Runx2 及 SIRT1 mRNA 表达; B: 模拟失重 48 h 后 MC3T3-E1 细胞的 SIRT1 蛋白表达

Fig.1 Expression level of SIRT1 in MC3T3-E1 cells cultured in simulated microgravity ($^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$, vs Con group)

A: Runx2 and SIRT1 mRNA expression levels in MC3T3-E1 cells after simulated weightlessness for 24 h, 48 h and 72 h; B: SIRT1 protein expression level in MC3T3-E1 cells after simulated weightlessness for 48 h

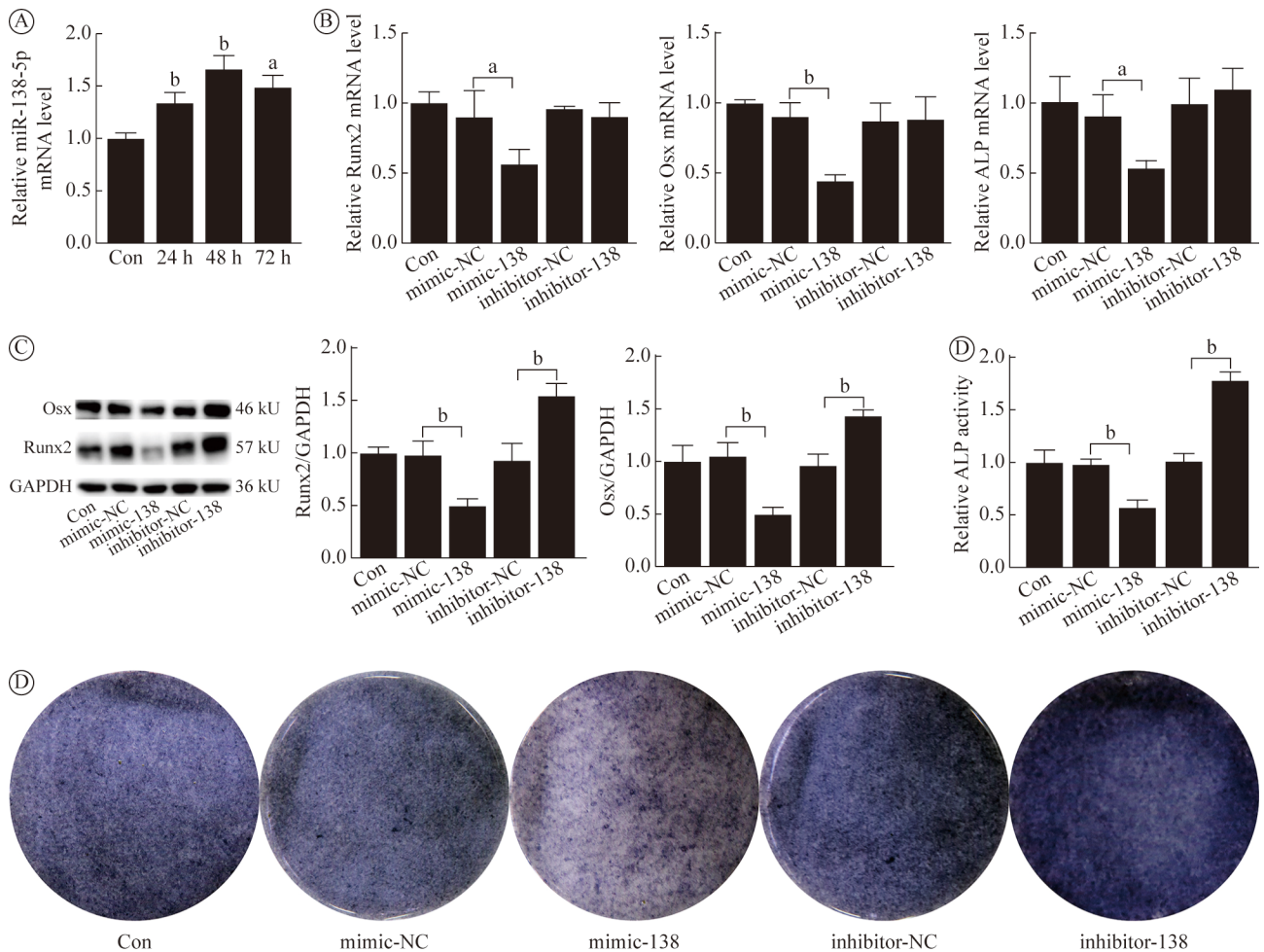


图 2 miR-138-5p 在模拟失重下表达上调并抑制骨分化 ($^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$, vs Con 组)

A: 模拟失重下 MC3T3-E1 细胞 miR-138-5p 的表达; B: 转染 miR-138-5p mimic、inhibitor 或阴性对照后 Runx2、Osx 及 ALP 的 mRNA 表达; C: 转染 miR-138-5p mimic、inhibitor 或阴性对照后 Runx2 和 Osx 蛋白的表达; D: ALP 染色

Fig.2 Expression level of miR-138-5p was up-regulated and then inhibited bone differentiation under simulated microgravity ($^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$, vs Con group)

A: Expression level of miR-138-5p in MC3T3-E1 cells cultured in simulated microgravity; B: mRNA expression levels of Runx2, Osx and ALP after transfection with mimic-138-5p, inhibitor-138-5p and negative control; C: Protein expression levels of Runx2 and Osx after transfection with mimic-138-5p, inhibitor-138-5p and negative control; D: Representative staining images of ALP in osteoblasts

照。qRT-PCR 结果表明, 与 mimic-NC 组相比, mimic 组 Runx2、Osx、ALP mRNA 水平表达显著下降, 且 Runx2、Osx 蛋白水平也显著下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 inhibitor-NC 组相比, inhibitor 组 Runx2、Osx、ALP mRNA 水平表达无明显变化, 但 Runx2、Osx 蛋白水平显著上调 ($P < 0.01$) (图 2B, 图 2C)。ALP 活性检测及 ALP 染色检测结果与 qRT-PCR、Western blot 结果一致 (图 2D)。

3 miR-138-5p 依赖 SIRT1 负调控成骨细胞分化

为了验证 miR-138-5p 是否通过靶向 SIRT1 调节成骨细胞功能, 将 miR-138-5p mimic 和 pEX-SIRT1 或其阴性对照共转染到 MC3T3-E1 细胞中。与 Con 组相比, mimic 组的成骨细胞分化能

力显著降低 ($P < 0.01$); 而在转染 pEX-SIRT1 后, 细胞中 SIRT1、Runx2、Osx、ALP mRNA 水平显著升高, 且 SIRT1、Runx2、Osx 蛋白水平也明显升高 ($P < 0.01$); ALP 染色检测得到了相同的结果 (图 3)。转染 pEX-SIRT1 后明显改善 miR-138-5p mimic 导致的 MC3T3-E1 细胞分化抑制, 提示 pEX-SIRT1 能够部分抵消成骨细胞分化抑制, 且 miR-138-5p 依赖 SIRT1 负调控成骨细胞分化。

4 抑制 miR-138-5p 可缓解模拟失重导致的 MC3T3-E1 细胞分化抑制 为了进一步探究模拟失重下通过 miR-138-5p/SIRT1 是否调节成骨细胞的分化, 我们用 miR-138-5p inhibitor 转染 MC3T3-E1 细胞 12 h 后在模拟失重环境中培养 48 h。与

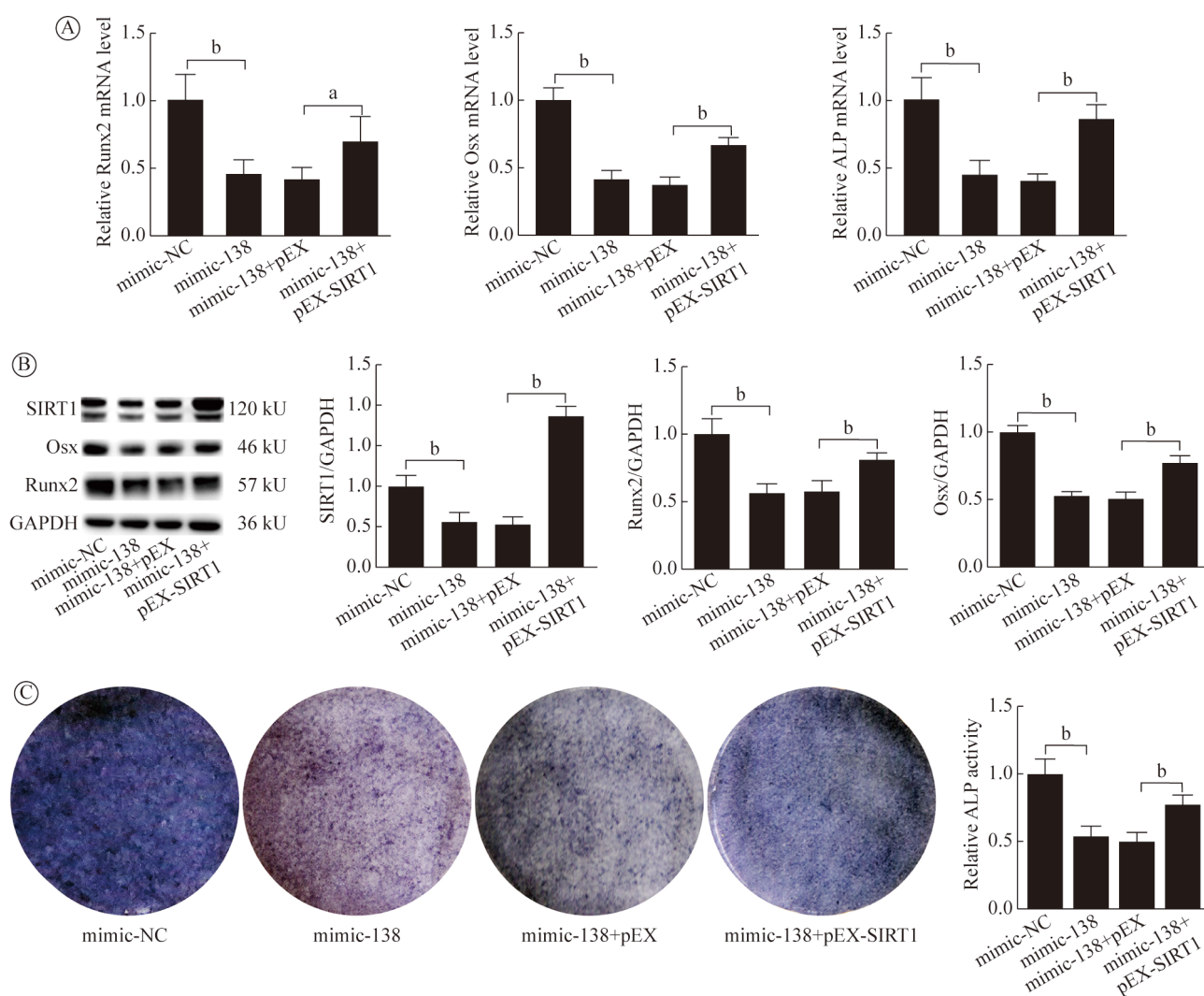


图 3 miR-138-5p 依赖 SIRT1 负调控成骨细胞分化 ($^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$, vs Con 组)

A: miR-138-5p mimic 和 pEX-SIRT1 或其阴性对照共转染到 MC3T3-E1 细胞后 Runx2、Osx 及 ALP 的 mRNA 的表达; B: miR-138-5p mimic 和 pEX-SIRT1 或其阴性对照共转染后, Runx2 和 Osx 蛋白的表达; C: ALP 染色

Fig.3 SIRT1 is essential for miR-138-5p to inhibit osteoblast differentiation ($^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$, vs Con group)

A: mRNA expression levels of Runx2, Osx and ALP after transfection with mimic-138-5p and pEX-SIRT1 or negative control; B: Protein expression levels of SIRT1, Runx2 and Osx after transfection with mimic-138-5p and pEX-SIRT1 or negative control; C: Representative staining images of ALP in osteoblasts

Con 组相比,抑制 miR-138-5p 可以部分缓解模拟失重导致的 SIRT1 mRNA 和蛋白表达抑制以及成骨分化抑制,表现为促进 SIRT1、Runx2、Osx、ALP mRNA 表达,促进 SIRT1、Runx2、Osx 蛋白表达 ($P < 0.01$)(图 4)。提示通过抑制 miR-138-5p/SIRT1 通路可以减轻模拟失重下成骨细胞的分化抑制,miR-138-5p 可以作为潜在的干预靶点。

讨论

骨骼是一种动态组织,成骨细胞的合成代谢和破骨细胞的分解代谢使骨骼组织不断自我更新,并保持适当的骨量和钙稳态^[17]。机械刺激在维持骨骼重塑方面起着重要作用。同时,骨骼可以通过调整自身的质量和结构来应对力学条件的变化^[1]。失重引起的骨骼系统损伤是中长期航天飞行的主要局限之一。在航天员和地面动物模型中,已经证实失重可造成骨量减少、矿化减少和骨基质基因表达降低^[18-19]。

SIRT1 是基因表达、细胞分化和代谢的关键调控因子。动物实验表明过表达 SIRT1 可延长小鼠的寿命,并可缓解衰老所致的骨质疏松^[20]。

SIRT1 敲除的小鼠小梁骨和骨皮质中均出现明显的缺陷,并随着年龄增长不断恶化,表明 SIRT1 在骨骼重塑中至关重要^[21]。SIRT1 可通过抑制 PPAR γ 或激活 β -catenin、FoxO 和 Runx2 表达促进成骨细胞分化^[22-24],但 SIRT1 是否在失重环境下参与骨骼发育及其上游调控机制尚不清楚。越来越多的证据显示 miRNA 参与多种骨骼疾病的预后和进展,并可能成为未来基因治疗的靶点^[10-12]。miR-138-5p 是一种机械敏感的 miRNA,在机体发育中起着复杂而全面的调节作用。miR-138 作为肿瘤抑制因子,可参与肿瘤细胞增殖、细胞凋亡、细胞迁移、细胞周期的调节,以及 DNA 损伤反应和修复^[25]。此外,miR-138 在神经元发育、神经疾病、心脏形态发生和乳腺发育中发挥重要作用^[26]。最近研究表明 miR-138 是骨骼细胞的关键调控因子,在骨骼疾病中发挥重要作用,如骨质疏松、骨肉瘤、多发性骨髓瘤、骨关节炎和软骨肉瘤等^[27]。SIRT1 最近被确定为 miR-138 的靶基因,可能与神经发育和疾病有关^[28]。然而目前尚未报道模拟失重下能否通过 miR-138-5p/SIRT1 通路调控成骨细胞分化。

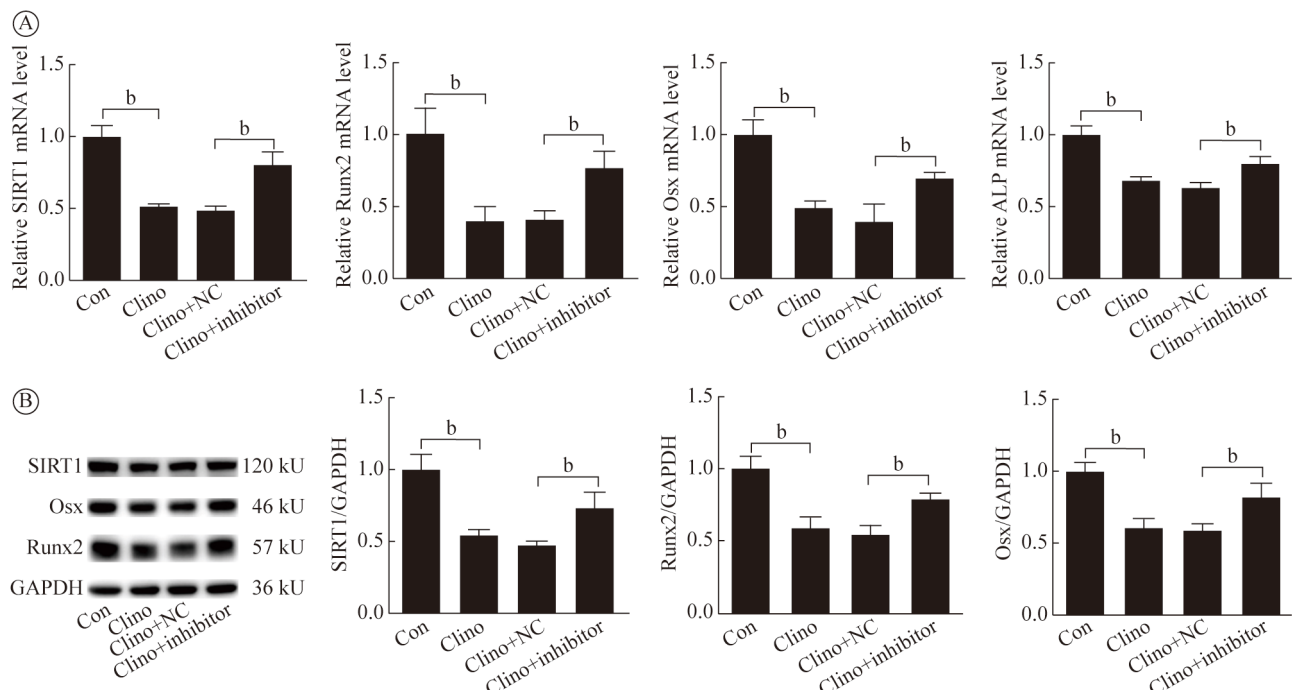


图 4 抑制 miR-138-5p 可缓解模拟失重导致的 MC3T3-E1 细胞分化抑制 ($^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$, vs Con 组)

A: 转染 miR-138-5p inhibitor 后模拟失重 48 h, SIRT1、Runx2、Osx 及 ALP 的 mRNA 表达; B: 转染 miR-138-5p inhibitor 后模拟失重 48 h, SIRT1、Runx2 和 Osx 的蛋白表达

Fig.4 Silencing miR-138-5p could alleviate the alterations in differentiation of MC3T3-E1 cells under simulated microgravity conditions ($^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$, vs Con group)

A: mRNA expression levels of SIRT1, Runx2, Osx and ALP after transfection with miR-138-5p inhibitor by qRT-PCR under microgravity; B: Protein expression levels of SIRT1, Runx2 and Osx after transfection with miR-138-5p inhibitor by Western blotting under microgravity

本研究中,我们首次发现 MC3T3-E1 细胞在模拟失重环境中 SIRT1 表达降低,而 miR-138-5p 表达水平显著升高。分别向细胞中转染 miR-138-5p mimic 或 inhibitor 进行功能实验,发现 miR-138-5p 能够显著减少 Runx2、Osx mRNA 及蛋白表达;miR-138-5p inhibitor 能够上调 Runx2、Osx 蛋白水平,但对 Runx2、Osx、ALP mRNA 水平无影响,表明 miR-138-5p inhibitor 可能通过抑制 mRNA 的翻译对 SIRT1 进行转录后调控,而非调控其转录水平,进而促进成骨细胞分化。此外,抑制 miR-138-5p 可以缓解模拟失重导致的 MC3T3-E1 细胞分化抑制。综上,miR-138-5p 通过直接靶向 SIRT1 抑制成骨细胞分化,可能对失重引起的骨质丢失具有保护作用。本研究揭示了 miR-138-5p/SIRT1 信号通路在成骨细胞中的功能,为以 miR-138-5p 为干预靶点治疗失重性骨质丢失或废用性骨质疏松症提供了实验依据。

参考文献

- 1 Hsieh YF, Turner CH. Effects of loading frequency on mechanically induced bone formation [J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16 (5): 918-924.
- 2 Carina V, Della Bella E, Costa V, et al. Bone's response to mechanical loading in aging and osteoporosis: molecular mechanisms [J]. *Calcif Tissue Int*, 2020, 107 (4): 301-318.
- 3 Vico L, Collet P, Guignandon A, et al. Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts [J]. *Lancet*, 2000, 355 (9215): 1607-1611.
- 4 Rittweger J, Frost HM, Schiessl H, et al. Muscle atrophy and bone loss after 90 days' bed rest and the effects of flywheel resistive exercise and pamidronate: results from the LTBR study [J]. *Bone*, 2005, 36 (6): 1019-1029.
- 5 Bucaro MA, Fertala J, Adams CS, et al. Bone cell survival in microgravity: evidence that modeled microgravity increases osteoblast sensitivity to apoptogens [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1027: 64-73.
- 6 Wang D, Cai J, Zeng ZB, et al. The interactions between mTOR and NF- κ B: a novel mechanism mediating mechanical stretch-stimulated osteoblast differentiation [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236: 4592-4603.
- 7 Chen C, Zhou M, Ge YC, et al. SIRT1 and aging related signaling pathways [J]. *Mech Ageing Dev*, 2020, 187: 111215.
- 8 Almeida M, Porter RM. Sirtuins and FoxOs in osteoporosis and osteoarthritis [J]. *Bone*, 2019, 121: 284-292.
- 9 Li QQ, Cheng JC, Jiang Q, et al. Role of sirtuins in bone biology: Potential implications for novel therapeutic strategies for osteoporosis [J]. *Aging Cell*, 2021, 20 (2): e13301.
- 10 Fang SJ, Deng Y, Gu P, et al. MicroRNAs regulate bone development and regeneration [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (4): 8227-8253.
- 11 王艺璇,王可,张舒.微小RNA、长链非编码RNA及二者相互作用调控成骨细胞功能的研究进展 [J]. *解放军医学院学报*, 2021, 42 (1): 118-124.
- 12 Liu J, Dang L, Wu X, et al. microRNA-mediated regulation of bone remodeling: a brief review [J]. *JBM Plus*, 2019, 3 (9): e10213.
- 13 Wang YX, Wang K, Hu ZB, et al. MicroRNA-139-3p regulates osteoblast differentiation and apoptosis by targeting ELK1 and interacting with long noncoding RNA ODSM [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (11): 1107.
- 14 Wang K, Wang YX, Hu ZB, et al. Bone-targeted lncRNA OGRU alleviates unloading-induced bone loss via miR-320-3p/Hoxa10 axis [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (5): 382.
- 15 王可,胡泽兵,王艺璇,等. miR-132-3p靶向的重力敏感长链非编码RNAs的筛选及调控探讨 [J]. *解放军医学院学报*, 2018, 39 (5): 426-431.
- 16 Chen ZH, Zhao F, Liang C, et al. Silencing of miR-138-5p sensitizes bone anabolic action to mechanical stimuli [J]. *Theranostics*, 2020, 10 (26): 12263-12278.
- 17 Kim JM, Lin CJ, Stavre Z, et al. Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis [J]. *Cells*, 2020, 9 (9): E2073.
- 18 Patterson-Buckendahl P, Arnaud SB, Mechanic GL, et al. Fragility and composition of growing rat bone after one week in spaceflight [J]. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*, 1987, 252 (2): R240-R246.
- 19 王艺璇,王可,张舒.微重力调控骨重建的细胞和分子机制研究进展 [J]. *解放军医学院学报*, 2020, 41 (11): 1140-1143.
- 20 Zhao M, Ko SY, Garrett IR, et al. The polyphenol resveratrol promotes skeletal growth in mice through a sirtuin 1-bone morphogenic protein 2 longevity axis [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175 (21): 4183-4192.
- 21 Zainabadi K. Drugs targeting SIRT1, a new generation of therapeutics for osteoporosis and other bone related disorders? [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 143: 97-105.
- 22 Simic P, Zainabadi K, Bell E, et al. SIRT1 regulates differentiation of mesenchymal stem cells by deacetylating β -catenin [J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5 (3): 430-440.
- 23 Zainabadi K, Liu CJ, Guarente L. SIRT1 is a positive regulator of the master osteoblast transcription factor, RUNX2 [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (5): e0178520.
- 24 Elsewidy MM, El-Swefy SE, Shaheen MA, et al. Effect of resveratrol and mesenchymal stem cell monotherapy and combined treatment in management of osteoporosis in ovariectomized rats: Role of SIRT1/FOXO3a and Wnt/ β -catenin pathways [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2021, 703: 108856.
- 25 Yeh M, Oh CS, Yoo JY, et al. Pivotal role of microRNA-138 in human cancers [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9 (6): 1118-1126.
- 26 Liu CM, Wang RY, Saijilafu, et al. MicroRNA-138 and SIRT1 form a mutual negative feedback loop to regulate mammalian axon regeneration [J]. *Genes Dev*, 2013, 27 (13): 1473-1483.
- 27 Eskildsen T, Taipaleenmäki H, Stenvang J, et al. MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108 (15): 6139-6144.
- 28 Lu YJ, Tan L, Wang X. Circular HDAC9/microRNA-138/sirtuin-1 pathway mediates synaptic and amyloid precursor protein processing deficits in Alzheimer's disease [J]. *Neurosci Bull*, 2019, 35 (5): 877-888.