

文章编号: 1004-7220(2023)02-0268-08

miR-199a-3p 通过靶向 CABLES-1 调控流体剪切力介导的成骨细胞增殖

王力夫, 张坤, 移穷, 刘众成, 刘雪宁, 耿彬, 夏亚一

(兰州大学第二医院 骨科; 甘肃省骨科临床医学研究中心; 甘肃省骨关节疾病研究重点实验室, 兰州 730030)

摘要:目的 探讨 miR-199a-3p 在流体剪切力(fluid shear stress, FSS)诱导成骨细胞增殖中的作用及其可能的分子机制。方法 对成骨细胞 MC3T3-E1 加载 1.2 Pa FSS, 时间分别为 0、15、30、45、60、75、90 min。使用 miR-199a-3p 模拟物或 miR-199a-3p 抑制物转染 MC3T3-E1 细胞。使用将过表达的 miR-199a-3p 以及其阴性对照分别转染 MC3T3-E1 细胞, 并以 1.2 Pa FSS 处理 45 min。将 pcDNA NC、pcDNA-CABLES-1、si RNA NC、si RNA CABLES-1 转染至 MC3T3-E1 细胞中。分别共转染 pcDNA-CABLES-1 与 miR-199a-3p mimic 以及 si RNA-CABLES-1 与 miR-199a-3p inhibitor。CCK-8 实验检测细胞活性; RT-qPCR 检测 CABLES-1、miR-199a-3p、CDK 6、Cyclin D1、PCNA 表达水平; 荧光素酶报告实验检测 CABLES-1 和 miR-199a-3p 的靶向关系。免疫荧光检测 CABLES-1 蛋白表达。Western blot 检测 CABLES-1、CDK 6、PCNA、Cyclin D1 的蛋白表达。结果 FSS 作用下 MC3T3-E1 细胞中的 miR-199a-3p 出现显著下调。过表达的 miR-199a-3p 抑制成骨细胞增殖, 下调 miR-199a-3p 表达促进成骨细胞增殖。miR-199a-3p 可以逆转 FSS 诱导的成骨细胞增殖。双荧光素酶实验表明, miR-199a-3p 靶向作用于 CABLES-1, 过表达的 miR-199a-3p 可抑制 CABLES-1 蛋白表达。CABLES-1 能够促进成骨细胞增殖。miR-199a-3p 通过 CABLES-1 抑制 FSS 诱导的成骨细胞增殖。结论 FSS 诱导的成骨细胞增殖通过下调 miR-199a-3p 并通过靶向作用于 CABLES-1 实现。研究结果为 FSS 诱导成骨细胞增殖机制的研究提供新方向, 也为未来机械刺激在骨关节疾病治疗中的临床应用研究提供新思路。

关键词: 流体剪切力; 成骨细胞; 细胞增殖; miR-199a-3p

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2023.02.010

Mir-199a-3p Mediates Fluid Shear Stress-Induced Osteoblast Proliferation by Targeting CABLES-1

WANG Lifu, ZHANG Kun, YI Qiong, LIU Zhongcheng, LIU Xuening, GENG Bin, XIA Yayi

(Department of Orthopedics, Lanzhou University Second Hospital; Orthopedic Clinical Medical Research Center of Gansu Province; Key Laboratory of Orthopedics of Gansu Province, Lanzhou 730030, China)

Abstract: Objective To explore the role of miR-199a-3p in osteoblast proliferation induced by fluid shear stress (FSS) and the potential molecular mechanism. **Methods** Osteoblast MC3T3-E1 was treated with 1.2 Pa FSS with time gradients of 0, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 min, respectively. MC3T3-E1 cells were transfected with miR-199a-3p mimic or miR-199a-3p inhibitor. MC3T3-E1 cells were transfected with miR-199a-3p mimic and its

收稿日期: 2022-04-04; 修回日期: 2022-04-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(81874017, 81960403, 82060405), 兰州市科技计划项目(2021-RC-102), 兰州大学第二医院“萃英科技创新”计划(CY2017-ZD02, CY2021-MS-A07)

通信作者: 夏亚一, 教授, 博士生导师, E-mail: xiayylzu@126.com

negative control and then treated with 1.2 Pa FSS for 45 min. The pc DNA NC, pc DNA-CABLES -1, si RNA NC and si RNA CABLES-1 were transfected into MC3T3-E1 cells. The pc DNA-CABLES-1 and miR-199a-3p mimic and SI NA-cables-1 and miR-199a-3p inhibitor were co-transfected, respectively. Cell activity was detected by CCK-8 assay. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect expression levels of CABLES-1, miR-199a-3p, CDK 6, Cyclin D1 and PCNA. Luciferase reporting assay was used to detect targeting relationship between CABLES-1 and miR-199a-3p. Immunofluorescence was used to detect protein expression of CABLES-1. Western blot was used to detect protein expression of CABLES-1, CDK 6, PCNA and Cyclin D1. **Results** Mir-199a-3p in MC3T3-E1 cells was significantly down-regulated by FSS. Over-expressed miR-199a-3p inhibited osteoblast proliferation, and down-regulated miR-199a-3p expression promoted osteoblast proliferation. miR-199a-3p could reverse the FSS-induced proliferation in osteoblasts. Dual luciferase assay showed that miR-199a-3p targeted to CABLES-1 and over-expressed miR-199a-3p inhibited expression of CABLES-1 protein. CABLES-1 could promote proliferation of osteoblasts. miR-199a-3p inhibited osteoblast proliferation induced by FSS through CABLES-1. **Conclusions** FSS-induced osteoblast proliferation can be realized by down-regulated miR-199a-3p expression via targeting CABLES-1. The findings in this study provide new direction for researches on mechanism of FSS-induced osteoblast proliferation, as well as new ideas for future research on clinical application of mechanical loading in the treatment of bone and joint diseases.

Key words: fluid shear stress (FSS); osteoblast; cell proliferation; miR-199a-3p

成骨细胞是骨组织中重要的骨形成细胞,可以分化成熟为功能性的骨细胞,并与破骨细胞一起维持骨稳态的平衡^[1]。而力学刺激已经被证明在维持骨稳态的平衡中起着重要作用^[2]。适当的机械负荷促进骨形成,缺乏力学负荷则会引起骨量的丢失^[3]。早在19世纪,Wolff就提出骨组织结构受到应力的影响,即骨折后骨组织会沿应力方向生长^[4]。随着时代的进步,尽管Wolff的一些理论被认为存在不足,但是骨组织生长受到力学刺激影响的理论还是被广泛接受^[5]。生理性的力学刺激可以促进骨组织的生长,而缺乏适当的力学刺激往往会抑制骨组织的生长。例如,在微重力环境下出现的骨质疏松症^[6]。骨组织中主要存在压应力和流体切应力(fluid shear stress, FSS)两种类型的力学刺激,均由骨组织的微小形变产生^[7]。研究表明,FSS对细胞具有更大的影响^[8-9]。因此,本文主要探讨FSS对成骨细胞的作用。

MicroRNA (miRNAs)是一类低分子量、非编码的单链RNA,通过参与转录后修饰调控细胞生理过程^[10]。研究已经证明,有部分miRNAs能够对力学刺激做出反应^[11]。这些现象不仅出现在体外实验^[12],同时也出现在体内实验^[13-14]。FSS可以刺激成骨细胞的增殖^[15]。然而,miRNA在FSS介导成骨细胞增殖过程中的作用仍然有待探索。

miR-199家族在多种肿瘤细胞的增殖过程中发挥着重要作用。同时有研究证明,在增殖的肿瘤细胞中,miR-199a-3p的表达量出现下降^[16-17]。因此,本文推测低表达的miR-199a-3p可能会促进细胞的增殖。Yuan等^[12]研究发现,在力学刺激下,骨组织中成骨细胞出现miR-199a-3p的表达下调。结合以上的研究,本文探讨miR-199a-3p对FSS介导成骨细胞增殖的作用,即FSS通过降低miR-199a-3p表达促进MC3T3-E1细胞的增殖。然而,本文结果表明,miR-199a-3p靶向作用于CABLES-1,FSS诱导的成骨细胞增殖通过下调miR-199a-3p并作用CABLES-1实现。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

ME3T3-E1成骨细胞(中国医学科学院); α -MEM培养基、优级胎牛血清、0.25%胰酶+EDTA溶液(Gibico公司,美国);CCK-8试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司)、双荧光素酶检测试剂盒(上海吉玛制药技术有限公司);放射免疫沉淀法(radio immunoprecipitation Assay, RIPA)蛋白裂解液、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);Trizol试剂、反

转录试剂盒、qRT-PCR 试剂盒(Takara 公司,日本);转染试剂(广州锐博生物技术有限公司);多聚甲醇、Triton X-100(上海碧云天生物技术有限公司);PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)、CDK 6 (cyclin-dependent kinase 6)、Cyclin D1 一抗(Affinity 公司,美国)、CABLES-1 一抗(Affinity 公司,美国)、 β -actin(Affinity 公司,美国),二抗(Affinity 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 MC3T3-E1 细胞接种到无菌培养瓶中,完整培养基含有 10% 胎牛血清、抗生素(青霉素 G、链霉素)和 α -MEM 培养基。细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中,2~3 d 更换 1 次培养基。

1.2.2 加载 FSS 实验 采用平行平板流动室装置(实用新型专利号:ZL201520637211.6)模拟体外 FSS^[18]。本课题组先前研究证实,1.2 Pa 是促进成骨细胞增殖的适宜 FSS 强度^[19]。为了找到最佳 FSS 作用的时间,细胞在 1.2 Pa FSS 加载下分别接受 0、15、30、45、60、75、90 min 处理。此外,为了能够在加载 FSS 后继续实验,FSS 加载装置经过高温消毒,并全程在超净台中完成实验。

1.2.3 细胞转染 按照说明配制转染试剂后,当培养瓶中细胞密度达到 60%~80%时,将培养瓶中的培养基吸取并弃去。加入 PBS 清洗 2~3 次后,加入转染复合物 1 mL 于培养瓶中,再加入 4 mL α -MEM。将烧瓶放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。

1.2.4 qRT-PCR 分析 使用 Trizol 法提取实验处理过的细胞总 RNA。ND-1000 分光光度计用于测定总 RNA 的浓度和纯度。逆转录合成 cDNA,以 cDNAs 作为模板,采用 qRT-PCR 分别检测 miR-199a-3p、PCNA、CDK 6、Cyclin D1、CABLES-1 的基因表达水平。qRT-PCR 中所有数据均通过 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 算法计算。所用引物序列如表 1 所示。

1.2.5 双荧光素酶实验 构建 CABLES-1 的野生型(wild type, WT)和突变型(mutant type, MUT) 3' UTR 序列,并将其插入到荧光素酶载体。使用转染试剂分别将 293T 细胞与这些载体和 miR-199a-3p 模拟物或其阴性对照共转染。转染 24 h 后,应用荧光素酶测定试剂盒进行荧光素酶测定。

1.2.6 CCK-8 实验 将实验处理后的成骨细胞制成细胞悬液。细胞计数后,将细胞悬液加入 96 孔

表 1 PCR 引物序列

Tab. 1 Sequence of primers for PCR

引物	引物序列(5'-3')
PCNA-F	GAAGTTTTCTGCAAGTGGAGAG
PCNA-R	CAGGCTCATTTCATCTCTATGGT
Cyclin D1-R	ATGGTCTCCTTCATCTTAGAGG
Cyclin D1-F	CGTATCTTACTTCAAGTGCCTG
CDK 6-F	ATGCCCGCTCTCCACCATAAG
CDK 6-R	GCACACATCAAACAACCTGACCAC
CABLES1/ik-3-F	ATGCGACAGCAGGATACCAA
CABLES1/ik-3-R	GCCTCCCTCCATCCAACCTT
miR-199a-3p	ACAGTAGTCTGCACATTGGTTA
U6-F	CTCGCTTCGGCACA
U6-R	AACGCTTCAGAATTTGCGT
GADPH-F	TGTGTCCGCTCGGATCTGA
GADPH-R	TTGCTGTTGAAGTCCGAGGAG

板中。每孔中包含约 1 000 个细胞。预培养 2 h 后,继续培养至适当时间(24、48、72 h)。每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,孵育 1~4 h。然后用 ELx800UV 阅读器检查 OD 值。

1.2.7 蛋白质免疫印迹实验 (Western blotting) 在经过实验处理后的细胞中加入 RIPA 裂解液后置冰上缓慢摇晃 30 min 后,用细胞刮刀收集裂解液于 1.5 mL 的 EP 管中。然后,在 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 15 min,用移液枪缓慢吸取上清液于 EP 管中,加入上清液 1/3 体积量的蛋白上样缓冲液后煮沸 3 min。以 β -actin 作为内参;配制聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE 凝胶)。然后经过上样、电泳、电转、封闭、孵育一抗、洗膜、孵育二抗、洗膜、曝光等步骤得到条带。

1.2.8 免疫荧光实验 使用多聚甲醇固定细胞 15 min 后使用 0.5% Triton X-100 通透细胞 20 min。通透后用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。使用山羊血清对细胞进行封闭 30 min。吸干山羊血清后,加入 CABLES-1 一抗孵育后在 4 °C 过夜。然后用 PBS 洗涤细胞,在室温下加入相应二抗孵育 2 h。最后,在室温下将 DAPI 滴入细胞 10 min 后使用荧光显微镜拍摄图像。

1.3 数据统计

所有实验数据均重复 3 次。实验数据以均数 \pm 标准差表示,采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,用 Image pro-Plus 6.0 软件测量条带灰度值,两组数据间统计学差异比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FSS 对成骨细胞增殖以及 miR-199a-3p 的影响

为研究 FSS 对细胞增殖的影响,将 MC3T3-E1 细胞置于 FSS 处理 0、15、30、45、60、75、90 min。CCK-8 检测显示,FSS 处理 45 min 后,MC3T3-E1 细胞增殖活力增强最明显。qRT-PCR 分析显示,miR-199a-3p 在该条件的 FSS 下相对表达量出现下调(见图 1)。

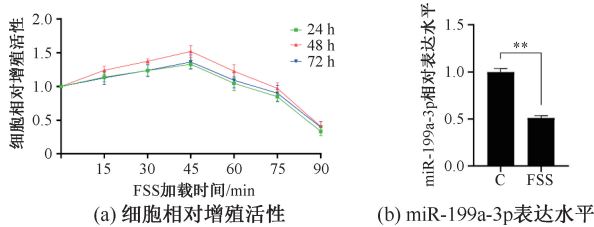


图 1 FSS 对细胞增殖与 miR-199a-3p 表达的影响

Fig. 1 Effects of FSS on cell proliferation and miR-199a-3p expression (a) Relative proliferative capacity of cells, (b) Relative expression of miR-199a-3p

注:与对照相比,** $P < 0.01$ 。C、FSS 分别代表空白对照、流体剪切力加载。

2.2 miR-199a-3p 抑制成骨细胞增殖

为研究 miR-199a-3p 对成骨细胞增殖的作用,分别应用 miR-199a-3p 模拟物(miR-199a-3p mimic)和 miR-199a-3p 抑制物(miR-199a-3p inhibitor)在 MC3T3-E1 细胞中过表达和下调 miR-199a-3p。qRT-PCR 结果显示,miR-199a-3p 模拟物转染 48 h 后,miR-199a-3p 水平明显升高,而 miR-199a-3p 抑制物转染 48 h 后,miR-199a-3p 表达显著降低。从 CCK-8 结果分析可知,过表达的 miR-199a-3p 抑制成骨细胞增殖,低表达的 miR-199a-3p 促进成骨细胞增殖。此外,通过检测增殖相关蛋白 PCNA、CDK6 和 Cyclin D1 表达水平,进一步研究 miR-199a-3p 对成骨细胞增殖的影响。qRT-PCR 结果显示,与对照组相比,转染 miR-199a-3p 模拟物后 miR-199a-3p 出现过表达,PCNA、CDK6、Cyclin D1 mRNA 相对表达量明显降低。转染 miR-199a-3p 抑制物后 miR-199a-3p 表达量下调,PCNA、CDK6 和 Cyclin D1 mRNA 的相对表达水平显著升高。同样,PCNA、

CDK6 和 Cyclin D1 蛋白表达水平也出现相同的差异(见图 2)。本文认为,miR-199a-3p 可以抑制成骨细胞的增殖。

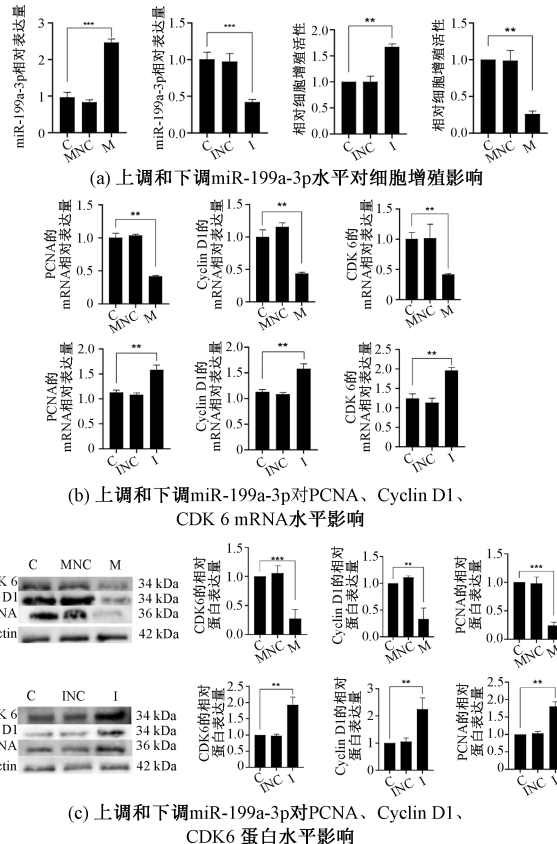


图 2 miR-199a-3p 对成骨细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of miR-199a-3p on osteoblast proliferation

(a) Effects of up-regulation and down-regulation of miR-199a-3p level on cell proliferation, (b) Effects of up-regulation and down-regulation of miR-199a-3p on mRNA levels of PCNA, Cyclin D1 and CDK 6, (c) Effects of up-regulation and down-regulation of miR-199a-3p on protein levels of PCNA, Cyclin D1 and CDK 6

注:与对照相比,** $P < 0.01$ 。C、MNC、M 分别表示空白对照组、miR-199a-3p 类似物阴性对照;M 代表 miR-199a-3p 类似物;INC、I 分别代表 miR-199a-3p 抑制物阴性对照、miR-199a-3p 抑制物。

2.3 过表达 miR-199a-3p 逆转 FSS 介导的成骨细胞增殖作用

FSS 可以促进成骨细胞的增殖^[20-21]。为研究 miR-199a-3p 在 FSS 诱导的细胞增殖中的作用,在细胞接受 FSS 处理前已将 miR-199a-3p 模拟物及模拟物阴性对照转染进细胞内。CCK-8 分析结果显示,与对照相比,FSS 增强了细胞增殖能力;而过表达

miR-199a-3p 部分逆转了 FSS 诱导的细胞增殖能力。此外,增殖相关蛋白 Cyclin D1、PCNA、CDK 6 的 mRNA 和蛋白表达也出现了相同的趋势(见图 3)。

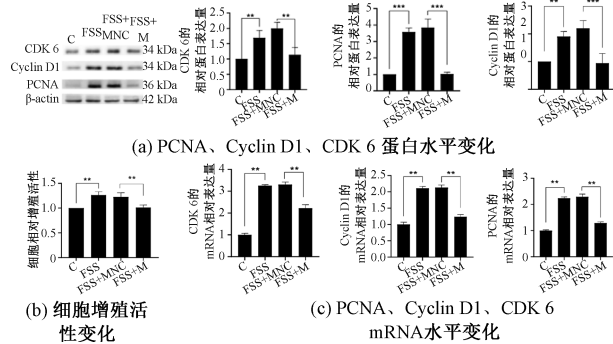


图 3 过表达 miR-199a-3p 逆转流体剪切力诱导的细胞增殖

Fig. 3 Overexpressed miR-199a-3p reversed cell proliferation induced by FSS (a) Changes of PCNA, Cyclin D1 and CDK 6 protein levels, (b) Changes in cell proliferative activity, (c) Changes of PCNA, Cyclin D1 and CDK 6 mRNA levels

注: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; C 代表为空白对照组; FSS+MNC 代表 miR-199a-3p 阴性对照与流体剪切力共同作用; FSS+M 代表流体剪切力与 miR-199a-3p 类似物共同作用。

2.4 miR-199a-3p 靶向作用于 CABLES-1

为了检测 miR-199a-3p 是否靶向作用于 CABLES-1, 构建 CABLES-1 3' UTR 野生型序列 (WT) 和 CABLES-1 3' UTR 突变序列 (MUT)。荧光素酶实验中, CABLES-1 3' UTR WT、miR-199a-3p、CABLES-1 3' UTR MUT 的序列分别为 5-GAGCA-GCACUACUACUACUGG-3、3-AUUGGUACACG-UCUGAUGACA-5、5-GAGCAGCACUACUUGAUG-ACG-3。

荧光素酶活性结果提示, miR-199a-3p 模拟物抑制了 CABLES-1 WT 荧光素酶活性, 但对 CABLES-1 MUT 无影响。结果表明, CABLES1 是 miR-199a-3p 的直接靶点。此外, 根据 qRT-PCR 和 Western Blotting 分析, miR-199a-3p 主要影响 CABLES-1 的蛋白水平。免疫荧光检测也显示了同样的趋势, miR-199a-3p mimic 降低 CABLES-1 的蛋白表达水平, 而 miR-199a-3p inhibitor 增加了 CABLES-1 的蛋白表达水平(见图 4)。

2.5 CABLES-1 促进成骨细胞增殖

为探究 CABLES-1 对成骨细胞增殖的影响, 用过表达载体 (pcDNA 3.1-CABLES-1) 过表达 CABLES-1,

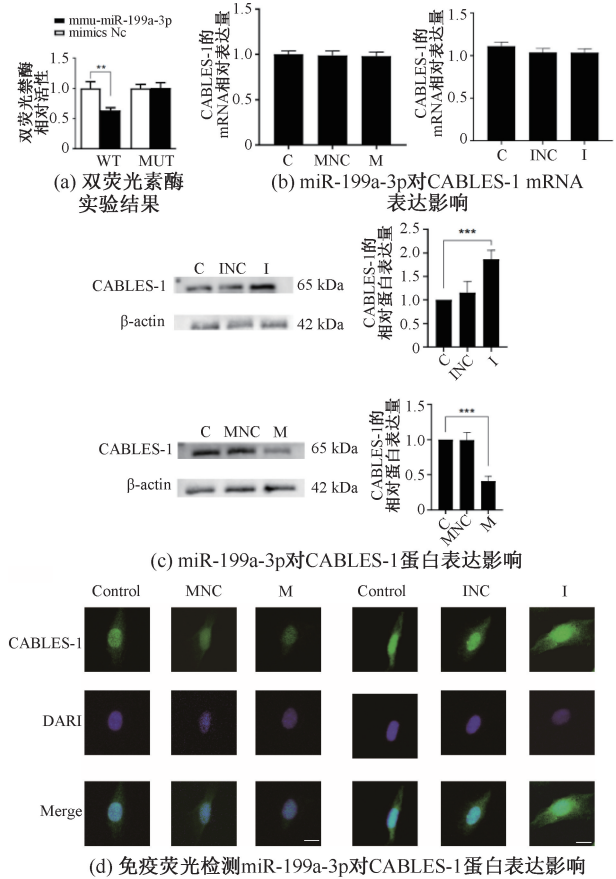


图 4 miR-199a-3p 靶向作用于 CABLES-1

Fig. 4 miR-199a-3p targeted CABLES-1 (a) Results of the double luciferase assay, (b) Effects of miR-199a-3p on mRNA expression of CABLES-1, (c) Effects of miR-199a-3p on the protein expression of CABLES-1, (d) Effects of miR-199a-3p on the expression of CABLES-1 protein was detected by immunofluorescence

注: 比例尺 = 10 μm 。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; WT、MUT 分别代表野生型、突变型; C 代表为空白对照组; MNC 代表 miR-199a-3p 模拟物阴性对照; M 代表 miR-199a-3p 模拟物; INC 代表 miR-199a-3p 抑制物阴性对照; I 代表 miR-199a-3p 抑制物。

用 siRNA-CABLES-1 抑制 MC3T3-E1 细胞中 CABLES-1 的表达。CCK-8 实验表明, 过表达 CABLES-1 可增加 MC3T3-E1 细胞的增殖能力, 而下调 CABLES-1 可抑制细胞的增殖能力。过表达 CABLES-1 增加了 PCNA、CDK6 和 Cyclin D1 的 mRNA 表达水平, 而下调 CABLES-1 后, 这些基因的 mRNA 表达受到抑制。Western Blot 检测 CDK6、PCNA 和 Cyclin D1 蛋白表达水平, 出现了相同的趋势(见图 5)。

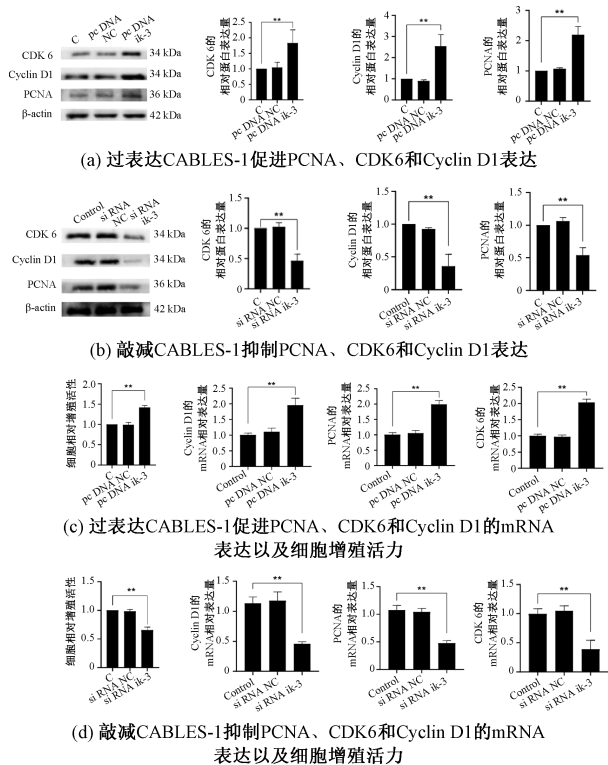


图5 CABLES-1对成骨增殖的影响

Fig. 5 Effects of CABLES-1 on proliferation of osteoblast

- (a) Overexpressed CABLES-1 promoted the expression of PCNA, CDK6 and Cyclin D1, (b) Knocking down CABLES-1 inhibits the expression of PCNA, CDK6 and Cyclin D1, (c) Overexpressed CABLES-1 promoted mRNA expression of PCNA, CDK6 and Cyclin D1 and cell proliferation activity, (d) Knocking down CABLES-1 inhibited mRNA expression of PCNA, CDK6 and Cyclin D1 and cell proliferation activity

注: ** $P < 0.01$; C代表为空白对照组。

2.6 miR-199a-3p 通过 CABLES-1 调节成骨细胞增殖

为证明 miR-199a-3p 是否通过 CABLES-1 抑制成骨细胞增殖, 将 miR-199a-3p 模拟物与 pcDNA-3.1 CABLES-1 或 pcDNA3.1-NC 共转染。在 CCK-8 试验中, miR-199a-3p 模拟物抑制成骨细胞的作用被过表达的 CABLES-1 所逆转。过表达 CABLES-1 也逆转了 miR-199a-3p 模拟物诱导的 PCNA、CDK6 和 Cyclin D1 mRNA 表达水平和蛋白表达水平的下调。此外, 使用 siRNA-CABLES-1 敲减 CABLES-1 基因可以逆转 miR-199a-3p 抑制物介导的细胞增殖活力增加。此外, 敲减 CABLES-1 基因可抑制 miR-199a-3p 抑制物诱导的 CDK6、PCNA 和 Cyclin D1 mRNA 和蛋白表达水平增加 (见图 6)。

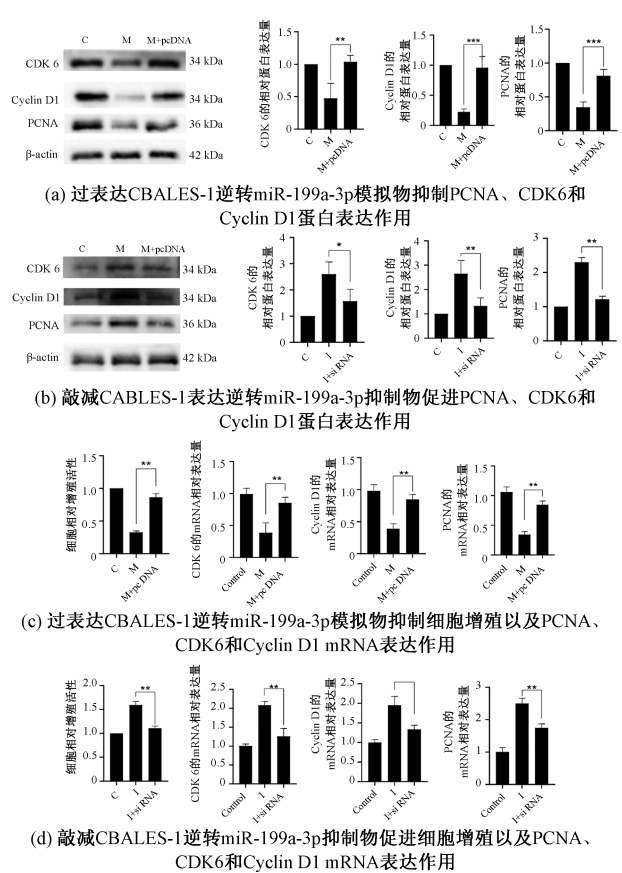


图6 miR-199a-3p 通过 CABLES-1 调节成骨细胞增殖

Fig. 6 miR-199a-3p regulates osteoblast proliferation through CABLES-1

- (a) Overexpression of CABLES-1 reversed the inhibition of PCNA, CDK6 and Cyclin D1 protein expression induced by miR-199a-3p mimics, (b) Knocking down CABLES-1 expression can reverse the promotion of PCNA, CDK6 and Cyclin D1 protein expression induced by miR-199a-3p inhibitor, (c) Overexpression of CABLES-1 reversed the inhibition on cell proliferation and the expression of PCNA, CDK6 and Cyclin D1 mRNA induced by miR-199a-3p, (d) Knockdown of CABLES-1 reversed the cell proliferation and PCNA, CDK6, and Cyclin D1 mRNA expression promoted by miR-199a-3p

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; C代表空白对照组; I为转染 miR-199a-3p 抑制物; I+siRNA 代表 miR-199a-3p 抑制物与小干扰 RNA (siRNA CABLES-1/ik-3) 共转染; M为转染 miR-199a-3p 模拟物; M+pcDNA 为 miR-199a-3p 模拟物与 pcDNA CABLES-1/ik-3 共转染。

3 讨论

已有研究表明, miRNA 可以响应力学负荷, 并且可能在成骨细胞分化和增殖中发挥重要作用^[12,22-23]。这些研究发现, miR-199a-3p 可以对力学

刺激做出反应。然而,miR-199a-3p 是否影响 FSS 介导的成骨细胞增殖及其可能的分子机制,仍然有待研究。本文结果提示,miR-199a-3p 调控 FSS 介导的成骨细胞增殖,其中 FSS 通过下调 miR-199a-3p 促进成骨细胞增殖。进一步的研究发现,miR-199a-3p 通过靶向作用于 CABLES-1 抑制成骨细胞增殖。综上所述,miR-199a-3p 可通过靶向作用于 CABLES-1 调控 FSS 介导的成骨细胞增殖。

力学刺激已被证明是参与骨骼代谢的重要因素。压应力和 FSS 是骨中两种常见的力学刺激。在研究 FSS 和力学应变对骨细胞影响的体外实验中,尽管细胞通常对这两种刺激都有反应,但细胞对 FSS 的反应更大^[8-9]。因此,与压应力相比,FSS 在成骨细胞功能和骨代谢方面发挥更重要的作用。研究表明,FSS 诱导的细胞增殖和分化与许多重要分子和信号通路有关。例如:FSS 可以快速增加细胞钙离子内流^[24]以及三磷酸肌醇(IP₃)、前列腺素 E₂^[25]、一氧化氮(NO)^[26]在成骨细胞内的含量。此外,成骨细胞内的骨桥蛋白(OPN)的表达量同样受到 FSS 的调节,类似的分子包括 COX、PGI₂^[26]。

从现有研究来看,力学敏感的 miRNAs 显示了其在 FSS 诱导成骨细胞分化和增殖中的重要性。Mai 等^[23]研究表明,在 MC3T3-E1 细胞中,有不止一种类型的 miRNAs 对 FSS 有反应。例如:miR-33-5p 通过 Hmga2 参与了 FSS 调节成骨细胞分化的过程^[28]。

虽然许多研究探讨了 miRNA 在 FSS 介导的成骨细胞增殖和分化中的作用机制,但 miR-199a-3p 在 FSS 介导的成骨细胞增殖中的作用机制尚不清楚。本文结果表明,FSS 下调 MC3T3-E1 细胞中 miR-199a-3p 的表达水平。miR-199a-3p 被认为在多在肿瘤细胞增殖的过程中发挥重要作用,其中包括前列腺癌^[16]、结直肠癌^[29]、卵巢癌^[30]以及肺腺癌^[31]。然而,miR-199a-3p 在成骨细胞分化和增殖中的作用机制尚不清楚。有研究表明,miR-199a-3p 在骨肉瘤细胞中表现为低表达^[32]。结合以上的研究,本文认为 miR-199a-3p 的低表达可能会促进细胞的增殖。本文结果证明了低表达的 miR-199a-3p 可以促进成骨细胞的增殖,而过表达的 miR-199a-3p 抑制了成骨细胞的增殖。在此基础上,过表达的 miR-199a-3p 部分逆转了 FSS 介导的

成骨细胞增殖。MicroRNAs 通过调控其靶基因实现其功能。例如:miR-199a-3p 通过 FGF7 调节了内皮细胞以及视网膜周细胞的增殖^[17]。Liu 等^[33]研究提示,miR-199a-3p 通过靶向作用于 CABLES-1 发挥作用。本文通过双荧光素酶实验得到相同的结果,即 miR-199a-3p 靶向作用于 CABLES-1。CABLES-1 是一种新型 CDK (cyclin-dependent kinase) 结合蛋白,位于人类染色体 18q11-12,CABLES-1 对于神经系统的生长具有重要作用,敲除该基因会导致细胞凋亡^[34-35]。本文发现,下调 CABLES-1 的表达抑制了成骨细胞的增殖,过表达 CABLES-1 可以促进成骨细胞增殖。

4 结论

本文证明了 FSS 促进成骨细胞 MC3T3-E1 增殖,其机制可能是通过 miR-199a-3p 及其靶基因 CABLES-1 实现。本文研究结果为 FSS 诱导成骨细胞增殖机制的研究提供新方向,也为未来机械刺激在骨关节疾病治疗中的临床应用研究提供新思路。

参考文献:

- [1] 杨焕,韩标,郭勇. 载荷作用下骨细胞分泌因子对成骨细胞和破骨细胞的调节[J]. 医用生物力学, 2021, 36(5): 824-828.
- [2] YANG H, HAN B, GUO Y. Regulation of osteoblasts and osteoclasts by secretory factors derived from osteocytes under mechanical loading [J]. J Med Biomech, 2021, 36(5): 824-828.
- [3] CLARKE B. Normal bone anatomy and physiology [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2008, 3(Suppl 3): S131-139.
- [4] OZCIVICI E, LUU YK, ADLER B, et al. Mechanical signals as anabolic agents in bone [J]. Nat Rev Rheumatol, 2010, 6(1): 50-59.
- [5] GREGL A, HEITMANN D, KRACK U, et al. Das gesetz der transformation der knochen A [J]. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1893, 19(47): 1222-1224.
- [6] LEE TC, TAYLOR D. Bone remodelling: Should we cry Wolff? [J]. Irish J Med Sci, 1999, 168(2): 102-105.
- [7] TOMINARI T, ICHIMARU R, TANIGUCHI K, et al. Hypergravity and microgravity exhibited reversal effects on the bone and muscle mass in mice [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 6614.
- [8] WITTKOWSKA C, REILLY GC, LACROIX D, et al. In vitro bone cell models: Impact of fluid shear stress on bone formation [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2016, 4: 87.
- [9] OWAN I, BURR DB, TURNER CH, et al. Mechanotransduction in bone: Osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain [J]. Am J Physiol, 1997,

- 273(3): C810-C815.
- [9] YOU J, REILLY GC, ZHEN XC, *et al.* Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(16): 13365-13371.
- [10] MOHR AM, MOTT JL. Overview of microRNA biology [J]. *Semin Liver Dis*, 2015, 35(1): 3-11.
- [11] 张扬, 张西正. 微重力环境下 MicroRNA 调控成骨细胞分化研究进展 [J]. *医用生物力学*, 2018, 33(3): 285-290.
ZHANG Y, ZHANG XZ. Research progress on MicroRNA regulating osteoblast differentiation under microgravity [J]. *J Med Biomech*, 2018, 33(3): 285-290.
- [12] YUAN Y, GUO J, ZHANG L, *et al.* MiR-214 attenuates the osteogenic effects of mechanical loading on osteoblasts [J]. *Int J Sports Med*, 2019, 40(14): 931-940.
- [13] WANG X, GENG B, WANG H, *et al.* Fluid shear stress-induced down-regulation of microRNA-140-5p promotes osteoblast proliferation by targeting VEGFA via the ERK5 pathway [J]. *Connect Tissue Res*, 2022, 63(2): 156-168.
- [14] 杨焕, 曹振, 汪洋, 王佳慧, 等. 跑步运动对小鼠骨组织微小 RNA 表达的影响 [J]. *医用生物力学*, 2021, 36(S1): 439.
- [15] AISHA MD, NOR-ASHIKIN MNK, SHARANIZA ABR, *et al.* Orbital fluid shear stress promotes osteoblast metabolism, proliferation and alkaline phosphates activity *in vitro* [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 337(1): 87-93.
- [16] QU F, ZHENG J, GAN W, *et al.* MiR-199a-3p suppresses proliferation and invasion of prostate cancer cells by targeting Smad1 [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(32): 52465-52473.
- [17] ZHOU L, ZHANG S, ZHANG L, *et al.* MiR-199a-3p inhibits the proliferation, migration, and invasion of endothelial cells and retinal pericytes of diabetic retinopathy rats through regulating FGF7 via EGFR/PI3K/AKT pathway [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2021, 41(1): 19-31.
- [18] JIANG J, ZHAO LG, TENG YJ, *et al.* ERK5 signalling pathway is essential for fluid shear stress-induced COX-2 gene expression in MC3T3-E1 osteoblast [J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 406(1-2): 237-243.
- [19] 张成俊, 夏亚一, 王常德, 等. 流体切应力下 SIVA-1 凋亡诱导因子促成骨细胞增殖分化的双向调节作用 [J]. *中国微创外科杂志*, 2009, 9(8): 741-746.
- [20] ZHANG B, AN L, GENG B, *et al.* ERK5 negatively regulates Kruppel-like factor 4 and promotes osteogenic lineage cell proliferation in response to MEK5 overexpression or fluid shear stress [J]. *Connect Tissue Res*, 2021, 62(2): 194-205.
- [21] LI P, MA YC, SHENG XY, *et al.* Cyclic fluid shear stress promotes osteoblastic cells proliferation through ERK5 signaling pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 364(1-2): 321-327.
- [22] GUO Y, WANG Y, LIU Y, *et al.* MicroRNA-218, microRNA-191, microRNA-3070a and microRNA-33 are responsive to mechanical strain exerted on osteoblastic cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2): 3033-3038.
- [23] MAI ZH, PENG ZL, ZHANG JL, *et al.* miRNA expression profile during fluid shear stress-induced osteogenic differentiation in MC3T3-E1 cells [J]. *Chin Med J*, 2013, 126(8): 1544-1550.
- [24] HUNG CT, POLLACK SR, REILLY TM, *et al.* Real-time calcium response of cultured bone cells to fluid flow [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1995, (313): 256-269.
- [25] REICH KM, FRANGOS JA. Effect of flow on prostaglandin E2 and inositol trisphosphate levels in osteoblasts [J]. *Am J Physiol*, 1991, 261(3 Pt 1): C428-432.
- [26] OWAN I, BURR DB, TURNER CH, *et al.* Mechanotransduction in bone: Osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(3 Pt 1): C810-815.
- [27] KAPUR S, BAYLINK DJ, LAU KH. Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways [J]. *Bone*, 2003, 32(3): 241-251.
- [28] WANG H, SUN Z, WANG Y, *et al.* miR-33-5p, a novel mechano-sensitive microRNA promotes osteoblast differentiation by targeting Hmg2 [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23170.
- [29] WANG X, LI Y, ZHOU H, *et al.* Effect of gambogic acid on miR-199a-3p expression and cell biological behavior in colorectal cancer cells [J]. *J Oncol*, 2021: 5140621.
- [30] XU C, ZHU LX, SUN DM, *et al.* Regulatory mechanism of lncRNA NORAD on proliferation and invasion of ovarian cancer cells through miR-199a-3p [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(4): 1672-1681.
- [31] LIU H, WANG Y, WANG Y, *et al.* miR-199a-3p plays an anti-tumorigenic role in lung adenocarcinoma by suppressing anterior gradient 2 [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 7859-7871.
- [32] DUAN Z, CHOY E, HARMON D, *et al.* MicroRNA-199a-3p is downregulated in human osteosarcoma and regulates cell proliferation and migration [J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(8): 1337-1345.
- [33] LIU J, WANG Y, CUI J, *et al.* miR199a-3p regulates P53 by targeting CABLES1 in mouse cardiac c-kit(+) cells to promote proliferation and inhibit apoptosis through a negative feedback loop [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 127.
- [34] ZUKERBERG LR, PATRICK GN, NIKOLIC M, *et al.* Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth [J]. *Neuron*, 2000, 26(3): 633-646.
- [35] GROENEWEG JW, WHITE YAR, KOKEL D, *et al.* Cables1 is required for embryonic neural development: Molecular, cellular, and behavioral evidence from the zebrafish [J]. *Mol Reprod Dev*, 2011, 78(1): 22-32.