

颅骨缺损山羊模型中 miR-196b 调节破骨细胞分化的作用机制

崔 阳 张春阳 杨文典 朱 东 李 鲁

摘 要 **目的** 研究 miR-196b 在调节破骨细胞分化过程中的作用机制。**方法** 通过构建山羊颅骨缺损模型,分别选取颅骨缺损山羊的颅骨组织和发育正常山羊的颅骨组织作为样本。将收集样本进行基因测序分析,得到两样本中明显差异表达的 miRNAs。以这些差异表达的 miRNA 为对象进行 KEGG pathway 功能分析,并通过靶基因预测软件预测 miR-196b 的靶基因,研究 miR-196b 在破骨细胞分化过程中的作用及其与靶基因的关系。**结果** miR-196b 在颅骨缺损组中呈高表达 ($P < 0.05$),两样本中差异表达的 miRNA 在破骨细胞分化通路中富集,miR-196b 调控的靶基因参与破骨细胞分化的调控通路。**结论** 高表达的 miR-196b 参与破骨细胞分化通路中对 AKT、JNK、STAT2 等靶基因的调控过程。其作用可能对骨组织的代谢产生影响。

关键词 miR-196b 破骨细胞 调控通路 靶基因

中图分类号 R651.1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.08.016

Mechanism of MiR-196b Regulate Osteoclast Differentiation in Goat Skull Defects. Cui Yang, Zhang Chunyang, Yang Wendian, et al. Baotou Medical College, Inner Mongolia 014030, China

Abstract **Objective** To investigate the modulation mechanism of miR-196b in osteoclast differentiation. **Methods** After the establishing the goat models with skull defects, the skull tissues were collected from both goats with skull defects and healthy goats with normal development as samples. Gene sequencing analysis was then performed for the skull tissue samples, and the miRNAs with obvious differential expressions were acquired. KEGG pathway analysis was carried out with the miRNAs as the object, and the target genes of miR-196b were predicted by gene target prediction software, and the function of miR-196b in osteoclast differentiation and the its relationship with the target genes. **Results** miR-196b presented high expression in the skull tissues of the skull defect group; the miRNAs with obvious differential expressions in the two samples presented enrichment in the osteoclast differentiation pathway; and the miR-196b modulated target genes play a role in the modulation pathway of osteoclast differentiation. **Conclusion** The highly-expressed miR-196b participates in the modulation of the target genes including AKT, JNK, STAT2 in the osteoclast differentiation pathway, and this modulation function may have influences on the metabolism of bone tissues.

Key words MiR-196b; Osteoclasts; Regulation pathways; Target genes

骨组织的代谢包括骨形成和骨吸收两个生理过程。这个生理过程需要成骨细胞和破骨细胞的作用来维持^[1,2]。破骨细胞是由单核细胞前体分化而来的骨吸收细胞,是一种高度分化的多核巨细胞,主要分布在骨质表面、骨内血管通道周围,是唯一一种具有吸收活性的细胞类型^[3,4]。microRNAs (miRNAs) 是一类广泛存在于组织器官的内源性单链低分子 RNA,其长度约 18~22 个核苷酸^[5]。miRNA 具有多

种生物学功能,可参与神经系统发育,免疫细胞发育与分化,肿瘤,以及各种骨细胞分化、发育的调控过程^[6-8]。成熟的 miRNA 在细胞内通过和成熟的 mRNA 的 3'-UTR 结合发挥生物学效能^[9]。

各种介导破骨细胞分化过程的细胞因子会通过复杂多样的信号转导通路直接或间接地调控关键核基因的表达来促进或抑制破骨细胞的分化过程。本研究探讨 miR-196b 调控的靶基因,以及对破骨细胞分化过程的影响。

材料与方法

1. 材料:实验动物:2 个月龄小尾寒羊 10 只(包头医学院动物实验室)。(1)实验仪器与主要试剂:Hisq2000 高通量测序仪、CBOT 簇生成仪购自美国 Illumina 公司;冷冻离心机购自美国 Scanspeed 公司;

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81360164)

作者单位:014030 包头医学院第一附属医院神经外科(崔阳、张春阳、杨文典、李鲁);包头医学院第二附属医院神经外科(朱东)

通讯作者:张春阳,主任医师、教授、硕士生导师,电子信箱:826110838@qq.com

Nanodrop 购自美国 Thermo 公司; Qubit 购自美国 Invitrogen 公司; 电泳仪购自中国天能公司; 凝胶成像系统购自中国天能公司; 超声波破碎仪购自比利时 Biorupter 公司; 浓缩仪购自美国 Thermo 公司; 常温离心机购自美国 Thermo 公司; 漩涡混合仪 vortex - genie 2 购自美国 SI 公司; 普通 PCR 仪购自美国 Life 公司。

(2) miRNA 建库: TruSeq[®] miRNA Sample Prep Kit v2 购自美国 Illumina 公司; 测序试剂 1: TruSeq SR Cluster Kit v3 - cBot - HS 购自美国 illumina 公司; 测序试剂 2: TruSeq SBS Kit v3 - HS (50 - cycles) 购自美国 Illumina 公司; 捕获磁珠 AmpureBeads 购自美国 Beckman 公司; Qubit 定量: Quant - iT[™] PicoGreen[®] dsDNA AssayKit 购自美国 life 公司; 枪头与离心管购自美国 Axygen 公司。

2. 方法: (1) 造模取样: 选择 2 个月龄的寒羊 10 只, 5 只为实验组 (S4), 5 只为对照组 (S44)。将实验组通过手术制造颅骨缺损模型。两组采取常规的喂养方式进行正常喂养, 均在 10 个月时处死, 实验组提取缺损处新生的颅骨组织, 对照组提取相同位置发育正常颅骨组织。采集后将细胞保护液加入 EP 管中, 置液氮迅速冷冻, 之后置于 -80℃ 备用。

(2) 样本 RNA 抽提: ①将组织在液氮中磨碎, 每 50 ~ 100mg 组织加入 1ml Trizol, 用匀浆仪进行匀浆处理, 室温放置 5min 使核酸蛋白完全分离后, 4℃ 12000 × g 离心 5min, 取上清; ②每使用 1ml TRIzol 加入 0.2ml 氯仿, 剧烈振荡 15s, 室温放置 3min。再次 4℃ 12000 × g 离心 15min 取无色水相转移到新管中用异丙醇沉淀水相中的 RNA; ③每使用 1ml Trizol 加入 0.5ml 异丙醇, 低温放置 30min 以上; ④4℃ 12000 × g 离心 10min, 移去上清后加 1ml 乙醇, 4℃ 8000 × g 离心 5min, 弃上清, 并吸干多余乙醇; ⑤加入一半体积的 8mol/L LiCl 溶液, 充分混匀, 冰上放置 1h; ⑥4℃ 13000 × g 离心 15min, 移去上清, 加 1ml 乙醇, 4℃ 8000 × g 离心 5min, 弃上清, 并吸干多余乙醇; ⑦加入 20 ~ 50μl 无 RNase 的水, 用枪头吸打几次使之溶解, 加入 20 ~ 50μl 无 RNase 的水, 用枪头吸打几次使之溶解; ⑧测定浓度, 并电泳质检 RNA。

(3) RNA 质检: ①取 1μl RNA 样本上 Nanodrop 仪器 (美国 Thermo 公司) 定量; ②根据 Nanodrop 仪器定量结果, 取 500ng 1% 琼脂糖电泳检测。

(4) miRNA 文库构建: ①加 3' 端接头: 取 1μg totalRNA, 用水调整体积到 5μl, 加 1μl 3' adapter 充分混匀, PCR 仪 70℃ 2min, 立即放冰上; 加 2μl HML, 1μl RNase Inhibitor, 1μl

T4RNA ligase2, truncated 1μl, 充分混匀, PCR 仪 28℃ 1h; 加 1μl STP, 充分混匀, 28℃ 15min; ②加 5' 端接头: 取 1.1μl RNA 5' adapter, PCR 仪 70℃ 2min, 立即放冰上; 加 1.1μl 10mmol/L dATP, 1.1μl T4 RNA ligase, 充分混匀; 将 3μl 上述 mix 加到步骤①的管中, 28℃ 1h, 放置冰上。

(5) RT - PCR 富集: ①取 0.5μl 25mmol/L dNTP mix 加 25μl 水, 充分混匀; ②取 6μl 加过接头的 RNA, 加 1μl RTP, 充分混匀, PCR 仪 70℃ 2min, 立即放冰上; ③加 2μl 5XFirst strand buffer, 0.5μl 12.5mmol/L dNTPs, 1μl 100mmol/L DTT, 1μl RNase Inhibitor, 1μl SSII 充分混匀之后, PCR 仪 50℃ 1h; ④取 12.5μl RT 产物, 加 8.5μl 水, 25μl PML, 2μl RP1 和 2μl RPIX, 充分混匀, 98℃ 30s, 11cycles (98℃ 10s, 60℃ 30s, 72℃ 10s), 72℃ 5min, 10℃ hold; ⑤PAGE 电泳回收 145 ~ 160bp 目的条带。

(6) 定量: Qubit (美国 Invitrogen 公司) 定量 miRNA 文库。

(7) 簇生成: ①Qubit 仪器 (美国 Invitrogen 公司) 定量文库, 稀释至 10nmol/L, 取 4μl 10nmol/L 文库, 加 1μl 2N NaOH, 加 15μl Tris - Cl, 混匀, 室温放置 5min; ②取 6μl 步骤①溶液, 加 994μl 冷的杂交 buffer; ③取 140μl 步骤②溶液, 放在 8 连管中, 置于 cBot 的 template 栏中, Start cBot 仪器, 开始簇生成。

(8) Illumina HiSeq2000 测序: HiSeq2000 (美国 Illumina 公司) 上机, 运行 4 天下机, 将原始数据转换成 Fastq 格式。

(9) miR - 196b 靶基因预测: 本研究使用 Targetscan、miRDB 软件预测 miR - 196b 的靶基因。

3. 统计学方法: 采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

经基因测序分析, 实验组 (S4) 与对照组 (S44) 相比差异表达的 miRNA 见图 1, 结果表明 miR - 196b 在两样本中表达的差异性较大。具体表达情况见图 2, 在实验组 (S4) 中 miR - 196b 较对照组 (S44) 的表达显著上调。破骨细胞分化的 PI₃K - AKT 信号通路, MAPK 信号通路, JAK - STAT 信号通路见图 3 ~ 图 5, 其中红色方框代表 miR - 196b 的靶基因。

讨 论

小儿颅骨缺损的修复一直是临床上的难题之一。颅骨缺损对小儿正常的生长发育及神经功能恢复有很大的影响, 目前已引起神经外科界的广泛关注。如果患儿颅骨缺损范围 > 3cm, 需颅骨缺损修补手术,

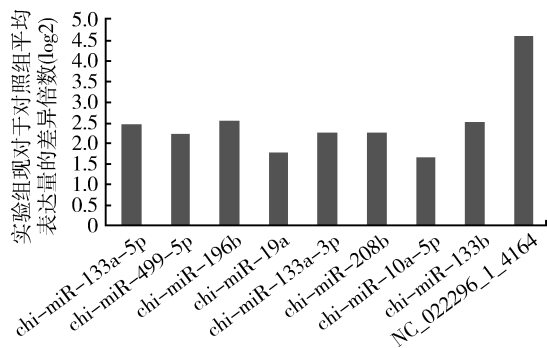


图 1 两样本明显差表达的 miRNA 横坐标为 miRNA 名称

纵坐标为实验组 (S4) 相对于正常对照组 (S44) 组平均表达量的差异倍数 (log2 转化)

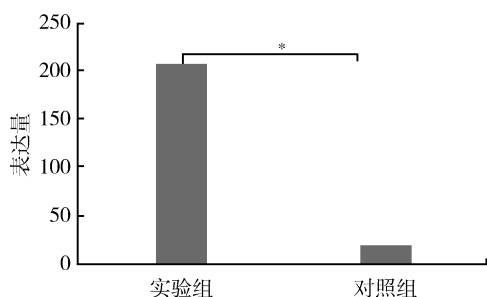


图 2 miR-196b 在两组中的表达情况

* $P < 0.05$

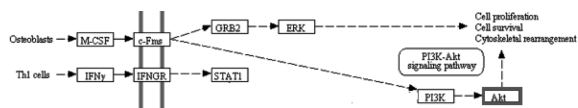


图 3 PI_3K -AKT 信号通路

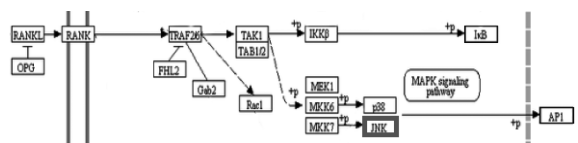


图 4 MAPK 信号通路



图 5 JAK-STAT 信号通路

的颅骨修补办法不适合应用,缺少较为理想的治疗方案。骨组织工程在治疗儿童颅骨缺损方面有着很好前景,也取得一定的进展,但仍存在短期内难以克服的问题。因此,需要从新的角度入手来寻找一种安全有效的儿童颅骨缺损修复的方法,是亟待解决的问题。

破骨细胞是一种高度分化的多核巨细胞,是骨吸收的主要功能细胞,参与贯穿生命始终的骨重建过程。目前已证实了在对破骨细胞分化的调节中,由骨保护蛋白 (osteoprotegerin, OPG)、细胞核因子 κB 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor kappa - B ligand, RANKL) 和细胞核因子 κB 受体活化因子 (receptor activator of nuclear factor kappa - B, RANK) 所形成的 OPG/ RANKL/ RANK 系统发挥着重要的作用^[10-13]。

因地域关系,本研究选用小尾寒羊作为实验动物,通过运用基因芯片、实时定量 real time - PCR 和生物信息学技术等方法检测寒羊缺损再生的颅骨中 miRNA 的表达谱,筛选差异表达的 miRNA,寻找可能的在颅骨再生分化过程中的特异性的 miRNA,最终进一步阐明 miRNA 在未发育成熟寒羊再生颅骨分化中的作用及其靶基因预测。本研究中,笔者选取 miR-196b 作为研究对象,首次研究其在破骨细胞分化过程中的作用及其机制。

本研究发现相比正常发育颅骨组织,颅骨缺损的样本中 miR-196b 表达明显上调。运用 KEGG pathway 功能分析的方法笔者发现两样本中明显差异表达的 miRNA 在破骨细胞分化通路中显著富集。为明确 miR-196b 在颅骨缺损山羊中对破骨细胞分化调控过程相关联的靶基因,借助靶基因软件 TargetScan、miRDB 分析得到其靶基因 AKT、JNK、STAT2 等参与破骨细胞分化过程。本研究还发现其他差异性表达的 miRNA 调节的靶基因参与破骨细胞分化的调控,例如 miR-181b 调节 IL-1 的表达,miR-499a-5p 调节 PI_3K 、Syk 的表达,miR-133b 调节 OSCAR、CN 的表达等。具体调节机制和原理还需实验研究去证实。

综上所述,理论上,凡是能对破骨细胞分化过程中的相关通路或蛋白起作用的 miRNA 都将起到调控破骨细胞分化的作用。而 miRNA 与靶 mRNA 的 3'非翻译区 (3' - UTRs) 不完全互补配对结合后,通过降低 mRNA 分子稳定性和翻译抑制两种方式参与靶基因表达调控^[14]。本研究首次发现过表达的 miR-

但由于小儿正处于生长发育期,如果手术时机选择不当可能会影响到小儿颅脑的正常发育,但手术的最佳时机目前临床上尚无满意的统一标准。由于儿童颅骨具有生长发育的特殊性,导致目前临床上很多常用

196b 参与对破骨细胞分化的调控过程,可能抑制破骨细胞的分化,为颅骨生长以及其他骨代谢疾病的研究提供新的思路。

参考文献

- Gruber HE, Ivey JL, Thompson ER, *et al.* Osteoblast and osteoclast cell number and cell activity in postmenopausal osteoporosis [J]. *Miner Electrolyte Metab*, 1986, 12(4): 246 – 254
- Segovia – Silvestre T, Neutsky – Wulff AV, Sorensen MQ, *et al.* Advances in osteoclast biology resulting from the study of osteopetrotic mutations [J]. *Hum Genet*, 2009, 124(6): 561 – 577
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, *et al.* Modulation osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families [J]. *Endocr Rev*, 1999, 20(3): 345 – 357
- Baron R. Molecular mechanisms of bone resorption: therapeutic implications [J]. *Rev Rhum Engl Ed*, 1996, 63(10): 633 – 638
- Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs [J]. *Cell*, 2009, 136(4): 642 – 655
- Graves PI, Zene Y. Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view genomics [J]. *Proteomics Bioinform*, 2012, 10(5): 239 – 245
- Ambros V. The functions of animal microRNAs [J]. *Nature*, 2004, 431: 350 – 355
- Kim SW, Ramasamy K, Bouamar H, *et al.* MicroRNAs miR – 125a and miR – 125b constitutively activate the NF – κ B pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha – induced protein 3 (TNFAIP3, A20) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 9(20): 7865 – 7870
- Noma K, Sugiyama T, Cam H, *et al.* KITS acts in cis to promote RNA interference – mediated transcriptional and post – transcriptional silencing [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(11): 1174 – 1180
- Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts [J]. *Science*, 2000, 289(5484): 1504 – 1508
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation [J]. *Cell*, 1998, 93(2): 165 – 176
- Anderson DM, Maraskovsky E, BULINGSLEY WL, *et al.* A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T – cell growth and dendritic – cell function [J]. *Nature*, 1997, 390(6656): 175 – 179
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan, *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density [J]. *Cell*, 1997, 89(2): 309 – 319
- Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, *et al.* Zebrafish MiR – 430 promotes eadenylation and clearance of maternal mRNAs [J]. *Science*, 2006, 312(5770): 75 – 79

(收稿日期: 2015 – 12 – 29)

(修回日期: 2016 – 01 – 22)

骨髓细胞固定液 DNA 提取与质量评价的实验研究

李 洁 孙恒娟 蒋 慧

摘 要 **目的** 利用骨髓染色体核型分析后剩余骨髓细胞固定液标本提取基因组 DNA 并评价 DNA 质量。**方法** 将 60 例骨髓细胞固定液标本按保存时间的不同分为 3 组,同时另取新鲜骨髓标本(冻存于 -80°C) 20 例,利用天根公司 DNA 提取试剂盒(离心柱型)提取基因组 DNA,通过紫外分光光度仪检测 DNA 浓度与纯度、DNA 凝胶电泳观察 DNA 条带、聚合酶链反应检测有无不同片段大小的目的基因的扩增以评价 DNA 质量。**结果** 骨髓细胞固定液标本及新鲜骨髓(冻存)标本所提取的基因组 DNA 的 A260/A280 比值分别为 1.93 ± 0.03 、 1.92 ± 0.04 ;两者纯度比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);不同保存时间 (< 3 年、 $3 \sim 5$ 年、 > 5 年)的骨髓细胞固定液标本所提取 DNA 的 A260/A280 比值分别为 1.94 ± 0.03 、 1.91 ± 0.03 、 1.93 ± 0.04 ,其纯度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。上述实验标本均能通过 PCR 反应扩增出不同片段大小的目的条带。**结论** 利用染色体核型分析后剩余的骨髓细胞固定液标本可以提取出质量合格的基因组 DNA,其可作为分子生物学相关研究的标本来源。

关键词 骨髓细胞 固定液 基因组 DNA 提取 质量评价

中图分类号 R72 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.08.017

Study on the Genomic DNA Extraction from the Fixative Solution of Bone Marrow Cells and Its Quality Evaluation. Li Jie, Sun Hengjuan, Jiang Hui. *Children's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai Children's Hospital, Shanghai 200040, China*

基金项目:上海市科委基金资助项目(14411950602)

作者单位:200040 上海交通大学附属儿童医院、上海市儿童医院血液肿瘤科(李洁、蒋慧),分子实验室(孙恒娟)

通讯作者:蒋慧,电子信箱:jhui0111@126.com