



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 _____

U D C _____

密 级 _____

博士学位论文

TNF- α 通过 microRNAs 导致骨质疏松中骨髓间充质干细胞分化缺陷的机制研究

廖立

培 养 类 别 _____ 全日制 _____

学 号 _____ 1302012153 _____

学 位 类 型 _____ 学术学位 _____

一级学科(专业类) _____ 口腔医学 _____

二级学科(专业) _____ 口腔基础医学 _____

研 究 方 向 _____ 干细胞调控机制 _____

指 导 教 师 _____ 金岩 教授 _____

培 养 单 位 _____ 口腔医院口腔组织病理教研室 _____

二〇一六年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____导师签名：_____日期：_____

目 录

缩略语表	1
中文摘要	3
ABSTRACT	7
前 言	12
文献回顾	14
正 文	28
第一部分 骨质疏松中 TNF- α 对 BMSCs 成骨分化的作用研究	28
1 材料	28
1.1 仪器和设备	28
1.2 实验动物	29
1.3 主要试剂	29
2 方法	29
2.1 去势骨质疏松模型的建立	29
2.2 组织学检测	30
2.3 microCT 检测	30
2.4 BMSC 培养	31
2.5 成骨集落形成实验	31
2.6 茜素红染色及定量	31
2.7 血清 TNF- α ELISA 检测	32
2.8 RNA 提取	32
2.9 mRNA 逆转录反应	33
2.10 Realtime PCR 检测	33
2.11 Western blot 检测	34
2.12 细胞凋亡检测	35
2.13 IKK α SiRNA 转染	35
2.14 统计	36
3 结果	36

4 讨论	40
第二部分 TNF- α 通过 miR-3077-5p 抑制 BMSCs 成骨分化	43
1 材料	43
1.1 仪器和设备	43
1.2 主要试剂	43
2 方法	44
2.1 miRNA 芯片筛选	44
2.2 不同组织 RNA 提取	44
2.3 茜素红染色及定量	45
2.4 miRNA Realtime PCR 检测	45
2.5 miRNA mimic 及 inhibitor 转染	45
2.6 miRNA 靶基因预测	45
2.7 荧光素酶报告基因检测	46
2.8 Western blot 检测	46
2.9 细胞增殖检测	46
2.10 雌激素体内注射	47
2.11 统计	47
3 结果	47
4 讨论	57
第三部分	59
1 材料	59
1.1 仪器和设备	59
1.2 主要试剂	60
2 方法	60
2.1 骨免疫组织化学检测	60
2.2 细胞免疫荧光检测	61
2.3 体内 BMSCs ROS 水平检测	61
2.4 体外 BMSCs ROS 水平检测	62
2.5 Realtime RT-PCR 检测	62
2.6 TNF- α 体内注射	62
2.7 TNF- α 中和实验	62
2.8 FOXO1 过表达慢病毒载体构建	63

2.9 统计	64
3 结果	65
4 讨论	75
第四部分 TNF- α 通过-miR-705 介导的正反馈回路持续性导致氧化应激	78
1 材料	78
1.1 仪器和设备	78
1.2 主要试剂	79
2 方法	79
2.1 miR-705 结合靶基因预测	79
2.2 MiR-705 Antagomir 骨髓腔内注射	80
2.3 荧光素酶报告实验	80
2.4 miR-705 启动子中 p65 结合位点预测	80
2.5 Chromatin Immunoprecipitation	80
2.9 统计	81
3 结果	82
4 讨论	92
小 结	94
参考文献	95
附 录	102
个人简历和研究成果	103
致 谢	106

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
ALP	alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
α -MEM	Alpha modified minimum essential medium	α -MEM 培养基
BMSCs	bone marrow-derived mesenchymal stem cell	骨髓基质干细胞
CAT	catalyse	过氧化氢酶
CHIP	chromatin immunoprecipitation	染色质免疫共沉淀
DCFH-DA	2' 7' Dichorodihydrofluorescein	2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
FCM	flow cytometry	流式细胞术
FOXO	Forkhead bOX-containing protein, O sub-family	叉头结合蛋白 O 亚家族
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
H&E	hematoxylinand and eosin	苏木素和伊红
IL	interleukin	白介素
IBMX	3-isobutyl-1-methyl-xanthine	3-异丁基-1-甲基黄嘌呤
IFN- γ	interferon- γ	干扰素- γ
MTT	3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide	3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二甲基四氮唑溴盐
miRNA	microRNA	微小 RNA
NAC	N-Acetyl-L-cysteine	N-乙酰半胱氨酸
OCN	osteocalcin	骨钙素
OPG	osteoprotegerin	骨保护素
OVX	ovariectomy	卵巢切除术
OS	oxidative stress	氧化应激
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
ROS	reactive oxygen species	氧自由基

RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction	逆转录聚合酶链式反应
SD	standard deviation	标准差
SHAM	sham surgery	假手术
SOD2	Superoxide Dismutase2	超氧化物歧化酶 2
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha	肿瘤坏死因子 α
TBS	Tris buffer saline	Tris 缓冲液
UTR	Untranslated region	非翻译区域

TNF- α 通过 microRNAs 导致骨质疏松中骨髓间充质干细胞分化缺陷的机制研究

博士研究生：廖 立

导 师：金 岩 教授

第四军医大学口腔医院口腔组织病理教研室，西安 710032

资助基金项目：国家重大科学研究计划项目（2011CB964700）

中文摘要

【背景】

绝经后骨质疏松是最常见的骨质疏松，主要表现为绝经后出现的骨密度降低、骨微结构破坏和力学性能减退。可造成非应力性骨折高发，是危害中老年女性健康和生命的主要退行性疾病之一。骨质疏松发生的根本原因是破骨细胞介导的骨吸收与成骨细胞介导的骨形成间的平衡破坏。骨髓间充质干细胞（BMSCs）作为成骨前体细胞的来源，在骨发育、改建和修复再生中均发挥重要作用。已有研究证实，在骨质疏松中 BMSCs 的成骨分化能力下降，是导致骨形成缺陷的重要原因。但是绝经后导致 BMSCs 分化功能异常的机制亟待阐明。

最新研究表明，雌激素并非主要通过直接作用于 BMSCs 发挥作用。而雌激素缺乏后 T 细胞激活引起的炎性因子增加是骨质疏松发生的重要致病因素。TNF- α 作为最主要的炎性因子，其升高已被证实可以抑制 BMSCs 的成骨分化，而通过基因敲除或中和抗体等方法抑制 TNF- α 可有效预防雌激素缺乏所致骨质疏松。但是因为 TNF- α 作用广泛、下游信号通路复杂，所以其抑制 BMSCs 分化的分子信号途径尚不清楚。

近年来 miRNA 作为基因表达的重要调控手段，已被证实在 BMSCs 分化中扮演关键角色。现已发现多个 miRNA 通过作用于成骨关键转录因子和信号分子调控 BMSCs 成骨分化进程。同时，在肿瘤、心血管疾病、神经退行性疾病等多种老年性

疾病中均观察到特定 miRNA 的表达变化，并参与了疾病的发生发展进程。但是骨质疏松过程中 BMSCs 中 miRNA 表达是否发生改变，其改变与骨质疏松发生是否相关等重要问题均有待解答。

【目的】

本研究拟利用 microRNA 高通量芯片检测技术，结合分子生物学和细胞生物学研究方法，探索 TNF- α 抑制 BMSCs 成骨分化的分子途径，明确 miRNA 在其中的作用及机制，为深入认识绝经骨质疏松的发生机制，探寻新的治疗靶点提供实验依据。

【方法】

1、通过卵巢切除 (OVX) 手术建立雌激素缺乏骨质疏松小鼠模型，利用 microCT 和组织学检测明确其骨量变化；2、通过体外成骨分化实验，利用茜素红染色和成骨标志基因 Realtime RT-PCR 检测明确 OVX 小鼠来源 BMSCs 成骨分化能力改变；3、利用 ELISA 检测明确 TNF- α 在 OVX 术后的水平变化；4、利用 Western blot 检测 TNF- α 下游激活的信号通路；5、利用 siRNA 阻断特定信号分子进行缺失性功能研究；6、通过 miRNA 高通量芯片筛查寻找在 OVX 及 SHAM BMSCs 中差异性表达的 miRNA；7、利用特定 miRNA mimics 和 inhibitor 转染进行获得/缺失性功能实验，用以确定 miR-3077-5p 和 miR-705 在 BMSCs 中的作用；8、利用生物信息学分析寻找 miRNA 作用的靶基因；9、采用 Western blot 检测结合荧光素酶报导系统验证 miRNA 对靶基因的直接作用；10、利用雌激素体内注射和体外处理明确 miR-3077-5p 和 miR-705 是否直接受雌激素调控；11、利用重组 TNF- α 和 TNF- α 中和抗体体内注射，明确 TNF- α 对 miR-3077-5p 和 miR-705 表达的调控作用及其激活的信号通路；12、利用 TNF- α 体外处理，研究 TNF- α 调控 miR-3077-5p 和 miR-705 表达的分子信号机制；13、利用 DCFH 标记检测 BMSCs 内 ROS 水平；14、利用抗氧化剂 NAC 明确 ROS 对于 BMSCs 成骨分化的作用；15、利用免疫组化检测骨质疏松后松质骨中 FOXO1 的表达；16、利用 FOXO1 siRNA 干扰和慢病毒过表达技术，明确 FOXO1 在 BMSCs 抗氧化防御中的作用；17、通过 antogomir 体内注射体内下调 miR-705 的表达，以体内验证 miR-705 的功能及其作用靶基因；18、利用 CHIP 技术明确 NF- κ B 信号通路是否直接调控 miR-705 的转录。

【结果】

1、骨质疏松中 TNF- α 通过 NF- κ B 信号通路抑制 BMSCs 成骨分化

OVX 术后 3mon, BMSCs 成骨分化能力较假手术组显著下降。而血液中 TNF- α 水平在雌激素缺乏后明显上升, 体外实验证实过量的 TNF- α 抑制 BMSCs 成骨分化。进一步信号通路检测发现 TNF- α 并不激活凋亡通路, 而激活 NF- κ B 信号通路。IKK siRNA 抑制 NF- κ B 通路后可有效恢复 OVX BMSCs 的成骨分化, 并阻断 TNF- α 对 BMSCs 成骨分化的抑制作用。

2、TNF- α 通过上调 miR-3077-5p 表达抑制 BMSCs 成骨分化

miRNA 芯片筛查发现 10 个 miRNA 在 SHAM 及 OVX BMSCs 中呈差异性表达, 其中 miR-3077-5p、miR-705 差异最为显著。进一步研究发现 miR-3077-5p 在 OVX BMSCs 和骨组织中表达异常升高, 雌激素治疗后骨组织中表达恢复, 但体外雌激素处理却促进 miR-3077-5p 表达, TNF- α 显著促进 miR-3077-5p 表达, 说明雌激素缺乏后间接通过 TNF- α 导致 miR-3077-5p 表达。此外, miR-3077-5p 在骨组织中呈高表达, 随 BMSCs 成骨分化进程显著下降, 功能学研究证实 miR-3077-5p 抑制 BMSCs 成骨分化, 主要通过直接结合于成骨关键转录因子 Runx2 3'UTR 区域发挥作用。抑制 miR-3077-5p 有效恢复 OVX BMSCs 的成骨功能低下, 并部分拮抗 TNF- α 的抑制成骨分化作用。

3、TNF- α 通过抑制 FOXO1 导致氧化损伤, 间接抑制 BMSCs 成骨分化

通过体内外实验证实, 骨质疏松中 TNF- α 的升高导致 BMSCs 中 ROS 水平升高, 抑制 BMSCs 成骨分化。其氧化应激是由于 SOD2、CAT 等抗氧化酶表达减少、抗氧化防御缺陷所导致。FOXO1 作为重要的抗氧化调节因子, 在骨质疏松骨组织及 BMSCs 中表达均下降。通过获得/缺失性功能实验证实 FOXO1 促进 SOD2、CAT 表达, 发挥关键的抗氧化作用。TNF- α 抑制 FOXO1 的蛋白表达, 导致 OVX BMSCs 氧化损伤, 而过表达 FOXO1 可减轻 OVX 和 TNF- α 所致的氧化损伤, 恢复 BMSCs 的成骨分化功能。

4、TNF- α 通过 NF- κ B 通路上调 miR-705, 导致持续性氧化损伤

TNF- α 并不直接调控 FOXO1 转录。结合生物信息学分析、获得/缺失性功能实验、荧光素酶报告体系证实 miR-705 可结合于 FOXO1 3'UTR 抑制其表达。体内、体外实验证实 TNF- α 促进 miR-705 表达, 下调 miR-705 可提高 BMSCs 中 FOXO1 蛋白水平、SOD2 和 CAT mRNA 表达, 并减轻氧化损伤。信号通路研究证实 TNF- α 通过激活 NF- κ B 信号通路, 促进 P65 入核结合于 miR-705 启动子激活其转录。此外, ROS

也能激活 NF- κ B 通路提高 miR-705 表达。TNF- α 长期刺激导致 NF- κ B-miR-705-FOXO1-ROS 正反馈回路激活，造成 BMSCs 持续性的氧化损伤和成骨分化缺陷。

【结论】

- 1、TNF- α 在雌激素缺乏所致骨质疏松中发挥关键作用；
- 2、TNF- α 通过激活 NF- κ B 通路，导致 miRNA 表达异常。
- 3、TNF- α 导致 miR-3077-5p 表达升高，抑制成骨关键转录因子 Runx2，直接抑制 BMSCs 分化；
- 4、TNF- α 导致 miR-705 表达升高，抑制抗氧化防御关键因子 FOXO1，导致细胞氧化应激损伤，间接抑制 BMSCs 分化；
- 5、雌激素缺乏后，微环境中炎性因子和细胞内氧化应激发生协同作用，共同破坏 BMSCs 功能，导致成骨下降。

关键词：骨质疏松，微小 RNA，骨髓间充质干细胞，肿瘤坏死因子 alpha，细胞分化、氧化应激

Study of the mechanism that TNF- α inhibits osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells through microRNA during osteoporosis

Candidate for doctor: Liao Li

Supervisor: Jin Yan

Department of oral histopathology, School of stomatology, Fourth Military Medical

University,

Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: National Major Scientific Research Program of China

(2011CB964700)

Abstract

[Background]

Postmenopausal osteoporosis (PMOP) is one of the most common type of osteoporosis. The pathological characteristics of PMOP includes low bone mass, damage of micro-structure and decrease of mechanical property, resulting in high incidence of non-stress fracture. PMOP is becoming the major degenerative disease threatening the healthy and life of aged females. The basic mechanism of osteoporosis is the imbalance between osteoclast-mediated bone resorption and osteoblast-mediated bone formation. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs), the origin of osteoblast pregenitors, play crucial role in bone development, remodeling and regeneration. Previous studies have confirmed that osteogenic differentiation capacity of BMSCs is decreased during osteoporosis, resulting in defect of bone formation. However, the mechanism of the decreased BMSC osteogenic differentiation remains elusive.

Recent studies have shown that estrogen dose no direct function in BMSCs. Elevated inflammatory factors secreted by T cells after estrogen-deficiency are important etiological factors of osteoporosis. As the major inflammatory factor, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) has been proved to inhibit BMSC osteogenic differentiation. Inhibition of TNF- α by gene knock-out or specific antibody efficiently prevent estrogen-deficiency-mediated osteoporosis. Since the function and downstream signaling of TNF- α is complicated, the molecular mechanism of TNF- α to inhibit differentiation of BMSCs remains unknown.

As important regulator of gene expression, microRNA (miRNA) are recently found to play important role in differentiation of BMSCs. A number of miRNAs could control

osteogenic differentiation of BMSCs by targeting master transcription factors and signaling molecules. Moreover, differential expression of miRNAs has been observed in numbers of age-related degenerative diseases including tumor, cardiovascular diseases and nerve degenerative diseases. Specific miRNAs might take part in the pathogenesis and development of diseases. But whether miRNA expression in BMSCs is affected during osteoporosis and whether the change of miRNA expression is related with osteoporosis are needed to be answered.

[Purpose]

Our study aims to take advantage of technologies of miRNA micro-array, molecular biology and cell biology to explore the molecular mechanism of TNF- α to inhibit BMSC osteogenic differentiation and confirm the function and mechanism of specific miRNAs. This study would provide experimental evidence to improve our understanding of etiology of postmenopausal osteoporosis and to explore novel targets of osteoporosis treatment.

[Methods]

1, Postmenopausal osteoporosis mice model was established by ovariectomy (OVX), and microCT and histology assay were used to determine the change of bone mass. 2, Based on in vitro osteogenic differentiation assay, the osteogenic differentiation capacity of OVX BMSCs was determined by alizarin red staining and realtime RT-PCR analysis of osteogenesis makers. 3, TNF- α levels of OVX mice were determined by ELISA analysis. 4, Downstream signaling pathways activated by TNF- α were determined by Western blot assay. 5, siRNA was used to knockdown specific signaling molecules in loss-of-function assays. 6, miRNA micro-array analysis was used to screen differentially expressed miRNAs between OVX and Sham surgery (SHAM) BMSCs. 7, Gain- and loss-of-function analysis based on miRNA mimics and inhibitor were performed to determine the function of miR-3077-5p and miR-705 in BMSCs. 8, Bioinformatic analysis was performed to find the candidate target gene of miRNA. 9, Western blot assay and luciferase reporter assay were used to determine whether miRNA directly bind on target mRNAs. 10, In vivo estradiol injection and in vitro estrogen treatment were used to explore whether miR-3077-5p and miR-705 are directly regulated by estrogen. 11, Recombinant TNF- α

and TNF- α antibody in vivo injection were used to determine the function of TNF- α on miR-3077-5p and miR-705 expression and the downstream signaling pathway. 12, TNF- α in vitro treatment assay was used to investigate molecular signaling of TNF- α to regulate miR-3077-5p and miR-705. 13, DCFH assay was used to label ROS in BMSCs. 14, Antioxidant NAC was used to determine the effect of ROS on BMSCs osteogenic differentiation. 15, Immunohistochemistry was performed to determine the levels of FOXO1 in osteoporotic bone. 16, siRNA and overexpression lenti-virus were used to determine the function of FOXO1 in antioxidant defense of BMSCs. 17, Angomir was injected in vivo to knockdown miR-705 expression and determine the function and target gene of miR-705 in vivo. 18, CHIP assay was used to determine whether NF- κ B signaling pathway directly regulate transcription of miR-705.

[Results]

1, TNF- α inhibits osteogenic differentiation of BMSCs during osteoporosis.

Three month after OVX, osteogenic differentiation capacity of BMSCs was decreased compared with Sham surgery group. TNF- α levels in serum was significantly increased after OVX. In vitro assay confirmed that redundant TNF- α inhibit BMSCs osteogenic differentiation. Further signaling pathway analysis confirmed that TNF- α did not trigger apoptosis pathway, while activate NF- κ B pathway. Inhibition of NF- κ B by IKK siRNA effectively rescue osteogenic differentiation of OVX BMSCs, and block the inhibitory function of TNF- α on BMSC differentiation.

2, TNF- α inhibits osteogenic differentiation of BMSCs by up-regulating miR-3077-5p.

MiRNA micro-array screening found 10 miRNAs were differentially expressed between SHAM and OVX BMSCs. Among them, the difference of miR-3077-5p and miR-705 expression were the most significant. Further analysis found that miR-3077-5p expression was increased in OVX BMSCs and bone tissue, which could be recovered by estradiol in vivo injection. But estradiol in vitro treatment promote the expression of miR-3077-5p. TNF- α robustly enhanced miR-3077-5p expression, suggesting that estrogen indirectly regulates miR-3077-5p expression through TNF- α . Moreover, miR-3077-5p are highly expressed in bone tissue and significantly decreased during BMSCs osteogenic

differentiation. Functional analysis showed that miR-3077-5p inhibited osteogenic differentiation of BMSCs by directly bind the 3' untranslated region (UTR) of the mRNA of Runx2, a master transcription factor of osteogenesis. Knockdown of miR-3077-5p efficiently improved the osteogenic differentiation defect of OVX BMSCs, while partly prevent the function of TNF- α on BMSC differentiation.

3, TNF- α indirectly inhibits osteogenic differentiation of BMSCs through suppressing FOXO-mediated antioxidant defense.

In vitro and in vivo analysis confirm that elevated TNF- α during osteoporosis enhanced ROS levels in BMSCs, leading to inhibition of BMSCs osteogenic differentiation. Oxidative stress was resulted from decreased of SOD2 and CAT and defect of antioxidant defense. FOXO1, a key regulator of antioxidant defense, was decreased in osteoporotic bone and BMSCs. Gain and loss of function analysis confirm that FOXO1 promoted expression of SOD2 and CAT to suppress oxidative stress. TNF- α inhibited the protein levels of FOXO1, leading to oxidative damage in OVX BMSCs. Overexpression of FOXO1 significantly alleviated oxidative damage caused by OVX and TNF- α , and recovered osteogenic differentiation capacity of BMSCs.

4, TNF- α leads to persistent oxidative damage by decreasing miR-705 expression through NF- κ B pathway

TNF- α did not directly regulate transcription of FOXO mRNA. Based on bioinformatics analysis, gain-and-loss-of function assay and luciferase reporter system, miR-705 was proved to directly target 3'UTR of FOXO1 mRNA to suppression its expression. In vivo and in vitro experimnts confirmed that TNF- α increased miR-705 expression. Knockdown of miR-705 increased FOXO1 protein levels, SOD2 and CAT mRNA levels and suppressed oxidative damage. Signaling pathways analysis showed that TNF- α activated NF- κ B pathway to promote nuclear translocation of P65 to activate miR-705 transcription. Moreover, ROS also activated NF- κ B to promote miR-705 expression. Long-term TNF- α treatment activated a feed-forward stemloop of NF- κ B-miR-705-FOXO1-ROS, resulting in persistent ROS damage and osteogenic differentiation defect of BMSCs.

[Conclusion]

- 1, TNF- α plays important role in osteoporosis after estrogen deficiency.
- 2, TNF- α lead to abnormal expression of miRNA by activating NF- κ B pathway.
- 3, TNF- α enhances miR-3077-5p expression, which inhibiting key transcription factor Runx2, to directly inhibit osteogenic differentiation of MSCs.
- 4, TNF- α enhances miR-705 expression to inhibit antioxidant defense regulator FOXO1, resulting in oxidative damage and BMSCs differentiation defect.
- 5, Inflammatory factors and intracellular oxidative stress synergistically inhibit the function of BMSCs to decrease bone formation after estrogen deficiency.

Key words:

Osteoporosis, MicroRNA, Bone-marrow derived mesenchymal stem cells, Tumor necrosis factor-alpha, cell differentiation, oxidative stress

前 言

超过 40% 的绝经后女性患有骨质疏松^[1]，主要表现为骨组织显微结构受损、骨矿化成分和骨基质减少、骨量减少、骨脆性增加和骨折危险度升高^[2]。2008 年研究估计我国女性中有 5410 万患有骨质疏松、1.13 亿骨量降低，造成严重的健康威胁和巨大的社会经济负担^[3]。绝经后骨质疏松由骨吸收-骨形成平衡失调所导致，虽然临床上已有多种高效的抗骨吸收药物，但尚无理想的促进骨形成的治疗方案^[4]。

骨髓间充质干细胞（bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs）是维持骨形成的关键细胞^[5,6]，而 BMSCs 的成骨分化功能下降被广泛认为是导致骨质疏松中骨形成缺陷的重要原因^[7-10]。已有研究尝试通过促进 BMSC 的成骨分化以治疗骨质疏松^[11,12]。但是因为骨衰老过程中导致 BMSC 功能下降的机制不清，导致尚无高效特异的方法。所以探索骨衰老中 BMSC 功能异常的分子机制，已成为骨质疏松研究和治疗领域的新热点。

在骨质疏松发生过程中，以辅助性 T 细胞（T helper）为主的多种免疫细胞被激活，导致多种炎症因子显著上升，造成病理性炎症微环境^[13]。其中，肿瘤坏死因子 α （tumor necrosis factor-alpha, TNF- α ）在骨质疏松、关节炎、肌肉萎缩等多种慢性退行性疾病的发生发展中发挥关键作用^[13]。国际上及所在实验室研究证实，骨质疏松中 TNF- α 的释放能够显著干扰 BMSCs 的成骨分化功能，影响其介导的骨形成^[14,15]。但是其具体的作用机制尚不清楚。

microRNA（miRNA）是一类广泛存在于细胞内的单链、非编码小 RNA^[16]，在 BMSC 成骨分化中发挥关键的调控作用^[17,18]。已有十余个 miRNA 被证实通过调控关键性的转录因子或信号分子，影响 BMSCs 的分化进程。值得重视的是，越来越多的研究发现，miRNA 表达水平的改变可导致干细胞功能缺陷，引起多种衰老相关退行性疾病的发生^[18]。但是骨质疏松中，BMSC 成骨缺陷是否与 miRNA 表达异常有关所知甚少，直接阻碍了对于骨质疏松致病机制的深入认识。

本研究中我们假设：骨质疏松过程中炎症因子 TNF- α 通过影响 miRNA 表达导致 BMSC 成骨分化异常，抑制其介导的骨形成，造成骨量丢失及骨质疏松。拟通过

高通量 miRNA 芯片筛查挑选出在骨质疏松 MSC 中差异表达的 miRNA，研究其在 BMSC 分化中的作用，探索 TNF- α 影响 miRNA 表达的机制，从而加深我们对于骨质疏松发病分子机制的理解，并为骨质疏松的治疗寻找新的治疗靶标。

文献回顾

第一部分 BMSCs 与绝经后骨质疏松

1 绝经后骨质疏松概述

绝经后骨质疏松是最常见的原发性骨质疏松，是一种因老年女性卵巢功能下降导致的骨退行性疾病^[1]，主要表现为骨组织显微结构受损、骨矿成分和骨基质等比例地不断减少、骨质变薄、骨小梁数量减少，造成脆性增加和骨折危险度升高^[2]。据统计，大约 40% 的绝经后女性患有骨质疏松，导致其中 50% 患者发生至少 1 次非应力性骨折^[2]。2008 年《骨质疏松症防治中国白皮书》指出，我国至少有 6944 万人患有骨质疏松，其中女性为 5410 万；有 2.1 亿人骨量降低，其中女性占 1.13 亿^[3]。

骨质疏松最大的危害是造成非应力性骨折。患有骨质疏松的中老年女性中有 50% 将发生至少 1 次非应力性骨折^[19]。其中，骨盆、腰椎等部位的骨折致死致残率极高^[19]。骨质疏松骨折已成为中老年女性致死、致残的最主要疾病之一^[19]，造成严重的健康威胁以及巨大的社会经济负担。所以，骨质疏松已被我国列为重点攻关的三大老年性疾病之一。

2 成骨破骨失衡是骨质疏松发生的根本原因

骨骼系统终身都处于动态改建之中，从而维持骨的形状、功能及力学性能。骨改建的基础是骨多细胞单元（bone multicellular units, BMUs），主要存在于松质骨表面的 Howship 陷窝和皮质骨中典型的哈弗氏系统（haversian system）^[20]。骨改建过程如下图所示，首先是造血前体细胞被激活，向破骨细胞分化；成熟的破骨细胞吸收骨基质，形成骨吸收陷窝；吸收期后，骨表面将由骨基质细胞（lining cells）所覆盖；骨形成过程由破骨细胞及破骨吸收过程中释放的因子所起始，BMSC 通过分化为成骨前体细胞，进一步形成成骨细胞，产生骨基质；最终成骨细胞被包埋于骨基质中，成为骨细胞或者凋亡，完成骨改建过程^[20]。

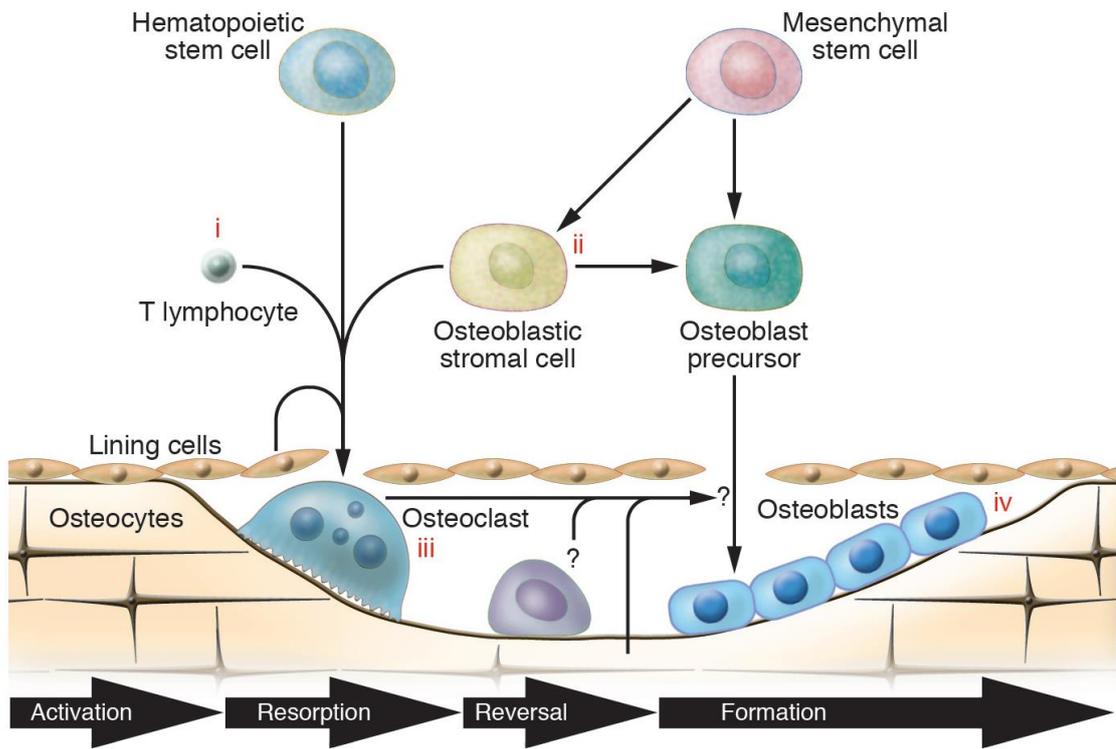


图 1 骨改建的基本过程

(引自 JCI, 2005)^[20]

在生理情况下，破骨细胞主导的骨吸收过程和成骨细胞主导的骨形成过程维持在一个动态平衡状态，共同保持骨量和骨微结构的完整。但是当这个平衡向骨吸收方向偏移，导致骨吸收速率超过骨形成速率，将造成骨量逐渐下降、骨结构破坏和力学性能减退，最终引起骨质疏松^[20]。

3 骨形成下降是骨质疏松发生的重要原因

大量实验证实，在雌激素缺乏后，特别是早期阶段，破骨细胞的数量及功能均有显著提高，造成骨吸收速度加快；相应的，骨形成也有一定增加，但无法完全弥补过快的骨吸收。所以过去的主流观点认为：骨吸收的异常增强是导致骨质疏松的关键原因^[21]。

但是，最新的临床治疗显示：单纯抑制破骨细胞介导的骨吸收，虽然可以减缓骨质丢失速率，却不能从根本上恢复正常的骨代谢平衡和骨力学性能^[4]。同时，在发育过程中虽然骨吸收也明显加快，但是正常的骨形成仍可维持骨改建平衡。而在衰老引起骨质疏松、糖皮质激素导致骨质疏松中，均发现骨形成异常是导致骨代谢失衡的原因。所以最新观点认为：虽然在绝经后骨质疏松早期骨形成是加快的，但实

际上是由于代偿机制引起，掩盖了雌激素缺乏对骨形成的抑制作用^[21]。

近年来通过对雌激素缺乏中后期的深入研究，证实了雌激素缺乏确实抑制了成骨细胞介导的骨形成。通过体外成骨克隆形成实验，发现雌激素缺乏短期内虽然成骨细胞数量有一定增加，但随着后期破骨活性的降低，成骨细胞数量逐渐减少，骨代谢呈现为低转换型；骨质疏松后期分离获得的成骨细胞骨形成能力明显低于正常组。而成骨细胞功能异常导致骨修复和重建减慢，是造成骨质疏松骨形成缺陷的重要原因^[22]。这些发现让学者们逐渐认识到骨形成缺陷在骨质疏松发生中重要性，并将目光转移到成骨相关细胞的研究中。

4 BMSCs 在骨发育与改建中发挥关键作用

4.1 BMSCs 概述

BMSC 是存在于骨髓中的一群间充质干细胞，能够体外贴壁生长，高表达 CD29, CD73, CD90, CD105 等间充质干细胞表面标志。具有很强的克隆形成能力及自我更新能力，同时具有多向分化潜能，能够分化为成骨细胞、脂肪细胞、成软骨细胞、成肌细胞等多种细胞类型^[23]。1980 年 BMSCs 就首次被 Freidenstain 报道，随后的研究主要专注于其体外的生物学特性和在再生医学领域的运用。大量研究证实，BMSCs 移植可以异位及原位形成新骨，并且可以有效促进骨折愈合和骨再生。

作为成骨前体细胞的唯一来源，BMSCs 被普遍认为在骨发育和改建中发挥关键作用，但因为缺少特异性标志，BMSCs 的体内功能很长时间内都没有得到证实。直到近几年，随着特异性表面标记的发现和基因修饰技术的发展，BMSCs 在骨组织中的定位、功能及其在骨发育及改建中的作用才逐渐得到阐明。

4.2 BMSCs 参与骨形成过程

BMSC 通过分化为成骨前体细胞，在骨发育、改建、修复及再生中均发挥关键作用^[24]。与其他组织干细胞类似，BMSCs 在一般情况下处于静止状态。但是在特定条件下，复杂信号网络启动 BMSCs 时间和空间特异性的活化，通过自我更新，源源不断的为骨发育提供成骨前体细胞。使用 Rainbow 小鼠，显示成年小鼠股骨局部区域内的成骨系细胞均为同一荧光标记，证明是由同一个 BMSC 扩增发育而成^[25]；如果特异性的剔除 BMSCs，将导致成骨细胞的减少和骨形成缺陷。在骨折及骨缺损发生后，BMSC 能够被迅速动员并向局部组织迁移，促进骨组织的再生修复^[26]。

在骨改建过程中，BMSCs 是维持成骨的关键。骨吸收开始后，BMSCs 可受到破

骨细胞吸收骨基质过程中释放的 TGF- β , IGF-1 等因子的趋化, 迁移至骨吸收陷窝局部, 并分化为成骨前体细胞, 形成骨基质^[27]。此外, BMSCs 可分泌 RANKL 和 OPG 等破骨细胞调控因子, 通过旁分泌作用发挥调节破骨细胞活化成熟的作用^[28]; 本研究团队还发现 BMSCs 可通过直接接触诱导破骨细胞凋亡, 维持破骨细胞数量。

5 BMSCs 在骨质疏松发生中的作用

5.1 骨质疏松中 BMSCs 存在异常

骨质疏松中骨改建的成骨-破骨平衡被打破, 根本原因是骨形成无法补偿骨吸收。上节已提到 BMSCs 可接收相应信号而被适时的激活, 分化为成骨前体细胞, 从而维持骨改建的平衡。骨改建平衡的破坏提示 BMSCs 介导的骨形成在骨质疏松中存在异常。

BMSCs 的异常主要表现在数量和分化功能的异常两方面。有研究报道 BMSCs 数量在衰老所致骨质疏松中明显下降, 其数量下降可能由 BMSCs 凋亡增加或自我更新减少所引起^[29]。但是近期研究发现 BMSCs 数量在骨质疏松中并无显著改变。因为 BMSCs 体内数量稀少、特异性表面标志不清, 需要通过更严格的体内实验才能明确骨质疏松过程中 BMSCs 的数量改变。BMSCs 在骨质疏松过程中的分化功能异常则较为明确。多项基于体外分化实验的研究发现: 多种骨衰老模型来源的 BMSCs 的成骨分化能力均出现异常。在衰老相关骨质疏松中, BMSC 定向分化能力出现明显异常, 表现为成骨分化降低, 而更倾向于向脂肪细胞分化, 其分化失调导致骨髓内脂肪增多, 骨量下降^[7,8,30]。糖皮质激素所致骨质疏松中, BMSCs 的成骨分化能力也受到抑制; 在雌激素缺乏引起的骨质疏松早期, 由于破骨吸收增加引起的代偿效应, BMSCs 成骨分化能力有所上升; 但是在中后期, BMSCs 的成骨分化能力出现下降。金岩等人研究也证实, 从绝经后骨质疏松骨髓中分离出的 BMSC 仍具有贴壁生长、体外扩增、多向分化能力。但是与正常骨髓来源的 BMSC 相比, 骨质疏松来源 BMSC 的成骨分化能力明显减弱, 与临床观察到的骨丢失表现和病理学改变相对应^[10,15,31]。

5.2 BMSCs 功能异常可导致骨质疏松

因为 BMSCs 是成骨细胞的唯一来源, 可以推论: BMSCs 的功能异常将导致骨形成和骨改建异常。这个推论也得到了越来越多证据的证实。首先, 基于基因敲除小鼠的研究揭示了 BMSCs 功能缺陷可导致骨质疏松^[32,33], 例如, 在早期的间充质干细胞中敲除 ATF4 基因, 将导致骨发育异常和骨质疏松。其次, 通过移植正常 BMSCs

可有效改善骨质疏松症状。通过向早衰小鼠抑制年轻 BMSC 可有效缓解骨衰老症状^[34]；而向 OVX 大鼠补充正常 BMSC 可显著改善成骨-破骨平衡。上述结果均这表明 BMSC 功能的改变造成骨组织的自身修复与再生能力下降^[35]，破坏成骨-破骨生理性动态平衡^[36]，导致骨质疏松的相关病理改变。因此 BMSC 功能缺陷在骨质疏松发生中具有重要作用。

但是，骨质疏松过程中导致 BMSC 功能异常的原因尚不明确，破坏 BMSC 成骨分化的分子通路尚未被阐明，极大的阻碍了骨质疏松治疗的进展。因此阐明影响 BMSC 成骨分化能力的分子机制，从而恢复 BMSC 的骨形成能力，已成为骨质疏松研究领域的一个热点。

第二部分 TNF- α 在骨质疏松发生中的作用研究

1 绝经后骨质疏松发病机制研究概述

雌激素是维持骨代谢平衡的重要激素，在正常情况下发挥重要的骨调节作用。BMSCs、成骨细胞、破骨细胞、骨细胞等参与骨改建的细胞均表达雌激素受体，并受其调控^[37]。值得注意的是，雌激素还可作用于多种免疫细胞，通过影响免疫细胞活化、炎症因子释放等方式间接影响骨代谢过程^[38]。绝经后骨质疏松发生机制中，雌激素的缺乏扮演了核心角色^[21]。雌激素的缺乏可能直接导致上述细胞的数量和功能改变，破坏骨代谢平衡。但是，由于其作用细胞种类较多、途径广泛、功能多样，所以具体的作用机制仍尚不清楚。

1.1 雌激素受体作用缺失

雌激素通过与细胞内雌激素受体结合，直接调控骨中多种细胞功能。一方面，雌激素受体可通过诱导破骨细胞凋亡直接抑制骨吸收。利用特异性基因敲除技术，证实雌激素通过与其受体 α 结合，可促进破骨细胞表达 FasL，激活外源性凋亡信号通路，导致破骨细胞凋亡，抑制其数量^[39]。另一方面，雌激素受体可以促进骨形成。体外研究显示雌激素可以抑制成骨细胞凋亡，维持其存活；最新研究发现，在成骨系细胞不同时期敲除 ER α ，观察到不同的结果。在早期间充质干细胞中敲除 ER α 导致皮质骨骨密度下降，但是在成熟的成骨细胞内敲除 ER α 则无明显异常，提示雌激素在不同细胞中发挥不同功能。值得注意的是，成骨系细胞中特异性敲除雌激素受体并不会导致明显的骨质疏松。这与临床观察到的绝经后骨质疏松相反。至今雌激

素受体对于骨形成的直接作用仍不明确^[21]。

1.2 氧化应激

氧化应激 (oxidative stress, OS) 被证实是导致骨质疏松的关键因素之一^[19,40,41]。在生理状态下, 细胞内氧化应激水平维持于正常范围, 不影响细胞的正常功能^[42]。但是, 在雌激素缺乏或衰老过程中, 骨组织内多种细胞中 ROS 产生增加, 而 ROS 的清除出现异常, 使得这种平衡打破, 导致氧化应激。Manolagas 研究团队用一系列实验证实: 随着年龄增长, 骨组织内多种氧化应激指标均显著上升, 与骨量的减少呈正相关^[43,44]。与之相应, 抗氧化剂治疗可有效减轻雌激素缺乏所致的骨质疏松^[44]。例如采用硫醇抗氧化物可以有效的预防 OVX 所致骨丢失^[45]; 抗氧化剂注射可显著提高衰老状态下骨组织的修复再生能力, 促进骨形成^[46]; 过表达抗氧化酶可有效预防 OVX 和衰老所致的骨丢失^[47,48]。证明氧化应激在骨质疏松发生中的重要作用

Table 1. Relationships between oxidative stress and the development of bone disease

Bone pathology	Observations	ROS involvement
Osteoporosis	• ↓ Bone formation rate	• ↑ ROS production [18] • ↓ Thiols antioxidant defences [18,23]
	• ↓ Bone mineral density	• ↑ Total plasma oxidant status [16,80] • ↑ Plasma lipid oxidation [17,20,21] • ↓ Catalase and glutathione peroxidase activity [20,21] • ↑ Plasma level and activity of super oxide dismutase [20,24,25]
	• ↓ Serum osteocalcin level	• Catalase gene polymorphism [81]
Bone tumours	• Advanced prostate cancer	• ↑ Oxidant status [26]
	• Ewing's sarcoma	• GSH depletion sensitises tumour cells to fenretinide-induced cell death [27]
Diabetes	• Streptozotocin-induced osteopenia	• ↑ Oxidant status [30]
Joint inflammatory diseases	• Rheumatoid arthritis	• ↑ ROS in synovial cells [32,33]
	• Ankylosing spondylitis	• ↑ ROS in senescent chondrocytes [34] • - ↑ Total oxidant status [36-38]

图 2 氧化应激与骨骼疾病发生间的相关性

(引用自 Endocrine Rev, 2010)^[41]

一系列体内外研究证实 ROS 对于 BMSCs 成骨分化和其介导的骨形成起抑制作用。骨质疏松中 ROS 水平升高可致 BMSCs 成骨分化能力下降; 而抗氧化处理可有效恢复衰老 BMSC 的成骨分化能力, 缓解衰老所致的骨量下降。因此, ROS 引起的 BMSC 损伤被认为是导致骨形成缺陷、骨量下降的重要原因^[41,49]。ROS 抑制骨形成的机制复杂, 虽然现有报道发现: ROS 的升高可致 Wnt 信号通路阻断, 抑制 BMSCs 和成骨前体细胞的成骨分化; 同时, 氧化应激能够通过线粒体引发 BMSC 的内源性凋亡途径, 导致 BMSC 的凋亡^[50]。可是在骨质疏松过程中, 导致 BMSC 中 OS 升高的原因及具体分子机制尚不清楚。

1.3 炎症因子

雌激素对于免疫系统具有显著的影响。包括 T 细胞, B 细胞、DC 细胞等在内的

多种细胞均表达雌激素受体，具有雌激素的应答性。而骨骼作为一个庞大而复杂的系统，与免疫系统、血液系统均存在密切联系。其中，辅助性 T 细胞与骨代谢的关系最为紧密。Pacifici 等发现，雌激素缺乏后促进 T 细胞产生 TNF- α 和 IL-6 等细胞因子，导致骨质疏松^[51]。一个典型的例子是缺乏 T 细胞的裸鼠去势后骨量不会下降，但如果注射入正常 T 细胞后，雌激素缺乏将引起裸鼠骨量下降^[51]。相应的，敲除 TNF- α 、IL-6 等细胞因子后可有效预防雌激素所致骨质疏松^[52]。所以，雌激素缺乏后可引起 T 细胞的异常活化，导致体内多种促炎因子水平均发生改变^[53]，从而严重影响 MSC、成骨细胞、破骨细胞等相关细胞的正常生理功能。

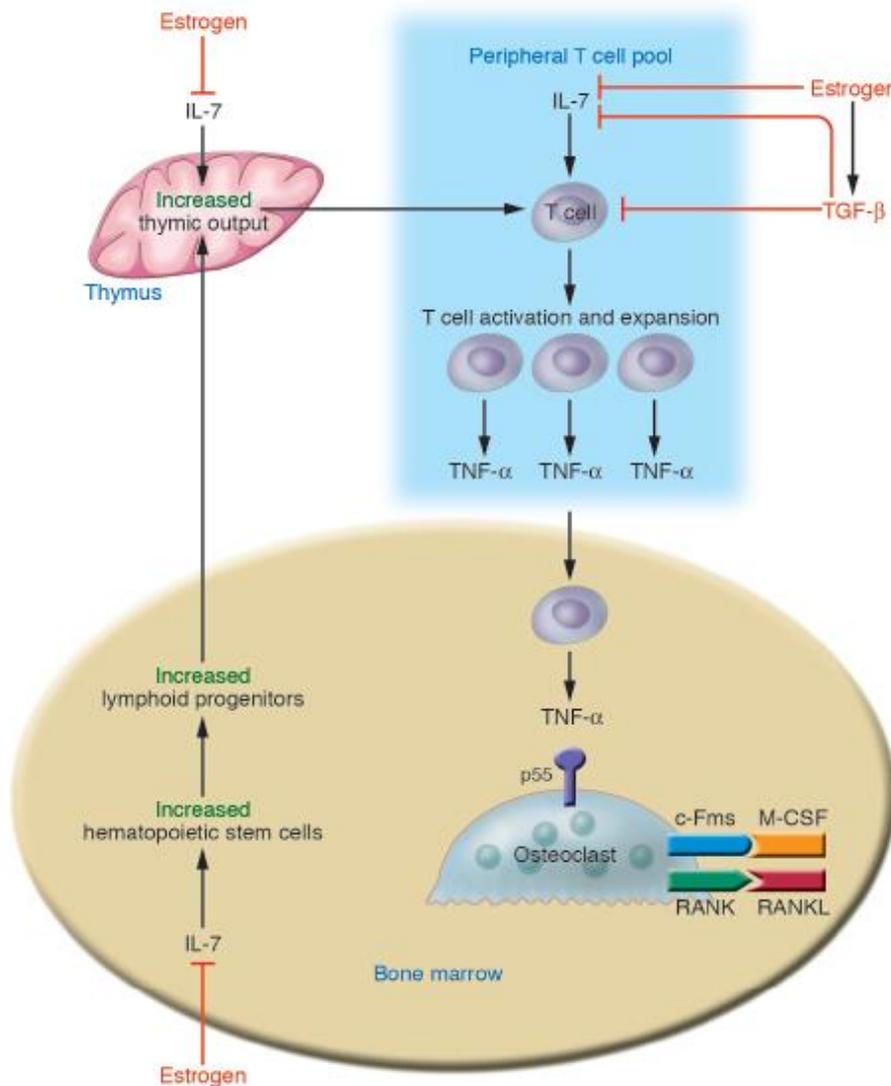


图 3 雌激素缺乏引起炎症因子增高

(引自 J Clin Invest, 2006)

大量研究证实, TNF- α 是导致骨质疏松发生发展的最重要炎性因子之一。TNF- α 水平上升主要是由于巨噬细胞和 DC 细胞通过抗原呈递导致 T 细胞增殖和存活时间延长, 从而使分泌 TNF- α 的 T 细胞数量增加^[52]。而 T 细胞还可通过分泌 IFN γ , IL-7 等因子间接地提高 TNF- α 的水平, 来发挥促骨质疏松的作用。过表达 TNF- α 的转基因小鼠表现出系统性的骨量丢失和骨质疏松, 其原因是由于骨吸收增加和骨形成下降。TNF- α 敲除小鼠及 TNF- α 受体 p55 缺失小鼠在去势手术后均不出现骨质疏松^[52]。过表达可溶性 TNF- α 受体从而对 TNF- α 耐受的转基因小鼠可以抵抗去势所致的骨质疏松, 而注射 TNF- α 抑制剂也能够发挥类似的保护作用^[54]。综上, TNF- α 是雌激素缺乏骨质疏松中的核心因素, 也是骨质疏松治疗一个可能靶点。

2 炎症微环境是导致 BMSCs 功能紊乱的重要原因

干细胞的自我更新和分化都依赖于其所处的特异性的微环境^[55]。干细胞微环境包括了所有直接包围细胞的成分, 由邻近细胞、细胞外基质、可溶性分子等构成^[56,57]。正常的功能性微环境是维持干细胞功能所必需。BMSCs 也处于一个独特的微环境内, 其微环境主要包括两个主要组成成分, 一是骨骼组织的细胞外基质。特定细胞外基质的缺乏导致 BMSCs 的功能异常^[58]; 通过重建丰富的基质微环境, 能促进间充质干细胞的成骨分化能力^[59]。同时骨骼中蕴含着丰富的 TGF- β 、BMP, IGF-1 等细胞因子, 在骨吸收时被释放, 招募 BMSCs 到骨吸收部位, 促进骨形成^[60]; 二是通过血液循环运输至骨髓局部的可溶性因子。

微环境中成分和信号的失调, 将导致干细胞自我更新和分化紊乱, 引发多种疾病^[61]。多种退行性疾病过程中往往伴随着免疫的异常和炎症因子的改变, 而过量的炎性因子, 可影响内源性干细胞介导的组织再生^[13]。研究表明持续性的慢性炎症环境能降低原位组织中干细胞的增殖和迁移能力, 并通过改变干细胞内在分子通路来抑制其组织再生修复的潜能^[62-64]。同样, 绝经后骨质疏松中 TNF- α 、IL-1 等炎症因子可显著抑制骨髓 BMSCs 的存活及成骨分化能力, 导致 BMSCs 介导的骨形成异常^[65,66]。但是, 在骨质疏松过程中, 外部炎性微环境导致 BMSCs 生物学行为变化的分子机制尚不清楚。

3 TNF- α 对 BMSCs 功能的影响

TNF- α 是最重要的炎症因子之一。在急性炎症期, 适量的 TNF- α 能够促进局部组织的重建和防御, 但是过量 TNF- α 长时间刺激能够引发和加剧多种炎症性疾病^[67]。

同时, TNF- α 也是慢性炎症过程中导致干细胞功能异常的关键因子^[68]。近期研究发现, TNF- α 对于不同来源的 MSCs 生物学行为均有影响。TNF- α 能够显著影响喉黏膜 MSCs 的成肌分化和自我更新, 导致 MSCs 介导喉黏膜再生的能力下降; TNF- α 可抑制牙周膜等组织来源 MSCs 的正常多向分化, 加重牙周炎所致的牙槽骨缺损^[9,31,69,70]; 此外, TNF- α 可以导致牙龈 MSCs 的过度增殖, 促进炎症性牙龈增生^[71]。TNF- α 对于 MSCs 的这些作用与其所导致的临床疾病表型和组织病理改变相一致, 提示 TNF- α 通过影响 MSCs 的生物学行为而导致炎症组织的正常稳态破坏, 引起病理改变。

TNF- α 对于骨髓 MSC 也发挥重要调控作用, 主要表现在几个方面: 1) TNF- α 可抑制 BMSCs 成骨分化; 2) TNF- α 可通过激活凋亡通路诱导 BMSCs 凋亡; 3) TNF- α 可影响 BMSCs 的增殖。虽然这三种作用均在体外得到证实, 但是在体内 TNF- α 对 BMSCs 生物学行为的影响尚不明确。

4 TNF- α 的作用分子机制

TNF- α 通过与其受体 TNFR1 和/或 TNFR2 结合, 激活一系列下游信号通路^[72]。其中一条重要通路是凋亡通路。TNF- α 能够通过激活下游的死亡配体 FADD 蛋白, 活化的 FADD 能够通过一系列激酶途径使 Caspase3 断裂, 使其活化, 并引起下游 Caspase8 的活化, 导致经典的细胞凋亡过程。TNF- α 下游的另一条重要通路是 NF- κ B 通路, 由 TRAF2 RIP 的活化所介导。因为该通路能调控多个维持细胞生存基因的转录, 所以具有抗凋亡的作用, 与 FADD 介导的凋亡信号相拮抗。FADD 和 NF- κ B 通路的相互比例决定了 TNF- α 对细胞的命运的作用。

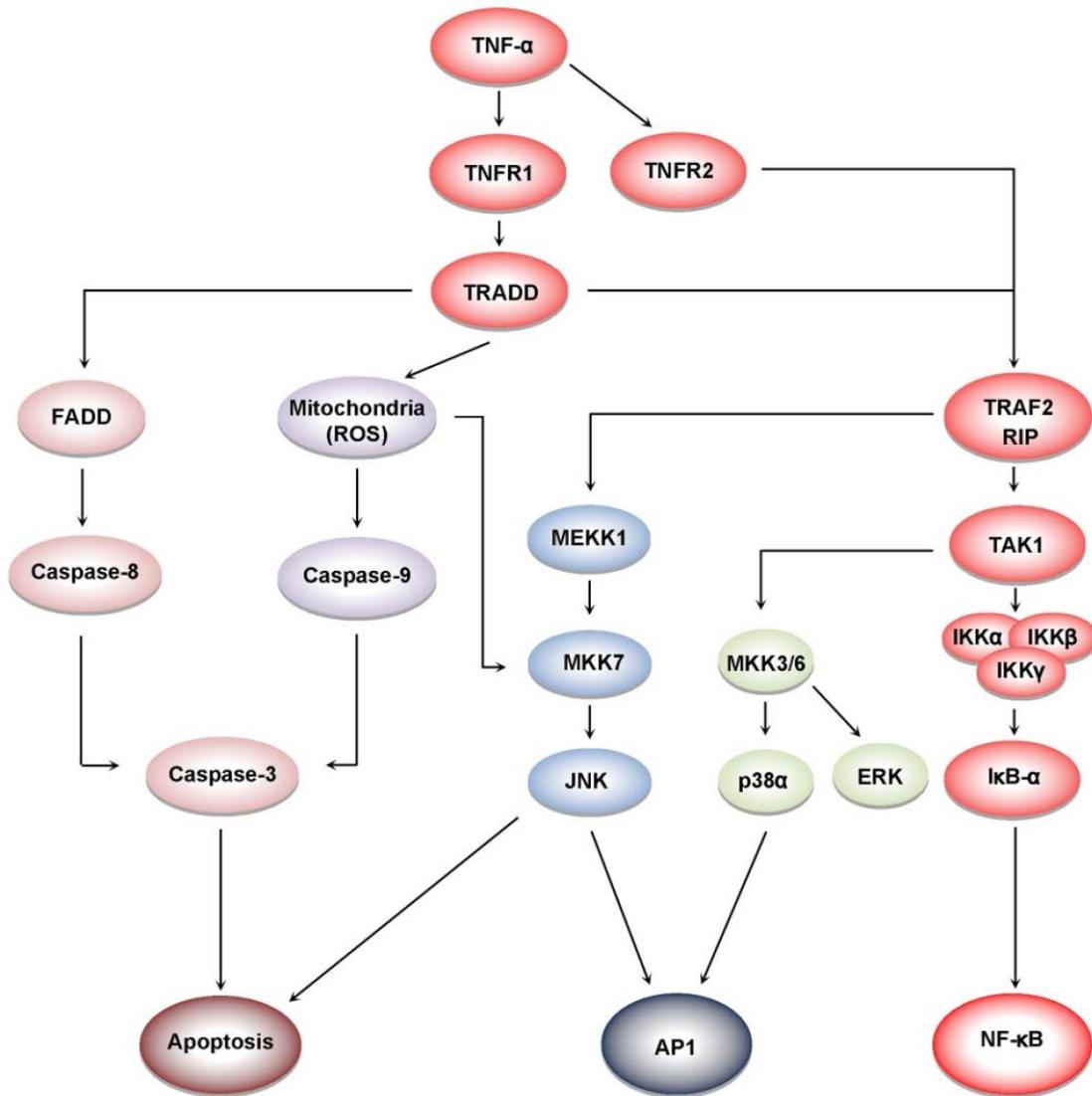


图 4 TNF- α 激活下游信号通路模式图

(引自 blood, 2012) [73]

4.2 TNF- α 调控 BMSCs 的分子机制

TNF- α 激活的两条下游通路均与 BMSCs 的功能密切相关^[74]。体外实验显示，较大剂量的 TNF- α 刺激能够诱导成骨细胞及 BMSCs 的凋亡^[75]。而体内研究也证实成骨细胞的凋亡水平与 TNF- α 的相关性，而中和 TNF- α 治疗可以减少成骨细胞的凋亡。同样，TNF- α 受体敲除后，成骨细胞凋亡减少。

NF- κ B 通路对于骨骼系统的发育和代谢也具有重要作用。成骨细胞内特异性抑制 NF- κ B 信号的小鼠在出生后无明显体征，但进入成年期后，小鼠的骨量逐渐低于 WT 小鼠。更重要的是，去势后的 ob-/-小鼠骨量并不发生显著的下降，证明了 NF- κ B

信号在骨质疏松发生中的关键作用^[76]。细胞功能检测证实其骨量下降主要是由于成骨细胞分化异常导致骨形成不足所致。进一步的机制研究证实，NF- κ B 信号直接调控 Smad7 基因的转录，从而抑制成骨分化^[66]。此外，NF- κ B 还被报道间接通过抑制 Wnt4 信号，而抑制成骨分化。说明 NF- κ B 通路主要影响成骨细胞的分化，而调节骨改建过程。

第三部分 miRNAs 在骨发育、改建及疾病中的功能研究

近十年来，通过引入大量模式动物及新的研究手段，骨发育及骨改建的研究取得了重大进展，一系列在成骨分化中发挥关键调控作用的信号通路和关键转录因子被发现。Wnt, BMP 等信号通路及 RUNX2, Osterix, ATF4 等转录因子的作用得到阐明，说明成骨分化是一个复杂的精确信号调控过程。而非编码小 RNA 所介导的转录后调控研究表明，参与信号调控的不仅仅是信号分子和转录因子，miRNA 等也在其中发挥重要作用，以提高信号调控的精确性与复杂性。

1 miRNA 概述

miRNA 是一类高度保守的、广泛存在于多种物种细胞中的单链、非编码小 RNA，一般含有 22-24 个核苷酸^[6]。通过在转录后水平与靶基因 mRNA 的 3'非翻译区 (untranslated region, UTR) 互补结合抑制基因表达^[77]，精确控制靶基因编码蛋白的数量。虽然 miRNAs 的发现较晚，但近几年对于 miRNAs 功能的研究一直呈快速增长趋势，其在细胞功能调控中的重要性也越来越受到研究人员的重视。大量研究证实，miRNA 是基因调控的主要调控机制之一^[77]。一个细胞内往往存在几百或上千种 miRNA，而一个 miRNA 可完全互补或者不完全互补地结合于多个 mRNA 的 3'UTR 区，调控其表达。因为其作用的广泛性及普遍性，超过 70%的哺乳动物基因都可能受到 miRNA 调控。

干细胞的生物学行为也受到 miRNA 的精确调控。最新研究表明，miRNA 广泛参与了干细胞的增殖、凋亡、分化、代谢等过程的调控，在其中发挥关键作用^[78]。探索 miRNA 的功能和作用机制也已成为干细胞研究的热点问题。

2 miRNAs 对于 BMSCs 分化的调控作用研究

研究发现，miRNAs 参与了 BMSC 自我更新、多向分化、命运决定、功能行使等各个方面^[79]。其中 miRNA 对 BMSC 的成骨分化调控研究最为深入。通过高通量

芯片筛查和测序等手段,发现了一系列在 MSC 成骨分化过程中表达发生特异性改变的 miRNA,提示其直接参与了分化进程。已证明其中超过 10 个 miRNAs 参与了 BMSC 的成骨分化调控。其中 miR-210、miR-20a、miR-2861 等被报道能够促进 BMSC 的成骨分化;而 miR-29a,b、miR-335、miR-637 等能够抑制 BMSC 的成骨分化^[80]。本实验室也并证明 miR-17 及 miR-26a 也参与了 BMSCs 的分化调控。其中,miR-17 通过直接作用于 WNT 通路的重要信号分子 TCF-3 而发挥作用^[81],而 miR-26a 在 BMSCs 成骨分化过程中表达上调,并通过调控 Wnt 信号通路而促进 BMSCs 的成骨分化^[82] [83]。

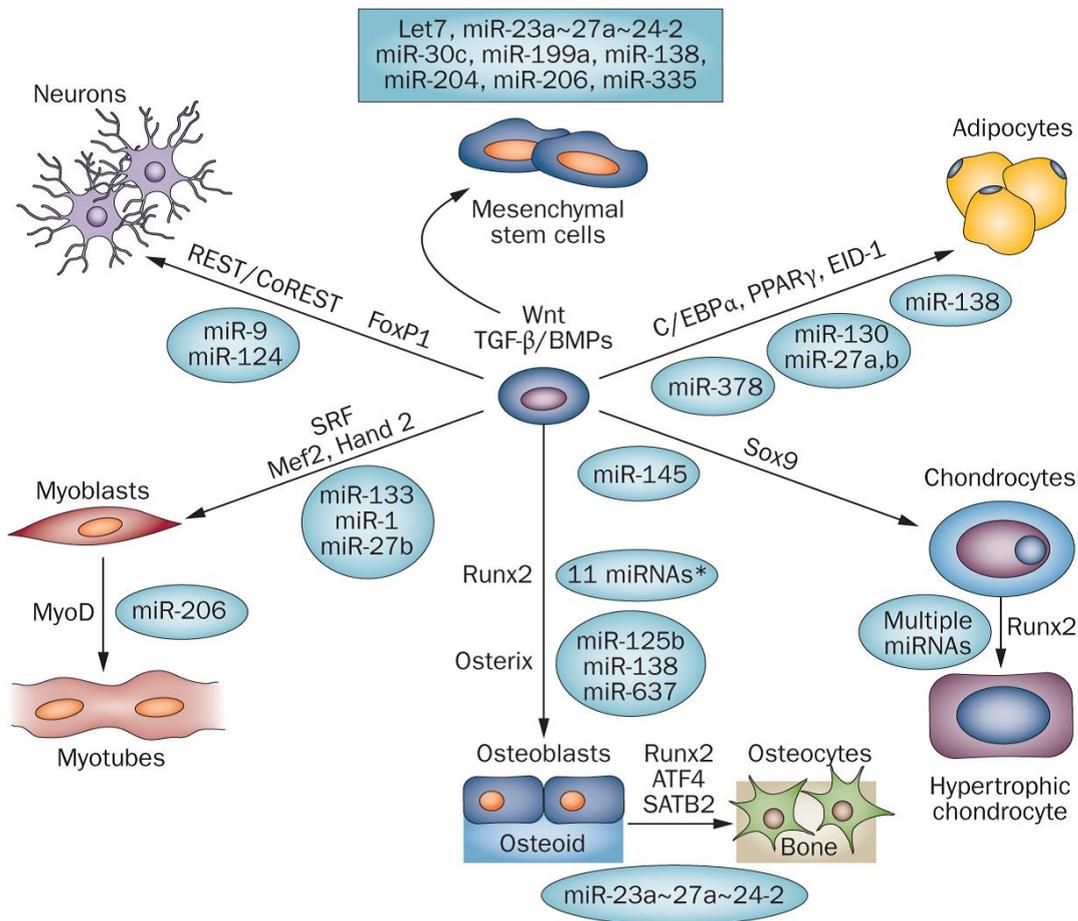


图 5 miRNA 通过调控关键转录因子影响 BMSCs 分化进程

(引自 Nat Rev Endocrinol, 2012)

3 miRNA 表达异常与骨质疏松密切相关

3.1 骨质疏松过程中 miRNA 表达变化

最新的研究发现, miRNA 表达水平的改变可导致相关疾病的发生, 从而为认识疾病过程提供了新的视野^[18]。在骨衰老过程中, 骨组织内及 BMSC 中的 miRNA 表达谱也出现了显著改变。最新研究发现, miR-214 在衰老人群成骨系细胞中显著上升, 通过抑制 TCF4 导致骨形成能力下降^[84]; miR-188 在衰老小鼠及人的 BMSC 中表达升高, 导致 BMSC 的分化缺陷^[85]。而特异性的抑制这两个 miRNA 均能有效恢复骨衰老中的骨形成。let-7 在 BMSCs 分化中发挥关键作用, let-7f 已被报道可以通过抑制 axin2 而促进 BMSC 的成骨分化^[86]。而多个课题组通过 miRNA 芯片筛查发现, let-7 家族的表达在人及小鼠 BMSC 成骨诱导分化过程中均显著上升^[87,88], 提示其与骨质疏松 BMSCs 分化异常有关。

3.2 炎症因子可调控 miRNA 表达

最新研究指出, 炎症因子可以通过特定的信号通路影响组织细胞的 miRNA 表达。其中, Llipoulos 等报道, 在肿瘤干细胞中, 炎症因子激活 NF- κ B 途径后, 导致 let-7a 的表达受到抑制, 使 IL-6 的表达上升, 该表观遗传途径形成一个正反馈回路, 不断加重细胞的炎症损伤, 最终导致细胞恶变^[89]。

这些开拓性的研究都提示: miRNA 表达异常是导致 BMSC 分化缺陷的关键因素, 炎症因子 TNF- α 可以通过改变特定 miRNAs 表达, 从而导致干细胞的功能异常, 引起机体组织结构的变化。但是, 在骨质疏松的 BMSCs 中是否存在特异的 miRNAs 改变, 其 miRNAs 改变是否影响 BMSCs 的功能等重要问题, 至今尚无相关报道, 已成为影响我们深入认识骨质疏松发病机制的重大障碍。

4 miRNA 是治疗衰老相关疾病的潜在靶点

骨衰老至今尚没有理想的治疗手段。临床上通常采用的都是以抑制破骨吸收为主的常规治疗, 但这种方法无法恢复正常的骨代谢平衡和力学性能, 甚至可能导致骨坏死等严重的副作用^[2]。随着干细胞研究的深入, 越来越多的人意识到干细胞可能成为多种疾病治疗的靶点, 但是如何恢复疾病 BMSC 的功能是其应用中的一大难题^[90]。

因为 miRNA 的特性, 可通过人工的 miRNAs 模拟物及抑制物直接调控体内 miRNA 的表达, 具有合成容易、给药途径方便、特异性好、安全性高等优点, 使得通过调控 miRNA 而达到恢复细胞功能、促进疾病恢复成为可能, 这也是当今 miRNAs 研究的热点之一^[84,91]。在骨质疏松的治疗中, 已有研究通过靶向运载 miR-214 至成

骨细胞内，体内调控 miR-214 的表达，恢复了内源性成骨细胞的成骨能力，实现了骨质疏松症的有效治疗^[84]。而通过抑制 miR-188a 可提高 BMSC 的成骨分化能力，改善衰老所致的骨质疏松^[85]。本实验室研究显示：通过下调牙周及骨髓来源 BMSCs 中 miR-17 的表达量，可以增强其骨向分化能力，逆转 TNF- α 导致的骨髓 BMSCs 成骨分化异常^[92]；miR-26a 可以促进 BMSCs 体内介导的骨再生及血管再生功能，促进 BMSCs 细胞膜片的骨损伤修复效果^[82]。这些先驱性的研究均提示了通过调控 miRNA 来特异性的作用于干细胞，可以有效的提高病理状态下组织损伤的修复能力，甚至直接治疗疾病，为 miRNA 的未来运用开辟了美好的前景^[84]。但是已有的研究均是通过抑制特定 miRNA 进行骨衰老及骨质疏松治疗，尚无明确报道能否通过促进特定 miRNA 的表达来进行骨质疏松的治疗。

总 结

综上，BMSC 在骨形成和再生修复中发挥重要的调控作用。BMSC 成骨分化能力下降是导致骨衰老中骨形成缺陷的关键。在骨质疏松及骨衰老过程中，炎症因子等致病因素可引起 miRNA 的表达出现异常，可能是导致 BMSC 成骨分化下降的重要因素。通过研究骨质疏松过程中炎症因子对 BMSC 中 miRNA 介导的转录后调控的影响及作用机制，有助于我们进一步认识骨质疏松的发病机制，提出以 miRNA 作为靶点的新的治疗思路，开创骨质疏松新的治疗策略。

正文

第一部分 骨质疏松中 TNF- α 对 BMSCs 成骨分化的作用研究

虽然绝经后骨质疏松的发病机制研究已久，但过去的研究主要把目光集中于终末分化的功能细胞——成骨细胞和破骨细胞。随着 BMSCs 研究的高度发展，其在骨发育、改建和疾病中的作用和重要性逐渐被认识。本研究尝试从 BMSCs 的角度出发，探讨骨质疏松骨形成缺陷的发生机制，以期补充和推进已有的对于骨质疏松的认识。

雌激素缺乏后继发出现的 TNF- α 等炎症因子水平上升是导致骨质疏松的重要因素。TNF- α 不仅能够促进破骨细胞活化引起骨吸收增加，还被发现可抑制 BMSCs 及成骨前体细胞介导的骨形成。作为一种重要的炎症因子，TNF- α 作用途径复杂、产生的效应多样。已有研究发现其能够诱导 BMSCs 凋亡、影响细胞增殖和抑制成骨分化。为了明确骨质疏松中 TNF- α 主要影响 BMSCs 的什么功能，以及其作用的主要分子信号途径，本研究将通过比较正常和骨质疏松来源 BMSCs 的生物学行为，结合体外 TNF- α 作用实验和信号通路研究进行探索。

1 材料

1.1 仪器和设备

1.1.1 Realtime 定量 PCR 仪	Bio-Rad, 美国
1.1.2 PCR 仪	Thermo, 美国
1.1.3 酶标仪	Bio-tek, 美国
1.1.4 microCT	Siemens, 德国
1.1.5 流式细胞仪	Beckman, 美国
1.1.6 倒置显微镜	Olympus, 日本
1.1.7 电泳仪	Bio-Rad, 美国
1.1.8 凝胶成像分析系统	天能, 上海
1.1.9 石蜡切片机	Leica, 德国

1.2 实验动物

C57BL6/J 小鼠

第四军医大学实验动物中心

1.3 主要试剂

1.3.1 a-MEM 培养液	Gibco, 美国
1.3.2 PBS	Gibco, 美国
1.3.3 青霉素	Sigma, 美国
1.3.4 链霉素	Sigma, 美国
1.3.5 胎牛血清:	四季青, 杭州
1.3.6 油红 O 染料	Sigma, 美国
1.3.7 茜素红染料	Sigma, 美国
1.3.8 异丙醇	思域, 上海
1.3.9 甲苯胺蓝	Sigma, 美国
1.3.10 RNA 反转录试剂盒	Takara, 日本
1.3.11 Realtime PCR 检测试剂盒	Takara, 日本
1.3.12 Trizol	Invitrogen, 美国
1.3.13 重组小鼠 TNF- α	Peptotech, 美国
1.3.14 小鼠 IgG	Millipore, 美国
1.3.15 甘油磷酸钠	Sigma, 美国
1.3.16 维生素 C	Sigma, 美国
1.3.17 地塞米松	Sigma, 美国
1.3.18 胰岛素	Sigma, 美国
1.3.19 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤	Sigma, 美国
1.3.20 伊红	Sigma, 美国
1.3.21 苏木素	Sigma, 美国
1.3.22 β -actin 抗体	Cell Signaling, 美国
1.3.23 P65 抗体	Cell Signaling, 美国
1.3.24 二抗	博士德, 武汉
1.3.25 免疫印迹化学发光液	七海复泰, 上海
1.3.26 细胞凋亡检测试剂盒	七海复泰, 上海
1.3.27 17 β 雌二醇	Sigma, 美国
1.3.28 小鼠 TNF- α ELISA 检测试剂盒	欣博盛, 深圳

2 方法

2.1 去势骨质疏松模型的建立

- 1) 选取 8 周大雌性 C57BL6/J 小鼠, 随机分为假手术组 (Sham surgery, SHAM) 和去势组 (Ovariectomy, OVX);
- 2) 腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉后, 经背部切口, 暴露分离双侧卵巢; OVX 组小鼠

完全切除双侧卵巢，而 SHAM 组小鼠仅切除少量卵巢周围脂肪组织；缝合伤口。

- 3) 术后所有小鼠均饲养于 SPF (specific pathogen-free) 级实验室，饲养于 22°C、50%–55% 湿度、12 h 光照/12 h 黑暗环境，自由取食和饮水，继续饲养 12 w 后进行后续实验。
- 4) 所有动物实验均完全遵照相关伦理要求实施。实验动物和实验条件均符合国家《实验动物管理条例》。

2.2 组织学检测

- 1) 选取 SHAM 及 OVX 术后 12 w 小鼠，戊巴比妥钠麻醉后颈椎脱臼处死，钝性分离双侧股骨，去除附着肌肉组织；
- 2) 采用 4% 多聚甲醛内固定 24 h 后，置于 10% EDTA (pH 7.0) 中脱钙 2 w，每 2 d 换液；
- 3) 取股骨远端，流水冲洗 8 h，以酒精进行梯度脱水，进行石蜡包埋；
- 4) 取股骨冠状面，常规切片，厚度 5 μm ；
- 5) 自动化 HE 染色。染色程序为：脱蜡（二甲苯，10 min \times 2 次），乙醇复水（100%，100%，85%，70%，50%，30% 乙醇，H₂O，各 2 min），苏木精染色 15min，0.1% HCl 分化 2sec，脱水（H₂O，30%，50%，70%，85% 乙醇，各 2min），0.5% 伊红复染 10min，乙醇脱水及二甲苯透明后中性树胶封片。
- 6) 在显微镜下进行观察，在股骨远端生长板近心端次级海绵区进行照相（放大倍数 \times 20）
- 7) 对照片中松质骨区域面积采用 Image Pro Software 进行分析计算。

2.3 microCT 检测

- 1) SHAM 及 OVX 术后 12 w，小鼠采用戊巴比妥钠麻醉后，固定于载物台支架上，对左侧股骨进行活体 microCT 扫描；
- 2) microCT 扫描：按照相应标准程序对股骨进行 360 度扫描，扫描参数为：电压 160kv，电流 500 mA，分辨率 10.44 μm
- 3) 采用自带 Inveon Research Workplace 2.2 软件系统进行 3D 图像重建
- 4) 图像分析：选取股骨远端生长板近端 1 mm 以上 0.5mm 区域，进行松质骨骨小梁形态分析和三维图像重建；选取股骨中段 1mm 范围进行皮质骨形态分析和图

像重建;

- 5) 股骨参数计算: 骨密度、松质骨骨小梁形态参数、皮质骨厚度均有系统自带软件进行计算。

2.4 BMSC 培养

- 1) SHAM 及 OVX 术后 12 w 小鼠颈椎脱臼处死, 钝性分离双侧股骨及胫骨, 使用 1 ml 针管吸取 α -MEM 培养液 (含 20% PBS, 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素) 反复冲洗骨髓腔 3-5 次, 获得骨髓细胞悬液;
- 2) 细胞计数后, 将 1×10^7 骨髓细胞加入含 10 ml α -MEM 培养液的 9 cm 培养皿中, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 及 75% 湿度细胞培养箱内进行原代培养。
- 3) 细胞培养 48 h 后以 PBS 轻轻冲洗 2 次, 去掉未贴壁细胞, 更换培养液; 此后每 3 d 换液;
- 4) 待 BMSC 生长至~80% 密度后, 采用 1% 胰酶消化 3-5 min, 以 1: 2 的比例传代;
- 5) 除特殊说明外, 本研究主要采用 2-3 代的 BMSC 进行实验。

2.5 成骨集落形成实验

- 1) 按方法 2.4 接种细胞, 培养 3-4d;
- 2) 吸尽 α -MEM, 换为成骨诱导液培养, 每 3d 换液, 继续培养 11d;
- 3) 茜素红染色: 弃掉培养液, PBS 清洗 3min \times 3 次; 60% 异丙醇固定 60s, PBS 水化 2 min; 10% 茜素红染色 3 min;
- 4) PBS 清洗 3min \times 3 次后, 吸净液体, 晾干后照相

2.6 茜素红染色及定量

- 1) 成骨诱导: 接种 BMSCs 于 12 孔板, 当细胞扩增至 80% 时换用成骨诱导液进行分化诱导, 每 3 天换液; (成骨诱导液配方: α -MEM 培养液, 10% FBS, 100 μ g/ml 抗坏血酸, 2mM β -甘油磷酸钠和 10nM 地塞米松)。
- 2) 茜素红染色: 成骨诱导 14 d 后, 弃掉培养液, PBS 清洗 3min \times 3 次; 60% 异丙醇固定 60s, PBS 水化 2 min; 10% 茜素红染色 3 min; PBS 清洗 3min \times 3 次后, 吸净液体, 照相
- 3) 茜素红定量: 每孔加入 1ml 2% 十六烷基吡啶, 轻微摇晃 10min 洗脱染料, 吸取 200ul 加入 96 孔板中, 分光光度计检测 540nm 处吸光值。

2.7 血清 TNF- α ELISA 检测

ELISA 检测严格按照试剂盒标准操作步骤操作。简述如下：

- 1) 血清采集：经小鼠眼球内眦静脉取血，自然凝血后 5000r/min 离心分离血清；
- 2) 添加标准品：在 96 孔板中每孔加入 1000、500、250、125、62.5、31.2 和 15.6 pg/ml 的小鼠 TNF- α 标准品各 100 μ l；空白孔加入 100 μ l 样本稀释液；
- 3) 添加样本：每空添加 100 μ l 小鼠血清；
- 4) 封闭孔板边缘，37 $^{\circ}$ C 孵育 90min；打开盖子，倒出液体，倒置于纸巾上吸尽残留液体；
- 5) 每孔加入 0.1ml 生物素标记的小鼠 TNF- α 抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 60min；0.01 M TBS 清洗 3 次；
- 6) 每孔加入预混好的工作液 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min；0.01 M TBS 清洗 5 次；倒出液体，倒置于纸巾上吸尽残留液体；
- 7) 每孔加入 90 μ l 显色液，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 25 min；
- 8) 每孔加入 100 μ l 终止液，液体颜色即刻呈现黄色；
- 9) 利用分光光度计记录 450 nm 处吸光值；
- 10) 计算：相对吸光值=每孔吸光值-空白框吸光值；通过标准品吸光值绘制标准曲线；依据标准曲线计算每个样本的 TNF- α 浓度。

2.8 RNA 提取

- 1) 以 Trizol (1 \times 10⁶/ml) 裂解细胞，收集入无 RNA 酶 EP 管中；
- 2) 加入 1/5 体积氯仿，剧烈摇晃 45s，静置 5min 使液体分层后，4 $^{\circ}$ C 下 12000 转/分离心 15min；
- 3) 吸取上清液，加入等体积异丙醇，混匀 30s 后，-20 $^{\circ}$ C 放置 2h；
- 4) 4 $^{\circ}$ C 下 12000 转/分离心 10min，吸尽上清；
- 5) 加入 1ml DEPC 处理 75% 乙醇清洗一遍，7500 转/分离心 5min，吸尽上清；
- 6) 加入适量 (20-50 μ l) DEPC 水溶解 RNA，定量检测后保存于 -80 $^{\circ}$ C。

2.9 mRNA 逆转录反应

- 1) 取 1mg 总 RNA，使用 PrimeScript RT reagent kit 逆转录试剂盒配置反应液。

表 1 RT 反应液配置

试剂	使用量	终浓度
5×PrimeScript® Buffer (for Real Time)	2 µl	1×
PrimeScript® RT Enzyme Mix I	0.5 µl	
Oligo dT Primer (50 µM)	0.5 µl	25 pmol
Random 6 mers (100 µM)	0.5 µl	50 pmol
Total RNA	1mg	
RNase Free dH2O	up to 10 µl	

- 2) 进行逆转录反应，获得 cDNA 文库

反应条件如下：37°C 15 min *3 (反转录反应)；85°C 5 sec (反转录酶的失活反应)

- 3) 获得 cDNA 保存于-80°C。

2.10 Realtime PCR 检测

- 1) 配置 SYBR GreenPCR 反应混合液

PCR 反应液配置

试剂	使用量	终浓度
SYBR® Premix Ex TaqTMII (2×)	10 µl	1×
PCR Forward Primer (10 µM)	0.8 µl	0.4 µM
PCR Reverse Primer (10 µM)	0.8 µl	0.4 µM
RT 反应液 (cDNA 溶液)	2 µl	
dH2O (灭菌蒸馏水)	6.4 µl	

- 2) 采用标准的三步法进行检测，设定程序如下

表 Realtime PCR 程序设定

循环	步骤	温度	时间	内容
1 X	预变性	95°C	20 sec	起始模板变性
	变性	95°C	10 sec	PCR 模板变性
40 X	退火	60°C	20 sec	退火
	延伸	70°C	1~10 sec	延伸

- 3) *β-actin* 和 U6 分别作为 mRNA 和 miRNA 的内参用于定量。

- 4) 实验所使用引物序列如下：

引物序列

Gene	Primer Sequence	
	Forward	Reverse
β-actin	5'-CTGGCACACACCTTCTACA-3'	5'-GGTACGACCAGAGGCATACA-3'

OCN	5'-CTGACAAAGCCTTCATGTCCAA-3'	5'-GCGCCGGAGTCTGTTCACATA-3'
RUNX2	5'-GACTGTGGTTACCGTCATGGC-3'	5'-ACTTGGTTTTTTCATAACAGCGGA-3'
IKK α	GTGAACATCCTCTGACATGTGTGGT	5'-GCAACACAAGGAGGCTGGGCT-3'

2.11 Western blot 检测

- 1) 蛋白提取：碧云天蛋白裂解液中加入 PMSF（终浓度 100 μ g/ml）后，立刻加入细胞培养皿中（1ml/ $\times 10^6$ cell）；轻轻混匀 2-3 min 后，置于 -80 $^{\circ}$ C 冻存；反复冻融 3 次；在冰上吸取上清液；
- 2) 蛋白定量：蛋白定量严格按照 BCA 蛋白定量试剂盒标准步骤进行，简述如下：
 - A，添加标准品：在 96 孔板的标准孔中分别加入 20，19，18，16，12，8，4，0 μ l 稀释液，随后分别加入蛋白标准品 0，1，2，4，8，16，20 μ l。
 - B，添加样本：每孔加入稀释液 18 μ l，随后分别加入样本各 2 μ l；
 - C，配置 BCA 检测试剂：以 1：20 的比例加入 BCA 试剂，混匀，静置 5min；
 - D，每孔加入 200 μ l BCA 检测液，封闭盖子后 30 $^{\circ}$ C 孵育 30min 至显色；
 - E，风光光度计检测 546nm 处吸光值
 - F，浓度计算：根据标准品浓度计数值绘制标准曲线，根据标准曲线计算每个样本蛋白浓度；
- 3) 蛋白变性：根据每个样本蛋白浓度，分别加入适量蛋白裂解液使样本间浓度相同，以 1：4 比例加入 5 \times loading buffer，混匀后 95 $^{\circ}$ C 水浴中变性 5min；
- 4) 配置 12% 分离胶和 4% 浓缩胶。

表 分离胶和浓缩胶配置

	12% 分离胶	4% 浓缩胶
超纯水	3.3 ml	1.4 ml
30% 丙烯酰胺	4 ml	0.33 ml
1.5 mol/L Tris·HCl (pH8.8)	2.5ml	—
0.1 mol/L Tris·HCl (pH6.8)	—	0.25 ml
10% SDS	100 μ l	20 μ l
10% 过硫酸胺	100 μ l	20 μ l
TEMED	4 μ l	2 μ l

- 5) SDS-PAGE 电泳：加入蛋白样品 20-30 μ l 后，进行 SDS-PAGE 电泳：80v 40min，120 v，90 min；（电泳缓冲液液配置：H₂O 1L；Tris 3.03g；甘氨酸 14.4g；SDS 1g）
- 6) 转膜：硝酸纤维素(PVDF)膜，200mA 转膜 90min（转膜缓冲液配置：H₂O 800ml；

Tris base 5.8g; 甘氨酸 2.9g; 甲醇 200ml)

- 7) 封闭: 10%小牛血清白蛋白 37°C封闭 2 hr; (洗膜液配置: Tris 2.42g ; H₂O 800ml; NaCl 8.8g; Tween 20 1ml, HCl 调整 PH 值至 7.6, 定容至 1L)
- 8) 一抗 4°C孵育过夜; 其中 β -actin 抗体以 1: 10000 稀释, 其余抗体均以 1: 1000 稀释。
- 9) 洗膜液清洗 10 min, 3 次; 加入二抗, 室温孵育 2 hr;
- 10) 扫膜: 在凝胶成像分析系统中, 加入免疫印迹化学发光液, 扫膜 120-300sec, 记录图像;
- 11) 定量分析: 采用 IMAGE J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), 对图像中的印迹的灰度值进行定量分析, 每个蛋白的灰度值通过与相应的 β -actin 灰度值相除, 进行归一化处理。

2.12 细胞凋亡检测

细胞凋亡检测按照 Annexin V/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒说明书标准步骤进行, 简述如下:

- 1) BMSCs 进行胰酶消化后, 800 转/min 离心 5min, 弃上清;
- 2) PBS 重悬细胞, 计数, 吸取 5×10^5 细胞, 离心, 弃上清;
- 3) 加入 400ul Binding 缓冲液重悬细胞;
- 4) 加入 5ul Annexin V-FITC, 混匀后避光室温孵育 15min
- 5) 加入 10 ul PI 染色液, 冰浴 5min
- 6) 流式细胞仪检测。其中, Annexin V-/PI-为活细胞, Annexin V+/PI- 为凋亡早期细胞, Annexin V+/PI+为凋亡晚期细胞, Annexin V-/PI+为坏死裂解细胞。

2.13 IKK α SiRNA 转染

- 1) 2×10^5 BMSCs 以无双抗含 10% 血清的 α -MEM 培养液接种于 6 孔板中, 培养至 70% 密度;
- 2) 以 250ul 无双抗无血清 α -MEM 稀释 10ul siRNA, 室温放置 5min;
- 3) 以 250ul 无双抗无血清 α -MEM 稀释 10ul lipofectamine 2000, 室温放置 5min;
- 4) 将上述两种稀释液轻轻混匀后室温孵育 15min;
- 5) 将混合液加入含 1500ul 培养液的 6 孔板中, 孵箱培养 24hr 后换液, 进行后续实

验。

2.14 统计

计量数据以均数±标准差 (mean ± SD) 表示。两组数据之间比较采用 student's t-test; 多组数据间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。P < 0.05 被认为具有显著性差异。

3 结果

3.1 OVX 骨质疏松小鼠 BMSC 成骨分化下降

为了研究绝经后骨质疏松中 BMSCs 的功能变化, 我们首先通过卵巢切除手术建立小鼠骨质疏松模型。术后 3mon, 通过形态学检测验证所构建的去势骨质疏松模型。microCT 结果显示: 术后 3 个月, OVX 小鼠股骨的骨小梁体积较 SHAM 小鼠下降了 60% ($P < 0.01$) (图 1-1A, B); H&E 染色也同样证实 OVX 小鼠股骨松质骨的丢失 (图 1-1C, D), 证明骨质疏松模型构建成功。

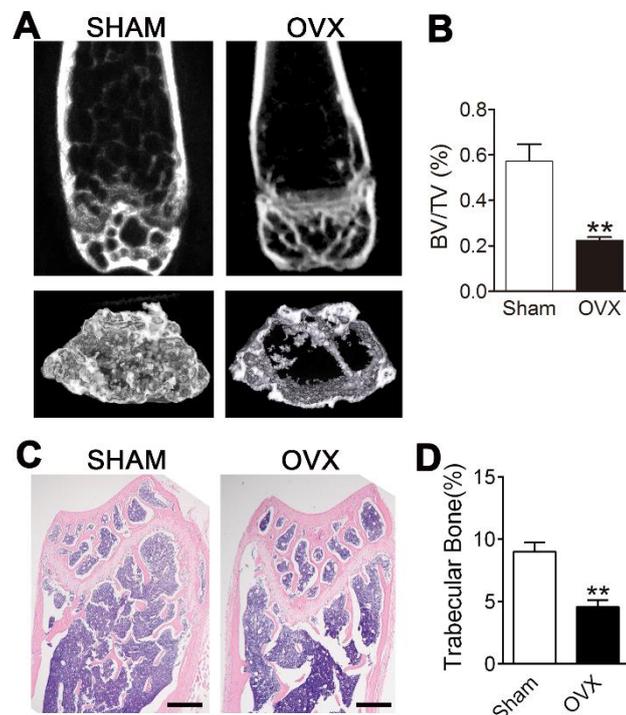


图 1-1 SHAM 及 OVX 小鼠股骨 microCT 及组织学检测

卵巢切除(OVX)及假手术(SHAM)术后 3 mon, 对小鼠股骨远端松质骨形态和体积进行 microCT 检测 (A, B) 及组织学检测 (C, D)。Scale bar, 200 μ m; BV/TV, 松质骨体积/总体积。 n=3;

** $P < 0.01$ 。

为了明确绝经后骨质疏松中 MSCs 的成骨分化能力是否改变,首先利用从 SHAM 及 OVX 小鼠股骨分离的 BMSCs 进行克隆形成 (CFU-F) 及成骨克隆形成 (CFU-Ob) 实验。结果显示 OVX BMSCs 形成的细胞集落数量较 SHAM BMSCs 减少 28% ($P < 0.05$) (图 1-2A),但是成骨集落数却减少了 65% ($P < 0.001$) (图 1-2B)。接下来,我们对相同数量体外培养的 SHAM 和 OVX BMSCs 进行成骨诱导实验,茜素红染色显示 OVX BMSCs 的成骨分化能力低于 SHAM BMSCs ($P < 0.05$) (图 1-2C)。为了进一步确证不同 BMSCs 成骨能力的差异,我们通过 realtime RT-PCR 检测了成骨分化标志性基因 Runx2 及 OCN 的表达,同样发现 OVX BMSCs 中成骨基因表达低于正常对照 (Runx2, $P < 0.05$; OCN, $P < 0.01$) (图 1-2D)。上述结果证实了绝经后骨质疏松中 BMSCs 的成骨分化能力显著下降。

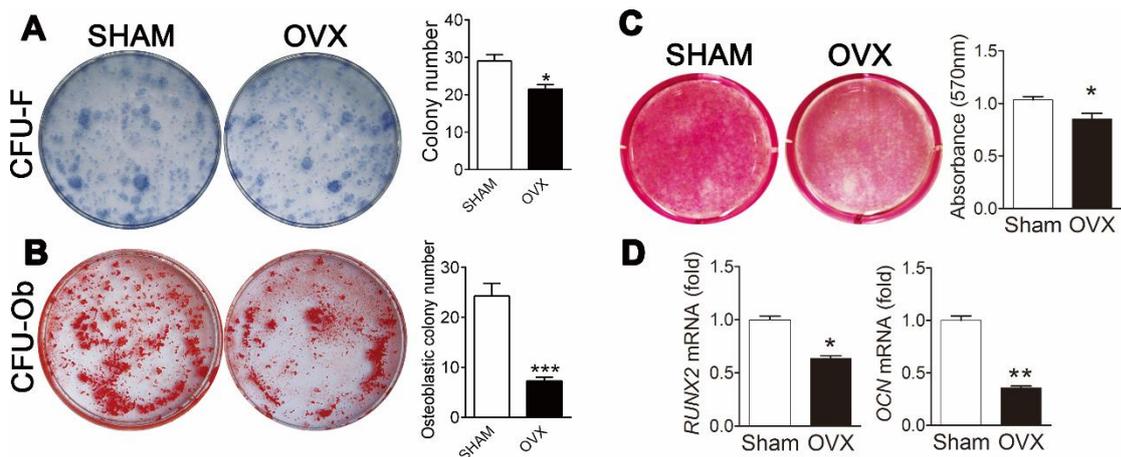


图 1-2 SHAM 及 OVX BMSCs 成骨分化能力检测

(A) SHAM 及 OVX 骨髓细胞培养 14d 后行甲苯胺蓝染色,并计算细胞集落数量;(B) SHAM 及 OVX 骨髓细胞成骨诱导液培养 14d 后行茜素红染色,并计算成骨细胞集落数量。(C,D)SHAM 及 OVX BMSCs 成骨诱导 14 d 后行茜素红染色和定量分析 (C),并利用 Realtime RT-PCR 检测成骨标志基因的表达(D)。n=3; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

3.2 雌激素缺乏后 TNF- α 含量升高抑制 BMSCs 成骨分化

为了明确 TNF- α 在 OVX BMSCs 成骨分化异常中的作用,首先采用 ELISA 检测模型小鼠血清中 TNF- α 含量,证实 TNF- α 血清浓度在骨质疏松过程中均升高约 30%

($P < 0.01$) (图 1-3A), 与以往文献报道相一致。随后, 我们建立体外 TNF- α 刺激模型。茜素红染色显示, TNF- α 14 d 后 BMSCs 形成的钙化结节减少超过 50% ($P < 0.001$) (图 1-3B), 而 Realtime RT-PCR 检测显示 TNF- α 处理造成 Runx2 表达降低 50% ($P < 0.05$), 而 OCN 表达降低超过 90% ($P < 0.001$) (图 1-3C)。证明 TNF- α 的升高可抑制 BMSCs 成骨分化。

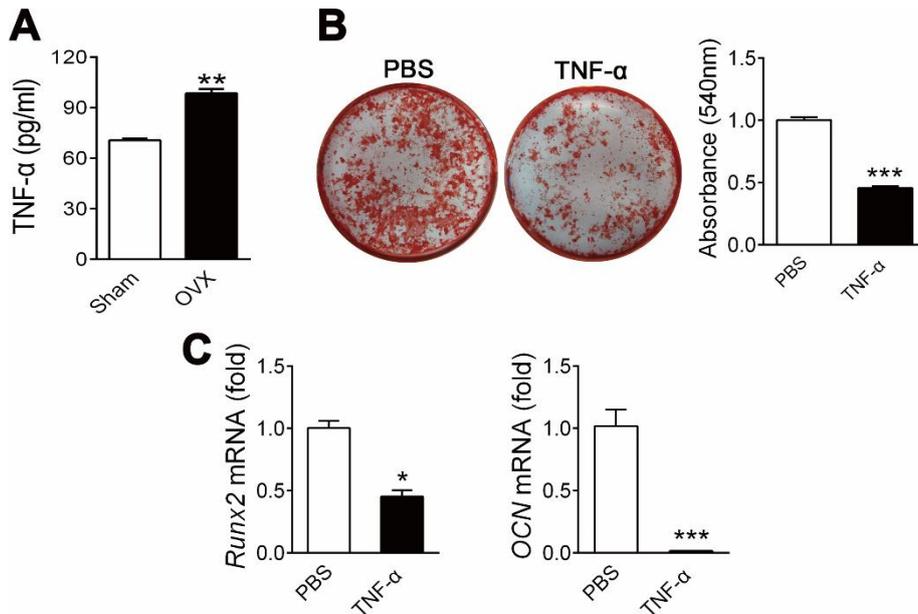


图 1-3 TNF- α 处理后 BMSCs 成骨分化能力检测

(A) 利用 ELISA 检测 SHAM 及 OVX 小鼠血清中 TNF- α 的浓度; (B, C) BMSC 成骨诱导过程中加入 20ng/ml TNF- α 刺激, 14d 后行茜素红染色 (B) 及 realtime RT-PCR 检测 (C)。n=3; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

3.3 TNF- α 通过激活 NF- κ B 信号通路抑制 BMSC 成骨分化

TNF- α 可通过与受体结合激活多条下游信号通路, 其中最主要的是凋亡通路及 NF- κ B 通路。为了明确 TNF- α 的作用通路, 首先检测 TNF- α 是否激活凋亡通路。Annexin V/PI 凋亡染色显示, TNF- α (20ng/ml) 刺激不诱导细胞凋亡 (图 1-4), 提示其并未激活凋亡通路。

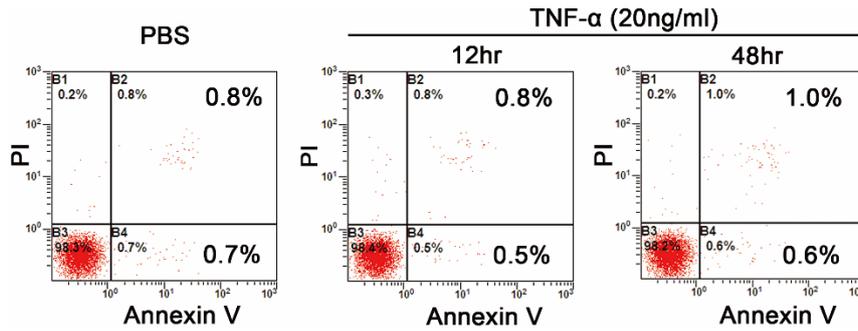


图 1-4 FCM 检测 TNF- α 刺激 12hr 和 48hr 后 BMSCs 的凋亡

接下来,对 NF- κ B 信号通路下游关键转录因子 P65 的表达水平进行检测。Western blot 和 Realtime RT-PCR 检测证实, P65 的蛋白 (图 1-4A) 和 mRNA (图 1-4D) 水平在 TNF- α 刺激后均明显升高。P65 磷酸化是 NF- κ B 信号激活的重要标志之一, 我们发现磷酸化 P65 在 TNF- α 刺激后也有所升高 (图 1-4A)。同时, 我们也证实 OVX MSCs 中 P65 的总蛋白和磷酸化蛋白水平显著高于 Sham BMSCs (图 1-4C)。上述结果说明 TNF- α 激活了 NF- κ B 信号通路。

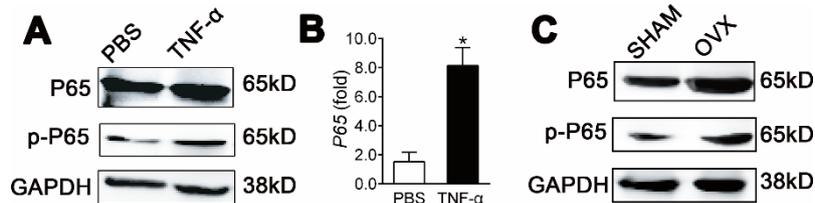


图 1-5 P65 PCR 及 western 检测 NF- κ B 信号通路

(A) Western blot 检测 20ng/ml TNF- α 刺激 12hr 后 P65 和 p-P65 的蛋白表达; GAPDH 作为内参; (B) Realtime RT-PCR 检测 TNF- α 刺激后 P65 mRNA 的表达。n=3; * P <0.05; (C) Western blot 检测 SHAM 和 OVX BMSCs 中 P65 和 p-P65 的蛋白表达。

为了证实 TNF- α 通过 NF- κ B 信号通路抑制 BMSCs 成骨分化, 我们采用 IKK α siRNA 沉默 IKK α 表达, 因为 IKK α 是激活 P65 的上游蛋白复合体的关键成员, 抑制 IKK α 可有效阻止 P65 的活化。Realtime RT-PCR 证实所用 siRNA 的沉默效率达到 60% 以上 (图 1-5A), 而 Western blot 检测也证实了沉默 siRNA 可有效抑制 P65 的磷酸化 (图 1-5B)。接下来我们对沉默了 IKK α 的 BMSC 成骨诱导过程中进行 TNF- α 处理, 茜素红染色及成骨基因检测证实, 抑制 NF- κ B 通路活化显著阻断了 TNF- α 对 BMSCs 成骨分化的抑制作用 (图 1-5D), 说明 TNF- α 主要通过 NF- κ B 信号通路发挥作用。

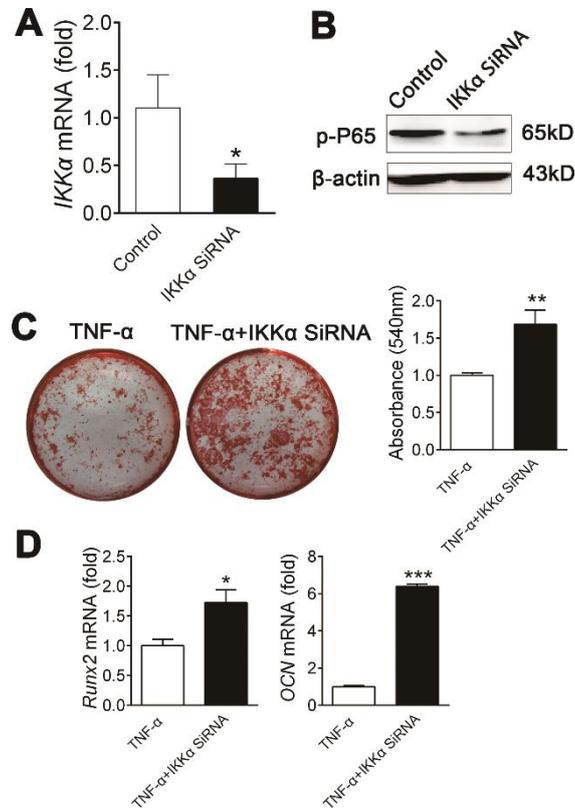


图 1-6 抑制 NF- κ B 后缓解 TNF- α 对 BMSCs 成骨分化的作用

(A) BMSCs 转染 IKK α siRNA 后，采用 realtime RT-PCR 检测对 IKK α mRNA 表达的干扰效率；
 (B) Western blot 检测 IKK α siRNA 转染后 p-P65 的表达；(C, D) 转染 IKK α siRNA 的 BMSCs 在成骨诱导中进行 TNF- α 处理，14d 后进行茜素红染色 (C) 及 realtime RT-PCR 检测 (D)。n=3；
 * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001。

4 讨论

骨质疏松发生的细胞学基础是破骨细胞介导的骨吸收过程超过了成骨细胞介导的骨形成过程，导致骨量减少。不过成骨-破骨失衡是一个相对动态过程。在骨质疏松早期，往往呈现为高代谢进程，即骨吸收异常升高而骨形成也随之上升；而进入骨质疏松稳定期后，则呈现为低代谢进程，即骨吸收及骨形成均下降。研究证实，雌激素缺乏早期的骨形成升高是由于破骨吸收增加引起的反馈性效应。所以在骨质疏松早期很难判断致病因素对于骨形成的真实作用，也一定程度上导致了骨质疏松

中 BMSCs 生物学行为研究的诸多矛盾结果。为了明确雌激素缺乏后对于 BMSCs 功能的影响,本研究中动物模型取材时间点均选择在术后 3mon,即骨质疏松的稳定期。该阶段中破骨细胞的吸收活动有所下降,骨代谢率趋缓,以尽可能的减少破骨吸收对于 BMSCs 介导的成骨活动的影响。

因为 BMSCs 是成骨前体细胞的来源,在骨形成过程中发生着至关重要的作用。BMSCs 发挥正常功能取决于两个重要特性:一是能够通过自我更新,终身维持干细胞池中的细胞数量,并且能够在骨损伤过程中,扩增出足够数量的 BMSCs;二是能够向成骨前体细胞分化。BMSCs 能够对机体的信号进行应答,从而在合适的时间空间分化,提供所需的成骨细胞。最典型的例子就是破骨细胞吸收骨基质过程中会释放 TGF- β 等细胞因子, BMSCs 能够响应 TGF- β 而向破骨吸收位点迁移,并分化为成骨前体细胞,修复骨吸收陷窝。基于以上规律,如果 BMSCs 的自我更新或分化能力发生改变,将直接引起骨形成功能异常。已有一些研究,对衰老相关骨质疏松的 BMSCs 的生物学行为改变进行了检测,并发现衰老导致 BMSCs 的自我更新及成骨分化能力下降。我们的研究也发现雌激素缺乏所致骨质疏松中, BMSCs 的成骨分化能力也发生类似的下降。这些结果提示 BMSCs 功能异常是骨质疏松发生的重要细胞学基础。

目前 BMSCs 的体内研究仍存在缺乏特异性标记手段、数量稀少等困难,技术和方法上的不足导致难以获得体内直接证据。目前 BMSCs 分化研究较多的依赖于体外成骨诱导实验。体外成骨实验的可靠性及有效性得到广泛认同。本实验中,一方面利用成骨细胞集落形成实验 (CFU-Ob),证实在 OVX 骨质疏松中, BMSCs 的数量并没有较大差异,但是具有成骨分化能力的 BMSCs 数量减少明显。另一方面,利用体外成骨诱导染色和基因检测,证明 OVX BMSCs 总体成骨分化能力下降。上述结果均证实了 OVX BMSCs 的成骨分化异常。

本研究发现,OVX 术后 3mon 小鼠 BMSCs 的成骨分化能力显著下降。已有研究报道,在骨质疏松早期,骨髓细胞体外形成的成骨克隆数量增加,提示成骨细胞数量增多;但随着骨质疏松的进展,成骨克隆形成能力则逐渐下降;而 OVX 术后 1mon,与 SHAM 组已无明显差别。说明随着骨质疏松发生进程中破骨吸收的降低, BMSCs 受外界代偿因素的影响减弱,逐渐反应出致病因素对其功能的真实作用。所以我们的结论与已有研究并不矛盾。

雌激素受体普遍存在于全身多种细胞中。研究显示，T 细胞、树突状细胞、巨噬细胞、神经细胞等都表达雌激素受体，均受到雌激素的调控。而免疫细胞、神经细胞的功能改变，则可以影响到骨改建。多项研究证实，雌激素缺乏后促进 T 细胞分泌 RANKL 及 TNF- α ，IL-6 等炎症因子，进而促进破骨活动，抑制成骨活动，是导致骨质疏松的重要原因。此外，研究发现在树突状细胞、神经细胞内特异性敲除雌激素受体也可导致骨量的下降。这些研究都提示雌激素对其他系统的间接作用在骨代谢平衡中发挥关键作用。这也进一步加大了雌激素调控骨代谢研究的复杂性及难度。因为所在实验室前期研究已证实，体内注射 TNF- α 中和抗体可有效的预防和治疗 OVX 所致骨质疏松，并发现中和 TNF- α 后骨形成得到一定恢复。有力的说明了 TNF- α 在绝经后骨质疏松中的核心作用。所以本研究中主要关注于雌激素缺乏后升高的 TNF- α 对于 BMSCs 的作用。

NF- κ B 作为 TNF- α 的重要下游，发挥着维持细胞生存的功能，从而与凋亡信号相互拮抗。我们观察到所用的中等浓度 TNF- α (20ng/ml) 并没有诱导明显的细胞凋亡，提示 NF- κ B 通路在 BMSCs 中发挥更关键的作用。然而，NF- κ B 通路也是对 BMSCs 而言也是一把双刃剑。NF- κ B 信号异常已被报道与包括骨质疏松、关节炎、阿尔茨海默症、糖尿病等老年退行性疾病相关^[93,94]。特别是近期王存玉等人通过小鼠基因修饰模型，体内实验证实 NF- κ B 通路抑制成骨细胞的分化，而抑制其激活可有效维持去势手术后的骨形成、预防骨质疏松^[76]。本研究中，我们也证实了 TNF- α 通过激活 NF- κ B 信号通路，抑制 BMSCs 的成骨分化，特异性阻断该通路可以有效阻断 TNF- α 的不良作用，并恢复骨质疏松 BMSCs 的成骨分化。此外，炎症因子、氧化应激、营养应激等都能够影响 NF- κ B 信号通路，导致其异常活化，提示 NF- κ B 可能是多种致病因素的信号枢纽，在骨质疏松中发挥关键的信号传递作用。但 NF- κ B 在免疫等系统中发挥重要的生理作用，如果广谱的抑制该通路将导致严重的副作用，所以 NF- κ B 通路难以成为骨质疏松治疗的靶点。而寻找出 NF- κ B 通路抑制 BMSCs 成骨分化的特异性下游信号分子，将是更为可行的策略。

第二部分 TNF- α 通过 miR-3077-5p 抑制 BMSCs 成骨分化

通过实验一，证实雌激素缺乏后 TNF- α 水平上升，并通过激活 NF- κ B 通路抑制 BMSCs 的成骨分化。NF- κ B 信号通路的作用十分广泛。其激活后主要通过促进 P65 等转录因子入核，调控基因转录，改变细胞的功能。现已发现大量基因均受到 P65 的调控，但是其影响 BMSCs 成骨分化的相关机制仍有待阐明。

miRNA 对于干细胞分化的调控作用越来越受到学者们重视。最新研究发现，多个 miRNA 在 BMSCs 分化中发挥重要调控作用；而在肿瘤中，已发现 NF- κ B 信号能够激活特定 miRNA 的表达。但是骨质疏松 BMSCs 分化功能异常是否与 miRNA 有关、TNF- α 是否通过影响 miRNA 表达调控细胞分化等重要问题尚无报道。所以该部分实验中，我们拟采用 miRNA 芯片筛查技术，探讨 TNF- α 是否通过调控 miRNA 抑制 BMSCs 成骨分化。

1 材料

1.1 仪器和设备

1.1.1 定量 PCR 仪	Bio-Rad, 美国
1.1.2 PCR 仪	Thermo, 美国
1.1.3 酶标仪	Bio-tek, 美国
1.1.4 microCT	Siemens, 德国
1.1.5 流式细胞仪	Beckman, 美国
1.1.6 倒置显微镜	Olympus, 日本
1.1.7 电泳仪	Bio-Rad, 美国
1.1.8 凝胶成像分析系统	天能, 上海

1.2 主要试剂

1.3.1 RNA 反转录试剂盒	Takara, 日本
1.3.2 Realtime PCR 检测试剂盒	Takara, 日本
1.3.3 Trizol	Invitrogen, 美国
1.3.4 miR-3077-5p mimics, inhibitor	锐博, 广州

1.3.5 miRNA PCR 检测套装	锐博, 广州
1.3.6 RUNX2 抗体	Cell Signaling, 美国
1.3.7 重组小鼠 TNF- α	Peprotech, 美国
1.3.8 miRNA 高通量芯片	联川生物, 杭州

2 方法

2.1 miRNA 芯片筛选

- 1) 取术后 12 w OVX 及 SHAM 小鼠股骨各 9 只, 分离培养 BMSCs;
- 2) 传至第二代后, 采用联川生物细胞 RNA 提取液裂解细胞 (500ul/1 \times 10⁶ cell), 干冰冻存, 寄送至联川生物公司;
- 3) 由联川生物公司进行每个细胞样品 RNA 提取, 质检合格后, 同组每 3 个样本 RNA 等量混合, 获得 6 个混合样本;
- 4) miRNA 芯片检测采用 μ Paraflo®生物芯片, 芯片版本为 Sanger 17.0; 每张芯片分别标记 Cy3 和 Cy5 标记 SHAM 和 OVX 混样标本, 共进行 3 张双色芯片检测;
- 5) 芯片检测结果由联川生物公司进行检测、计算、统计学分析;。

2.2 不同组织 RNA 提取

- 1) 骨组织 RNA 提取方法: 小鼠股骨彻底分离软组织, 用预冷的 PBS 反复冲洗骨髓腔, 去除骨髓细胞; 迅速放入液氮冷冻; 在 DEPC 处理过的研钵中放入液氮与骨组织, 反复研磨至粉末; 加入 Trizol (1ml/100mg), 继续研磨至 Trizol 溶解, 按第一部分常规 RNA 提取方法进行提取。
- 2) 心、肝、肺、脂肪、脑、肌肉、脾的 RNA 提取方法: 小鼠颈椎脱臼处死后, 立刻在冰上分离脏器, 冲洗血液后切取 100mg 组织, 加入 1ml Trizol 中, 匀浆器将组织完全匀浆, 后续提取方法同第一部分;
- 3) 血细胞 RNA 提取方法: 经内眦静脉抽取 0.5ml 血液, 加入含枸橼酸钠的抗凝管中, 5000rpm 离心 10min, 去除血浆后加入 1ml Trizol, 重悬混匀。后续提取方法同第一部分。。

2.3 茜素红染色及定量

- 1) 取 1mg 总 RNA，使用 PrimeScript RT reagent kit 逆转录试剂盒配置反应液。

miRNA RT 引物和 RNA 混合配置		
试剂	使用量	终浓度
RNA Template	2 μ g	
RT 引物工作液 (500 nM)	2 μ l	40 nM
RNase-free H ₂ O	至 11 μ l	

- 2) 混匀后 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min，冰浴 2 min

- 3) 配置 RT 反应液

miRNA RT 反应液配置		
试剂	使用量	终浓度
5 \times PrimeScript $^{\circ}$ Buffer (for Real Time)	2 μ l	1 \times
PrimeScript $^{\circ}$ RT Enzyme Mix I	0.5 μ l	
RT 引物-RNA 混合液	11 μ l	
RNase Free dH ₂ O	up to 25 μ l	

miRNA RT 反应： 42 $^{\circ}$ C 60 min； 70 $^{\circ}$ C 10 min；

2.4 miRNA Realtime PCR 检测

miRNA realtime PCR 检测方法与第一部分检测方法相同。所使用 miRNA 引物购自锐博，U6 作为内参进行 miRNA 的定量分析。

2.5 miRNA mimic 及 inhibitor 转染

- 1) 2×10^5 BMSCs 接种于 6 孔板，采用无抗生素培养基培养至 70% 密度
- 2) 将 10 μ l miR-3077-5p mimic 工作液(终浓度 50nM)、20 μ l (终浓度 100nM)和 10 μ l negative control (终浓度 50nM)分别与 250 μ l 无血清 α -MEM 培养基混合，静置 5min；
- 3) 将 5 μ l lipofectamineTM 2000 与 250 μ l 无血清 α -MEM 培养基混合，静置 5min
- 4) 将上述两种稀释液混合后，室温静置 20min 后，加入培养板中，轻轻混匀；
- 5) 置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱培养 8hr 后更换为常规 α -MEM 培养基，继续培养 24-48h 后进行后续实验。

2.6 miRNA 靶基因预测

- 1) 通过 miRNA 靶基因预测数据库对 miR-3077-5p 可能结合的 mRNA (RNA22: <http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html>)

- 2) 在预测可能性排列靠前的靶基因中, 根据其已知生物学功能, 挑选出与 BMSCs 分化功能相关的候选靶基因。

2.7 荧光素酶报告基因检测

- 1) 根据生物信息学预测结合位点, 设计 PCR 引物 (Forward: 5'-GGACTAGTGCCAATCCCAGCATTCCT-3'; Rverse: 5'-CGACGCGTTGGTGTGCTTCAAGCTAC-3'), 通过 PCR 克隆获取 Runx2 mRNA 3'UTR 片段;
- 2) 将获得片段插入 pMIR-Report 载体的 HindIII 和 SpeI 位点, 构建 Runx2 pMIR-Report 载体;
- 3) 将 BMSCs 以无抗生素培养基接种于 96 孔板, 生长至 70% 密度;
- 4) 将 Runx2 pMIR-Report、pMIR-Report (pMIR-Cont) 空载体及 pMIR- β -gal 载体分别混合于无血清 α -MEM 培养基 (终浓度)
- 5) 在稀释液中分别加入 miR-3077-5p mimic, inhibitor 和 negative control (终浓度 100nM)
- 6) 将 0.5 ul lipofectamineTM 2000 与 25 ul 无血清 α -MEM 培养基混合, 静置 5min
- 7) 将上述两种稀释液混合后, 室温静置 20min 后, 加入培养板中, 轻轻混匀; 每个样本设置 2 个副孔。
- 8) 置于 37°C 孵箱培养 8hr 后更换为常规 α -MEM 培养基, 继续培养 48h;
- 9) 利用荧光素酶检测试剂盒裂解细胞, 并采用荧光检测仪进行荧光强度检测
- 10) 利用 β -gal 检测试剂盒检测相应副孔 β -gal 表达
- 11) 荧光强度检测数据除以 β -gal 检测数值, 进行归一化处理。

2.8 Western blot 检测

Western blot 检测方法与第一部分方法相同。采用 Runx2 抗体 (1: 1000) 检测蛋白表达。。

2.9 细胞增殖检测

- 1) miR-3077-5p mimic、inhibitor、negative control 转染 BMSCs: 方法参考同 2.1;
- 2) 转染 48hr 后胰酶消化 BMSCs, 获取细胞悬液, 细胞计数;
- 3) 以 6000 个/孔密度接种于 96 孔板, 每组设置 7 个时间点, 每个时间点 5 个副孔,

另设一组空白对照；

- 4) 每天同一时间进行 MTT 检测：每孔加入 20ul 50ug/ml MTT 溶液，37℃ 静置 4h；吸尽培养液，每孔加 150ul DMSO 震荡 10min，全程避光；酶标仪检测 490nm 波长处吸光值。
- 5) 连续检测 6 天，绘制生长曲线。

2.10 雌激素体内注射

小鼠 OVX 术后 2mon，通过腹腔注射 50 μ g/kg 体重的 17 β 雌二醇，而对照组仅注射橄榄油。每隔一天注射一次，注射 4week。

2.11 统计

计量数据以均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。两组数据之间比较采用 student's t-test；多组数据间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。P < 0.05 被认为具有显著性差异。

3 结果

3.1 TNF- α 可引起 BMSCs 内 miRNA 表达异常

为了明确雌激素缺乏是否导致 BMSCs 中 miRNA 表达出现异常，我们对 SHAM 及 OVX BMSCs 中 miRNA 表达进行了高通量芯片筛查。经过对两组芯片数据进行统计分析，结果显示：1. OVX 及 Sham BMSCs 整体 miRNA 表达谱无明显差异，在 SHAM BMSCs 和 OVX BMSCs 中表达的 miRNA 基本相同；2. 绝大多数 miRNA 表达水平在 OVX BMSCs 及 Sham BMSCs 之间无显著差异。3. 10 个 miRNA 的表达量在 OVX BMSCs 及 Sham BMSCs 之间存在差异（表 2-1）。4. miR-705 ($P < 0.033$)，miR-20a ($P < 0.033$)，miR-3077-5p ($P < 0.034$) 在 SHAM 及 OVX BMSCs 中表达差异最为显著（表 2-1）。但考虑到 miR-20a 的检测信号值在 SHAM BMSCs 中 524，OVX BMSCs 中为 372，接近芯片检测的最低可靠信号值（500），说明其在 BMSCs 中表达量较低。而 miR-705 的检测信号值超过 8200，miR-3077-5p 的信号检测值超过 4300，所以选取 miR-705 及 miR-3077-5p 进行后续研究。

表 1-1 SHAM 及 OVX miRNA 芯片筛查结果统计 (n=3)

Reporter Name	SHAM	OVX	Log2 (OVX/SHAM)	p-value
mmu-miR-705	8,212	11,684	0.51	0.033
mmu-miR-20a	524	372	-0.5	0.033
mmu-miR-3077-5p	4,392	7,148	0.7	0.034
mmu-miR-21	37,705	27,752	-0.44	0.067
mmu-miR-149*	21,102	33,468	0.67	0.072
mmu-miR-146a	8,679	4,847	-0.84	0.075
mmu-miR-680	460	784	0.77	0.088
mmu-miR-181c	55	29	-0.9	0.078
mmu-miR-181b	247	125	-0.98	0.079
mmu-miR-451	24	4	-2.46	0.088

首先, 通过 realtime RT-PCR 验证芯片筛查结果, 证实 OVX BMSCs 中 miR-705 表达水平较 SHAM BMSCs 升高超过 1 倍 ($P<0.05$), 而 miR-3077-5p 的表达则升高了近 2 倍 ($P<0.05$) (图 2-1A)。为了明确二者与绝经后骨质疏松发生的相关性, 我们检测了雌激素治疗后股骨组织中 miRNA 的表达, 发现雌激素体内注射有效降低 miR-705 和 miR-3077-5p 的表达水平 ($P<0.05$) (图 2-1B), 与雌激素缺乏后观察到的表达上升相一致。为了明确 miR-705 和 miR-3077-5p 的表达是否直接受雌激素调控, 我们体外对 BMSCs 进行不同浓度雌激素处理, 但是发现与预期结果正好相反, 雌激素在体外明显促进 miR-705 和 miR-3077-5p 的表达, 并呈剂量依赖性 (图 2-1C)。雌激素体内和体外作用的差异性, 提示雌激素在体内是通过间接作用抑制 miR-705 和 miR-3077-5p 表达。

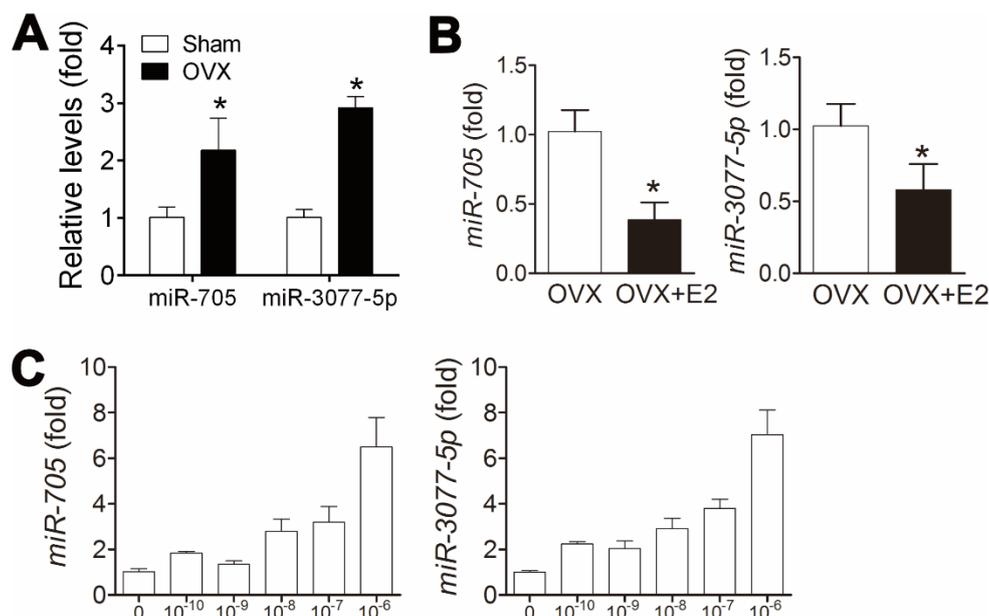


图 2-1 雌激素间接调控 miR-705 和 miR-3077-5p 表达

(A) Realtime RT-PCR 检测 SHAM 及 OVX BMSCs 中 miR-705 和 miR-3077-5p 的表达; (B) OVX 小鼠进行 E2 注射治疗 20d 后, realtime RT-PCR 检测股骨中 miR-705 和 miR-3077-5p 的表达; (C) Realtime RT-PCR 检测体外不同浓度 E2 处理后 BMSCs 中 miR-705 和 miR-3077-5p 的表达。n=3; * $P<0.05$ 。

基于 TNF- α 在 OVX BMSC 分化异常中的重要作用, 我们探索 OVX BMSCs 中差异性表达的 miRNA 是否由 TNF- α 水平升高所导致。经过 20ng/ml TNF- α 体外刺激 2 hr 后, Realtime RT-PCR 检测显示 BMSCs 中 miR-705 的表达升高了约 6 倍 ($P<0.01$), 而 miR-3077-5p 的表达升高了 0.7 倍 ($P<0.05$) (图 2-2), 证实 TNF- α 体外显著促进 miR-3077-5p 及 miR-705 的表达, 与二者在骨质疏松 BMSCs 中变化趋势相一致。

因为前面结果已证实 TNF- α 通过 NF- κ B 通路抑制 BMSCs 成骨分化, 于是我们检测 TNF- α 是否通过 NF- κ B 信号通路调控 miR-705 及 miR-3077-5p 的表达。siRNA 抑制 NF- κ B 通路后, TNF- α 刺激对 miR-705 及 miR-3077-5p 表达的促进作用显著降低 ($P<0.05$) (图 2-2), 说明 TNF- α 也是通过 NF- κ B 通路调控这两个 miRNA 的表达。

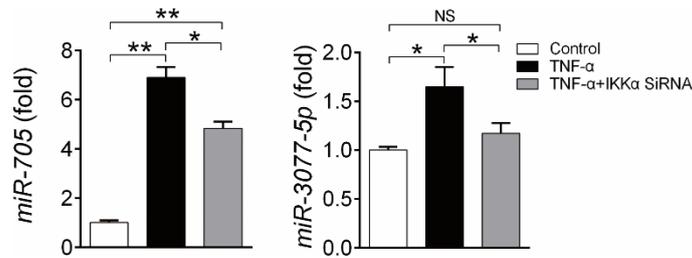


图 2-2 TNF- α 通过 NF- κ B 通路促进 miR-705 及 miR-3077-5p 表达。

BMSCs 分别转染 IKK α siRNA 和 negative control siRNA 后用 20ng TNF- α 处理 2hr, Realtime RT-PCR 检测 miR-705 及 miR-3077-5p 的表达。n=3; * P <0.05, ** P <0.01。

同样, 抑制 IKK α 之后, OVX BMSCs 中 miR-705 及 miR-3077-5p 的表达降低了 50% (P <0.01) (图 2-3), 结合图 2-2 的结果, 提示 NF- κ B 的异常激活导致了 OVX BMSCs 中 miRNA 表达异常。

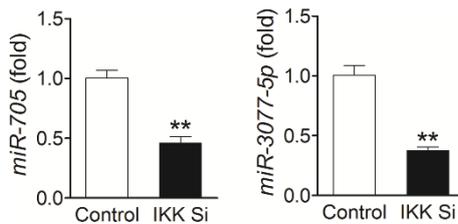


图 2-3 Realtime RT-PCR 检测 OVX BMSCs 转染 IKK α siRNA 后 miR-705 和 miR-3077-5p 表达。n=3; ** P <0.01。

3.2 miR-3077-5p 对 MSCs 分化的调控作用

通过上述实验, 筛选出两个在雌激素缺乏骨质疏松中受 TNF- α 调控的 miRNA。因为这两个 miRNA 均受到 NF- κ B 信号通路的直接调控, 而 NF- κ B 是抑制 BMSCs 分化的关键信号, 所以我们提出假设: miRNA 可能参与 NF- κ B 信号对 BMSCs 成骨分化的抑制过程。通过查阅文献, 发现这两个 miRNA 均是在 2011 年才通过 miRNA 高通量测序技术筛查发现, 相关研究甚少, 其在 BMSCs 或骨中是否发挥作用尚无任何报道。为了进一步明确其是否在骨质疏松 BMSCs 功能异常中发挥一定作用, 我们首先对在 SHAM 和 OVX BMSCs 中表达差异更大的 miR-3077-5p (表 2-1) 进行系统研究, 明确其组织特异性、分化过程中的表达变化、对 BMSCs 的功能、调控靶基因等一系列问题。

部分 miRNA 的表达具有组织/器官特异性, 并且其特异性往往与其功能相一致。

为了探索 miR-3077-5p 的功能，首先检测了 miR-3077-5p 在不同组织器官中的表达，发现在小鼠多个主要脏器中，miR-3077-5p 在骨组织中表达最高，其骨组织表达量比在肌肉、脑、脂肪、心、肝、肺、脾和血液细胞中的表达量均高 1 倍以上（图 2-4）。说明其具有一定的骨组织特异性，可能在骨发育和代谢中发挥作用。

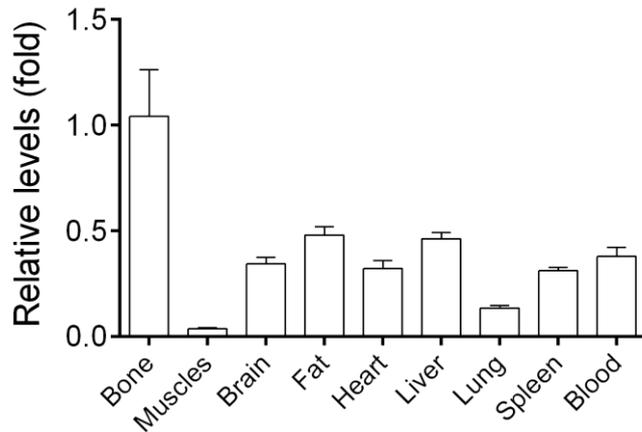


图 2-4 Realtime RT-PCR 检测 miR-3077-5p 在不同器官组织中的表达。n=3。

为了明确 miR-3077-5p 是否参与了 BMSCs 成骨分化调控，对其在 BMSCs 体外成骨分化的各个时间点的表达进行检测。发现 miR-3077-5p 表达在 BMSCs 分化过程中呈现规律性变化，即：随着成骨分化，其表达量显著下降，特别在成骨分化前 7 天内下降最为显著（图 2-5），提示其可能在 BMSCs 分化早期和中期发挥一定作用。

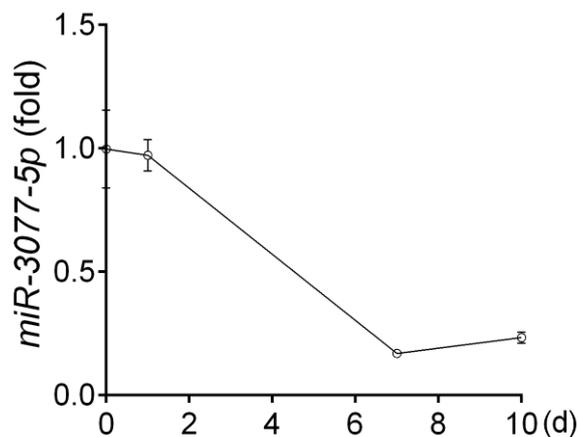


图 2-5 Realtime RT-PCR 检测 miR-3077-5p 在 MSCs 成骨分化过程中的表达。n=3。

为了直接明确 miR-3077-5p 在 BMSCs 成骨分化中的作用,开展了获得/缺失性功能实验。人工合成的 miR-3077-5p 模拟物 (mimic) 和抑制剂 (inhibitor) 分别被转染如 BMSCs 中,以上调或下调其表达水平。Realtime RT-PCR 检测证实了 mimic 可上调 miR-3077-5p 表达超过 36 倍($P<0.01$),inhibitor 可下调 miR-3077-5p 表达至 50% 左右 ($P<0.05$) (图 2-6),说明所采用试剂对 miR-3077-5p 表达的调控效果明显。

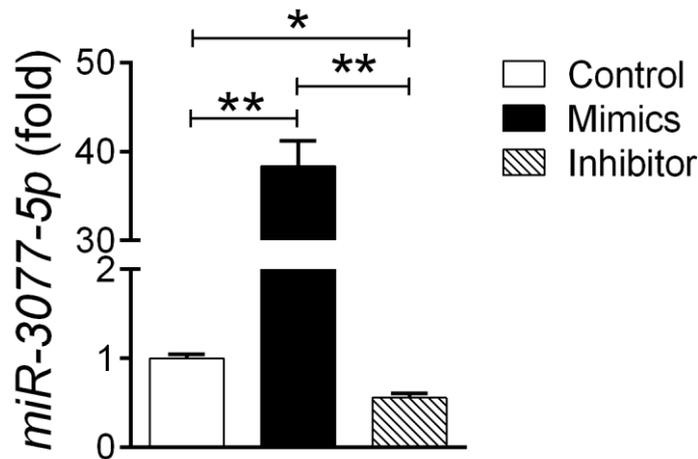


图 2-6 Realtime RT-PCR 检测 miR-3077-5p mimic、inhibitor 和 negative control 转染后 miR-3077-5p 的表达。n=3; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

对转染后 BMSCs 进行成骨分化诱导,14 d 后经茜素红染色发现 miR-3077-5p mimic 转染,可减少 BMSCs 钙化结节形成超过 60% ($P<0.01$),而 miR-3077-5p inhibitor 转染则明显提高 BMSCs 钙化结节数量 70% ($P<0.01$) (图 2-7A, B)。对成骨关键标志基因 Runx2 和 OCN 的检测也发现通过过表达 miR-3077-5p 可显著抑制 BMSCs 中 Runx2 和 OCN 的表达 ($P<0.05$),而下调 miR-3077-5p 则可促进 Runx2 和 OCN 的表达 ($P<0.05$) (图 2-7C),证实了 miR-3077-5p 在 BMSCs 成骨分化起负性调节作用。

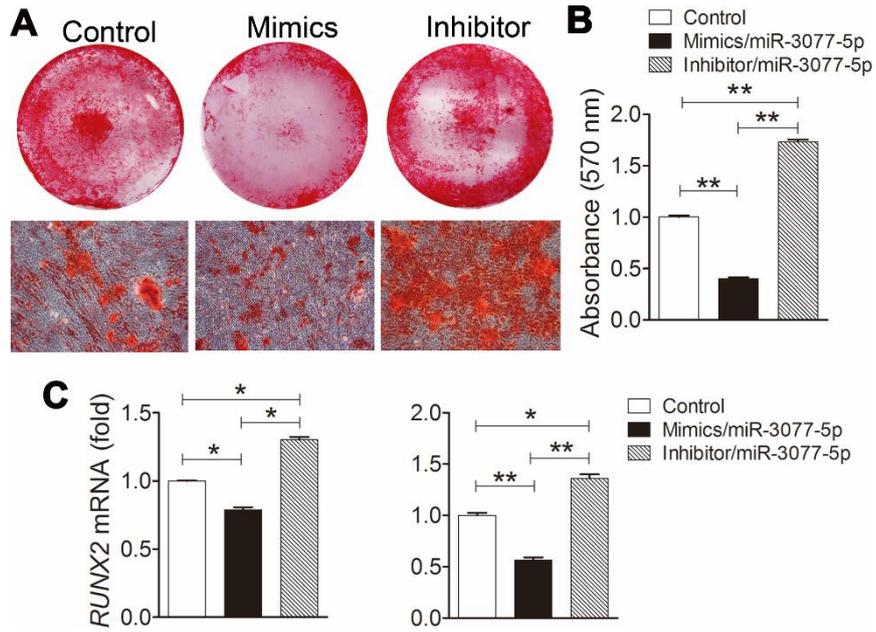


图 2-7 miR-3077-5p 对 BMSCs 成骨分化的作用

BMSCs 转染 miR-3077-5p mimic、inhibitor 及 negative control 后进行成骨诱导，14d 后进行茜素红染色 (A) 和定量分析 (B)，以及 Realtime RT-PCR 检测成骨标志基因表达 (C)。n=3; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

为了排除 miR-3077-5p 通过影响 BMSCs 增殖对茜素红染色的影响，对转染后 BMSCs 生长速度进行了比较。MTT 显示过表达及下调 miR-3077-5p 对 BMSCs 增殖均无显著影响 (图 2-8)。

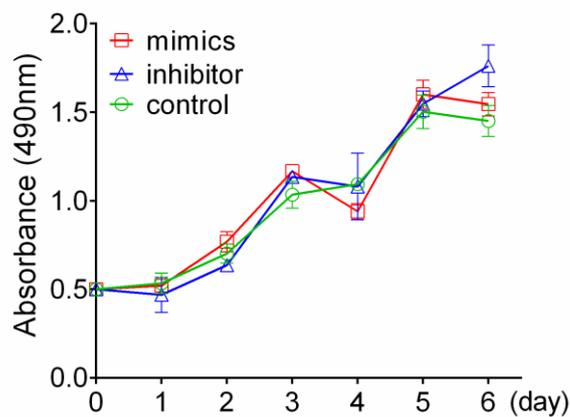


图 2-8 miR-3077-5p 对 BMSCs 增殖的作用

BMSCs 转染 miR-3077-5p mimic、inhibitor 及 negative control 后，用于增殖实验，通过 MTT 检测 6d 中 BMSCs 的增殖情况。n=5。

3.3 miR-3077-5p 的作用分子机制研究

miRNA 主要通过与其靶基因 mRNA 的 3'UTR 区域靶向结合，从而抑制 mRNA 的翻译过程。因为 miRNA 的结合基于种子序列 (seed region) 和 3'UTR 区序列的互补，所以通过生物信息分析成为寻找 miRNA 作用基因的有效途径。因为 miR-3077-5p 直到 2011 年才通过 miRNA 测序手段被发现并确认，大多数数据库中并未录入 miR-3077-5p，仅能通过 RNA22 数据库 (<http://cbsrv.watson.ibm.com/rna22.html>) 对 miR-3077-5p 可能的结合 mRNA 进行分析。通过生物信息学分析，我们发现 Runx2 是候选靶基因之一 (图 2-9)。



图 2-9 miR-3077-5p 与 Runx2 mRNA 3' UTR 结合位点

Runx2 是 BMSCs 成骨分化最重要的核心调节因子，Runx2 的缺失可导致成骨分化完全阻断，敲除 Runx2 的小鼠无法形成成熟成骨细胞。同时 Western blot 显示 OVX BMSCs 中 Runx2 表达水平明显低于 SHAM BMSCs。所以我们进一步研究 miR-3077-5p 能否调控 Runx2。首先，我们开展 miR-3077-5p 获得/缺失性实验，同时检测 Runx2 mRNA 及蛋白表达水平。发现过表达 miR-3077-5p 导致 Runx2 蛋白表达下降了 50%，而下调 miR-3077-5p 表达可增加 Runx2 蛋白表达水平 (图 2-10)。

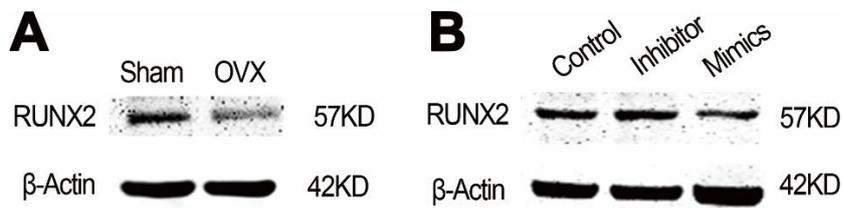


图 2-10 Western blot 检测 Runx2 在 SHAM 及 OVX BMSCs 中的表达 (A)，以及转染了 miR-3077-5p mimic、inhibitor、negative control 后的蛋白表达 (B)。

为了明确 miR-3077-5p 是否直接结合于 Runx2 mRNA 3'UTR 发挥抑制作用，我们克隆获得包含结合位点的 3'UTR 片段，并插入 pMIR-report 质粒

(Runx2-pMIR-report)。该质粒含有荧光素酶基因，转染入细胞后可表达荧光素酶，其表达量可通过加入荧光底物后进行定量检测。如果 miR-3077-5p 可直接结合于所克隆的 3'UTR 片段，则相应的能够降低质粒荧光素酶的表达。

荧光检测证实，miR-3077-5p mimic 确实可抑制转染 Runx2-pMIR-report 后 BMSCs 中荧光素酶表达 ($P<0.01$)，同时 miR-3077-5p inhibitor 能促进转染后 BMSCs 中荧光素酶表达 ($P<0.05$) (图 2-11)。证实了 miR-3077-5p 是通过直接结合于 Runx2 3'UTR 发挥基因沉默作用。

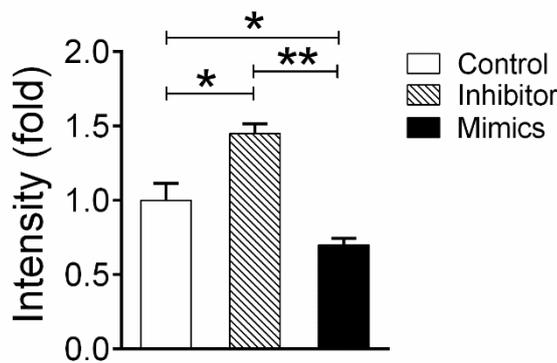


图 2-11 荧光素酶活性检测

Runx2-pMIR-report 分别与 miR-3077-5p mimics、inhibitor、negative control 共转染至 BMSCs 中，48hr 后行荧光素酶活性检测。n=5；* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

3.4 TNF- α 通过 miR-3077-5p 抑制 BMSCs 成骨分化

通过上述研究，证实了 miR-3077-5p 在 BMSCs 成骨分化中发挥负性调控作用，从而可提出推断：其表达异常可能导致骨质疏松 BMSCs 成骨分化缺陷。为了回答这个问题，我们利用 miR-3077-5p inhibitor 抑制 OVX BMSCs 中 miR-3077-5p 的表达，使其恢复到正常水平后进行成骨分化实验。14d 后茜素红染色发现，下调 miR-3077-5p 部分恢复了 OVX BMSCs 的成骨分化 ($P<0.05$) (图 2-12A, B)。Realtime RT-PCR 检测发现抑制 miR-3077-5p 并未提高 OVX BMSCs 中 Runx2 的 mRNA 表达，但是部分提高了 Runx2 的蛋白表达 (图 2-12C, D)，提示 miR-3077-5p 通过转录后调控发挥作用。

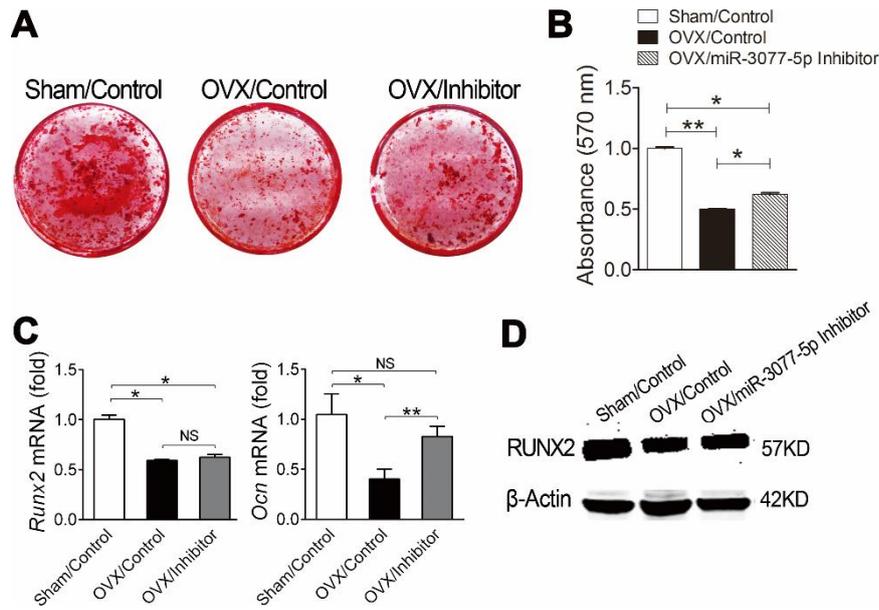


图 2-12 抑制 miR-3077-5p 部分恢复 OVX MSCs 的成骨分化能力

SHAM 及 OVX BMSCs 分别转染 negative control 和 miR-3077-5p inhibitor 后进行成骨诱导，14d 后行茜素红染色 (A) 及定量 (B)，Realtime RT-PCR 检测成骨标志基因表达 (C)，Western blot 检测 RUNX2 蛋白表达 (D)。B: n=4; C:n=3; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, NS, no significance。

因为 TNF- α 可上调 miR-3077-5p 的表达,为了进一步确认 miR-3077-5p 是 TNF- α 抑制 BMSCs 分化的关键下游,我们采用 miR-3077-5p inhibitor 抑制 BMSCs 中 miR-3077-5p 的表达后,检测其在 TNF- α 刺激下的分化能力。与 OVX BMSCs 实验结果一致,下调 miR-3077-5p 有效减轻了 TNF- α 对 BMSCs 成骨分化的抑制作用 ($P<0.001$) (图 2-13)。说明上调 miR-3077-5p 是 TNF- α 抑制 BMSCs 成骨分化的重要途径。

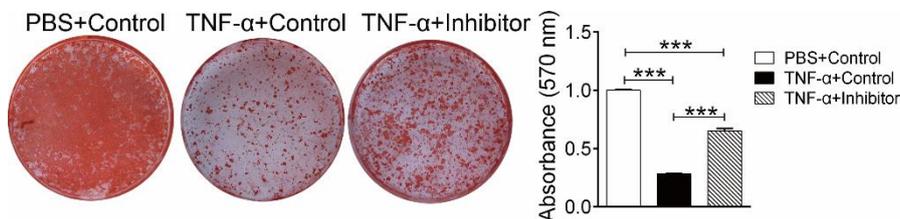


图 2-13 下调 miR-3077-5p 可部分阻断 TNF- α 的成骨抑制作用

BMSCs 分别转染 negative control 和 miR-3077-5p inhibitor 后进行成骨诱导,同时加入 TNF- α 刺激,14d 后行茜素红染色和定量分析。n=3; *** $P<0.001$ 。

4 讨论

通过 miRNA 芯片筛查,我们发现多个 miRNA 的表达在 Sham 及 OVX MSCs 中存在差异,说明雌激素缺乏可影响到细胞内 miRNA 的表达。而绝大多数 miRNA 的表达较为恒定,说明并非通过直接影响 miRNA 剪切、转运、成熟等过程中的核心因子或共同途径,而是通过某些途径有选择性地调控特定 miRNA 的转录。该结果也在一定程度上反映出 miRNA 表达调控的复杂性。

雌激素作为重要的激素,已被报道可调控 miRNA 表达。其中一项研究发现,雌激素可直接抑制 miRNA 合成的复合体,从而下调一系列 miRNA 的表达。但是包括本实验在内的多项研究发现雌激素也可促进特定 miRNA 的表达,说明雌激素的作用具有一定的细胞特异性或者基因特异性。我们发现雌激素缺乏导致骨组织及 BMSCs 中 miR-3077-5p 及 miR-705 的表达升高,雌激素注射可体内抑制骨组织中二者的水平,但体外雌激素对上述 miRNA 的调控作用却与体内相反,提示雌激素缺乏后并非通过直接作用影响 miR-3077-5p 及 miR-705 的表达。我们的结果进一步表明 miR-3077-5p 及 miR-705 的升高是由于 TNF- α 所引起,说明 TNF- α 的调控作用要强于雌激素缺乏的效应。该结果也支持 TNF- α 在绝经后骨质疏松中发挥关键作用的观点。

miRNA 在 BMSCs 分化中发挥着重要作用。一系列调控 BMSCs 成骨分化的 miRNA 已被报道,包括 miR-34s, miR-335, miR-26a, miR-204/211 等^[80,95,96]。但是,骨质疏松中致病因素是否通过影响 miRNA 导致细胞内信号异常尚不清楚。我们发现 BMSCs 中 miR-3077-5p 在骨质疏松后表达上升,而进行雌激素治疗后表达下降,提示这两个 miRNA 与骨质疏松进程密切相关。但是 miR-3077-5p 直到 2010 年才通过 miRNA 测序技术被发现。其生物学功能尚无报道。为了阐明 miR-3077-5p 在 BMSCs 中的功能,我们从组织特异性、与成骨分化的相关性、获得/缺失性功能实验这三个层面进行了研究,发现 miR-3077-5p 在骨组织中的表达量明显高于其他器官组织,在成骨分化过程中表达显著下降,并证明其对于 BMSCs 成骨分化发挥负性调控作用。这些结果充分说明了 miR-3077-5p 是 SC 成骨分化中一个重要的负性调控因子。我们的研究发现了一个新的 BMSCs 谱系分化的调控因子,为进一步认识 miRNA 在干细胞命运决定中的作用提供了实验依据。

Runx2 是成骨分化最重要的转录因子,在成骨细胞的成熟中发挥关键作用。Runx2 的缺失功能突变或缺失均导致骨量下降和骨发育的异常。Runx2 的激活主要依靠 Osterix 为主的转录活动。但是近期的多项研究发现,多个 miRNA 均发挥抑制 Runx2 蛋白表达的功能,说明这些 miRNA 可能是维持 BMSCs 未分化状态的开关之一。成骨分化中,相关的负性调节 miRNA 表达受到抑制,从而协同启动 Runx2 的表达和功能发挥,推动细胞谱系分化。miR-3077-5p 很可能也是这群开关控制 miRNA 中的一员。值得注意的是,miRNA 可以同时调控多个靶点,通过靶基因预测数据库可预测出大量可能受 miR-3077-5p 调控的候选基因。虽然我们证实了 Runx2 是其中重要的一个靶基因,但是要深入认识 miR-3077-5p 的功能,还需要进一步验证其他的靶基因。此外,miR-3077-5p 通过调控不同的靶基因可能发挥不同的功能。虽然在本研究中,OVX BMSCs 的成骨分化异常最为显著,所以我们在该实验中主要挑选了 BMSCs 成骨分化调控密切相关的靶基因,但不能排除 miR-3077-5p 还能调控 BMSCs 的其他生物学行为。上述问题也是所有 miRNA 功能研究中的难点,需要依

靠新的技术手段才可能解决。

结合芯片筛查结果，我们检测了 TNF- α 对于候选 miRNA 表达的调控作用，发现 miR-705 及 3077-5p 均受到 TNF- α 的调控，提示 TNF- α 可能通过调控 miRNA 发挥作用。进一步实验证实 miR-705 及 3077 都是受到 NF- κ B 通路调控，与 TNF- α 通过 NF- κ B 通路抑制成骨相一致。通过抑制 miR-3077-5p 的异常表达，可以部分恢复 OVX BMSCs 的成骨分化能力，并拮抗 TNF- α 的抑制成骨作用。提示 miR-3077-5p 是 TNF- α 所致一系列 BMSCs 内部信号改变的重要环节。虽然已有实验证实 TNF- α 抑制 BMSCs 成骨分化，但是 TNF- α 能够通过调控 miRNA 介导的转录后调控影响 BMSCs 功能尚无报道。我们的研究提出了 TNF- α 抑制成骨分化而导致骨质疏松的全新机制。

值得注意的是，抑制 miR-3077-5p 表达后，能够部分恢复 OVX BMSCs 及 TNF- α 处理后 BMSCs 的成骨分化能力，说明其只是 TNF- α 下游作用的其中一条途径。而且近期报道了多个在骨质疏松过程中表达异常升高的 miRNA，提示多个 miRNA 的表达升高可能形成一个相互作用的网络，发挥协同效应，而 TNF- α 可能通过调控多个 miRNA 发挥功能。这些假设均需要进一步实验的证实。

NF- κ B 通过活化 P65 入核，与染色体上特定的 NF- κ B 位点结合，发挥促进或抑制特定基因表达的作用。miRNA 的转录与基因转录机制类似，需要转录因子结合启动转录过程。我们对 pri-miR-705 和 pri-miR-3077-5p 的启动子区域进行了对比分析，发现两个启动子区域均有 NF- κ B 结合位点，可能直接受 P65 调控。因为 NF- κ B 通路作用广泛，其对于 miR-3077-5p 的特异性调控除了导致骨质疏松发生外，其是否还有生理意义尚无清楚。但是王存玉研究团队通过基因修饰手段抑制成骨细胞中 NF- κ B 信号通路，在骨发育阶段并未观察到显著改变，而在雌激素缺乏或者衰老调节下，却能够防止骨形成下降，提示可能 NF- κ B 对于 BMSCs 可能主要产生负效应。如果 miR-3077-5p 对于 BMSCs 也主要发挥负作用的话，就有可能成为一种安全的、无副作用的促进骨形成的干预靶点。有必要开展进一步的研究来明确抑制 miR-3077-5p 是否会导致其他副作用。

第三部分

在骨质疏松中，ROS 损伤已被大量研究证实是导致骨质疏松的关键致病因素之一。骨中 ROS 的水平随着疾病发展进程而不断增加。同时，ROS 损伤是骨质疏松 BMSCs 功能下降的最重要的直接因素。ROS 能够抑制 BMSCs 的分化，诱导 BMSCs 的凋亡，从而抑制骨形成。重要的是，多项研究发现炎症反应和氧化应激往往同时存在，并且相互促进，很可能在衰老相关退行性疾病中发挥协同作用。

通过前期研究，我们发现 TNF- α 可通过促进 miR-3077-5p 的转录导致 BMSCs 的成骨分化异常，证明了 TNF- α 可通过 miRNA 直接影响 BMSCs 的分化。但最新研究发现，TNF- α 除直接调控细胞功能外，还可引起一系列的细胞损伤，间接影响干细胞的功能。已有部分研究报道 TNF- α 可引起氧化应激，提示在骨质疏松中 TNF- α 可能通过引起氧化应激间接的破坏 BMSCs 功能。但是 TNF- α 是否通过引起 BMSCs 内氧化应激而影响成骨分化尚不清楚，其引起氧化应激的分子途径也有待阐明。为了更深入的理解 TNF- α 的作用机制，我们进一步开展研究，明确 TNF- α 能否通过氧化应激间接抑制 BMSCs 成骨分化，并探索其分子机制。

1 材料

1.1 仪器和设备

1.1.1 定量 PCR 仪	Bio-Rad, 美国
1.1.2 PCR 仪	Thermo, 美国
1.1.3 酶标仪	Bio-tek, 美国
1.1.4 microCT	Siemens, 德国
1.1.5 流式细胞仪	Beckman, 美国
1.1.6 倒置显微镜	Olympus, 日本
1.1.7 电泳仪	Bio-Rad, 美国
1.1.8 凝胶成像分析系统	天能, 上海
1.1.9 激光共聚焦显微镜	Olympus, 日本

1.2 主要试剂

1.3.1 RNA 反转录试剂盒	Takara, 日本
1.3.2 Realtime PCR 检测试剂盒	Takara, 日本
1.3.3 Trizol	Invitrogen, 美国
1.3.4 SYBR Premix Ex Taq II kit	Takara, 日本
1.3.5 miRNAPCR 检测套装	锐博, 广州
1.3.6 Foxo1 siRNA	锐博, 广州
1.3.7 APC-conjugated Sca-1 antibody	eBioscience, 美国
1.3.8 PE-conjugated CD45 antibody	BD Pharmingen, 美国
1.3.9 DAB 蛋白定量试剂盒	博士德, 武汉
1.3.10 anti-FoxO1	Cell Signaling, 美国
1.3.11 anti-FoxO3	Cell Signaling, 美国
1.3.12 Anti-p-P65	Cell Signaling, 美国
1.3.13 EDTA	Sigma, 美国
1.3.14 blood cell lysis buffer	Invitrogen, 美国
1.3.15 DCFH-DA 检测试剂盒	GENMED, 美国

2 方法

2.1 骨免疫组织化学检测

- 1) 10% EDTA (pH 7.0)中脱钙 2 w 的小鼠股骨,按第一部分方法常规石蜡包埋,切片,脱蜡及水化;
- 2) 0.3% H₂O₂ 浸泡 30min, 蒸馏水洗 5min, PBS 清洗 5min×3 次;
- 3) 0.1%胰酶抗原修复 20min, PBS 清洗 5min×3 次
- 4) 与制备二抗相同的动物非免疫血清 37℃孵育 1h, 防止非特异吸附;
- 5) 加入一抗 (1: 100) 孵育, 4℃过夜;
- 6) PBS 洗涤 5min×3 次;
- 7) 生物素化二抗 37℃孵育 60min; PBS 洗涤 5min×3 次;
- 8) 切片置入 DAB 显色液中 5-10min 至显色;

- 9) 流水冲洗 10min, 蒸馏水洗 3min
- 10) 苏木素复染 30sec
- 11) 酒精盐酸分化后, 自来水中继续分化;
- 12) 70%, 80%, 90%, 95%, 100%I, 100%II 酒精脱水各 5min
- 13) 二甲苯透明后, 树胶封片。

2.2 细胞免疫荧光检测

- 1) BMSC 接种于盖玻片, 生长至 55%-60%; PBS 洗 10min×3 次;
- 2) 4%多聚甲醛室温固定 20-30 min; PBS 洗 10min×3 次;
- 3) 0.2% Triton X-100 透化 2-5min; PBS 洗 10min×3 次;
- 4) 5%BSA 室温封闭 30 分钟;
- 5) 加一抗 (用 1%BSA 稀释, 1: 100), 湿盒内 4℃过夜; PBS 洗 10min×3 次;
- 6) 加荧光二抗 (用 1%BSA 稀释) 闭光孵育 30 分钟; PBS 洗 10min×3 次;
- 7) 95%甘油封片

2.3 体内 BMSCs ROS 水平检测

- 1) PBS 冲洗获得小鼠股骨骨髓细胞悬液, 1000 转/分离心 5min, 弃上清;
- 2) 加入 2ml 红细胞裂解液, 重悬后静置 5min;
- 3) 1000 转/分离心 5min, 弃上清; PBS 重悬, 细胞计数板计数;
- 4) 取 1×10^6 骨髓细胞, 离心后吸尽 PBS;
- 5) 加入 25mM DCFH-DA 1ml 重悬细胞, 37℃ 孵育 20 min;
- 6) 预冷 PBS 清洗 5min×2 次; 离心后弃上清;
- 7) APC-标记 Sca-1 抗体 (1:500) 和 PE-标记 CD45 抗体各 500ul, 重悬细胞, 4℃ 孵育 30 min;
- 8) 预冷 PBS 清洗 5min×2 次;
- 9) 流式细胞检测 Sca-1+CD45-细胞中 488nm 激发光强度;
- 10) 使用 FlowJo 软件对检测结果进行计算

2.4 体外 BMSCs ROS 水平检测

- 1) BMSCs 于 6 孔板内培养至 80%左右，吸尽上清，清洗液洗 3min;
- 2) 加入 DCFH-DA (25mM) 1ml, 37°C 孵育 30min;
- 3) 预冷 PBS 清洗 5min×2 次;
- 4) 荧光显微镜观测：置于荧光显微镜下激发光 488nm 观察；随机选取 5 个不同区域进行照相；
- 5) ROS 流式检测：0.25%胰酶消化 5min, 800 转/分离心，弃上清后用 500ul 预冷的保存液重悬；即刻行流式检测，记录 488nm 激发光强度

2.5 Realtime RT-PCR 检测

方法同第一部分。所使用引物序列如下：

Foxo1 (F: ACGAGTGGATGGTGAAGAGC; R: TGCTGTGAAGGGACAGATTG),

β -actin (F: CTGGCACCACCTTCTACA; R: GGTACGACCAGAGGCATACA),

Runx2 (F: GACTGTGGTTACCGTCATGGC; R: ACTTGGTTTTTCATAACAGCGGA),

OCN (F: CTGACAAAGCCTTCATGTCCAA; R: GCGCCGGAGTCTGTTCCTA),

P65 (F: GAGTCGCGCACCTGCTCTCG; R: TCGCCAGAGGCGGAAATGCG),

IKK α (F: GTGAACATCCTCTGACATGTGTGGT; R: GCAACACAAGGAGGCTGGGCT),

Sod2 (F: CAGACCTGCCTTACGACTATGG; R: CTCGGTGGCGTTGAGATTGTT),

Cat (F: AGCGACCAGATGAAGCAGTG; R: TCCGCTCTCTGTCAAAGTGTG)

2.6 TNF- α 体内注射

- 1) 将 8 只 3 月龄小鼠随机平均分为两组
- 2) TNF- α 处理组通过鼠尾静脉注射 1 μ g (溶于 250 μ l PBS) 重组小鼠 TNF- α ; 对照组仅注射 250 μ l PBS;
- 3) 每隔 1 天注射 1 次，持续 4 次;
- 4) 最后一次注射后 2 h, 处死小鼠后收集股骨进行后续检测

2.7 TNF- α 中和实验

- 1) 体外中和血清中 TNF- α : 将 100 μ g/mL TNF- α 中和抗体加入含 OVX 及 SHAM 小

鼠血清的培养液，以中和血清中的 TNF- α ；等量普通小鼠 IgG 被作为阴性对照。

- 2) 体内中和血液中 TNF- α ：小鼠 OVX 术后 8 w，采用 100 μ g/kg TNF- α 中和抗体经尾静脉注射，每周 2 次，连续注射 4 w 后取材。

2.8 FOXO1 过表达慢病毒载体构建

- 1) 根据 Genbank 获得小鼠 FOXO1 基因序列，设计引物采用 Forward: CTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCTGATGGCCGAAGCGCCCCAG; reverse: CATGGTGGCGACCGGTGGATCCCGGCCTGACACCCAGCTGTGTGTT.
- 2) 采用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) 克隆野生型小鼠 Foxo1 基因：按说明书标准操作，简述如下：
- 3) 1st-Strand cDNA 合成反应：

模板引物混合液配置

Reagent	Volume (μ L)
Anchored-oligo(dT) ₁₈ Primer	1 μ L
Total RNA	4 μ g
RNAase Free dH2O	up to 11.4 μ l

65 $^{\circ}$ C 下变性 10 min，冰上冷却

反转录液配置

Reagent	Volume (μ L)
Reverse Transcriptase Reaction Buffer	4.0 μ L
Protector Rnase Inhibitor	0.5 μ L
Deoxynucleotide Mix	2.0 μ L
DTT	1 μ L
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1.1 μ L
模板引物混合液	11.4 μ L
RNAase Free dH2O	Up to 20 μ L

反应条件： 55 $^{\circ}$ C，30 min；85 $^{\circ}$ C，5 min。

PCR 反应：

PCR 反应液配置

Reagent	Volume (μ L)
Template	1
primer-F	0.5
primer-R	0.5
dNTP	2
2 \times GC buffer	12.5
PrimerSTAR	0.25
ddH2O	8.25
Total	25 μ L

反应条件：98℃，10 sec；58℃，5 sec；72℃，1kb/min： 30 cycles

4) 重组反应：

重组反应液配置	
ddH2O	Up to 20 μ l
5 \times CE II Buffer	4 μ l
线性化克隆载体(190 ng)	0.6 μ l
插入片段扩增产物(80ng)	7 μ l
Exnase® II	2 μ l

37℃反应 30 min。待反应完成后，立即将反应管置于冰水浴中冷却 5 min

5) 反应产物转化、涂板：20 μ l 冷却反应液加入 100 μ l 感受态细胞中，混匀后冰浴 30 min。42℃热激 45~90 秒，冰浴 2 min。加入 900 μ l LB 培养基，37℃孵育 10 min；37℃摇菌 45 min；4000rpm/min 离心 4min，弃去 900 μ l 上清，重悬菌液，取 30 μ l 涂布平板，37℃过夜培养。

6) 克隆鉴定

7) 提取质粒酶切鉴定后，送至生工生物（上海）测序，验证 FoxO1 片段是否成功插入；

8) 慢病毒质粒的构建：

反应液配置	
反应组成	体积(μ l)
Pentr2B (150ng/ μ l)	1
pLenti6/V5- DEST (150ng/ μ l)	1
TE buffer(pH8.0)	6
LR Clonase™II enzyme mix	2

25℃反应 1h，加入 1 μ l Proteinase K solution 37℃孵育 10min；取 2 μ l 反应液转化 E.coli DH-5 α ；挑菌，37℃摇床培养 16h，提取质粒；

9) 包装病毒：使用 Lipofectamine 2000 转移载体与两个包装质粒(psPAX2 和 pMD2.G) 共同转染入 293T 细胞；24hr 后收集病毒液；

10) 病毒转染：采用磷酸钙转染试剂盒，将慢病毒转染入 BMSC；转染 8hr 后，更换正常培养液，48hr 后进行后续实验。

2.9 统计

计量数据以均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。两组数据之间比较采用 student's t-test；多组数据间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。P < 0.05 被认为具有显著性差异。

3 结果

3.1 OVX BMSC 中抗氧化防御缺陷导致氧化应激

为了验证 ROS 在骨质疏松 BMSCs 分化异常中的作用, 首先明确 OVX BMSCs 内的 ROS 水平是否升高。通过利用 DCFH-DA 反映 ROS 的含量, 流式检测发现 OVX 小鼠骨髓细胞内的 ROS 水平高于 SHAM 小鼠骨髓细胞 ($P<0.05$) (图 3-1A)。为了检测 BMSCs 中 ROS 水平是否也升高, 利用 Sca-1 和 CD45 荧光抗体对骨髓细胞进行标记。因为 Sca-1 是 BMSCs 的特异性表面标记, 而 CD45 是造血系统细胞的特异性标记, 所以可认为 Sca-1⁺CD45⁻的细胞群体是 BMSCs。流式检测显示: 而 OVX 小鼠骨髓内 BMSCs 细胞的 ROS 水平也同样高于 sham 组 60% ($P<0.05$) (图 3-1B)。我们也通过荧光显微镜观察和 FCM 检测了体外纯化扩增获得的 OVX 及 SHAM BMSCs 中 ROS 含量, 结果与体内检测相一致 (图 3-1C, D)。

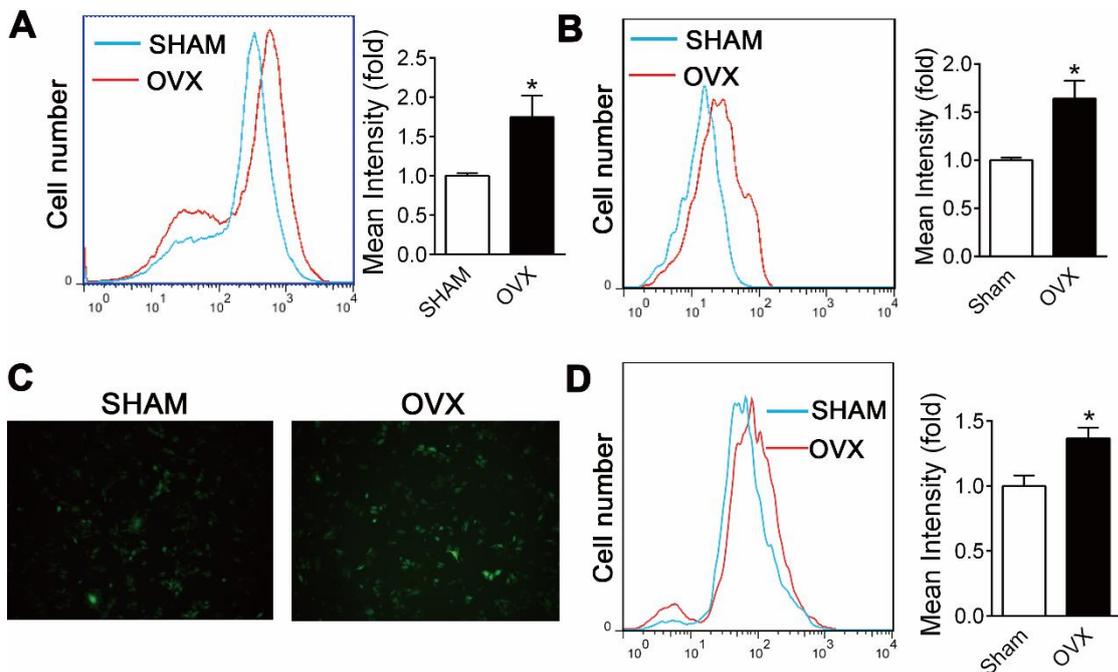


图 3-1 骨质疏松后 BMSCs 中 ROS 水平升高

(A)流式检测 SHAM 和 OVX 小鼠股骨骨髓细胞中 ROS 含量; (B) 流式检测 SHAM 和 OVX 股骨中 Sca-1⁺CD45⁻骨髓细胞中 ROS 含量; (C)荧光显微镜检测体外培养的 SHAM 及 OVX BMSCs 中 ROS 含量; (D) 流式检测体外培养的 SHAM 及 OVX BMSCs 中 ROS 含量; n=3; * $P<0.05$ 。

为了明确升高的 ROS 是否导致 BMSCs 成骨分化异常, 我们使用抗氧化剂 NAC 清除 BMSCs 内过多的 ROS (图 3-2A)。体外成骨分化实验发现, NAC 处理可有效恢复 OVX BMSCs 的成骨分化能力 ($P<0.001$) (图 3-2B), 证实 OVX BMSCs 中氧化应激持续升高是抑制其成骨分化的重要原因。

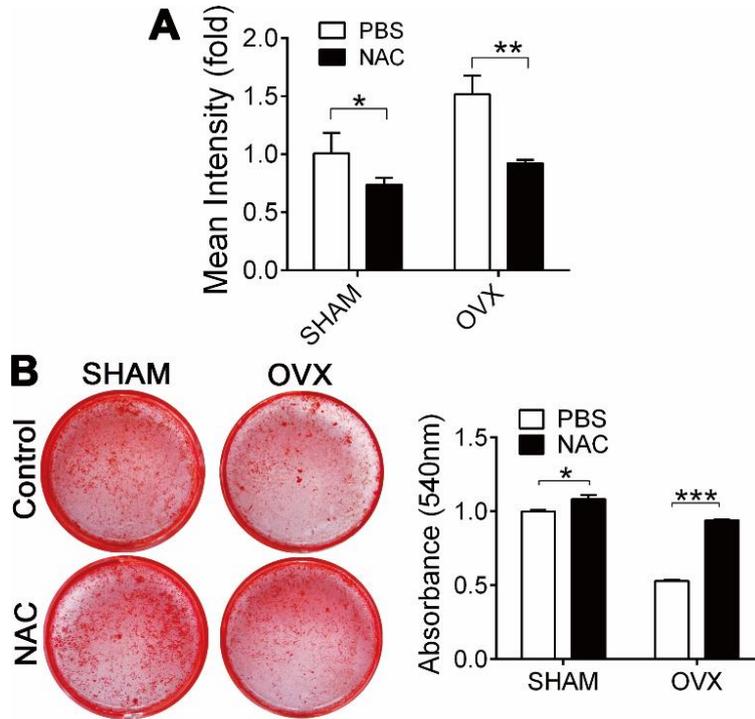


图 3-2 抗氧化剂 NAC 处理可改善 OVX BMSCs 成骨分化

(A) FCM 检测 10mM NAC 处理 2h 后 SHAM 及 OVX 中 ROS 水平; (B) SHAM 及 OVX BMSCs 在成骨诱导过程中同时加入 10mM NAC, 14d 后行茜素红染色。n=3; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

氧化应激水平由 ROS 产生和清除间的平衡决定。已有研究提出骨质疏松中抗氧化防御功能存在缺陷。为了明确 OVX BMSCs 抗氧化防御是否正常, 我们在 SHAM 和 OVX BMSCs 中加入 H_2O_2 以增加细胞内 ROS。荧光显微镜观察和 FCM 检测均显示 OVX BMSCs 加入外源性 H_2O_2 后, 其 ROS 含量仍明显高于 SHAM BMSCs (图 3-3), 提示 OVX BMSCs 清除外源性 ROS 的能力有所下降。

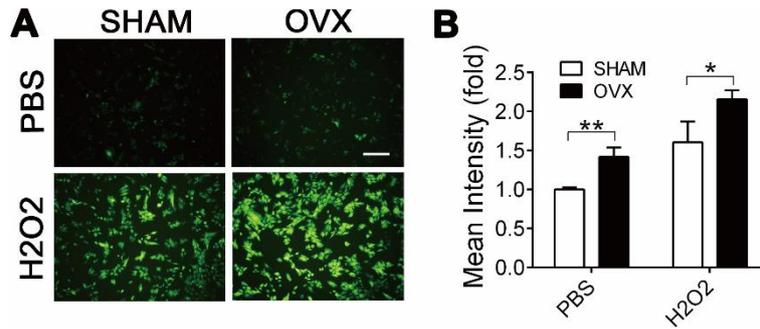


图 3-3 OVX BMSCs 抗氧化能力降低

SHAM 及 OVX BMSCs 中加入 100 μ M H₂O₂ 处理 2h 后, 通过荧光显微镜 (A) 和 FCM (B) 检测 ROS 水平。Scale bar, 20 μ m。n=3; * P <0.05, ** P <0.01。

同时, 我们对 SOD2 和 CAT 这两个重要的抗氧化酶的表达进行检测, 发现骨质疏松后骨组织及 BMSCs 中 SOD2 和 CAT 表达均下降明显 (P <0.05) (图 3-5)。上述结果说明骨质疏松 BMSCs 中抗氧化防御存在缺陷。

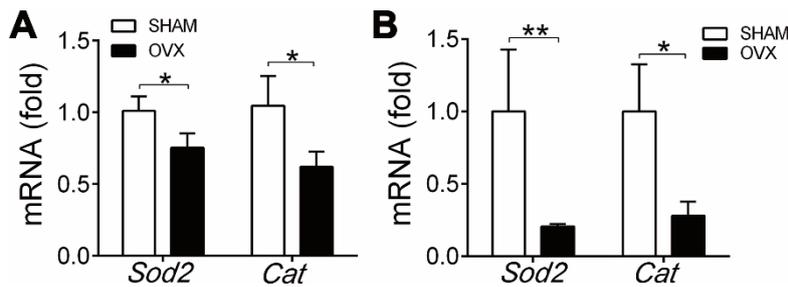


图 3-5 骨质疏松后骨组织和 BMSCs 中 SOD2 和 CAT 表达下降

Realtime RT-PCR 检测 SHAM 及 OVX 小鼠来源股骨组织 (A) 及 BMSCs (B) 中 Sod2 和 Cat 的表达。n=3; * P <0.05, ** P <0.01。

为了探索 OVX BMSCs 抗氧化防御下降是否与其成骨分化异常相关, 我们在 SHAM 及 OVX BMSCs 成骨诱导过程中加入外源性 H₂O₂。茜素红染色和 Realtime RT-PCR 检测显示过量的 ROS 显著抑制 SHAM 及 OVX BMSCs 的成骨分化; 值得注意的是, H₂O₂ 处理后 SHAM BMSCs 的钙化结节含量减少约 45% (P <0.05), 成骨基因表达下降 40% 左右 (P <0.05); 但是 H₂O₂ 处理却造成 OVX BMSCs 钙化结节形成减少超过 65% (P <0.01), 成骨基因表达下降超过 70% (P <0.01) (图 3-6A, B), 说明 OVX BMSCs 更易于遭受 ROS 损伤。

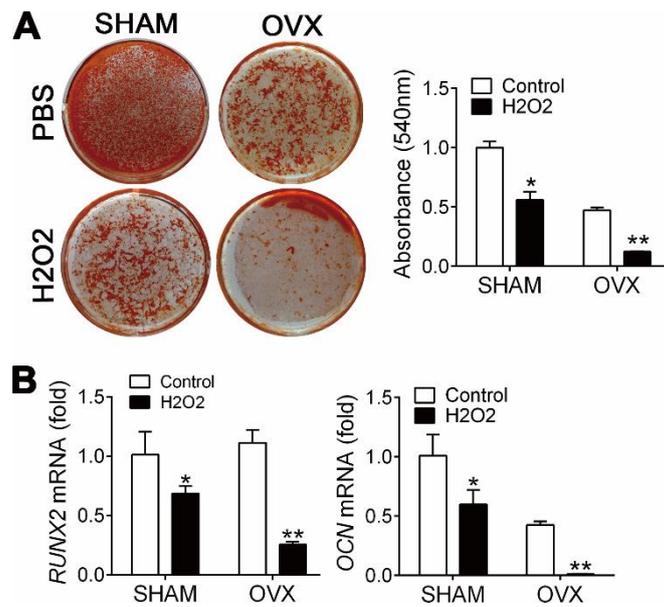


图 3-6 外源性 H₂O₂ 对于 OVX BMSCs 成骨分化的抑制作用大于 SHAM BMSCs。SHAM 及 OVX BMSCs 成骨诱导过程中加入 100 μ M H₂O₂ 处理，14d 后行茜素红染色 (A) 及 Realtime RT-PCR 检测 (B)。n=3; **P*<0.05, ** *P*<0.01。

3.2 TNF- α 通过抑制抗氧化防御导致 BMSCs 氧化应激

接下来我们研究是否 TNF- α 导致了 BMSCs 中 ROS 水平升高。首先，我们分离了 SHAM 及 OVX 小鼠血清用于 BMSCs 培养，发现 OVX 血清培养的 BMSCs 内 ROS 含量高于 SHAM 血清培养，而利用特异性的 TNF- α 抗体中和 OVX 血清中的 TNF- α 之后，则不再导致 BMSCs 中 ROS 水平升高 (图 3-7)。

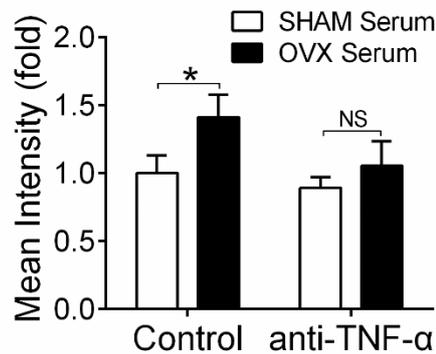


图 3-7 中和 SHAM 和 OVX 小鼠血清中 TNF- α 后 BMSCs 中 ROS 水平检测。n=4; **P*<0.05, NS, no significance。

接下来，我们检测 TNF- α 体外刺激后 BMSCs 中 ROS 的水平。FCM 检测证实 TNF- α 体外刺激能够增加 BMSCs 内 ROS 含量，并呈剂量依赖性（图 3-8A）；为了明确 TNF- α 是否通过抑制抗氧化防御导致氧化应激，我们对细胞内 SOD2 及 CAT 表达进行检测，发现 TNF- α 能够抑制 Sod2 和 Cat 的基因表达（ $P < 0.05$ ）（图 3-8B）。

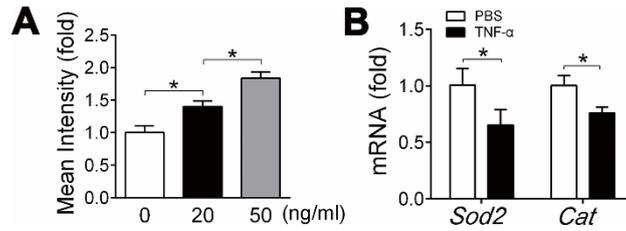


图 3-8 TNF- α 体外抑制 BMSCs 抗氧化防御

(A) FCM 检测 0、20、50ng/ml TNF- α 处理 12hr 后 BMSCs 中 ROS 水平；(B) Realtime RT-PCR 检测 20ng/ml TNF- α 处理 12hr 后 Sod2 和 Cat 的表达。n=3；* $P < 0.05$ 。

为了进一步体内证实 TNF- α 导致 BMSCs 氧化应激，我们体内注射 TNF- α 后检测骨髓中 BMSCs 内 ROS 水平。FCM 结果显示 TNF- α 注射导致骨髓细胞 ROS 水平升高 45%（ $P < 0.05$ ）（图 3-9A），Sca1⁺CD45⁻ BMSCs 中 ROS 水平升高 20%（ $P < 0.05$ ）（图 3-9B）。同时，TNF- α 注射显著降低股骨中 Sod2（ $P < 0.001$ ）和 Cat（ $P < 0.01$ ）的表达（图 3-9C）。上述结果与 TNF- α 体外实验结果相一致，说明 TNF- α 通过抑制抗氧化防御导致 BMSCs 中氧化应激。

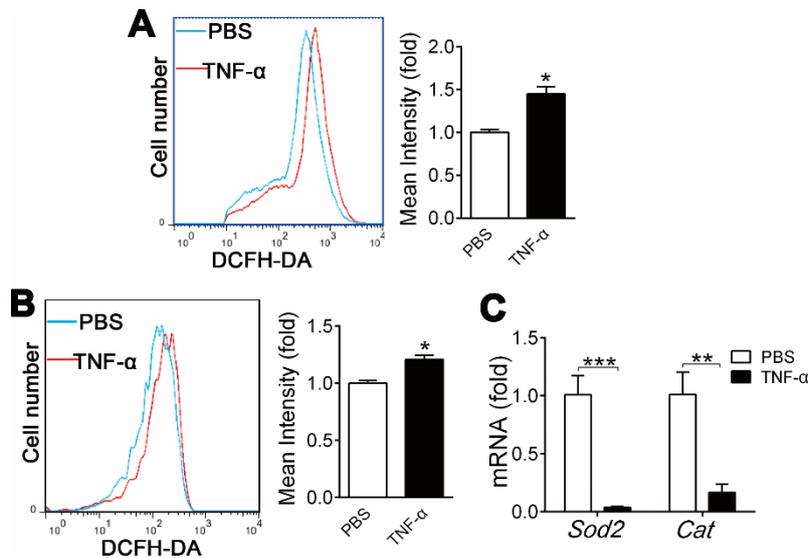


图 3-9 TNF- α 体内抑制 BMSCs 的抗氧化防御导致氧化应激

1 μ g TNF- α 静脉注射 1 w 后, FCM 检测骨髓细胞 (A), Sca-1+CD45- BMSCs(B)中 ROS 水平, Realtime RT-PCR 检测股骨组织内 Sod2 和 Cat 表达。n=3; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001。

为了明确 TNF- α 是否通过抑制抗氧化防御影响 BMSCs 成骨分化,我们在 BMSCs 体外成骨诱导过程中同时加入 H₂O₂ 和 TNF- α 刺激,茜素红染色和 Realtime RT-PCR 检测发现 TNF- α 能够显著增强 H₂O₂ 对于 BMSCs 成骨分化的抑制作用 (图 3-10A, B)。

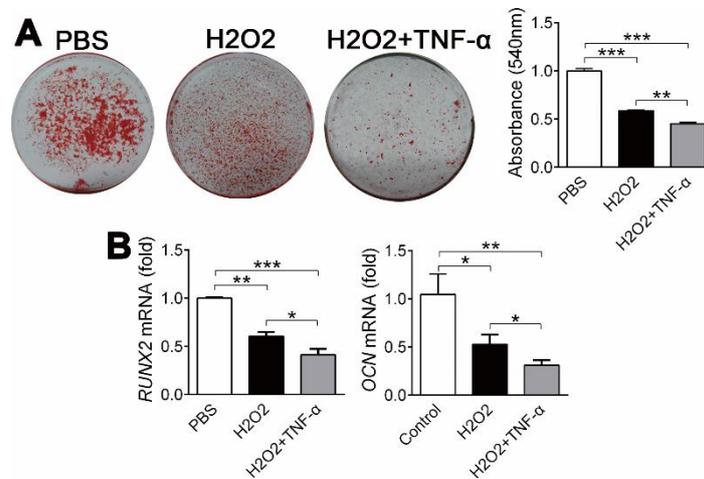


图 3-10 TNF- α 加重 ROS 对 BMSCs 成骨分化的抑制

BMSCs 成骨诱导过程中同时加入 100 μ M H₂O₂ 和 20ng/ml TNF- α 处理, 14d 后行茜素红染色 (A) 及 Realtime RT-PCR 检测 (B)。n=3; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001。

我们还利用 NAC 抑制 TNF- α 导致的氧化应激, 发现其可以有效拮抗 TNF- α 对 BMSCs 成骨分化的抑制作用 (图 3-11A, B)。综合上述结果, 说明 TNF- α 可通过抑制 BMSCs 的抗氧化防御导致氧化应激, 从而抑制其成骨分化。

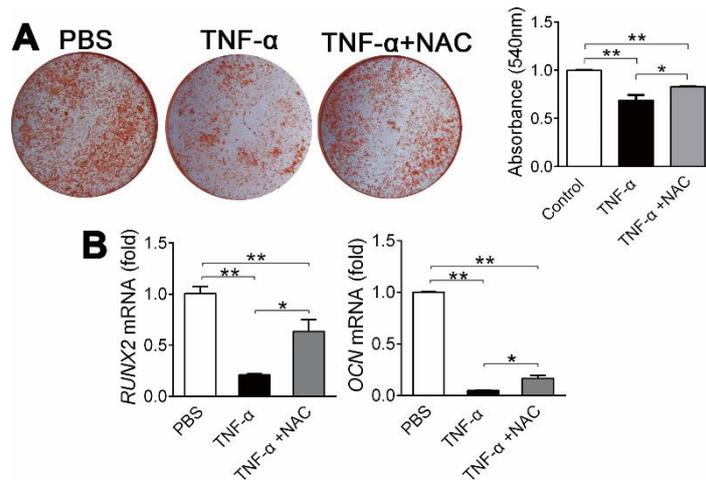


图 3-11 TNF- α 通过上调 ROS 抑制 BMSC 成骨分化

BMSCs 成骨诱导过程中加入 20ng/ml TNF- α 和 NAC 处理, 14d 后行茜素红染色 (A) 及 Realtime RT-PCR 检测 (B)。n=3; * P <0.05, ** P <0.01。

3.3 TNF- α 通过下调 FOXO1 抑制抗氧化防御

接下来, 我们探索 TNF- α 抑制 BMSCs 抗氧化防御的机制。近年来通过模式动物研究发现 FOXO1 在干细胞及成骨细胞中发挥抗氧化的功能, FOXO1 基因敲除可导致氧化应激损伤及骨量下降。最新研究显示, TNF- α 能够抑制 FOXO1 的表达和活化, 提示 TNF- α 可能通过抑制 FOXO1 导致 BMSCs 的氧化应激。

所以我们首先检测 FOXO1 的表达是否在骨质疏松后是否改变。免疫组化检测显示 FOXO1 在 OVX 小鼠骨髓腔内的表达有所下降, 其中骨小梁周围成骨系细胞中的表达显著降低。

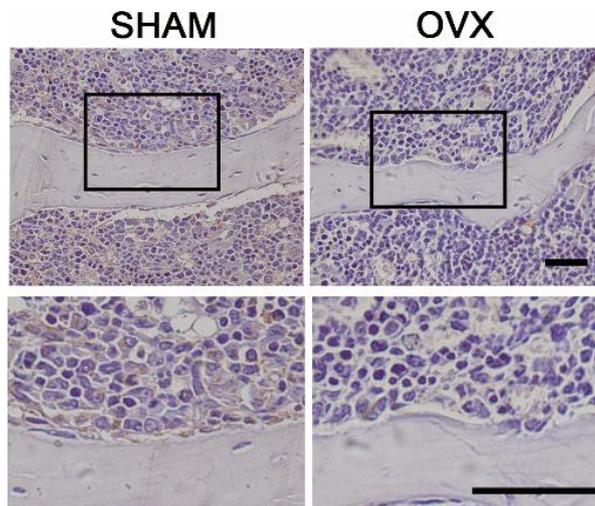


图 3-12 免疫组化检测 FOXO1 在 SHAM 及 OVX 小鼠股骨中的表达。Scale bar, 100 μ m。

为了进一步明确骨质疏松后 BMSCs 中 FOXO1 的表达变化, 我们检测体外培养 BMSCs 中 FOXO1 的蛋白水平。发现 OVX BMSCs 中 FOXO1 表达显著低于 SHAM BMSCs (图 3-13A), 与体内结果相一致。因为 FOXO1 在核内及胞浆中的分布决定了其功能, 我们利用免疫细胞荧光检测观察了 BMSCs 中 FOXO1 的分布, 发现 OVX BMSCs 的胞浆和胞核内 FOXO1 的表达均下降 (图 3-13B)。

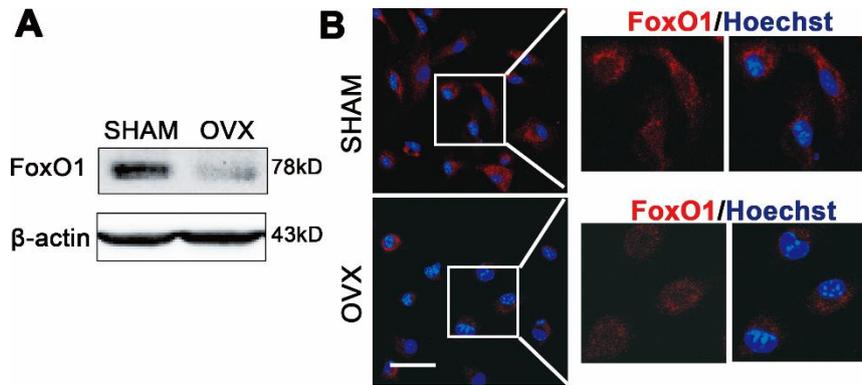


图 3-13 FOXO1 在骨质疏松 BMSCs 中表达下降

(A) Western blot 检测 SHAM 及 OVX BMSCs 中 FOXO1 的蛋白表达; (B) 免疫细胞荧光检测 SHAM 及 OVX BMSCs 中 FOXO1 的表达及分布。Scale bar, 20 μ m。

因为 FOXO 家族包含多个成员, 其中 FOXO3 也被报道与成骨细胞抗氧化应激相关。所以我们对 FOXO3 进行检测, 发现其在 SHAM 及 OVX BMSCs 中表达无明显差异 (图 3-14)。从而排除 FOXO3 导致 OVX BMSCs 抗氧化异常的可能。

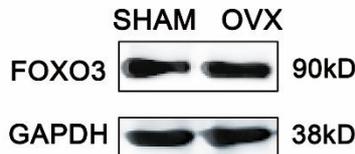


图 3-14 Western blot 检测 SHAM 及 OVX BMSCs 中 FOXO3 的表达

为了验证 FOXO1 是否在 BMSCs 中调控抗氧化酶系统, 我们采取了获得/缺失性功能试验。首先验证了 FOXO1 siRNA 可有效下调 FOXO1 的蛋白表达 (图 3-15A)。通过 siRNA 干扰技术抑制 FOXO1 后, BMSCs 内 SOD2 和 CAT 表达均下降 ($P < 0.01$)

(图 3-15B), ROS 水平升高 ($P<0.05$) (图 3-15C)。为了确定 FOXO1 是否能够在 BMSCs 成骨分化中抵抗氧化损伤, 我们对敲低 FOXO1 的 BMSC 进行成骨诱导同时进行外源性 H₂O₂ 处理, 14 d 后茜素红染色及 Realtime RT-PCR 检测显示抑制 FOXO1 显著降低 H₂O₂ 刺激后 BMSCs 的成骨分化 (图 3-15D)。

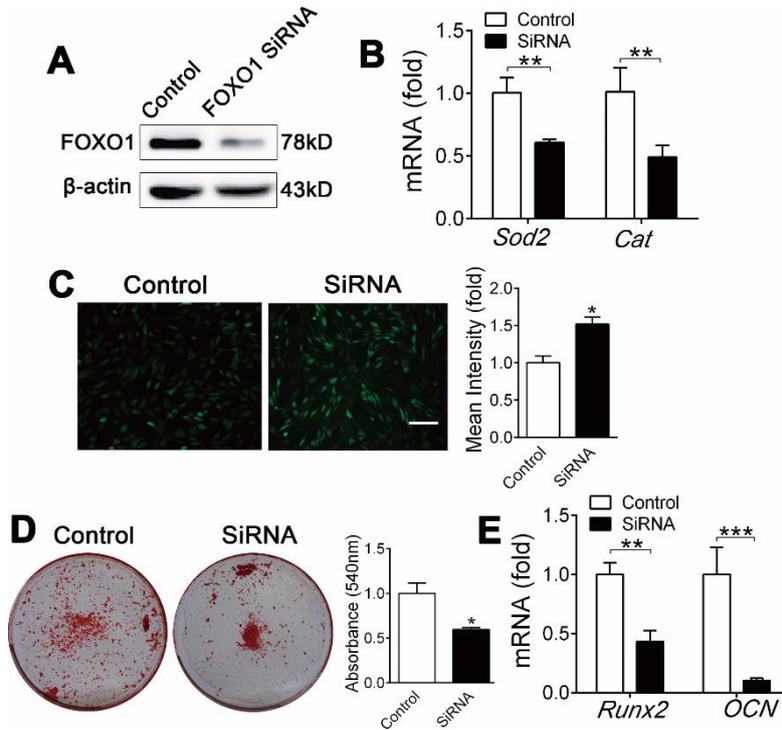


图 3-15 抑制 FOXO1 影响 BMSC 的 ROS 水平及成骨分化

(A-C) 转染 FOXO1 siRNA 和 control siRNA 48hr 后, 检测 BMSCs 中 FOXO1 的蛋白表达 (A)、Sod2 和 CAT 基因表达 (B) 以及 ROS 水平 (C)。(D, E) BMSCs 转染 FOXO1 siRNA 和 control siRNA 后进行成骨诱导, 14d 后行茜素红染色 (D) 及 Realtime RT-PCR 检测 (E)。Scale bar, 50 μ m; n=3; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

同时, 我们构建了 FOXO1 过表达慢病毒载体进行获得性功能实验。首先 Western blot 检测证实过表达慢病毒可明显提高 BMSCs 中 FOXO1 的表达 (图 3-16A)。相应的, 通过过表达慢病毒转染, 发现过表达 FOXO1 可明显升高 SOD2 ($P<0.05$) 和 CAT 表达 ($P<0.001$) (图 3-16C) 并降低 ROS 水平 ($P<0.05$) (图 3-16B)。成骨实验也证实了过表达慢病毒可显著提高 OVX BMSCs 的成骨分化能力 (图 3-16D)。结合缺失性实验和获得性实验结果, 说明 FOXO1 是通过促进抗氧化防御在 BMSCs 的成骨分化中发挥关键作用。

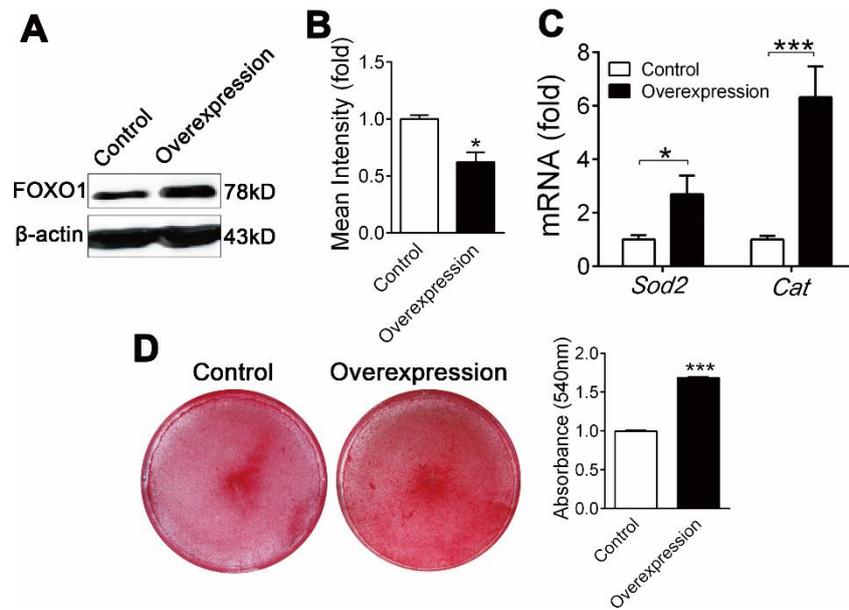


图 3-16 过表达 FOXO1 回复骨质疏松 BMSC 的 ROS 水平及成骨分化

(A-C) 转染 FOXO1 过表达慢病毒 48hr 后, 检测 BMSCs 中 FOXO1 的蛋白表达 (A)、Sod2 和 CAT 基因表达 (B) 以及 ROS 水平 (C)。(D, E) BMSCs 转染 FOXO1 过表达慢病毒后进行成骨诱导, 14d 后行茜素红染色 (D) 及 Realtime RT-PCR 检测 (E)。n=3; * P <0.05, *** P <0.001。

为了明确 TNF- α 是否通过 FOXO1 抑制抗氧化酶表达, 首先对 TNF- α 体内处理后 FOXO1 蛋白水平进行检测。免疫组化显示体内 TNF- α 注射抑制股骨松质骨表面细胞中 FOXO1 的表达 (图 3-17A), 而注射 TNF- α 抗体可明显提高 OVX 小鼠松质骨表面 FOXO1 的表达 (图 3-17B)。

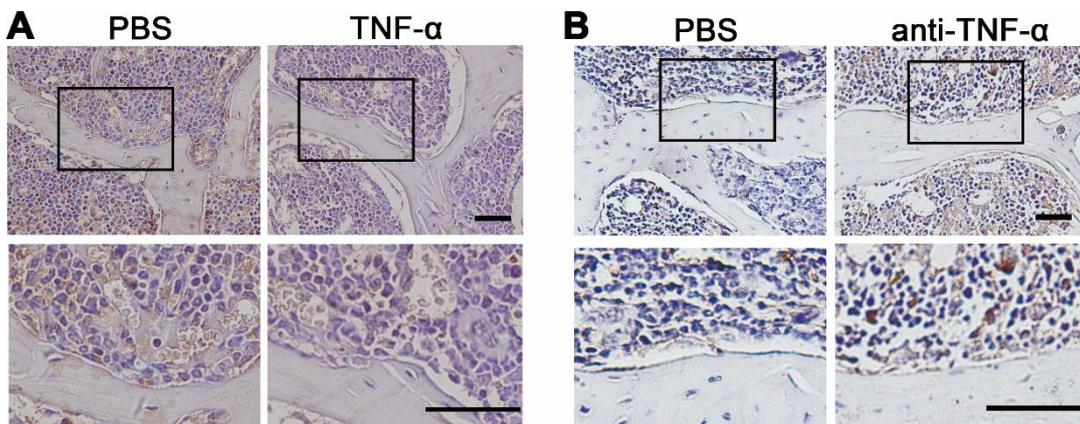


图 3-17 TNF- α 体内抑制 FOXO1 表达

(A)小鼠经静脉注射 1 μ g TNF- α 1w 后, 行免疫组化检测 FOXO1 在股骨中的表达; (B) OVX 小

鼠注射 TNF- α 中和抗体 1mon 后，免疫组化检测 FOXO1 在股骨中的表达。Scale bar, 100 μ m。

其次，TNF- α 体外刺激 12 hr 后，BMSCs 中 FOXO1 水平明显下降，并且该抑制作用随浓度升高和时间延长而加大，呈现显著的浓度和时间依赖性（图 3-18A, B）。

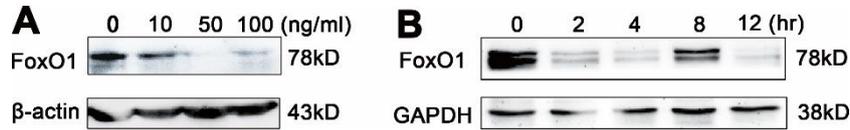


图 3-18 TNF- α 体外抑制 FOXO1 的表达

(A) Western blot 检测不同浓度 TNF- α 刺激 12hr 后 BMSCs 中 FOXO1 蛋白表达；(B) 20ng/ml TNF- α 处理不同时间后，Western blot 检测 FOXO1 的表达。

同时，Western blot 和免疫细胞荧光检测显示，TNF- α 体外处理 12 hr 后可同时抑制胞浆和胞核内 FOXO1 蛋白水平（图 3-19A, B），说明 TNF- α 主要影响 FOXO1 蛋白的整体水平而非亚细胞定位。

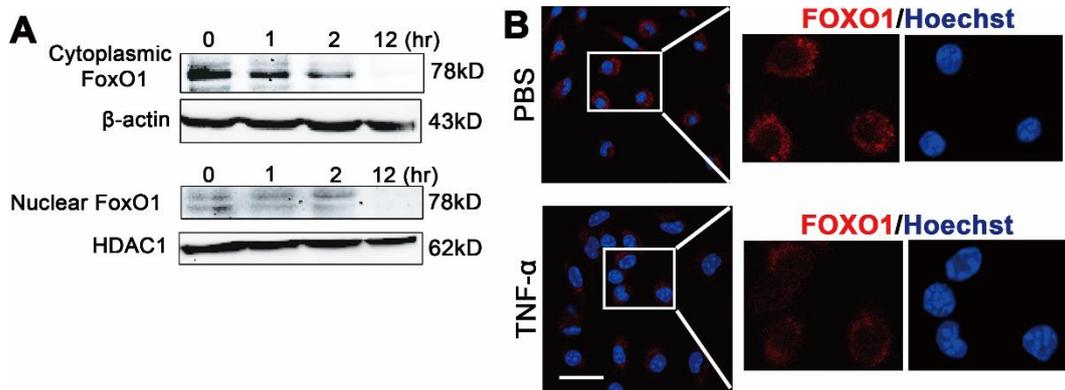


图 3-19 TNF- α 同时抑制胞浆内和核内 FOXO1 表达

(A) Western blot 检测 20ng/ml TNF- α 刺激不同时间后，胞浆和胞核中 FOXO1 的表达；(B) 免疫细胞荧光检测 20ng/ml TNF- α 刺激 12hr 后 FOXO1 的表达。Scale bar, 20 μ m。

4 讨论

已有研究发现 TNF- α 与 ROS 直接存在密切联系。一方面，ROS 能够促进 T 细胞、基质细胞、巨噬细胞等分泌 TNF- α ，并且促进 TNF- α 诱导的细胞凋亡等破坏作用。另一方面，TNF- α 等炎症因子也能够导致或促进 OS。过去研究认为这种作用主要是通过诱导大量免疫细胞的迁移和聚集，导致局部组织内呼吸爆炸间接引起。近

期的研究指出, TNF- α 还能够直接作用于细胞, 增加内源性 ROS 的产生。已知 TNF- α 可通过多条途径增加 ROS 的产生。首先, TNF- α 可通过下游信号直接影响线粒体功能, 刺激 ROS 产生^[97]; 其次, TNF- α 可提高多个 NADPH 氧化酶组成成员的表达, 或者引起 NADPH 氧化酶的活化^[97,98]。但是 TNF- α 是否作用于抗氧化防御体系尚无报道。在本研究中, 我们发现 TNF- α 还能够抑制抗氧化防御系统。TNF- α 通过抑制 FOXO1 的功能, 下调 *Cat* 和 *Sod2* 的表达, 这些证据表明, TNF- α 在 BMSCs 和骨的氧化损伤中发挥了重要作用。因此本研究首次提出了 TNF- α 通过抑制 FOXO1 介导的抗氧化机制而导致细胞损伤, 加深了对于 TNF- α 致病机制的认识。因为 TNF- α 的升高已在多种退行性疾病中被观察到^[99], 所以有必要进一步研究 TNF- α 是否在其他疾病中也抑制抗氧化防御而导致氧化损伤。

生理情况下, 细胞内 ROS 稳态维持依赖于 ROS 产生和清除的平衡^[100]。在绝经后骨质疏松中观察到抗氧化防御机制出现缺陷^[101,102]。但是其机制尚不清楚。本研究中, 我们发现 FOXO1 作为骨骼及干细胞氧化防御中的关键调节因子, 其蛋白表达水平在绝经后骨质疏松 BMSCs 中显著下降。其表达降低导致了 *Cat* 和 *Sod2* 的表达下降, 造成了抗氧化防御的缺陷。因为过量的 ROS 会抑制 BMSC 介导的骨形成, 我们的研究指出 FoxO1 可能在绝经后骨质疏松发病机制中扮演了核心作用。同时, 通过过表达 FoxO1 可有效恢复 OVX BMSCs 的成骨分化能力, 提示 Foxo1 可能成为骨质疏松预防与治疗的一个重要靶点。

Foxo1 被认为在骨发育和改建中发挥了重要作用。但是近期几项基于条件下基因敲除小鼠模型的研究却得到了令人困惑的结果。Rached 研究团队在 Col 2.3⁺ 的成骨细胞中特异性敲除 Foxo1, 发现小鼠骨量下降, 提出 Foxo1 可通过调控成骨细胞增殖和抗氧化工作促进骨形成^[103]。但是, Lyer 等人在表达 *Osx1* 的成骨前体细胞中敲除 Foxo1, 却发现 Wnt 信号通路被激活从而促进骨形成^[104]。在本实验中, 我们证明 Foxo1 的下降导致了 BMSCs 的氧化损伤并抑制其成骨分化, 说明 Foxo1 在 BMSCs 的分化过程中起到必不可少的作用。这些实验说明, Foxo1 很可能在成骨细胞分化的不同阶段发挥不同的调控作用, 但其中的分子机制仍需进一步探索。

已有研究发现 TNF- α 可通过两条途径调控 Foxo1 的功能。第一, 通过调控 Foxo1 蛋白的磷酸化。例如 TNF- α 可拮抗 Akt 依赖性的 Foxo1 磷酸化, 从而促进 Foxo1 的

核内转运^[105,106]；第二，通过调控 Foxo1 基因转录。TNF- α 可提高肌细胞^[107]和软骨细胞^[108]内 Foxo1 的表达，而抑制肺动脉平滑肌细胞 Foxo1 的表达^[109]。本实验中，我们提出了一条新的 TNF- α 调控 Foxo1 的途径：miRNA 介导的转录后调控。这些发现说明了 TNF- α 信号在 Foxo1 功能调节中的复杂性。现在尚不清楚为何在不同细胞中，TNF- α 通过不同的下游信号途径调控 FOXO1，并发挥不同的作用。需要进一步的研究不同细胞内 TNF- α 下游信号分子的表达进行比较研究，从而明确其分子机制。

BMSCs 的谱系分化受到复杂的分子网络调控。过去研究主要集中于转录因子和其上游信号通路研究^[110]。这些研究证明，激活关键转录因子是启动 BMSCs 分化程序的关键^[111]。在本实验中，我们发现 ROS 可以调控 BMSCs 的谱系分化。一方面，ROS 激活 BMSCs 中 NF- κ B 信号通路，而 NF- κ B 通路可调节骨形成中关键性转录因子 Fra-1^[76]。另一方面，ROS 也可导致 DNA、脂质和蛋白的随机性损伤而扰乱细胞稳态平衡^[112]。为阐明 ROS 的作用机制，有必要深入研究 ROS 的作用是否依赖于影响转录因子的功能。

第四部分 TNF- α 通过-miR-705 介导的正反馈回路持续性导致氧化应激

第三部分研究我们证实了 TNF- α 可以通过导致 BMSCs 内氧化应激，而间接的抑制成骨分化。并发现 TNF- α 是通过抑制 FOXO1，破坏细胞内抗氧化防御机制。通过过表达 FOXO1 可以恢复 OVX BMSCs 的抗氧化能力及成骨分化。上述研究均提示 FOXO1 是 TNF- α 作用的一个核心靶点。所以，研究 TNF- α 调控 FOXO1 的分子机制对于深入理解骨质疏松的发病机制至关重要。

FOXO1 作为能量代谢的关键信号分子和抗氧化的重要调控因子，受到复杂的信号网络的调控。已有研究证明，FOXO1 的功能主要受磷酸化修饰和乙酰化修饰调控，通过影响其入核和出核协调其细胞内定位和功能。但是我们实验结果显示 TNF- α 并不影响 FOXO1 的细胞定位，而是降低其蛋白表达水平。最新研究显示，FOXO1 的表达受到转录后调控，多个 miRNA 已被证实能够结合于 FOXO1 mRNA 3'UTR，抑制其表达。因为第二部分已证实 TNF- α 可导致多个 miRNA 的表达异常，所以在本部分实验中，我们将重点探讨 TNF- α 是否通过 miRNA 介导的转录后调控抑制 FOXO1 表达。

1 材料

1.1 仪器和设备

- | | |
|----------------|-------------|
| 1.1.1 定量 PCR 仪 | Bio-Rad, 美国 |
| 1.1.2 PCR 仪 | Thermo, 美国 |
| 1.1.3 酶标仪 | Bio-tek, 美国 |
| 1.1.4 microCT | Siemens, 德国 |
| 1.1.5 流式细胞仪 | Beckman, 美国 |
| 1.1.6 倒置显微镜 | Olympus, 日本 |
| 1.1.7 电泳仪 | Bio-Rad, 美国 |
| 1.1.8 凝胶成像分析系统 | 天能, 上海 |

1.1.9 激光共聚焦显微镜	Olympus, 日本
1.2 主要试剂	
1.3.1 RNA 反转录试剂盒	Takara, 日本
1.3.2 Realtime PCR 检测试剂盒	Takara, 日本
1.3.3 Trizol	Invitrogen, 美国
1.3.4 SYBR Premix Ex Taq II kit	TaKaRa, 日本
1.3.5 miRNA 引物套装	锐博, 广州
1.3.6 Foxo1 siRNA	锐博, 广州
1.3.7 miR-705 mimics	锐博, 广州
1.3.8 miR-705 inhibitor RiboBio.	锐博, 广州
1.3.9 anti-FoxO1	Cell Signaling, 美国
1.3.10 DCFH-DA 检测试剂盒	GENMED, 美国
1.3.11 pLVX-EF1 α -DsRed-monomer-N1 vector	Clontech, 美国
1.3.12 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche, 瑞士
1.3.13 Calcium Phosphate Transfection System	Promega, Madison, 美国
1.3.14 Chromatin Immunoprecipitation Kit	Millipore, 美国

2 方法

2.1 miR-705 结合靶基因预测

- 1) 通过 miRNA 靶基因预测数据库对 miR-705 可能结合的 mRNA
(PicTar: <http://pictar.mdc-berlin.de/>;
microRNA: <http://www.microrna.org/microrna/home.do>;
RNA22: <http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html>;
DIANAMT: <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/microT.php>)
- 2) 挑选出至少 3 个数据库共同预测的靶基因;
- 3) 根据靶基因的已知功能, 挑选出与 BMSCs 分化功能密切相关的候选靶基因。

2.2 MiR-705 Antagomir 骨髓腔内注射

- 1) 小鼠接受 OVX 术后 4 周，1% 戊巴比妥钠麻醉；
- 2) 后切开左侧膝关节腔，暴露股骨远端关节面；
- 3) 治疗组以微量注射器刺入骨髓腔内 5mm，缓慢注射 1ng miR-705 antagomir（溶于 20ul PBS 中）；对照组仅注射等量的 PBS；
- 4) 骨蜡封闭注射孔，分层缝合；
- 5) 每周 1 次，共注射 3 次；
- 6) 处死后常规分离股骨，用于后续检测。

2.3 荧光素酶报告实验

荧光素酶报告实验方法同第二部分。克隆 Foxo1 3'UTR 结合位点片段所用引物为： Forward: 5'- ACCTGAAATCCTGCCAGACCA-3'; Reverse: 5'- ACTGTGCCCCAGACAACACTGC-3'。

2.4 miR-705 启动子中 p65 结合位点预测

- 1) 通过 miRBase 和 NCBI 网站查找 miR-705 染色体定位，发现 miR-705 基因位于 Rab11fip5 基因内；
- 2) 利用 NCBI 网站查找 Rab11fip5 基因启动子序列；
- 3) 利用 Genomatix 网站 (<http://www.genomatix.de/cgi-bin/eldorado/main.pl>)，预测可能结合于 Rab11fip5 基因启动子（-500 至 2000bp 区域）的转录因子及结合位点；
- 4) 挑选出 NF- κ B 的可能结合位点。

2.5 Chromatin Immunoprecipitation

免疫共沉淀按照试剂盒标准流程进行，简述如下：

- 1) 2×10^6 BMSC 接种于 10 cm 培养皿，培养至 85% 密度后以 20ng/ml 重组小鼠 TNF- α 分别处理 1h 和 4h；
- 2) 加入 270ul 37% 多聚甲醛，轻轻混匀后室温放置 10 min；
- 3) 加入 1 ml 10 \times 谷氨酸中和过多多聚甲醛。室温放置 5min；
- 4) 在冰上吸尽液体，加入 10ml 预冷的 PBS 清洗 2 次；
- 5) 加入 1ml 含 5ul 蛋白酶抑制剂的 PBS，细胞刮刮取细胞；4 $^{\circ}$ C 下 700 \times g 离心 5min；
- 6) 去上清，加入 1ml 含有蛋白酶抑制剂的 SDS Lysis Buffer 裂解细胞；

- 7) 在冰上超声裂解细胞；4℃ 下 12000×g 离心 10 min，吸取上清；
- 8) 每 100ul 上清中加入 900ul 含蛋白酶抑制剂的 Dilution buffer，加入 60ul Protein G
- 9) Agarose；4℃下旋转孵育 1 hr；
- 10) 4000×g 离心 1min；吸取上清入新离心管；实验组加入 5ug P65 抗体；阳性对照组加入 1ug anti-RNA Polymerase；阴性对照组加入 1ug 正常小鼠 IgG；4℃下旋转孵育过夜；
- 11) 加入 60ul Protein G Agarose，4℃下旋转孵育 1 hr；4000×g 离心 1min，去除上清；
- 12) 依次采用 Low Salt Immune Complex Wash Buffer (1 次)、High Salt Immune Complex Wash Buffer(1 次)、LiCl Immune Complex Wash Buffer (1 次)、TE Buffer(2 次)清洗 Protein G Agarose-antibody/chromatin 复合物；每次清洗 4min 后 4000×g 离心 1min，弃上清；
- 13) 加入 100ul Elution Buffer，轻弹离心管使其混匀；室温孵育 15min；4000×g 离心 1min；吸取上清；
- 14) 重复上述步骤，将所得上清混合；
- 15) 加入 8ul 5M NaCl，65℃孵育 4 过夜以解除 DNA-蛋白交联；
- 16) 加入 1ul RNase A，37℃孵育 30min；
- 17) 加入 4ul 0.5M EDTA，8ul 1M Tris-HCl 和 1ul Proteinase K，45℃孵育 2hr
- 18) 每 200ul DNA 样本中加入 1ml Binding Reagent A，混匀；加入旋转过滤柱中，10000×g 离心 30sec；倒出收集管中的液体
- 19) 加入 500ul Wash Reagent B 至过滤柱，10000×g 离心 30sec；倒出收集管中液体后再次 10000×g 离心 30sec；
- 20) 将过滤柱置于新的收集管中，加入 10ul Elution Buffer，10000×g 离心 30sec；
- 21) 收集管中液体即为纯化的 DNA，用于后续的 PCR 检测。
- 22) realtime RT-PCR 检测方法同前，所用引物为：miR-705 promoter (forward: 5'-TGGCCGACTCTTGCTGAAAT -3' and reverse: 5'-ACAAACAAGGCAAACAGGGC -3')。

2.9 统计

计量数据以均数±标准差 (mean ± SD) 表示。两组数据之间比较采用 student's t-test;

多组数据间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。P < 0.05 被认为具有显著性差异。

3 结果

3.1 TNF- α 通过 miR-705 抑制 FOXO1

TNF- α 抑制 FOXO1 总体蛋白水平, 可能从转录水平和转录后水平发挥功能。为了明确 TNF- α 是否直接调控 FOXO1 转录, 我们对 FOXO1 的 mRNA 表达进行检测。PCR 检测发现 OVX BMSCs 中 FOXO1 mRNA 与 Sham BMSCs 无显著差异(图 4-1A); TNF- α 体外刺激并不抑制 FOXO1 mRNA 的表达 (图 4-1B)。上述结果表明 TNF- α 并不直接调控 FOXO1 转录, 而可能通过转录后途径调控 FOXO1 表达。

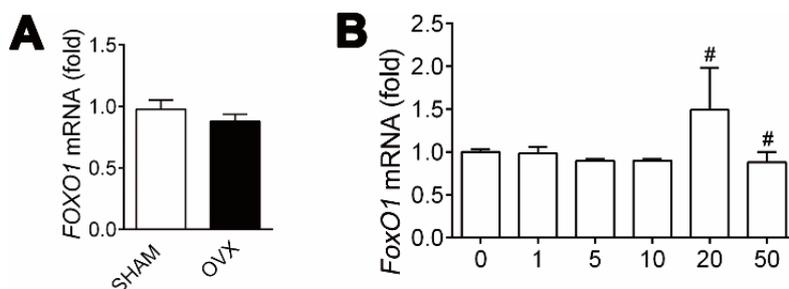


图 4-1 TNF- α 对 FOXO1 mRNA 表达的作用

Realtime RT-PCR 检测 SHAM 及 OVX BMSCs 中(A)和不同浓度 TNF- α 处理后(B)FOXO1 mRNA 水平。#, 与 0 组相比无差异。n=3。

实验一、二证实: 骨质疏松过程中 TNF- α 引起 BMSCs miRNA 表达异常, 而异常表达的 miRNA 通过转录后调控, 影响特定靶基因的蛋白水平, 扰乱 BMSCs 的正常功能。因此我们尝试探索 TNF- α 是否通过 miRNA 抑制 FOXO1 蛋白水平。因为 miRNA 主要发挥基因抑制作用, 我们先对 miRNA 芯片筛选出的在 OVX BMSCs 中表达升高的 miRNA 进行生物信息学分析。利用多个数据库进行预测, 发现在 5 个 miRNA 中, 只有 miR-705 同时被多个数据库预测可能结合于 FOXO1 的 3'UTR 区域 (图 4-2A)。所以我们在后续实验中, 进一步探索 miR-705 是否发挥更广泛的作用, 参与 TNF- α 对于 ROS 的调控。

接下来我们验证 miR-705 是否直接结合于 FOXO1。通过 miR-705 的获得性及缺失性功能试验发现, 过表达 miR-705 可明显抑制 FOXO1 蛋白表达, 而抑制 miR-705

可提高 BMSCs 中 FOXO1 的蛋白水平, 说明 miR-705 负向调控 FOXO1 的蛋白表达 (图 4-2B); 荧光素酶报告试验显示过表达 miR-705 可抑制 FOXO1-pMIR-report 中荧光素酶的表达 ($P<0.01$), 而敲低 miR-705 可促进报告载体荧光素酶表达 ($P<0.05$), 证实了 miR-705 直接结合于 FOXO1 的 3'UTR (图 4-2C), 说明 miR-705 是通过转录后调控方式发挥作用。

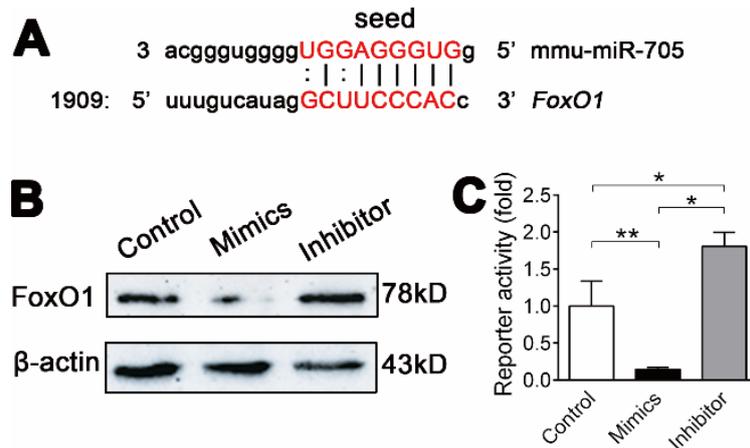


图 4-2 miR-705 靶向抑制 FOXO1

(A) miR-705 与 FOXO1 mRNA 3'UTR 区域结合位点示意图; (B) 转染 miR-705 mimics、inhibitor、negative control 48h 后, western blot 检测 FOXO1 蛋白表达; (C) Foxo1 p-miR-reporter 分别与 miR-705 mimics、inhibitor、negative control 共转染 48h 后, 检测荧光素酶活性。n=5; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

为了明确 miR-705 能否通过抑制 FOXO1 影响 BMSCs 抗氧化防御, 我们进一步检测过表达/敲低 miR-705 表达后抗氧化酶的表达和 ROS 水平。结果显示, miR-705 mimic 转染可抑制 BMSCs 中 Sod2 ($P<0.05$) 和 CAT ($P<0.01$) 表达 (图 4-3A), 并提高胞内 ROS 水平 ($P<0.001$) (图 4-3B); 而 miR-705 inhibitor 转染后作用与 mimic 的作用相反 (图 4-3B)。为了明确 miR-705 是通过抑制 FOXO1 发挥上述作用, 我们在转染 miR-705 mimics 的同时转染 Foxo1 过表达慢病毒, 发现过表达 FOXO1 可以完全拮抗 miR-705 mimics 导致的氧化应激 (图 4-3C)。

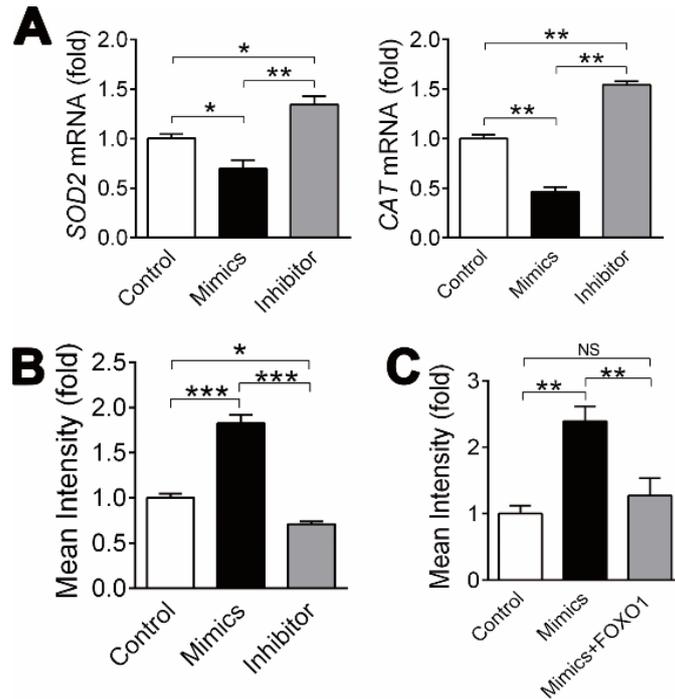


图 4-3 miR-705 抑制抗氧化应激防御

(A, B) 转染 miR-705 mimics、inhibitor、negative control 后检测 BMSCs 中 Sod2、Cat 的表达 (A) 以及 ROS 水平 (B); (C) 转染 miR-705 mimics 的同时转染 FOXO1 过表达慢病毒, FCM 检测 BMSCs ROS 水平. $n=3$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, NS, no significance.

为了进一步体内证实 miR-705 对 FOXO1 的调控作用, 采用 miR-705 antagomir (一种经化学修饰的 miRNA 抑制物) 进行骨髓腔内注射。Realtime RT-PCR 证实 miR-705 antagomir 有效降低体内骨组织 miR-705 的表达 ($P<0.05$) (图 4-4A)。免疫组化检测显示 miR-705 antagomir 可恢复 OVX 小鼠股骨中 FOXO1 的表达(图 4-4B), 相应的骨髓中 BMSCs 的 ROS 水平也降低了 30% ($P<0.001$) (图 4-4C)。

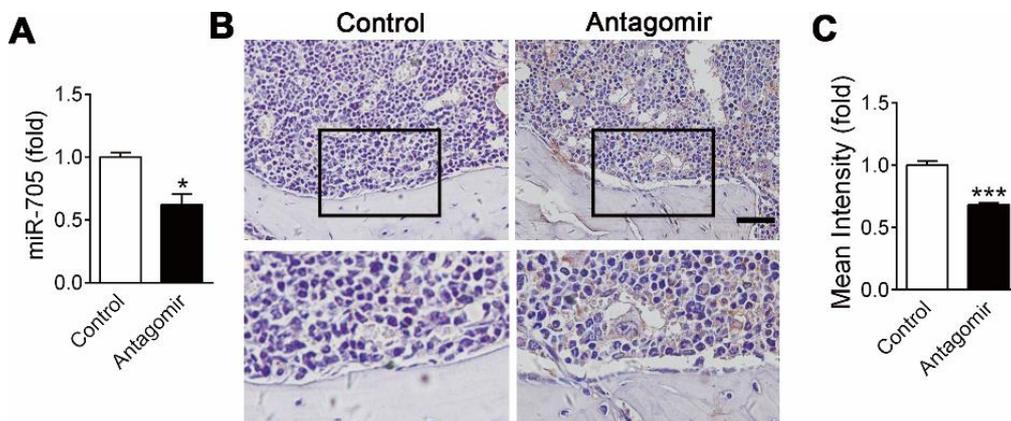


图 4-4 TNF- α 体内调控 miR-705

OVX 小鼠股骨骨髓腔内注射 miR-705 antagomir (1ng) 3 w。(A) Realtime RT-PCR 检测骨组织中 miR-705 表达;(B)免疫组化检测股骨松质骨中 FOXO1 表达;(C)FCM 检测骨髓中 Sca-1+CD45-BMSCs 细胞的 ROS 水平。Scale bar, 100 μ m。n=3; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001。

我们进一步明确 TNF- α 是否调控 miR-705 表达。结果显示：雌激素所致骨质疏松中 BMSCs 和骨组织中 miR-705 表达均显著上升 (P <0.01) (图 4-5A)。体外 TNF- α 处理可提高 BMSCs 中 miR-705 表达水平, 并呈剂量依赖性 (图 4-5A)。体内 TNF- α 注射提高骨组织中 miR-705 表达 1 倍以上 (P <0.05) (图 4-5C); 而中和 OVX 小鼠体内 TNF- α 可降低骨组织中 miR-705 水平 40% (P <0.05) (图 4-5D)。上述实验证实 TNF- α 体内/体外均促进 miR-705 的表达。

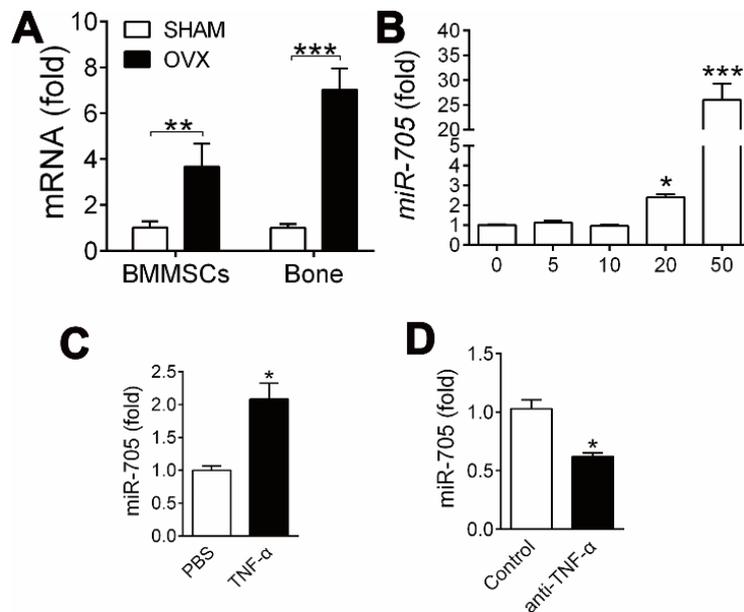


图 4-5 TNF- α 体外及体内促进 miR-705 表达

(A) Realtime RT-PCR 检测 SHAM 及 OVX 小鼠 BMSCs 和股骨组织中 miR-705 的表达; (B) 不同浓度 TNF- α 处理 BMSCs 2h 后 miR-705 的表达; (C) 体内注射小鼠重组 TNF- α 后股骨组织中 miR-705 的表达; (D) OVX 小鼠体内注射 TNF- α 中和抗体后, 股骨组织中 miR-705 的表达。n=3; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001。

为了明确 miR-705 在骨质疏松 BMSCs 成骨分化异常中的作用, 我们利用 inhibitor 抑制 OVX BMSCs 中 miR-705 的表达, 并进行体外成骨实验。茜素红染色显示抑制 miR-705 能够一定程度上恢复 OVX BMSCs 的成骨分化能力 (P <0.01) (图 4-6A)。

Western blot 检测进一步证实抑制 miR-705 可明显恢复 OVX BMSCs 中 FOXO1 的蛋白水平 (图 4-6B), 提示是通过提高 FOXO1 表达恢复 OVX BMSCs 的成骨分化。

我们接下来研究 TNF- α 是否通过 miR-705 加重 BMSCs 的氧化损伤。在过表达/敲低 miR-705 表达的 BMSCs 进行成骨诱导, 并同时加入 TNF- α 和 H₂O₂ 处理, 发现 miR-705 mimics 转染加重 TNF- α 在成骨分化过程中导致的 BMSCs 氧化损伤 ($P<0.01$), 而 miR-705 inhibitor 转染可一定程度上减轻 TNF- α 导致的氧化损伤 ($P<0.01$) (图 4-6C)。Western blot 检测进一步证实抑制 miR-705 能够防止 TNF- α 导致的 FOXO1 表达下降 (图 4-6D)。

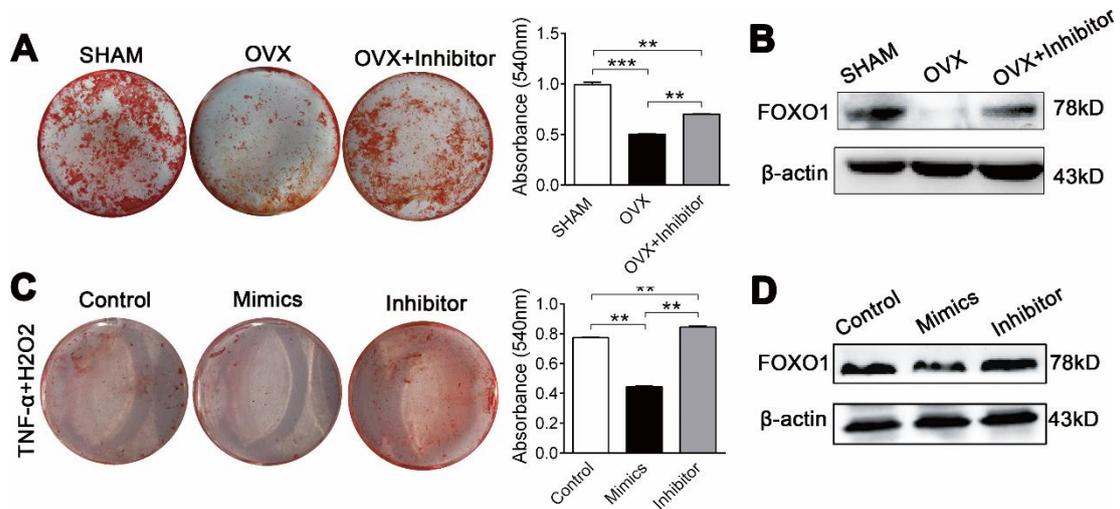


图 4-6 TNF- α 通过 miR-705 调控 FOXO1 的表达

(A, B) SHAM 及 OVX 分别转染 negative control 和 miR-705 inhibitor 后行成骨诱导, 14d 后行茜素红染色 (A), 并检测 FOXO1 的蛋白表达 (B); (C, D) MSC 转染 miR-705 mimics、inhibitor 和 negative control 后行成骨诱导, 同时加入 TNF- α (20ng/ml) 和 H₂O₂ (100 μ M) 处理, 14d 后行茜素红染色 (C), 并检测 FOXO1 的蛋白表达 (D)。n=3; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

3.2 TNF- α 通过 NF- κ B 通路促进 miR-705 表达

我们接下来研究 TNF- α 调控 miR-705 引起 BMSCs 氧化应激的信号途径。因为第一部分研究已明确 TNF- α 主要通过激活 NF- κ B 信号通路抑制 BMSCs 成骨分化, 而第二部分研究发现 TNF- α 通过 NF- κ B 通路调控 miR-705 的表达, 所以首先需要明确其是否也通过 NF- κ B 通路抑制 BMSCs 抗氧化防御。通过 IKK α siRNA 抑制 NF- κ B 通路后, TNF- α 对 Foxo1 蛋白表达 (图 4-7A) 和 Sod2、Cat mRNA 表达 (图 4-7B)

的抑制作用均明显减弱 ($P<0.05$), 同时其导致的氧化应激也有所减轻 ($P<0.01$) (图 4-7C)。

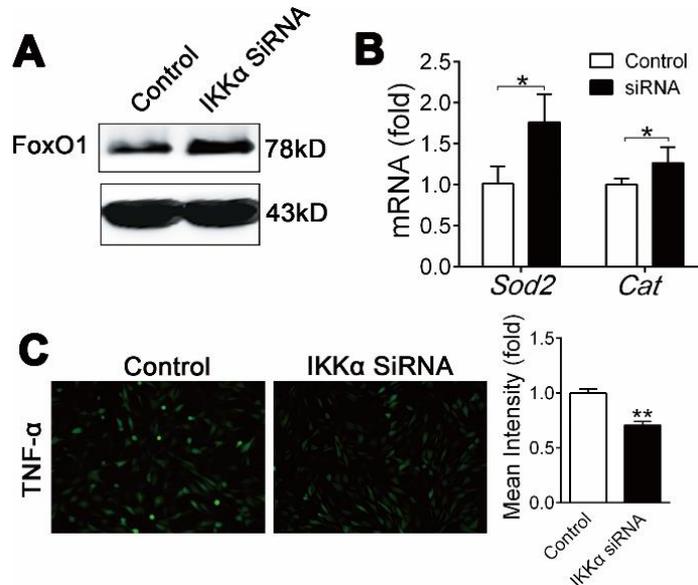


图 4-7 TNF- α 通过 NF- κ B 调控 FOXO1

转染 IKK α siRNA 和 negative control siRNA 的 BMSCs 中加入 20ng/ml TNF- α 处理 12h, 检测 FOXO1 蛋白表达 (A), Sod2 和 Cat mRNA 表达 (B), 以及 ROS 水平 (C)。n=3; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

成骨诱导试验也证实抑制 NF- κ B 通路后, OVX BMSCs 的抗氧化损伤能力明显升高 (图 4-8)。

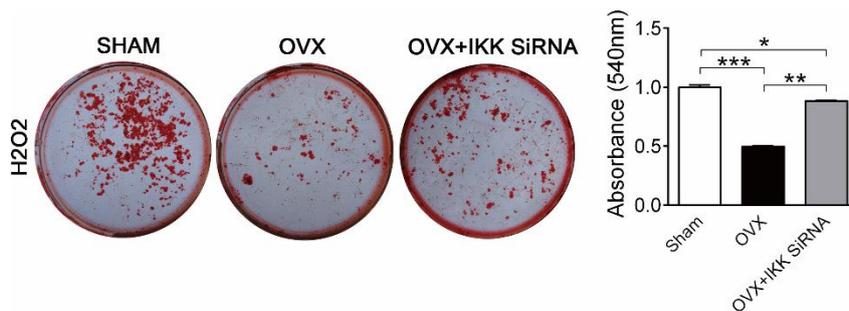


图 4-8 IKK α 转染后 H₂O₂ 对 OVX BMSCs 成骨分化的作用检测

SHAM 及 OVX BMSCs 分别转染 negative control siRNA 和 IKK α siRNA 后行成骨诱导, 同时加入 100 μ M H₂O₂ 处理, 14d 后行茜素红染色。n=3; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

随后进一步探索 NF- κ B 通路调控 miR-705 表达的具体机制。抑制 NF- κ B 后, TNF- α 对 miR-705 的调节作用减弱 ($P<0.01$) (图 4-9A,)。因为 P65 是 NF- κ B 通路

下游的关键转录因子，而生物信息学分析发现在 miR-705 启动子区~500bp 处有 P65 的启动子区域，所以我们首先检验 P65 能够直接结合于 miR-705 启动子区域。通过 CHIP 实验证实，P65 能够结合于 miR-705 启动子区，且其结合在 TNF- α 处理后显著增多。说明 TNF- α 直接通过 NF- κ B 下游转录因子 P65 启动 miR-705 转录。

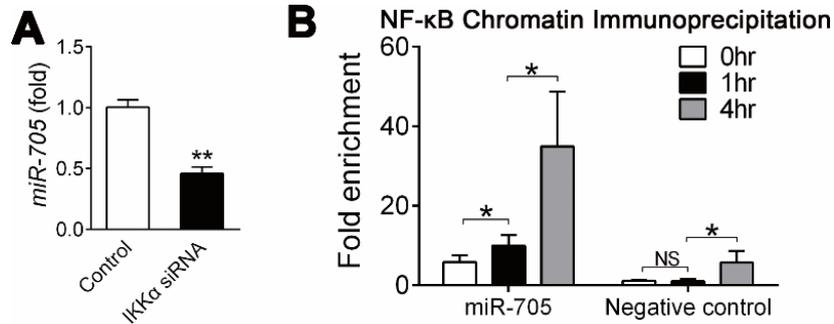


图 4-9 TNF- α 通过 NF- κ B 调控 miR-705

(A)转染 IKK α siRNA 和 negative control siRNA 的 BMSCs 中加入 20ng/ml TNF- α 处理 12h, Realtime RT-PCR 检测 miR-705 表达; (B) 20ng/ml TNF- α 处理 1、4h 后行 P65 免疫与 miR-705 启动子区的免疫共沉淀检测。n=3; * P <0.05, ** P <0.01, NS, no significance。

3.3 反馈回路导致 BMSCs 持续性氧化损伤

通过前期研究，我们发现 BMSCs 在脱离炎症微环境后，甚至多次传代后仍然维持其功能缺陷。同时，我们检测了体外传代过程中 OVX BMSCs 中 ROS 含量，发现其水平在脱离炎症刺激后也无法恢复。此外，FOXO1 和 SOD2 和 CAT 的表达也持续低下。说明 OVX BMSCs 中抗氧化保护机制持续受到抑制。

为了明确这种持续性损伤是否与 TNF- α 有关，我们在体外对 BMSCs 进行 3d 的 TNF- α 长期刺激，随后将细胞传代并换用正常培养基继续培养 48h，发现 TNF- α 预处理组 BMSCs 中 ROS 仍然升高 (P <0.01) (图 4-10A)、FOXO1、SOD2 和 CAT 表达持续低下 (图 4-10B, C)。与 OVX BMSCs 中观察到的现象相一致。

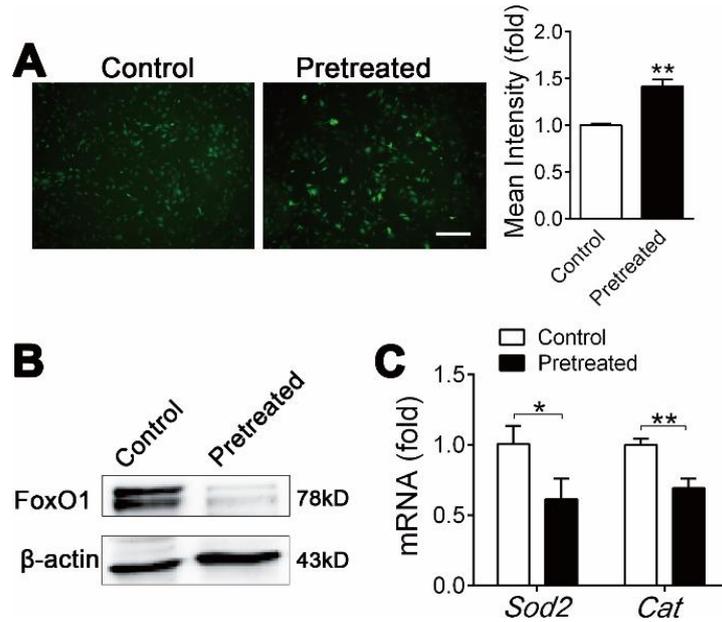


图 4-10 TNF- α 持续性导致 BMSCs 内氧化应激

TNF- α 预处理 3d 后, BMSCs 传代培养 48hr, 检测其中 ROS 水平 (A)、FOXO1 蛋白表达 (B) 和 Sod2 及 Cat mRNA 表达 (C)。Scale bar, 50 μ m; n=3; * P <0.05, ** P <0.01。

与之相应, TNF- α 预处理也可持续性抑制 BMSCs 的成骨分化, 并加重分化过程中 ROS 导致的损伤 (图 4-11)。

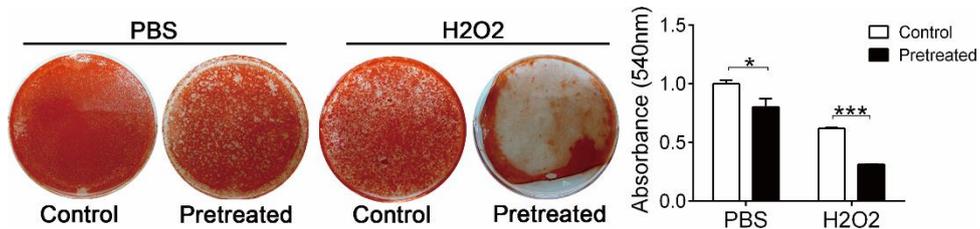


图 4-11 TNF- α 预处理后 BMSCs 分化及 ROS

TNF- α 预处理 3d 后, BMSCs 传代培养并进行成骨诱导, 同时进行 H₂O₂ (100 μ M) 处理, 14d 后行茜素红染色。n=3; * P <0.05, *** P <0.001。

前面实验结果证明 TNF- α 对于 BMSCs 分化及 FOXO1 的抑制作用能够在一定时间内持续, 这提示 TNF- α 并不是简单的依靠与受体作用后激活下游信号通路的途径发挥作用, 而是可能形成反馈回路, 使其效应持续。

根据已有研究报道, ROS 也能够激活 NF- κ B 信号通路。Western 及 PCR 检测结果证实, ROS 的确能够激活 NF- κ B 信号通路 (图 4-12A, B)。更重要的是, ROS 能

够加强 TNF- α 对于 NF- κ B 的激活作用 (图 4-12A, B)。相应的, ROS 也能够促进 miR-705 的表达 (图 4-12C), 并加剧 TNF- α 诱导的 miR-705 表达上升 (图 4-12D) 和 FOXO1 蛋白水平下降 (图 4-12E)。因为 miR-705 过量表达抑制 FOXO1 的蛋白水平, 从而 FOXO1 蛋白的降低可进一步破坏其介导的抗氧化防御体系。因此 NF- κ B-miR-705-FOXO1-ROS 之间形成了一条正反馈回路。

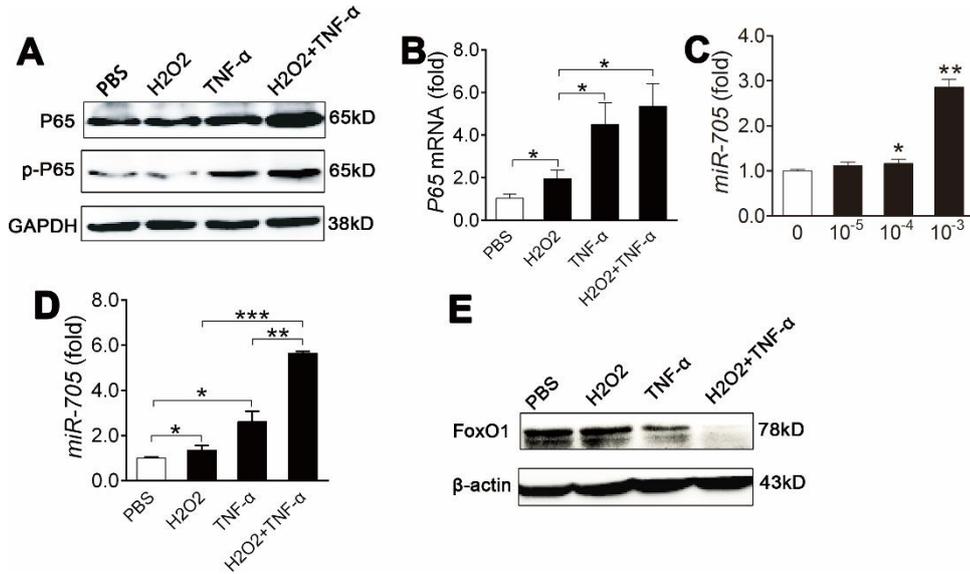


图 4-12 ROS 促进 NF- κ B 通路的激活

H₂O₂ (100 μ M) 或/和 TNF- α (20ng/ml) 处理 2h 后, 检测 MSC 中 P65、p-P65 蛋白表达 (A)、P65 mRNA 表达 (B)、miR-705 表达 (D) 以及 Foxo1 蛋白表达 (E)。(C) 不同浓度 H₂O₂ 刺激后 2h 后, realtime RT-PCR 检测 BMSCs 中 miR-705 的表达。n=3; *P<0.05, ** P<0.01, ***P<0.001。

对 TNF- α 预处理后的 BMSCs 中 P65 激活情况和 miR-705 的表达进行检测, 证实 TNF- α 长时间刺激确实能够引起 NF- κ B 信号通路的持续激活 (图 4-13A) 和 miR-705 的持续高表达 (P<0.001) (图 4-13B)。从而支持我们提出的正反馈回路假设。

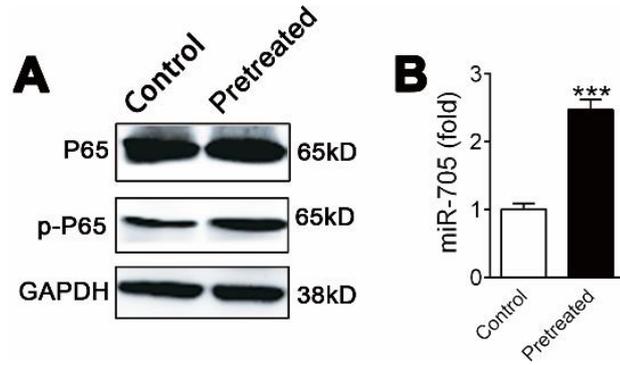


图 4-13 TNF- α 预处理持续性激活 NF- κ B 通路和 miR-705 表达

TNF- α 预处理 3d 后, BMSCs 传代培养 48hr, 检测其中 P65、p-P65 蛋白表达 (A) 和 miR-705 表达 (B)。n=3; *** P <0.001。

因此, 通过本部分研究, 证实了 TNF- α 长时间刺激后可能激活一条正反馈的分子信号回路, 从而持续性的引起 BMSCs 内的氧化应激, 并持久抑制 BMSCs 的成骨分化 (图 4-14)。

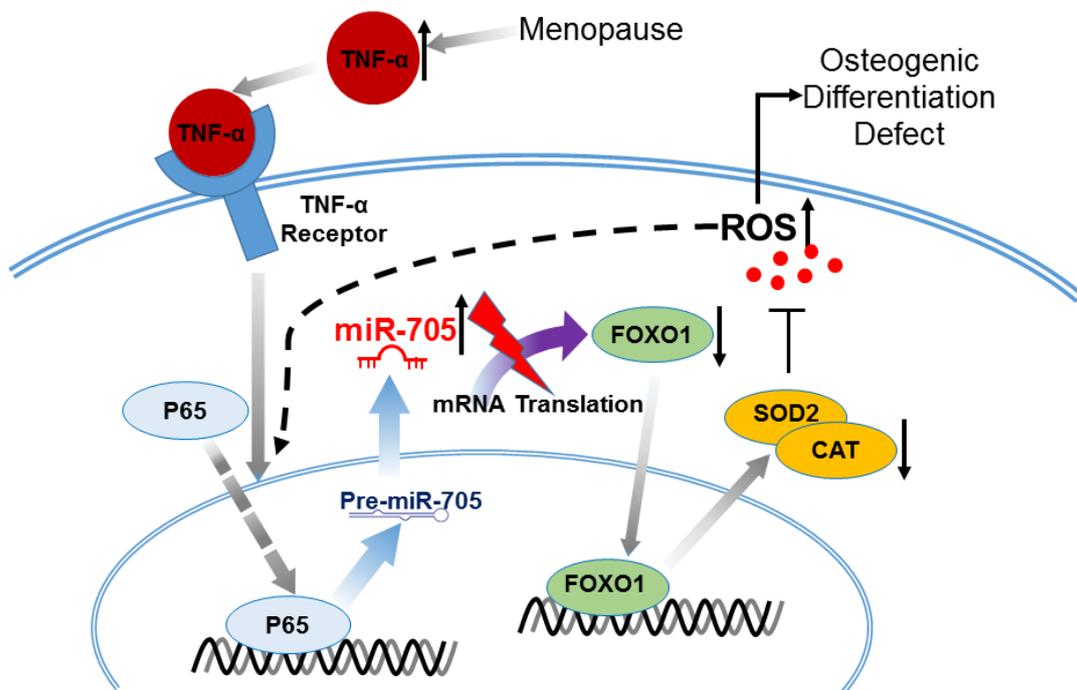


图 4-14 模式图: TNF- α 通过 miR-705 抑制 FOXO1, 并导致持续性氧化应激损伤

4 讨论

本实验发现, BMSCs 的成骨异常在体外培养过程中仍然维持, 即使通过体外传代后也不能显著逆转。上述的结果似乎存在一定的矛盾: 一方面, 骨质疏松来源的 BMSCs 在同样的体外诱导条件下仍表现出成骨分化缺陷, 提示存在细胞自主性 (cell autonomous) 的机制; 另一方面, BMSCs 的分化异常是由雌激素的缺乏引发的一系列外部微环境改变所导致, 提示细胞外信号是 BMSCs 分化异常的重要因素。我们通过相关研究文献分析, 发现这个现象普遍存在于退行性和炎症性疾病过程。例如炎症微环境被认为可以诱导细胞出现恶变, 就是一个外界异常信号导致细胞内部持久性改变的例子。慢性炎症中分离的多种干细胞的体外分化功能仍然存在异常, 从而可以通过体外细胞学研究探索炎症的致病机制。因此, 我们认为骨质疏松中外部微环境的改变, 可能导致 BMSCs 内部信号应答的不可逆性改变, 产生对细胞功能的持续影响。该假设也成为了我们后续研究的一个基本前提及研究重点。

更重要的是, 我们通过建立多种体外和体内慢性炎症模型, 发现 TNF- α 长时间刺激能够不可逆的抑制 BMSCs 的多向分化能力, 其功能异常甚至在脱离炎症环境并多次传达后均无法恢复^[9], 提示 TNF- α 长期作用所造成的 BMSCs 持续性功能异常很可能是慢性炎症难以治愈的关键原因。可以推断, 在骨质疏松发生过程中, TNF- α 可能是最为关键的启动因子, 其长时间刺激激活了下游的反馈回路, 从而造成持续性的损伤和 BMSCs 生物学行为变化。经过深入研究, 我们发现了一条由 NF- κ B - miR-705 - FOXO1 - ROS 组成的正反馈回路, 从而解释了前面实验发现的 OVX BMSCs 脱离体内炎症微环境后仍然存在氧化应激这个现象。上述结果提示骨质疏松发生的复杂性及其治疗的困难性: 单一的治疗手段可能无法有效恢复受损 BMSCs 的功能, 需要通过联合对抗多种致病因素, 在去除诱因的同时切断已激活的正反馈回路。如果假设成立的话, 将有望提出新的骨质疏松治疗策略。

根据现有研究, FOXO1 的调控主要有三种途径: 最主要也是研究最深入的是蛋白的磷酸化及乙酰化修饰, FOXO1 特定位点的修饰可以促进或抑制其入核, 从而增强或减弱其转录活性及功能。第二种是转录调控, 即影响 FOXO1 的表达量而控制其数量。第三种是 miRNA 介导的转录后修饰。越来越多的研究发现 miRNA 是 FOXO1 蛋白表达的重要调控因子。MiR-27a, miR-233, miR-96, miR-107, miR-182, miR-9,

miR-153, miR-183, and miR-186 均被报道在肿瘤细胞中抑制 Foxo1 表达^[113-115]; miR-139 在干细胞中抑制 Foxo1 的功能^[116]; miR-182 通过抑制 Foxo1 调控成骨细胞分化^[117]。本研究首次证实 miR-705 能够通过结合于 FOXO1 3'UTR 区域抑制 FOXO1 的蛋白表达。更重要的是, miR-705 介导了 TNF- α 对 FOXO1 的调控作用, TNF- α 通过 miR-705 导致 BMSCs 内的氧化应激损伤,从而提出了在病理条件下影响 FOXO1 表达的新的分子机制。值得注意的是,上述实验提示在不同细胞中 Foxo1 可能受到不同的 miRNA 的调控。在我们的研究模型中, miR-705 在骨质疏松后骨组织和 BMSCs 均呈高表达,并受到 TNF- α 的调控。可能上述条件决定了在骨质疏松过程中 miR-705 是调控 Foxo1 表达的重要 miRNA。

抗氧化方法已被尝试用于治疗骨衰老等疾病^[118,119]。现在普遍采用的抗氧化方法是使用抗氧化剂,但是这种方式靶点不明确;同时抗氧化剂由于经过消化道吸收和细胞摄入过程中的损失,导致其最后进入细胞内发挥抗氧化的效率很低,在一定程度上限制其治疗效果。寻找 OS 的下游治疗靶点可能是另一种理想途径。miRNA 可通过人工合成的模拟物和抑制剂进行调控,其方法具有设计简单、作用高效、副作用小、价格相对低廉等潜在的优势。已有多项开拓性的研究尝试通过调控 miRNA 进行疾病的治疗,并收到理想疗效。特别随着近年来特异性运输载体技术的进展,使得通过 miRNA 治疗骨质疏松治疗成为可能。有两个研究团队探讨了通过抑制特定 miRNA 促进骨形成以治疗骨质疏松的可行性。他们通过筛选,分别发现了成骨细胞中 miR-214 和 BMSCs 中 miR-188a 在骨质疏松后表达上升,利用靶向特异性载体运输技术,将上述 miRNA 的抑制剂(antagomir)体内运送至成骨细胞或 BMSCs,发现可有效缓解衰老、OVX、失重等导致的骨质疏松。说明 miRNA 可能成为有效的骨质疏松干预靶点。我们也通过体外实验证实抑制 miR-3077-5p 的异常表达升高可部分恢复 OVX BMSCs 的成骨分化,并对抗 TNF- α 的抑成骨作用,提示其也是骨质疏松治疗的候选靶点。但能否通过抑制 miR-3077-5p 来治疗骨质疏松,仍需进一步的体内实验支持。

小 结

本研究基于炎症因子在绝经后骨质疏松中发生中的关键作用，着眼于 miRNA 介导的转录后调控的变化和功能，通过高通量芯片筛选技术，发现了两个受 TNF- α 调控的 miRNA，利用一系列的功能实验证明其在 BMSCs 成骨分化中扮演重要角色，并开展信号通路研究，阐明了 TNF- α 导致 miRNA 异常表达的信号途径，提出了 TNF- α 导致 BMSCs 成骨功能下降的新的机制。此外，还证明通过恢复特定 miRNA 的异常表达可有效提高骨质疏松 BMSCs 的成骨分化能力，提示 miRNA 可能骨质疏松治疗新的靶点，从而提供了促进骨质疏松下骨形成的新策略。

本研究的主要发现和结论归纳如下：

(1) TNF- α 在雌激素缺乏后骨形成缺乏中发挥了关键作用。一方面，TNF- α 直接抑制 BMSCs 的成骨分化；另一方面，TNF- α 可导致氧化应激损伤，间接破坏 BMSCs 的骨形成能力。

(2) miRNA 介导的转录后调控在 BMSCs 功能维持中起着重要作用，雌激素缺乏后 miRNA 的表达异常是导致 BMSCs 成骨分化缺陷的关键因素。

(3) TNF- α 通过激活 NF- κ B 信号通路促进 miR-3077-5p 表达，下调 BMSCs 中 Runx2 蛋白水平，直接抑制 BMSCs 的成骨分化；

(4) FOXO1 的下降引起 Sod2 和 CAT 等抗氧化酶表达减少，是导致 BMSCs 抗氧化防御缺陷的重要因素；

(5) TNF- α 通过激活 P65，直接结合于 miR-705 启动子上促进其转录，导致 FOXO1 蛋白表达减少，造成 BMSCs 的氧化损伤和成骨功能降低。

(6) 干细胞微环境中的炎症因子与细胞内氧化应激反应间具有协同效应，通过一系列复杂的信号传递网络相互作用和增强，共同导致干细胞功能失调。

参考文献

- [1] Pietschmann P, Rauner M, Sipos W, Kersch-Schindl K. Osteoporosis: an age-related and gender-specific disease--a mini-review. *Gerontology*. 2009;55(1):3-12.
- [2] Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *Lancet*. 2011;377(9773):1276-87.
- [3] 中国健康促进基金会骨质疏松防治中国白皮书编委会. 骨质疏松症中国白皮书. *中华健康管理学杂志*. 2009;3(3):148-54.
- [4] Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Oden A. Approaches to the targeting of treatment for osteoporosis. *Nature reviews*. 2009;5(8):425-31.
- [5] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):726-36.
- [6] Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1176:101-17.
- [7] Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*. 2008;7(3):335-43.
- [8] Yu JM, Wu X, Gimble JM, Guan X, Freitas MA, Bunnell BA. Age-related changes in mesenchymal stem cells derived from rhesus macaque bone marrow. *Aging Cell*. 2011;10(1):66-79.
- [9] Liao L, Su X, Yang X, et al. TNF-alpha Inhibits FoxO1 by Up-regulating MiR-705 to Aggravate Oxidative Damage in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells during Osteoporosis. *Stem Cells*. 2015.
- [10] Jing H, Liao L, An Y, et al. Suppression of EZH2 Prevents the Shift of Osteoporotic MSC Fate to Adipocyte and Enhances Bone Formation During Osteoporosis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2016;24(2):217-29.
- [11] Li Y, Fan L, Hu J, et al. MiR-26a Rescues Bone Regeneration Deficiency of Mesenchymal Stem Cells Derived From Osteoporotic Mice. *Mol Ther*. 2015;23(8):1349-57.
- [12] Yamaza T, Miura Y, Bi Y, et al. Pharmacologic stem cell based intervention as a new approach to osteoporosis treatment in rodents. *PloS one*. 2008;3(7):e2615.
- [13] Lepperdinger G. Inflammation and mesenchymal stem cell aging. *Current opinion in immunology*. 2011;23(4):518-24.
- [14] Liu Y, Wang L, Kikuri T, et al. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN-gamma and TNF-alpha. *Nat Med*. 2011;17(12):1594-601.
- [15] Liao L, Yang X, Su X, et al. Redundant miR-3077-5p and miR-705 mediate the shift of mesenchymal stem cell lineage commitment to adipocyte in osteoporosis bone marrow. *Cell death & disease*. 2013;4:e600.
- [16] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642-55.
- [17] Li H, Xie H, Liu W, et al. A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast

- differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(12):3666-77.
- [18] Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. *Nature reviews*.11(4):252-63.
- [19] Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. *Lancet*. 2006;367(9527):2010-8.
- [20] Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(12):3318-25.
- [21] Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2012;23(11):576-81.
- [22] Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocrine reviews*. 2002;23(3):279-302.
- [23] Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008;2(4):313-9.
- [24] Park D, Spencer JA, Koh BI, et al. Endogenous bone marrow MSCs are dynamic, fate-restricted participants in bone maintenance and regeneration. *Cell Stem Cell*. 2012;10(3):259-72.
- [25] Chan CK, Seo EY, Chen JY, et al. Identification and specification of the mouse skeletal stem cell. *Cell*. 2015;160(1-2):285-98.
- [26] Miller FD, Kaplan DR. Mobilizing endogenous stem cells for repair and regeneration: are we there yet? *Cell Stem Cell*. 2012;10(6):650-2.
- [27] Teitelbaum SL. Stem cells and osteoporosis therapy. *Cell stem cell*. 2010;7(5):553-4.
- [28] Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1143:123-50.
- [29] Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing research reviews*. 2006;5(1):91-116.
- [30] Verma S, Rajaratnam JH, Denton J, Hoyland JA, Byers RJ. Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis. *Journal of clinical pathology*. 2002;55(9):693-8.
- [31] Yang N, Wang G, Hu C, et al. Tumor necrosis factor alpha suppresses the mesenchymal stem cell osteogenesis promoter miR-21 in estrogen deficiency-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2013;28(3):559-73.
- [32] Wallace JM, Rajachar RM, Chen XD, et al. The mechanical phenotype of biglycan-deficient mice is bone- and gender-specific. *Bone*. 2006;39(1):106-16.
- [33] Miura M, Chen XD, Allen MR, et al. A crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(12):1704-13.
- [34] Takada K, Inaba M, Ichioka N, et al. Treatment of senile osteoporosis in SAMP6 mice by intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2006;24(2):399-405.
- [35] Bellantuono I, Aldahmash A, Kassem M. Aging of marrow stromal (skeletal) stem cells and their contribution to age-related bone loss. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1792(4):364-70.
- [36] Hadjidakis DJ, Androulakis, II. Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of*

- Sciences. 2006;1092:385-96.
- [37] Simpson ER, Misso M, Hewitt KN, et al. Estrogen--the good, the bad, and the unexpected. *Endocrine reviews*. 2005;26(3):322-30.
- [38] Carlsten H. Immune responses and bone loss: the estrogen connection. *Immunological reviews*. 2005;208:194-206.
- [39] Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*. 2007;130(5):811-23.
- [40] Kasper G, Mao L, Geissler S, et al. Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2009;27(6):1288-97.
- [41] Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, Guicheux J, Wittrant Y. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol Med*. 2009;15(10):468-77.
- [42] Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(9):722-8.
- [43] Almeida M, Ambrogini E, Han L, Manolagas SC, Jilka RL. Increased lipid oxidation causes oxidative stress, increased peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression, and diminished pro-osteogenic Wnt signaling in the skeleton. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(40):27438-48.
- [44] Almeida M, Han L, Martin-Millan M, et al. Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(37):27285-97.
- [45] Lean JM, Davies JT, Fuller K, et al. A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(6):915-23.
- [46] Jamal SA, Cummings SR, Hawker GA. Isosorbide mononitrate increases bone formation and decreases bone resorption in postmenopausal women: a randomized trial. *J Bone Miner Res*. 2004;19(9):1512-7.
- [47] Dai DF, Chen T, Wanagat J, et al. Age-dependent cardiomyopathy in mitochondrial mutator mice is attenuated by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Aging Cell*. 2010;9(4):536-44.
- [48] Lustgarten MS, Jang YC, Liu Y, et al. MnSOD deficiency results in elevated oxidative stress and decreased mitochondrial function but does not lead to muscle atrophy during aging. *Aging Cell*. 2011;10(3):493-505.
- [49] Manolagas SC. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocrine reviews*. 2010;31(3):266-300.
- [50] Raftopoulos M. Mitochondrial wrinkles: the first signs of ageing? *Nat Cell Biol*. 2005;7(9):853.
- [51] Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(10):1229-37.
- [52] Roggia C, Gao Y, Cenci S, et al. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(24):13960-5.
- [53] Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, Schatz H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocrine reviews*. 2002;23(1):90-119.
- [54] Kimble RB, Bain S, Pacifici R. The functional block of TNF but not of IL-6 prevents bone loss

- in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res.* 1997;12(6):935-41.
- [55] Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:605-31.
- [56] Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation.* *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):204.
- [57] Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature.* 2006;441(7097):1075-9.
- [58] Chen XD, Shi S, Xu T, Robey PG, Young MF. Age-related osteoporosis in biglycan-deficient mice is related to defects in bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* 2002;17(2):331-40.
- [59] Zhang Y, Li L, Zhu J, et al. In vitro observations of self-assembled ECM-mimetic bioceramic nanoreservoir delivering rFN/CDH to modulate osteogenesis. *Biomaterials.* 2012;33(30):7468-77.
- [60] Tang Y, Wu X, Lei W, et al. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nature medicine.* 2009;15(7):757-65.
- [61] Xie T, Li L. Stem cells and their niche: an inseparable relationship. *Development.* 2007;134(11):2001-6.
- [62] Armaka M, Apostolaki M, Jacques P, Kontoyiannis DL, Elewaut D, Kollias G. Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases. *J Exp Med.* 2008;205(2):331-7.
- [63] Baldrige MT, King KY, Goodell MA. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends Immunol.* 2011;32(2):57-65.
- [64] Li J, Tang Y, Cai D. IKKbeta/NF-kappaB disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. *Nat Cell Biol.* 2012;14(10):999-1012.
- [65] Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *The Journal of clinical investigation.* 2006;116(5):1186-94.
- [66] Wang L, Zhao Y, Liu Y, et al. IFN-gamma and TNF-alpha synergistically induce mesenchymal stem cell impairment and tumorigenesis via NFkappaB signaling. *Stem Cells.* 2013;31(7):1383-95.
- [67] Ware CF. The TNF receptor super family in immune regulation. *Immunological reviews.* 2011;244(1):5-8.
- [68] Pronk CJ, Veiby OP, Bryder D, Jacobsen SE. Tumor necrosis factor restricts hematopoietic stem cell activity in mice: involvement of two distinct receptors. *J Exp Med.* 2011;208(8):1563-70.
- [69] Chen X, Hu C, Wang G, et al. Nuclear factor-kappaB modulates osteogenesis of periodontal ligament stem cells through competition with beta-catenin signaling in inflammatory microenvironments. *Cell death & disease.* 2013;4:e510.
- [70] Zhang Q, Wang HY, Liu X, Bhutani G, Kantekure K, Wasik M. IL-2R common gamma-chain is epigenetically silenced by nucleophosphin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) and acts as a tumor suppressor by targeting NPM-ALK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011;108(29):11977-82.
- [71] Tang L, Li N, Xie H, Jin Y. Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva. *Journal of cellular physiology.* 2011;226(3):832-42.
- [72] Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(9):745-56.

- [73] Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 2012;119(3):651-65.
- [74] Kotake S, Nanke Y. Effect of TNF α on osteoblastogenesis from mesenchymal stem cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1840(3):1209-13.
- [75] Ghali O, Chauveau C, Hardouin P, Broux O, Devedjian JC. TNF- α 's effects on proliferation and apoptosis in human mesenchymal stem cells depend on RUNX2 expression. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1616-26.
- [76] Chang J, Wang Z, Tang E, et al. Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor- κ B. *Nature medicine*. 2009;15(6):682-9.
- [77] Kahai S, Lee SC, Lee DY, et al. MicroRNA miR-378 regulates nephronectin expression modulating osteoblast differentiation by targeting GalNT-7. *PloS one*. 2009;4(10):e7535.
- [78] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
- [79] Dirks PB. MicroRNAs and parallel stem cell lives. *Cell*. 2009;138(3):423-4.
- [80] Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, et al. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(4):212-27.
- [81] Liu W, Liu Y, Guo T, et al. TCF3, a novel positive regulator of osteogenesis, plays a crucial role in miR-17 modulating the diverse effect of canonical Wnt signaling in different microenvironments. *Cell death & disease*. 2013;4:e539.
- [82] Li Y, Fan L, Liu S, et al. The promotion of bone regeneration through positive regulation of angiogenic-osteogenic coupling using microRNA-26a. *Biomaterials*. 2013;34(21):5048-58.
- [83] Su X, Liao L, Shuai Y, et al. MiR-26a functions oppositely in osteogenic differentiation of BMSCs and ADSCs depending on distinct activation and roles of Wnt and BMP signaling pathway. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1851.
- [84] Wang X, Guo B, Li Q, et al. miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nature medicine*. 2013;19(1):93-100.
- [85] Li CJ, Cheng P, Liang MK, et al. MicroRNA-188 regulates age-related switch between osteoblast and adipocyte differentiation. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(4):1509-22.
- [86] Egea V, Zahler S, Rieth N, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) regulates mesenchymal stem cells through let-7f microRNA and Wnt/ β -catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(6):E309-16.
- [87] Li Z, Hassan MQ, Jafferji M, et al. Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(23):15676-84.
- [88] Eskildsen T, Taipaleenmaki H, Stenvang J, et al. MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011.
- [89] Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF- κ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell*. 2009;139(4):693-706.
- [90] Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*. 2011;9(1):11-5.
- [91] Dangwal S, Thum T. microRNA therapeutics in cardiovascular disease models. *Annual review*

- of pharmacology and toxicology. 2014;54:185-203.
- [92] Liu Y, Liu W, Hu C, et al. MiR-17 modulates osteogenic differentiation through a coherent feed-forward loop in mesenchymal stem cells isolated from periodontal ligaments of patients with periodontitis. *Stem Cells*. 2011;29(11):1804-16.
- [93] Krum SA, Chang J, Miranda-Carboni G, Wang CY. Novel functions for NFkappaB: inhibition of bone formation. *Nature reviews*. 2010;6(10):607-11.
- [94] Granic I, Dolga AM, Nijholt IM, van Dijk G, Eisel UL. Inflammation and NF-kappaB in Alzheimer's disease and diabetes. *J Alzheimers Dis*. 2009;16(4):809-21.
- [95] Wei J, Shi Y, Zheng L, et al. miR-34s inhibit osteoblast proliferation and differentiation in the mouse by targeting SATB2. *The Journal of cell biology*. 2012;197(4):509-21.
- [96] Zhang L, Liu Y, Song F, et al. Functional SNP in the microRNA-367 binding site in the 3'UTR of the calcium channel ryanodine receptor gene 3 (RYR3) affects breast cancer risk and calcification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(33):13653-8.
- [97] Morgan MJ, Liu ZG. Reactive oxygen species in TNFalpha-induced signaling and cell death. *Mol Cells*. 2010;30(1):1-12.
- [98] Li Q, Ye Z, Wen J, et al. Gelsolin, but not its cleavage, is required for TNF-induced ROS generation and apoptosis in MCF-7 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;385(2):284-9.
- [99] Bruunsgaard H, Pedersen BK. Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2003;23(1):15-39.
- [100] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(1):44-84.
- [101] Sendur OF, Turan Y, Tastaban E, Serter M. Antioxidant status in patients with osteoporosis: a controlled study. *Joint Bone Spine*. 2009;76(5):514-8.
- [102] Muthusami S, Ramachandran I, Muthusamy B, et al. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2005;360(1-2):81-6.
- [103] Rached MT, Kode A, Xu L, et al. FoxO1 is a positive regulator of bone formation by favoring protein synthesis and resistance to oxidative stress in osteoblasts. *Cell metabolism*. 2010;11(2):147-60.
- [104] Iyer S, Ambrogini E, Bartell SM, et al. FOXOs attenuate bone formation by suppressing Wnt signaling. *J Clin Invest*. 2013;123(8):3409-19.
- [105] Alikhani M, Roy S, Graves DT. FOXO1 plays an essential role in apoptosis of retinal pericytes. *Molecular vision*. 2010;16:408-15.
- [106] Ito Y, Daitoku H, Fukamizu A. Foxo1 increases pro-inflammatory gene expression by inducing C/EBPbeta in TNF-alpha-treated adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;378(2):290-5.
- [107] Wang DT, Yin Y, Yang YJ, et al. Resveratrol prevents TNF-alpha-induced muscle atrophy via regulation of Akt/mTOR/FoxO1 signaling in C2C12 myotubes. *International immunopharmacology*. 2014;19(2):206-13.
- [108] Kayal RA, Siqueira M, Alblowi J, et al. TNF-alpha mediates diabetes-enhanced chondrocyte

- apoptosis during fracture healing and stimulates chondrocyte apoptosis through FOXO1. *J Bone Miner Res.* 2010;25(7):1604-15.
- [109] Savai R, Al-Tamari HM, Sedding D, et al. Pro-proliferative and inflammatory signaling converge on FoxO1 transcription factor in pulmonary hypertension. *Nat Med.* 2014;20(11):1289-300.
- [110] Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:629-48.
- [111] Karsenty G. Transcriptional control of skeletogenesis. *Annual review of genomics and human genetics.* 2008;9:183-96.
- [112] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000;408(6809):239-47.
- [113] Guttilla IK, White BA. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry.* 2009;284(35):23204-16.
- [114] Wu L, Li H, Jia CY, et al. MicroRNA-223 regulates FOXO1 expression and cell proliferation. *FEBS letters.* 2012;586(7):1038-43.
- [115] Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ, et al. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer. *Cancer research.* 2010;70(1):367-77.
- [116] Houssein LK, Hinault C, Lebrun P, Gautier N, Paul-Bellon R, Van Obberghen E. miR-139 impacts FoxO1 action by decreasing FoxO1 protein in mouse hepatocytes. *Biochemical and biophysical research communications.* 2009;390(4):1278-82.
- [117] Kim KM, Park SJ, Jung SH, et al. miR-182 is a negative regulator of osteoblast proliferation, differentiation, and skeletogenesis through targeting FoxO1. *J Bone Miner Res.* 2012;27(8):1669-79.
- [118] Finkel T. Radical medicine: treating ageing to cure disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(12):971-6.
- [119] Mares J. Food antioxidants to prevent cataract. *JAMA.* 2015;313(10):1048-9.

附 录

个人简历和研究成果

个人简介:

廖立, 男, 1982年3月生于贵州安顺, 汉族, 中共党员

受教育经历

2009/09 至今, 第四军医大学, 口腔医学院, 硕博连读研究生

2000/09-2005/06, 第四军医大学, 口腔医学院, 学员

发表学术论文:

第一及共同第一作者 SCI 文章

[1] Liao L, Su X, Yang X, Hu C, Li B, Lv Y, et al. TNF- α Inhibits FoxO1 by Up-regulating MiR-705 to Aggravate Oxidative Damage in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells during Osteoporosis. *Stem Cells*. 2015.

[2] Liao L, Yang X, Su X, Hu C, Zhu X, Yang N, et al. Redundant miR-3077-5p and miR-705 mediate the shift of mesenchymal stem cell lineage commitment to adipocyte in osteoporosis bone marrow. *Cell death & disease*. 2013;4:e600.

[3] Jing H, Liao L, An Y, Su X, Liu S, Shuai Y, et al. Suppression of EZH2 Prevents the Shift of Osteoporotic MSC Fate to Adipocyte and Enhances Bone Formation During Osteoporosis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2016;24:217-29.

[4] Su X, Liao L, Shuai Y, Jing H, Liu S, Zhou H, et al. MiR-26a functions oppositely in osteogenic differentiation of BMSCs and ADSCs depending on distinct activation and roles of Wnt and BMP signaling pathway. *Cell death & disease*. 2015;6:e1851.

[5] Shao B, Liao L, Yu Y, Shuai Y, Su X, Jing H, et al. Estrogen preserves Fas ligand levels by inhibiting microRNA-181a in bone marrow-derived mesenchymal stem cells to maintain bone remodeling balance. *FASEB J*. 2015;29:3935-44.

共同作者 SCI 文章

- [1] Li Y, Fan L, Hu J, Zhang L, Liao L, Liu S, et al. MiR-26a Rescues Bone Regeneration Deficiency of Mesenchymal Stem Cells Derived From Osteoporotic Mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2015;23:1349-57.
- [2] Yang N, Wang G, Hu C, Shi Y, Liao L, Shi S, et al. Tumor necrosis factor alpha suppresses the mesenchymal stem cell osteogenesis promoter miR-21 in estrogen deficiency-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2013;28:559-73.
- [3] He X, Zhang W, Liao L, Fu X, Yu Q, Jin Y. Identification and characterization of microRNAs by high through-put sequencing in mesenchymal stem cells and bone tissue from mice of age-related osteoporosis. *PloS one*. 2013;8:e71895.
- [4] Li C, Li B, Dong Z, Gao L, He X, Liao L, et al. Lipopolysaccharide differentially affects the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells through Toll-like receptor 4 mediated nuclear factor kappaB pathway. *Stem cell research & therapy*. 2014;5:67.
- [5] Chen X, Hu C, Wang G, Li L, Kong X, Ding Y, et al. Nuclear factor-kappaB modulates osteogenesis of periodontal ligament stem cells through competition with beta-catenin signaling in inflammatory microenvironments. *Cell death & disease*. 2013;4:e510.

第一作者中文文章

- [1] 廖立, 苏晓霞, 金岩. 抗氧化酶系统异常导致衰老骨髓间充质干细胞的成骨分化能力下降[J]. *口腔生物医学*, 2015, 03: 113-118.
- [2] 廖立, 杨小红, 金岩. 骨髓间充质干细胞功能异常在雌激素所致骨质疏松发病中的作用研究[J]. *创伤外科杂志*, 2012, 01: 61-65.
- [3] 廖立, 杨小红, 金岩. 骨质疏松发病过程中骨髓间充质干细胞差异性表达 microRNA 的筛选及其在干细胞多向分化中的功能[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2012, 01: 75-80.

参编专著

金岩等, 组织工程与再生医学, 人民卫生出版社. 100 万字, 2014, 参编

学术奖励

2013 年获全国组织工程与再生医学大会青年研究者优秀论文评选一等奖

2013 年获第四军医大学口腔医院学术年会二等奖

2014 年获选参加德国林岛诺贝尔奖获得者大会

2015 年获第四届口腔生物医学优秀青年研究奖三等奖

致 谢

时间的流逝悄然又厚重。悄然如白驹过隙，虽然还清晰记得入学报道时的情景，现在却已经要面临离校的惜别了。厚重如冰川漂移，时间不但走过，还留下了无数无法抹去的痕迹。这一路上，最为深刻和无法磨灭的是一位位老师、一位位亲人、一位位同学、一位位朋友，在我的路上搭起的灯塔、伸出的援手、提供的帮助。可以说，没有这一切，就没有我的这番旅途，也没有了途中绝美的风景。

首先，最感激的是我的导师金岩教授。您的渊博学识、深厚造诣，将我带进生命科学的殿堂；您的高瞻远瞩，目光精准，为我指明人生的方向；您的披荆斩棘、一往无前，让我明白事业上的勇与谋；您的知行合一、硕果累累，让我明白科学工作者的责任与荣耀；您的豁达开朗、为人处事，让我学到了大家风范。您不仅仅是我的老师，更是我人生的向导、领路人和扶持者。不管在学习、工作还是生活中，只要在我遇到困难的时候，您总会立刻出手相助、指点迷津。能够成为您的学生，使我一生的幸运。

感谢口腔组织病理学教研室的周峻教授、董绍忠教授、刘源教授，是您们的言传身教、耐心指导，使我不断的学习成长，掌握扎实的专业基础知识。

感谢组织工程中心的张勇杰老师、倪华老师、王卫华老师、许小林老师，管江涛老师、毋妮老师、刘文婷老师，樊莹老师，张磊磊老师、田荣老师、李莉老师、高福利老师，使我得以熟练掌握各项试验技术，顺利突破一道道困难。同时感谢在实验中帮助过我的堵斌老师、周德顺老师、王宝琴老师、王电虎老师。

感谢在组织工程中心一同交流学习奋斗过的唐亮博士、郭维华博士、胡成虎博士、刘世宇博士、刘文佳博士、李蓓博士、陈小燕博士、孔祥伟博士、明磊国硕士、张立强硕士、何小宁博士、赵盼硕士，是你们带我融入了中心这个大家庭，不仅获得了学业上的帮助，更感受到家的温暖。

感谢在组织工程中心干细胞与骨衰老课题组中一同学习工作过的杨晓红博士，帅逸博士，景欢博士，邵秉一硕士，于洋硕士，时炳正硕士，常鹤然硕士，张立超硕士，付欣硕士，周游博士，张昕景博士，杜建宇硕士，朱小斐硕士，范龙坤硕士，

是你们的帮助和支持使得研究课题能够顺利进行。

感谢我的同学张安生博士，杨擎天博士，谢诚博士，张磊博士，许波硕士，不是关键时刻你们的鼓励与支持，我可能会与这段学习生涯失之交臂

感谢解放军第 59 中心医院的院领导和政治处工作人员，是您们对人才的重视和对个人前途的考虑让我顺利的入学并圆满完成学业。

感谢我和父母对我的选择无限的支持，默默的在身后哺育、培养、照顾、关心我三十余载，如今我已成家立业，到了回报您们的时候了。

最后，要特别感谢我的爱人苏晓霞，不仅感谢她能够毫不犹豫的选择成为一名军人的妻子，感谢她为我生命带来的幸福和快乐，更要感谢她在我身边无时无刻的理解、关心、照顾，使我勇于追寻自己的理想；特别是在怀孕期间都尽量保证我工作和学习的时间，默默的承担了绝大部分辛苦。