

· 基础研究 ·

清络通痹方对佐剂性关节炎大鼠破骨细胞分化
相关 miRNA 表达的影响彭孝武¹ 周玲玲² 朱亚梅¹ 周学平¹

摘要 **目的** 观察清络通痹方(Qingluo Tongbi Compound, QTC)对佐剂性关节炎(adjuvant induced arthritis, AIA)大鼠骨破坏相关 miRNA 表达的影响,探讨其治疗类风湿关节炎的机制。**方法** 建立 AIA 大鼠滑膜成纤维细胞和单核细胞共培养诱导破骨样细胞模型,应用 miRNA 芯片的方法初步筛选破骨细胞分化后期 miRNA 的异常表达谱,并采用实时定量 PCR(RT-PCR)对芯片结果进行验证。制备 QTC 含药血清和空白血清,将破骨细胞随机分为空白组、空白血清组及 QTC 组,采用 RT-PCR 检测 QTC 对差异表达 miRNA 的影响,并应用生物信息学软件对关键性 miRNA 进行分析。**结果** 与单核细胞比较,破骨样细胞分化过程中存在明显差异表达的 miRNAs 共 211 个,其中表达上调 88 个,表达下调 123 个。RT-PCR 验证结果与芯片检测结果表达趋势一致。RT-PCR 结果显示, QTC 干预后 miR-140-5p 表达明显上调,生物信息学分析结果显示 miR-140-5p 靶基因显著富集在肌动蛋白细胞骨架的调节、Ras 信号通路、cAMP 信号通路和 Rap1 信号通路等信号通路上。**结论** 破骨样细胞分化后期存在多种 miRNAs 失调, QTC 可能通过影响 miR-140-5p 的表达参与调控破骨细胞的分化。

关键词 清络通痹方; microRNA; 类风湿关节炎; 破骨细胞

Effect of Qingluo Tongbi Compound on Osteoclast Differentiation-related miRNA Expressions in Adjuvant Induced Arthritis Rats PENG Xiao-wu¹, ZHOU Ling-ling², ZHU Ya-mei¹, and ZHOU Xue-ping¹ 1 First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210023); 2 College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210023)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Qingluo Tongbi Compound (QTC) on osteoclast differentiation-related miRNA expressions in adjuvant induced arthritis (AIA) rats, and to study its mechanism for treating rheumatoid arthritis (RA). **Methods** The synovial fibroblasts and monocytes of peripheral blood from AIA rats were co-cultured to induce osteoclast-like cells. Differently expressed miRNAs in the late stage osteoclasts differentiation were detected by miRCURY™ Array. Real-time quantitative PCR (RT-PCR) was applied to verify the reliability of miRNA array. QTC drug-containing sera and blank sera were prepared and added to the co-cultured system. The osteoclasts were randomly divided into three groups, the blank group, the blank serum group, and the QTC group. RT-PCR was applied to detect the effect of QTC on related differentially expressed miRNAs. Bioinformatics software was applied to analyze related differentially expressed miRNAs. **Results** miRNA array results showed that as compared with the monocytes group, there were 211 miRNAs differentially expressed in osteoclast-like cell differentiation, including 88 up-regulated miRNAs and 123 down-regulated miRNAs. Results of RT-PCR were consistent with results of the array. RT-PCR showed that the expression level of miR-140-5p was obviously up-regulated after the intervention of QTC. Results of bioinformatics analyses showed that the target gene of miR-140-5p was significantly enriched in signaling pathways such as the regulation of actin cytoskeleton, Ras signaling pathways, cAMP signaling pathways, and Rap1 signaling pathways. **Conclusions** There were various dysregu-

基金项目:国家基金预研基金资助项目(N0.14XY01)

作者单位:1.南京中医药大学第一临床医学院(南京 210023);2.南京中医药大学药学院(南京 210023)

通讯作者:周学平, Tel:13901592816, E-mail:zxp@njutcm.edu.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2016.10.1213

lated expressions of miRNAs in the anaphase of osteoclast-like cells differentiation. QTC participated the regulation of osteoclast differentiation by effecting the expression of miR-140-5p.

KEYWORDS Qingluo Tongbi Compound; microRNA; rheumatoid arthritis; osteoclast

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种临床常见的慢性系统性自身免疫病,患病率和致残率较高,致残原因主要由关节骨侵蚀引起。已知在 RA 早期即可发生骨质破坏^[1],目前研究认为,破骨细胞是引起 RA 骨破坏的关键细胞之一^[2],因此探讨骨侵蚀的病理机制,寻找与 RA 骨破坏相关的基因和分子,对于 RA 的诊断和治疗尤为重要。microRNA(miRNA)是一类内源性的长度约为 22 个核苷酸的非编码 RNA,通过调控其靶基因发挥生物学作用。已有研究表明,miRNA 在破骨细胞的分化过程中也扮演重要的角色^[3]。

清络通痹方(Qingluo Tongbi Compound, QTC)是依据国医大师周仲瑛教授多年的临床实践经验选药组方,课题组前期研究表明其对佐剂关节炎(adjuvant induced arthritis, AIA)大鼠的免疫功能、滑膜炎和骨质破坏均有良好的改善作用^[4]。另外研究发现, QTC 参与抑制破骨细胞的分化^[5,6]。因此笔者推测 QTC 能通过调控破骨细胞分化过程中 miRNA 的表达干预 RA 的骨破坏过程。通过建立滑膜成纤维细胞(synovial fibroblasts, SFs)和外周血单核细胞共培养诱导破骨样细胞(osteoclast-like cell, OLC)的体系可有效体外模拟 RA 的体内病理过程。本研究在前期实验基础上,采用此共培养体系诱导 OLC,应用 miRNA 芯片的方法初步筛选破骨细胞分化后期 miRNA 的异常表达谱,并通过实时定量 PCR 对芯片结果进行验证并检测 QTC 对差异表达 miRNA 的影响;应用生物信息学软件对相关 miRNA 进行靶基因预测和生物学功能、信号通路分析,初步探索 RA 骨侵蚀与 miRNA 的内在联系,为进一步阐明 QTC 治疗 RA 的机制提供新的线索。

材料与方法

1 动物 70 只 8 周龄 SPF 级成年雄性 SD 大鼠,由南京中医药大学实验动物中心供应,动物合格证号:SYXK(苏)2015-0003,体重 180~220 g,室温(23±3)℃,湿度 40%~70%。动物给予全价颗粒饲料(江苏协同医药生物有限公司)喂养,自由饮水,每日光照/黑暗各 12 h。动物适应性饲养 3 天后进行试验。

2 药物 QTC 由雷公藤 15 g 青风藤 15 g 生

地 10 g 僵蚕 10 g 三七 3 g 组成,水提液由江苏省植物药研究与新药开发中心提供, QTC 水提液含生药 1.29 g/mL,使用前蒸馏水稀释。

3 试剂与仪器 卡介苗减毒活疫苗冻干粉(批号:20140623,上海瑞楚生物科技有限公司)。RPMI 1640 培养液(批号:8116135)及 α-MEM 培养液(批号:8115429)均购自 GIBCO 公司。大鼠外周血淋巴细胞分离液(天津灏洋华科生物科技有限公司,批号:G20140526)。抗酒石酸酸性磷酸酶染液(南京建成生物工程研究所,批号:20140213)。Trizol(批号:79403,美国 Life Technologies 公司)。miRCURY™ Array Power Labeling Kit(批号:208032-A,丹麦 Exiqon 公司)。miRCURY™ Array, Wash Buffer Kit(批号:208021,丹麦 Exiqon 公司)。荧光定量 PCR(型号:Lightcycler96,罗氏公司);紫外分光光度计(型号:ND-1000, USA Thermo 公司);Axon GenePix 4000B 扫描仪(Axon Instruments, Foster City, CA);GenePix Pro 6.0 软件(Axon, CA)。

4 含药血清制备 将 20 只 SD 雄性大鼠随机分为空白对照组及 QTC 组(14.4 g 生药/kg,根据项目组前期研究^[7]相当于临床用量的 4 倍)。QTC 组 SD 大鼠按 1 mL/100 g 连续灌胃给药 1 周,空白对照组给予等剂量生理盐水灌胃,第 7 天于灌胃后 1 h 腹主动脉取血,离心后得血清,灭活,过滤除菌, -20℃ 冰箱保存备用。

5 AIA 大鼠 SFs 与单核细胞共培养模型的建立 参照参考文献[8],进行 AIA 大鼠造模。50 只 SD 雄性大鼠右后肢皮内注射弗氏完全佐剂 0.1 mL/只,饲养 28 天,可见大鼠双侧后肢充血肿胀。取新鲜抗凝血,以淋巴细胞分离液进行分离,获取单核细胞。大鼠颈椎脱臼处死,取双侧膝关节滑膜组织,剪成 1 mm×1 mm×1 mm 左右的组织块,使用无菌注射器将其均匀地置入培养瓶内,每个组织块间距约 5 mm。加入培养液,24 h 后换液。待组织块间生长的 SFs 彼此接触时,去除组织块,继续培养,传代。6 孔板内加入单核细胞作为诱导形成 OLC 的前体细胞,将传代至 3~5 代的 SFs 制备成细胞悬液,加入 6 孔培养板的悬挂式 Transwell 小室内,置 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 培养 3 周,诱导生成具有典型破骨细胞特征的 OLC,经抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色阳性的

多核(≥3 核)细胞为 OLC。

6 细胞分组及给药 共培养至第 19 天时,将细胞分为空白组、空白血清组及 QTC 含药血清组,设 3 个复孔,QTC 含药血清组及空白血清组分别给予 200 μL 含药血清及空白血清,空白组仅进行正常换液处理,继续培养 48 h。

7 总 RNA 提取与质量控制 OLC 共培养第 21 天,采用 Trizol 试剂分别提取各组细胞样本总 RNA。并对 RNA 进行定量和质量检测。

8 miRNA 芯片检测 miRNA 芯片检测与分析由上海康成生物技术有限公司完成。采用 miRCURY™ Array Power Labeling Kit 标记,再应用 miRCURY LNA Array(v. 18.0)进行芯片杂交。杂交后芯片用 Wash Buffer Kit 进行洗片,具体步骤按各试剂盒说明书进行。采用 Axon GenePix 4000B 扫描仪杂交后芯片进行图像扫描,所得数据通过原始值减去背景值进行修正,并用中值进行标准化,分别计算出样本中 miRNA 的标准值及比值。以两种样本比值≤0.5 或≥2 为标准判定差异表达 miRNA。

9 Real time PCR(RT-PCR)与 miRNA 芯片筛选差异表达结果验证 根据芯片检测所得结果,应用 RT-PCR 试剂盒对差异表达的 3 个 miRNAs(分别为 miR-30e-5p、miR-26a-5p、miR-140-5p)进一步验证芯片结果是否可靠。采用 Primer 5.0 设计引物,引物序列见表 1。按照试剂盒指定操作步骤扩增,进行 RT-PCR 反应,PCR 程序为:95 ℃,10 min;40 个 PCR 循环(95 ℃,10 s;60 ℃,60 s 收集荧光)。扩增反应结束后,按 95 ℃,10 s;60 ℃,60 s;95 ℃,15 s;并从 60 ℃缓慢加热到 99 ℃(仪器自动进行 Ramp Rate 为 0.05 ℃/s),建立 PCR 产物的熔解曲线。获得扩增曲线及 Ct 值。各样品的目的 miRNA 和内参 U6 分别进行 RT-PCR 反应。采用 U6 作为实验的内参基因进行归一化,数据采用 2^{-ΔΔCt}法进行分析,设置 3 个平行复孔,检测结果取平均值。

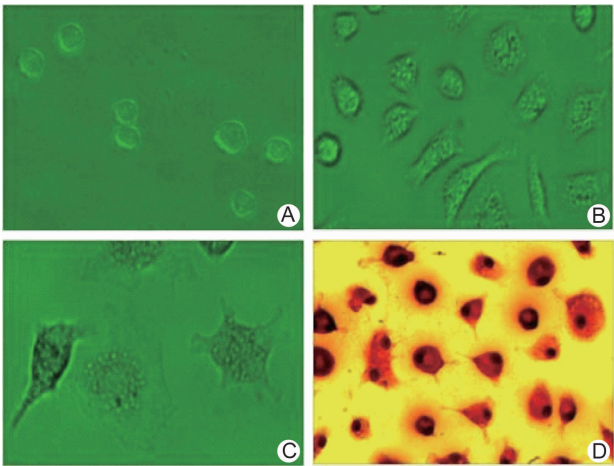
表 1 目的 miRNA 及内参基因引物序列	
基因	引物序列
rno-miR-30e-5p	GSP:5'-GGGTGTAACATCCTTGAC-3'
	R:5'-TGCCTGTCTGTTGAGTC-3'
rno-miR-26a-5p	GSP:5'-GGGTCAAGTAATCCAGG-3'
	R:5'-TGCCTGTCTGTTGAGTC-3'
rno-miR-140-5p	GSP:5'-CCCCAGTGGTTTACCTTA-3'
	R:5'-GTGCTGTCTGTTGAGTCG-3'
U6	F:5'-GCTTCGCGACGACATATACTAAAT-3'
	R:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGCAT-3'

10 生物信息学分析 采用 miRNA 常用靶基因预测数据库 Target 和 miRanda 对目的基因进行靶基因预测,取两个数据库预测的交集靶基因并进行功能富集分析(GO 分析)和 KEGG 信号通路(pathway)富集分析,筛选标准为 P<0.05。

11 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 OLC 鉴定(图 1) 镜下可见,细胞呈现不规则形态,细胞周边可见片状或者丝状伪足,多核。苏木素染色呈红色或红紫色颗粒部分为 TRAP 酶活性的部位所在,细胞核染色紫红色,由此鉴定共培养所生成的阳性多核细胞为 OLC。



注:A 为分化前;B 为分化中;C 为分化后;D 为 OLC TRAP 染色鉴定

图 1 OLC 鉴定 (×400)

2 RNA 质量控制 使用 NanoDrop ND-1000 对 RNA 进行定量并检测 RNA 质量,结果发现各样本 A₂₆₀/A₂₃₀ 比值均大于 1.8,说明杂质较少。A₂₆₀/A₂₈₀ 比值均接近 2.0,说明 RNA 纯度较好,符合 miRNA 芯片的质量要求。

3 miRNA 芯片筛选结果与验证 通过比较破骨样细胞与单核细胞 miRNAs 的表达谱,从中筛选出差异表达达到两倍以上 miRNAs,结果发现,OLC 中具有差异表达的 miRNAs 共有 211 个。其中表达上调的 miRNAs 有 88 个;表达下调的有 123 个;部分差异表达较为显著的 miRNAs 见表 2。

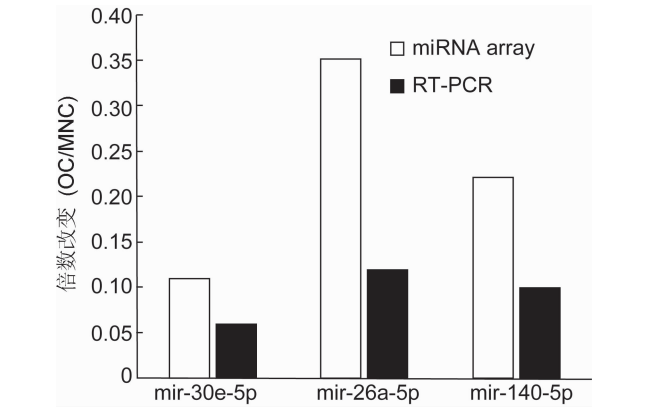
4 miRNA 芯片与 RT-PCR 结果验证(图 2) 根据芯片检测所得结果,应用实时定量 PCR 试剂盒

表 2 OLC 与单核细胞 miRNA 的差异表达(部分)

miRNA	OLC 与单核细胞的倍数比
rno-miR-214-3p	19.91 ↑
rno-miR-222-3p	13.80 ↑
rno-miR-124-5p	8.51 ↑
rno-miR-146a-5p	2.23 ↑
rno-miR-34a-5p	3.43 ↑
rno-miR-23a-5p	0.39 ↓
rno-miR-223-3p	0.25 ↓
rno-miR-140-5p	0.22 ↓
rno-let-7g-5p	0.22 ↓
rno-miR-26a-5p	0.35 ↓
rno-miR-30e-5p	0.11 ↓
rno-miR-23a-5p	0.39 ↓

注: ↑表示倍数 >2,表达上调; ↓表示倍数 <0.5,表达下调

对差异表达的 3 个 miRNAs 进一步验证,结果显示,与单核细胞比较,OLC 中 miR-30e-5p、miR-26a-5p 和 miR-140-5p 的表达倍数分别为 0.06、0.12 和 0.10,而在芯片中三者表达倍数分别为 0.11 倍、0.35 倍和 0.22 倍。通过比对发现,miRNA 芯片检测结果与 RT-PCR 检测结果具有良好的一致性,表明芯片筛选结果可靠。



注:OC 为破骨细胞; MNC 为单核细胞

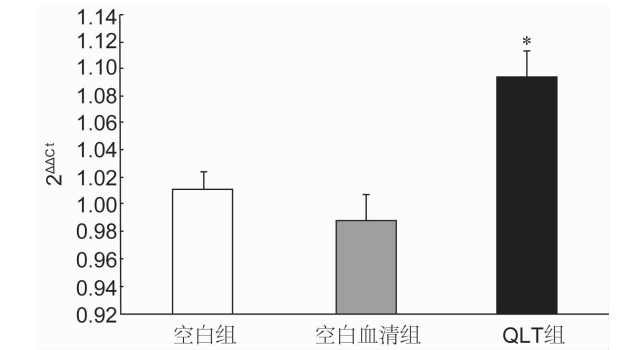
图 2 miRNA 芯片与 RT-PCR 结果验证

5 各组 OLC miR-140-5p 相对表达水平比较 (图 3) 空白组 miR-140-5p 相对表达量为 (1.012 ± 0.012),空白血清组为 (0.989 ± 0.020),两组比较,差异无统计学意义 (P > 0.05);QTC 组相对表达量为 (1.090 ± 0.020),与空白组及空白血清组比较,其表达水平明显上调 (P < 0.01)。

6 生物信息学分析

6.1 miR-140-5p 靶基因预测结果(表 3) 应用 Targetscan 和 miRanda 2 个数据库对 miR-140-5p 进行靶基因预测并取交集基因,Targetscan 预测的靶基因有 462 个,miRanda 有 958 个,二者交集基

因共 175 个。部分交集基因结果见表 3。



注:与空白组及空白血清组比较,*P < 0.01

图 3 各组 OLC miR-140-5p 相对表达水平比较

表 3 Targetscan 和 miRanda 中的 miR-140-5p 部分交集基因

miR-140-5p 预测靶基因	miR-140-5p 预测靶基因
Nbr1	Irf7
Abhd6	Wnk4
Ppp1cc	Slc7a5
Ngfr	Paqr4
Map3k12	Reep6
Map2k1	Rap1b
Tgfr1	Glud1
IL-10	Taf9l
Map2k1ip1	Bet1
Tbrg1	Acs16

6.2 miR-140-5p 靶基因功能的 GO 分析 (图 4) miR-140-5p 交集基因的显著性功能分析结果包括细胞膜、细胞质等细胞器的形成等。

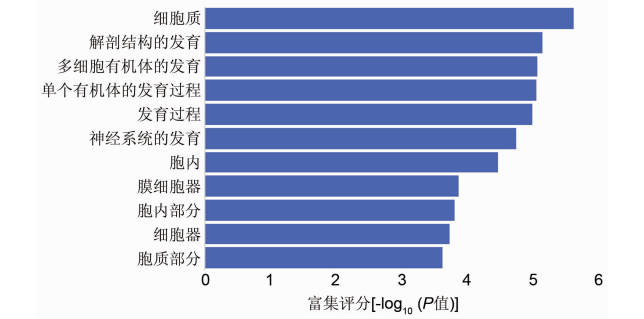


图 4 miR-140-5p 潜在作用靶标 GO 生物学过程富集分析

6.3 miR-140-5p 预测靶基因的 pathway 富集分析(图 5) 采用 DAVID 数据库对其进行基于 KEGG 数据库的 pathway 富集分析,靶基因集合的信号传导通路富集分析显示 miR-140-5p 的靶基因主要参与受体相互作用通路主要富集在肌动蛋白细胞骨架

的调节、精氨酸和脯氨酸代谢、Ras 信号通路、cAMP 信号通路、Rap1 信号通路、代谢和肿瘤等。

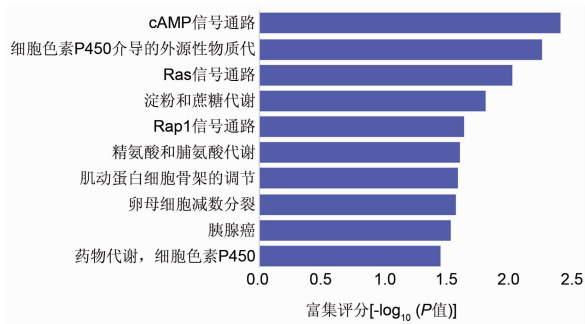


图5 miR-140-5p 潜在作用靶标 pathway 的富集分析

讨论

RA 的致残率高,其主要原因为关节骨侵蚀,目前研究认为破骨细胞是引起 RA 骨破坏的关键细胞之一,因此延缓及阻止骨破坏的发生与发展是临床治疗 RA 的重要环节^[2]。

miRNA 通过调控靶基因的表达,在破骨细胞的分化、成熟及骨吸收过程中起着重要的调节作用^[3],目前已有研究证实,在 RA 患者和实验性关节炎动物体内均存在 miRNAs 的失调^[9]。本研究通过对 OLC 分化后期 miRNAs 表达谱的筛选及验证,结果表明, SFs 与单个核细胞共培养体系诱生的 OLC 在其分化后期中存在异常表达的 miRNAs 有 211 个,其中一些 miRNAs 在 OCL 分化中的作用已得到证实:(1)影响细胞因子的生成,如 miR-23 的下调可导致前炎症因子 TNF、IL-1 β 、IL-17 的产生,miR-146 可影响 TNF 和 OLC 分化因子(receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)的生成^[10]等;(2)干预信号蛋白的表达,如 miR-26a 可上调 DC-STAMP 的表达^[11]、miR-146a 可抑制 TRAF6 的表达,从而减轻胶原性关节炎的骨质破坏^[12];(3)调控破骨细胞的分化和活化,如 miR-222-3p 通过抑制组织蛋白酶 K 等抑制破骨细胞的分化^[13],如 miR-223 和 miR-124 等可影响破骨细胞分化中的迁移、增殖、TRAP 活性和骨吸收过程^[14,15]。提示多种 miRNA 参与了共培养模型 OLC 的分化。

目前国内外已有对 miR-140-5p 的在疾病中作用的研究报道,主要集中在肿瘤方面,miR-140-5p 可通过调控 smad2、血小板源性生长因子受体 α 多肽 (platelet-derived growth factor receptor α , PDGFRA)^[16]、TNF- α ^[17]、基质金属蛋白酶-13(ma-

trix metalloproteinase-13, MMP-13)^[18]等细胞因子、TGF- β 、骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2)等信号分子参与调控细胞的分化、增殖、迁移等过程^[19,20]。其中 MMPs、smad2、PDGFRA、TNF- α 、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、BMP2 也参与了破骨细胞的分化过程,如 MMPs、TNF- α 均可促进破骨细胞的生成^[21]。BMP 是一种广泛存在于骨基质中的酸性糖蛋白,是 TGF- β 超家族中最大的一族,smad/BMP 信号也参与调节破骨细胞的分化过程^[22]。本研究 RT-PCR 结果显示,破骨细胞分化后期 miR-140-5p 下调较为明显,而 QTC 干预后可上调 miR-140-5p 的表达水平,提示 miR-140-5p 可能是 QTC 调控 OLC 分化 miRNA 网络的重要靶位之一。生物信息学分析发现,miR-143 的靶基因中有 Map3k12、Map2k1、Tgfb1、IL10、PDGFRA、smad2 等,并参与了细胞膜、细胞质等细胞器的形成等生物过程;信号通路显著富集在肌动蛋白细胞骨架的调节、Ras 信号通路、cAMP 信号通路、Rap1 信号通路、代谢等信号通路上,其中 smad、Tgfb1^[23]、肌动蛋白细胞骨架的调节^[24]、cAMP 信号通路^[25]等可能与 RA 骨破坏中 OLC 分化过程密切相关。QTC 通过影响 miR-140-5p 的表达参与调控破骨细胞的分化,进而参与 RA 骨破坏的发生。

综上所述,OLC 分化后期存在多种 miRNA 的失调,QTC 可能通过干预多种 miRNA 的表达参与抑制 OLC 的分化,笔者推测 miR-140-5p 可能作为关键性 miRNA 参与其中。本研究为进一步认识 QTC 干预 AIA 骨破坏机制提供新的线索,但其具体调路径及机制仍有待通过转染等技术进行更明确的深入研究。

参考文献

- [1] Hayer S, Redlich K, Korb A, et al. Tenosynovitis and osteoclast formation as the initial preclinical changes in a murine model of inflammatory arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2007, 56 (1): 79-88.
- [2] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL, et al. Osteoclast differentiation and activation [J]. Nature, 2003, 423: 337-342.
- [3] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N, et al. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers insight [J]. Nat Rev Genet, 2008, 9(2): 102-114.
- [4] 周玲玲,柳璋璞,周聪,等.清络通痹颗粒通过 MAPKs 信号通路干预共培养诱生的破骨样细胞的分化 [J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(12): 1235-1239.

- [5] 韩越, 王逸萍, 周玲玲, 等. 清络通痹颗粒对佐剂性关节炎大鼠骨质破坏影响的研究[J]. 中国药房, 2007, 18(36): 2814–2816.
- [6] 周玲玲, 柳璋璞, 梁晓雯, 等. 清络通痹颗粒对滑膜成纤维细胞与单核细胞共培养诱生的破骨样细胞的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2011, 37(11): 988–992.
- [7] Liu TY, Zhou LL, Zhou C. Inhibition mechanism of Qingluo Tongbi Granule on osteoclast differentiation induced by synovial fibroblast and monocytes co-culture in adjuvant-induced arthritic rats [J]. Chin J Integr Med, 2015, 21(4): 291–298.
- [8] 徐叔云, 卞如濂, 陈修主编. 药理实验方法学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 723–723.
- [9] Kurowska-Stolarska M, Alivernini S, Ballantine LE, et al. microRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108: 11193–11198.
- [10] Kagiya T, Nakamura S. Expression profiling of microRNAs in RAW264.7 cells treated with a combination of tumor necrosis factor alpha and RANKL during osteoclast differentiation [J]. J Periodontal Res, 2013, 48(3): 373–385.
- [11] Kim K, Kim JH, Kim I, et al. microRNA-26a regulates RANKL-induced osteoclast formation [J]. Molec Cells, 2015, 38(1): 75–80.
- [12] Nakasa T, Shibuya H, Nagata Y, et al. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2011, 63: 1582–1590.
- [13] Takigawa S, Chen A, Wan Q, et al. Role of miR-222-3p in c-Src-mediated regulation of osteoclastogenesis [J]. Int J Molec Sci, 2016, 17(2): E240.
- [14] Shibuya H, Nakasa T, Adachi N, et al. Over-expression of microRNA-223 in rheumatoid arthritis synovium controls osteoclast differentiation [J]. Modern Rheumatol, 2013, 23: 674–685.
- [15] Lee Y, Kim HJ, Park CK, et al. microRNA-124 regulates osteoclast differentiation [J]. Bone, 2013, 56(2): 383–389.
- [16] Lan H, Chen W, He G. miR-140-5p inhibits ovarian cancer growth partially by repression of PDGFRA [J]. Biomed Pharmacother, 2015, 75: 117–122.
- [17] Jude JA, Dileepan M, Subramanian S, et al. miR-140-3p regulation of TNF-alpha-induced CD38 expression in human airway smooth muscle cells [J]. Am J Physiol Lung Cellular Molec Physiol, 2012, 303(5): L4690–L4698.
- [18] Tardif G, Hum D, Pelletier JP, et al. Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes [J]. BMC Musculoskeletal Disord, 2009, 10(2): 148.
- [19] Zhai H, Fesler A, Ba Y, et al. Inhibition of colorectal cancer stem cell survival and invasive potential by hsa-miR-140-5p mediated suppression of Smad2 and autophagy [J]. Oncotarget, 2015, 6(23): 19735–19746.
- [20] Hwang S, Park SK, Lee HY, et al. miR-140-5p suppresses BMP2-mediated osteogenesis in undifferentiated human mesenchymal stem cells [J]. FEBS Lett, 2014, 588(17): 2957–2963.
- [21] Qi J, Hu KS, Yang HL, et al. Roles of TNF- α , GSK-3 β and RANKL in the occurrence and development of diabetic osteoporosis [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(10): 11995–12004.
- [22] Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, et al. BMP2 regulates osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation [J]. J Biol Chem, 2008, 283(43): 29119–29125.
- [23] Yasui T, Kadono Y, Nakamura M, et al. Regulation of RANKL-induced osteoclastogenesis by TGF- β through molecular interaction between Smad3 and Traf6 [J]. J Bone Miner Res, 2011, 26(7): 1447–1456.
- [24] Coury F, Zenger S, Stewart AK, et al. SLC4A2-mediated Cl⁻/HCO₃⁻ exchange activity is essential for calpain-dependent regulation of the actin cytoskeleton in osteoclasts [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(6): 2163–2168.
- [25] Bassett JH, van der Spek A, Logan JG, et al. Thyrostimulin regulates osteoblastic bone formation during early skeletal development [J]. Endocrinology, 2015, 156(9): 3098–3113.

(收稿: 2016-05-19 修回: 2016-06-19)