

· 基础研究 ·

# miR-133a 对骨形态发生蛋白 2 诱导的鼠前成骨细胞分化的影响及其作用机制

丁永利, 陈星, 赵明明, 蔡一强, 姜勇

(河南中医学院第一附属医院, 河南 郑州 450000)

**摘要 目的:**探究 miR-133a 对骨形态发生蛋白 2 诱导的鼠前成骨细胞分化的影响及其作用机制。**方法:**检测骨形态发生蛋白 2 诱导的鼠前成骨细胞分化过程中 miR-133a 水平、碱性磷酸酶活性、Runx-2 蛋白水平及 Osterix 蛋白水平, 检测转染 miR-133a 后鼠前成骨细胞分化过程中碱性磷酸酶活性、Runx-2 mRNA 水平、Runx-2 蛋白水平、Osterix mRNA 水平和 Osterix 蛋白水平。miR-133a 测定采用 qRT-PCR 法, Runx-2 和 Osterix 蛋白水平测定采用 Western-blot 法, Runx-2 和 Osterix mRNA 水平测定采用 RT-PCR 法, 碱性磷酸酶活性检测采用碱性磷酸酶检测试剂盒。采用 HEK293 细胞进行 miR-133a 靶基因验证实验, 细胞中荧光值的检测采用荧光素酶报告基因检测系统。**结果:**miR-133a 在骨形态发生蛋白 2 诱导的 MC3T3-E1 细胞分化过程中表达显著下调, 碱性磷酸酶的活性则显著增高。转染 miR-133a 后, 细胞中碱性磷酸酶活性受到明显抑制, Runx-2 蛋白水平显著下调、Runx-2 mRNA 水平未发生明显变化, Osterix 的 mRNA 和蛋白水平均明显下调。荧光素酶报告基因检测结果显示, miR-133a 可靶向作用于 Runx-2 mRNA 的 3'-UTR 区。**结论:**miR-133a 通过抑制 Runx-2 的蛋白表达进而抑制骨形态发生蛋白 2 诱导的鼠前成骨细胞分化过程。

**关键词** 微 RNAs 成骨细胞 骨形态发生蛋白质 2 miR-133a Runx-2 Osterix 碱性磷酸酶 动物实验

**Effect of miR-133a on differentiation of murine preosteoblasts induced by bone morphogenetic protein 2 and the mechanism of action** Ding Yongli\*, Chen Xing, Zhao Mingming, Cai Yiqiang, Jiang Yong. \*The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, Henan, China

**ABSTRACT Objective:**To explore the effect of miR-133a on differentiation of murine preosteoblasts induced by bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and the mechanism of action. **Methods:** The miR-133a levels, alkaline phosphatase (ALP) activities, Runx-2 protein levels and Osterix protein levels were detected in the process of murine preosteoblast differentiation induced by BMP 2. The ALP activities, Runx-2 mRNA levels, Runx-2 protein levels, Osterix mRNA levels and Osterix protein levels were detected in the process of murine preosteoblast differentiation after miR-133a transfection. The qRT-PCR assays was used for miR-133a determination, Western-blot for Runx-2 and Osterix protein levels determination, RT-PCR for Runx-2 and Osterix mRNA levels determination and ALP Assay Kit for ALP activities determination. HEK293 cells were used to verify the target gene of miR-133a, and the luciferase reporter gene detection system was used for the determination of fluorescence value in cells. **Results:** A significant down-regulation of miR-133a expression was found in the process of MC3T3-E1 differentiation induced by BMP-2, while a significant increase was found in the ALP activities. After transfection of miR-133a, the ALP activities were inhibited significantly, and a significant down-regulation can be seen in the Runx-2 protein levels and the mRNA and protein levels of Osterix, while no evident changes was found in Runx-2 mRNA levels. The detection result of luciferase reporter gene showed that miR-133a can target the 3'-UTR region of Runx-2 mRNA. **Conclusion:** The miR-133a can suppress the murine preosteoblast differentiation induced by BMP-2 by suppressing the expression of Runx-2 protein.

**Key words** MicroRNAs; Osteoblasts; Bone morphogenetic protein 2; miR-133a; Runx-2; Osterix; Alkaline phosphatase; Animal Experimentation

miRNA 是一种长度约为 18~25 个核苷酸的非编码核糖核酸, 可与靶 mRNA 的 3' 端非编码区域非完全或完全配对结合, 起到降解靶 mRNA 或抑制靶 mRNA 翻译过程的作用<sup>[1-5]</sup>, 从而实现对基因表达的转录后调控。其中 miR-133a 是一类对于骨的发生有

重要调控作用的 miRNA, 在骨形态发生中发挥着重要作用<sup>[6]</sup>。Runx-2 是调控前成骨细胞分化为成骨细胞的关键因子, 与其下游基因 Osterix 在骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 诱导的前成骨细胞分化中发挥着重要作用。BMP 广泛存在于骨基质

中<sup>[7-8]</sup>,其中 BMP-2 在鼠成骨过程中可刺激碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、Osterix、骨钙素等的 mRNA 转录,间接调控骨的形成<sup>[9]</sup>。本研究从 miR-133a 入手,探究了 miR-133a 在 BMP-2 诱导的鼠前成骨细胞分化过程中的调控作用及其作用靶位。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验材料** MC3T3-E1 细胞系、胎牛血清、细胞培养液(ATCC 公司);BMP-2、Trizol(Invitrogen 公司);ECL 发光试剂盒、RIPA 细胞蛋白裂解液、琼脂糖(BioWest 公司);荧光实时定量试剂盒(Takara); $\beta$ -actin、兔抗 Runx-2、兔抗 Osterix(Sigma 公司);BSA 及 BCA 总蛋白定量试剂盒(Thermo Scientific 公司);HEK293、miR-133a、Runx-2、Osterix 及内参引物和 miR-133a 模拟物(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)。

**1.2 实验仪器** Exculture CO<sub>2</sub> 培养箱(Queensland 公司);ChemiDoc XRS 凝胶成像系统、iQ<sup>TM</sup>5 荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(Bio-Rad 公司);SimpliAmp PCR 仪(Applied Biosystems 公司);DYCP-31BN 电泳仪(北京六一仪器厂)。

## 2 方法

**2.1 BMP-2 诱导的鼠前成骨细胞分化过程中 miR-133a 水平、ALP 活性及 Runx-2、Osterix 蛋白水平测定** 将小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 接种于含 10% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基中,48 h 后更换为无血清的培养基继续培养 24 h。然后将其分为 2 组,观察组加入终浓度为 300 ng · mL<sup>-1</sup> 的 BMP-2,对照组不进行干预,继续培养,分别于 24 h、48 h、72 h 时取细胞测定 miR-133a 水平、ALP 活性及 Runx2 和 Osterix 蛋白水平。miR-133a 测定采用 qRT-PCR 法,Runx-2 和 Osterix 蛋白水平测定采用 Western-blot 法,ALP 活性检测采用 ALP 检测试剂盒。

**2.2 转染 miR-133a 后鼠前成骨细胞分化过程中 ALP 活性及 Runx-2、Osterix mRNA 和蛋白水平测定** 将 MC3T3-E1 细胞以每孔  $1 \times 10^5$  个 · mL<sup>-1</sup> 的密度接种于 6 孔培养板中,加入不含血清和抗生素的培养基培养 24 h。取 25 pmol · L<sup>-1</sup> miR-133a mimic 或 negative miRNA 1.25  $\mu$ L 稀释至 50  $\mu$ L Opti-DMEM 培养基中,再取 1.5  $\mu$ L lipofectamine 2000 稀释至 50  $\mu$ L Opti-DMEM 培养基中,分别混匀后将上述两种溶液混合,室温孵育 20 min,制备转染试剂。弃培养基,加入 400

$\mu$ L Opti-DMEM 孵育后,将 100  $\mu$ L 转染试剂加至相应细胞中,培养 24 h 后更换为正常培养基。将其分为 4 组,Ⅰ组不干预,Ⅱ组加入 300 ng · mL<sup>-1</sup> BMP-2 诱导,Ⅲ组转染 miR-133a mimic 并加 300 ng · mL<sup>-1</sup> BMP-2 诱导,Ⅳ组转染 negative miRNA 并加 300 ng · mL<sup>-1</sup> BMP-2 诱导。继续培养,分别于 24 h、48 h、72 h 时取细胞测定 ALP 活性、Runx-2 mRNA 水平、Osterix mRNA 水平、Runx-2 蛋白水平和 Osterix 蛋白水平。Runx-2 和 Osterix mRNA 水平测定采用 RT-PCR 法,Runx-2 和 Osterix 蛋白水平测定采用 Western-blot 法,ALP 活性检测采用 ALP 检测试剂盒。

**2.3 miR-133a 靶基因验证** 将 HEK293 细胞接种于 24 孔板培养,当细胞达到 80% ~ 90% 融合时进行转染。每孔取 100 ng 重组 pmirGLO 和 25 pmol Runx-2 RNA 稀释至 50  $\mu$ L Opti-DMEM 培养基中,再取 1.5  $\mu$ L lipofectamine 2000 稀释至 50  $\mu$ L Opti-DMEM 培养基中。将两者混匀,静置 20 min,弃培养基,加入 400  $\mu$ L Opti-DMEM 和 100  $\mu$ L 转染试剂,培养 6 h 后更换为含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基。将其分为 4 组,A 组加入 Runx2-3' UTR(构建的质粒中含有 Runx-2 基因 3' 非翻译区的荧光素酶报告基因表达体系),B 组加入 Runx-2-3' UTR 和 miR-133a mimic,C 组加入 Runx-2-3' UTR 和 negative RNA,D 组加入 mutant Runx-2-3' UTR 和 miR-133a mimic,转染 24 h 后进行荧光素酶报告基因检测。

**2.4 统计分析** 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,观察组和对照组 BMP-2 诱导后不同时点 MC3T3-E1 细胞中 miR-133a 水平、ALP 活性、Runx-2 和 Osterix 蛋白水平及 Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组转染 miR-133a 后不同时点 MC3T3-E1 细胞中 Runx-2、Osterix mRNA 和蛋白水平的比较采用重复测量资料的方差分析,Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组转染 miR-133a 后不同时点 MC3T3-E1 细胞中 ALP 活性的组间比较和 A、B、C、D 组荧光值的组间比较采用方差分析,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 3 结果

**3.1 BMP-2 诱导的鼠前成骨细胞分化过程中 miR-133a 水平、ALP 活性及 Runx-2、Osterix 蛋白水平测定结果** BMP-2 诱导 24 h、48 h 和 72 h 后,观察组 MC3T3-E1 细胞中 miR-133a 水平均低于对照组(表 1)。BMP-2 诱导 24 h 后 2 组细胞 ALP 活性比

较,差异无统计学意义;BMP-2 诱导 48 h 和 72 h 后,观察组 ALP 活性均高于对照组(表 2)。BMP-2 诱导 24 h、48 h 和 72 h 后,观察组 MC3T3-E1 细胞中 Runx-2 蛋白表达水平均高于对照组(表 3)。BMP-2 诱

导 24 h 后 2 组细胞 Osterix 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义;BMP-2 诱导 48 h 和 72 h 后,观察组 Osterix 蛋白表达水平均高于对照组(表 4)。

表 1 BMP-2 诱导后不同时间点 MC3T3-E1 细胞中 miR-133a 水平

组别	0 h	24 h	48 h	72 h	合计	F 值	P 值
观察组	0.92 ± 0.06	0.81 ± 0.04	0.65 ± 0.02	0.57 ± 0.04	0.74 ± 0.15	46.422	0.000
对照组	0.92 ± 0.06	0.91 ± 0.04	0.92 ± 0.04	0.92 ± 0.05	0.92 ± 0.04	0.062	0.978
合计	0.97 ± 0.05	0.87 ± 0.05	0.74 ± 0.04	0.78 ± 0.04	0.81 ± 0.07	22.399*	0.000*
t 值	0.000	3.327	11.429	9.966	89.097*	(F = 23.227, P = 0.000) #	
P 值	1.000	0.029	0.000	0.001	0.001*		

\* 主效应的 F 值和 P 值;#交互效应的 F 值和 P 值

表 2 BMP-2 诱导后不同时间点 MC3T3-E1 细胞中 ALP 活性

组别	0 h	24 h	48 h	72 h	合计	F 值	P 值
观察组	0.051 ± 0.005	0.073 ± 0.003	0.133 ± 0.015	0.200 ± 0.010	0.110 ± 0.060	143.688	0.000
对照组	0.052 ± 0.006	0.054 ± 0.006	0.051 ± 0.005	0.051 ± 0.005	0.050 ± 0.010	0.194	0.898
合计	0.060 ± 0.006	0.064 ± 0.005	0.124 ± 0.012	0.194 ± 0.011	0.096 ± 0.050	102.107*	0.000*
t 值	0.000	-5.292	-8.814	-23.083	452.420*	(F = 107.140, P = 0.000) #	
P 值	1.000	0.060	0.001	0.000	0.000*		

\* 主效应的 F 值和 P 值;#交互效应的 F 值和 P 值

表 3 BMP-2 诱导后不同时间点 MC3T3-E1 细胞中 Runx-2 蛋白水平

组别	0 h	24 h	48 h	72 h	合计	F 值	P 值
观察组	0.20 ± 0.02	0.32 ± 0.04	0.41 ± 0.03	0.56 ± 0.05	0.37 ± 0.14	54.327	0.000
对照组	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.227	0.875
合计	0.31 ± 0.02	0.38 ± 0.03	0.47 ± 0.03	0.64 ± 0.05	0.46 ± 0.12	35.624*	0.002*
t 值	0.000	-4.781	-10.991	-11.406	376.798*	(F = 36.953, P = 0.002) #	
P 值	1.000	0.009	0.000	0.000	0.000*		

\* 主效应的 F 值和 P 值;#交互效应的 F 值和 P 值

表 4 BMP-2 诱导后不同时间点 MC3T3-E1 细胞中 Osterix 蛋白水平

组别	0 h	24 h	48 h	72 h	合计	F 值	P 值
观察组	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.52 ± 0.02	0.31 ± 0.15	199.030	0.000
对照组	0.92 ± 0.06	0.91 ± 0.04	0.92 ± 0.04	0.92 ± 0.05	0.17 ± 0.02	0.455	0.721
合计	0.96 ± 0.05	0.95 ± 0.03	1.05 ± 0.04	1.32 ± 0.15	0.34 ± 0.12	137.833*	0.000*
t 值	0.000	0.000	-8.626	-22.045	117.823*	(F = 161.470, P = 0.000) #	
P 值	1.000	1.000	0.001	0.000	0.000*		

\* 主效应的 F 值和 P 值;#交互效应的 F 值和 P 值

**3.2 转染 miR-133a 后鼠前成骨细胞分化过程中 ALP 活性及 Runx-2、Osterix mRNA 和蛋白水平测定结果** 4 组细胞 ALP 活性比较,差异有统计学意义 [(0.010 ± 0.002), (0.102 ± 0.005), (0.052 ± 0.005), (0.107 ± 0.006), F = 268.784, P = 0.000]。Ⅲ组细胞 ALP 活性高于 I 组(P = 0.000),但低于 II 组和 IV 组(P = 0.000, P = 0.000)。转染 miR-133a 后 24 h、48 h、72 h,4 组细胞中 Runx-2 mRNA 水平比较,

差异无统计学意义;转染 miR-133a 后 24 h、48 h、72 h,Ⅲ组细胞中 Runx-2 蛋白水平均低于 II 组(P = 0.024, P = 0.019, P = 0.032)。见表 5、表 6。转染 miR-133a 后 24 h、48 h、72 h,Ⅲ组细胞中 Osterix mRNA 水平和蛋白水平均低于 II 组(P = 0.004, P = 0.001, P = 0.001; P = 0.008, P = 0.004, P = 0.021)。见表 7、表 8。

表 5 转染 miR-133a 后不同时间点 MC3T3-E1 细胞中 Runx-2 mRNA 水平

组别	24 h	48 h	72 h	合计	F 值	P 值
I 组	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.08	0.000	1.000
II 组	2.40 ± 0.20	4.01 ± 0.24	7.58 ± 0.51	4.66 ± 2.32	180.598	0.000
III 组	2.35 ± 0.24	4.14 ± 0.27	7.87 ± 0.32	4.79 ± 2.45	307.148	0.000
IV 组	2.47 ± 0.13	4.20 ± 0.14	7.83 ± 0.54	4.84 ± 2.38	202.417	0.000
合计	2.06 ± 0.66	3.34 ± 1.42	6.07 ± 3.08	4.07 ± 2.12	694.195 *	0.000 *
F 值	51.350	183.750	208.414	359.128 *	(F = 77.330, P = 0.000) #	
P 值	2.000	0.244	0.073	0.513 *		

\* 主效应的 F 值和 P 值;#交互效应的 F 值和 P 值

表 6 转染 miR-133a 后不同时间点 MC3T3-E1 细胞中 Runx-2 蛋白水平

组别	24 h	48 h	72 h	合计	F 值	P 值
I 组	0.31 ± 0.06	0.37 ± 0.03	0.42 ± 0.05	0.37 ± 0.03	1.440	0.071
II 组	0.53 ± 0.02	0.67 ± 0.06	1.04 ± 0.09	0.75 ± 0.10	20.250	0.001
III 组	0.47 ± 0.05	0.50 ± 0.07	0.89 ± 0.12	0.62 ± 0.09	5.760	0.005
IV 组	0.34 ± 0.03	0.41 ± 0.06	0.44 ± 0.03	0.40 ± 0.07	1.000	0.015
合计	0.41 ± 0.11	0.49 ± 0.09	0.70 ± 0.15	0.53 ± 0.14	1.860 *	0.054 *
F 值	9.000	4.000	3.240	11.111 *	(F = 13.701, P = 0.000) #	
P 值	0.004	0.002	0.001	0.003 *		

\* 主效应的 F 值和 P 值;#交互效应的 F 值和 P 值

表 7 转染 miR-133a 后不同时间点 MC3T3-E1 细胞中 Osterix mRNA 水平

组别	24 h	48 h	72 h	合计	F 值	P 值
I 组	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.10	1.03 ± 0.08	1.01 ± 0.08	0.151	0.863
II 组	2.10 ± 0.20	3.20 ± 0.24	4.67 ± 0.51	3.32 ± 1.16	41.697	0.000
III 组	1.53 ± 0.24	2.40 ± 0.27	2.93 ± 0.32	2.29 ± 0.66	19.148	0.002
IV 组	2.03 ± 0.14	3.00 ± 0.14	4.49 ± 0.54	3.17 ± 1.11	41.478	0.000
合计	1.67 ± 0.49	2.40 ± 0.91	3.28 ± 1.57	3.43 ± 1.38	222.215 *	0.000 *
F 值	25.049	73.358	51.778	60.990 *	(F = 30.554, P = 0.000) #	
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000 *		

\* 主效应的 F 值和 P 值;#交互效应的 F 值和 P 值

表 8 转染 miR-133a 后不同时间点 MC3T3-E1 细胞中 Osterix 蛋白水平

组别	24 h	48 h	72 h	合计	F 值	P 值
I 组	0.01 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.05 ± 0.01	4.000	0.003
II 组	0.31 ± 0.09	0.35 ± 0.08	0.39 ± 0.11	0.35 ± 0.06	1.494	0.385
III 组	0.13 ± 0.04	0.21 ± 0.09	0.30 ± 0.03	0.21 ± 0.01	1.778	0.004
IV 组	0.09 ± 0.01	0.14 ± 0.06	0.17 ± 0.04	0.12 ± 0.02	16.000	0.028
合计	0.18 ± 0.06	0.19 ± 0.04	0.24 ± 0.04	0.18 ± 0.07	2.250 *	0.223 *
F 值	81.000	64.000	30.250	36.000 *	(F = 26.811, P = 0.000) #	
P 值	0.005	0.003	0.010	0.001 *		

\* 主效应的 F 值和 P 值;#交互效应的 F 值和 P 值

**3.3 miR-133a 靶基因验证结果** 4 组细胞荧光值比较,差异有统计学意义[(99.83 ± 7.75), (42.83 ± 4.37), (96.60 ± 5.28), (90.63 ± 7.40), F = 52.870, P = 0.000]。B 组荧光值低于 A、C、D 组(P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000);其余各组两两比较,差异均无统计学意义。

## 4 讨 论

由于 miRNA 可通过降解靶基因或抑制靶基因的翻译,发挥转录后负调控的作用,miRNA 已成为目前心脑血管疾病、风湿骨病、膀胱癌等多种疾病领域的研究热点<sup>[10-12]</sup>。miR-133a 作为 miRNA 中的一个重要成员,在骨骼肌的发生以及骨形态的生成中发挥着

重要作用<sup>[13-14]</sup>,但其具体机制尚不明确。

本研究首先探讨了 miR-133a 在 BMP-2 诱导鼠前成骨细胞的分化过程中的作用。研究结果显示,在 BMP-2 诱导的鼠前成骨细胞的分化过程中,miR-133a 的表达显著下调,ALP 的活性显著上调。转染 miR-133a 后,鼠前成骨细胞中 ALP 的活性显著下调。以上结果表明 miR-133a 参与了骨的发生过程。为进一步探究 miR-133a 的作用机制,本研究还检测了转染 miR-133a 的鼠前成骨细胞中 Runx-2、Osterix mRNA 和蛋白水平的变化。结果显示,转染 miR-133a 后鼠前成骨细胞中 Runx-2 mRNA 水平未出现明显变化,但 Runx-2 的蛋白表达水平显著降低;Runx-2 的下游基因 Osterix 的 mRNA 和蛋白水平均被显著抑制,表明 miR-133a 对 MC3T3-E1 细胞分化的调控作用可能是通过抑制 Runx-2 的蛋白表达进而影响 Osterix 的水平来实现的。为进一步证实 miR-133a 的作用靶位点,我们通过构建含有 Runx-2-3' UTR 和突变的 Runx-2-3' UTR 的重组质粒,并将构建的质粒和 miR-133a 瞬时共转染 HEK293 细胞,培养 24 h 后检测 luciferase 的荧光值。结果显示,共转染的野生 Runx-2-3' UTR 和 miR-133a mimic 组的荧光值显著降低,说明 Runx-2 是 miR-133a 的作用靶基因。

本研究的结果提示,miR-133a 通过抑制 Runx-2 的蛋白表达而抑制 BMP-2 诱导的鼠前成骨细胞分化过程;但其是否与其他 miRNA 协同作用,或者参与调控其他基因以调控骨的形成等问题尚不十分明确,还需要进一步的深入研究。

## 5 参考文献

- [1] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004,431(76):350-355.
- [2] Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing[J]. Cell, 2003,113(6):673-676.
- [3] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs[J]. Science, 2001,294(5543):853-858.
- [4] Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*[J]. Science, 2001,294(5543):862

-864.

- [5] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. Cell, 1993,75(5):843-854.
- [6] Liao XB, Zhang ZY, Yuan K, et al. miR-133a modulates osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells[J]. Endocrinology, 2013,154(9):3344-3352.
- [7] Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, et al. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression[J]. J Biol Chem, 2003,278(36):34387-34394.
- [8] Lee MH, Kwon TG, Park HS, et al. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is Independent of Runx2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003,309(3):689-694.
- [9] Hu Z, Peel SA, Ho SK, et al. Role of bovine bone morphogenetic proteins in bone matrix protein and osteoblast-related gene expression during rat bone marrow stromal cell differentiation[J]. J Craniofac Surg, 2005,16(6):1006-1014.
- [10] Cai B, Pan Z, Lu Y. The roles of microRNAs in heart diseases: a novel important regulator[J]. Curr Med Chem, 2010,17(5):407-411.
- [11] Chiyomaru T, Enokida H, Tatarano S, et al. miR-145 and miR-133a function as tumour suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer[J]. Br J Cancer, 2010,102(5):883-891.
- [12] Small EM, Frost RJ, Olson EN. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease[J]. Circulation, 2010,121(8):1022-1032.
- [13] Koutsoulidou A, Mastroiannopoulos NP, Furling D, et al. Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle[J]. BMC Dev Biol, 2011,11:34.
- [14] Li Z, Hassan MQ, Volinia S, et al. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008,105(37):13906-13911.

(2013-12-28 收稿 2014-03-10 修回)

## · 作者须知 ·

### 论著类文章的书写要求

论著类文章要求附结构式中、英文摘要及关键词。摘要包括目的、方法、结果、结论四要素,关键词尽量采用最新《中文医学主题词表》(CMeSH)中所列的词。摘要中不要使用英文缩写,如 OA;摘要中也不能标注参考文献。