

miR-3182 调控 LPPR4 表达并抑制成骨细胞分化成熟的研究

唐晓琳¹ 孔霞² 王槐高² 李蓉²

【摘要】 目的 本文通过细胞功能学实验探讨循环 miR-3182 和其靶基因磷酸酯酶 4 (LPPR4) 在成骨细胞分化成熟中的调控作用。**方法** 本文通过对 GEO 数据 GSE63446 及 GSE62402 分析循环 MicroRNA (miRNA) 和组织表达谱信使 RNA (mRNA) 分别在人体低水平骨密度 (BMD) 与高水平 BMD 的表达谱的差异。对差异化表达的 miRNA 及其潜在调控靶点在表达谱芯片数据进行调控比对。对可能调控 BMD 水平的 LPPR4 基因进行过表达和微小 RNA (siRNA) 干扰方法研究其对成骨细胞 hFOB1.19 分化成熟的研究。**结果** 外周循环 miR-3182 在低 BMD 人群中显著高表达, 其在区分高 BMD 和低 BMD 人群有非常好的敏感性和特异性。慢病毒质粒载体介导的 miR-3182 高表达显著降低细胞 LPPR4 基因 mRNA 水平和蛋白水平, 并抑制成骨细胞 hFOB1.19 矿化结节形成。LPPR4 蛋白高表达显著增加成骨细胞 hFOB1.19 矿化结节的形成率和分化标志物 OPG 表达水平。**结论** 受 miR-3182 调控的 LPPR4 基因促进成骨细胞分化。

【关键词】 MicroRNA-3182; LPPR4 蛋白; 骨密度; 基因表达汇编数据库

MiR-3182 regulates LPPR4 expression and inhibits osteoblasts differentiation and maturation Tang XiaoLin¹, Kong Xia², Wang Huaigao², Li Rong². ¹Department of Medical Science, Shunde Polytechnic, Foshan 528300, China; ²Department of Physiopathology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China

Corresponding author: Tang Xiaolin, Email: celinetangphd@163.com

【Abstract】 Objective This study aims to reveal the regulatory effect of miR-3182 and its target LPPR4 on osteoblasts differentiation and maturation. **Methods** The study employed GSE63446 and GSE62402 datasets to reveal the association of circulating miRNA and tissue mRNA in bone mineral density (BMD). The two datasets were cross validated based on targets prediction. Plasmid mediated LPPR4 gene overexpression or siRNA interference was used to investigate its regulatory role in osteoblasts differentiation and maturation. **Results** Circulating miR-3182 was highly expressed in low BMD group, indicating excellent sensitivity and specificity in BMD classification. Lentivirus plasmid mediated miR-3182 expression decreased LPPR4 protein level and inhibited osteoblast hFOB1.19 mineralized nodules formation. Ectogenic overexpression of LPPR4 promoted hFOB1.19 cells mineralized nodule formation, and induced biomarker OPG expression. **Conclusion** LPPR4 promotes osteoblasts hFOB1.19 differentiation and maturation.

【Key words】 MicroRNA-3182; LPPR4 protein; Bone density; Gene Expression Omnibus (GEO) Database

骨质疏松是一种常见的骨代谢疾病, 表现为骨密度和骨量的减少以及骨微结构的破坏, 引起骨强度的明显降低, 最终导致骨折发生。骨质生成主要依赖成骨细胞的成骨活动, 因此成骨细胞分化成熟

能力与骨密度 (bone mineral density, BMD) 密切相关。低 BMD 被认为是引起骨质疏松和骨折的重要危险因素。因此, 借助影像学手段如双能量 X 线骨密度仪 (dualenergy X-ray absorptiometry, DXA) 对人

BMD进行测量就成为诊断骨质疏松的临床诊断指标之一。但是,由于DXA是基于X线进行测量,因此具有放射性;另外DXA所测量的为二维的表面骨密度(aBMD),已有研究指出在老年骨质疏松患者中aBMD并不能很好地预测骨折的发生率^[1]。因此,用DXA测出的aBMD并不是一个理想的骨折发生的预测标志物。近年来,外周血循环miRNA逐渐成为疾病发生预测或诊断标志物的研究热点。许多研究报道miRNA作为诊断标志物具有很高的敏感性和特异性,有越来越多的miRNA标志物成为临床诊断的标志物并用于临床筛查,例如,miR-34a用于肝癌早期诊断^[2],miR-10b用于胶质细胞瘤的初步诊断^[3]等。因此,外周血循环miRNA检查可以成为简单易行的筛查手段。另外,许多研究报道循环miRNA以外泌体的方式进行远处“靶向”性调控,与BMD代谢相关的靶点mRNA都可以被内源或外源的miRNA调控^[4-5]。BMD水平与基因表达水平密切相关^[6],在众多可以调节BMD的miRNA中,循环miRNA-mRNA形成的相互作用网络的研究显得非常重要。磷酸酯酶4(areal bone mineral density, LPPR4)基因及其蛋白多在磷脂代谢中报道,其在BMD中的研究尚没有见报道。血液循环miR-3182尚没有研究报道其潜在调控的基因参与BMD代谢。

材料与方法

一、主要试剂与仪器

Ham's F12培养基和DMEM培养基和胎牛血清购自GIBCO公司,胰蛋白酶购自吉诺生物医药公司,JetPEI转染试剂购自Polyplus公司,反转录PCR和RT-qPCR的试剂均购自Promega公司,U6内参引物购自广州英伟科技有限公司,miR-3182引物由上海生工生物工程有限公司合成,LPPR4(sc-515779)和actin(sc-70319)抗体购自SCBT公司。

二、GEO数据组分析

基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)数据GSE63446和GSE62402数据通过GEO数据库进行下载,两组数据经过R语言工具包Bioconductor和limma包进行标准化分析,标准化后的表达数据用于差异化表达分析。GSE63446数据为高BMD对照和低BMD组外周循环miRNA表达分析。GSE62402数据为高BMD对照和低BMD组组织表达mRNA水平分析。

三、细胞培养

人成骨细胞hFOB1.19购买自美国ATCC公司(ATCC, #CRL-11372)并由本学院保存。培养条件:Ham's F12培养基与DMEM培养基1:1混合,添加0.3 mg/ml G418和10%FBS。细胞置于37℃、5%CO₂的恒温细胞培养箱中培养。于倒置显微镜下观察细胞生长情况,待细胞生长至80%融合度时,用胰酶消化进行传代培养,取生长状态良好的细胞用于实验。

四、细胞转染

选用慢病毒表达载体pLVX-shRNA2介导miRNA表达,或选用pcDNA3.1-GFP载体进行基因过表达。将miR-3182的序列与空载体组合构建pLVX-shRNA2-miR-3182重组质粒。将LPPR4完整CDS序列合成后构建到pcDNA3.1-GFP载体中。转染试剂采用JetPEI试剂对细胞进行瞬转处理。转染试剂用量参照JetPEI转染试剂说明书,本实验均采用质粒DNA:转染试剂=1:2。转染后于48 h于荧光显微镜下检测转染效率或进行后续实验。

五、qPCR检测细胞miRNA和mRNA的表达

根据TRIzol说明书提取总RNA后,加入相应的miRNA反转录引物按Promega的逆转录试剂说明进行逆转录反应。然后取1 μl反应产物用SYBR Green Mix(2×)进行定量PCR反应。反应程序为:94℃ 10 min; 40个循环94℃ 15 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s;循环结束后72℃ 10 min;然后8℃直至取出反应管。选择U6作为内参基因,计算方法为 $RQ=2^{-\Delta Ct}$ (Ct值为循环数, $\Delta Ct=Ct_{\text{样本}}-Ct_{U6}$)。

miR-3182反转录引物为:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGA - CGACTAC;

miR-3182上下游引物序列分别为GCTTCTGTAGTGTAGTC: 和 GTGCAGGGTCCGAGGT- 3。

OPG的mRNA定量上游引物:GTGTGTCCCTTGCCCTGACTAC,下游引物:GTTTCACGGTCTGCAGTTCCTT。

六、pcDNA3.1质粒介导成骨细胞LPPR4蛋白高表达

将转染pcDNA3.1-LPPR4-GFP质粒的细胞按 1×10^5 /孔铺板种于6孔板,细胞贴壁后进行转染。转染后48 h用胰酶消化并收集细胞进行细胞裂解。经过12 000 g离心后去蛋白上清进行SDS-PAGE电泳分离。然后进行蛋白转膜电泳。蛋白膜进行一抗室温2 h孵育,HRP标记的二抗室温1 h孵育。然后用

ECL试剂进行化学发光并进行显影。

七、成骨细胞成熟分化实验

成骨细胞分化成熟实验方法参加作者已发表的论文^[7]。简要如下,将成骨细胞按 1×10^5 /孔铺板种于6孔板过夜培养。细胞培养基中加入1 nM地塞米松,50 μ M维生素C和20 mM β 巯基乙醇(索莱宝公司)。细胞加入刺激因素后,继续培养5天等待矿化结节形成。细胞用PBS洗一次后,用70%乙醇固定30 min,然后用2%茜素红(Alizarin Red S)进行染色,显微镜下观察矿化结节情况,并记录量化结果。

八、统计学处理

采用SPSS 16.0(IBM,美国)对实验数据进行分析,并用Graph pad 5.0软件作图。计量资料采用Kolmogorov-Smirnov检验是否符合正态分布,符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对符合正态分布的miRNA表达差异性数据比较用Student *t*检验;用受试者工作曲线(ROC)方法分析miRNA区分高低BMD水平准确性和特异性。检验水准 α 值取双侧0.05。

结 果

一、miR-3182在BMD中的诊断作用

GEO数据库中GSE63446数据为外周血循环miRNA芯片分析数据。下载的数据为芯片矩阵数据,经过R平台的Bioconductor和limma包标准化后,可以进行差异化比较分析。对众多差异化表达的miRNA分析后,发现miR-3182在低BMD人群中总体高表达,其ROC分析的AUC=1.000,提示在其区分高BMD和低BMD人群中有非常好的敏感性和特异性($P=0.0009$)。结果也提示miR-3182在调控BMD相关基因中可能发挥重要的调节作用。见图1~2。

二、miR-3182潜在调控基因的表达情况

在经过分析GSE63446数据后,得出miR-3182

在低BMD人群外周血中水平升高。因此,我们对miR-3182的所有可能调控靶点进行预测并列表。GSE62402数据对高BMD和低BMD人群的骨组织mRNA进行芯片表达谱分析。经过两个数据结果

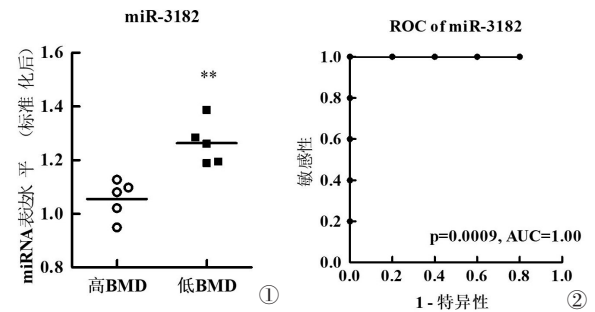
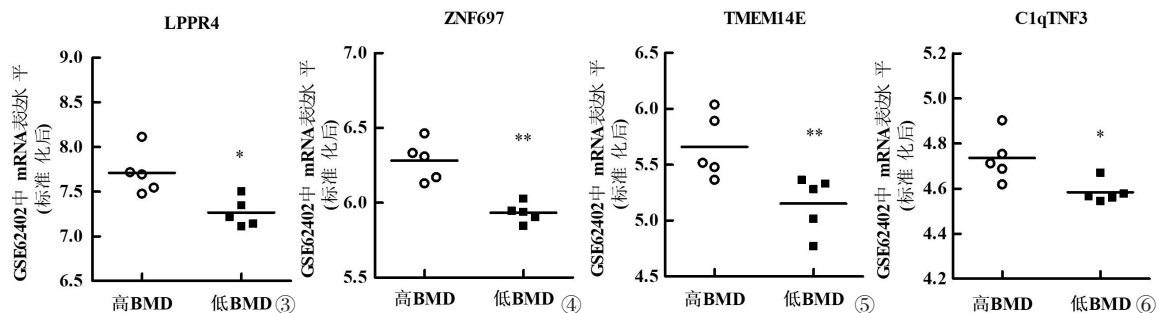


图1~2 miR-3182在GSE63446数据的表达水平。图1 外周血循环miR-3182在BMD中的表达水平;图2 mir-3182对BMD水平的ROC分析

的比对,结果发现LPPR4、ZNF697、TMEM14E和C1qTNF3基因的mRNA水平显著降低(图3~6)。分析结果提示mRNA芯片实验结果与miRNA预测的结果吻合。根据网络数据库KEGG通路预测,miR-3182参与的调控通路非常少,说明对该miRNA的研究尚没有深入。对miR-188-3p调控基因的研究也没有涉及与BMD的联系。

三、miR-3182调节LPPR4转录并促进成骨细胞分化

经过TargetScanHuman7.1软件预测mir-3182对LPPR4基因的调控分析,结果显示miR-3182对LPPR4的mRNA3'末端有很高的结合分值(图7)(http://www.targetscan.org/vert_71/)。我们用慢病毒载体构建miR-3182表达质粒后,对hFOB1.19细胞进行转染实验,并用去PCR进行含量确定。结果证明慢病毒介导的miR-3182表达增高约4倍(数据没有显示)。48 h后,提取细胞裂解上清,进行SDS-PAGE和蛋白



注:“*”表示 $P<0.05$;“**”表示 $P<0.01$

图3~6 GSE62402数据基因表达情况。LPPR4、ZNF697、TMEM14E and C1qTNF3基因mRNA水平在低BMD人群中显著低表达

免疫印迹分析。实验结果显示,载体介导的 miR-3182 高表达后显著降低 LPPR4 蛋白水平,而对照质粒不引起该蛋白变化(图 8)。结果显示,miR-3182 高表达可以抑制成骨细胞矿化结节的形成(图 9~10)。

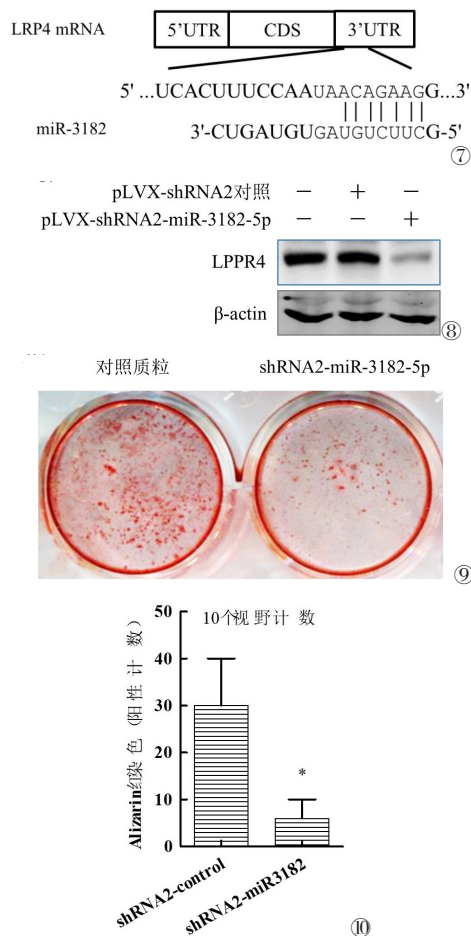
四、LPPR4 促进人 hFOB1.19 细胞分化成熟

人成骨细胞 hFOB1.19 细胞在用 pcDNA3.1-LP-PR4-GFP 载体转染后,荧光显微镜观察结果显示对照组和融合蛋白载体组均出现大于 90% 的阳性转染率(图 11)。对细胞裂解蛋白进行 SDS-PAGE 和蛋白免疫印迹分析,结果显示 LPPR4 蛋白表达显著增加(图 12)。hFOB1.19 成骨细胞用 6 孔板进行分化成熟的诱导实验,经 7 天诱导实验,结果显示 LPPR4 高表达组能显著增加矿化结节的形成率(图 13, $P < 0.05$),提示 LPPR4 对成骨细胞分化成熟的促进能

力。另一方面, LPPR4 高表达上调成骨细胞分化成熟标志物 OPG 的表达(图 14~15, $P < 0.05$)。由于目前对 miR-3182 的研究尚少,其 KEGG 通路分析结果尚不完整,对少量的通路分析见表 1。

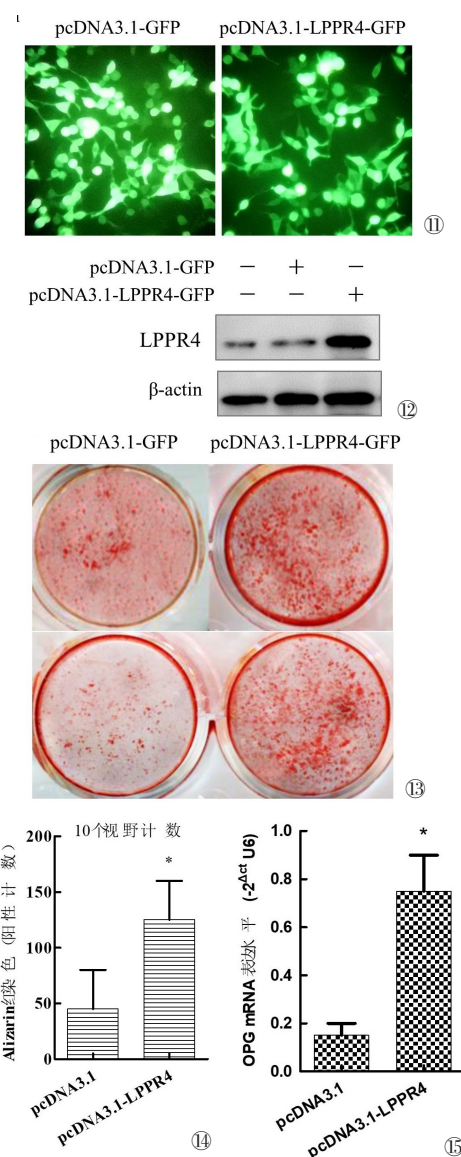
讨 论

近年来, miRNA 在疾病筛查、诊治、预后判断等方面的重要作用及其应用越来越受到重视。其优势主要表现在:首先,循环 miRNA(包括血液、尿液、



注:“*”表示 $P < 0.05$

图 7~10 miR-3182 调控 LPPR4 基因的翻译。图 7 miR-3182 与 LPPR4 基因 mRNA 末端结合的示意图;图 8 LPPR4 蛋白免疫印迹, actin 作为内参;图 9 质粒 shRNA2-3182-5p 介导的 miR-3182 高表达抑制成骨细胞矿化结节的形成;图 10 对图 9 视野内矿化结节进行半定量统计分析。



注:“*”表示 $P < 0.05$

图 11~15 LPPR4 蛋白促进成骨细胞分化成熟。图 11 构建的 LPPR4 重组质粒与对照质粒均出现大于 90% 的阳性转染效率;图 12 LPPR4 蛋白免疫印迹;图 13 LPPR4 对成骨细胞矿化沉积结节的影响;图 14~15 LPPR4 高表达上调 OPG 表达

表1 预测 miR-3182 参与的KEGG通路调控

序号	KEGG 通路	p-value	基因名称
1	Prion diseases (hsa05020)	1.81612E-76	PRNP
2	RNA transport (hsa03013)	0.04291703	SEN2, NUP43
3	Systemic lupus erythematosus (hsa05322)	0.04291703	C2

胃液等)可以作为疾病临床阶段的早期筛查^[8];其次,利用 miRNA 构建的 RNA 药物可以作为疾病精准靶向治疗的一个补充^[9]。在 BMD 与骨质疏松和血清循环 microRNA 研究方面,最新的研究报道血清 miR-196a-2 表达水平与人群 BMD 水平密切相关^[10]。另外,外周血循环 miR-21-5p, miR-24-3p, miR-93-5p, miR-100-5p 和 miR125b-5p 与 BMD 和骨质疏松关系非常密切 $r>0.9$,而且还与年龄、性别存在密切关联^[11]。我们从对 GEO 数据库中 microRNA 表达与 BMD 条件通路蛋白水平相关研究出发,通过建立 microRNA 表达水平与 BMD 程度的 ROC 密切程度,从而筛选到与 BMD 代谢密切相关的蛋白,及其调控的 microRNA。本研究首次发现循环 miR-3182 通过调节 LPPR4 水平可以促进成骨细胞分化的矿物化能力,提示其血液循环中可能有远处靶向调节的作用,也揭示了该 miRNA 用于骨质疏松倾向的早期诊断的临床意义。

LRPP4 属于脂质磷酸酶家族,主要参与一系列磷酸酯物质的去磷酸化,参与机体生物功能调节。目前报道 LPPR4 主要表达在神经、睾丸、膀胱和皮肤组织,主要作为细胞外受体传递生物信号,例如细胞发育和再生等。最近的研究报道, LPPR4 通过激活 SP1/整合素 α /FAK 信号转导通路促进胃癌细胞浸润和转移,研究结果提示 LPPR4 是靶向肿瘤细胞转移的潜在药物靶点^[12]。另有研究报道 LPP 家族蛋白,包括 LPPR1-LPPR5 相互作用形成异源多聚体,参与细胞形态改变和运动^[13]。在研究 LPPR 与循环 microRNA 方面, LPPR4 的 mRNA 还可以被 miR-103a 和 miR-450-5p 调控,提示 LPPR4 高表达可以抑制血管平滑肌细胞的迁移,而低表达则促进血管平滑肌细胞发生迁移,也提示其在细胞移动方面的重要作用^[14]。但是, LPPR4 在骨质疏松中和脆性骨折中的研究尚非常少,其作用机制尚不清楚。

本研究从数据挖掘出发,再到实验探索,结果发现受 miR-3182 调控的 LPPR4 基因参与 BMD 代谢信号

转导通路,并从 LPPR4 表达水平直接验证其对成骨细胞 hFOB1.19 的促进成骨细胞分化成熟的观察结果。结合前期关于 LPPR4 的功能研究,研究结果也提示了 LPPR4 在细胞信号转导通路中的重要作用。显然,单一的指标用于骨质疏松的早期诊断难以达到很好的效果,无论是以 miR-21-5p、miR-100-5p 等为代表的 miRNA,还是一系列 miRNA 组合标签,都应该与传统诊断方法结合才得到更准确的早期诊断或预测结果。

参 考 文 献

- 1 Wainwright SA, Marshall LM, Ensrud K, et al. Study of osteoporotic fractures research G:hip fracture in women without osteoporosis [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(5): 2787-2793.
- 2 Kim NH, Hyun SK, Li XY, et al. A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial - mesenchymal transition [J]. J Exp Med, 2011, 208(12): i32-i32.
- 3 Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy [J]. Trends Mol Med, 2014, 20(8): 460-469.
- 4 Tang J, Li Y, Liu K, et al. Exosomal miR-9-3p suppresses HBGF-5 expression and is a functional biomarker in hepatocellular carcinoma [J]. Minerva medica, 2018, 109(1): 15-23.
- 5 Pethő A, Chen YH, George A. Exosomes in extracellular matrix bone biology [J]. Curr Osteoporos Rep, 2018, 16(1): 58-64.
- 6 Upala S, Yong WC, Sanguankee A. Bone mineral density is decreased in fibromyalgia syndrome: a systematic review and meta-analysis [J]. Rheumatol Int, 2017, 37(4): 617-622.
- 7 Tang XL, Lin JT, Wang GH, et al. MicroRNA-433-3p promotes osteoblast differentiation through targeting DKK1 expression [J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0179860.
- 8 周琨, 陆霖, 殷晓星, 等. 血清 miRNA-128a 和 miRNA-128b 表达对胃癌早期诊断和预后的影响 [J]. 复旦学报(医学版), 2019, 06: 15-19.
- 9 许从飞, 王均. 非编码 RNA 药物的研究进展 [J]. 生命科学, 2018, 30(2): 213-221.
- 10 Karabegovic I, Maas S, Medina-Gomez C, et al. Genetic Polymorphism of miR-196a-2 is Associated with Bone Mineral Density (BMD) [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(12): 2529.
- 11 Kelch S, Elizabeth RB, Seeliger C, et al. miRNAs in bone tissue correlate to bone mineral density and circulating miRNAs are gender Independent in osteoporotic patients [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15861.
- 12 Zang D, Zhang C, Li C, et al. LPPR4 promotes peritoneal metastasis via Sp1/integrin α /FAK signaling in gastric cancer [J]. Am J Cancer Res, 2020, 10(3): 1026-1044.
- 13 Yu P, Agbaegbu C, Malide DA, et al. Cooperative interactions of LPPR family members in membrane localization and alteration of cellular morphology [J]. J Cell Sci, 2015, 128(17): 3210-3222.
- 14 章里西. microRNA 对冠心病疑似致病基因 LPPR4 表达调控的初步研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2017.

(收稿日期:2020-01-16)

(本文编辑:吕红芝)