

文章编号:1004-7220(2020)01-0035-08

# 基于转录组测序分析微重力环境下 MC3T3-E1 成骨细胞 miRNA/mRNA 表达谱及功能变化

韩标<sup>1,2</sup>, 郭勇<sup>1</sup>, 韦淑萍<sup>2</sup>, 李昊<sup>2</sup>, 张西正<sup>1,2</sup>

(1. 桂林医学院 生物技术学院, 桂林 541199; 2. 军事科学院 卫勤保障技术研究所, 天津 300161)

**摘要:**目的 探讨微重力环境对 MC3T3-E1 成骨细胞分化的影响。方法 采用转录组测序技术(RNA-seq)观察微重力培养前后 MC3T3-E1 成骨细胞 miRNA/mRNA 表达谱变化,测序结果采用 q-PCR 验证。采用生物信息学方法进一步研究差异性表达的 miRNA/mRNA。结果 与对照组(CON)相比,模拟微重力组(SMG)共有 160 条 miRNA 和 1 912 个 mRNAs 发生显著改变;根据生物信息学结果,筛选出 10 个关键性基因(3 条 miRNA、7 个 mRNA),其中 miR-9\_6666-5p 为微重力敏感 miRNA,可能在微重力环境下成骨细胞分化过程中起到重要的作用。结论 在微重力环境下,成骨细胞分化受到抑制可能与 miRNA/mRNA 表达谱的改变有关。研究结果将有助于深入理解 miRNA 与 mRNA 在微重力环境下调控成骨分化与骨生成的分子机制。

**关键词:**微重力;微小 RNA;成骨细胞分化;骨重建

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2020.01.010

## Differential MiRNA/mRNA Expression Profiling and Functional Network Analysis for MC3T3-E1 Cells with Microgravity Stimulation Based on RNA-seq

HAN Biao<sup>1,2</sup>, GUO Yong<sup>1</sup>, WEI Shuping<sup>2</sup>, LI Hao<sup>2</sup>, ZHANG Xizheng<sup>1,2</sup>

(1. College of Biotechnology, Guilin Medical University, Guilin 541199, China; 2. Institute of Medical Service and Technology, Academy of Military Sciences, Tianjin 300161, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of microgravity on MC3T3-E1 osteoblast differentiation. **Methods** The differential miRNA and mRNA expression profiling of MC3T3-E1 cells during exposure to microgravity were established by RNA transcriptome sequencing technology (RNA-seq). The RNA sequencing results were validated using quantitative real-time polymerase chain reaction (q-PCR). Bioinformatic analyses were applied for further study of these differentially expressed miRNAs and mRNAs. **Results** Compared with control (CON) group, A total of 1 912 coding transcripts and 160 miRNAs were detected along with osteogenic differentiation in simulated microgravity (SMG) group. Bioinformatic analysis revealed 10 core regulatory genes including 7 mRNAs and 3 miRNAs. Based on the analysis and verification, one miRNA, miR-9\_6666-5p, was identified, which might play an important role in osteogenic differentiation process under microgravity. **Conclusions** The process of osteoblast differentiation was repressed under microgravity which might be related to the changed expression profile of miRNA/mRNA. The research findings can contribute to the better understanding of the molecular mechanisms of mRNA and miRNAs in osteogenic differentiation and bone formation under the microgravity condition.

**Key words:** microgravity; microRNA(miRNA); osteoblast differentiation; bone remodeling

收稿日期:2019-09-06; 修回日期:2019-11-01

基金项目:国家自然科学基金项目(11432016)

通信作者:张西正,教授,E-mail: z84656716@yahoo.com

机械应力在骨重建过程中发挥着至关重要的作用。骨组织与细胞具有力学敏感性,可以将力学信号转化为生物信号,进行自我调控,以适应外界环境的变化<sup>[1]</sup>。微重力即为零重力,狭义的微重力是指重力或其他外力引起的加速度不超过  $10^{-5} \sim 10^{-4} g$ ;随着地基模拟微重力方法的不断发展,广义的微重力是指生物体受到机械力学刺激的减少或消失。研究表明,力学刺激减少或者缺失(如处于太空环境或长期卧床等)会影响骨的代谢,造成骨微观结构被破坏、骨质流失等症状<sup>[2-3]</sup>。重力对维持机体健康状态具有重要的作用,宇航员长期太空作业会导致一系列健康问题,如骨质疏松、骨骼肌萎缩、心血管改变、免疫系统失调以及睡眠和昼夜节律的改变<sup>[4-6]</sup>。然而,失重对成骨细胞影响的具体分子机制仍尚未阐明。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类非编码 RNA 单链分子,含有 15~25 个核苷酸,在调节机体生命进程中具有重要的作用<sup>[7]</sup>。研究发现,miRNA 参与成骨分化过程,并涉及 Wnt、BMP、TGF- $\beta$ 、FGF、Notch、IGF 和 Hh 等多种信号通路<sup>[8-10]</sup>。目前,miRNA 在骨力学生物学中的作用已初见端倪,但是 miRNA 在微重力环境下对成骨细胞的作用尚不清楚。

本文重点研究微重力环境对 MC3T3-E1 成骨细胞分化的影响,通过旋转培养系统 (rotary cell culture systems, RCCS) 构建 MC3T3-E1 微重力暴露模型,分析比较微重力环境下 miRNA/mRNA 表达谱的改变,构建相关相互作用网络,并筛选与成骨分化相关的核心因子,为后续深入探讨 miRNA 在微重力环境下调控骨重建提供基础。本研究结果表明,miRNA 可能参与微重力环境下骨组织的损伤、修复与重建过程,miRNA 的表达谱改变可能在微重力环境下成骨细胞分化过程中起到重要的调控作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞系(中国医学科学院基础医学研究所),实验室冻存。 $\alpha$ -MEM 培养基、优级胎牛血清、0.25% 胰酶 + EDTA 溶液 (Gibico 公司,美国),碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)

活性检测试剂盒(南京建成生物研究所),BCA 蛋白定量试剂盒(南京凯基生物公司),PCR 实验引物(上海生工生物工程公司),Trizol 试剂 (Sigma 公司,美国),I 型胶原 (collagen type I, Col-I)、骨钙素 (osteocalcin, OCN) 一抗 (Abcam 公司,美国),二抗(武汉博士德生物公司),Cytodex 3 微载体 (GE Healthcare 公司,美国),RCCS 系统 (Cell Tech 公司,美国),GENios 酶标仪 (Tecan 集团公司,瑞士)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 取冻存细胞进行复苏,按  $1 \times 10^5$  个/mL 密度接种到细胞培养瓶中,置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温培养箱中培养,次日换液,以后每 2 d 更换培养液,待细胞铺满培养瓶底部 80% 左右进行传代。

**1.2.2 模拟微重力环境** 微重力组 (simulated microgravity, SMG): 分别按照操作说明配置 5 mg/mL 微载体混悬液,以及对旋转系统的培养皿进行灭菌处理。用无菌注射器依次加入 30 mL 新鲜的  $\alpha$ -MEM 培养基 (无血清、双抗)、5 mL 优级胎牛血清、5 mL 微载体混悬液、含  $5 \times 10^4$  个细胞悬液,之后用新鲜培养基将培养皿灌满,排尽气泡。将上述培养皿安装至旋转系统电机上,设置电机旋转速度恒定为 20 r/min,连续培养 3 d。实验期间时刻注意清除培养皿中产生的气泡,防止流体剪切力的产生。对照组 (CON): 将细胞置于 2D 培养皿中常规培养 3 d。

**1.2.3 ALP 活性检测** 细胞培养 3 d 后,离心收集各组细胞,清洗后加入 500  $\mu$ L 的 PBS 缓冲液重悬细胞,在 300 W 功率下将细胞置于冰水浴状态进行蛋白超声裂解。裂解细胞时超声探头需在液面以下,注意探头不要接触到管壁,每次超声 5 s,间隔 4 次,每次间隔时间为 30 s。用 BCA 方法将蛋白定量,按操作表将各试剂加入到 96 孔板,520 nm 处波长酶标仪测定各孔吸光度。

**1.2.4 实时荧光定量 PCR** 细胞培养 3 d 后,离心收集各组细胞,酚氯仿法提取各组细胞的总 RNA,定量 RNA 为 1  $\mu$ g/mL,逆转录合成 cDNA,以 cDNAs 作为模板采用实时荧光定量 PCR 分别检测 ALP、OCN、Col-I 的基因表达水平,引物序列见表 1。

表1 实验引物序列

Tab.1 Primer sequences for experiment

基因	引物序列(5'-3')
ALP	正 TGACCTTCTCTCCTCCATCC 反 CTTCTGGGAGTCTCATCCT
OCN	正 TGCTTGTGACGAGCTATCAG 反 GAGGACAGGGAGGATCAACT
Col-I	正 GAGCGGAGAGTACTGGATCG 反 GTTCGGCTGATGTACCACT
$\beta$ -actin	正 GATTACTGCTCTGGCTCCT 反 ACTCCTGCTTGCTGATCC
miR-145a-5p	正 CAGTGCCTGTCGTGGAGT 反 AGGTCCAGTTTCCCAGG
miR-9_6666-5p	正 TCGGCAGCCAGTTGAGCAA 反 CTCAACTGGTGTCTGGACT
let-7c-5p	正 UGAGGUAGUAGGUUGUAUGG 反 CCAUACAACCUACUACCUCA
U-6	正 CTTCCGGCAGCACATATAC 反 GAACGCTTCACGAATTTCG

**1.2.5 Western blot 检测** 细胞培养 3 d 后,离心收集各组细胞,加入蛋白裂解液,用 BCA 法定量各组细胞蛋白浓度。取各组定量后蛋白 30  $\mu$ g,加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液,沸水中煮 10 min,而后将样品加入已配制的含 10% 分离胶与 5% 浓缩胶的电泳系统内跑胶;切胶并转膜;将 PVDF 膜与 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h;封闭后的 PVDF 膜分别与兔抗 OCN (1:500)、Col-I (1:1 000)、GAPDH (1:2 500) 一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜;取出 PVDF 膜, PBST 洗涤 5 次,与山羊抗兔的二抗 (1:5 000 稀释) 常温孵育 1 h, PBST 洗涤 5 次;加入显影发光液 (ECL), 暗室显影定影,取出胶片后用 Image J 软件分析结果。

**1.2.6 RNA 文库建立与测序** 细胞培养 3 d 后,离心收集各组细胞。根据操作手册,采用 TRIzol™ 试剂提取各组细胞的总 RNA, 每组设有 3 个生物学重复 (细胞样品均来自 3 次独立实验)。采用 NanoDrop 和甲醛变性胶初步检测 RNA 纯度及完整性,再采用 Agilent 2100 BioAnalyzer 准确分析各组细胞总 RNA 的完整性与纯度 (要保证 RIN>7.0、28S/18S $\geq$ 1.5)。Qubit RNA Assay Kit 对起始的总 RNA 进行准确定量,保证各组 RNA 起始量处于 1~10  $\mu$ g。

对样品进行 3' 适配体与 5' 适配体的连接,其

次进行反转录,最后对整体系进行 PCR 扩增,对文库质控后开始上机测序。

**1.2.7 GO 条目与 KEGG 信号通路富集注释** 基因本体 (gene ontology, GO) 注释和富集分析,是运用 DAVID 基因注释工具 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 研究目标基因集合在 GO 中的分布状况,阐明实验中样本差异在基因功能上的表现。具体来说,即利用 Fisher 双侧精确检测来对 GO 的条目进行分类,同时利用假发现率 (false discovery rate, FDR) 计算出相应校正后的  $P$  值,  $P<0.05$  且  $FDR<0.05$  表示 GO 的注释富集具有显著差异。

同样,信号通路分析是根据京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genome, KEGG) 数据库的注释,揭示了与差异表达 miRNA 共表达的 mRNA 所富集的相关信号通路 (<http://www.genome.jp/kegg/>)。GO 与 KEGG 分析使用 KEGG 和 PubMed 数据库。

### 1.3 统计学方法

所有数据均来自 3 次独立实验,数据采用均值 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析;GO 与 KEGG 分析采用 Fisher 双侧精确检验,  $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 微重力环境对成骨细胞分化的影响

ALP、OCN、Col-I 是成骨细胞成熟与分化的标志基因,为了验证微重力环境是否会对 ALP、OCN、Col-I 产生影响,分别采用 q-PCR、ALP 试剂盒和 Western blot 检测各组细胞中 ALP、OCN 和 Col-I 的 mRNA 和蛋白表达水平。结果显示,与 CON 组相比,SMG 显著抑制成骨分化相关基因的表达,ALP 活性显著下降,OCN、Col-I 的蛋白表达水平也显著降低 (见图 1)。

### 2.2 微重力环境下成骨细胞中 miRNA/mRNA 表达谱的变化

为了检测成骨细胞暴露微重力环境后 miRNA/mRNA 的表达差异变化,首先对测序的原始数据进行过滤与质控,并将变化倍数 $\geq 2$ 且  $P<0.05$  定义为表达上调,将变化倍数 $\leq 0.5$ 且  $P<0.05$  定义为表达下调。结果显示,与 CON 组相比,SMG 组共有 160 条

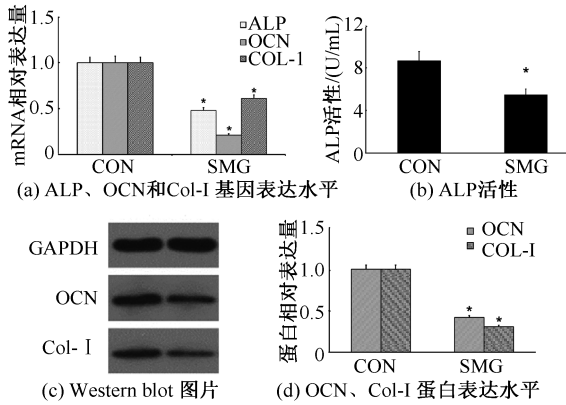
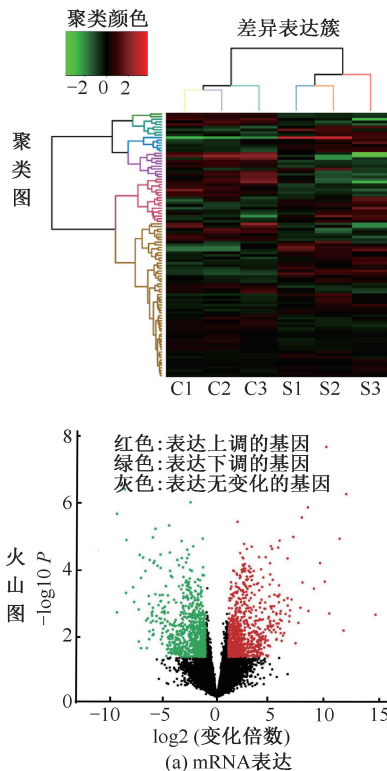


图1 微重力环境对 MC3T3-E1 细胞分化的影响 (\*与 CON 组比较,  $P < 0.05$ )

**Fig.1 Effects of microgravity on MC3T3-E1 cells differentiation** (a) mRNA expression level of ALP, OCN and Col-I, (b) ALP activity, (c) Picture of Western blot, (d) Relative protein expression of OCN and Col-I

miRNA 发生显著性改变, 其中, 表达上调的有 84 条, 表达下调的有 76 条; 共有 1 912 个 mRNAs 发生显著改变, 其中, 表达上调的有 991 个, 表达下调的有 921 个(见图 2)。



为了确保测序结果的准确性, 选取 5 个 mRNA 与 3 条 miRNA 进行 q-PCR 验证。结果显示, q-PCR 结果与测序结果具有较好的一致性(见图 3)。

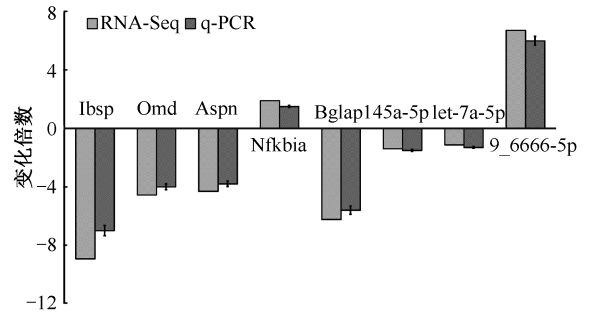


图3 RNA-seq 与 q-PCR 检测微重力环境下 MC3T3-E1 细胞中 mRNA/miRNA 表达结果比较

**Fig.3 Comparison between RNA-sequence and q-PCR results for mRNAs and miRNAs of MC3T3-E1 cells under microgravity**

### 2.3 微重力环境下差异性 miRNA/mRNA 生物学功能分析

为了选出微重力敏感的关键 miRNA 与 mRNA, 对差异性 miRNA 共表达的 mRNA 进行 GO 的分类

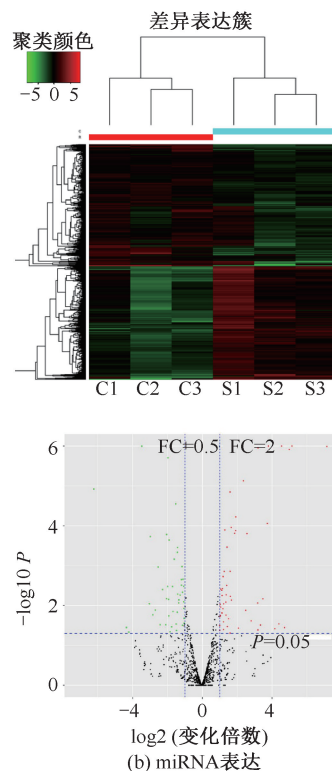


图2 微重力环境对 mRNA 与 miRNA 表达谱的变化

**Fig.2 Effects of microgravity on miRNA and mRNA expression profile in MC3T3-E1 cells** (a) mRNA expression, (b) miRNA expression

注释和 KEGG 信号通路分析,并筛选出富集结果差异最显著的前 10 位 ( $P < 0.05$  且  $FDR < 0.05$ )。GO 分析主要包含细胞学组件 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 及生物学途径 (biological process, BP), 被富集的条目及 KEGG 信号通路分析均按照  $P$  值大小来排序。

结果显示:与细胞学组件相关的 GO 二级条目主要富集在细胞核、细胞膜、细胞质、细胞器等;与

生物学途径相关的 GO 二级条目主要富集在细胞内信号、蛋白修饰、力学响应、免疫系统进程等;与分子功能相关的 GO 二级条目主要富集在钙黏蛋白结合、MDM2/MDM4 家族蛋白结合、分子内氧化还原酶活性等。为了进一步了解共表达差异基因的功能,对这些共表达差异基因进行 KEGG 通路分析。结果表明,这些差异基因主要富集在 Jak-STAT、TNF、成骨细胞分化等信号通路中(见图 4)。

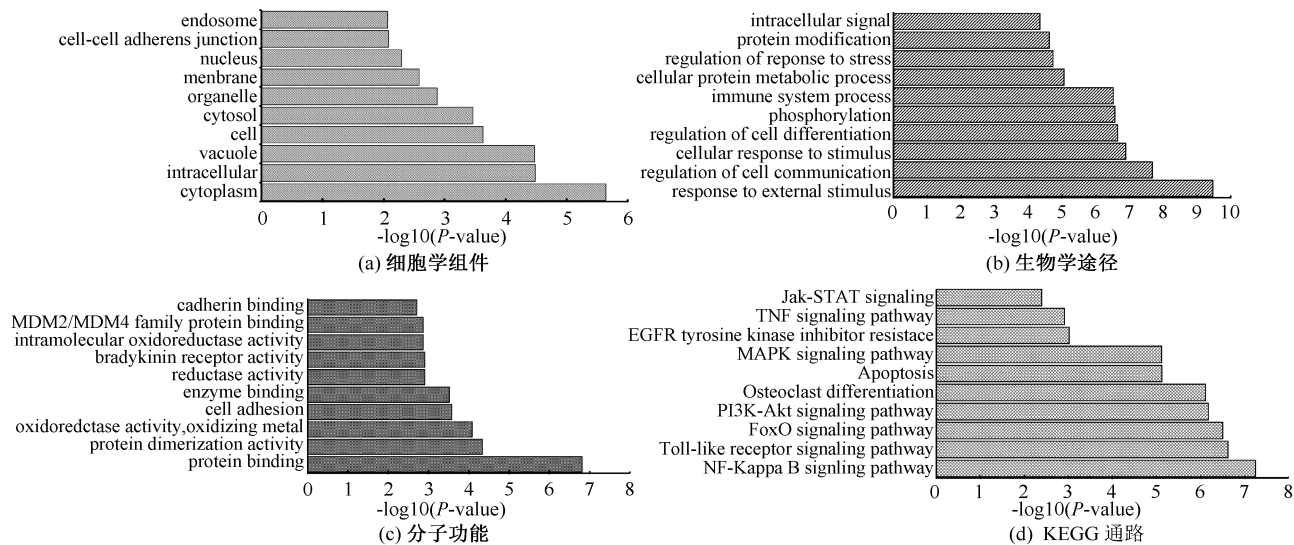


图 4 微重力环境下共表达差异基因 GO 与 KEGG 通路富集分析

Fig.4 Enrichment of ontology (GO) analysis and KEGG pathways of differentially co-expressed genes under microgravity

(a) Cellular component, (b) Biological process, (c) Molecular function, (d) KEGG pathway

为了得到微重力环境下参与成骨分化的关键 miRNA 与 mRNA,首先,计算差异表达 miRNAs 和差异表达 mRNA 两者的表达相关系数  $r$ , 筛选显著相关的关系对;其次,利用 miRanda 软件预测 miRNA-靶基因,并与前者结果合并,最后构建 miRNA-mRNA 表达调控网络;最终,筛选出 10 个关键因子,包括 7 个 mRNA (Ibsp、Omd、Alpl、Bglap、Col1a1、Ogn、Aspn) 与 3 条 miRNA (miR-9\_6666-5p、let-7c-5p、miR-145a-5p)。

## 2.4 不同时间梯度微重力暴露下 miR-9\_6666-5p 在 MC3T3-E1 细胞中的表达

根据构建的 miRNA-mRNA 表达调控网络发现,所筛选出的 3 条 miRNA 中,miR-9\_6666-5p 与微重力环境下成骨细胞分化的关系较为密切, Ogn、Col12a1、Itga1、Oasl2、Runx2、Ston1 等与成骨分化密切相关的基因为 miR-9\_6666-5p 的靶基因。

因此,采用 q-PCR 方法检测不同时间梯度 (0、24、48、72 h) 微重力暴露后 miR-9\_6666-5p 在 MC3T3-E1 细胞中的表达情况。结果显示,随着微重力环境暴露时间的延长,miR-9\_6666-5p 的表达逐渐升高,说明 miR-9\_6666-5p 对微重力环境较为敏感,并可作为研究微重力环境下骨重建的候选因子(见图 5)。

## 3 讨论

### 3.1 微重力环境对骨重建的影响

机械应力在维持骨骼的完整性与骨量方面具有重要的作用<sup>[11]</sup>。随着国防建设、重大生产以及科研探索活动的日益增多,特别是 2020 年中国将建成空间站,宇航员将面临长达 1 年以上的空间飞行时间。但是,航天员长时间微重力暴露后会造骨组织大量流失,易发生骨质疏松,且无法完全恢复,是

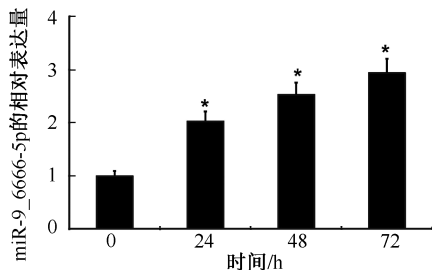


图5 不同时间梯度微重力暴露下 miR-9\_6666-5p 在 MC3T3-E1 细胞中的表达情况 (\*与 0 h 组相比,  $P < 0.05$ )

Fig.5 miR-9\_6666-5p expression in MC3T3-E1 cells at different time gradients under microgravity

制约宇航员长期太空作业的主要因素。空间飞行资料显示,失重性骨质流失是以骨形成受抑制且骨吸收增强为主要表现的过程,微重力环境下机体骨量大量流失,骨相关细胞功能受损<sup>[12-14]</sup>。空间实验人员搭载大鼠和猴进行为期 2 周的微重力暴露,结果显示,大鼠骨细胞功能受损,骨矿物质吸收明显,骨细胞被严重破坏;猴长骨出现较为明显的溶骨效应,骨细胞陷窝加重<sup>[15-17]</sup>。同样,本课题组前期利用尾悬吊与 RCCS 的方法分别建立动物与细胞水平的微重力环境。结果发现,微重力环境下,小鼠骨组织的显微结构遭到破坏,宏观力学性能减弱;成骨细胞骨架发生重组,细胞增殖、分化均受到显著抑制,且与 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活相关<sup>[18-19]</sup>。以上研究结果表明,微重力环境在多层次对机体的骨重建进行调控,然而其具体的分子生物学机制仍不清楚。

### 3.2 微重力环境下 miRNA 对成骨细胞分化的影响

miRNA 是一种内源性的小非编码 RNA 分子 (15~25 个核苷酸),其主要通过靶向具有互补序列的 mRNA 调节转录后的表达,抑制 mRNA 的翻译或增强其降解。近年来,miRNA 在维持细胞表型方面发挥了重要作用,随着测序技术与生物信息学的发展,目前已鉴定出包括骨相关细胞在内的不同细胞类型中数以万计的 miRNA 的生物学功能。如今,有关 miRNA 调控骨代谢的研究不一而足,然而研究微重力下 miRNA 调控骨代谢的研究尚不多见。Hu 等<sup>[20]</sup>研究发现,在微重力环境下,大鼠原代成骨细胞中 miR-132-3p 的表达上调;分别过表达或低表达 miR-132-3p 后发现,细胞向成骨分化抑制或增强;此外,miR-132-3p 可通过与 Ep300 蛋白相互作用,

进而抑制 Runx2 的活性和乙酰化来调控骨代谢活动。然而,微重力环境下成骨细胞中 miRNA 的表达谱变化以及生物学功能的改变仍尚不清楚。

### 3.3 微重力环境下 MC3T3-E1 细胞中 miRNA/mRNA 表达谱变化

本研究采用 RNA-Seq 方法研究微重力环境下 MC3T3-E1 成骨细胞中 miRNA/mRNA 表达谱的改变。通过生物信息学分析,鉴定出了差异表达的 160 条 miRNA 与 1 912 个 mRNA,为 MC3T3-E1 成骨细胞对力学刺激缺失的响应提供了基因表达谱。另外,根据进一步的生物信息学分析,筛选出微重力下与成骨分化相关的候选基因及相关的信号通路。在筛选出的信号通路中,NF- $\kappa$ B 信号通路是占主导的一条信号通路,其中富集的基因有 10 个,且骨涎蛋白 (bone sialoprotein 2, Ibsp) 表达量最高。研究发现,低表达 COL15A1 或 Ibsp 导致髌关节置换患者的骨小梁厚度降低,骨表面积和组织体积的比值增大,表明 COL15A1 或 IBSP 参与调控骨组织的微观结构<sup>[21]</sup>。骨调蛋白 (osteomodulin, Omd) 能在成骨细胞中特异性表达。研究表明,Omd 的表达受转录因子 Runx2、Smads 或细胞因子 TGF- $\beta$ 1 和 BMP-2 的调控<sup>[22]</sup>。无孢蛋白 (asporin, Aspn) 是一种 SLRP 家族蛋白,参与 TGF- $\beta$  介导的软骨细胞活性调控<sup>[23]</sup>。Nfkbia 又被称为 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制剂  $\alpha$ (I $\kappa$ B $\alpha$ )。研究表明,NF- $\kappa$ B 信号通路在骨重建过程中发挥着重要的功能,而骨吸收过程则主要是由 RANK/RANKL 介导。此外,机体在处于非正常的环境中会产生细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等,这些细胞因子则会激活 NF- $\kappa$ B 转录因子<sup>[24-25]</sup>。随后,NF- $\kappa$ B 又会进一步导致细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等的释放,最终导致骨质破坏<sup>[26]</sup>。Alpl、Bglap、Colla1 是成骨细胞分化的主要标志物,在调节骨钙平衡的过程具有重要作用,也是临床诊断骨质疏松、骨钙代谢异常的重要指标。以上结果提示,微重力暴露后,MC3T3-E1 成骨细胞中与骨代谢相关的基因发生显著性改变,说明 miRNA/mRNA 表达谱改变在调节微重力环境下成骨细胞进程中发挥着重要的作用。

### 3.4 微重力环境下调节成骨细胞分化的候选 miRNA 选择分析

本文根据 miRNA-mRNA 相互作用网络选取 miR-9\_6666-5p 作为后续研究的靶 miRNA。实验结

果显示,在不同时间的微重力暴露下,miR-9\_6666-5p的表达水平随暴露时间的增加而增强。因此,本文确定 miR-9\_6666-5p 是一个与重力密切相关的 miRNA。既往的研究证实,miRNA 主要通过靶向具有互补序列的 mRNA 调节转录后的表达,抑制 mRNA 的翻译或增强其降解来行使其生物学功能。根据 miRNA-mRNA 相互作用网络,本文发现 miR-9\_6666-5p 与 Ogn、Col12a1、Itga1、Oasl2、Runx2、Ston1 密切相关。测序结果表明,在微重力环境条件下,上述 6 个 mRNA 的表达均下调,这说明 Ogn、Col12a1、Itga1、Oasl2、Runx2、Ston1 在微重力条件下作为负调控因子调节成骨细胞分化。综上所述,可以确定 miR-9\_6666-5p 在微重力环境下调控成骨分化的过程中起到重要作用,可能是通过与 Ogn、Col12a1、Itga1、Oasl2、Runx2、Ston1 等基因相互作用实现的,但具体的机制仍需进一步验证。

## 4 结论

本文通过 RNA-seq 测序技术对微重力环境下 MC3T3-E1 成骨细胞中 miRNA/mRNA 的表达谱进行分析研究,预测 miRNA 与 mRNA 之间的相互作用关系,并构建相关的作用网络,找出一条微重力敏感的 miRNA——miR-9\_6666-5p。本文的研究结果将有助于更好地理解 mRNA 与 miRNA 的关系,以及它们在微重力环境下对成骨分化和骨重建的作用。

## 参考文献:

[ 1 ] 龙勉. 细胞-分子层次的多尺度力学-化学-生物学耦合 [ J ]. 医用生物力学, 2016, 31(4): 327-332.  
LONG M. Multiscale mechano-chemo-biological coupling at cellular and molecular levels [ J ]. J Med Biomech, 2016, 31(4): 327-332.

[ 2 ] 陈阳, 马信龙, 马剑雄. 废用性骨质疏松症的研究进展 [ J ]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19(12): 1286-1290.

[ 3 ] ALEXANDRE C, VICO L. Pathophysiology of bone loss in disuse osteoporosis [ J ]. Joint Bone Spine, 2011, 78(6): 572-576.

[ 4 ] ALLEN DL, BANDSTRA ER, HARRISON BC, *et al.* Effects of spaceflight on murine skeletal muscle gene expression [ J ]. J Appl Physiol, 2009, 106(2): 582-595.

[ 5 ] HATTON DC, YUE Q, DIERICKX J, *et al.* Calcium metabolism and cardiovascular function after spaceflight [ J ]. J Appl Physiol, 2002, 92(1): 3-12.

[ 6 ] CRUCIAN B, SAMS C. Immune system dysregulation dur-

ing spaceflight: Clinical risk for exploration-class missions [ J ]. J Leukoc Biol, 2009, 86(5): 1027-1038.

[ 7 ] PASQUINELLI AE. MicroRNAs and their targets: Recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship [ J ]. Nat Rev Genet, 2012, 13(4): 271-282.

[ 8 ] BELLAVIA D, DE LUCA A, CARINA V, *et al.* Deregulated miRNAs in bone health: Epigenetic roles in osteoporosis [ J ]. Bone, 2019, 122: 52-75.

[ 9 ] KUREEL J, DIXIT M, TYAGI AM, *et al.* miR-542-3p suppresses osteoblast cell proliferation and differentiation, targets BMP-7 signaling and inhibits bone formation [ J ]. Cell Death Dis, 2014, 5(2): e1050.

[ 10 ] RAHMAN MS, AKHTAR N, JAMIL HM, *et al.* TGF- $\beta$ /BMP signaling and other molecular events: Regulation of osteoblastogenesis and bone formation [ J ]. Bone Res, 2015, 3(1): 11-30.

[ 11 ] MANOLAGAS SC. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis [ J ]. Endocr. Rev, 2000, 21(2): 115-137.

[ 12 ] LYNCH MP, CAPPARELLI C, STEIN L, *et al.* Apoptosis during bone-like tissue development *in vitro* [ J ]. J Cell Biochem, 1998, 68(1): 31-49.

[ 13 ] CARRNELIET G, BOUILLON R. The effect of microgravity on morphology and gene expression of osteoblasts *in vitro* [ J ]. FASEB J, 1999, ( Suppl 13 ): S1292-1341.

[ 14 ] HUGHES, FULFORD M, TJANDRAWINATA R, *et al.* Effects of microgravity on osteoblast growth [ J ]. Gravit Space Biol Bull, 1998, 11(2): 512-601.

[ 15 ] DOTY SB, MOREY-HOLTON ER, DURNOVA GN, *et al.* Cosmos 1887: Morphology, histochemistry, and vasculature of the growing rat tibia [ J ]. FASEB J, 1990, 4(1): 16-23.

[ 16 ] RODIONOVA NV, POLKOVENKO OV, OGANOV VS. Interactions of cells in zones of bone resorption under microgravity and hypokinesia [ J ]. J Gravit Physiol, 2004, 11(2): 147-151.

[ 17 ] RODIONOVA NV, OGANOV VS, ZOLOTOVA NV. Ultrastructural changes in osteocytes in microgravity conditions [ J ]. Adv Space Res, 2002, 30(4): 765-770.

[ 18 ] 韩标, 张新昌, 李昊, 等. 不同强度周期性动态力学载荷对微重力下骨质疏松的影响 [ J ]. 医用生物力学, 2017, 32(1): 83-87.  
HAN B, ZHANG XC, LI H, *et al.* The effect of periodic dynamic mechanical load with different intensity on microgravity-induced osteoporosis [ J ]. J Med Biomech, 2017, 32(1): 83-87.

[ 19 ] 韩标, 张扬, 李昊, 等. 模拟微重力环境下核因子  $\kappa$ B 信号通路调节 MC3T3-E1 细胞成骨分化的实验研究 [ J ]. 生物医学

- 工程学杂志, 2019, 36(3): 421-427.
- [20] HU Z, WANG Y, SUN Z, *et al.* miRNA-132-3p inhibits osteoblast differentiation by targeting Ep300 in simulated microgravity [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 18655.
- [21] TROŠT Z, MENCEJ-BEDRAC S, ALBAGHA OM, *et al.* The expression of COL15A1 and IBSP genes correlate with trabecular bone microarchitecture parameters [J]. *Bone*, 2012, 50(3): S131-S131.
- [22] REHN AP, CHALK AM, WENDEL M. Differential regulation of osteoadherin (OSAD) by TGF- $\beta$ 1 and BMP-2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 349(3): 1057-1064.
- [23] KIZAWA H, KOU I, IIDA A, *et al.* An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis [J]. *Nat Genet*, 2005, 37(2): 138-144.
- [24] RAUNER M, SIPOS W, PIETSCHMANN P. Osteoimmunology [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2007, 143(1): 31-48.
- [25] SAGAR DR, ASHRAF S, XU L, *et al.* Osteoprotegerin reduces the development of pain behaviour and joint pathology in a model of osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(8): 1558-1565.
- [26] BRÜHL H, MACK M, NIEDERMEIER M, *et al.* Functional expression of the chemokine receptor CCR7 on fibroblast-like synoviocytes [J]. *Rheumatology*, 2008, 47(12): 1771-1774.

## 冯元桢先生百年纪念感言

张西正

冯元桢先生作为生物力学的开拓者和奠基人,其“应力-生长”理论是整个生物力学的灵魂,更是现阶段深入研究生物力学与力学生物学重要的理论基础。该理论揭示了机械运动与生命运动的关系,引领生物力学从“应用于生物学的力学”转变为“力学与生命过程有机结合”,直接促进了力学生物学的诞生。我们基于冯先生的“应力-生长”理论,开展力学环境下骨重建的力学生物学研究。建立了从微重力到超重、运动疲劳到过载、深海高压到高原低压的等效载荷谱,从而多维度(面

力-体力)、多尺度(器官-组织-细胞-分子)研究了力学环境作用下骨组织重建的力学生物学机制,发展和丰富了骨重建的理论,并以此缅怀和纪念冯元桢先生。当然,作为人类健康与医学的重大问题,骨重建的理论还需要大量的科学研究成果来进一步丰富和发展,因此需要大量的研究人员参与其中。我们将遵循冯先生的人生信条“听从自己内心的声音,永不放弃对未知的探索,生命不息,奋斗不止”,促进生物力学科学的不断发展与壮大。