

论著

文章编号:1000-5404(2013)10-0922-05

## miRNA-144 靶向调节钙粘蛋白 11 对间充质干细胞成骨分化的抑制效应

康夏<sup>1,2</sup>, 康菲<sup>1</sup>, 杨波<sup>1</sup>, 郭洪峰<sup>1</sup>, 权毅<sup>2</sup>, 董世武<sup>1</sup> (400038 重庆, 第三军医大学基础医学部人体解剖学教研室, 重庆市生物力学重点实验室<sup>1</sup>; 610083 成都, 成都军区总医院骨科<sup>2</sup>)

**[摘要]** 目的 证实 miRNA-144 靶向调节钙粘蛋白 11 (Cad-11) 表达, 抑制间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSCs) 的成骨分化。方法 通过双荧光素酶报告系统对 Cad-11 与 miRNA-144 的靶基因关系进行鉴定; 将 pre-miR-144 及 anti-miR-144 分别转染 MSCs, 成骨诱导 7、14 d 后, 实时定量 PCR 和蛋白印迹方法检测细胞中 Cad-11 及成骨标志物 Runx2、ALP 的表达情况, 分析其与 MSCs 成骨分化的变化关系。黏附实验检测 miRNA-144 对 MSCs 成骨分化过程中黏附的影响。结果 Cad-11 是 miRNA-144 的靶基因; miRNA-144 在成骨诱导第 7、14 天可明显抑制 Cad-11、Runx2 和 ALP 的表达 ( $P < 0.05$ ), 同时降低 MSCs 的黏附性。结论 miRNA-144 通过抑制 Cad-11 的表达对间充质干细胞的成骨分化起负向调控的作用。

**[关键词]** miRNA-144; 钙粘蛋白 11; 间充质干细胞; 骨生成

**[中图分类号]** R322.71; R329.2; R394.3

**[文献标志码]** A

## miRNA-144 inhibiting osteogenesis of mesenchymal stem cells by targeting cadherin-11

Kang Xia, Kang Fei, Yang Bo, Guo Hongfeng, Quan Yi, Dong Shiwu (<sup>1</sup>Department of Anatomy, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; <sup>2</sup>Department of Orthopaedics, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of miRNA-144 in inhibiting the osteogenesis of mesenchymal stem cells (MSCs) by regulating cadherin-11 (Cad-11). **Methods** Dual-luciferase reporter assay was used to identify the relationship between miRNA-144 and Cad-11. Pre-mir-144 and anti-mir-144 were transferred into C3H/10T1/2 cells, respectively. Then the cells were transfected after osteogenesis induction for 7 d and 14 d. Real-time PCR and Western blotting were performed to detect the expression of Cad-11 and related osteogenetic biomarkers, including Runx2 and ALP. Then the adhesion of MSCs was tested. **Results** Cad-11 was the target gene of miRNA-144, and miRNA-144 could downregulate the expression of Cad-11, Runx2 and ALP. Furthermore, it could inhibit the adhesion of MSCs. **Conclusion** miRNA-144 can inhibit the osteogenesis process of MSCs by downregulating Cad-11.

**[Key words]** miRNA-144; cadherin-11; mesenchymal stem cells; osteogenesis

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2011CB964701) and the National Natural Science Foundation of China (30872636, 81271980). Corresponding author: Quan Yi, E-mail: quanyi56@sina.com; Dong Shiwu, E-mail: dongshiwu@163.com

间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSCs) 是组织工程及生物材料研究的重要种子细胞, 其向成骨细胞的定向分化是骨组织工程及骨病治疗中的重要研究

内容。钙粘蛋白 11 (Cadherin-11, Cad-11) 在 MSCs 向成骨细胞分化过程中以及在骨骼的形成和发育中起着重要作用<sup>[1-2]</sup>, 但是该过程中的调控网络尚不完全清楚。微小 RNA (microRNA, miRNA) 作为近年发现的重要的转录后调节因素, 广泛参与干细胞向成骨细胞分化的过程<sup>[3-4]</sup>。为进一步了解 miRNA 对 MSCs 成骨分化的调控研究, 我们通过 miRNA 基因芯片分析发现 miR-144 显著降低, 生物信息学预测发现 Cad-11 可能

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划 (973 计划, 2011CB964701); 国家自然科学基金 (30872636, 81271980)

**[通信作者]** 权毅, E-mail: quanyi56@sina.com  
董世武, E-mail: dongshiwu@163.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130321.1423.028.html> (2013-03-21)

是 miR-144 的潜在靶基因。由于 miRNA 通过抑制靶基因发挥作用,本研究探讨 miRNA-144 能否通过抑制 Cad-11 的表达从而调控 MSCs 向成骨细胞的分化,旨在阐明 MSCs 在成骨微环境诱导下的分化过程中 miRNA 与蛋白编码基因表达的互动机制,为临床利用 miRNA 调控成骨细胞的生物学行为奠定基础,并有望为干细胞成骨定向分化在组织工程领域的应用提供有价值的线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

pre-miR-144、anti-miR-144 及其阴性对照、Lipofectamine 2000 与 TRIzol 试剂均购于 Invitrogen 公司,质粒抽提盒购自 Promega 公司,成骨诱导培养基(胎牛血清、双抗、抗坏血酸、地塞米松、 $\beta$ -甘油磷酸钠、谷氨酰胺)购于赛业公司,胎牛血清、DMEM 培养基购于 Hyclone 公司,Cad-11、 $\beta$ -actin 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,Real-time PCR 相关试剂购自 GeneCopoeia 公司。

### 1.2 构建双荧光素酶报告基因系统载体

合成与 miR-144 的预测结合位点完全互补的序列(PT),Cad-11 mRNA 3' UTR 端的双拷贝 MRE 序列(2  $\times$  MRE)以及对 MRE 序列的碱基位点进行人为点突变的突变序列(Mut)<sup>[5]</sup>。使用 Hind III 及 Spe I 限制性内切酶将 pMIR-Report 荧光素酶质粒酶切,后将 PT、MRE 及 Mut 片段连接到 pMIR-Report 质粒的 Spe I/Hind III 酶切位点之间,片段长度为 31 ~ 72 bp,进一步通过测序确认质粒是否构建成功。

### 1.3 细胞培养及转染

1.3.1 细胞培养 HEK293 细胞和 C3H/10T1/2 细胞培养于含 10% FBS F12-DMEM 培养基,HEK293 与 C3H/10T1/2 细胞均置于 37  $^{\circ}$ C,含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱,每天换液 1 次。

1.3.2 细胞转染 双荧光素酶检测样本细胞的制备:实验分组为 PT 组、2  $\times$  MRE 组、Mut 组及相应的阴性对照组。将 50  $\mu$ L 无血清、无抗生素的培养基与 1  $\mu$ L Lipofectamine 2000 轻柔混合,室温孵育 5 min,同时将 125 ng 重组后 pMIR-Report 质粒与 25 ng pRL-TK 质粒加入分别含有 150 ng pre-miR-144、anti-miR-144、pre-miR 对照或 anti-miR 对照的 50  $\mu$ L 无血清、无抗生素的培养基中,轻柔混匀,后将孵育后的 Lipofectamine 2000 混合溶液与质粒及 miRNA 混合溶液混匀,室温下孵育 30 min。将孵育后的溶液加入含有 500  $\mu$ L 不含抗生素的培养基及 HEK293 细胞的 24 孔板中,在 37  $^{\circ}$ C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内孵育 24 h。成骨诱导样本细胞的制备:实验分组为 pre-miR-144 组(实验组)、anti-miR-144 组(抑制组、Inhibitor 组)及对照组。将 250  $\mu$ L 无血清、无抗生素的培养基与 5  $\mu$ L Lipofectamine 2000 轻柔混合,室温孵育 5 min,同时将 100 pmol pre-miR-144、anti-miR-144 加入 250  $\mu$ L 无血清、无抗生素的培养基中,轻柔混匀,后将孵育后的 Lipofectamine 2000 混合溶液与质粒及 miRNA 混

合溶液混匀,室温下孵育 30 min。将孵育后的溶液加入含有 2 mL 不含抗生素的培养基及 C3H/10T1/2 细胞的 6 孔板中,在 37  $^{\circ}$ C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内孵育 24 h,然后更换为成骨诱导培养基,每 3 天更换 1 次培养液。选取诱导 7、14 d 样本进行实时定量 PCR 检测。选取诱导 14 d 样本进行蛋白印迹检测。

### 1.4 双荧光素酶报告基因检测

实验组及其阴性对照组:pre-miR-144 或其阴性对照 miRNA 分别与 pMIR-PT、pMIR-MRE 及 pMIR-Mut 共转染;抑制组(Inhibitor 组)及其阴性对照组:anti-miR-144 或其阴性对照 miRNA 分别与 pre-miR-144 及 pMIR-PT、pMIR-MRE 及 pMIR-Mut 共转染。裂解转染后的细胞,配置 LARII 和 Stop and Glo。每管光度仪检测管中加入 100  $\mu$ L LARII,设定光度仪 2 s 的预检测延迟,10 s 的检测时间。将 20  $\mu$ L 细胞裂解产物加入检测管,吹打混匀 2 ~ 3 次,置于光度仪中读数,计数萤火虫荧光素酶活性。然后加入 100  $\mu$ L Stop and Glo 试剂,混匀,重置光度仪中读数。计数海肾荧光素酶活性。统计萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性比值。

### 1.5 Real-time PCR 检测

按照 1.3 中方法转染并成骨诱导 7、14 d。按照  $\Delta\Delta$ Ct 解析法进行实验设计并计算。用 TRIzol 试剂提取细胞 RNA,并进行质量鉴定。用 Primer 5 软件进行引物设计,Cad-11(NM\_009866)上游:5'-TTGAAGAGGAGGATGTCCGTGAG-3',下游:5'-TGATAAGCAGGGTGGCTATGTGCG-3',预期片段长度为 99 bp;Runx2(NM\_001145920.1)上游:5'-GAATGAAGTCGCTGTCCTCG-3',下游:5'-CCTTCCCTGCTCTTGTGG-3',预期片段长度为 146 bp;ALP(NM\_007431)上游:5'-CTGACTGACCCCTCGCTCTC-3',下游:5'-GTGGTCAATCCTGCTCCT-3',预期片段长度为 105 bp;GAPDH(NM\_008084)上游:5'-CTTGGGCTACTGAGGACC-3',下游:5'-CATAACCAGGAAATGAGCTTGAC-3',预期片段长度为 125 bp。用 First Strand cDNA Synthesis Kit 进行 25  $\mu$ L 体系逆转录反应。取 2  $\mu$ L 逆转录产物进行 PCR 反应(SYBR PrimeScript RT-PCR Kit):10  $\mu$ L 2  $\times$  All-in-One<sup>TM</sup> qPCR Mix,2  $\mu$ L 上、下游引物(0.2  $\mu$ mol/L),2  $\mu$ L cDNA,加水至总体积为 20  $\mu$ L。反应条件:95  $^{\circ}$ C,10 min;40 个 PCR 循环:95  $^{\circ}$ C 10 s;60  $^{\circ}$ C 20 s;72  $^{\circ}$ C 20 s。

### 1.6 Western blot 检测

按照 1.3 中方法转染并成骨诱导 14 d。采用蛋白质提取试剂盒提取培养细胞的总蛋白,用 BCA 蛋白定量检测工作液测定蛋白含量,取 50  $\mu$ g 总蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移至 PVDF 膜,奶粉封闭后加入 1:1 000 稀释兔抗鼠 Cad-11 和  $\beta$ -actin 抗体 4  $^{\circ}$ C 过夜,漂洗后 1:1 000 山羊抗兔二抗 37  $^{\circ}$ C 2 h,化学发光试剂显色,然后进行检测。

### 1.7 细胞黏附实验

将数量为  $5 \times 10^3$  的细胞接种至 6 孔板中进行细胞培养,直到细胞融合度接近 100%。按 1.3 中方法转染,转染 6 h 更换培养基,转染 24 h 去掉培养基,PBS 漂洗后用 Hoechst 33342 标记,然后用胰酶消化 Hoechst 33342 标记的贴壁细胞,离心去上

清,用无血清培养基重悬。37℃孵育2h,去掉细胞悬液,PBS漂洗3次。加入PBS置于摇床上震荡5min后,弃去悬浮细胞。激光共聚焦显微镜下观察细胞黏附能力。

### 1.8 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 17.0 统计学软件,组间比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 生物信息学分析结果

经过 Targetscan 预测 miR-144 共有 650 个潜在靶基因,其中包含 Cad-11。在 Cad-11 的 3' UTR (位置为 167 ~ 173) 存在 1 个保守的结合序列(图 1)。



图1 Cadherin-11 的 3' UTR 端与 miR-144 的预测结合位点

### 2.2 目标载体构建鉴定

经过测序,合成的核苷酸片段连入 pMIR-Report 荧光报告载体,序列正确,没有碱基缺失、替换等,质粒构建成功(表 1)。

表1 合成的目标片段序列

目标载体 (5'→3')	序列	片段长度
PT	上游 actagtACTACATCATCTATACTGTAaagett 下游 aagettTACAGTATAGATGATGTACTactagt	32 bp
2 × MRE	上游 actagtAGGACATCAAAGTGGAAAATACTGTgtag-ctaaAGGACATCAAAGTGGAAAATACTGTGaaagett 下游 aagcttCACAGTATTTCCACTTTGATGTCCTTTA-GCTACACAGTATTTCCACTTTGATGTCCTactagt	71 bp
Mut	上游 actagtAGGACATCAAAGTGGAAAAGaagett 下游 aagcttCTTTCCACTTTGATGTCCTactagt	31 bp

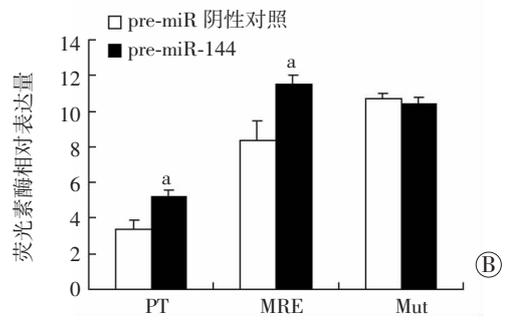
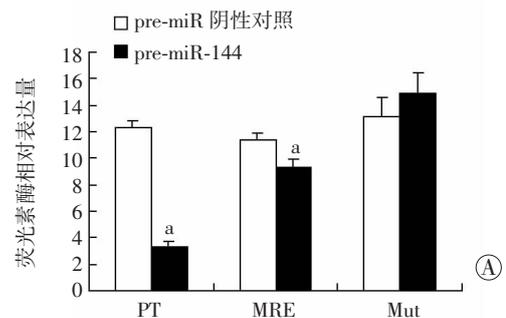
小写字母表示连接序列及两端的酶切位点序列;大写字母表示目的基因片段

### 2.3 双荧光素酶报告基因系统验证 Cadherin-11 是 miRNA-144 的靶基因

将重组 pMIR-PT 质粒或 pMIR-MRE 质粒分别与 pre-miR-144 共转染至 HEK293 细胞后,其荧光表达量分别较对照组明显下降,但 pre-miR-144 与 pMIR-MUT 共转染无明显变化。在加入 pre-miR-144 的同时加入 anti-miR-144 或其阴性对照后,阴性对照组的荧光素表达量较抑制组明显下降。与对照组相比,pre-miR-144 能够抑制 PT 组和 MRE 组的荧光表达 ( $P < 0.05$ ),但不能影响 Mut 组,而加入 anti-miR-144 后,其能够拮抗 pre-miR-144 的作用 ( $P < 0.05$ )。证明 miR-144 可与 Cad-11 mRNA 的 3' -UTR 端的 MRE 序列特异性结合。见图 2。

### 2.4 miRNA-144 在 MSCs 向成骨细胞分化过程中抑制 Cad-11 的表达并促进其向成骨细胞的分化

对 MSCs 成骨诱导 7、14 d 后回收的标本进行实时定量 PCR 检测,并与对照组进行对比发现,转染 pre-miR-144 后,Cad-11、Runx2、ALP 在实验组的表达较对照组明显下降 ( $P < 0.05$ ),而转染 anti-miR-144 后,其表达较对照组明显上升(表 2)。Western blot 检测结果则显示转染 pre-miR-144 后,Cad-11 的蛋白表达量较对照组明显减少,而抑制组则明显增加(图 3)。证明 pre-miR-144 能够抑制 Cad-11 的表达并抑制 MSCs 细胞向成骨细胞方向分化。



a:  $P < 0.05$ , 与阴性对照比较

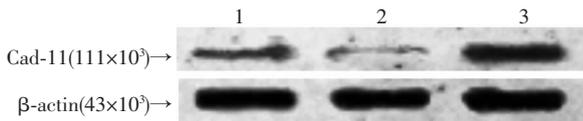
A: 转染 pre-miR-144 及其阴性对照的检测结果; B: pre-miR-144 与 anti-miR-144 共转染或 pre-miR-144 与 anti-miR 阴性对照共转染的检测结果

图2 双荧光素酶基因报告系统鉴定 anti-miR Cad-11 与 miRNA-144 的靶基因关系

表2 Real-time PCR 检测成骨培养 7、14 d 后 Cad-11 及成骨标志物表达 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	Cad-11	Runx2	ALP
对照组			
7 d	1.30 ± 0.04	0.88 ± 0.08	2.29 ± 0.13
14 d	1.58 ± 0.09	1.43 ± 0.06	3.35 ± 0.12
实验组			
7 d	0.78 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.01 ± 0.24 <sup>a</sup>
14 d	0.88 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.14 <sup>a</sup>	2.20 ± 0.29 <sup>a</sup>
抑制组			
7 d	1.81 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.34 ± 0.11 <sup>a</sup>	5.57 ± 0.64 <sup>a</sup>
14 d	2.64 ± 0.13 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.23 <sup>a</sup>	9.96 ± 0.62 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与同时时间点对照组比较



1: 对照组; 2: 实验组; 3: 抑制组

图3 Western blot 检测转染后成骨诱导第14天时 MSCs 中 Cad-11 的表达

### 2.5 miRNA-144 在 MSCs 向成骨细胞分化过程中抑制细胞的黏附能力

转染 pre-miR-144 后, MSCs 的黏附能力较对照组明显降低, 而抑制组则明显增高(图4), 证明 miR-144 会抑制 MSCs 的黏附能力。与对照组(281.67 ± 38.07)相比, 实验组(188.33 ± 18.17)明显降低( $P < 0.05$ ), 抑制组(373.67 ± 21.39)明显增高( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

成骨细胞源自于 MSCs, 是骨形成的主要细胞, 负责合成和分泌骨基质, 并促进矿化过程。MSCs 在治疗骨坏死、骨不愈合中十分重要, 如何调控 MSCs 向成骨

细胞分化是骨组织工程的一个关键问题。目前 MSCs 向成骨细胞分化的调控基因主要有 Cadherin 家族、Smad 家族、Runx2、ALP 以及 C22 等<sup>[1-2,6]</sup>。Cadherin 家族在整个成骨分化的信号链中发挥了多种功能, 是关键起始分子。Cad-11 是该家族的一员, 属 II 型钙黏附蛋白家族。其结构包括一个胞外结构域、一个跨膜区、一个胞内结构域及 N' 端的信号序列<sup>[7]</sup>, 其实质为一种钙离子依赖性介导细胞-细胞间黏附的单链跨膜糖蛋白, 钙离子必须结合到胞外结构域的重复序列上, 才能使钙黏附蛋白胞外部分呈硬杆样结构并激活下游分子, 发挥生物活性。Hadeball 等<sup>[8]</sup>发现 Cad-11 的激活依赖于 Wnt 通路的激活, 而 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路对 MSCs 的成骨分化具有明确的促进作用, miRNA 对此通路的调控作用也已明确<sup>[9-10]</sup>。然而, Cad-11 并未直接参与到 Wnt/ $\alpha$ -catenin 通路中, 它拥有自己的下游分子。Shin 等<sup>[11]</sup>发现 Cad-11 及 N-Cad 的表达升高能够决定 C3H10T1/2 细胞向成骨细胞方向分化。这一结果得到了 Kii 等<sup>[12]</sup>的实验证实, 他们

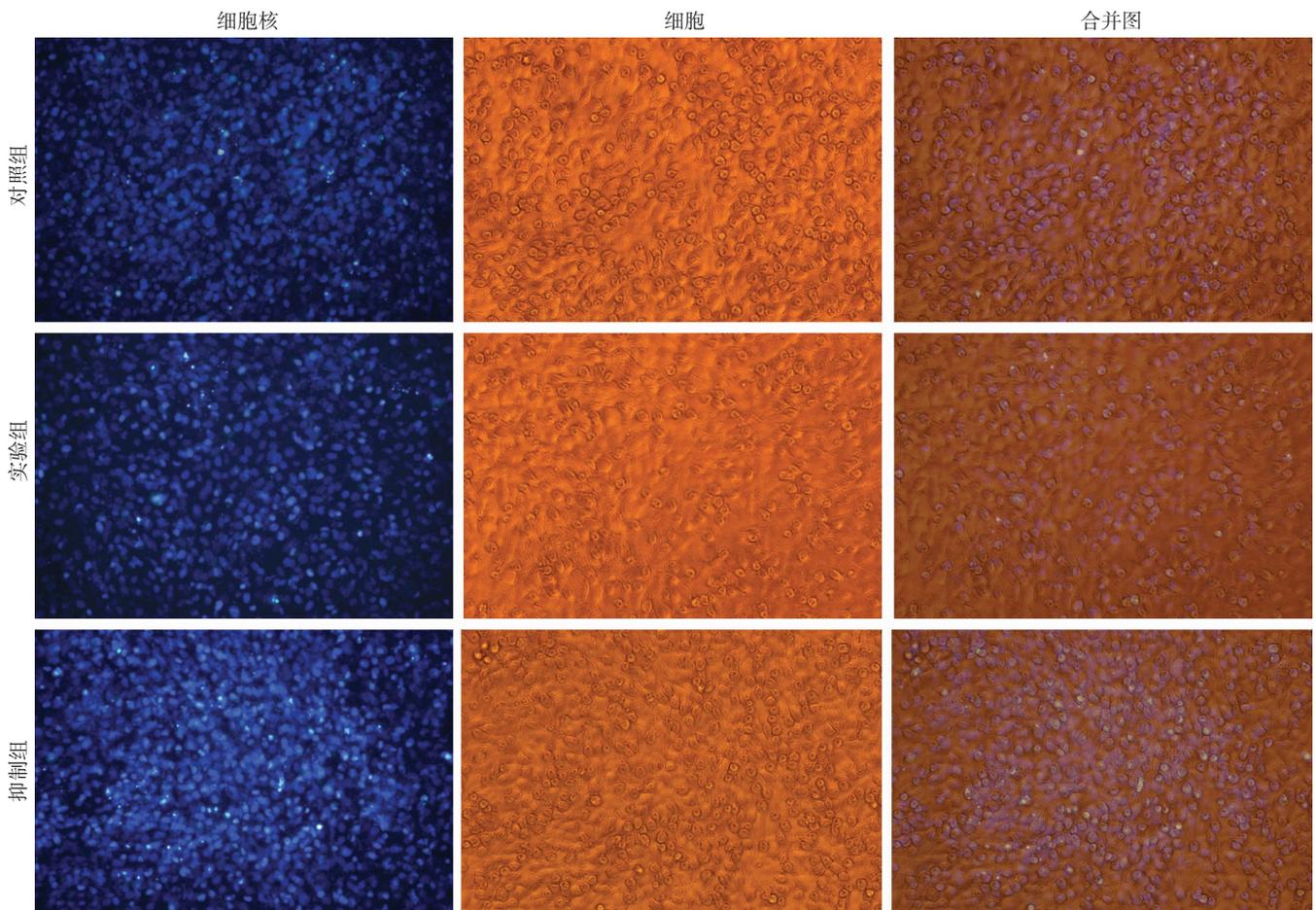


图4 Hoechst33342 染色观察转染后成骨诱导培养第14天 MSCs 的黏附能力 (×100)

发现 Cad-11 和 N-Cad 是决定 MSCs 向成骨系发展的关键分子,其表达部位均位于细胞的黏附部位,但两者引起的细胞形态不同,Cad-11 介导的黏附会形成片状结构,而通过 N-Cad 则形成球状结构,分子机制研究发现 Cad-11 在成骨过程中会诱导 ALP 等成骨分子表达的升高,因而他们认为 Cad-11 能够直接调节 MSCs 的成骨分化。而 Koike 等<sup>[13]</sup> 研究发现硫酸软骨素-E (CS-E) 能够与 Cad-11 结合,进而激活下游的 Smad 家族分子,促进成骨分化,在加入 Cad-11 抗体后,细胞的成骨分化过程即被阻断,同时细胞黏附也会受到抑制。这些研究说明 Cad-11 主要通过影响 ALP、Smad 家族等下游分子以及细胞的黏附影响干细胞的成骨分化。但是,这些研究仅初步证实了 Cad-11 对 MSCs 成骨诱导的重要作用,其完整的调控网络尚不清楚,由于成骨是一种骨形成与骨吸收的平衡过程,负性调控在成骨过程中的作用不应忽视。

实时定量 PCR 和 Western blot 检测发现转染 pre-miR-144 后,Cad-11、Runx2 和 ALP 在成骨诱导 7、14 d MSCs 中的表达明显降低,MSCs 的成骨诱导过程受到抑制,而加入 miRNA-144 的 inhibitor 后,会促进上述这些分子的表达。说明 miRNA-144 能够通过抑制 Cad-11 的表达影响到其下游分子的表达,从而负向调控 MSCs 的成骨诱导过程。同时,对转染 miR-144 后 MSCs 的黏附能力进行检测,发现 miR-144 能够显著降低 MSCs 在成骨诱导过程中的黏附能力。

由于 Cad-11 与 Wnt 信号通路以及 BMP 蛋白家族之间的联系十分紧密,miR-144 是否能够通过调控 Cad-11 进而影响 Wnt 或 BMP 蛋白家族的表达,从更大范围内影响 MSCs 的成骨诱导过程,形成一个完整的调控网络,我们将进一步研究。本研究为骨组织工程材料的研究以及股骨头坏死、骨不连等疑难病症的治疗提供了新的治疗靶点。此外,由于 Cad-11 的过度表达会导致骨关节炎的骨赘生长<sup>[2]</sup>,因此,本研究亦为 miR-144 成为骨关节炎的一个治疗靶点提供了一定的借鉴作用。

#### 参考文献:

[1] Di-Benedetto A, Watkins M, Grimston S, *et al.* N-cadherin and cadherin 11 modulate postnatal bone growth and osteoblast differentiation

by distinct mechanisms[J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 15): 2640 - 2648.

- [2] Kawaguchi J, Azuma Y, Hoshi K, *et al.* Targeted disruption of cadherin-11 leads to a reduction in bone density in calvaria and long bone metaphyses[J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(7): 1265 - 1271.
- [3] Kawaguchi J, Kii I, Sugiyama Y, *et al.* The transition of cadherin expression in osteoblast differentiation from mesenchymal cells: consistent expression of cadherin-11 in osteoblast lineage[J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(1): 260 - 269.
- [4] Kim K M, Park S J, Jung S H, *et al.* miR-182 is a negative regulator of osteoblast proliferation, differentiation, and skeletogenesis through targeting FoxO1[J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(8): 1669 - 1679.
- [5] Yang B, Guo H, Zhang Y, *et al.* MicroRNA-145 regulates chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells by targeting Sox9 [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21679.
- [6] Yu S, Geng Q, Sun F, *et al.* Osteogenic differentiation of C2C12 myogenic progenitor cells requires the Fos-related antigen Fra-1 - A novel target of Runx2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 430(1): 173 - 178.
- [7] Lee D M, Kiener H P, Agarwal S K, *et al.* Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis[J]. *Science*, 2007, 315(5814): 1006 - 1010.
- [8] Hadeball B, Borchers A, Wedlich D. Xenopus cadherin-11 (Xcadherin-11) expression requires the Wg/Wnt signal[J]. *Mech Dev*, 1998, 72(1/2): 101 - 113.
- [9] Hassan M Q, Maeda Y, Taipaleenmaki H, *et al.* miR-218 directs a Wnt signaling circuit to promote differentiation of osteoblasts and osteomimicry of metastatic cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(50): 42084 - 42092.
- [10] Hu W, Ye Y, Zhang W, *et al.* miR-142-3p promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(2): 689 - 693.
- [11] Shin C S, Lecanda F, Sheikh S, *et al.* Relative abundance of different cadherins defines differentiation of mesenchymal precursors into osteogenic, myogenic, or adipogenic pathways[J]. *J Cell Biochem*, 2000, 78(4): 566 - 577.
- [12] Kii I, Amizuka N, Shimomura J, *et al.* Cell-cell interaction mediated by cadherin-11 directly regulates the differentiation of mesenchymal cells into the cells of the osteo-lineage and the chondro-lineage[J]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(11): 1840 - 1849.
- [13] Koike T, Izumikawa T, Tamura J, *et al.* Chondroitin sulfate-E fine-tunes osteoblast differentiation via ERK1/2, Smad3 and Smad1/5/8 signaling by binding to N-cadherin and cadherin-11 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420(3): 523 - 529.

(收稿:2013-02-23;修回:2013-03-07)

(编辑 龙 亮)