



DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.04.002

<http://xbyx.xysm.net/xbwk/fileup/PDF/201304341.pdf>

miR-125b 通过靶向抑制 Smad4 调控骨髓间充质干细胞成骨分化

陆细红¹, 邓敏², 贺洪辉¹, 曾德辉¹, 张卫¹

(1. 南华大学附属南华医院骨科, 湖南 衡阳 421002; 2. 广州医学院附属肿瘤医院肿瘤研究所, 广州 510183)

[摘要] 目的: 研究 miR-125b 是否通过调控其预测的靶基因 Smad4 表达而调节骨髓间充质干细胞 (MSCs) 成骨分化。方法: 构建 Smad4 3'-UTR- 荧光素酶报告载体, 通过荧光素酶报告检测观察 miR-125b 对 Smad4 3'-UTR- 荧光素酶活性的影响; 分离培养人骨髓 MSCs, 在 MSCs 中转染 miR-125b mimics 并进行成骨诱导, 采用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 Western 印迹检测 Smad4 表达水平; Smad4 siRNA 转染 MSCs 并进行成骨诱导, 通过检测碱性磷酸酶 (AKP) 活性及 RUNX2 mRNA 表达水平变化考察 Smad4 下调对 MSCs 成骨分化的影响。结果: 双荧光素酶报告检测显示 miR-125b 能特异性地与 Smad4 mRNA 的 3'-UTR 结合, 抑制其荧光素酶活性 ($P < 0.05$)。过表达 miR-125b 能抑制 MSCs 成骨分化过程中 Smad4 表达水平。干扰 Smad4 表达能抑制 AKP 活性及 RUNX2 mRNA 表达水平, 它能部分模拟 miR-125b 调控 MSCs 成骨分化的功能。结论: miR-125b 通过抑制靶基因 Smad4 的表达调控 MSCs 成骨分化。

[关键词] miR-125b; 间充质干细胞; 成骨分化; Smad4

miR-125b regulates osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells by targeting Smad4

LU Xihong¹, DENG Min², HE Honghui¹, ZENG Dehui¹, ZHANG Wei¹

(1. Department of Orthopedics, Affiliated Nanhua Hospital of University of South China, Hengyang Hunan 421002;
2. Cancer Research Institute, Affiliated Cancer Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510183, China)

ABSTRACT

Objective: To investigate whether miR-125b regulates the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) by modulating Smad4, a predicted target in silicon.

Methods: Smad4 3'-UTR-luciferase vector was constructed and dual-luciferase reporter gene assay was employed to examine the effect of miR-125b on luciferase activity. MSCs were isolated and cultured from human bone marrow, and then transfected with miR-125b mimics followed by induction of osteogenic differentiation. qRT-PCR and Western blot were used to detect the expressions of Smad4 mRNA and protein. MSCs were induced into the osteoblasts after transfecting with Smad4 siRNA, and the effect of Smad4 downregulation on osteogenic differentiation was observed by AKP activity and RUNX2 mRNA levels.

Results: miR-125b bound Smad4 3'-UTR and inhibited the luciferase activity ($P < 0.05$).

收稿日期 (Date of reception): 2012-09-12

作者简介 (Biography): 陆细红, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事骨髓间充质干细胞分化调控的研究。

通信作者 (Corresponding author): 张卫, Email: zhangwei6601@163.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81101526)。This work was supported by National Natural Science Foundation of China (81101526).

Smad4 mRNA and protein expressions were significantly down-regulated in the MSCs induced into osteogenic differentiation when miR-125b was overexpressed. Downregulation of Smad4 suppressed the AKP activity and RUNX2 mRNA expression, indicating that Smad4 siRNA simulated at least in part the function of miR-125b as the regulator of MSCs osteogenic differentiation.

Conclusion: miR-125b can suppress MSCs osteogenic differentiation by directly targeting Smad4.

KEY WORDS

miR-125b; mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; Smad4

miRNAs是近十年来发现的一类具有调控功能的19~25个核苷酸组成的非编码小分子RNA。成熟miRNA与靶基因mRNA的3'-UTR结合抑制靶mRNA的翻译或降解靶mRNA,从而实现基因表达的转录后调控^[1]。miRNAs参与生命活动过程中一系列的重要进程,包括生长发育、细胞增殖、分化、细胞运动、新陈代谢等^[1-2]。许多研究^[3-4]发现miRNAs参与调控干细胞生物学行为。miRNAs在调控间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)或前体细胞成骨、成软骨及成脂分化过程中发挥重要的生物学功能。例如,miR-30家族能抑制骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)诱导的干细胞成骨分化,通过对靶基因进行验证发现,BMP成骨信号通路中Smad1(mothers against decapentaplegic homolog 1)和RUNX2均是其调控的靶基因^[5]。研究^[6]发现:miR-125b参与MSCs成骨分化。miR-125b在鼠ST2向成骨细胞分化后表达下降,外源性过表达miR-125b可以通过抑制ST2细胞增殖从而抑制其成骨分化,而抑制miR-125b表达则可以促进其成骨分化。马张稳等^[7]在人骨髓MSCs中转染miR-125b inhibitor发现,下调miR-125b表达可促进MSCs的成骨分化。这些研究表明,miR-125b具有负向调控MSCs向成骨分化潜能的功能。然而其具体的分子机制并不清楚。通过生物信息学预测靶基因发现Smad4是其潜在的靶基因。Smad4是BMP/TGF- β 骨形成信号通路的中心介导者。BMPs与苏氨酸激酶的I型和II型受体结合形成异源受体复合物后使Smad蛋白磷酸化。Smad1/Smad5磷酸化后同Smad4结合形成的复合物可直接进入细胞核来调控成骨分化基因的表达^[8]。本研究拟采用荧光素酶报告活性检测、荧光定量PCR(qRT-PCR)、Western印迹等分子生物学技术证实miR-125b可通过靶向调控Smad4抑制MSCs成骨分化,揭示miR-125b调控MSCs成骨分化过程的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

pMIR-REPORT luciferase荧光素酶报告质粒购自美国Ambion公司。Lipofectamine 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司。TRIzol购自美国Invitrogen公司。SYBR Premix ExTaqTM定量PCR试剂、T4-DNA连接酶、*Spe* I和*Hin* dIII限制性内切酶均为大连宝生物公司产品。qRT-PCR miRNA Detection Kit购自广州天根生物公司。miR-125b mimics及inhibitors为美国Ambion公司产品。Quik Change Site-Directed Mutagenesis试剂盒为美国Stratagene公司产品。Smad4 siRNA在美国Invitrogen公司合成,序列为:5'-GCACCATACACACCTAATT-3'。双荧光素酶活性检测试剂盒购自美国Promega公司。Smad4抗体和GAPDH抗体购自美国CST公司。a-MEM培养基为美国Gibco公司产品。胎牛血清来自杭州四季青公司。

1.2 方法

1.2.1 野生型 Smad4 3'-UTR- 荧光素酶报告载体的构建

通过targetscan, Pictar, miRase软件预测出Smad4 mRNA的3'-UTR片段4934~4940 nt与miR-125b有结合位点。根据Smad4 3'-UTR序列设计末端带*Spe* I和*Hin* dIII酶切位点的特异性引物。引物序列为,F:5'-AAGACTAGTAGTGCTTCCTGATTCTTGC,R:5'-TCGAAGCTTAACTGCTGCAAGGTAGCC(带下划线的为酶切位点)。

以正常人血细胞DNA为模板PCR扩增Smad4 3'-UTR部分片段(4544~5333 bp)。将PCR产物与pMIR-REPORT luciferase报告载体分别用*Spe* I和*Hin* dIII双酶切后纯化、连接、产物转化及鉴定。构建野生型Smad4 3'-UTR-荧光素酶报告载体,命名为pSmad4-Mt。

1.2.2 突变型 Smad4 3'-UTR- 荧光素酶报告载体构建

以野生型 pSmad4-Mt 荧光素酶报告载体为模板, 采用 QuikChange Site-Directed Mutagenesis 通过 PCR 反应对 Smad4 3'-UTR 上 miR-125b 结合位点进行定点突变。突变引物为, F: 5'-GTAATTGCTAGTGTTTTCGTTACTTTTAAACATCAGACTGG-3', R: 5'-CCAGTCTGATGTTAAAAGTAAACGAAAACACTAGCAATTAC-3' (下划线表示结合位点的突变)。然后应用 DpnI 酶特异性地去除模板质粒, 转化, 测序鉴定。构建突变型 Smad4 3'-UTR- 荧光素酶报告载体, 命名为 pSmad4-Mut。

1.2.3 MSCs 的分离、培养、成骨诱导

人 MSCs 是从一个 20 岁健康女性志愿者 (自愿参与本研究并已签署知情同意书) 捐献的骨髓中分离得到的。骨髓血采用密度梯度离心法分离 MSCs。MSCs 在含 10% 胎牛血清及双抗的 α -MEM 细胞培养液中培养。在实验中所用 MSCs 的代数均为第 4 代。MSCs 经不同的处理后接种于 6 孔板中, 待细胞融合度达 60%~70% 时, 加入成骨诱导培养基 (含有 10% FBS 的 α -MEM 培养液) 包括 0.1 μ mol/L 地塞米松, 50 μ g/mL 维生素 C, 10 mmol/L β -磷酸甘油钠) 进行成骨分化诱导。每 3 d 进行一次全量换液。

1.2.4 miRNA mimics 或 siRNA 转染细胞

将生长状态良好的细胞接种于 6 孔板中, 待培养细胞生长至 50%~70% 融合开始转染。加入 5 μ L 的脂质体于 250 μ L 无血清培养基中, 室温混匀静置 5 min。在另一管中加入 100 pmol miRNA mimics 或 siRNA 于 250 μ L 无血清培养基中。将上述两管混合, 室温静置 45 min。用 Hank's 液洗涤细胞 2 次, 然后加入 1.5 mL 无抗生素的无血清培养基。将上述混合物加入 6 孔板中, 轻轻摇匀。37 $^{\circ}$ C 培养 4~6 h 后, 换成完全培养基继续培养以备后续实验。

1.2.5 qRT-PCR 检测

细胞总 RNA 按 TRIzol 试剂盒说明书常规提取, 测浓度。反转录反应按美国 Promega 公司反转录试剂盒说明书进行, 体系如下: 总 RNA 1 μ g, 10 \times Buffer 2 μ L, dNTP 2 μ L, MgCl₂ 4 μ L, Oligo dT primer 1 μ L, RNasin 0.5 μ L, AMV 反转录酶 0.6 μ L, DEPC 水补至 20 μ L。反应条件: 42 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 然后 98 $^{\circ}$ C 5 min 灭活酶反应。

qRT-PCR 按宝生物公司 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒说明书进行, 反应体系如下: SYBR Premix Ex TaqTM 10 μ L, Forward Primer (10 μ mol/L) 0.4 μ L, Reverse Primer (10 μ mol/L) 0.4 μ L, cDNA 模板 2.0 μ L, 灭菌蒸馏水补至 20 μ L。Smad4 引物序列, F: 5'-AGGACAGAAGCCATTGAG-3', R:

5'-CGATGACACTGACGCAAA-3'。RUNX2 引物序列, F: 5'-ACTTCCTGTGCTCGGTGCT-3', R: 5'-GACGGTATGGTCAAGGTGAA-3'。

采用 Bio-Rad IQ5 实时定量 PCR 仪进行 PCR 反应, 反应条件: 预反应, 95.0 $^{\circ}$ C 30 s; 然后 95.0 $^{\circ}$ C 5 s, 60.0 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环后, 测定 ΔC_T 值, 以 GAPDH 为内参照, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 表示基因 mRNA 的相对表达量。

1.2.6 Western 印迹

提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。上样、SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、1% BSA 封闭后, 加入 Smad4 抗体 (1:1000 稀释) 或 GAPDH 抗体 (1:4000 稀释) 4 $^{\circ}$ C 过夜。TBST 洗膜后, 加入二抗 (1:8000 稀释) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜后, 加入 ECL 发光剂、X 线片曝光、显影、定影。

1.2.7 荧光素酶活性检测

将 COS7 细胞接种于 24 孔培养板中, 待细胞生长至 60%~80% 融合度时, 共转染荧光素酶报告载体及 miR-125b mimics, control mimics 或 miR-125b inhibitors。以转染 pRL-TK 作为标准内质控。转染 36 h 后, 收获细胞。按 Promega 公司双荧光素酶活性检测试剂盒说明书检测细胞荧光素酶活性, 主要步骤如下: 弃去细胞培养液, PBS 清洗两次, 然后每孔加入已稀释的 1 \times PLB 裂解细胞 15 min。将细胞刮下, 收集至 1.5 mL EP 管中, 12000 r/min 离心 2 min, 取上清。取 20 μ L 细胞上清液, 加入荧光素酶检测试剂 (LARII) 100 μ L, 单光子检测仪荧光素酶活性检测, 记录萤火虫荧光素酶活性值; 然后加入 stop&Glo 试剂 100 μ L, 单光子检测仪记录海肾荧光素酶活性值。计算相对荧光素酶活性 = 萤火虫荧光素酶活性值 / 海肾荧光素酶活性值。

1.2.8 碱性磷酸酶活性检测

miRNA 转染处理后, 用成骨诱导培养液继续培养 9 d, 收集细胞, 抽提细胞总蛋白, 按照碱性磷酸酶 (AKP) 检测试剂盒说明书进行 AKP 活性检测。用 Bradford 法测定蛋白浓度。AKP 的比活力为 AKP 的活性比相应的蛋白浓度。

1.3 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件进行统计学分析, 组间比较采用方差检验。数据以均值 \pm 标准误表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Smad4 3'-UTR- 荧光素酶报告载体构建

通过在线靶基因软件预测发现, miR-125b 可能与 Smad4 mRNA 的 3'-UTR 片段 4934~4940 bp 相结

合, 且该结合位点在多物种间高度保守。PCR扩增Smad4 3'-UTR 部分片段(4544~5333 bp)。将PCR产物与pMIR-REPORT luciferase报告载体分别用SpeI和Hin dIII双酶切后纯化, 连接, 转化, 从LB培养板中挑取克隆进行菌落PCR鉴定, 结果可见多数克隆有长约790 bp的特异条带(图1), 表明目的片段成功连入pMIR-REPORT luciferase载体。质粒经测序发现, 目的片段插入方向正确, 且插入的序列与GenBank中的Smad4 3'-UTR序列完全一致, 表明已成功构建野生型Smad4 3'-UTR-荧光素酶报告载体, 即pSmad4-Mt。

以野生型Smad4 3'-UTR-荧光素酶报告载体pSmad4-Mt为模板通过PCR反应对Smad4 3'-UTR miR-125b结合位点进行定点突变。经DpnI酶消化, 质粒转化, 测序后发现, 引入的突变位点与预期一致, 且除突变点之外序列与GenBank中Smad4 3'-UTR序列完全一致, 无移码突变, 表明成功构建突变型Smad4 3'-UTR-荧光素酶报告载体, 即pSmad4-Mut。

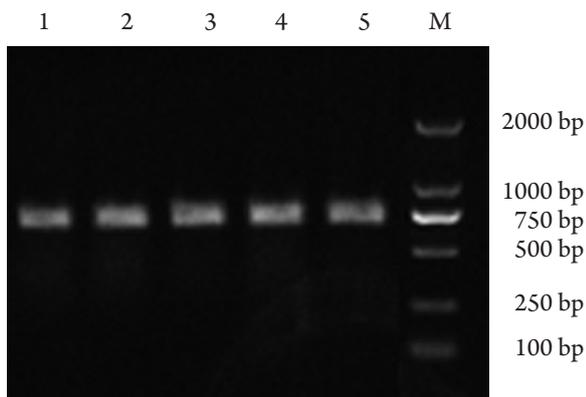


图1 质粒菌落PCR鉴定。1~5: 挑选的阳性克隆; M: DNA marker。

Figure 1 Identification of bacterial colony by PCR. 1-5: Number of positive bacterial colony; M: DNA marker.

2.2 miR-125b 抑制 Smad4 mRNA 的 3'-UTR 的荧光酶活性

荧光酶活性检测结果显示, 与转染control mimics组比较, miR-125b mimics明显抑制pSmad4-Mt报告载体的荧光素酶活性($P < 0.05$), 而转染miR-125b inhibitor不能下调pSmad4-Mt报告载体的荧光素酶活性; 并且 miR-125b mimics对突变型pSmad4-Mut载体的荧光素酶活性无明显抑制作用(图2)。表明miR-125b能特异性与Smad4 mRNA的3'-UTR结合。

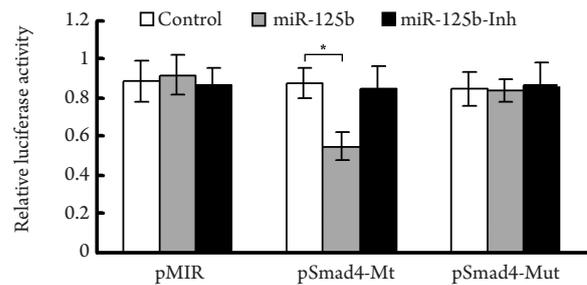


图2 miR-125b抑制Smad4 mRNA的3'-UTR的荧光酶活性。

Control: Control mimics; miR-125b: miR-125b mimics; miR-125b-Inh: miR-125b inhibitor; pMIR: pMIR-REPORT luciferase空白载体; pSmad4-Mt: 野生型Smad4 3'-UTR-荧光素酶报告载体; pSmad4-Mut: 突变型Smad4 3'-UTR-荧光素酶报告载体; * $P < 0.05$ 。

Figure 2 miR-125b inhibits luciferase activity of mRNA 3'-UTR of Smad4. Control: Control mimics; miR-125b: miR-125b mimics; miR-125b-Inh: miR-125b inhibitor; pMIR: pMIR-REPORT luciferase plasmid; pSmad4-Mt: Wild type of Smad4 3'-UTR-luciferase vector; pSmad4-Mut: Mutation type of Smad4 3'-UTR-luciferase vector; * $P < 0.05$ 。

2.3 在 MSCs 成骨分化中 miR-125b 下调 Smad4 mRNA 和蛋白表达水平

miR-125b mimics或siRNA转染MSCs后, 成骨分化培养液诱导培养转染的MSCs 9 d, 通过qRT-PCR和Western印迹检测Smad4 mRNA和蛋白表达水平。qRT-PCR结果显示: 与control组比较, 转染miR-125b mimics组Smad4 mRNA表达水平约下降52%(图3A)。Western印迹检测与qRT-PCR结果基本一致, miR-125b mimics转染明显下调Smad4蛋白表达水平(图3B)。并且, miR-125b mimics下调Smad4表达的程度大致与Smad4 siRNA下调Smad4内源性表达相当(图3)。表明在MSCs成骨分化中miR-125b能靶向调控Smad4表达。

2.4 干扰 Smad4 或过表达 miR-125b 抑制 MSCs 的成骨分化

将合成的Smad4 siRNA转染到MSCs中, 并加入诱导剂进行诱导成骨分化。第9天收集样品, 进行AKP活性测定。结果显示, 转染Smad4 siRNA明显抑制AKP活性($P < 0.05$, 图4)。qRT-PCR检测结果显示, Smad4 siRNA能下调成骨分化的关键调控因子RUNX2的表达($P < 0.01$, 图5)。表明干扰Smad4能部分模拟miR-125b调控 MSCs成骨分化的功能。

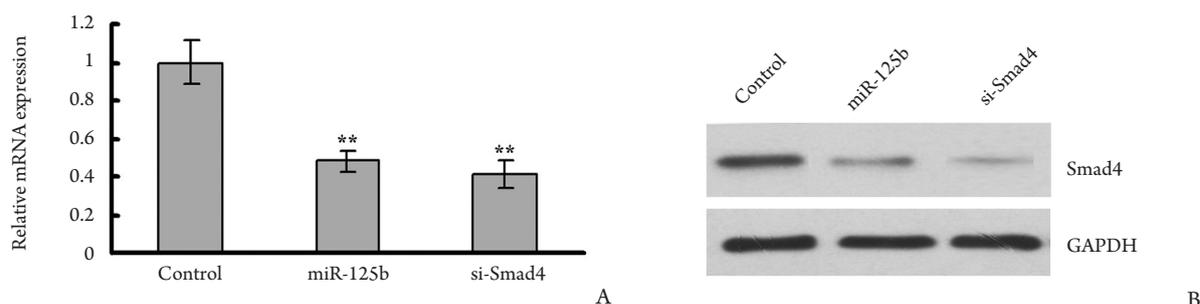


图3 miR-125b抑制Smad4 mRNA和蛋白表达。A: qRT-PCR检测。与Control组比较, ** $P < 0.01$; B: Western印迹检测。

Figure 3 miR-125b suppresses mRNA and protein expressions of Smad4. A: qRT-PCR analysis. ** $P < 0.01$ vs the control group; B: Western blot analysis.

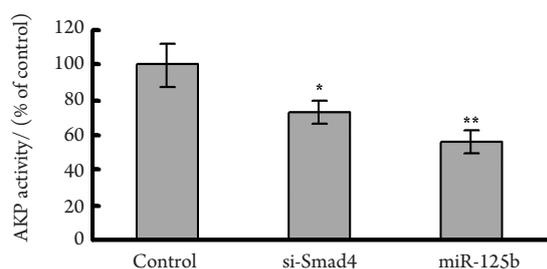


图4 干扰Smad4或过表达miR-125b抑制AKP活性。与Control组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Figure 4 Smad4 siRNA inhibits AKP activity. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the control group.

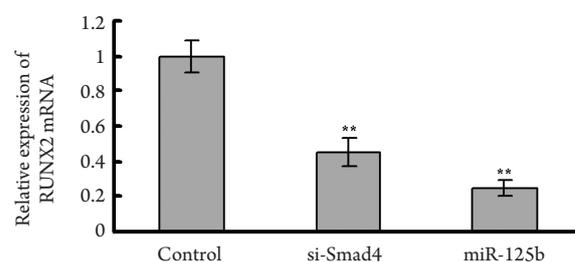


图5 干扰Smad4或过表达miR-125b下调RUNX2表达。与Control组比较, ** $P < 0.01$ 。

Figure 5 Smad4 siRNA downregulates RUNX2 expression. ** $P < 0.01$ vs the control group.

3 讨论

骨是一种处于连续动态平衡的组织, 它包括两种细胞, 即成骨细胞(osteoblast)和破骨细胞(osteoclast)。正常的骨组织处于这两种细胞的平衡状态, 一旦这种平衡被打破, 就会引发骨质疏松等疾病^[9]。随着我国老龄化日趋严重, 骨质疏松以及骨折、骨裂等多种骨代谢相关疾病已经成为了一个亟待解决的问题。MSCs是一类具有自我更新能力和多向分化潜能的细胞^[10-11]。它能分化成为成骨细胞及成软骨细胞, 在骨的形成和重建中发挥巨大作用^[12-13]。

miRNAs作为一种新型的基因转录后调控方式, 调控个体组织器官生长发育、细胞增殖、分化、细胞运动、新陈代谢等生命活动^[1-2]。miRNAs在干细胞增殖、分化、凋亡、自我更新和多向分化中起重要的作用^[14]。已有研究^[6-7]发现miRNAs在调控MSCs或前体细胞成骨、成软骨及成脂分化过程中也发挥重要生物学功能。miR-125b能抑制MSCs向成骨分化。然而它是通过何种分子机制或者说通过哪些靶基因来实现这一功能的, 目前不甚清楚。

为明确Smad4 是否是miR-125b调控的靶基因, 本研究首先将Smad4 3'-UTR克隆入荧光素酶报告载体, 然后与miR-125b共转染COS7细胞。结果发现miR-125b能特异性与Smad4 mRNA的3'-UTR结合, 抑制Smad4 mRNA的3'-UTR荧光素酶活性。虽然荧光素酶报告检测结果显示miR-125b能结合Smad4 3'-UTR序列, 但在生理状态下靶基因3'-UTR序列中的miRNA结合位点有可能由于mRNA的构象而被掩盖, 导致该miRNA无法发挥抑制靶基因表达的功能。因此笔者检测miR-125b对Smad4表达的影响验证该miRNA确实能结合Smad4 3'-UTR序列并发挥它抑制Smad4表达的功能, 从而确定Smad4是miR-125b的靶基因。本研究结果显示miR-125b能抑制成骨分化过程中Smad4 mRNA及蛋白表达, 并且其强度与Smad4 siRNA干扰Smad4内源性表达相当; 说明miR-125b直接靶向调控Smad4表达。通过功能研究siRNA干扰Smad4表达能抑制MSCs的成骨分化, 它能部分模拟miR-125b 调控MSCs成骨分化的功能; 说明miR-125b确实通过抑制靶基因Smad4调控MSCs向成骨分化。此外, 本研究结果显示: miR-125b抑制 MSCs成骨分化的强度要大于Smad4 siRNA, 这可能是由于除了Smad4

这个靶点外, miR-125b还通过其他的靶基因来抑制MSCs的成骨分化所致。

miR-125b可以通过调控Smad4这个BMP/TGF- β 成骨信号通路的关键因子影响MSCs成骨分化的进行,从而可能在骨质疏松、骨折愈合与骨不连的发生发展中发挥重要作用,因此,以miR-125b为靶点开发的药物有望用于骨质疏松等多种骨代谢疾病的治疗。

参考文献

1. Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers [J]. Mol Cancer, 2007, 6: 60.
2. Chen B, Li H, Zeng X, et al. Roles of microRNA on cancer cell metabolism [J]. J Transl Med, 2012, 10: 228.
3. Wang Y, Yu Y, Tsuyada A, et al. Transforming growth factor- β regulates the sphere-initiating stem cell-like feature in breast cancer through miRNA-181 and ATM [J]. Oncogene, 2011, 30(12): 1470-1480.
4. McDermott SP, Wicha MS. Targeting breast cancer stem cells [J]. Mol Oncol, 2010, 4(5): 404-419.
5. Wu T, Zhou H, Hong Y, et al. miR-30 family members negatively regulate osteoblast differentiation [J]. J Biol Chem, 2012, 287(10): 7503-7511.
6. Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, et al. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 368(2): 267-272.
7. 马张稳, 杜胜利, 田红英, 等. miR-125b对人骨髓间充质干细胞成骨潜能的影响[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2011, 32(4): 512-513.
MA Zhangwen, DU Shengli, TIAN Hongying, et al. The effect of miR-125b on MSCs osteoblastic differentiation [J]. Journal of Qiqihar University of Medicine, 2011, 32(4): 512-513.
8. Yamamoto N, Akiyama S, Katagiri T, et al. Smad1 and smad5 act downstream of intracellular signalings of BMP-2 that inhibits myogenic differentiation and induces osteoblast differentiation in C2C12 myoblasts [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 238(2): 574-580.
9. Pagani F, Francucci CM, Moro L. Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives [J]. J Endocrinol Invest, 2005, 28(10 Suppl): 8-13.
10. Gheisari Y, Soleimani M, Azadmanesh K, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells: optimization and comparison of five cationic polymer-based gene delivery methods [J]. Cytotherapy, 2008, 10(8): 815-823.
11. Domínguez-Bendala J, Lanzoni G, Inverardi L, et al. Concise review: mesenchymal stem cells for diabetes [J]. Stem Cells Transl Med, 2012, 1(1): 59-63.
12. Otsuru S, Gordon PL, Shimono K, et al. Transplanted bone marrow mononuclear cells and MSCs impart clinical benefit to children with osteogenesis imperfecta through different mechanisms [J]. Blood, 2012, 120(9): 1933-1941.
13. Chen K, Aenlle KK, Curtis KM, et al. Hepatocyte growth factor(HGF) and 1,25-dihydroxyvitamin D together stimulate human bone marrow-derived stem cells toward the osteogenic phenotype by HGF-induced up-regulation of VDR [J]. Bone, 2012, 51(1): 69-77.
14. Laine SK, Hentunen T, Laitala-Leinonen T. Do microRNAs regulate bone marrow stem cell niche physiology? [J]. Gene, 2012, 497(1): 1-9.

(本文编辑 彭敏宁)

本文引用: 陆细红, 邓敏, 贺洪辉, 曾德辉, 张卫. miR-125b通过靶向抑制 Smad4 调控骨髓间充质干细胞成骨分化 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2013, 38(4): 341-346. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.04.002

Cite this article as: LU Xihong, DENG Min, HE Honghui, ZENG Dehui, ZHANG Wei. miR-125b regulates osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells by targeting Smad4 [J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2013, 38(4): 341-346. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.04.002