

文章编号 1006-8147(2020)03-0204-05

论 著

miR-20a-5p 调控成骨细胞分化相关靶基因的筛选及靶向关系验证

李亚冲¹, 刘颖¹, 朱恩东²

(1. 天津医科大学口腔医院牙体牙髓科, 天津 300070; 2. 天津医科大学朱宪彝纪念医院生化与分子生物学研究室, 国家卫生健康委员会激素与发育重点实验室, 天津市代谢性疾病重点实验室, 天津市内分泌研究所, 天津 300134)

摘要 目的: 筛选 miR-20a-5p 调控成骨分化的靶基因, 深入研究 miR-20a-5p 调控成骨分化的分子机制。方法: 通过靶基因预测软件预测 miR-20a-5p 的靶基因, 将靶基因的 3'UTR 及点突变序列插入荧光素酶或绿色荧光蛋白(GFP)报告载体中, 并与 miR-20a-5p 的模拟物或阴性对照共转染 HEK-293T 细胞, 通过双荧光素酶实验和 GFP 抑制实验检测荧光素酶活性及 GFP 阳性细胞比例, 确定 miR-20a-5p 与靶基因的靶向关系。结果: 通过生物信息学预测到 Smad7 是 miR-20a-5p 的靶基因, miR-20a-5p 在不同物种的 Smad7 基因 3'UTR 区都有保守的结合种子序列; 荧光素酶、GFP 报告基因及点突变载体经 PCR 及测序鉴定均正确; 双荧光素酶活性检测结果显示: miR-20a-5p 显著降低 Smad7 3'UTR 报告基因载体的荧光素酶活性; GFP 抑制实验及流式细胞仪检测结果显示: miR-20a-5p 可以显著降低 GFP 阳性细胞的比例。结论: miR-20a-5p 可以直接靶作用于 Smad7 3'UTR 的种子序列, 提示其可能通过直接靶向 Smad7 基因来发挥促进成骨分化的调控作用。

关键词 微小 RNAs; miR-20a-5p; Smad7; 双荧光素酶活性检测; GFP 抑制检测

中图分类号 Q78

文献标志码 A

Screening of the target gene and verification of its targeting relationship with miR-20a-5p to regulate osteoblast differentiation

LI Ya-chong¹, LIU Ying¹, ZHU En-dong²

(1. Department of Endodontics, Stomatological Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Chu Hsien-I Memorial Hospital, Tianjin Medical University, NHC Key Laboratory of Hormones and Development, Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases, Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin 300134, China)

Abstract **Objective:** To screen the target gene of miR-20a-5p to regulate osteogenic differentiation, and study the molecular mechanism of miR-20a-5p regulating osteoblast differentiation. **Methods:** The target gene of miR-20a-5p was predicted by online software. The 3'UTR sequence and its mutant sequence of the target gene was cloned into the pMIR-REPORT and pMIR-GFP-REPORT. Then, HEK-293T cells were transfected with luciferase (or GFP) reporter vector and either miR-20a-5p mimics or miR-NC. Finally, determine the targeting relationship between miR-20a-5p and the target genes by luciferase activity and the GFP expression through dual luciferase reporter system and GFP repression assay. **Results:** As predicted by bioinformatics, Smad7 was the target gene of miR-20a-5p, and it contains a conserved seed sequence in 3'UTR element complementary to miR-20a-5p in different species. Results from PCR and DNA sequencing showed that the sequence of inserted Smad7 3'UTR in luciferase reporter constructions, GFP reporter constructions and all mutant constructions were correct. Dual luciferase reporter system showed that miR-20a-5p significantly repressed the reporter activity of Smad7 3'UTR reporter vector. GFP repression assay and FACS indicated that miR-20a-5p significantly reduced the proportion of GFP positive cells. **Conclusion:** miR-20a-5p can directly target the seed sequence of Smad7 3'UTR, suggesting that it may play a role in promoting osteogenic differentiation by targeting the Smad7 gene directly.

Key words microRNAs; miR-20a-5p; Smad7; dual luciferase activity assay; GFP repression assay

microRNA 是一类长度为 18~25 个核苷酸的小的非编码内源性 RNA 分子, 可以通过与靶基因 mRNA 3'非翻译区(3'UTR)发生完全或不完全互补

配对, 致使 mRNA 降解或翻译被抑制, 从而在转录水平或转录后水平调控基因的表达^[1]。近期研究发现, miR-20a-5p 在组织和器官发育中发挥重要作用^[2]。例如, miR-20a-5p 可延长细胞外信号调节激酶(ERK)磷酸化, 同时上调血管生成基因(如成纤维细胞生长因子 9)的表达^[3], 并且 miR-20a-5p 可以通过抑制组蛋白去甲基化酶 Kdm6b 及转录因子

基金项目 国家自然科学基金面上项目基金资助(81871741); 天津市自然科学基金资助项目(18JCYBJC94300)

作者简介 李亚冲(1993-), 女, 硕士在读, 研究方向: 口腔临床医学;
通信作者: 朱恩东, E-mail: ezhu@tmu.edu.cn。

Kruppel 样因子 3(Klf3)等靶基因的表达,促进间充质干细胞的成脂分化^[4-5]。Zhang 等^[6]研究发现,miR-20a-5p 可通过靶向抑制过氧化物酶体增殖物活化受体 γ (PPAR γ)的表达促进人间充质干细胞的成骨分化。此外,本课题组的前期研究初步证实了 miR-20a-5p 具有促进小鼠间充质干细胞向成骨细胞分化的功能^[4]。然而,笔者检测发现小鼠 PPAR γ mRNA 3'UTR 区并不存在 miR-20a-5p 的结合位点,而且 miR-20a-5p 不能抑制小鼠 PPAR γ 基因蛋白水平的表达,因此 miR-20a-5p 在成骨分化过程中的靶向分子机制尚需进一步研究。深入了解 microRNA 调控成骨分化的分子机制将有助于完善对骨代谢相关疾病的认识。本研究旨在筛选 miR-20a-5p 在成骨分化中的靶向作用基因,进一步验证其靶向关系,阐明 miR-20a-5p 调控成骨分化的分子机制,为临床利用 microRNA 调控成骨细胞分化的生物学行为奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 高效率逆转录试剂盒购买自美国 Thermo Fisher 公司;SE 无缝克隆和组装试剂盒购买自北京庄盟国际生物基因科技有限公司;Mut Express® II Fast Mutagenesis Kit 购买自南京诺唯赞生物科技有限公司;DMEM 高糖(DMEM/H)培养基购买自上海源培生物科技有限公司;Trizol 和 Lipofectamine™ 2000 购买自美国 Invitrogen 公司;miR-20a-5p miR-NC 及 miR-mimics 由上海吉玛制药技术有限公司合成;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购买自美国 Promega 公司;全自动酶标仪购买自美国伯腾仪器有限公司;流式细胞仪购买自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HEK-293T 和 MC3T3-E1 均用含有 10% FBS 的 DMEM/H 培养基,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 cDNA 的获取 收集 MC3T3-E1 细胞,用 Trizol 法提取总 RNA。取 0.5 μ g 总 RNA 逆转录为 cDNA。逆转录的条件:25℃ 10 min;42℃ 60 min;70℃ 10 min。

1.2.3 靶基因的预测 通过靶基因预测数据库 TargetScan 7.2(http://www.targetscan.org/mmu_72/)预测 miR-20a-5p 的靶基因,选定 Smad7 作为 miR-20a-5p 的候选靶基因。

1.2.4 miR-20a-5p 靶基因荧光报告载体的构建 根据靶基因预测数据库 TargetScan 中查找的靶基因 3'UTR 序列,设计 Smad7 上下游特异性同源引物,上游引物:5'-TGA TGA AAG CTG CGC AAT CCC

TTG GCT GGC TCC-3', 下游引物:5'-AAA AGA TCC TTT ATT AGC TAG GTG ATA ACA CCC ATA GAA-3'。

以上面逆转录合成的 cDNA 为模板,用 Smad7 上下游特异性引物扩增 Smad7 的 3'UTR 序列。将 pMIR-REPORT-Luciferase 载体进行 *Spe* I、*Hind* III 双酶切。利用 SE 无缝克隆体系将 Smad7 扩增产物和 pMIR-REPORT-Luciferase 载体酶切产物于 37℃ 进行重组反应 30 min,取重组产物转化 DH5 α 感受态细胞,均匀涂布在含有氨苄抗性的固体 LB 平板上,倒置于 37℃ 孵箱过夜培养。于平板中挑取单菌落送交测序,测序正确的样品进一步提取重组质粒,命名为 pMIR-LUC-Smad7,置于-80℃ 储存备用。

设计 Smad7 点突变上下游引物,上游引物:5'-AAG ATC CTC ATA GCT TTA ATA TAA ATG CAA ATA ACA TGC CAA AT-3', 下游引物:5'-AAA GCT ATG AGG ATC TTT TCT TTA TTC TTC TCG TTT ATA CAC ATT G-3'。以 pMIR-LUC-Smad7 为模板,使用 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 进行载体扩增,扩增产物使用 DpnI 于 37℃ 消化 1 h 去除甲基化模板质粒;然后用 Exnase II 使扩增产物同源重组。挑选测序结果正确样品提取质粒,命名为 pMIR-LUC-Smad7-MUT,置于-80℃ 保存备用。

1.2.5 miR-20a-5p 靶基因绿色荧光(GFP)报告载体的构建 设计扩增 eGFP 的上下游特异性引物,上游引物:5'-CGG GAT CCA CCA TGG TGA GCA AGG GCG AGG -3', 下游引物:5'-CCG CTC GAG TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC-3'。以质粒 pMIR-REPORT-eGFP 为模板进行 PCR 扩增,将扩增产物 pMIR-LUC-Smad7 和 pMIR-LUC-Smad7-MUT 分别使用 *Bam* H I 和 *Xho* I 进行双酶切。利用 T4 DNA 连接酶分别将 eGFP 与 pMIR-LUC-Smad7 或 pMIR-LUC-Smad7-MUT 酶切产物进行连接。测序正确的样品提取质粒并命名为 pMIR-GFP-Smad7 及 pMIR-GFP-Smad7-MUT,存放于-80℃ 保存备用。

1.2.6 双荧光素酶检测 将处于对数生长期的 HEK-293T 细胞接种于 96 孔板,24 h 后贴壁细胞达 70% 汇合率时进行转染。将合成的 miR-20a-5p miR-mimics 或阴性对照 miR-NC 与已构建的 pMIR-LUC-Smad7 或 pMIR-LUC-Smad7-MUT、质粒 pRL-TK 共转染 HEK-293T 细胞。转染 24 h 后,用 Dual-Luciferase® Reporter Assay System 试剂盒检测荧光素酶活性。

1.2.7 GFP 抑制实验 将处于对数生长期的 HEK-293T 细胞接种于 24 孔板, 24 h 后贴壁细胞达 70% 汇合率时进行转染。将 miR-20a-5p miR-mimics 或 miR-NC 与已构建的 pMIR-GFP-Smad7 或 pMIR-GFP-Smad7-MUT 共转染 HEK-293T 细胞。转染 24 h 后, 先用 OLYMPUS 倒置荧光显微镜观察拍照, 然后经 BD FACSVerse™ 流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞比例。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组样本中两组间比较首先进行独立样本单因子变异数分析(one-way ANOVA), 然后做 Tukey 或 Dunnett's *T*3 检测。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

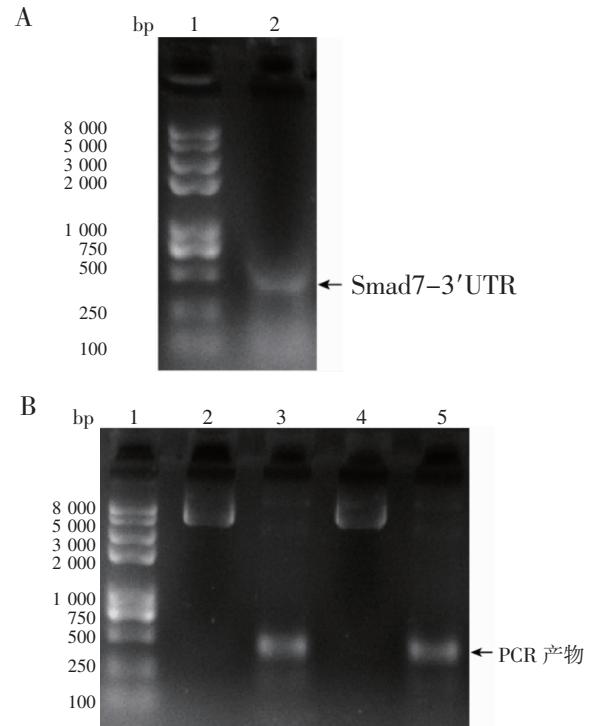
2.1 miR-20a-5p 靶基因预测 根据靶基因预测数据库 TargetScan 7.2(http://www.targetscan.org/mmu_72/) 对 miR-20a-5p 的靶基因进行预测, 将在转化生长因子(TGF)- β 信号通路中发挥抑制作用的 Smad 家族成员 Smad7 选为 miR-20a-5p 的候选靶基因。包括小鼠、大鼠及人等在内的 11 个脊椎动物的 Smad7 基因 3'UTR 都有保守的 miR-20a-5p 结合种子序列 GCACTTT(图 1)。

Smad7 3'UTR	1400-----1410-----1420-----1430
小鼠	---AAUAAAGAAAAGAUGCACUUUGCUUUAUUAUAAA---
大鼠	---AAUAAAGAAAAGAUGCACUUUGCUUUAUUAUAAA---
松鼠	---AAUAAAGAAAAGAUGCACUUUGCUUUAUUAUAAA---
兔	---AAUAAAGAAAAGAUGCACUUUGCUUUAUUAUAAA---
人	---AAUAAAGAAAAGAUGCACUUUGCUUUAUUAUAAA---
猩猩	---AAUAAAGAAAAGAUGCACUUUGCUUUAUUAUAAA---
猪	---AAUAAAGAAAAGAUGCACUUUGCUUUAUUAUAAA---
牛	---AAUAAAGAAAAGAUGCACUUUGCUUUAUUAUAAA---
猫	---AAUAAAGAAAAGAUGCACUUUGCUUUAUUAUAAA---
狗	---AAUAAAGAAAAGAUGCACUUUGCUUUAUUAUAAA---
鸡	-----AAAA--AAGAUGCACUUUGCUUUAUUAUAAA---

图 1 miR-20a-5p 识别结合 Smad7 mRNA 3'UTR 的生物信息学分析
Fig 1 Bioinformatics analysis of miR-20a-5p binding to 3'UTR of Smad7 mRNA

2.2 荧光素酶报告基因载体的构建 以小鼠 MC3T3-E1 细胞的 cDNA 为模板, 利用 PCR 技术扩增长度为 447 bp 的序列(图 2A), 经同源重组将扩增片段连接至荧光素酶报告载体 pMIR-REPORT-Luciferase, 命名为 pMIR-LUC-Smad7。pMIR-LUC-Smad7 重组质粒及 PCR 特异性扩增片段进行琼脂糖凝胶电泳可见插入片段长度正确, 经测序确定插入片段碱基序列亦正确(图 2B 泳道 1、2)。用点突变特异性引物扩增 pMIR-LUC-Smad7 后进行同源重组构建得到 miR-20a-5p 结合种子序列 GCACTTT 突变为 CCTCATA 的重组质粒 pMIR-

LUC-Smad7-MUT(图 3)。pMIR-LUC-Smad7-MUT 重组质粒及 PCR 特异性扩增片段进行琼脂糖凝胶电泳可见插入片段长度正确, 经测序确定插入片段碱基序列亦正确(图 2B 泳道 3、4)。



注: A: 1. DNA Marker Trans 2K plus II; 2. 以小鼠 MC3T3-E1 细胞的 cDNA 为模板, PCR 特异性扩增的 Smad7 mRNA 3'UTR 序列; B: 1. DNA Marker Trans 2K plus II; 2. pMIR-LUC-Smad7 载体; 3. 以 pMIR-LUC-Smad7 载体为模板, PCR 特异性扩增的 Smad7 mRNA 3'UTR 序列; 4. pMIR-LUC-Smad7-MUT 载体; 5. 以 pMIR-LUC-Smad7-MUT 载体为模板, PCR 特异性扩增点突变后的 Smad7 mRNA 3'UTR 序列

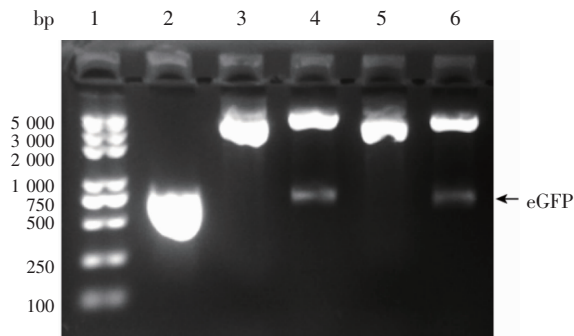
图 2 Smad7 mRNA 3'UTR 扩增、pMIR-LUC-Smad7、pMIR-LUC-Smad7-MUT 构建及其 PCR 鉴定
Fig 2 Amplification of Smad7 mRNA 3'UTR, construction and PCR identification of pMIR-LUC-Smad7 and pMIR-LUC-Smad7-MUT

Position 1414-1420 of Smad7 3'UTR 5'...	GAAUAAAGAAAAGAUGCACUUUG...
mmu-miR-20a-5p 3'	GAUGGACGUGAUUUCGUGAAAU
mutant 3'UTR 5'...	GAAUAAAGAAAAGAUCCUCAUAG...

图 3 miR-20a-5p 识别结合 Smad7 mRNA 3'UTR 种子序列及其突变序列

Fig 3 The wildtype and mutant seed sequence of miR-20a-5p recognizing Smad7 mRNA 3'UTR

2.3 GFP 报告基因载体的构建 以质粒 pMIR-REPORT-eGFP 为模板, 利用 PCR 技术扩增长度为 720 bp 的 eGFP 表达序列(图 4 泳道 2)。将 pMIR-LUC-Smad7 及 pMIR-LUC-Smad7-MUT 分别经双酶切去除荧光素酶报告基因, 然后将 eGFP 表达序列分别插入上述两个载体, 测序及 PCR 扩增结果均



注:1. DNA Marker Trans 2K plus II;2. 以 pMIR-REPORT-eGFP 为模板,PCR 特异性扩增的 eGFP 基因片段;3. pMIR-GFP-Smad7 载体;4. 以 pMIR-GFP-Smad7 载体为模板,PCR 特异性扩增的 eGFP 序列;5. pMIR-GFP-Smad7-MUT 载体;6. 以 pMIR-GFP-Smad7-MUT 载体为模板,PCR 特异性扩增的 eGFP 序列

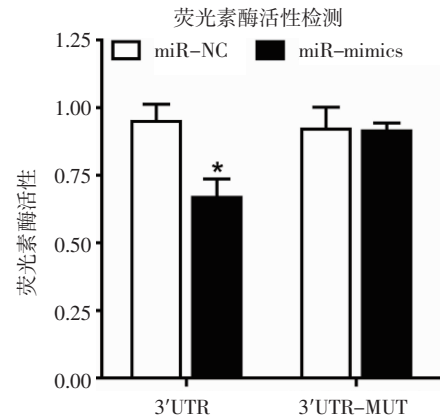
图4 eGFP 扩增,pMIR-GFP-Smad7,pMIR-GFP-Smad7-MUT 构建及其 PCR 鉴定

Fig 4 Amplification of eGFP,construction and PCR identification of pMIR-GFP-Smad7 and pMIR-GFP-Smad7-MUT

显示插入 eGFP 表达序列正确(图4泳道3~6)。

2.4 双荧光素酶活性检测 双荧光素酶活性检测结果显示,pMIR-LUC-Smad7 与 miR-mimics 共转染组与其对照组相比荧光素酶活性降低;而pMIR-LUC-Smad7-MUT 与 miR-mimics 共转染组与对照组相比,荧光素酶活性未见明显变化(图5)。

2.5 GFP 抑制实验 相关重组载体与 miR-20a-5p

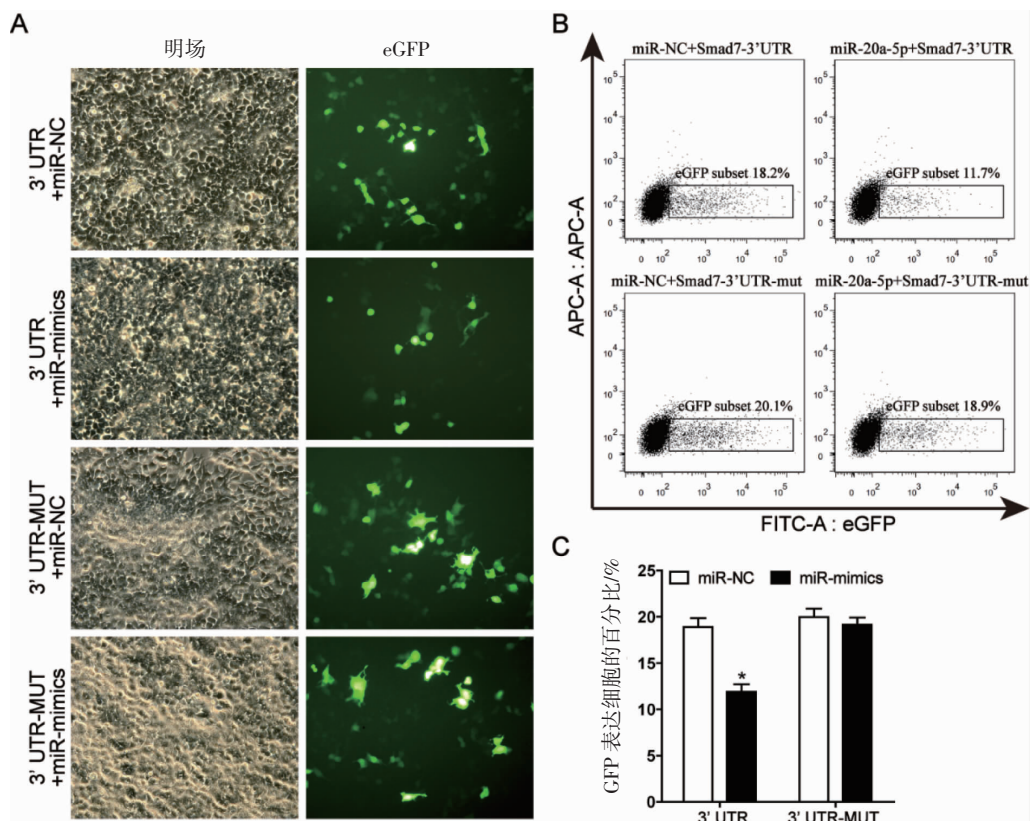


注: * $P < 0.05$ (miR-mimics+3'UTR 共转染组 vs. miR-NC+3'UTR 共转染组)

图5 双荧光素酶报告系统验证 miR-20a-5p 与靶基因 Smad7 mRNA 3'UTR 的相互作用

Fig 5 Dual luciferase reporter system validated the interaction of miR-20a-5p with Smad7 mRNA 3'UTR

miR-NC 及 miR-mimics 共转染的细胞经倒置荧光显微镜观察可见,与对照组相比,pMIR-GFP-Smad7 与 miR-mimics 共转染组 GFP 表达阳性细胞比例显著降低,而 pMIR-GFP-Smad7-MUT 与 miR-mimics 共转染组与对照组相比 GFP 表达阳性细胞比例未见显著差异(图6A)。流式细胞仪测定结果与倒置荧光显微镜观察结果一致,pMIR-GFP-Smad7 与 miR-mimics 共转染组较其他组 GFP 表达阳性细胞



注:A.倒置荧光显微镜观察结果($\times 100$);B.流式细胞仪检测;C.流式细胞仪检测后统计分析,* $P < 0.05$ (miR-mimics+3'UTR 共转染组 vs. miR-NC+3'UTR 共转染组)

图6 GFP 抑制实验验证 miR-20a-5p 与靶基因 Smad7 mRNA 3'UTR 的相互作用

Fig 6 GFP repression assay confirmed the interaction of miR-20a-5p with Smad7 mRNA 3'UTR

比例显著减少(图 6B,6C)。

3 讨论

骨质疏松症是一种骨质流失的全身系统性疾病,流行病学调查结果显示,我国 50 岁以上的人群中骨质疏松症患病率为:女性 20.7%,男性 14.4%。骨质疏松是多因素过程,其主要特征是骨量减少和骨密度降低。促进骨质形成、增加骨量是治疗骨质疏松的有效手段^[7-8]。而骨形成与间充质干细胞的增殖以及向成熟的成骨细胞分化有关,因此,成骨分化是骨形成的一个关键因素^[9-10]。

近年来的研究表明,大量 miRNAs 参与成骨细胞的分化过程,在调节骨再生的过程中发挥着重要作用^[11-12]。例如 microRNA-130a 通过靶向 Smurf2 基因的 3'UTR 区促进骨髓间充质干细胞的成骨分化^[13]。miR-20a-5p 在人间充质干细胞中通过抑制人 PPAR γ 基因表达及调控 BMP 信号通路,从而促进成骨分化^[6]。然而,Zhou 等^[4]的研究结果表明,通过 microRNA 靶基因预测数据库并未预测到 PPAR γ 为 miR-20a-5p 的潜在靶基因;另外,miR-20a-5p 不能改变小鼠 PPAR γ 3'UTR 构建体的荧光素酶活性;而且,miR-20a-5p 不能抑制小鼠 PPAR γ 基因蛋白水平的表达。因此,miR-20a-5p 在成骨分化过程中的靶向分子机制尚需进一步研究。

本研究首先通过生物信息学预测发现在 TGF- β 信号通路中发挥抑制作用的 Smad 家族成员 Smad7 可能是 miR-20a-5p 的潜在靶基因。Smad 家族转录因子是 TGF- β 细胞因子信号转导通路的关键因子,该信号转导通路在动物胚胎发育和组织再生等多个生命进程中发挥重要作用。Smad7 能够通过和活化受体相互作用使 TGF- β 信号通路失去活性而发挥抑制成骨分化的作用^[14]。

为探究 miR-20a-5p 对 Smad7 的靶向作用,本研究首先成功将 Smad7 3'UTR 克隆至双荧光素酶报告基因载体以及绿色荧光报告基因载体上,然后将构建成功的报告基因与 miR-20a-5p mimics 或 NC mimics 共转染 HEK-293T 细胞,双荧光素酶活性检测和绿色荧光抑制实验结果显示,与对照组相比,miR-20a-5p 显著抑制报告基因载体表达的绿色荧光蛋白及荧光素酶活性,提示 miR-20a-5p 可能通过直接作用于靶基因 Smad7,在成骨分化中发挥调控作用。

综上,本研究结果表明:miR-20a-5p 能够直接

靶向作用于 Smad7 的 3'UTR。而 Smad7 与 TGF- β 信号通路有着十分密切的联系。因此,笔者将进一步研究确定 miR-20a-5p 是否通过阻断靶基因 Smad7 在 TGF- β 信号通路中的抑制作用而促进成骨分化。对成骨调控机制的研究,将为骨质疏松等骨代谢相关疾病的治疗提供新的药物靶点。

参考文献:

- [1] Wu R, Shen D, Sohun H, et al. miR186, a serum microRNA, induces endothelial cell apoptosis by targeting SMAD6 in kawasaki disease[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4):1899
- [2] 王珊,李晓霞,周杰,等. Nfic 基因 3'UTR 双荧光素酶报告质粒的构建及其与 miR-20a 靶向关系的验证[J].天津医药,2016,44(9):1065
- [3] Lin S C, Wang C C, Wu M H, et al. Hypoxia-induced microRNA-20a expression increases ERK phosphorylation and angiogenic gene expression in endometriotic stromal cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(8):E1515
- [4] Zhou J, Guo F, Wang G, et al. miR-20a regulates adipocyte differentiation by targeting lysine-specific demethylase 6b and transforming growth factor- β signaling[J]. Int J Obes, 2015, 39(8):1282
- [5] Zhu E D, Zhang J J, Zhou J, et al. miR-20a-5p promotes adipogenic differentiation of murine bone marrow stromal cells via targeting kruppel-like factor 3[J]. J Mol Endocrinol, 2018, 60(3):225
- [6] Zhang J F, Fu W M, He M L, et al. MiRNA-20a promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by co-regulating BMP signaling[J]. RNA Biol, 2011, 8(5):829
- [7] 张月红.骨质疏松发病机制研究进展[J].解放军预防医学杂志,2004,22(2):151
- [8] Yang D H, Yang M Y. The role of macrophage in the pathogenesis of osteoporosis[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9):2093
- [9] Khojasteh A, Behnia H, Naghdi N A, et al. Effects of different growth factors and carriers on bone regeneration: a systematic review[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2013, 116(6):E405
- [10] Yousefi A M, James P F, Akbarzadeh R, et al. Prospect of stem cells in bone tissue engineering: a review[J]. Stem Cells Int, 2016(2016): 6180487
- [11] Valenti M T, Carbonare L D, Mottes M. Role of microRNAs in progenitor cell commitment and osteogenic differentiation in health and disease (Review)[J]. Int J Mol Med, 2018,41(5):2441
- [12] Tu M L, Tang J J, He H B, et al. MiR-142-5p promotes bone repair by maintaining osteoblast activity[J]. J Bone Miner Metab, 2017, 35(3):255
- [13] Lin Z Y, He H B, Wang M, et al. MicroRNA-130a controls bone marrow mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblastic and adipogenic fate[J]. Cell Prolif, 2019, 52(6):e12688
- [14] Macias M J, Martin-Malpartida P, Massagué J. Structural determinants of Smad function in TGF- β signaling[J]. Trends Biochem Sci, 2015, 40(6):296

(2019-10-01 收稿)