

文章编号: 1004-7220(2024)04-0623-08

# miR-194-3p 调控模拟微重力条件下致成骨细胞功能异常的实验研究

薛进冬<sup>1</sup>, 程路畅<sup>1</sup>, 王敏<sup>1</sup>, 谭彩美<sup>1</sup>, 邓琪琪<sup>1</sup>, 朱海美<sup>1</sup>, 郭勇<sup>1,2</sup>, 韩标<sup>1,2</sup>

(1. 桂林医学院 智能医学与生物技术学院, 桂林 541199; 2. 广西高校医药生物技术与转化医学重点实验室, 桂林 541199)

**摘要:** **目的** 探讨模拟微重力环境下 miR-194-3p 对成骨细胞功能变化的调控作用, 为极端力学环境下成骨细胞的力学响应机制提供理论基础。 **方法** 利用细胞旋转培养系统建立细胞水平微重力环境, 分别采用 MTT、RT-PCR、Western blot、荧光双染色法和茜素红染色法检测转染 miR-194-3p 抑制剂前后 MC3T3-E1 成骨细胞增殖、分化、凋亡和矿化的变化情况。 **结果** 模拟微重力环境下 miR-194-3p 表达上调, 成骨细胞的增殖、分化和矿化均受到一定程度的抑制, 同时促进了成骨细胞的凋亡。转染 miR-194-3p 抑制剂后, miR-194-3p 表达显著下调, 且能部分逆转由微重力导致的细胞成骨细胞增殖减弱、成骨分化标志物如 ALP、OCN 和 COL-I 基因和蛋白表达降低、骨矿化结节减少和成骨细胞凋亡数目增加的情况, 说明 miR-194-3p 能有效改善微重力暴露下成骨细胞功能异常的情况。 **结论** 模拟微重力环境下 miR-194-3p 可能作为一种负调控因子, 通过调控成骨细胞功能参与其力学响应的进程。

**关键词:** 模拟微重力环境; miR-194-3p; 成骨细胞; 细胞增殖; 细胞分化; 矿化; 力学响应

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2024.04.008

## MiR-194-3p Regulation of Simulated Microgravity Induced-Dysfunction of Osteoblasts: An Experimental Study

XUE Jindong<sup>1</sup>, CHENG Luchang<sup>1</sup>, WANG Min<sup>1</sup>, TAN Caimei<sup>1</sup>, DENG Qiqi<sup>1</sup>, ZHU Haimei<sup>1</sup>, GUO Yong<sup>1,2</sup>, HAN Biao<sup>1,2</sup>

(1. Intelligent Medicine and Biotechnology School, Guilin Medical University, Guilin 541199, China; 2. Key Laboratory of Medical Biotechnology and Translational Medicine, Guilin 541199, China)

**Abstract: Objective** To investigate the role of miR-194-3p in regulating functional changes in osteoblasts in a simulated microgravity environment and to provide a theoretical foundation for understanding the mechanical response mechanisms of osteoblasts in extreme mechanical environments. **Methods** The effects of microgravity on osteoblasts were simulated by using a rotary cell culture system. MC3T3-E1 osteoblasts were transfected with an miR-194-3p inhibitor and changes in proliferation, differentiation, apoptosis, and mineralization were assessed using MTT assay, RT-PCR, Western blot, double fluorescence staining, and alizarin red staining. **Results** Elevated expression of miR-194-3p under simulated microgravity conditions led to the suppression of osteoblast proliferation, differentiation, and mineralization to a certain extent, while promoting osteoblast apoptosis. However, transfection with the miR-194-3p inhibitor significantly downregulated miR-194-3p expression and

收稿日期: 2024-01-28; 修回日期: 2024-02-27

基金项目: 广西自然科学基金项目(2020GXNSFBA238006, 桂科 AD22080037), 国家自然科学基金项目(12202113, 32071309), 广西硕士研究生创新项目(YCSW2022368)

通信作者: 韩标, 讲师, E-mail: hanbiao@glmc.edu.cn

partially reversed the reduced osteoblast proliferation, decreased expression of osteogenic differentiation markers such as ALP, OCN, and COL-1 genes and proteins, decreased bone mineralization nodules, and increased osteoblast apoptosis induced by microgravity exposure. These findings indicated that miR-194-3p effectively ameliorates abnormal osteoblast function under microgravity conditions. **Conclusions** MiR-194-3p acts as a negative regulatory factor in the mechanical responses of osteoblasts under simulated microgravity.

**Key words:** simulated microgravity; miR-194-3p; osteoblast; cell proliferation; cell differentiation; mineralization; mechanical response

微重力效应(力学卸载)引起宇航员骨质流失/疏松是限制其长期太空作业的主要原因之一,骨组织细胞感知并响应重力改变并引起自身功能异常是其病理基础,但其具体机制尚未完全阐明。研究表明,力学环境改变是影响骨内稳态的重要因素之一<sup>[1]</sup>。微重力作为极端力学环境的一种,其作用下骨质流失的主要原因是骨组织持续暴露于力学载荷缺失的环境中。这一病变是多因素、多途径共同作用下的骨重建过程,主要伴随着骨组织的结构发生改变,功能退化,骨相关细胞的增殖、分化与凋亡受到显著影响,且在此过程中,细胞内大量与骨生成/吸收相关的基因、蛋白与信号通路也发生相应的改变<sup>[2-4]</sup>。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 作为长度约 22 核苷酸的一类非编码 RNA 小分子,主要通过靶向 mRNA 抑制基因转录和蛋白翻译使其生物学功能<sup>[5-6]</sup>。研究表明,miRNA 的表达水平对骨稳态和骨骼重塑十分重要。例如,miR-29a、miR-19a/b 等均可通过激活或抑制许多与骨形成相关的基因和信号通路调节成骨细胞的增殖、分化和凋亡<sup>[7-9]</sup>。本课题组前期通过 RNA 测序实验发现,miRNA 能够响应微重力环境,并筛选出重力敏感的目的 miRNA,提示 miR-194-3p 可能在模拟微重力条件下对成骨细胞功能改变发挥重要的调控作用。然而,其具体的分子机制仍需进一步探讨。

本文对模拟微重力条件下 miR-194-3p 对成骨细胞增殖、分化和矿化的潜在影响及其机制进行研究,为探索微重力环境/力学卸载条件下骨重建的力学适应机制以及对抗微重力环境、防治相关骨损伤带来新的研究思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

MC3T3-E1 细胞系购于广州吉尼欧生物有限公

司。DMEM 培养基、胎牛血清购于美国 Gibco 公司,MTT 噻唑蓝购于上海蓝季科技发展有限公司,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所,成骨细胞矿化结节染色液购于北京雷根生物技术有限公司,细胞凋亡荧光 Hoechst/PI 双染试剂盒购于北京索莱宝生物科技有限公司,PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,I 型胶原(collagen type I, COL-1)、骨钙素(osteocalcin, OCN)一抗购于武汉爱博泰克生物科技有限公司,二抗购于武汉博士德生物工程有限公司。Cytodex 3 微载体购于美国 GE Healthcare 公司。细胞旋转培养系统(rotary cell culture systems, RCCS)购于美国 Synthecon INC 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 取冻存细胞进行复苏,  $1 \times 10^5$  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 48 h 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 微重力环境建立** 将细胞按  $1 \times 10^5$  个/mL 密度接种于旋转培养器内,而后加入 6 mL 微载体溶液(5 mg/mL),用移液枪排除气泡。以 20 r/min 转速匀速培养 72 h。期间若发现有气泡产生,立即将气泡赶尽,以免流体剪切力在培养过程中对细胞产生影响。对照组置于细胞培养瓶中常规培养。

**1.2.3 细胞转染** 取出 4 个 2 mL 的 EP 管,分别加入 625  $\mu$ L 无血清 DMEM。同时,两个 EP 管各加入 12.5  $\mu$ g 质粒,混匀;另两个 EP 管加入 10  $\mu$ L Lipofectamin 2000,混匀。室温放置 5 min 后将两组管各自混合,室温放置 20 min。吸去六孔板的培养液,每孔加入 1.25 mL 无血清 DMEM 培养液。将转染混合物逐滴加入到六孔板中,混匀后,在培养箱中培育 12 h。吸去转染液,之后更换为完全培养

基。对照组与实验组分别行常规培养和微重力培养,72 h 后检测相关结果。

**1.2.4 成骨细胞分化诱导** 所有涉及成骨细胞诱导分化的实验,均添加成骨分化诱导液(含 10% 胎牛血清、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抗坏血酸、5  $\text{mmol}/\text{L}$   $\beta$ -甘油磷酸钠和 2  $\text{mmol}/\text{L}$  谷氨酰胺),细胞培养条件如前所述,成骨细胞诱导与模拟微重力处理同时进行,诱导分化时间与各实验保持一致。

**1.2.5 MTT 法检测成骨细胞增殖能力** 取各组细胞,细胞计数,调整细胞浓度约为  $8 \times 10^4$  个/ $\text{mL}$ ,接种于 96 孔板,37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养,每组设 3 个复孔。72 h 后,加入 50  $\mu\text{L}$  MTT 溶液,37  $^{\circ}\text{C}$  继续孵育 4 h,小心弃去培养上清,加入 300  $\mu\text{L}$  DMSO,震荡 10 min。酶标仪测定各组 490 nm 波长处的吸光度值。

**1.2.6 成骨细胞 ALP 活性测定** 收集各组的细胞上清液,4  $^{\circ}\text{C}$ ,1 200 r/min,离心 10 min,按 ALP 试剂盒说明书加入各组分,轻轻振荡,用酶标仪于 520 nm 波长处检测各组吸光度值。

**1.2.7 荧光定量 PCR** 收取各组细胞到离心管,酚氯仿法提取总 RNA。NanoDrop 2000 检测 RNA 浓度( $>200$  ng/ $\mu\text{L}$ ),琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。逆转录合成 cDNA,以 cDNAs 作为模板采用实时荧光定量 PCR 和 miRNA 茎环法荧光定量 PCR 检测 ALP、OCN、COL-I 和 miR-194-3p 的基因表达水平,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Sequences of primer used in this study

基因	引物序列(5'-3')
OCN	F: TGCTTGTGACGAGCTATCAG
	R: GAGGACAGGGAGGATCAAGT
COL-I	F: CAGTGGCGTTATGACTT
	R: CTGCGGATGTTCTCAATCT
ALP	F: GAAGGAGCGAGGTTGAC
	R: ATCAGCAGTAACCACAGTC
GAPDH	F: CAGCAACTCCCACTCTTC
	R: TGTAGCCGTATTCAATGTC
miR-194-3p	F: GCCAGTGGGGCTGCTGT
	R: AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
U6	F: CTTCGGCAGCACATATAC
	R: GAACGCTTCACGAATTTGC

**1.2.8 Western blot 检测成骨相关蛋白表达水平变化** 收集各组细胞,RIPA 裂解液提取蛋白,BCA 法

定量蛋白,取定量后蛋白 30  $\mu\text{g}$ ,加入 4 $\times$ 上样缓冲液,沸水中煮 10 min,而后将样品加入含有配制好的含 15% 分离胶与 5% 浓缩胶的电泳系统内跑胶;切胶并转膜;转膜结束后,将 PVDF 膜与 5% 脱脂奶粉室温下反应 1 h;封闭后的 PVDF 膜分别与兔抗 OCN(1 : 500 稀释)、COL-I (1 : 5 000 稀释)、 $\beta$ -actin 等一抗(1 : 50 000 稀释)4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;取出 PVDF 膜,TBST 洗涤 5 次,与山羊抗兔的二抗(1 : 5 000 稀释)常温孵育 2 h,TBST 洗涤 5 次;加入 ECL 化学发光液,于凝胶成像系统中显影,应用 Image J 软件分析结果。

**1.2.9 成骨细胞矿化结节染色** 取培养 14 d 各组细胞的 6 孔板,弃液,PBS 清洗两次,加入足量 OB 固定液固定 15 min,PBS 清洗 3 次,每次 3 min。然后滴加适量的茜素红染液,常温避光染色 30 min,双蒸水清洗 3 次。最后清洗完毕、镜检。

**1.2.10 荧光 Hoechst/PI 双染试剂检测细胞凋亡**

将转染 72 h 的成骨细胞按  $3 \times 10^5$  个/孔重新接种到 24 孔板中,37  $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱培养 48 h 后,用 PBS 清洗两次,接着加入 0.8 mL 细胞染色缓冲液,再加入 5  $\mu\text{L}$  的 Hoechst 染色液和 PI 染色液,混匀,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min,染色完毕 PBS 清洗,镜检。

### 1.3 统计分析

实验数据均用(平均值 $\pm$ 标准差)表示,两组之间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义,每组数据来源至少为 3 次独立实验结果。

## 2 结果

### 2.1 模拟微重力环境下成骨细胞增殖、分化、凋亡及矿化的情况

分别采用 MTT 法、RT-PCR、Western blot、Hoechst/PI 双染、茜素红染色法检测模拟微重力效应下 MC3T3-E1 成骨细胞增殖、分化、凋亡及矿化的功能改变。结果发现,微重力暴露 72 h 后,与对照组(control, CON)相比,模拟微重力组(simulated microgravity group, SMG)成骨细胞的增殖率显著减弱;成骨细胞分化标志物如 ALP、COL-I、OCN 的基因和蛋白表达水平显著下调,提示微重力暴露后成骨细胞分化能力降低;Hoechst/PI 双染结果表明,MC3T3-E1 成骨细胞在模拟微重力环境暴露 72 h 后,SMG 组成骨细胞呈现出更多数量的弱红光+强

蓝光特征,预示微模拟重力效应促进了成骨细胞的凋亡;茜素红染色结果显示,对照组相较于SMG组,

细胞经茜素红染色后显示出更多、更明显的钙红色结节(见图1)。

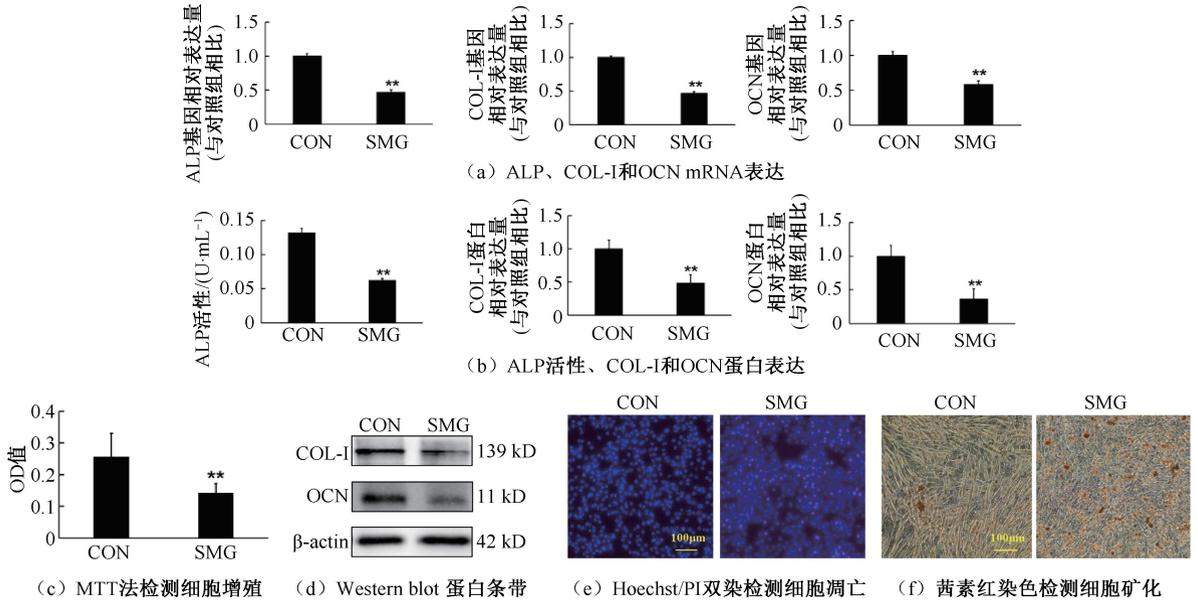


图1 模拟微重力环境下成骨细胞增殖、分化、凋亡与矿化情况

Fig. 1 Proliferation, differentiation, apoptosis and mineralization of osteoblasts in simulated microgravity

(a) Relative mRNA of ALP, COL-1 and OCN expression level, (b) Relative protein of ALP, COL-1 and OCN expression level, (c) Cell proliferation detected by MTT assay, (d) Western blot protein bands, (e) Alizarin red staining examination for osteoblast mineralization, (f) Hoechst/PI double staining examination for osteoblast apoptosis

注: \*\*与对照组相比,  $P < 0.01$ ; 比例尺 = 100  $\mu\text{m}$ 。

## 2.2 模拟微重力环境下 miR-194-3p 在成骨细胞中表达上调

本课题组前期实验结果表明,微重力效应可以显著抑制成骨细胞的分化进程,RNA 测序结果显示 miR-194-3p 显著上调,并且可能作为重力敏感的 miRNA 调控成骨细胞的功能<sup>[10-11]</sup>。为了验证 RNA 测序结果的准确性以及 miR-194-3p 对模拟微重力环境的响应,RT-PCR 分别检测 miR-194-3p 在微重力暴露前后的表达水平。结果发现,miR-194-3p 在模拟微重力效应下表达显著上调,与 RNA 测序结果相一致,且呈现出时间依赖性(见图2)。

## 2.3 下调 miR-194-3p 表达水平可逆转微重力环境下成骨细胞功能异常情况

为了探讨模拟微重力环境下 miR-194-3p 对成骨细胞功能的调控作用,首先使用 miR-194-3p inhibitor 和 NC 分别转染 MC3T3-E1 细胞,检测 miR-194-3p 的表达变化;之后经微重力暴露 72 h,分别采用 MTT 法、RT-PCR、Western blot、Hoechst/PI

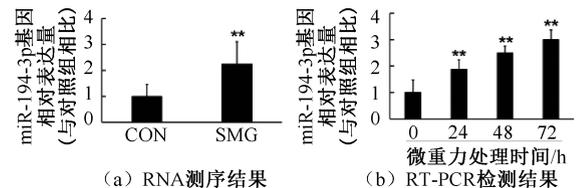


图2 模拟微重力环境下 miR-194-3p 在成骨细胞 MC3T3-E1 中表达

Fig. 2 Expression of miRNA-194-3p level in osteoblasts in simulated microgravity (a) Results of RNA-seq, (b) Results of RT-PCR

注: \*\*与对照组相比,  $P < 0.01$ 。

双染、茜素红染色法检测下调 miR-194-3p 的表达水平后模拟微重力效应下 MC3T3-E1 成骨细胞增殖、分化、凋亡及矿化的功能改变。

结果表明,与对照组相比, inhibit-NC 组中 miR-194-3p 的表达水平没有显著变化, inhibit-194-3p 组中 miR-194-3p 的表达水平显著下调 ( $P < 0.01$ ), SMG 组中也出现同样的趋势,主要表现为相比

SMG-inhibit-NC 组, SMG-inhibit-194-3p 组中 miR-194-3p 表达水平下降(见图 3)。

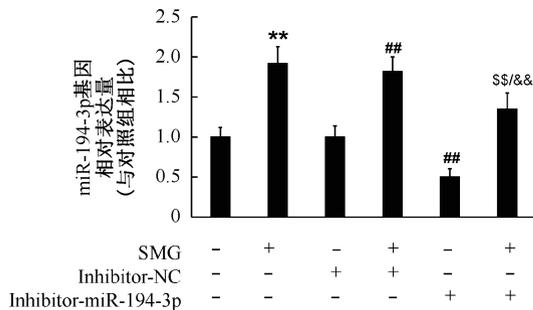


图 3 miR-194-3p 在使用抑制剂前后表达变化

Fig. 3 Expression of miR-194-3p level before and after the use of inhibitors

注:与对照组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与正常空载体 (inhibit-NC) 组相比, # $P < 0.01$ ; 与旋培空载体 (SMG-inhibit-NC) 组相比, \$ $P < 0.01$ ; 与正常敲低 (inhibit-194-3p) 组相比, && $P < 0.01$ 。

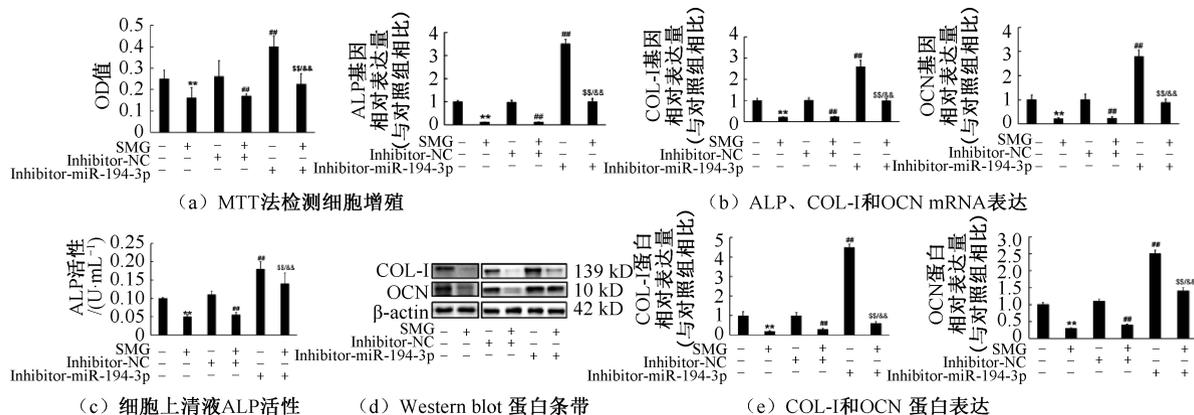


图 4 模拟微重力环境下调 miR-194-3p 表达后成骨细胞增殖、分化情况

Fig. 4 Effects of lower expression of miR-194-3p on proliferation, differentiation of osteoblasts in simulated microgravity

(a) Cell proliferation detected by MTT assay, (b) Relative mRNA of ALP, COL-I and OCN expression level, (c) ALP activity of cell supernatant, (d) Western blot protein bands, (e) Relative protein of COL-I and OCN expression level

注:与对照组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与正常空载体组 (inhibit-NC) 相比, # $P < 0.01$ ; 与旋培空载体组 (SMG-inhibit-NC) 相比, \$ $P < 0.01$ ; 与正常敲低组 (inhibit-194-3p) 相比, && $P < 0.01$ 。

对各组细胞进行茜素红染色,镜下可见红色钙结节,与空白组相比, inhibit-NC 组的矿化结节区域没有显著变化,与 inhibit-NC 相比, inhibit-194-3p 组矿化结节分布区域大且多, SMG-inhibit-NC 组结节分布分散且少, SMG-inhibit-194-3p 组分布区域较多。

Hoechst/PI 双染结果表明,正常细胞的染色

MTT 细胞增殖实验表明,与对照组相比, inhibit-NC 组中细胞增殖水平没有显著变化, inhibit-194-3p 组增殖率最高 ( $P < 0.05$ ), SMG-inhibit-NC 组最低, SMG-inhibit-194-3p 组相比 SMG-inhibit-NC 组的增殖率要高。

ALP 活性检测结果显示, SMG 组的 ALP 活性降低, inhibit-NC 组的 ALP 活性无明显差异; inhibit-194-3p 组的 ALP 活性最高,与 inhibit-NC 组相比, SMG-inhibit-NC 组 ALP 活性降低 ( $P < 0.05$ )。下调 miR-194-3p 表达水平后, SMG-inhibit-194-3p 组 ALP 活性相比 SMG-inhibit-NC 组较高 ( $P < 0.01$ )。RT-PCR 和 Western blot 结果显示,与对照组相比, SMG-inhibit-194-3p 组相比 inhibit-194-3p 组的成骨分化相关基因 ALP、OCN ( $P < 0.05$ )、COL-I ( $P < 0.01$ ) 表达水平有不同程度的提高;与此同时, OCN、COL-I 蛋白表达水平与基因表达水平趋于一致(见图 4)。

显示弱红光+弱蓝光,坏死细胞染色显示强红光+强蓝光,凋亡细胞显示弱红光+强蓝光,与对照组相比, inhibit-NC 组和 inhibit-19-3p 组没有明显变化, SMG-inhibit-NC 组弱红色和强蓝色较多,凋亡最明显, SMG-inhibit-194-3p 组相比 inhibit-194-3p 组和 SMG-inhibit-NC 组凋亡较不明显(见图 5)。

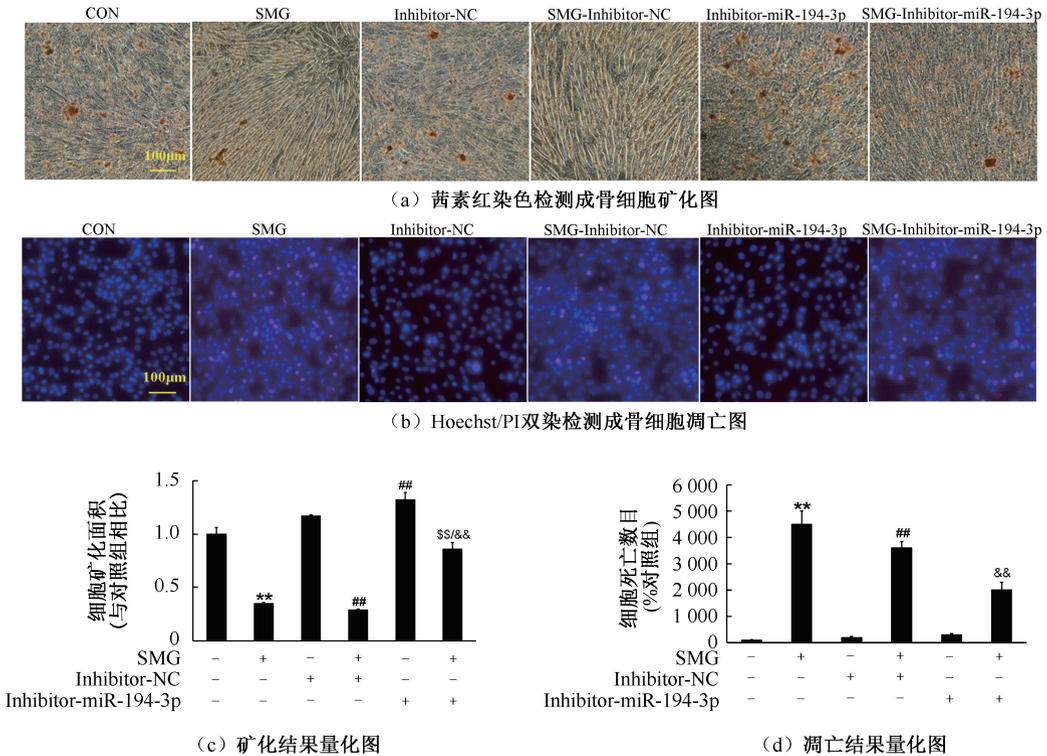


图 5 模拟微重力环境下下调 miR-194-3p 表达后成骨细胞矿化与凋亡情况

Fig. 5 Effects of down-regulating miR-194-3p on apoptosis and mineralization of osteoblasts in simulated microgravity (a) Alizarin red staining examination for osteoblast mineralization, (b) Hoechst/PI double staining examination for osteoblast apoptosis, (c) Quantification of mineralization results, (d) Quantification of apoptosis results

注:与对照组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与正常空载体 (inhibit-NC) 组相比, ## $P < 0.01$ ; 与旋培空载体 (SMG-inhibit-NC) 组相比, §§ $P < 0.01$ ; 与正常敲低 (inhibit-194-3p) 组相比, && $P < 0.01$ , 比例尺为  $100 \mu\text{m}$ 。

### 3 讨论

成骨细胞是人体骨形成的主要功能细胞, 骨基质的合成、分泌和矿化都要依靠成骨细胞; 并且成骨细胞对外界应力较为敏感, 重力改变可以较明显影响它的形态和功能<sup>[11]</sup>。微重力会影响成骨细胞的功能, 并且诱导肌动蛋白微丝破坏和骨质丢失<sup>[12]</sup>。成骨细胞分化是维持骨组织稳定和健康的重过程, 然而在微重力环境下, 成骨细胞的分化受到极大挑战和干扰, 导致可能会发生异常的分化和功能失调<sup>[13]</sup>。研究表明, 微重力下失重引起的骨量减少是因为骨形成与重吸收之间的平衡被破坏, 骨质形成减少, 而重吸收保持正常或增加, 最终导致了骨量丢失<sup>[6]</sup>。由于成骨细胞分化是骨骼形成和维持骨量的关键步骤, 故目前被普遍接受的观点

是微重力导致骨丢失的主要原因是成骨细胞分化障碍, 但导致成骨细胞分化障碍的分子机制并不完全清楚<sup>[14]</sup>。

miRNA 是一类内源性的小非编码 RNA 单链分子, 长度为 15~25 个核苷酸, miRNA 通常会与互补序列的 mRNA 分子结合并对其进行调节, 从而在细胞中发挥重要的调控功能, 在调节成骨细胞分化过程中具有重要作用。研究表明, miR-194-3p 在调控成骨细胞分化过程中起到关键作用, miR-194-3p 可能是维持成骨细胞生成的关键调节因子<sup>[15]</sup>。

失重引起的骨质丢失的主要原因是成骨细胞功能的异常, 有研究证实成骨细胞在微重力环境下细胞增殖和分化受到了抑制, 使得有成骨功能的细胞数量下降, 从而导致骨形成减少<sup>[16]</sup>。本文发现, 模拟微重力下敲低 miR-194-3p 表达对成骨细胞的

增殖具有促进作用。研究表明,细胞凋亡对保持正常成骨细胞的数量具有非常重要的作用,微重力环境不仅抑制成骨细胞的增殖,还促使细胞凋亡,导致成骨细胞的数量减少<sup>[17]</sup>。本文结果显示,微重力下敲低 miR-194-3p 表达可以抑制成骨细胞凋亡,说明模拟微重力下 miR-194-3p 对维持成骨细胞数量有着重要作用。

ALP 是成骨细胞前期分化的重要标志物,它在一定程度上可以反映成骨细胞的活性或功能状况<sup>[18]</sup>。矿化基质的形成是成骨细胞分化末期的重要标志,也是成骨能力的体现<sup>[19]</sup>。骨是一种代谢活跃的组织,其中矿化基质不断沉积并被特化细胞吸收,而成骨细胞是专门合成和沉积类骨细胞的细胞,这些细胞类型之间的稳态保证了骨组织的适当重塑和更新<sup>[13]</sup>。本文发现,微重力下敲低 miR-194-3p 可以提高成骨细胞 ALP 活性,增加矿化结节数量,说明微重力下敲低 miR-194-3p 对成骨细胞的分化、矿化具有促进作用。

COL-I 是成骨阶段主要的胶原,由成骨细胞分泌,是成骨分化检测的重要指标。OCN 是骨代谢的标志物之一,反映成骨细胞功能的活性变化<sup>[20]</sup>。本文发现,模拟微重力培养下,miR-194-3p 表达水平明显提高,敲低 miR-194-3p 后成骨标记物 COL-I 和 OCN 在基因和蛋白表达水平均有不同程度提高。该结果说明,模拟微重力环境下 miR-194-3p 可能通过负调控 COL-I 和 OCN 的表达进而调控成骨细胞分化。

本文还发现,模拟微重力条件下,miR-194-3p 的表达水平提高。当敲低 miR-194-3p 的表达水平后,成骨细胞的增殖率提高,成骨细胞矿化钙结节增多,ALP、COL-I 和 OCN 的表达水平都有不同程度的提高,成骨细胞凋亡减少。综上所述,在模拟微重力环境下,miR-194-3p 作为骨负调控因子在成骨细胞生物学功能调控中发挥重要作用。

## 4 结论

模拟微重力环境下,miR-194-3p 的表达水平显著升高,敲低 miR-194-3p 的表达水平后,成骨细胞的增殖率提高,成骨细胞矿化钙结节增多,ALP 活性提高,成骨相关标记物 COL-I 和 OCN 表达水平提高,同时抑制成骨细胞的凋亡。在模拟微重力环境

下,抑制 miR-194-3p 能够显著促进成骨细胞的分化,但其具体机制仍需进一步研究。这些发现将有助于深入了解长期太空探索中骨质流失的机制,为预防和治疗微重力环境下的骨质疏松等骨相关疾病提供新思路和方向。

**利益冲突声明:**无。

**作者贡献声明:**薛进冬负责细胞实验、论文撰写、整理和排版论文图片;程路畅、王敏负责协助论文撰写和修改;谭彩美、邓琪琪、朱海美负责协助细胞实验及数据分析;郭勇、韩标负责研究和数据分析指导,以及论文指导与修改。

## 参考文献:

- [1] FAN C, WU Z, COOPER DML, et al. Activation of focal adhesion kinase restores simulated microgravity-induced inhibition of osteoblast differentiation via Wnt/B-catenin pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5593.
- [2] GENCHI GG, MOLLO V, BATTAGLINI M, et al. Effects of simulated microgravity on the internalization of cerium oxide nanoparticles by proliferating human skeletal myoblasts [J]. *ACS Appl Nano Mater*, 2023, 6(12): 10853-10862.
- [3] CORYDON TJ, SCHULZ H, RICHTER P, et al. Current knowledge about the impact of microgravity on gene regulation [J]. *Cells*, 2023, 12(7): 1043.
- [4] 张浩. 微重力环境下对抗骨质疏松的生物力学机理模拟研究[D]. 天津: 天津理工大学, 2022.
- [5] FANG S, DENG Y, GU P, et al. MicroRNAs regulate bone development and regeneration [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(4): 8227-8253.
- [6] 王艺璇, 王可, 张舒. 微小 RNA、长链非编码 RNA 及二者相互作用调控成骨细胞功能的研究进展[J]. *解放军医学院学报*, 2021, 42(1): 118-124.
- [7] ZHANG J, HUANG X, XIE J, et al. Exosomal miR-29a derived from bone marrow mesenchymal stem cells promotes mouse bone development and formation [J]. *J Biomater Tissue Eng*, 2023, 1(13): 188-194.
- [8] TAIPALEENMÄKI H, SAITO H, SCHRÖDER S, et al. Antagonizing microRNA-19a/b augments PTH anabolic action and restores bone mass in osteoporosis in mice [J]. *EMBO Mol Med*, 2022, 14(11): e13617.
- [9] 徐丽群, 张丽君, 李高志, 等. 模拟失重下 miR-138-5p 靶向 SIRT1 负调控成骨细胞分化的研究[J]. *解放军医学院学报*, 2021, 42(10): 1074-1080.
- [10] 韩标. 微重力环境对成骨细胞的影响及机制的实验研究[D]. 天津: 军事科学院, 2019.

- [11] 韩标, 郭勇, 韦淑萍, 等. 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 [J]. 医用生物力学, 2020, 35(1): 35-42.  
HAN B, GUO Y, WEI SP, *et al.* Differential MiRNA/mRNA expression profiling and functional network analysis for MC3T3-E1 cells with microgravity stimulation based on RNA-seq [J]. J Med Biomech, 2020, 35(1): 35-42.
- [12] LIN X, XIAO YY, ZHANG KW, *et al.* Knockdown of MACF1 inhibits the migration and cytoskeletal arrangement of pre-osteoclasts induced by simulated microgravity [J]. Acta Astron, 2022(190): 149-159.
- [13] LI J, HE X, WEI W, *et al.* MicroRNA-194 promotes osteoblast differentiation via downregulating STAT1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 460(2): 482-488.
- [14] XU Z, GUO B, CHANG P, *et al.* The differential expression of miRNAs and a preliminary study on the mechanism of miR-194-3p in keloids [J/OL]. Biomed Res Int, 2019, doi: 10.1155/2019/8214923.
- [15] JEONG BC, KANG IH, HWANG YC, *et al.* MicroRNA-194 reciprocally stimulates osteogenesis and inhibits adipogenesis via regulating COUP-TFII expression [J]. Cell Death Dis, 2014, 5(11): e1532.
- [16] GRIMM D, WEHLAND M, CORYDON TJ, *et al.* The effects of microgravity on differentiation and cell growth in stem cells and cancer stem cells [J]. Stem Cells Transl Med, 2020, 9(8): 882-894.
- [17] SUN Z, LI Y, WANG H, *et al.* miR-181c-5p mediates simulated microgravity-induced impaired osteoblast proliferation by promoting cell cycle arrested in the G2 phase [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(5): 3302-3316.
- [18] MONTAGNA G, PANI G, FLINKMAN D, *et al.* Long-term osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells in simulated microgravity: Novel proteins sighted [J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(10): 536.
- [19] SHI W, XIE Y, HE J, *et al.* Microgravity induces inhibition of osteoblastic differentiation and mineralization through abrogating primary cilia [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1866.
- [20] CHRISTENSON RH. Biochemical markers of bone metabolism: An overview [J]. Clin Biochem, 1997, 30(8): 573-593.