

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00610

· 论 著 ·

miRNA-140 在早期骨关节炎软骨细胞中的表达规律及功能

周新华¹, 王敏^{2*}, 姬颜辉², 蒋毅¹, 刘庆¹

1. 北京积水潭医院, 北京大学第四临床医学院矫形科, 北京 100035

2. 第三军医大学新桥医院骨科, 重庆 400037

[摘要] **目的** 观察早期骨关节炎(osteoarthritis, OA)软骨细胞中 miRNA-140 的表达规律以及转染 ds-miRNA-140 对软骨细胞功能的影响。**方法** 建立兔 OA 模型, 获得正常软骨细胞(A组)和4周(B组)、8周(C组)OA 软骨细胞, 应用实时定量 PCR 和蛋白质印迹法检测各组 miRNA-140 相对表达量以及 II 型胶原蛋白(Col2a1)和金属蛋白酶 13(MMP-13)的表达情况。各组软骨细胞转染 ds-miRNA-140 后, 观察细胞 Col2a1、MMP-13 的表达情况。**结果** B组、C组软骨细胞 miRNA-140 的表达和 A组相比分别下降到 63% 和 57% ($P < 0.01$), 而 B组和 C组软骨细胞 miRNA-140 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); B、C两组细胞 Col2a1 mRNA 的表达和 A组相比分别减少了 52% 和 63% ($P < 0.01$), B、C两组软骨细胞 MMP-13 mRNA 的表达和 A组相比分别升高了 3.01 倍和 4.15 倍 ($P < 0.01$)。转染 ds-miRNA-140 后, B、C两组细胞 Col2a1 mRNA 的表达分别增加了 60% 和 127% ($P < 0.01$), B、C两组 MMP-13 mRNA 的表达在转染后是转染前的 54.53% 和 42.61% ($P < 0.01$)。Col2a1 和 MMP-13 蛋白表达水平变化趋势与 mRNA 一致。**结论** OA 早期关节软骨 miRNA-140 的表达显著减少; 转染 ds-miRNA-140 可增加软骨细胞 Col2a1 表达, 同时降低 MMP-13 的表达。

[关键词] 骨关节炎; miRNA-140; 软骨细胞; 胶原 II 型; 基质金属蛋白酶 13**[中图分类号]** R 684.3**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2014)06-0610-06

Expression of miRNA-140 in chondrocytes of patients with early osteoarthritis and its function

ZHOU Xin-hua¹, WANG Min^{2*}, JI Yan-hui², JIANG Yi¹, LIU Qing¹

1. Department of Orthopaedics, Beijing Jishuitan Hospital, The Fourth Clinical College of Peking University, Beijing 100035, China

2. Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

[Abstract] **Objective** To observe miRNA-140 expression in chondrocytes of patients with early osteoarthritis (OA) and the effect of transfecting double-stranded miR-140 (ds-miRNA-140) on chondrocyte function. **Methods** Normal and OA chondrocytes (4 weeks and 8 weeks) were collected from rabbit model of early OA (A, B and C group, respectively). Quantitative polymerase chain reaction was used to examine miRNA-140 expression and Western blotting analysis was used to examine Col2a1 and MMP-13 protein expression in each group. Col2a1 and MMP-13 protein expression was also observed in chondrocytes transfected with ds-miR-140. **Results** Compared with group A, miR-140 expressions in group B and C were reduced to 63% and 57%, respectively ($P < 0.01$); the expression was not significantly different between the group B and C ($P > 0.05$). Compared with group A, Col2a1 mRNA expressions in group B and C were reduced by 52% and 63%, respectively ($P < 0.01$); while MMP-13 mRNA expressions were up-regulated by 3.01 and 4.15 folds, respectively ($P < 0.01$). Transfection with ds-miR-140 increased Col2a1 mRNA by 60% and 127% in group B and C, respectively ($P < 0.01$), and the expressions of MMP-13 mRNA in group B and C were reduced to 54.53% and 42.61%, respectively ($P < 0.01$). The changes of Col2a1 and MMP-13 protein expression were the same as that of mPNA. **Conclusion** miR-140 expression is reduced in early OA cartilage, and transfection with ds-miR-140 may increase Col2a1 expression and reduce MMP-13 expression.

[Key words] osteoarthritis; miRNA-140; chondrocytes; collagen type II; matrix metalloproteinase 13

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(6): 610-615]

[收稿日期] 2013-11-12 **[接受日期]** 2014-05-19**[作者简介]** 周新华, 博士, 副主任医师. E-mail: bjzhouxinhua@sina.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-68774308, E-mail: 52solar@sina.cn

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是多因素所致的软骨退行性病变,疼痛和畸形严重影响了患者的生活质量,目前原因仍不清楚。在骨骼系统,miRNA在蛋白翻译水平精细调控软骨细胞的分化,深刻影响软骨的生长发育^[1-2]。目前研究发现 miRNA-140在晚期 OA 软骨细胞中表达显著降低^[2],但其在早期 OA 中的表达以及作用尚不清楚。本研究拟观察早期 OA 软骨细胞 miRNA-140 的表达规律以及转染外源性双链 miRNA-140(ds-miRNA-140)对软骨细胞功能的影响。

1 材料和方法

1.1 动物模型 成年新西兰大白兔 20 只,雌雄比为 1:1,购自重庆市渝达实验兔场,许可证号:SCXK(渝)2007-0009。参照 Pickarski 等^[3]的前交叉韧带切断术(anterior cruciate ligament transection, ACLT)方法,制作成年兔 OA 模型:动物麻醉后右膝关节周围用电动剃刀剪毛,碘伏消毒,做髌骨内侧小切口,将髌骨外翻并屈曲膝关节,显露出前交叉韧带,用眼科剪将其切断,冲洗关节,闭合关节囊和皮肤,肌注抗生素 1 次。动物自由活动,分笼饲养。以兔右膝关节为实验侧,左膝为正常对照侧,设定模型建立后 4 周右膝为 B 组($n=10$),8 周右膝为 C 组($n=10$),左膝自身对照为 A 组($n=10$)。

1.2 细胞培养 兔处死后无菌条件下切开关节收集关节软骨,收集的软骨组织切成 1~2 mm³大小的碎片,室温下分别用 0.2%胰蛋白酶和 0.2% II 型胶原酶消化 30 min 和 2 h,将获得的细胞在含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 DMEM/F12 培养液中培养。原代细胞单层培养。

1.3 软骨细胞转染 ds-miR-140 采用 ds-miR-140 序列模拟内源性 miR-140。先合成 2 条 RNA 寡核苷酸序列 5'-CAG UGG UUU UAC CCU AUG GUA G-3'和 5'-ACC ACA GGG UAG AAC CAC GGA C-3',退火后获得 ds-miR-140(由上海吉玛生物公司合成)。按照 Lipofectamine 2000(Invitrogen)操作手册进行细胞转染,每次实验使用相同浓度的 Silencer Negative Control #1 small interfering RNA (Ambion)转染作为对照。

1.4 实时定量 PCR 检测 miRNA 和 mRNA 的表达 根据 TRIzol 试剂盒(北京博凌科为生物科技有限公司)说明书提取软骨细胞总 RNA。miRNA 的检测:取 25 ng 总 RNA,使用茎环结构反转录引物

5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACC TAC CA-3'进行反转录反应,然后 95℃ 孵育 10 min 使反转录酶失活。实时定量 PCR 在 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, 美国)中进行,mi-RNA-140检测的上游引物为 5'-GCC TCA GTG GTT TTA CCC TA-3',下游引物为 5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'。

II 型胶原蛋白(Col2a1)、金属蛋白酶 13(MMP-13) mRNA 的检测:应用 Readyto-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare, 英国)试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA。使用 TaqMan Gene Expression Assay 进行实时定量 PCR 分析,Col2a1 探针为 Hs00164004_m1, MMP-13 探针为 Hs00233992_m1。以 U18 和 GAPDH 基因作为内参对照。Col2a1 引物序列:5'-TCC TAA GGG TGC CAA TGG TGA-3'(上游),5'-AGG ACC AAC TTT GCC TTG AGG AC-3'(下游);MMP-13 引物序列:5'-TCC CAG GAA AAT AGC TGA GAA CTT-3'(上游),5'-AAA CCC AAA TGC TTC AAA GAC AG-3'(下游);GAPDH 引物序列:5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3'(上游),5'-TGG TGA AGA CGC CAG TGG A-3'(下游);U18 引物序列:5'-GCA GTC CGC ACA CAG TAT CTG ACG ATA GCA-3'(上游),5'-GCG AGC TCG TCC AAC CGA ATA TA-3'(下游)。

1.5 蛋白质印迹检测 Col2a1 和 MMP-13 蛋白表达 用 PBS 漂洗软骨细胞,加入适量预冷的细胞裂解液,收集蛋白裂解液至 EP 管中,超声裂解后,4℃ 2 920×g 离心 20 min,收集上清。BCA 法测定蛋白浓度后,取等量总蛋白(约 80 μ g)的样品,加入上样缓冲液混匀后 100℃ 变性 10 min,上样进行 10% SDS-PAGE。电泳结束后使用 Bio-Rad Mini 湿式转移电泳槽以恒流 200 mA 转膜 2 h 至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉(0.1% TBST 配制)室温封闭 3 h, TBST 漂洗 3 次后加入一抗(Col2a1 大鼠抗兔单克隆抗体 1:500, MMP-13 大鼠抗兔单克隆抗体 1:500, PIERCE 公司),4℃ 孵育过夜。TBST 漂洗 3 次后,加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次, ECL 显影。以 β -actin 作为内参对照。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,检

验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 OA 关节软骨细胞 miRNA-140 的表达变化 由图 1 可见,早期 OA 关节软骨细胞 miRNA-140 的表达显著减少,4 周(B 组)时,下降到正常值(A 组)的 63%,8 周(C 组)下降到 57%,B、C 组和 A 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),B 组和 C 组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 转染 ds-miRNA-140 对 OA 关节软骨细胞 Col2a1 mRNA 和蛋白表达的影响 由图 2 可见,B 组细胞 Col2a1 mRNA 的表达量与 A 组比较降低了 52%,C 组与 A 组比较降低了 63%,B 组、C 组和 A 组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$),B 组和 C 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。A、B、C 3 组细胞转染 ds-miRNA-140 后,A 组 Col2a1 mRNA 的表达未发生明显变化,B 组转染后 Col2a1 mRNA 的表达增加了 60%,C 组转染后 Col2a1 mRNA 的表达增加了 127%,B、C 两组与转染前相比差异均有统计学意义($P < 0.01$),而 B 组与 C 组转染后 Col2a1 mRNA 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

正常关节软骨细胞(A 组)Col2a1 蛋白表达较多,转染 ds-miR-140 前后差异不大;OA 关节软骨细胞(B、C 组)Col2a1 蛋白表达减少,但在转染 ds-miR-140 后表达增加明显(图 3)。

2.3 转染 ds-miRNA-140 对 OA 关节软骨细胞 MMP-13 mRNA 和蛋白表达的影响 由图 4 可见,B 组细胞 MMP-13 mRNA 的表达量和 A 组比较增加了 3.01 倍,C 组和 A 组比较增加了 4.15 倍,B 组、C 组和 A 组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$),B 组和 C 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。A、B、C 3 组细胞转染 ds-miRNA-140 后,A 组 MMP-13 mRNA 的表达未发生明显变化,B 组转染后 MMP-13 mRNA 的表达是转染前的 54.53%,C 组转染后 MMP-13 mRNA 的表达是转染前的 42.61%,B、C 两组与转染前相比差异均有统计学意义($P < 0.01$),而 B 组与 C 组转染后 MMP-13 mRNA 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

正常关节软骨细胞(A 组)MMP-13 蛋白表达量较低,转染 ds-miR-140 后 MMP-13 蛋白表达变化不大;B 组和 C 组在转染前 MMP-13 蛋白表达丰富,尤其 C 组丰度更大,转染 ds-miR-140 后 B 组和 C 组

MMP-13 蛋白表达显著降低,接近 A 组丰度(图 3)。

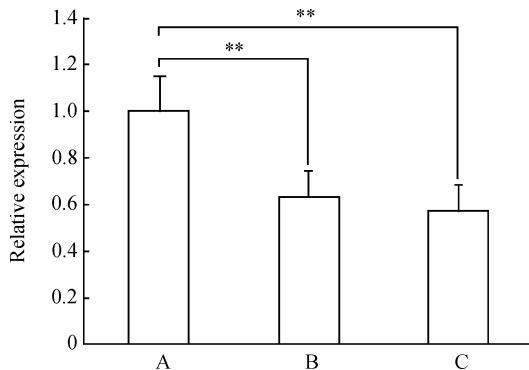


图 1 各组软骨细胞 miRNA-140 的表达(实时定量 PCR)
Fig 1 Expressions of miRNA-140 in chondrocytes of each groups as detected by real-time quantitative PCR

A: Normal chondrocytes; B, C: Chondrocytes were collected from 4 weeks and 8 weeks osteoarthritic rabbits, respectively. ** $P < 0.01$. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

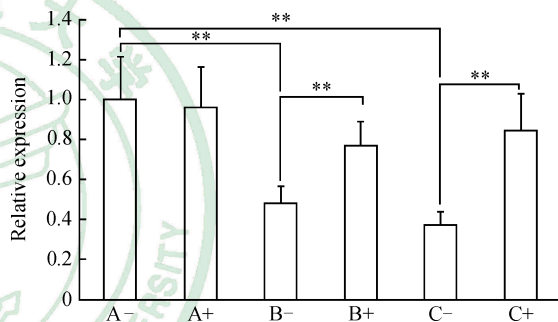


图 2 各组软骨细胞 Col2a1 mRNA 的表达(实时定量 PCR)
Fig 2 Expression of Col2a1 mRNA in chondrocytes of each group by real-time quantitative PCR

A: Normal chondrocytes; B, C: Chondrocytes were collected from 4 weeks and 8 weeks osteoarthritic rabbit, respectively. -: Without ds-miRNA-140 transfection; +: With ds-miRNA-140 transfection. ** $P < 0.01$. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

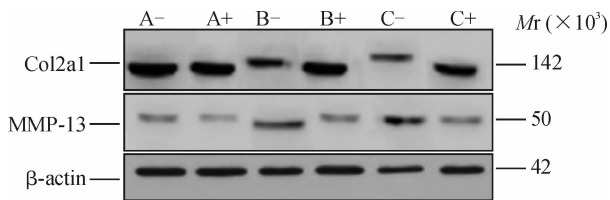


图 3 各组软骨细胞 MMP-13 和 Col2a1 蛋白的表达(蛋白质印迹分析)

Fig 3 MMP-13 and Col2a1 protein expression in chondrocytes of each group as detected by Western blotting analysis

A: Normal chondrocytes; B, C: Chondrocytes were collected from 4 weeks and 8 weeks osteoarthritic rabbits, respectively. -: Without ds-miRNA-140 transfection; +: With ds-miRNA-140 transfection

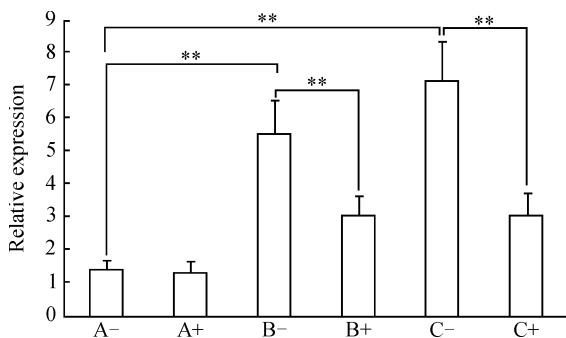


图4 各组软骨细胞 MMP-13 mRNA 表达(实时定量 PCR)

Fig 4 Expression of MMP-13 mRNA in chondrocytes of each group as detected by real-time quantitative PCR

A: Normal chondrocytes; B, C: Chondrocytes were collected from 4 weeks and 8 weeks osteoarthritic rabbits, respectively. -: Without ds-miRNA-140 transfection; +: With ds-miRNA-140 transfection. ** $P < 0.01$, $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

OA 的发病原因尚不清楚, OA 软骨细胞中 miRNA 的异常变化引起了广泛关注^[4-7], 了解其机制将为更深入地研究 OA 的发病原因提供新的思路。miRNA-140 是胚胎软骨发育期仅在软骨组织中表达的一种 miRNA^[8-14], 随着软骨细胞分化发育成熟, 细胞内 miRNA-140 表达也增强, 研究表明正常关节软骨细胞中 miRNA-140 的表达比骨髓基质干细胞(MSCs)高 2 倍以上^[9]。缺乏 miRNA-140 的小鼠出生后骨骼发育畸形, 关节软骨细胞凋亡^[9,12]。而敲除 miRNA-140 基因, 关节软骨则很快发生老年性改变^[9], 所以 miRNA-140 是软骨细胞生长发育和功能维持最重要的 miRNA 之一。

研究发现晚期 OA 软骨细胞内 miRNA-140 表达显著减少^[8-11], 导致 OA 中多种降解软骨组织的酶增加, 如解整链蛋白金属蛋白酶(ADAMTS5, disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs)高表达^[9], 最终软骨组织降解破坏。但早期 OA 软骨细胞 miRNA-140 变化情况目前不太清楚。本研究制作早期的 OA 关节模型, 观察 8 周内关节软骨细胞 miRNA-140 的变化情况, 结果显示在 OA 4 周时软骨细胞内 miRNA-140 的表达就明显下降, 8 周时下降更明显, 提示 miRNA-140 在早期 OA 软骨细胞内即迅速降低, 而且降低幅度较大, 这种减少的情况和程度可能一直持续到晚期 OA 软骨细胞。早期 OA 软骨细胞中 miRNA-140 表达下降原因不清楚, 有研究表明 IL-1 β 和其他相关细胞因子会显著抑制 miR-140 的表达^[9], 推测生物力学、遗传、创伤、

感染等因素可能会作用在一个共同的通路上造成早期 OA 软骨细胞内 miRNA-140 下降, 其机制有待进一步研究。

本研究同时还观察了 Col2a1 和 MMP-13 的表达变化。Col2a1 表达是软骨细胞功能的重要标志, 它的下降预示关节软骨开始发生退变, 而这个时候影像学表现可能没有任何改变^[8]。本研究观察到 OA 软骨细胞中 Col2a1 的 mRNA 和蛋白表达显著降低, 与文献报道晚期 OA 软骨细胞 Col2a1 基因和蛋白表达降低的程度^[8]接近, 显示在 OA 早期软骨细胞的功能即受到严重损害。MMP-13 是重要的软骨基质降解酶, MMP-13 的增加能加剧软骨的退变^[11]。本研究观察到 OA 4 周和 8 周时软骨细胞中 MMP-13 的表达均显著增加, 提示及早干预这种变化有利于预防早期关节炎, 防止 OA 进一步发展, 特别是在关节影像学发生改变以前干预, 可以避免关节置换手术。

本研究通过转染外源性 ds-miRNA-140 来提高 miRNA-140 的表达, 发现 OA 早期软骨细胞 Col2a1 的基因和蛋白表达在 4 周时均得到增加, 到 8 周时略有增加, 但增加幅度不大; 同时 MMP-13 表达显著下降, 8 周时几乎降低了一半。研究初步显示 ds-miRNA-140 在改善早期 OA 软骨细胞功能方面具有积极作用。

尽管 miRNA-140 在 OA 研究中展示了良好的应用前景^[15], 但其机制还不清楚。目前在 OA 软骨细胞中确认的 miR-140 靶目标主要有组蛋白脱乙酰酶(HDAC4)^[16]、趋化因子配体 12(CXCL12)^[17]、胰岛素生长因子结合蛋白 5(IGFBP5)^[11]、ADAMTS-5 和 MMP-13^[8]、Smad3(TGF β 信号通路转录子)^[11]、天冬酰胺氨肽酶(Dnpep)^[12]、Sp1 转录子(细胞循环调节激活剂 P15INK4b)^[18]、血小板源性生长因子 A(PDGF-A)^[19]等。这些靶目标是软骨细胞表型相关的重要因子。miRNA-140 也会影响重要信号通路 Bmp2(小鼠)和 BMP2(人)^[8,13], Nakamura 等^[12]在 miRNA-140 基因缺失小鼠实验中证实 miRNA-140 可作用于 Dnpep, 进而抑制 BMP 信号通路, 保持软骨细胞分化。

MMP-13 是软骨细胞最重要的基质降解酶之一, 是 miRNA-140 的直接靶目标, miRNA-140 在 MMP-13 mRNA 的 3' 端有结合位点, 负向调节 MMP-13 的表达, 改善人 C28/I2 软骨细胞的炎症程度^[20]。本研究中转染外源性 ds-miRNA-140 出现

MMP-13 表达显著下降可能是 miRNA-140 直接作用在 MMP-13 mRNA 的结果,但转染 ds-miRNA-140 后,Col2a1 升高的机制有待研究。Col2a1 并不是 miRNA-140 的直接靶目标,miRNA-140 表达受 Sox9(transcription factor SRY-box-containing gene 9) 调控,Sox9 是 miRNA-140 的主要上游调控子^[15,21],其家族中的 L-Sox5 和 Sox6 辅助调节 Sox9^[19,22]。Sox9 蛋白与 Col2a1 的第一个内含子中的特异性序列结合,影响 Col2a1 表达。Sox9 上游的调节因素很多,其中 Wnt/ β -catenin 信号通路和 Sox9 关系最为密切,是 Sox9 上游的重要调控开关^[18],该信号通路激活会强烈抑制 Sox9 表达,所以我们设想研究中转染 ds-miRNA-140 后 Col2a1 升高的现象不是 miRNA-140 直接作用的结果,而是 miRNA-140 抑制了 Wnt/ β -catenin 信号通路,解除了对 Sox9 的抑制后 Sox9 表达增加所致。

脱靶效应是 miRNA-140 研究中需要考虑的一个重要问题,miRNA-140 的靶基因很多,现发现有 574 个,其中保守靶基因有 55 个,而非保守基因则高达 519 个^[13],ds-miRNA-140 的脱靶效应 mRNA 可能会更多^[23]。

Miyaki 和 Nicolas 等^[8,13]认为 miRNA-140 影响骨形态形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP) 2 信号通路。miRNA-140、miRNA-675 受 Sox-9、Sox-5、Sox-6 的调节,Sox-9 是重要的软骨细胞外基质基因,提示 miRNA-140 与软骨功能关系密切^[15,22],但 miRNA-140 具体调控机制目前仍不太清楚,了解其复杂的调控机制是今后重要的研究内容。

除 miRNA-140 外,其他 miRNA 在 OA 软骨细胞中也起重要作用,沉默 miRNA-34a 基因可以抑制软骨细胞的凋亡^[24]。miRNA-23b 通过下调蛋白激酶 A 信号通路而促进 MSCs 分化为软骨细胞^[25]。miRNA-27b 抑制 OA 软骨细胞 MMP-13 的表达^[5]。Martinez-Sanchez 等^[26]发现正常人软骨细胞中 miRNA-145 的增高抑制软骨细胞外基质基因(Col2a1、蛋白多糖等)以及 miRNA-675、miRNA-140 的表达,而 RUNX2 和 MMP-13 表达增高。miRNA-22 可调节 IL-1 β 、BMP-7 和 BMP-13 等的表达,抑制软骨细胞炎症反应和分解代谢^[6,27],这些 miRNA 在软骨细胞中组成复杂的调控网络,而 miRNA-140 在其中的地位有待研究。

miRNA 同时精细调节多种基因的功能强于 siRNA,在临床应用中也可能取得更好的效果。

miRNA-140 揭示了 OA 病因病理新的领域,明确 miRNA-140 在 OA 软骨细胞中的作用和机制,特别是其靶基因,可能为 OA 治疗提供新的策略与思路。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

(志谢 本次研究工作得到美国加州大学圣迭戈分校生物工程系及 Scripps 骨科研究所 Peter Chen 教授的大力支持,在此表示感谢!)

[参考文献]

- [1] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005,120:15-20.
- [2] Miyaki S, Asahara H. Macro view of microRNA function in osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2012, 8: 543-552.
- [3] Pickarski M, Hayami T, Zhuo Y, Duong le T. Molecular changes in articular cartilage and subchondral bone in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2011, 12:197.
- [4] Díaz-Prado S, Cicione C, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Oreiro N, Fernández-López C, et al. Characterization of microRNA expression profiles in normal and osteoarthritic human chondrocytes[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2012, 13:144.
- [5] Akhtar N, Rasheed Z, Ramamurthy S, Anbazhagan A N, Voss F R, Haqqi T M. MicroRNA-27b regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritis chondrocytes [J]. Arthritis Rheum, 2010, 62:1361-1371.
- [6] Iliopoulos D, Malizos K N, Oikonomou P, Tsezou A. Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks[J]. PLoS One, 2008, 3:e3740.
- [7] Zuntini M, Salvatore M, Pedrini E, Parra A, Sgariglia Fa, Magrelli A, et al. MicroRNA profiling of multiple osteochondromas: identification of disease-specific and normal cartilage signatures[J]. Clin Genet, 2010, 78: 507-516.
- [8] Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S, Grogan S P, Higashiyama R, Inoue A, et al. MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60:

- 2723-2730.
- [9] Miyaki S, Sato T, Inoue A, Otsuki S, Ito Y, Yokoyama S, et al. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis[J]. *Genes Dev*, 2010, 24:1173-1185.
- [10] Araldi E, Schipani E. MicroRNA-140 and the silencing of osteoarthritis[J]. *Genes Dev*, 2010, 24:1075-1080.
- [11] Tardif G, Hum D, Pelletier J P, Duval N, Martel-Pelletier J. Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2009, 10:148.
- [12] Nakamura Y, Inloes J B, Katagiri T, Kobayashi T. Chondrocyte-specific microRNA-140 regulates endochondral bone development and targets Dnpep to modulate bone morphogenetic protein signaling[J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31:3019-3028.
- [13] Nicolas F E, Pais H, Schwach F, Lindow M, Kauppinen S, Moulton V, et al. mRNA expression profiling reveals conserved and non-conserved miR-140 targets[J]. *RNA Biol*, 2011, 8:607-615.
- [14] Li X, Gibson G, Kim J S, Kroin J, Xu S, van Wijnen A J, et al. MicroRNA-146a is linked to pain-related pathophysiology of osteoarthritis[J]. *Gene*, 2011, 480(1-2):34-41.
- [15] Nakamura Y, He X, Kato H, Wakitani S, Kobayashi T, Watanabe S, et al. Sox9 is upstream of microRNA-140 in cartilage[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 166:64-71.
- [16] Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, Waters J, Hajihosseini M K, Clark I, et al. The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(1-2):4214-4217.
- [17] Nicolas F E, Pais H, Schwach F, Lindow M, Kauppinen S, Moulton V, et al. Experimental identification of microRNA-140 targets by silencing and overexpressing miR-140[J]. *RNA*, 2008, 14:2513-2520.
- [18] Yang J, Qin S Y, Yi C, Ma G, Zhu H, Zhou W, et al. MiR-140 is co-expressed with Wwp2-C transcript and activated by Sox9 to target Sp1 in maintaining the chondrocyte proliferation[J]. *FEBS Lett*, 2011, 585:2992-2997.
- [19] Eberhart J K, He X, Swartz M E, Yan Y L, Song H, Bolling T C, et al. MicroRNA Mirn140 modulates Pdgf signaling during palatogenesis[J]. *Nat Genet*, 2008, 40:290-298.
- [20] Liang Z J, Zhuang H, Wang G X, Li Z, Zhang H T, Yu T Q, et al. MiRNA-140 is a negative feedback regulator of MMP-13 in IL-1 β -stimulated human articular chondrocyte C28/I2 cells[J]. *Inflamm Res*, 2012, 61:503-509.
- [21] Oh C D, Maity S N, Lu J F, Zhang J, Liang S, Coustry F, et al. Identification of SOX9 interaction sites in the genome of chondrocytes [J]. *PLoS One*, 2010, 5:e10113.
- [22] Yamashita S, Miyaki S, Kato Y, Yokoyama S, Sato T, Barrionuevo F, et al. L-Sox5 and Sox6 proteins enhance chondrogenic miR-140 microRNA expression by strengthening dimeric Sox9 activity[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287:22206-22215.
- [23] Jones S W, Watkins G, Le Good N, Roberts S, Murphy C L, Brockbank S M, et al. The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF-alpha and MMP13[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17:464-472.
- [24] Abouheif M M, Nakasa T, Shibuya H, Niimoto T, Kongcharoensombat W, Ochi M. Silencing microRNA-34a inhibits chondrocyte apoptosis in a rat osteoarthritis model *in vitro* [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2010, 49:2054-2060.
- [25] Ham O, Song B W, Lee S Y, Choi E, Cha M J, Lee C Y, et al. The role of microRNA-23b in the differentiation of MSC into chondrocyte by targeting protein kinase A signaling[J]. *Biomaterials*, 2012, 33:4500-4507.
- [26] Martinez-Sanchez A, Dudek K A, Murphy C L. Regulation of human chondrocyte function through direct inhibition of cartilage master regulator SOX9 by microRNA-145 (miRNA-145) [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287:916-924.
- [27] Taganov K D, Boldin M P, Chang K J, Baltimore D. NFkappaB dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:12481-12486.