

综 述

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002611

非创伤性股骨头坏死患者 microRNA 差异表达的研究进展

白浩波, 路倩, 张健

(重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆 400016)

【摘要】非创伤性股骨头坏死(nontraumatic osteonecrosis of femoral head, NONFH)是由多种原因引起的骨组织血供中断, 骨细胞坏死。因早期症状不典型、诊断困难, 而患者晚期会面临因股骨头塌陷所引起的髋关节疼痛、活动受限, 只能行髋关节置换术。故研究非创伤性股骨头坏死的发病机制对疾病早期诊断和治疗有重要意义。微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是一种非编码的单链 RNA 分子, 参与调控基因转录后的表达。随着 miRNA 研究技术的发展及对非创伤性股骨头坏死这一疾病研究的深入, 越来越多的 miRNA 被发现在非创伤性股骨头坏死中异常表达。本文通过整理非创伤性股骨头坏死不同组织和细胞中的差异表达 miRNA, 发现了多次报道表达异常且趋势一致的 miRNA, 并对这些 miRNA 的功能和可能的发病机制进行综述。

【关键词】非创伤性股骨头坏死; 微小核糖核酸; 骨髓间充质干细胞; 微血管内皮细胞

【中图分类号】R684.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2020-01-06

Differential expression of microRNA in patients with nontraumatic osteonecrosis of femoral head

Bai Haobo, Lu Qian, Zhang Jian

(Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Nontraumatic osteonecrosis of femoral head (NONFH) is characterized with disruption of blood supply to bone tissue and osteocyte necrosis, which is caused by a variety of risk factors. Due to its nontypical early symptoms and difficulties in diagnosis, patients suffer hip joint pain and limited mobility in the late stage caused by femoral head collapse and the hip replacement will be the only choice in the final stage. Therefore, to seek for early diagnosis and treatment of NONFH has significance in early diagnosis and treatment. MicroRNA (miRNA) is a non-coding single-stranded RNA molecule that can involve in post-transcription regulation. With more advanced research techniques of miRNA and more studies on NONFH, more miRNAs are found that abnormally expressed in NONFH. This article summarized the differentially expressed miRNAs in different tissues and cells of NONFH, which has been reported by several studies and has consistency with those studies, and reviewed functions of these miRNAs and corresponding mechanisms for participating in pathogenesis.

【Key words】nontraumatic osteonecrosis of femoral head; microRNA; mesenchymal stem cells; microvascular endothelial cell

股骨头坏死是一种常见的骨科疾病, 通常因为股骨头血供中断引起骨细胞坏死, 导致相关的结构改变, 在疾病晚期可引起股骨头塌陷^[1]。股骨头坏死分为创伤性和非创伤性 2 类: 创伤性通常是因为创伤导致的血供中断; 而非创伤性是由多种原因共同作用引起的血供中断, 如长期饮酒、吸烟及

激素使用^[2]。中国每年有 10 万~20 万股骨头坏死患者被确诊, 其中 70% 的患者都需要进行全髋关节置换^[3]。目前研究认为, 长期吸烟、饮酒和激素使用与非创伤性股骨头坏死的微血管内皮损伤、血管内凝血异常、骨髓腔脂质代谢紊乱、脂肪栓塞等病理变化密切相关, 但具体机制仍不清楚^[4]。

MicroRNAs (miRNAs) 是一类高度保守的非编码小分子 RNA, 由 21~25 个核苷酸组成。通过与靶 mRNA 的 3'-UTR 结合来调控其翻译或稳定性, 从而负调控靶 mRNA 的表达^[5]。一个 miRNA 可以调控多个下游 mRNA, 而一个 mRNA 又可以受多个 miRNA 调控。人体基因组中已检测到 400 多种 miRNA, 约有 1/3 的蛋白编码基因受这些 miRNA 负调控^[6]。既往研究表明, miRNA 在细胞增殖、分化、代谢、迁移和凋亡等多种生理过程中发挥重要作用^[7]。近年有

作者介绍: 白浩波, Email: 740979175@qq.com,

研究方向: 股骨头坏死。

通信作者: 张健, Email: zhangjianqmu@sohu.com。

基金项目: 重庆市卫计委医学科重点资助项目(编号: 2017ZDXM006);

重庆市科学技术委员会基础与前沿科技资助项目(编号: 20150121)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20201029.1701.006.html>

(2020-10-30)

关股骨头坏死的 miRNA 研究越来越多,发现 miRNA 在股骨头坏死的发生发展中起重要作用,但尚没有文章对这些研究进行总结和归纳。本综述总结了不同组织和细胞中被多次报道的具有表达趋势一致的差异表达 miRNA,及其在非创伤性股骨头坏死中的可能致病机制。

1 非创伤性股骨头坏死患者不同组织中的差异表达 miRNA

1.1 miRNA 在非创伤性股骨头坏死患者骨组织中的差异表达

Wu X 等^[8]分别提取非创伤性股骨头坏死患者骨组织与股骨颈骨折患者骨组织总 RNA 并纯化后进行高通量测序,发现与股骨颈骨折患者的骨组织相比,非创伤性股骨头坏死患者的骨组织中有 39 个异常表达的 miRNA (其中 22 个 miRNA 表达上调,17 个 miRNA 表达下调)。Jia ZF 等^[9]发现 Let-7 在股骨头坏死患者骨组织中表达升高,而 Let-7 的表达升高往往会负向调控凋亡抑制基因 Bcl-xl,抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。而成骨细胞的增殖抑制和骨细胞的凋亡是非创伤性 ONFH 的重要机制^[10]。此外,let-7 家族的另一成员 let-7i 在非创伤性股骨头坏死患者的骨组织中表达下调,let-7i 可负向调控 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)^[11]。TLR4 表达上调引起的免疫应答在非创伤性股骨头坏死的病理变化中也扮演着非常重要的角色^[12]。miR-320e 在非创伤性股骨头坏死患者骨组织中被发现表达上调,而其下游靶基因钙黏附蛋白 11 (cadherin 11, CDH11) 的缺少往往会导致骨髓基质前体细胞成骨分化向成脂分化转变^[13]。股骨头坏死中低表达的 miR-335-5p 通过下调重组人 Dickkopf 相关蛋白 1 (Dickkopf-related protein 1, DKK1),激活 Wnt 信号通路,起到促进成骨细胞增殖分化、抑制破骨细胞和骨细胞凋亡的作用^[14]。

在股骨头塌陷合并骨坏死的病理过程中,骨组织的修复反应也非常重要。Yuan H 等^[15]通过 3 例非创伤性股骨头坏死患者修复区骨组织与股骨颈骨折患者的正常骨组织进行比较,发现 17 个异常表达的 miRNA (其中 12 个 miRNA 表达上调,5 个 miRNA 表达下调)。其中 miR-146a 已被发现可抑制关节炎小鼠的破骨细胞形成和防止关节破坏,是类风湿关节炎中潜在的新的骨破坏治疗靶点^[16]。miR-34a 通过阻断血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的产生抑制血管生成^[17]。

1.2 miRNA 在非创伤性股骨头坏死患者血清中的表达

Kao GS 等^[18]通过 46 例非创伤性股骨头坏死患者和 85 例健康对照患者的血清进行测序,发现 51 个异常表达的 miRNA (34 个 miRNA 表达上调,17 个 miRNA 表达下调)。其中 miR-24 受缺氧调控,抑制内皮细胞和平滑肌细胞的增殖,导致血管生成受损^[19]。过表达 miR-19a 可缓解由微血管阻塞、缺氧诱导的细胞死亡^[20]。这 2 个 miRNA 在非创伤性股骨头坏死患者的血液中都高表达。此外,miR-138-1 在非创伤性股骨头坏死患者血液中也高表达,抑制间充质干细胞的成骨分化^[21]。

Wang X 等^[22]通过因系统性红斑狼疮而长期服用激素导致股骨头坏死患者的血清与系统性红斑狼疮患者的血清及

正常人血清进行比较。发现 miR-423-5p、miR-3960、miR-195-5p、miR-15b-3p、miR-1304-3p 在股骨头坏死患者的血清中均表达上调,而 miR-100-5p、miR-99a-5p、miR-532-5p、miR-140-5p、miR-10a-5p、miR-10b-5p、miR-181c-5p、miR-433 在股骨头坏死患者血清中表达下调。猜测 miR-15 和 miR-195 通过促进细胞凋亡的功能影响股骨头坏死的发生发展。而能正向调控细胞增殖和分化的 miR-10a、miR-10b 反而在股骨头坏死患者的血清中表达降低,这也可能是股骨头坏死发生发展的一个原因。同时,在股骨头坏死患者血清中低表达的 miR-140 可直接靶向调控 SMAD 家族成员 3 (SMAD family member 3, SMAD3),抑制成骨细胞分化引起股骨头坏死。

Li Z 等^[23]通过比较因系统性红斑狼疮而长期服用激素导致股骨头坏死患者的血清和系统性红斑狼疮患者的血清及正常人血清,发现 11 个异常表达的 miRNA (2 个 miRNA 表达上调,9 个 miRNA 表达下调)。笔者认为 miR-4440、miR-6787-5p、miR-6717-5p、miR-500a-3p、miR-130a-3p、miR-3663-3p 和 miR-222-3p 在股骨头坏死的发生中起关键作用。

Wei B 和 Wei W^[24]通过 30 例非创伤性股骨头坏死患者和 30 例正常患者的血清进行比较,发现 12 个异常表达的 miRNA (9 个 miRNA 表达上调,3 个 miRNA 表达下调),并预测了 miR-423-5p 可能是股骨头坏死的潜在诊断标志物。

1.3 miRNA 在非创伤性股骨头坏死模型鼠间充质干细胞中的表达

Wang B 等^[25]通过对比 3 只激素诱导股骨头坏死鼠模型 (小鼠皮下注射 21 mg/kg 甲泼尼龙 4 周) 和 3 只正常小鼠的骨髓间充质干细胞,发现 23 个异常表达的 miRNA (7 个 miRNA 表达上调,16 个 miRNA 表达下调)。生物信息学分析发现有 7 个异常表达的 miRNA 与成骨分化有关,其中 2 个上调 (miR-21-3p 和 miR-652-5p),5 个下调 (miR-206-3p、miR-196a-5p、miR-34b-3p、miR-34c-5p、miR-148a-3p)。

Gu C 等^[26]通过对比 3 只激素诱导的股骨头坏死鼠模型 (给予地塞米松磷酸钠肌注 10 mg/kg, 共 3 次,间隔 24 h) 和 3 只正常小鼠的骨髓间充质干细胞,发现 37 个异常表达的 miRNA (9 个 miRNA 表达上调,28 个 miRNA 表达下调)。miR-27a 在股骨头坏死组中表达下调,而 miR-27a 的下调可促进间充质干细胞的成脂分化,抑制成骨分化,因此 miR-27a 可能是类固醇诱导的股骨头坏死病理改变中脂肪累积的关键调控因子和潜在治疗靶点。

Yue J 等^[27]通过对比激素诱导股骨头坏死模型鼠 (脂多糖腹腔内注射 20 μg/kg 24 h 后,肌肉注射 3 次 40 mg/kg 甲泼尼龙,每次间隔 24 h) 和 3 只正常组小鼠的骨微血管内皮细胞,发现 4 个异常表达的 miRNA (2 个 miRNA 表达上调,2 个 miRNA 表达下调)。其中表达上调的 miR-335 通过下调一氧化氮合成酶、超氧化物歧化酶 2 (superoxide dismutase 2, SOD2) 和 Ras p21 蛋白活化子 1 (Ras p21 protein activator 1, RASA1) 的表达,抑制血管内皮细胞损伤后修复的增殖能力,促进股骨头坏死的发展。另一方面,在股骨头坏死组的血管内皮细胞中上调的 miR-132 会增加血管内皮细胞的成管和

增殖能力,这可能与股骨头坏死发生后的修复反应有关。

1.4 miRNA 在非创伤性股骨头坏死患者骨髓间充质干细胞中的表达

Bian Y 等^[28]从 3 例正常患者中提取骨髓间充质干细胞,通过成骨诱导培养液进行培养,然后分别加入 10^{-7} mol/L 和 10^{-9} mol/L 的地塞米松。 10^{-7} mol/L 的地塞米松可诱导骨髓间充质干细胞的成骨分化和细胞增殖。在 10^{-7} mol/L 的地塞米松诱导组发现了 17 个异常表达的 miRNA (11 个 miRNA 表达上调,6 个 miRNA 表达下调),这些差异基因参与细胞增殖、细胞凋亡、间充质干细胞成骨分化、脂质代谢等过程的调控。

Hao C 等^[29]通过提取非创伤性股骨头坏死患者和股骨颈骨折患者的骨髓间充质干细胞进行测序,发现 16 个异常表达的 miRNA (4 个 miRNA 表达上调,12 个 miRNA 表达下调)。后期实验中进一步发现股骨头坏死患者和经糖皮质激素处理的骨髓间充质干细胞中都出现了 miR-708 上调,miR-708 通过调节下游靶基因 SMAD3 来调控间充质干细胞的成骨分化和成脂分化。

2 在多个结果中出现的共同 miRNA

通过对既往研究结果的统计(表 1),本研究发现有多个 miRNA 在不同的研究中重复出现,且异常表达趋势一致(图 1、表 2)。这些在多个组织中都异常表达的 miRNA 可能在股骨头坏死中起更关键的作用。下面将重点讨论这些不同组织中重复出现的异常表达 miRNA。

2.1 血清中重复出现的差异表达 miRNA

有趣的是,Wei B^[24]和 Wang X 等^[22]都发现 miR-195-5p、miR-423-5p、miR-21-5p、miR-28-5p、miR-484、miR-596、miR-130a-3p 在非创伤性股骨头坏死患者的血清中表达上调,miR-10a-5p、miR-99a-5p 在非创伤性股骨头坏死患者的血清中表达下调。

有研究认为,miR-10a-5p、miR-99a-5p 和 miR-21-5p 是血清中激素敏感型 miRNA,在受到激素刺激时表达水平会发生较大改变^[30]。在滑膜细胞中的 miR-10a-5p 下调通过靶向作用 T-Box 转录因子 5(T-box transcription factor 5, TBX5)使其表达上调引起 Toll 样受体 3(Toll like receptor 3, TLR3)和基质金属蛋白酶 13(matrix metalloproteinase 13, MMP13)及多种炎症因子的产生进而增加炎症反应^[31]。

Xu H 等^[32]发现,在骨髓间充质干细胞中 miR-99a-5p 的表达下调会抑制骨髓间充质干细胞的成骨分化。而在血管内皮细胞中 miR-99 通过抑制 mTOR/NF- κ B 信号减轻了内皮细胞炎症^[33]。此外,在主动脉平滑肌细胞中 miR-99a-5p 上调通过靶向作用同源盒 A1(homeobox A1, HOXA1)抑制动脉粥样硬化^[34]。由此可见,非创伤性股骨头坏死患者血液中 miR-99a-5p 的表达下调可能通过影响骨髓间充质干细胞的成骨分化及内皮细胞的损伤在股骨头坏死的发生发展中起作用。

miR-21-5p 在微血管内皮细胞中的表达上调可通过调节炎症因子的表达和 NF- κ B 信号通路来抑制炎症,同时也可以作用于凋亡相关基因的表达抑制内皮细胞的凋亡^[35]。

在小胶质细胞中,miR-21-5p 的表达上调可通过靶向作用硫氧还蛋白互作蛋白(thioredoxin interacting protein, TXNIP)抑制局部缺血引起的炎症小体激活,起到保护作用^[36]。此外,在人视网膜微血管内皮细胞中抑制 miR-21-5p 可减少高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞增殖、迁移及血管形成^[37]。在非创伤性股骨头坏死患者血清中,上调的 miR-21-5p 可能通过抑制炎症和内皮细胞凋亡起到对微血管的保护作用,减缓疾病的发展。

Li P 等^[38]通过对比股骨头坏死塌陷区和非塌陷区发现 miR-195-5p 存在显著差异,由此推断股骨头的塌陷可能与 miR-195-5p 的表达有关。在人牙周膜细胞中,上调的 miR-195-5p 通过直接作用成纤维细胞生长因子 2(fibroblast growth factor 2, FGF2)和骨形态发生蛋白受体 1a(bone morphogenetic protein receptor type 1A, BMPRI1A)抑制细胞成骨分化^[39]。而在人脐静脉内皮细胞中,表达上调的 miR-195-5p 通过靶向作用 Bcl-2 抑制内皮细胞活性,促进细胞凋亡,而内皮细胞的损伤往往是股骨头坏死血供中断的重要因素之一。

其他有关 miRNA 的研究报道包括:miR-423-5p 下调可以靶向作用 MYBL2,抑制缺血缺氧引起的心肌细胞损伤^[40];miR-484 通过抑制心肌细胞凋亡过程中 caspase-3 和 caspase-9 的表达来保护心肌细胞免受缺血再灌注损伤^[41];miR-28-5p 表达上调可以调控信号转导与转录激活因子 1(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)表达,诱导人骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化^[42];miR-130a-3p 在软骨细胞中的表达下调会引起转录因子 4(transcription factor 4, TCF4)的表达升高,从而促进细胞凋亡,激活炎症反应和细胞外基质降解^[43]。这些 miRNA 与缺氧缺血、再灌注损伤及骨髓间充质干细胞成骨有关,但在股骨头坏死的发生发展中起什么作用还需进一步研究。

2.2 骨组织中重复出现的差异表达 miRNA

Wu X 等^[8]发现在非创伤性股骨头坏死患者骨组织中 miR-3064-5p 表达上调,miR-629-3p 表达下调;而 Yuan H 等^[15]在非创伤性股骨头坏死患者骨组织修复区也发现了相同的结果。此外,Yuan H 等^[15]发现的 miR-1273e 表达上调结果与 Wang X 等^[22]在非创伤性股骨头坏死患者血清中的发现一致。

在胃癌细胞中,miR-3064-5p 表达上调可靶向作用 VI 型胶原 α 3 链(collagen type VI alpha 3 chain, COL6A3),抑制其表达,促进细胞增殖和迁移^[44];而在乳腺癌细胞中,miR-3064-5p 也是一个靶向作用于关键糖酵解蛋白的 miRNA^[45]。可见 miR-3064-5p 在细胞的能量供给和增殖调控中都起着重要作用,但在骨组织中所起到的作用仍需进一步研究。

miR-629-3p 可直接靶向作用于白血病抑制因子受体(leukemia inhibitory factor receptor, LIFR)^[46]。LIFR 可以促进骨髓间充质干细胞的成脂分化,而骨髓间充质干细胞的成脂分化被激活也是股骨头坏死病理变化的重要表现之一。这提示 miR-629-3p 的表达下调靶向作用于 LIFR,使其表达升高促进骨髓间充质干细胞的成脂分化,加速股骨头坏死的病理进程。

2.3 骨髓间充质干细胞中重复出现的差异表达 miRNA

骨髓间充质干细胞的成骨和成脂分化在激素性股骨头坏死的发病机制中起重要作用。Gu C 等^[26]发现 miR-140 在

表 1 异常表达的 miRNA 统计

研究方法	研究对象	上调 miRNA	下调 miRNA	参考文献
Microarray RT-PCR	股骨头坏死 患者骨组织	上调 miRNA 22 个(miR-320e、miR-4786-5p、 miR-4681、miR-H4-5p、miR-4761-3p、miR-4491、 miR-K12-3-3p、miR-BART1-3p、miR-3064-5p、 miR-551a、miR-4451、miR-27a-3p、let-7c、miR- 4503、miR-890、miR-4317、miR-210-3p、miR- 4497、miR-204-3p、miR-5684、miR-H20、 miR-3654)	下调 miRNA 17 个(miR-182-5p、miR-4655-3p、 miR-615-5p、miR-3129-5p、miR-324-5p、 miR-767-3p、miR-151a-5p、miR-629-3p、 let-7i-3p、miR-4642、miR-133a-3p、 miR-146b-5p、miR-339-5p、miR-331-3p、 miR-335-5p、let-7i、miR-126-3p)	[8]
Microarray RT-PCR	股骨头坏死 患者骨组织 修复区	上调 miRNA 12 个(miR-34a-3p、miR-146a-5p、 miR-187-3p、miR-181a-3p、miR-650、miR-3652、 miR-181c-3p、miR-1273e、miR-3064-5p、 miR-4444、miR-30c-1-3p、miR-99a-3p)	下调 miRNA 5 个 (miR-212-3p、miR-132-3p、miR-212-5p、 miR-629-3p、miR-6836-5p)	[15]
Microarray RT-PCR	股骨头坏死 患者血清	上调 miRNA 33 个 (miR-103b、miR-138-1、miR-140、miR-143、 miR-148a、miR-188、miR-18、miR-18a、miR-192、 miR-195、miR-19a、miR-19b、miR-21、miR-2115、 miR-24-2、miR-29b-1、miR-301a、miR-30e、 miR-3136、miR-3201、miR-335、miR-340、 miR-3911、miR-4461、miR-4538、miR-4539、 miR-454、miR-4736、miR-601、miR-628、 miR-660、miR-7-1、miR-708)	下调 miRNA 17 个(miR-1246、miR-1273d、 miR-1273f、miR-1290、miR-1972-1、miR-3175、 miR-3609、miR-3613、miR-3622a、miR-4443、 miR-4484、miR-4485、miR-4492、miR-4505、 miR-4508、miR-665、miR-933)	[18]
Microarray RT-PCR	股骨头坏死 患者血清	上调 miRNA 15 个(miR-21-5p、miR-423-5p、 miR-130a-3p、miR-103b-3p、miR-3960、miR-195- 5p、miR-1304-3p、miR-15b-3p、miR-374-3p、miR- 28-5p、miR-5585-3p、miR-4792、miR-103a-2、 miR-1273e、miR-596)	下调 miRNA 12 个 (miR-484、miR-100-5p、miR-99a-5p、 miR-342-3p、miR-532-5p、miR-140-3p、 miR-10a-5p、miR-10b-5p、miR-197-3p、 miR-101-3p、miR-181c-5p、miR-433)	[22]
Microarray RT-PCR	股骨头坏死 患者血清	上调 miRNA 2 个 (miR-4440、miR-6813-5p)	下调 miRNA 9 个(miR-6787-5p、miR-606、miR- 22-3p、miR-6717-5p、miR-500a-3p、miR-130a- 3p、miR-3663-3p、miR-222-3p、miR-324-3p)	[23]
Microarray RT-PCR	股骨头坏死 患者血清	上调 miRNA 9 个(miR-378、miR-147、miR-130a- 3p、miR-28-5p、miR-596、miR-423-5p、miR-195- 5p、miR-21-5p、miR-145)	下调 miRNA 3 个(miR-484、miR-99a-5p、 miR-10a-5p)	[24]
Microarray RT-PCR	激素诱导大鼠 模型间充质干 细胞测序	上调 miRNA 7 个(miR-500-3p、miR-21-3p、 miR-342-5p、miR-92b-5p、miR-720、 miR-652-5p、miR-5112)	下调 miRNA 16 个(miR-206-3p、miR-30a-3p、 miR-127-3p、miR-34b-3p、miR-345-5p、miR-615- 3p、miR-345-3p、miR-1906、miR-196a-5p、miR-665- 3p、miR-669p-3p、miR-3096-3p、miR-382-5p、 miR-467a-5p、miR-34c-5p、miR-148a-3p)	[25]
Microarray RT-PCR	激素诱导大鼠 模型间充质干 细胞测序	上调 miRNA 9 个(miR-140、miR-10b、 miR-451、miR-127、miR-136、miR-182、 miR-486、miR-144、miR-379)	下调 miRNA 28 个(miR-205、miR-1247、miR-34a、 miR-221、miR-130b、miR-23b、miR-214、miR- 203a、miR-497、miR-27b、let-7a-1、miR-181b-1、 miR-450a、miR-27a、miR-133a、miR-24-1、miR- 23a、miR-98、miR-19b-1、miR-195、miR-20a、 miR-30b、miR-17-1、miR-301a、let-7e、miR-150、 miR-21、miR-22)	[26]
Microarray RT-PCR	激素诱导大鼠 模型骨微血管 内皮细胞	上调 miRNA 2 个 (miR-132-3p、miR-335)	下调 miRNA 2 个 (miR-466b-2-3p、let-7c-1-3p)	[27]
Microarray RT-PCR	正常人的骨髓 间充质干细胞, 分别用 10^{-7} 与 10^{-9} mol/L 的 地塞米松进行诱 导后测序	上调 miRNA 11 个(miR-4289、miR-378g、 miR-378f、miR-378d、miR-196b-5p、 miR-196a-5p、miR-16-5p、miR-1268b、 miR-1268a、miR-107、miR-103a-3p)	下调 miRNA 6 个(miR-4634、miR-4448、 miR-378i、miR-378h、miR-378a-3p、 miR-24-3p)	[28]
Microarray RT-PCR	正常人的骨髓 间充质干细胞 和坏死患者的 骨髓间充质干 细胞对比	上调 miRNA 4 个 (miR-483-5p、miR-3180-3p、miR-708、miR-30a)	下调 miRNA 12 个(miR-4304、miR-4443、 miR-4487、miR-3197、miR-25、miR-20b、 miR-1972、miR-106b、miR-92a-1、miR-486-3p、 miR-4486、miR-4286)	[29]

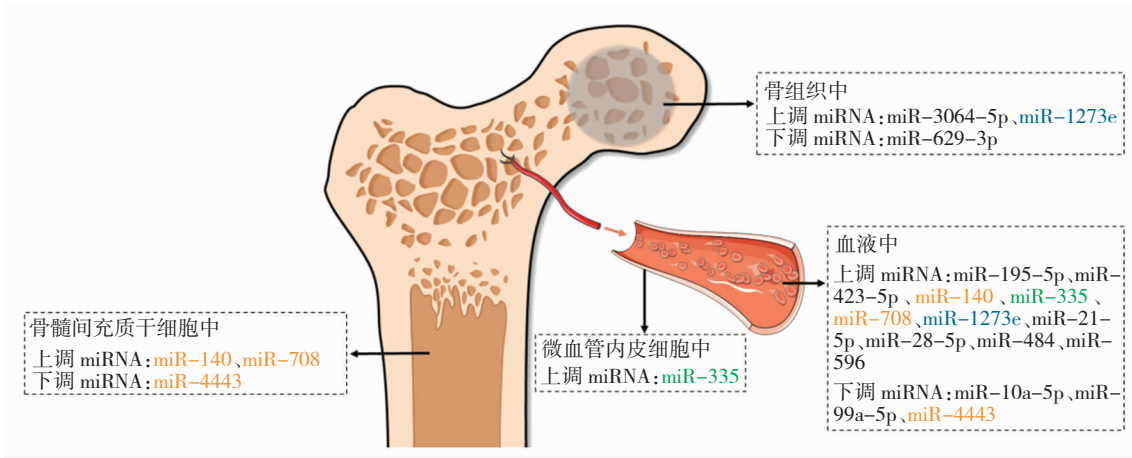


图 1 不同研究中相同的差异表达 miRNA

表 2 不同研究中重复出现的 miRNA

研究对象	差异 miRNA 趋势	差异 miRNA	参考文献 1	参考文献 2
股骨头坏死患者血清	一致上调 miRNA	miR-195-5p	[22]	[24]
		miR-423-5p	[22]	[24]
		miR-21-5p	[22]	[24]
		miR-28-5p	[22]	[24]
		miR-484	[22]	[24]
		miR-596	[22]	[24]
	一致下调 miRNA	miR-10a-5p	[22]	[24]
股骨头坏死患者骨组织	一致上调 miRNA	miR-3064-5p	[8]	[15]
		miR-629-3p	[8]	[15]
股骨头坏死患者骨组织 + 股骨头坏死患者血清	一致上调 miRNA	miR-1273e	[15]	[22]
股骨头坏死患者血清 + 激素诱导大鼠模型间充质干细胞	一致上调 miRNA	miR-140	[18]	[26]
股骨头坏死患者血清 + 激素诱导大鼠模型骨微血管内皮细胞	一致上调 miRNA	miR-335	[18]	[27]
股骨头坏死患者血清和 + 坏死患者的骨髓间充质干细胞	一致下调 miRNA	miR-4443	[18]	[29]
	一致上调 miRNA	miR-708	[18]	[29]

激素型股骨头坏死的大鼠模型中表达上调,这与 Kao GS 等^[18]在非创伤性股骨头坏死患者血清中发现的一致。此外,Hao C 等^[29]通过比较激素型股骨头患者和正常人的骨髓间充质干细胞,发现 miR-443 在股骨头坏死患者中表达下调,miR-708 的表达上调,这与 Kao GS 等^[18]在非创伤性股骨头坏死患者血清中的发现一致。

miR-140 上调可靶向作用 BMP-2,使其表达上调,促进成骨细胞分化^[47]。miR-708 可直接作用于 SMAD3,抑制骨髓间充质干细胞的成骨分化。而间充质干细胞的成骨分化抑制和成骨细胞的凋亡也在股骨头坏死的发生发展中扮演重要角色。

2.4 骨微血管内皮细胞中重复出现的差异表达 miRNA

Yue J 等^[27]在激素型股骨头坏死大鼠模型的内皮细胞中发现 miR-335 表达升高,这与 Kao GS 等^[18]在非创伤性股骨头坏死患者血清中的发现一致。miR-335 与多种病理生理过程有关,包括肿瘤发生、脂质代谢等。在心肌细胞中上调的

miR-335 增强了缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 subunit alpha, HIF-1 α)的转录活性,改善细胞的缺氧损伤^[48],但 miR-335 表达的改变对微血管内皮细胞的影响还需进一步研究。

3 小结与展望

综上所述,非创伤性股骨头坏死患者体内存在诸多异常表达的 miRNA,且在不同的组织中存在相同表达趋势的 miRNA。这些表达异常的 miRNA 与骨髓间充质干细胞成骨分化抑制、成脂分化增强、内皮细胞损伤、炎症及细胞的增殖和迁移相关(图 2)。但到目前为止,研究者对这些 miRNA 是如何参与到股骨头坏死的发生发展过程中的认识还比较片面。随着分子生物学研究的进一步发展,miRNA 转录后调控及 miRNA 的功能会更加明确,使得利用 miRNA 对股骨头坏死这一复杂疾病进行早期诊断及治疗变得可能。

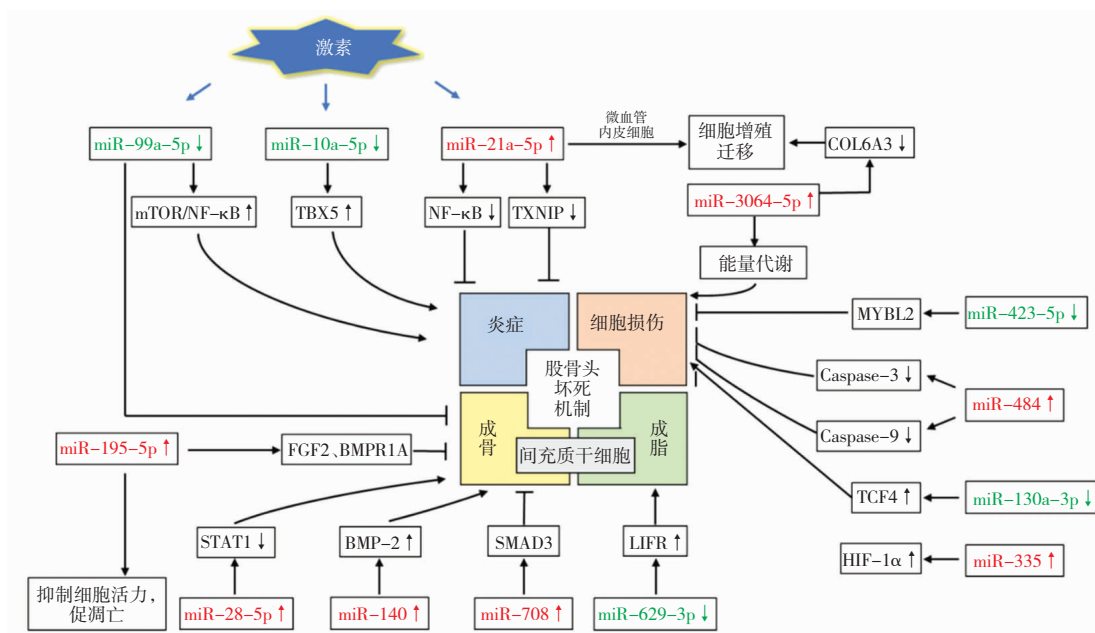


图2 多研究提示的差异表达 miRNA 在非创伤性股骨头坏死中的可能机制作用

目前仍存在许多问题:异常表达的 miRNA 是股骨头坏死的原因还是结果;目前的研究仍停留在 miRNA 对单一基因转录的调控层面上,针对一个 miRNA 下游的多基因转录调控研究甚少。正因为这些原因限制了 miRNA 在临床诊断治疗的应用。miRNA 可以帮助我们更好地解析非创伤性股骨头坏死的发病机制,期待通过对 miRNA 的进一步研究找到非创伤性股骨头坏死的早期诊断生物标志物,以及为其治疗提供新的药物靶点与理论依据。

参考文献

- [1] Larson E, Jones LC, Goodman SB, et al. Early-stage osteonecrosis of the femoral head: where are we and where are we going in year 2018? [J]. *Int Orthop*, 2018, 42(7): 1723-1728.
- [2] Philippe H, Matthieu T, François R, et al. Stem cell therapy for the treatment of hip osteonecrosis: a 30-year review of progress [J]. *Clin Orthop Surg*, 2016, 8(1): 1-8.
- [3] Yang S, Halim AY, Werner BC, et al. Does osteonecrosis of the femoral head increase surgical and medical complication rates after total hip arthroplasty? A comprehensive analysis in the United States [J]. *Hip Int*, 2015, 25(3): 237-244.
- [4] Tsai SW, Wu PK, Chen CF, et al. Etiologies and outcome of osteonecrosis of the femoral head: etiology and outcome study in a Taiwan population [J]. *J Chi Med Assoc*, 2016, 79(1): 39-45.
- [5] Gao Y, Xue Q, Wang D, et al. miR-873 induces lung adenocarcinoma cell proliferation and migration by targeting SRCIN1 [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 7(11): 2519-2526.
- [6] Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 141(4): 1202-1207.
- [7] Liu F, Wang X, Li J, et al. miR-34c-3p functions as a tumour suppressor by inhibiting eIF4E expression in non-small cell lung cancer [J]. *Cell Prolif*, 2015, 48(5): 582-592.
- [8] Wu X, Zhang Y, Guo X, et al. Identification of differentially expressed microRNAs involved in non-traumatic osteonecrosis through microRNA expression profiling [J]. *Gene*, 2015, 565(1): 22-29.
- [9] Jia ZF, Cao DH, Wu YH, et al. Lethal-7-related polymorphisms are associated with susceptibility to and prognosis of gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(8): 1012-1023.
- [10] Mutijima E, De Maertelaer V, Deprez M, et al. The apoptosis of osteoblasts and osteocytes in femoral head osteonecrosis: its specificity and its distribution [J]. *Clin Rheumatol*, 2014, 33(12): 1791-1795.
- [11] Chen XM, Splinter PL, O'Hara SP, et al. A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against cryptosporidium parvum, infection [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(39): 28929-28938.
- [12] Tian L, Wen Q, Dang X, et al. Immune response associated with Toll-like receptor 4 signaling pathway leads to steroid-induced femoral head osteonecrosis [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2014, 15: 18.
- [13] 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(15): 2640-2648.
- [14] Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(5): 1202-1209.
- [15] Yuan H, Von Roemeling C, Gao H, et al. Analysis of altered microRNA expression profile in the reparative interface of the femoral head with osteonecrosis [J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 98(2): 158-163.
- [16] Nakasa T, Shibuya H, Nagata Y, et al. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(6): 1582-1590.
- [17] Kumar B, Yadav A, Lang J, et al. Dysregulation of microRNA-34a expression in head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor growth and tumor angiogenesis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37601.

- [18] Kao GS, Tu YK, Sung PH, et al. MicroRNA-mediated interacting circuits predict hypoxia and inhibited osteogenesis of stem cells, and dysregulated angiogenesis are involved in osteonecrosis of the femoral head[J]. *Int Orthop*, 2018, 42(7): 1605–1614.
- [19] Fiedler J, Stöhr A, Gupta SK, et al. Functional microRNA library screening identifies the hypoxamir miR-24 as a potent regulator of smooth muscle cell proliferation and vascularization[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(8): 1167–1176.
- [20] Gao YH, Qian JY, Chen ZW, et al. Suppression of Bim by microRNA-19a may protect cardiomyocytes against hypoxia-induced cell death via autophagy activation[J]. *Toxicol Lett*, 2016, 257: 72–83.
- [21] Qu B, Xia X, Wu HH, et al. PDGF-regulated miRNA-138 inhibits the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Biochem Biophysical Res Commun*, 2014, 448(3): 241–247.
- [22] Wang X, Qian W, Wu Z, et al. Preliminary screening of differentially expressed circulating microRNAs in patients with steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(6): 3118–3124.
- [23] Li Z, Jiang C, Li X, et al. Circulating microRNA signature of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Cell Prolif*, 2018, 51(1): e12418.
- [24] Wei B, Wei W. Identification of aberrantly expressed of serum microRNAs in patients with hormone-induced non-traumatic osteonecrosis of the femoral head[J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 75: 191–195.
- [25] Wang B, Yu P, Li T, et al. MicroRNA expression in bone marrow mesenchymal stem cells from mice with steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 7447–7454.
- [26] Gu C, Xu Y, Zhang S, et al. miR-27a attenuates adipogenesis and promotes osteogenesis in steroid-induced rat BMSCs by targeting PPAR γ and GREM1[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38491.
- [27] Yue J, Wan F, Zhang Q, et al. Effect of glucocorticoids on miRNA expression spectrum of rat femoral head microcirculation endothelial cells[J]. *Gene*, 2018, 651: 126–133.
- [28] Bian Y, Qian W, Li H, et al. Pathogenesis of glucocorticoid-induced avascular necrosis: a microarray analysis of gene expression *in vitro*[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(3): 678–684.
- [29] Hao C, Yang S, Xu W, et al. MiR-708 promotes steroid-induced osteonecrosis of femoral head, suppresses osteogenic differentiation by targeting SMAD3[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22599.
- [30] Li Z, Jiang C, Ye C, et al. miR-10a-5p, miR-99a-5p and miR-21-5p are steroid-responsive circulating microRNAs[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(5): 1490–1497.
- [31] Hussain N, Zhu W, Jiang C, et al. Down-regulation of miR-10a-5p in synoviocytes contributes to TBX5-controlled joint inflammation[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 22(1): 241–250.
- [32] Xu H, Wang J, Ye X, et al. Effect of miR-99a-5p on the differential ability of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2018, 26(2): 563–568.
- [33] Bao MH, Li JM, Luo HQ, et al. NF- κ B-regulated miR-99a modulates endothelial cell inflammation[J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 5308170.
- [34] Han Z, Guan Y, Liu B, et al. MicroRNA-99a-5p alleviates atherosclerosis via regulating Homeobox A1[J]. *Life Sci*, 2019, 232: 116664.
- [35] Ge X, Huang S, Gao H, et al. miR-21-5p alleviates leakage of injured brain microvascular endothelial barrier *in vitro* through suppressing inflammation and apoptosis[J]. *Brain Res*, 2016, 1650: 31–40.
- [36] Zhang HS, Liu MF, Ji XY, et al. Gastrodin combined with rhynchophylline inhibits cerebral ischaemia-induced inflammasome activation via upregulating miR-21-5p and miR-331-5p[J]. *Life Sci*, 2019, 239: 116935.
- [37] Qiu F, Tong H, Wang Y, et al. Inhibition of miR-21-5p suppresses high glucose-induced proliferation and angiogenesis of human retinal microvascular endothelial cells by the regulation of AKT and ERK pathways via maspin[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2018, 82(8): 1366–1376.
- [38] Li P, Zhai P, Ye Z, et al. Differential expression of miR-195-5p in collapse of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Onco-target*, 2017, 8(26): 42638–42647.
- [39] Chang M, Lin H, Fu H, et al. MicroRNA-195-5p regulates osteogenic differentiation of periodontal ligament cells under mechanical loading[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(12): 3762–3774.
- [40] Zhu X, Lu X. MiR-423-5p inhibition alleviates cardiomyocyte apoptosis and mitochondrial dysfunction caused by hypoxia/reoxygenation through activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway via targeting MYBL2[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 22034–22043.
- [41] Liu H, Li S, Jiang W, et al. MiR-484 protects rat myocardial cells from ischemia-reperfusion injury by inhibiting caspase-3 and caspase-9 during apoptosis[J]. *Korean Circ J*, 2020, 50(3): e20.
- [42] Demowsek JA, Pereira MC, Fornari TA, et al. Posttranscriptional interaction between miR-450a-5p and miR-28-5p and STAT1 mRNA triggers osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(11): 4045–4062.
- [43] Luo X, Wang J, Wei X, et al. Knockdown of lncRNA MFI2-AS1 inhibits lipopolysaccharide-induced osteoarthritis progression by miR-130a-3p/TCF4[J]. *Life Sci*, 2020, 240: 117019.
- [44] Sun X, Zhang X, Zhai H, et al. A Circular RNA derived from COL6A3 functions as a ceRNA in gastric cancer development[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 515(1): 16–23.
- [45] He Y, Deng F, Zhao S, et al. Analysis of miRNA-mRNA network reveals miR-140-5p as a suppressor of breast cancer glycolysis via targeting GLUT1[J]. *Epigenomics*, 2019, 11(9): 1021–1036.
- [46] Wang J, Song C, Tang H, et al. miR-629-3p may serve as a novel biomarker and potential therapeutic target for lung metastases of triple-negative breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2017, 19(1): 72.
- [47] Yang R, Zhang D, Yu K, et al. Detection of miR-22, miR-140 and bone morphogenetic proteins(BMP)-2 expression levels in synovial fluid of osteoarthritis patients before and after arthroscopic debridement[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 863–868.
- [48] Wu N, Zhang X, Du S, et al. Upregulation of miR-335 ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury via targeting hypoxia inducible factor 1- α subunit inhibitor[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(12): 4082–4094.