

微 RNA 在骨损伤诊断和治疗中的研究进展

杨文涛 关德宏

摘要 微 RNA(miRNA)与骨科疾病的发生密切相关。部分 miRNA 在骨折患者的骨组织和血清中表达失调,miRNA 可通过激活多种信号转导通路对骨再生进行调节。miRNA 在间充质干细胞和血管相关细胞中起着重要调控作用,影响骨折过程中的血管生成和成骨作用。部分 miRNA 与骨质疏松性骨折相关,可能作为骨折风险的评定指标。miRNA 在骨愈合延迟、骨不连和骨缺损的治疗方面也有巨大潜力。该文对 miRNA 在骨损伤诊断和治疗中的研究进展作一综述。

关键词 微 RNA;骨不连;骨缺损;骨修复

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2020.05.007

微 RNA(miRNA)是短链非编码 RNA 分子,长度为 19~25 个核苷酸,广泛存在于生物体内^[1],是一种特殊的生物调节因子。成熟的 miRNA 可与目标信使 RNA 发生碱基互补配对,并诱导目标信使 RNA 降解或抑制其翻译,调控靶基因表达水平^[2-3]。研究证实,miRNA 对细胞的增殖、迁移和分化有重要调节作用,在骨发育和骨再生中也发挥重要调控作用^[4]。

随着人口老龄化日益严重,交通运输业不断发展,骨科疾病发病率逐年攀升,大面积骨缺损、骨不连的发生率也有所上升。目前,自体骨移植依然是治疗骨缺损的首选方法^[5],但存在骨供应量有限,给患者带来额外痛苦等缺点,而 miRNA 的发现则为这些难治性骨折的治疗提供了新思路。本文对 miRNA 在骨损伤诊疗中的研究进展作一综述。

1 miRNA 表达失调与骨损伤

miRNA 与骨密度降低、骨质疏松、骨折等骨科疾病均存在密切联系,骨折发生和愈合过程中涉及各种调节因子,包括 miRNA^[6-7]。

1.1 miRNA 在骨组织中的表达失调

Gautvik 等^[8]进行骨折风险研究,他们选取不同部位共 102 例活体骨样本,通过聚合酶链式反应分析和 miRNA 芯片技术检测相关 miRNA 含量,并进行对比分析,最后确定 28 个 miRNA 的表达水平与骨折相关。他们进一步分析发现,其中 5 个

miRNA(miR-484、miR-328-3p、miR-27a-5p、miR-28-3p 和 miR-409-3p)与骨密度正相关,即这 5 个 miRNA 水平降低会增加骨折发生风险。不过,该研究中研究对象均为绝经后妇女,5 个 miRNA 是否与雌激素相关,其变化是否适用于所有性别和年龄的人群,还需深入研究。

Chen 等^[9]对 30 例骨质疏松性骨折患者的骨折碎片进行研究,同时以 30 例行髋关节置换的骨关节炎患者的股骨颈区骨样本作为正常对照组,发现骨质疏松性骨折患者骨折碎片样本中 miR-135b-5p 表达水平明显高于对照组。进一步的体外细胞实验发现,miR-135-5p 可通过调控骨特异性转录因子(Runx)2 抑制成骨细胞的增殖和分化。该研究直接以骨质疏松性骨折患者的骨折碎片作为研究样本,极具代表性,但对照组与正常人骨骼样本的差异可能对研究结果存在影响,对此还需进一步探究。

以上两项研究中均采用人体骨组织作为样本,这限制了样本采集和 miRNA 的实时监测,但研究结果对骨科疾病的探索仍具有深刻意义。

1.2 miRNA 在血液中的表达失调

相对于骨组织样本,血液样本易采集,且一定意义上可做到 miRNA 实时监测。Mandourah 等^[10]提取正常人、骨质疏松患者、骨质疏松性骨折患者共 139 例志愿者的血液样品,利用 RNA 测序技术对 370 个 miRNA 进行高通量筛选,发现 40 个 miRNA 出现差异性表达,最终确定 miR122-5p 和 miR-4516 表达水平下降与骨质疏松性骨折的发生存在密切联系。

Kocijan 等^[11]对 153 例骨折患者(绝经前女性

基金项目:哈尔滨市科技局基金(2016RAXYJ078)

作者单位:150086, 哈尔滨医科大学附属第二医院骨科五病房

通信作者:关德宏 E-mail: Dehongguan@163.com

46例、绝经后女性52例、男性55例)血液中187个miRNA进行聚合酶链式反应定量分析,发现骨折患者血清中miR-152-3p、miR-30e-5p、miR-140-5p、miR-324-3p、miR-19b-3p、miR-335-5p、miR-19a-3p和miR-550a-3p的水平有明显改变,且与患者的年龄和性别无关。

Feichtinger等^[12]进行骨折风险预测研究。他们提取36例轻度骨折患者的血浆,通过RNA测序、实时聚合酶链式反应定量分析等技术对可能产生影响的19个miRNA进行分析,发现多个miRNA对骨组织微结构有影响,其中miR-29b-3p、miR-324-3p和miR-550a-3p的表达水平降低,且与骨密度降低直接相关。该研究提示,一些miRNA的表达水平在骨折高风险人群(骨质疏松患者)、骨折患者与健康人中出现明显差异,这或可用于评估骨折风险。

以上研究包含了各年龄段和性别的患者,并实现一定程度上的实时监测,但人体血清成分复杂,其变化的影响因素也较多。

2 miRNA调节骨愈合

miRNA在细胞的特定时期表达,并能靶向调节组织细胞的分化、增殖、凋亡和迁移等过程^[13]。骨组织的再生和血管化过程涉及干细胞的增殖、分化和迁移,miRNA参与这些过程中^[14-15]。

2.1 miRNA对骨再生的调节作用

骨的形成和再生主要依赖于间充质干细胞(MSC)向成熟成骨细胞分化^[16],这一基本步骤的实现需激活包括转化生长因子(TGF)- β 、骨形态发生蛋白(BMP)和Wnt等在内的多种信号转导通路,这些信号转导通路均受miRNA调控^[17]。以上信号转导通路的激活常导致下游核蛋白的表达,如Runx2、Osterix蛋白和环腺苷酸依赖性转录因子-4,它们可调控成骨细胞的发育。

Yang等^[18]将经miR-21修饰的骨髓间充质干细胞(BMSC)/ β -磷酸三钙复合材料用于填补动物骨缺损模型。术后6个月显微CT检查发现新骨形成较好,进一步研究发现,miR-21可通过磷酸酶与张力蛋白同源物(PTEN)/磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/低氧诱导因子-1 α 途径促进骨再生,他们认为miR-21在体外可促进BMSC的迁移和成骨分化。Sun等^[19]的动物实验证实,miRNA-21过表达可增加BMSC中骨桥蛋白和碱性磷酸酶(ALP)的表达,从而促进成骨,加速骨折

愈合。

Sun等^[20]研究发现,miR-26a可促进BMSC的骨钙沉积,提高ALP和骨钙素的水平,他们认为miR-26a有促成骨分化的作用。此外,他们将miR-26a用于骨不连的大鼠模型中,X线检查、苏木精-伊红染色和Masson染色实验均表明,miR-26a可明显增强成骨效果。实验还对miR-26a促进骨折愈合的分子机制进行研究,结果显示miR-26a通过Wnt/ β -catenin信号转导通路,靶向抑制含骨硬化蛋白结构域蛋白1的表达,促进MSC的成骨分化,从而促进骨不连的愈合。

Zhang等^[21]在体外成骨细胞培养实验中加入miR-218,采用蛋白质印迹法和细胞计数检测发现,miR-218可促进Runx2表达,从而促进成骨细胞成熟。Shi等^[22]进行了进一步研究,他们将过表达miR-218的BMSC移植至股骨骨折小鼠模型中,通过X线和显微CT检查,机械测试,组织染色检测发现,miR-218可加速骨折愈合。

Ge等^[23]研究发现,在骨折早期小鼠体内miR-374b的表达水平明显增高。随后的体外细胞实验发现,给予miR-374b,MSC中的ALP活性增加,成骨相关基因和蛋白的表达也明显增加,而利用抗miR-374b敲低miR-374b表达则出现相反结果。进一步研究发现,miR-374b可通过降解PTEN促进MSC的成骨分化,从而促进骨折愈合。

综上所述,miRNA在骨折愈合过程中发挥重要调控作用,通过调节部分miRNA的表达可促进成骨作用,最终达到改善骨折愈合的效果。miRNA在骨折延迟愈合、骨不连和骨缺损的治疗中具有潜在的应用价值。

2.2 miRNA对血管生成的调节作用

骨折通常伴有微血管破坏,形成局部低氧环境,这会刺激血管再生相关因子分泌,从而促进血管系统重建^[24]。骨折后,新生血管可为局部组织提供营养,还可运输骨折修复所需的调控因子^[25],miRNA便是其中之一。血管生成常与成骨作用一起促进骨折愈合^[14]。

一项体外细胞研究发现,含锂的生物陶瓷材料(Li-BGC)可直接促进人脐静脉内皮细胞的成血管能力^[26]。随后的动物研究发现,Li-BGC也可促进新生血管向骨内生长。进一步研究证实,Li-BGC能促进BMSC生成含miR-130a的外泌体,外泌体中的miR-130a作用于人脐静脉内皮细胞,使Akt和

核因子- κ B(NF- κ B)通路激活,PTEN 蛋白表达下调,从而促进人脐静脉内皮细胞的增殖和迁移,最终促血管生成。该过程中,miRNA 参与 BMSC 与血管内皮细胞之间的信号传导和反馈调节,同时具有促血管生成和促骨再生的作用。

Yan 等^[27]将 MSC 层整合到钛合金上,形成 MSC 片-植入物复合物(MSIC),用于研究抗 miR-138 对复合体的影响。他们发现,抗 miR-138 具有促血管生成和骨钙沉积的作用。在小鼠皮下植入 MSIC 进行进一步研究发现,与加入 miR-138 和生理盐水相比,加入抗 miR-138 的 MSIC 可形成更为坚固的血管化骨组织,他们认为抗 miR-138 具有促血管生成和促进骨再生的作用。

Wang 等^[28]进行成骨细胞和 H-型内皮细胞共培养实验,应用 miRNA 测序技术分析证实 miR-143 在血管生成以及成骨过程中具有重要作用。随后的临床实验发现,老年骨折患者血清中 miR-143 的表达水平低于年轻患者。动物实验发现,miR-143 敲除小鼠中 H-型血管生成和成骨细胞分化受到明显抑制,其给予基因敲除小鼠蛋白脱乙酰酶(HDAC)7 可改善血管生成和骨再生,推测 miR-143 靶向作用于 HDAC7 以促进成血管细胞和成骨细胞的分化。

以上研究表明,miRNA 在 MSC 和血管相关细胞中起着重要调控作用,可影响骨折过程中的血管生成和成骨作用。骨愈合过程中 BMSC 和血管相关细胞常相互联系^[29],其联系机制也值得深入研究。

3 miRNA 对骨愈合的潜在诊疗价值

miRNA 与骨折及骨愈合有着密切联系,血循环中的部分 miRNA 也会随着骨折的发生和发展出现变化。部分与骨质疏松性骨折相关的 miRNA 或可作为预测骨折风险的评估指标^[30]。虽然骨愈合延迟及骨不连与患者的年龄以及骨折部位有关,但尚缺少客观的预测指标,骨折患者血液或骨折碎片中的 miRNA 水平或可作为参考,这有利于对高风险人群提前制定更为合理且有效的诊疗决策。

miRNA 除可应用于疾病诊断中,在骨愈合延迟、骨不连和骨缺损的治疗方面也有巨大应用潜力^[7]。动物实验发现,miRNA 单独应用或与干细胞、生物材料联合应用,均能发挥良好的促骨愈合作用,但考虑到应用安全性,对 miRNA 相关的辅助治疗以及临床应用仍需开展进一步的研究和评估。

4 结语

随着生物技术的不断发展,学者们开始注意到 miRNA 的潜在诊疗价值。涉及 miRNA 治疗的专利逐年增加,开展相关研究的生物制药公司不断增多。目前,大多数 miRNA 相关药物仍处于 I 期临床试验阶段。尽管 miRNA 在骨科领域应用的研究远落后于心血管疾病、癌症以及慢性伤口愈合等领域^[31-32],但随着研究的进一步开展,miRNA 可能在骨相关疾病的诊断与治疗中得到更多应用。

参考文献

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.
- [2] Vimalraj S, Miranda PJ, Ramyakrishna B, et al. Regulation of breast cancer and bone metastasis by microRNAs[J]. Dis Markers. 2013, 35(5): 369-387.
- [3] Vimalraj S, Selvamurugan N. MicroRNAs expression and their regulatory networks during mesenchymal stem cells differentiation toward osteoblasts[J]. Int J Biol Macromol, 2014, 66: 194-202.
- [4] Mens MMJ, Ghanbari M. Cell cycle regulation of stem cells by microRNAs[J]. Stem Cell Rev Rep, 2018, 14(3): 309-322.
- [5] Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, et al. Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects[J]. J Bone Joint Surg Am, 2005, 87(6): 1367-1378.
- [6] Hadjiargyrou M, O'Keefe RJ. The convergence of fracture repair and stem cells: interplay of genes, aging, environmental factors and disease[J]. J Bone Miner Res, 2014, 29(11): 2307-2322.
- [7] Nugent M. MicroRNAs and fracture healing [J]. Calcif Tissue Int, 2017, 101(4): 355-361.
- [8] Gautvik KM, Günther CC, Prijatelj V, et al. Distinct subsets of noncoding RNAs are strongly associated with BMD and fracture, studied in weight-bearing and non-weight-bearing human bone[J]. J Bone Miner Res, 2020, 35(6): 1065-1076.
- [9] Chen B, Yang W, Zhao H, et al. Abnormal expression of miR-135b-5p in bone tissue of patients with osteoporosis and its role and mechanism in osteoporosis progression[J]. Exp Ther Med, 2020, 19(2): 1042-1050.
- [10] Mandourah AY, Ranganath L, Barraclough R, et al. Circulating microRNAs as potential diagnostic biomarkers for osteoporosis[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 8421.
- [11] Kocijan R, Muschitz C, Geiger E, et al. Circulating microRNA signatures in patients with idiopathic and postmenopausal osteoporosis and fragility fractures[J]. J Clin

- Endocrinol Metab, 2016, 101(11): 4125-4134.
- [12] Feichtinger X, Muschitz C, Heimel P, et al. Bone-related circulating microRNAs miR-29b-3p, miR-550a-3p, and miR-324-3p and their association to bone microstructure and histomorphometry[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 4867.
- [13] Wong SA, Rivera KO, Miclau TR 3rd, et al. Microenvironmental regulation of chondrocyte plasticity in endochondral repair: a new frontier for developmental engineering[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2018, 6: 58.
- [14] Stegen S, van Gastel N, Carmeliet G. Bringing new life to damaged bone; the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration[J]. Bone, 2015, 70: 19-27.
- [15] Freitas J, Santos SG, Gonçalves RM, et al. Genetically engineered-MSC therapies for non-unions, delayed unions and critical-size bone defects[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(14): 3430.
- [16] Fang S, Deng Y, Gu P, et al. MicroRNAs regulate bone development and regeneration[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(4): 8227-8253.
- [17] Rahman MS, Akhtar N, Jamil HM, et al. TGF-beta/BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation[J]. Bone Res, 2015, 3: 15005.
- [18] Yang C, Liu X, Zhao K, et al. miRNA-21 promotes osteogenesis via the PTEN/PI3K/Akt/HIF-1alpha pathway and enhances bone regeneration in critical size defects[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 65.
- [19] Sun Y, Xu L, Huang S, et al. mir-21 overexpressing mesenchymal stem cells accelerate fracture healing in a rat closed femur fracture model[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 412327.
- [20] Sun L, Li Z, Xue H, et al. MiR-26a promotes fracture healing of nonunion rats possibly by targeting SOSTDC1 and further activating Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2019, 460(1-2): 165-173.
- [21] Zhang Y, Xie RL, Croce CM, et al. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(24): 9863-9868.
- [22] Shi L, Feng L, Liu Y, et al. MicroRNA-218 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and accelerates bone fracture healing[J]. Calcif Tissue Int, 2018, 103(2): 227-236.
- [23] Ge JB, Lin JT, Hong HY, et al. MiR-374b promotes osteogenic differentiation of MSCs by degrading PTEN and promoting fracture healing[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(11): 3303-3310.
- [24] Wan C, Gilbert SR, Wang Y, et al. Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(2): 686-691.
- [25] Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S. Role of angiogenesis in bone repair[J]. Arch Biochem Biophys, 2014, 561: 109-117.
- [26] Liu L, Liu Y, Feng C, et al. Lithium-containing biomaterials stimulate bone marrow stromal cell-derived exosomal miR-130a secretion to promote angiogenesis[J]. Biomaterials, 2019, 192: 523-536.
- [27] Yan J, Chang B, Hu X, et al. Titanium implant functionalized with anti-miR-138 delivered cell sheet for enhanced peri-implant bone formation and vascularization[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2018, 89: 52-64.
- [28] Wang R, Zhang H, Ding W, et al. miR-143 promotes angiogenesis and osteoblast differentiation by targeting HDAC7[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(3): 179.
- [29] Diomedea F, Marconi GD, Fonticoli L, et al. Functional relationship between osteogenesis and angiogenesis in tissue regeneration[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(9): 3242.
- [30] Bottani M, Banfi G, Lombardi G. Perspectives on miRNAs as epigenetic markers in osteoporosis and bone fracture risk: a step forward in personalized diagnosis[J]. Front Genet, 2019, 10: 1044.
- [31] Mulholland EJ, Dunne N, McCarthy HO. MicroRNA as therapeutic targets for chronic wound healing[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2017, 8: 46-55.
- [32] Beavers KR, Nelson CE, Duvall CL. MiRNA inhibition in tissue engineering and regenerative medicine[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 88: 123-137.

(收稿:2020-05-12)

(本文编辑:李圆圆)