

环状核糖核酸在绝经后骨质疏松症治疗中的调控与诊断作用

袁孟珂¹ 李远峰^{2△} 姜益常² 任树军² 董书含¹

[关键词] 绝经后骨质疏松;环状核糖核酸;雌激素;间充质干细胞;破骨细胞

[中图分类号] R681 [文献标志码] A [文章编号]1005-0205(2023)07-0085-04

DOI:10.20085/j.cnki.issn1005-0205.230717

绝经后骨质疏松症(Postmenopausal Osteoporosis, PMOP)是由于绝经后雌激素水平降低引起的全身性代谢性骨疾病,常造成骨脆性增加,并容易引起骨折等,严重影响患者的生活质量,给社会带来沉重负担^[1-2],然而目前仍然缺乏防治绝经后骨质疏松症的特效药物。最新的研究发现,环状核糖核酸(circular-RNAs, circRNAs)能够通过调节成骨/破骨细胞分化、成熟及细胞间信号传导等生物学过程,参与维持骨形成/骨吸收之间的平衡,并有望成为绝经后骨质疏松症治疗的新靶点^[3-4]。同时,由于环状核糖核酸稳定的环状结构及独特的表达特征,其作为诊断生物标志物的价值也引起了广泛的重视^[5-6]。本研究对环状核糖核酸在绝经后骨质疏松症治疗中的调控作用及诊断价值进行了总结。

1 环状核糖核酸的特点与分子调控机制

环状核糖核酸是一种单链、共价闭合的 RNA 分子,广泛地存在于病毒到哺乳动物等物种,是一种新型的内源性非编码 RNAs^[7],目前认为环状核糖核酸可以通过充当转录调节器、microRNAs (miRNAs)海绵和蛋白质支架等参与基因的表现遗传学、转录和转录后调控,调节重要的生物学过程,此外,部分环状核糖核酸还具有翻译成多肽的功能^[8-10]。研究发现环状核糖核酸在免疫、心血管、神经、运动等多种系统疾病中发挥重要的调节作用^[11-14],并被证实能够通过直接作用于骨调节蛋白分子,或作为竞争性内源 RNA (Competing Endogenous RNA, ceRNA)结合 miRNAs,或参与外泌体信号传导^[15]等分子机制,发

挥与雌激素受体(Estrogen receptor, ERs)相互作用、调节间充质干细胞(Mesenchymal Stem Cells, MSCs)成骨/成脂分化、调节破骨细胞等作用,影响绝经后骨质疏松症发生。

2 环状核糖核酸和雌激素受体相互作用

Circ2: 27713879/27755789/240822115/240867796 能够与雌激素受体相互作用,调节绝经后骨质疏松症。绝经后雌激素水平降低,骨吸收和骨形成之间失衡是绝经后骨质疏松症的主要原因^[16]。一方面,雌激素促进间充质干细胞向成骨细胞分化和成熟,促进骨形成;另一方面,雌激素能够抑制破骨细胞生成并诱导其凋亡,限制骨吸收;雌激素不足时,骨合成代谢和抗破骨作用降低,导致持续的骨破坏^[17]。此外,绝经后妇女雌激素水平降低引起炎症因子白介素(Interleukin, IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子 α (Tumor Necrosis Factor α , TNF- α)等表达升高,进而通过核因子 κ B受体活化因子(Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B, RANK)/核因子 κ B受体活化因子配体(Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand, RANKL)/骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)途径促进破骨细胞增殖和成骨细胞凋亡,引发骨丢失^[18-19]。雌激素主要通过结合雌激素受体发挥作用,经典的雌激素受体包括 ER α 和 ER β ^[20], Li 等^[21]发现 ER β 敲低可能通过调节 circ2: 27713879/27755789/240822115/240867796 抑制成骨相关基因表达, miR-328-5p 则被预测为这些环状核糖核酸的下游,通过调控 PI3K-AKT、MAPK、TGF- β 和 WNT 等通路的关键分子,调节骨形成。槲皮素是黄酮类化合物,能够在 ER α 缺陷条件下促进成骨和脂肪细胞生成,而 ER α 和槲皮素可能通过 circRNA-miR-326-5p-mRNA 轴发挥作用^[22]。

3 环状核糖核酸调节间充质干细胞的分化

环状核糖核酸可以直接或通过海绵吸附 miRNAs 间接调控分化相关因子的表达,调节间充质干细胞成

基金项目:第七批全国老中医药专家学术经验继承项目(国中医药人教函[2022]76号)

黑龙江省自然科学基金项目(LH2020H086)

¹ 黑龙江中医药大学(哈尔滨,150040)

² 黑龙江中医药大学附属第一医院

骨/成脂分化过程。间充质干细胞是一种多能干细胞,具有强大的自我更新和分化能力,在损伤修复和组织生成中起到关键作用,主要来源于骨髓和脂肪组织,称为骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell, BMSCs)和脂肪间充质干细胞(Adipose Mesenchymal Stem Cells, AMSCs),具有成骨/成脂分化的潜能^[23-24]。骨是动态的器官,整个生命周期中,在生理和病理刺激下,经历不断的重塑过程,期间旧骨或受损骨在特定部位被吸收,同时释放生长因子,诱导间充质干细胞的募集与分化^[25-26]。正常情况下成骨/成脂分化由细胞内或胞外信号调节和维持,处于适当的平衡状态,雌激素缺乏和衰老等条件下二者平衡被打破,成脂分化活性增高及成骨分化活性降低,引起绝经后骨质疏松症^[27]。

3.1 环状核糖核酸促进间充质干细胞成骨分化

circ_0048211、circ_0016624、circ_33287、circStag1可以促进间充质干细胞向成骨细胞分化从而抑制绝经后骨质疏松症的发生。骨形态发生蛋白2(Bone Morphogenetic Protein 2, BMP2)/Smad通路是维持软骨形成和骨骼稳态的重要通路,可以在雌激素作用下激活,促进 Runt 相关转录因子2(Runt Related Transcription Factor2, RUNX2)的表达,RUNX2是间充质干细胞向成骨细胞分化时的始动因子,还能促进成骨细胞成熟^[1,28]。Qiao等^[28]发现绝经后骨质疏松症患者骨髓间充质干细胞中 circ_0048211 表达下降,过表达 circ_0048211 通过竞争性内源 RNA 机制与 miR-93-5p 结合促进骨形态发生蛋白2的表达,促进骨形成和骨矿化,缓解绝经后骨质疏松症进展。另一调控轴 circ_0016624/miR-98 也被证明通过竞争性内源 RNA 机制靶向骨形态发生蛋白2,参与绝经后骨质疏松症发生^[29]。RUNX3能够增强骨形态发生蛋白2诱导的成骨关键因子 RUNX2 的表达以及矿化基质水平^[30],circ_33287 被证明可能通过结合 miR-214-3p 促进 RUNX3 的表达,调节间充质干细胞的成骨分化^[31]。WNT/ β -catenin 是通路调节骨骼发育、骨量维持的经典通路,与 BMP2/Smads 共同调节成骨,并在激活到生物学效应的不同阶段相互影响^[32]。Chen等^[33]发现 circStag1 在绝经后骨质疏松症患者和骨髓间充质干细胞中表达降低,并通过靶向作用于人类抗原 R(Human Antigen R, HuR),同时促进其异位到细胞质中,促进低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6和 β -catenin 的表达,激活 WNT 信号通路,促进成骨分化和骨组织再生。

3.2 环状核糖核酸促进间充质干细胞成脂分化

外泌体 hsa_circ_0006859 同时具有抑制间充质干细胞成骨分化、促进成脂分化的功能。外泌体是细胞

分泌的膜包裹的囊泡,可以转移蛋白质、核酸和脂质等,发挥信号传递作用,影响邻近或远处受体细胞的生物学过程,是细胞间重要的通信方式^[34]。骨髓间充质干细胞衍生的外泌体环状核糖核酸对组织修复和再生具有重要的调节作用^[35]。Zhi等^[36]通过血清样品分离外泌体、微阵列检测及定量实时 PCR(qRT-PCR)验证,发现绝经后骨质疏松症患者外泌体中的 hsa_circ_0006859 显著上调,且 hsa_circ_0006859 能够抑制人骨髓间充质干细胞的成骨细胞分化,同时促进脂肪分化。进一步的研究发现 circRNA 分子直接与 miR-431-5p 结合,靶向作用于视紫质重组蛋白(Recombinant Rhodopsin, RHO)关联含卷曲螺旋结合蛋白激酶1(RHO-associated Coiled-coil-forming Kinases, ROCK1)。ROCKs 是 RHO 的效应分子,后者是小 G 蛋白亚家族之一,结合三磷酸鸟苷(Guanosine Triphosphate, GTP)激活并作用于效应蛋白分子,通过磷酸化细胞内靶分子参与细胞生命活动,RHO/ROCKs 通路是细胞分化重要的通路,hsa_circ_0006859 通过海绵吸附 miR-431-5p 激活该通路调控,人骨髓间充质干细胞的成骨与成脂分化^[37-39]。

4 环状核糖核酸调节破骨细胞分化

circHmbox1、circ_28313、circ_0007059 通过调节破骨细胞分化、成熟影响绝经后骨质疏松症的发生。绝经后女性炎症因子 TNF- α 增高,引起破骨细胞生成和骨破坏增加,Liu等^[40]发现 TNF- α 诱导原代骨髓巨噬细胞(Bone Marrow Macrophages, BMMs)向破骨细胞分化过程中,外泌体 circHmbox1 的表达降低,并通过影响下游 miR1247-5p 和转录因子 B 细胞淋巴瘤6(B Cell Lymphoma 6, BCL6)的表达促进破骨细胞生成。RANK/RANKL/OPG 是炎症因子影响破骨细胞、成骨细胞的主要途径,TNF- α 可以刺激间充质干细胞分泌肿瘤坏死因子受体配体和巨噬细胞集落刺激因子1(Colony-stimulating Factor1, CSF1),肿瘤坏死因子受体配体能够与骨保护素竞争性结合肿瘤坏死因子,肿瘤坏死因子是来源于前体或成熟破骨细胞的跨膜蛋白,肿瘤坏死因子受体配体-肿瘤坏死因子结合不仅可以促进破骨细胞的分化,而且可以激活成熟的破骨细胞,促进骨吸收^[41-42]。Chen等^[43]发现 circ_28313 在 RANKL+CSF1 诱导的骨髓巨噬细胞破骨细胞分化过程中表达上调,并通过结合 miR-195a 间接促进 CSF1 的表达,促进破骨细胞分化,敲除 circ_28313 阻止了去卵巢绝经后骨质疏松症模型鼠中骨丢失。此外,Liu等^[44]发现过表达 circ_0007059 能够减弱肿瘤坏死因子受体配体诱导的人骨髓基质细胞的破骨细胞分化,且 circ_0007059 通过 ceRNA 作用结合 miR-378,调控骨形态发生蛋白2的表达发挥作用。

5 环状核糖核酸在绝经后骨质疏松症治疗中的诊断价值

Hsa_circ_0001445、circ_0021739、外泌体 hsa_circ_0006859 对绝经后骨质疏松症具有重要的诊断价值。受试者工作特征 (Receiver Operating Characteristic Curve, ROC) 曲线分析是评估诊断分子预测价值的重要方式,揭示了敏感性和特异性之间关系,曲线下面积 (Area Under Curve, AUC) 在 0.5~1.0 之间,越大表明分类效果越好^[45]。Xiang 等^[46]发现 hsa_circ_0001445 在绝经后骨质疏松症患者血浆中的表达明显低于健康对照组,且表达水平与腰椎骨密度 T 评分呈正相关,与骨转换指标 β -异构 C 末端肽 (β -isomerized C-terminal Teloepptides, β -CTX) 呈负相关,受试者工作特征曲线分析显示曲线下面积为 0.965 4,以高灵敏度 (94.0%) 和特异性 (88.0%) 将绝经后骨质疏松症患者与健康对照组区分开来。circ_0021739 在绝经后骨质疏松症患者中亦呈低表达,其水平与腰椎、股骨和前臂 T 评分呈正相关,曲线下面积达 0.849,敏感性和特异性分别为 100% 和 42.9%,对于绝经后骨质疏松症具有较高的诊断价值^[47]。此外,外泌体 hsa_circ_0006859 在绝经后骨质疏松症患者中显著增高,并与腰椎骨密度 T 评分和 Z 评分呈负相关,受试者工作特征曲线分析显示曲线下面积为 0.913,敏感性和特异性分别为 94.00% 和 76.67%^[36]。

6 总结与展望

环状核糖核酸通过复杂的调控机制影响多种疾病,为疾病的防治与诊断提供了新的方向。然而,目前环状核糖核酸在绝经后骨质疏松症治疗中的研究尚处于初始阶段,其调控机制主要集中在环状核糖核酸的海绵吸附 miRNAs 作用上,并且多靶向绝经后骨质疏松症经典通路相关分子。cirRNAs 能否作为蛋白支架在绝经后骨质疏松症治疗中发挥关键作用以及是否涉及更多的信号通路仍是值得探索的问题。近年来发现部分环状核糖核酸具有翻译潜能,此类环状核糖核酸在绝经后骨质疏松症治疗中的研究也较为缺乏。此外,环状核糖核酸作为绝经后骨质疏松症诊断学分子标志物的研究主要集中于筛选和探索,缺少大样本的临床试验验证,将其作为预测指标而广泛地应用于临床仍任重道远。总之,绝经后骨质疏松症是亟需解决的健康问题,环状核糖核酸的深入研究有望对其诊断、治疗和预后提供新的思路和解决方案。

参考文献

- [1] LEE W, KO K R, KIM H K, et al. Dehydrodiconiferyl alcohol promotes BMP-2-induced osteoblastogenesis through its agonistic effects on estrogen receptor[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 495(3): 2242-2248.
- [2] YARDIMCI A, OZDEDE M R, KELESTIMUR H. Agomelatine, a potential multi-target treatment alternative

- for insomnia, depression, and osteoporosis in postmenopausal women: a hypothetical model[J]. Front Psychiatry, 2021, 12: 654616.
- [3] QU S, YANG X, LI X, et al. Circular RNA: a new star of noncoding RNAs[J]. Cancer Lett, 2015, 365(2): 141-148.
- [4] PATOP I L, WUST S, KADENER S. Past, present, and future of circRNAs[J]. EMBO J, 2019, 38(16): e100836.
- [5] CHEN L, WANG C, SUN H, et al. The bioinformatics toolbox for circRNA discovery and analysis[J]. Brief Bioinform, 2021, 22(2): 1706-1728.
- [6] JECK W R, SHARPLESS N E. Detecting and characterizing circular RNAs[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(5): 453-461.
- [7] CHEN L L, YANG L. Regulation of circRNA biogenesis[J]. RNA Biol, 2015, 12(4): 381-388.
- [8] CHEN L L. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(8): 475-490.
- [9] KRISTENSEN L S, ANDERSEN M S, STAGSTED L V W, et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs[J]. Nat Rev Genet, 2019, 20(11): 675-691.
- [10] CORTES-LOPEZ M, MIURA P. Emerging functions of Circular RNAs[J]. Yale J Biol Med, 2016, 89(4): 527-537.
- [11] AUFIERO S, RECKMAN Y J, PINTO Y M, et al. Circular RNAs open a new chapter in cardiovascular biology[J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(8): 503-514.
- [12] LI J, SUN D, PU W, et al. Circular RNAs in cancer: biogenesis, function, and clinical significance[J]. Trends Cancer, 2020, 6(4): 319-336.
- [13] MEHTA S L, DEMPSEY R J, VEMUGANTI R. Role of circular RNAs in brain development and CNS diseases[J]. Prog Neurobiol, 2020, 186: 101746.
- [14] ZHOU Z, SUN B, HUANG S, et al. Roles of circular RNAs in immune regulation and autoimmune diseases[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10(7): 503.
- [15] FU M, FANG L, XIANG X, et al. Microarray analysis of circRNAs sequencing profile in exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells in postmenopausal osteoporosis patients[J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2022, 36(1): e23916.
- [16] LI L, WANG Z. Ovarian aging and osteoporosis[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2018, 108: 199-215.
- [17] FISCHER V, HAFFNER-LUNTZER M. Interaction between bone and immune cells: implications for postmenopausal osteoporosis[J]. Semin Cell Dev Biol, 2022, 123: 14-21.
- [18] TAO H, LI W, ZHANG W, et al. Urolithin A suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and postmenopausal osteoporosis by suppresses inflammation and downstream NF- κ B activated pyroptosis pathways[J]. Pharmacological Research, 2021, 174: 105967.

- [19] WU D, CLINE-SMITH A, SHASHKOVA E, et al. T-cell mediated inflammation in postmenopausal osteoporosis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12:687551.
- [20] TORAN-ALLERAND C D. Estrogen and the brain: beyond ER- α and ER- β [J]. *Experimental Gerontology*, 2004, 39(11/12):1579-1586.
- [21] LI X, PENG B, ZHU X, et al. Changes in related circular RNAs following ER β knockdown and the relationship to rBMSC osteogenesis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 493(1):100-107.
- [22] LI X, CHEN R, LEI X, et al. Quercetin regulates ER α mediated differentiation of BMSCs through circular RNA [J]. *Gene*, 2021, 769:145172.
- [23] 王祥强, 苗峰, 卜志勇. 经皮椎体成形术联合骨髓间充质干细胞治疗骨质疏松性椎体压缩性骨折效果观察[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2018, 32(12):1175-1177.
- [24] LIN Z, TANG X, WAN J, et al. Functions and mechanisms of circular RNAs in regulating stem cell differentiation[J]. *RNA Biol*, 2021, 18(12):2136-2149.
- [25] IQBAL J, YUEN T, KIM S M, et al. Opening windows for bone remodeling through a SLIT[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(4):1255-1257.
- [26] HU Y, ZHANG Y, NI C Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stromal cells-derived extracellular vesicles exert potent bone protective effects by CLEC11A-mediated regulation of bone metabolism [J]. *Theranostics*, 2020, 10(5):2293-2308.
- [27] LI J, CHEN X, LU L, et al. The relationship between bone marrow adipose tissue and bone metabolism in postmenopausal osteoporosis[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2020, 52:88-98.
- [28] QIAO L, LI C G, LIU D. CircRNA_0048211 protects postmenopausal osteoporosis through targeting miRNA-93-5p to regulate BMP2[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2020, 24(7):3459-3466.
- [29] YU L, LIU Y G. circRNA_0016624 could sponge miR-98 to regulate BMP2 expression in postmenopausal osteoporosis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 516(2):546-550.
- [30] 朱正清, 陈香润, 贾方腾, 等. 骨形态发生蛋白 9 诱导成骨机制及其临床应用[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(33):5404-5412.
- [31] WANG H, ZHOU K, XIAO F, et al. Identification of circRNA-associated ceRNA network in BMSCs of OVX models for postmenopausal osteoporosis [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1):10896.
- [32] 林晓芳, 方芳, 彭志强, 等. Wnt/ β -catenin 与 BMP-2/Smads 信号通路及其相互作用对骨质疏松疾病的影响[J]. *浙江中医药大学学报*, 2019, 43(7):711-717.
- [33] CHEN G, LONG C, WANG S, et al. Circular RNA circ-Stag1 promotes bone regeneration by interacting with HuR[J]. *Bone Research*, 2022, 10(1):32.
- [34] PEGTEL D M, GOULD S J. Exosomes[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2019, 88:487-514.
- [35] WANG Z, WU Y, ZHAO Z, et al. Study on transorgan regulation of intervertebral disc and extra-skeletal organs through exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9:741183.
- [36] ZHI F, DING Y, WANG R, et al. Exosomal hsa_circ_0006859 is a potential biomarker for postmenopausal osteoporosis and enhances adipogenic versus osteogenic differentiation in human bone marrow mesenchymal stem cells by sponging miR-431-5p[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2021, 12(1):157.
- [37] 徐亮, 陶树清, 文刚, 等. RhoA/ROCK 信号通路在骨质疏松大鼠 BMSCs 成骨分化中的研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(11):1415-1419.
- [38] ZHENG J, GAO Y, LIN H, et al. Enhanced autophagy suppresses inflammation-mediated bone loss through ROCK1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Cells & Development*, 2021, 167:203687.
- [39] GUO X, WEI S, LU M, et al. RNA-Seq investigation and in vivo study the effect of strontium ranelate on ovariectomized rat via the involvement of ROCK1 [J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2018, 46(sup1):629-641.
- [40] LIU Z, LI C, HUANG P, et al. CircHmbox1 targeting miRNA-1247-5p is involved in the regulation of bone metabolism by TNF- α in postmenopausal osteoporosis[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 8:594785.
- [41] BOYLE W J, SIMONET W S, LACEY D L. Osteoclast differentiation and activation [J]. *Nature*, 2003, 423(6937):337-342.
- [42] TEITELBAUM S L, ROSS F P. Genetic regulation of osteoclast development and function [J]. *Nat Rev Genet*, 2003, 4(8):638-649.
- [43] CHEN X, OUYANG Z, SHEN Y, et al. CircRNA_28313/miR-195a/CSF1 axis modulates osteoclast differentiation to affect OVX-induced bone absorption in mice[J]. *RNA Biol*, 2019, 16(9):1249-1262.
- [44] LIU S, WANG C, BAI J, et al. Involvement of circRNA_0007059 in the regulation of postmenopausal osteoporosis by promoting the microRNA-378/BMP-2 axis[J]. *Cell Biology International*, 2021, 45(2):447-455.
- [45] 朱映璇, 李杨, 吴疏桐, 等. ROC 曲线和 PR 曲线在临床诊断试验评估中的应用[J]. *中华预防医学杂志*, 2022, 56(9):1341-1347.
- [46] XIANG S K, YANG W, HUAN S, et al. Circular RNA hsa_circ_0001445 in plasma as a novel biomarker for osteoporosis in postmenopausal women[J]. *Biomarkers in Medicine*, 2020, 14(16):1599-1607.
- [47] GUAN J, GAN L, JIN D, et al. Overexpression of circ_0021739 in peripheral blood mononuclear cells in women with postmenopausal osteoporosis is associated with reduced expression of microRNA-194-5p in osteoclasts[J]. *Medical Science Monitor*, 2021, 27:e929170.