

基于高通量测序技术的激素性股骨头坏死 骨组织微小核糖核酸差异表达谱研究

胥彪¹ 赖超超^{1△}

[摘要] 目的:探究激素性股骨头坏死(SANFH)骨组织微小核糖核酸(miRs)差异表达谱。方法:选取 2019 年 6 月至 2023 年 1 月因激素性股骨头坏死和股骨颈骨折行全髋关节置换术的患者各 31 例,分别记为激素性股骨头坏死组和对照组。采用 Illumina 高通量测序技术对激素性股骨头坏死患者和股骨颈骨折患者骨组织进行测序,筛选组间差异微小核糖核酸,利用生物信息学方法分析两类人群基因表达谱的差异。结果:通过 Illumina 高通测序,比对到 1 668 个已知微小核糖核酸,预测到 107 个新的微小核糖核酸。与对照组比,激素性股骨头坏死组患者骨组织中有 76 个差异表达的微小核糖核酸($\log_2(\text{FoldChange}) > 1.5, P < 0.05$),其中表达上调的微小核糖核酸有 40 个,表达下调的微小核糖核酸有 36 个。Go 分析显示,两组差异表达的微小核糖核酸调控的靶基因功能主要包括细胞代谢过程、细胞内信号转导、间充质细胞增殖、细胞杀伤、受体结合、蛋白活性、酶调节活性、解剖结构发育等;京都基因和基因组数据库(KEGG)通路富集分析显示,两组差异表达的微小核糖核酸调控的信号通路主要包括过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)信号通路、Janus 激酶(JAK)/信号转导转录激活因子(STAT)信号通路、转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)/Smad3 途径、磷脂酰肌醇 3 激酶(P13K)/丝氨酸苏氨酸激酶(Akt)信号通路、T 细胞受体信号通路、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路和泛素蛋白酶体途径等。结论:激素性股骨头坏死骨组织中存在差异表达的微小核糖核酸,差异表达的微小核糖核酸可通过作用于 PPAR γ 、JAK/STAT、TGF- $\beta 1$ /Smad3、P13K/Akt 等信号通路,参与激素性股骨头坏死的发生发展。

[关键词] 高通量测序技术;激素性股骨头坏死;骨组织;微小核糖核酸;生物信息学

[中图分类号] R681.8 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)01-0059-06

DOI: 10.20085/j.cnki.issn1005-0205.240110

Differential Expression Profile of miRs in Bone Tissue of Steroid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head Based on High-Throughput Sequencing Technology

XU Biao¹ LAI Chaochao^{1△}

¹ Department of Orthopedics, Dazhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Dazhou 635000, Sichuan China.

Abstract Objective: To investigate the differential expression profile of micrnas (miRs) in bone tissue of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head (SANFH). **Methods:** 31 patients who underwent total hip arthroplasty due to SANFH and tibia fractures from June 2019 to January 2023 were selected and recorded as SANFH group and control group respectively. The Illumina high-throughput sequencing technology was used to sequence the bone tissues of SANFH patients and femoral neck fracture patients, and the miRs differences between groups were screened. Bioinformatics was used to analyze the difference of gene expression profiles between the two populations. **Results:** Through Illumina high pass sequencing, 1 668 known miRNAs were compared and 107 new miRNAs were predicted. Compared with the control group, there were 76 differentially expressed miRNAs ($\log_2(\text{FoldChange}) > 1.5, P < 0.05$) in bone tissue of patients with SANFH, including 40 up-regulated miRNAs and 36 down-regulated miRNAs. Target gene prediction was conducted for 61

differentially expressed miRs. Go analysis showed that the target gene functions regulated by the two groups of differentially expressed miRs mainly include: cell metabolic

¹ 达州市中西医结合医院骨病中心(四川 达州, 635000)

[△]通信作者 E-mail: nrqiao640259@163.com

process, intracellular signal transduction, mesenchymal cell proliferation, cell killing, receptor binding, protein activity, enzyme regulation activity, anatomical structure development, etc. The enrichment analysis of Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway showed that the signal pathways regulated by the two groups of differentially expressed miRs mainly included: peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) signal pathway, Janus kinase (JAK)/signal transducer activator of transcription (STAT) signal pathway, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)/Smad3 pathway, phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/serine threonine protein kinase (Akt) signal pathway, T cell receptor signal pathway, vascular endothelial growth factor (VEGF) signal pathway, ubiquitin proteasome pathway, etc. **Conclusion:** There are differentially expressed miRs in SANFH bone tissue, which can act on PPAR γ , JAK/STAT, TGF- β 1/Smad3, PI3K/Akt and other signal pathways participate in the occurrence and development of SANFH.

Keywords: high throughput sequencing technology; steroid induced avascular necrosis of femoral head; bone tissue; micro ribonucleic acid; bioinformatics

激素性股骨头坏死(SANFH)是一种非创伤性骨坏死疾病,具有较高的致残率,严重影响患者生活质量^[1]。微小核糖核酸(miRs)可通过调节细胞和组织的功能,影响骨骼发育和再生参与激素性股骨头坏死的发生发展过程^[2]。已有研究显示,600多种微小核糖核酸对骨和软骨组织有影响,在成骨细胞、破骨细胞、软骨细胞及其他间充质细胞的生命活动中发挥作用^[3]。本研究通过高通量测序技术探究激素性股骨头坏死组织中差异表达的微小核糖核酸,以探讨微小核糖核酸在激素性股骨头坏死发病过程中可能发挥的作用,筛选出激素性股骨头坏死发展过程中发挥关键作用的候选微小核糖核酸,现报告如下。

1 研究对象和方法

1.1 研究对象

选取本单位2019年6月至2023年1月因激素性股骨头坏死和股骨颈骨折行全髋关节置换术的患者各31例,分别记为激素性股骨头坏死组和对照组。本研究已得到医院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

1.2 纳入标准

1)激素性股骨头坏死组患者临床综合诊断为股骨头坏死,符合《中国成人股骨头坏死临床诊疗指南(2020)》^[4]诊断标准,且有长期大量使用激素类药物史;2)股骨颈骨折组患者临床综合诊断为股骨颈骨折,诊断标准符合《成人股骨颈骨折诊治指南》^[5]诊断标准,且无激素使用史。

1.3 排除标准

1)近半年内服用过影响骨代谢的药物者;2)有吸烟、酗酒史者;3)合并严重心脑血管病、先天性免疫系统疾病、肿瘤等病史者;4)有代谢性骨病或有代谢性骨病病史者。

1.4 方法

收集两组患者术中取出的股骨头松质骨组织,TRIzol法提取组织中的总RNA,NanoDrop ND-1000紫

外分光光度计检测RNA浓度及纯度,用琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。Agilent 2100 Bioanalyzer生物分析仪检测RNA完整性参数(RIN) ≥ 8.0 ,符合建库要求。用oligo dT纤维素亲和层析法富集总RNA样品中的mRNA,通过KAPA Stranded RNA-Seq文库扩增试剂盒构建文库。完成建库后通过生物分析仪进行文库质量检测,利用Pico green荧光染料定量检测文库总浓度,qPCR法检测有效文库浓度。将多样品DNA文库均一化至10 nmol/L浓度后等体积混合,将混合好的文库逐步稀释定量至4~5 pmol/L后通过Illumina NovaSeq 6000测序仪HiSeq Single-End模式进行测序。

通过Cutadapt v1.12软件去除原始数据的低质量reads及Adapter接头,将过滤后的clean reads进行去重处理和长度筛选,得到unique reads,然后利用miRDeep2软件进行基因组比对,对测到的微小核糖核酸进行注释,运用mireap v2.0.1.2软件根据前体序列分析未注释到任何信息的序列,进行新的微小核糖核酸预测分析。将比对到微小核糖核酸成熟体的序列数量记为微小核糖核酸的Reads Count值(基因表达量),通过DESeq2软件对微小核糖核酸表达量进行差异表达分析,将组间 $\log_2(\text{FoldChange}) > 1.5$, $P < 0.05$ 的基因筛选为具有显著统计学差异的基因。用Targetscan和miRanda靶基因预测软件预测差异表达的微小核糖核酸靶基因,取两个预测结果的交集,进行功能富集分析。然后通过topGO对差异表达的微小核糖核酸靶基因进行GO功能富集分析,从而确定差异表达基因的主要生物学功能,通过clusterProfiler软件对差异表达的微小核糖核酸靶基因进行京都基因和基因组数据库(KEGG)通路富集分析, $P < 0.05$ 表示通路显著富集。

1.5 观察指标

1)评估测序文库的质量;2)采用Illumina高通量测序技术对激素性股骨头坏死患者和股骨颈骨折患者骨组织进行测序,筛选组间差异微小核糖核酸;3)利用

生物信息学分析差异表达微小核糖核酸的靶基因并对其功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,将符合正态分布数据用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。两组间比较采用 t 检验,重复测量方差分析用于重复测量样本间比较, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

31 例激素性股骨头坏死患者中男 19 例,女 12 例,平均年龄为 (47.26 ± 8.11) 岁,病程为 5 个月~7 年,平均为 (3.26 ± 0.55) 年;双髋 8 例,左髋 13 例,右髋 10 例。31 例股骨颈骨折患者中男 17 例,女 14 例,平均年龄为 (45.71 ± 6.53) 岁。两组患者性别、年龄差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 测序文库的质量评估

微小核糖核酸文库生成后应用 Agilent 2100 Bioanalyzer 生物分析仪和 Pico green 荧光染料进行定性与定量分析,结果表明对照组与激素性股骨头坏死组患者骨组织小 RNA 长度主要集中在 21 个核苷酸,其次是 22 个核苷酸、20 个核苷酸,完整性参数(RIN)均 ≥ 8.0 ,文库浓度均 > 25 nmol/L,提示微小核糖核酸文库质量完好,可用于测序文库的构建和 Illumina 测序分析。

2.3 微小核糖核酸的差异表达分析

通过 Illumina 高通测序,比对到 1 668 个已知微小核糖核酸,预测到 107 个新的微小核糖核酸。应用 DESeq2 软件,从激素性股骨头坏死组和对照组患者骨组织中共筛选出 76 个差异表达的微小核糖核酸($\log_2(\text{FoldChange}) > 1.5, P < 0.05$),筛选前 10 个显著表达上调和下调的微小核糖核酸列于表 1。其中表达上调的微小核糖核酸有 40 个(红色点),表达下调的微小核糖核酸有 36 个(蓝色点),灰色点为无差异表达的微小核糖核酸,见图 1。将差异表达的微小核糖核酸数据制作成聚类分析热图展示基因的在组间的上、下调水平,红色代表上调,绿色代表下调;横向为样品间聚类,代表样品的重复性;纵向为基因间聚类,代表基因功能的相似性,见图 2。

2.4 差异表达微小核糖核酸的靶基因预测及功能分析

通过 Targetscan 和 miRanda 两个数据库对预测得到的 76 个差异表达的微小核糖核酸进行靶基因预测,分别得到 19 216 个和 15 095 个靶基因,取交集后得到 1 863 个共同作用的靶基因,对这些靶基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析显示,其主

表 1 显著表达上调和下调的微小核糖核酸

上调微小核糖核酸	$\log_2(\text{Fold Change})$	下调微小核糖核酸	$\log_2(\text{Fold Change})$
miR-672-5p	19.75	miR-17-5p	-15.66
miR-100-5p	16.69	miR-548d-5p	-13.33
miR-141	12.60	miR-149-3p	-9.61
miR-708	9.62	miR-26a	-9.28
miR-320	9.31	miR-34a-5p	-8.07
miR-214	8.55	miR-708	-7.92
miR-132-3p	8.21	miR-200a	-7.19
miR-206	6.96	miR-145	-6.84
miR-596	6.73	miR-122-5p	-5.32
miR-887	5.82	miR-596	-4.35

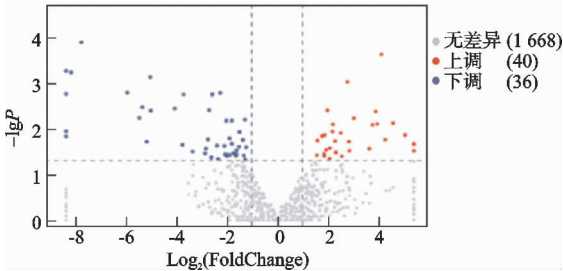


图 1 两组患者骨组织微小核糖核酸差异化表达火山图

要富集在 8 个功能上和 7 条通路上。其中 GO 功能富集性分析显示,两组差异表达的微小核糖核酸调控的靶基因功能主要包括细胞代谢过程、细胞内信号转导、间充质细胞增殖、细胞杀伤、受体结合、蛋白活性、酶调节活性、解剖结构发育;KEGG 通路富集分析显示,两组差异表达的微小核糖核酸调控的信号通路主要包括 PPAR γ 信号通路、JAK/STAT 信号通路、TGF- β 1/Smad3 途径、P13K/Akt 信号通路、T 细胞受体信号通路、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路和泛素蛋白酶体途径等,见图 3 和图 4,图中圆点越大说明包含的差异基因数目越多;颜色越偏向红色提示富集越显著;富集因素指富集到的差异基因个数与注释到的差异基因个数的比值,数值越大富集程度越大。

3 讨论

激素性股骨头坏死是一个复杂的进行性的病理过程,主要是由于大量应用糖皮质激素导致骨髓间充质干细胞(BMSCs)的成骨-成脂分化失衡,进而使患者出现骨代谢紊乱及股骨头血液循环障碍,骨细胞和骨髓成分死亡,最终引起股骨头塌陷、髋关节功能障碍和股骨头坏死^[6]。高通量测序技术是近年来继生物芯片技术之后新兴的可高效测定分析生物组织及细胞的基因组序列新技术。本研究通过检测激素性股骨头坏死患者骨组织中的微小核糖核酸表达谱变化,探索其靶基因生物学功能与调控的信号通路,对激素性股骨头坏死的预防与治疗具有重要意义。

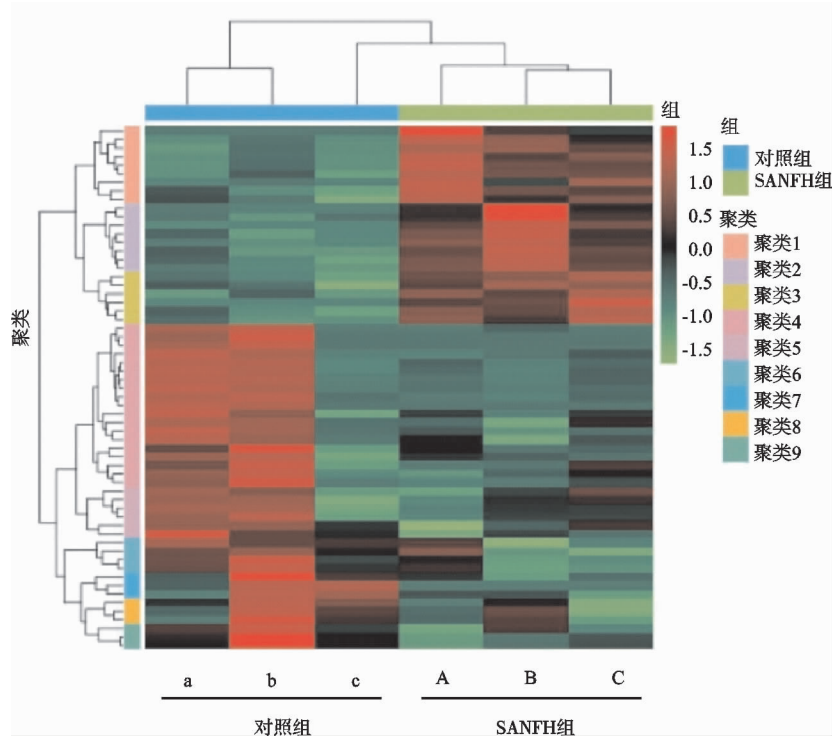


图 2 两组患者骨组织微小核糖核酸差异化表达聚类分析

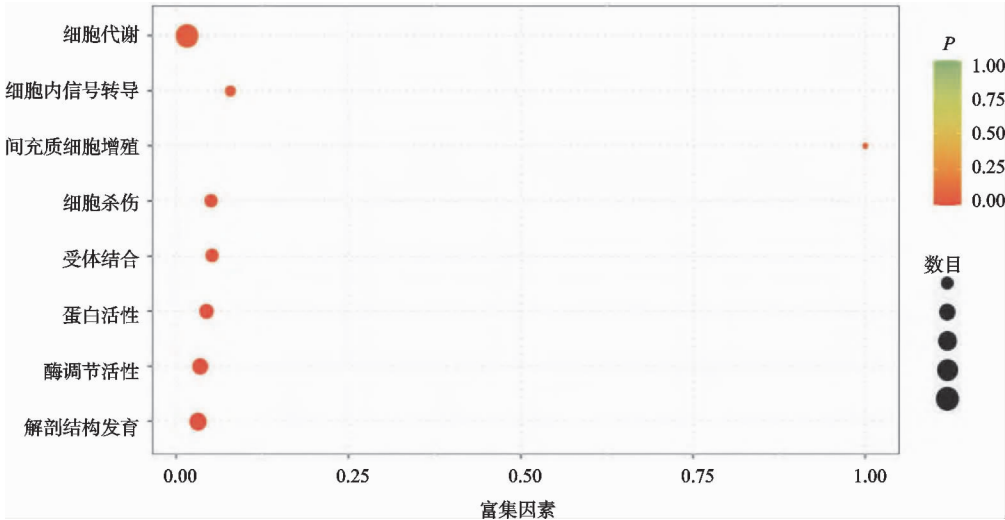


图 3 GO 功能富集分析

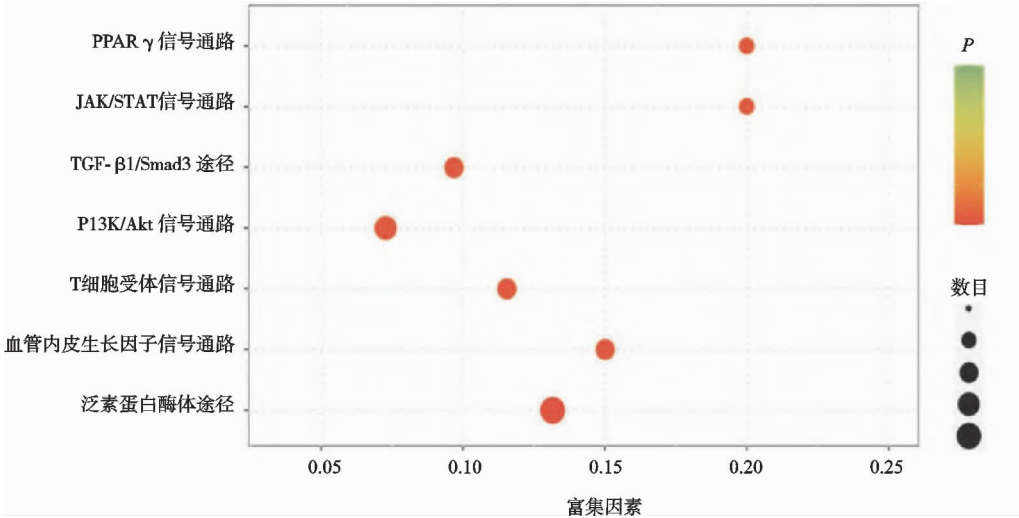


图 4 KEGG 通路富集分析

近年来研究显示,多种微小核糖核酸通过参与骨髓间充质干细胞增殖、成骨和成脂分化,成骨细胞和骨细胞凋亡,血管生成等过程参与激素性股骨头坏死的发生发展^[7-8]。骨髓间充质干细胞是一种多能细胞,具有自我更新及多向分化潜能,可分化为成骨细胞、成软骨细胞、成脂细胞等多种细胞类型。Gao 等^[9]指出微小核糖核酸的表达在骨代谢和股骨头缺血性坏死中发挥重要作用。本研究 Illumina 高通测序结果显示,在激素性股骨头坏死患者骨组织中比对到 1 668 个已知微小核糖核酸,预测到 107 个新的微小核糖核酸,共筛选出 76 个差异表达的微小核糖核酸,表达上调的微小核糖核酸有 40 个,表达下调的微小核糖核酸有 36 个。其中 miR-672-5p、miR-100-5p、miR-141 显著表达上调,miR-17-5p、miR-548d-5p 显著表达下调,且与对照组比均差异倍数均在 10 倍以上。徐丹等^[10]研究显示,miR-672-5p 在激素性股骨头坏死患者中表达水平高于对照组,且其水平与股骨头坏死程度呈正相关。Ahmad 等^[11]研究显示,miR-672-5p 可通过促进 Runt 相关转录因子 2(Runx2)的转录诱导成骨细胞分化和矿化,从而逆转卵巢切除术引起的小鼠骨质流失。Yang 等^[12-13]报道,miR-100-5p 在非创伤性股骨头坏死(NONFH)患者骨组织外泌体和股骨头组织中表达上调,通过抑制骨髓间充质干细胞的成骨分化、迁移和人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的血管生成参与非创伤性股骨头坏死的病理生理机制。Wei 等^[14]研究指出,与骨关节炎患者相比,非创伤性股骨头坏死患者骨髓间充质干细胞中 miR-17-5p 的表达水平较低。Tian 等^[15]发现,下调 miR-141 可通过促进成骨细胞活性并诱导血管生成、重建坏死区的骨结构以改善股骨头坏死。沉默 miR-141 不仅能促进股骨头坏死中骨髓间充质干细胞的成骨分化,还能抑制骨髓间充质干细胞凋亡^[16-17]。有关 miR-548d-5p 在股骨头坏死中的调控作用尚未见相关报道,但 Zhang 等^[18]发现 miR-548d-5p 具有促进骨髓间充质干细胞成骨分化的作用,据此推测 miR-548d-5p 可能通过促进骨髓间充质干细胞成骨分化参与激素性股骨头坏死的发生发展过程。

微小核糖核酸通过作用于靶基因的 mRNA 发挥生物学功能,微小核糖核酸靶向治疗作为多种疾病预防及治疗的新策略具有广阔的应用前景。因此,预测微小核糖核酸的靶基因以及对靶基因进行 GO 分析和 KEGG 分析十分重要。为了提高靶基因的预测准确性,本研究选取 TargetsCan 和 miRanda 预测到的靶基因的交集,从而缩小筛选的范围。GO 分析结果显示这些在激素性股骨头坏死患者骨组织中异常表达的靶基因主要参与了细胞代谢过程、细胞内信号转导、间充质细胞增殖、细胞杀伤、受体结合、蛋白活性、酶调节活

性、解剖结构发育等生物学过程,说明上述生物学过程的调节异常是导致激素性股骨头坏死发生发展的重要因素。KEGG 分析显示这些差异表达的靶基因主要富集在 PPAR γ 、JAK/STAT、TGF- β 1/Smad3、Pl3K/Akt 等信号通路上,这些通路细胞的增殖、分化、凋亡及多种疾病的发生发展过程等密切相关。糖皮质激素可通过增加 PPAR γ 基因的表达打破成骨-成脂分化失衡,从而促进骨髓间充质干细胞成脂分化,抑制骨重建,造成股骨头塌陷和股骨头局部缺血,最终导致激素性股骨头坏死的发生^[19]。Sun 等^[20]报道显示,miR-548d-5p 通过直接靶向和下调 PPAR γ 抑制地塞米松诱导的骨髓间充质干细胞的成脂分化并增强其成骨潜力,表明 miR-548d-5p 在治疗皮质类固醇诱导的股骨头骨坏死方面具有潜力。Chen 等^[21]研究指出,miR-672 可通过靶向骨形态发生蛋白-2(BMP2)促进脂肪来源间充质干细胞(ADSCs)的血管生成和骨再生过程。Wang 等^[22]指出,miR-100-3p 通过 Pl3K/Akt 信号通路靶向磷酸肌醇 3-激酶调节亚基 1(PIK3R1),抑制骨髓间充质干细胞的成脂分化,促进其成骨分化。Najm 等^[23]研究显示,miR-17-5p 可直接靶向类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞中的 JAK/STAT 途径,减少胶原蛋白诱导性关节炎小鼠的炎症和骨侵蚀。Wang 等^[24]通过卵巢切除术构建去势骨质疏松症大鼠发现,miR-29 可通过 Pl3K/AKT 和 TGF- β /Smad 信号通路促进大鼠骨髓间充质干细胞的增殖和迁移,提示 Pl3K/AKT 和 TGF- β /Smad 通路均可能与骨代谢过程有关。上述信号通路在调控炎症、成骨细胞增殖分化、骨重建以及调控血管生成等方面发挥了关键性作用,广泛参与了股骨头坏死的发生发展过程。

综上所述,激素性股骨头坏死骨组织差异表达的微小核糖核酸可通过作用于 PPAR γ 、JAK/STAT、TGF- β 1/Smad3、Pl3K/Akt 等信号通路参与激素性股骨头坏死的发生发展。本研究从基因水平初步阐明了微小核糖核酸在激素性股骨头坏死发生发展中的作用及可能的分子机制,为激素性股骨头坏死的预防与治疗提供了新的思路,但对于激素性股骨头坏死骨组织差异表达微小核糖核酸的测序结果仍有待后续进一步的实验验证。

参考文献

- [1] AL-OMARI A A, ALESHAWI A J, MAREI O A, et al. Avascular necrosis of the femoral head after single steroid intra-articular injection[J]. Eur J Orthop Surg Traumatol, 2020, 30(2): 193-197.
- [2] WANG G, ZHANG L, YAN C, et al. Upregulation of microRNA-576-5p protects from steroid-induced avascular necrosis of the femoral head by suppressing ANXA2[J]. Cell Cycle, 2022, 21(1): 49-62.

- [3] DE MARTINIS M, GINALDI L, ALLEGRA A, et al. The osteoporosis/microbiota linkage; the role of miRNA[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23):8887.
- [4] 中国医师协会骨科医师分会骨循环与骨坏死专业委员会, 中华医学会骨科分会骨显微修复学组, 国际骨循环学会中国区. 中国成人股骨头坏死临床诊疗指南(2020)[J]. *中华骨科杂志*, 2020, 40(20):1365-1376.
- [5] 中华医学会骨科学分会创伤骨科学组, 中国医师协会骨科医师分会创伤专家工作委员会. 成人股骨颈骨折诊治指南[J]. *中华创伤骨科杂志*, 2018, 20(11):921-928.
- [6] ZHAO X, ALQWBANI M, LUO Y, et al. Glucocorticoids decreased Cx43 expression in osteonecrosis of femoral head; the effect on proliferation and osteogenic differentiation of rat BMSCs[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(1):484-498.
- [7] ZHAO S R, WEN J J, MU H B. Role of Hsa-miR-122-3p in steroid-induced necrosis of femoral head[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(3 Suppl):54-59.
- [8] FANG S H, CHEN L, CHEN H H, et al. MiR-15b ameliorates SONFH by targeting Smad7 and inhibiting osteogenic differentiation of BMSCs[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(22):9761-9771.
- [9] GAO Y, PATIL S, QIAN A. The role of microRNAs in bone metabolism and disease[J]. *Int J MolSci*, 2020, 21(17):6081.
- [10] 徐丹, 杨静华, 朱世华, 等. TGF- β 、BMP-2 及 miR-672-5p 与激素性股骨头坏死的关系分析[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(12):2013-2016.
- [11] AHMAD N, KUSHWAHA P, KARVANDE A, et al. microRNA-672-5p identified during weaning reverses osteopenia and sarcopenia in ovariectomized mice[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 4:536-549.
- [12] YANG W, ZHU W, YANG Y, et al. Exosomal miR-100-5p inhibits osteogenesis of hBMSCs and angiogenesis of HUVECs by suppressing the BMPR2/Smad1/5/9 signaling pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1):390.
- [13] 杨武, 杨韵霏, 郭民康, 等. miR-100-5p 通过抑制大鼠骨髓间充质干细胞的迁移和成骨分化参与非创伤性股骨头坏死[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2022, 38(2):159-164.
- [14] TIAN L, SUN S, LI W, et al. Down-regulated microRNA-141 facilitates osteoblast activity and inhibits osteoclast activity to ameliorate osteonecrosis of the femoral head via up-regulating TGF- β 2 [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(7):772-786.
- [15] MENG C Y, XUE F, ZHAO Z Q, et al. Influence of microRNA-141 on inhibition of the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells in steroid-induced osteonecrosis via SOX11[J]. *Orthop Surg*, 2020, 12(1):277-285.
- [16] XUE F, WU J, FENG W, et al. microRNA141 inhibits the differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells in steroid-induced osteonecrosis via E2F3 [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 26(1):234.
- [17] 田楠楠, 冯蜜亚, 吴涛. miR-141 对股骨头坏死骨髓间质干细胞活性及 VEGF/TGF- β 2 蛋白的影响[J]. *河北医学*, 2022, 28(12):1949-1956.
- [18] ZHANG W, ZHANG L, ZHOU Y, et al. Synergistic effects of BMP9 and miR-548d-5p on promoting osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *Biomed Res Int*, 2015:309747.
- [19] DUAN P, WANG H, YI X, et al. C/EBP α regulates the fate of bone marrow mesenchymal stem cells and steroid-induced avascular necrosis of the femoral head by targeting the PPAR γ signalling pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1):342.
- [20] SUN J, WANG Y, LI Y, et al. Down regulation of PPAR γ by miR-548d-5p suppresses the adipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells and enhances their osteogenic potential[J]. *J Transl Med*, 2014, 12:168.
- [21] CHEN M, ZHOU M, FU Y, et al. Effects of miR-672 on the angiogenesis of adipose-derived mesenchymal stem cells during bone regeneration[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1):85.
- [22] WANG T, ZHONG D, QIN Z, et al. miR-100-3p inhibits the adipogenic differentiation of hMSCs by targeting PIK3R1 via the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(24):25090-25100.
- [23] NAJM A, MASSON F M, PREUSS P, et al. microRNA-17-5p reduces inflammation and bone erosions in mice with collagen-induced arthritis and directly targets the JAK/STAT pathway in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2020, 72(12):2030-2039.
- [24] WANG Y, HAN X, ZANG T, et al. miR-29b enhances the proliferation and migration of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with castration-induced osteoporosis through the PI3K/AKT and TGF- β /Smad signaling pathways[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(4):3185-3195.

(收稿日期:2023-02-08)