

DNA 甲基化在运动干预骨质疏松中的作用机制

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3017>

刘 波, 陈祥和, 杨 康, 余慧琳, 陆鹏程

2095-4344.3017

投稿日期: 2020-04-26

送审日期: 2020-04-28

采用日期: 2020-05-28

在线日期: 2020-08-25

中图分类号:

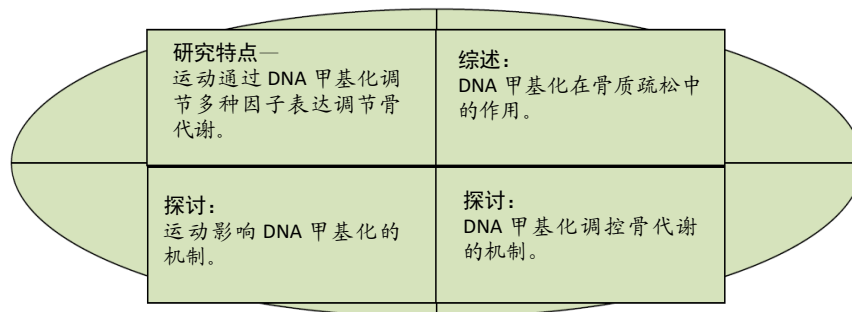
R446; R496; R318

文章编号:

2095-4344(2021)05-00791-07

文献标识码: A

文章快速阅读:



文题释义:

DNA甲基化: 是指在不改变基因序列情况下, 使基因发生可遗传的表达, DNA甲基化是目前研究最多的表观遗传机制, 可以调控相关基因表达调节成骨细胞/破骨细胞活性, 进而影响骨代谢。

经典Wnt/ β -catenin通路: Wnt蛋白与膜受体卷曲蛋白结合, 经过一系列蛋白的相互作用, 使 β -catenin稳定沉聚, 并在细胞核内对T细胞转录因子和淋巴增强因子发生作用, 通过启动Runx2及下游基因Osx、远端缺失同源盒基因5等的表达来促进成骨细胞分化、成熟。

摘要

背景: 成骨细胞介导的骨形成与破骨细胞介导的骨吸收之间的动态平衡是维持机体骨组织稳定的基础, 当两者代谢平衡紊乱时造成骨质流失和骨微细结构退化, 导致骨质疏松发生。

目的: 综述DNA甲基化在骨质疏松中的作用, 探讨运动影响DNA甲基化及DNA甲基化调控骨代谢的机制。

方法: 检索2002年1月至2020年4月CNKI和PubMed等外文生物医学、生物学、体育学期刊系统相关文献, 中文关键词: DNA甲基化; 骨质疏松; 运动干预; 机械应力; 成骨分化; 英文关键词: DNA methylation; Osteoporosis; Exercise intervention; Mechanical stress; Osteogenic differentiation。排除不符合纳入标准的文献, 对入选的52条文献进行归纳总结。

结果与结论: ①DNA甲基化是一种相对保守、稳定的表观修饰, 其调控基因表达、沉默以及疾病发生; ②研究表明, β -catenin、Runx2、骨桥蛋白等基因甲基化水平降低能促进其表达进而活化Wnt通路; 而硬化蛋白、核因子 κ B受体活化因子配体等基因甲基化水平降低则会促进其表达, 抑制Wnt通路以及降低OPG/RANKL比例, 进而对成骨细胞和破骨细胞的增殖、分化及功能产生影响, 从而调节骨形成和骨吸收动态平衡; ③成骨细胞和破骨细胞为力学刺激敏感细胞, 骨骼能将运动产生的机械负荷转变为生物学刺激作用于相关骨细胞分化及功能的发挥, 进而调节骨代谢; ④体外实验表明, 不同形式的机械应力刺激可以改变骨桥蛋白、GNAS1等基因甲基化水平进而调节其表达, 从而对骨形成产生积极作用; ⑤骨组织是力学敏感组织, 而DNA甲基化能通过调节多种因子来调节骨代谢。

关键词: 运动; DNA; 甲基化; 骨质疏松; 机械应力; 成骨分化; 蛋白; 因子; 通路

缩略语: 核因子 κ B受体活化因子配体: receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, RANKL; 成骨特异性转录因子: runt related transcription factor2, Runx2; 核因子 κ B受体活化因子: receptor activator of nuclear factor kappa B, RANK

Mechanism of DNA methylation in exercise intervention for osteoporosis

Liu Bo, Chen Xianghe, Yang Kang, Yu Huilin, Lu Pengcheng

College of Physical Education, Yangzhou University, Yangzhou 225127, Jiangsu Province, China

Liu Bo, Master candidate, College of Physical Education, Yangzhou University, Yangzhou 225127, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Chen Xianghe, PhD, Lecturer, College of Physical Education, Yangzhou University, Yangzhou 225127, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: The dynamic balance between bone formation mediated by osteoblasts and bone resorption mediated by osteoclasts is the basis for maintaining the stability of the body's bone tissue. The metabolic imbalance between them can cause bone loss and fine structure degeneration of the bone cells, leading to osteoporosis.

OBJECTIVE: To review the role of DNA methylation in osteoporosis and to explore the mechanism of exercise affecting DNA methylation and DNA methylation regulating bone metabolism.

扬州大学体育学院, 江苏省扬州市 225127

第一作者: 刘波, 男, 1996年生, 山西省阳城县人, 汉族, 扬州大学在读硕士, 主要从事运动与骨代谢研究。

通讯作者: 陈祥和, 讲师, 博士, 扬州大学体育学院, 江苏省扬州市 225127

<https://orcid.org/0000-0002-3379-1713> (刘波)

基金资助: 中国博士后科学基金资助 (2019M661957), 项目负责人: 陈祥和

引用本文: 刘波, 陈祥和, 杨康, 余慧琳, 陆鹏程. DNA甲基化在运动干预骨质疏松中的作用机制 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(5):791-797.



METHODS: A computer-based search of PubMed and CNKI databases was performed for relevant articles published from January 2002 to April 2020 with “DNA methylation; Osteoporosis; Exercise intervention; Mechanical stress; Osteogenic differentiation” as key words in English and Chinese, respectively. Initially, finally 52 eligible articles were included for result analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: DNA methylation is a relatively conservative and stable apparent modification, which regulates gene expression, silencing and disease occurrence. Studies have shown that reduced methylation levels of genes such as β -catenin, Runx2, osteopontin (OPG) can promote their expression and activate Wnt Pathway, whereas the reduction of methylation level of Sclerosin, receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) and other genes can promote their expression, and inhibit Wnt pathway and reduce the ratio of OPG/RANKL, thereby affecting the proliferation, differentiation and function of osteoblasts and osteoclasts, and accordingly regulating dynamic equilibrium between bone formation and bone resorption. Osteoblasts and osteoclasts act as sensitive cells for mechanical stimulation. Bone can transform the mechanical load generated by exercise into biological stimulation that acts on the differentiation and function of related bone cells, thereby regulating bone metabolism. In vitro experiments have indicated that different forms of mechanical stress stimulations can change the methylation level of genes such as OPN and GNAS1 to regulate their expression, which has a positive effect on bone formation. Bone tissue is a mechanically sensitive tissue, and DNA methylation can regulate bone metabolism by regulating a variety of factors.

Key words: exercise; DNA; methylation; osteoporosis; mechanical stress; osteogenic differentiation; protein; factor; pathway

Funding: the China Postdoctoral Science Foundation, No. 2019M661957 (to CXH)

How to cite this article: LIU B, CHEN XH, YANG K, YU HL, LU PC. Mechanism of DNA methylation in exercise intervention for osteoporosis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(5):791-797.

0 引言 Introduction

骨质疏松症是代谢性骨病，其分子网络机制研究一直是生命医学领域的研究热点^[1]。成骨细胞介导的骨形成与破骨细胞介导的骨吸收之间的动态平衡是保持人体骨代谢稳定的基础，维持着机体骨骼的完整性。当此种平衡被打破，即骨吸收速率大于骨形成时，会出现骨质流失、骨密度下降、骨微结构被破坏进而导致骨质疏松性增加，最终产生骨质疏松症^[2]。骨质疏松症的产生由多因素引起，遗传因素则是研究较多的一种。目前已经证实，存在一种更为复杂的遗传机制——表观遗传参与了骨代谢的调节过程。表观遗传是指在不改变 DNA 序列前提下，使基因发生稳定表达且可遗传，并介导环境暴露对基因表达的影响。

DNA 甲基化是研究较为广泛的一种表观遗传修饰机制，在基因印记、基因失活以及 X 染色体失活等方面起重要作用。研究证实， β -catenin、Frizzled 等基因甲基化水平升高会抑制其表达，进而抑制 Wnt 信号通路激活并减弱骨形成，而活化核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, RANKL), Notch1、硬化蛋白 (sclerostin, SOST) 等基因甲基化水平降低会促进其表达，在抑制骨形成的同时还能够增加骨吸收，进而导致骨代谢失调并导致骨质疏松症产生^[3]。体外研究表明，诱导间充质干细胞成骨分化后，经染色质免疫共沉淀法检测到成骨特异性转录因子 (runt related transcription factor2, Runx2) 甲基化程度降低了 50% 以上，且 Runx2 mRNA 表达显著上升^[4]，此外诸如锌指结构转录因子 (osterix, Osx)、骨钙素、碱性磷酸酶、骨桥蛋白等与骨代谢密切相关的基因，其启动子区域甲基化改变也能调节基因表达，进而影响成骨细胞、破骨细胞活性和功能，与骨质疏松症密切相关。

骨组织长期缺乏应力刺激会导致其代谢功能下降，骨质疏松症患病风险增加^[5]，这一点在长期缺乏运动的老年人中较为常见。研究证实，运动产生的机械负荷刺激能作用于骨组织，下调硬化蛋白基因表达并促进 β -catenin 蛋白表达，激活经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路，同时上调 Jagged1、Notch1 表达来激活 Notch 信号通路，促进骨形成；不仅如此，运动还能下调 RANKL 表达，使骨保护素 (osteoprotegerin, OPG)/RANKL 上升，抑制骨吸收过程，此外，Runx2、骨桥蛋

白、骨钙素、碱性磷酸酶、Osx 等骨形成标志基因 mRNA 在运动干预后表达均上升。一些研究表明，体外培养的间充质干细胞施加机械振动刺激后，骨桥蛋白、GNAS1 等基因启动子甲基化水平降低且表达上升，促进了间充质干细胞向成骨分化。目前运动通过 DNA 甲基化影响骨质疏松症的机制还不明确，结合相关研究，运动可能是通过降低 Notch1、 β -catenin、Runx2、骨桥蛋白等基因甲基化水平来促进其表达，激活 Wnt、Notch 信号通路进而增加骨形成；增加硬化蛋白、RANKL 等基因甲基化水平来抑制其表达，进而减弱骨吸收，最终达到改善骨质疏松症的作用。文章综述 DNA 甲基化在骨质疏松中的作用；探讨运动影响 DNA 甲基化的机制及 DNA 甲基化调控骨代谢的机制，以期运动防治骨质疏松症提供新的方法。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 由第一作者检索 2002 年 1 月至 2020 年 4 月 CNKI 和 PubMed 等外文生物医学、生物学、体育学期刊系统相关文献。中文关键词：DNA 甲基化；骨质疏松；运动干预；机械应力；成骨分化；英文关键词：DNA methylation; Osteoporosis; Exercise intervention; Mechanical stress; Osteogenic differentiation。

1.2 纳入和排除标准

纳入标准：①所述内容需与 DNA 甲基化、骨质疏松、运动、骨代谢等方面密切相关；②同一领域选择近期或在权威杂志上发表的文章。

排除标准：①重复性研究；②与文章内容无关的研究。

经过中英文关键词分别组合检索，排除不符合纳入标准的文献，最终入选 52 条文献进行综述。文献检索流程图见图 1。

2 结果 Results

2.1 DNA 甲基化 DNA 甲基化是表观遗传学的研究热点，分为维持甲基化和从头甲基化，呈现甲基在供体分子间的级联反应的一碳代谢过程。S-腺苷甲硫氨酸在由 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMTs) 催化的反应中将其甲基基团供给胞嘧啶，此位点位于 CpG 岛二核苷酸胞嘧啶的 5 号碳原子

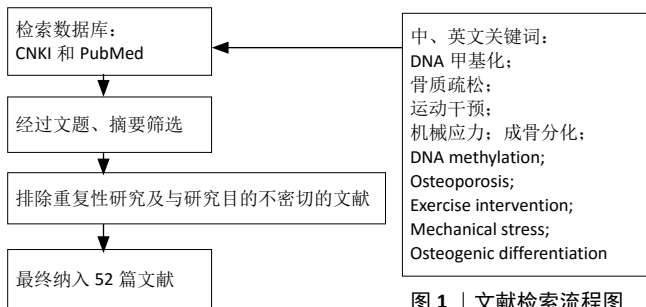


图 1 | 文献检索流程图

(C5)^[6]。CpG 岛是基因中胞嘧啶 (C) 和鸟嘌呤 (G) 大量存在的二核苷酸重复序列, C 和 G 通过磷酸二酯 (p) 相连, CpG 岛与基因启动子的功能高度相关。研究证实, 基因启动子中 CpG 岛密度越高, DNA 甲基化程度对其转录水平的制约就越强。

DNA 甲基化可以通过多种方式调控基因表达: ①发生甲基化的 DNA 与转录因子结合发生障碍。由于在 DNA 双螺旋结构的大沟内存在含有 CpG 位点的启动子序列, 且该处是许多转录因子与 DNA 集合的位置, 当此处发生甲基化后, 一些对甲基化敏感的转录因子如核转录因子、转录因子 2 等与识别位点的结合发生障碍, 这会抑制转录过程, 干扰基因表达。②甲基 CpG 结合蛋白对基因表达的抑制或沉默。甲基 CpG 结合蛋白是特异性转录抑制物, 并以蛋白复合体的形式发挥作用, 包括甲基 CpG 结合蛋白 1 和甲基 CpG 结合蛋白 2 两种甲基 CpG 结合蛋白复合体, 而后者对单一的甲基化 CpG 位点高度亲和, 当转录因子的启动子识别序列中的 CpG 位点发生甲基化时, 其会与转录因子竞争甲基化结合位点, 从而导致基因表达受影响。③DNA 甲基化引起染色质结构改变, 抑制基因表达。发生 DNA 甲基化后, 组蛋白 H3, H4 氨基端赖氨酸残基出现去乙酰化, 核小体结构受到影响, 并改变组蛋白 H1 的连接活性来调节基因活性。另外, DNA 甲基化会阻止转录因子进入而诱导染色质失活, 防止染色质活化^[7]。一般认为, 高甲基化的 DNA 序列表达水平低; 反之, 表达水平高。DNA 甲基化水平在甲基化和去甲基化的共同作用下保持动态平衡, 而衰老、饮食、运动、内分泌干扰物、细菌感染等外界环境因素会引起 DNA 甲基化发生变化, 从而引起各种疾病的发生。

2.2 DNA 甲基化与骨质疏松症

2.2.1 单基因水平中的 DNA 甲基化

成骨细胞来源于间充质干细胞分化, 在间充质干细胞成骨分化过程中往往伴随着关键因子的 DNA 甲基化变化, 目前研究较多的包括 Runx2、Osx、碱性磷酸酶、骨形态发生蛋白 2 等。Runx2 在间充质干细胞成骨分化中起初始调节器的作用, 随后通过 Osx 调节, 碱性磷酸酶与骨钙素分别代表早期与晚期成骨标志物。XU 等^[8]通过分离人骨髓来源的间充质干细胞和脂肪组织来源的间充质干细胞并诱导其向成骨分化, 结束后检测到骨髓间充质干细胞中 Runx2 表达上升, 且 Runx2 基因启动子 CPG 位点甲基化水平降低, 而成脂相关基因 PPAR γ 表达降低, 并出现高甲基化。王剑等^[9]使用鹿茸中药复方来处理骨质疏松症大鼠, 发现鹿茸中药复方能有效降低骨组织 Runx2、Osx 启动

子甲基化水平, 从而增加骨形成, 提高骨密度。WAKITANI 等^[10]对小鼠原代间充质干细胞培养过程中, 观察到 Runx2 表达与其甲基化率呈负相关, 该甲基化区域位于 Runx2 启动子 -2.7 至 -2.2 kb, 是新发现的差异甲基化区域, 在诱导间充质干细胞向成骨分化后, Runx2 此区域甲基化修饰程度降低且表达上升, 这与其他研究相似^[11], 提示 Runx2 甲基化变化对成骨分化有重要作用。但 HAGH 等^[12]在人骨髓间充质干细胞成骨分化中并未发现 Runx2 启动子出现甲基化, 反观其下游靶点 Osx 启动子出现动态甲基化变化, 这与上述研究相矛盾, 但这是否说明 Osx 的 DNA 甲基化修饰在间充质干细胞成骨分化中起主要作用仍有待研究, 造成此差异原因可能与实验对象、环境等有关。

此外, 骨形态发生蛋白 2 作为关键骨形成因子, 能在体外刺激成骨细胞分化和成骨结节形成, 以及在体内刺激成骨。研究表明, 骨形态发生蛋白 2 也受 DNA 甲基化调控。RAJE 等^[13]发现, 与健康人群相比, 骨质疏松症患者骨形态发生蛋白 2 启动子区甲基化水平较高, 使其转录活性降低, 同时降低了骨形成标志物表达, 在使用 DNA 甲基化抑制剂处理之后骨形态发生蛋白 2 表达上调^[14]。另外, 一些其他的成骨特异性基因如远端缺失同源盒基因 5、骨钙素等在脂肪源性干细胞成骨分化中, 其启动子区发生去甲基化并伴随着基因表达上调, 在此过程中还伴随着生长阻滞和 DNA 损伤诱导蛋白的表达增加, 在降低 DNA 损伤诱导蛋白表达后, 成骨特异性基因启动子甲基化水平升高, 导致转录活性降低并抑制了脂肪源性干细胞向成骨分化, 这说明 DNA 损伤诱导蛋白参与了 DNA 甲基化对基因表达的调控过程^[15]。

骨硬化蛋白是硬化蛋白基因编码由骨细胞通过旁分泌作用于成骨细胞的功能蛋白, 对骨组织具有高度选择性, 可负性调节骨形成^[16]。硬化蛋白基因也受 DNA 甲基化调控, 其基因 -581~+30 区富含 CPGs, 在成骨细胞中该区域呈现高甲基化, 而随着向骨细胞转变其甲基化水平逐渐降低, 通过使用 5- 氮胞苷 (甲基转移酶抑制剂) 处理后硬化蛋白基因表达增加并促进成骨细胞向骨细胞转变^[17]。研究表明, 绝经后骨质疏松患者血浆硬化蛋白甲基化阳性率显著低于无骨质疏松者, 且前者硬化蛋白 mRNA 相对表达量明显高于后者^[18], 表明硬化蛋白基因甲基化异常导致骨质疏松症产生。此外, Osx 等成骨转录因子可通过与硬化蛋白中 CG 富集点结合来活化硬化蛋白, 对其进行正向调控进而影响骨形成过程^[19], 而 DNA 甲基化又在此过程中发挥重要作用, 干扰素调节因子 8 是调控破骨细胞分化的关键负性调节因子, DNMT3a 能通过增加干扰素调节因子 8 远侧调节元件的甲基化进而抑制干扰素调节因子 8, 同时 S- 腺苷蛋氨酸浓度增加能促进其甲基化^[20]。调节性 T 细胞可抑制破骨细胞分化及活性, 影响骨代谢^[21]。调节性 T 细胞调节骨代谢依赖于 Foxp3 基因的正常表达, 而 Foxp3 基因保守非编码序列 2 去甲基化有助于其稳定表达^[22], 研究表明, 骨质疏松症患者调节性 T 细胞中 Foxp3 保守非编码序列 2 去甲基化水平远远低于观察组^[22]。

上述研究表明, DNA 甲基化在间充质干细胞成骨分化以及成骨细胞、破骨细胞增殖分化中起重要作用。

2.2.2 Wnt/ β -catenin、Notch 信号通路与 DNA 甲基化 Wnt 信号通路在干细胞成骨分化以及骨形成代谢中发挥重要作用。在经典 Wnt/ β -catenin 通路中, Wnt 蛋白与膜受体卷曲蛋白 (Frizzled, Fz) 结合, 经过一系列蛋白的相互作用, 使 β -catenin 稳定沉聚, 并在细胞核内对 T 细胞转录因子和淋巴增强因子发生作用, 通过启动 Runx2 及下游基因 *Osx*、远端缺失同源盒基因 5 等的表达来促进成骨细胞分化、成熟^[23]。研究表明, Wnt 信号通路相关基因受到 DNA 甲基化调控。在对骨质疏松性髌部骨折患者和髌骨关节炎患者 Wnt 相关基因表达及其甲基化水平进行检测时, 发现骨折患者 Wnt 通路中的 FZD10、TBL1X、CSNK1E、WNT8a、CSNK1A1L、SFRP4 基因甲基化水平高于后者, 导致 Wnt 通路活性降低并抑制了成骨细胞分化成熟^[24]。 β -catenin 是 Wnt 信号通路靶基因, 通过建立骨髓间充质干细胞成骨分化诱导体系, 发现在成骨诱导 3d 后 β -catenin 基因表达明显上调, 经甲基化特异性 PCR 法检测发现 β -catenin 基因甲基化水平明显下降, 而 β -catenin 基因表达增加促进了骨髓间充质干细胞向成骨分化^[25]。WU 等^[26]研究发现, 股骨头坏死患者的间充质干细胞中 Wnt 受体 Frizzled1 基因转录水平较低, 同时伴有 Frizzled1 基因启动子异常高甲基化, 这使得 Wnt/ β -catenin 通路功能被抑制并直接影响间充质干细胞成骨分化及骨形成。另外, 在该过程中 Wnt 信号通路共受体酪氨酸激酶样孤核受体 2 可通过诱导成骨转录因子 *Osx* 改变干细胞分化表型, 而其自身表达增加并伴随 DNA 甲基化水平降低^[27]。综上所述, Wnt/ β -catenin 信号通路相关的基因甲基化水平改变, 会影响其表达进而对骨形成产生影响。

Notch 信号通路广泛存在于哺乳动物细胞内, 由 5 种配体 (Delta-like-1, Delta-like-3, Delta-like-4, Jagged-1 和 Jagged-2)、4 种受体 (Notch1-4)、下游传导靶基因和调节分子组成, 当其受体与配体结合后, Notch 受体释放部分胞外片段, 胞内部分经 γ -分泌酶 (γ -secretase) 酶切后释放可溶性的 Notch 胞内段 (Intracellular domain of Notch, NICD)。NICD 转移至细胞核内, 与转录抑制因子结合后即成为转录活化因子, 最终影响细胞的分化、增殖和凋亡^[28]。研究表明, Notch 信号通路对成骨分化具有抑制和促进的双重作用, 且 Notch1、Notch4、Delta-like-1 等受体或配体受 DNA 甲基化调控。Notch1 可抑制间充质干细胞成骨分化, ZHOU 等^[29]在研究中发现, 诱导成骨分化 14 d 后, 钙化性主动脉瓣疾病和人主动脉瓣间质细胞中 Notch1 启动子甲基化水平显著升高, 导致 Notch1 表达下调进而促进了成骨分化, 增加了钙化程度, 而使用 5-氮胞苷处理之后则抑制了成骨分化。另一研究中, HADJI 等^[30]在钙化性主动脉瓣疾病中观察到长链非编码 RNA H19 表达增加, 且启动子区甲基化降低, 进一步分析表明, H19 通过阻止 P53 募集到其启动子区进而沉默 Notch1, 促进了成骨分化。

目前关于 DNA 甲基化通过 Notch 信号通路来调节骨代谢的研究较少。研究表明, Notch1、Notch4 基因均存在甲基化,

且 Delta-like-1 基因启动子的超甲基化可调控其表达, 当这些配体或受体启动子甲基化水平改变时会激活 Notch 信号通路, 引起下游信号分子 HES1 上调, 进而对骨形成产生影响^[31]。此外, Wnt 和 Notch 信号通路并不完全独立, Wnt 信号通路中的糖原合成酶激酶 3 β 和 Notch 通路可相互作用, 通过结合和磷酸化 Notch2 来调节 Notch 的活化。Wnt 信号通路在成骨调控中其目的基因的表达依赖 Runx2 的活性, Notch 信号通路目的基因 HEY1 编码的蛋白质可对抗并降低 Runx2 的转录活性, 进而抑制 Wnt 目的基因的表达, 而当 Notch1 启动子 DNA 甲基化水平升高时, 会导致其表达降低而使 NICD 释放减少, 进而促进 Wnt/ β -catenin 信号通路激活, 促进成骨分化^[29-30, 32]。基于以上分析, 作者认为 Notch1 基因甲基化水平降低时会促进其表达, 发挥其对 Wnt 通路的抑制作用, 从而抑制成骨分化; 当 Notch1 基因甲基化水平升高时则会抑制其表达, 从而对骨形成产生积极作用, 另外, lncRNA 在其中也发挥一定作用。

2.2.3 OPG/RANKL/RANK 系统与 DNA 甲基化 OPG/RANKL/RANK 系统是调节骨吸收代谢的关键途径分子轴。成骨细胞分泌的 RANKL 可以激活破骨细胞上的核因子 κ B 受体活化因子 (Receptor activator of nuclear factor kappa B, RANK) 并与其结合, 在肿瘤坏死因子受体相关因子的参与下激活信号转导, 从而促进破骨细胞成熟, 增强骨吸收作用, 而骨保护素可以抑制 RANKL 与 RANK 的结合, 降低骨吸收^[33]。目前研究表明, 肿瘤坏死因子受体相关因子参与 OPG/RANKL/RANK 系统调节骨代谢的可能途径为: ①核转录因子 κ B 途径, 首先 RANK 会与肿瘤坏死因子受体相关因子 6 结合, 激活核转录因子 κ B 诱导激酶并使得核转录因子 κ B 转移至细胞核上调 c-Fos 的表达, 使得破骨细胞生成基因开始转录, 并诱导破骨细胞成熟; ② JNK 途径, RANK 与肿瘤坏死因子受体相关因子 6 结合后激活细胞外信号调节激酶 (Extracellular signal-regulated kinase, ERK)、丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK), 并诱导 c-Jun/Fos 活化蛋白 1 (AP-1) 活化, 使 c-Jun 磷酸化, c-Fos 表达增加, 最终使破骨前体细胞功能活跃, 分化生成破骨细胞; ③蛋白激酶 B (Protein kinase B, PKB, 又称为 Akt) 途径, RANK 与肿瘤坏死因子受体相关因子 6 结合, 激活磷脂酰肌醇, 活化 Akt, 参与核转录因子 κ B 活化, 促进破骨细胞成熟^[34]。

DNA 甲基化可以调控 OPG/RANKL/RANK 系统影响骨代谢。在对小鼠 ST2 的骨髓间充质干细胞研究中发现, 诱导分化的骨髓间充质干细胞中 RANKL 基因转录起始位点周围的 CPG 出现甲基化, 导致启动子沉默, 抑制了 RANKL 基因表达, 影响成骨细胞分化。进一步实验表明, 仅 RANKL 基因启动子 TATA-box 上游的单一 CpG 位点的甲基化就可调节其表达, 进而影响破骨细胞分化^[35]。DELGADO-CALLE 等^[36]使用 5-氮胞苷处理高甲基化的 HEK-293 细胞, 发现 RANKL 和骨保护素表达明显上调, 而此变化会影响破骨细胞形成, 影响骨稳态。另外, DNMT3a 能够通过偶联 S-腺苷甲硫氨酸介导的代谢

途径,抑制抗破骨细胞形成基因的表达,调节破骨细胞分化,且此代谢过程涉及 RANKL 通路相关基因甲基化的改变。虽然 HUSAIN 等^[37]曾表示在人体研究中尚未发现骨质疏松症患者组间 RANKL 基因的甲基化差异,但 WANG 等^[38]通过分离非骨质疏松/骨质疏松性骨折组织,对骨保护素和 RANKL 启动子的 CPG 岛中 CPG 位点甲基化状态进行检测,结果发现,骨质疏松症组 RANKL 表达显著高于非骨质疏松症组,而 RANKL 基因启动子的甲基化水平远远低于非骨质疏松症组。以上分析表明,RANKL 基因甲基化水平降低会促进其表达,使 OPG/RANKL 降低并提高了破骨细胞活性,促进了骨吸收,导致骨流失加速并产生骨质疏松症(图 2)。

综上所述,在经典的 Wnt/ β -catenin、Notch 信号通路、OPG/RANKL/RANK 系统中,部分受体或配体及下游因子存在 DNA 甲基化,如 β -catenin、Frizzled、Notch1、Jag-1、RANKL、以及 Runx2、Ox、骨桥蛋白等众多下游基因,这些基因在骨质疏松症体内往往出现甲基化异常,导致骨形成受阻以及骨吸收增加,骨代谢失衡。而除了 Wnt/ β -catenin 与 Notch 信号通路之间的交互影响外,Notch 信号通路中的 Notch1 也可促进骨保护素表达,进而抑制破骨细胞形成,减少骨吸收^[39]。

2.3 DNA 甲基化在运动影响骨质疏松症中的作用研究

2.3.1 运动产生的机械效应与骨质疏松症 运动引起的肌肉收缩、血流速度改变、重力变化等宏观负荷可在骨骼内转变为机械刺激^[40],这种刺激是调控骨转换、生长、矿化的关键调节器,合理运动产生的力学刺激能有效地刺激骨的生长。体外研究表明,在细胞水平上,机械负荷通过作用于骨引起骨髓腔产生压力及流动力,从而给间充质干细胞刺激并引起其向成骨分化。前面说过, β -catenin 是 Wnt 信号通路的核心转导因子,研究证实,无论体内、体外机械应力刺激都能促进 β -catenin 蛋白表达进而激活 Wnt 信号通路,促进骨形成,并且随着 Wnt 信号通路的激活,成骨细胞对外源刺激将变得更加敏感^[41]。生长期小鼠在经过跑台运动后,相较于未运动组,其内源性甲状旁腺素和雌激素浓度提高,使得 LRP5 基因和 β -catenin 蛋白表达上升并导致骨矿含量升高^[42]。对小鼠骨髓间充质干细胞施加 2% 的牵张力干预后,GSK3 β 活性被抑制,降低了对 β -catenin 降解作用,使 β -catenin 大量聚集于细胞质并转移入核,从而激活 Wnt 信号通路^[43]。

除了间充质干细胞外,流体剪切应力能诱导成骨细胞中骨形态发生蛋白受体表达进而激活 Smad1/5,上调白细胞介素 11 的表达最终促进成骨细胞分化。也有研究发现,采用 10%、频率为 1 Hz 强度的机械应力能通过骨形态发生蛋白受体 I 来激活 Smad1/5,进而上调 Runx2 来促进骨形成^[44]。通过对 MC3T3-E1 成骨细胞系施加不同形变幅度和时间的牵张应力干预,结果发现,中等强度(3%和 6%)和中等时间(4 h)的干预能有效促进碱性磷酸酶、Runx2、骨钙素、Ox 等 mRNA 表达升高,并降低硬化蛋白 mRNA^[45],使得 Wnt 信号通路被激活,从而促进骨形成。GAO 等^[46]也有相似发现,

机械振动(0.5 gn, 45 Hz)促进了成骨细胞增殖和细胞外基质矿化,改善了原代成骨细胞中细胞骨架的排列,进一步检测到碱性磷酸酶、骨形态发生蛋白 2、骨保护素 mRNA 表达增加,硬化蛋白表达被抑制,另外还检测到 Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达上升,这种变化促进了骨形成。另外,骨保护素大鼠经负重爬梯训练后,骨组织中骨保护素表达上升而 RANKL 表达下降,OPG/RANKL 比例上升,从而抑制破骨细胞分化,使骨吸收/骨形成逆向迁移,对骨质疏松症产生改善作用^[47]。

2.3.2 DNA 甲基化在运动调控骨质疏松症中的作用机制 目前,运动在防治某些疾病如 2 型糖尿病、肥胖、阿尔茨海默症中受到越来越多重视,而研究表明,运动能通过调节相关基因甲基化水平改善这些疾病。何标等^[48]对 APP/PS1 转基因小鼠施加 10 周跑台运动后,小鼠海马中 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b mRNA 表达显著增加,造成小鼠海马甲基化水平升高,降低了 APP/PS1/A β 42 等蛋白表达水平,从而提高小鼠空间记忆能力。田雪文^[49]分别采用低氧运动和常氧运动处理肥胖大鼠后发现,低氧运动能有效降血脂、调节脂代谢进而降低体质量、体脂,对相关因子 mRNA 和蛋白表达进行检测后发现,与脂代谢相关的基因表达出现显著变化,并用 RRBS 技术检测到两种运动方式使大鼠全基因组中 675 个基因的 CPG 岛发生显著的甲基化变化,其中 Wnt 信号通路相关基因的 mRNA 表达和甲基化最明显。这些研究直接证明了运动可以通过改变 DNA 甲基化来对机体产生影响。

研究证实,DNA 甲基化在运动影响骨代谢中具有重要调控作用。将小鼠体内分离出来的间充质干细胞置于振荡流液中进行 3 h 机械刺激,经检测,在排除生物化学诱导分化的影响后,骨桥蛋白表达增加了 2.3 倍,且启动子甲基化下降了 35%,并且 3 周的生化诱导分化所引起的骨桥蛋白低甲基化与 3 h 机械刺激引起的低甲基化差异不大,证明了机械刺激较生化调节来说是一种较强的调节手段。该实验首次验证了机械微环境能通过降低骨桥蛋白启动子甲基化水平来上调其表达,并促进间充质干细胞的迁移进而增加成骨分化的潜力^[50]。GNAS 基因与多种骨疾病有关,GNAS1 基因编码的刺激性 G 蛋白 α 亚基(Stimulatory protein subunit α , Gs α)可通过经典 Wnt/ β -catenin 信号通路以及 Hedgehog 信号途径对成骨分化和骨形成产生影响。VLAIKOU 等^[51]对从成年男性和女性供体获得的 AT-MSC 施加循环机械拉伸,15d 后从细胞形态上观察到成骨率明显升高,并检测到 NESP CpG24,GNASXL CpG27 和 GNASXL CpG26 三个 CPG 位点的总体甲基化水平在 15 d 后显著降低,这促进了人脂肪组织多能基质细胞(hAT-MSC)成骨分化。

综上,以上研究证实了长期的机械应力能诱导 GNAS 基因甲基化水平改变,从而诱导人脂肪组织多能基质细胞(hAT-MSC)向成骨分化,促进骨形成。非受体酪氨酸蛋白激酶和非受体酪氨酸激酶作为影响骨形成代谢的重要因子,可通过抑制骨桥蛋白、Ox 以及 Runx2 等骨形成基因来调节骨量,非受体酪氨酸蛋白激酶或非受体酪氨酸激酶基因缺失小鼠都表现出高骨量^[52]。非受体酪氨酸蛋白激酶和非受体酪氨酸激

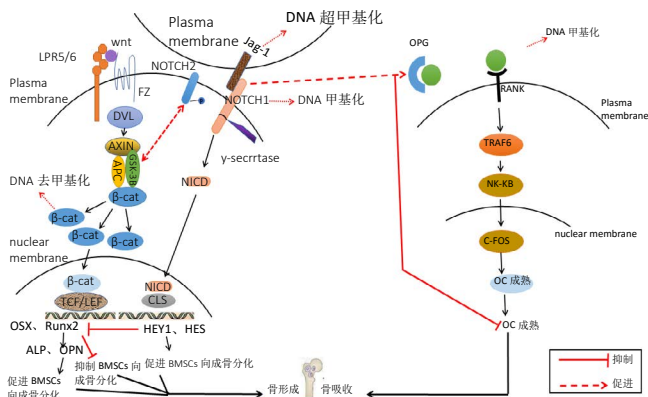


图2 | 部分骨代谢途径中的 DNA 甲基化

酶可以响应对骨骼的机械负荷, HUM 等^[52]通过对 MC3T3 成骨细胞施加流体剪切应力后发现, 非受体酪氨酸蛋白激酶和非受体酪氨酸激酶被激活并大量转移入核并与甲基 CPG 结合域蛋白 2(MBD2) 结合, 后者再与基因启动子中的 CPG 岛结合导致基因沉默, 该过程同时还增加了骨桥蛋白与环氧化酶 2 表达, 促进了骨形成。

综上所述, DNA 甲基化引发的骨代谢紊乱导致骨质疏松症发生, 而运动防治骨质疏松症中伴随着 β -catenin、Osx、骨桥蛋白、Runx2、RANKL、Notch1 等基因的表达改变。研究表明, 运动可通过 DNA 甲基化来防治多种疾病, 如肥胖、2 型糖尿病、阿尔茨海默症等。体外实验证明, 外界产生的机械负荷可以作用于间充质干细胞, 通过降低骨桥蛋白、GNAS1 等骨形成基因的甲基化水平来上调其表达进而促进间充质干细胞成骨分化。因此, 结合相关研究, 运动可能通过 DNA 甲基化来影响骨质疏松症的几个位点: 运动能使硬化蛋白基因发生甲基化, 下调其表达从而减少对 Wnt 通路的抑制, 上调 β -catenin 表达进而促进骨形成; 运动能使 Notch1 和 Jag-1 发生去甲基化并促进其表达, 激活 Notch 通路, 上调下游信号分子 HES1 表达, 进而促进骨形成, 同时 Notch1 表达增加会促进骨保护素表达上升, 减弱骨吸收; 运动使 RANKL 甲基化水平提高并降低其表达, 使 OPG/RANKL 上升, 协同 Notch 通路抑制破骨细胞活性, 减弱骨吸收 (图 3)。

3 研究展望 Prospects

DNA 甲基化作为生物医学领域的研究热点, 能通过 Runx2、Osx、硬化蛋白、RANKL、Wnt/ β -catenin 信号通路等基因调控骨代谢, 介导骨质疏松症发生。骨骼作为力学敏感组织, 能将运动产生的机械应力刺激转化为生物学信号作用于细胞, 引起受 DNA 甲基化调控的基因表达改变, 进而改善骨代谢。然而, 运动通过 DNA 甲基化来调节骨代谢进而影响骨组织, 最终改善骨质疏松症的直接研究却未见。作者通过整理文献资料发现, 机械应力刺激能作用于体外培养的间充质干细胞, 引起骨桥蛋白、GNAS1 等骨形成相关基因甲基化水平降低, 提高其表达, 从而促进间充质干细胞向成骨分化并增加骨形成的能力。此外, 关于运动如何影响 DNA

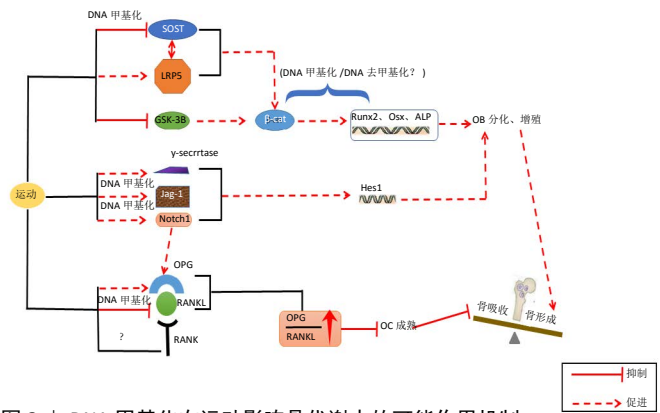


图3 | DNA 甲基化在运动影响骨代谢中的可能作用机制

甲基化的机制仍不清楚, 这将是作者后续的研究方向。而运动如何通过 DNA 甲基化来调节骨代谢进而影响骨质疏松症将是今后运动医学和体育科学领域的研究热点, 相信今后的研究能进一步揭示其机制, 为调控 DNA 甲基化进而调控骨代谢平衡提供新的理论依据和方法证据。

作者贡献: 研究设计为第一作者和通讯作者, 资料收集为全体作者, 第一作者撰写文章, 通讯作者审核。

经费支持: 该文章接受了“中国博士后科学基金资助 (2019M661957)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA 指南)。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 马远征, 王以朋, 刘强, 等. 中国老年骨质疏松症诊疗指南 (2018)[J]. 中国骨质疏松志, 2018, 24(12):1541-1567.
- [2] 周隆, 任兆舟, 张展, 等. 运动疗法对防治绝经后妇女骨质疏松症的疗效分析及对骨密度的影响 [J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(7): 1270-1273.
- [3] LETAROUILLY JG, BROUX O, CLABAUT A. New insights into the epigenetics of osteoporosis. Genomic. 2019; 111(4):793-798.
- [4] 胡晓青, 张辛, 代岭辉, 等. 骨髓间充质干细胞成骨分化过程中 Runx2 的表观遗传学修饰 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(2):150-155.
- [5] CHISATI EM, CONSTANTINOU D, LAMPIAO F. Management of reduced bone mineral density in HIV: pharmacological challenges and the role of exercise. Front Physiol. 2018; 7(9):1074.
- [6] CHEN R, REN L, CAI Q, et al. The role of epigenetic modifications in the osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells. Connect Tissue Res. 2019; 60(6):507-520.
- [7] 赵倩, 王巍, 孙野青. 植物 DNA 甲基化与基因表达的关联性研究进展 [J]. 生物技术通报, 2016, 32(4):16-23.

- [8] XU L, LIU Y, SUN Y, et al. Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: a comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):275.
- [9] 王剑, 李屹, 王实, 等. 基于骨组织 Runx2、Osterix 启动子甲基化探究鹿茸中药复方对去卵巢骨质疏松症大鼠的疗效机制 [J/OL]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2020:1-6.
- [10] WAKITANI S, YOKOI D, HIDAKA Y, et al. The differentially DNA-methylated region responsible for expression of runt-related transcription factor 2. *J Vet Med Sci.* 2017; 79:230-237.
- [11] 朱筱. 1、Runx2 甲基化状态变化对血管平滑肌细胞成骨样分化影响的研究 2、Vaspin 对成人成骨细胞凋亡的作用机制研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2012:34-50.
- [12] HAGH MF, NORUZINIA M, MORTAZAVI Y, et al. Different methylation patterns of RUNX2, OSX, DLX5 and BSP in osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell J.* 2015;17:71-82.
- [13] RAJE MM, ASHMA R. Epigenetic regulation of BMP2 gene in osteoporosis: a DNA methylation study. *Mol Biol Rep.* 2019;46(8):1667-1674.
- [14] FU B, WANG H, WANG J, et al. Epigenetic Regulation of BMP2 by 1,25-dihydroxyvitamin D3 through DNA Methylation and Histone Modification. *PLoS ONE.* 2013; 8(4):e61423.
- [15] 张瑞鹏. DNA 去甲基化在脂肪干细胞分化与红细胞发育中的作用研究 [D]. 浙江大学, 2011:33-39.
- [16] 张爽, 高艳虹. sclerostin 在骨代谢中的作用和机制 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2015, 35(4):589-593.
- [17] 牛亚丹, 林伊荷, 张汉清, 等. DNA 甲基化与骨代谢调节及骨质疏松症研究进展 [J]. 生命科学, 2020, 32(2):162-169.
- [18] 时宇博, 朱福良, 李立军, 等. 绝经后骨质疏松症患者血浆 SOST 表达变化及其与基因甲基化的关系 [J]. 山东医药, 2016, 56(16):35-37.
- [19] YANG F, TANG W, SO S, et al. Sclerostin is a direct target of osteoblast-specific transcription factor osterix. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;400(4):684-688.
- [20] 张丽君, 王艺璇, 胡泽兵, 等. 表观遗传学调控骨骼细胞功能的研究进展 [J]. 解放军医学院学报, 2019, 40(12):1199-1202+1206.
- [21] HONG L, KATHARINA SB, ANKE D, et al. Regulatory T cell-mediated anti-inflammatory effects promote successful tissue repair in both indirect and direct manners. *Front Pharmacol.* 2015;6:184.
- [22] 李子祺, 葛鸿庆, 王君鳌, 等. 外周血 CD4+T 细胞 Foxp3 基因 CNS2 去甲基化与绝经后骨质疏松症的关系 [J]. 实用医学杂志, 2018, 34(14):2329-2332.
- [23] DAO C, LIU, SI H, et al. Different effects of Wnt/ β -catenin activation and parathyroid hormone on diaphyseal and metaphyseal in the early phase of femur bone healing of mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2019; 46(7):652-663.
- [24] GARCÍA-IBARBIA C, DELGADO-CALLE J, CASAFont I, et al. Contribution of genetic and epigenetic mechanisms to Wnt pathway activity in prevalent skeletal disorders. *Gene.* 2013; 532(2):165-172.
- [25] 潘乐. 补肾药对 BMSCs 成骨与成脂分化及 β -catenin、PPAR γ 甲基化的影响 [D]. 陕西中医学院, 2014.
- [26] WU F, JIAO J, LIU F, et al. Hypermethylation of Frizzled1 is associated with Wnt/ β -catenin signaling inactivation in mesenchymal stem cells of patients with steroid-associated osteonecrosis. *Exp Mol Med.* 2019; 51(2): 23.
- [27] TARFIEI G, NORUZINIA M, SOLEIMANI M, et al. ROR2 promoter methylation change in osteoblastic differentiation of mesenchymal Stem Cells. *Cell J.* 2011; 13(1): 11-15.
- [28] LEE S Y, LONG F. Notch signaling suppresses glucose metabolism in mesenchymal progenitors to restrict osteoblast differentiation. *J Clin Invest.* 2018;128(12):5573-5586.
- [29] ZHOU Y, LI J, ZHOU K, et al. The methylation of Notch1 promoter mediates the osteogenesis differentiation in human aortic valve interstitial cells through Wnt/ β -catenin signaling. *J Cell Physiol.* 2019; 234(11):20366-20376.
- [30] HADJI F, BOULANGER M, GUAY S, et al. Altered DNA Methylation of Long Noncoding RNA H19 in Calcific Aortic Valve Disease Promotes Mineralization by Silencing NOTCH1. *Pubmed.* 2016;134(23):1848-1862.
- [31] 傅涛, 李佳欢, 蔡逊. Notch 信号通路在胃肠道肿瘤机制研究中的新进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2015, 21(10):852-855.
- [32] 任磊, 代光明, 林泉, 等. 骨细胞 Wnt/ β -Catenin 通过 Notch 信号促进 BMSCs 成骨分化 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(5):600-605.
- [33] ROCHETTE L, MELOUX A, RIGAL E, et al. The Role of Osteoprotegerin in Vascular Calcification and Bone Metabolism: The Basis for Developing New Therapeutics. *Calcif Tissue Int.* 2019;105(3):239-251.
- [34] 李子怡, 李玉坤. OPG/RANK/RANKL 信号通路在骨质疏松症中的研究进展和应用 [J]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2017, 3(2): 124-128.
- [35] KITAZAWA S, KITAZAWA R. Epigenetic control of mouse receptor activator of NF- κ B ligand gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293(1):126-131.
- [36] DELGADO-CALLE, JESÚS, FERNÁNDEZ, et al. Role of DNA methylation in the regulation of the RANKL-OPG system in human bone. *Epigenetics.* 2012; 7(1):83-91.
- [37] HUSAIN A, JEFFRIES MA. Epigenetics and Bone Remodeling. *Curr Osteoporosis Rep.* 2017;15(5):450-458.
- [38] WANG P, CAO Y, ZHAN D, et al. Influence of DNA methylation on the expression of OPG/RANKL in primary osteoporosis. *Int J Med Sci.* 2018; 15(13):1480-1485.
- [39] 李永贤, 张顺聪, 郭丹青. Notch 信号通路调控 OPG/RANKL/RANK 系统对骨质疏松椎体骨折影响的研究进展 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2015, 23(11):73-77.
- [40] 胡晓馨, 李世昌, 孙朋. 生物力学因子 YAP/TAZ 与骨代谢的关系 [J]. 生命科学, 2019, 31(6):602-608.
- [41] 全晓阳, 张玲莉, 郭健民, 等. 运动对骨代谢信号通路影响的研究进展 [J]. 中国康复理论与实践, 2016, 22(12):1425-1429.
- [42] 杨念恩. 不同方式运动对生长期小鼠骨合成代谢和 Wnt 信号通路的影响 [D]. 上海: 华东师范大学, 2014.
- [43] CASE N, THOMAS J, XIE Z, et al. Mechanical input restrains PPAR γ expression and action to preserve mesenchymal stem cell multipotentiality. *Bone.* 2013; 52(1):454-464.
- [44] RATH B, NAM J, DESCHNER J, et al. Biomechanical forces exert anabolic effects on osteoblasts by activation of SMAD 1/5/8 through type 1 BMP receptor. *Biorheology.* 2011; 48(1):37-48.
- [45] 陈熙, 郭健民, 元宇, 等. 不同牵张应力对成骨细胞 MC3T3-E1 分化及 Wnt 信号转导通路的影响研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(1): 9-13.
- [46] GAO H, ZHAI M, WANG P, et al. Low level mechanical vibration enhances osteoblastogenesis via a canonical Wnt signaling associated mechanism. *Pubmed.* 2017;16(1):317-324.
- [47] 刘晨涛, 张娟娟, 苗华, 等. 负重爬梯运动调节去卵巢大鼠 OPG/Ikka/Runx2 基因表达以及对股骨结构和生物力学的影响 [J]. 中国运动医学杂志, 2019, 38(4):296-304.
- [48] 何标, 徐波, 张宪亮. 运动通过提高 DNA 甲基化水平改善阿尔茨海默病小鼠空间学习记忆能力 [J]. 天津体育学院学报, 2016, 31(4): 333-339.
- [49] 田雪文. 基于 iTRAQ 的低氧运动肥胖大鼠肝脏蛋白质组学及 Wnt/ β -catenin 信号通路的作用机制研究 [D]. 上海: 上海体育学院, 2018.
- [50] ARNSDORF EJ, TUMMALA P, CASTILLO AB, et al. The epigenetic mechanism of mechanically induced osteogenic differentiation. *Biomech.* 2010;43(15):2881-2886.
- [51] VLAIKOU AM, KOUROUPIS D, SGOUROU A, et al. Mechanical stress affects methylation pattern of GNAS isoforms and osteogenic differentiation of hAT-MSCs. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017; 1864(8):1371-1381.
- [52] HUM JM, DAY RN, BIDWELL JP, et al. Mechanical Loading in Osteocytes Induces Formation of a Src/Pyk2/MBD2 Complex That Suppresses Anabolic Gene Expression. *Plos One.* 2014; 9(5):e97942.