

MiR-106b-5p 调控老年骨质疏松性骨折的分子网络

<https://doi.org/10.12307/2022.039>王海龙¹, 李龙¹, 伊力哈木·托合提¹, 刘旭², 那次克道尔吉², 陈洪涛², 崔泳³

投稿日期: 2020-09-28

送审日期: 2020-09-30

采用日期: 2020-12-09

在线日期: 2021-06-02

中图分类号:

R459.9; R318; R683

文章编号:

2095-4344(2022)02-00239-06

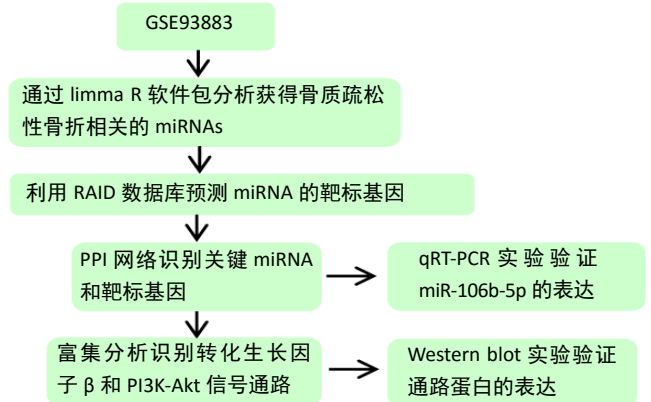
文献标识码: B

文章快速阅读:

文章特点一

△ MiR-106b-5p 可能是调控老年骨质疏松性骨折基因表达的重要转录因子;

△ MiR-106b-5p 的分子调控机制可能与 PI3K-Akt 和转化生长因子 β 信号通路有关。



文题释义:

老年骨质疏松性骨折: 骨质疏松症是最常见的全身性和代谢性骨骼疾病, 骨质疏松性骨折是继发于骨质疏松症、低能量暴力导致的骨折。伴随中国进入老年社会, 骨质疏松性骨折发病率逐年快速升高, 逐渐成为骨质疏松症患者的首发症状和就诊原因。

MicroRNAs: MicroRNAs 在多种生物功能中的关键调节作用是一个成熟的概念, 其与多种生理和病理条件的关系也在推动 MicroRNAs 作为生物标志物的临床应用。MicroRNAs 的识别应该是骨质疏松性骨折的诊断学和治疗学中向前迈出的重要一步。新的生物标记物对于改善骨质疏松性骨折患者的治疗是可取的。

摘要

背景: 骨质疏松性骨折是与年龄有关的疾病, 由于人口老龄化, 其发病率和患病率不断上升。

目的: 鉴定 miRNA 与老年骨质疏松性骨折有关。

方法: 通过 limma 包分析 GSE93883 中骨质疏松性骨折相关的差异表达 miRNA; 通过 RAID 数据库预测差异表达 miRNA 的靶标基因, 并通过 PPI(蛋白质-蛋白质相互作用)网络识别关键 miRNA 及靶标基因; 富集分析识别靶标基因参与的生物功能和信号通路。最后, 收集 5 例老年骨质疏松性骨折和 5 例老年非骨质疏松性骨折患者的骨组织, 利用 qPCR 和 Western blot 验证关键 miRNA 及信号通路。

结果与结论: ① 共获得 21 个骨质疏松性骨折相关的差异表达 miRNA 并预测得到 530 个靶标基因; 通过 PPI 网络鉴定 miR-106b-5p 为关键调控基因, 其靶标基因主要与 MAPK 活性的激活等生物功能以及 PI3K-Akt 和转化生长因子 β 信号通路相关; ② qPCR 结果验证了 miR-106b-5p 在老年骨质疏松性骨折骨组织中的表达较对照骨组织显著下调 ($P < 0.05$); Western blot 结果显示 PI3K-Akt 和转化生长因子 β 信号通路在老年骨质疏松性骨折中被激活; ③ 提示: miRNA 参与老年骨质疏松性骨折, 并与 PI3K-Akt 和转化生长因子 β 信号通路相关。miR-106b-5p 可能抑制骨质疏松性骨折的发生, 并成为潜在的标志物和治疗靶标。

关键词: 骨质疏松性骨折; miR-106b-5p; PI3K-Akt; 转化生长因子 β ; 差异表达

Molecular network of miR-106b-5p regulating osteoporotic fracture in the elderly

Wang Hailong¹, Li Long¹, Yilihamu Tuoheti¹, Liu Xu², Nacikedaoerji², Chen Hongtao², Cui Yong³¹Department of Orthopedics, the Seventh Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China;²Department of Sports Injury, the Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830010, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China;³Department of Orthopedics, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Wang Hailong, Department of Orthopedics, the Seventh Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Cui Yong, Department of Orthopedics, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China¹新疆医科大学第七附属医院骨科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000; ²新疆医科大学第六附属医院运动损伤科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830010; ³新疆医科大学第五附属医院骨科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

第一作者: 王海龙, 新疆医科大学第七附属医院骨科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

通讯作者: 崔泳, 新疆医科大学第五附属医院骨科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

<https://orcid.org/0000-0001-5670-4718> (崔泳)

基金资助: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2017D01C276), 项目负责人: 崔泳

引用本文: 王海龙, 李龙, 伊力哈木·托合提, 刘旭, 那次克道尔吉, 陈洪涛, 崔泳. MiR-106b-5p 调控老年骨质疏松性骨折的分子网络 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(2):239-244.



Abstract

BACKGROUND: Osteoporotic fractures are age-related diseases, with increasing incidence and prevalence due to the aging population.

OBJECTIVE: To identify whether miRNA is associated with osteoporotic fracture.

METHODS: The differential expression of miRNA (DEM) related to osteoporotic fracture in GSE93883 was analyzed by limma package. The target genes of differentially expressed miRNA were predicted by RAID database, and the key miRNAs and target genes were identified by protein-protein interaction network. Enrichment analysis identified the biological functions and signaling pathways involved in target genes. Finally, qPCR and western blot were used to verify the key miRNAs and signal pathways in bone tissue of five elderly patients with osteoporotic fractures and five elderly patients with non-osteoporotic fractures.

RESULTS AND CONCLUSION: A total of 21 differentially expressed miRNAs related to osteoporotic fracture were obtained and 530 target genes were predicted. miR-106b-5p was identified as a key regulatory gene by protein-protein interaction network. The target genes were mainly related to the activation of MAPK activity, PI3K-Akt signaling pathway and transforming growth factor β signaling pathway. In addition, qPCR results confirmed downregulation of miR-106b-5p in elderly osteoporotic fracture ($P < 0.05$). Western blot results showed that PI3K-Akt and transforming growth factor β signaling pathways were significantly activated in elderly osteoporotic fractures. Therefore, miRNA is involved in elderly osteoporotic fracture and is associated with PI3K-Akt and transforming growth factor β signaling pathways. miR-106b-5p may inhibit the occurrence of osteoporotic fractures and become a potential marker and therapeutic target.

Key words: osteoporotic fracture; miR-106b-5p; PI3K-Akt; transforming growth factor β ; differential expression

Funding: the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2017D01C276 (to CY)

How to cite this article: WANG HL, LI L, TUOHETI Y, LIU X, NACIKEDAOERJI, CHEN HT, CUI Y. Molecular network of miR-106b-5p regulating osteoporotic fracture in the elderly. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2022;26(2):239-244.

0 引言 Introduction

骨质疏松症是临床最常见的骨骼疾病之一，它可以在任何年龄发生。骨质疏松症的主要特点是骨量和质量的下降，使患者容易发生骨质疏松性骨折（脆性骨折），造成创伤^[1]。骨质疏松症在老龄人口中普遍存在，并已成为世界范围内健康威胁的主要因素之一。随着社会经济的快速改善，人类预期寿命的延长和出生率的降低，中国人口在过去几十年中已大幅老龄化，导致骨质疏松等与老龄化有关的慢性病的发病率随之上升^[2]。据报道，2010年，全世界约有2 100万男性和1.37亿女性在50岁及以上时处于骨质疏松性骨折的高风险期^[3]。在中国，超过1/3的女性和大约1/10的男性患有严重的骨质疏松性骨折^[4]。有研究表明，骨质疏松性骨折与后续发生骨折的高风险和死亡率密切相关^[5]。此外，骨质疏松性骨折对患者和医疗系统造成很大的经济压力^[6-7]。因此，预防和治疗骨质疏松性骨折尤为重要。

在目前正在开发的几种新技术中，使用 microRNAs (miRNAs) 作为骨质疏松性骨折的生物标志物是很有吸引力的。miRNAs 是一种小的内源性调节 RNA，通过充当调控基因表达的表观遗传关键因素，影响许多生理和病理生理过程^[8]。尽管 miRNAs 并不完全互补于 mRNA 序列，miRNAs 与具有相似序列的目标基因相互作用，抑制了不同基因的翻译。许多研究报告，miRNA 通过其在成骨细胞和破骨发生中的活性来调节骨的发育和稳态^[9]。有趣的是，miRNAs 也参与了骨重塑和骨质疏松等许多骨代谢疾病的过程。miRNA 在骨质疏松症和难治性骨质疏松性骨缺损方面显示出前所未有的诊断和治疗潜力^[10-11]。目前，已有大量研究证实了骨质疏松性骨折中 miRNAs 与骨折及愈合受损相关^[12-13]。鉴于这些结果，miRNAs 或许可以作为诊断骨质疏松性骨折的生物标志物，也可以作为治疗骨质疏松性骨折患者骨丢失的靶点。

越来越多的 miRNA 阵列数据被上传并存储在基因表达总括 (GEO) 数据库中。利用 GEO 数据库，一些研究通过高通量 miRNA 阵列分析 miRNA 的表达特征，以进行生物标志

物鉴定。这项研究通过 GSE93883 明确骨质疏松性骨折和 miRNA 之间的联系，并收集老年骨质疏松性骨折的临床样本进行验证，以了解骨质疏松性骨折的特征性 miRNA 及其调控网络机制，为鉴定老年骨质疏松性骨折的生物标志物和治疗靶标奠定理论基础。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 分子网络学分析

1.1.1 数据收集及差异分析 收集 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>) 的 GSE93883 数据集，其中包含 6 例骨质疏松性骨折样本、6 例骨质疏松非骨折样本、6 例非骨质疏松非骨折样本的 miRNA 表达谱。通过 limma R 软件包计算骨质疏松性骨折与对照样本，以及骨质疏松非骨折与对照样本之间的差异表达 miRNA (DEM)。 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 \text{fold change (FC)}| \geq 2$ 筛选显著差异表达的 miRNA。此外，利用 RAID 数据库 (<http://www.rna-society.org/raid>) 设置筛选得分大于 0.7，预测 miRNA 的靶标基因。

1.1.2 PPI 网络分析和富集分析 根据 String 数据库 (<http://string-db.org/>) 中蛋白质相互作用信息，构建靶标基因的 PPI 网络，并进行连接度 (degree) 排序。利用 clusterProfiler R 软件包进行基因本体论 (gene ontology, GO) 与京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 途径分析。设置筛选阈值 $P < 0.05$ 。

1.2 核心 miRNA 和信号通路的验证

1.2.1 时间及地点 实验于 2020 年 5 月至 6 月在新疆医科大学第七附属医院骨科实验室完成。

1.2.2 样本收集 5 例老年骨质疏松性骨折和 5 例老年非骨质疏松性骨折患者的骨组织收集自新疆医科大学第七附属医院。T 值 [(骨密度 - 骨峰值) / 标准差] < -2.5 的老年骨折为老年骨质疏松性骨折的纳入标准。纳入研究的非骨质疏松性骨折患者为 T 值 > -2.5 且由创伤所致骨折。这项研究得到了新疆医科大学伦理委员会的批准。所有患者均充分了解这项研究，并签署了书面同意书。

1.2.3 实时定量 PCR 利用 Trizol 提取 200 μg 液氮研磨的骨组织中的总 RNA。随后,通过 miScript II RT Kit (Qiagen) 将 RNA 反转录成互补 DNA(cDNA)。最后,用 miScript SYBR Green PCR Kit 检测 miR-106b-5p 的表达。U6 为内参基因,基因表达结果以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算。引物序列为: miR-106b-5p(F: 5'-TGC GGC AAC ACC AGT CGA TGG-3', R: 5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG T-3'); U6(F: 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3', R: 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3')。

1.2.4 Western blot 采用 Western blot 方法检测骨组织样本中 Akt 和转化生长因子 β (transforming growth factor-beta, TGF- β) 蛋白的表达水平。从骨组织中提取总蛋白,用 Bio-Rad 进行定量分析。然后用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白质,并转印到 PVDF 膜上。分别与 Akt (Abcam) 和 TGF- β (Abcam) 抗体在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜后,用辣根过氧化物酶结合二抗 (Abcam) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。以 GAPDH 为内参对照。最后,利用凝胶成像系统 (Bio-Rad) 对蛋白质表达进行评价。

1.2.5 主要观察指标 骨组织中 miR-106b-5p 含量,以及 TGF- β 和 AKT 蛋白表达水平。

1.2.6 统计学分析 在 SPSS 22.0 中进行统计学分析,结果以柱形图形式给出,用 $\bar{x}\pm s$ 表示。学生 t 检验用于两组之间的比较,双边 $\alpha=0.05$ 。采用 Lasso Cox 比例风险回归分析确定骨质疏松性骨折的独立危险因素。 $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 分子网络学分析

2.1.1 骨质疏松性骨折的差异表达 miRNAs 为了确定在骨质疏松性骨折中差异表达的 miRNAs,获得了骨质疏松性骨折、骨质疏松性非骨折和对照样本的 miRNA 表达谱,见图 1A。以 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 \text{FC}| \geq 2$ 为标准,骨质疏松性骨折和对照之间获得了 37 个差异表达的 miRNAs,见图 1B;骨质疏松性非骨折和对照之间获得了 51 个差异表达的 miRNAs,见图 1C。在这些差异表达 miRNAs 中,鉴定出 21 个 miRNAs 为骨质疏松性骨折相关的 miRNAs,见图 1D。

2.1.2 DEM 及靶基因的筛选与鉴定 利用 RAID 数据库预测 21 个 miRNAs 的调控靶标基因,共得到了 530 个骨质疏松性骨折相关 miRNA 的靶标基因。通过构建靶标基因的 PPI 网络,鉴定出连接度 (degree) 最高的前 10 个靶标基因,见图 2A,并进一步识别了 10 个靶标基因所对应的 DEM,见图 2B。其中,miR-106b-5p 调控最多的靶标基因 (CCND1, MAPK1, STAT3, VEGFA 和 MYC) 而被筛选为核心 miRNA。与对照组相比较,miR-106b-5p 在骨质疏松性骨折中差异表达下调 ($P < 0.01$),见图 2C。

2.1.3 miRNAs 靶基因的 GO 和 KEGG 途径 GO 功能注释分析结果表明,骨质疏松性骨折相关 miRNAs 的靶标基因主要参与凋亡进程,MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)活性的激活等

生物进程,见图 3A。

KEGG 通路分析表明,靶标基因主要富集的途径是“PI3K-Akt(磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B)信号通路”“MAPK 信号通路”等,见图 3B。

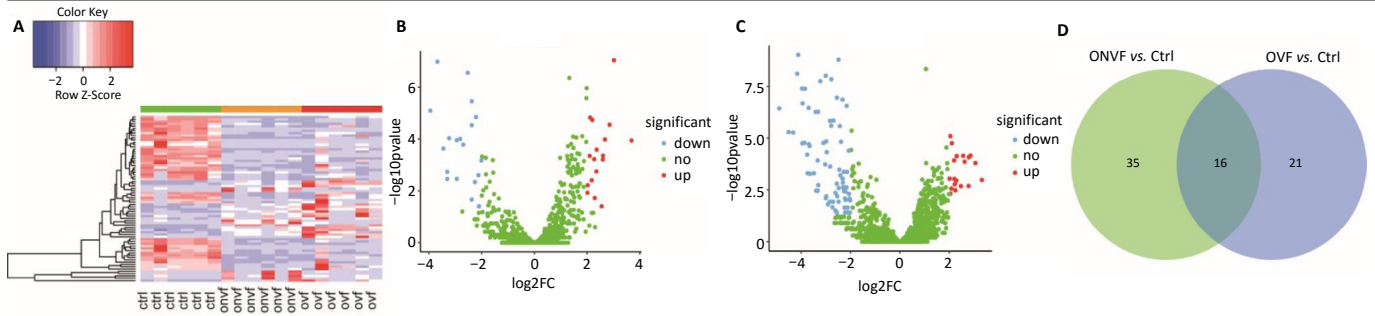
另外,对 miR-106b-5p 的信号通路网络研究结果表明,其与 TGF- β (转化生长因子 β) 信号通路和 PI3K-AKT 信号通路密切相关,见图 3C。

2.2 核心 miRNA 和信号通路的验证结果 通过 qPCR 实验,验证了 miR-106b-5p 在老年骨质疏松性骨折与对照的骨组织相比差异表达显著下调 ($P < 0.05$),见图 4A。Western blot 实验结果显示,老年骨质疏松性骨折的骨组织中 TGF- β 信号通路和 PI3K-AKT 信号通路被激活,见图 4B。

3 讨论 Discussion

身体正常的骨形成和功能依赖于动态平衡过程,在动态平衡过程中,成骨细胞诱导成骨,而破骨细胞诱导骨吸收。因此,由于骨质疏松症等因素打破骨形成的动态平衡,一般倾向于骨量丢失,削弱骨强度,相应地诱发骨质疏松性骨折^[14]。目前,人们已经做了大量的工作来识别和验证 miRNAs 作为骨折风险的循环生物标记物^[15-16]。此次研究发现骨质疏松性骨折和对照组织之间的 37 个差异表达 miRNA 中,有 21 个与骨折相关。其中,在骨质疏松性骨折中下调的 hsa-miR-106b-5p 被鉴定为核心 miRNA。研究报道 miR-106b-5p 在绝经后妇女椎体骨折中差异表达^[17]。据报道,miR-106-5p 与血清 17 β -雌二醇显著相关,并被预测为血管内皮生长因子和 Smad 6/7 的上游调节因子^[18]。在 FK506 促进成骨分化和骨形成的过程中,miR-106b-5p 显著差异上调表达,参与干细胞分化、TGF- β 受体信号转导^[19]。miR-106b-5p 通过靶向 RANKL 和其他细胞因子(白细胞介素 8、基质金属蛋白酶 2 和 TWIST),被证实是一种新的破骨和骨溶解抑制剂^[20]。还有研究显示,miR-106b-5p 通过靶向 Smad 5 抑制成骨细胞分化^[21]。因此,作者认为 miR-106b-5p 可以作为骨质疏松性骨折的潜在保护性治疗靶标。

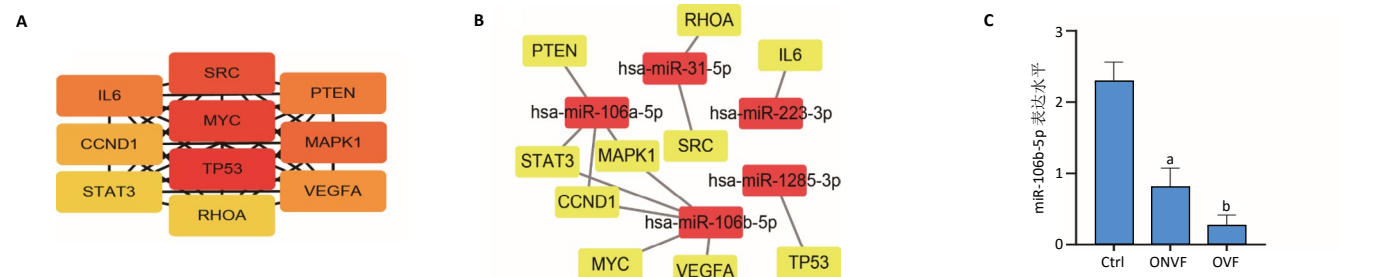
miR-106b-5p 的靶标基因中,细胞周期调节蛋白 D1 (Cyclin D1, CCND1) 与绝经后骨质疏松有关,在破骨细胞中参与 Wnt/ β -catenin 信号^[22]。CCND1 通过促进细胞增殖,调节细胞周期从 G₁ 期向 S 期的转变^[23]。骨髓间充质干细胞在维持骨质疏松相关的骨内动态平衡的微环境中具有重要作用^[24]。已有研究发现下调表达的 CCND1 可导致人骨髓间充质干细胞向成脂而非成骨方向分化^[25]。骨细胞通过细胞骨架适应和 MAPK 通路在骨折中发挥抗炎作用^[1]。MAPK1 是活性氧、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路中的常见基因,MAPK 磷酸化后通过相关转录因子的分化来促进脂肪形成和成骨,是间充质干细胞分化过程中唯一的活跃信号^[26]。MAPK 的激活在破骨发生中也起着关键作用^[27]。人类和小鼠信号转导与转录激活子 3(signal transducers and activators of transcription-3, STAT3) 的缺乏与骨异常和破骨细胞数量增加



图注：图 A 为 miRNA 的表达热图；B 为骨质疏松性骨折与对照样本之间的差异表达 miRNA；C 为骨质疏松非骨折与对照样本之间的差异表达 miRNA；D 为两组差异表达 miRNA 的 veen 图。Ctrl：对照；ONVF：骨质疏松非骨折；OVF：骨质疏松性骨折

图 1 | 骨质疏松性骨折相关 miRNA

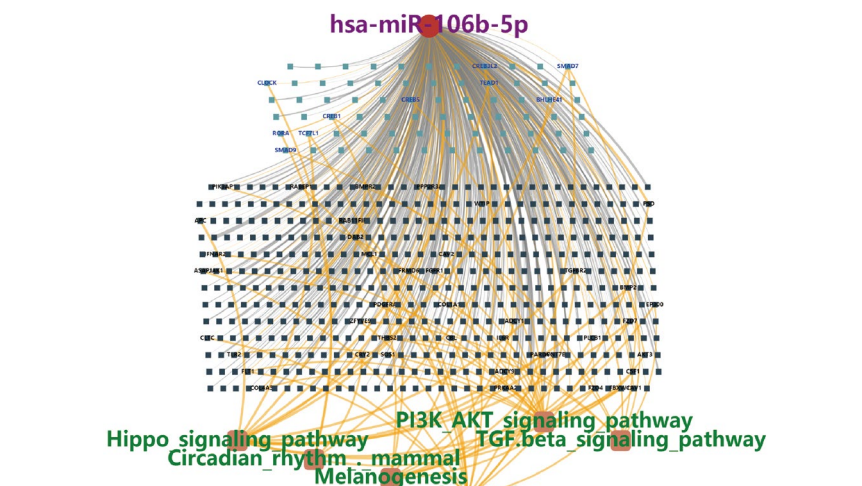
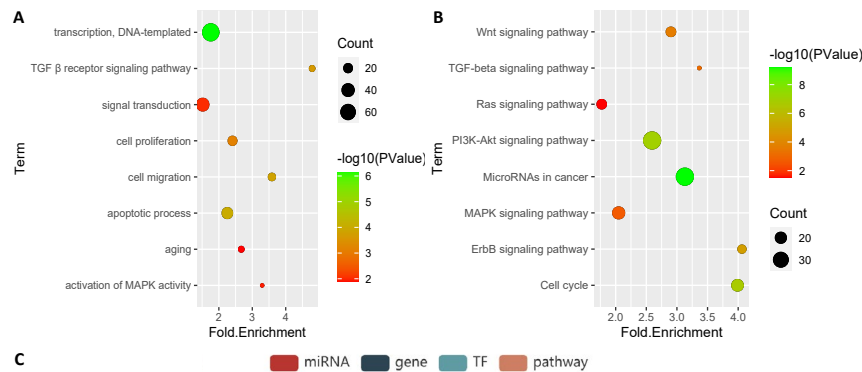
Figure 1 | Osteoporotic fracture-associated miRNAs



图注：图 A 为 PPI 网络中连接度前 10 的靶标基因；B 为靶向调节 10 个靶标基因的 miRNA；C 为 miR-106b-5p 在骨质疏松性骨折、骨质疏松非骨折以及非骨质疏松非骨折 (对照) 样本中的表达。与对照比较，^a $P < 0.01$ ，^b $P < 0.001$ 。Ctrl：对照；ONVF：骨质疏松非骨折；OVF：骨质疏松性骨折

图 2 | 关键 miRNA 及靶标基因的筛选

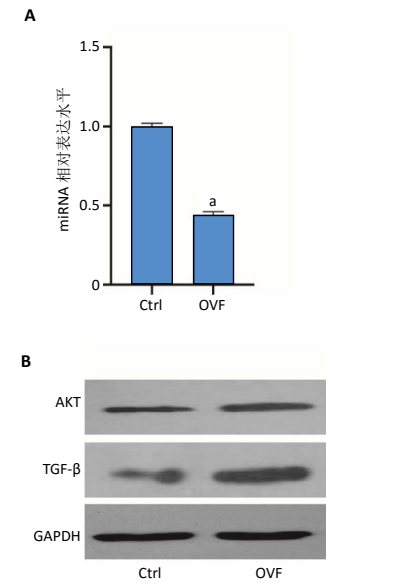
Figure 2 | Screening of key miRNAs and target genes



图注：图 A 为靶标基因参与的生物进程；B 为靶标基因参与的 KEGG 信号通路；C 为 miR-106b-5p 的调控网络

图 3 | 骨质疏松相关 miRNA 靶标基因的功能富集

Figure 3 | Functional enrichment of osteoporosis-related miRNA target gene



图注：图 A 为 miR-106b-5p 的 qPCR 验证结果，与对照比较，^a $P < 0.001$ ；B 为 Western blot 检测 TGF- β 和 AKT 蛋白的表达。Ctrl：对照；OVF：骨质疏松性骨折。TGF- β ：转化生长因子 β

图 4 | miR-106b-5p 的表达和信号通路的验证

Figure 4 | Expression of miR-106b-5p and verification of signaling pathways

有关,其发挥抗炎作用,是抑制破骨作用的一个重要分子途径^[28]。造血细胞特异性 STAT3 缺陷小鼠通过增加破骨作用而发生骨质疏松,导致骨小梁和皮质骨的减少^[29]。研究显示,通过 STAT 途径发出信号对成骨细胞的分化是很重要的^[30]。此外,早期成骨细胞系细胞的血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 是骨折愈合所必需的^[31]。VEGFA 由于对促进血管生成有很强的亲和力,而骨修复的过程需要血管生成^[32]。这在其他研究中得到了证实,组成型 *Osx-Cre* 小鼠中的 VEGFA 缺失在长骨发育和修复期间损害成骨细胞生成^[33-34]。成骨细胞中 MYC(c-Myc) 的减少具有抑制破骨作用^[35]。MYC 或许可以作为调控成骨细胞和破骨细胞分化的靶标^[36]。

为进一步探讨骨质疏松性骨折中 miRNA 的调控分子机制,对靶标基因进行了功能富集分析。MAPK 信号通路是与骨折相关的 miRNA 靶基因的富集结果,MAPK 信号的持续抑制促进细胞外基质的早期成骨分化和矿化^[37]。TGF- β 激活 MAPK 通路,抑制间充质多能细胞和成骨前细胞的成骨作用^[38]。在一些研究中,TGF- β 被认为是骨质疏松严重程度的一个指标。TGF- β 在骨质疏松症中对骨形成和吸收具有双重作用^[3, 39]。有研究表明,血清 TGF- β 水平与骨密度 T 评分呈显著正相关,与骨质疏松性骨折的发生呈负相关^[40]。TGF- β 和 VEGF 在骨折中迅速位于骨折部位,促进血管形成,同时从外周血中吸收各种类型的干细胞,诱导其分化为成骨细胞,加速骨折修复^[41]。PI3K-Akt 途径的活化参与人骨质疏松过程中,促进成骨分化并保护成骨损伤^[42-43]。

miRNAs 在多种生物功能中的关键调节作用是一个成熟的概念,其与多种生理和病理条件的关系也在推动其作为生物标志物的临床应用。此次研究结果提示 miR-106b-5p 可以作为老年骨质疏松性骨折的生物标志物和治疗靶标而进行深入研究。miR-106b-5p 可能通过 TGF- β 和 PI3K-Akt 途径调节骨质疏松性骨折的进展。

此次研究的局限性在于分析的基因表达谱收集自公共数据库,样本数量相对较小。为了解决这一问题,需要进一步收集临床样本进行实验验证重要的分析结果。尽管如此,miR-106b-5p 对老年骨质疏松性骨折的预测作用仍需要大量临床样本进行验证。

致谢:感谢参与这项研究的所有志愿者。

作者贡献:设计为王海龙;资料收集为李龙;文献分析为伊力哈木托合体和陈洪涛;王海龙和刘旭成文。那次克道尔吉审核,崔泳对文章负责。

经费支持:该文章接受了“新疆维吾尔自治区自然科学基金(2017D01C276)”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。

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。

生物统计学声明:该文统计学方法已经被新疆医科大学第五附属医院生物统计学专家审核。

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

- XIE Y, ZHANG L, XIONG Q, et al. Bench-to bedside strategies for osteoporotic fracture: From osteoimmunology to mechanosensation. *Bone Res.* 2019;7:25.
- CHEN J, HONG Z, ZHAO C, et al. Associations between polymorphisms of the PDLIM4 gene and susceptibility to osteoporotic fracture in an elderly population of Han Chinese. *Biosci Rep.* 2019;39(1): BSR20181505.
- LIU DB, SUI C, WU TT, et al. Association of Bone Morphogenetic Protein (BMP)/Smad Signaling Pathway with Fracture Healing and Osteogenic Ability in Senile Osteoporotic Fracture in Humans and Rats. *Med Sci Monit.* 2018;24:4363-4371.
- LU J, REN Z, LIU X, et al. Osteoporotic Fracture Guidelines and Medical Education Related to the Clinical Practices: A Nationwide Survey in China. *Orthop Surg.* 2019;11:569-577.
- LIU R, CHAO A, WANG K, et al. Incidence and risk factors of medical complications and direct medical costs after osteoporotic fracture among patients in China. *Arch Osteoporos.* 2018;13:12.
- KIM HY, HA YC, KIM TY, et al. Healthcare Costs of Osteoporotic Fracture in Korea: Information from the National Health Insurance Claims Database, 2008-2011. *J Bone Metab.* 2017;24:125-133.
- TAGUCHI Y, INOUE Y, KIDO T, et al. Treatment costs and cost drivers among osteoporotic fracture patients in Japan: a retrospective database analysis. *Arch Osteoporos.* 2018;13:45.
- BARTEL DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell.* 2018;173:20-51.
- PICKERING ME, MILLET M, ROUSSEAU JC, et al. Selected serum microRNA, abdominal aortic calcification and risk of osteoporotic fracture. *PLoS One.* 2019;14:e0216947.
- SUN X, GUO Q, WEI W, et al. Current Progress on MicroRNA-Based Gene Delivery in the Treatment of Osteoporosis and Osteoporotic Fracture. *Int J Endocrinol.* 2019;2019:6782653.
- TANG X, BAI Y, ZHANG Z, et al. A validated miRNA signature for the diagnosis of osteoporosis related fractures using SVM algorithm classification. *Exp Ther Med.* 2020;20:2209-2217.
- RAMIREZ-SALAZAR EG, CARRILLO-PATINO S, HIDALGO-BRAVO A, et al. Serum miRNAs miR-140-3p and miR-23b-3p as potential biomarkers for osteoporosis and osteoporotic fracture in postmenopausal Mexican-Mestizo women. *Gene.* 2018;679:19-27.
- FISCHER M, QUAAS M, STEINER L, et al. The p53-p21-DREAM-CDE/CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:164-174.
- FANG H, ZHANG H, WANG Z, et al. Systemic immune-inflammation index acts as a novel diagnostic biomarker for postmenopausal osteoporosis and could predict the risk of osteoporotic fracture. *J Clin Lab Anal.* 2020;34:e23016.
- BOTTANI M, BANFI G, LOMBARDI G. The Clinical Potential of Circulating miRNAs as Biomarkers: Present and Future Applications for Diagnosis and Prognosis of Age-Associated Bone Diseases. *Biomolecules.* 2020;10(4):589.

- [16] HADJIARGYROU M, KOMATSU DE. The Therapeutic Potential of MicroRNAs as Orthobiologics for Skeletal Fractures. *J Bone Miner Res.* 2019;34:797-809.
- [17] ZARECKI P, HACKL M, GRILLARI J, et al. Serum microRNAs as novel biomarkers for osteoporotic vertebral fractures. *Bone.* 2020;130:115105.
- [18] KANGAS R, TORMAKANGAS T, FEY V, et al. Aging and serum exomiR content in women-effects of estrogenic hormone replacement therapy. *Sci Rep.* 2017;7:42702.
- [19] ZHANG J, YU X, YU Y, et al. MicroRNA expression analysis during FK506-induced osteogenic differentiation in rat bone marrow stromal cells. *Mol Med Rep.* 2017;16:581-590.
- [20] YANG Y, FANG S. Small non-coding RNAs-based bone regulation and targeting therapeutic strategies. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;456:16-35.
- [21] FANG T, WU Q, ZHOU L, et al. miR-106b-5p and miR-17-5p suppress osteogenic differentiation by targeting Smad5 and inhibit bone formation. *Exp Cell Res.* 2016;347:74-82.
- [22] HU H, HE X, ZHANG Y, et al. MicroRNA Alterations for Diagnosis, Prognosis, and Treatment of Osteoporosis: A Comprehensive Review and Computational Functional Survey. *Front Genet.* 2020;11:181.
- [23] CHEN YJ, CHANG WA, HUANG MS, et al. Identification of novel genes in aging osteoblasts using next-generation sequencing and bioinformatics. *Oncotarget.* 2017;8:113598-113613.
- [24] ZHENG CX, SUI BD, LIU N, et al. Adipose mesenchymal stem cells from osteoporotic donors preserve functionality and modulate systemic inflammatory microenvironment in osteoporotic cytotrapy. *Sci Rep.* 2018;8:5215.
- [25] HE H, CHEN K, WANG F, et al. miR-204-5p promotes the adipogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells by modulating DVL3 expression and suppressing Wnt/beta-catenin signaling. *Int J Mol Med.* 2015;35:1587-1595.
- [26] MEI Y, BIAN C, LI J, et al. miR-21 modulates the ERK-MAPK signaling pathway by regulating SPRY2 expression during human mesenchymal stem cell differentiation. *J Cell Biochem.* 2013;114:1374-1384.
- [27] SHUAI Y, JIANG Z, YUAN Q, et al. Deciphering the Underlying Mechanism of Eucommiae Cortex against Osteoporotic Fracture by Network Pharmacology. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2020;2020:7049812.
- [28] ZHANG H, HU H, GREELEY N, et al. STAT3 restrains RANK- and TLR4-mediated signalling by suppressing expression of the E2 ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13. *Nat Commun.* 2014;5:5798.
- [29] SOWERWINE KJ, SHAW PA, GU W, et al. Bone density and fractures in autosomal dominant hyper IgE syndrome. *J Clin Immunol.* 2014;34:260-264.
- [30] NICOLAIDOU V, WONG MM, REDPATH AN, et al. Monocytes induce STAT3 activation in human mesenchymal stem cells to promote osteoblast formation. *PLoS One.* 2012;7:e39871.
- [31] BUETTMANN EG, MCKENZIE JA, MIGOTSKY N, et al. VEGFA From Early Osteoblast Lineage Cells (Osterix+) Is Required in Mice for Fracture Healing. *J Bone Miner Res.* 2019;34:1690-1706.
- [32] TOMLINSON RE, MCKENZIE JA, SCHMIEDER AH, et al. Angiogenesis is required for stress fracture healing in rats. *Bone.* 2013;52:212-219.
- [33] DUAN X, MURATA Y, LIU Y, et al. Vegfa regulates perichondrial vascularity and osteoblast differentiation in bone development. *Development.* 2015;142:1984-1991.
- [34] HU K, OLSEN BR. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *J Clin Invest.* 2016;126:509-526.
- [35] GHAYOR C, WEBER FE. Epigenetic Regulation of Bone Remodeling and Its Impacts in Osteoporosis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9):1446.
- [36] LAMOUREUX F, BAUD'HUIN M, RODRIGUEZ CALLEJA L, et al. Selective inhibition of BET bromodomain epigenetic signalling interferes with the bone-associated tumour vicious cycle. *Nat Commun.* 2014;5:3511.
- [37] HIGUCHI C, MYOUI A, HASHIMOTO N, et al. Continuous inhibition of MAPK signaling promotes the early osteoblastic differentiation and mineralization of the extracellular matrix. *J Bone Miner Res.* 2002;17:1785-1794.
- [38] SUN X, XIE Z, MA Y, et al. TGF-beta inhibits osteogenesis by upregulating the expression of ubiquitin ligase SMURF1 via MAPK-ERK signaling. *J Cell Physiol.* 2018;233:596-606.
- [39] MACFARLANE EG, HAUPT J, DIETZ HC, et al. TGF-beta Family Signaling in Connective Tissue and Skeletal Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(11):a022269.
- [40] HAGHIGHIZADEH E, SHAHREZAEI M, SHARIFZADEH SR, et al. Transforming growth factor-beta3 relation with osteoporosis and osteoporotic fractures. *J Res Med Sci.* 2019;24:46.
- [41] SUN X, LI X, QI H, et al. MiR-21 nanocapsules promote early bone repair of osteoporotic fractures by stimulating the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Orthop Translat.* 2020;24:76-87.
- [42] LI H, LI T, FAN J, et al. miR-216a rescues dexamethasone suppression of osteogenesis, promotes osteoblast differentiation and enhances bone formation, by regulating c-Cbl-mediated PI3K/AKT pathway. *Cell Death Differ.* 2015;22:1935-1945.
- [43] DE-UGARTE L, YOSKOVITZ G, BALCELLS S, et al. MIRNA profiling of whole trabecular bone: identification of osteoporosis-related changes in MiRNAs in human hip bones. *BMC Med Genomics.* 2015;8:75.

(责任编辑: ZN, SX)