

miR-27b/PPAR γ 2 轴对小鼠胚胎成骨前体细胞增殖和成骨细胞分化的意义

王磊¹, 白雪松¹, 杜宇¹, 何爱民¹, 郑钧¹, 张志鹏¹, 吕惠成²

<https://doi.org/10.12307/2023.129>

投稿日期: 2022-03-16

采用日期: 2022-05-13

修回日期: 2022-06-21

在线日期: 2022-07-26

中图分类号:

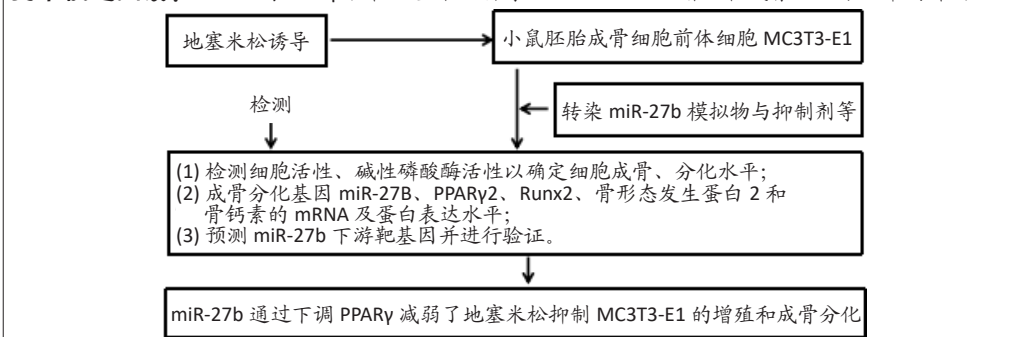
R446; R496; R318

文章编号:

2095-4344(2023)11-01780-07

文献标识码: A

文章快速阅读: miR-27b/PPAR γ 轴在地塞米松诱导 MC3T3-E1 细胞增殖和成骨细胞分化中的作用



文题释义:

骨质疏松症: 一种代谢性骨病, 其特征是骨密度和骨质量严重下降, 骨微结构改变, 导致骨骼变脆易于骨折。成骨细胞或破骨细胞的功能障碍可影响骨形成和吸收, 最终导致骨质疏松症, 在病理过程开始时常缺乏明显的症状, 当出现骨折后, 严重影响患者生活质量。

miRNA: 是一类由内源基因编码的 RNA 分子, 长度为 20-22 个核苷酸, 可以通过结合靶 mRNA 的 3'UTR 区调控靶基因的表达抑制或翻译, 从而在转录及转录后水平调控相关基因的表达。miRNA 在细胞增殖、分化及凋亡等多种生物学活动过程中起着非常重要的调控作用。

摘要

背景: 先前的研究证实了 miR-27b 在脂质水平的作用, 可以控制多个对血脂异常有重要影响的基因, 推测 miR-27b 可能通过靶向 PPAR γ 2 在骨质疏松症中发挥作用。

目的: 探讨 miR-27b/PPAR γ 轴在地塞米松诱导小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 MC3T3-E1 细胞建立骨质疏松症细胞模型中的影响及相关作用机制。

方法: 体外地塞米松诱导 MC3T3-E1 细胞后, 通过 Lipofectamine[®]2000 转染 miR-27b 模拟物、miR-27b 抑制剂、NC-模拟物、NC-抑制剂、siPPAR γ 2、siNC, 使用二甲亚砜处理作为对照。细胞诱导培养后, 检测细胞活性、碱性磷酸酶活性以确定细胞成骨、分化水平; 实时荧光定量 PCR 法和 Western blot 法检测成骨分化基因 miR-27b、PPAR γ 2、Runx2、骨形态发生蛋白 2 和骨钙素的 mRNA 及蛋白表达水平; 信分析预测 miR-27b 下游靶基因, 并用双荧光素酶基因报告实验验证。

结果与结论: ①地塞米松处理显著降低了 MC3T3-E1 细胞的活力和 miR-27b 表达水平; 与二甲亚砜相比, 地塞米松处理在 24 和 48 h 显著抑制 MC3T3-E1 细胞的活力并显著下调了 miR-27b 的表达水平; ②miR-27b 可直接调控 PPAR γ 2; 与相应的 NC 相比, miR-27b 模拟物显著上调了 miR-27b 的表达水平, 而 miR-27b 抑制剂显著下调了 miR-27b 的表达水平; 与相应的 NC 相比, PPAR γ 2 mRNA 和相应蛋白质表达被 miR-27b 模拟物抑制, 并被 miR-27b 抑制剂显著增强; ③miR-27b 过表达减弱了地塞米松抑制 MC3T3-E1 细胞的增殖和成骨分化; 与二甲亚砜+NC-mimic 组相比, 地塞米松显著抑制成骨细胞分化; 而地塞米松诱导的抑制作用则被 miR-27b 模拟物所逆转, 细胞碱性磷酸酶活性和骨形态发生蛋白 2、Runx2 和骨钙素蛋白表达水平部分恢复; ④抑制 miR-27b 通过上调 PPAR γ 2 抑制 MC3T3-E1 细胞的增殖和成骨分化; miR-27b 的敲除明显增加了 PPAR γ 2 的表达, 并降低了细胞活力、成骨细胞分化、碱性磷酸酶活性以及骨形态发生蛋白 2、Runx2 和骨钙素的表达水平; PPAR γ 2 可能是 miR-27b 的直接作用靶点。

关键词: miR-27b; PPAR γ 2; MC3T3-E1; Runx2; 成骨分化; 增殖; 骨质疏松症; 地塞米松;

缩略语: 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ : peroxisome proliferators-activated receptors γ , PPAR γ ; RUNT 相关转录因子 2: Runt-related transcription factor 2, Runx2

Significance of miR-27b/peroxisome proliferators-activated receptor gamma 2 axis for proliferation and osteoblast differentiation of mouse embryonic osteogenic precursor cells

Wang Lei¹, Bai Xuesong¹, Du Yu¹, He Aimin¹, Zheng Jun¹, Zhang Zhipeng¹, Lyu Huicheng²

¹Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010010, Inner Mongolia Autonomous Region, China; ²Trauma Center, The Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010020, Inner Mongolia Autonomous Region, China

¹内蒙古医科大学, 内蒙古自治区呼和浩特市 010010; ²内蒙古医科大学第二附属医院创伤中心, 内蒙古自治区呼和浩特市 010020

第一作者: 王磊, 男, 1997 年生, 内蒙古自治区商都县人, 汉族, 内蒙古医科大学在读硕士, 主要从事骨质疏松症方向的研究。

并列第一作者: 白雪松, 男, 1996 年生, 内蒙古自治区库伦旗库伦镇人, 蒙古族, 内蒙古医科大学在读硕士, 主要从事骨质疏松症方向的研究。

通讯作者: 吕惠成, 博士, 教授, 主任医师, 内蒙古医科大学第二附属医院创伤中心, 内蒙古自治区呼和浩特市 010020

<https://orcid.org/0000-0003-0629-4049>(王磊); <https://orcid.org/0000-0003-2692-8053>(白雪松)

基金资助: 内蒙古自治区自然科学基金(2017MS08118), 项目负责人: 吕惠成; 内蒙古医科大学科技百万专项(YK2016kjwb010),

项目负责人: 吕惠成

引用本文: 王磊, 白雪松, 杜宇, 何爱民, 郑钧, 张志鹏, 吕惠成. miR-27b/PPAR γ 2 轴对小鼠胚胎成骨前体细胞增殖和成骨细胞分化的意义[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(11):1780-1786.



Wang Lei, Master candidate, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010010, Inner Mongolia Autonomous Region, China
Bai Xuesong, Master candidate, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010010, Inner Mongolia Autonomous Region, China
Wang Lei and Bai Xuesong contributed equally to this work.

Corresponding author: Lyu Huicheng, MD, Professor, Chief physician, Trauma Center, The Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010020, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have confirmed that miR-27b at the lipid level can control multiple genes that have an important impact on dyslipidemia. It is speculated that miR-27b may function in osteoporosis by targeting peroxisome proliferators-activated receptors γ 2 (PPAR γ 2).

OBJECTIVE: To investigate the effect of miR-27b/PPAR γ 2 axis in the dexamethasone-induced osteoporosis model in mouse embryonic osteogenic precursor cells MC3T3-E1 and related mechanisms of action.

METHODS: After MC3T3-E1 cells were dexamethasone-induced and cultured in vitro, miR-27b mimic, miR-27b inhibitor, NC-mimic, NC-inhibitor, siPPAR γ 2, and siNC were transfected with Lipofectamine[®]2000, and dimethyl sulfoxide was used as a control. After the cells were induced and cultured, the cell viability and alkaline phosphatase activity were detected to determine the osteogenesis and differentiation levels of the cells. The mRNA and protein expression levels of osteogenic differentiation genes miR-27b, PPAR γ 2, Runt-related transcription factor 2 (Runx2), bone morphogenetic protein 2 and osteocalcin were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and western blot methods. Bioinformatics analysis predicted the downstream target genes of miR-27b followed by verification with dual luciferase gene reporter experiments.

RESULTS AND CONCLUSION: Dexamethasone treatment significantly reduced cell viability and miR-27b expression levels in MC3T3-E1 pre-osteoblasts. Compared with dimethyl sulfoxide, dexamethasone significantly inhibited MC3T3-E1 cell viability and downregulated miR-27b expression levels at 24 and 48 hours. miR-27b could directly regulate PPAR γ 2. Compared with the corresponding NC-mimic, the miR-27b mimic significantly upregulated the expression level of miR-27b, while the miR-27b inhibitor significantly downregulated the expression level of miR-27b. Furthermore, PPAR γ 2 mRNA and protein expression levels were inhibited by the miR-27b mimic and significantly enhanced by the miR-27b inhibitor. miR-27b overexpression attenuated the inhibitory effect of dexamethasone on the proliferation and osteogenic differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts. Dexamethasone significantly inhibited osteoblast differentiation compared with the dimethyl sulfoxide + NC-mimic group. In contrast, the dexamethasone-mediated inhibition was reversed by the miR-27b mimic. Cellular alkaline phosphatase activity and bone morphogenetic protein 2, Runx2 and osteocalcin protein expression levels were partially restored. Inhibition of miR-27b suppressed proliferation and osteogenic differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts through the upregulation of PPAR γ 2. Knockout of miR-27b significantly increased PPAR γ 2 expression and decreased cell viability, osteoblast differentiation, alkaline phosphatase activity, and expression levels of bone morphogenetic protein 2, Runx2 and osteocalcin. PPAR γ 2 may be a direct target of miR-27b.

Key words: miR-27b; PPAR γ 2; MC3T3-E1; Runx2; osteogenic differentiation; proliferation; osteoporosis; dexamethasone

Funding: the Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region, No. 2017MS08118 (to LHC); Inner Mongolia Medical University Science and Technology Million Project, No. YKD2016kjbw010 (to LHC)

How to cite this article: WANG L, BAI XS, DU Y, HE AM, ZHENG J, ZHANG ZP, LYU HC. Significance of miR-27b/peroxisome proliferators-activated receptor gamma 2 axis for proliferation and osteoblast differentiation of mouse embryonic osteogenic precursor cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(11):1780-1786.

0 引言 Introduction

随着社会现代化的建设与人口的老齡化, 骨质疏松症成为最常见的代谢性、高风险骨骼疾病之一^[1], 给医疗保健系统带来巨大的经济负担并伴随着老年人的高死亡率^[2]。骨质疏松症是一种无声的疾病, 是绝经后 5 年或更长时间的女性和 60 岁以上男性的常见问题, 由于骨质疏松症发病的隐匿性, 大多数患者没有进行明确的诊疗。一旦出现明显的骨折症状, 骨质疏松症患者的预后将会直线下滑。根据最近对骨质疏松症患病率的调查, 全球骨质疏松症的患病率为 21.7%, 亚洲的骨质疏松症患病率为 24.3%^[3], 而全球男性患病率为 11.7%, 女性为 23.1%^[4]。在中国, 骨质疏松症的患病率已经由 2015 年 20% 上升至 2019 年的 21.25%^[5-6], 未来这个趋势也将会继续上升, 并且患病年龄趋于年轻化, 即使目前存在大量骨质疏松的治疗方案与药物^[7]。比较讽刺的是, 最初用于治疗骨质疏松症的促骨生成药物是甲状旁腺激素 (PTH), 但这种激素被证明在过量存在时对骨骼有害, 包括后来的双膦酸盐等药物^[8-9]。在这种情况下, 促使人们开发新型治疗方式与药物来应对骨质疏松症。

骨质疏松症作为一种与代谢相关、年龄相关的骨性疾病, 其特点是全身性骨量减少、骨骼微结构恶化以及对脆性骨折的敏感性增加^[10]。骨是一种动态的结缔组织, 通过严格调节旧骨吸收和新骨形成之间的平衡来维持骨骼完整性和钙磷稳定^[11], 在整个骨骼塑性过程中, 骨形成主要由成骨细胞调控, 不断进行骨骼重塑, 而破骨细胞是调节骨重塑和维持骨骼完

整性的关键吸收细胞。成骨细胞和破骨细胞的形成与功能支撑保持骨的良好结构^[12-13]。骨吸收和骨形成之间的不平衡明显影响骨重塑, 当破骨细胞的活性上升或者成骨细胞的衰老、凋亡增加, 就会造成骨质疏松症, 进而导致骨折率增加^[14]。

最近, 微小核糖核酸被认为在骨质疏松症进程中具有重要的地位。miRNA 是一类序列高度保守的非编码 RNA, 其广泛存在于动植物细胞当中, 长度为 20 个核苷酸左右^[15], 能够与靶基因 mRNA 3' 非翻译区以碱基配对的方式联结, 调控下游靶基因的表达, 广泛参与不同疾病的生物学过程^[16]。以往的研究表明, 一些 miRNA 在调节骨代谢和细胞分化中发挥积极或消极的作用, 如 miR-21 参与细胞的成骨分化进程并促进细胞成骨分化^[17], miR-98-5p 通过抑制 HMG2 减弱成骨细胞的增殖和分化^[18], miR-705 在小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 (MC3T3-E1 细胞) 成骨分化中表达, 并具有抑制分化的作用^[19], miR-129-5p 则参与了 MC3T3-E1 细胞成骨过程, 促进相关基因标志 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, Runx2) 和骨钙素的表达^[20]。先前的研究观察到 miR-27b 在破骨细胞形成过程中有异常表达^[21]。此外, 在脂肪细胞中证明了 miR-27b 通过过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptors, PPAR γ) 的抑制降低了人脂肪源间充质干细胞的脂肪生成并减弱了 C/EBP α 等调节因子的诱导^[22], 由于 miR-27b 在多种细胞的表达, 因此, 假设 miR-27b 可能与骨质疏松症的病理过程有关。

最近的研究表明, 包括 PPAR γ 在内的过氧化物酶体增殖

物激活受体参与调节骨髓基质产生的骨细胞相对比例, 它们是核激素受体超家族一员, 目前已知 3 种 PPAR, 即 PPAR α 、PPAR δ 和 PPAR γ ^[23]。每一种 PPAR 都有特定的组织分布, PPAR γ 有 2 种亚型, 这是使用不同启动子和选择性剪接的结果, 称为 $\gamma 1$ 和 $\gamma 2$ 。PPAR γ 对各种前体细胞或细胞系的成骨分化有调控作用^[24], 并且作为一种关键的转录因子参与了许多物质成份的代谢过程, 包括骨代谢在内^[25-27]; 同时包括 PPAR $\gamma 2$ 在内的 PPAR γ 亚型也受到多种基因或表达因子的调控, 比如微小核糖核酸 miRNA^[28]。先前的研究证实了 miR-27b 在脂质水平的作用, 可以控制多个对血脂异常有重要影响的基因^[29], miR-27b 可以抑制 PPAR γ 和脂质代谢相关因子, 从而影响脂质代谢, 升高三酰甘油以及相关脂蛋白等浓度^[30]; 并且 PPAR γ 在软骨细胞中被 miR-27b 负调控^[31]。因此, 推测 miR-27b 可能通过靶向 PPAR $\gamma 2$ 在骨质疏松症中发挥作用。地塞米松作为一种人工糖皮质激素, 可体外构建骨质疏松的模型^[32], 越来越多的研究表明, 暴露于地塞米松可诱导成骨细胞凋亡并抑制 MC3T3-E1 细胞增殖^[33]。在此次研究中, 用地塞米松处理 MC3T3-E1 细胞在体外建立骨质疏松症细胞模型, 目的是确定 miR-27b/PPAR γ 轴在地塞米松诱导 MC3T3-E1 细胞增殖和成骨细胞分化中的作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外观察细胞实验。

1.2 时间及地点 实验于 2017 年 9 月至 2019 年 7 月在上海基尔顿生物科技有限公司实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞 小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 (MC3T3-E1 细胞), 由美国 ATCC 细胞库提供。

MC3T3-E1 细胞的培养及鉴定

细胞来源	美国 ATCC 细胞库
培养基介绍	DMEM 培养基
添加材料	体积分数 10% 胎牛血清, 1% 双抗 (青霉素链霉素混合液)
原代培养时间	48-72 h
细胞传代	1 : 2 传代, 消化液消化后吹打
细胞鉴定	细胞 STR 鉴定

1.3.2 实验使用的主要试剂 10%FBS、Trizol、SYBR Green PCR 试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒 (Gibco; Thermo 美国); 1% 青霉素链霉素双抗、胰蛋白酶、二甲基亚砜 (北京 Solarbio 科技有限公司); DMEM (HyClone; Cytiva 美国); 甘油磷酸盐、抗坏血酸、地塞米松 (Sigma-Aldrich 美国, Merck KGaA 德国); miR-27b-3p 模拟物、miR-27b-3p 抑制剂、NC- 模拟物, NC- 抑制剂 (广州核糖生物有限公司合成); Lipofectamine[®] 2000、Lipofectamine[®] 3000 试剂 (Invitrogen; Thermo 美国); AKP 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 反转录试剂盒 (Fermentas; Thermo 美国); 异丙醇, 无水乙醇, 氯仿 (国

药集团); RIPA 组织细胞快速裂解液 (上海基尔顿生物); 羊抗兔 HRP 标记二抗 (上海碧云天生物技术有限公司); 抗 PPAR $\gamma 2$ 、骨形态发生蛋白 2、Runx2、骨钙素 (上海艾博抗贸易有限公司); GAPDH (CST 生物试剂有限公司), 增强化学发光系统 (美国伯乐公司); ImageJ 软件 (美国国立卫生研究院); GraphPad Prism 7.0 (GraphPad 软件公司); pGL3 启动子质粒中、pRL-TK-Renilla 报告载体、双启动子荧光素酶检测试剂盒 (北京普洛麦格生物技术有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养和地塞米松处理 取小鼠 MC3T3-E1 细胞, 当细胞处于对数生长期时, 在含有体积分数 10%FBS 和 1% 青霉素链霉素的 DMEM 中培养在 37 °C、体积分数 5%CO₂ 条件下, 每两三天换液 1 次; 当 MC3T3-E1 细胞在完全生长培养基中生长到 70% 融合时, 用含有 DMEM、体积分数 10%FBS、 β -甘油磷酸酯 (4 mmol/L) 和抗坏血酸 (25 mg/L) 的新鲜培养基替换, 在成骨分化培养基中培养, 培养基每 3 d 更换 1 次相应浓度的培养液。用 1 μ mol/L 地塞米松处理细胞以在体外诱导骨质疏松症, 并使用二甲基亚砜作为对照。

1.4.2 细胞转染 对于 miR-27b-3p 的过表达或敲除: miR-27b-3p 模拟物 (5'-UUC ACA GUG GCU AAG UUC UGC-3'), miR-27b-3p 抑制剂 (5'-GCA GAA CUA GCC ACU GUG UA-3') 及其相应的阴性对照物 (NC- 模拟物, 5'-UGU ACU GUC AGC-3'; NC- 抑制剂, 5'-CAG UAC UUG UA CAA-3')。3 个 PPAR $\gamma 2$ siRNA 被设计用于沉默 PPAR $\gamma 2$ 的表达, 它们的序列如下: siPPAR $\gamma 2$ -1 (5'-CGC AUU CUU GAA TT-3'); siPPAR $\gamma 2$ -2 (5'-CAA UGG UUG UGU UAC AAT T-3'); siPPAR $\gamma 2$ -3 (5'-GGG CGA UGA UGA GAA TT-3'); siRNA 阴性对照 (siNC, 5'-UUC UCG CGA CGU GUC UCU TT-3')。当 MC3T3-E1 细胞处于对数生长期时, 进行胰蛋白酶消化, 计数。取 6 孔培养板, 向每孔中加入 2 mL 细胞浓度为 1×10^5 L⁻¹ 的细胞悬液, 在 37 °C、体积分数 5%CO₂ 培养箱内至过夜。当 MC3T3-E1 细胞达到 60%-70% 融合时, 将 miR-27b 模拟物、miR-27b 抑制剂、NC- 模拟物、NC- 抑制剂、siPPAR $\gamma 2$ 、siNC 使用 Lipofectamine[®] 2000 在 37 °C 下转染细胞 4-6 h。转染 24 h 后, 用完整培养基 (含体积分数 10%FBS 的 DMEM) 替换无血清转染液, 并继续培养 48 h, 转染后设置不同分组。

1.4.3 细胞活力检测试验 ① 将成骨分化诱导后的 MC3T3-E1 细胞共 100 μ L 悬浮液添加到 96 孔板中 (每孔约 2×10^4 个细胞), 并在 37 °C 下培养过夜。分别使用地塞米松与二甲基亚砜处理 0, 12, 24 或 48 h 后, 用 100 μ L CCK-8 溶液处理细胞 1 h, 通过荧光分光光度计检测各组 450 nm 的吸光度值。② 实验设置二甲基亚砜 + NC- 模拟物组、地塞米松 + NC- 模拟物组、地塞米松 + miR-27b 模拟物组、NC- 抑制剂 + siNC 组、抑制剂 + siNC 组、抑制剂 + siPPAR $\gamma 2$ 组, 分别按照 1.4.2 转染, 分别在处理 0, 12, 24, 48 h 后用 100 μ L CCK-8 液在 37 °C 下处理 1 h, 以相同方法测定 450 nm 波长吸光度。

1.4.4 Real-Time PCR 反应检测 使用 TRIzol 从 MC3T3-E1 细胞中提取 RNA 样品, 并根据制造商的方案使用 RevertAid

First Strand cDNA 合成试剂盒将其反向转录成 cDNA, 随后使用 SYBR Green qPCR 预混物进行扩增。以下热循环条件用于 qPCR: 95 °C, 10 min; 95 °C 15 s 和 60 °C 45 s 下循环 40 次; 将 U6 和 GAPDH 作为内部对照, miR-27b 和 PPAR γ -2 mRNA 的相对水平使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算。引物序列如下: miR-27b-3p 正向, 5'-GCG CGT TCA CAG TGG C TAAG-3' 和反向, 5'-AGT GCA GGT CAG AGG TAT T-3'; U6 正向, 5'-GCT TCG GCA GCA C-3', 反向, 5'-GGA ACG CTT CAC G-3; PPAR γ 2 正向, 5'-TGC GAT CAA GTA GAA CC-3' 和反向, 5'-AAG CCT GAT GTT TAT CC-3'; GAPDH 正向, 5'-CTG CCA GAC ATC C-3' 和反向, 5'-CTC AGA ATG CCT GCT TCA C-3'。实验使用地塞米松与二甲基亚砷处理后转染, 设置 miR-27b 模拟物组、miR-27b 抑制剂组、NC-模拟物对照组、NC-抑制剂对照组, 二甲基亚砷 +NC-模拟物组、地塞米松 +NC-模拟物组、地塞米松 +miR-27b 模拟物组, NC-抑制剂 +siNC 组、抑制剂 +siNC 组、抑制剂 +siPPAR γ 2 组, 所有组分别设 3 个复孔, 检测各组细胞 PPAR γ 和 miR-27b 的 mRNA 表达水平。

1.4.5 生化检测 将 MC3T3-E1 细胞共 100 μ L 悬浮液添加到 96 孔板中, 每孔约 2 \times 10⁴ 个细胞, 并在 37 °C 下培养过夜。分别使用地塞米松与二甲基亚砷处理后, 进行碱性磷酸酶检测, 通过在 4 °C 下以 800 r/min 离心 10 min 获得 MC3T3-E1 细胞的上清液, 并使用碱性磷酸酶试剂盒测定碱性磷酸酶活性。将上清液和试剂盒溶液混合, 并在 37 °C 的水浴中培养 15 min。在 520 nm 处测量吸光度值。实验设置: 二甲基亚砷 +NC-模拟物组、地塞米松 +NC-模拟物组、地塞米松 +miR-27b 模拟物组, NC-抑制剂 +siNC 组、抑制剂 +siNC 组、抑制剂 +siPPAR γ 2 组, 每组 3 个复孔。

1.4.6 蛋白质印迹法 (Western blot 法) 使用 RIPA 裂解缓冲液从 MC3T3-E1 细胞中提取目标蛋白质, 并通过 BCA 分析试剂盒测定蛋白质浓度。分离的蛋白 (25 μ g/lane) 在 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离。随后转移到 PVDF 膜, 在 4 °C 下用 5% 的脱脂牛奶封闭 PVDF 膜并过夜, 并与以下主要抗体孵育: 抗 PPAR γ 2 (1 : 500), 抗骨形态发生蛋白 2 (1 : 1 000), 抗 Runx2 (1 : 1 000), 抗骨钙素 (1 : 1 000) 和抗 GAPDH (1 : 2 000) 在 4 °C 下过夜; 初步培养后, 将膜与辣根过氧化物酶结合的山羊抗兔二抗 (1 : 1 000) 在 37 °C 下培养 1 h。通过增强化学发光系统进行信号定量, 使用 ImageJ 软件通过密度测定法对条带进行量化。实验使用地塞米松与二甲基亚砷处理后转染, 设置 miR-27b 模拟物组、miR-27b 抑制剂组、NC-模拟物对照组、NC-抑制剂对照组, 二甲基亚砷 +NC-模拟物组、地塞米松 +NC-模拟物组、地塞米松 +miR-27b 模拟物组, NC-抑制剂 +siNC 组、抑制剂 +siNC 组、抑制剂 +siPPAR γ 2 组, 所有组分别设 3 个复孔, 检测各组细胞 PPAR γ 、骨形态发生蛋白 2、Runx2 和骨钙素的蛋白水平。

1.4.7 双荧光素酶报告试验 利用生物信息学软件 TargetScan 7.2 预测 miR-27b 的靶基因, 将野生型 (wt) 或突变型 (mut)

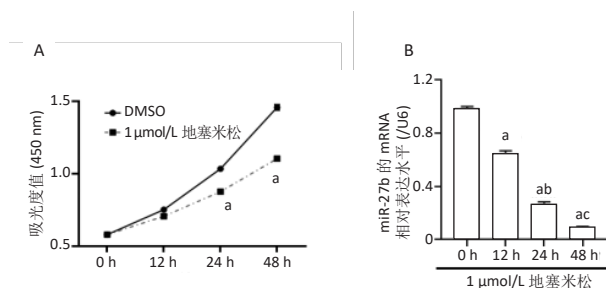
PPAR γ 2-3' 非翻译区 (UTR) 克隆到含有萤火虫荧光素酶基因的 pGL3 启动子质粒中。重组的 pGL3 启动子与 pRL-TK-Renilla 报告载体 (Promega Corporation) 一起, 使用 Lipofectamine[®]3000 试剂在 37 °C 下, 导入 MC3T3-E1 细胞, 转染 6 h 后, 分用 miR-27b 模拟物与 NC-模拟物处理细胞 24 h, 实验设置 miR-27b 模拟物 +wt 组、NC-模拟物 +wt 组、miR-27b 模拟物 +mut 组、NC-模拟物 +mut 组, 2 个 NC 组用于验证实验体系, 使用双启动子荧光素酶检测试剂盒评估荧光素酶活性。

1.5 主要观察指标 ①检测细胞活性、碱性磷酸酶活性以确定细胞成骨、分化水平; ②成骨分化基因 miR-27b、PPAR γ 2、Runx2、骨形态发生蛋白 2 和骨钙素的 mRNA 及蛋白表达水平; ③预测 miR-27b 下游靶基因并进行验证。

1.6 统计学分析 使用 GraphPad Prism 7.0 进行定量分析, 每个实验重复 3 次, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。使用非配对 t 检验, Bonferroni 多重比较检验的双因素方差分析或 Tukey 多重比较检验的单因素方差分析各组之间的差异, $P < 0.05$ 表明存在统计学上的显著差异。文章统计学方法已经过内蒙古医科大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 地塞米松处理显著降低 MC3T3-E1 细胞的活力和 miR-27b 表达水平 用 1 μ mol/L 地塞米松处理 MC3T3-E1 细胞, 在处理 0, 12, 24 和 48 h 检测细胞活力。结果表明, 与二甲基亚砷相比, 地塞米松处理在 24 和 48 h 显著抑制 MC3T3-E1 细胞的活力, 见图 1A。此外, 测定了 miR-27b 水平, 与 0 h 相比, 地塞米松处理在 12, 24 和 48 h 显著下调了 miR-27b 的表达水平, 见图 1B。



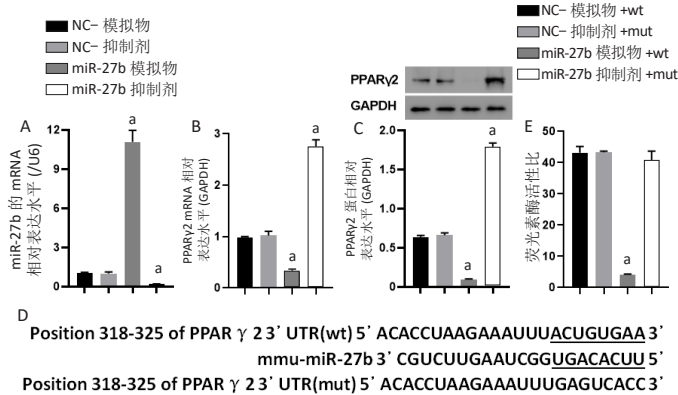
图注: 与二甲基亚砷或 0 h 比较, ^a $P < 0.001$; 与 12 h 比较, ^b $P < 0.001$; 与 24 h 比较, ^c $P < 0.001$ 。MC3T3-E1 细胞: 小鼠胚胎成骨细胞前体细胞; DMSO: 二甲基亚砷

图 1 | 地塞米松处理显著下调 MC3T3-E1 细胞的活力 (A) 和 miR-27b mRNA 表达水平 (B)

Figure 1 | Dexamethasone treatment significantly downregulates the viability (A) and miR-27b mRNA expression level (B) of MC3T3-E1 cells

2.2 miR-27b 可直接调控 PPAR γ 2 通过之前的研究和生信分析的结果, 预测 PPAR γ 2 与 miR-27b 相互作用。为了验证这种相互作用, 将 miR-27b 模拟物和抑制剂转染到 MC3T3-E1 细胞中。结果表明, 与相应的 NC 相比, miR-27b 模拟物显著上调了 miR-27b 的表达水平, miR-27b 的表达水平通过 miR-27b 抑制剂显著下调, 见图 2A。此外, 与相应的 NC 相

比, PPAR γ 2 mRNA 和蛋白质表达被 miR-27b 模拟物抑制, 并被 miR-27b 抑制剂显著增强, 见图 2B, C。为了进一步验证 miR-27b 靶向 PPAR γ 2 的分子机制, 进行了荧光素酶检测, 将 miR-27b 模拟物和含有 wt 或 mut-PPAR γ 2-3'UTR 的荧光素酶载体共转染 MC3T3-E1 细胞, 见图 2D。结果显示, 与 NC- 模拟物相比, miR-27b 通过结合 PPAR γ 2-3'UTR wt 序列显著降低了荧光素酶活性, 然而, 在与 PPAR γ 2-3'UTR mut 和 miR-27b 模拟物共转染后, 荧光素酶活性没有观察到明显差异, 见图 2E。总之, 这些结果表明 miR-27b 可直接调控并抑制 PPAR γ 2 的表达水平。



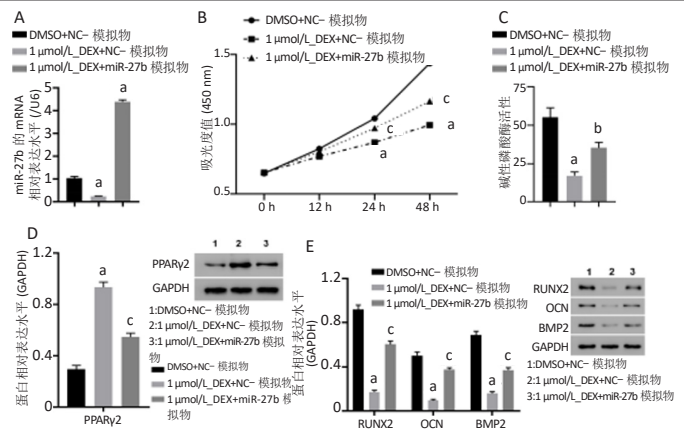
图注: 图 A, B 分别为 PCR 检测 MC3T3-E1 细胞中 miR-27b 和 PPAR γ 2 mRNA 表达水平; C 为 Western blot 检测 PPAR γ 2 蛋白水平; D 为 PPAR γ 2 wt 和 mut 载体与 miR-27b 的潜在结合序列, 横线意为预测结合位点序列; E 为用含有 wt 或 mut PPAR γ 2-3'UTR 的 miR-27b 模拟物和荧光素酶载体转染 MC3T3-E1 细胞, 评估相对荧光素酶活性。与 NC- 模拟物、NC- 抑制剂或 NC- 模拟物 +wt 比较, $^a P < 0.001$ 。MC3T3-E1 细胞: 小鼠胚胎成骨细胞前体细胞; PPAR γ 2: 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 2

图 2 | miR-27b 负向调控 PPAR γ 2 的表达

Figure 2 | miR-27b negatively regulates the expression of peroxisome proliferators-activated receptor γ 2

2.3 miR-27b 过表达减弱了地塞米松抑制 MC3T3-E1 细胞的增殖和成骨分化 在地塞米松处理的 MC3T3-E1 细胞中转染 miR-27b 模拟物后观察 miR-27b 的潜在功能。结果表明, miR-27b 过表达部分逆转了地塞米松对 miR-7b 表达和细胞增殖的抑制 (图 3A 和 B)。并且检测了 M3T3-E1 细胞的碱性磷酸酶活性 (图 3C), 以及成骨细胞分化标志物的表达, 包括骨形态发生蛋白 2、Runx2 及骨钙素。研究结果表明, 与二甲基亚砜 +NC-mimic 组相比, 地塞米松处理显著降低了碱性磷酸酶活性和骨形态发生蛋白 2、Runx2 和骨钙素蛋白表达水平, 但增加了 PPAR γ 2 蛋白表达水平。但是, 地塞米松介导的作用被 miR-27b 模拟物所减弱 (图 3D 和 E)。细胞碱性磷酸酶活性和骨形态发生蛋白 2、Runx2 和骨钙素蛋白表达水平部分恢复。这些结果表明 miR-27b 过表达减弱地塞米松介导的抑制成骨细胞分化作用。

2.4 抑制 miR-27b 通过上调 PPAR γ 2 抑制 MC3T3-E1 细胞的增殖和成骨分化 通过 RT-qPCR 和 Western blot 分析证明了 MC3T3-E1 细胞中靶向 PPAR γ 2 的 siRNA 的转染效率, siPPAR γ 2-2 转染的细胞中 mRNA 和蛋白表达量最低。因此, 选择 siPPAR γ 2-2 进行后续分析 (图 4A 和 B)。为了研究 miR-27b

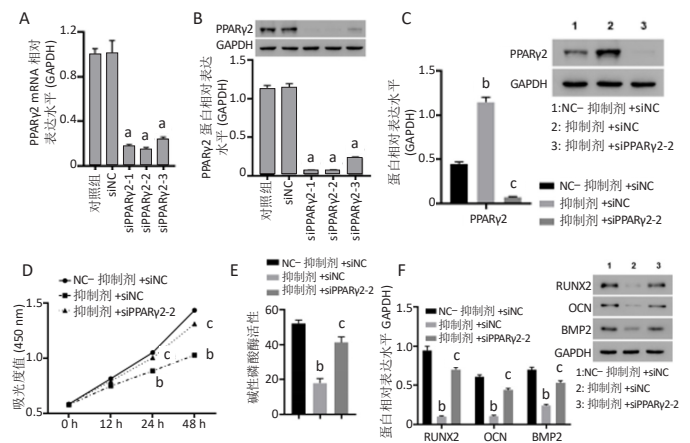


图注: 图 A 为使用反转录-定量 PCR 检测 miR-27b 的 mRNA 表达水平; B 为细胞活力; C 为碱性磷酸酶活性; D 为 PPAR γ 2 表达水平; E 为 MC3T3-E1 细胞的 Runx2、OCN 和 BMP2 的蛋白表达水平。与 DMSO+NC-mimic 比较, $^a P < 0.001$; 与 1 μ mol/L DEX+NC- 模拟物比较, $^b P < 0.01$, $^c P < 0.001$ 。MC3T3-E1 细胞: 小鼠胚胎成骨细胞前体细胞; PPAR γ 2: 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 2; DMSO: 二甲基亚砜; Runx2: RUNT 相关转录因子 2; OCN: 骨钙素; BMP2: 骨形态发生蛋白 2

图 3 | miR-27b 模拟物减弱地塞米松 (DEX) 抑制的 MC3T3-E1 细胞的增殖和成骨分化

Figure 3 | miR-27b mimic attenuates the proliferation and osteogenic differentiation of dexamethasone-suppressed MC3T3-E1 cells

对 PPAR γ 2 的潜在调节作用, 将 MC3T3-E1 细胞与 miR-27b 抑制剂和 PPAR γ 2 siRNA 共同转染。结果表明, 通过对 miR-27b 的敲除, 观察到了 PPAR γ 2 明显的表达增加, 并降低了细胞活力、成骨细胞分化、碱性磷酸酶活性以及骨形态发生蛋白 2、Runx2 和骨钙素的表达水平。然而, 这些影响被 siPPAR γ 2-2 转染所取代 (图 4C-F), miR-27b 作用被重新激活。因此, miR-27b 的敲除通过 PPAR γ 2 的上调抑制了 MC3T3-E1 细胞的增殖和成骨分化。



图注: 用 siPPAR γ 2 转染细胞 48 h, 图 A, B 为 PPAR γ 2 mRNA 和蛋白水平; MC3T3-E1 细胞与 miR-27b 抑制剂和 siPPAR γ 2-2 共转染, 图 C 为 PPAR γ 2 的蛋白表达; D 为细胞活力; E 为碱性磷酸酶活性; F 为 MC3T3-E1 细胞中 Runx2、OCN 和 BMP2 的蛋白表达水平。与 siNC 比较, $^a P < 0.001$; 与 NC- 抑制剂 +siNC 比较, $^b P < 0.001$; 与抑制剂 +siNC 比较, $^c P < 0.001$ 。MC3T3-E1 细胞: 小鼠胚胎成骨细胞前体细胞; PPAR γ 2: 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 2; Runx2: RUNT 相关转录因子 2; OCN: 骨钙素; BMP2: 骨形态发生蛋白 2

图 4 | miR-27b 抑制剂通过调节 PPAR γ 2 抑制 MC3T3-E1 细胞的增殖和成骨分化

Figure 4 | miR-27b inhibitor inhibits the proliferation and osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells by regulating peroxisome proliferators-activated receptor γ 2

3 讨论 Discussion

骨质疏松症作为一种慢性疾病,涉及到诸多方面的因素影响,最常见的原发病因素便是年龄与雌激素^[34-35],而继发性骨质疏松症包括糖皮质激素、肾脏病^[36]、胃肠道疾病以及恶性肿瘤和酒精等^[37-38],并且糖皮质激素诱导的骨质疏松症(GIOP)是继发性骨质疏松症的主要原因^[39],虽然有许多研究探索了多种治疗方式来治疗这些疾病,但疗效仍然有诸多局限性。有研究表明细胞大约30%的基因变化受到miRNA的调控,在细胞增殖、分化和凋亡中起重要的影响^[17]。其中miRNA参与调控成骨细胞分化、骨代谢和骨重建是近年来的研究热点^[40-41],如miR-320a和miR-532-3p,可以缓解骨质疏松症的进展^[42-43]。因此,许多miRNA可能成为开发安全有效的骨质疏松症治疗方案的新靶点。

MC3T3-E1细胞是小鼠中体外分离培养的一株成骨细胞,它能够展现成骨细胞的各个发育阶段和各种生物学特性,被认为是体外成骨细胞分化研究的良好模型^[44]。在此次研究中,地塞米松处理显著降低小鼠MC3T3-E1细胞的活力、碱性磷酸酶活性和成骨细胞分化,表明地塞米松诱导的骨质疏松模型的成功建立。miR-27b作为一种非编码miRNA,与多种疾病有关,例如妊娠期糖尿病、神经母细胞瘤等^[45-46],并且在脂肪生成早期,miR-27b的过表达可损害脂肪生成^[22],然而,miR-27b在骨质疏松症中的确切病理机制仍有待阐明。此次研究结果显示,miR-27b基因敲除抑制了MC3T3-E1细胞的增殖和成骨细胞分化,这与先前的研究结果一致,即miR-27b在人间充质干细胞体外成骨抑制PPAR γ 的作用,通过增加RUNX2基因表达增强成骨^[47],此次研究中地塞米松处理显著降低MC3T3-E1细胞的活力和miR-27b表达水平,当使用miR-27b模拟物过表达后则减弱了地塞米松抑制的增殖和成骨细胞分化,细胞碱性磷酸酶活性和骨形态发生蛋白2、Runx2和骨钙素蛋白表达水平部分恢复,凸显了miR-27b在骨质疏松症当中的潜在保护作用,但是不能完全逆转地塞米松的抑制作用。

PPAR γ 信号通路在细胞的生长、增殖和分化中起着重要作用,包括成骨细胞与破骨细胞,已经证明PPAR γ 的促破骨细胞生成作用^[48],并且PPAR γ 具有调控糖酵解和脂质代谢的功能,抑制肿瘤细胞的增殖与浸润^[26],miR-27a在激素性股骨头坏死大鼠模型中通过PPAR γ 抑制脂肪生成并促进成骨^[49]。因此假设miR-27b与PPAR γ 具有相互作用,在此次研究中,将miR-27b模拟物和抑制剂转染到MC3T3-E1细胞中,结果表明,PPAR γ 2 mRNA和蛋白质表达被miR-27b模拟物抑制,并被miR-27b抑制剂显著增强,这一结果表明地塞米松诱导MC3T3-E1细胞中miR-27b和的PPAR γ 2表达可能存在联系;并且通过转染PPAR γ 2 siRNA抑制PPAR γ 2,证明miR-27b可恢复部分细胞活力、碱性磷酸酶活性以及骨形态发生蛋白2、Runx2和骨钙素的表达水平;进一步通过荧光素酶报告实验,验证miR-27b可直接靶向作用于PPAR γ 2;研究结果显示,miR-27b通过靶向PPAR γ 2增强MC3T3-E1细胞

的增殖和成骨细胞分化,突出了PPAR γ 2在成骨细胞形成中的重要性。

在此次研究中,试图探索miR-27b对成骨细胞活性、分化和凋亡的作用,以及miR-27b在地塞米松诱导MC3T3-E1细胞中的下游靶基因和相关信号通路,利用了一些成骨分化标志物,包括碱性磷酸酶、Runx2、骨形态发生蛋白2和骨钙素等等。碱性磷酸酶是一种成骨早期标志物,其活性是细胞或者组织发生矿化的标志,碱性磷酸酶活性越高表明细胞向成骨方向分化的程度越高^[19]。此次实验结果表明,与对照组相比,地塞米松处理小鼠MC3T3-E1细胞的活力、碱性磷酸酶活性下降,而通过miR-27b模拟物转染,碱性磷酸酶活性有所恢复;将MC3T3-E1细胞与miR-27b抑制剂和PPAR γ 2 siRNA共同转染,结果表明,miR-27b的敲除明显增加了PPAR γ 2的表达,并降低了细胞活力、成骨细胞分化、碱性磷酸酶活性,但其在siPPAR γ 2-2转染后所上升;此外,随着成骨标志物(Runx2、骨钙素和骨形态发生蛋白2)表达的改变,以及在实验过程中的分析也证明miR-27b在地塞米松诱导MC3T3-E1细胞中的下游靶基因是PPAR γ 2。

很多研究证明了骨质疏松症的病理过程,而该过程中骨代谢与骨吸收的平衡至关重要,而miRNA可以传递细胞间的信号,并且可以通过改变来主动控制疾病。细胞外miRNA很容易被检测到,而且这种变化是有意义的,因为它们可能是疾病诊治过程的新方式,故研究miR-27b-3p/PPAR γ 2轴的作用对于骨质疏松症治疗非常重要。如此次结果所示,地塞米松诱导细胞组织中PPAR γ 2的表达升高,miR-27b负调控PPAR γ 2的表达;敲除PPAR γ 2后miR-27b对MC3T3-E1细胞的促进成骨可恢复。根据研究结果,miR-27b和PPAR γ 2可能构成一个重要的信号网络,直接或间接调节骨质疏松症的进展。值得注意的是,由于缺乏体内功能实验,目前的研究存在一些局限性。此外,未来如需根据研究结果开发骨质疏松症治疗药物,有必要进行动物实验并招募糖皮质激素诱发骨质疏松症患者,分析miR-27b/PPAR γ 2在骨质疏松症的确切机制。

结论:综上所述,miR-27b可抑制PPAR γ 2通路,增强miR-27b通过下调PPAR γ 2,可促进地塞米松诱导MC3T3-E1细胞的增殖和成骨分化,此外,在MC3T3-E1细胞中敲除PPAR γ 2可以恢复miR-27b的部分作用,从而改善骨质疏松症的发展,为骨质疏松症的治疗提供了新思路。

作者贡献:王磊、白雪松(并列第一作者)负责实验设计及文章撰写,杜宇负责数据整理、实验实施,何爱民负责对文章的知识性内容作批评性审阅,郑钧、张志鹏负责文献搜索、数据收集及统计分析。

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。

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。

版权转让:文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范:文章撰写遵守了《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。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。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊投稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] FEEHAN J, AL SAEDI A, DUQUE G. Targeting fundamental aging mechanisms to treat osteoporosis. *Expert Opin Ther Targets*. 2019;23:1031-1039.

[2] MENDOZA FA, LE ROUX M, AHMED I. Primary osteoporosis in men: an unmet medical need. *Fertil Steril*. 2019;112(5):791-798.

[3] SALARI N, DARVISHI N, BARTINA Y, et al. Global prevalence of osteoporosis among the world older adults: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res*. 2021;16(1):669.

[4] SALARI N, GHASEMI H, MOHAMMADI L, et al. The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res*. 2021;16(1):609.

[5] CHEN P, LI Z, HU Y. Prevalence of osteoporosis in China: a meta-analysis and systematic review. *BMC Public Health*. 2016;16(1):1039.

[6] CHENG X, ZHAO K, ZHA X, et al. Opportunistic Screening Using Low-Dose CT and the Prevalence of Osteoporosis in China: A Nationwide, Multicenter Study. *J Bone Miner Res*. 2021;36(3):427-435.

[7] CUI Z, MENG X, FENG H, et al. Estimation and projection about the standardized prevalence of osteoporosis in mainland China. *Arch Osteoporos*. 2019;15(1):2.

[8] WATANABE A, YONEYAMA S, NAKAJIMA M, et al. Osteosarcoma in Sprague-Dawley rats after long-term treatment with teriparatide (human parathyroid hormone (1-34)). *J Toxicol Sci*. 2012;37(3):617-629.

[9] MALLUCHE HH, CHEN J, LIMA F, et al. Bone Quality and Fractures in Women With Osteoporosis Treated With Bisphosphonates for 1 to 14 Years. *JBMR Plus*. 2021;5(11):e10549.

[10] LI J, CHEN X, LU L, et al. The relationship between bone marrow adipose tissue and bone metabolism in postmenopausal osteoporosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2020;52:88-98.

[11] MURUGANANDAN S, IONESCU AM, SINAL CJ. At the Crossroads of the Adipocyte and Osteoclast Differentiation Programs: Future Therapeutic Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2277.

[12] MURUGANANDAN S, SINAL CJ. The impact of bone marrow adipocytes on osteoblast and osteoclast differentiation. *IUBMB Life*. 2014;66(3):147-155.

[13] MURUGANANDAN S, GOVINDARAJAN R, SINAL CJ. Bone Marrow Adipose Tissue and Skeletal Health. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(4):434-442.

[14] ZHAO X, PATIL S, XU F, et al. Role of Biomolecules in Osteoclasts and Their Therapeutic Potential for Osteoporosis. *Biomolecules*. 2021;11(5):747.

[15] YANG Y, YUJIAO W, FANG W, et al. The roles of miRNA, lncRNA and circRNA in the development of osteoporosis. *Biol Res*. 2020;53(1):40.

[16] ZHAO H, LU A, HE X. Roles of MicroRNAs in Bone Destruction of Rheumatoid Arthritis. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:600867.

[17] 彭建强, 黄年盛, 黄胜, 等. H₂O₂ 下调 miR-21 对 MC3T3-E1 细胞成骨分化影响的研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2018,32(3):276-284.

[18] 郑峰, 张富财, 许喆. miR-98-5p 促进成骨细胞增殖和分化的可能及机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2021,25(26):4112-4117.

[19] 杨晓红, 杨琨, 廖立, 等. 微 RNA-705 对 MC3T3-E1 细胞成骨分化能力的影响 [J]. *浙江大学学报 (医学版)*, 2016,45(6):575-580.

[20] 赵长铭, 黄萌, 王振宁, 等. miR-129-5p 调控 MC3T3-E1 细胞成骨分化的体外研究 [J]. *解放军医学院学报*, 2021,42(5):565-570.

[21] HAN Z, ZHAN R, CHEN S, et al. miR-181b/Oncostatin m axis inhibits prostate cancer bone metastasis via modulating osteoclast differentiation. *J Cell Biochem*. 2020;121(2):1664-1674.

[22] KARBIENER M, FISCHER C, NOWITSCH S, et al. microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390(2):247-251.

[23] JACKSON SM, DEMER LL. Peroxisome proliferator-activated receptor activators modulate the osteoblastic maturation of MC3T3-E1 preosteoblasts. *FEBS Lett*. 2000;471(1):119-124.

[24] FAJAS L, AUBOEUUF D, RASPÉ E, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*. 1997;272(30):18779-18789.

[25] 朱磊, 路瑛丽, 冯连世, 等. 低氧训练诱导 miR-27/PPAR γ 调控肥胖大鼠腓肠肌脂代谢的研究 [J]. *体育科学*, 2019,39(6):55-61.

[26] 郭鑫, 宗欢欢, 李杜达, 等. PPAR γ 在肿瘤中的双重作用 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2021,43(2):460-468.

[27] WEI W, ZEVE D, WANG X, et al. Osteoclast progenitors reside in the peroxisome proliferator-activated receptor γ -expressing bone marrow cell population. *Mol Cell Biol*. 2011;31(23):4692-4705.

[28] MITTAL S, INAMDAR S, ACHARYA J, et al. miR-3666 inhibits development of hepatic steatosis by negatively regulating PPAR γ . *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2020;1865(10):158777.

[29] WANG X, XU Y, ZHU YC, et al. lncRNA NEAT1 promotes extracellular matrix accumulation and epithelial-to-mesenchymal transition by targeting miR-27b-3p and ZEB1 in diabetic nephropathy. *J Cell Physiol*. 2019;234(8):12926-12933.

[30] WANG X, LU Y, ZHU L, et al. Inhibition of miR-27b Regulates Lipid Metabolism in Skeletal Muscle of Obese Rats During Hypoxic Exercise by Increasing PPAR γ Expression. *Front Physiol*. 2020;11:1090.

[31] XU J, LV S, HOU Y, et al. miR-27b promotes type II collagen expression by targeting peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 during rat articular chondrocyte differentiation. *Biosci Rep*. 2018;38(1):BSR20171109.

[32] 董莹莹, 王猛, 郭艳, 等. 低钙饲料联合地塞米松致大鼠骨质疏松模型的建立 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019,25(10):1393-1397+1404.

[33] YANG L, LIU S, MU S, et al. Paeoniflorin Attenuates Dexamethasone-Induced Apoptosis of Osteoblast Cells and Promotes Bone Formation via Regulating AKT/mTOR/Autophagy Signaling Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2021;2021:6623464.

[34] PIGNOLO RJ, LAW SF, CHANDRA A. Bone Aging, Cellular Senescence, and Osteoporosis. *JBMR Plus*. 2021;5(4):e10488.

[35] PAIK J, SCOTT LJ. Romosozumab: A Review in Postmenopausal Osteoporosis. *Drugs Aging*. 2020;37(11):845-855.

[36] TASNIM N, DUTTA P, NAYEEM J, et al. Osteoporosis, an Inevitable Circumstance of Chronic Kidney Disease: A Systematic Review. *Cureus*. 2021;13(10):e18488.

[37] BABAN YN, EDICHERIA CM, JOSEPH J, et al. Osteoporosis Complications in Crohn's Disease Patients: Factors, Pathogenesis, and Treatment Outlines. *Cureus*. 2021;13(12):e20564.

[38] DRAKE MT, MURAD MH, MAUCK KF, et al. Clinical review. Risk factors for low bone mass-related fractures in men: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(6):1861-1870.

[39] BUCKLEY L, HUMPHREY MB. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *N Engl J Med*. 2018;379(26):2547-2556.

[40] ZHANG L, LI G, WANG K, et al. MiR-30 family members inhibit osteoblast differentiation by suppressing Runx2 under unloading conditions in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;522(1):164-170.

[41] 段克友, 官建中. 外泌体在骨质疏松症治疗中的研究进展 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2021,35(12):1642-1649.

[42] KONG Y, NIE ZK, LI F, et al. MiR-320a was highly expressed in postmenopausal osteoporosis and acts as a negative regulator in MC3T3E1 cells by reducing MAP9 and inhibiting PI3K/AKT signaling pathway. *Exp Mol Pathol*. 2019;110:104282.

[43] FAN Q, LI Y, SUN Q, et al. miR-532-3p inhibits osteogenic differentiation in MC3T3-E1 cells by downregulating ETS1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;525(2):498-504.

[44] 孙芬, 刘名燕, 刘铭, 等. miR-132-3p 过表达对 MC3T3-E1 细胞增殖分化的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2020,24(1):59-64.

[45] 王丽娜, 刘春梅, 胡叶青, 等. 血清 miR-27、PPAR- γ 表达与妊娠期糖尿病胰岛素抵抗 [J]. *中国计划生育学杂志*, 2021,29(5):1021-1024.

[46] LEE JJ, DRAKAKI A, ILIOPOULOS D, et al. MiR-27b targets PPAR γ to inhibit growth, tumor progression and the inflammatory response in neuroblastoma cells. *Oncogene*. 2012;31(33):3818-3825.

[47] SEENPRACHAWONG K, TAWORNSAWUTRUK T, NANTASENAMAT C, et al. miR-130a and miR-27b Enhance Osteogenesis in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells via Specific Down-Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ . *Front Genet*. 2018;9:543.

[48] WAN Y, CHONG LW, EVANS RM. PPAR- γ regulates osteoclastogenesis in mice. *Nat Med*. 2007;13(12):1496-1503.

[49] GU C, XU Y, ZHANG S, et al. miR-27a attenuates adipogenesis and promotes osteogenesis in steroid-induced rat BMSCs by targeting PPAR γ and GREM1. *Sci Rep*. 2016;6:38491.

(责任编辑: WZH, ZN, ZJP)