

# 非编码RNA在股骨头坏死发展中的作用 及中药干预研究进展

杜佳哲<sup>1</sup> 徐西林<sup>2</sup> 王银仓<sup>1</sup> 夏雪<sup>1</sup> 张晓峰<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>黑龙江中医药大学研究生院, 哈尔滨 150040; <sup>2</sup>黑龙江中医药大学附属第三医院骨科, 哈尔滨 150016;

<sup>3</sup>黑龙江省中医药管理局, 哈尔滨 150036)

**摘要** 非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA)是一类从基因组中转录而来、对蛋白质编码有调节作用的RNA。研究证明, ncRNA对骨髓间充质干细胞分化、骨代谢和血管修复发挥调节作用, 参与了股骨头坏死的发病进程, 而近年来作为治疗手段之一, 关于中药药物治疗疾病、影响ncRNA表达的实验也不在少数, 相关研究对于股骨头坏死发生机制的确定、诊疗手段的丰富具有重要意义。该文通过对知网、PubMed数据库内的相关文献进行归纳, 综述了近年来该领域的研究进展, 将中药干预与之联系, 为疾病的临床诊断、靶向治疗提供了新的理论依据和方向。

**关键词** 非编码RNA; 股骨头坏死; miRNA; lncRNA; circRNA; 中药复方

## Research Progress of Non-Coding RNA in the Pathogenesis of ONFH and Chinese Medicine Intervention Treatment

DU Jiazhe<sup>1</sup>, XU Xilin<sup>2</sup>, WANG Yincang<sup>1</sup>, XIA Xue<sup>1</sup>, ZHANG Xiaofeng<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>Graduate School, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

<sup>2</sup>Department of Orthopedics, the Third Hospital, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150016, China;

<sup>3</sup>Heilongjiang Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, China)

**Abstract** ncRNA (non-coding RNA) is a class of RNA that is transcribed from the genome and has a regulatory role in protein coding. ncRNA has been shown to play a regulatory role in bone marrow mesenchymal stem cell differentiation, bone metabolism and vascular repair, and is involved in the pathogenesis of femoral head necrosis. In recent years, there are few experiments on the treatment of femoral osteonecrosis by herbal medicine and the influence of ncRNA expression as one of the therapeutic tools. This paper reviews the research progress in this field in recent years by summarizing the relevant literature in CNKI and PubMed databases, and links Chinese medicine interventions to them, providing a new theoretical basis and direction for the clinical diagnosis and targeted treatment of the disease.

**Keywords** non-coding RNA; ONFH; miRNA; lncRNA; circRNA; Chinese herbal compound

收稿日期: 2023-04-25

接受日期: 2023-07-17

国家自然科学基金(批准号: 81774343)、全国名老中医药专家传承工作室建设项目(批准号: 2021—2024)、国家中医药管理局青年岐黄学者支持项目(批准号: 2021—2023)、中央支持地方高校改革发展资金人才培养支持计划(高水平人才培养支持项目)和黑龙江省骨坏死基础与临床研究重点实验室资助的课题

\*通讯作者。Tel: 18545009888, E-mail: zxfeng9919@163.com

Received: April 25, 2023

Accepted: July 17, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81774343), the State Administration of Traditional Chinese Medicine Construction Project of Inheritance Studio of National Famous Traditional Chinese Medicine Experts (Grant No.2021—2024), State Administration of Traditional Chinese Medicine Young Qihuang Scholars Support Project (Grant No.2021—2023), the Central Government Supports the Reform and Development of Local Colleges and Universities to Support the Talent Training Support Plan (High-Level Talent Training Support Project) and Key Laboratory of Basic and Clinical Research of Osteonecrosis in Heilongjiang Province

\*Corresponding author. Tel: +86-18545009888, E-mail: zxfeng9919@163.com

股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head, ONFH)是由多种原因引起的骨细胞凋亡性疾病,常表现为股骨头形态改变,并可进一步发生股骨头塌陷,通常由遗传和环境因素导致,包括遗传多态性、过量饮酒和激素应用等。现阶段ONFH的发病机制尚未完全得到公认,研究者多围绕“骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)表达异常”“骨代谢异常”“血运障碍”等主流学说进行讨论。其中,“BMSCs表达异常学说”认为BMSCs作为一种能分化成多种骨基质细胞的多能干细胞,成骨分化、成脂分化间的不平衡是ONFH发病的主要机制;“骨代谢异常学说”将目光放在成骨细胞(osteoblast, OB)、破骨细胞(osteoclast, OC)两者的关系上,认为ONFH的实质是这两种细胞的生成、分化受到促进或抑制,平衡度被打破;“血运障碍学说”则认为ONFH最常见的病理改变是导致血液出现高凝状态并形成微循环血栓,使股骨头局部血供受影响。

在症状体征方面,ONFH通常表现为髋部和腹股沟的疼痛,由于缺乏早期诊断的手段,患者很容易错过最佳治疗时间,大多数患者发病时身体已发生病理和影像学改变,在病变部位出现大量凋亡的骨细胞。在治疗方面,目前手术治疗方法主要有人工关节置换、髓芯减压和骨髓间充质干细胞移植等;在非手术治疗上,以西医药物治疗为代表的常规方法和以中药内服外敷、针灸为主要手段的中医传统疗法都具有良好的疗效。

随着对ONFH探讨的不断深入,目前大量研究发现ncRNA参与其中,且过程涉及多种靶标基因和多条信号通路,如果能由此阐明疾病的发病机制,对今后的防治将有重要意义<sup>[1-3]</sup>。笔者通过研究发现,ncRNA能经由某些特定途径直接或间接参与BMSCs表达、骨代谢和血管修复过程,并最终导致股骨头病理状态的出现。因此,本文就ncRNA的生物学特征、功能,以及ncRNA在“BMSCs表达”“骨代谢”和“血管修复”中的调控作用作一综述,又由于中药对于本病疗效显著,本文针对ncRNA在股骨头坏死发展中的作用研究进展加以阐述。

## 1 ncRNA的概述

人类的基因组中只有1.5%是蛋白质编码区,而其余没有蛋白质编码能力的核苷酸序列统

称为ncRNA<sup>[4]</sup>。ncRNA是指不能编码产生蛋白质的RNA分子,不仅可以调节基因表达、在细胞间进行信息传递,也可充当潜在的疾病诊断标记物。按功能其可分为管家ncRNA及调节ncRNA,前者包括转运RNA、核糖体RNA等,后者包括微小RNA(microRNA, miRNA)、长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)和环状RNA(circular RNA, circRNA)等。目前对ncRNA与ONFH的研究多集中在miRNA、lncRNA和circRNA,它们有望作为解析疾病发生和作为诊疗靶点的新型分子。

BMSCs表达、骨代谢和血管修复的异常作为ONFH重要的发病机制,大量研究已证实ncRNA在这些机制中作为调节因子存在<sup>[5-7]</sup>。

## 2 不同ncRNA对ONFH的作用机制

### 2.1 miRNA与ONFH

miRNA是一种小片段、单链、内源性的ncRNA,主要通过与其靶mRNA的3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'UTR)结合来调节其翻译,从而负调控靶mRNA的表达。关于miRNA通过调控BMSCs增殖分化、骨代谢及血管修复的途径参与ONFH的发生发展,具体如表1、表2和表3所示。

2.1.1 miRNA对BMSCs增殖、分化的作用 BMSCs是一种具有较强的增殖能力和多向分化潜能的成体干细胞,在特定的刺激下可被诱导分化为成骨细胞、成软骨细胞等多种骨基质细胞。已有实验证明miRNA能影响BMSCs的增殖和分化,多数认为该过程是通过miRNA与信号通路的交联实现的,其中Wnt/ $\beta$ -catenin就是一条引导BMSCs向OB分化的经典通路,该通路首先经Wnt蛋白激活下游级联反应,使 $\beta$ -catenin发生核转移,继而激活转录因子以实现对其靶基因的表达<sup>[8]</sup>。WU等<sup>[9]</sup>第一步确定GSK3B为miR-155-5p的靶基因,继而观察到转染miR-155-5p能增加 $\beta$ -catenin的表达量,相反,转染GSK3B则抑制其积累,由此得出结论——miR-155-5p能促进 $\beta$ -catenin的细胞质-核转位并激活 $\beta$ -catenin表达的信号,促进BMSCs的增殖和成骨分化。另有研究发现,过表达的miR-15a-5p能显著抑制Wnt和 $\beta$ -catenin蛋白的表达,同时诱导脂肪生成转录因子——PPAR $\gamma$ 生成,实现对BMSCs凋亡的抑制并促进脂肪生成与成骨分化<sup>[10]</sup>。此外,在Wnt/ $\beta$ -catenin这一经典通路中还存在着一种与成骨相关联的重要靶基因,即

表1 miRNA与BMSCs表达的关系(靶基因用下划线标出)

Table 1 Relationship between miRNA and BMSCs expression (target genes are underlined)

miRNA	目标基因和调节通路 Target genes and regulatory pathways	促进/抑制(→/⊥) Facilitation/inhibition (→/⊥)	影响 Effect result
miR-145 ↓	<u>GABARAPL1</u> ↑	→	BMSCs proliferation and differentiation
miR-244-5p ↑	<u>Smad4-TAZ</u> ↓	⊥	BMSCs adipogenic differentiation osteogenic differentiation
miR-596 ↑	<u>Smad3</u> ↓	⊥	BMSCs proliferation and osteogenic differentiation
miR-27a ↑	<u>PPAR-γ</u> ↓	⊥	BMSCs osteogenic differentiation osteogenic differentiation
miR-181d ↑	<u>Smad3</u> ↓	⊥	BMSCs osteogenic differentiation
miR-708 ↑	<u>Smad3</u> ↑	⊥	BMSCs osteogenic differentiation and adipogenic differentiation
miR-155-5p ↑	<u>GSK3B</u> ↓ → Wnt/β-catenin ↑	→	BMSCs proliferation and osteogenic differentiation
miR-15a-5p ↑	<u>PPAR</u> ↓ → Wnt/β-catenin ↑	→	BMSCs proliferation
miR-141 ↑	<u>E2F3</u> ↓	⊥	BMSCs osteogenic differentiation
miR-27a ↑	<u>PPARγ</u> ↓ <u>GREM1</u> ↓	⊥	BMSCs osteogenic differentiation adipogenic differentiation
miR-141 ↓	<u>SOX11</u> ↑	→	BMSCs proliferation
miR-148a-3p ↑	<u>SMURF1</u> ↓ → <u>BCL2</u> , <u>SMAD7</u> ↑	→	BMSCs proliferation and osteogenic differentiation

↑: 升高; ↓: 降低。

↑: rising; ↓: reducing.

表2 miRNA与骨代谢的关系(靶基因用下划线标出)

Table 2 Relationship between miRNA and bone metabolism (target genes are underlined)

miRNA	目标基因和调节通路 Target genes and regulatory pathways	促进/抑制(→/⊥) Facilitation/inhibition (→/⊥)	影响 Effect result
miR-122-5p ↑	<u>SPRY2</u> ↓ → <u>RTK</u> ↑	→	OB proliferation and differentiation
miR-576-5p ↑	<u>ANXA2</u> ↓	⊥	OB proliferation and mineralization OB apoptosis
miR-30b-5p ↓	<u>RUNX2</u> ↑ → <u>MMP13</u> , <u>Coll10a1</u> ↑	→	Cell apoptosis
miR-141 ↓	<u>TGF-β2</u> ↑	⊥	OB activity ↑ OC activity ↑
miR-20b ↑	<u>BMP</u> ↑	→	Cell apoptosis
miR-145 ↑	<u>TGF-β/Smad7</u> ↑	→	OB proliferation and differentiation
miR-206 ↑	<u>PDCD4</u> ↓	⊥	Cell apoptosis OB proliferation
miR-145 ↓	<u>VEGF</u> , <u>bFGF</u> ↑, Wnt/β-catenin ↑	⊥	Cell apoptosis
miR-26a ↑	<u>E2H2</u> ↓	⊥	OB proliferation Cell apoptosis
miR-93-5p ↑	<u>BMP-2</u> ↓	⊥	Osteogenic differentiation
miR-532-5p ↑	<u>NCOA3</u> ↓	→	Cell apoptosis
miR-3175 ↑	<u>DCAF1</u> ↓ → <u>Nrf2</u> ↑	⊥	Cell apoptosis
miR-135b ↑	<u>PDCD4</u> ↓ → <u>hips-MSC-Exos</u> ↑	⊥	Cell proliferation Cell apoptosis
miR-25-5p ↑	<u>PKCζ</u> ↓ → <u>AMPK</u> ↑	→	OB activity ↑
miR-13b ↑	<u>Ppm1e</u> ↓ → <u>AMPK</u> ↑	→	OB activity ↑

↑: 升高; ↓: 降低。

↑: rising; ↓: reducing.

表3 miRNA与血管修复的关系(靶基因用下划线标出)

Table 3 Relationship between miRNA and vascular repair (target genes are underlined)

miRNA	目标基因和调节通路 Target genes and regulatory pathways	促进/抑制(→/⊥) Facilitation/inhibition (→/⊥)	影响 Effect result
miR-100-5p ↑	<u>BMPR2</u> ↓ → <u>SMAD1/5/9</u> ↓	——	HUVEC angiogenesis
miR-224-3p ↓	<u>FIP200</u> ↑	——→	VEC angiogenesis
miR-214-3p	<u>Runx1</u> /VEGFA ↑	——→	Angiogenesis

↑: 升高; ↓: 降低。

↑: rising; ↓: reducing.

*Runx2*, 多个研究表明, miR-15b、miR-30-5p等可通过靶向调控*Runx2*影响BMSCs的成骨分化过程<sup>[11-12]</sup>。

在其他关于信号通路的研究中, TGF-β/Smad同样具有很高的研究热度, Smad3是该通路的下游信号分子, 磷酸化后与Smad4结合能实现对BMSCs分化的调控, 这一结论先后得到了多位研究者的证明<sup>[13-15]</sup>。除此之外, Smad家族中的抑制性蛋白——Smad7也同样与miRNA关系密切。HUANG等<sup>[16]</sup>通过使BMSCs细胞外囊泡来源的miR-148-3p过表达, 实现对靶基因*SMURF1*的抑制, 而*SMURF1*作为Smad7的E3泛素连接酶, 还能同时促进Smad7在系膜细胞中表达。这种通过干预miRNA、Smad家族的蛋白质以达到调节TGF-β信号通路并最终靶向BMSCs成骨分化的办法不失为一种好选择。

国内外的结果表明, 差异化表达的miRNA能在一定程度上经相同的信号通路对BMSCs进行调控, 同样的, 相同miRNA也可以通过不同的信号通路实现表达。如何在此研究基础上由点及线、由线及面将miRNA与信号通路有机串联, 进一步整体化探究疾病的发生机制是研究人员需要考量的。

**2.1.2 miRNA对骨代谢的作用** 骨代谢指骨髓及骨细胞的生成、修复重建等过程, ONFH的发生与骨代谢的平衡性失调有很大联系, 研究证实miRNA可经一定的信号通路调整OB、OC的增殖速度与分化程度, 继而参与骨代谢过程。与BMSCs表达引起ONFH的机制类似, Wnt/β-catenin、TGF-β作为与骨生长发育密切相关的信号通路在骨代谢调节中也扮演了相当重要的角色。TIAN等<sup>[17]</sup>敲除新西兰兔模型的miR-145抑制骨细胞凋亡, 检测到VEGF、bFGF的表达水平升高, 他们认为这一变化是通过促进β-catenin实现的。TIAN等<sup>[18]</sup>在确定了TGF-β是miR-141的靶基因后, 过表达前者

或抑制后者, 均观察到骨保护素、Runx2升高与骨保护素配体下降, 由此增加了OB活性, 并实现了对OC活性的抑制。

除经典通路外, AMK活化蛋白激酶[adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK]也是当下的热点之一。AMPK作为一种能量代谢的主要调节因子, 关于其能否在骨代谢中影响OB引起了研究人员的注意, FAN等<sup>[19-20]</sup>先后两次进行实验, 分别提出了“miRNA-25-5p激活AMPK并靶向PKCζ非翻译区”“miR-135b激活AMPK并靶向Ppmle非翻译区”的观点, 下一步两者均可通过提高烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸活性来减缓激素诱导的OB氧化应激进程。上述研究表明, miRNA在调节OB、OC活性, 维持股骨头稳定性上发挥了重要作用。而研究人员首先假定某个调节OB活性的因素, 继而将研究范围衍生至不同的miRNA及每个miRNA所对应的靶基因, 这种方法有助于更快、更全面地形成对发生机理的系统化认识。

**2.1.3 miRNA对血管修复的作用** 骨修复过程中的血管化是骨再生的重要调控因素, “血管新生-骨形成耦联”机制是调控骨重建修复的关键机制<sup>[21]</sup>。作为经典学说之一, 血管内皮损伤引发ONFH的机制已被大多数人认可, 如何改善坏死局部的血运障碍及骨微血管内皮细胞的损伤以作为新的治疗手段成为亟需解决的问题。YANG等<sup>[22]</sup>注意到BMSCs来源的外泌体能抑制成骨及血管生成, 他们找到了其中的关键miRNA——miR-100-5p, 并通过双荧光素酶报告基因测定确定*BMPR2*为靶基因。在此过程中*BMPR2*首先磷酸化*BMPRI*, 激活的*BMPRI*继续磷酸化Smad1/5/9参与对分化的调控, 最终达到成血管化的效果。除了创伤性ONFH的研究外, BMSCs来源的外泌体同样也被应用于外伤导致的ONFH治疗上,

研究人员首次提出了外泌体可被血管内皮内化的观点,他们认为外泌体中 miR-224-3p 的沉默是导致目标靶蛋白 *FIP200* 增加的原因所在,并最终实现促进血管内皮细胞的增殖<sup>[23]</sup>。

作为近年一种较为新颖的方式,外泌体疗法能通过促进内皮细胞生成、改善坏死区域血供以达到治疗目的,外泌体因为其来源的多样化也赋予了该疗法更多的选择性与可能性。此外,对疾病相关特异性 miRNA 研究的深入,使得修饰、编码、工程化改造外泌体成为可能,所需的 miRNA 在这一疗法中扮演“货物”的角色,在外泌体的帮助下被递送至靶器官,在外泌体这个“载体”的协助下,将来对于不同类型、不同分期 ONFH 患者的治疗将更加有针对性。总之,外泌体疗法的出现为血管内皮损伤学说中 miRNA 的靶向治疗拓宽了思路,有利于更好地促进内皮细胞生成、改善股骨头局部血供。

**2.2 lncRNA与ONFH**

lncRNA 是一种非编码的、长度大于 200 个核苷酸的 RNA 序列,具有类似 mRNA 的特征。其在骨科的应用多集中于骨关节炎、骨质疏松等病的治疗上,目前与 ONFH 相关的研究并不多。除能直接参与调控细胞增殖、分化外,lncRNA 还能充当 miRNA 的海绵,作为侵略性的内源 RNA,通过竞争性结合使 miRNA 活性降低,并间接上调下游靶基因的表达。

与上文 miRNA 类似,lncRNA 在 ONFH 上的应用同样集中在和 BMSCs 表达、骨代谢相关的调控上,具体作用机制如图 1 所示。

**2.2.1 lncRNA对BMSCs表达的作用** WU 等<sup>[24]</sup> 选用 lnc-FGD-AS1 充当 miR-296-5p 的海绵,通过下调 miR-296-5p、上调靶基因 *STAT3* 来促进 BMSCs 增殖,而同时 lnc-FGD-AS1 本身也具备了促进治疗 ONFH 的能力。除此之外,在最近的研究中,ZHANG 等<sup>[25]</sup> 首次考虑了缺氧状态会对 BMSCs 的凋亡造成影响,在实验中他们发现 lnc-Tmem235 和靶基因 *BIRC5* mRNA 均具有 miR-34a-3p 的结合位点,因此 lnc-Tmem235 能和 *BIRC5* mRNA 竞争性结合 miR-34a-3p,从而解除后者对前者的沉默作用,最终实现对缺氧状态下 BMSCs 凋亡的抑制。

不难看出,lncRNA 除直接对 BMSCs 的增殖、分化进行调节外,也能以海绵的形式间接对 miRNA 及靶基因进行调控,在此基础上研究人员若进一步引入缺氧、高糖、微重力等人体环境变量,能最大程度模拟抑制 BMSCs 表达的因素,对 ONFH 的整体化治疗起到一定参考作用。

**2.2.2 lncRNA对骨代谢的作用** 在关于 lncRNA 对骨代谢影响的研究中,有实验表明,异位过表达 lnc-EPIC1 能抑制激素诱导的成骨细胞 OB-6 凋亡和程序性坏死,靶向 siRNA 沉默则增强了激素诱导的

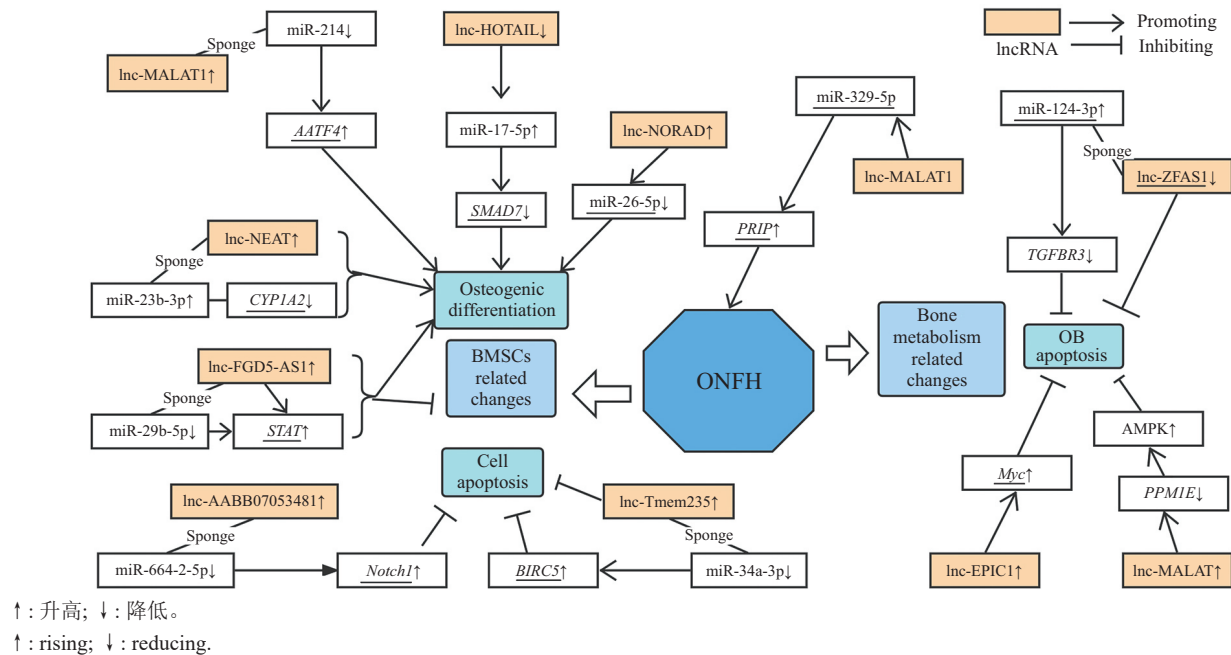


图1 lncRNA与ONFH的作用机制(靶基因用下划线标出)

Fig.1 Mechanism of action between lncRNA and ONFH (target genes are underlined)

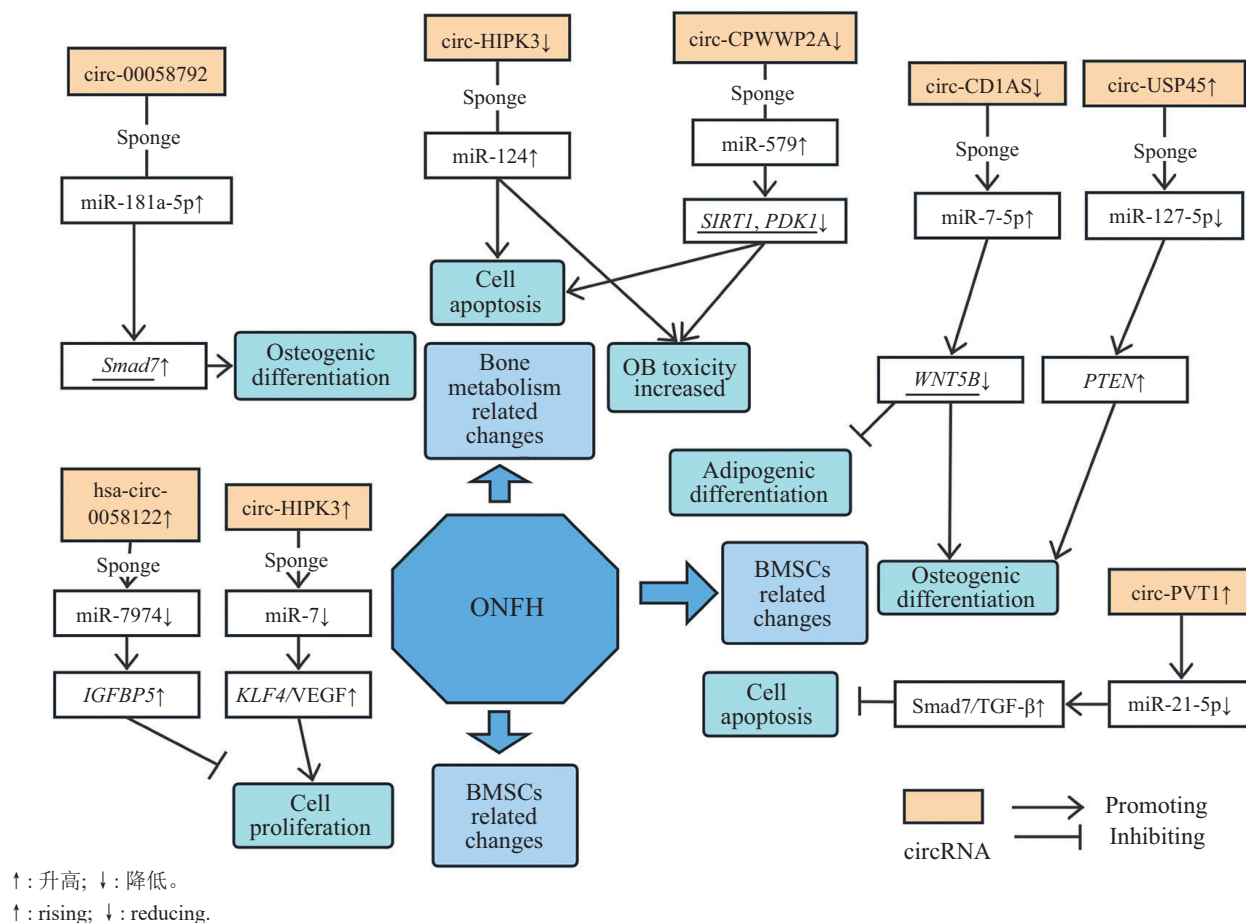


图2 circRNA与ONFH的作用机制(靶基因用下划线标出)

Fig.2 Mechanism of action between circRNA and ONFH (target genes are underlined)

细胞毒性, 而若采用 CRISPR-Cas-9 方法敲除靶基因 *Myc*, 则可消除 *lnc-EPIC1* 的针对性保护作用 [26]。除此之外, 在最新的研究中, 研究者认为 *lnc-ZFAS1* 作为 *miR-124-3p* 的内源竞争 RNA (亦可称为海绵) 上调了 *TGFBR3* 的表达, 影响了 OB 的增殖和骨形成过程, 而在之前敲低 *lnc-ZFAS1* 已被证明能改善骨微结构、骨密度并加速形成 BMP-9、BMP-3 和骨钙素, 这表明 *lnc-ZFAS1/miR-124-3p/TGFBR3* 轴是治疗激素诱导的 ONFH 的潜在靶点 [27]。故干扰 *lncRNA* 的异常表达可能是延缓 ONFH 进展的有效治疗方法。

### 2.3 circRNA与ONFH的关系

circRNA 是一种不具有蛋白质编码功能的长链内源性环状 RNA 分子, 参与多种基因组转录, 经常被认为与细胞稳态有关, 而细胞稳态在某些生理过程中起着关键作用 [28]。关于与 ONFH 的作用机制关系具体如图 2 所示。

在“BMSCs 表达”方面, 研究认为 *circ-PVT1* 能下调 *miR-21-5p* 激活 TGF-β/Smad 通路, 以实现 BMSCs 凋亡的抑制 [29]; HAN 等 [30] 认为 *circ-0058792* 能通过 TGF-β/Smad7 通路与 *miR-181a-5p* 相互作用来调节成骨、破骨间的平衡。在“血管修复”方面, 研究者得出结论, *circHIPK3* 能通过靶向 *miR-7* 和 *KLF4/VEGF* 信号通路促进 BMECs 增殖、迁移和血管生成 [6]。与其他两种 ncRNA 相比, circRNA 关于 ONFH 发病机制的研究尚少, 处于起步阶段, 但由于 circRNA 特殊的环状结构具有其他线性 RNA 所没有的稳定性, 因此能对其更加有控制地、人为地进行调控, circRNA 为本病的治疗提供了新的靶点, 未来可能是研究重心所在。

### 3 ncRNA对于ONFH的诊断意义

由于目前临床缺乏 ONFH 特异性的生物标志物, 早期诊断只能依靠影像学检查, 而近年随着对

ncRNA研究的深入,人们对其发生机制认识得更加全面,在此基础上也进一步丰富了ONFH的诊疗手段。

### 3.1 生物标志物诊断

蛋白组学、基因组学等基础学科的发展为ONFH的诊断提供了强有力的帮助。在临床诊断中,可通过检测患者血清、尿液或组织中ncRNA的表达水平来判断ONFH的发生与否及严重程度。CHAO等<sup>[31]</sup>发现miR-1207-5p在激素所致ONFH患者的外周血中高表达,在“血清”中的含量可达对照组的2.5倍,且与髋关节功能评分成反比;陈德龙<sup>[32]</sup>利用了外泌体稳定存在于体液的特性,对来自“尿液”外泌体的miRNA进行测序,发现共有28条miRNA表达存在明显差异,其中15条上调、13条下调,而后又对其中的miR-206进行了靶基因和信号通路的预测,完善了靶向路径的研究;在“组织”的表达研究中,LUO等<sup>[33]</sup>运用芯片技术得到了ONFH患者组织的lncRNA表达谱,发现有1 179个上调、3 214个下调,其中上调的以NR 027293、NR 046211为代表,下调的以T318766、NR 038891为多。相比于其他有创诊疗手段,患者的血清、尿液等获取相对简单,采用这种具有非介入、可重复特性的“液体活检”的方式,更有利于建立起疾病的完整基因表达谱,实现实时监测疾病发展进程及靶向用药的目的。

### 3.2 早期诊断与预后评估

ONFH的早期诊断对于患者的治疗、康复至关重要,由于ncRNA在疾病早期就发生变化,因此其可能成为协助早期诊断的重要指标。有研究表明在早期ONFH组织中miR-206等表达水平显著升高,而miR-27a、lnc-HOTAIR等表达水平则显著下降<sup>[34-36]</sup>。同样,如在疾病后期,通过检测特征性表达的ncRNA亦可实现对ONFH的预后评估。有研究发现,ONFH患者的circ-CDR1AS表达水平降低,而低表达的circ-CDR1AS表达降低往往被认为是预后差的表现<sup>[37]</sup>。ncRNA有潜力成为ONFH的早期诊断与预后评估的重要标志物,为医生制定临床方案、预测复发风险、评估病程时间提供帮助,也在一定程度上减少了患者因为早期诊断不明确导致的坏死加重,甚至塌陷的风险。对于临床上较难分辨的疾病类型及分期可以借助ncRNA的表达差异来进行鉴别,这一“精准医学手段”的应用有助于提高诊断准确性。

## 4 中药对ONFH的作用机制

ncRNA除能协助疾病诊断外,还能帮助阐明某些治疗方法的作用机制。大量研究显示,中药在ONFH的治疗上效果突出、特点鲜明,中医将本病归于“骨痹”范畴,致病因素主要有“痰”“瘀”“虚”三类,其中“痰瘀互结”为标,“肝肾亏虚”为本。中医的整体观念、辨证论治具有多层次、多靶点的优势,能够通过干预多种靶基因及信号通路达到改善骨代谢、重建骨平衡的效果。而从ncRNA角度分析中药的临床疗效,也给这一学科注入了独特的生命力,本部分对中药通过此角度作用于ONFH的机制加以总结(图3)。

### 4.1 单体药物

仙鹤草多糖(APP-AW)即 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D葡聚糖,是仙鹤草的主要成分,APP-AW及其硫酸衍生物(S2)以50  $\mu$ g/mL预处理48 h后,能对地塞米松诱导的ONFH模型起到维持细胞存活、促进成骨分化、抑制细胞凋亡的作用,这一过程是通过增强miR-107的表达能力与介导Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路实现的<sup>[38]</sup>。白藜芦醇(Resveratrol, Res)是白藜芦的一种多酚化合物,除本身特有的抗氧化性质外,之前的研究已证实其还能促进BMSCs的成骨分化,CHEN等<sup>[39]</sup>实验得出结论Res通过上调miR-146a对ONFH进行调节,逆转坏死期间发生的异常OB/OC生成活动,该过程通过清除活性氧、抑制FOXO转录因子对 $\beta$ -catenin的整合,最终上调Wnt信号级联反应。同样能促进BMSCs增殖的还有葛根素和黄芪多糖(Astragalus polysaccharide, APS),前者是一种来源于葛根根部的异黄酮类化合物,后者是黄芪的主要成分,它们均能通过改变一定的miRNA实现调控<sup>[40-42]</sup>。显然,中药单体干预ncRNA治疗ONFH过程的研究热点相对集中,分类上以miRNA为主;调控效果方面,在大量关于BMSCs增殖、分化的前期实验基础上,现阶段重心多处于“骨代谢”调控的研究;若从中药药性角度来看,所研究的单体药物多属于“补益类”药物的范畴。笔者认为,如何以药物的药性、归经等为出发点,拓宽使用更多类别中药提取物成分,并研究对骨细胞凋亡、自噬的作用机制将是下一步的重点。

单体中药除具有调控骨代谢的功能外,还能通过促血管修复来抑制ONFH的发生。例如来自淫羊藿的成分——淫羊藿苷(Icariin, ICA),先后有研究

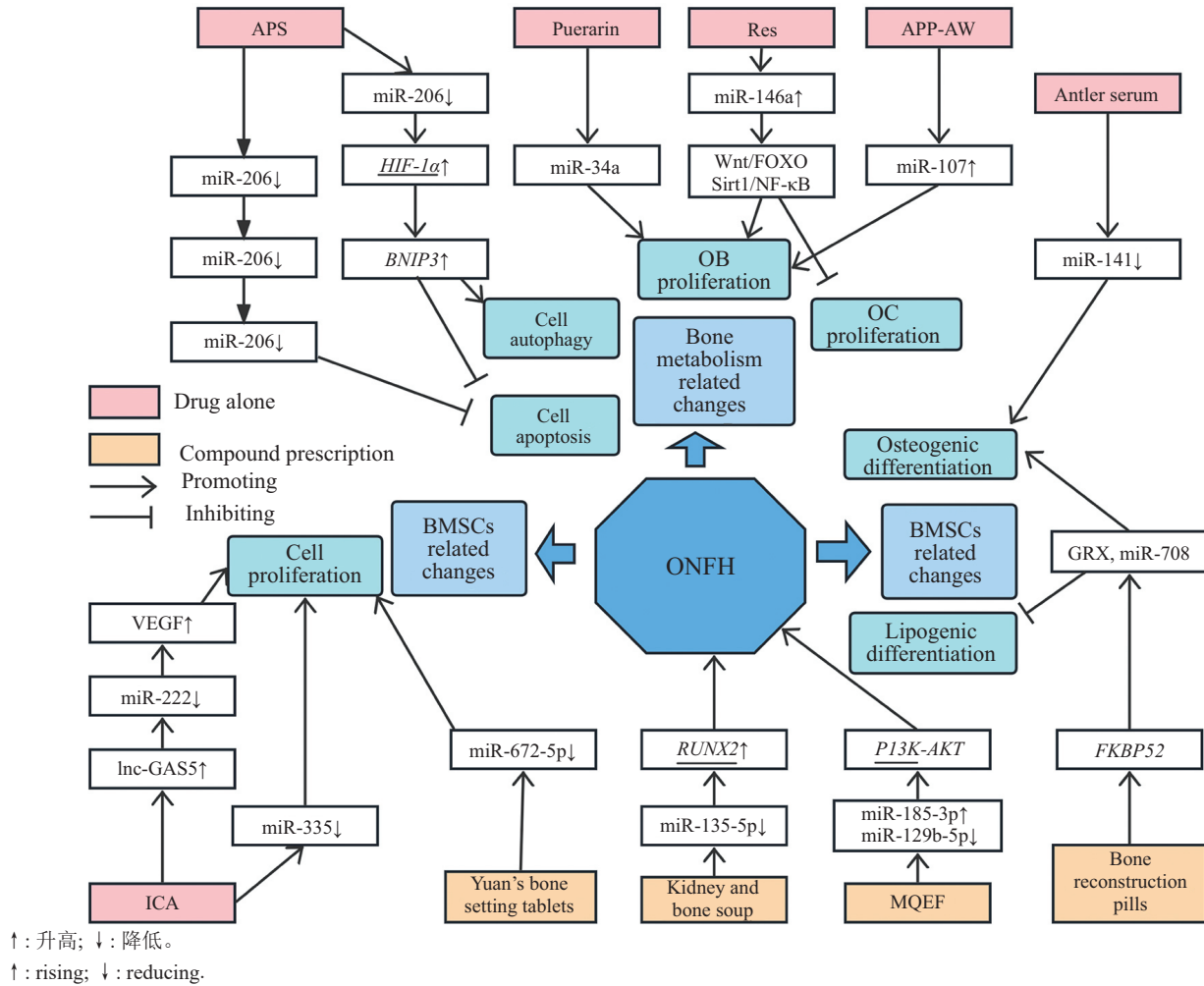


图3 中药通过ncRNA作用于ONFH(靶基因用下划线标出)  
Fig.3 Traditional Chinese medicine acts ONFH through ncRNA (target genes are underlined)

证实ICA可通过调节miR-335、miR-222的表达实现BMECs的成血管分化和VEGF的表达,其中关于前者miR-335的研究更为深入,认为其调控涉及了lnc-GAS5/miR-222的信号轴<sup>[43-44]</sup>。

#### 4.2 复方药物

由多种单味药组成的中药复方在基础研究中也证明与ONFH的治疗关系密切。在关于袁氏生脉成骨片的相关研究中,研究者首先对激素诱导的ONFH小鼠OB中差异表达的miRNA进行分析,其中差别较明显的共4个,运用靶点预测软件对其中的miR-672-5p进行检测,得到靶基因*Angptl4*、*Ccdc51*、*RGD1306991*、*Ssbp3*。本研究虽未深入至发生机制层面,但也为该成药参与促血管生成、重建骨平衡提供了一定参考<sup>[45]</sup>。

生骨再造丸方中君药淫羊藿、鹿角胶滋肝肾,强筋骨,在初期试验中,研究者发现生骨再造丸干

预后miR-708-3p和miR-708-5p的表达水平下降明显;在进一步深入研究中发现,生骨再造丸是经由FKBP52/GRα/miR-708信号通路促进BMSCs成骨分化、抑制成脂分化的<sup>[46-48]</sup>。

加味青娥方(Modified Qing' E Formula, MQEF)由杜仲、补骨脂等药物组成,具有补肾阳、强筋骨之功。ZHU等<sup>[49]</sup>制备了MQEF治疗的ONFH小鼠模型,后提取股骨骨髓来源的外泌体进行GO分析和KEGG分析,在标志性miRNA中,miR-185-3p和miR-1b-5p上调明显、miR-129b-5p和miR-223-5p下调明显,取其中变化最为显著的进行后续实验,证明了miRNA是通过PI3K-AKT通路参与骨代谢和骨重建过程的。

不难发现,关于中药复方对ONFH的治疗是一个多靶点、多通路共同协作的过程,不同于单味药的直接作用,对于复方的研究更为复杂,这就意味着



研究者需要从表达谱以及中医药治疗后 miRNA 的差异化表达分析上着手,进而再预测相关联的多个靶基因及信号通路。在临床上,复方的使用率明显高于单药,如何将方剂的整体分析与某一味单药的深入挖掘有机结合,以及如何将 ONFH 的中医辨证分型和 ncRNA 的表达相结合可能是下一步中医研究的方向所在。

## 5 总结与展望

本文就 miRNA、lncRNA、circRNA 在 ONFH 的研究进展进行综述,总结特征性 RNA 和靶基因,绘制机制图,以期为研究者提供一定参考,将 ncRNA 与三种主流学说结合,也证明了通过此角度解释疾病的具体机制是可行的。通过对某一个或某几个特征性 ncRNA 进行研究,使得对众多 ncRNA 及通路构成的网状作用机制的了解成为可能。当熟悉知晓机理后,如何利用其中的特殊的 ncRNA 就成为下一步关键所在,例如“引入靶向药物”“研究酒精、缺氧等特定环境因素影响”“编码外泌体运送指定‘货物’至所需部位”等多种方向,还可针对有保护作用的 ncRNA,运用组织工程技术,植入特定的干细胞或 OB 等细胞,用以早期干预 ONFH。这些都将成为技术突破的关键,对于协助临床诊断、丰富治疗方法大有帮助。

此外,我们也要看到中药在疾病的治疗方面的优势。中医治疗以活血化瘀、补肾壮骨为出发点,如何将“填精益髓”与促进骨髓间充质干细胞的增殖、分化相结合,如何将“补肾壮骨”与骨代谢中促成骨作用相结合,如何将“养血活血”与血管内皮修复相结合,值得各位研究者深入思考。在临床疗效确定的前提下,从西医分子生物学等角度证明中医疗法的科学性对于中医药学科的发展是大有帮助的。

## 参考文献 (References)

- [1] DUAN D Y, TANG J, TIAN H T, et al. Adipocyte-secreted microvesicle-derived miR-148a regulates adipogenic and osteogenic differentiation by targeting Wnt5a/Ror2 pathway [J]. *Life Sci*, 2021, 278: 119548.
- [2] HAN N, LI Z. Non-coding RNA identification in osteonecrosis of the femoral head using competitive endogenous RNA network analysis [J]. *Orthop Surg*, 2021, 13(3): 1067-76.
- [3] ZHANG Q, LONG Y, JIN L, et al. Non-coding RNAs regulate the BMP/Smad pathway during osteogenic differentiation of stem cells [J]. *Acta Histochem*, 2023, 125(1): 151998.
- [4] LANDER E S. Initial impact of the sequencing of the human genome [J]. *Nature*, 2011, 470(7333): 187-97.
- [5] LAN X, MA H, XIONG Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes mediate nuclear receptor coactivator-3 expression in osteoblasts by delivering miR-532-5p to influence osteonecrosis of the femoral head development [J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46(12): 2185-97.
- [6] PENG P, HE W, ZHANG Y X, et al. CircHIPK3 promotes bone microvascular endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis by targeting miR-7 and KLF4/VEGF signaling in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2023, 32: 43-55.
- [7] WANG T, XIE Z H, WANG L, et al. LncAABR07053481 inhibits bone marrow mesenchymal stem cell apoptosis and promotes repair following steroid-induced avascular necrosis [J]. *Commun Biol*, 2023, 6(1): 365.
- [8] SUN Q, LIU S, FENG J, et al. Current status of microRNAs that target the wnt signaling pathway in regulation of osteogenesis and bone metabolism: a review [J]. *Med Sci Monit*, 2021, 27: e929510.
- [9] WU F, HUANG W, YANG Y, et al. miR-155-5p regulates mesenchymal stem cell osteogenesis and proliferation by targeting GSK3B in steroid-associated osteonecrosis [J]. *Cell Biol Int*, 2021, 45(1): 83-91.
- [10] ZHANG W L, CHI C T, MENG X H, et al. miRNA-15a-5p facilitates the bone marrow stem cell apoptosis of femoral head necrosis through the Wnt/ $\beta$ -catenin/PPAR $\gamma$  signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19: 4779-87.
- [11] 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): 9761-71.
- [12] LIN L, YU Y, LIU K, et al. Downregulation of miR-30b-5p facilitates chondrocyte hypertrophy and apoptosis via targeting Runx2 in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11275.
- [13] CAO Y, JIANG C, WANG X, et al. Reciprocal effect of microRNA-224 on osteogenesis and adipogenesis in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. *Bone*, 2021, 145: 115844.
- [14] HAO C, YANG S, XU W, et al. MiR-708 promotes steroid-induced osteonecrosis of femoral head, suppresses osteogenic differentiation by targeting SMAD3 [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22599.
- [15] XIE Y, HU J Z, SHI Z Y. MiR-181d promotes steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by targeting SMAD3 to inhibit osteogenic differentiation of hBMSCs [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(13): 4053-62.
- [16] HUANG S, LI Y, WU P, et al. microRNA-148a-3p in extracellular vesicles derived from bone marrow mesenchymal stem cells suppresses SMURF1 to prevent osteonecrosis of femoral head [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 24(19): 11512-23.
- [17] TIAN Z J, LIU B Y, ZHANG Y T, et al. MiR-145 silencing promotes steroid-induced avascular necrosis of the femoral head repair via upregulating VEGF [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(17): 3763-9.
- [18] 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- $\beta$ 2 [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(7): 772-86.
- [19] FAN J B, LIU W, ZHU X H, et al. microRNA-25 targets PKC $\zeta$  and protects osteoblastic cells from dexamethasone via activating AMPK signaling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(2): 3226-36.
- [20] FAN J B, RUAN J W, LIU W, et al. miR-135b expression down-regulates Ppm1e to activate AMPK signaling and protect osteoblastic cells from dexamethasone [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(43): 70613-22.
- [21] STEWEN J, BIXEL M G. Intravital imaging of blood flow and HSPC homing in bone marrow microvessels [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2017: 109-21.
- [22] YANG W, ZHU W, YANG Y, et al. Exosomal miR-100-5p inhibits osteogenesis of hBMSCs and angiogenesis of HUVECs by suppressing the BMP2/Smad1/5/9 signalling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 390.
- [23] XU H J, LIAO W, LIU X Z, et al. Down-regulation of exosomal microRNA-224-3p derived from bone marrow-derived mesenchymal stem cells potentiates angiogenesis in traumatic osteonecrosis of the femoral head [J]. *FASEB J*, 2019, 33(7): 8055-68.
- [24] WU Y, FANG L, GAO Y, et al. lncRNA FGD5-AS1 regulates bone marrow stem cell proliferation and apoptosis by affecting miR-296-5p/STAT3 axis in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. *J Healthc Eng*, 2019, 33(7): 8055-68.
- [25] ZHANG F, PENG W, WANG T, et al. Lnc Tmem235 promotes repair of early steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by inhibiting hypoxia-induced apoptosis of BMSCs [J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(11): 1991-2006.
- [26] ZHANG X Y, SHAN H J, ZHANG P, et al. LncRNA EPIC1 protects human osteoblasts from dexamethasone-induced cell death [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4): 2255-62.
- [27] LAN X Y, XIONG Y, MA H, et al. Long noncoding RNA zinc finger antisense 1 affects glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head by performing as a ceRNA for microRNA-124-3p and accelerating transforming growth factor type III receptor [J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022: 4487864.
- [28] SAKSHI S, JAYASURIYA R, GANESAN K, et al. Role of circRNA-miRNA-mRNA interaction network in diabetes and its associated complications [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 26: 1291-302.
- [29] HAO Y, LU C, ZHANG B, et al. CircPVT1 up-regulation attenuates steroid-induced osteonecrosis of the femoral head through regulating miR-21-5p-mediated Smad7/TGF $\beta$  signalling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(10): 4608-22.
- [30] HAN N, QIAN F, NIU X, et al. Circ\_0058792 regulates osteogenic differentiation through miR-181a-5p/Smad7 axis in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(5): 12807-22.
- [31] CHAO P C, CUI M Y, LI X A, et al. Correlation between miR-1207-5p expression with steroid-induced necrosis of femoral head and VEGF expression [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(7): 2710-8.
- [32] 陈德龙. 借助尿液外泌体microRNAs的差异表达探讨“治未病”在激素性股骨头坏死早期诊断中的价值[D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [33] LUO H, LAN W, LI Y, et al. Microarray analysis of long-non-coding RNAs and mRNA expression profiles in human steroid-induced avascular necrosis of the femoral head [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 15800-13.
- [34] LIU G, LUO G, BO Z, et al. Impaired osteogenic differentiation associated with connexin43/microRNA-206 in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head [J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 101(1): 89-99.
- [35] CUI Y, HUANG T, ZHANG Z, et al. The potential effect of BMSCs with miR-27a in improving steroid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 21051.
- [36] WEI B, WEI W, ZHAO B, et al. Long non-coding RNA HO-TAIR inhibits miR-17-5p to regulate osteogenic differentiation and proliferation in non-traumatic osteonecrosis of femoral head [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0169097.
- [37] JIANG B, ZHU S H, ZENG J Y, et al. Plasma and local expressions of CircRNA CDR1as are linked with disease severity in patients with non-traumatic osteonecrosis of femoral head [J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1): 592.
- [38] HUANG W, JIN S, YANG W, et al. Agrimonia pilosa polysaccharide and its sulfate derivatives facilitate cell proliferation and osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells by targeting miR-107 [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 157: 616-25.
- [39] CHEN X H, SHI Z G, LIN H B, et al. Resveratrol alleviates osteoporosis through improving the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(14): 6352-9.
- [40] JIANG X, CHEN W, SU H, et al. Puerarin facilitates osteogenesis in steroid-induced necrosis of rabbit femoral head and osteogenesis of steroid-induced osteocytes via miR-34a upregulation [J]. *Cytokine*, 2021, 143: 155512.
- [41] ZHANG S Y, WANG F, ZENG X J, et al. Astragalus polysaccharide ameliorates steroid-induced osteonecrosis of femoral head through miR-206/HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 axis [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2021, 37(12): 1089-100.
- [42] YUE J, YU H, LIU P, et al. Preliminary study of icariin indicating prevention of steroid-induced osteonecrosis of femoral head by regulating abnormal expression of miRNA-335 and protecting the functions of bone microvascular endothelial cells in rats [J]. *Gene*, 2021, 766: 145128.
- [43] ZHANG S, DONG K, ZENG X, et al. Astragalus polysaccharide ameliorates steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by regulating miR-200b-3p-mediated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway via inhibiting SP1 expression: astragalus polysaccharide regulates SONFH via SP1 [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2023, 24(1): 369.
- [44] 刘沛. 淫羊藿苷经lncRNA GAS5/miRNA-222轴调控激素性股骨头坏死BMECs成血管分化的机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [45] 李鹏飞, 孙楠, 樊粤光, 等. 袁氏生脉成骨片对激素干预后大鼠成骨细胞的差异表达miRNA的实验研究[J]. *中华中医药学刊* (LI P F, SUN N, FAN Y G, et al. Experimental study of differential expression of miRNA in osteoblasts after hormone intervention by Yuan's shengmai chenggu tablet in rats [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*), 2017, 35(1): 91-4,260.
- [46] 马学强. 生骨再造丸通过FKBP52/GR $\alpha$ /miRNA-708信号通路对激素性股骨头坏死BMSCs成脂分化的影响[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2022.
- [47] 王多贤. 生骨再造丸对FKBP52/GR $\alpha$ /miRNA-708信号通路及激素性股骨头坏死兔BMSCs成骨分化的影响[D]. 兰州: 甘肃

- 中医药大学, 2022.
- [48] 曹林忠, 邬明峻, 蒋玮, 等. 生骨再造丸对激素性股骨头坏死兔骨髓组织中微小RNA-708表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志(CAO L Z, WU M J, JIANG W, et al. Efficacy of shenggu zaizao pills on microRNA-708 expression in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head rabbit bone marrow tissue and its mechanism [J]. Chinese J Trad Med Traum & Orthop), 2021, 29(7): 1-6.
- [49] ZHU W, ZHANG F, LU J, et al. The analysis of modified Qing' E formula on the differential expression of exosomal miRNAs in the femoral head bone tissue of mice with steroid-induced ischemic necrosis of femoral head [J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 954778.