

机械负荷调节骨形成的非编码RNA机制研究进展

王谦 蔺俊斌 夏露*

(武汉大学中南医院康复医学科, 武汉 430071)

摘要 骨组织作为一种力学反应性组织, 能对机械负荷的刺激作出反应。机械负荷能够通过调控细胞内复杂的信号转导影响骨的形成和吸收。研究显示非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA)在机械负荷调控骨形成和吸收的过程中发挥重要作用。其中, 长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)和miRNA(microRNA)等多种ncRNAs协同参与各类通路的调控, 进而参与机械负荷条件下骨形成的调节。该文总结了参与机械负荷调控的关键ncRNAs及其通路, 旨在明确机械负荷通过调控相关ncRNAs调节骨形成的具体内在机制, 为未来进一步应用机械负荷促进成骨分化提供理论依据, 也为相关骨形成异常有关疾病的治疗提供思路。

关键词 机械应力; 非编码RNA; lncRNA; miRNA; 骨形成

Advances in Non-Coding RNA Mechanisms of Mechanical Loading Regulating Bone Formation

WANG Qian, LIN Junbin, XIA Lu*

(Department of Rehabilitation Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract Bone tissue, as a mechanically responsive tissue, is able to respond to stimulation by mechanical loading. Mechanical loading can affect bone formation and resorption by regulating complex intracellular signaling. Studies have shown that ncRNA (non-coding RNA) plays an important role in the regulation of bone formation and resorption by mechanical loading. Among them, lncRNA (long non-coding RNA), miRNA and other ncRNAs are involved in the regulation of various pathways in a synergistic manner, which in turn are involved in the regulation of bone formation under mechanical loading conditions. This paper summarized the key ncRNAs and their pathways involved in the regulation of mechanical loading, aiming to clarify the specific intrinsic mechanism by which mechanical loading regulates bone formation through the modulation of ncRNAs, which provides a theoretical basis for the further application of mechanical loading to promote osteogenic differentiation, as well as a reference for the treatment of diseases related to abnormalities in bone formation.

Keywords mechanical stress; non-coding RNA; lncRNA; miRNA; bone formation

骨组织是一种致密的结缔组织, 是脊椎动物内骨骼的一部分^[1]。在整个生命过程中, 骨骼处于一个动态的力学环境中。骨通过两个协调且同步的过程不断重塑, 即成骨细胞驱动的骨形成和破骨细胞驱

动的骨吸收, 这种重塑帮助骨形成更优化的形态结构以适应变化的负荷并维持稳态^[2-3]。作为典型的力学反应性组织, 骨能够对机械负荷的刺激作出反应, 生理负荷可诱导骨形成, 而缺乏负荷或过度负荷可

收稿日期: 2024-10-04

接受日期: 2024-10-28

国家自然科学基金青年项目(批准号: 82301644)资助的课题

*通信作者。Tel: 18086065751, E-mail: xialuznyy@163.com

Received: October 4, 2024

Accepted: October 28, 2024

This work was supported by the National Natural Foundation of China (Grant No.82301644)

*Corresponding author. Tel: +86-18086065751, E-mail: xialuznyy@163.com

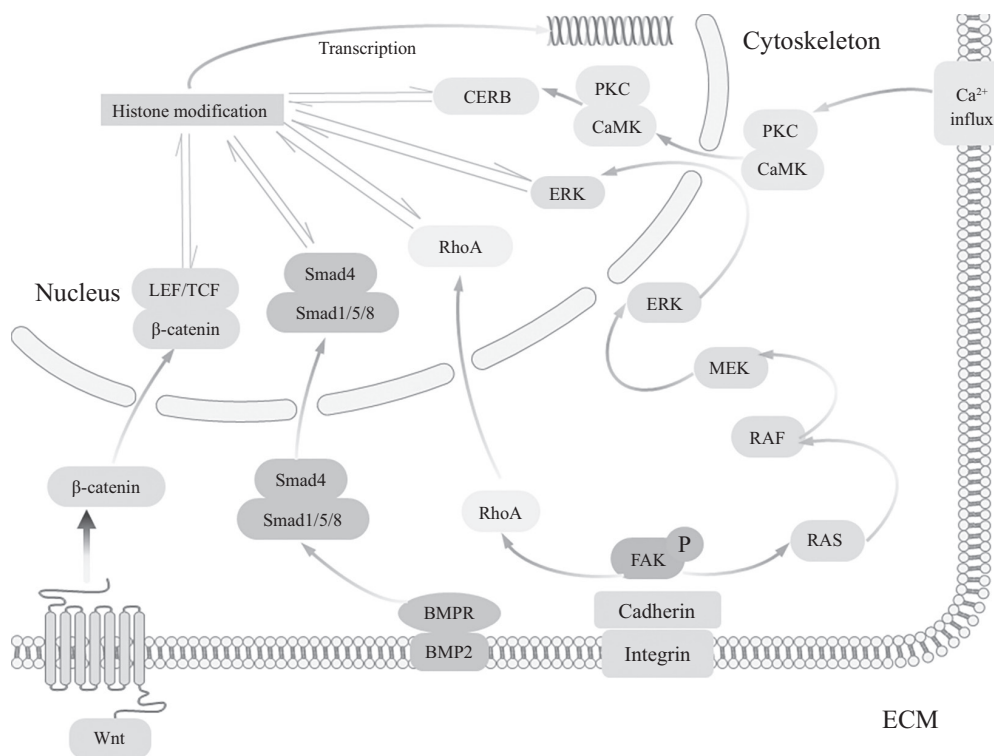


图1 机械刺激调控骨形成的分子机制

Fig.1 Molecular mechanisms of mechanical stimulation regulating bone formation

导致骨吸收^[4]。机械负荷是骨形成和吸收的主要调节因素,在骨的代谢平衡中起着至关重要的作用^[5]。据报道,流体剪切应力(fluid shear stress, FSS)、应变、低渗溶液诱导的膜拉伸、压缩应力和微重力(microgravity, MG)等机械应力均可以调节骨重建^[6-8]。这些机械刺激被骨重建相关的力学敏感细胞所感知,这些细胞在空间和时间上形成一种相互交织的协同作用,对机械刺激作出反应并将机械刺激整合到生化信号中,进而调节骨形成和骨吸收^[9-12]。多项证据表明,在机械信号的传导过程中,非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA)在力学传导及促进成骨分化等方面均发挥着关键作用^[13-15]。ncRNA是一种独特的RNA转录物,它不编码蛋白质,在超过80%的被转录人类基因组中,大部分都被转录为ncRNA^[16-17]。虽然不具有编码蛋白质的功能,但是,ncRNA并非无用的转录“噪声”。相反,ncRNA能够连接相关的遗传网络,影响各种基本的蛋白质效应器,驱动特定的细胞生物学反应并决定细胞命运,是发育、生理和疾病中基因表达的重要调节因子^[18-19]。在骨代谢中,ncRNA可能通过与破骨细胞和成骨细胞中的miRNA相互作用调控基因转录,从而影响细胞活性^[20]。成骨细胞的分化是骨形成过程中的关键,正常情况下大部分

骨基质都被成骨细胞矿化。此外,类骨的分泌和钙化同样需要成熟成骨细胞的参与。研究显示,成骨细胞的分化是由机械刺激诱导的激素和生长因子等活性物质的分泌触发的,机械刺激对于成骨分化的调控具有重要作用^[21]。然而,目前关于机械刺激调控成骨分化的具体机制仍不清楚,尤其是成骨分化过程中响应机械刺激的关键ncRNA以及其具体调控通路尚需进一步探究。因此,本文通过查阅近些年不同类型机械负荷影响细胞成骨分化的相关文章,对参与成骨分化过程中机械负荷调控的关键ncRNA及其通路进行了全面总结(图1)。本研究的主要目的在于明确机械负荷通过调控ncRNA调节骨形成的具体生物学机制,为未来进一步应用机械负荷促进成骨分化提供理论依据,也为相关骨形成异常等有关疾病的治疗提供相关思路。

1 ncRNA概述

ncRNA主要包括核仁小RNA(small nucleolar RNA, snoRNA)、环状RNA(circular RNA, circRNA)、微小RNA(microRNA, miRNA)和lncRNA,其中miRNA和lncRNA是被研究的最多的类型^[16]。

miRNA是一种长度约为22个核苷酸的短链

ncRNA, 它通过转录后控制 mRNA 的降解和翻译来调控蛋白质的表达^[22]。虽然 miRNA 本身不编码蛋白质, 但其前体分子 pri-miRNA 可以在某些情况下编码功能性多肽。有研究显示, miR-200a 和 miR-200b 的 pri-miRNA 编码调节肿瘤发生的肽, 而 miR-200a 和 miR-200b 的成熟型 miRNA 通过直接靶向靶基因的 3'UTRs 来调节癌症进展^[22]。miRNA 受多种调节机制的调节。有证据表明, miRNA 本身是调控性 RNA 的靶标, 一些带有 miRNA 结合位点的 ncRNA 分子能够作为 miRNA 的“海绵”进行调节^[23]。此类 miRNAs“海绵”通过结合并竞争性地隔离 miRNAs, 从而阻止它们与天然的靶标相互作用, 进而对相关功能产生影响。而竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 可在生理相关靶标上抑制 miRNA 的活性^[24-25]。WU 等^[26]研究发现 lncRNA TUG1 作为 miR-222-3p 的“海绵”, 与靶基因竞争 miR-222-3p 结合位点, 抑制 miR-222-3p 对 Smad2/7 的负调控, 促进牙周膜干细胞 (periodontal ligament stem cells, PDLSCs) 成骨分化。

LncRNA 是长度超过 200 个核苷酸的非编码转录本, 其二级结构能够更好地为蛋白质或 RNA 提供结合位点, 这些蛋白质或 RNA 参与转录、翻译、细胞分化和其他生物过程的调节^[23]。因此 lncRNA 可在转录、转录后和表观遗传学等方面调控蛋白质编码基因的表达, 从而参与细胞生长、细胞周期调节和细胞分化等一系列生物学过程的调节^[23,27]。不少研究证明 lncRNA 参与包括成骨分化在内等多种骨细胞的生理过程, 与骨质疏松等骨疾病发病机制密切相关^[28-30]。例如, 有研究发现在体内抑制 lncRNA AK016739 的表达可促进成骨基因的表达并恢复卵巢切除小鼠颅骨的骨形成^[31]。许多关于 lncRNA 的研究表明, lncRNA 在亚细胞中的定位可能决定其对细胞活性的调节机制。多数研究认为, 核内 lncRNA 在功能上参与基因调控过程, 如转录激活和表观遗传基因调控; 而定位于细胞质中的 lncRNA 参与转录后基因调控过程, 包括作为 ceRNA 与 miRNA 结合, 并通过上调 miRNA 靶基因的表达来抑制其活性^[32-33]。与 miRNA 不同的是, 虽然 lncRNA 被归类为非编码 RNA, 但研究表明, 许多 lncRNA 转录本中包含小开放阅读框 (small open reading frames, smORFs), 这些 smORFs 可以编码功能性多肽^[34]。因此, lncRNA 能够编码肽/蛋白质, 或直接作为 RNA

分子发挥作用, 但是其不具有双重功能^[35]。例如 lncRNA HOXB-AS3 能够编码抑制肿瘤发生和代谢的肽段, 而其本身并不能影响肿瘤的发生进程。

综上所述, 研究证明 ncRNA 非转录“噪声”, 而是发育、生理和疾病中基因表达的重要调节因子, 参与细胞成骨分化等多项生理进程的调控。miRNA 和 lncRNA 是最常见的 ncRNAs 类型。其中 miRNAs 主要通过转录后控制 mRNAs 的降解和翻译从而调控蛋白质的表达。然而, 虽然 lncRNA 被归类为 ncRNA, 但许多 lncRNA 转录本中包含 smORFs 使其具有编码多肽的功能。因此, lncRNA 能够通过编码蛋白质或直接作为 RNA 分子发挥作用。

2 机械负荷条件下的 lncRNA-miRNA-mRNA 调节网络

机械负荷是调控骨组织再生的重要表观遗传因素, 机体依靠黏着斑、细胞骨架以及参与力传感的膜通道等“机械感受器”来感知细胞外机械刺激信号并将其转化为细胞内生化信号^[54]。研究发现, 机械应力能够通过调节不同类型 ncRNAs 表达水平来调控成骨分化^[36-37]。

研究显示, 机械敏感的 lncRNA 和 miRNA 通过构建 lncRNA-miRNA-mRNA 网络来调控基因表达, 以响应机械应力从而调控成骨分化。WANG 等^[38]研究证明动态张力促进 PDLSCs 的成骨分化的过程涉及 344 个 lncRNAs、57 个 miRNAs、41 个 circRNAs 和 70 个 mRNAs 的差异表达。这些差异表达的 ncRNAs 和 mRNAs 主要富集于成骨相关与机械应激相关的生物过程和信号转导通路。该研究进一步构建了 circRNA/lncRNA-miRNA-mRNA 竞争性调控网络^[38]。该竞争性调控网络中, *EGR1* (early growth response 1)、*RIPK4* (receptor-interacting serine/threonine kinase 4) 和 *ATF3* (activating transcription factor 3) 被识别为差异表达的 mRNA 中的三个关键枢纽基因, 分别与成骨分化、信号通路调控及细胞应激反应紧密相关。*EGR1* 与 has-miR-200b-3p、lncRNA-N2 和 LINC02193 结合, 而 *ATF3* 和 *RIPK4* 均可与 has-miR-588、SUGT1P4-STRA6LP-CCDC180-204、ENST00000611274、HCG18-263 和 ENST00000568093 结合发挥作用。在另一项研究中, 研究人员基于未拉伸和拉伸条件下 PDLSCs 之间差异表达的 10 组 lncRNAs 和 miRNAs 初步构建了调控

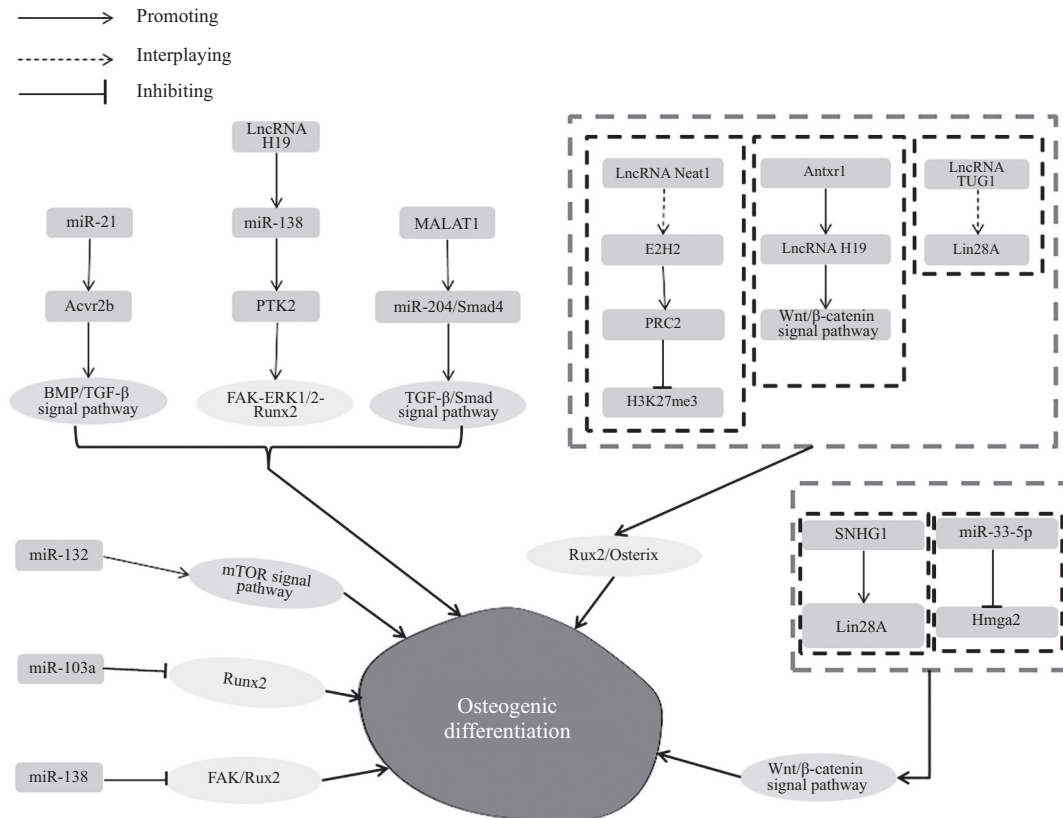


图2 LncRNA-miRNA-mRNA调控网络

Fig.2 LncRNA-miRNA-mRNA regulatory network

网络^[39]。研究发现,单个lncRNA可能同时调控多个miRNAs,而miRNAs则可能与多个lncRNAs相连,共同影响mRNA的表达,进而调节成骨分化。除这些常规的lncRNA-miRNA-mRNA或竞争性调控网络外,有研究发现转录因子也作为一种特殊类型的mRNA在转录后水平受到ceRNA相互作用的调控,甚至与lncRNA相互串扰形成一个反馈回路^[40]。

综上,研究发现,ncRNA广泛参与细胞对机械信号的应答过程。在机械负荷诱导骨形成的过程中,ncRNA形成了复杂的lncRNA-miRNA-mRNA调控网络(图2),这对于成骨细胞的增殖、分化及骨组织的形成与重塑具有重要作用。尽管目前的研究已经揭示了这些分子网络在骨代谢中的关键作用,但不同类型的机械负荷可能激活不同的信号通路,导致不同的lncRNA-miRNA-mRNA网络响应。通过比较不同机械负荷条件下的网络变化进而揭示不同负荷形式下机械响应性分子调控网络的共性和特异性,这对于机械负荷下骨代谢调控机制的理解尤为重要。

3 不同机械负荷环境下ncRNA对成骨细胞分化的调控

研究显示,骨组织主要通过反馈系统对机械负荷信号进行应答。具体而言,局部机械环境的变化能够向骨细胞发出信号,而这些信号通过改变成骨相关细胞活性、增殖或迁移而影响骨形成和骨吸收平衡,促使骨结构改变以满足新的要求^[41-42]。例如非接触性重力的急剧下降会导致人类MSCs的成骨分化减少,而成脂分化增加。因此,依据机械刺激的类型、持续时间、强度等多种参数之间的不同,细胞响应力的信号通路以及内部的机械敏感性ncRNA调控网络表达往往也有较大差异^[43]。据报道,MG、FSS、牵张应力、压缩应力以及震动等多种机械负荷均可以对骨组织的成骨分化进行调节^[6,43],本文中我们对几种常见类型的机械负荷调控成骨分化的机制进行了相应总结,以期成骨相关疾病的治疗提供更科学的思路。

3.1 MG

MG是一种特殊而相对彻底的机械卸载环境,可迅速导致大量骨丢失^[44]。这一过程主要影响在需

要长时间制动或卧床休息的患者和MG环境下的宇航员。在太空飞行期间, 宇航员的骨量丢失在1个月内可达到总骨量的2%, 相当于绝经后妇女1年以上的骨量丢失^[44-45]。许多研究者指出, 机械卸载导致的骨形成的抑制是由成骨细胞活性的减弱引起的。通过研究卸载环境下成骨细胞功能的分子调控机制, 进而开发有前景的骨形成策略是必要和可行的。

基因组分析揭示, 在MG暴露之后, 成骨细胞在数百个基因的表达上发生了显著变化, 其中lncRNA在模拟MG条件下成骨细胞分化过程中扮演了关键角色^[13,46]。后续观察显示, 在模拟MG条件下的MC3T3-E1细胞中, 有857个lncRNAs的表达发生了显著变化^[13]。LIU等^[47]对模拟MG条件下成骨细胞中的机械敏感性lncRNA进行研究, 发现lncRNA核旁斑组装转录本1(nuclear-enrichment transcript 1, Neat1)水平显著下降。随后的体内实验表明, lncRNA Neat1敲除的小鼠骨骼表型受损, 对机械负载和后肢卸载的反应减弱, 导致骨形成受损、骨结构和强度下降以及骨量减少^[47]。LncRNA Neat1是构成亚核结构paraspeckles的骨架, paraspeckles是高度有序的无膜核小体^[48]。研究发现, paraspeckles促进了*Smurf1* mRNA在核内的滞留, 阻止了其在细胞质中的转录和翻译, 从而抑制了通过泛素化介导的*Smurf1*靶基因的表达。这反过来抑制了成骨细胞转录因子Runx2的降解, 从而增强了成骨细胞的功能。*Smurf1*是维持骨骼平衡的关键E3泛素连接酶, 其过度表达会抑制骨骼发育^[49]。因此, 机械负载能够通过诱导lncRNA Neat1表达的上调以及paraspeckles的组装、固化和延伸提升成骨细胞的功能。相反, 机械卸载可以通过抑制lncRNA Neat1的表达降低成骨细胞的功能, 进而抑制成骨分化。然而, 力的具体传导机制仍需进一步探究来明确。另一项研究中, 机械卸载能够促进lncRNA ODSM的表达, 进而部分减少MC3T3-E1细胞的凋亡并促进其分化。与lncRNA Neat1不同的是, lncRNA ODSM定位于细胞质中, 主要参与转录后基因调控过程。LncRNA ODSM通过调控miR-139-3p的靶基因*ETS*样转录因子(*ETS*-like 1 transcription factor, *ELK1*, 一种对微重力敏感的蛋白)或作为miR-139-3p的“海绵”间接调控*ELK1*, 从而影响细胞的成骨分化^[50-51]。除了与lncRNA相互作用参与成骨调节外, 多项研究报道miRNAs也可以直接靶向成骨细胞中核心结合蛋白因子2(runt-

related transcription factor-2, *Runx2*)调控成骨分化。ZHOU等^[52]研究显示miR-133a能够靶向*Runx2*正调控成骨细胞活化和矿化, 在小鼠后肢卸载(hindlimb-unloaded, HU)模型中能够显著改善小鼠的骨丢失、微结构和生物力学性能。另一项研究中, miR-103a负调控其直接靶基因*Runx2*, 治疗性抑制miR-103a可部分挽救体内机械卸载引起的骨量减少^[53]。

综上所述, MG提供的机械卸载环境可导致迅速而严重的骨丢失, 其根本原因是骨形成受到抑制而骨吸收得到促进。研究显示, MG主要通过其对成骨细胞活性的抑制来抑制细胞分化, 而且该过程可能受多种ncRNAs的同时调控。据报道, miRNA、lncRNA、circRNA均参与MG条件下成骨分化的调节。这些ncRNAs通过靶向*ELK1*、*Runx2*等不同的下游因子或影响mRNA的转录及翻译进而影响成骨相关细胞的活性、增殖及凋亡, 最终调控骨形成。此外, 调控网络之间的相互作用可能会增强这种效应。因此, 靶向ncRNA的骨代谢治疗可能对于需要长时间制动和患肢悬垂的患者的具有重要意义。

3.2 FSS

FSS是一种常见的骨机械刺激, 被认为是机械力刺激骨生长的主要机制^[54]。研究显示, 机械应力介导的矿化基质的变形导致了非均匀的压力梯度, 从而增强了哈弗氏和腔隙-骨小管网络系统中的组织间液的间隙流体流动, 产生了跨骨细胞表面的FSS^[55-56]。

最近的研究表明, 在FSS条件下, 细胞中miRNAs具有机械敏感性。例如, miR-132的上调在FSS诱导的牙周膜细胞分化和增殖中发挥作用^[57]。同样, miR-33-5P在FSS条件下升高并促进成骨细胞MC3T3-E1的分化^[58]。FSS通过抑制miR-23b-3p和激活*PEO*启动子导致E-Tmod41的上调, 从而促进F-肌动蛋白细胞骨架重塑^[59]。效应细胞以及FSS的作用参数及时长常导致不同的miRNAs的响应机制^[54,60]。PENG等^[60]研究显示, MC3T3-E1细胞在单次短时间FSS(12 dyn/cm², 1 h)作用6 h后, 或在骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)中作用12 h后, miR-20a表达量显著增加。进一步研究显示miR-20a可能通过靶向抑制母体抗生物皮肤生长因子同源物6(small mothers against decapentaplegic family member 6, SMAD6)和骨成形蛋白-激活素膜结合阻断因子(BMP and activin membrane-

bound inhibitor, BAMBI)的表达来激活骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)信号通路,从而参与成骨细胞分化的正向调节。BAMBI是一个BMP2信号通路的假受体,而SMAD6能够促进*Smurf1*介导的*Runx2*降解,从而抑制BMP2/*Runx2*信号通路的激活^[61]。另一项研究中,在12 dyn/cm²的FSS下作用0、30、60、90 min,或在0、3、6、9、12、15、18 dyn/cm² FSS下作用1 h后,FSS的作用能明显降低MC3T3-E1成骨细胞miR-214-3p的表达水平,增加其靶基因转录活化因子4(activating transcription factor 4, ATF4)表达水平,并显著抑制线粒体介导的MC3T3-E1细胞成骨细胞凋亡^[62]。此外,先前的研究表明,稳定的12 dyn/cm²的FSS持续作用1 h可以促进小鼠颅骨来源的MC3T3-E1细胞、hPDLcs和BMSCs的成骨分化^[63]。DOLE等^[64]研究证明10 dyn/cm²的FSS处理同样能够有效促进成骨分化。该研究显示10 dyn/cm²的FSS处理2 h能够刺激OCY454骨细分化,该机制可能与TGF- β 的激活相关,进而负向调控miR-100并间接激活骨细胞中经典Wnt/ β -catenin信号通路。Wnt信号通路在骨发育、内稳态和机械调节发挥重要作用^[65]。然而,目前较多研究讨论了FSS在MC3T3-E1细胞中的成骨分化诱导效应,对于其他类型细胞的研究相对较少。未来仍需进一步扩大对FSS诱导不同类型细胞成骨分化机制的研究,以期更全面地揭示FSS条件下成骨分化的响应机制。有趣的是,近些年的研究中,FSS结合不同类型生物材料的应用取得了较多关注。研究显示,纳米结构生物材料上的脉冲流体增加了MC3T3-E1细胞的胶原和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP) mRNA表达量^[66]。FSS结合生物支架材料可以通过上调脂肪来源的MSC中ALP和*Runx2*的表达来促进成骨分化^[67]。

综上,FSS被认为是机械力刺激骨生长的主要机制,其经各种信号转导途径,能够在成骨细胞中启动合成代谢反应,从而促进成骨。研究显示,FSS能够通过对miR-20a、miR-33-5p、miR-140-5p以及miR-34a等多种机械敏感性ncRNAs的调控,进而调节成骨。然而,响应FSS的ncRNAs调控机制往往受流体压力强度、应用时间和细胞类型(微环境)等因素影响而有较大差异。目前的研究较多地关注了MC3T3-E1、MSCs等细胞,未来的研究可以更多地关注效应细胞的类型及相应机制间的联系。此外,

FSS结合生物材料的应用对成骨分化的诱导效应也具有重要意义。

3.3 机械牵张应力

牵张应力是调控骨组织再生的重要表观遗传因素,大量研究显示机械牵张刺激是骨代谢的正性物理调节元件,不同类型的机械牵张应力已经被广泛研究^[68-70]。研究证明,不同强度及频率的机械牵张应力对细胞成骨分化的效应及作用机制具有明显差异。在牵张应力刺激PDLSCs的研究中,10%的底膜伸长强度可以降低炎症水平,提高其成骨水平^[71];12%的底膜伸长强度被认为与生理负荷条件下的应变条件有良好的相关性,能更好地模拟正畸应力,诱导PDLSCs的增殖,成骨效果最佳^[72-73]。在12%的底膜伸长强度条件下,研究发现频率为0.7 Hz时促进PDLSCs成骨作用最为显著^[74],频率为0.1 Hz的张力未持续作用24 h以上,或频率为0.5 Hz张力未持续作用12 h以上,均不能促进PDLSCs的成骨分化^[75]。

周期性牵张应力作为一种常见的机械刺激,能更真实地模拟在体细胞受到力学刺激时所处的微环境,是目前研究最多的机械力^[76-77]。有研究利用周期性机械牵张模拟正畸牙齿移动(orthodontic tooth movement, OTM)过程中产生的张力,探究其对PDLSCs成骨分化诱导的调控机制。PDLSCs负责OTM过程中的骨改建,其对力高度敏感,是力学研究的理想模型^[78]。OTM中产生的压缩应力抑制PDLSCs成骨分化,而产生的机械牵张应力则促进其成骨过程。CHANG等^[79]利用12%强度、0.1 Hz的5 s拉伸和5 s松弛,分别处理24、48和72 h的周期性拉伸模拟OTM治疗,结果发现miR-195-5p的表达下调并与PDLcs的成骨分化呈负相关。进一步的实验发现miR-195-5p通过抑制成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2)、BMPRI A、Wnt家族成员3a(wnt family member 3a, Wnt3A)三种蛋白的翻译,进而抑制FGF、BMP和Wnt/ β -catenin信号通路激活,显著降低了ALP活性及成骨细胞特异性转录因子(osterix, OSX)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、骨钙素(osteocalcin, OCN)等成骨相关蛋白的表达水平,进而抑制成骨基质矿化。MENG等^[80]利用10%强度、0.1HZ的5 s拉伸和5 s松弛,作用24、72 h,发现miR-34a和miR-146a的表达下调,同样与PDLcs的成骨分化呈负相关。PDLcs是机械牵张应力研究中最常使用的细胞,除PDLcs外,也有研

究人员探究了脂肪组织衍生干细胞(adipose tissue-derived stem cell, ADSCs)、MSCs等干细胞中机械牵张应力的骨形成调节机制。LI等^[81]研究显示机械牵张应力能够显著抑制miR-154-5p表达,随后通过抑制Wnt/PCP通路负调控ADSCs成骨分化。该研究发现miR-154-5p负调控Wnt11蛋白表达,抑制RhoA的活化并降低活性ROCKII的表达水平,进而调控非经典Wnt/PCP通路的活性。这提示miR-154-5p-Wnt11-Wnt/PCP可能是ADSCs在张力下的重要机械传导通路。在利用机械牵张应力促进成骨的机制探究中,我们发现ncRNA常通过不同的方式参与其调节过程。ZENG等^[82]研究显示miRNA可以通过骨细胞作为中介,参与调节成骨细胞分化。骨腔隙-小管系统中的骨细胞主要是骨组织中的机械感觉细胞。它们将机械刺激转化为生物力学信号,并通过调节成骨细胞和破骨细胞的活性来调节骨重塑^[83]。ZENG等^[82]发现机械拉伸应变(0.5 Hz、2 500 $\mu\epsilon$)刺激能够下调骨细胞中miR-29b-3p的表达并上调胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)的表达,进而促进MC3T3-E1细胞的成骨分化。然而,在MC3T3-E1成骨细胞中,miR-29b-3p并不参与细胞对机械牵张刺激的响应过程。此外,机械牵张刺激可能通过激活宿主基因的启动子来调控miRNAs的表达或刺激两者共表达来实现对成骨基因的调控。据报道,大量的miRNAs已被发现位于蛋白质编码基因(宿主基因)的内含子区,即所谓的“内含子miRNAs”。因此,这些miRNAs位于基因组中的特定位置,大多数与宿主基因共表达,发挥着相似的作用。

综上所述,牵张应力是调控骨组织再生的重要表观遗传因素,常用于模拟OTM过程中产生的张力,周期性牵张应力是目前研究最多的机械力。由于不同类型的机械牵张应力能够给细胞提供不同的微环境刺激,因此其成骨分化效应及调控机制有显著不同。有研究显示12%的底膜伸长强度被认为与生理负荷条件下的应变条件有良好的相关性,能更好地模拟正畸应力,诱导PDLSCs的增殖分化。机械张力诱导细胞成骨分化过程中有多种ncRNAs参与,这些ncRNAs通过靶向FGF、BMP和Wnt/ β -catenin等骨形成常见信号通路调控成骨细胞分化。然而,有研究显示miRNA也可以不直接影响成骨细胞,而是通过骨细胞作为一种中介进而调节

成骨细胞分化。由于所选择的牵张刺激与作用的机械敏感性细胞不同,ncRNA对细胞成骨分化的调控效果有较大差异,因此在应用时应注意选择适当的类型、频率、强度的刺激及作用时间以更好地促进细胞成骨分化。

4 小结与展望

骨是一种高度血管化的组织,机械负荷在骨的重塑过程中至关重要,生理动态负荷促进骨形成,而缺乏机械负荷会导致骨丢失。在骨组织中,成骨细胞是重要的机械受体,可以将机械刺激转化为骨基质形成和矿化的生化信号。机械力是成骨细胞增殖、分化和凋亡的重要调节因子,MG、FSS、机械牵张应力等多种形式的机械负荷被证实可调控成骨分化过程中ncRNA的表达,进而影响成骨细胞的功能,调控骨形成。研究证明,在机械负荷诱导骨形成的过程中,ncRNA广泛参与细胞对机械信号的应答过程并形成了复杂的lncRNA-miRNA-mRNA调控网络。这对于成骨细胞的增殖、分化及骨组织的形成与重塑具有重要作用。研究显示,不同类型的机械负荷可能激活不同的信号通路,导致不同的lncRNA-miRNA-mRNA网络响应。MG可以通过影响mRNA的转录及翻译,或Runx2等多种下游因子,影响成骨相关细胞的活性,调节其分化增殖。FSS通过对miR-20a、miR-33-5p、miR-140-5p以及miR-34a等多种机械敏感性ncRNAs的调控,调节成骨细胞的增殖和凋亡。机械牵张应力通过miRNAs靶向Wnt、BMP等信号通路,参与成骨细胞分化的调控,从而调节骨形成。因此,通过比较不同机械负荷条件下的ncRNA响应网络变化,揭示不同负荷形式下机械响应性分子调控网络的共性和特性,这对于机械负荷下骨代谢调控机制的理解尤为重要。

然而,目前对于不同机械负荷条件下的ncRNA的响应机制研究仍较为局限。关于多种机械负荷刺激下ncRNA响应网络如何协调变化,以及同一种机械反应中使用不同参数是否会改变经典ncRNA信号通路对骨形成的调控等多个问题尚不明确,仍需要进一步的研究。此外,目前的研究较多地关注了MC3T3-E1、MSCs、PDLSCs等经典细胞,未来的研究可以更多地探索其他不同类型的效应细胞及其对机械负荷的响应机制,以更深入地理解机械负荷下ncRNA的响应机制。在ncRNA的多种类型中,miRNAs和lncRNAs

是被研究的最多的类型, 而对其他类型的探索较少。在未来的研究中, 可以注重扩大对ncRNA研究类型以及效应细胞类型的研究, 更加注重对与成骨相关的重要ncRNAs的发现, 进而探索更多的通过机械应力调控ncRNAs促进骨形成的方式, 为通过机械应力促进骨形成、维持骨稳态提供新的思路。

参考文献 (Reference)

- [1] COHEN A. Bone metabolism, bone mass, and bone structure during pregnancy and lactation: normal physiology and pregnancy and lactation-associated osteoporosis [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2024, 53(3): 453-70.
- [2] WANG D, CAI J, PEI Q, et al. Gut microbial alterations in arginine metabolism determine bone mechanical adaptation [J]. *Cell Metab*, 2024, 36(6): 1252-68.e8.
- [3] YU S, TANG Q, LU X, et al. Time of exercise differentially impacts bone growth in mice [J]. *Nat Metab*, 2024, 6(6): 1036-52.
- [4] ZHAO Z, DU Y, YAN K, et al. Exercise and osteoimmunology in bone remodeling [J]. *FASEB J*, 2024, 38(7): e23554.
- [5] YANG J, CHEN Z, GAO C, et al. A mechanical-assisted post-bioprinting strategy for challenging bone defects repair [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 3565.
- [6] THOMPSON W R, RUBIN C T, RUBIN J. Mechanical regulation of signaling pathways in bone [J]. *Gene*, 2012, 503(2): 179-93.
- [7] LIU Z, GAO J, GONG H. Spatiotemporal characterization of microstructure morphology, mechanical properties and bone remodeling of rat tibia under uniaxial compressive overload loading [J]. *Ann Biomed Eng*, 2024, 52(9): 2388-402.
- [8] XIONG Z, ROUQUIER L, HUANG X, et al. Porosity and surface curvature effects on the permeability and wall shear stress of trabecular bone: guidelines for biomimetic scaffolds for bone repair [J]. *Comput Biol Med*, 2024, 177: 108630.
- [9] BAN Y, WU Y Y, YU T, et al. Response of osteoblasts to low fluid shear stress is time dependent [J]. *Tissue Cell*, 2011, 43(5): 311-7.
- [10] TATSUMI S, ISHII K, AMIZUKA N, et al. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction [J]. *Cell Metab*, 2007, 5(6): 464-75.
- [11] DONG L, SONG Y, ZHANG Y, et al. Mechanical stretch induces osteogenesis through the alternative activation of macrophages [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(9): 6376-90.
- [12] WU W, ZHAO Z, WANG Y, et al. Biomechanical effects of mechanical stress on cells involved in fracture healing [J]. *Orthop Surg*, 2024, 16(4): 811-20.
- [13] HU Z, WANG H, WANG Y, et al. Genome-wide analysis and prediction of functional long noncoding RNAs in osteoblast differentiation under simulated microgravity [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8180-8.
- [14] WEI F, LIU D, FENG C, et al. microRNA-21 mediates stretch-induced osteogenic differentiation in human periodontal ligament stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(3): 312-9.
- [15] QIN Q, YANG H, ZHANG C, et al. lncRNA HHIP-AS1 promotes the osteogenic differentiation potential and inhibits the migration ability of periodontal ligament stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2021, 2021: 5595580.
- [16] NEMETH K, BAYRAKTAR R, FERRACIN M, et al. Non-coding RNAs in disease: from mechanisms to therapeutics [J]. *Nat Rev Genet*, 2024, 25(3): 211-32.
- [17] NAPPI F. Non-coding RNA-targeted therapy: a state-of-the-art review [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(7): 3630.
- [18] BEŇAČKA R, SZABÓOVÁ D, GULAŠOVÁ Z, et al. Non-coding RNAs in human cancer and other diseases: overview of the diagnostic potential [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(22): 16213.
- [19] CHEN B, DRAGOMIR M P, YANG C, et al. Targeting non-coding RNAs to overcome cancer therapy resistance [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 121.
- [20] FARALDI M, GOMARASCA M, YIN C, et al. Editorial: role of long non-coding RNA and circular RNA in bone metabolism and their role as circulating biomarkers for bone diseases [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1321962.
- [21] MANTILA ROOSA S M, TURNER C H, LIU Y. Regulatory mechanisms in bone following mechanical loading [J]. *Gene Regul Syst Bio*, 2012, 6: 43-53.
- [22] CHEN W, XU J, WU Y, et al. The potential role and mechanism of circRNA/miRNA axis in cholesterol synthesis [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(9): 2879-96.
- [23] WANG L, CHO K B, LI Y, et al. Long noncoding RNA (lncRNA)-mediated competing endogenous RNA networks provide novel potential biomarkers and therapeutic targets for colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 5758.
- [24] YATES L A, NORBURY C J, GILBERT R J. The long and short of microRNA [J]. *Cell*, 2013, 153(3): 516-9.
- [25] KARTHA R V, SUBRAMANIAN S. Competing endogenous RNAs (ceRNAs): new entrants to the intricacies of gene regulation [J]. *Front Genet*, 2014, 5: 8.
- [26] WU D, YIN L, SUN D, et al. Long noncoding RNA TUG1 promotes osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cell through sponging microRNA-222-3p to negatively regulate Smad2/7 [J]. *Arch Oral Biol*, 2020, 117: 104814.
- [27] BRIDGES M C, DAULAGALA A C, KOURTIDIS A. LNCation: lncRNA localization and function [J]. *J Cell Biol*, 2021, 220(2): 5758.
- [28] LI B, ZHAO J, MA J X, et al. Overexpression of DNMT1 leads to hypermethylation of H19 promoter and inhibition of Erk signaling pathway in disuse osteoporosis [J]. *Bone*, 2018, 111: 82-91.
- [29] LEE S, SHIN Y A, CHO J, et al. Trabecular bone microarchitecture improvement is associated with skeletal nerve increase following aerobic exercise training in middle-aged mice [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 800301.
- [30] MAN K, BRUNET M Y, FERNANDEZ-RHODES M, et al. Epigenetic reprogramming enhances the therapeutic efficacy of osteoblast-derived extracellular vesicles to promote human bone marrow stem cell osteogenic differentiation [J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(9): e12118.
- [31] YIN C, TIAN Y, YU Y, et al. A novel long noncoding RNA AK016739 inhibits osteoblast differentiation and bone formation [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 11524-36.
- [32] THOMSON D W, DINGER M E. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy [J]. *Nat Rev Genet*, 2016,

- 17(5): 272-83.
- [33] TAY Y, RINN J, PANDOLFI P P. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition [J]. *Nature*, 2014, 505(7483): 344-52.
 - [34] JACKSON R, KROEHLING L, KHITUN A, et al. The translation of non-canonical open reading frames controls mucosal immunity [J]. *Nature*, 2018, 564(7736): 434-8.
 - [35] WANG J, ZHU S, MENG N, et al. ncRNA-encoded peptides or proteins and cancer [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(10): 1718-25.
 - [36] YUAN Y, ZHANG L, TONG X, et al. Mechanical stress regulates bone metabolism through micrornas [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(6): 1239-45.
 - [37] CHEN Z, ZHANG Y, LIANG C, et al. Mechanosensitive miRNAs and bone formation [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(8): 1684.
 - [38] WANG W, LI N, WANG M, et al. Analysis of ceRNA networks during mechanical tension-induced osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells [J]. *Eur J Oral Sci*, 2022, 130(5): e12891.
 - [39] WANG H, FENG C, LI M, et al. Analysis of lncRNAs-miRNAs-mRNAs networks in periodontal ligament stem cells under mechanical force [J]. *Oral Dis*, 2021, 27(2): 325-37.
 - [40] JI Y, GU Y, HONG S, et al. Comprehensive analysis of lncRNA-TF crosstalks and identification of prognostic regulatory feedback loops of glioblastoma using lncRNA/Tf-mediated ceRNA network [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(1): 755-67.
 - [41] KIM D S, JUNG S M, YOON G H, et al. Development of a complex bone tissue culture system based on cellulose nanowhisker mechanical strain [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, 123: 838-44.
 - [42] YANG M, XIAO L W, LIAO E Y, et al. The role of integrin-beta/FAK in cyclic mechanical stimulation in MG-63 cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(11): 7451-9.
 - [43] HAO J, ZHANG Y, JING D, et al. Mechanobiology of mesenchymal stem cells: perspective into mechanical induction of MSC fate [J]. *Acta Biomater*, 2015, 20: 1-9.
 - [44] MAN J, GRAHAM T, SQUIRES-DONNELLY G, et al. The effects of microgravity on bone structure and function [J]. *NPJ Microgravity*, 2022, 8(1): 9.
 - [45] HU Y, TIAN H, CHEN W, et al. The critical role of the piezo1/ β -catenin/ATF4 axis on the stemness of Gli1⁺ BMSCs during simulated microgravity-induced bone loss [J]. *Adv Sci*, 2023, 10(32): e2303375.
 - [46] PATEL M J, LIU W, SYKES M C, et al. Identification of mechanosensitive genes in osteoblasts by comparative microarray studies using the rotating wall vessel and the random positioning machine [J]. *J Cell Biochem*, 2007, 101(3): 587-99.
 - [47] LIU C, GAO X, LI Y, et al. The mechanosensitive lncRNA Neat1 promotes osteoblast function through paraspeckle-dependent Smurf1 mRNA retention [J]. *Bone Res*, 2022, 10(1): 18.
 - [48] TODOROVSKI V, FOX A H, CHOI Y S. Matrix stiffness-sensitive long noncoding RNA NEAT1 seeded paraspeckles in cancer cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2020, 31(16): 1654-62.
 - [49] SUN X, XIE Z, MA Y, et al. TGF- β inhibits osteogenesis by upregulating the expression of ubiquitin ligase SMURF1 via MAPK-ERK signaling [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(1): 596-606.
 - [50] WANG Y, WANG K, ZHANG L, et al. Targeted overexpression of the long noncoding RNA ODSM can regulate osteoblast function *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 133.
 - [51] WANG Y, WANG K, HU Z, et al. MicroRNA-139-3p regulates osteoblast differentiation and apoptosis by targeting ELK1 and interacting with long noncoding RNA ODSM [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(11): 1107.
 - [52] ZHOU Y, CHEN X, ZHU Z, et al. MiR-133a delivery to osteoblasts ameliorates mechanical unloading-triggered osteopenia progression *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 97: 107613.
 - [53] CAO Y, LÜ Q, LÜ C. MicroRNA-153 suppresses the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by targeting bone morphogenetic protein receptor type II [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(3): 760-6.
 - [54] WANG X, HE J, WANG H, et al. Fluid shear stress regulates osteoblast proliferation and apoptosis via the lncRNA TUG1/miR-34a/FGFR1 axis [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(18): 8734-47.
 - [55] FRITTON S P, WEINBAUM S. Fluid and solute transport in bone: flow-induced mechanotransduction [J]. *Annu Rev Fluid Mech*, 2009, 41: 347-74.
 - [56] HINTON P V, GENOUD K J, EARLY J O, et al. Impact of fluid flow shear stress on osteoblast differentiation and cross-talk with articular chondrocytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(16): 9505.
 - [57] QI L, ZHANG Y. The microRNA 132 regulates fluid shear stress-induced differentiation in periodontal ligament cells through mTOR signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(2): 433-45.
 - [58] WANG H, SUN Z, WANG Y, et al. miR-33-5p, a novel mechanosensitive microRNA promotes osteoblast differentiation by targeting Hmga2 [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23170.
 - [59] MU W, WANG X, ZHANG X, et al. Fluid shear stress upregulates E-Tmod41 via miR-23b-3p and contributes to F-actin cytoskeleton remodeling during erythropoiesis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136607.
 - [60] PENG Z, MAI Z, XIAO F, et al. MiR-20a: a mechanosensitive microRNA that regulates fluid shear stress-mediated osteogenic differentiation via the BMP2 signaling pathway by targeting BAMBI and SMAD6 [J]. *Ann Translat Med*, 2022, 10(12): 683.
 - [61] SHEN R, CHEN M, WANG Y J, et al. Smad6 interacts with Runx2 and mediates Smad ubiquitin regulatory factor 1-induced Runx2 degradation [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(6): 3569-76.
 - [62] ZHANG K, LIU X, TANG Y, et al. Fluid shear stress promotes osteoblast proliferation and suppresses mitochondrial-mediated osteoblast apoptosis through the miR-214-3p-ATF4 signaling axis [J]. *Physiol Res*, 2022, 71(4): 527-38.
 - [63] TANG M, PENG Z, MAI Z, et al. Fluid shear stress stimulates osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells via the extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways [J]. *J Periodontol*, 2014, 85(12): 1806-13.
 - [64] DOLE N S, YOON J, MONTEIRO D A, et al. Mechanosensitive miR-100 coordinates TGF β and Wnt signaling in osteocytes during fluid shear stress [J]. *FASEB J*, 2021, 35(10): e21883.
 - [65] NGUYEN J, TANG S Y, NGUYEN D, et al. Load regulates bone formation and Sclerostin expression through a TGF β -dependent mechanism [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53813.
 - [66] PRODANOV L, SEMEINS C M, VAN LOON J J, et al. Influence of nanostructural environment and fluid flow on osteoblast-

- like cell behavior: a model for cell-mechanics studies [J]. *Acta Biomater*, 2013, 9(5): 6653-62.
- [67] ELASHRY M I, BAULIG N, WAGNER A S, et al. Combined macromolecule biomaterials together with fluid shear stress promote the osteogenic differentiation capacity of equine adipose-derived mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 116.
- [68] WANG F, LI S, KONG L, et al. Tensile stress-activated and exosome-transferred YAP/TAZ-Notch circuit specifies type H endothelial cell for segmental bone regeneration [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(12): e2309133.
- [69] ZHANG Y, FENG X, ZHENG B, et al. Regulation and mechanistic insights into tensile strain in mesenchymal stem cell osteogenic differentiation [J]. *Bone*, 2024, 187: 117197.
- [70] XIAO X, ZOU S, CHEN J. Cyclic tensile force modifies calvarial osteoblast function via the interplay between ERK1/2 and STAT3 [J]. *BMC Mol Cell Biol*, 2023, 24(1): 9.
- [71] SUN C, JANJIC RANKOVIC M, FOLWACZNY M, et al. Effect of different parameters of *in vitro* static tensile strain on human periodontal ligament cells simulating the tension side of orthodontic tooth movement [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1525.
- [72] NATALI A N, PAVAN P G, SCARPA C. Numerical analysis of tooth mobility: formulation of a non-linear constitutive law for the periodontal ligament [J]. *Dent Mater*, 2004, 20(7): 623-9.
- [73] LIU J, LI Q, LIU S, et al. Periodontal ligament stem cells in the periodontitis microenvironment are sensitive to static mechanical strain [J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 1380851.
- [74] WANG W, LI N, ZHAO Y, et al. Effect of stretch frequency on osteogenesis of periodontium during periodontal ligament distraction [J]. *Orthod Craniofac Res*, 2023, 26(1): 53-61.
- [75] SUN C, JANJIC RANKOVIC M, FOLWACZNY M, et al. Effect of tension on human periodontal ligament cells: systematic review and network analysis [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 695053.
- [76] MASUDA T, TAKAHASHI I, ANADA T, et al. Development of a cell culture system loading cyclic mechanical strain to chondrogenic cells [J]. *J Biotechnol*, 2008, 133(2): 231-8.
- [77] PENG Y, QU R, YANG Y, et al. Regulation of the integrin $\alpha V\beta 3$ -actin filaments axis in early osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells under cyclic tensile stress [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 308.
- [78] HUANG H, YANG R, ZHOU Y H. Mechanobiology of periodontal ligament stem cells in orthodontic tooth movement [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 6531216.
- [79] CHANG M, LIN H, FU H, et al. MicroRNA-195-5p regulates osteogenic differentiation of periodontal ligament cells under mechanical loading [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(12): 3762-74.
- [80] MENG X, WANG W, WANG X. MicroRNA-34a and microRNA-146a target CELF3 and suppress the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells under cyclic mechanical stretch [J]. *J Dent Sci*, 2022, 17(3): 1281-91.
- [81] LI J, HU C, HAN L, et al. MiR-154-5p regulates osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells under tensile stress through the Wnt/PCP pathway by targeting Wnt11 [J]. *Bone*, 2015, 78: 130-41.
- [82] ZENG Q, WANG Y, GAO J, et al. miR-29b-3p regulated osteoblast differentiation via regulating IGF-1 secretion of mechanically stimulated osteocytes [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2019, 24: 11.
- [83] THI M M, SUADICANI S O, SCHAFFLER M B, et al. Mechanosensory responses of osteocytes to physiological forces occur along processes and not cell body and require $\alpha V\beta 3$ integrin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(52): 21012-7.