doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.09.006

外泌体 miR-338 对骨质疏松大鼠骨代谢水平、骨小梁微结构 和骨生物力学的影响*

张玉婷 侯静雯 张 蕾 朱新华 王 枚 许慧娟 张晓阳[△] (新疆医科大学第五附属医院老年病科 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要目的:探讨外泌体 miR-338 对骨质疏松大鼠骨代谢水平、骨小梁微结构和骨生物力的影响。方法:采用健康成年 SPF 级 SD 雄性大鼠进行骨髓间充质干细胞(BMSCs)分离。采用双侧卵巢摘除手术方法构建了骨质疏松大鼠模型。采用 qRT-PCR 法检测 miR-338 的表达水平;检测大鼠的骨密度,骨小梁微结构和骨生物力学指标。结果:与空白对照组相比,OP 模型组、OP+ ExoBMSCs、抑制组和过表达组 miR-338 的表达水平明显更高 (P<0.05);抑制组的 miR-338 的表达水平低于 OP 模型组、OP+ ExoBMSCs 和过表达组 (P<0.05);与空白对照组相比,OP 模型组、OP+ ExoBMSCs、抑制组和过表达组 OC、PINP、BALP 的表达水平明显更低(P<0.05);抑制组的 OC、PINP、BALP 的表达水平明显高于 OP 模型组、OP+ ExoBMSCs 和过表达组(P<0.05);与空白对照组相比,OP 模型组和过表达组 BV/TV、Th.N、Tb.Th、Conn.D 水平更低,而 Tb.Sp、SMI 明显更低(P<0.05);抑制组的 BV/TV、Th.N、Tb.Th、Conn.D 水平明显高于 OP 模型组、OP+ ExoBMSCs 和过表达组,而 Tb.Sp、SMI 明显更低(P<0.05);抑制组的 BV/TV、Th.N、Tb.Th、Conn.D 水平明显高于 OP 模型组、OP+ ExoBMSCs 和过表达组,而 Tb.Sp、SMI 明显更低(P<0.05);抑制组的 BV/TV、Th.N、Tb.Th、Conn.D 水平明显高于 OP 模型组、OP+ ExoBMSCs 和过表达组,而 Tb.Sp、SMI 明显更高(P<0.05);抑制组组的 BV/TV、Th.N、Tb.Th、Conn.D 水平明显高于 OP 模型组、OP+ ExoBMSCs 和过表达组,而 Tb.Sp、SMI 明显更低(P<0.05);抑制组的 BMD、最大荷载、最大应力、最大位移、刚度水平高于 OP 模型组、OP+ExoBMSCs 和过表达组(P<0.05)。结论:BMSCs 源性的 miR-338 可影响骨质疏松大鼠骨代谢、骨小梁微结构和骨生物力学状态。

关键词:外泌体;miR-338;骨质疏松;大鼠

中图分类号:R-33;R68 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2023)09-1631-05

Effects of Exosome MiR-338 on Bone Metabolism, Trabecular Microstructure and Bone Biomechanics in Osteoporotic Rats*

ZHANG Yu-ting, HOU Jing-wen, ZHANG Lei, ZHU Xin-hua, WANG Mei, XU Hui-juan, ZHANG Xiao-yang^A (Department of Geriatrics, The Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of exosome miR-338 on bone metabolism, trabecular microstructure and bone biodynamics in osteoporosis rats. Methods: Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were isolated from healthy adult SPF SD male rats. A rat model of osteoporosis was established by bilateral ovariectomy. The expression level of miR-338 was detected by qRT-PCR. Bone mineral density, trabecular microstructure and bone biomechanics were measured. Results: Compared with blank control group, the expression level of miR-338 was higher in OP model group, OP+ ExoBMSCs, inhibition group and overexpression group (P<0.05). The expression level of miR-338 in inhibition group was lower than that in OP model group, OP+ ExoBMSCs and overexpression group (P<0.05). Compared with blank control group, the expression levels of OC, PINP and BALP in OP model group, OP+ ExoBMSCs, inhibition group and overexpression group were lower (P<0.05). The expression levels of OC, PINP and BALP in inhibition group were higher than those in OP model group, OP+ ExoBMSCs and overexpression group (P<0.05). Compared with blank control group, the levels of BV/TV, Th.N, Tb.Th and Conn. D in OP model group, OP+ ExoBMSCs, inhibition group and overexpression group were lower, Tb.Sp and SMI were higher (P<0.05). The levels of BV/TV, Th.N, Tb.Th and Conn.D in inhibition group were higher than those in OP model group, OP+ ExoBMSCs and overexpression group (P<0.05), Tb.Sp and SMI were lower (P<0.05). Compared with blank control group, the levels of BMD, maximum load, maximum stress, maximum displacement and stiffness in OP model group, OP+ ExoBMSCs, inhibition group and overexpression group were lower (P<0.05). The levels of BMD, maximum load, maximum stress, maximum displacement and stiffness in inhibition group were higher than those in OP model group, OP+ ExoBMSCs and overexpression group (P<0.05). Conclusion: BMScS-derived miR-338 can affect bone metabolism, trabecular microstructure and bone biomechanical status in osteoporosis rats.

Key words: Exosomes; MiR-338; Osteoporosis; Rat

^{*}基金项目:新疆维吾尔族自治区自然科学基金项目(2021D01C451)

作者简介:张玉婷(1986-),女,硕士研究生,主治医师,研究方向:骨质疏松、肌少症,E-mail:z77064223@163.com

[△] 通讯作者:张晓阳(1971-),女,硕士研究生,主任医师,研究方向:老年冠心病、老年高血压病、老年糖尿病发病机制及老年综合评估技术的应用,E-mail:z77064223@163.com

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R68 Document code: A Article ID:1673-7273(2023)09-1631-05

前言

骨质疏松症(Osteoporosis)是一种骨吸收和骨形成之间的 平衡被破坏,导致骨吸收增加,从而降低骨密度(Bone mineral density, BMD)的骨骼疾病[1]。流行病学研究显示[2],全世界约有 2亿人受骨质疏松症的困扰,其中女性发病率明显高于男性, 且本病在绝经后女性中发病率显著上升。骨质疏松症的发生致 使骨折风险明显升高,严重影响了患者的预后生活质量。现阶 段骨质疏松的具体发病机制仍未被完全阐明问。现代医学采取 药物治疗的方案可有效延缓骨量流失,但长期服药可增加患者 经济负担同时带来诸多并发症,那么进一步明确骨质疏松发病 机制迫在眉睫。近来研究证实14,骨代谢水平,骨髓微环境和骨 生物力学改变是骨质疏松病情发生、发展的核心靶点。骨髓间 充质干细胞(Bone manrrow mesenchymal stemcells, BMSCs)已 被证实在血管再生和骨生成中扮演着尤为重要的角色,而 BM-SCs 的组织修复功能很大程度上依赖于其产生的外泌体^[5]。外 泌体(Exos)是一种 30~100 nm 的双分子层性囊泡, Exos 内包 裹的 miRNA 是其参与调控信息表达的关键 ¹⁰。miR-338 是 miRNAs 家族中的一员,近来被发现在骨质疏松中表达上调, 然而 BMSCs 来源的外泌体 miR-338 能否通过改善骨代谢水 平、骨髓微环境和骨生物力学进而促进骨质疏松病情转归仍未 见系统报道四。基于此背景,本次研究拟通过构建骨质疏松大鼠 模型,并通过构建 miR-338 的差异化表达模型,旨在明确外泌 体 miR-338 的表达对骨质疏松大鼠骨代谢水平、骨髓微环境和 骨生物力学的影响,以期为后续骨质疏松靶向干预策略的构建 提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 研究对象

健康成年 SPF 级 SD 雄性大鼠 6 只和 40 只雌鼠, SPF 级, 体重 220±20 g。所有动物均进行适应性喂养 1 周。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 分离与培养 取 6 只 SD 大鼠采用脊柱脱臼法 处死,无菌条件取大鼠的双侧股骨及胫骨骨骺端,并暴露大鼠 的骨髓腔,随后使用胎牛血清将骨髓冲出,待吹打成单细胞悬 液状时加入等体积的 Percoll 分离液,随后进行低速离心(离心 条件为:30 min,1500 r/min),并将中间细胞层收集于新的离心 管中。随后采用 PBS 进行冲洗,冲洗完成后再次进行离心操 作,离心条件为 10 min,1000 r/min。并再次加入 DMEM/F12 完 全培养基悬浮细胞,并在标准条件(5 %CO₂,37℃)下进行培养。培养每 3 d 换液 1 次,待细胞融合度达到 85 %时进行传代 培养。

1.2.2 流式细胞仪检测 BMSCs 表面标志物 采集传代完成细胞,并采用消化处理后进行单细胞悬液制备,悬液制备完成后进行低速离心,离心条件为 1200 r/min,5 min。并将细胞密度调整至 1×10⁶ 个 /mL。取 100 μL 细胞悬液,并加入 CD90-PE、CD44-FITC、CD34-FTTC,冰上避光孵育 30 min,待孵育操作完

成后采用 PBS 进行洗涤, PBS 洗涤操作重复 3 次, 随后对细胞 进行重悬, 并采用流式细胞仪进行检查。

1.2.3 BMSCs 成骨诱导分化 收集第3代生长状况良好的 BMSCs细胞,依据3.5×10⁴个/mL的细胞密度进行接种,待细 胞在6孔板中融合度达到80%时滴入成骨诱导液,总进行21d 的诱导,每3d换一次诱导液。21d后吸弃培养基,并加入4% 多聚甲醛固定30min,随后采用PBS进行洗涤,洗涤操作共进 行3次,随后加入1mL的茜素红染液孵育5min,孵育操作完 成后再次进行漂洗,漂洗操作共进行3次。

1.2.4 miR-338 慢病毒载体构建 取第3代 BMSCs 细胞进行 慢病毒载体转染,按照4.0×10⁴个/mL 的细胞密度将细胞接种 于6孔板中,并将细胞分为空白对照组,miR-338 抑制组和 miR-338 过表达组,待细胞融合度达到80%后,将对应的最重 组慢病毒转染至对应的培养基中,并维持培养48h。并采用 qRT-PCR 对转染效率进行检查。

1.2.5 BMSCs 外泌体提取及鉴定 将各组完成转染的培养液 上清取出,并参考外泌体提取试剂盒的操作说明进行外泌体的 提取操作,首先加入培养液 20%的体积的外泌体提取试剂,并 静置 12 h(4℃),静置完成后再进行 30 min 的离心操作,离心 参数为 1500 r/min,离心完成后吸弃上清,并加入 150 μL 重悬 沉淀。完成重悬操作后,采集部分样品进行形态检验(检验采用 透射电子显微镜观察),完成检查后采用 Western blot 对外泌体 特异性蛋白的表达情况进行检测(CD81 和 CD63),随后采用 qRT-PCR 检测外泌体中 miR-338 的表达情况。

1.2.6 建模及干预 将 40 只 SD 雌鼠随机分为组 5 组每组 8 只,空白对照组、OP 模型组、OP+ExoBMSCs、OP+ExoBM-SCs+miR-338 抑制(抑制组)和 OP+ExoBMSCs+miR-338 过表达(过表达组)。OP 大鼠模型建立方法:参考双侧卵巢摘除手术方法,构造骨质疏松大鼠模型。将大鼠置于无菌台上,麻醉采用腹腔注射戊巴比妥钠(30 mg/kg),待麻醉起效后并沿着大鼠背部正中线做长约 3 cm 的切口,并沿切口进入大鼠腹腔,暴露双侧卵巢后并切除,彻底止血后进行缝合,术后进行常规抗感染操作,并在 1 周后拆线。若 BMD 峰值减少≥ 2.5 则代表建模成功。建模成功后分别取对应组的外泌体(750 mg/mL)注射至大鼠右侧股骨处。

1.2.7 qRT-PCR 法 采用 Trizol 法(上海尚宝生物科技有限公司)提取总 RNA,并采用 SYBRR Green 荧光染料试剂盒(上海 俊晟生物科技有限公司)和 ABI StepOne PCR 仪(上海蓓米尔 生物科技有限公司)进行逆转录操作,逆转录条件为:98℃、50℃和 37℃条件下进行逆转录操作,待逆转录为 cDNA 后进 行 RT-PCR 扩增,并以 GAPDH 为内参。反应条件为:65℃1 min, 95℃15 s,95℃10 min。最后参考 $2^{s_{A}CT}$ 计算 miR-338 的 mRNA 相对表达水平。

1.2.8 骨相关指标检测 (1)骨代谢水平 采用脊柱脱臼法处 死大鼠后,取血 2 mL,并置于离心机中,在 3000 r/min,10 cm 离心半径条件下离心 10 min。离心完成后静置并吸弃上清液。 采用 ELISA 法检测骨钙素(Osteocalcin, OC)、I 型前胶原氨基 端前肽(Procollagen type I amino-terminal peptide, PINP)和血清 中骨特异性碱性磷酸酶(Bone specific alkaline phosphatase, BALP)的表达水平。

(2)骨密度检测 采用骨密度仪,对所有大鼠的骨密度水平 进行检查,骨密度检查操作均由同一人完成。通过骨密度仪分 析各组大鼠 BMD 变化。所有操作分析均由同一组人完成。

(3)骨小梁微结构 取各组大鼠右侧股骨远端,并将标本的 生长板顶点至皮质部分去掉后进行兴趣区域的划定,并提取 CT 影像资料,随后采用 ABA 软件对结构模型指数(SMI)、骨 小梁数量(Tb.N)、骨小梁分离度(Tb.Sp)、连接密度(Conn.D)、 骨小梁厚度(Tb.Th)和相对骨体积(BV/TV)。

(4)骨生物力学 取各组大鼠右侧股骨,采用游标卡尺进行 尺度的测量,每次测量均重复3次,取平均值,并将标本固定后 采用电子万能生物力学材料试验机进行弯曲力学试验,加载速 度 1 mm/min,最大量程 1 000 N,支点跨距 20 mm,并记录载荷-变形曲线。

1.3 统计学方法

本研究所得数据结果采用 SPSS22.0 进行处理和分析,计 量资料以(均数±标准差)表示,多组间比较采用单因素方差分 析进行检验,两组间比较采用 t 检验,检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠外泌体 miR-338 mRNA 表达情况

与空白对照组相比, OP 模型组、OP+ ExoBMSCs、抑制组 和过表达组 miR-338 的表达水平更高;抑制组的 miR-338 的表 达水平低于 OP 模型组、OP+ ExoBMSCs 和过表达组 (*P*< 0.05),详情见表 1。

表 1 各组大鼠外泌体 miR-338 mRNA 表达情况(均数±标准差)
Table 1 Rat exomiR-338 mRNA expression in each group (mean± standard deviation)

Groups	n	miR-338 mRNA
Blank control group	8	1.03 ± 0.03
OP model group	8	2.87±0.32ª
OP+ExoBMSCs group	8	2.71±0.28
Inhibition group	8	1.62±0.31 ^{ab}
Overexpression group	8	3.52±0.21 ^{abc}
F/P	-	357.54/<0.001

Note: compared with OP model group, ^aP<0.05; compared with OP+ExoBMSCs group, ^bP<0.05; compared with Inhibition group, ^aP<0.05, the same below.

2.2 各组大鼠骨代谢标志物的含量结果比较

PINP、BALP 的表达水平高于 OP 模型组、OP+ExoBMSCs 和过表达组(P<0.05),详情见表 2。

与空白对照组相比,OP模型组、OP+ExoBMSCs、抑制组和 过表达组 OC、PINP、BALP 的表达水平更低;抑制组的 OC、

表 2 各组大鼠骨代谢标志物的含量结果比较(均数±标准差)

	-			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Groups	n	OC(µg/L)	PINP(µg/L)	BALP(µg/L)
Blank control group	8	18.75±2.61	31.52±7.54	21.32±6.87
OP model group	8	8.54±1.65	17.56±3.54	13.24±2.32
OP+ExoBMSCs group	8	8.61±1.51ª	17.32±3.61ª	13.18±2.51ª
Inhibition group	8	16.21±3.54 ^{ab}	28.12±6.12 ^{ab}	19.32±5.21 ^{ab}
Overexpression group	8	6.54±1.02 ^{abc}	13.54±2.21 ^{abc}	9.54±1.31 abc
F/P	-	19.54/<0.001	156.43/<0.001	254.12/<0.001

2.3 各组大鼠骨小梁微结构的结果比较

与空白对照组相比,OP 模型组、OP+ ExoBMSCs、抑制组 和过表达组 BV/TV、Th.N、Tb.Th、Conn.D 水平更低,而 Tb.Sp、 SMI 更高;抑制组组的 BV/TV、Th.N、Tb.Th、Conn.D 水平高于 OP 模型组、OP+ ExoBMSCs 和过表达组,而 Tb.Sp、SMI 更低 (P<0.05),详情见表 3。

2.4 各组大鼠骨生物力学结果比较

与空白对照组相比,OP模型组、OP+ExoBMSCs、抑制组和过表达组BMD、最大荷载、最大应力、最大位移、刚度水平更

低;抑制组组的 BMD、最大荷载、最大应力、最大位移、刚度水 平高于 OP 模型组、OP+ ExoBMSCs 和过表达组 (P<0.05),详 情见表 4。

3 讨论

本次研究通过分离大鼠 BMSCs 细胞并分离出外泌体,进 一步通过在外泌体中转染 miR-338 慢病毒载体。随后参考赖鸿 辉人¹⁸的方法采用双侧卵巢摘除手术方法构建了骨质疏松大鼠 模型,结果显示模型组骨密度明显下降,提示模型构建成功。进

Table 3 Comparison of trabecular microstructures (mean± standard deviation)								
Groups	n	BV/TV(%)	Th.N(cm)	$\text{Tb.Th}(\mu m)$	Conn.D(cm ³)	Tb.Sp(cm)	SMI	
Blank control group	8	0.46 ± 0.06	6.87±0.18	62.45±9.54	85.45±13.21	0.18 ± 0.09	0.83±0.09	
OP model group	8	0.17±0.06	3.07±0.13	27.32±3.54	47.45±9.54	0.68 ± 0.05	1.40±0.06	
OP+ExoBMSCs group	8	0.19 ± 0.05^{a}	3.11±0.11 ^a	27.28±3.42ª	46.52±8.54ª	0.71 ± 0.06^{a}	1.42 ± 0.07^{a}	
Inhibition group	8	$0.41 {\pm} 0.05^{ab}$	6.12±0.21 ^{ab}	57.54 ± 8.45^{ab}	79.54 ± 3.45^{ab}	0.23 ± 0.11^{ab}	0.97 ± 0.06^{ab}	
Overexpression group	8	$0.10{\pm}0.03$ abc	2.12±0.37 ^{abc}	13.21±3.54 ^{abc}	31.54±6.45 abc	1.01±0.61 abc	1.87±0.31 abc	
F/P	-	365.45/<0.001	45.67/<0.001	175.45/<0.001	125.45/<0.001	185.34/<0.001	115.12/<0.001	

表 3 各组大鼠骨小梁微结构的结果比较(均数±标准差)

表 4 各组大鼠骨生物力学结果比较(均数±标准差)

Table 4 Com	narison of hor	e hiomechanica	l results of all	group rats (mean+ standard	deviation)
1 abic + Com	parison or 001	e oforneenamea	i results of all	group rais (mean± standard	ucviation)

	1		c	1	,	
Groups	n	BMD	Peak load /N	Maximum stress	Maximum	Rigidity (N/mm)
				/MPa	displacement /mm	0,000
Blank control group	8	0.23±0.03	163.72±27.25	184.25±15.12	0.91±0.07	221.54±21.21
OP model group	8	0.11±0.02	97.54±11.02	131.12±10.12	0.57 ± 0.03	145.64±11.12
OP+ExoBMSCs group	8	0.13±0.04ª	95.45±10.12 ^a	129.54±9.54ª	0.61 ± 0.04^{a}	143.45±10.32ª
Inhibition group	8	0.19 ± 0.03^{ab}	134.56±10.12 ^{ab}	165.57±6.54 ^{ab}	$0.81{\pm}0.03^{ab}$	198.45±12.12 ^{ab}
Overexpression group	8	0.07 ± 0.03^{abc}	77.65 ± 10.54^{abc}	101.12±6.45 ^{abc}	$0.41 \pm 0.11^{\text{abc}}$	113.12±9.45 ^{abc}
<i>F/P</i>	-	367.54/<0.001	16.54/<0.001	15.464/<0.001	185.54/<0.001	125.45/<0.001

骨密度是现阶段临床确诊骨质疏松的关键指标,而骨密度 的改变与骨代谢水平密切相关。OC 又称骨 R- 羟基谷氨酸蛋 白,主要由成牙质细胞和成骨细胞合成,OC是成骨细胞分泌的 关键蛋白,临床可通过监测 OC 的变化进而评估骨代谢情 况^[9,10]。Capozzi 等^[11]研究证实, OC 是骨基质中常见的主要非胶 原蛋白,其表达水平可反应骨代谢水平,且在骨质疏松的治疗 过程中具有重要的监测意义。Ebtesam 等凹研究证实,OC 可调 节骨矿化。PINP 为 I 型前胶原细胞外分泌产物是评估骨形成 的可靠血清标志物[13,14]。Gillett 等[15]研究证实, PINP 为骨质疏松 症中骨形成的参考标志物,PINP 具有非常低的昼夜节律和生 物变异,不受食物摄入的影响。临床可将 PINP 作为评估骨代谢 状况的可靠血清指标^{16]}。Garnero等^[17]研究证实,PINP作为骨形 成和骨吸收的标志物,可反应骨质疏松患者的相关骨代谢状 况。BALP 是与骨代谢密切相关的血清标志物,被广泛证实在 骨质疏松症患者中表达异常^[18]。Song 等^[19]研究证实, 骨碱性磷 酸酶(BALP)的表达变化可有效反应骨代谢的变化,临床可将 其作为重要的参考指标。Linder 等四报道显示,骨碱性磷酸酶 (BALP)可促进细胞外矿化。骨小梁微结构是影响骨折发生风 险的关键指标,骨质疏松发生后骨密度降低,随着骨密度水平 的进行性降低可导致骨小梁微结构被破坏进而表现为患者临 床更高的骨折风险^[21,22]。本次研究结果显示,外泌体 miR-338 抑 制组骨小梁微结构破坏明显得到改善,提示 BMSCs 源性的外 泌体 miR-338 可有效改善骨质疏松大鼠骨小梁微结构并促进 骨密度改善。考虑 BMSCs 细胞在近来研究中被广泛证实参与 骨矿化等骨质疏松相关病理机制, 而 BMSCs 源性的外泌体作

为 BMSCs 细胞功能表达的重要途径,其中包含的 miR-338 在 近来研究中亦受到广泛重视[23,24]。Lin 等[25]研究证实,miR-338 在绝经后骨质疏松患者中表达上调,在抑制 miR-338 的表达后 骨质疏松病情得到明显的好转,提示 miR-338 可能与骨质疏松 的病情密切相关。Maria 等2%研究显示,骨质疏松患者经治疗后 期 miR-338 的表达明显升高,即 miR-338 的表达水平与骨质疏 松病情呈负相关。本次研究结果显示,外泌体 miR-338 抑制组 骨生物力学明显优于其他各组, 证实 BMSCs 源性的外泌体 miR-338 抑制可有效促进骨质疏松大鼠骨生物力学。考虑骨生 物力学性能主要从骨的承载能力、变性能力和应变等多角度反 应骨骼的功能状况,骨质疏松病发后成骨和破骨的动态被打破 致使骨代谢状态出现紊乱,而异常水平的骨代谢能力致使骨骼 矿化受到影响,进而导致骨小梁微结构被破坏,随着骨小梁微 结构破坏的积累致使骨骼的承载能力、变性能力和应变等多方 面性能被破坏,最终表现为患者合并更高的骨折风险,而采用 BMSCs 源性的外泌体 miR-338 干预后可逆转这一病理过程, 这项研究为进一步探索骨质疏松的行干预策略提供了新思路, 亦为后续进一步探索 BMSCs 源性的外泌体在骨质疏松干预中 的潜在作用奠定了理论基础[27-30]。

综上所述,BMSCs 源性的外泌体 miR-338 可改善骨质疏 松大鼠骨生物力学、骨髓微环境和骨代谢水平。后续的研究应 积极开展临床试验以明确相关靶点的临床价值,并推动新靶点 向临床转化进而为骨质疏松患者的早期干预和病情预测评估 提供新思路。然而,本次实验仅构建了骨质疏松大鼠在体模型 进行了相关研究,今后研究中仍需要进一步开展细胞体外水平 研究和临床队列研究进一步探明 BMSCs 源性的外泌体在骨质 疏松中的作用及其价值。

参考文献(References)

- Yong EL, Logan S. Menopausal osteoporosis: screening, prevention and treatment[J]. Singapore Med J, 2021, 62(4): 159-166
- [2] 孙菁,朱媛媛,郭海英,等.基于 AGEs/RAGE/NF-κB 通路探讨老年 性骨质疏松症发病机制 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(6): 919-923
- [3] Bijelic R, Milicevic S, Balaban J. Risk Factors for Osteoporosis in Postmenopausal Women[J]. Med Arch, 2017, 1(1): 25-28
- [4] Camacho PM, Petak SM, Binkley N, et al. American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis-2020 Update [J]. Endocr Pract, 2021, 27(4): 379-380
- [5] Guo Y, Jia X, Cui Y, et al. Sirt3-mediated mitophagy regulates AGEsinduced BMSCs senescence and senile osteoporosis [J]. Redox Biol, 2021, 41(15): 101915
- [6] Zhang Y, Xie Y, Hao Z, et al. Umbilical Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome-Encapsulated Hydrogels Accelerate Bone Repair by Enhancing Angiogenesis[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2021, 13 (16): 18472-18487
- [7] Liu H, Sun Q, Wan C, et al. MicroRNA-338-3p regulates osteogenic differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells by targeting Runx2 and Fgfr2[J]. J Cell Physiol, 2014, 229(10): 1494-502
- [8] 赖鸿辉,刘跃,李体远,等.外源性硫化氢对双侧卵巢摘除骨质疏松 模型大鼠骨代谢的影响 [J].中国组织工程研究,2021,25(29): 25-31
- [9] Boyacioglu O, Orenay-Boyacioglu S, Yildirim H, et al. Boron intake, osteocalcin polymorphism and serum level in postmenopausal osteoporosis[J]. J Trace Elem Med Biol, 2018, 48(1): 52-56
- [10] Atalay S, Elci A, Kayadibi H, et al. Diagnostic utility of osteocalcin, undercarboxylated osteocalcin, and alkaline phosphatase for osteoporosis in premenopausal and postmenopausal women [J]. Ann Lab Med, 2012, 32(1): 23-30
- [11] Capozzi A, Scambia G, Migliaccio S, et al. Role of vitamin K2 in bone metabolism: a point of view and a short reappraisal of the literature[J]. Gynecol Endocrinol, 2020, 36(4): 285-288
- [12] Al-Suhaimi EA, Al-Jafary MA. Endocrine roles of vitamin K-dependent- osteocalcin in the relation between bone metabolism and metabolic disorders [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2020, 21(1): 117-125
- [13] Eastell R, Szulc P. Use of bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2017, 5(11): 908-923
- [14] Mattia L, Davis S, Mark-Wagstaff C, et al. Utility of PINP to monitor osteoporosis treatment in primary care, the POSE study (PINP and Osteoporosis in Sheffield Evaluation)[J]. Bone, 2022, 158(11): 116347
- [15] Gillett MJ, Vasikaran SD, Inderjeeth CA. The Role of PINP in Diagnosis and Management of Metabolic Bone Disease [J]. Clin Biochem Rev, 2021, 42(1): 3-10
- [16] Szulc P, Naylor K, Hoyle NR, et al. National Bone Health Alliance

Bone Turnover Marker Project. Use of CTX-I and PINP as bone turnover markers: National Bone Health Alliance recommendations to standardize sample handling and patient preparation to reduce pre-analytical variability[J]. Osteoporos Int, 2017, 28(9): 2541-2556

- [17] Garnero P. New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis[J]. Bone, 2014, 66(15): 46-55
- [18] Wen Y, Li H, Zhang X, et al. Correlation of Osteoporosis in Patients With Newly Diagnosed Type 2 Diabetes: A Retrospective Study in Chinese Population [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12(5): 531904
- [19] Song YE, Tan H, Liu KJ, et al. Effect of fluoride exposure on bone metabolism indicators ALP, BALP, and BGP[J]. Environ Health Prev Med, 2011, 16(3): 158-63
- [20] Halling Linder C, Ek-Rylander B, et al. Bone Alkaline Phosphatase and Tartrate-Resistant Acid Phosphatase: Potential Co-regulators of Bone Mineralization[J]. Calcif Tissue Int, 2017, 101(1): 92-101
- [21] Li Y, Tseng WJ, de Bakker CMJ, et al. Peak trabecular bone microstructure predicts rate of estrogen-deficiency-induced bone loss in rats[J]. Bone, 2021, 145(14): 115862
- [22] Wang X, Liang T, Zhu Y, et al. Melatonin prevents bone destruction in mice with retinoic acid-induced osteoporosis [J]. Mol Med, 2019, 25(1): 43
- [23] Liu F, Yuan Y, Bai L, et al. LRRc17 controls BMSC senescence via mitophagy and inhibits the therapeutic effect of BMSCs on ovariectomy-induced bone loss[J]. Redox Biol, 2021, 43(2): 101963
- [24] Yang W, Li HY, Wu YF, et al. ac4C acetylation of RUNX2 catalyzed by NAT10 spurs osteogenesis of BMSCs and prevents ovariectomyinduced bone loss[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 26(3): 135-147
- [25] Lin C, Yu S, Jin R, et al. Circulating miR-338 Cluster activities on osteoblast differentiation: Potential Diagnostic and Therapeutic Targets for Postmenopausal Osteoporosis [J]. Theranostics, 2019, 9 (13): 3780-3797
- [26] Yavropoulou MP, Anastasilakis AD, Makras P, et al. Serum Profile of microRNAs Linked to Bone Metabolism During Sequential Treatment for Postmenopausal Osteoporosis [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2020, 105(8): dgaa368
- [27] Yang W, Li HY, Wu YF, et al. ac4C acetylation of RUNX2 catalyzed by NAT10 spurs osteogenesis of BMSCs and prevents ovariectomyinduced bone loss[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 26(5): 135-147
- [28] Yang X, Yang J, Lei P, et al. LncRNA MALAT1 shuttled by bone marrow-derived mesenchymal stem cells-secreted exosomes alleviates osteoporosis through mediating microRNA-34c/SATB2 axis[J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(20): 8777-8791
- [29] Xu R, Shen X, Si Y, et al. MicroRNA-31a-5p from aging BMSCs links bone formation and resorption in the aged bone marrow microenvironment[J]. Aging Cell, 2018, 17(4): e12794
- [30] Hu Y, Li X, Zhang Q, et al. Exosome-guided bone targeted delivery of Antagomir-188 as an anabolic therapy for bone loss [J]. Bioact Mater, 2021, 6(9): 2905-2913