

· 学术探讨 ·

血清 microRNA 与绝经后骨质疏松症肾虚证的关系

梁文娜, 李西海, 李灿东

(福建中医药大学, 福建 福州 350122)

摘 要 microRNA(miRNA)是一类非编码小 RNA 分子,主要通过靶基因 3' 非翻译区相结合而降解靶基因或阻止靶基因的翻译。肾虚证是绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)的主要中医证型,血清 miRNA 表达紊乱与 PMOP 肾虚证的发生、发展存在重要关联。将 miRNA 引入 PMOP 肾虚证的研究领域,建立与肾虚证相关的血清 miRNA 调控网络,可以从转录后水平揭示 PMOP 肾虚证的本质,能够为 PMOP 肾虚证的治疗提供新的方向。本文从 miRNA 的生物合成及功能、血清 miRNA 与 PMOP 的关系、基于血清 miRNA 研究 PMOP 肾虚证的优势、基于血清 miRNA 研究 PMOP 肾虚证的方法 4 个方面,对血清 miRNA 与 PMOP 肾虚证的关系进行了探讨。

关键词 骨质疏松;绝经后;微 RNAs;辨证分型;肾虚

microRNA(miRNA)是一类非编码小 RNA 分子,其表达具有高度的保守性、时序性及组织特异性,其可以通过调控靶基因的表达影响细胞的增殖、分化与凋亡^[1]。绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是一种因雌激素水平下降引起的,以骨量减少和骨组织微结构退变为特征,导致骨的脆性增加及易于骨折的代谢性骨骼疾病,属于中医学“骨痿”范畴^[2-4]。肾虚证是 PMOP 的主要中医证型,包括肾阴虚证、肾阳虚证及肾阴阳两虚证^[5-6]。由于肾虚证不仅是人体气血阴阳失衡状态的总体概括,也是某一病理状态的具体概括,所以肾虚证体现了人体分子、细胞、组织、器官和系统的综合动态变化,因此深入研究 PMOP 肾虚证的发生机制,寻找更有效的防治措施,是目前中医领域的研究热点及难点。本文通过分析国内外相关文献,从 miRNA 的生物合成及功能、血清 miRNA 与 PMOP 的关系、基于血清 miRNA 研究 PMOP 肾虚证的优势、基于血清 miRNA 研究 PMOP 肾虚证的方法 4 个方面,对血清 miRNA 与 PMOP 肾虚证的关系进行了探讨。

1 miRNA 的生物合成及功能

miRNA 是一类具有发育阶段特异性或组织特异性表达特征的非编码小 RNA,长度为 16~29 个核苷

酸,平均长度约为 22 个核苷酸^[7]。miRNA 的转录方式与蛋白质编码基因的转录方式相似,其生物合成过程可以分为 2 个阶段:①细胞核内发生,主要是原始 miRNA(primary miRNA, pri-miRNA)的修饰,包括原始 miRNA 的生成、前体 miRNA(precursor miRNA, pre-miRNA)的生成;②细胞质中发生,主要是成熟 miRNA 的形成,包括 pre-miRNA 从细胞核转运至细胞质、双链 miRNA 的产生及 miRNA 诱导沉默复合物(miRNA-induced silencing complex, miRISC)的生成^[8-9]。

miRNA 的经典转录途径是通过 RNA 聚合酶 II 介导转录,转录后可产生含有 3' 端多聚腺苷酸结构与 5' 端帽式结构的多聚核苷酸前体 pri-miRNA。在细胞核内, pri-miRNA 被 microprocessor 多蛋白复合物识别,并通过其核心催化酶核糖核酸酶 III(Drosha)与双链 RNA 结合蛋白(Pasha)将 pri-miRNA 中的侧链序列切除,从而产生具有茎环结构、长度为 70~80 个核苷酸的 pre-miRNA^[10-13]。pre-miRNA 被 Ran-GTP 依赖的核质/细胞质转运蛋白 exportin5 所识别,并从细胞核内运输至细胞质中^[14]。在细胞质中, pre-miRNA 在另一种核糖核酸酶 III(Dicer)的作用下,被剪切成长度为 22~25 个核苷酸,且 5' 端磷酸化及 3' 端含有长度为 2 个核苷酸的不完全匹配双链 RNA^[15];该双链 RNA 是一种由一条成熟的 miRNA 引导链及一条与之相对的 miRNA(miRNA*)构成的二聚体,其在 RNA 解螺旋酶的作用下产生成熟的 miRNA 与 miRNA*^[16]。成熟 miRNA 通过与 miRISC 中的 argonaute(AGO)蛋白相结合形成复合物,而 miRNA* 则被降

基金项目:国家自然科学基金重点项目(81230087);福建省自然科学基金项目(2015J01339);福建省卫生系统中青年骨干人才培养项目(2015-ZQN-JC-32);2015 年度福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划

通讯作者:李灿东 E-mail:fjzylcd@126.com

解。miRISC 复合物可与靶基因 3' 端非翻译区 (3' untranslated region, 3' UTR) 完全或不完全结合, 诱导靶基因的降解或阻止靶基因的翻译, 从而发挥调控靶基因的作用^[17-18]。

miRNA 的非经典转录途径与经典途径大致相似, 主要区别在于 pri-miRNA 由内含子转录产生 (而不是由独立基因转录产生), microprocessor 多蛋白复合物不参与 pri-miRNA 合成 pre-miRNA 的过程, 因此又称为 Dorsha 酶非依赖途径^[19]。

2 血清 miRNA 与 PMOP 的关系

血清 miRNA 异常表达引起的相应基因调控网络紊乱, 是疾病发生的重要原因。血清 miRNA 可以调节骨骼系统多种重要蛋白的表达, 并参与骨代谢的调控。血清 miRNA 在 PMOP 中的研究重点, 主要是筛选生物标志物和治疗靶点。

2.1 血清 miRNA 可作为 PMOP 的生物标志物 由于血清 miRNAs 的表达水平与 PMOP 骨代谢紊乱密切相关, 因此血清 miRNAs 可作为 PMOP 的生物标志物。研究表明, 与健康对照组相比, PMOP 患者血清 miR-21 表达下调、miR-133a 及 miR-422a 表达上调, 这不仅可用于区分 PMOP 患者与健康者, 还可用来确定 PMOP 的病变程度^[20-22]。

2.2 血清 miRNA 可作为 PMOP 的治疗靶点 血清 miRNA 异常表达是 PMOP 发生和发展的重要环节, 因此血清 miRNA 可作为 PMOP 的治疗靶点。若 PMOP 患者血清 miRNA 表达上调, 可采用以拮抗为主的治疗策略降低其表达水平; 如采用反义寡核苷酸 (anti-miRNA oligonucleotide, AMO) 技术人工合成能与靶 miRNA 特异互补的寡核苷酸, 从而降解 miRNA^[23]; 也可采用 miRNA 擦除器或 miRNA 海绵, 降低 miRNA 的表达水平^[24]。若 PMOP 患者血清 miRNA 表达下调, 可补充人工合成的外源性 miRNA 提高其表达水平。通过人工合成与靶基因某一段序列特异互补的非天然核苷酸序列, 可以在转录后水平调节靶基因的表达^[25]。

2.3 血清 miRNA 可作为调控 PMOP 骨代谢的靶基因 血清 miRNA 能对成骨分化过程产生负向或正向的调控作用, 因此其可作为调控 PMOP 骨代谢的靶基因。负向调控成骨细胞分化的 miRNA 主要包括 miR-17/20a^[26]、miR-4448/4708/4773^[27]、miR-34a^[28]、miR-26a^[29]、miR-125b^[30]、miR-204/211^[31]、miR-

141/200a^[32]、miR-206^[33]、miR-378^[34]、miR-29a/29c^[35], 正向调控成骨细胞分化的 miRNA 主要包括 miR-27^[36]、miR-2861^[37]、miR-210^[38]。

3 基于血清 miRNA 研究 PMOP 肾虚证的优势

中医学认为“肾为先天之本”“肾主骨, 生髓”, 肾与骨骼的生长发育密切相关。《素问·上古天真论》即载有肾气盛衰与女子骨代谢相关的条文, “女子七岁, 肾气盛, 齿更发长”“三七肾气平均, 故真牙生而长极”“四七筋骨坚, 发长极, 身体盛壮”。《素问·痿论篇》载有: “肾气热, 则腰脊不举, 骨枯而髓减, 发为骨痿”, 论述了“骨痿”的成因。

虽然血清 miRNA 与 PMOP 的发生、发展密切相关, 但目前有关血清 miRNA 与 PMOP 肾虚证的研究则较少。由于 miRNA 数量较少, 但调控范围广泛, 且处于转录后调控的枢纽地位, 因此将 miRNA 引入 PMOP 肾虚证的研究领域具有一定优势。可运用生物信息学软件预测与 PMOP 肾虚证相关的靶基因, 通过靶基因之间的相互作用构建与 PMOP 肾虚证相关的血清 miRNA 调控网络。miRNA 表达的时序性和特异性与肾虚证的动态时空特征极其相似, miRNA 异常表达引起相应调控网络紊乱是 PMOP 肾虚证发生的重要原因之一。不同时空条件下 miRNA 的调控网络紊乱也不相同, 导致不同的靶基因产生异常蛋白质, 在宏观层次上表现为不同的症状和体征, 这也表明基于血清 miRNA 研究 PMOP 肾虚证具有一定的可行性。

4 基于血清 miRNA 研究 PMOP 肾虚证的方法

西医辨病与中医辨证相结合的模式, 即是基于血清 miRNA 研究 PMOP 肾虚证的主要方法。可采用 miRNA 芯片技术检测 PMOP 肾虚证患者与健康对照者之间的血清 miRNA 表达谱, 利用统计学方法筛选出与 PMOP 肾虚证相关的差异血清 miRNA; 采用血清 miRNA 靶基因预测软件筛选相关靶基因, 并通过生物学实验进行验证; 分析差异血清 miRNA 靶基因调控的生物学过程, 以化学合成的血清 miRNA 或 miRNA 反义抑制寡核苷酸转染细胞, 模拟血清 miRNA 高表达或低表达对细胞功能的影响; 最终, 通过分析相关信号通路来验证 PMOP 肾虚证特异性血清 miRNA 的调控网络。

5 小结

本课题组前期研究表明, PMOP 肾虚证的中医

病理特点以虚为主,存在虚实夹杂、多脏腑病变,其核心病机是肾虚骨痿^[39];成骨细胞和破骨细胞相互作用是调控骨重建的核心因素,而细胞核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)、细胞核因子 κ B 受体活化因子(receptor activator of NF- κ B, RANK)及护骨素(osteoprotegerin, OPG)组成的 RANKL/RANK/OPG 系统,是连接骨与免疫系统的分子桥梁,对调节骨吸收和骨形成具有重要作用^[40];PMOP 肾阳虚证患者血清中雌二醇、OPG 和胰岛素样生长因子-1 含量下降,可引起 RANKL/OPG 系统失衡,从而抑制成骨细胞的骨形成功能^[41]。将血清 miRNA 引入 PMOP 肾虚证的研究领域,借助血清 miRNA 芯片技术及生物信息学技术,建立与肾虚证相关的血清 miRNA 调控网络,可以从转录后水平揭示 PMOP 肾虚证的本质,能够为 PMOP 肾虚证的治疗提供新的方向。

6 参考文献

- [1] ZHAO X, XU D, LI Y, et al. MicroRNAs regulate bone metabolism[J]. J Bone Miner Metab, 2014, 32(3): 221-231.
- [2] STEIN EM, KEPLEY A, WALKER M, et al. Skeletal structure in postmenopausal women with osteopenia and fractures is characterized by abnormal trabecular plates and cortical thinning[J]. J Bone Miner Res, 2014, 29(5): 1101-1109.
- [3] WON Y, LIM JR, KIM YH, et al. Atypical femoral fracture combined with osteonecrosis of jaw during osteoporosis treatment with bisphosphonate[J]. J Bone Metab, 2014, 21(2): 155-159.
- [4] IGASE M, KOHARA K, TABARA Y, et al. Change in arterial stiffness associated with monthly bisphosphonate treatment in women with postmenopausal osteoporosis[J]. Menopause, 2014, 21(9): 962-966.
- [5] LIANG W, LI X, LI Y, et al. Tongue coating microbiome regulates the changes in tongue texture and coating in patients with post-menopausal osteoporosis of Gan-shen deficiency syndrome type[J]. Int J Mol Med, 2013, 32(5): 1069-1076.
- [6] LIANG W, LIM M, LI X, et al. Icaritin promotes bone formation via the BMP-2/Smad4 signal transduction pathway in the hFOB 1.19 human osteoblastic cell line[J]. Int J Mol Med, 2012, 30(4): 889-895.
- [7] CROSET M, SANTINI D, IULIANI M, et al. MicroRNAs and bone metastasis: a new challenge[J]. Molecules, 2014, 19(7): 10115-10128.
- [8] CHOUDHURI S. Small noncoding RNAs: biogenesis, function, and emerging significance in toxicology[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2010, 24(3): 195-216.
- [9] SIOMI H, SIOMI MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals[J]. Mol Cell, 2010, 38(3): 323-332.
- [10] LEE Y, KIM M, HAN J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II[J]. EMBO J, 2004, 23(20): 4051-4060.
- [11] CARTHEW RW, SONTHEIMER EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs[J]. Cell, 2009, 136(4): 642-655.
- [12] DENLI AM, TOPS BB, PLASTERK RH, et al. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex[J]. Nature, 2004, 432(7014): 231-235.
- [13] KIM VN, HAN J, SIOMI MC. Biogenesis of small RNAs in animals[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10(2): 126-139.
- [14] YI R, QIN Y, MACARA IG, et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs[J]. Genes Dev, 2003, 17(24): 3011-3016.
- [15] BOHNSACK MT, CZAPLINSKI K, GORLICH D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs[J]. RNA, 2004, 10(2): 185-191.
- [16] HAMMOND SM, BERNSTEIN E, BEACH D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells[J]. Nature, 2000, 404(6775): 293-296.
- [17] DJURANOVIC S, NAHVI A, GREEN R. A parsimonious model for gene regulation by miRNAs[J]. Science, 2011, 331(6017): 550-553.
- [18] GUO H, INGOLIA NT, WEISSMAN JS, et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels[J]. Nature, 2010, 466(7308): 835-840.
- [19] YANG JS, MAURIN T, ROBINE N, et al. Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(34): 15163-15168.
- [20] GARNERO P. New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis[J]. Bone, 2014, 66: 46-55.
- [21] CAO Z, MOORE BT, WANG Y, et al. MiR-422a as a potential cellular microRNA biomarker for postmenopausal osteoporosis[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97098.

- [22] WANG Y, LI L, MOORE BT, et al. MiR - 133a in human circulating monocytes: a potential biomarker associated with postmenopausal osteoporosis [J]. PLoS One, 2012, 7 (4): e34641.
- [23] LU Y, XIAO J, LIN H, et al. A single anti - microRNA antisense oligodeoxyribonucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approach for microRNA interference [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37 (3): e24.
- [24] EBERT MS, SHARP PA. MicroRNA sponges: progress and possibilities [J]. RNA, 2010, 16 (11): 2043 - 2050.
- [25] YOUNGER ST, COREY DR. Transcriptional gene silencing in mammalian cells by miRNA mimics that target gene promoters [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39 (13): 5682 - 5691.
- [26] SHI C, QI J, HUANG P, et al. MicroRNA - 17/20a inhibits glucocorticoid-induced osteoclast differentiation and function through targeting RANKL expression in osteoblast cells [J]. Bone, 2014, 68: 67 - 75.
- [27] KATO RB, ROY B, DE OLIVEIRA FS, et al. Nanotopography directs mesenchymal stem cells to osteoblast lineage through regulation of microRNA - SMAD - BMP - 2 circuit [J]. J Cell Physiol, 2014, 229 (11): 1690 - 1696.
- [28] CHEN L, HOLMSTRØM K, QIU W, et al. MicroRNA - 34a inhibits osteoblast differentiation and in vivo bone formation of human stromal stem cells [J]. Stem Cells, 2014, 32 (4): 902 - 912.
- [29] LUZI E, MARINI F, SALA SC, et al. Osteogenic differentiation of human adipose tissue - derived stem cells is modulated by the miR - 26a targeting of the SMAD1 transcription factor [J]. J Bone Miner Res, 2008, 23 (2): 287 - 295.
- [30] MIZUNO Y, YAGI K, TOKUZAWA Y, et al. miR - 125b inhibits osteoblastic differentiation by down - regulation of cell proliferation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 368 (2): 267 - 272.
- [31] HUANG J, ZHAO L, XING L, et al. MicroRNA - 204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation [J]. Stem Cells, 2010, 28 (2): 357 - 364.
- [32] ITOH T, NOZAWA Y, AKAO Y. MicroRNA - 141 and - 200a are involved in bone morphogenetic protein - 2 - induced mouse pre-osteoblast differentiation by targeting distal-less homeobox 5 [J]. J Biol Chem, 2009, 284 (29): 19272 - 19279.
- [33] INOSE H, OCHI H, KIMURA A, et al. A microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106 (49): 20794 - 20799.
- [34] KAHAI S, LEE SC, LEE DY, et al. MicroRNA miR - 378 regulates nephronectin expression modulating osteoblast differentiation by targeting GalNT - 7 [J]. PLoS One, 2009, 4 (10): e7535.
- [35] KAPINAS K, KESSLER CB, DELANY AM. miR - 29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling [J]. J Cell Biochem, 2009, 108 (1): 216 - 224.
- [36] WANG T, XU Z. miR - 27 promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 402 (2): 186 - 189.
- [37] LI H, XIE H, LIU W, et al. A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans [J]. J Clin Invest, 2009, 119 (12): 3666 - 3677.
- [38] MIZUNO Y, TOKUZAWA Y, NINOMIYA Y, et al. miR - 210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b [J]. FEBS Lett, 2009, 583 (13): 2263 - 2268.
- [39] 梁文娜, 李西海, 李灿东. 绝经后骨质疏松的核心病机——骨痿 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35 (18): 5333 - 5335.
- [40] 梁文娜, 李西海, 李灿东, 等. 骨免疫与绝经后骨质疏松妇女骨重建失衡 [J]. 国际骨科学杂志, 2012, 33 (2): 103 - 105.
- [41] LI Y, LIANG W, LI X, et al. Effect of serum from postmenopausal women with osteoporosis exhibiting the Kidney - Yang deficiency pattern on bone formation in an hFOB 1. 19 human osteoblastic cell line [J]. Exp Ther Med, 2015, 10 (3): 1089 - 1095.

(2017-08-09 收稿 2017-08-21 修回)

(上接第 52 页)

- [22] 隋世燕, 吕则刚. 实验兔动脉粥样硬化动物模型研究进展 [J]. 中国畜禽种业, 2009, 5 (4): 142 - 144.
- [23] 李万江, 彭礼清, 李真林. 多层螺旋 CT 在评价颈动脉斑块特征中的价值 [J]. 华西医学, 2012, 27 (9): 1354 - 1357.
- [24] CHEN S, LOU H, GUO L, et al. 3 - D finite element model-

ing of facial soft tissue and preliminary application in orthodontics [J]. Comput Methods Biomech Biomed Engin, 2012, 15 (3): 255 - 261.

- [25] 金龙, 乔爱科. 颈动脉易损斑块的生物力学机制和破裂风险评价指标 [J]. 医用生物力学, 2016, 31 (1): 89 - 94.

(2017-06-26 收稿 2017-07-24 修回)