

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2022.06.002

· 基础研究 ·

环状RNA CDR1as促进小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化和成血管相关基因表达

杨玮哲¹, 韩祥祯¹, 郑美洁¹, 周琦琪¹, 何惠宇^{1,2}

1. 新疆医科大学第一附属医院(附属口腔医院)口腔修复科,新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐(830054); 2. 新疆维吾尔自治区口腔医学研究所,新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐(830011)

【摘要】 目的 探讨环状RNA小脑变性相关蛋白1的反义转录物(antisense to the cerebellar degeneration-related protein 1 transcript, CDR1as)在Balb/C小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)中过表达与低表达后对其成骨和成血管相关基因的影响。方法 体外培养及鉴定BMSCs,将含过表达与沉默circRNA CDR1as基因的慢病毒(lentiviruses, LV)载体及对照组慢病毒分别转染至小鼠BMSCs并筛选稳定的细胞株,分为circRNA CDR1as过表达组、过表达对照组、circRNA CDR1as低表达组和低表达对照组。各组成骨诱导14、21 d后分别进行茜素红染色和碱性磷酸酶染色;qRT-PCR检测目的基因circRNA CDR1as、成骨分化特异标志物碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、Runt相关基因2(runt-related transcription factor 2, RUNX2)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、骨桥素(osteopontin, OPN)、锌指结构转录因子(osterix, OSX)、I型胶原蛋白(collagen-I, COL-1),以及成血管特异标志物血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管生成素-1(angiogenin-1, Ang-1)的mRNA表达水平。结果 茜素红和ALP染色均显示:过表达实验组钙沉淀和ALP染色区域多于过表达对照组;而低表达实验组钙沉淀和ALP染色区域少于低表达对照组,随着成骨诱导天数的增加,各组的钙沉淀和ALP染色面积也增大。qRT-PCR结果显示:过表达实验组BMSCs中circRNA CDR1as、ALP、RUNX2、OCN、OPN、OSX、COL-1、VEGF和Ang-1的mRNA表达水平显著升高($P < 0.001$);低表达实验组BMSCs中circRNA CDR1as、ALP、RUNX2、OCN、OPN、OSX、COL-1、VEGF和Ang-1的mRNA表达水平显著降低($P < 0.001$)。结论 过表达circRNA CDR1as基因可促进BMSCs的成骨分化及血管生成的能力;低表达circRNA CDR1as基因可抑制BMSCs的成骨分化及血管生成的能力。

【关键词】 骨; 环状RNA CDR1as; 基因沉默; 小鼠骨髓间充质干细胞; Runt相关基因2; I型胶原蛋白; 血管内皮生长因子; 成骨分化; 骨组织工程

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2022)06-0390-08

【引用著录格式】 杨玮哲, 韩祥祯, 郑美洁, 等. 环状RNA CDR1as促进小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化和成血管相关基因表达[J]. 口腔疾病防治, 2022, 30(6): 390-397. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2022.06.002.

CircularRNA CDR1as promotes osteogenic differentiation and angiogenesis related genes expression in mouse bone marrow mesenchymal stem cells YANG Weizhe¹, HAN Xiangzhen¹, ZHENG Meijie¹, ZHOU Qiqi¹, HE Huiyu^{1,2}.

1. Department of Prosthodontics, the First Affiliated Hospital (Affiliated Stomatological Hospital) of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2. Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute of Stomatology, Urumqi 830011, China

Corresponding author: HE Huiyu, Email: hehuiyu01@126.com, Tel: 86-991-4362225

【Abstract】 Objective To investigate the effects of over expression and low expression of antisense transcripts of circular RNA cerebellar degeneration associated protein 1 (CDR1as) in Balb/C mouse bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on factors related to osteogenesis and angiogenesis. **Methods** BMSCs were cultured and identified *in vi-*



微信公众号

【收稿日期】 2021-09-27; **【修回日期】** 2022-02-29

【基金项目】 新疆维吾尔自治区科技支疆项目(2020E02133)

【作者简介】 杨玮哲, 住院医师, 硕士研究生, Email: 1520656068@qq.com

【通信作者】 何惠宇, 主任医师, 博士, Email: hehuiyu01@126.com, Tel: 86-991-4362225

tro. The lentiviral (LV) vector containing the overexpressed and silenced circRNA CDR1as genes and the control lentivirus were respectively transfected into mouse BMSCs, and stable cell lines were screened. The cells were divided into the circRNACDR1as over expression group and the over expression control group, and the CircRNACDR1as low expression group and the low expression control group. The components were stained with Alizarin Red S and alkaline phosphatase after 14 and 21 days of osteoinduction; qRT-PCR was used to detect the target genes circRNA CDR1as, osteogenic differentiation markers alkaline phosphatase (ALP), runt-related transcription factor 2 (RUNX2), osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN), osterix(Osx), collagen I (COL-1), and the mRNA expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenin-1 (Ang-1). **Results** The results of alizarin red staining and alkaline phosphatase staining showed that the extracellular matrix calcium precipitation and ALP staining area of the over expression experimental group was greater than its control group, and those of the low expression experimental group was less than its control group. As the number of days of osteogenic induction increased, the calcium precipitation and ALP staining in each group also increased. RT-PCR results showed that the mRNA expression levels of circRNA CDR1as, ALP, RUNX2, OCN, OPN, OSX, COL-1, VEGF and Ang-1 in the over expression experimental group BMSCs were significantly increased ($P < 0.001$). In the low expression experimental group, the mRNA expression levels of circRNA CDR1as, ALP, RUNX2, OCN, OPN, OSX, COL-1, VEGF and Ang-1 in BMSCs were significantly reduced ($P < 0.001$). **Conclusion** Over expression of the circRNA CDR1as gene promotes the osteogenic differentiation and angiogenesis of BMSCs. Low expression of the circRNA CDR1as gene inhibits the osteogenic differentiation and angiogenesis of BMSCs.

【Key words】 bone; CircularRNA CDR1as; gene silencing; mouse bone marrow mesenchymal stem cells; runt-related transcription factor 2; collagen-I; vascular endothelial growth factor; osteogenic differentiation; bone tissue engineering

J Prev Treat Stomatol Dis, 2022, 30(6): 390-397.

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from Xinjiang Uygur Autonomous Region Science and Technology Support Project (No.2020E02133).

颌骨缺损是口腔临床治疗中的常见疾病,研究发现相较于常规使用的骨移植物和纯生物材料支架,携带生长因子的细胞复合支架材料,能够更好地诱导骨组织再生^[1]。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)经不同的刺激或诱导后可分化为成骨细胞、脂肪细胞等,因此BMSCs在骨组织工程中经常作为种子细胞被用于相应研究^[2]。课题组前期将miRNA-378a以慢病毒载体的形式转入BMSCs中研究其成骨及成血管性能,验证了骨髓间质干细胞为良好的种子细胞^[3]。环状RNA(circular RNA, circRNA)小脑变性相关蛋白1的反义转录物(anti-sense to the cerebellar degeneration-related protein 1 transcript, CDR1as),是一种特殊的非编码RNA,在骨组织修复中起到调控作用^[4]。研究发现在股骨头坏死患者中,circRNA CDR1as通过circRNA-miR-7-5p-Wnt5B通路在BMSCs的成脂/成骨分化中发挥关键作用^[5]。本实验将过表达与低表达的circRNA CDR1as慢病毒转染至小鼠BMSCs,检测BMSCs中相关成骨、成血管因子的表达水平,以探究circRNA CDR1as对BMSCs成骨及成血管作用的影响,并判断其能否为后期修复骨缺损奠定实验基础。

circRNA CDR1as对BMSCs成骨及成血管作用的影响,并判断其能否为后期修复骨缺损奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及仪器

4周龄SPF级Balb/C小鼠,雌雄不限,15~25g,购于新疆医科大学动物实验中心,许可证号:SCXK(新)2016-0003,实验经新疆医科大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准(动物伦理审核项目编号:IACUC20170706-04)。

低糖DMEM培养基(Gibco,美国);胎牛血清(Gibco,美国);Balb/C小鼠BMSCs成骨诱导分化培养基(Cyagen,中国);实时定量PCR引物合成(上海生物工程公司,中国);反转录试剂盒(Takara,日本);Real-Time PCR试剂盒(Takara,日本);增强型CCK-8(Bioss,北京);荧光定量PCR仪(QuantStudio™ 6Flex, Thermo, 美国);流式细胞仪(BD facsaria, 美国);高速离心机(5810R, Eppendorf, 德国);酶标仪(Thermo, 美国);激光共聚焦显微镜(Olympus, 日本);倒置相差显微镜(莱卡, 德国)。CCK-8

试剂盒(Bioss,中国),茜素红(北京索莱宝公司,中国),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)(北京索莱宝公司,中国),慢病毒(上海吉凯基因科技有限公司,中国)。

过表达 circRNA CDR1as 慢病毒来自 circbase 数据库的 mmu_circ_0001878 过表达的序列,使用的载体元件顺序:CMV-circRNA-EF1-ZsGreen1-T2A-puromycin,过表达阴性对照组的载体元件顺序 MV-circRNA-EF1-ZsGreen1-T2A-puromycin,是一个空载体。

低表达组和低表达对照组,使用的载体元件顺序 hU6-MCS-Ubiquitin-EGFP-IRES-puromycin,低表达 circRNA CDR1as 慢病毒靶点序列 1:5'-TCTGCCGTATCC AGGGTTT-3',低表达 circRNA CDR1as 慢病毒靶点序列 2:5'-TATCCAGGTTTCCAGTGG-3';低表达对照组序列:5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。

1.2 方法

1.2.1 细胞的分离培养与鉴定 麻醉 Balb/C 小鼠后颈椎脱臼处死,75%乙醇溶液浸泡 5 min,无菌条件下分离肱骨和股骨,剪去两端干骺端,用低糖 DMEM 完全培养基(含 10%胎牛血清、0.5%链霉素、0.5%青霉素及 1%谷氨酰胺)冲出骨髓,离心(5 min,1 000 r/min,22 ℃)后加入完全培养基重悬细胞于培养瓶中,置入恒温培养箱,每 72 h 换液,待细胞密度长至 85%~90%时,0.25%胰酶消化传代。取第 3 代 BMSCs 加入特异性表达抗体 CD29 和 CD31 上流式细胞仪检测。

1.2.2 慢病毒转染 BMSCs 将 3 代 BMSCs 按细胞密度为 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板,细胞长至 60%左右时,根据说明书确定转染时病毒滴度,按照转染慢病毒载体的不同分为 circRNA CDR1as 过表达组(过表达实验组)和 circRNA CDR1as 低表达组(低表达实验组)以及分别相对应的阴性对照组,每孔转染液体总量 1 mL,放入培养箱中,24 h 后换液,2 mL/孔培养基继续培养,荧光显微镜观察 72~96 h 转染情况。

1.2.3 流式细胞术检测转染效率 各组细胞培养 72 h 后,胰酶消化收集细胞,流式检测各组慢病毒载体转染后增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)表达效率。同时将各组细胞收集后按照 1×10^5 个/mL 的细胞密度分别接种到激光共聚焦小皿培养 24 h,共聚焦显微镜观察 EGFP 荧光数量。

1.2.4 CCK-8 检测细胞毒性 各组 BMSCs 转染 72 h 后,按照 1 000 个/孔的细胞密度接种至 96 孔板,培养 24 h 后,弃去原培养基,每孔加入 10 μ L CCK-8 液孵育,2 h 后测 OD_{450 nm} 值,每隔 24 h 检测 1 次,连续测 10 d,检测病毒转染后对 BMSCs 增殖的影响。

1.2.5 茜素红染色 各组 BMSCs 转染 72 h 后,加入成骨诱导液,成骨诱导 14、21 d 后染色。多聚甲醛固定,超纯水洗涤,茜素红染液染色,超纯水洗涤,倒置相差显微镜下观察钙结节区域。

1.2.6 碱性磷酸酶染色 各组 BMSCs 转染 72 h 后,成骨诱导 14、21 d 后染色。2 mL 4%多聚甲醛固 30 min,蒸馏水洗 3 遍,按比例加入碱性磷酸酶染色液,避光孵育 20~30 min,直至显色至预期深浅,蒸馏水洗 2 遍,倒置相差显微镜下观察钙沉淀区域。

1.2.7 qRT-PCR 检测成骨成血管相关基因表达 BMSCs 转染 72 h 后,Trizol 法提取各组总 RNA,测量浓度与纯度。使用 Takara 逆转录试剂盒两步法将 RNA 逆转为 cDNA,以 20 μ L 体系进行 qRT-PCR,反应条件:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s,40 个循环。检测各组 circRNA CDR1as 基因,成骨分化特异标志物 ALP、Runt 相关基因 2(runt-related transcription factor 2, RUNX2)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、骨桥素(osteopontin, OPN)、锌指结构转录因子(osterix, OSX)、I 型胶原蛋白(collagen-I, COL-1),以及成血管特异标志物血管内皮生长因子(vascular endothelial grown factor, VEGF)、血管生成素-1(angiotensin-1, Ang-1)的 mRNA 表达水平,实验至少重复 3 次。qRT-PCR 所用引物见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列
Table 1 Primers sequences of RT-PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')
GAPDH	F: AAGGTCGGAGTCAACGGATTT
	R: GGTTCACGCCCATCACAAA
circRNACDR1as	F: TTTCTGGTGTCTGCCGTATC
	R: GGAAGATCACGATTGTCTGGAA
ALP	F: GGTGGGTACTCATTGGCATAG
	R: GTTGGTGTGTACGTCTTGGGA
RUNX2	F: CAGACCAGCACACTCCATA
	R: CAGCGTCAACACCATCATTC
OCN	F: GCTGTGGCCGCACTCTGC
	R: AGAGTGGGGCTGGCCGCTC
OPN	F: CCCATCTCAGAAGCAGAATCTT
	R: GTCATGGCTTTCATTGGAGTTG

续表

OSX	F: AGAAGCCATACACTGACCTTTC R: GGTGGGTAGTCATTGGCATAG
COL-1	F: TGGGGCAAGACAGTGATCG R: GGAGGGAGTTTACAGGAAGCAG
VEGF	F: ACATCTTCAAGCCGTCCTGTGTGC R: AAATGGCGAATCCAGTCCCACGAG
Ang-1	F: GACACCTTGAAGGAGGAGAAAG R: GTGTCCATGAGCTCCAGTTGT

circRNA CDR1as: circular RNA antisense to the cerebellar degeneration-related protein1 transcript; ALP: alkaline phosphatase; RUNX2: runt-related transcription factor 2; OCN: osteocalcin; OPN: osteopontin; OSX: osterix; COL-1: collagen-I; VEGF: vascular endothelial growth factor; Ang-1: angiogenin-1

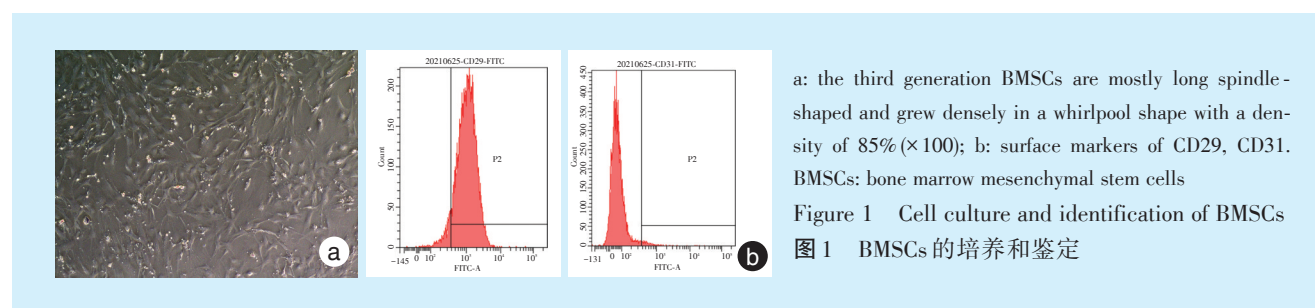
1.3 统计学分析

实验数据使用统计学软件 SPSS 25.0 进行分析,符合正态性,选用两独立样本 *t* 检验,各组基因的表达量通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算,实验数据以表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,统计图使用 GraphPad Prism 软件绘制。

2 结果

2.1 BMSCs 培养及鉴定

生长良好的3代细胞多为长梭状,生长密集呈旋涡状;流式细胞术检测细胞表面特异性抗体 CD29 阳性表达(93.1%),而 CD31 阴性表达(2.4%),符合 BMSCs 的表型特点(图1)。



a: the third generation BMSCs are mostly long spindle-shaped and grew densely in a whirlpool shape with a density of 85% ($\times 100$); b: surface markers of CD29, CD31. BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells

Figure 1 Cell culture and identification of BMSCs
图1 BMSCs 的培养和鉴定

2.2 BMSCs 转染效率

各组细胞转染 72 h 后,采用激光共聚焦显微镜观察携带 EGFP 绿色荧光的细胞,DAPI 染色后细胞核镜下呈蓝色荧光;明场图观察细胞数量,各组细胞转染率无明显差异;使用流式细胞仪检测 EGFP 表达效率,过表达实验组转染率为 88.7%,过表达对照组为 77.3%;低表达实验组转染率为 81.9%,低表达对照组为 68.8%,四组转染率差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图2)。

2.3 CCK-8 细胞毒性检测

根据所测 OD 值,绘制 4 组细胞生长曲线图,类似“S”形,4 组细胞 1 d、2 d 增殖速率较缓和,各组细胞增殖活性无统计学差异 ($P > 0.05$),7 d 时增至最高,8 d 时细胞增殖速率开始减缓;3 ~ 10 d,过表达实验组细胞增殖活性高于过表达对照组 ($P < 0.05$),而低表达实验组细胞增殖活性低于低表达对照组 ($P < 0.05$) (图3)。

2.4 茜素红染色结果

随着成骨诱导天数的延长,每组红色钙结节数量相应增多,由单一钙结节变为团块状钙结节。同一时间段内,过表达实验组红色钙化区域大于过表达对照组;而低表达实验组红色钙化区

域少于其对照组(图4)。

2.5 ALP 染色结果

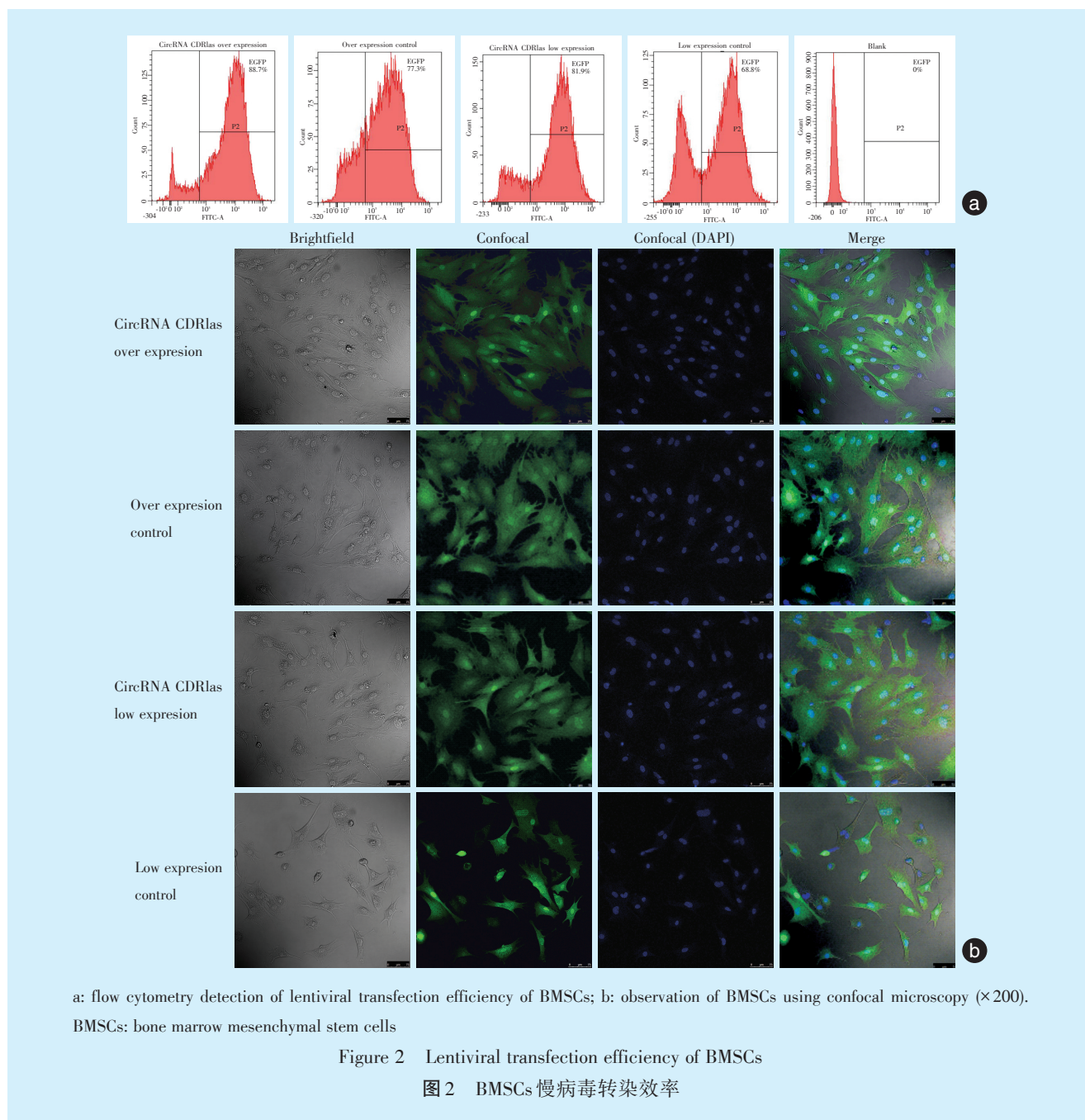
过表达实验组 ALP 染色面积多于过表达对照组,而低表达实验组 ALP 染色面积少于其对照组,随着成骨诱导天数的增加,各组的 ALP 染色面积逐渐增大(图5)。

2.6 各组成骨及成血管相关基因 mRNA 表达

circRNA CDR1as 的 mRNA 表达水平,在低表达实验组中 circRNA CDR1as 的表达显著降低 ($P < 0.001$),在过表达实验组中显著增高 ($P < 0.001$)。RUNX2、ALP、VEGF、Ang-1、OSX、COL-1、OCN 和 OPN 的 mRNA 表达水平在过表达实验组中高于其对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.001$); RUNX2、ALP、VEGF、Ang-1、OSX、COL-1、OCN 和 OPN 的 mRNA 表达水平在低表达实验组中低于其对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.001$) (图6)。

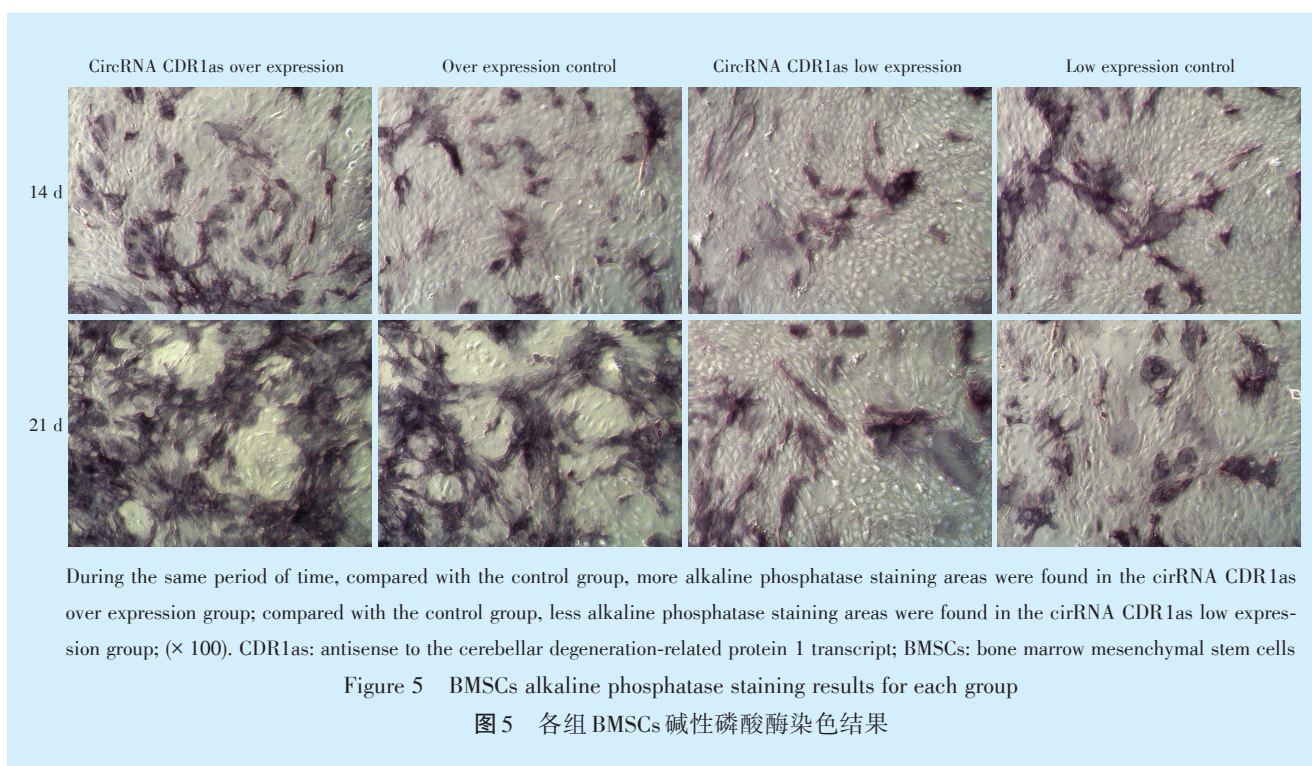
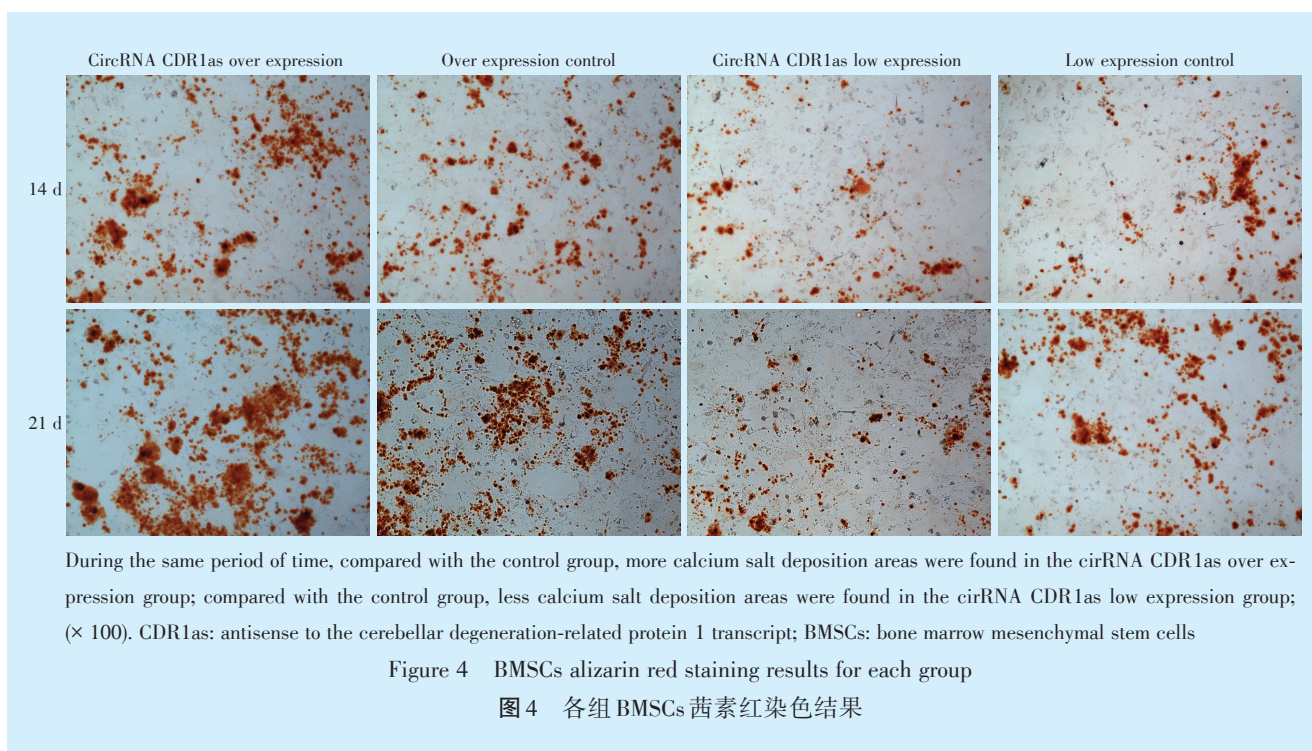
3 讨论

近年在组织工程骨的研究中,circRNA 为骨组织疾病及干细胞成骨分化方面注入了新的“血液”^[6]。研究发现,在人类和小鼠的神经元细胞中,circRNA CDR1as 被微小 RNA (microRNA, miRNA)-



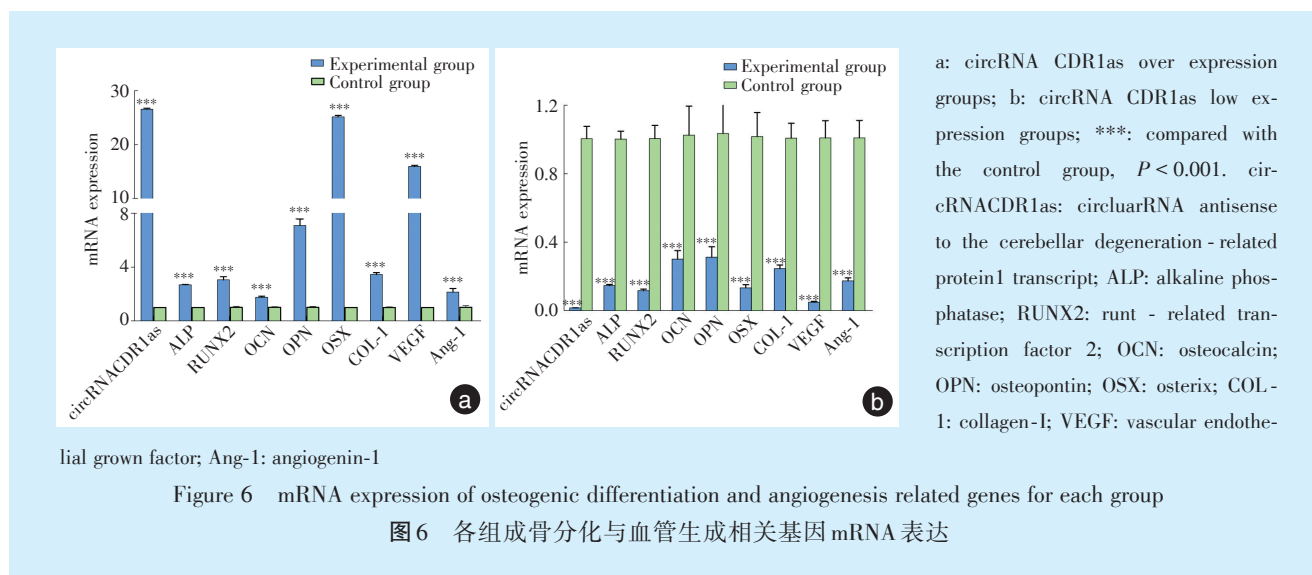
7 和 miRNA-671 所调控,两者通过敲除 circRNA CDR1as 的基因片段而对细胞发挥不同的刺激作

用^[7]。本实验通过以慢病毒载体的方式,转染 circRNA CDR1as 至小鼠 BMSCs 中以检测 circRNA



CDR1as对骨髓干细胞成骨和成血管基因表达的影响,为后期转染过 circRNA CDR1as 的 BMSCs 膜片包裹生物支架材料修复骨缺损奠定实验基础,以探索 circRNA CDR1as 在骨组织工程中的研究价值。本研究中,分别将过表达与低表达 circRNA CDR1as 基因和空载慢病毒转染至 BMSCs 中,通过

流式细胞术检测各组的转染效率,四组转染效率无统计学差异。激光共聚焦显微镜观察到 BMSCs 转染 72 h 后,细胞贴壁生长且形态规则,呈扁梭角形且触角短小,由此可知慢病毒对细胞的形态无明显影响。同时 CCK-8 生长曲线结果显示, circRNA CDR1as 过表达实验组细胞增殖率 3 ~ 10 d



高于其对照组,而 circRNA CDR1as 低表达实验组细胞增殖率 3~10 d 低于其对照组,提示过表达 circRNA CDR1as 可促进 BMSCs 增殖,而低表达 circRNA CDR1as 可抑制 BMSCs 增殖。

骨缺损修复的过程中往往伴随着成骨和成血管因子的基因变化,课题组前期左新慧等^[8]通过在 BMSCs 中过表达与低表达低氧诱导因子,发现了相关成骨和成血管基因的不同表达水平。Peng 等^[9]的研究指出,在上颌窦膜干细胞的成骨分化期间,OSX 的 mRNA 表达水平随着 circRNA_33287 的过表达或沉默而增加或降低。Xu 等^[10]在骨质疏松症患者中构建了 circRNA_0011269-miRNA 靶标结合的网络,并在该网络中探寻到 miR-122;利用双荧光素酶报告验证了 miR-122 与 circRNA_0011269/RUNX2 的靶向关系;并证实 circRNA_0011269 的过表达可以促进 RUNX2 的表达并抑制骨质疏松症。ALP 和 RUNX2 是成骨细胞的早期标志物,反映了成骨细胞的分化能力,同时可以将 BMSCs 的相关成骨基因进行定向分化、转录和翻译^[11-12]。本实验结果显示当过表达或低表达 circRNA CDR1as 作用于 BMSCs 时,ALP 和 RUNX2 的 mRNA 的表达水平分别呈升高和下降趋势。OCN 是细胞骨向分化的晚期标志物,能灵敏反映成骨细胞活性和骨转换状况^[13]。OPN 广泛存在于骨细胞中,充当催化剂作用,加速类骨质的矿化和成骨细胞的形成^[14]。OSX 是一种特殊的成骨分化转录因子,其特殊性是只在骨组织细胞中表达,是骨形成所必需的相关因子^[15]。COL-1 由成骨细胞分泌,在成骨细胞早期形成阶段表现活跃,其表达活性持续至骨成熟

阶段^[16]。本实验 OCN、OPN、OSX、COL-1 的 mRNA 表达水平过表达组呈增高趋势,而低表达组呈下降趋势,提示过表达 circRNA CDR1as 促进 BMSCs 的成骨分化。VEGF 可促进血管内皮细胞增生和新生血管形成,是成血管的关键指标^[17]。Ang-1 在吸引血管周细胞、促进血管重塑和成熟等方面具有重要作用,可进一步增强内皮细胞屏障的完整性^[18]。本实验中,成血管标志物 VEGF、Ang-1 随着 circRNA CDR1as 的过表达和低表达而分别增高和降低,提示当过表达或低表达 circRNA CDR1as 作用于 BMSCs 时,可以调节 BMSCs 中的成骨-血管生成耦联过程。Li 等^[19]发现当过表达或敲低 circRNA CDR1as 作用于牙周膜干细胞时,观察到过表达的 circRNA CDR1as 促进成骨细胞分化,而敲低的 circRNA CDR1as 抑制了 ALP 的活性和成骨基因的表达,以及 ALP 和茜素红矿物沉积的减少,证实了 circRNA CDR1as 参与了牙周膜干细胞成骨分化的调节。本实验中,对各组的茜素红染色和 ALP 染色结果证明了 circRNA CDR1as 对 BMSCs 的成骨分化具有调节作用。

综上所述,本实验通过构建慢病毒载体的方式,将过表达和低表达的 circRNA CDR1as 转染至 BMSCs 中,证实了 circRNA CDR1as 对 BMSCs 的成骨及成血管基因起到一定的调控作用,为 circRNA 结合干细胞修复骨缺损提供了新思路。但本实验仅限于体外细胞学实验,后期将复合生物支架进行动物回植实验,进一步证实 circRNA CDR1as 在体内的成骨及成血管的能力,以期更好的使其应用于组织工程中。

【Author contributions】 Yang WZ performed the experiments and wrote the article. Zheng MJ performed the experiments. Han XZ and Zhou QQ revised the article. He HY designed the study and reviewed the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- [1] Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE, et al. Bone regeneration strategies: engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives[J]. *Biomaterials*, 2018, 180(11): 143-162. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.017.
- [2] Yusop N, Battersby P, Alraies A, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow and the endosteal niche: a comparative study[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 22(3): 6869128. doi: 10.1155/2018/6869128.
- [3] 李君, 左新慧, 刘小元, 等. 过表达 miR-378a 可影响骨髓间充质干细胞膜片成骨及成血管分化的能力[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(31): 4939-4944. doi: CNKI: SUN: XDKF.0.2021-31-006.
Li J, Zuo XH, Liu XY, et al. Effect of over expression of miR-378a on osteogenic and vascular differentiation of bone marrow mesenchymal stem cell sheet[J]. *China's Push Tiss Eng*, 2021, 25(31): 4939-4944. doi: CNKI: SUN: XDKF.0.2021-31-006.
- [4] 陈德龙, 陈鹏, 王粤淇, 等. 环状 RNA 与骨科相关疾病研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(6): 852-857. doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.
Chen DL, Chen P, Wang YQ, et al. Research progress on cyclic RNA and orthopedic-related diseases[J]. *Chin J Osteopor*, 2019, 25(6): 852-857. doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.
- [5] Chen G, Wang Q, Li Z, et al. Circular RNA CDR1as promotes adipogenic and suppresses osteogenic differentiation of BMSCs in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Bone*, 2020, 133(4): 115258. doi: 10.1016/j.bone.2020.115258.
- [6] 王欣, 王兴. circRNAs 在成骨细胞分化中的调控作用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(2): 336-341. doi: 10.11844/cjcb.2020.02.0019.
Wang X, Wang X. The regulatory role of circRNAs in osteoblast differentiation[J]. *Chin J Cell Biol*, 2020, 42(2): 336-341. doi: CNKI: SUN: XBZZ.0.2020.02.019.
- [7] Piwecka M, Glazar P, Hernandez-Miranda LR, et al. Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function[J]. *Science*, 2017, 357(6357): 1254. doi: 10.1126/science.aam8526.
- [8] 左新慧, 李君, 韩祥祯, 等. 低氧诱导因子-1 α 对骨髓间充质干细胞成骨分化与血管生成相关因子的影响[J]. *口腔疾病防治*, 2021, 29(7): 449-455. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.07.003.
Zuo XH, Li J, Han XZ, et al. Effects of hypoxia-inducible factor-1 α on factors related to osteogenic differentiation and angiogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *J Prev Treat Stom Dis*, 2021, 29(7): 449-455. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.07.003.
- [9] Peng W, Zhu SX, Chen JL, et al. Hsa_circRNA_33287 promotes the osteogenic differentiation of maxillary sinus membrane stem cells *via* miR-214-3p/Runx3[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109(1): 1709-1717. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.159.
- [10] Xu X, Chen Y, Tan B, et al. Circular RNA circ_0011269 sponges miR-122 to regulate RUNX2 expression and promotes osteoporosis progression[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 3(7): 29709. doi: 10.1002/jcb.29709.
- [11] Yu RH, Zhang XY, Xu W, et al. Apolipoprotein D alleviates glucocorticoid-induced osteogenesis suppression in bone marrow mesenchymal stem cells *via* the PI3K/Akt pathway[J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1): 307. doi: 10.1186/s13018-020-01824-1.
- [12] Komori T. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7): 1694. doi: 10.3390/ijms20071694.
- [13] Li J, Zhang H, Yang C, et al. An overview of osteocalcin progress [J]. *J Bone Miner Metab*, 2016, 34(4): 367-379. doi: 10.1007/s00774-015-0734-7.
- [14] Carvalho MS, Silva JC, Hoff CM, et al. Loss and rescue of osteocalcin and osteopontin modulate osteogenic and angiogenic features of mesenchymal stem/stromal cells[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(10): 7496-7515. doi: 10.1002/jcp.29653.
- [15] Gao Y, Xiao F, Wang C, et al. Long noncoding RNA MALAT1 promotes osterix expression to regulate osteogenic differentiation by targeting miRNA-143 in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(8): 6986-6996. doi: 10.1002/jcb.26907.
- [16] 夏欣一, 崔英霞, 杨滨, 等. I 型胶原基因突变与成骨不全研究进展[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2009, 17(5): 12-13, 8. doi: CNKI: SUN: ZYYA.0.2009-05-005.
Xia XY, Cui YX, Yang B, et al. Research progress of type I collagen gene mutation and osteogenesis imperfecta[J]. *Chin J Birth Health Heredity*, 2009, 17(5): 12-13, 8. doi: CNKI: SUN: ZYYA.0.2009-05-005.
- [17] Bai Y, Bai L, Zhou J, et al. Sequential delivery of VEGF, FGF-2 and PDGF from the polymeric system enhance HUVECs angiogenesis *in vitro* and CAM angiogenesis[J]. *Cell Immunol*, 2018, 323(1): 19-32. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.10.008.
- [18] Zhang H, Yuan YL, Wang Z, et al. Sequential, timely and controlled expression of hVEGF165 and Ang-1 effectively improves functional angiogenesis and cardiac function *in vivo*[J]. *Gene Ther*, 2013, 20(9): 893-900. doi: 10.1038/gt.2013.12.
- [19] Li X, Zheng Y, Zheng Y, et al. Circular RNA CDR1as regulates osteoblastic differentiation of periodontal ligament stem cells *via* the miR-7/GDF5/SMAD and p38 MAPK signaling pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 232. doi: 10.1186/s13287-018-0976-0.

(编辑 张琳, 韩倩倩)



官网