

二甲双胍通过差异表达microRNAs促进人骨髓间充质干细胞成骨分化

蒋华生¹, 梁沛杰¹, 刘智彬¹, 洪冠豪¹, 杨树凯², 魏波², 王家丰^{1*} (广东医科大学附属医院 1. 干细胞研发与临床转化中心; 2. 骨科中心, 广东湛江 524001)

摘要: 目的 探讨差异表达miRNAs在二甲双胍(MF)促进人骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨分化中的作用。方法 使用0、0.5、1、2 mmol/L MF处理BMSCs,用CCK8、茜素红染色法检测BMSCs增殖活性、成骨作用,高通量测序、RT-qPCR分别检测miRNAs差异表达及成骨相关基因表达。结果 0.5、1、2 mmol/L MF处理BMSCs 72 h后细胞活力、成骨分化明显增加($P<0.05$)。1 mmol MF处理7、14 d后miR-7110-3p、miR-4632-3p、miR-933表达下降($P<0.05$),而miR-6885-3p、miR-542-3P仅在14 d表达下降($P<0.05$)。RT-qPCR显示成骨相关关键基因BMP7、BMP10、RUNX2、OPN基因在MF处理后14 d上调($P<0.05$),而脂质代谢相关基因HMGCR处理后7 d下调($P<0.05$)。结论 MF可能在转录后水平通过miRNAs调控成骨相关通路,从而影响BMSCs成骨分化过程。

关键词: 二甲双胍; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 微小RNA

中图分类号: R 394.2

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2022) 04-0368-06

Metformin promotes osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells by differentially expressed microRNAs

JIANG Hua-sheng¹, LIANG Pei-jie¹, LIU Zhi-bin¹, HONG Guan-hao¹, YANG Shu-kai², WEI Bo², WANG Jia-feng^{1*} (1. Stem Cell Research and Clinical Transformation Center; 2. Orthopaedic Center; Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: Objective To investigate the role of differentially expressed miRNAs in metformin (MF)-induced osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs). Methods After treated with 0, 0.5, 1, 2 mmol/L MF, proliferation, osteogenesis, differentially expressed miRNAs, and osteogenesis-related genes of hBMSCs were detected by CCK8, alizarin red stain, high-throughput sequencing, and RT-qPCR, respectively. Results Cell viability and osteogenesis increased after 72 h treatment of 0.5, 1, 2 mmol/L MF ($P<0.05$). Expression of miR-7110-3p, miR-4632-3p and miR-933 decreased following 1 mmol/L MF treatment for 7 d and 14 d ($P<0.05$), while that of miR-6885-3p and miR-542-3P reduced only at 14 d ($P<0.05$). RT-qPCR showed that osteogenesis-related key genes including BMP7, BMP10, RUNX2 and OPN up-regulated after MF treatment for 14 days ($P<0.05$), while lipid metabolism-related gene HMGCR down-regulated at 7 d ($P<0.05$). Conclusion MF may regulate osteogenesis-related pathways through miRNAs at post-transcription level, and then affect osteogenic differentiation of hBMSCs.

Key words: metformin; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; miRNAs

骨质疏松症(OP)是一种常见的慢性代谢性骨骼疾病,其特征是骨量减少,骨组织微结构破坏及恶化,导致脆性增强,骨折风险增加^[1]。人口老龄化和生活方式的改变使骨质疏松症成为世界范围内的一个主要公共卫生问题。现有数据显示,中国大陆所有成年人的骨质疏松症患病率约为7%,城市地区约为

10%~20%,50岁及以上男性、女性分别约为22.5%、40.1%^[2]。目前,骨质疏松症已成为21世纪五大疾病之一,其所引发的并发症发生率明显上升,致残率、病死率也随之增加。临床研究发现长期服用二甲双胍(MF)的2型糖尿病患者骨质疏松症状有明显改善^[3]。同时,体外研究发现MF可通过多条信号通路促进骨髓间充

收稿日期: 2021-08-10

基金项目: 广东省医学自然科学基金(A2020376),湛江市科技计划项目(2019A01011, 2019A01032, 2020B010637),广东医科大学科研基金(GDMUM2020004),广东省攀登计划项目(Pdjh2020b0258)

作者简介: 蒋华生(1995-),男,硕士,医师, E-mail: 526518269@qq.com

通信作者: 王家丰(1983-),男,博士,副研究员, E-mail: wangjiafeng_gz@163.com

质基质细胞和成骨前细胞系的增殖和成骨分化,具有明确的促成骨作用^[4]。然而MF促进成骨分化的具体机制目前尚未完全明确。目前对于MF引起与成骨分化相关miRNAs研究甚少。本研究意在探讨MF处理人BMSCs后miRNAs表达的变化及其促进BMSCs成骨分化的作用,为利用MF改造BMSCs治疗骨质疏松治疗等骨代谢疾病的治疗提供理论依据与技术手段。

1 材料与方法

1.1 实验样本

收集2017-2019年广东医科大学附属第一医院骨科20~25岁患者手术骨髓样本(广东医科大学附属第一医院伦理委员会批准,患者本人签订知情同意书)。

1.2 主要实验试剂

单核细胞分离液(Sigma) α -MEM培养液、胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素-链霉素溶液、磷酸盐缓冲液(Gibco公司,美国),二甲双胍(Sigma公司,美国),成骨诱导完全培养液、成脂诱导完全培养液、油红O染色液(中国广州铂晋生物科技有限公司),茜素红S染色液(中国索莱宝生物科技有限公司),CCK-8试剂盒(DOJINDO公司,日本)。

1.3 方法

1.3.1 骨髓间充质干细胞分离培养 收集广东医科大学附属第一医院骨科20~25岁患者手术骨髓样本,术前排除骨代谢性疾病、自身免疫性及血液系统疾病等。术中取注射器抽吸骨髓,于生物安全柜中把骨髓血移至15 mL离心管中,加入等体积的PBS混匀,混匀后沿管壁缓慢加入另一15 mL离心管内等体积的单细胞分离液。室温400 g离心20 min,离心后液体分4层,吸取第2层内的液体至15 mL离心管内,加入10倍体积的PBS,室温下1 000 g离心3 min,弃上清,加入细胞完全培养液并接种于10 cm培养皿内,置于37 °C、5%CO₂细胞培养箱中培养72 h后更换培养基,随后每3天更换培养基。细胞长满培养皿90%左右,用0.25%胰酶消化细胞后冻存或接种到新的培养皿继续培养。

1.3.2 骨髓间充质干细胞的表面标志物及多向分化鉴定 细胞传代至P3代后,选取生长处于对数期的BMSCs,利用流式细胞仪检测胞表面标志物。操作方法按照试剂盒实验说明书(BD Biosciences公司,美国)。取BMSCs接种于6孔板,完全培养基培养至细胞密度达70%~80%后,更换成骨或成脂诱导培养基诱导培养20 d后,分别用0.2%、pH8.3的茜素红S或60%油红O染色,分别观察钙盐结节及脂滴密度。

1.3.3 二甲双胍处理浓度筛选 取P3代BMSCs细胞接种于96孔板中(5×10^3 cell),待细胞完全贴壁后,使用含不同浓度MF(0、0.5、1、2 mmol/L)的 α -MEM完全培养基,分别处理48、72 h后,CCK-8检测细胞活性差异,每组重复5次。

1.3.4 二甲双胍促进骨髓间充质干细胞成骨分化 取P3代BMSCs细胞接种于12孔板中(1×10^5 cell),待细胞完全贴壁后,更换含不同浓度MF(浓度分别为0、0.5、1、2 mmol/L)的成骨诱导培养基,间隔3 d换液,21 d后茜素红S染色。

1.3.5 高通量测序筛查miRNAs差异表达 取P3代BMSCs细胞接种到10 cm细胞培养皿中,细胞完全贴壁后第1组用成骨诱导培养基培养,另2组在成骨诱导培养基中添加终浓度为1 mmol的MF。分别诱导7、14 d后收取两组细胞提取总RNA,委托广东吉赛生物科技有限公司按照miRNA高通量测序要求建库并进行miRNA转录组测序,分析各组细胞miRNAs表达谱。对比不同分组miRNAs表达量差异,筛选BMSCs成骨分化过程MF处理引起的显著差异表达miRNAs。

1.3.6 RT-qPCR表达验证 根据上述转录组筛选的差异表达miRNAs设计相应的PCR引物,利用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)验证MF处理引起的显著差异表达miRNAs及其成骨分化相关靶基因的转录表达水平。

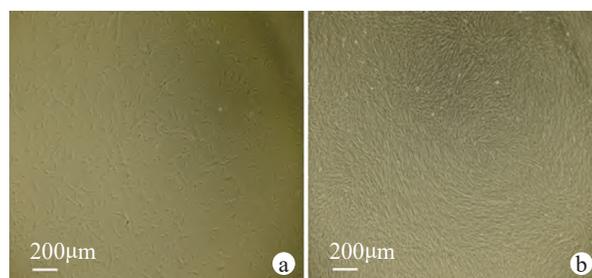
1.4 统计学处理

实验数据资料用GraphPad Prism8.0软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞提取与鉴定

2.1.1 细胞形态 骨髓间充质干细胞呈现多角形或菱形的贴壁生长,培养至P3代,镜下细胞以棱形为主并呈涡旋样生长,形态符合干细胞生长特征,见图1。



a.P1代hBMSCs培养第3天; b.P3代hBMSCs培养第3天

图1 显微镜下BMSCs生长状态(40 \times)

2.1.2 诱导成骨分化 取用P3代BMSCs添加成骨分化诱导培养基,诱导成骨分化21 d镜下可见多个明显的钙盐沉积形成的结节;利用茜素红S染色,发现钙盐结节能够被茜素红S染成亮红色,见图2。

2.1.3 诱导成脂分化 取用P3代BMSCs添加成脂分化诱导培养基,诱导成脂分化28 d镜下可见大多数细胞中分布多个明显的脂质液滴亮点;利用油红O染色,镜下观察发现细胞中脂质液滴被油红O染成规则红色圆形液滴,见图3。

2.1.4 流式鉴定 流式细胞仪检测P3代BMSCs的表面抗原,其中间充质干细胞阳性表达标记(包括CD90、CD105、CD73)表达率分别为98.6%、99.4%、99.9%;而间充质干细胞阴性表达标记(包括CD34、CD45、CD1b等混合)表达率为0.03%,符合间充质干细胞的表面标记,见图4。

2.2 二甲双胍浓度的筛选

在BMSCs培养基中添加0、0.5、1、2 mmol/L浓度MF处理,利用CCK8试剂盒检测细胞活力。与0 mmol/L浓度比较,0.5、1、2 mmol/L MF处理72 h后其细胞活力均高于0 mmol/L MF组($P<0.05$),见图5。

2.3 二甲双胍促进BMSCs成骨分化

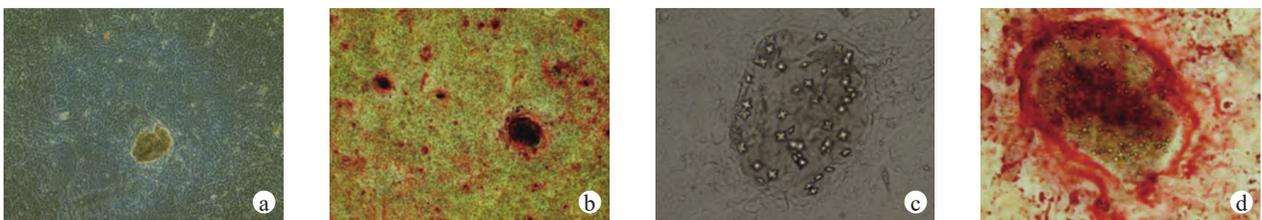
茜素红S染色后观察不同浓度MF处理BMSCs成骨分化钙盐结节的影响,添加低浓度MF处理可以显著促进钙盐结节的生成,但是随着MF浓度的升高,这种促进作用逐渐降低,见图6。

2.4 二甲双胍处理BMSCs后miRNAs差异表达

通过比较MF体外处理BMSCs并诱导成骨分化7、14 d后与空白对照组miRNAs表达谱的差异,筛选出5条显著差异表达miRNA,包括:miR-7110-3p、miR-6885-3p、miR-542-3p、miR-4632-3p以及miR-933。与空白对照组比较,miR-542-3p、miR-4632-3p与miR-933在MF处理7、14 d后的表达量水平显著下降($P<0.05$),miR-6885-3p与miR-542-3p只在14 d的表达量水平显著下降($P<0.05$),见图7。

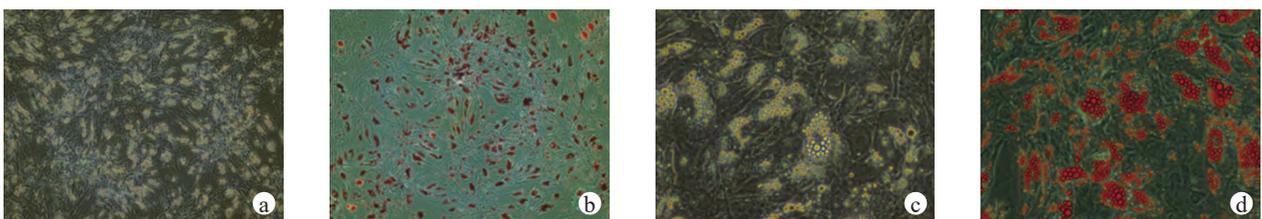
2.5 成骨相关miRNAs靶基因的差异表达

利用RT-qPCR技术检测二甲双胍处理BMSCs后成骨分化相关基因(包括ALP、RUNX2、BMP7、OPN、HMGCR、BMP10)的转录水平差异,发现二甲双胍处理后第3天ALP转录水平空白对照组比较显著升高($P<0.05$),第7天反而下降,与空白对照组无显著差异,



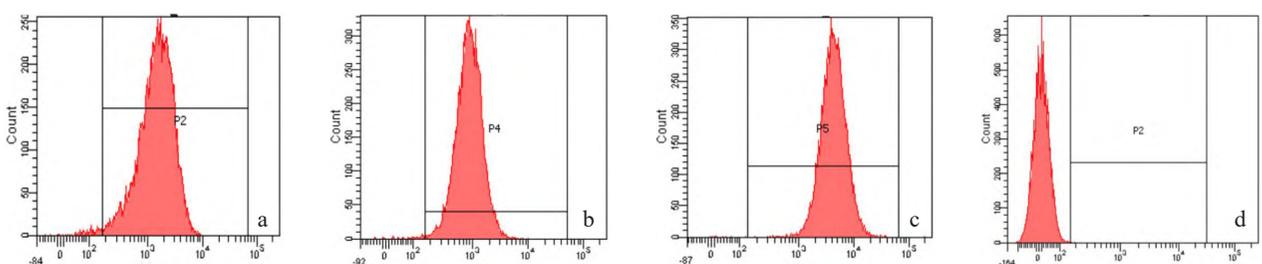
a. 茜素红S染色前(100×); b. 茜素红S染色后(100×); c. 茜素红S染色前(400×); d. 茜素红S染色后(400×)

图2 hBMSCs成骨诱导分化21 d



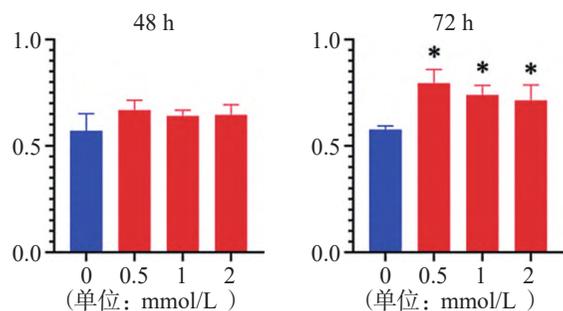
a. 油红O染色前(40×); b. 油红O染色后(40×); c. 油红O染色前(100×); d. 油红O染色后(100×)

图3 hBMSCs成脂诱导分化28 d



a.CD90 FITC; b.CD105 PerCP-Cy5.5; c.CD73 APC; d.CD34等混合物PE

图4 流式细胞仪检测hBMSCs细胞表面抗原



与 0 mmol/L 比较: * $P < 0.05$

图5 二甲双胍处理BMSCs浓度的筛选

第 14 天后呈现再次上调, 与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。BMP7、BMP10、RUNX2 与 OPN 基因在二甲双胍处理前 7 天与空白对照组比较差异均无统计学意义, 而在处理 14 天均表达上调($P < 0.05$)。脂质代谢相关的基因 HMGCR 转录水平在二甲双胍处理后 7 天表现为表达下调($P < 0.05$)。见图 8。

3 讨论

骨质疏松症在世界范围内仍然是一个重大的医

学和社会经济挑战, 其骨量和微结构的全身性损害极大地增加了脆性骨折的风险^[1,5]。目前临床上用于治疗骨质疏松症的药物昂贵且疗效不确切, 长期使用药物治疗易发生并发症^[6]。人体骨质代谢涉及骨吸收和骨形成过程之间的平衡, 在这个过程中, BMSCs 通过迁移以及分化为软骨细胞或成骨细胞, 以适应骨的形成和再生。当骨质疏松症和骨不连等骨病发生时, 骨平衡被破坏, 骨髓间充质干细胞被招募到骨表面, 然后分化为成骨细胞形成新骨, 其中BMSCs 的成骨分化潜能是抑制骨质疏松症骨量减少的根本^[7]。研究发现在骨质疏松症发展过程中, BMSCs 成骨分化能力显著降低, 导致骨形成减少以及骨密度下降^[8]。近年来, 研究证明靶向调控BMSCs 和成骨细胞的功能可显著促进骨形成作用^[9]。目前, 我国干细胞临床研究正在蓬勃发展, 国家卫生部门已经审批针对多种不同适应症的干细胞疗法。BMSCs 被认为是治疗骨质疏松等骨质减少相关疾病最有潜力的方法之一, 研究BMSCs 成骨分化过程分子机制, 寻找调控手段增强其成骨分化潜能

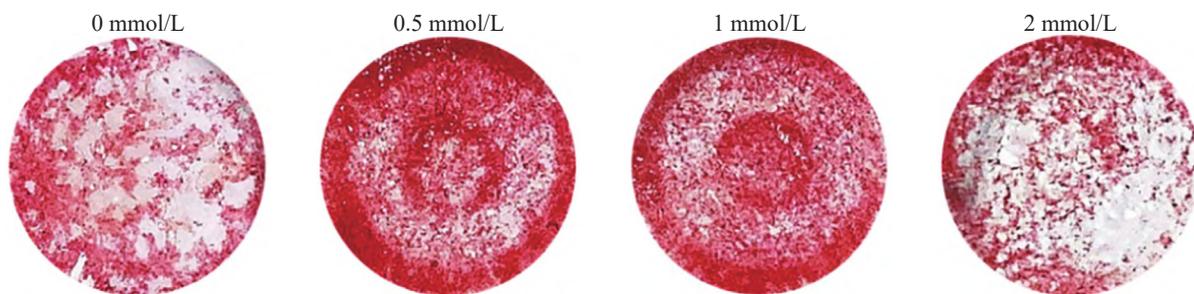
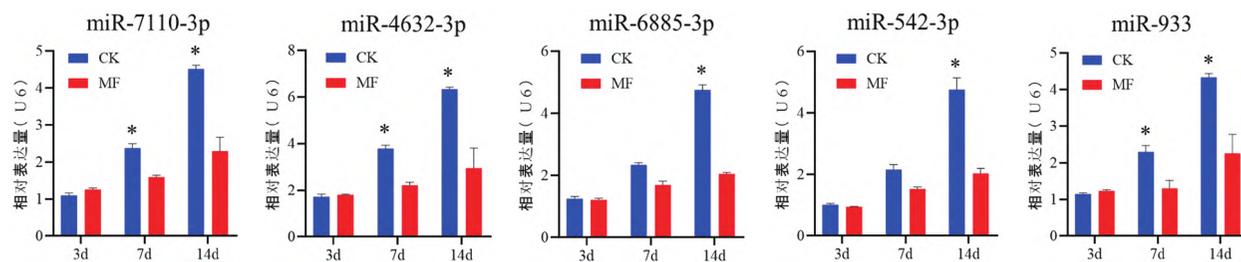
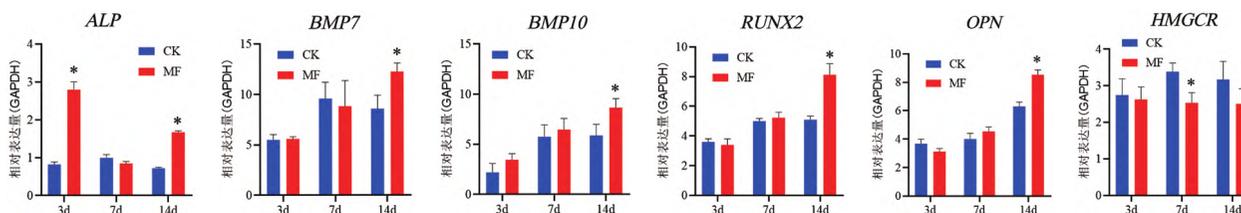


图6 二甲双胍促进BMSCs成骨分化



与空白对照组(CK)比较: * $P < 0.05$

图7 RT-qPCR 检测miRNAs 在二甲双胍处理BMSCs 后的表达量变化



与空白对照组(CK)比较: * $P < 0.05$

图8 RT-qPCR 检测在二甲双胍处理BMSCs 后骨代谢等相关基因的表达量变化

有助于开发骨形成相关适应证的全新治疗方式,具有重要的临床医学意义。

MF 是一种安全、耐受性良好的药物,它主要通过减少肝脏中的糖异生来降低胰岛素抵抗^[10]。临床上通常用于治疗肥胖症、胰岛素抵抗和持续性高胰岛素血症的 2 型糖尿病患者。最近的研究表明, MF 可以影响新陈代谢和细胞过程,如炎症、氧化损伤、自噬减弱、细胞衰老和凋亡^[11-12]。体内和体外研究显示 MF 还可以影响骨骼的稳态,能显著增加全身骨密度、骨小梁体积、骨细胞密度和成骨细胞数,并对骨丢失起到保护作用,降低骨折的风险,还可以影响骨骼的稳态^[13]。体外实验显示 MF 可促进 BMSCs 和成骨前细胞系的增值与分化^[4],同时 MF 在体内、外显著促进成骨作用^[13-14],一项在模型动物体内研究发现 MF 治疗明显改善双侧卵巢切除术后大鼠的骨密度和质量受损程度,并提出这种作用可能通过诱导调节骨髓细胞发育来实现^[15]。动物体内实验表明 MF 可通过抑制骨吸收和刺激小梁骨中的骨形成来防止 GC 诱导的骨丢失^[16]。也有临床观察发现使用 MF 治疗的 2 型糖尿病患者血钙、骨钙素以及骨密度显著高于未使用 MF 治疗的患者,提示 MF 可通过促进骨形成改善 2 型糖尿病患者骨代谢,有助于降低骨质疏松的发生^[3]。在本研究中,我们通过利用不同浓度的 MF 处理人 BMSCs,结果发现 MF 在低浓度水平下对细胞活性没有显著影响,但 MF 可显著促进 BMSCs 诱导成骨分化过程钙盐结节的数量增加,证明 MF 能够在体外显著促进 BMSCs 的成骨分化。

在 MF 促进成骨分化机制探索方面也有不少发现,有研究表明 MF 至少部分通过抑制 GSK3 β 促进人骨髓间充质干细胞的成骨分化活动^[4],也有研究发现 MF 通过孤核受体 SHP 介导的 RUNX2 反式激活而诱导成骨细胞分化^[17]。而最近一项研究表明 MF 通过维持成骨细胞功能和血管密度,抑制坏死股骨头的破骨细胞活性,从而防止大鼠股骨头骨缺血性坏死^[18]。目前大多数研究表明 MF 的促成骨作用可能是通过 AMPK 介导途径发挥作用^[13, 17, 19]。此外,也有研究表明 MF 可能通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路来减轻高血糖诱导的成骨细胞凋亡和分化抑制^[20]。然而, MF 促进成骨的具体机制尚未明确。目前,也有研究使用 MF 改善成骨分化的探索, Hashemi 等^[21] 利用带有壳聚糖涂层的 TiO₂ NT 表面实现在持续的时间内将 MF 递送到骨骼部位,并在体外证明其具有增强 MSC 细胞附着、增殖和分化的潜力。然而,鉴于 MF 是一种主要调节糖代谢的药物,体内直接使用 MF 可能存在紊乱糖代谢

风险的可能。因此探索 MF 调控成骨分化的主要机制并利用该机制精准靶向性调控成骨分化过程则成为一种更为有效的必然手段。

miRNA 早已被证实参与调节骨髓间充质干细胞自我更新和多向分化过程,相关的报道显示多种 miRNA (包括 miR-542-3p^[22]、miR-335-5p^[23]、miR-15b^[24]、miR-21-5p^[25]、miR-130a^[26]、miR-1-3p^[27]、miR-532-5p^[28] 等)参与骨代谢,在转录后通过作用于骨形成相关基因表达而参与 BMSCs 成骨分化及骨形成。此外, Li 等^[29] 发现 miR-216a 通过调节 c-Cbl 介导的 PI3K/AKT 通路,挽救地塞米松对成骨细胞的抑制,促进成骨分化。Li 等^[30] 发现 miR-188 是 BMSCs 成骨与成脂转换的关键调节因子,可能是治疗老年性骨丢失的潜在靶点。然而 MF 处理 hUMSCs 后的 miRNAs 表达变化及其介导的对成骨分化的调控机制尚未见报道。

为了进一步探索 MF 促成骨作用的分子机制,我们利用二代测序技术检测 MF 体外处理 BMSCs 后 miRNA 表达谱,筛选 MF 处理引起 BMSCs 细胞显著差异表达 miRNA,并探索这些差异表达 miRNAs 在成骨分化调控过程的作用。通过比较 MF 体外处理 BMSCs 并诱导成骨分化 7、14 天后与空白对照组 miRNAs 表达谱的差异,筛选出 5 条显著差异表达 miRNA,包括: miR-7110-3p、miR-6885-3p、miR-542-3p、miR-4632-3p 以及 miR-933。其中 miR-542-3p 已经被证实可能通过调控 BMP7 从而影响成骨过程;其它显著差异表达 miRNAs 参与调控成骨的相关报道较少,值得进一步研究具体的相关调控机制。

本研究在明确 MF 处理 BMSCs 能够显著提高其成骨分化能力,然后利用高通量测序检测 BMSCs 成骨分化过程中 miRNAs 的变化,初步证实 MF 可通过 miRNAs 调控成骨分化相关通路最终影响 BMSCs 的成骨分化过程。接下来,应进一步研究 MF 引起的差异表达 miRNAs 调控 BMSCs 成骨分化的详细机制,以期临床应用改造后的 BMSCs 治疗骨质疏松症等多种骨代谢疾病提供理论依据。

参考文献:

- [1] KERSCHAN-SCHINDL K. Prevention and rehabilitation of osteoporosis[J]. Wien Med Wochenschr, 2016, 166(1-2): 22-27.
- [2] WANG Y, TAO Y, HYMAN M E, et al. Osteoporosis in China [J]. Osteoporos Int, 2009, 20(10): 1651-1662.
- [3] BLUMEL J E, ARTEAGA E, AEDO S, et al. Metformin use is associated with a lower risk of osteoporosis in adult women independent of type 2 diabetes mellitus and obesity. REDLINC

- IX study[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2020, 36(5): 421-425.
- [4] MA J, ZHANG Z L, HU X T, et al. Metformin promotes differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells into osteoblast via GSK3 β inhibition[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(22): 7962-7968.
- [5] RACHNER T D, KHOSLA S, HOFBAUER L C. Osteoporosis: Now and the future[J]. *Lancet*, 2011, 377(9773): 1276-1287.
- [6] MILLER P D. Management of severe osteoporosis[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2016, 17(4): 473-488.
- [7] AUGELLO A, DE BARI C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells[J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(10): 1226-1238.
- [8] HU L, YIN C, ZHAO F, et al. Mesenchymal stem cells: Cell fate decision to osteoblast or adipocyte and application in osteoporosis treatment[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2):360.
- [9] 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.
- [10] BAILEY C J. Metformin: Historical overview[J]. *Diabetologia*, 2017, 60(9): 1566-1576.
- [11] WANG Y W, HE S J, FENG X, et al. Metformin: A review of its potential indications[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11: 2421-2429.
- [12] PODHORECKA M, IBANEZ B, DMOSZYNSKA A. Metformin-its potential anti-cancer and anti-aging effects[J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2017, 71(0): 170-175.
- [13] MOLINUEVO M S, SCHUMAN L, MCCARTHY A D, et al. Effect of metformin on bone marrow progenitor cell differentiation: In vivo and in vitro studies[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(2): 211-221.
- [14] BAK E J, PARK H G, KIM M, et al. The effect of metformin on alveolar bone in ligature-induced periodontitis in rats: A pilot study[J]. *J Periodontol*, 2010, 81(3): 412-419.
- [15] GAO Y, LI Y, XUE J, et al. Effect of the anti-diabetic drug metformin on bone mass in ovariectomized rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 635(1-3): 231-236.
- [16] ZHAO J, LI Y, ZHANG H, et al. Preventative effects of metformin on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats[J]. *J Bone Miner Metab*, 2019, 37(5): 805-814.
- [17] JANG W G, KIM E J, BAE I H, et al. Metformin induces osteoblast differentiation via orphan nuclear receptor SHP-mediated transactivation of Runx2[J]. *Bone*, 2011, 48(4): 885-893.
- [18] PARK S H, KANG M A, MOON Y J, et al. Metformin coordinates osteoblast/osteoclast differentiation associated with ischemic osteonecrosis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(6): 4727-4741.
- [19] LI J, ZHANG B, LIU W X, et al. Metformin limits osteoarthritis development and progression through activation of AMPK signalling[J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79(5): 635-645.
- [20] ZHENG L, SHEN X, Ye J, et al. Metformin alleviates hyperglycemia-induced apoptosis and differentiation suppression in osteoblasts through inhibiting the TLR4 signaling pathway[J]. *Life Sci*, 2019, 216:29-38.
- [21] HASHEMI A, EZATI M, MOHAMMADNEJAD J, et al. Chitosan coating of TiO₂ nanotube arrays for improved metformin release and osteoblast differentiation[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 4471-4481.
- [22] LIU H, WANG H, YANG S, et al. Downregulation of miR-542-3p promotes osteogenic transition of vascular smooth muscle cells in the aging rat by targeting BMP7[J]. *Hum Genomics*, 2019, 13(1): 67.
- [23] ZHANG L, TANG Y, ZHU X, et al. Overexpression of MiR-335-5p promotes bone formation and regeneration in mice[J]. *J Bone Miner Res*, 2017, 32(12): 2466-2475.
- [24] VIMALRAJ S, PARTRIDGE N C, SELVAMURUGAN N. A positive role of microRNA-15b on regulation of osteoblast differentiation[J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(9): 1236-1244.
- [25] ARUMUGAM B, BALAGANGADHARAN K, SELVAMURUGAN N. Syringic acid, a phenolic acid, promotes osteoblast differentiation by stimulation of Runx2 expression and targeting of Smad7 by miR-21 in mouse mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Commun Signal*, 2018, 12(3): 561-573.
- [26] LIN Z, HE H, WANG M, et al. MicroRNA-130a controls bone marrow mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblastic and adipogenic fate[J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(6): e12688.
- [27] GU H, SHI S, XIAO F, et al. MiR-1-3p regulates the differentiation of mesenchymal stem cells to prevent osteoporosis by targeting secreted frizzled-related protein 1[J]. *Bone*, 2020, 137: 115444.
- [28] GUO X, WEI S, XU F, et al. MicroRNA-532-5p is implicated in the regulation of osteoporosis by forkhead box O₁ and osteoblast differentiation[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2020, 21(1): 296.
- [29] LI H, LI T, FAN J, et al. MiR-216a rescues dexamethasone suppression of osteogenesis, promotes osteoblast differentiation and enhances bone formation, by regulating c-Cbl-mediated PI3K/AKT pathway[J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(12): 1935-1945.
- [30] LI C J, CHENG P, LIANG M K, et al. MicroRNA-188 regulates age-related switch between osteoblast and adipocyte differentiation[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(4): 1509-1522.