

DOI: 10.13376/j.cbls/2020022

文章编号: 1004-0374(2020)02-0162-08

DNA甲基化与骨代谢调节及骨质疏松症研究进展

牛亚丹, 林伊荷, 张汉清, 陶 涛, 徐雷艇*

(宁波大学医学院, 宁波 315211)

摘要: 骨质疏松症的根本病因是由于多种因素导致成骨细胞介导的骨形成与破骨细胞介导的骨吸收过程之间的负平衡, 引起骨质进行性丢失, 骨密度降低, 骨脆性增加, 进而导致骨折风险增加。越来越多的研究表明, DNA 甲基化可通过调控相关基因表达调节成骨细胞 / 破骨细胞的分化与功能, 进而影响骨形成 / 骨吸收平衡, 介导骨质疏松症的发生、发展。现主要阐述 DNA 甲基化与骨代谢调节和骨质疏松症之间的关系, 并对相关研究进展进行综述。

关键词: 骨质疏松症; 骨代谢; DNA 甲基化

中图分类号: R34; R589.5

文献标志码: A

Research progress on the role of DNA methylation in bone metabolism regulation and osteoporosis

NIU Ya-Dan, LIN Yi-He, ZHANG Han-Qing, TAO Tao, XU Lei-Ting*

(School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The ultimate etiology of osteoporosis is the negative balance between osteoblasts-mediated bone formation and osteoclasts-mediated bone resorption caused by multi-factors, which results in progressive loss of bone, decreased bone mineral density, increased bone fragility and hence increased risk of fracture. More and more studies have shown that DNA methylation plays an important role in the differentiation and function of osteoblasts/osteoclasts by regulating the expression of related genes, thereby affecting the balance of bone formation/resorption and mediating the occurrence and development of osteoporosis. This paper reviewed the recent research progress on the relationship between DNA methylation and bone metabolism regulation and osteoporosis.

Key words: osteoporosis; bone metabolism; DNA methylation

人体骨骼的完整性由不断重复、时空偶联的骨吸收和骨形成过程维持, 此过程称为骨重塑 (bone remodelling)^[1]。成骨细胞参与的骨形成与破骨细胞参与的骨吸收之间的动态平衡是骨重塑过程的关键, 而上述两种细胞的功能又受到骨细胞的调节。当骨形成和骨吸收之间的平衡稳态被打乱, 骨吸收 / 骨形成比值升高时, 骨质进行性丢失, 可导致以骨密度 (bone mineral density, BMD) 降低、骨微结构退化、骨脆性增加进而骨折风险增加为特征的退行性骨代谢疾病, 即骨质疏松症 (osteoporosis, OP)^[1], 其最大危害是易发生脆性骨折, 是老年人致残、致死的主要原因之一^[2]。基因是决定 BMD 和 OP 风

险的重要因素。已发现许多骨代谢调节相关基因的多态性与骨量、OP 易感性和骨折风险有关, 但这些已知基因序列的变异累加起来仅能解释不到 10% 的 BMD 变异^[3], 而家庭和双胞胎研究证实 BMD 的遗传度高达 40%~90%^[4]。遗传度的缺失表明, 有其他更复杂的基因 - 基因和基因 - 环境相互作用机制参与了骨代谢的调节。

收稿日期: 2019-11-21; 修回日期: 2020-01-17

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LY16H070001)

*通信作者: E-mail: xuleiting@nbu.edu.cn; Tel: 0574-87609597

表观遗传能在不改变 DNA 序列的情况下, 使基因表达发生稳定的改变且具有可遗传性, 从而介导环境暴露对基因表达的影响, 其中 DNA 甲基化是目前研究最多的表观遗传机制^[5]。DNA 甲基化是指 DNA 甲基转移酶将甲基转移到 CpG 二核苷酸胞嘧啶残基的 5' 位碳, 形成 5-甲基胞嘧啶的过程。多数基因转录起始位点附近富含 CpG 二核苷酸, 称为 CpG 岛。这些 CpG 岛的甲基化可影响转录因子结合位点构象, 干扰转录因子与基因调控区的结合, 从而抑制基因转录与表达^[6]。越来越多的研究表明, DNA 甲基化可通过调控相关基因表达调节成骨细胞/破骨细胞的分化、成熟与凋亡, 进而影响骨形成/骨吸收平衡, 介导 OP 的发生、发展^[7]。本文主要综述 DNA 甲基化与骨代谢调节和 OP 之间的关系及相关研究进展。

1 候选基因DNA甲基化研究

目前多数涉及 DNA 甲基化与骨代谢调节的研究采用候选基因法, 研究较多的包括 Runt 相关转录因子 2 (*runt-related transcription factor 2*, *RUNX2*)、锌指结构转录因子 (*Osterix*, *OSX*)、Wnt/ β -catenin 信号通路分子、骨形成蛋白 2 (*bone morphogenetic protein 2*, *BMP2*)、硬化蛋白 (*sclerostin*, *SOST*)、OPG/RANKL/RANK 信号系统、碱性磷酸酶 (*alkaline phosphatase*, *ALP*) 和骨钙素 (*osteocalcin*, *OCN*) 等。

1.1 *RUNX2*和*OSX*

成骨细胞来源于间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs)。MSCs 在向成骨细胞分化并进一步向骨细胞分化的过程中伴随着关键基因启动子甲基化变化, 表明 DNA 甲基化是成骨细胞分化的重要调控机制之一^[8-9]。*RUNX2* 和 *OSX* 是成骨细胞分化和骨形成所必需的特异性转录因子, 而且 *OSX* 是 *RUNX2* 介导成骨细胞分化过程中的下游靶点^[10]。*RUNX2* 和 *OSX* 可以相互作用并协同调控骨特异性基因的表达, 包括 *ALP*、I 型胶原蛋白基因和 *OCN* 等^[11-13]。*Wakitani* 等^[14] 发现, 来源于鼠和狗的 MSC 样细胞 *RUNX2* 转录起始位点 -2.7 kb 至 -2.2 kb 区域甲基化程度与基因表达呈负相关, 在诱导 MSCs 向成骨细胞分化后, *RUNX2* 差异甲基化区域甲基化程度下降, 提示 *RUNX2* 甲基化在成骨细胞分化中发挥重要调节作用。但也有研究报道, 人类骨髓来源的 MSCs 在向成骨细胞分化过程中, 其 *RUNX2* 启动子甲基化状态没有改变, 而 *OSX* 启动子甲基化模式呈现动态变化, 由此推断 *OSX* 的表观遗传

调控可能在 MSCs 成骨分化过程中起主要作用^[15]。*Chen* 等^[16] 将小鼠 MSC 样细胞 C3H10T1/2 置于流体剪切应力刺激后的鼠源 MLO-Y4 骨样细胞培养液中培养 24 h, 观察到 C3H10T1/2 细胞中 *RUNX2* 和 *OSX* 启动子甲基化水平降低, 同时骨形成标志物 *OCN* 表达相应增加, 表明骨细胞感受机械刺激后可通过抑制 MSCs 成骨基因甲基化促进成骨细胞分化与骨形成。

1.2 Wnt/ β -catenin信号通路

许多信号分子参与经典 Wnt/ β -catenin 通路信号传递, 其中 β -catenin 扮演着中枢性角色。Wnt 配体与跨膜受体结合后, 可抑制胞浆内 β -catenin 降解, 完整的 β -catenin 转入细胞核与多种转录因子共同调节基因转录, 促进成骨细胞分化、成熟及骨形成^[17]。研究表明, 在骨髓 MSCs 向成骨细胞分化过程中, 伴随着 Wnt/ β -catenin 信号通路分子甲基化状态的改变^[18]。*Wu* 等^[19] 发现, 股骨头坏死患者 MSCs 中 Wnt 受体 *Frizzled1* 基因启动子 CpG 岛异常高甲基化, *Frizzled1* 转录和翻译水平降低, 抑制了 Wnt/ β -catenin 信号通路, 削弱了 MSCs 成骨分化与增殖能力。黄韧带骨化症患者骨髓 MSCs 中 *Wnt5a* 基因去甲基化导致 *Wnt5a* 高表达, 可促进 MSCs 成骨分化, 进而引起黄韧带过度骨化^[20]。*García-Ibarbia* 等^[21] 报道, 骨质疏松性骨折与骨关节炎患者骨组织 Wnt 通路中多个基因甲基化水平有明显变化, 导致 OP 患者成骨细胞核内 β -catenin 水平降低。这些研究表明, DNA 甲基化可通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路分子的转录与表达, 调节成骨细胞的分化与功能, 影响骨转换, 从而参与 OP 的产生、发展。

1.3 *BMP2*

BMP2 是关键的骨生长因子, 可通过诱导 *RUNX2*、*OSX*、*OCN* 等的表达, 刺激 MSCs 向成骨细胞分化, 后者合成和分泌构成骨基质的蛋白, 最终促进骨生长^[22-24]。研究表明, 成骨细胞 *BMP2* 启动子区高甲基化导致骨形成标志物表达下调^[25], 而 DNA 甲基化抑制剂上调其表达^[26]。*BMP2* 在非骨原性的 3T3-L1 和 NIH3T3 细胞中呈高度甲基化, 对上游 Wnt 信号无反应, 但用 DNA 甲基转移酶 1 抑制剂 5-AzadC 处理后, 上述两种细胞可在 Wnt 信号刺激下表达 *BMP2*, 并向成骨细胞分化^[27]。*Raje* 和 *Ashma*^[25] 发现, OP 患者 *BMP2* 转录起始点上游 -267 位 CpG 位点甲基化程度与 OP 显著相关, 其甲基化水平高于健康个体, 导致 *BMP2* 启动子的转录活性下调, 基因表达降低。以上研究表明, *BMP2* 甲基化是调

控成骨细胞分化和骨形成的重要机制之一。

1.4 SOST

SOST 是一种主要由骨细胞分泌的糖蛋白, 可通过抑制 Wnt 信号转导抑制成骨细胞分化, 是骨形成的负性调节因子, 雌激素、RUNX2 和 BMP2 等可调节其表达^[28-31]。SOST 是成骨细胞向骨细胞分化的标志分子, 其基因 -581~+30 区域富含 CpGs, 该区域在成骨细胞中呈高度甲基化, 在向骨细胞的转变过程中甲基化水平逐渐降低, 最终以骨细胞特异性的方式表达并发挥骨代谢调节作用^[31-32]。体外给予 5-AzadC 强制去甲基化后, 成骨细胞 SOST 表达增加, 并加速向骨细胞分化^[31, 33]。Lhaneche 等^[34]报道, 人类胫骨组织 SOST 启动子的 DNA 甲基化程度与基因表达水平相关。Cao 等^[28]报道, 骨质疏松性骨折患者股骨组织 SOST 启动子甲基化水平略低于正常对照, 而 mRNA 和蛋白质表达水平则较高, 说明 DNA 甲基化影响 SOST 基因的转录表达, 可能在原发性 OP 的发病机制中起重要作用, 但 SOST 甲基化水平降低的原因不明。与之相反, Reppe 等^[29]报道, OP 患者髌骨活检组织 SOST 甲基化水平比年龄和体重指数匹配的健康对照高 17.3%, 在血清和骨中的 mRNA 表达水平与全髌 BMD 呈正相关。Shan 等^[35]也报道了相似的研究结果。OP 患者骨组织中 SOST 高甲基化一方面可能是由于成骨细胞向骨细胞分化出现障碍, 单位体积骨组织中成骨细胞(高甲基化)数量增加而骨细胞(低甲基化)数量相对减少而引起^[35]; 另一方面也可能是一种代偿性抵消机制, 通过降低 SOST 表达, 减少 Wnt 信号的抑制, 代偿性地促进骨形成, 以维持骨量^[29]。上述研究所用的检材均为含有不同比例成骨细胞、破骨细胞和骨细胞的骨组织, 导致研究结果并不一致, 有必要分离这些细胞分别检测, 以明确 SOST 甲基化在骨代谢及 OP 中的确切作用。

1.5 OPG/RANKL/RANK信号系统

核因子 κ B 受体活化因子 (receptor activator of NF- κ B, RANK) 是位于破骨细胞表面的受体, 其配体包括核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) 和骨保护素 (osteoprotegerin, OPG), 两者均由成骨细胞和骨髓基质细胞合成和分泌。OPG/RANKL/RANK 是介导骨重塑过程中成骨细胞与破骨细胞相互作用的信号通道, 可调控破骨细胞的分化、成熟及活性, 是最重要的骨代谢调节信号系统之一^[36]。RANKL 与 RANK 结合可刺激破骨细胞分化, 促进骨吸收, 而 OPG 与 RANK 的

结合则阻断这种活性^[37-39]。RANKL 的表达与其启动子的甲基化密切相关, 去甲基化剂处理小鼠 ST2 细胞后, RANKL 表达显著增加, 这一发现已在人类多个细胞系中得到证实^[37, 40-42]。在高同型半胱氨酸血症伴 OP 动物模型中, DNA 甲基转移酶 1 表达升高, 从而引起 OPG 启动子高甲基化, 抑制 OPG 转录, 进而导致 RANKL 表达激活和破骨细胞形成, 最终引起骨质丢失^[43]。人群研究也发现, 与对照相比, OP 患者 RANKL 启动子低甲基化, 而 OPG 启动子高甲基化, 导致 RANKL 表达升高, OPG 水平降低, 有利于破骨细胞分化与骨吸收^[44]。因此, OPG/RANKL/RANK 是成骨细胞与破骨细胞平衡的主要调控分子, 这一系统的甲基化调节可能在原发性 OP 的发病机制中起着“主开关”的作用^[45]。

1.6 ALP和OCN

骨源性 ALP 和 OCN 的表达与分泌几乎完全局限于成骨细胞, 两者均作为最常用的骨形成标志物用来评价成骨活性^[46]。ALP 的主要生理功能是在成骨过程中水解磷酸酯, 为羟基磷灰石的沉积提供必要的磷酸, 同时水解焦磷酸盐, 解除其对骨盐形成的抑制作用, 有利于成骨作用^[46]。已知 ALP 转录起始位点附近 1 415 bp 区域甲基化程度与基因表达呈负相关^[47], 成骨细胞中 ALP 由于启动子低甲基化而高表达, 在向骨细胞分化的过程中甲基化程度逐渐升高, 因此在成熟的骨细胞中几乎检测不到 ALP 基因表达^[6]。此外, 在环境因素刺激下, 成骨细胞 ALP 甲基化程度可发生相应的改变, 增加或降低 ALP 表达^[47]。OCN 是一种骨基质蛋白, 与羟基磷灰石有较强的亲和力, 主要生理功能是维持骨的正常矿化速率^[46]。在不表达 OCN 的细胞中, OCN 启动子高甲基化, 并与集缩染色质结构有关; 在体外培养的原代成骨细胞分化过程中, OCN 启动子逐步去甲基化, 基因表达上升^[48]。

1.7 其他候选基因

Alu 元件是灵长类动物特有的短散在元件, 在人类基因组重组、可变剪切和 mRNA 转录后的修饰和调控中发挥着特殊的作用。在儿童快速生长期, Alu 元件甲基化水平显著升高, 表明 Alu 元件甲基化可能参与人类生长特别是骨生长调节^[49]; 随着年龄增长, Alu 元件逐渐去甲基化, 但 OP 和骨量减少患者的 Alu 元件甲基化水平显著低于同年龄对照组, 提示 Alu 元件的低甲基化水平可能与 OP 发生相关^[50]。同型半胱氨酸可以通过增加赖氨酸氧化酶 (lysyl oxidase, LOX) 基因近端启动子甲基化水平

来抑制其在成骨细胞中的表达^[51], 后者是催化骨胶原蛋白交联的关键酶, 对骨生长与骨结构维持具有重要作用。成骨细胞雌激素受体 α (estrogen receptor alpha, ESR1) 的表达主要由启动子 F 调控, 其甲基化水平与骨代谢有关。Penolazzi 等^[52] 的研究表明, 骨活检分离的成骨细胞 *ESR1* 表达水平与其 F 启动子甲基化程度呈负相关, 受影响的甲基化位点接近转录因子 RUNX2 的结合位点。BMP2 信号通路的近端靶点无远端同源框基因家族 5 (distal-less homeobox, *DLX5*) 是成骨细胞分化后期表达的骨形成诱导转录因子, 在 BMP2 激活下游 RUNX2 过程中起着关键作用, *DLX5* 缺陷小鼠成骨异常^[22]。此外, BMP2 可使 C2C12 成肌细胞 *DLX5* 启动子去甲基化, 促进其向成骨细胞分化^[22,53]。

上述研究选取的候选基因所编码的蛋白一般是已知和成骨/破骨细胞分化与功能调控相关的关键受体、配体和信号通路分子, 或是直接参与骨矿化、骨胶原蛋白代谢等骨形成过程的效应分子。这些基因启动子区域的甲基化可调节相应基因的表达, 从

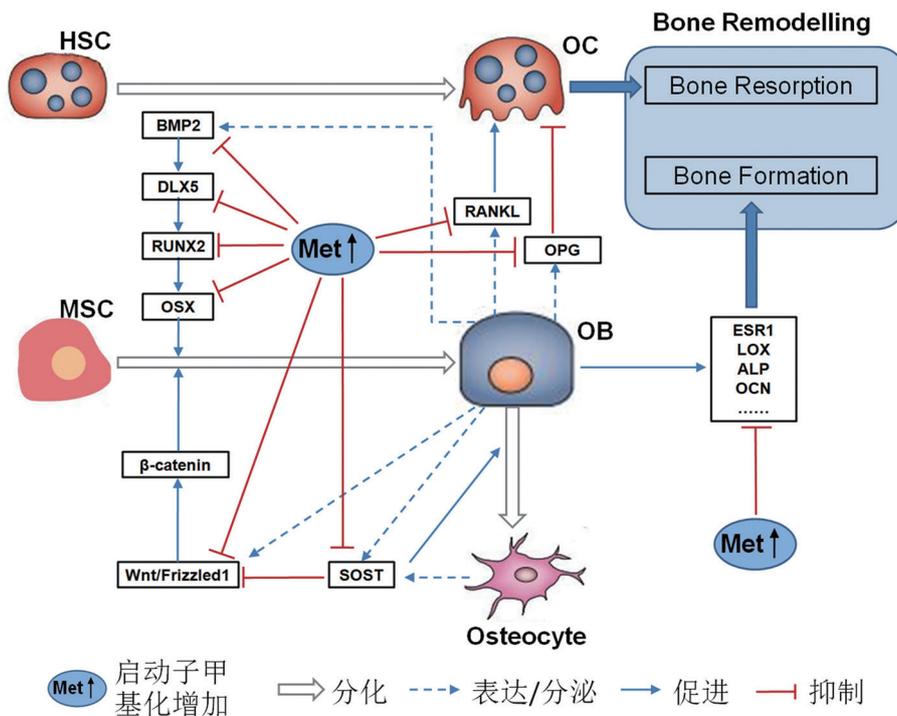
而影响成骨/破骨细胞分化与功能, 最终影响骨重塑过程中骨形成与骨吸收之间的动态平衡, 与 OP 的发生、发展密切相关(图 1)。

2 全基因组DNA甲基化研究

候选基因研究往往只关注少数基因, 且主要局限于体外实验。新一代测序技术的出现为在单碱基分辨率和全基因组水平上分析 DNA 甲基化模式提供了前所未有的机会。自 2013 年以来, 研究者运用芯片技术在骨组织、原代细胞和外周血中对全基因组 DNA 甲基化模式进行了探索, 试图为甲基化在骨代谢调控中的作用机制提供新线索, 或为 OP 早期诊断寻找甲基化分子标记。

2.1 骨组织与细胞

2013 年, Delgado-Calle 等^[54] 首次利用 Illumina 27k 甲基化芯片对骨质疏松性骨折患者骨小梁组织进行全基因组 DNA 甲基化分析, 并与骨关节炎患者进行了比较, 结果识别出 241 个差异甲基化 CpG 位点, 其中 217 个位点在 OP 患者中低甲基化。与



成骨细胞(OB)分泌的BMP2通过自分泌或旁分泌方式诱导DLX5、RUNX2和OSX的表达, 刺激间充质干细胞(MSCs)向OB分化; Wnt分子与受体Frizzled1结合后, 抑制胞浆内 β -catenin降解, 诱导成骨相关基因转录, 促进OB分化; OB合成、分泌LOX、ALP和OCN等分子, 参与骨形成。上述基因的高甲基化可抑制OB的分化与功能, 从而抑制骨形成。OB可分泌RANKL和OPG, RANKL刺激破骨细胞(OC)分化, 而OPG可拮抗此作用, 因此RANKL高甲基化可抑制OC分化, 有利于骨形成, 而OPG高甲基化则促进骨吸收。SOST抑制Wnt信号转导, 进而抑制OB分化, 故SOST高甲基化可促进骨形成。

图1 骨代谢相关基因甲基化对成骨/破骨平衡过程的调控作用

这些 CpG 位点相关的 228 个基因在糖蛋白代谢、细胞分化和同源异型盒超家族转录因子通路中富集, 其中包括 *LEP*、*PLOD2*、*IRX2* 和 *MSX2* 等已报道的可能与骨代谢相关的基因。Reppe 等^[55] 使用 Illumina 450k 芯片分析比较了绝经后 OP 患者和健康者骨活检组织的全基因组 DNA 甲基化谱, 在差异最显著的 100 个基因中发现 4 个与骨生长和代谢相关的基因 *MEPE*、*SOST*、*WIF1* 和 *DKK1*, 其转录水平与其甲基化程度呈高度相关; 此外, 他们还发现了 63 个额外的差异甲基化 CpG 位点与 BMD 显著相关^[56]。2016 年, del Real 等^[57] 比较了从骨质疏松性骨折和骨关节炎患者的股骨头中分离的 MSCs 的全基因组甲基化谱, 并结合 RNA-seq 转录组数据分析发现, 差异甲基化基因主要存在于与干细胞发育和骨骼相关的通路中, 如 Wnt 受体信号通路、成骨细胞分化和 MSCs 增殖信号通路等。Lien 等^[58] 检测了 80 名挪威绝经后妇女骨活检组织的全基因组 DNA 甲基化谱和转录组, 并利用高维惩罚回归模型分析了全基因组 DNA 甲基化与 BMD 的关系, 发现其中 22 个差异甲基化位点能够解释 72.6% 的 BMD 变异, 这些位点与所覆盖的相应基因的 mRNA 转录水平相关, 包括 *ADAMTS2*、*COL11A2*、*TFEC*、*DOCK5*、*PTPN11*、*ANXA2* 和 *DSTN* 等已报道可能与骨代谢相关的基因。de la Rica 等^[59] 研究了人类 CD14⁺ 巨噬细胞在体外经巨噬细胞集落刺激因子及 RANKL 刺激分化成破骨细胞的过程中全基因组 DNA 甲基化水平的变化, 发现在破骨细胞分化过程中, 1 895 个基因甲基化水平降低, 2 054 个基因甲基化水平升高, 且这些基因的甲基化变化规律在不同患者来源的细胞中相当一致, 其中包括 *ACP5*、*CTSK*、*TM7SF7* 和 *TM4SF19* 在内的与破骨细胞生物学密切相关的基因启动子在 RANKL 和集落刺激因子的刺激下快速去甲基化, 有力地证明了 DNA 甲基化调控机制在破骨细胞分化中的关键作用。

2.2 外周血

2017 年, Morris 等^[60] 首次进行了大规模 BMD 表观基因组关联研究。研究人员测量了多达 5 515 名欧洲后裔个体的位点特异性 DNA 甲基化, 并与股骨颈和腰椎 BMD 进行相关分析, 在控制了年龄、体重、吸烟状况等混杂因素后, 虽然发现有一个 CpG 位点 cg23196985 与股骨颈 BMD 相关, 但这种关联并没有在另一人群中得到重复, 表明外周血 DNA 甲基化模式与 BMD 缺乏一致、显著的关联。无独有偶, Fernandez-Rebollo 等^[61] 分析比较了 32

名原发性 OP 和 16 名非 OP 患者外周血的全基因组 DNA 甲基化谱, 试图找出与 OP 相关的 DNA 甲基化生物标记, 但未发现任何一个 CpG 位点在 OP 患者中存在显著异常甲基化。因此, 作者认为由于基因甲基化模式具有组织、细胞特异性, 外周血可能并不适合用来寻找原发性 OP 的 DNA 甲基化生物标记。

与上述研究结果相反, Cheishvili 等^[62] 检测了加拿大多中心 OP 研究 (CaMos) 队列中 22 名正常女性和 22 名绝经后 OP 女性 (51~89 岁) 的外周血全基因组 DNA 甲基化谱, 在 OP 女性中发现 1 233 个差异甲基化 CpG 位点; 对其中差异最显著的 77 个 CpG 位点进行热图和聚类分析, 发现这些位点的差异甲基化可有效区分 OP 与正常人群, 提示这些位点与 OP 有关; 此外, 由于这些差异位点也存在于早期 OP 患者, 故可作为 OP 早期外周血生物标记。其中, 5 个具有潜在的骨生物学功能的基因 *ZNF267*、*ABLIM2*、*RHOJ*、*CDKL5* 和 *PDCD1* 的加权多基因甲基化评分与 BMD 相关, 可预测早期 OP, 且具有较高的敏感性和特异性。本课题组未发表的研究采用 Illumina 850k 芯片技术分析了小样本 OP 患者与对照的外周血全基因组 DNA 甲基化谱, 发现 OP 患者有 198 个位点存在甲基化修饰差异, 涉及 104 个基因, 与细胞黏附、应激、分化、维生素 D₃ 代谢及胰岛素抵抗等通路相关。由于样本量较少, 该结果仍有待大样本焦磷酸测序验证。

3 总结

尽管有些分歧, 但是已有的候选基因研究有力地表明 DNA 甲基化在成骨细胞分化过程中起重要作用, 这些基因的甲基化模式具有细胞特异性和分化阶段特异性, 而关于 DNA 甲基化与破骨细胞分化和活性的调控仍知之甚少。此外, 细胞功能在很大程度上受到涉及多个基因的复杂调控网络的影响, 作为抑制或促进基因表达的“开关”, DNA 甲基化如何协调骨代谢中各种细胞分化和相关基因转录仍不是很明确, 有待进一步研究来完善。

全基因组 DNA 甲基化研究大大丰富了骨表型相关基因, 但目前已有的研究报道的全基因组 DNA 甲基化模式并不一致, 不同研究筛选出来的差异甲基化的基因大都不重合。此外, 这些基因的甲基化虽然与 BMD 或 OP 显著相关, 但绝大多数不是已知的经典骨代谢相关基因。造成这一结果的原因一方面可能与研究人群基因背景差异有关, 另

一方面也可能是由于原发性 OP 患者骨代谢的调控网络比已知的更为复杂。例如, 骨骼与其他系统如神经 - 免疫系统之间存在紧密的相互作用, 因此, 其他系统的基因异常甲基化必然会在 OP 患者中得到体现。

DNA 甲基化筛选已经在肿瘤中得到临床应用, 但目前没有甲基化测试可用于常见的包括 OP 在内的骨骼疾病。由于 DNA 甲基化模式是高度组织、细胞特异性的, 外周血 DNA 甲基化模式是否可以作为 OP 生物标记仍有争议, 已有的几个研究结果也并不一致。有必要在严格控制混杂因素后, 在不同人群中进行大样本病例 - 对照研究, 进一步寻找 OP 相关甲基化生物标记, 以期在基于 BMD 进行 OP 诊断之前识别出高风险人群, 有利于 OP 早期诊断和治疗干预。

[参 考 文 献]

- [1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2017). 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2017, 10: 413-44
- [2] Siris ES, Adler R, Bilezikian J, et al. The clinical diagnosis of osteoporosis: a position statement from the National Bone Health Alliance Working Group. *Osteoporos Int*, 2014, 25: 1439-43
- [3] Hsu YH, Kiel DP. Clinical review: genome-wide association studies of skeletal phenotypes: what we have learned and where we are headed. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97: E1958-77
- [4] Bjornerem A, Bui M, Wang X, et al. Genetic and environmental variances of bone microarchitecture and bone remodeling markers: a twin study. *J Bone Miner Res*, 2015, 30: 519-27
- [5] Gibney ER, Nolan CM. Epigenetics and gene expression. *Heredity (Edinb)*, 2010, 105: 4-13
- [6] Marini F, Cianferotti L, Brandi ML. Epigenetic mechanisms in bone biology and osteoporosis: can they drive therapeutic choices? *Int J Mol Sci*, 2016, 17: E1329
- [7] Letarouilly JG, Broux O, Clabaut A. New insights into the epigenetics of osteoporosis. *Genomics*, 2019, 111: 793-8
- [8] Kang MI, Kim HS, Jung YC, et al. Transitional CpG methylation between promoters and retroelements of tissue-specific genes during human mesenchymal cell differentiation. *J Cell Biochem*, 2007, 102: 224-39
- [9] Zhang RP, Shao JZ, Xiang LX. GADD45A protein plays an essential role in active DNA demethylation during terminal osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem*, 2011, 286: 41083-94
- [10] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 2002, 108: 17-29
- [11] Severson B, Taylor S, Pan Y. Cbfa1/RUNX2 directs specific expression of the sclerostosis gene (*SOST*). *J Biol Chem*, 2004, 279: 13849-58
- [12] Qiu WX, Ma XL, Lin X, et al. Deficiency of Macf1 in osterix expressing cells decreases bone formation by Bmp2/Smad/Runx2 pathway. *J Cell Mol Med*, 2020, 24: 317-27
- [13] Komori T. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: E1649
- [14] Wakitani S, Yokoi D, Hidaka Y, et al. The differentially DNA-methylated region responsible for expression of runt-related transcription factor 2. *J Vet Med Sci*, 2017, 79: 230-7
- [15] Farshdousti Hagh M, Noruzinia M, Mortazavi Y, et al. Different methylation patterns of RUNX2, OSX, DLX5 and BSP in osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell J*, 2015, 17: 71-82
- [16] Chen JC, Chua M, Bellon RB, et al. Epigenetic changes during mechanically induced osteogenic lineage commitment. *J Biomech Eng*, 2015, 137: 020902
- [17] Hartmann C. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol*, 2006, 16: 151-8
- [18] Cao Y, Yang H, Jin L, et al. Genome-wide DNA methylation analysis during osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 8238496
- [19] Wu F, Jiao J, Liu F, et al. Hypermethylation of *Frizzled1* is associated with Wnt/ β -catenin signaling inactivation in mesenchymal stem cells of patients with steroid-associated osteonecrosis. *Exp Mol Med*, 2019, 51: 23
- [20] Chiba N, Furukawa K, Takayama S, et al. Decreased DNA methylation in the promoter region of the *WNT5A* and *GDNF* genes may promote the osteogenicity of mesenchymal stem cells from patients with ossified spinal ligaments. *J Pharmacol Sci*, 2015, 127: 467-73
- [21] Garcia-Ibarbia C, Delgado-Calle J, Casafont I, et al. Contribution of genetic and epigenetic mechanisms to Wnt pathway activity in prevalent skeletal disorders. *Gene*, 2013, 532: 165-72
- [22] Lee JY, Lee YM, Kim MJ, et al. Methylation of the mouse *Dlx5* and *Osx* gene promoters regulates cell type-specific gene expression. *Mol Cells*, 2006, 22: 182-8
- [23] Chen G, Deng C, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*, 2012, 8: 272-88
- [24] Kamiya N. The role of BMPs in bone anabolism and their potential targets SOST and DKK1. *Curr Mol Pharmacol*, 2012, 5: 153-63
- [25] Raje MM, Ashma R. Epigenetic regulation of *BMP2* gene in osteoporosis: a DNA methylation study. *Mol Biol Rep*, 2019, 46: 1667-74
- [26] Fu B, Wang H, Wang J, et al. Epigenetic regulation of *BMP2* by 1,25-dihydroxyvitamin D3 through DNA methylation and histone modification. *PLoS One*, 2013, 8: e61423

- [27] Cho YD, Yoon WJ, Kim WJ, et al. Epigenetic modifications and canonical wntless/int-1 class (WNT) signaling enable trans-differentiation of nonosteogenic cells into osteoblasts. *J Biol Chem*, 2014, 289: 20120-8
- [28] Cao Y, Wang B, Wang D, et al. Expression of sclerostin in osteoporotic fracture patients is associated with DNA methylation in the CpG island of the *SOST* gene. *Int J Genomics*, 2019, 2019: 7076513
- [29] Reppe S, Noer A, Grimholt RM, et al. Methylation of bone *SOST*, its mRNA, and serum sclerostin levels correlate strongly with fracture risk in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*, 2015, 30: 249-56
- [30] Matsui S, Yasui T, Kasai K, et al. Increase in circulating sclerostin at the early stage of menopausal transition in Japanese women. *Maturitas*, 2016, 83: 72-7
- [31] Delgado-Calle J, Sanudo C, Bolado A, et al. DNA methylation contributes to the regulation of sclerostin expression in human osteocytes. *J Bone Miner Res*, 2012, 27: 926-37
- [32] Tu X, Rhee Y, Condon KW, et al. *SOST* downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. *Bone*, 2012, 50: 209-17
- [33] Husain A, Jeffries MA. Epigenetics and bone remodeling. *Curr Osteoporosis Rep*, 2017, 15: 450-8
- [34] Lhaneche L, Hald JD, Domingues A, et al. Variations of *SOST* mRNA expression in human bone are associated with DNA polymorphism and DNA methylation in the *SOST* gene. *Bone*, 2016, 92: 107-15
- [35] Shan Y, Wang L, Li G, et al. Methylation of bone *SOST* impairs SP7, RUNX2, and ER α transactivation in patients with postmenopausal osteoporosis. *Biochem Cell Biol*, 2019, 97: 369-74
- [36] Chen X, Wang Z, Duan N, et al. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res*, 2018, 59: 99-107
- [37] Kalkan R, Becer E. RANK/RANKL/OPG pathway is an important for the epigenetic regulation of obesity. *Mol Biol Rep*, 2019, 46: 5425-32
- [38] Liu W, Zhang X. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues. *Mol Med Rep*, 2015, 11: 3212-8
- [39] Akbar IZ, Dewi FRP, Setiawan B. In silico interaction of the active compounds of *scurrula atropurpurea* with the RANK/RANKL/OPG system in diabetoporosis. *Acta Inform Med*, 2019, 27: 8-11
- [40] Delgado-Calle J, Sanudo C, Fernandez AF, et al. Role of DNA methylation in the regulation of the RANKL-OPG system in human bone. *Epigenetics*, 2012, 7: 83-91
- [41] Kitazawa R, Kitazawa S. Methylation status of a single CpG locus 3 bases upstream of TATA-box of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) gene promoter modulates cell- and tissue-specific RANKL expression and osteoclastogenesis. *Mol Endocrinol*, 2007, 21: 148-58
- [42] Kim JY, Kim SH, Kim HS. Promoter methylation down-regulates osteoprotegerin expression in ovarian carcinoma. *Anticancer Res*, 2019, 39: 2361-7
- [43] Behera J, George AK, Voor MJ, et al. Hydrogen sulfide epigenetically mitigates bone loss through OPG/RANKL regulation during hyperhomocysteinemia in mice. *Bone*, 2018, 114: 90-108
- [44] Wang P, Cao Y, Zhan D, et al. Influence of DNA methylation on the expression of OPG/RANKL in primary osteoporosis. *Int J Med Sci*, 2018, 15: 1480-5
- [45] Ghayor C, Weber FE. Epigenetic regulation of bone remodeling and its impacts in osteoporosis. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: E1446
- [46] Licini C, Vitale-Brovarone C, Mattioli-Belmonte M. Collagen and non-collagenous proteins molecular crosstalk in the pathophysiology of osteoporosis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2019, 49: 59-69
- [47] Delgado-Calle J, Sanudo C, Sanchez-Verde L, et al. Epigenetic regulation of alkaline phosphatase in human cells of the osteoblastic lineage. *Bone*, 2011, 49: 830-8
- [48] Villagra A, Gutierrez J, Paredes R, et al. Reduced CpG methylation is associated with transcriptional activation of the bone-specific rat osteocalcin gene in osteoblasts. *J Cell Biochem*, 2002, 85: 112-22
- [49] Rerkasem K, Rattanatanyong P, Rerkasem A, et al. Higher Alu methylation levels in catch-up growth in twenty-year-old offsprings. *PLoS One*, 2015, 10: e0120032
- [50] Jintaridith P, Tungtrongchitr R, Preutthipan S, et al. Hypomethylation of Alu elements in post-menopausal women with osteoporosis. *PLoS One*, 2013, 8: e70386
- [51] Thaler R, Agsten M, Spitzer S, et al. Homocysteine suppresses the expression of the collagen cross-linker lysyl oxidase involving IL-6, Fli1, and epigenetic DNA methylation. *J Biol Chem*, 2011, 286: 5578-88
- [52] Penolazzi L, Lambertini E, Giordano S, et al. Methylation analysis of the promoter F of estrogen receptor α gene: effects on the level of transcription on human osteoblastic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004, 91: 1-9
- [53] 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 Clin Invest*, 2009, 119: 3666-77
- [54] Delgado-Calle J, Fernandez AF, Sainz J, et al. Genome-wide profiling of bone reveals differentially methylated regions in osteoporosis and osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol*, 2013, 65: 197-205
- [55] Reppe S, Lien TG, Hsu YH, et al. Distinct DNA methylation profiles in bone and blood of osteoporotic and healthy postmenopausal women. *Epigenetics*, 2017, 17: 674-87
- [56] Reppe S, Datta H, Gautvik KM. The influence of DNA methylation on bone cells. *Curr Genomics*, 2015, 16: 384-92
- [57] del Real A, Perez-Campo FM, Fernandez AF, et al. Differential analysis of genome-wide methylation and gene expression in mesenchymal stem cells of patients with fractures and osteoarthritis. *Epigenetics*, 2017, 12: 113-22
- [58] Lien TG, Borgan O, Reppe S, et al. Integrated analysis of DNA-methylation and gene expression using high-dimensional penalized regression: a cohort study on bone mineral density in postmenopausal women. *BMC Med*

- Genomics, 2018, 11: 24
- [59] de la Rica L, Rodriguez-Ubreva J, Garcia M, et al. PU.1 target genes undergo Tet2-coupled demethylation and DNMT3b-mediated methylation in monocyte-to-osteoclast differentiation. *Genome Biol*, 2013, 14: R99
- [60] Morris JA, Tsai PC, Joehanes R, et al. Epigenome-wide association of DNA methylation in whole blood with bone mineral density. *J Bone Miner Res*, 2017, 32: 1644-50
- [61] Fernandez-Rebollo E, Eipel M, Seefried L, et al. Primary osteoporosis is not reflected by disease-specific DNA methylation or accelerated epigenetic age in blood. *J Bone Miner Res*, 2018, 33: 356-61
- [62] Cheishvili D, Parashar S, Mahmood N, et al. Identification of an epigenetic signature of osteoporosis in blood DNA of postmenopausal women. *J Bone Miner Res*, 2018, 33: 1980-9