

环状RNA在成骨分化中的作用

董惠贤^{1,2}, 钟嘉琳^{1,2}, 江千舟^{1,2}



1. 广州医科大学附属口腔医院牙体牙髓病科 (广州 510182)
2. 广州市口腔再生医学基础与应用研究重点实验室 (广州 510182)

【摘要】 环状核糖核酸 (circular RNAs, CircRNAs) 是一类特殊的非编码 RNA 分子, 呈封闭环状结构, 由非经典剪接方式反向剪接而形成, 存在于高度分化的真核生物中。越来越多的研究表明 CircRNAs 在成骨分化中发生变化, 本文介绍 CircRNAs 在组织细胞成骨分化中的作用, 并对其在成骨分化过程中的作用靶点及信号通路研究现状作一综述。

【关键词】 环状 RNA; 成骨; 分化; 调控

Functions of CircRNAs in osteogenic differentiation

Hui-Xian DONG^{1,2}, Jia-Lin ZHONG^{1,2}, Qian-Zhou JIANG^{1,2}

1. Department of Endodontics, Affiliated Stomatology Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China

2. Guangzhou Key Laboratory of Basic and Applied Research of Oral Regenerative Medicine, Guangzhou 510182, China

Corresponding author: Qian-Zhou JIANG, E-mail: jqianzhou@126.com

【Abstract】 CircRNAs are a special class of non-coding RNA (ncRNA) molecules. They have a closed circular structure and are formed by reverse splicing by non-classical splicing methods. They coexist in highly differentiated eukaryotes. More and more studies have shown that CircRNAs would change during osteogenic differentiation. This paper introduces the role of CircRNAs in tissue cell osteogenic differentiation, and reviews the current research status of the targets and signaling pathways of CircRNAs during osteogenic differentiation.

【Keywords】 CircRNAs; Osteogenesis; Differentiation; Regulation

环状核糖核酸 (circular RNAs, CircRNAs) 首次在类病毒中被发现^[1], 被认为是异常剪接的副产品。CircRNAs 通过 5' 端和 3' 端的反向剪接, 形成环状 RNA 结构^[2], 这种独特的环状结构可以抵抗核糖核酸酶的消化, 并且相对稳定, 半衰期可以超过 48 小时^[3], 随着高通量测序技术的发展, 在众多的细胞系和不同的物种中已经有效地识别出了大量的 CircRNAs^[4-5], 大量证据表明它们在器

官和疾病发育过程中的基因调控中扮演着不同的角色, 在神经系统疾病、癌症以及干细胞的发育、干性维持及多向分化调控和调节分化的生物学活动中发挥关键作用^[6-9]。其中, CircRNAs 在成骨过程中的变化提示, CircRNAs 在成骨过程中可能发挥作用^[10-13]。本文介绍在不同组织细胞中 CircRNAs 成骨分化的作用 (图 1), 将 CircRNAs 在成骨分化过程中生物学功能的研究现状作一综述。

DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.2021.01.04

基金项目: 广东省科技创新战略专项资金粤港联合资助计划 (平台) 项目 (2018B050502012)

通信作者: 江千舟, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: jqianzhou@126.com

<http://www.jnewmed.com>

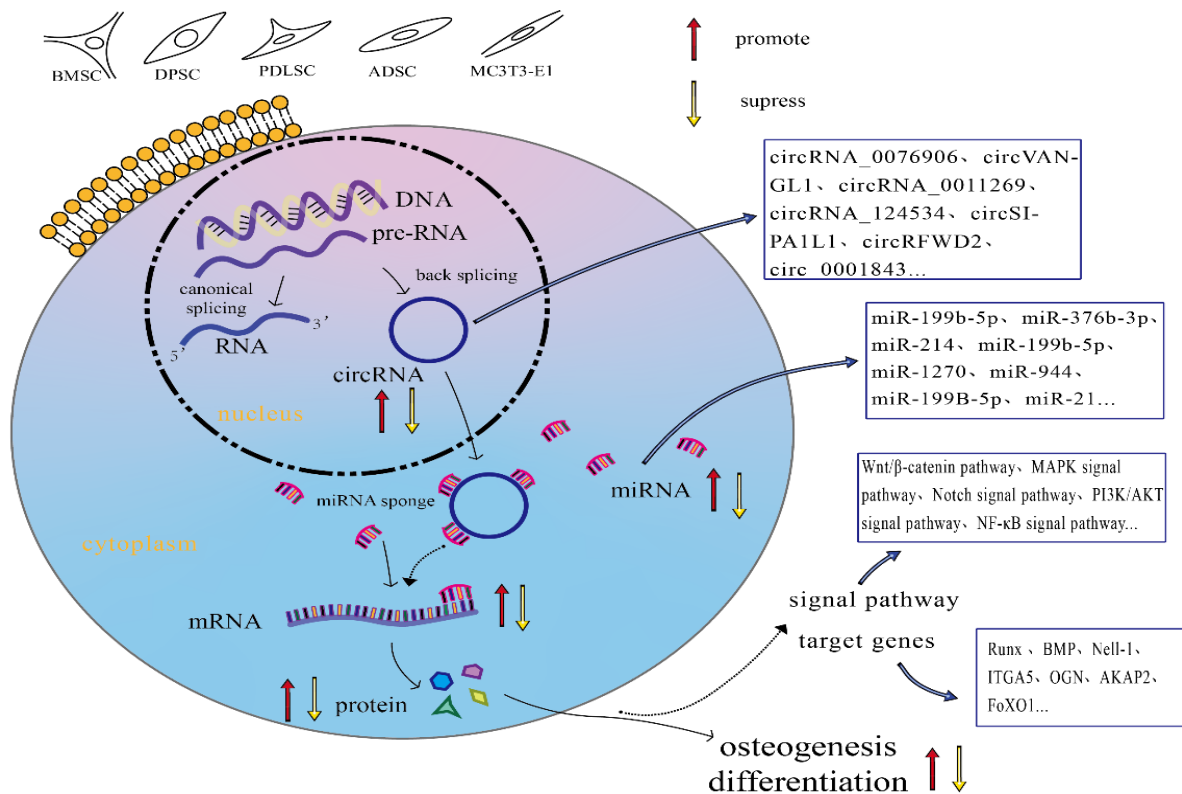


图1 CircRNAs在成骨分化中的作用
Figure 1. The role of CircRNAs in osteogenic differentiation

1 CircRNAs的特点

CircRNAs 是一类新的非编码 RNA，是在转录过程中 RNA 转录片段端到端连接而产生的闭环 RNA。根据基因组起源，CircRNAs 分为三类：仅由内含子组成的内含子 CircRNAs (CiRNAs)；仅由外显子组成的外显子 CircRNAs (EcircRNAs)；由外显子和内含子共同形成的外显子-内含子 CircRNAs (EircRNAs) [14]。目前普遍认为 CircRNAs 的环化方式主要有套索驱动环化、内含子配对驱动环化和 RNA 结合蛋白驱动环化 3 种 [3,14-15]。套索驱动环化指当 mRNA 前体 (pre-mRNA) 进行 GU/AG 剪切时，可以跨外显子进行剪切，形成含有外显子和内含子的套索中间体，然后加工形成 CircRNAs。内含子配对驱动环化指某些外显子两侧的内含子序列中含有反向互补序列，它们之间互补配对形成 RNA 双链，促进 CircRNAs 的形成。而 RNA 结合蛋白驱动环化则指一些 RNA 结合蛋白可以结合到外显子侧翼的内含子序列上，促进 CircRNAs 的形成。

因为缺少 RNA 酶介导的降解的自由端 [16]，所以与 lncRNAs 和 miRNAs 相比，CircRNAs 在哺

乳动物细胞中具有更高的稳定性和序列保守性 [17]。也有研究发现，CircRNAs 具有种属特异性、组织特异性、疾病特异性以及与发育阶段相关的特异性 [18-20]。同时一个基因可以产生多种不同类型的 CircRNAs，甚至有些 CircRNAs 表达量比其相对应的线性 RNAs 还要丰富。尽管有这些发现，CircRNAs 的许多特征仍不清楚。

2 干细胞中CircRNAs的成骨分化作用

近年来，细胞治疗特别是间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 在骨缺损的治疗中显示出良好的应用前景。MSCs 是一种多潜能干细胞，具有自我更新和多向分化的特点。它们几乎存在于所有组织中，并在组织修复和再生中发挥重要作用 [21]。常用于骨组织工程的 MSCs 主要包括：骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)、脂肪源性间充质干细胞 (adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSCs)、牙髓干细胞 (dental pulp stem cells, DPSCs)、胚胎干细胞、脐血间充质干细胞、诱导多能干细胞等 [22]。近年来许多关于非编码 RNA 调控成骨分化的研究主要集中在 BM-

MSCs、ADSCs、DPSCs、牙周韧带干细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSCs) 等细胞系上, 且许多研究已表明 CircRNAs 在这类细胞成骨分化过程中发挥重要作用。

2.1 骨髓间充质干细胞

BM-MSCs 是一种多能干细胞, 具有高成骨潜能, 被广泛用于组织工程研究及应用。BM-MSCs 是成骨细胞的主要来源, 可以促进缺损区骨修复^[22]。BM-MSCs 的成骨分化受一系列编码和非编码 RNA 调控^[23-25]。目前已经有不少研究表明 CircRNAs 对 BM-MSCs 成骨分化过程具有调控作用, 例如: 在骨质疏松研究中, circRNA_0076906、circVANG1、circRNA_0011269、circRNA_0016624、circRUNX2、circ_0076690、circ_0024097 及 circ_0006393 在人 BM-MSCs 中起到促进成骨分化, 抑制骨质疏松发展的作用^[26-33]。circRNA_1983 在硅酸氢钙微粒诱导 BM-MSCs 成骨分化和骨缺损修复中具有促进作用^[34]。circDAB1、circRNA_33287、circRNA_0074834、circ-SLC8A1 的抑制降低了 BMSCs 的矿化结节形成已经被证明能够促进人 BM-MSCs 的成骨分化^[11,34-36]。另外有研究表明, 除了正向调控作用外, CircRNAs 对 BM-MSCs 成骨分具有负向调控影响, 例如: circIGSF11、circRNA_0127781 可能参与抑制人 BM-MSCs 的成骨分化^[37]。Kuang 等人揭示, 在糖皮质激素引起的股骨头坏死中 circUSP45 在 BM-MSCs 的成骨分化过程中起负调控作用^[38]。

此外, Zhang 等证实在股骨头坏死的 BM-MSCs 中 circRNA_0000219、circRNA_0004588、circRNA_0005936 等 CircRNAs 的表达与 BM-MSCs 的增殖和成骨能力呈潜在的正相关^[37]。在钛表面机械研磨促进人 BM-MSCs 成骨分化的研究中发现 circRNA_0032600 对人 BM-MSCs 中晚期成骨分化也有调节作用^[39]。

2.2 牙髓干细胞

DPSCs 来源于牙髓组织, 可从牙髓组织中获得, 具有来源广泛、较高的安全性、高增殖潜能及较强的克隆能力、可自我更新性和多向分化性等特性, 已成为组织工程及再生医学领域的种子细胞^[40]。DPSCs 的成牙本质向分化是牙体组织自我防御及修复的关键, 已有研究证实 circRNA 可参与调控 DPSCs 的成牙本质向分化过程, 例如研

究表明 circRNA_0015260、circRNA_0006984 在诱导成牙本质分化的人牙髓细胞中表达上调, 并证明其具有促进人牙髓细胞的成牙本质分化的功能^[41]。

在不同的诱导条件下, DPSCs 可以分化为神经性、成骨性和肌源性细胞系^[34]。来自活体研究和动物模型的实验证据表明, DPSCs 具有产生适当血管化的板层骨的能力^[42]。因此, 越来越多学者将 DPSCs 用于骨再生的研究中。其中不少学者对 CircRNAs 在 DPSCs 成骨分化过程的作用进行研究。如体内外研究发现在人 DPSCs 成骨分化过程中, circRNA_0026827 的表达显著增加, 且体内异位骨模型研究也发现 circRNA_0026827 过表达在促进异位骨形成中起重要作用^[43]; 另外 circRNA_124534、circSIPA1L1 也被证实能促进 DPSCs 向成骨细胞分化^[44-45]。

2.3 脂肪源性间充质干细胞

ADSCs 位于脂肪组织的基质-血管段, 由于其具有来源丰富、自体来源容易等特点, 逐渐成为骨再生医学研究的重点。然而, 有限的成骨分化潜能和天然的向成脂细胞分化的倾向极大地阻碍了其在骨修复中的临床应用发展^[44]。ADSCs 的成骨分化涉及包括非编码 RNA 在内的多种因素的复杂调控, 而且在很大程度上还没有确定^[45]。部分研究已证实 CircRNAs 在 ADSCs 成骨分化过程中具有调控作用, 例如 circRNAvg13 能显著促进 ADSCs 的成骨分化^[46]; circRFWD2 和 circINO80 可以与 miR-6817-5p 相互作用, 从而抑制 ADSCs 成骨作用^[47]。

2.4 牙周韧带干细胞

PDLSCs 已被证明能产生典型的牙周韧带样组织, 以再生牙周炎损伤的组织。此外 PDLSCs 具有巨大的再生能力潜力, 这有助于其自我更新和多向分化, 尤其是成骨方向分化^[48]。例如, Li 等观察到 circCDR1as 在 PDLSCs 成骨分化过程中显著上调, 并发现 circCDR1as 能促进其成骨分化^[49]。而 Gu 等人通过数据分析发现 circBANP、circRNA_4214、circRNA_3140 和 circITCH 对 PDLSCs 成骨分化具有调控作用^[48]。此外 circRNA_432、circRNA_126、circRNA_4045、circRNA_4251、circRNA_5331、circRNA_3140、circRNA_436 和 circRNA_4045 等 CircRNAs 被检测对机械力刺激下的 PDLSCs 的成骨分化具有调控作用^[50]。

2.5 小鼠胚胎成骨细胞前体细胞

小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 (MC3T3-E1) 是一种成骨细胞样细胞系, 是研究成骨细胞增殖和分化, 以探讨骨质疏松分子机制的有用模型^[51]。有报道称在小鼠胚胎成骨细胞前体细胞中 circRNA_19142 和 circRNA_5846 与成骨细胞分化相关^[12]。mm9_circ_009056 能够正向诱导小鼠胚胎成骨细胞前体细胞成骨分化^[52]。另外, 在氧化应激诱导小鼠胚胎成骨细胞前体细胞的细胞凋亡和成骨的研究中表明, circ_0001843 具有成骨促进作用^[53]。而在微重力作用下的 MC3T3-E1 细胞成骨过程 circ_010383、circ_014154 和 circ_014977 的差异表达较明显, 且生物信息学分析发现, circ_014154 靶向 miR-145a-5p 和 let-7a-5p, 另外 GO 和 KEGG 分析表明 circ_014154 参与成骨细胞分化的正调控^[54]。在小鼠胚胎成骨细胞前体细胞研究中发现, circAFF4 能够促进股骨骨折愈合^[55]。此外 circFGFR2 被证实能促进大鼠牙囊细胞成骨分化^[10]。

3 CircRNAs在成骨分化调控中的信号通路研究

Wnt/ β -catenin 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 通路、Notch 信号通路和核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路等在组织成骨分化过程中发挥着不可替代的作用。随着对 CircRNAs 研究的深入, CircRNAs 是否参与或影响重要信号通路的调控受到了广泛的关注。

3.1 Wnt/ β -catenin通路

Wnt/ β -catenin 信号通路(称为经典 Wnt 通路)广泛存在于多细胞动物中, 是一条在物种进化中高度保守的信号通路, 其构成主要包括 Wnt、卷曲蛋白、 β -catenin、低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6、GSK-3 β 、T 细胞因子/淋巴增强因子等^[56]。目前, 靶向 Wnt/ β -catenin 信号通路已经成为维持骨内稳态、促进骨修复、治疗骨质疏松的重要途径之一^[57]。

已有大量研究证实, CircRNAs 可通过靶向广泛的 miRNA 对 Wnt/ β -catenin 信号通路的调控作用产生影响。据报道, 沉默 circIGSF11 可以促进 BMSCs 的成骨过程, 并且与 miR-199b-5p 呈负相关^[37]。而 miR-199b-5p 可以通过靶向糖原合成酶

激酶 3 β (GSK-3 β) 刺激成骨细胞分化, 其中 GSK-3 β 可以通过诱导 β -catenin 进入细胞核, 从而激活 Wnt 信号通路^[58]。此外有报道表明, 源自 YAP1 的 circ_0024097 使 miR-376b-3p 上调了 YAP1 的水平, 从而激活 Wnt/ β -catenin 途径, 进一步促进了 BMSC 和 MC3T3-E1 细胞的成骨分化^[32]。

Qian 等发现, circRNA_5846 与小鼠胚胎成骨细胞前体细胞成骨分化相关^[12], 且生物信息学分析表明 circRNA_5846 与 miR-432 之间存在相互作用。同时有研究表明, miR-432 可能通过下调 Wnt/ β -catenin 信号通路来抑制人肝癌细胞的增殖^[59]。但是否存在 circRNA_5846/miR-432/Wnt/ β -catenin 途径调节成骨仍有待研究。

3.2 丝裂原活化蛋白激酶通路

MAPKs 是普遍存在于各种哺乳动物细胞中的一组丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 能被多种外环境所激活, 通过三级酶促级联反应进行信号转导, 参与细胞生长、分化、凋亡等多种生理过程^[60], 尤其在 BM-MSCs 的成骨过程中起着重要作用。据报道, 在 HNGF6A 处理后的小鼠胚胎成骨细胞前体细胞中, circRNA_0001843 可靶向结合 miR-214, 进而抑制 p38 和 JNK 的磷酸化。此外, circRNA_0001843 过表达和 miR-214 敲低均显著降低了 HNGF6A 的细胞保护和成骨促进作用。因此证明了 HNGF6A 通过靶向 circRNA_0001843/miR-214 通路及其下游激酶 p38 和 JNK, 保护成骨细胞免受氧化应激诱导的凋亡和成骨细胞表型抑制^[53]。

此外报道, circRNA_4214 在成骨诱导的牙周膜干细胞中表达显著上调, 并通过调控 miR-21 及 MAPKs 信号通路促进成骨^[51]。同时 circBANP、circITCH 分别与 miR-34a 和 miR-146a 相互作用, 通过 MAPKs 信号通路调节人牙周膜干细胞的成骨分化^[48]。

3.3 Notch信号通路

Notch 信号抑制 MSCs 向成骨细胞系的分化, 但在早期促进干细胞的增殖, 在后期 Notch 激活促进干细胞成骨向分化^[57]。有研究揭示, miR-199b-5p 过表达抑制 C3H10T1/2 细胞的生长, 而促进了转化生长因子- β 3 诱导 C3H10T1/2 细胞向软骨细胞分化, 增强软骨细胞特异性标志物 SOX9、aggrecan 和 II 型胶原 (Col2a1) 的基因和蛋白表达^[61]。而沉默 circIGSF11 被证实可以上调

miR-199b-5p 的表达^[37], 因此推测 circIGSF11/miR-199b-5p/JAG1 轴可能具有调控 C3H10T1/2 细胞软骨向分化的潜能。

另外, Notch 途径中重要的转录因子 kappa J 区重组信号结合蛋白 (RBPJ) 与 DAB1 启动子相互作用, 而不与 circDAB1 结合。circDAB1 过表达可导致 RBPJ 与 DAB1 启动子结合增强。circDAB1 通过结合和 miR-944 上调 RBPJ 的表达水平。过表达 circDAB1 可促进 BM-MSCs 的增殖和成骨分化。因此表明 circDAB1 通过 Notch/RBPJ 途径促进 BMSCs 增殖和成骨分化^[62]。

3.4 其他信号通路

PI3K/AKT 信号通路由 PI3K 和下游效应器 AKT 构成, 参与调控细胞存活、增殖、生长、分化等生理过程。有报道 circAFF4/miR-7223-5p/PIK3R1 轴在骨折愈合过程中具有促进作用^[55]。

此外有学者发现 circRNA_3140 与 Toll 样受体信号通路和 NF- κ B 信号通路相关。circRNA_3140 可作为 miR-21 的分子海绵, 间接靶向激活素受体 IIB 在机械力诱导 PDLSCs 成骨分化中发挥关键作用^[50]。

4 CircRNAs对成骨相关因子和蛋白的调控作用

4.1 矮小相关基因RUNX

矮小相关转录因子, 又称 RUNX 因子, 蛋白质定位于亚核区域, 并在基因启动子调控复合物的形成过程整合细胞信号^[61]。哺乳动物的 RUNX 转录因子由 RUNX1、RUNX2 和 RUNX3 组成, 其中 RUNX2 在胚胎发育和骨骼发育过程中起着至关重要的作用^[63]。已有大量研究表明 CircRNAs 能通过 miRNA 海绵作用调控 RUNX 因子参与组织成骨分化过程, 例如: circRUNX2 通过拮抗 miR-203, 间接促进 RUNX2 的表达, 从而发挥正向调控成骨分化的生物学功能^[30]。在 BMP2 诱导的 BM-MSCs 成骨分化过程中 circRNA_33287 作为 miR-214-3p 的分子海绵, miR-214-3p 可靶向 RUNX3 的 3' 端非编码区来调控表达^[11]。Xu 等研究发现, circ_0011269 在骨质疏松症患者标本中低表达, 并验证了 circRNA_0011269/miR-122 和 miR-122/RUNX2 的靶向关系, 证实了 circRNA_0011269 可以通过 miR-122 调控 RUNX2 的表达水平^[28]。同样, Han 等发现 circ_0076690

可通过靶向 miR-152 调控 RUNX2, 进而促进 BMSCs 的成骨分化^[31]。

另外, 在硅酸氢钙微粒诱导的 BM-MSCs 中敲低 circRNA_1983 的表达水平后, miR-6931 表达水平上调, 其靶基因 Gas7 和 RUNX2 的表达水平下降, 成骨分化受到抑制^[34]。circRNA_0026827 通过 miR-188-3p 的分子海绵, 间接调控下游 BECLIN 1 和 RUNX1 信号通路, 进而促进人 DPSCs 向成骨细胞分化^[43]。Yang 等证实, 人 BM-MSCs 中 circ-VANGL1 通过靶向 miRNA-217 来调节 RUNX2 的表达, 从而促进其成骨分化进程^[27]。

4.2 骨形态发生蛋白

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 信号通路在许多物种中高度保守, 其在骨骼系统模式形成中具有重要性。BMP 信号通路的紊乱会导致严重的骨缺损。这一途径是通过 BMP 配体与 BMP 受体 I 型和 II 型结合, 进一步激活细胞内的 Smads (Smad1、Smad5 和 Smad8) 蛋白, Smads 磷酸化可以与 co-Smad4 结合形成复合物, 该复合物可以移位到细胞核并触发骨相关基因的表达^[64]。

在降钙素基因相关肽诱导的小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 (MC3T3) 中, mm9_circ_009056 的表达上调, 而 miR-22-3p 的表达明显降低。沉默 mm9_circ_009056 可增加 miR-22-3p 的表达, 降低 BMP7、RUNX2 的基因和蛋白水平。后续实验进一步证实 mm9_circ_009056 可作为 miR-22-3p 的分子海绵调控 BMP7、RUNX2 的表达, 进而发挥促进小鼠胚胎成骨细胞前体细胞成骨分化的生物学作用^[52]。此外, Ge 等报道 circSIPA1L1 通过吸附 miR-617 影响下游靶基因 Smad3 的表达水平, 进而促进 DPSCs 成骨^[65]。

Chen 等发现在大鼠牙囊细胞成骨分化过程中, circFGFR2 和 BMP6 表达增加, miR-133 表达降低。在此之前已有研究发现 circFGFR2 可以通过用靶向结合海绵 miR-133a-5p 和 miR-29b-1-5p 促进骨骼肌增殖和分化^[66]。因此猜想 circFGFR2/miR-133/BMP6 可能在牙齿再生和骨形成过程中发挥重要作用^[10]。

4.3 人源重组蛋白

人源重组蛋白 (Nell-1) 是一种分泌型成骨生长因子。circRFWD2 和 circINO80 可以调节

Hsa-miR-6817-5p 的表达, 并影响重组 NELL-1 诱导的人脂肪干细胞的成骨分化^[47]。骨不连患者的 BM-MSCs 中 circRNA_0074834 的表达降低。circRNA_0074834 可作为 ceRNA 靶向 miR-942-5p 调控 ZEB1 和 VEGF 的表达, 进而促进 BM-MSCs 的成骨分化和骨缺损的修复^[35]。

4.4 整合素5

有报道称 circRNA-vgl3 通过直接靶向 miR-326-5p 调控 ADSCs 的成骨分化, miR-326-5p 通过抑制整合素 5 (integrin alpha5, ITGA5) 的翻译而阻断成骨分化。ITGA5 属于整合素受体家族, 介导细胞粘附。在研究中, circRNA-vgl3 可以显著促进 ITGA5 的表达, 因此, 过表达 circRNA-vgl3 的 ADSCs 可能具有更强的细胞粘附能力, 包括归巢效应和骨祖细胞募集。此外, ITGA5 与骨形成过程密切相关。在体内实验中, 将 ADSCs 附载于 CPC 支架上, 在过表达 circRNA-vgl3 组中缺损区新骨形成水平显著增加, 证实 circRNA-vgl3 可增强骨的粘附、增加骨祖细胞募集和促进成骨分化^[46]。

4.5 骨糖蛋白

骨糖蛋白 (Osteoglycin, OGN) 也被称为骨诱导因子或 Mimecan, 是一种分泌到细胞外基质中的富含亮氨酸的小蛋白多糖, 最初是从牛骨中分离出来的, 作为基质矿化的诱导剂, 在调节骨骼对改变能量平衡的适应性反应中起着关键作用^[67]。Wen 等发现, circ_0076906 可以结合 miR-1305 并调节其靶基因 OGN 的表达, 从而调节人 BM-MSCs 的成骨分化, 减缓骨质疏松的进展^[26]。

4.6 A激酶锚定蛋白2

A 激酶锚定蛋白 2 (A-kinase anchoring protein 2, AKAP2) 可能参与信号通路中的极性形成或参与构建 PKA-RII 效应物复合物, 以捕获、扩增和聚焦弥散性跨细胞 cAMP 信号传导系统^[68]。许多研究揭示 AKAP2 的突变与骨疾病有关, 其被鉴定为中国特发性脊柱侧弯家庭突变的新基因^[68]。Lin 等发现, 抑制 circ-SLC8A1 可降低 BMSCs 矿化结节的形成, 其机制主要是 circ-SLC8A1 可以充当 ceRNA, 通过 miRNA 海绵作用调节 miR-516b-5p 进一步调节 AKAP2 的表达, 进而促进 BMSCs 的成骨分化^[36]。

4.7 FoXO1 因子

FoXO1 是 FOXO 的 O 类成员, 是骨骼中酶

抗氧化防御的主要调节剂, 在成骨细胞中敲除 FoXO1 会降低骨量和成骨细胞, 而在成骨细胞中 FoXO3 或 FoXO4 不会影响骨量, 研究表明 FoXO1 是预防和治疗骨质疏松症的潜在靶标, FoXO1 通过调节成骨细胞的增殖和氧化还原平衡来促进骨形成^[69]。在糖皮质激素诱发的骨质疏松症研究中发现, circ_0006393 通过调控 miR-145-5p 并上调 FoXO1 来提高骨重塑过程中成骨基因的表达水平, 进而促进细胞成骨分化, GioP 小鼠模型也证实了 circ_0006393 的促成骨潜能^[33]。

5 结语

目前骨缺损和骨质疏松等骨疾病的诊断及治疗方法仍在不断的更新迭代中, 近年来 CircRNAs 在生物矿化中所发挥的生物学作用已受到广泛研究及关注, 但在基因表达及调控方面尚待解决的问题还有很多, 例如在不同细胞系之间 CircRNAs-miRNAs 调控网络是否成立; 在 CircRNAs 调控网络中, 各通路之间是否存在一定的协同作用; CircRNAs-miRNAs-mRNAs 轴在成骨过程中调控方式以及其相互作用的具体分子机制。与此同时, CircRNAs 能否通过翻译蛋白或直接结合蛋白来调控成骨还有待研究。对 CircRNAs 在成骨分化中的进一步深入研究将为骨缺损和骨质疏松等骨疾病的诊断和治疗提供新的思路。

参考文献

- 1 Cocquerelle C, Mascrez B, Héтуin D, et al. Mis-splicing yields circular RNA molecules[J]. FASEB J, 1993, 7(1):155-160. DOI: 10.1096/fasebj.7.1.7678559.
- 2 Sanger HL, Klotz G, Riesner D, et al. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1976, 73(11): 3852-3856. DOI: 10.1073/pnas.73.11.3852.
- 3 Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. RNA, 2013, 19(2): 141-157. DOI: 10.1261/ma.035667.112.
- 4 Glažar P, Papavasileiou P, Rajewsky N. CircBase: a database for circular RNAs[J]. RNA, 2014, 20(11): 1666-1670. DOI: 10.1261/ma.043687.113.
- 5 Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glažar P, et al. Circular

- RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed[J]. *Mol Cell*, 2015, 58(5): 870–885. DOI: [10.1016/j.molcel.2015.03.027](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.03.027).
- 6 Yu CY, Li TC, Wu YY, et al. The circular RNA circBIRC6 participates in the molecular circuitry controlling human pluripotency[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1149. DOI: [10.1038/s41467-017-01216-w](https://doi.org/10.1038/s41467-017-01216-w).
- 7 You X, Vlatkovic I, Babic A, et al. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity[J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(4): 603–610. DOI: [10.1038/nn.3975](https://doi.org/10.1038/nn.3975).
- 8 Han D, Li J, Wang H, et al. Circular RNA circMTO1 acts as the sponge of microRNA-9 to suppress hepatocellular carcinoma progression[J]. *Hepatology*, 2017, 66(4): 1151–1164. DOI: [10.1002/hep.29270](https://doi.org/10.1002/hep.29270).
- 9 Kristensen LS, Okholm TLH, Venø MT, et al. Circular RNAs are abundantly expressed and upregulated during human epidermal stem cell differentiation[J]. *RNA Biol*, 2018, 15(2): 280–291. DOI: [10.1080/15476286.2017.1409931](https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1409931).
- 10 Du Y, Li J, Hou Y, et al. Alteration of circular RNA expression in rat dental follicle cells during osteogenic differentiation[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 13289–13301. DOI: [10.1002/jcb.28603](https://doi.org/10.1002/jcb.28603).
- 11 Peng W, Zhu S, Chen J, 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: 1709–1717. DOI: [10.1016/j.biopha.2018.10.159](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.159).
- 12 Qian DY, Yan GB, Bai B, et al. Differential circRNA expression profiles during the BMP2-induced osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 492–499. DOI: [10.1016/j.biopha.2017.03.051](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.03.051).
- 13 Zheng Y, Li X, Huang Y, et al. The circular RNA landscape of periodontal ligament stem cells during osteogenesis[J]. *J Periodontol*, 2017, 88(9): 906–914. DOI: [10.1902/jop.2017.170078](https://doi.org/10.1902/jop.2017.170078).
- 14 Meng S, Zhou H, Feng Z, et al. CircRNA: functions and properties of a novel potential biomarker for cancer[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 94. DOI: [10.1186/s12943-017-0663-2](https://doi.org/10.1186/s12943-017-0663-2).
- 15 Li X, Yang L, Chen LL. The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs[J]. *Mol Cell*, 2018, 71(3): 428–442. DOI: [10.1016/j.molcel.2018.06.034](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.034).
- 16 Wesselhoeft RA, Kowalski PS, Anderson DG. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2629. DOI: [10.1038/s41467-018-05096-6](https://doi.org/10.1038/s41467-018-05096-6).
- 17 Liang D, Wilusz JE. Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production[J]. *Genes Dev*, 2014, 28(20): 2233–2247. DOI: [10.1101/gad.251926.114](https://doi.org/10.1101/gad.251926.114).
- 18 Dong R, Ma XK, Chen LL, et al. Increased complexity of circRNA expression during species evolution[J]. *RNA Biol*, 2017, 14(8): 1064–1074. DOI: [10.1080/15476286.2016.1269999](https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1269999).
- 19 Werfel S, Nothjunge S, Schwarzmayr T, et al. Characterization of circular RNAs in human, mouse and rat hearts[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 98: 103–107. DOI: [10.1016/j.yjmcc.2016.07.007](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.07.007).
- 20 Chen W, Schuman E. Circular RNAs in brain and other tissues: a functional enigma[J]. *Trends Neurosci*, 2016, 39(9): 597–604. DOI: [10.1016/j.tins.2016.06.006](https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.06.006).
- 21 Bianco P, Cao X, Frenette PS, et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine[J]. *Nat Med*, 2013, 19(1): 35–42. DOI: [10.1038/nm.3028](https://doi.org/10.1038/nm.3028).
- 22 Yousefi AM, James PF, Akbarzadeh R, et al. Prospect of stem cells in bone tissue engineering: a review[J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 6180487. DOI: [10.1155/2016/6180487](https://doi.org/10.1155/2016/6180487).
- 23 Zhang W, Dong R, Diao S, et al. Differential long noncoding RNA/mRNA expression profiling and functional network analysis during osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 30. DOI: [10.1186/s13287-017-0485-6](https://doi.org/10.1186/s13287-017-0485-6).
- 24 Wu Y, Lian K, Sun C. LncRNA LEF1-AS1 promotes osteogenic differentiation of dental pulp stem cells via sponging miR-24-3p[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 475(1–2): 161–169. DOI: [10.1007/s11010-020-03868-7](https://doi.org/10.1007/s11010-020-03868-7).
- 25 Li M, Cong R, Yang L, et al. A novel lncRNA LNC_000052 leads to the dysfunction of osteoporotic BMSCs via the miR-96-5p – PIK3R1 axis[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(9): 795. DOI: [10.1038/s41419-020-03006-7](https://doi.org/10.1038/s41419-020-03006-7).
- 26 Wen J, Guan Z, Yu B, et al. Circular RNA hsa_circ_0076906 competes with OGN for miR-1305 binding

- site to alleviate the progression of osteoporosis[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2020, 122: 105719. DOI: [10.1016/j.biocel.2020.105719](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105719).
- 27 Yang L, Zeng Z, Kang N, et al. Circ-VANGL1 promotes the progression of osteoporosis by absorbing miRNA-217 to regulate RUNX2 expression[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(3): 949-957. DOI: [10.26355/eurev_201902_16981](https://doi.org/10.26355/eurev_201902_16981).
- 28 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, 121(12): 4819-4826. DOI: [10.1002/jcb.29709](https://doi.org/10.1002/jcb.29709).
- 29 Yu L, Liu Y. CircRNA_0016624 could sponge miR-98 to regulate BMP2 expression in postmenopausal osteoporosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516(2): 546-550. DOI: [10.1016/j.bbrc.2019.06.087](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.06.087).
- 30 Yin Q, Wang J, Fu Q, et al. CircRUNX2 through has - miR - 203 regulates RUNX2 to prevent osteoporosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(12): 6112-6121. DOI: [10.1111/jcmm.13888](https://doi.org/10.1111/jcmm.13888).
- 31 Han S, Kuang M, Sun C, et al. Circular RNA hsa_circ_0076690 acts as a prognostic biomarker in osteoporosis and regulates osteogenic differentiation of hBMSCs via sponging miR-152[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(14): 15011-15020. DOI: [10.18632/aging.103560](https://doi.org/10.18632/aging.103560).
- 32 Huang Y, Xiao D, Huang S, et al. Circular RNA YAP1 attenuates osteoporosis through up-regulation of YAP1 and activation of Wnt/beta-catenin pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110365. DOI: [10.1016/j.biopha.2020.110365](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110365).
- 33 Wang XB, Li PB, Guo SF, et al. CircRNA_0006393 promotes osteogenesis in glucocorticoid-induced osteoporosis by sponging miR1455p and upregulating FOXO1[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(3): 2851-2858. DOI: [10.3892/mmr.2019.10497](https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10497).
- 34 Zhong W, Li X, Pathak JL, et al. Dicalcium silicate microparticles modulate the differential expression of circRNAs and mRNAs in BMSCs and promote osteogenesis via circ_1983-miR-6931-Gas7 interaction[J]. *Biomater Sci*, 2020, 8(13): 3664-3677. DOI: [10.1039/d0bm00459f](https://doi.org/10.1039/d0bm00459f).
- 35 Ouyang Z, Tan T, Zhang X, et al. CircRNA hsa_circ_0074834 promotes the osteogenesis-angiogenesis coupling process in bone mesenchymal stem cells (BMSCs) by acting as a ceRNA for miR-942-5p[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(12): 932. DOI: [10.1038/s41419-019-2161-5](https://doi.org/10.1038/s41419-019-2161-5).
- 36 Lin C, Zhong W, Yan W, et al. Circ-SLC8A1 regulates osteoporosis through blocking the inhibitory effect of miR-516b-5p on AKAP2 expression[J]. *J Gene Med*, 2020, 22(11): e3263. DOI: [10.1002/jgm.3263](https://doi.org/10.1002/jgm.3263).
- 37 Zhang M, Jia L, Zheng Y. CircRNA expression profiles in human bone marrow stem cells undergoing osteoblast differentiation[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2019, 15(1): 126-138. DOI: [10.1007/s12015-018-9841-x](https://doi.org/10.1007/s12015-018-9841-x).
- 38 Kuang MJ, Xing F, Wang D, et al. CircUSP45 inhibited osteogenesis in glucocorticoid-induced osteonecrosis of femoral head by sponging miR-127-5p through PTEN/AKT signal pathway: experimental studies[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 509(1): 255-261. DOI: [10.1016/j.bbrc.2018.12.116](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.116).
- 39 Zhu S, Zhu Y, Wang Z, et al. Bioinformatics analysis and identification of circular RNAs promoting the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on titanium treated by surface mechanical attrition[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e9292. DOI: [10.7717/peerj.9292](https://doi.org/10.7717/peerj.9292).
- 40 Ge X, Li Z, Jing S, et al. Parathyroid hormone enhances the osteo/odontogenic differentiation of dental pulp stem cells via ERK and P38 MAPK pathways[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(2): 1209-1221. DOI: [10.1002/jcp.29034](https://doi.org/10.1002/jcp.29034).
- 41 Li C, Jiang H. Altered expression of circular RNA in human dental pulp cells during odontogenic differentiation[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(2): 871-878. DOI: [10.3892/mmr.2019.10359](https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10359).
- 42 Ferrarotti F, Romano F, Gamba MN, et al. Human intrabony defect regeneration with micrografts containing dental pulp stem cells: a randomized controlled clinical trial[J]. *J Clin Periodontol*, 2018, 45(7): 841-850. DOI: [10.1111/jcpe.12931](https://doi.org/10.1111/jcpe.12931).
- 43 Ji F, Zhu L, Pan J, et al. Hsa_circ_0026827 promotes osteoblast differentiation of human dental pulp stem cells through the beclin1 and RUNX1 signaling pathways by sponging miR-188-3p[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 470. DOI: [10.3389/fcell.2020.00470](https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00470).
- 44 Laloze J, Fiévet L, Desmoulière A. Adipose-derived stromal cell in regenerative medicine: a review[J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2021, 10(1): 24-28. DOI: [10.1089/wound.2020.1175](https://doi.org/10.1089/wound.2020.1175).

- 45 Betz VM, Kochanek S, Rammelt S, et al. Recent advances in gene - enhanced bone tissue engineering[J]. *The Journal of Gene Medicine*, 2018, 20(6): e3018. DOI: [10.1002/jgm.3018](https://doi.org/10.1002/jgm.3018).
- 46 Zhang D, Ni N, Wang Y, et al. CircRNA-vgl3 promotes osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells via modulating miRNA-dependent integrin $\alpha 5$ expression[J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(1): 283-302. DOI: [10.1038/s41418-020-0600-6](https://doi.org/10.1038/s41418-020-0600-6).
- 47 Huang X, Cen X, Zhang B, et al. The roles of circRFWD2 and circINO80 during NELL - 1 - induced osteogenesis[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(12): 8432-8441. DOI: [10.1111/jcmm.14726](https://doi.org/10.1111/jcmm.14726).
- 48 Gu X, Li M, Jin Y, et al. Identification and integrated analysis of differentially expressed lncRNAs and circRNAs reveal the potential ceRNA networks during PDLSC osteogenic differentiation[J]. *BMC Genet*, 2017, 18(1): 100. DOI: [10.1186/s12863-017-0569-4](https://doi.org/10.1186/s12863-017-0569-4).
- 49 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](https://doi.org/10.1186/s13287-018-0976-0).
- 50 Wang H, Feng C, Jin Y, et al. Identification and characterization of circular RNAs involved in mechanical force - induced periodontal ligament stem cells[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 10166-10177. DOI: [10.1002/jcp.27686](https://doi.org/10.1002/jcp.27686).
- 51 Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, et al. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3 - E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development[J]. *J Bone Miner Res*, 1992, 7(6): 683-692. DOI: [10.1002/jbmr.5650070613](https://doi.org/10.1002/jbmr.5650070613).
- 52 Wu C, Zheng Z, Ren W, et al. Mm9_circ_009056 enhances osteogenesis by targeting BMP7 via CGRP-mediated miR-22 - 3p[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 501(1): 199-205. DOI: [10.1016/j.bbrc.2018.04.215](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.215).
- 53 Zhu X, Zhao Z, Zeng C, et al. HNGF6A inhibits oxidative stress-induced MC3T3-E1 cell apoptosis and osteoblast phenotype inhibition by targeting circ_0001843/mir-214 pathway[J]. *Calcif Tissue Int*, 2020, 106(5): 518-532. DOI: [10.1007/s00223-020-00660-z](https://doi.org/10.1007/s00223-020-00660-z).
- 54 Cao Z, Zhang Y, Wei S, et al. Comprehensive circRNA expression profile and function network in osteoblast-like cells under simulated microgravity[J]. *Gene*, 2021, 764: 145106. DOI: [10.1016/j.gene.2020.145106](https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145106).
- 55 Mi B, Xiong Y, Chen L, et al. CircRNA AFF4 promotes osteoblast cells proliferation and inhibits apoptosis via the Mir-7223-5p/PIK3R1 axis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(24): 11988-12001. DOI: [10.18632/aging.102524](https://doi.org/10.18632/aging.102524).
- 56 Huang P, Yan R, Zhang X, et al. Activating Wnt/ β -catenin signaling pathway for disease therapy: challenges and opportunities[J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 196: 79-90. DOI: [10.1016/j.pharmthera.2018.11.008](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.11.008).
- 57 Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments[J]. *Nat Med*, 2013, 19(2): 179-192. DOI: [10.1038/nm.3074](https://doi.org/10.1038/nm.3074).
- 58 Zhao R, Li Y, Lin Z, et al. miR-199b-5p modulates BMSC osteogenesis via suppressing GSK-3 β / β -catenin signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 477(4): 749-754. DOI: [10.1016/j.bbrc.2016.06.130](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.130).
- 59 Jiang N, Chen WJ, Zhang JW, et al. Downregulation of miR-432 activates Wnt/ β -catenin signaling and promotes human hepatocellular carcinoma proliferation[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(10): 7866-7879. DOI: [10.18632/oncotarget.3492](https://doi.org/10.18632/oncotarget.3492).
- 60 Kim HY, Park SY, Choung SY. Enhancing effects of myricetin on the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via BMP-2/Smad and ERK/JNK/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 834: 84-91. DOI: [10.1016/j.ejphar.2018.07.012](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.012).
- 61 Zhang M, Yuan SZ, Sun H, et al. miR-199b-5p promoted chondrogenic differentiation of C3H10T1/2 cells by regulating JAG1[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2020, 14(11): 1618-1629. DOI: [10.1002/term.3122](https://doi.org/10.1002/term.3122).
- 62 Chia W, Liu J, Huang YG, et al. A circular RNA derived from DAB1 promotes cell proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs via RBPJ/DAB1 axis[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(5): 372. DOI: [10.1038/s41419-020-2572-3](https://doi.org/10.1038/s41419-020-2572-3).
- 63 Mevel R, Draper JE, Lie-A-Ling M, et al. RUNX transcription factors: orchestrators of development[J]. *Development*, 2019, 146(17): dev148296. DOI: [10.1242/dev.148296](https://doi.org/10.1242/dev.148296).
- 64 Chen G, Xu H, Yao Y, et al. BMP signaling in the

- development and regeneration of cranium bones and maintenance of calvarial stem cells[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 135. DOI: [10.3389/fcell.2020.00135](https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00135).
- 65 Ge X, Li Z, Zhou Z, et al. Circular RNA SIPA1L1 promotes osteogenesis via regulating the miR-617/Smad3 axis in dental pulp stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 364. DOI: [10.1186/s13287-020-01877-3](https://doi.org/10.1186/s13287-020-01877-3).
- 66 Chen X, Ouyang H, Wang Z, et al. A novel circular RNA generated by FGFR2 gene promotes myoblast proliferation and differentiation by sponging miR-133a-5p and miR-29b-1-5p[J]. *Cells*, 2018, 7(11): 199. DOI: [10.3390/cells7110199](https://doi.org/10.3390/cells7110199).
- 67 Lee NJ, Ali N, Zhang L, et al. Osteoglycin, a novel coordinator of bone and glucose homeostasis[J]. *Mol Metab*, 2018, 13: 30–44. DOI: [10.1016/j.molmet.2018.05.004](https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.05.004).
- 68 Li W, Li Y, Zhang L, et al. AKAP2 identified as a novel gene mutated in a Chinese family with adolescent idiopathic scoliosis[J]. *J Med Genet*, 2016, 53(7): 488–493. DOI: [10.1136/jmedgenet-2015-103684](https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103684).
- 69 Liao L, Su X, Yang X, et al. TNF- α inhibits FoxO1 by upregulating miR-705 to aggravate oxidative damage in bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteoporosis[J]. *Stem Cells*, 2016, 34(4): 1054–1067. DOI: [10.1002/stem.2274](https://doi.org/10.1002/stem.2274).

收稿日期: 2020 年 10 月 13 日 修回日期: 2020 年 12 月 06 日
本文编辑: 李 阳 曾宪涛

引用本文: 董惠贤, 钟嘉琳, 江千舟. 环状 RNA 在成骨分化中的作用[J]. 医学新知, 2021, 31(1): 23–32. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.2021.01.04](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.2021.01.04).
Dong HX, Zhong JL, Jiang QZ. Functions of CircRNAs in osteogenic differentiation[J]. *Yixue Xinzhi Zhazhi*, 2021, 31(1): 23–32. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.2021.01.04](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.2021.01.04).