

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.14.001

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220623.0850.004.html\(2022-06-23\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220623.0850.004.html(2022-06-23))

miR-152-3p 通过调控 DUSP1 对激素性股骨头坏死 BMSCs 成骨分化的作用研究^{*}

李双庆¹, 崔书伟², 武瑞臣³

(1. 沧州市中心医院骨三科, 河北沧州 061000; 2. 冀中能源峰峰集团总医院邯郸院区骨四科, 河北邯郸 056000; 3. 邯郸市中心医院急诊外一科, 河北邯郸 056000)

[摘要] **目的** 探讨 miR-152-3p 通过调控双特异性磷酸酶 1(DUSP1)对激素性股骨头坏死骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨分化的作用。**方法** 取健康人、激素性股骨头坏死患者骨髓组织进行 BMSCs 分离、培养及鉴定,检测 miR-152-3p、DUSP1 mRNA 表达及转染后检测各组细胞 miR-152-3p、碱性磷酸酶(ALP)、骨形态发生蛋白 2(BMP-2)mRNA 表达,验证 miR-152-3p 与 DUSP1 的靶向关系,检测 DUSP1、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)、胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)等蛋白表达。**结果** 与健康人 BMSCs 比较,激素性股骨头坏死患者 BMSCs miR-152-3p mRNA 表达升高,DUSP1 mRNA 表达降低($P<0.05$)。与空白组、对照组比较,转染组 miR-152-3p mRNA 表达降低,ALP、BMP-2 mRNA 表达升高($P<0.05$)。TargetScan 软件分析发现,DUSP1 3'UTR 含有 miR-152-3p 的结合位点。与对照组和空白组比较,转染组 DUSP1 mRNA 3'UTR 野生型荧光素酶报告质粒相对活性值降低,DUSP1 蛋白表达升高,p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/ERK1、p-ERK2/ERK2 蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论** 低表达 miR-152-3p 可促进激素性股骨头坏死 BMSCs 成骨分化,作用机制可能与调控 DUSP1 表达,抑制 MAPK 通路有关。

[关键词] 激素性股骨头坏死;骨髓间充质干细胞;成骨分化;微小 RNA-152-3p;双特异性磷酸酶 1

[中图分类号] R285.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2022)14-2341-05

Effect of miR-152-3p on osteogenic differentiation of BMSCs in steroid induced necrosis of femoral head by regulating DUSP1^{*}

LI Shuangqing¹, CUI Shuwei², WU Ruichen³

(1. Third Department of Orthopedics, Cangzhou Municipal Central Hospital, Cangzhou, Hebei 061000, China; 2. Fourth Department of Orthopedics, Handan Campus, General Hospital of Jizhong Energy Fengfeng Group, Handan, Hebei 056000, China; 3. First Department of Emergency Surgery, Handan Municipal Central Hospital, Handan, Hebei 056000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of microRNA (miR)-152-3p on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in steroid induced necrosis of the femoral head by regulating dual specificity phosphatase 1 (DUSP1). **Methods** The bone marrow was taken from the healthy people and the subjects with steroid induced femoral head necrosis for conducting the isolation, culture and identification of BMSCs. The expression levels of miR-152-3p and DUSP1 mRNA and the expression levels of miR-152-3p, alkaline phosphatase (ALP) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) mRNA after transfection were detected to verify the targeting relationship between miR-152-3p and DUSP1. The expressions of DUSP1, p38 MAPK and ERK1/2 proteins were detected. **Results** Compared with BMSCs in healthy people, the expression level of miR-152-3p mRNA in BMSCs of the subjects with steroid induced femoral head necrosis was increased, while the expression level of DUSP1 mRNA was decreased ($P<0.05$). Compared with the blank group and control group, the expression level of miR-152-3p mRNA in the transfection group was decreased, while the expression levels of ALP and BMP-2 mRNA were increased ($P<0.05$). The Targetscan software analysis found that DUSP1 3'UTR contained the miR-152-3p binding site. Compared with the control group and blank group, the relative activity of DUSP1 mRNA 3'UTR wild-type luciferase reporter plasmid in the transfection group was decreased, the relative expression level of DUSP1 protein was increased, and the ex-

^{*} 基金项目:河北省医学科学研究项目(20200320)。 作者简介:李双庆(1977—),副主任医师,硕士,主要从事骨关节研究。

pression levels of p-p38 MAPK/p38 MAPK, p-ERK1/ERK1, p-ERK2/ERK2 protein were decreased ($P < 0.05$).

Conclusion Low expression of miR-152-3p can promote the osteogenic differentiation of steroid induced necrosis of femoral head BMSCs, and the mechanism may be related to regulate the expression of DUSP1 and inhibit MAPK pathway.

[Key words] steroid induced necrosis of the femoral head; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; microRNA-152-3p; dual specificity phosphatase 1

激素性股骨头坏死主要是短期或长期应用糖皮质激素所致的代谢性疾病, 临床特征包括股骨头结构坏死、股骨头塌陷、关节功能障碍等^[1]。miRNA 是一种非蛋白编码小 RNA 分子, 可在转录后调节基因表达, 参与调控细胞增殖、分化、凋亡等多种病理生理过程^[2]。有研究发现^[3], 激素性股骨头坏死可能是因激素作用导致细胞内一些 miRNA 表达改变, 调控相应靶基因表达, 对正常骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 成骨分化造成干扰, 影响正常骨细胞修复。还有报道显示^[4], miR-152-3p 在地塞米松刺激的 BMSCs 中表达上调, 但就其对激素性股骨头坏死 BMSCs 成骨分化作用及机制尚无明确定论。本研究重点分析 miR-152-3p 对激素性股骨头坏死 BMSCs 成骨分化的作用, 探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 病例选择

收集 2019 年 1 月至 2020 年 1 月沧州市中心医院 10 例确诊激素性股骨头坏死并行全髋关节置换术患者及 10 例健康志愿者骨髓组织各 10 mL, 患者及健康志愿者平均年龄相近 [(50.63 ± 7.15) 岁 vs. (51.87 ± 8.09) 岁]。本研究经医院伦理委员会批准 (CZSZXY20190006), 研究对象均自愿签署知情同意书。

1.2 主要试剂和仪器

LipofectamineTM3000 试剂、胎牛血清、DMEM 培养基、胰蛋白酶 (赛默飞世尔科技公司), miR-152-3p 小干扰 RNA (siRNA)、阴性对照 NC-siRNA 质粒 (美国 Applied Biosystems 公司), 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 试剂盒 (德国 Qiagen 公司), 兔抗人双特异性磷酸酶 1 (dual specificity phosphatase 1, DUSP1)、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)、磷酸化 p38 MAPK (phosphorylated-p38 MAPK, p-p38 MAPK)、胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2)、磷酸化 ERK1/2 (phosphorylated-ERK1/2, p-ERK1/2) 一抗及山羊抗兔 IgG 二抗 (美国 Abcam 公司), DMIL-PH1 型倒置相差显微镜 (德国徕卡微系统有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 BMSCs 分离、培养及鉴定

取健康人、激素性股骨头坏死患者骨髓组织, 置于含 5 mL PBS 离心管, 吹打混匀, 制备细胞悬液。置

于含 1.073 g/mL 淋巴细胞分离液离心管内, 2 000 r/min 离心 30 min, 离心半径 8 cm, 收集白膜层单个核细胞, 置于含 10% 胎牛血清、低糖型 DMEM 培养基, 细胞密度 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 。37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, 每隔 3 d 更换 1 次培养液。观察细胞生长融合率 ≥ 80%, 培养瓶内加含 0.25% 胰蛋白酶、0.02% EDTA 的细胞消化液 1 mL, 1:2 传代比例转移到新培养瓶, 继续培养。实验取第 3 代细胞, 镜下观察 BMSCs 细胞形态学。

1.3.2 RT-PCR 检测健康人与激素性股骨头坏死患者 BMSCs 中 miR-152-3p、DUSP1 mRNA 表达

取健康人、激素性股骨头坏死患者对数生长期 BMSCs, Trizol 法提取总 RNA, 纯化, 逆转录获得互补链 cDNA。反应体系: SYBR[®] Premix Ex TaqTM 12.5 μL, cDNA 模版 2 μL, 上下游引物各 1 μL。反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 5 s; 60 °C 退火延伸 20 s, 40 个循环。引物设计: miR-152-3p: 上游引物 5'-TCG TCG AAG TGT TTC AGC A-3', 下游引物 5'-TGG CAC CTC TCA AGC GTC A-3'。DUSP1: 上游引物 5'-GAA CTT CAG TGT TCG TGC A-3', 下游引物 5'-CTC GCA CTG TCC GTC AAG A-3'。GAPDH: 上游引物 5'-AAT CAC TAC GTC CAC TTC T-3', 下游引物 5'-CTG GTT GTC ATC ACA CTC G-3'。凝胶电泳, 观察电泳条带, 以 GAPDH 为内参, 计算 miR-152-3p、DUSP1 mRNA 相对表达情况 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)。

1.3.3 细胞转染及分组

取人激素性股骨头坏死对数生长期 BMSCs, 以含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基培养。细胞融合度达 70% 时, 根据 LipofectamineTM3000 转染试剂说明书转染。以转染 miR-152-3p-siRNA 细胞作为转染组, 转染 NC-siRNA 质粒细胞作为对照组, 未经任何处理 BMSCs 为空白组。转染 48 h 后, 经倒置显微镜观察转染效率 (发绿色荧光细胞数/细胞总数 × 100%), 重复 5 次, 取平均值。

1.3.4 转染后各组细胞 miR-152-3p mRNA 表达

取 1.3.3 中细胞, 接种于 96 孔板, 各组设 5 个复孔。细胞贴壁后, 以 Trizol 法提取总 RNA, 按照 1.3.2 步骤进行 RT-PCR 检测, 反应体系、反应条件、引物设计保持一致, 计算 miR-152-3p mRNA 相对表达水平 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)。

1.3.5 成骨分化能力评估

取1.3.3中细胞,接种于96孔板,细胞密度 $2\times 10^4/\text{cm}^2$ 。细胞生长至70%~80%,将培养液更换成骨诱导培养液继续培养。每隔2d更换1次培养液。诱导后第12天,RT-PCR检测成骨表型标志基因碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)、骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2,BMP-2)mRNA相对表达水平,评估成骨分化能力。

1.3.6 miR-152-3p与DUSP1的靶向关系验证

利用生物信息学软件TargetScan初步预测miR-152-3p与DUSP1 3'UTR的结合位点。含miRNA可能结合位点的DUSP1 mRNA的3'UTR质粒由上海生工生物工程股份有限公司合成并鉴定,转染前24h,取对数生长期BMSCs,在96孔板内接种。观察细胞生长至70%,将DUSP1 mRNA 3'UTR野生型和突变型荧光素酶报告质粒与内参海肾荧光素酶质粒pRLTK转染至空白组、转染组、对照组,孵育48h。检测荧光素酶强度,计算相对荧光素酶活性(萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性)。

1.3.7 DUSP1、p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/ERK1、p-ERK2/ERK2蛋白表达

取1.3.3中细胞,PBS清洗2次,冰上裂解。4℃12 000 r/min离心10 min,离心半径8 cm,取上清液。二奎啉甲酸法行蛋白定量,加上样缓冲液,沸水浴10 min,变性。凝胶电泳,分离蛋白,转膜,加5%脱脂奶粉封闭1 h。加DUSP1、p-p38 MAPK、p38 MAPK、p-ERK1、ERK1、p-ERK2、ERK2一抗(1:1 000),4℃摇床孵育过夜。TBST洗膜4次,每次10 min。加二抗(1:2 500),室温孵育2 h。TBST洗膜4次,每次10 min。加ECL试剂,显影曝光。以目的蛋白条带灰度值与GAPDH条带灰度值比值表示目的蛋白相对表达。

1.4 统计学处理

采用SPSS19.0统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,重复计量资料比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs细胞形态学

BMSCs呈长梭形,表现为典型成纤维细胞生长;培养第8~10天,细胞生长达80%以上,见图1。

2.2 不同研究对象BMSCs中miR-152-3p、DUSP1 mRNA表达比较

与健康人比较,激素性股骨头坏死患者BMSCs中miR-152-3p mRNA表达升高,DUSP1 mRNA表达降低($P<0.05$),见表1。

2.3 转染效率

镜下观察显示,转染组转染效率91.12%,对照组转染效率89.45%,可用于后续实验,见图2。

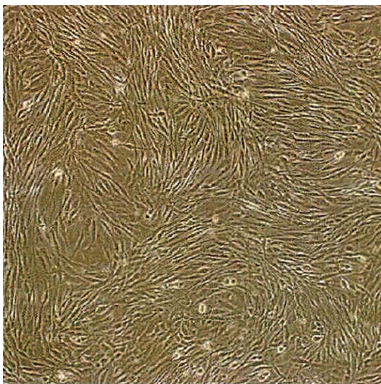
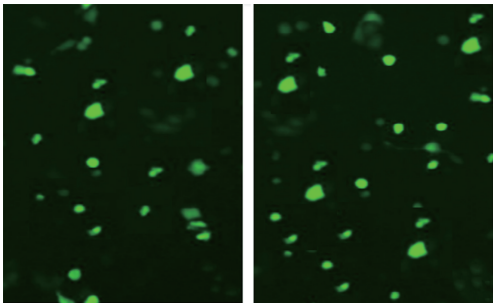


图1 BMSCs细胞形态(×200)

表1 各组miR-152-3p、DUSP1 mRNA表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	miR-152-3p	DUSP1
健康人	5	1.03±0.28	1.02±0.17
激素性股骨头坏死者	5	2.84±0.32	0.47±0.11
<i>t</i>		9.518	6.074
<i>P</i>		<0.001	<0.001



对照组 转染组

图2 BMSCs转染后显微镜下绿色荧光情况(×200)

2.4 各组细胞miR-152-3p mRNA表达比较

转染组miR-152-3p mRNA表达(0.48 ± 0.17)与空白组(1.12 ± 0.18)、对照组(1.13 ± 0.21)比较,差异有统计学意义($P<0.05$);空白组与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。各组miR-152-3p mRNA表达比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 各组细胞ALP、BMP-2 mRNA表达比较

各组ALP、BMP-2 mRNA表达比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。与空白组、对照组比较,转染组ALP、BMP-2 mRNA表达升高($P<0.05$);空白组与对照组ALP、BMP-2 mRNA表达比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。

表2 各组ALP、BMP-2 mRNA表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	ALP	BMP-2
空白组	5	0.85±0.05	0.79±0.07
对照组	5	0.86±0.07	0.78±0.08
转染组	5	2.41±0.09 ^{ab}	1.86±0.08 ^{ab}
<i>F</i>		780.032	326.469
<i>P</i>		<0.001	<0.001

^a: $P<0.05$,与空白组比较;^b: $P<0.05$,与对照组比较。

2.6 验证结果

TargetScan 软件分析发现,DUSP1 3'UTR 含有 miR-152-3p 的结合位点,见图 3。各组 DUSP1 mRNA 3'UTR 野生型荧光素酶报告质粒相对活性值比较,差异有统计学意义($P<0.05$);各组 DUSP1 mRNA 3'UTR 突变型荧光素酶报告质粒相对活性值比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组和空白组比较,转染组 DUSP1 mRNA 3'UTR 野生型荧光素酶报告质粒相对活性值下降($P<0.001$);对照组与空白组 DUSP1 mRNA 3'UTR 野生型荧光素酶报告质粒相对活性值比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

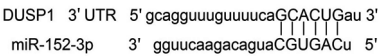


图 3 miR-152-3p 与 DUSP1 3'UTR 的结合位点预测结果

2.7 各组细胞相关蛋白表达比较

各组 DUSP1、p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-

ERK1/ERK1、p-ERK2/ERK2 蛋白表达比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。与空白组、对照组比较,转染组 DUSP1 蛋白表达升高,p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/ERK1、p-ERK2/ERK2 蛋白表达降低($P<0.05$);空白组和对照组 DUSP1、p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/ERK1、p-ERK2/ERK2 蛋白表达比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 4、表 4。

表 3 双荧光素酶实验结果

组别	<i>n</i>	野生型荧光素酶报告质粒相对活性值	突变型荧光素酶报告质粒相对活性值
空白组	5	1.05±0.14	1.02±0.13
对照组	5	1.02±0.17	1.04±0.11
转染组	5	0.46±0.11 ^{ab}	0.99±0.12
<i>F</i>		27.335	0.219
<i>P</i>		<0.001	0.807

^a: $P<0.05$,与空白组比较;^b: $P<0.05$,与对照组比较。

表 4 各组相关蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	DUSP1	p-p38 MAPK/p38 MAPK	p-ERK1/ERK1	p-ERK2/ERK2
空白组	5	0.35±0.05	0.86±0.08	0.71±0.05	0.69±0.06
对照组	5	0.37±0.04	0.85±0.07	0.72±0.07	0.67±0.08
转染组	5	0.62±0.08 ^{ab}	0.41±0.03 ^{ab}	0.25±0.02 ^{ab}	0.14±0.02 ^{ab}
<i>F</i>		32.333	81.189	138.654	140.337
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a: $P<0.05$,与空白组比较;^b: $P<0.05$,与对照组比较。

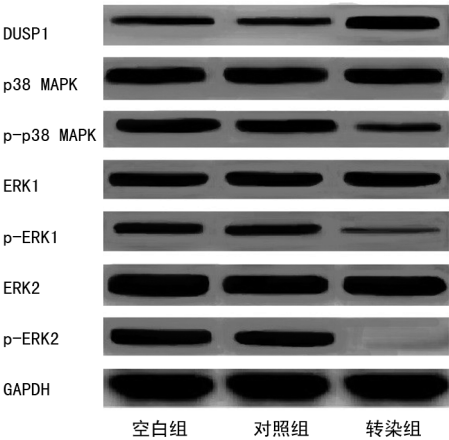


图 4 各组相关蛋白印迹图

3 讨论

激素性股骨头坏死为临床常见病、多发病,其发生、发展与激素应用剂量、疗程密切相关,目前尚无特效治疗方法^[5]。BMSCs 是一种多能干细胞,其自我更新及分化潜能可在多种组织修复重建中发挥重要作用^[6]。在较多非创伤性股骨头坏死发生中,股骨骨髓内 BMSCs 成骨分化能力改变发挥一定作用,逐渐引起广泛关注。研究发现^[7],糖皮质激素大剂量应用可能引发 BMSCs 增殖、成骨能力减弱,但机制尚不明确。还有报道显示^[8],激素性股骨头坏死患者存在

BMSCs 功能丢失现象,其近端 BMSCs 增殖能力较股骨颈骨折患者低。因此,临床研究影响激素性股骨头坏死患者 BMSCs 成骨转化的指标,以探寻新的诊断和治疗靶点,改善患者治疗效果,提升生命质量,具有重要意义。

miRNA 是一类内源性非编码单链小分子 RNA,可经结合靶向 mRNA 3'UTR,降解 mRNA 转录或翻译,改变 mRNA 调控细胞信号通路,参与调控细胞增殖、分化、侵袭、凋亡等过程。有报道显示^[9],在 BMSCs 增殖、分化、迁移等细胞生物学功能中,miRNA 发挥一定作用,且有多种 miRNA 参与调控 BMSCs 成骨分化。miR-152-3p 为 miRNA 家族成员之一,被证实可参与调控细胞增殖、分化、凋亡等过程,促进成骨分化,在绝经后骨质疏松发生中有一定作用,但就 miR-152-3p 对激素性股骨头坏死患者 BMSCs 分化影响尚无明确定论^[10]。本研究结果显示,激素性股骨头坏死患者 BMSCs 中存在 miR-152-3p 高表达,且转染组 ALP、BMP-2 mRNA 表达升高,提示低表达 miR-152-3p 可促进激素性股骨头坏死 BMSCs 成骨分化。

哺乳动物细胞中氧化应激、生长因子可促使多种信号通路被激活,MAPK 信号通路便是其中之一。研究发现^[11],MAPK 通路参与细胞增殖、凋亡、生长、分化等多种病理生理过程,其持续激活可引发细胞过度

增殖或细胞非程序性死亡。DUSP1 为双特异性蛋白磷酸酶家族成员之一,广泛存在于人体细胞内,可调控细胞生长、分化、凋亡及肿瘤形成过程。DUSP1 属于 MAPK 特异性抑制剂,能抑制 MAPK 信号通路,减轻炎症反应、氧化应激反应,保护细胞^[12]。有报道显示^[13],MAPK 信号通路激活可引发 DUSP1 gDNA 染色质重构,诱导 DUSP1 转录,参与细胞分化过程。但目前就 DUSP1 在激素性股骨头坏死 BMSCs 中表达研究较少,且就 miR-152-3p 是否通过调控 DUSP1 表达影响 BMSCs 分化、机制如何尚未可知。本研究发现,激素性股骨头坏死患者 BMSCs 中不仅存在 miR-152-3p 高表达,还存在 DUSP1 低表达。TargetScan 软件分析发现 DUSP1 3'UTR 含有 miR-152-3p 的结合位点,荧光素酶强度显示 miR-152-3p 与 DUSP1 之间呈靶向关系,提示 miR-152-3p 可靶向作用于 DUSP1。另外,转染组 DUSP1 蛋白表达升高,p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/ERK1、p-ERK2/ERK2 蛋白表达降低,提示低表达 miR-152-3p 可靶向调控 DUSP1 表达,抑制 MAPK 信号通路,推测这是低表达 miR-152-3p 发挥促进激素性股骨头坏死 BMSCs 成骨分化作用的重要机制之一。但本研究未分析阻断 DUSP1 表达是否可产生相反作用,今后仍需就该问题进行深入研究。

综上所述,低表达 miR-152-3p 可促进激素性股骨头坏死 BMSCs 成骨分化,作用机制可能与调控 DUSP1 表达,抑制 MAPK 信号通路有关。本研究未就其他通路进行分析,而低表达 miR-152-3p 发挥作用是经多种途径进行的,今后仍需进一步深入分析。

参考文献

- [1] YE J, WEI D, PENG L, et al. Ginsenoside Rb1 prevents steroid-induced avascular necrosis of the femoral head through the bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(4): 3175-3181.
- [2] GOMEZ J L, CHEN A, DIAZ M P, et al. A network of sputum micrornas is associated with neutrophilic airway inflammation in asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 202(1): 51-64.
- [3] FU L G, LIU H W, LEI W J. MiR-596 inhibits osteoblastic differentiation and cell proliferation by targeting Smad3 in steroid-induced osteonecrosis of femoral head[J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15:173.
- [4] MA Z J, YANG J J, LU Y B, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine[J]. *World J Stem Cells*, 2020, 12(8): 814-840.
- [5] ZHANG S, WANG C, SHI L, et al. Beware of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head in the treatment of COVID-19-experience and lessons from the SARS epidemic[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15:983-995.
- [6] JIAO D, ZHENG A, LIU Y, et al. Bidirectional differentiation of BMSCs induced by a biomimetic procallus based on a gelatin-reduced graphene oxide reinforced hydrogel for rapid bone regeneration[J]. *Bioact Mater*, 2020, 6(7): 2011-2028.
- [7] ZHAO X, ALQWBANI M, LUO Y, et al. Glucocorticoids decreased Cx43 expression in osteonecrosis of femoral head: the effect on proliferation and osteogenic differentiation of rat BMSCs[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(1): 484-498.
- [8] ATILLA B, BAKIRCIOĞLU S, SHOPE A J, et al. Joint-preserving procedures for osteonecrosis of the femoral head[J]. *EFORT Open Rev*, 2020, 4(12): 647-658.
- [9] TANG Y, ZHANG L, TU T, et al. MicroRNA-99a is a novel regulator of KDM6B-mediated osteogenic differentiation of BMSCs[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(4): 2162-2176.
- [10] 房根强, 赵正历, 靳宪辉, 等. miR-152-3p 通过 DNMT1 介导的 SFRP2 基因甲基化修饰促进绝经后骨质疏松发生[J]. *中华内分泌外科杂志*, 2020, 14(6): 492-496.
- [11] SINKALA M, NKHOMA P, MULDER N, et al. Integrated molecular characterisation of the MAPK pathways in human cancers reveals pharmacologically vulnerable mutations and gene dependencies[J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 9-10.
- [12] XIN Y, TANG L, CHEN J, et al. Inhibition of miR-101-3p protects against sepsis-induced myocardial injury by inhibiting MAPK and NF-κB pathway activation via the upregulation of DUSP1s[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(3): 20.
- [13] PENG W, ZHANG C, PENG J, et al. Lnc-FAM84B-4 acts as an oncogenic lncRNA by interacting with protein hnRNPK to restrain MAPK phosphatases-DUSP1 expression[J]. *Cancer Let*, 2020, 494(6): 128-130.