DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20230207

表观遗传和代谢调控间充质干细胞成骨分化的研究进展

石玉，尹贝，李鑫，叶玲*

（口腔疾病研究国家重点实验室，国家口腔疾病临床医学研究中心，四川大学华西口腔医院，四川 成都 610041）

【摘要】间充质干细胞是目前硬组织再生与修复中最为重要的种子细胞，在临床应用中前景广阔，因此其命运调控以及定向分化机制一直是领域内的重点研究方向。但由于间充质干细胞的异质性以及对其定向分化调控机制尚未完全清楚等诸多原因，制约了间充质干细胞在临床治疗中的应用。近些年来越来越多的研究证明，在间充质干细胞成骨分化过程中表观遗传修饰发挥了重要调控作用；表观遗传调控异常与骨质疏松症的发生有关，且干预表观遗传修饰的小分子化合物具有改善骨质疏松的潜能。另一方面，营养物质代谢，尤其是葡萄糖代谢（糖代谢）不仅为细胞生理活动提供必需的能量物质，其代谢中间产物也是干细胞增殖、分化的调控因子；表观遗传修饰与糖代谢紧密关联，对间充质干细胞的生物学特性、命运决定起到至关重要的作用。在本文中，我们简要叙述了糖代谢和表观遗传修饰调控间充质干细胞成骨分化的研究进展和表观遗传在骨质疏松症中的临床应用前景。

【关键词】间充质干细胞；成骨分化；表观遗传修饰；骨质疏松

中图分类号：Q254 **文献标识码：**A **文章编号：**2096-8965（2023）02-0057-15

Research progress on the epigenetic and metabolic regulation on osteogenesis of MSCs

Shi Yu, Yin Bei, Li Xin, Ye Ling*

(State Key Laboratory of Oral Diseases &National Clinical Research Center for Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China)

【Abstract】Until now, mesenchymal stem cells (MSCs) are the most important candidates for calcified tissue regeneration and injury repair, showing broad clinical application prospects. Therefore, the mechanism of fate determination and differentiation regulation has been the fundamental question in the field. However, due to many reasons, such as the heterogeneity and limited knowledge of regulatory mechanisms, the further investigation and clinical application of MSCs are restricted. In recent years, emerging studies have proved that epigenetic modification plays an important regulatory role in the process of osteogenic differentiation of MSCs. Abnormal epigenetic regulation is associated with the development of osteoporosis, and small molecules that interfere with epigenetic modifications have the potential to improve osteoporosis. On the other hand, nutrient metabolism, especially glucose metabolism, is a necessary energy source for cell physiological activities and a regulatory factor for stem cell proliferation and differentiation. They are closely related and play a crucial role in the

收稿日期：2022-07-18；**修回日期：**2023-05-10

基金项目：国家杰出青年科学基金项目（81825005）

通信作者：叶 玲（1975-），女，四川成都人，教授，主要从事牙髓/骨生物学、干细胞调控的研究。E-mail：yeling@scu.edu.cn

biological characteristics and fate determination of MSCs. In this paper, we briefly describe the research progress of glucose metabolism and epigenetic modifications in regulating osteogenic differentiation of MSCs and the prospect of clinical application of epigenetics in osteoporosis.

【**Keywords**】Mesenchymal stem cell; Osteogenic differentiation; Epigenetic modification; Osteoporosis

0 前言

颌面骨缺损多由创伤、炎症、肿瘤以及先天性发育不良等引起，严重影响患者颌面部外形美观，并引起口腔功能障碍[1]。在临床上常用的治疗方法包括自体骨移植、异体骨移植、人工骨移植等。但是由于自体骨骨量有限，异体骨有潜在的排斥反应，而人工骨因为力学活性以及生物学活性问题对临床应用造成局限。因此，基于间充质干细胞（Mesenchymal Stem Cells，MSCs）的硬组织修复手段有望成为治疗颌骨缺损的有效方法。目前已有报道，MSCs已经用于2型糖尿病[2]、中风[3]、心肌梗死[4]以及自身免疫疾病[5]等相关疾病的临床实验。MSCs的应用作为一种新型治疗手段，受到广泛关注。但是全球正在进行的MSCs临床研究大多处于早期阶段，随着试验进入后期，研究数量迅速减少。从发表在ClinicalTrials.gov上的数据可以看出，MSCs在临床Ⅰ期Ⅱ期的研究数目在500~600项左右，而进展到Ⅲ期临床的研究数目降到60项左右（ClinicalTrials.gov，以MSCs和Clinical Trail为关键词）。有研究指出，临床试验数据可比性差、重复性欠佳的主要原因包括不同组织的MSCs存在异质性，对于MSCs生物学功能了解不足而导致的制备方法不同，以及MSCs在治疗时的传代数目有差异等等[6]。这些问题反应出MSCs的研究仍有欠缺，无法满足标准化、规模化的临床疾病治疗。而在骨骼研究领域，骨来源的MSCs已被报道可用于治疗大段骨缺损，骨折愈合以及颅颌面骨损伤修复的临床试验处于进展中[7，8]，但由于其定向分化调控机制不明，从而制约了其临床试验效果。

近年来，越来越多的科学研究集中在探讨骨来源MSCs维持和分化过程中的调控机制。在这些研究进展中，表观遗传修饰调控MSCs对组织的维持和再生作用无疑是领域内的热点与重点之一[9]。在体内外实验中，表观遗传学修饰决定MSCs的分化方向[10，11]；并且表观遗传修饰的异常会导致MSCs功能障碍，其中包括增殖、凋亡以及炎症反应的发生[12]。因此，在MSCs生物学功能调控与命运决定的过程中，对表观遗传修饰的了解与研究，可为探讨MSCs的定向分化机制提供科学基础，同时也为其临床应用提供指导意义。

1 骨来源间充质干细胞

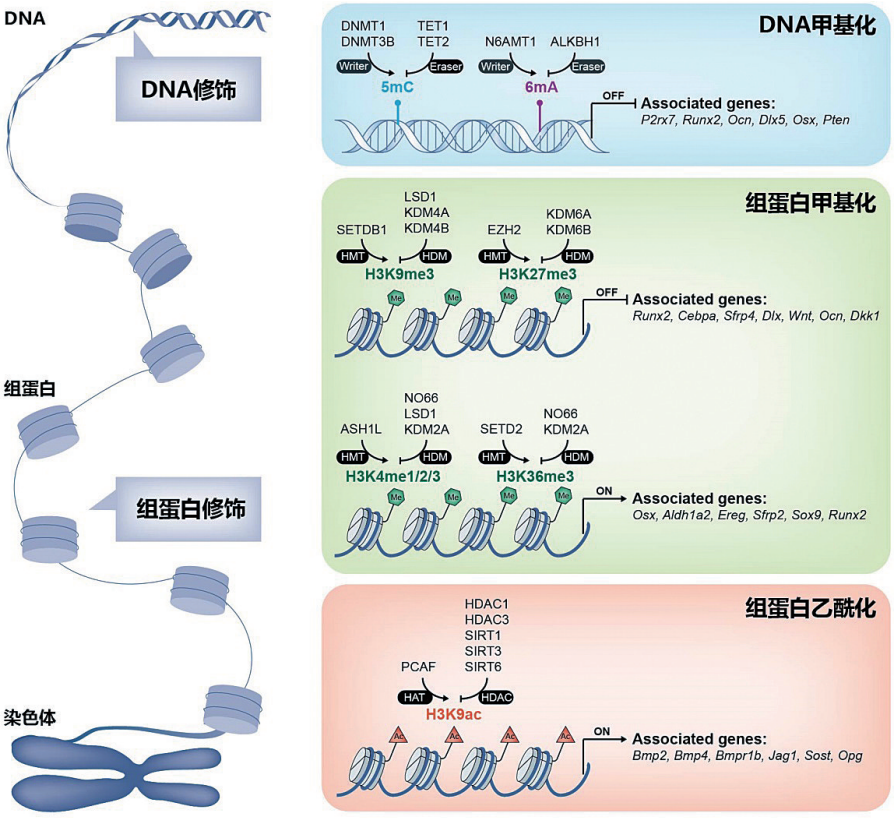
在骨骼研究中常用的MSCs于1968年首次在骨髓内被分离出来，其具有良好的贴壁能力以及体外增殖能力，可自我复制，并且可以形成单克隆[13]；随后研究发现，骨来源的MSCs可以在体外特定诱导刺激下，分化成为中胚层的多种细胞（包括成骨细胞、脂肪细胞以及软骨细胞），内胚层细胞以及神经外胚层细胞[14]。位置分布上，MSCs常常聚集在血管周围，在获取养分的同时，也可以通过分泌细胞因子以及外泌体影响微环境[14]。目前越来越多的研究表明，骨来源的MSCs存在着异质性，不同硬组织来源的MSCs表达干细胞表面标志物的情况差异明显，在同一组织中干细胞的生物学特性以及种类也有区别[15]。尽管如此，由于MSCs容易获得，并且具有多向分化能力以及低免疫原性等特点，仍然成为治疗多种骨骼疾病的潜在细胞群体[16]。

2 MSCs成骨分化中的表观遗传修饰调控

近些年来，MSCs的表观遗传修饰逐渐成为干细胞分化领域的研究热点[17]。核小体是染色体最为基本的结构单元，由脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic Acid，DNA）以及包裹在外侧的组蛋白构成。基因的表达受到转录因子和表观遗传学修饰共同的、动态的调控。因此，作用于DNA或是核心组蛋白层面上的各种表观遗传修饰酶成为研究的重点与核心（见图1）。

2.1 DNA甲基化

在多种表观遗传修饰的方式中，DNA甲基化中的5-甲基胞嘧啶（5-methylcytosine，5 mC）修饰是研究比较深入的MSCs行为调控方式之一。在大多数的情况下，基因启动子区域的甲基化代表着基因表达被抑制。在体内和体外的实验中，众多基因启动子区域CpG岛的甲基化被报道调控着干细胞的分化。其中，10-11易位家族（Ten-Eleven Translocation Family，TET Family）去甲基化酶TET1、TET2、以及TET3在MSCs中都有明显的表达。动物实验证明，在小鼠体内敲除*Tet1*和*Tet2*基因会导致骨髓MSCs功能障碍，从而产生骨质疏松的表型[11，18]。



DNMT1：DNA甲基化转移酶1；DNMT3B：DNA甲基化转移酶3B；TET1：10-11易位家族去甲基化酶TET1；TET2：10-11易位家族去甲基化酶TET2；N6AMT1：N-6腺嘌呤特异性DNA甲基转移酶1；ALKBH1：AlkB同系物1，组蛋白H2A双加氧酶；*P2rx7*：嘌呤能受体P2X7；*Runx2*：Runt相关转录因子2；*Ocn*：骨钙素；*Dlx5*：远中缺失同源盒基因5；*Osx*：Osterix；*Pten*：磷酸酶与张力蛋白同源物基因；SETDB1：SET结构域分叉的组蛋白赖氨酸甲基转移酶；LSD1：赖氨酸特异性组蛋白去甲基化酶1；KDM4A：赖氨酸去甲基化酶4A；K；DM4B：赖氨酸去甲基化酶4B；EZH2：Zeste同源物增强子2；KDM6A：赖氨酸去甲基化酶6A；KDM6B：赖氨酸去甲基化酶6B；*Cebpa*：CCAAT/增强子结合蛋白alpha；*Sfrp4*：分泌型卷曲相关蛋白4；*Dkk1*：Wnt抑制剂Dickkopf-1；ASH1L：组蛋白甲基化转移酶ASH1L；NO66：蛋白核仁蛋白66；KDM2A：赖氨酸去甲基化酶2A；SETD2：含有set结构域的蛋白2；*Aldh1a2*：醛脱氢酶1家族成员A2；*Ereg*：表皮调节素；*Sfrp2*：分泌型卷曲相关蛋白2；*Sox9*：SRY（性别决定区域Y）相关的高迁移率族框族9；PCAF：p300/CBP相关因子；HDAC1：组蛋白去乙酰化酶1；HDAC3：组蛋白去乙酰化酶3；SIRT1：Sirtuin 1；SIRT3：Sirtuin 3；SIRT6：Sirtuin 6；*Bmp2*：骨形态发生蛋白2；*Bmp4*：骨形态发生蛋白4；*Bmpr1B*：骨形态发生蛋白受体1B；*Jag1*：Jagged1；*Sost*：硬骨素；*Opg*：骨保护素。

图1　MSCs成骨分化中的表观遗传调控

另一方面，DNA甲基化转移酶（DNA Methyltransferase，DNMT）抑制基因表达，负调控MSCs介导的硬组织再生。DNMT1负责维持已有的甲基化位点，DNMT3A以及DNMT3B则是在未发生甲基化的DNA上添加新的甲基基团[19]。DNA的甲基化状态与分化潜能有关，并进一步影响骨骼疾病的过程。例如，当MSCs经过DNMT1抑制剂处理后，伴随着基因组DNA的去甲基化以及成骨调控基因的表达增加，如*Runx2*、骨钙素（*Osteocalcin*，*Ocn*），远中缺失同源盒基因5（Distal-less Homeobox 5，*Dlx5*）和*Osterix*（*Osx*），同时，成骨分化特异染色显示碱性磷酸酶（Alkaline Phosphatase，ALP）活性和矿化也有明显增强[20]。与此类似，DNMT家族中的DNMT3B也参与调控了MSCs的成骨分化。敲除骨髓MSCs中的DNMT3B降低了磷酸酶与张力蛋白同源物基因（Phosphatase and Tensin Homolog，PTEN）启动子的DNA甲基化水平，从而上调*Pten*表达，促进了骨髓MSCs的成骨潜能[21]。

最新研究成果显示，DNA的另一种甲基化修饰形式N6-甲基腺嘌呤（N6-methyladenine，6mA）修饰不但可以调控胚胎干细胞的发育过程[22]，而且对MSCs的成骨分化也起到负调控作用[23]。这个过程中，AlkB同系物1，组蛋白H2A双加氧酶（AlkB Homolog 1，Histone H2A Dioxygenase，ALKBH1）作为一种去甲基化酶，N-6腺嘌呤特异性DNA甲基转移酶1（N-6 Adenine-specific DNA Methyltransferase 1，N6AMT1）作为甲基化酶共同

调节6mA的修饰。前者被证明在MSCs成骨分化以及损伤修复中不可或缺[23]，但是后者对DNA的6mA甲基转移酶作用仍有争议[24]。

2.2 组蛋白修饰

2.2.1 组蛋白甲基化

目前，已知的被广泛研究的甲基化位点包括组蛋白3（Histone 3，H3）的第四位赖氨酸残基（Lysine 4，K4）、K9、K27、K36和K79以及组蛋白H4的K20[25]。H3K4、H3K36和H3K79的甲基化通常被认为是转录和基因表达活跃的标志，而H3K9、H3K27和H4K20的甲基化通常与染色质浓缩和基因活性抑制有关[26]。组蛋白甲基化修饰依赖于组蛋白甲基转移酶（Histone Methyltransferase，HMT），而组蛋白去甲基化酶（Histone Demethylase，HDM）的发现证明了组蛋白甲基化是一个可逆的过程。甲基化过程的调控是由HMT和HDM两类酶相反的活性所动态控制，通过与特定的组蛋白残基结合，调控蛋白甲基化和去甲基化的功能[27]。

2.2.1.1 H3K9me3

作为特异性催化H3K9的甲基转移酶SET结构域分叉的组蛋白赖氨酸甲基转移酶1（SET Domain Bifurcated Histone Lysine Methyltransferase 1，SETDB1），在调控MSCs成骨分化过程中具有重要作用。SETDB1可与成骨重要调控基因*Runx2*启动子区结合，诱导H3K9甲基化修饰在其上的积累，抑制*Runx2*的转录活性[28]。赖氨酸去甲基化酶4A（Lysine Ddemethylase 4A，KDM4A）与KDM4B也是H3K9去甲基化酶，在MSCs定向分化中起到重要作用。*Kdm4a*在成骨和成脂分化过程中表达升高，然而，过表达*Kdm4a*阻碍了ST2细胞（小鼠骨髓基质细胞系）和原代骨髓MSCs的成骨分化。最新研究报道，在MSCs中靶向*Kdm4b*的治疗策略不仅可以调节成骨与成脂肪分化异常，而且可以逆转细胞衰老，达到骨骼健康的目的[29]。

2.2.1.2 H3K27me3

Zeste同源物增强子2（Enhancer of Zeste Homolog 2，EZH2）是另一种组蛋白甲基转移酶，是多梳抑制性复合物2（Polycomb Repressive Complex 2，PRC2）的催化亚基，其特异性催化H3K27的甲基化。有文章报道，*Ezh2*抑制骨骼发育和成骨分化[30, 31]；药物抑制和siRNA介导的*Ezh2*敲除均可降低转录起始区附近H3K27me3水平，从而刺激相关骨基因的表达，促进MSCs的成骨分化[32]。

*Kdm6a*和*Ezh2*在MSCs成骨或成脂分化过程中具有相反的作用，*Kdm6a*的过表达通过降低*Runx2*和*Ocn*启动子区域的H3K27me3甲基化水平，从而增加了*Runx2*和*Ocn*的表达[33]。同时，在小鼠成骨细胞系MC3T3细胞和原代成骨细胞中，*Kdm6a*的表达在成骨细胞分化过程中升高，外源性抑制KDM6A导致*Osx*和*Runx2*的启动子活性降低[34]。KDM6A可降低H3K27me3对Wnt抑制剂*Dickkopf-1*（*Dkk1*）启动子的富集，从而阻碍了成骨细胞功能。

2.2.1.3 H3K4me3和H3K36me3

另一方面，染色质活化型的表观遗传修饰H3K4me3以及H3K36me3在MSCs成骨分化过程中起到正相关作用，可以作用于成骨相关基因的启动子区域上，从而促进成骨分化[10, 35]。含有Jmjc结构域的蛋白核仁蛋白66（Nucleolar protein 66，NO66）是激活型组蛋白修饰H3K4me3和H3K36me3的组蛋白去甲基化酶。NO66通过其去甲基化酶活性以及*NO66*与*Osx*之间的相互结合，抑制了*Osx*的转录因子活性，从而抑制了*Osx*下游靶基因的转录，抑制MSCs的成骨分化，最终导致成骨受损[36]。赖氨酸特异性组蛋白去甲基化酶1（Lysine-Specific Histone Demethylase 1，LSD1）能特异性地去除组蛋白H3K4和H3K9的单和双甲基化修饰。近期，Science Advances报道LSD1在Prx1阳性MSCs中的缺失导致骨折延迟愈合并发生骨不连的症状，这项研究证明，LSD1在骨缺损中的关键作用[37]。此外，Yu等[38]发现在根尖乳头干细胞中，KDM2A通过降低*Sfrp2*启动子处的H3K4me3和H3K36me2来抑制*Sfrp2*的转录，而SFRP2被报道可以通过*Osx*增强成骨分化，因此认为KDM2A在MSCs成骨、成牙过程中起到负调控功能。

与之对应的，含有set结构域的蛋白2（Set Domain Containing 2，SETD2）可以催化H3K36me3的修饰水平，提升MSCs的成骨能力，同时抑制其脂肪向分化的能力。在小鼠模型中特异地敲除MSCs中的*Setd2*，明显地导致骨量丢失，同时骨髓腔中脂肪细胞含量显著升高[10]。此外，H3K4me3的甲基化水平可被组蛋白甲基化转移酶ASH1L（Absent, Small, or Homeotic-Like，ASH1L）调控，后者的过表达可以促进MSCs成骨、成软骨向分化，抑制脂肪向细胞分化[35]。

2.2.2 组蛋白的乙酰化

组蛋白乙酰化是另一种表观遗传修饰，促进转录激活；相应的，组蛋白去乙酰化会导致染色质紧凑，进而转录被抑制[39]。乙酰化转移酶（Histone

Acetyltransferases，HATs）介导组蛋白乙酰化，并被报道参与MSCs的成骨分化。例如，乙酰化转移酶p300/CBP相关因子（p300/CBP-Associated Factor，PCAF）通过在骨形态发生蛋白2（Bone morphogenetic protein，Bmp2）、*Bmp4*、骨形态发生蛋白受体1B（Bone morphogenetic protein receptor, Type 1B，Bmpr1B）等基因启动子区富集H3K9乙酰化（H3K9-Acetyl，H3K9ac）修饰，活化BMP通路进而促进成骨分化，增加骨量[40]。组蛋白去乙酰化，是由组蛋白去乙酰化酶家族（Histone Deacetylases，HDACs）调控的。H3K9ac是组蛋白乙酰化常见的修饰，据报道调控它的去乙酰化酶HDAC3，4，5，7在软骨内骨化中不可或缺，其中，在软骨中特异敲除*Hdac3*会导致胚胎死亡，而出生后敲除*Hdac3*延迟了钙化形成以及生长板处软骨成熟，同时也会导致破骨细胞活性增强[41，42]。研究表明[43]，Sirtuin蛋白通过作用于MSC和成骨细胞，在正常骨骼发育和稳态中发挥关键作用，其失调可能与不同的骨骼疾病有关。线粒体去乙酰化酶SIRT3，在细胞传代过程中表达水平下降，表现为氧化应激减弱以及细胞衰老，*Sirt3*的敲除降低MSCs分化为脂肪和成骨细胞的能力；*Sirt1*也在骨组织发育中必不可少，在成年小鼠中敲除*Sirt1*明显降低松质骨和密质骨的骨量[44]。体内实验证明，使用Prx1-Cre小鼠在MSCs中过表达*Sirt1*，可以通过促进MSCs的成骨分化，增加骨细胞在系统中的累积进而增加年轻小鼠（1月龄）和老年小鼠（18月龄）的骨密度，这充分说明*Sirt1*在MSCs衰老过程中对成骨分化的关键作用[45，46]。Sirt家族的*Sirt6*对骨稳态的维持同样至关重要。成骨细胞特异的敲除*Sirt6*，影响H3K9的去乙酰化修饰，降低了骨保护素（Osteoprotegerin，OPG）的表达水平；随后因OPG旁分泌作用的减弱，使得破骨细胞活性增加，导致骨量丢失[47]。

3 表观遗传与骨质疏松症

尽管有文献报道[48]，骨质疏松患者与健康成人的外周血全基因组DNA甲基化谱并无显著差异，但通过比较正常妇女和绝经后骨质疏松妇女的全血DNA样本，发现了77个显著差异甲基化的CpG位点，表明雌激素相关的这一类骨质疏松可使用全血DNA甲基化分析[49]，预估发病风险，使患者从早期治疗干预中受益。与全血组织相比，局部的骨组织中成骨相关基因的DNA甲基化水平可能在原发性骨质疏松症的发病机制中发挥更为主要的“开关”作用。与非骨质疏松的骨折组织比较，骨质疏松的骨折组织中*Sost*基因启动子去甲基化[50]，而*Opg*[51]和核因子E2相关因子2（Nuclear Factor Erythroid Derived 2-related factor-2，Nrf2）[52]的基因启动子甲基化水平较高，从而影响了上述基因的转录。此外，HAT1、HDAC6和DNMT3A在绝经后骨质疏松症患者的骨小梁组织样本中表达显著降低，并且与骨矿物质密度指标、OPG水平显著相关[53]。有报道称在个体增龄过程中，H3K9me3以及H3K27me3在成骨相关基因的启动子区域富集，导致MSCs成骨向分化能力减弱，在小鼠体内表现为骨量丢失以及骨髓脂肪积累的表型[29-31]。在糖皮质激素诱导的骨质疏松小鼠中，H3K27去甲基化酶组蛋白KDM6A表达下调，从而使*Runx2*和*Osx*基因的H3K27me3水平升高，抑制二者的转录[54]。EZH2的抑制剂GSK126可降低上述基因启动子区的H3K27甲基化水平，有助于上调成骨相关基因的表达，具有促进成骨和恢复骨量的潜能。研究者使用卵巢切除术（Ovariectomy，OVX）模型模拟绝经后骨质疏松症，术后每天注射50 mg/kg的GSK126，发现GSK126刺激骨形成而不影响骨吸收，对骨质疏松的治疗具有重要的应用前景[55]。且GSK126可与BMP2联合用药，促进小鼠颅骨临界缺损的愈合，同时降低BMP2用药的成本及不良反应[56]。此外，EZH2的抑制剂EPZ-6438在体外实验中刺激成骨细胞生成方面比GSK126更有效，而其体内效果尚待进一步研究，针对EZH2的化合物的开发为骨增强策略提供了机会[57]。除H3K27甲基化修饰外，H3K4甲基化也参与了骨质疏松。H3K4me3去甲基化酶KDM5A的转录水平在骨质疏松患者的BMSCs中较对照组明显上调，因此降低了*Runx2*启动子上的H3K4me3水平，抑制*Runx2*的基因表达。KDM5A抑制剂JIB-04可以部分挽救骨质疏松症的骨质流失[58]。Pargyline是LSD1的抑制剂，pargyline可通过提高成骨相关基因启动子区域的H3K4二甲基化水平，挽救了OVX小鼠BMMSCs的成骨分化能力，改善老年或卵巢切除小鼠模型的骨质疏松状况[59]。

除组蛋白甲基化外，干预组蛋白乙酰化修饰也是调节骨重塑失衡和治疗骨质疏松等疾病的潜在靶点。广泛控制氨基酸合成蛋白5（General Control of Amino-Acid Synthesis 5，GCN5）是一种重要的组蛋白乙酰基转移酶，可乙酰化H3K9/14位点；

Gcn5-慢病毒表达载体注入小鼠股骨骨髓，可防止OVX后股骨的骨矿物质密度下降和骨小梁丢失[60]。临床前研究表明，用SIRT激动剂治疗对小鼠衰老以及绝经引起的骨质疏松症具有保护作用，包括SIRT1激动剂白藜芦醇[61, 62]、SRT1720[44]、SRT2104[63]和SRT3025[64]，其机制为刺激骨形成、抑制骨吸收和减少*Sost*水平。除上述骨质疏松模型外，SIRT1的激活可防止使用糖皮质激素的骨质流失和废用性骨质疏松症[65]。花青素是SIRT6的激动剂，动物实验表明，花青素治疗通过抑制破骨细胞的形成和骨吸收来保护OVX小鼠的骨质流失[48]。除Sirt家族外，另一类组蛋白去乙酰化酶家族也被证明有治疗骨质疏松的潜能。HDAC1抑制剂丙戊酸预处理可以部分挽救机械卸荷引起的骨质疏松[49]。此外，局部注射HDAC的抑制剂曲古柳菌素（Trichostatin A，TSA）可促进大鼠实验性牙周炎的牙周组织修复，有望成为牙周组织修复的潜在治疗选择[66]。HDAC2和HDAC3的选择性抑制剂MI19能在体外和体内促进hBMSCs成骨分化，表现出在骨增强策略中的治疗潜力[67]。

除组蛋白乙酰化外，有研究表明[50]干预DNA甲基转移酶也是治疗骨质流失的策略，研究者采用小鼠尾部悬吊法建立后肢去负荷动物模型后发现，机械性卸载导致大鼠股骨组织中DNMT1上调。在大鼠的髓内局部注射*Dnmt1*小干扰RNA（small interfering RNA，siRNA）可挽救废用性骨质疏松症模型导致的组织病理学变化。另有研究表明，后肢去负荷小鼠的BMSCs中具有高水平的*Dnmt3b*，通过DNA甲基化机制下调了*Sonic Hedgehog*（*Shh*）的表达，从而抑制了成骨分化；DNMT3B抑制剂Nanaomycin A可使骨量、骨矿物质密度、骨小梁数量和厚度有不同程度的改善[51]。

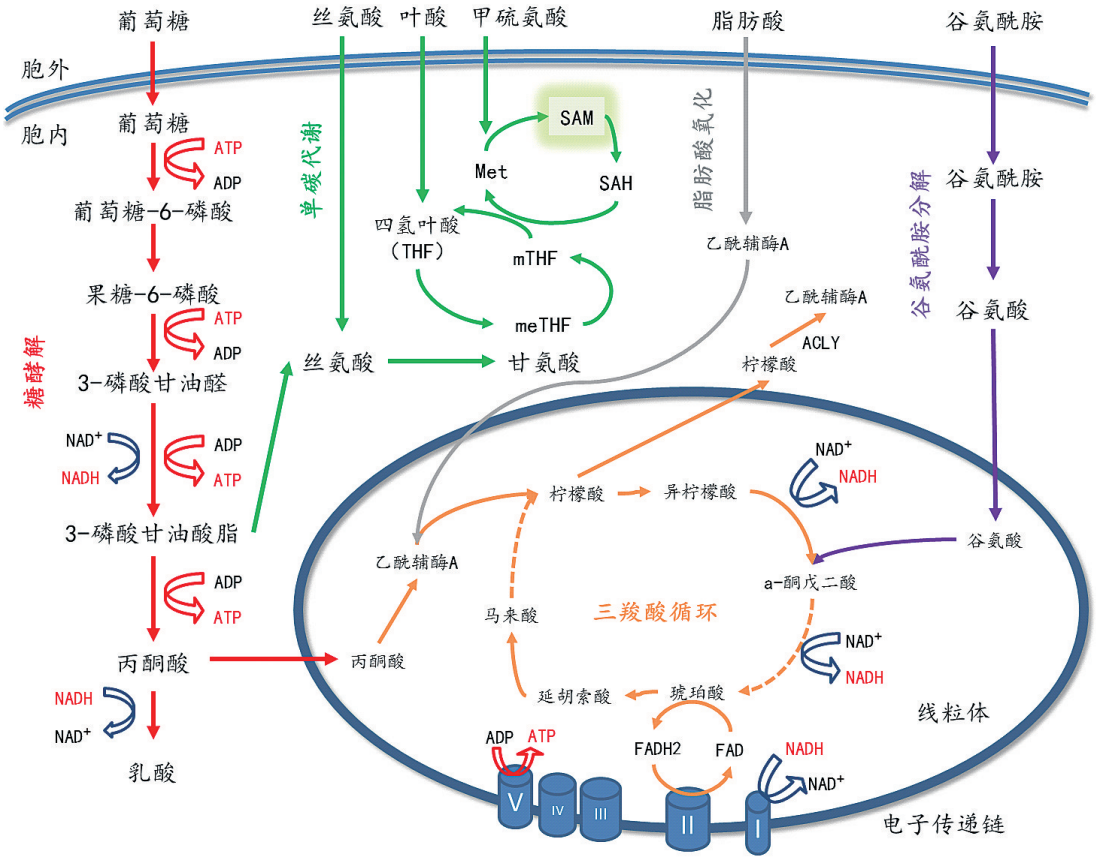
溴结构域和端外结构域（Bromodomain and Extra-Terminal Domain，BET）蛋白家族选择性地识别并结合到乙酰化组蛋白，是一类重要的“组蛋白阅读蛋白”，BET抑制剂如N，N-二甲基乙酰胺（N，N-Dimethylacetamide，DMA）、JQ1及其衍生物ND、N-甲基吡咯烷酮（N-Methyl Pyrrolidone，NMP）通过抑制BET对乙酰化组蛋白的结合发挥作用，动物实验表明，上述药物能抑制OVX相关的骨质疏松症中的病理性骨质流失，是潜在的骨质疏松症治疗候选药物[52-53, 68-70]。靶向表观遗传的干预措施尤其是小分子化合物的激动剂和抑制剂有望成为新的治疗手段（见表1）。

表1　表观调控小分子化合物在骨质疏松症临床前研究中的应用

调控剂	调控剂类型	靶分子	靶分子类型	生物学功能	动物模型
GSK126[55]	小分子抑制剂	EZH2	组蛋白甲基转移酶	降低Runx2和Osx基因启动子区H3K27me3水平，刺激骨形成	OVX骨质疏松
JIB-04[58]	小分子抑制剂	KDM5A	组蛋白去甲基化酶	上调Runx2基因启动子区H3K4me3水平，挽救骨质流失	OVX骨质疏松
Pargyline[59]	小分子抑制剂	LSD1	组蛋白去甲基化酶	上调成骨相关基因启动子区H3K4me2水平，挽救OVX BMSCs的成骨分化能力	OVX/衰老骨质疏松
丙戊酸[49]	小分子抑制剂	HDAC1	组蛋白去乙酰化酶	挽救骨质疏松	机械卸荷所致骨质疏松
Nanaomycin A[51]	小分子抑制剂	DNMT3B	DNA甲基转移酶	上调Shh水平，改善骨量、骨矿物质密度、骨小梁数量和厚度	后肢卸荷所致骨质疏松
DMA/JQ1/NMP[52, 53, 68-70]	小分子抑制剂	BET	组蛋白阅读蛋白	抑制BET与乙酰化组蛋白结合，抑制骨质流失	OVX骨质疏松
白藜芦醇/SRT1720/SRT2104/SRT3025[44, 61-64]	小分子激动剂	SIRT1	组蛋白去乙酰化酶	刺激骨形成、抑制骨吸收和减少Sost水平	衰老/绝经/糖皮质激素/废用性骨质疏松
花青素[48]	小分子激动剂	SIRT6	组蛋白去乙酰化酶	抑制破骨细胞形成和骨吸收	OVX骨质疏松

4 葡萄糖代谢与骨

除了上述的表观遗传修饰外，葡萄糖代谢（糖代谢）对MSCs定向分化也十分重要，并且可以直接或间接调控表观遗传修饰水平。糖代谢不仅为机体消耗能量的生物学功能提供所需的三磷酸腺苷（Adenosine Triphosphate，ATP），还可以提供细胞分裂过程中合成代谢反应所必需的中间产物。实验证明，细胞ATP的主要来源之一是葡萄糖。糖代谢可被分为氧化磷酸化（在线粒体中完成）和有氧糖酵解（在细胞质中完成）。葡萄糖主要通过特殊的葡萄糖转运蛋白家族（Glucose Transporter，GLUT）转运到细胞中[57]。随后，葡萄糖经历一系列生化反应，产生丙酮酸和两个ATP分子[71]。丙酮酸可以通过单羧酸转运蛋白进入线粒体中，发生氧化磷酸化（Oxidative Phosphorylation，OXPHOS）并产生ATP分子[72]。丙酮酸也可以在细胞质内，在乳酸脱氢酶A（Lactate Dehydrogenase A，LDHA）的作用下发生有氧糖酵解，转化为乳酸；在产生乳酸的同时，还原型的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（Nicotinamide Adenine Dinucleotide，NADH）被转化为氧化型的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（Nicotinamide Aadenine Ddinucleotide$^+$，NAD$^+$）（见图2）。



NADH：还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸；NAD$^+$：氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸；ATP：腺嘌呤核苷三磷酸；ADP：腺嘌呤核苷二磷酸；FADH2：还原型黄素二核苷酸；FAD：黄素腺嘌呤二核苷酸；SAM：S-adenosyl methionine（S-腺苷甲硫氨酸）；Met：甲硫氨酸；SAH：S-腺苷同型半胱氨酸；meTHF：5,10-亚甲基四氢叶酸；mTHF：5-甲基四氢叶酸；ACLY：ATP柠檬酸裂合酶；虚线代表两者之间中间有省略的步骤。

图2 能量代谢示意图

有报道认为，在干细胞向体细胞分化的不同阶段，对于能量代谢的使用方式会发生明显的改变，在干细胞阶段，细胞更加倾向于使用糖酵解；而在分化过程中，细胞更倾向于使用氧化磷酸化[73-75]。在MSCs分化中，成骨向分化的细胞倾向于使用糖酵解产生ATP；而成脂肪向分化的细胞倾向于使用氧化磷酸化的方式提供细胞生理反应所需的能量[76]。这种特异的方式对细胞高效使用环境中的能量物质、减少分子水平活性氧自由基的损伤以及维持特定的表观遗传修饰至关重要。

在成骨分化过程中，葡萄糖代谢起到重要作用。在成骨细胞中可以检测到GLUT1和GLUT3的表达[77, 78]。并且，GLUT1被证明是原代成骨细胞中葡萄糖的主要转运蛋白，并通过抑制腺苷5'-单

磷酸激酶和阻断RUNX2的泛素化来调节RUNX2的翻译后修饰；体外和体内实验证明，成骨细胞前体中选择性缺失 *Glut1* 会抑制成骨细胞的分化[79]。同时也有报道称，在新生儿颅骨成骨细胞中，*Glut4* 在成骨分化过程中及胰岛素刺激葡萄糖摄取的作用下表达量增加，但是 *Glut4* 基因缺失不会导致明显的骨骼表型[66]。因此，未来的研究需要了解在体内成骨细胞中不同GLUT转运蛋白之间潜在的功能冗余。

在葡萄糖经过GLUT家族介导进入细胞后，对于MSCs成骨分化过程中糖的使用方式，一直都存在争论。一部分研究认为[80-82]，和肿瘤细胞类似，MSCs响应成骨信号的同时，发生有氧糖酵解（又称Warburg Effect），终产物为乳酸。WNT可以通过哺乳动物雷帕霉素复合物2（mammalian Target of Rapamycin Complex 2，mTORC2）途径促进MSCs细胞系ST2摄取更多的葡萄糖，并且产生更多的乳酸[67]。Notch通过抑制糖酵解从而抑制MSCs的成骨分化[83]。BMP2在软骨内骨化过程中，通过mTORC1-缺氧诱导因子（Hypoxia Inducible Factor，HIF）通路促进 *Glut1* 表达，从而促进葡萄糖代谢[84]。

另一部分研究认为，由于MSCs分化需要大量ATP，因而普通糖被代谢后会进入三羧酸循环，发生氧化磷酸化。例如，MSCs在成骨诱导液刺激下，氧化磷酸化活性增强，同时伴随有糖酵解的减弱；在成脂肪分化的细胞中却展现出糖酵解的明显增强，氧化磷酸化不变的现象。机制层面，通过实验分析发现NAD^+介导的线粒体氧化磷酸化水平的改变是改变干细胞定向分化的主要原因之一[85]。因此，深入研究糖代谢的发生机制并解决这一争论，对靶向糖代谢治疗骨相关疾病有着重要的指导意义。

5 糖代谢对表观遗传修饰的影响

糖代谢除了为细胞和组织提供生存所必需的ATP之外，其催化反应还提供了细胞合成新的生物物质所必需的中间产物，这些中间产物可以重新合成，并以核苷酸、磷脂和氨基酸的形式存在，且在表观遗传学的调控中起到重要作用。例如，单碳代谢过程中产生的S-腺苷甲硫氨酸（S-Adenosyl Methionine，SAM），糖酵解过程中产生的乙酰辅酶a，三羧酸循环中产生的黄素腺嘌呤二核苷酸（Flavin Adenine Dinucleotide，FAD）和α-酮戊二酸（α-Ketoglutaric Acid，αKG），糖酵解以及氧化磷酸化中产生的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（Nicotinamide Adenine Dinucleotide，NAD）等等都是代谢过程中产生的对表观遗传修饰不可或缺的中间产物[86]。

5.1 糖代谢与表观遗传修饰——甲基化

目前，已知葡萄糖通过相应酶的代谢被分解为葡萄糖-6-磷酸，进而形成果糖-6-磷酸，随后形成3-磷酸甘油醛，通过磷酸戊糖途径形成核苷酸。3-磷酸甘油醛经过代谢产生的3-磷酸甘油酸酯通过单碳代谢产生非必需氨基酸丝氨酸和甘氨酸[87]。单碳代谢是一系列复杂的循环反应，涉及单个碳原子的转移，包括三种途径：叶酸循环、甲硫氨酸循环和转硫途径[88]。这些循环联合作用在细胞增殖过程中，提供合成磷脂和核苷酸所必需的碳单元[89]，单碳代谢还可能通过NADPH的氧化和谷胱甘肽的生成（通过转硫途径）来调节细胞水平的氧化还原状态。叶酸在细胞内代谢为四氢叶酸，随后代谢为5,10-亚甲基四氢叶酸以及5-甲基四氢叶酸，这个过程后一个碳原子可以被加到同型半胱氨酸上形成甲硫氨酸，随后通过甲硫氨酸的腺苷酰（化）作用，产生SAM[90]，而后者作为重要的甲基供体，可参与DNA在5'甲基胞嘧啶处的甲基化[91]以及组蛋白H3K4的甲基化[92]等甲基化事件。甲基基团可以从SAM上转移到受体的赖氨酸或是精氨酸上，随后SAM变为S-腺苷同型半胱氨酸（S-Adenosine Homocysteine，SAH），后者可以在酶的作用下重新获得甲基基团，生成SAM，形成循环[93]，不间断为DNA或者是组蛋白甲基化提供甲基基团（见图2、图3）。

糖酵解以及脂肪酸代谢产生的线粒体乙酰辅酶A进入三羧酸循环后经过氧化脱羧反应产生大量的NADH以及还原型黄素腺嘌呤二核苷酸（Flavin Adenine Dinucleotide，reduced，FADH2），促使电子传递链运转，产生ATP。许多三羧酸循环和电子传递链产生的中间产物被泵到线粒体外，通过组蛋白甲基化的形式参与表观遗传修饰。以H3K4与H3K9修饰为例，赖氨酸去甲基化酶LSD1特异靶向单–、双–甲基化的H3K4以及H3K9去除其上的甲基化修饰，这一过程LSD1需要FAD参与，而这里的FAD正是三羧酸循环中产生的FADH2转变而来的。由于FAD与几个代谢过程密切相关，这种对组蛋白去甲基化的影响提示了表观遗传修饰与细胞代谢状态的潜在联系。细胞内FAD还可以由核黄素（维生素B2）和ATP产生，存在于细胞质、

线粒体和细胞核中[94]。在脂肪酸氧化过程中，乙酰辅酶a转化为2-烯醇基辅酶a，并通过线粒体中的复合物Ⅱ（琥珀酸脱氢酶），最终将FAD还原为FADH2。在电子传递链（Electron Transfer Chain，ETC）中发生反应FADH2的氧化，产生FAD的更新和两个电子的释放。因此，LSD1去甲基化酶的活性可能既依赖于核黄素新合成的FAD，也依赖于脂肪酸氧化的相对活性、三羧酸循环等。

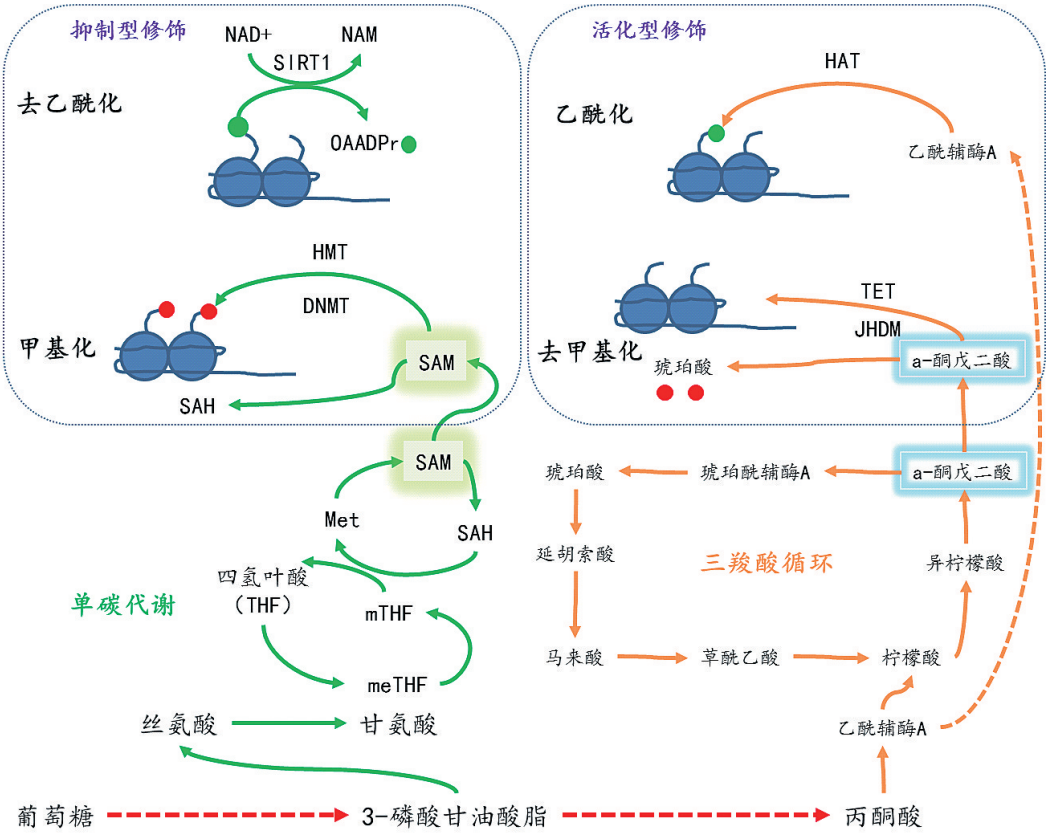
另外两种去甲基化酶组蛋白去甲基化酶JMJC家族以及DNA去甲基化酶TET家族，可以靶向赖氨酸和精氨酸残基，去除其上的甲基化基团，但不同于LSD家族，JMJC以及TET去甲基化过程需要的是α-酮戊二酸的参与，并且在这个过程中将α-酮戊二酸转变为琥珀酸[95]。而α-酮戊二酸在三羧酸循环中是个关键的组分，是异柠檬酸在异柠檬酸脱氢酶（Isocitrate Dehydrogenase，IDH）的作用下代谢而成的。为了可以被JMJC或TET去甲基化反应利用，α-酮戊二酸首先被输出线粒体，随后被转化为柠檬酸（用于生产乙酰辅酶a）。近期有文章指出[96]，给老龄大鼠和小鼠喂食α-酮戊二酸，可以缓解骨髓MSCs分泌的衰老相关分泌表型（Senescence Associated Secretory Phenotype，SASP），同时促进其增殖、克隆形成、迁移以及成骨分化能力，从而增加模式动物的骨量，缓解由于衰老造成的骨质疏松。在机制层面，α-酮戊二酸减少了H3K9me3以及H3K27me3在细胞中的积累，更为重要的是，降低了这些抑制型表观遗传修饰在*Bmp*和*Nanog*等重要干细胞维持以及成骨分化调控基因启动子区域的富集，可达到促进骨形成的现象[96]。

5.2 糖代谢与表观遗传修饰——乙酰化

在葡萄糖代谢过程中，3-磷酸甘油酸酯被代谢为丙酮酸。丙酮酸除了能够转化为乳酸外，还可以被运输到线粒体中，在丙酮酸脱氢酶（Pyruvate Dehydrogenase，PDH）的催化下，丙酮酸被转化为乙酰辅酶a。而PDH的活性同时被丙酮酸脱氢酶激酶（Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1-4，PDK1-4）所调控。因此，糖酵解产生的乙酰辅酶a受到丙酮酸、PDH以及PDK酶活性的多重调节。PDK活性的增加导致丙酮酸向乙酰辅酶a转化的减少，而PDK本身的活性是通过丙酮酸和NAD^+的抑制作用来调节的，因此在丙酮酸、PDH和PDK之间形成负反馈[75]。重要的是，乙酰化辅酶a可以启动三羧酸循环，导致脂质的重新合成，以及进入细胞核参与组蛋白上特定氨基酸残基——主要是赖氨酸上的乙酰化[71]。哺乳动物细胞ATP柠檬酸裂解酶（ATP Citrate Lyase，ACLY）将葡萄糖来源的线粒体柠檬酸进一步转化为核乙酰辅酶a，而后者是组蛋白乙酰化底物产生的又一途径[97]（见图3）。

在糖代谢过程中，NADH与NAD^+的相互转换，又为细胞提供了去乙酰化酶Sirtuin的底物——NAD^+（见图3）。在伴有严重骨质疏松症的Werner综合症的动物模型中，NAD^+的恢复可以缓解其线粒体功能障碍，延长其寿命[98，99]。烟酰胺单核苷酸（Nicotinamide Mononucleotide，NMN），一种关键的NAD^+中间体，已被证明可在小鼠模型中增强NAD^+的生物合成而改善多种病理症状[82]。Mills等[80]研究指出，NMN对小鼠骨质疏松症有一定的保护作用。NAD^+的另一种天然前体烟酰胺核苷（Nicotinamide Riboside，NR）被证明可延长野生型小鼠[81]和早衰症动物模型的寿命[82]。NAD^+的丰度与表达量可以调节Sirtuins的酶活性[100]。而Sirtuins是一个烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖型去乙酰化酶家族，具有显著的促进长寿和对抗年龄相关疾病的能力。迄今为止，已有七种NAD^+依赖性的赖氨酸去乙酰化酶SIRT1-7被鉴定出来，并发现其在促进DNA修复、抗氧化防御、线粒体生物发生和抗炎等方面具有重要作用[101]。其中，SIRT1主要位于细胞核和胞质中，调节多种转录因子，如FOXO [102]和过氧化物酶体增殖物激活受体γ共激活因子1α（PPAR Coactivator 1α，PGC1α)[103]。其他SIRT蛋白中，SIRT2主要存在于细胞质中，而SIRT3、SIRT4和SIRT5位于线粒体中，参与调节ATP的产生、抗氧化防御、能量代谢和细胞信号传导[104]。*Sirt3*敲除小鼠在8周龄时骨量明显低于对照组；但是在成年后6月龄的敲除小鼠中，骨量相对于对照组变化并不明显，这提示SIRT3虽然在骨形成中发挥重要作用，但是仍需要后续实验研究其在特定细胞（MSCs、成骨细胞、破骨细胞）中的功能[105，106]。SIRT6和SIRT7主要定位于细胞核，调节对受损DNA的应答和修复[104]。Sirtuins在去乙酰化过程中将NAD^+和乙酰基转化为烟酰胺（Nicotinamide，NAM）和O-乙酰-adp-

核糖[107]（见图3）。NAD+/NADH在糖酵解、三羧酸循环和氧化磷酸化中的作用提示，代谢、Sirtuin蛋白、去乙酰化修饰之间存在复杂的相互作用。并且，Sirtuin敲除和转基因模型为这些蛋白在骨稳态中的功能和信号转导提供了新的理解。



OAADPr：O-acetyl-ADP-ribose, O-乙酰ADP核糖；NAM：烟酰胺；NAD+：氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸；NADH：还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸；DNMT：DNA甲基转移酶；HMT：组蛋白乙酰转移酶；JHDM：Jumonji家族组蛋白去甲基化酶；TET：Ten-Eleven Translocation methylcytosine dioxygenase；HAT：组蛋白去乙酰化酶；SAM：S-adenosyl methionine（S-腺苷甲硫氨酸）；Met：甲硫氨酸；SAH：S-腺苷同型半胱氨酸；meTHF：5,10-亚甲基四氢叶酸；mTHF：5-甲基四氢叶酸；红点：甲基基团；绿点：乙酰基团；虚线代表两者之间有省略的步骤。

图3 代谢中间产物对表观遗传修饰的影响

6 总结

一直以来，科学家们对于糖代谢在系统性疾病中的作用机制进行了深入的研究，尤其是针对高糖高脂肪饮食导致的肥胖和2型糖尿病的研究一直都是代谢领域内的重中之重。在骨骼系统中，科学家们同样发现MSCs使用糖作为营养物质的方式会随着定向分化进程而发生改变。近些年来，虽然相关报道逐渐增多，但糖代谢作为广泛发生的生物学事件，如何“指导”干细胞向特定方向，或者说有利于某一方向分化仍是不解之谜。其中一种可能是，MSCs的分化不仅依赖于特定转录因子，同样需要糖代谢中特定的中间产物作为基石。因此，这些中间产物是如何影响分化的，将成为下一个重要的科学问题亟待解决。

近年来，研究者运用质谱、液相色谱、同位素标记等多种手段鉴定并验证了多种新型的组蛋白修饰，如组蛋白的乳酸化修饰、巴豆酰化修饰、琥珀酰化修饰、糖基化修饰等。发生在组蛋白赖氨酸上的乳酸化修饰在人和小鼠的细胞中广泛存在，通常能激活基因转录。组蛋白乳酸化修饰的供体来源于葡萄糖代谢产生的乳酸，并受到糖酵解和线粒体氧化代谢的调控[108]。由于乳酸代谢在众多生理以及病理过程中被调节并发挥重要作用，组蛋白乳酸化修饰可能成为代谢调控表观遗传的重要环节。除乳酸化修饰外，巴豆酸、琥珀酸、酮体等代谢通路来源的组蛋白修饰为揭示细胞代谢如何通过表观遗传调控基因转录提供了新的视角。然而，上述修饰在特定环境下如何动态地响应能量代谢，以及与特定生理病理情况的因果关系，尚待进一步研究。为了

将表观遗传作为潜在的治疗目标，有必要利用纵向研究、因果推断统计学、功能模型测试等明确表观遗传紊乱是疾病的原因还是疾病的后果，这也是当前表观遗传研究的热门话题。另外，单细胞中的代谢异质性，表观遗传因子的细胞特异性，以及二者如何精准调控影响由不同胚层不同发育阶段细胞组成的组织或器官的功能尚待研究。单细胞多组学技术将帮助在单细胞水平解析基因表达、DNA甲基化、组蛋白修饰和染色质可及性[109]。此外，器官或组织的不同细胞组成，也可以通过与参考表观基因组的比较在计算上进行校正[110]。表观遗传因子间具有相互拮抗或协同作用，因此形成高度动态的、与细胞代谢互动的复杂而精密的调控网络。有研究报道，在癌症治疗的过程中靶向不同的表观遗传途径的小分子的组合（如组蛋白去乙酰化酶抑制剂和DNA甲基化抑制剂联用）可以增加它们的治疗效率[111, 112]。然而，目前对成骨分化过程中表观遗传调控机制的研究多集中在某一特定表观遗传因子，未来的研究应整合成骨分化过程中的表观基因组信息，绘制表观遗传图谱，探讨表观遗传药物的联合应用方案，实现高效地治疗骨疾病或应用于骨组织工程的目的。

在这篇综述中，我们浅谈了表观遗传修饰和葡萄糖代谢在MSCs成骨分化中的作用，梳理了两种调控方式在分子层面的机制以及相关性。表观遗传修饰是干细胞分化过程中最为普遍的调控方式之一，领域内已有广泛研究。糖代谢中很多的中间产物恰恰是表观遗传修饰中重要的底物和效应分子，因而糖代谢和表观遗传的相互作用很可能成为今后本领域的另一个研究重点。肿瘤研究领域，除了糖代谢中间产物，众多关键酶（也是限速酶）同样可以调控表观遗传修饰。例如，延胡索酸水合酶突变会导致基因的过度甲基化，这一过程与肿瘤发生密切相关[113]，但该基因的功能在成骨分化中暂无明确报道。这提示我们今后可以深入研究代谢限速酶，检测其在硬组织形成与修复中的作用，并探讨该过程是否由表观遗传修饰介导。

参考文献

[1] WASEEM A, MUHAMMAD A A, AFEEFA E, et al. Non-vascularized autogenous bone grafts for reconstruction of maxillofacial osseous defects[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2018, 28(1): 17-21.

[2] CHO J, D'ANTUONO M, GLICKSMAN M, et al. A review of clinical trials: mesenchymal stem cell transplant therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus [J]. Am J Stem Cells, 2018, 7(4): 82-93.

[3] ZHENG H, ZHANG B, CHHATBAR P Y, et al. Mesenchymal stem cell therapy in stroke: a systematic review of literature in pre-clinical and clinical research [J]. Cell Transplant, 2018, 27(12): 1723-1730.

[4] ATTAR A, BAHMANZADEGAN JAHROMI F,KAVOUSI S, et al. Mesenchymal stem cell transplantation after acute myocardial infarction: a meta-analysis of clinical trials[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 600.

[5] JASIM S A, YUMASHEV A V, ABDELBASSET W K, et al. Shining the light on clinical application of mesenchymal stem cell therapy in autoimmune diseases [J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 101.

[6] KABAT M, BOBKOV I, KUMAR S, et al. Trends in mesenchymal stem cell clinical trials 2004-2018: is efficacy optimal in a narrow dose range? [J]. Stem Cells Transl Med, 2020, 9(1): 17-27.

[7] RODRIGUEZ-COLLAZO E R, URSO M L. Combined use of the Ilizarov method, concentrated bone marrow aspirate (cBMA), and platelet-rich plasma (PRP) to expedite healing of bimalleolar fractures[J]. Strategies Trauma Limb Reconstr, 2015, 10(3): 161-166.

[8] DORO D H, GRIGORIADIS A E, LIU K J. Calvarial suture-derived stem cells and their contribution to cranial bone repair[J]. Front Physiol, 2017, 8: 956.

[9] AVGUSTINOVA A, BENITAH S A. Epigenetic control of adult stem cell function[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(10): 643-658.

[10] WANG L, NIU N, LI L, et al. H3K36 trimethylation mediated by SETD2 regulates the fate of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. PLoS Biol, 2018, 16(11): e2006522.

[11] YANG R, YU T, KOU X, et al. Tet1 and Tet2 maintain mesenchymal stem cell homeostasis via demethylation of the P2rX7 promoter[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2143.

[12] KUANG W, ZHENG L, XU X, et al. Dysregulation of the miR-146a-Smad4 axis impairs osteogenesis of bone mesenchymal stem cells under inflammation[J]. Bone Res, 2017, 5: 17037.

[13] FRIEDENSTEIN A J, PETRAKOVA K V, KUROLESOVA A I, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues [J]. Transplantation, 1968, 6(2): 230-247.

[14] UCCELLI A, MORETTA L, PISTOIA V. Mesenchymal stem cells in health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(9): 726-736.

[15] COSTA L A, EIRO N, FRAILE M, et al. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(2): 447-467.

[16] VARGA E, NEMES C, KOVÁCS E, et al. Generation of human induced pluripotent stem cell (iPSC) line from an unaffected female carrier of Mucopolysaccharidosis type II (MPS II) disorder[J]. Stem Cell Res, 2016, 17(3): 514-516.

[17] HOLLIDAY R. Epigenetics: an overview[J]. Dev Genet, 1994, 15(6): 453-457.

[18] TORAÑO E G, BAYÓN G F, DEL REAL Á, et al. Age-associated hydroxymethylation in human bone-marrow mesenchymal stem cells[J]. J Transl Med, 2016, 14(1): 207.

[19] LIU S, LIU D, CHEN C, et al. MSC transplantation improves osteopenia via epigenetic regulation of notch signaling in lupus[J]. Cell Metab, 2015, 22(4): 606-618.

[20] ZHOU G S, ZHANG X L, WU J P, et al. 5-Azacytidine facilitates osteogenic gene expression and differentiation of mesenchymal stem cells by alteration in DNA methylation[J]. Cytotechnology, 2009, 60(1-3): 11.

[21] SHEN W C, LAI Y C, LI L H, et al. Methylation and PTEN activation in dental pulp mesenchymal stem cells promotes osteogenesis and reduces oncogenesis[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2226.

[22] WU T P, WANG T, SEETIN M G,et al. DNA methylation on N(6)-adenine in mammalian embryonic stem cells[J]. Nature, 2016, 532(7599): 329-333.

[23] ZHOU C, LIU Y, LI X, et al. DNA N(6)-methyladenine demethylase ALKBH1 enhances osteogenic differentiation of human MSCs[J]. Bone Res, 2016, 4: 16033.

[24] LI W, SHI Y, ZHANG T, et al. Structural insight into human N6amt1-Trm112 complex functioning as a protein methyltransferase[J]. Cell Discov, 2019, 5: 51.

[25] MUSSELMAN C A, LALONDE M E, CÔTÉ J, et al. Perceiving the epigenetic landscape through histone readers[J]. Nat Struct Mol Biol, 2012, 19(12): 1218-1227.

[26] SHI Y. Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease[J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(11): 829-833.

[27] BLACK J C, VAN RECHEM C, WHETSTINE J R. Whetstine, histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact[J]. Mol Cell, 2012, 48(4): 491-507.

[28] LAWSON K A, TETEAK C J, GAO J, et al. ESET histone methyltransferase regulates osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells during postnatal bone development[J]. FEBS Lett, 2013, 587(24): 3961-3967.

[29] DENG P, YUAN Q, CHENG Y, et al. Loss of KDM4B exacerbates bone-fat imbalance and mesenchymal stromal cell exhaustion in skeletal aging[J]. Cell Stem Cell, 2021, 28(6): 1057-1073, e3.

[30] WEI Y, CHEN Y H, LI L Y, et al. CDK1-dependent phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of H3K27 and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(1): 87-94.

[31] SCHWARZ D, VARUM S, ZEMKE M, et al. Ezh2 is required for neural crest-derived cartilage and bone formation[J]. Development, 2014, 141(4): 867-877.

[32] DUDAKOVIC A, CAMILLERI E T, PARADISE C R, et al. Enhancer of zeste homolog 2 (Ezh2) controls bone formation and cell cycle progression during osteogenesis in mice[J]. J Biol Chem, 2018, 293(33): 12894-12907.

[33] HEMMING S, CAKOUROS D, ISENMANN S, et al. EZH2 and KDM6A act as an epigenetic switch to regulate mesenchymal stem cell lineage specification[J]. Stem Cells, 2014, 32(3): 802-815.

[34] YANG D, OKAMURA H, TERAMACHI J, et al. Histone demethylase Utx regulates differentiation and mineralization in osteoblasts[J]. J Cell Biochem, 2015, 116(11): 2628-2636.

[35] YIN B, YU F, WANG C, LI B, et al. Epigenetic control of mesenchymal stem cell fate decision via histone methyltransferase Ash1l[J]. Stem Cells, 2019, 37(1): 115-127.

[36] CHEN Q, ZHANG L, DE CROMBRUGGHE B, et al. Mesenchyme-specific overexpression of nucleolar protein 66 in mice inhibits skeletal growth and bone formation[J]. FASEB J, 2015, 29(6): 2555-2565.

[37] SUN J, FENG H, XING W, et al., Histone demethylase LSD1 is critical for endochondral ossification during bone fracture healing[J]. Sci Adv, 2020, 6(45): eaaz1410.

[38] YU G, WANG J, LIN X, et al. Demethylation of SFRP2 by histone demethylase KDM2A regulated osteo -/ dentinogenic differentiation of stem cells of the apical papilla[J]. Cell Prolif, 2016, 49(3): 330-340.

[39] SHAHBAZIAN M D, GRUNSTEIN M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation[J]. Annu Rev Biochem, 2007, 76: 75-100.

[40] ZHANG P, LIU Y, JIN C, et al. Histone H3K9 acetyltransferase PCAF is essential for osteogenic differentiation through bone morphogenetic protein signaling and may be involved in osteoporosis[J]. Stem Cells, 2016, 34(9): 2332-2341.

[41] CARPIO L R, BRADLEY E W, MCGEE-LAWRENCE M E, et al. Histone deacetylase 3 supports endochondral bone formation by controlling cytokine signaling and matrix remodeling[J]. Sci Signal, 2016, 9(440): ra79.

[42] BRADLEY E W, CARPIO L R, VAN WIJNEN A J, et al. Histone deacetylases in bone development and skeletal disorders[J]. Physiol Rev, 2015, 95(4): 1359-1381.

[43] DENU R A. SIRT3 enhances mesenchymal stem cell longevity and differentiation[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 5841716.

[44] ZAINABADI K, LIU C J, CALDWELL A L M, et al. SIRT1 is a positive regulator of in vivo bone mass and a therapeutic target for osteoporosis[J]. PLoS One, 2017, 12 (9): e0185236.

[45] SUN W, QIAO W, ZHOU B, et al. Overexpression of Sirt1 in mesenchymal stem cells protects against bone loss in mice by FOXO3a deacetylation and oxidative stress inhibition[J]. Metabolism, 2018, 88: 61-71.

[46] WANG H, HU Z, WU J, et al. Sirt1 promotes osteogenic differentiation and increases alveolar bone mass via bmi1 activation in mice[J]. J Bone Miner Res, 2019, 34(6): 1169-1181.

[47] KIM S J, PIAO Y, LEE M G, et al. Loss of Sirtuin 6 in osteoblast lineage cells activates osteoclasts, resulting in osteopenia[J]. Bone, 2020, 138: 115497.

[48] CHENG J, ZHOU L, LIU Q, et al. Cyanidin chloride inhibits ovariectomy-induced osteoporosis by suppressing RANKL-mediated osteoclastogenesis and associated signaling pathways[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(3): 2502-2512.

[49] WANG J, WANG C D, ZHANG N, et al. Mechanical stimulation orchestrates the osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells by regulating HDAC1 [J]. Cell Death Dis, 2016, 7: e2221.

[50] LI B, ZHAO J, MA J X, et al. Overexpression of DNMT1 leads to hypermethylation of H19 promoter and inhibition of Erk signaling pathway in disuse osteoporosis[J]. Bone, 2018, 111: 82-91.

[51] WANG C, SHAN S, WANG C, et al. Mechanical stimulation promote the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells through epigenetic regulation of Sonic Hedgehog[J]. Exp Cell Res, 2017, 352(2): 346-356.

[52] LIU Y, LIU W, YU Z, et al. A novel BRD4 inhibitor suppresses osteoclastogenesis and ovariectomized osteoporosis by blocking RANKL-mediated MAPK and NF-κB pathways[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(7): 654.

[53] BAUD'HUIN M, LAMOUREUX F, JACQUES C, et al. Inhibition of BET proteins and epigenetic signaling as a potential treatment for osteoporosis[J]. Bone, 2017, 94: 10-21.

[54] WANG F S, LIAN W S, LEE M S, et al. Histone demethylase UTX counteracts glucocorticoid deregulation of osteogenesis by modulating histone-dependent and -independent pathways[J]. J Mol Med (Berl), 2017, 95(5): 499-512.

[55] DUDAKOVIC A, CAMILLERI E T, RIESTER S M, et al. Enhancer of zeste homolog 2 inhibition stimulates bone formation and mitigates bone loss caused by ovariectomy in skeletally mature mice[J]. J Biol Chem, 2016, 291(47): 24594-24606.

[56] DUDAKOVIC A, SAMSONRAJ R M, PARADISE C R, et al. Inhibition of the epigenetic suppressor EZH2 primes osteogenic differentiation mediated by BMP2[J]. J Biol Chem, 2020, 295(23): 7877-7893.

[57] MUECKLER M, THORENS B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters[J]. Mol Aspects Med, 2013, 34(2-3): 121-138.

[58] WANG C, WANG J, LI J, et al. KDM5A controls bone morphogenic protein 2-induced osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells during osteoporosis[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(8): e2335.

[59] GHORBANINEJAD M, KHADEMI-SHIRVAN M, HOSSEINI S, et al. Epidrugs: novel epigenetic regulators that open a new window for targeting osteoblast differentiation[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 456.

[60] JING H, SU X, GAO B, et al. Epigenetic inhibition of Wnt pathway suppresses osteogenic differentiation of BMSCs during osteoporosis[J]. Cell Death Dis, 2018, 9 (2): 176.

[61] PEARSON K J, BAUR J A, LEWIS K N, et al. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span[J]. Cell Metab, 2008, 8(2): 157-168.

[62] FENG J, LIU S, MA S, et al. Protective effects of resveratrol on postmenopausal osteoporosis: regulation of SIRT1-NF - κB signaling pathway[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014, 46(12): 1024-1033.

[63] MERCKEN E M, MITCHELL S J, MARTIN-MONTALVO A, et al. SRT2104 extends survival of male mice on a standard diet and preserves bone and muscle mass[J]. Aging Cell, 2014, 13(5): 787-796.

[64] ARTSI H, COHEN-KFIR E, GURT I, et al. The Sirtuin1 activator SRT3025 down-regulates sclerostin and rescues ovariectomy-induced bone loss and biomechanical deterioration in female mice[J]. Endocrinology, 2014, 155 (9): 3508-3515.

[65] HOU T, ZHANG L, YANG X. Ferulic acid, a natural polyphenol, protects against osteoporosis by activating SIRT1 and NF-κB in neonatal rats with glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 120: 109205.

[66] LI Z, FREY J L, WONG G W, et al. Glucose transporter-4 facilitates insulin-stimulated glucose uptake in osteoblasts[J]. Endocrinology, 2016, 157(11): 4094-4103.

[67] ESEN E, CHEN J, KARNER C M, et al. WNT-LRP5 signaling induces Warburg effect through mTORC2 activation during osteoblast differentiation[J]. Cell Metab, 2013, 17(5): 745-755.

[68] GHAYOR C, GJOKSI B, DONG J, et al. N, N Dimethylacetamide a drug excipient that acts as bromodomain ligand for osteoporosis treatment[J]. Sci Rep, 2017, 7: 42108.

[69] KARFELD-SULZER L S, GHAYOR C, SIEGENTHALER B, et al. Comparative study of NMP-preloaded and diploaded membranes for guided bone regeneration of rabbit cranial defects[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2017, 11(2): 425-433.

[70] GJOKSI B, GHAYOR C, SIEGENTHALER B, et al. The epigenetically active small chemical N-methyl pyrrolidone (NMP) prevents estrogen depletion induced osteoporosis [J]. Bone, 2015, 78: 114-121.

[71] KOOPMAN R, LY C H, RYALL J G. A metabolic link to skeletal muscle wasting and regeneration[J]. Front Physiol, 2014, 5: 32.

[72] LIN R Y, VERA J C, CHAGANTI R S, et al. Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter[J]. J Biol Chem, 1998, 273(44): 28959-28965.

[73] SIMSEK T, KOCABAS F, ZHENG J, et al. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(3): 380-390.

[74] RODRÍGUEZ-COLMAN M J, SCHEWE M, MEERLO M, et al. Interplay between metabolic identities in the intestinal crypt supports stem cell function[J]. Nature, 2017, 543(7645): 424-427.

[75] TAKUBO K, NAGAMATSU G, KOBAYASHI C I, et al. Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2013, 12(1): 49-61.

[76] GUNTUR A R, GERENCSER A A, LE P T, et al. Osteoblast-like MC3T3-E1 cells prefer glycolysis for atp production but adipocyte-like 3T3-L1 cells prefer oxidative phosphorylation[J]. J Bone Miner Res, 2018, 33 (6): 1052-1065.

[77] THOMAS D M, ROGERS S D, NG K W, et al. Dexamethasone modulates insulin receptor expression and subcellular distribution of the glucose transporter GLUT 1 in UMR 106-01, a clonal osteogenic sarcoma cell line[J]. J Mol Endocrinol, 1996, 17(1): 7-17.

[78] THOMAS D M, MAHER F, ROGERS S D, et al. Expression and regulation by insulin of GLUT 3 in UMR 106-01, a clonal rat osteosarcoma cell line[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 218(3): 789-793.

[79] WEI J, SHIMAZU J, MAKINISTOGLU M P, et al. Glucose uptake and runx2 synergize to orchestrate osteoblast differentiation and bone formation[J]. Cell, 2015, 161(7): 1576-1591.

[80] MILLS K F, YOSHIDA S, STEIN L R, et al. Long-term administration of nicotinamide mononucleotide mitigates age - associated physiological decline in mice[J]. Cell Metab, 2016, 24(6): 795-806.

[81] ZHANG H, RYU D, WU Y, et al. NAD(+) repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice[J]. Science, 2016, 352(6292): 1436-1443.

[82] FANG E F, KASSAHUN H, CROTEAU D L, et al. NAD (+) replenishment improves lifespan and healthspan in ataxia telangiectasia models via mitophagy and dna repair [J]. Cell Metab, 2016, 24(4): 566-581.

[83] LEE S Y, LONG F. Notch signaling suppresses glucose metabolism in mesenchymal progenitors to restrict osteoblast differentiation[J]. J Clin Invest, 2018, 128(12): 5573-5586.

[84] LEE S Y, ABEL E D, LONG F. Glucose metabolism induced by Bmp signaling is essential for murine skeletal development[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4831.

[85] LI B, SHI Y, LIU M, et al. Attenuates of NAD(+) impair BMSC osteogenesis and fracture repair through OXPHOS [J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 77.

[86] LUNT S Y, VANDER HEIDEN M G.Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2011, 27: 441-464.

[87] TOHYAMA S, HATTORI F, SANO M, et al. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. Cell Stem Cell, 2013, 12(1): 127-137.

[88] LOCASALE J W. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(8): 572-583.

[89] LABUSCHAGNE C F, VAN DEN BROEK N J, MACKAY G M, et al. Serine, but not glycine, supports

one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells [J]. Cell Rep, 2014, 7(4): 1248-1258.

[90] MADDOCKS O D, LABUSCHAGNE C F, ADAMS P D, et al. Serine metabolism supports the methionine cycle and dna / rna methylation through de novo ATP synthesis in cancer cells[J]. Mol Cell, 2016, 61(2): 210-221.

[91] KURNIAWAN H, FRANCHINA D G, GUERRA L, et al. Glutathione restricts serine metabolism to preserve regulatory T cell function[J]. Cell Metab, 2020, 31(5): 920-936, e7.

[92] FAWAL M A, JUNGAS T, KISCHEL A, et al. Cross talk between one-carbon metabolism, eph signaling, and histone methylation promotes neural stem cell differentiation[J]. Cell Rep, 2018, 23(10): 2864-2873, e7.

[93] ZEE B M, LEVIN R S, XU B, et al. In vivo residue-specific histone methylation dynamics[J]. J Biol Chem, 2010, 285(5): 3341-3350.

[94] GIANCASPERO T A, BUSCO G, PANEBIANCO C, et al. FAD synthesis and degradation in the nucleus create a local flavin cofactor pool[J]. J Biol Chem, 2013, 288(40): 29069-29080.

[95] YANG H, LIN H, XU H, et al. TET-catalyzed 5-methylcytosine hydroxylation is dynamically regulated by metabolites[J]. Cell Res, 2014, 24(8): 1017-1020.

[96] WANG Y, DENG P, LIU Y, et al. Alpha-ketoglutarate ameliorates age-related osteoporosis via regulating histone methylations[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 5596.

[97] WELLEN K E, HATZIVASSILIOU G, SACHDEVA U M, et al. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation[J]. Science, 2009, 324(5930): 1076-1080.

[98] FANG E F, HOU Y, LAUTRUP S, et al. NAD(+) augmentation restores mitophagy and limits accelerated aging in Werner syndrome[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 5284.

[99] OSHIMA J, SIDOROVA J M, MONNAT R J. Werner syndrome: clinical features, pathogenesis and potential therapeutic interventions[J]. Ageing Res Rev, 2017, 33: 105-114.

[100] IMAI S I, GUARENTE L. NAD+ and sirtuins in aging and disease[J]. Trends Cell Biol, 2014, 24(8): 464-471.

[101] DONMEZ G, GUARENTE L. Aging and disease: connections to sirtuins[J]. Aging Cell, 2010, 9(2): 285-290.

[102] SHAN P, FAN G, SUN L, et al. SIRT1 functions as a negative regulator of eukaryotic poly(A)RNA transport [J]. Curr Biol, 2017, 27(15): 2271-2284, e5.

[103] RODGERS J T, LERIN C, HAAS W, et al. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1[J]. Nature, 2005, 434(7029): 113-118.

[104] LI Q, CHENG J C, JIANG Q, et al. Role of sirtuins in bone biology: potential implications for novel therapeutic strategies for osteoporosis[J]. Aging Cell, 2021, 20(2): e13301.

[105] GAO J, FENG Z, WANG X, et al. SIRT3 / SOD2 maintains osteoblast differentiation and bone formation by regulating mitochondrial stress[J]. Cell Death Differ, 2018, 25(2): 229-240.

[106] HO L, WANG L, ROTH T M, et al. Sirtuin-3 promotes adipogenesis, osteoclastogenesis, and bone loss in aging male mice[J]. Endocrinology, 2017, 158(9): 2741-2753.

[107] CANTÓ C, MENZIES K J, AUWERX J. NAD(+) metabolism and the control of energy homeostasis: a balancing act between mitochondria and the nucleus[J]. Cell Metab, 2015, 22(1): 31-53.

[108] ZHANG D, TANG Z, HUANG H, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation[J]. Nature, 2019, 574(7779): 575-580.

[109] DAI Z, RAMESH V, LOCASALE J W. The evolving metabolic landscape of chromatin biology and epigenetics [J]. Nat Rev Genet, 2020, 21(12): 737-753.

[110] BERDASCO M, ESTELLER M. Clinical epigenetics: seizing opportunities for translation[J]. Nat Rev Genet, 2019, 20(2): 109-127.

[111] FISKUS W, SHARMA S, SHAH B, et al. Highly effective combination of LSD1 (KDM1A) antagonist and pan-histone deacetylase inhibitor against human AML cells[J]. Leukemia, 2014, 28(11): 2155-2164.

[112] ZAHNOW C A, TOPPER M, STONE M, et al. Inhibitors of DNA methylation, histone deacetylation, and histone demethylation: a perfect combination for cancer therapy [J]. Adv Cancer Res, 2016, 130: 50-111.

[113] LI X, EGERVARI G, WANG Y, et al. Regulation of chromatin and gene expression by metabolic enzymes and metabolites[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(9): 563-578.