

·REVIEW·

·综述·

RNA结合蛋白相分离在激素性股骨头坏死中的作用机制

胡天发¹, 韩杰², 吴亚超¹, 姚国军¹, 尚轲斌¹, 廖祯¹, 农彬¹, 玉开龙¹

(1. 广西中医药大学研究生院, 南宁 530001; 2. 广西中医药大学第二附属医院关节与运动医学科, 南宁 530011)

[摘要] 激素性股骨头坏死(steroid-associated necrosis of the femoral head, SANFH)是一种由糖皮质激素诱发的难治性骨关节疾病, 其病理机制复杂, 临床干预手段有限。近年来研究表明, RNA结合蛋白(RNA binding proteins, RBPs)通过液-液相分离(liquid-liquid phase separation, LLPS)在转录后调控、细胞信号转导及代谢平衡中发挥关键作用。在SANFH的发病机制中, RBPs通过LLPS参与调控骨代谢关键环节, 可能成为潜在干预靶点。RBPs的结构域特性、RNA结合状态及三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)微环境等因素可动态调节其相分离行为, 进而影响DNA损伤修复、铁死亡、外泌体形成、转化生长因子- β (transforming growth factor-beta, TGF- β)/Sma和Mad相关蛋白7(Sma- and Mad-related protein 7, Smad7)信号通路、炎症小体激活及m⁶A修饰等过程, 这些均与SANFH的发生和发展密切相关。靶向调控RBPs相分离, 有望通过多途径干预骨代谢失衡、抑制细胞死亡及减轻炎症反应。将RBPs相分离这一前沿细胞生物学机制与SANFH的多阶段、多通路病理进程进行串联, 构建了一个新的机制框架, 这为SANFH的防治提供新思路。未来需进一步明确RBPs相分离在SANFH中的具体作用机制, 并探索基于相分离调控的精准治疗策略。

[关键词] RNA结合蛋白; 激素性股骨头坏死; 糖皮质激素; 相分离; 外泌体; m⁶A修饰; 铁死亡

Mechanisms of RNA-binding protein phase separation in steroid-associated necrosis of the femoral head

HU Tianfa¹, HAN Jie², WU Yachao¹, YAO Guojun¹, SHANG Kebin¹, LIAO Zhen¹, NONG Bin¹, YU Kailong¹

(1. Graduate School, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001; 2. Department of Joint and Sports Medicine, Second Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

ABSTRACT

Steroid-associated necrosis of the femoral head (SANFH) is a refractory osteoarticular disease induced by glucocorticoids, characterized by a complex pathogenesis and limited

收稿日期(Date of reception): 2026-01-04

第一作者(First author): 胡天发, Email: 3118334434@qq.com, ORCID: 0009-0009-8340-6113;

通信作者(Corresponding author): 韩杰, 主任医师, Email: jham@163.com, ORCID: 0000-0003-4736-9131

基金项目(Foundation item): 国家自然科学基金(82260858, 82460872); 广西高水平中医药重点学科建设试点项目(桂中医药科教发[2023]13号); 广西中医药重点研究室建设项目{桂中医药科教发[2023]9号}; 广西青年岐黄学者培养项目{桂中医药科教发[2022]13号}; 广西中医药大学“岐黄工程”高层次人才团队培育项目{桂中医大党[2024]3号}。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82260858; 82460872); the Pilot project of the Construction of high-level Key disciplines of Traditional Chinese Medicine in Guangxi (GTYKEF[2023]13), the Guangxi Key Research Office of Traditional Chinese Medicine Construction Project {GTYKEF[2023]9}, the Guangxi Youth Qhuang Scholars Training Project {GTYKEF [2022]13}, and the “Qhuang Project” high-level talent team Cultivation Project of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine {[2024]3}, China.

开放获取(Open access): 本文遵循知识共享许可协议, 允许第三方用户按照署名-非商业性使用-禁止演绎4.0(CC BY-NC-ND 4.0)的方式, 在任何媒介以任何形式复制、传播本作品(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)。

clinical treatment options. Recent studies have demonstrated that RNA-binding proteins (RBPs) play crucial roles in post-transcriptional regulation, cell signal transduction, and metabolic homeostasis through liquid-liquid phase separation (LLPS). In the pathogenesis of SANFH, RBPs participate in the regulation of key processes involved in bone metabolism via LLPS and may represent potential therapeutic targets. The phase-separation behavior of RBPs can be dynamically regulated by factors such as domain characteristics, RNA-binding status, and the adenosine triphosphate (ATP) microenvironment. These regulatory mechanisms subsequently influence DNA damage repair, ferroptosis, exosome biogenesis, the transforming growth factor-beta (TGF- β)/Sma- and Mad-related protein 7 (Smad7) signaling pathway, inflammasome activation, and m⁶A modification, all of which are closely associated with the initiation and progression of SANFH. Targeted regulation of RBP phase separation may provide a promising strategy to restore bone metabolism homeostasis, inhibit cell death, and alleviate inflammatory responses through multiple mechanisms. By integrating the emerging cell-biological mechanism of RBP phase separation with the multistage and multipathway pathological progression of SANFH, a novel mechanistic framework is proposed, offering new perspectives for the prevention and treatment of SANFH. Further studies are warranted to elucidate the precise roles of RBP phase separation in SANFH and to explore phase separation-based precision therapeutic strategies.

KEY WORDS

RNA-binding protein; steroid-associated necrosis of the femoral head; glucocorticoid; phase separation; exosome; m⁶A modification; ferroptosis

激素性股骨头坏死(steroid-associated necrosis of the femoral head, SANFH)是一种由于长期使用糖皮质激素等原因导致股骨头代谢异常、脂质代谢失衡和血液微循环紊乱,最终引发骨小梁骨折、骨组织坏死塌陷、髋关节功能障碍的难治性骨骼疾病,是最常见的非外伤性股骨头坏死类型^[1]。在临床治疗中,由于风湿性疾病、免疫相关疾病等对高剂量糖皮质激素高度依赖且治疗周期长, SANFH发病率正逐年上升。据统计,中国是股骨头坏死患者数量较多的国家之一,每年需要接受治疗的患者例数超800万^[2];多中心流行病学研究报告^[3]指出, SANFH约占全部股骨头坏死病例的24.1%。同时,由于糖皮质激素在临床治疗中难以替代,探究SANFH的具体发病机制极为迫切。

RNA结合蛋白(RNA-binding proteins, RBPs)是一种通过与RNA分子结合并参与基因表达调控和转录过程的蛋白质,其在细胞稳态维持和组织发育中起关键作用^[4]。RBPs可通过液-液相分离(liquid-liquid phase separation, LLPS)形成无膜细胞器,这是一种由特定蛋白质和核酸在最优条件和浓度下,在水环境中引发的可逆相变,形成一个密集的液滴,即“凝聚体”^[5]。目前,研究^[6-7]发现LLPS在DNA修复、

细胞信号转导、代谢调控等方面起重要作用。SANFH的病理机制聚焦于脂代谢紊乱、氧化应激、血管损伤和细胞凋亡/焦亡等。然而,这些下游事件是否存在一个共同的、更上游的分子调控枢纽,以及RBPs的LLPS是否参与其中,仍需要进一步探索。近年来研究^[8]发现, RBPs通过LLPS形成的无膜细胞器,也是协调基因转录、翻译、信号转导和应激反应的关键空间平台。在多种退行性疾病中, RBPs的异常相分离或是致病的核心环节。因此,糖皮质激素可能通过干扰股骨头关键靶细胞内特定RBPs的相分离稳态,促使其从动态的、功能性的“工作平台”转变为病理性的、功能失调的凝聚体,同时扰乱DNA修复、铁死亡、炎症信号、成骨/破骨分化等多个下游通路,最终协同驱动骨坏死的发生,而药物通过参与调控RBPs的LLPS则具备一定的治疗潜力。

本文旨在通过系统分析糖皮质激素诱导股骨头坏死发生的病理进程,总结RBPs在各领域研究中的最新进展,归纳RBPs通过LLPS在DNA修复、铁死亡调控和外泌体形成、转化生长因子- β (transforming growth factor-beta, TGF- β)/Sma和Mad相关蛋白7(Sma- and Mad-related protein 7, Smad7)信号通路调控、炎症因子调节等环节中的作用机制,对RBPs在SANFH

中的治疗作用提出展望, 并对潜在靶点的临床转化应用提出合理方向, 为靶向 RBP 的 SANFH 治疗策略提供新的思路。

1 RBPs 相分离的调控机制

1.1 RBPs 上的无序结构域影响 LLPS

RBPs 上的无序结构域在 LLPS 中发挥重要推动作用。酵母核糖体生成因子是一种内在无序的 RBPs, 具有 8 个重复的带正电荷且无结构的核酸结合基序, 这种多个基序的结构能够通过协同作用催化 RNA 折叠, 驱动相分离过程^[9]。严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 型(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)的核衣壳蛋白能够与转

录活性 DNA 结合蛋白(transactive response DNA-binding protein, TDP-43)形成生物分子凝聚体, 这一过程依赖于 N 蛋白的 C 末端结构域和 TDP-43 的内在无序 C 末端结构域的 LLPS, 并且在有 RNA 存在的情况下, 这一过程会显著加快^[10]。RBPs 多聚腺苷酸结合蛋白核 1(polyadenylate-binding protein nuclear 1, PABPN1)通过其 N 端无序结构域和 RNA 识别基序的 LLPS 促进核内多聚腺苷酸结构域的形成^[11](图 1)。富含碱性氨基酸的相互作用域蛋白 1A 包含一个类似朊病毒的结构域, 其能够通过液相聚集促进液态聚集体的形成^[12]。肽基脯氨酰异构酶 A 内的无序区域有助于其与其他蛋白质或核酸相互作用, 引发 LLPS, 提高细胞的抗应激能力^[13]。

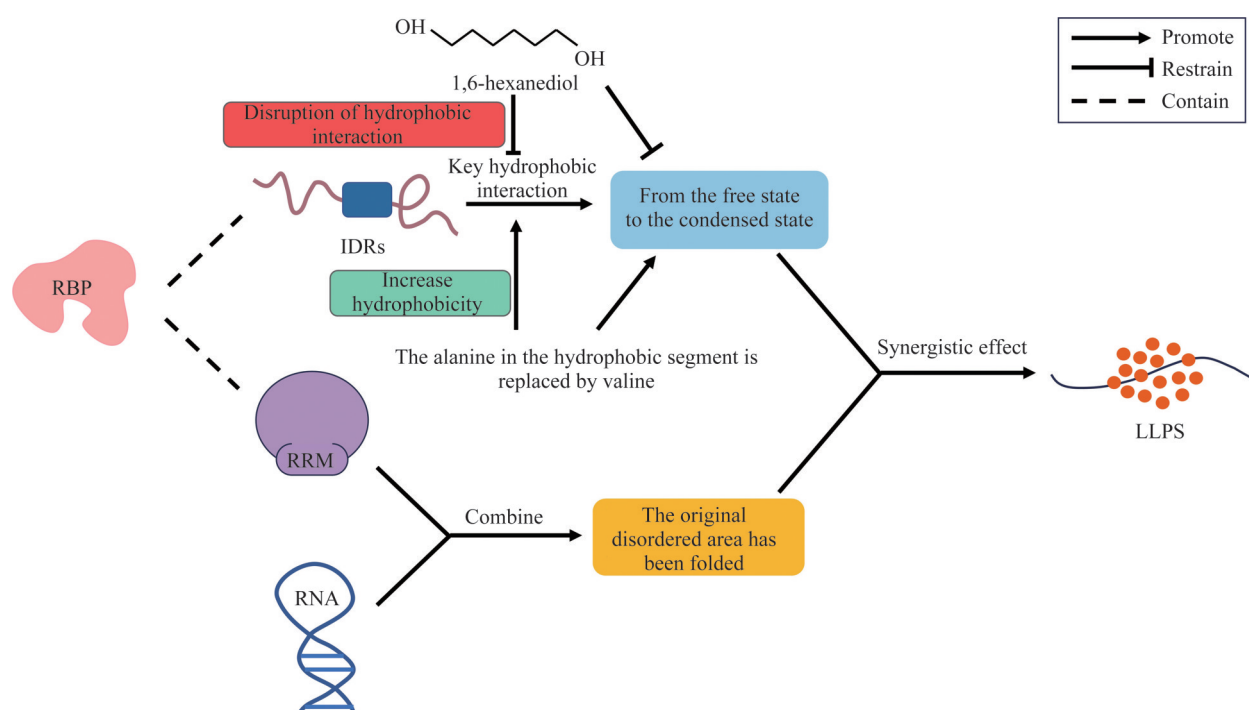


图1 RNA 结合蛋白无序结构域的相分离调控机制图

Figure 1 Phase separation regulatory mechanism of the intrinsically disordered regions of RNA-binding proteins

RNA: Ribonucleic acid; LLPS: Liquid-liquid phase separation; IDR: Intrinsically disordered region; RRM: RNA recognition motif; RBP: RNA-binding protein.

RBPs 上的无序结构域也可抑制 LLPS 的发生。细胞质内激活增殖关联蛋白 1(cytoplasmic activation/proliferation-associated protein 1, Caprin1) 的 C 端结构域可自发地发生 LLPS, 而其 N 端结构域与 Ras GTP 酶激活蛋白结合蛋白 1(Ras GTPase-activating protein-binding protein 1, G3BP1) 相互作用抑制 G3BP1 的 LLPS, 由此 Caprin1 通过 2 个结构域对 LLPS 发挥双向调控作用^[14]。C 端结构域促进自身的 LLPS, 而 N 端结构域通过占用 G3BP1 的核运输因子

2(nuclear transport factor 2, NTF2) 样结构域从而抑制其 LLPS 的发生(图 2)。RBPs 的 LLPS 过程受到不同结构域的精细调控。

RBPs 上的无序结构域通过 2 种作用力驱动相分离过程: 1) 疏水相互作用。研究^[15]发现 LLPS 中稳定疏水相互作用在相分离条件下占主导地位, 而不稳定静电作用则处于劣势。朊蛋白第 145 位酪氨酸处的疾病相关终止密码子突变可通过内在高度无序的 N 端结构域发生 LLPS, 而通过 1,6-己二醇破坏较弱的

疏水相互作用会明显抑制相分离现象, 实验中通过在疏水区段将丙氨酸替换为缬氨酸以增加其疏水性, 会显著增强发生 LLPS 的倾向(图 1), 这表明疏水相互作用在无序结构域的液态自组装过程中起重要作用^[16]。2) 静电相互作用。不含朊病毒结构域的 TDP-43 具有低电位和相反电位的区域, 而盐作用会减弱域间的静电吸引力, 抑制 LLPS。由于朊病毒结构域带正电荷, 具有朊病毒结构域的 TDP-43 在盐和高 pH 值的影响下减弱静电排斥作用, 促进 LLPS(图 3)。由此看来, 静电相互作用对 LLPS 的影响有吸引力与排斥力 2 种不同形式, 这取决于 RBPs 结构域上的不同电位的相互作用及环境对电位的影响^[17]。异质核核糖核蛋白 A1(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, hnRNP A1)低复杂度结构域(low-complexity domain, LCD)中折叠域的存在相较于单纯 LCD 驱动相分离的盐依赖性更低, 这逆转了 LCD 以盐依赖的方式促进相分离的机制, 而是以一种域内残基的强静电作用的方式驱动相分离过程^[18]。这意味着盐浓度的敏感性在这种无序折叠域的 LLPS 发生过程中被削弱了, 折叠域形成的一种特异的、高亲和力的结合位点通常不容易被盐离子屏蔽, RBPs 中的无序折叠域可通过残基间的静电作用促进 LLPS。

无序结构域在 LLPS 的发生过程中占据主导地位。研究^[19]发现, TDP-43 的氨基末端和羧基末端结构域与 CLIP34(一种重要的 RBPs)相关联的相分离和自我调节可能通过 N 末端结构域的磷酸化得到有效控制。RNA 结合蛋白(RNA-binding glycine-rich, RBG)D2 和 RBGD4 在体外进行 LLPS, 并通过酪氨酸残基阵列在体内形成应激颗粒, 从而对抗热胁迫, 改变酪氨酸残基阵列会破坏这一聚合过程^[20]。热激蛋白(heat shock protein, HSP)70 和 HSP90 伴侣通过识别 TDP-43 朊蛋白结构域中的结构元件促进 TDP-43 的相分离过程; TDP-43 朊蛋白中的第 2 个螺旋元件的甲硫氨酸硫化物的去除则会破坏伴侣识别, 影响相分离过程^[21]。

1.2 RNA 结合影响 LLPS

非编码 RNA 充当支架促进 LLPS。非编码 RNA 在 RBPs 的相分离过程中可招募具有内在无序结构域的 RBPs 触发 LLPS 的起始事件, 从而形成核凝聚体, 为基因组的转录和转录后调控提供专门的核内环境, 在维持细胞稳态中发挥关键作用^[22](图 4)。环状棕榈酰化膜蛋白 6 作为支架, 可促进 RNA 结合家族成员 A 与 RBPs 之间的相互作用, 并通过 LLPS 促使结肠癌细胞表现出更具侵袭性的特性^[23]。非编码环状 RNA 膜泡关联膜蛋白 3 来源的环状 RNA 可作为分子支架,

招募 Caprin1 与 G3BP1 相结合的复合物, 通过 LLPS 抑制肝细胞癌的增殖和转移^[24]。RNA 在 RBPs 的初始相分离过程中发挥重要作用, 非编码 RNA 可充当支架为初始相分离创造条件。

RNA 结合通过影响分子亲和力显著调控 RBPs 的 LLPS。研究^[25]表明, TDP-43 的寡聚化受 RNA 结合的调节, 影响 RBPs 的稳定性、剪接功能、LLPS 和亚细胞定位等, TDP-43 与 RNA 结合会使其在细胞质中形成包涵体, 而 RNA 结合缺陷的同型物则在细胞核中聚集。这一现象归因于 RNA 对分子亲和力的影响, 在低至中等浓度下凝聚相模型中, RNA 可通过增强凝聚液相的分子连接增强 RBPs 凝聚体的稳定性。RNA 与混合物中较低价态的蛋白质具有更高的亲和力, 而与同种较高价态的蛋白质的亲和力较低, 促进多组分凝聚体的相分离, 这与 RNA 可以加速相分离的起始阶段密切相关^[26](图 4)。一个小型(68 个残基)、带正电荷且包含固有无序区域的富含谷氨酸(glutamic acid, E)-精氨酸(arginine, R)-天冬氨酸(aspartic acid, D)-赖氨酸(lysine, K)的短基序的小蛋白质(small ERDK-rich factor, SERF)通过与聚阴离子 RNA 结合时会减弱 SERF 内部电荷的排斥, SERF 集合体呈现出一定程度的压缩现象, 为 RNA 通过 LLPS 实现的高阶组装提供了理论依据^[27]。因此, RNA 可通过调控分子连接性或静电作用的方式促进 LLPS, 对 LLPS 有显著调控作用。

1.3 ATP 作用调节 LLPS

研究^[28]发现, 富含精氨酸-甘氨酸/精氨酸-甘氨酸-甘氨酸的冷诱导 RNA 结合蛋白(cold-inducible RNA-binding protein, CIRBP)的 RNA 识别基序及无序结构域会与三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)、二磷酸腺苷、一磷酸腺苷及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、还原型辅酶 I、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸和还原型辅酶 II 直接相互作用, 其 RNA 引导的相分离过程会被 ATP 结合抑制。Aida 等^[29]对肉瘤融合蛋白(fused in sarcoma, FUS)进行研究发现, ATP 分子可通过其腺嘌呤基团与 FUS 蛋白上的第 22 位酪氨酸残基的侧链基团接触, 使磷酸基团暴露于外部溶剂中, 增加 FUS-LC(FUS 蛋白的核心区域)的溶解度, 抑制 FUS 蛋白通过 LLPS 引发的液滴形成(图 5)。此外, ATP 对聚集物形成的调控不仅限于 FUS, 在人的眼球晶状体中, 也发现了高浓度的 ATP, 其可以有效地抑制 γ S-晶状体蛋白质聚集^[30]。综上, ATP 作为“生物溶剂”, 极可能与 ATP 对相分离的抑制作用相关。

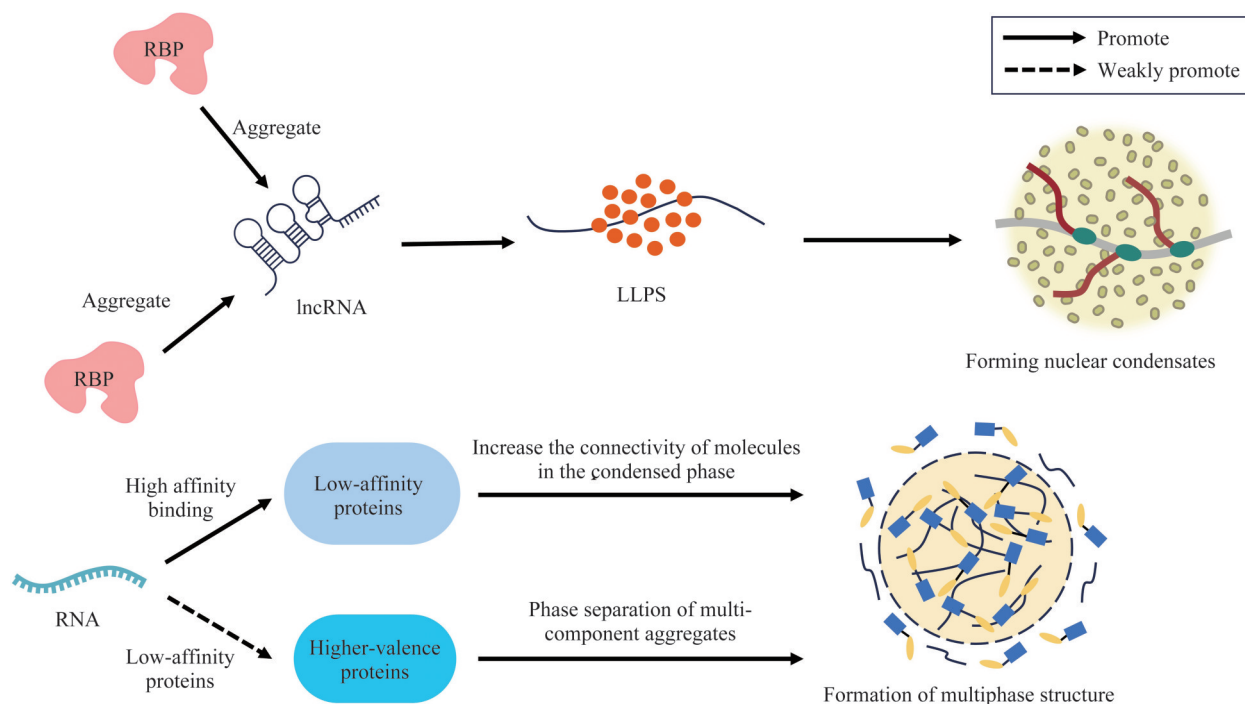


图4 lncRNA与RBP介导的LLPS及多价态调控机制

Figure 4 Regulatory mechanism of lncRNA and RBP-mediated LLPS and multivalency

lncRNA: Long non-coding RNA.

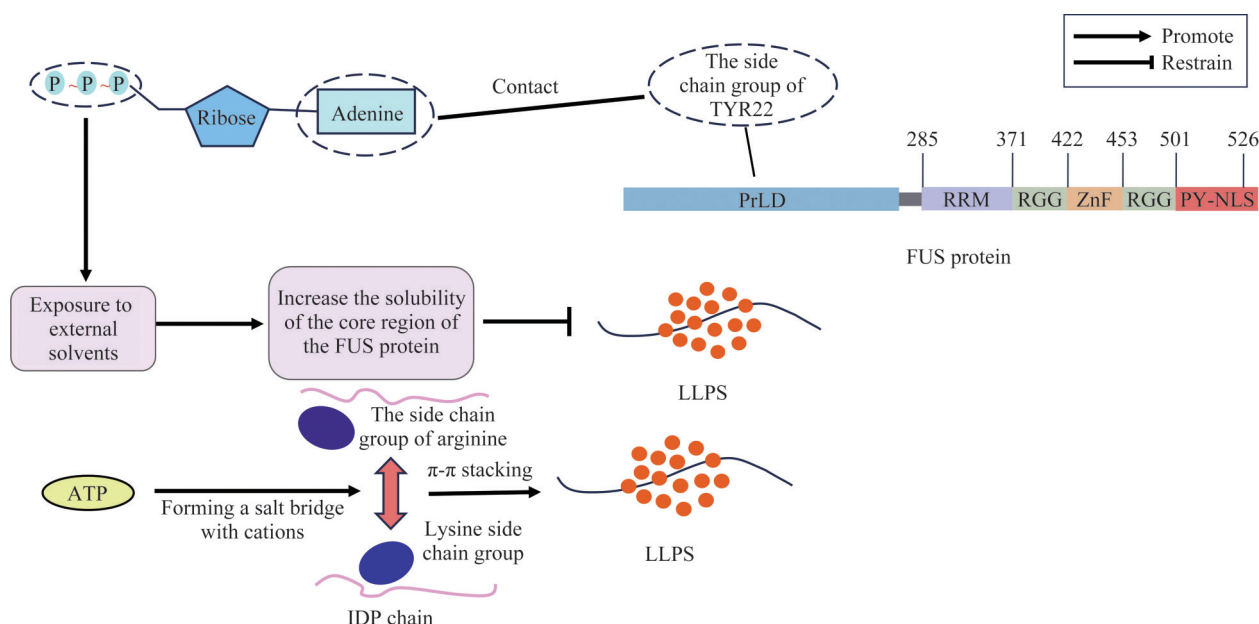


图5 ATP分子在RBP介导的LLPS中的双向调控机制

Figure 5 Bifunctional regulatory mechanisms of ATP molecules in RBP-mediated LLPS

PrLD: Prion-like domain; RGG: Arginine-glycine-glycine repeat region; ZnF: Zinc finger domain; PY-NLS: Proline-tyrosine nuclear localization signal; IDP: Intrinsically disordered protein; TYR22: Calcitonin gene-related peptide 22; FUS: Fused in sarcoma.

研究^[31]发现, ATP能够促进固有无序蛋白(basic intrinsically disordered proteins, bIDPs)的相分离, 在bIDP-ATP的凝聚体中, ATP分子充当内在无序蛋白

链之间的桥梁, 通过与内在无序蛋白的精氨酸和赖氨酸侧链形成广泛盐桥和阳离子相互作用, 促进相分离(图5)。在RNA结合蛋白Caprin1的羧基末端上,

存在带正电的无序区域,当添加带负电的ATP或高浓度的氯化钠时,该区域会发生相分离。其相分离轨迹上的特定残基可以凭借其近表面的静电势影响蛋白质的富集水平和凝聚相机械性能,从而对生物过程进行调节^[32]。ATP对相分离的作用是双向的,ATP对相分离的促进作用更倾向于在低浓度下,ATP减轻了电荷之间的排斥作用,从而促进LLPS的发生。当ATP浓度高于一定值时,蛋白体高度溶解阻止了液态包涵体的形成,抑制LLPS^[33-34]。

2 激素诱导股骨头坏死发生的分子机制与潜在治疗靶点

2.1 启动阶段:糖皮质激素暴露与早期应激

在持续高剂量的糖皮质激素作用下,出现血管内皮细胞损伤与高凝状态、氧化应激及脂代谢紊乱三大早期病理反应。

2.1.1 血管内皮损伤与高凝状态

糖皮质激素通过上调纤溶酶原激活物抑制剂-1活性来抑制纤溶系统,使血液处于相对高凝状态^[35]。这种高凝状态易诱发微血栓形成,直接阻碍股骨头局部血供,构成SANFH的血管性阻碍环节。此外,糖皮质激素还可促进血小板聚集并诱导内皮细胞凋亡,进一步加剧血栓形成。组织病理学相关观察研究^[36]证实,在坏死股骨头区域邻近的骨髓微血管内存在血小板血栓,这是糖皮质激素损伤骨髓内皮细胞后引发的继发性改变(图6)。

2.1.2 氧化应激

大剂量糖皮质激素可诱发细胞氧化应激,导致线粒体功能障碍,进而产生过量活性氧,打破机体氧化-抗氧化平衡^[37]。活性氧的堆积可引起蛋白质、脂质及核酸等生物大分子的氧化损伤。尤为重要的是,糖皮质激素可能损害DNA修复系统功能,阻碍DNA损伤的正常修复,从而显著增加细胞对氧化应激的敏感性^[38](图6)。

2.1.3 脂代谢紊乱

糖皮质激素可导致脂肪细胞肿胀、坏死,并增加骨细胞内脂质沉积,引发高脂血症、脂肪栓塞、骨髓基质细胞成脂分化及骨髓脂肪浸润。这些变化引起骨内静脉瘀滞,导致骨内微循环中断,进一步减少股骨头血供^[38]。在分子层面,糖皮质激素可下调成骨关键调控因子Runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)的表达,同时上调脂肪分化核心因子过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) γ -2的表达,最终导致脂肪分化增强、脂代谢异常与成

骨分化受抑制^[39](图6)。

2.2 进展阶段:细胞功能障碍与程序性死亡

在缺血、缺氧及氧化应激的病理微环境下,股骨头内骨细胞功能严重受损,并启动多种形式的程序性死亡,其中炎症与免疫失衡、细胞凋亡与自噬失调是此阶段的核心病理机制。

2.2.1 炎症与免疫失衡

骨代谢稳态本质上是一种受精密调控的炎症反应,多种炎症细胞与因子参与其中。SANFH的重要特征之一是存在异常、持续的慢性炎症^[40]。例如,在SANFH病程中,关键线粒体自噬因子UNC-51样自噬激活激酶1的缺失会削弱线粒体清除能力,从而激活NOD样受体蛋白3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)炎症小体,进而促进破骨细胞分化与成熟^[41];同时也会出现促炎的M1型巨噬细胞与抗炎/修复的M2型巨噬细胞的比例失衡,导致持续性炎症与组织损伤加剧。因此,针对特定炎症信号通路或巨噬细胞极化状态的免疫调节治疗,有望减轻炎症、促进修复并延缓疾病进展^[38](图7)。

2.2.2 细胞凋亡与自噬失调

2.2.2.1 自噬抑制

在高剂量糖皮质激素的SANFH模型中,线粒体功能障碍及自噬水平普遍降低。糖皮质激素通过下调自噬及线粒体自噬标志物的表达,抑制成骨细胞分化与矿化^[42];同时,其可过度表达线粒体自噬关键调节蛋白帕金森病相关蛋白2,进而促进破骨细胞形成^[43]。此外,过量的活性氧累积也会导致骨细胞自噬活性降低^[44]。这提示自噬失调可能与早期氧化应激失衡密切相关。值得关注的是,有研究^[45]指出通过沉默调节蛋白3/BCL2相互作用蛋白3(sirtuin 3/BCL2 interacting protein 3, SIRT3/BNIP3)通路调节的线粒体自噬可对抗铁死亡,而柚皮素等化合物通过靶向SIRT3对SANFH产生显著保护作用,这为SANFH的治疗提供了新思路(图7)。

2.2.2.2 细胞凋亡

糖皮质激素可直接诱导成骨细胞凋亡,同时增强破骨细胞活性、抑制成骨细胞功能,从而驱动SANFH发展^[46]。在间接层面上,累积的氧化应激会降低骨髓间充质干细胞活性,加速其衰老并诱导凋亡^[47]。糖皮质激素可通过抑制单酰甘油脂肪酶,阻碍抗氧化Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1/核因子E2相关因子2(Kelch-like ECH-associated protein 1/nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Keap1/Nrf2)信号通路的激活,导致骨髓间充质干细胞内产生高水平氧化应激,最终引发细胞死亡^[48](图7)。

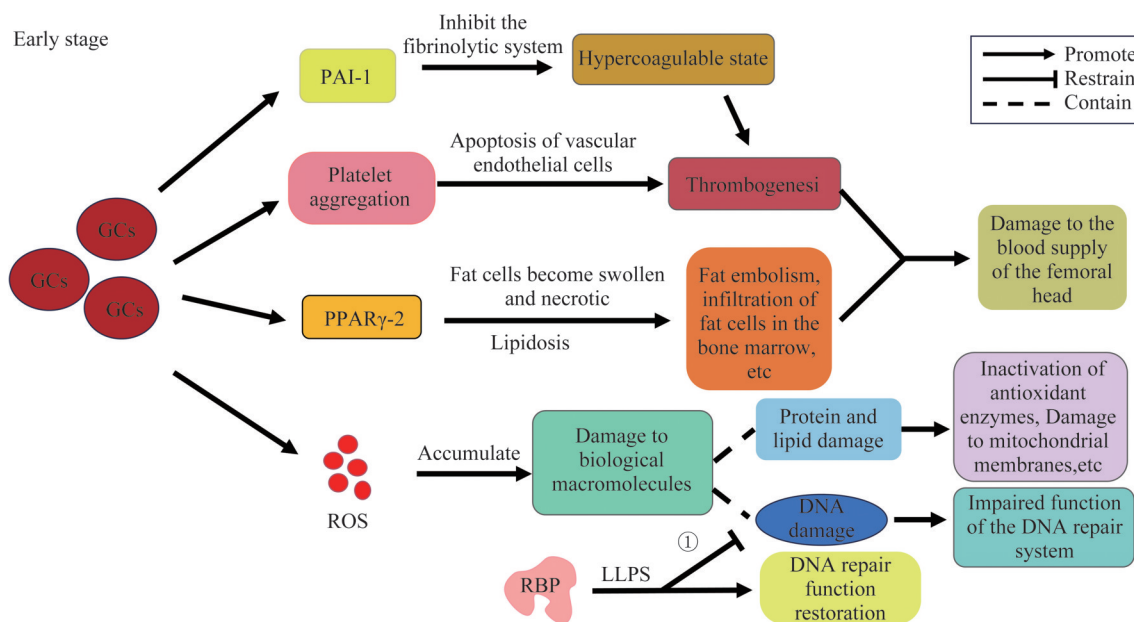


图6 糖皮质激素诱导股骨头坏死发生的早期病理进程

Figure 6 Early pathological process of glucocorticoid-induced femoral head necrosis

GCs: Glucocorticoids; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1; PPAR γ -2: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2; ROS: Reactive oxygen species.

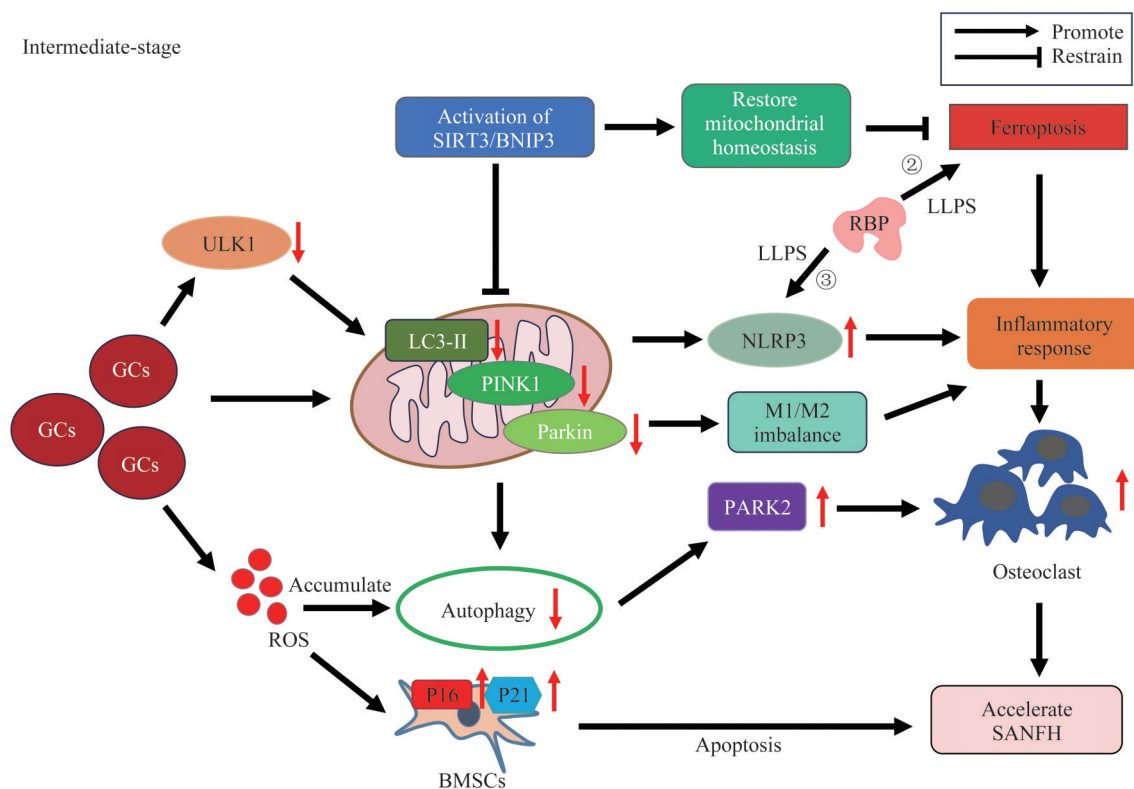


图7 糖皮质激素诱导股骨头坏死发生的中期病理进程

Figure 7 Mid-stage pathological process of glucocorticoid-induced femoral head necrosis

ULK1: UNC-51 like autophagy activating kinase 1; SIRT3: Sirtuin 3; BNIP3: BCL2 interacting protein 3; LC3-II: Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-II; PINK1: PTEN-induced kinase 1; NLRP3: NOD-like receptor protein 3; M1/M2: M1/M2 macrophage balance; P16 and P21: Senescence-associated marker proteins; PARK2: A key regulatory protein in the mitophagy process; SANFH: Steroid-associated necrosis of the femoral head; BMSCs: Bone marrow mesenchymal stem cells.

2.3 失代偿阶段：骨代谢稳态的破坏

失代偿阶段核心事件是骨形成与骨吸收的动态平衡被彻底打破, 导致净骨量持续丢失。累积的氧化应激直接损害骨髓间充质干细胞、成骨细胞及破骨细胞的功能, 是骨代谢失衡的关键推手^[49]。

2.3.1 骨形成抑制

高剂量糖皮质激素损害骨髓间充质干细胞与成骨细胞的线粒体功能, 导致活性氧水平升高、抗氧

化能力下降, 进而抑制 Wnt/ β -连环蛋白(Wnt/ β -catenin)信号通路和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路等经典成骨信号通路, 最终损害细胞功能与活力^[48]。同时, 骨髓间充质干细胞中衰老相关蛋白(如 P21、P16)表达显著增加, 呈现应激性衰老。活性氧也会减缓细胞周期, 削弱骨髓间充质干细胞的增殖能力^[50], 最终导致骨形成抑制(图 8)。

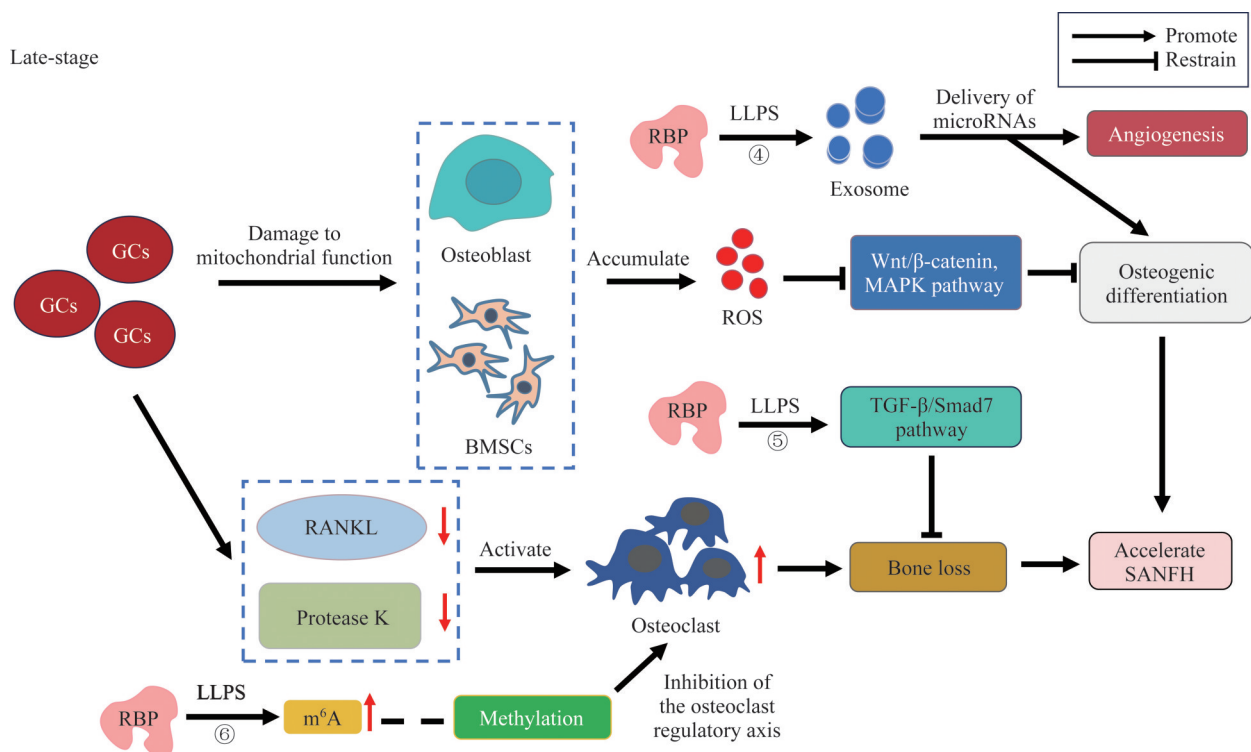


图8 糖皮质激素诱导股骨头坏死发生的晚期病理进程

Figure 8 Late pathological process of glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head

RANKL: Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; m⁶A: N⁶-methyladenine; TGF- β : Transforming growth factor-beta; Smad7: Sma- and Mad-related protein 7.

2.3.2 骨吸收增强

糖皮质激素可显著上调核因子 κ B受体激活因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)及组织蛋白酶K等破骨相关蛋白的表达, 促进破骨细胞分化与活化, 从而导致骨吸收增加、大量骨丢失^[51](图 8)。反之, 通过干预手段减少活性氧生成, 可降低碳酸酐酶II、基质金属蛋白酶9及抗酒石酸酸性磷酸酶等破骨细胞相关基因的表达, 从而导致破骨细胞形成受损, 抑制其骨吸收功能^[52]。

2.4 潜在治疗靶点

利用外泌体递送特定微RNA(miRNA)来修复

SANFH已取得显著进展。miR-378-ASCs外泌体通过靶向融合和激活声波信号通路增强成骨分化和血管生成^[53]; miR-26a-CD34外泌体则通过促进血管生成和成骨分化来保护股骨头免受糖皮质激素损伤^[54], 这表明外泌体在治疗SANFH中的潜力。此外, circ-0058792可通过TGF- β /Smad7通路与miR-181a-5p的相互作用调节成骨与破骨细胞之间的平衡^[55]。表观遗传学研究^[56]显示, DNA甲基化可抑制骨保护素基因的表达, 特定胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤(cytosine-phosphate-guanine, CpG)位点的高甲基化会增加SANFH风险。尽管N⁶-甲基腺嘌呤(N⁶-methyladenine, m⁶A)修饰在SANFH中的作用尚未被充分阐明, 但作

为甲基化修饰的一种重要形式, 其与 SANFH 病理机制可能存在密切关联(图 8)。调控外泌体生成、m⁶A 表观遗传修饰及 TGF- β /Smad7 通路, 成为干预 SANFH 病理网络、恢复骨代谢稳态的具有前景的治疗方向。

3 RBP 相分离通过调节骨代谢参与 SANFH 治疗

3.1 RBP 相分离调控 DNA 损伤修复

DNA 损伤在骨骼疾病中起至关重要的作用^[57]。随着年龄的增长, DNA 修复功能缺失的小鼠骨小梁和骨皮质的密度下降得更早, 会出现骨膜增生减少、骨强度降低的现象, 且 DNA 损伤的积累会干扰正常的骨骼维护, 从而引起正常骨重塑的成骨前体细胞数量减少, 导致骨骼结构和强度的丧失。这表明 DNA 修复对于维持骨骼的正常状态起重要调控作用^[58]。活性氧物质正逐渐成为细胞内的 DNA 损伤因子, 高水平的活性氧可能会导致氧化性 DNA 损伤水平增加^[59]。研究^[60]表明, 在糖皮质激素的诱导下, 活性氧还可激活 c-Jun 氨基末端激酶/c-Jun(c-Jun N-terminal kinase/c-Jun signaling pathway, JNK/c-Jun)信号通路, 引起成骨细胞凋亡, 造成骨破坏。SANFH 作为一种由糖皮质激素诱导的主要骨科疾病, 以活性氧积累为主要特征, DNA 损伤是 SANFH 的重要病理机制。

RBP 正逐渐成为细胞 DNA 损伤的重要效应因子。RBP 可在体外经历可逆的 LLPS 过程参与 DNA 修复^[61]。在体内, LLPS 同样会在 DNA 损伤部位发生^[62-63]。例如, 融合性肉瘤蛋白的 LLPS 过程会招募具有类似朊病毒结构域的 RNA 结合蛋白(splicing factor proline- and glutamine-rich, SFPQ), 从而参与染色质重塑和 DNA 损伤修复的蛋白质结合过程^[64]。一种具有超过 70 个潜在 miR-7 结合位点的环状 RNA ciRS-7, 是 miRNA 诱导的沉默复合体组装和 DNA 修复的促进因子。过表达 ciRS-7 会显著增强 DNA 重组修复蛋白 RAD51 的募集并促进 LLPS 过程, 促进由辐射引起的 DNA 损伤修复过程^[65](表 1)。因此, RBP 引发的 LLPS 可成为 SANFH 导致的 DNA 损伤病理机制中的一个潜在治疗靶点(图 6)。

3.2 RBP 相分离调节铁死亡过程

在 SANFH 中, 糖皮质激素可通过肿瘤蛋白 p53/溶质载体家族 7 成员 11/谷胱甘肽过氧化物酶 4 信号轴(P53/solute carrier family 7 member 11/glutathione peroxidase 4, P53/SLC7A11/GPX4)诱导铁死亡发

生^[66], 这表明脂质过氧化会驱动铁代谢失衡, 从而驱动骨细胞死亡, 这是 SANFH 发病过程中的重要机制。实验^[67]发现, 染色质相关环状 RNA(chromatin-associated circular RNA SCN8A, ca-circSCN8A)会募集 E1A 结合蛋白 p300(E1A binding protein p300, EP300), 促进 FUS 的乳酰化作用, 从而推动 LLPS 介导的 ca-circSCN8A/FUS/EP300 复合物的形成, 在这一过程中, ca-circSCN8A 会与铁死亡相关基因 *SLC7A11* 启动子形成 R 环, 并通过 LLPS 过程维持 R 环的稳定性, 从而进一步导致氧化还原平衡的破坏, 诱导铁死亡过程。铁死亡抑制蛋白 1(ferroptosis suppressor protein 1, FSP1)会被 FSP1 抑制剂作用, 触发其在细胞膜上的重新定位与聚集, 并通过 LLPS 形成具有类似液滴特性的 FSP1 胶体, 导致 FSP1 功能丧失, 促进铁死亡^[68](表 1)。LLPS 的调控可能成为 SANFH 治疗中调节铁死亡过程的重要靶点(图 7)。目前的研究仍支持 RBP 的 LLPS 对铁死亡的促进作用。

3.3 RBP 相分离影响外泌体形成

外泌体可将蛋白质和核酸运输到邻近细胞, 从而介导细胞间的通讯。一些蛋白质和 RNA 在外泌体中含量显著增加。近年来, 关于外泌体给药治疗骨科疾病的研究逐渐深入, 例如在骨关节炎中, 过表达 miRNA-155-5p 的外泌体能够增强骨关节炎软骨细胞的增殖和转移, 并抑制其凋亡; 此外, 外泌体还能通过 Runx2 进一步促进细胞外基质的分泌, 有效预防骨关节炎的进展^[69]。在 SANFH 中, 由锂离子刺激的骨髓间充质干细胞分泌的外泌体能够促进巨噬细胞向 M2 型极化, 并且在水凝胶载体的介入下, 能显著促进股骨头成骨和血管生成^[70]。因此, 外泌体给药的方式治疗 SANFH 在未来将有广阔的应用前景。

RBP 的 LLPS 在外泌体形成中发挥重要作用。例如异质核糖核蛋白 A2B1 作为一种 RBP, 参与了 miRNA、长链非编码核糖核酸和环状核糖核酸的外泌体分类过程, 其亦可作为 RNA 颗粒的组成部分参与 LLPS 过程, 因此 LLPS 可能有助于外泌体形成^[71]。Liu 等^[72]的研究表明, Y 箭头蛋白 1 在体外和细胞中会发生 LLPS, 从而选择性地招募 miRNA-223, 促进 miRNA-223 分配到外泌体中; 而抑制 Y 箭头蛋白 1 相分离的点会干扰这一过程(表 1)。这说明 LLPS 在外泌体的形成中发挥不可忽视的作用。其中, miRNA-223 是小的非编码 RNAs, 这些多种类的微核糖核酸已被发现对骨重塑有重要的调节作用, 正如 miRNA-27a 的表达可降低小鼠胚胎成骨细胞前体细胞中凋亡蛋白的表达, 促进成骨细胞分化^[73]。然而在破骨细胞中, Yang 等^[74]证明破骨细胞来源的外

泌体可通过携带 miRNA-23a-5p 抑制 Runx2 和促进 Yes 相关蛋白 1 介导的金属硫蛋白 1D 伪基因的表达来抑制成骨细胞分化。而作为外泌体的内容物之一, miRNA 可通过外泌体在细胞间转移, 在未来将有很大的可能运用于 SANFH 的治疗当中, 而 RBPs 的 LLPS 在此过程中必将发挥重要的调控作用(图 8)。

3.4 RBPs 相分离调控 TGF- β /Smad 通路

RBPs 的 LLPS 可调控 TGF- β /Smad 通路的活性。SANFH 的早期发生与 TGF- β /Smad 通路的异常密不可分。TGF- β 与 TGF- β 膜受体结合可激活 Smad 信号, 引起 Runx2 表达水平的增加, 这能够促进骨髓间充质干细胞的成骨分化过程^[75]。反之, TGF- β /Smad 通路的异常则可能会导致 SANFH 早期骨量的丢失, 引起 SANFH。因此, TGF- β /Smad 信号通路在调控 SANFH 的骨代谢失衡中有重要作用。

SANFH 与 TGF- β /Smad 通路失调存在关联。Hao 等^[76]发现, 在糖皮质激素处理的骨髓间充质干细胞中, Smad2/3 与促凋亡蛋白水平被显著激活, 而 Smad7 水平则受到抑制, 这可佐证 TGF- β /Smad 信号通路在 SANFH 病理机制中有重要作用。其中, 通过促进环状 RNA PVT1 的表达可促进 TGF- β /Smad7 通路的激活, 从而改善糖皮质激素诱导的骨髓间充质干细胞的凋亡, 延缓 SANFH 进展^[76]。此外, miRNA-27a 也可通过激活 TGF- β /Smad7 信号通路调节骨代谢及成骨分化过程, 实现对 SANFH 的治疗作用^[73]。这说明 TGF- β /Smad7 通路的激活在未来极有可能应用于 SANFH 的治疗。

LLPS 可对 TGF- β /Smad 通路起重要调控作用。SFPQ 上一种类似朊病毒的结构域会导致 LLPS 的发生, 其凝聚物会将 Smad4 从 Smad 复合物中分离出来, 从而在功能上抑制 Smad 相关的转录反应, 抑制 TGF- β 的信号转导^[77]。与之相反, Li 等^[78]发现, TGF- β 信号通路可通过 TGF- β 与转化生长因子 β 受体 (transforming growth factor-beta receptor, T β R) II 结合而激活, 这一过程可磷酸化 T β RI, 并磷酸化 Smad2 和 Smad3, 最终磷酸化的 Smad2 和 Smad3 可与 Smad4 形成异二聚体和三聚体复合物 Smad2/3/4, 这一复合物可在细胞核中通过 LLPS 激活酪氨酸氨基转移酶转录, 促进凋亡因子的表达, 其中, LLPS 促进 TGF- β /Smad 下游信号转导(表 1)。LLPS 在 TGF- β /Smad 信号通路中起重要调控作用, 其可在通路中对 TGF- β /Smad 信号进行抑制, 也可在 Smad2 和 Smad3 的下游促进凋亡的发生。LLPS 在 TGF- β /Smad 信号转导中发挥“双刃剑”的作用, RBPs 通过 LLPS 在 TGF- β /Smad 通路上游既可抑制 Smad4 信号转导, 又可潜在促进

拮抗因子 Smad7 的表达(图 8), 这有益于 SANFH 的治疗。

3.5 RBPs 相分离影响 NLRP3 等炎症小体的激活

糖皮质激素可诱发 NLRP3 等炎症小体激活。糖皮质激素可增加糖基化终产物受体和 Toll 样受体 4 下游的核因子 κ B 促进核苷酸结合寡聚化结构域样受体的形成, 增加 NLRP3 炎症小体的数量^[79]。不仅如此, 大量使用糖皮质激素还可能会激活骨髓间充质干细胞焦亡, 而炎症小体和细胞因子激活炎症级联反应导致的细胞焦亡会对不同程度的 SANFH 发挥关键作用^[80], NLRP3 炎症小体能介导骨髓间充质干细胞的细胞焦亡, 并触发成骨细胞和破骨细胞的分化失衡^[81]。因此, NLRP3 等炎症小体与糖皮质激素引起的 SANFH 的骨代谢失衡有密切联系。NLRP3 等炎症小体的调控会成为治疗 SANFH 的一个潜在方向。

LLPS 在 NLRP3 等炎症小体的调控中发挥重要作用。过敏原会增强 YTH 结构域蛋白 1 的 LLPS, 并驱动由二聚体 YTH 结构域蛋白 1 和 CLOCK mRNA 构成的复合物的形成, 该复合物被分布到应激颗粒中, 使得 YTH 结构域蛋白 1 强烈激活 NLRP3 炎症小体的产生和白细胞介素-1 β 的分泌^[82]。Schmacke 等^[83]认为 NLRP3 在棕榈酰化修饰后, 可能会解除自身抑制, 并且能够通过 LLPS 组装成一个炎症小体盘状结构, 从而驱动炎症小体的激活(表 1)。不仅如此, NLRP3 自身具有发生 LLPS 的条件, NLRP3 的炎症小体感应关联结构域上的无序结构域与疏水残基在 NLRP3 的 LLPS 激活过程中发挥重要作用, 而棕榈酰化修饰会一定程度上降低其溶解度, 降低 NLRP3 相分离发生的阈值^[84]。这表明 LLPS 的发生与 NLRP3 等炎症小体的产生与激活密切相关, 在上游的相关 RBPs 的 LLPS 也可促使 NLRP3 的产生; 而对于 NLRP3 自身, 也存在通过 LLPS 激活的条件。LLPS 可直接或间接地激活炎症反应, 而 RBPs 参与的上游调控过程可影响 SANFH 的骨代谢, 这提示 LLPS 的抑制对 SANFH 中炎症反应的潜在治疗效用(图 7)。

3.6 LLPS 可能通过影响 m⁶A 水平调控骨代谢

m⁶A 修饰在骨代谢的调控中起重要作用。在骨髓间充质干细胞的成骨分化过程中, Runx2 的表达显著增加, 而 YTH N6-甲基腺苷 RNA 结合蛋白 C2(YTH N6-methyladenosine RNA binding protein C2, YTHDC2)的表达减少, 这提示 YTHDC2 与 Runx2 存在负相关, YTHDC2 可通过 m⁶A 的修饰加速甲基化 Runx2 mRNA 的降解, 并抑制骨髓间充质干细胞的成骨分化, m⁶A 修饰的 YTHDC2 可能成为调节骨髓间

充质干细胞分化有前景的分子靶点^[85]。m⁶A相关基因是SANFH的潜在生物标志物之一^[86], DNA甲基化可抑制骨保护素基因的表达, 从而增加SANFH发生的风险。而m⁶A修饰作为甲基化修饰的一种重要形式, 在SANFH的发生和发展中也可能发挥重要作用。

RBP相分离可调控m⁶A修饰。m⁶A是分布最广泛的动态转录后修饰, 其会改变修饰RNA的电荷、构象和RBPs的锚定作用, 从而对LLPS过程起调节作用^[87]。在肌萎缩侧索硬化症中, m⁶A修饰的RNA会增强YTH结构域家族蛋白的浓缩并引导其到达应激颗粒, 从而有助于应激颗粒中的mRNA分配, 促进LLPS的发生^[88](表1)。在糖尿病性心脏纤维化模型小鼠中, Notch同源蛋白1 mRNA中升高的m⁶A水平显著提升了YTH结构域蛋白2的相分离作用, 增加了YTH结构域蛋白2对Notch同源蛋白1 mRNA中m⁶A基因残基的识别能力, 并导致Notch同源蛋白1的降解^[89]。此外, 由于m⁶A是YTHDC1进行LLPS形成核YTHDC1-m⁶A聚集体所必需的, 因此m⁶A也是形成相分离介导的核体所必需的, 该核体能够维持mRNA稳定性, 控制癌细胞的存活与分化^[90](表1)。m⁶A修饰在RBPs相分离的作用机制中充当着“动态调控开关”的角色, 能改变RNA-蛋白质相互作用的强度和特异性, 从而对相分离起到调控作用。然而Ge等^[91]的研究发现, 相分离过程亦可反向影响m⁶A修饰的动态调控, 如Wilms肿瘤1相关蛋白(一种“书写者”复合物的关键组成部分)的过度表达容易促使相分离的发生, 并促使“书写者复合物”聚集到核小体上, 促使m⁶A修饰水平的增加, 从而加速促炎反应。这为SANFH的治疗中通过相分离作用影响m⁶A修饰提供了参考(图8)。m⁶A修饰在相分离中起显著的调控作用, 且RBPs的相分离作用也可调控m⁶A水平, 通过修饰RNA影响骨代谢过程, 从而对SANFH起到潜在治疗作用。因此相分离与m⁶A的相互作用在SANFH的治疗中有巨大潜力, 这似乎是值得继续深入探索的方向之一。

4 瓶颈与临床转化方向

4.1 诊断标志物

未来转化研究的聚焦于: 1)液体活检。验证外泌体中特异性RNA及血浆中m⁶A修饰酶的水平是否能在临床队列中区分SANFH的不同阶段, 并预测疾病进展速度, 如8种差异脂质代谢物与SANFH的疾病分期密切相关^[92]。相较于传统的影像学检查, 这有助于实现真正的“早期预警”。2)功能活性评估。开发

检测关键RBPs在患者骨髓单个核细胞中相分离倾向的实验方法, 可从功能层面评估疾病活动度, 为个性化治疗提供依据。

4.2 靶向治疗策略

针对已鉴定的核心调控节点, 可发展以下靶向策略: 1)靶向“书写者”或“擦除者”复合物的相分离。利用反义寡核苷酸或小干扰RNA, 特异性降解或抑制驱动病理性相分离的RNA, 如促铁死亡的环状RNA ca-circSCN8A, 或靶向结合特定RBPs的内在无序区域, 改变其相分离性质, 从而调控SANFH的病理进程。2)调控炎症相关RBPs的相分离。针对YTH结构域家族蛋白1等RBPs, 其异常相分离可驱动应激颗粒形成并强烈激活NLRP3炎症小体。开发小分子抑制剂特异性干扰此类RBPs的相分离过程, 从而从上游抑制炎症小体的异常组装与激活, 为减轻SANFH中的慢性炎症提供新策略, 为抑制SANFH中的慢性炎症和细胞焦亡提供新途径; 针对在DNA损伤位点通过相分离发挥修复功能的关键RBPs, 如肉瘤融合蛋白, 可开发小分子调节剂。在SANFH早期氧化应激阶段, 稳定FUS等功能性修复凝聚体的形成, 增强骨细胞对糖皮质激素诱导的DNA损伤的修复能力, 从源头上延缓细胞功能障碍的发生, 从而对SANFH的病理性进展起调控作用。

4.3 药物递送

药物递送是临床转化的核心瓶颈, 任何针对RNA代谢或相分离的干预手段, 必须解决“如何将药物高效、特异地递送至股骨头的靶细胞”这一难题。目前针对SANFH药物递送存在以下问题: 1)局部血管缺血导致递送系统难以通过血液循环进入病灶区域; 2)缺氧和酸性微环境会影响递送载体的稳定性和药物释放行为; 3)缺乏能在股骨头内部长期留存且受控释放的递送平台。针对此类问题, 目前可行的策略有: 1)骨靶向载体。利用双膦酸盐、天冬氨酸六肽等对骨组织/骨细胞有高亲和力的分子修饰脂质纳米粒、聚合物纳米粒或外泌体, 实现药物在骨组织的富集。2)微环境响应性释放。针对坏死股骨头缺血、缺氧、酸性的独特微环境, 设计智能响应型水凝胶或纳米载体, 实现药物在病灶部位的“按需释放”, 提高局部浓度, 减少全身不良反应。3)细胞特异性递送。通过对载体进行表面修饰, 如连接靶向成骨细胞、破骨细胞或血管内皮细胞的特异性抗体或配体, 实现对特定细胞群体的精准干预。

表 1 通过相分离影响 SANFH 的 RBPs

Table 1 RBPs influencing SANFH via liquid-liquid phase separation

蛋白质家族	RNA 结合蛋白	主要结构域	所调控阶段/机制	对 SANFH 的潜在影响	参考文献
FET 蛋白家族	FUS	1 个 LCD	转录	促进活性氧诱导的骨组织细胞的 DNA 修复	[64]
GW182 蛋白家族	TNRC6B	多个类 RGG	miRNA 加工	招募 RAD51 可促进骨组织细胞的 DNA 修复	[65]
FET 蛋白家族	FUS	1 个 PrLD、1 个 LCD、1 个 RRM	转录	可诱导铁死亡过程, 导致氧化还原平衡的骨破坏	[67]
凋亡诱导因子家族	FSP1	2 个 IDRs、1 个 LCD	铁死亡过程	FSP1 通过 LLPS 促进铁死亡过程, 可导致骨流失	[68]
异质核糖核酸蛋白的 A/B 亚家族	hnRNPA2	2 个 RRM、1 个 LCD	转录、剪接、miRNA 加工	参与外泌体中 RNA 的分类, 有助于外泌体的形成, 修复股骨头	[71]
冷休克蛋白家族	YBX1	1 个 CSD、1 个 LCD	miRNA 加工	选择性招募 miR-223 从而形成外泌体, 修复股骨头	[72]
果蝇行为/人类剪接蛋白家族	SFPQ	1 个 PrLD	转录	促进 Smad4 从 Smad 复合物中分离, 抑制 TGF- β /Smad 通路, 从而影响成骨	[77]
Smad 家族	Smad4	1 个 PrLD	转录	Smad2/3/4 复合物通过 LLPS 激活 TAT 转录, 促进凋亡因子表达, 可导致骨破坏	[78]
YTH 结构域家族	YTHDF1	1 个 PrLD、1 个 YTH	翻译	激活 NLRP3 炎症小体的产生和白细胞介素-1 β 的分泌, 导致骨代谢失衡	[82]
核苷酸结合结构域和富含亮氨酸重复结构域家族	NLRP3	1 个 FISNA	翻译	NLRP3 在棕榈酰化修饰后, 可通过 LLPS 驱动炎症小体的激活, 导致骨代谢失衡	[83]
Ras-GTP 酶激活蛋白 SH3 域结合蛋白家族	G3BP1	1 个 NTF2L、1 个 RRM	mRNA 稳定性、翻译	m ⁶ A 修饰的 RNA 增强应激颗粒的 LLPS, 导致骨代谢失衡	[88]
YTH 结构域家族	YTHDF2	1 个 YTH、2 个 LCD	mRNA 稳定性	Notch1 mRNA 中升高的 m ⁶ A 显著增强 YTHDF2 的相分离, 并导致 Notch1 的降解, 导致骨代谢失衡	[89]
YTH 结构域家族	YTHDC1	1 个 YTH、2 个 IDRs	mRNA 稳定性	m ⁶ A 促使 YTHDC1 进行 LLPS 并形成核 YTHDC1-m ⁶ A 聚集体, 影响骨代谢	[90]

FUS: 肉瘤融合蛋白; TNRC6B: 三核苷酸重复序列蛋白; FSP1: 铁死亡抑制蛋白 1; hnRNPA2: 异质性核糖核蛋白 A2; YBX1: Y 框结合蛋白 1; SFPQ: 剪接因子脯氨酸和谷氨酰胺丰富蛋白; Smad4: MAD 同源物 4; TAT: 酪氨酸氨基转移酶; YTHDF1: YTH 结构域蛋白 1; NLRP3: NOD 样受体家族 pyrin 域包含蛋白 3; G3BP1: Ras GTP 酶激活蛋白 SH3 结构域结合蛋白 1; YTHDF2: YTH 结构域蛋白 2; Notch1: Notch 同源蛋白 1; YTHDC1: YTH 结构域包含蛋白 1; LCD: 低复杂度结构域; RGG: 精氨酸-甘氨酸-甘氨酸基序; PrLD: 朊病毒样结构域; RRM: RNA 识别基序; IDRs: 固有无序区域; CSD: 冷休克结构域; FISNA: 炎症小体感应关联结构域; NTF2L: 核运输因子 2 样结构域。

4.4 现有药物的 LLPS

部分已应用于临床或处于研发阶段的药物, 其作用机制可能涉及调节相分离, 这为快速临床转化提供了捷径。例如, SIRT3 激动剂(如柚皮素及其衍生物)可通过 SIRT3/BNIP3 通路保护线粒体自噬、对抗铁死亡。未来可探究其是否通过稳定 SIRT3 蛋白的相分离稳态来发挥作用, 并评估其治疗 SANFH 的临床潜力。NLRP3 抑制剂(如 MCC950、CY-09 等)可直接抑制 NLRP3 炎症小体的组装。NLRP3 通过相分离

激活的机制, 可进一步评估这些药物是否可通过干扰 NLRP3 的 LLPS 来发挥效应, 从而为老药新用提供理论基础。

从机制到临床的跨越, 需要建立“靶点验证-药物开发-递送优化-临床评价”的完整闭环。揭示的 RBPs 相分离调控网络可为开发针对 SANFH 的新型诊断工具和治疗药物提供新的靶点。然而, 真正的突破有赖于多学科交叉合作, 特别是材料科学与药剂学的深度介入, 以解决靶向递送这一瓶颈问题。将

相分离理论应用于骨科退行性疾病的诊疗, 不仅有望改变 SANFH 的临床实践, 更可能为其他骨代谢疾病的治疗范式带来积极影响。

5 结 语

RBP 的 LLPS 作为一种新兴的细胞功能组织形式, 在 SANFH 的调控网络中可能扮演着核心而复杂的“调控枢纽”角色。在生理状态下, RBP 可通过功能性的 LLPS 高效组织 DNA 修复、mRNA 代谢、应激反应等过程, 维持骨细胞的稳态。然而, 在糖皮质激素诱导的病理条件下, RBP 的 LLPS 可能发生广泛失调, 其作用亦呈现出多面性。例如, 在 DNA 损伤修复中, FUS 蛋白的正常 LLPS 可募集修复因子对抗早期氧化损伤, 保护骨细胞; 但在铁死亡通路中, FUS 又可被异常 RNA 募集, 通过 LLPS 形成促铁死亡复合物, 加剧骨破坏。在炎症调控中, YTH 结构域蛋白 1 的异常 LLPS 可驱动 NLRP3 炎症小体产生, 放大炎症; 而在外泌体介导的细胞间通讯中, Y 框结合蛋白 1 的 LLPS 则选择性分选保护性微核糖核酸进入外泌体, 潜在促进骨修复。在 TGF- β /Smad 通路中, SFPQ 蛋白的 LLPS 隔离 Smad4, 与之拮抗的 Smad7 得到激活, 从而促进成骨和血管修复; 不仅如此, Smad2/3/4 复合物自身的 LLPS 却可激活促凋亡程序, 引起细胞凋亡。

RBP 的 LLPS 对 SANFH 的生理与病理起着不同作用, 这种矛盾性深刻揭示了 RBP 的 LLPS 功能具有高度的阶段依赖性和微环境特异性。在 SANFH 早期, 细胞可能通过激活保护性 LLPS 来应对糖皮质激素应激; 随着损伤累积和微环境恶化, 这些 LLPS 过程可能从动态、功能性的“液滴”失控转变为病理性、固化的“凝胶”, 从而加速疾病进展。同时, 其作用也因结合的 RNA 分子、共调节因子及所处的亚细胞区域而异, 从而对同一病理环节产生截然不同的作用, 因此药物通过调控 RBP 的 LLPS 参与其中则有着巨大的临床应用潜力。在临床转化层面, 筛选出包括 TGF- β /Smad7 通路、NLRP3、外泌体及 m⁶A 修饰酶在内的多个潜在靶点, 并指出通过干预 RNA 结合蛋白相分离稳态以恢复 RNA 代谢平衡, 有望成为区别于传统疗法的新兴治疗策略, 为开发靶向 RNA 结合蛋白的精准诊疗方案提供了理论依据和创新思路。

作者贡献声明: 胡天发 论文撰写与修改; 韩杰 研究构想, 文章框架设计; 吴亚超、姚国军、尚轲斌、廖祯 图表制作; 农彬、玉开龙 文献检索与

内容整合。所有作者阅读并同意最终的文本。

利益冲突声明: 作者声称无任何利益冲突。

参考文献

- [1] 朱正杰, 彭昊. 成骨细胞在激素性股骨头坏死发病机制中的作用研究进展[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2025, 22(1): 76-81. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-5972.2025.01.015>.
ZHU Zhengjie, PENG Hao. Research progress on the role of osteoblasts in the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. Orthopaedic Biomechanics Materials and Clinical Study, 2025, 22(1): 76-81. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-5972.2025.01.015>.
- [2] Li L, Zhao S, Leng Z, et al. Pathological mechanisms and related markers of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. Ann Med, 2024, 56(1): 2416070. <https://doi.org/10.1080/07853890.2024.2416070>.
- [3] Cui L, Zhuang Q, Lin J, et al. Multicentric epidemiologic study on six thousand three hundred and ninety five cases of femoral head osteonecrosis in China[J]. Int Orthop, 2016, 40(2): 267-276. <https://doi.org/10.1007/s00264-015-3061-7>.
- [4] Swahn H, Olmer M, Lotz MK. RNA-binding proteins that are highly expressed and enriched in healthy cartilage but suppressed in osteoarthritis[J]. Front Cell Dev Biol, 2023, 11: 1208315. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1208315>.
- [5] Scott-Hewitt N, Mahoney M, Huang YT, et al. Microglial-derived C1q integrates into neuronal ribonucleoprotein complexes and impacts protein homeostasis in the aging brain [J]. Cell, 2024, 187(16): 4193-4212. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.05.058>.
- [6] 梁婷婷, 曾雷. 液-液相分离在基因转录调控中功能机制的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2022, 48(6): 1629-1634. <https://doi.org/10.13481/j.1671-587X.20220632>.
LIANG Tingting, ZENG Lei. Research progress in functional mechanism of liquid-liquid phase separation in gene transcription regulation[J]. Journal of Jilin University. Medicine Edition, 2022, 48(6): 1629-1634. <https://doi.org/10.13481/j.1671-587X.20220632>.
- [7] 王丽, 王拥军, 万兵, 等. 液-液相分离: 细胞内的调控机制和疾病发展[J]. 激光生物学报, 2024, 33(2): 97-107. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-7146.2024.02.001>.
WANG Li, WANG Yongjun, WAN Bing, et al. Liquid-liquid phase separation: intracellular regulatory mechanisms and disease development[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2024, 33(2): 97-107. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-7146.2024.02.001>.
- [8] Fierro-Monti I. RBPs: an RNA editor's choice[J]. Front Mol Biosci, 2024, 11: 1454241. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2024.1454241>.
- [9] Niedner-Boblenz A, Monecke T, Hennig J, et al. Intrinsically disordered RNA-binding motifs cooperate to catalyze RNA folding and drive phase separation[J]. Nucleic Acids Res, 2024,

- 52(22): 14205-14228. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1107>.
- [10] Strong MJ, McLellan C, Kaplanis B, et al. Phase separation of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein with TDP-43 is dependent on C-terminus domains[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(16): 8779. <https://doi.org/10.3390/ijms25168779>.
- [11] Dai XX, Pi SB, Zhao LW, et al. PABPN1 functions as a hub in the assembly of nuclear poly(A) domains that are essential for mouse oocyte development[J/OL]. *Sci Adv*, 2022, 8(43): eabn9016[2025-10-15]. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abn9016>.
- [12] Kim YR, Joo J, Lee HJ, et al. Prion-like domain mediated phase separation of ARID1A promotes oncogenic potential of Ewing's sarcoma[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 6569. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51050-0>.
- [13] Maneix L, Iakova P, Lee CG, et al. Cyclophilin A supports translation of intrinsically disordered proteins and affects haematopoietic stem cell ageing[J]. *Nat Cell Biol*, 2024, 26(4): 593-603. <https://doi.org/10.1038/s41556-024-01387-x>.
- [14] Song D, Kuang LS, Yang L, et al. Yin and Yang regulation of stress granules by Caprin-1[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(44): e2207975119[2025-10-15]. <https://doi.org/10.1073/pnas.2207975119>.
- [15] Pakravan D, Michiels E, Bratek-Skicki A, et al. Liquid-liquid phase separation enhances TDP-43 LCD aggregation but delays seeded aggregation[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(4): 548. <https://doi.org/10.3390/biom11040548>.
- [16] Agarwal A, Rai SK, Avni A, et al. An intrinsically disordered pathological prion variant Y145Stop converts into self-seeding amyloids via liquid-liquid phase separation[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(45): e2100968118[2025-10-15]. <https://doi.org/10.1073/pnas.2100968118>.
- [17] Staderini T, Bigi A, Lagrèze C, et al. Biophysical characterization of the phase separation of TDP-43 devoid of the C-terminal domain[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2024, 29(1): 104. <https://doi.org/10.1186/s11658-024-00615-4>.
- [18] Martin EW, Thomasen FE, Milkovic NM, et al. Interplay of folded domains and the disordered low-complexity domain in mediating hnRNP A1 phase separation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(5): 2931-2945. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab063>.
- [19] Koehler LC, Grese ZR, Bastos ACS, et al. TDP-43 oligomerization and phase separation properties are necessary for autoregulation[J]. *Front Neurosci*, 2022, 16: 818655. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.818655>.
- [20] Zhu S, Gu J, Yao J, et al. Liquid-liquid phase separation of RBGD2/4 is required for heat stress resistance in *Arabidopsis* [J]. *Dev Cell*, 2022, 57(5): 583-597. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.02.005>.
- [21] Carrasco J, Antón R, Valbuena A, et al. Metamorphism in TDP-43 prion-like domain determines chaperone recognition[J]. *Nat Commun*, 2023, 14: 466. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36023-z>.
- [22] Ku D, Yang Y, Kim Y. RNA-associated nuclear condensates: Where the nucleus keeps its RNAs in check[J]. *Mol Cells*, 2025, 48(8): 100240. <https://doi.org/10.1016/j.mocell.2025.100240>.
- [23] Chen RX, Xu SD, Deng MH, et al. Mex-3 RNA binding family member A (MEX3A)/circMPP6 complex promotes colorectal cancer progression by inhibiting autophagy[J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 80. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01787-3>.
- [24] Chen S, Cao X, Zhang J, et al. circVAMP3 drives CAPRIN1 phase separation and inhibits hepatocellular carcinoma by suppressing c-myc translation[J]. *Adv Sci*, 2022, 9(8): 2103817. <https://doi.org/10.1002/advs.202103817>.
- [25] Pérez-Berlanga M, Wiersma VI, Zbinden A, et al. Loss of TDP-43 oligomerization or RNA binding elicits distinct aggregation patterns[J/OL]. *EMBO J*, 2023, 42(17): e111719[2025-10-15]. <https://doi.org/10.15252/embj.2022111719>.
- [26] Joseph JA, Espinosa JR, Sanchez-Burgos I, et al. Thermodynamics and kinetics of phase separation of protein-RNA mixtures by a minimal model[J]. *Biophys J*, 2021, 120(7): 1219-1230. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.01.031>.
- [27] Mitra R, Usher ET, Dedeoğlu S, et al. Molecular insights into the interaction between a disordered protein and a folded RNA [J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2024, 121(49): e2409139121 [2025-10-15]. <https://doi.org/10.1073/pnas.2409139121>.
- [28] Zhou Q, Usluer S, Zhang F, et al. ATP regulates RNA-driven cold inducible RNA binding protein phase separation[J]. *Protein Sci*, 2021, 30(7): 1438-1453. <https://doi.org/10.1002/pro.4123>.
- [29] Aida H, Shigeta Y, Harada R. The role of ATP in solubilizing RNA-binding protein fused in sarcoma[J]. *Proteins Struct Funct Bioinform*, 2022, 90(8): 1606-1612. <https://doi.org/10.1002/prot.26335>.
- [30] He Y, Kang J, Song J. ATP antagonizes the crowding-induced destabilization of the human eye-lens protein γ S-crystallin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 526(4): 1112-1117. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.04.014>.
- [31] Kota D, Prasad R, Zhou HX. ATP mediates phase separation of disordered basic proteins by bridging intermolecular interaction Networks[J]. *BioRxiv*, 2023, 20: 2023.08.20.554035.
- [32] Toyama Y, Rangadurai AK, Forman-Kay JD, et al. Surface electrostatics dictate RNA-binding protein CAPRIN1 condensate concentration and hydrodynamic properties[J]. *J Biol Chem*, 2023, 299(1): 102776. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102776>.
- [33] Kang J, Lim L, Song J. ATP enhances at low concentrations but dissolves at high concentrations liquid-liquid phase separation (LLPS) of ALS/FTD-causing FUS[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504(2): 545-551. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.014>.
- [34] Hautke A, Ebbinghaus S. The emerging role of ATP as a cosolute for biomolecular processes[J]. *Biol Chem*, 2023, 404(10): 897-908. <https://doi.org/10.1515/hsz-2023-0202>.
- [35] Okada K, Okamoto T, Okumoto K, et al. PAI-1 is involved in delayed bone repair induced by glucocorticoids in mice[J]. *Bone*, 2020, 134: 115310. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115310>.

- [36] Liverani E, Banerjee S, Roberts W, et al. Prednisolone exerts exquisite inhibitory properties on platelet functions[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(10): 1364-1373. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.02.006>.
- [37] Ding LZ, Teng X, Zhang ZB, et al. Mangiferin inhibits apoptosis and oxidative stress via BMP2/Smad-1 signaling in dexamethasone-induced MC3T3-E1 cells[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(5): 2517-2526. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3506>.
- [38] Zhang J, Cao JZ, Liu YF, et al. Advances in the pathogenesis of steroid-associated osteonecrosis of the femoral head[J]. *Biomolecules*, 2024, 14(6): 667. <https://doi.org/10.3390/biom14060667>.
- [39] Yang W, Li HY, Wu YF, et al. ac4C acetylation of RUNX2 catalyzed by NAT10 spurs osteogenesis of BMSCs and prevents ovariectomy-induced bone loss[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, 26: 135-147. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.06.022>.
- [40] Ma M, Tan Z, Li W, et al. Osteoimmunology and osteonecrosis of the femoral head[J]. *Bone Joint Res*, 2022, 11(1): 26-28. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.111.BJR-2021-0467.R1>.
- [41] Deng R, Zhang HL, Huang JH, et al. MAPK1/3 kinase-dependent ULK1 degradation attenuates mitophagy and promotes breast cancer bone metastasis[J]. *Autophagy*, 2021, 17(10): 3011-3029. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1850609>.
- [42] Chen L, Shi X, Weng SJ, et al. Vitamin K2 can rescue the dexamethasone-induced downregulation of osteoblast autophagy and mitophagy thereby restoring osteoblast function in vitro and in vivo[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1209. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01209>.
- [43] Hong SJ, Jung S, Jang JS, et al. PARK2 induces osteoclastogenesis through activation of the NF- κ B pathway[J]. *Mol Cells*, 2022, 45(10): 749-760. <https://doi.org/10.14348/molcells.2022.0058>.
- [44] Kar R, Riquelme MA, Hua R, et al. Glucocorticoid-induced autophagy protects osteocytes against oxidative stress through activation of MAPK/ERK signaling[J/OL]. *JBM Plus*, 2019, 3(4): e10077[2025-10-15]. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10077>.
- [45] Fan Y, Chen Z, Wang H, et al. Isoviteixin targets SIRT3 to prevent steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by modulating mitophagy-mediated ferroptosis[J]. *Bone Res*, 2025, 13(1): 18. <https://doi.org/10.1038/s41413-024-00390-0>.
- [46] Schepper JD, Collins F, Rios-Arce ND, et al. Involvement of the gut microbiota and barrier function in glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. *J Bone Miner Res*, 2020, 35(4): 801-820. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3947>.
- [47] Wei H, Li Z, Hu S, et al. Apoptosis of mesenchymal stem cells induced by hydrogen peroxide concerns both endoplasmic reticulum stress and mitochondrial death pathway through regulation of caspases, p38 and JNK[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(4): 967-978. <https://doi.org/10.1002/jcb.22785>.
- [48] Yang N, Sun H, Xue Y, et al. Inhibition of MAGL activates the Keap1/Nrf2 pathway to attenuate glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head[J/OL]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(6): e447[2025-10-15]. <https://doi.org/10.1002/ctm2.447>.
- [49] Kubo Y, Drescher W, Fragoulis A, et al. Adverse effects of oxidative stress on bone and vasculature in corticosteroid-associated osteonecrosis: potential role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in cytoprotection[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2021, 35(5): 357-376. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8163>.
- [50] Sun LY, Pang CY, Li DK, et al. Antioxidants cause rapid expansion of human adipose-derived mesenchymal stem cells via CDK and CDK inhibitor regulation[J]. *J Biomed Sci*, 2013, 20(1): 53. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-20-53>.
- [51] Okada H, Okabe K, Tanaka S. Finely-tuned calcium oscillations in osteoclast differentiation and bone resorption[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 180. <https://doi.org/10.3390/ijms22010180>.
- [52] An J, Hao D, Zhang Q, et al. Natural products for treatment of bone erosive diseases: The effects and mechanisms on inhibiting osteoclastogenesis and bone resorption[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 36: 118-131. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.04.024>.
- [53] Nan K, Zhang Y, Zhang X, et al. Exosomes from miRNA-378-modified adipose-derived stem cells prevent glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head by enhancing angiogenesis and osteogenesis via targeting miR-378 negatively regulated suppressor of fused (Sufu)[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 331. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02390-x>.
- [54] Zuo R, Kong L, Wang M, et al. Exosomes derived from human CD34⁺ stem cells transfected with miR-26a prevent glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head by promoting angiogenesis and osteogenesis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 321. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1426-3>.
- [55] Han N, Qian F, Niu X, et al. Circ_0058792 regulates osteogenic differentiation through miR-181a-5p/Smad7 axis in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(5): 12807-12822. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2074617>.
- [56] He MC, Zhang J, Chen XJ, et al. Osteoclastic activity was associated with the development of steroid-induced osteonecrosis of femoral head[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1): 1036-1046. <https://doi.org/10.1080/21691401.2020.1774596>.
- [57] Usategui-Martín R, Gutiérrez-Cerrajero C, Jiménez-Vázquez S, et al. Polymorphisms in genes implicated in base excision repair (BER) pathway are associated with susceptibility to Paget's disease of bone[J]. *Bone*, 2018, 112: 19-23. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.04.003>.
- [58] Nicolaïje C, Diderich KE, Botter SM, et al. Age-related skeletal dynamics and decrease in bone strength in DNA repair deficient male trichothiodystrophy mice[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35246[2025-10-15]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035246>.
- [59] Botter SM, Zar M, van Osch GJ, et al. Analysis of osteoarthritis in a mouse model of the progeroid human DNA repair syndrome trichothiodystrophy[J]. *Age (Dordr)*, 2011, 33(3): 247-260. <https://doi.org/10.1007/s11357-010-9175-3>.

- [60] Peng P, Nie Z, Sun F, et al. Glucocorticoids induce femoral head necrosis in rats through the ROS/JNK/c-Jun pathway[J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(1): 312-321. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13037>.
- [61] Levone BR, Lenzken SC, Antonaci M, et al. FUS-dependent liquid-liquid phase separation is important for DNA repair initiation[J/OL]. *J Cell Biol*, 2021, 220(5): e202008030[2025-10-15]. <https://doi.org/10.1083/jcb.202008030>.
- [62] Kilic S, Lezaja A, Gatti M, et al. Phase separation of 53BP1 determines liquid-like behavior of DNA repair compartments [J/OL]. *EMBO J*, 2019, 38(16): e101379[2025-10-15]. <https://doi.org/10.15252/embj.2018101379>.
- [63] Pessina F, Giavazzi F, Yin Y, et al. Functional transcription promoters at DNA double-strand breaks mediate RNA-driven phase separation of damage-response factors[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(10): 1286-1299. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0392-4>.
- [64] Reber S, Jutzi D, Lindsay H, et al. The phase separation-dependent FUS interactome reveals nuclear and cytoplasmic function of liquid-liquid phase separation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(13): 7713-7731. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab582>.
- [65] Wang YL, Feng LL, Shi J, et al. CIRS-7 enhances the liquid-liquid phase separation of miRISC and promotes DNA damage repair[J]. *Nucleus*, 2023, 14(1): 2293599. <https://doi.org/10.1080/19491034.2023.2293599>.
- [66] Sun F, Zhou JL, Liu ZL, et al. Dexamethasone induces ferroptosis via P53/SLC7A11/GPX4 pathway in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 602: 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.02.112>.
- [67] Li M, Hao Y, Song X, et al. Ca-circSCN8A promotes HPASMCs ferroptosis via LLPS initiated R-loop[J/OL]. *Hypertension*, 2025, 82(7): e114-e128[2025-10-15]. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.125.25036>.
- [68] Nakamura T, Hipp C, Santos Dias Mourão A, et al. Phase separation of FSP1 promotes ferroptosis[J]. *Nature*, 2023, 619(7969): 371-377. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06255-6>.
- [69] Wang Z, Yan K, Ge G, et al. Exosomes derived from miR-155-5p-overexpressing synovial mesenchymal stem cells prevent osteoarthritis via enhancing proliferation and migration, attenuating apoptosis, and modulating extracellular matrix secretion in chondrocytes[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2021, 37(1): 85-96. <https://doi.org/10.1007/s10565-020-09559-9>.
- [70] Chen C, Fu L, Luo Y, et al. Engineered exosome-functionalized extracellular matrix-mimicking hydrogel for promoting bone repair in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15(24): 28891-28906. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c01539>.
- [71] Ryan VH, Dignon GL, Zerze GH, et al. Mechanistic view of hnRNPA2 low-complexity domain structure, interactions, and phase separation altered by mutation and arginine methylation [J]. *Mol Cell*, 2018, 69(3): 465-479. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.022>.
- [72] Liu XM, Ma L, Schekman R. Selective sorting of microRNAs into exosomes by phase-separated YBX1 condensates[J/OL]. *eLife*, 2021, 10: e71982[2025-10-15]. <https://doi.org/10.7554/eLife.71982>.
- [73] Bai Y, Liu Y, Jin S, et al. Expression of microRNA-27a in a rat model of osteonecrosis of the femoral head and its association with TGF- β /Smad7 signalling in osteoblasts[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(2): 850-860. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.4007>.
- [74] Yang JX, Xie P, Li YS, et al. Osteoclast-derived miR-23a-5p-containing exosomes inhibit osteogenic differentiation by regulating Runx2[J]. *Cell Signal*, 2020, 70: 109504. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109504>.
- [75] Fang SH, Chen L, Chen HH, et al. miR-15b ameliorates SONFH by targeting Smad7 and inhibiting osteogenic differentiation of BMSCs[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(22): 9761-9771. https://doi.org/10.26355/eurrev_201911_19539.
- [76] Hao Y, Lu C, Zhang B, et al. CircPVT1 up-regulation attenuates steroid-induced osteonecrosis of the femoral head through regulating miR-21-5p-mediated Smad7/TGF β signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(10): 4608-4622. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16294>.
- [77] Xiao M, Wang F, Chen N, et al. Smad4 sequestered in SFPQ condensates prevents TGF- β tumor-suppressive signaling[J]. *Dev Cell*, 2024, 59(1): 48-63. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2023.11.020>.
- [78] Li J, Wang W, Li S, et al. Smad2/3/4 complex could undergo liquid liquid phase separation and induce apoptosis through TAT in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 176. <https://doi.org/10.1186/s12935-024-03353-x>.
- [79] Oh S, Yang J, Park C, et al. Dieckol attenuated glucocorticoid-induced muscle atrophy by decreasing NLRP3 inflammasome and pyroptosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8057. <https://doi.org/10.3390/ijms22158057>.
- [80] 王多贤, 曹林忠, 蒋玮, 等. 激素性股骨头坏死中的炎症小体激活与细胞焦亡[J]. *生命的化学*, 2021, 41(8): 1733-1739. <https://doi.org/10.13488/j.smhx.20210061>.
WANG Duoxian, CAO Linzhong, JIANG Wei, et al. Inflammasome activation and pyrolysis in hormone-induced femoral head necrosis[J]. *Chemistry of Life*, 2021, 41(8): 1733-1739. <https://doi.org/10.13488/j.smhx.20210061>.
- [81] Shahzad K, Bock F, Al-Dabet MM, et al. Caspase-1, but not caspase-3, promotes diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(8): 2270-2275. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015060676>.
- [82] Wang J, Zhou Y, Zhang M, et al. YTHDF1-CLOCK axis contributes to pathogenesis of allergic airway inflammation through LLPS[J]. *Cell Rep*, 2024, 43(3): 113947. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.113947>.
- [83] Schmacke NA, Hornung V. Decoding NLRP3: Phase separation enters the scene[J]. *Cell Res*, 2025, 35(6): 391-392. <https://doi.org/10.1038/s41422-025-01120-9>.
- [84] Zou G, Tang Y, Yang J, et al. Signal-induced NLRP3 phase separation initiates inflammasome activation[J]. *Cell Res*, 2025,

- 35(6): 437-452. <https://doi.org/10.1038/s41422-025-01096-6>.
- [85] Ma B, Cao P, Zhang L, et al. YTHDC2 inhibits rat bone mesenchymal stem cells osteogenic differentiation by accelerating RUNX2 mRNA degradation via M6A methylation[J/OL]. *Heliyon*, 2023, 9(8): e18876[2025-10-15]. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18876>.
- [86] 原天伟, 刘洪江, 杨增强, 等. 激素性股骨头坏死中m6A相关基因差异性的鉴定[J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(14): 2159-2165. <https://doi.org/10.12307/2024.329>.
YUAN Tianyi, LIU Hongjiang, YANG Zengqiang, et al. Identification of differences in N6-methyladenosine-related genes in steroid-induced femoral head necrosis[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2024, 28(14): 2159-2165. <https://doi.org/10.12307/2024.329>.
- [87] Su Y, Maimaitiyiming Y, Wang L, et al. Modulation of phase separation by RNA: a glimpse on N⁶-methyladenosine modification[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 786454. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.786454>.
- [88] Park J, Wu Y, Shao W, et al. Poly(GR) interacts with key stress granule factors promoting its assembly into cytoplasmic inclusions[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(8): 112822. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112822>.
- [89] Liu ZY, Lin LC, Liu ZY, et al. N⁶-Methyladenosine-mediated phase separation suppresses NOTCH1 expression and promotes mitochondrial fission in diabetic cardiac fibrosis[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2024, 23(1): 347. <https://doi.org/10.1186/s12933-024-02444-3>.
- [90] Cheng Y, Xie W, Pickering BF, et al. N6-Methyladenosine on mRNA facilitates a phase-separated nuclear body that suppresses myeloid leukemic differentiation[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(7): 958-972. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.04.017>.
- [91] Ge Y, Chen R, Ling T, et al. Elevated WTAP promotes hyperinflammation by increasing M6A modification in inflammatory disease models[J/OL]. *J Clin Invest*, 2024, 134(14): e177932[2025-10-15]. <https://doi.org/10.1172/JCI177932>.
- [92] 闫玉珠, 于燕, 刘俊叶, 等. 酒精性和激素性股骨头坏死的外周血脂组学分析[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2022, 47(7): 872-880. <https://doi.org/10.11817/j.issn.1672-7347.2022.210567>.
YAN Yuzhu, YU Yan, LIU Junye, et al. Lipid metabolism analysis for peripheral blood in patients with alcohol-induced and steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Journal of Central South University Medical Science*, 2022, 47(7): 872-880. <https://doi.org/10.11817/j.issn.1672-7347.2022.210567>.

(责任编辑 宋柳)