

· 论著 ·

绝经后骨质疏松症差异表达 lncRNAs 及其靶基因抑瘤素 M 在外周血的表达研究

李生强 谢冰颖 陈娟 谢丽华 叶云金 黄景文 葛继荣*

福建省中医药科学院骨质疏松证候基因组学研究室, 福建 福州 350003

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 03-0359-05

摘要: **目的** 探讨绝经后骨质疏松症差异表达 lncRNAs 及其靶基因抑瘤素 M (oncostatin M, OSM) 在绝经后骨质疏松症外周血的表达及其意义。 **方法** 在前期 lncRNA-mRNA 芯片检测绝经后骨质疏松症差异 lncRNAs 并进行共表达分析的基础上, 利用 blat 软件分析 lncRNA TTC28-AS1、linc-IRF2BP2-1、linc-FAM126B-1 靶基因; RNAfold 预测其二级结构; 随机选择绝经后妇女受试者, 检测骨密度, 正常骨密度妇女 25 例为对照组, 骨质疏松症患者 25 例为骨质疏松症组; 定量 PCR 检测两组人群外周血 lncRNA TTC28-AS1、linc-IRF2BP2-1、linc-FAM126B-1 及抑瘤素 M 的表达。 **结果** blat 软件预测 lncRNA TTC28-AS1、linc-IRF2BP2-1、linc-FAM126B-1 的靶基因为 OSM, 相关系数分别为 0.8506 ($P = 0.0037$)、0.9314 ($P = 0.0003$) 及 0.9222 ($P = 0.0004$); RNAfold 预测 3 个 lncRNAs 均具有多个茎环、多分枝内部环结构; lncRNA TTC28-AS1、linc-IRF2BP2-1、linc-FAM126B-1 及其靶基因抑瘤素 M 在骨质疏松症组中表达水平均显著低于对照组 (P 值均小于 0.05)。 **结论** lncRNA TTC28-AS1、linc-IRF2BP2-1、linc-FAM126B-1 及其靶基因抑瘤素 M 表达下调可能与绝经后骨质疏松症存在相关性。

关键词: 长链非编码 RNA; 抑瘤素 M; 绝经后骨质疏松症; RNA 二级结构; lncRNA TTC28-AS1; linc-IRF2BP2-1; linc-FAM126B-1

Differential expression of lncRNAs and its target gene oncostatin M in peripheral blood in postmenopausal osteoporosis

LI Shengqiang, XIE Bingying, CHEN Juan, XIE Lihua, YE Yunjin, HUANG Jingwen, GE Jirong*

Key Research Section of Osteoporosis Syndrome Genomics, Fujian Academy of Chinese Medical Sciences, Fuzhou 350003, China

* Corresponding author; GE Jirong, Email: gjrrjgcy@163.com

Abstract: **Objective** Our aim is to investigate the expression and significance of differential expressed long-chain non-coding RNAs and oncostatin M (OSM) in postmenopausal osteoporosis. **Methods** Based on the detection of lncRNAs with lncRNA-mRNA chip and co-expression analysis, the target genes lncRNA TTC28-AS1, linc-IRF2BP2-1, and linc-FAM126B-1 were analyzed with a blat software. The secondary structure of lncRNAs was predicted with an online software RNAfold. The subjects were randomly selected from the postmenopausal women, and their BMD was measured. Twenty-five women with normal BMD were included in the control group. Twenty-five patients with osteoporosis were included in the osteoporosis group. The expression of oncostatin M and lncRNA TTC28-AS1, linc-IRF2BP2-1, and linc-FAM126B-1 in the two groups were detected with quantitative PCR. **Results** Blat software predicted that the target of lncRNA TTC28-AS1, linc-IRF2bp2-1, and linc-FAM126B-1 was OSM, and the correlation coefficients were 0.8506 ($P = 0.0037$), 0.9314 ($P = 0.0003$), and 0.9222 ($P = 0.0004$) respectively. RNAfold predicted that all the 3 lncRNAs had multiple stem rings and multi-branched internal ring structures. The expression levels of OSM, lncRNA TTC28-AS1, linc-IRF2bp2-1, and linc-FAM126B-1 in postmenopausal osteoporosis group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The down-regulation of lncRNA TTC28-AS1, linc-IRF2BP2-1, linc-FAM126B-1, and their target gene oncostatin M may be related to postmenopausal osteoporosis.

Key words: long chain non-coding RNA; oncostatin M; postmenopausal osteoporosis; RNA secondary structure; lncRNA TTC28-AS1; linc-IRF2BP2-1; linc-FAM126B-1

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81774350); 福建省自然科学基金项目(2019J01339); 福建省科技厅省属公益类科研院所基本科研专项(2019R1003-1)

* 通信作者: 葛继荣, Email: gjrrjgcy@163.com

随着老龄社会的到来,骨骼健康逐渐引起人们的重视。骨质疏松症以骨骼脆弱和微结构退化为特点,主要出现在绝经后妇女,与椎体和非椎体骨折的风险增加密切相关。骨质疏松症导致的骨折是最常见的残疾原因之一,具有较高的致死率,给社会和家庭带来沉重的医疗负担。因此骨质疏松症的发病机制及防治研究具有重要的临床和公共卫生意义^[1-2]。绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是由于旧骨的清除(骨吸收)与新骨的产生(骨生成)之间平衡受到破坏,从而引起骨微结构破坏,造成骨量下降^[2]。这种动态平衡受到许多因素的影响与调节等。长链非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA)是长度超过 200 个核苷酸且没有蛋白编码能力的转录本,大量证据表明,lncRNA 参与了多种分子机制和疾病^[3-4]。前期课题组以 lncRNA-mRNA 芯片技术为手段,比较分析 PMOP 患者与对照组外周血 lncRNAs 表达谱变化,获得了差异表达 lncRNAs^[5]。本研究在 lncRNA-mRNA 共表达分析的基础上,分析差异表达 lncRNAs 及其靶基因的关系,预测 lncRNAs 二级结构,从临床纳入人群验证 lncRNAs 及靶基因的表达变化,为从长链非编码 RNA 角度阐释骨质疏松症的机制提供思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象:从常住福州地区的汉族绝经后妇女中随机选择受试者,进行血常规、尿常规、肝功、肾功能、腹部 B 超和心电图等检查,结合问卷调查排除严重疾病者;采用双能 X 线骨密度仪检测受试者正位腰椎(L₂₋₄)、左侧股骨颈、大转子和 Ward 区骨密度(g/cm²);根据骨密度检测结果,纳入骨质疏松症组及对照组各 25 例。

纳入标准:①骨质疏松症诊断标准参照《中国人骨质疏松症建议诊断标准(第二稿)》^[6];②受试者均签署知情同意书。本研究方案获得福建省中医药研究院中医药临床研究伦理委员会审批通过^[7]。

排除标准:①不符合中国人骨质疏松症诊断标准者;②类风湿性关节炎、糖尿病、甲状腺功能亢进等继发性骨质疏松症者;③合并有心脑血管、胃肠道等严重疾病者;④肝、肾功能检查异常者;⑤近 3 个月内用激素替代治疗,使用降钙素者;近 6 个月内有连续 15 d 用双膦酸盐等防治骨质疏松症者^[7]。

1.1.2 主要仪器和试剂:Discovery W 双能 X 线骨密度仪(变异系数 1.0%,精度 0.25%,美国 Hologic 公司);微量核酸检测仪 Nanodrop ND-2000(美国 Thermo scientific 公司);实时荧光定量 PCR 仪(7500 fast 美国 ABI 公司);人外周血淋巴细胞分离液(北京索莱宝科技有限公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);引物合成、反转录试剂盒、SYBR 定量 PCR 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]。

1.2 方法

1.2.1 lncRNA 靶基因预测:在 lncRNA-mRNA 共表达分析的基础上,利用 blat 工具对 lncRNA 和 mRNA(3'UTR)序列进行比对。序列相似的 lncRNA 与 mRNA(相关系数大于 0.85 且 P 值小于 0.05)预测为具有靶向调节关系。

1.2.2 lncRNA 二级结构预测:打开 RNAfold(<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>)网址,分别输入 lncRNA TTC28-AS1、linc-IRF2BP2-1、linc-FAM126B-1 全长序列,分别对其二级结构进行预测分析。

1.2.3 总 RNA 抽提及反转录:抗凝采血管采集受试者空腹外周血 2 mL,逐滴加入到淋巴细胞分离液,1 500 r/min 离心 15 min,小心吸出中间白色细胞层,并用生理盐水重悬、离心;Trizol 法抽提细胞中的总 RNA;微量核酸检测仪检测吸光度值,分析 RNA 的纯度并计算浓度。采用两步法进行反转录,每个样品取 1 μg 总 RNA 用于反转录合成 cDNA,并于 -80 °C 保存。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 验证:定量 PCR 采用 20 μL 反应体系:SYBR mix 10 μL,上下游引物各 0.4 μL,ROX dye II 0.4 μL,稀释 10 倍的 cDNA 2 μL,dd H₂O 6.8 μL;一个样品中的一个基因做 3 个重复孔;PCR 反应步骤及相对表达量 2^{-ΔΔCt}法参照前期发表文献^[7]。上下游引物序列及扩增产物大小见表 1。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据统计分析,计量资料采用均数±标准差描述。根据数据是否正态分布,选择非参数检验或 t 检验比较组间差异,以 P<0.05 判断为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA 靶基因预测结果

lncRNA 靶基因预测结果见表 2。

表 1 定量 PCR 上下游引物序列

Table 1 Upstream and downstream primer sequences for RT-PCR

基因	引物序列	产物大小/bp
GAPDH	上游序列:5'-GGG AAA CTG TGG CGT GAT-3' 下游序列:5'-GAG TGG GTG TCG CTG TTG A-3'	299
OSM	上游序列:5'-TCC CCA TGG TGA ACG GAA CA -3' 下游序列:5'-AGG CAC CCA GGC TTA GCG -3'	175
lncRNA TTC28-AS1	上游序列:5'- GAT TTC TGA ACG CGA GCA GTG-3' 下游序列:5'- TGA CCA AAT TTC TTT GAC CAG AGT-3'	79
linc-IRF2BP2-1	上游序列:5'- TTG GTC CAG CCT TGA AGC TC-3' 下游序列:5'- GGC CAA GAG AGA AGA TTT GGC A-3'	150
linc-FAM126B-1	上游序列:5'- AAA CTC ACA GGA AAG GTG AAG A-3' 下游序列:5'- TTC ACT ACG GCT CAA TCC CG -3'	84

表 2 LncRNA 靶基因预测

Table 2 Prediction of target genes of lncRNAs

探针	长链非编码 RNA	长度/bp	靶基因	相关性	P 值
p11149	lncRNA TTC28-AS1	663	OSM	0.8506	0.0037
p17588	linc-IRF2BP2-1	330	OSM	0.9314	0.0003
P20974	linc-FAM126B-1	791	OSM	0.9222	0.0004

2.2 LncRNA 二级结构预测

由于碱基数较长,研究表明 LncRNA 能形成保守的二级结构,对于它们参与复杂的调控作用起着重要作用。RNAfold 软件进行 lncRNAs 结构预测,结果表明,lncRNA TTC28-AS1、linc-IRF2BP2-1、linc-FAM126B-1 均含有多个茎环及多分枝内部环结构(见图 1)。lncRNA 系列越长,如 linc-FAM126B-1 包含更多的环形结构(图 1C),其二级结构越复杂,

可能参与更多的生物学功能。

2.3 两组人群基础资料及骨密度比较

骨质疏松症组及对照组人群基础资料见表 2,两组人群在年龄、初潮年龄、怀孕次数、绝经年龄及 BMI 指数等方面差异均无统计学意义,结果具有可比性。与对照组相比,骨质疏松症组在腰椎及 Ward 区骨密度显著下降(P 值均小于 0.05),两组骨密度比较见表 4。

表 3 受试者基础资料比较($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of basic data of the subjects($\bar{x} \pm s$)

组别	n	年龄/(岁)	初潮年龄/(岁)	怀孕次数/(次)	绝经年龄/(岁)	BMI/(kg/m ²)
对照组	25	62.3 $\pm$ 4.3	15.5 $\pm$ 1.7	2.3 $\pm$ 1.2	49.5 $\pm$ 3.4	24.34 $\pm$ 3.77
骨质疏松症组	25	61.6 $\pm$ 4.7	15.2 $\pm$ 1.5	2.2 $\pm$ 1.3	49.2 $\pm$ 3.3	24.13 $\pm$ 3.54

表 4 受试者骨密度比较($\bar{x} \pm s$, g/cm²)Table 3 Comparison of bone mineral density of the subjects($\bar{x} \pm s$, g/cm²)

组别	n	腰椎	股骨颈	大转子	Ward 区
对照组	25	0.792 $\pm$ 0.143	0.732 $\pm$ 0.145	0.662 $\pm$ 0.153	0.652 $\pm$ 0.121
骨质疏松症组	25	0.685 $\pm$ 0.126 [*]	0.717 $\pm$ 0.134	0.645 $\pm$ 0.148	0.543 $\pm$ 0.105 [*]

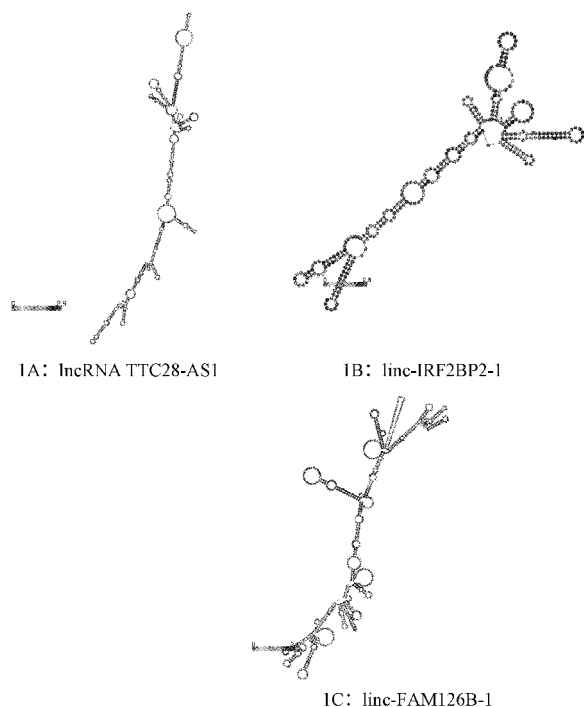
注:与对照组相比,^{*} $P < 0.05$ 。

2.4 定量 PCR 检测抑瘤素 M 及 lncRNAs 在两组人群中的表达

定量 PCR 结果表明,OSM 在骨质疏松症组人群外周血中表达显著降低,与对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$); lncRNA TTC28-AS1、linc-IRF2BP2-1、linc-FAM126B-1 等在骨质疏松症组人群中表达水平显著降低,与对照组相比,差异具有统计学意义(P 值均小于 0.05),见图 2。

3 讨论

随着测序技术的迅速发展,越来越多的基因组转录本得到研究,从而产生了大量的长链非编码(long chain non-coding RNA, lncRNA)。虽然科学家已经掌握了许多 DNA 调节元件(如增强子、启动子)的调控特点,但是,鉴定及功能性研究仍然是当前 lncRNA 研究的首要任务^[8-9]。从 2018 年开始,



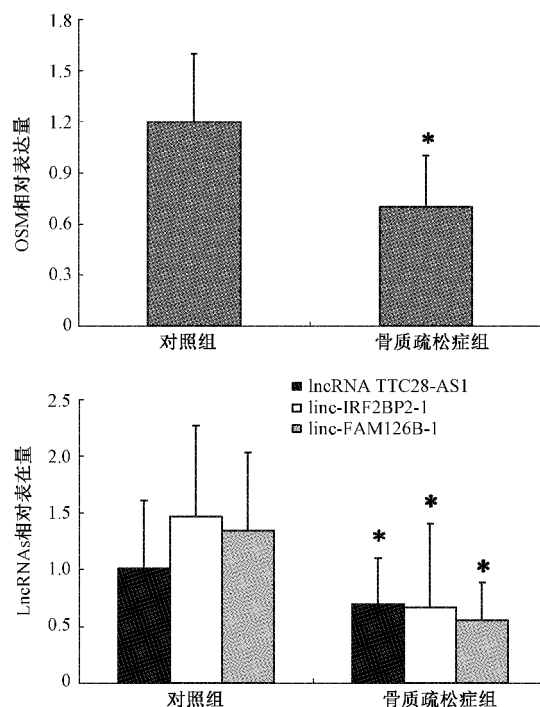
注: 1 A: lncRNA TTC28-AS1; 1B: linc-IRF2BP2-1; 1C: linc-FAM126B-1。

图1 RNAfold 预测 lncRNAs MEF 二级结构图

Fig.1 MEF secondary structure of lncRNAs predicted with RNAfold software

日益增长的研究表明, lncRNA 在骨代谢中起着重要作用, 许多长链非编码 RNA 被发现参与多种骨代谢疾病的发生、发展及转归过程^[10-13]。在骨质疏松症, 长链非编码 RNA 主要参与了成骨细胞分化^[14-16]、破骨细胞分化^[17]及细胞信号通路激活^[2,16]等调节过程, 在骨生成与骨吸收动态平衡中起着重要调节作用。

本研究在获得绝经后骨质疏松症差异性 lncRNA 及 mRNA 的基础上^[5], 进行 lncRNA-mRNA 共表达分析, 利用 blat 工具预测 lncRNA TTC28-AS1、linc-IRF2BP2-1、linc-FAM126B-1 的靶基因可能为抑瘤素 M (OSM)。目前国内尚没有 OSM 与骨代谢的相关报道, 但在国外已有相关研究。OSM 作为白细胞介素-6 (interleukin 6, IL-6) 家族成员, 是具有调节基因活性、抑制肿瘤增殖等生物学活性的分泌性糖蛋白^[18-19]。骨细胞、成骨细胞和巨噬细胞均能以旁分泌的形式产生 OSM。研究表明, OSM 既可促进成骨细胞成骨分化, 又能间接促进破骨细胞生成, 是具有双向调节作用独特细胞因子^[20-22]。OSM 与受体 (oncostatin M, OSMR) 结合后可启动下游的广泛的信号通路^[22]。OSM 基因敲除小鼠具有成骨细胞数量降低、骨小梁减少的特征, 表明 OSM 具有



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图2 定量 PCR 检测基因表达水平

Fig.2 Expression level of the genes detected with real-time PCR

促进成骨细胞分化的功能^[23]; OSMR 敲除小鼠实验表明 OSM 可能通过影响成骨细胞的 RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B ligand) 表达, 负向调节破骨细胞功能^[24]。本研究中, 样品来自人的外周血, OSM 在绝经后骨质疏松组表达水平下降, 这可能与吞噬细胞、破骨细胞分化能力相关, 表明外周血 OSM 的表达与 PMOP 具有相关性。在前期六味地黄丸治疗绝经后骨质疏松症患者的临床试验中, 课题组发现患者治疗 3 个月后, 外周血 OSM 的表达具有上升趋势, 表明 OSM 可能是六味地黄丸治疗 POP 的靶标之一^[25]。

生物体内 RNA 较少单独存在, 它们往往与具有特定功能的蛋白质特异性结合从而发挥生物学功能, 特异性结合就要求 RNA 具有一定的结构特征。RNA 的二级结构会影响到 RNA 的生物学功能^[26]。通过在线预测 RNAfold 预测得到 lncRNA TTC28-AS1、linc-IRF2BP2-1、linc-FAM126B-1 的二级结构, 它们均具有多个茎环、多分枝内部环, 系列最长的 linc-FAM126B-1 其结构也最复杂, 具有最多的茎环结构, 说明它可能参与更多的生物学功能。lncRNA 二级结构预测结合 lncRNA 功能研究, 对于预测具有某种功能的结构单元、寻找药物治疗靶标具有重

要意义。

在前期芯片检测中,我们发现, lncRNA TTC28-AS1、linc-IRF2BP2-1、linc-FAM126B-1 及 OSM 在绝经后骨质疏松症组表达均出现下调。本研究结果表明,与对照组相比,骨质疏松症组 lncRNA TTC28-AS1、linc-IRF2BP2-1、linc-FAM126B-1 及其靶基因 OSM 表达水平均显著下降,与芯片检测结果一致。外周血 lncRNA TTC28-AS1、linc-IRF2BP2-1、linc-FAM126B-1 及其靶基因 OSM 的表达下调,可能与绝经后骨质疏松症相关。

本文不足之处在于本研究中临床例数还偏少, lncRNAs 与 OSM 的靶向调节关系还需要进一步的实验验证,我们也将开展 lncRNA TTC28-AS1、linc-IRF2BP2-1、linc-FAM126B-1 相关功能性实验。

综上所述,本实验结果证明 lncRNA TTC28-AS1、linc-IRF2BP2-1、linc-FAM126B-1 及其靶基因 OSM 基因在绝经后骨质疏松症中表达显著下调,它们可能为绝经后骨质疏松症的重要关联基因。本文从调控 PMOP 的关联长链非编码 RNAs 及其靶基因 OSM 入手,为阐明 PMOP 的分子机制提供新的研究思路。

【 参 考 文 献 】

- [1] Black DM, Rosen CJ. Clinical practice. postmenopausal osteoporosis[J]. N Engl J Med, 2016,374(3):254-262.
- [2] Tan X, Wen F, Yang W, et al. Comparative efficacy and safety of pharmacological interventions for osteoporosis in postmenopausal women: a network meta-analysis (Chongqing, China) [J]. Menopause, 2019, 26(8): 929-939.
- [3] 马智勇,郭成龙. lncRNA 对骨质疏松骨代谢相关信号通路影响的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(4):547-551.
- [4] Djebali S, Davis CA, Merkel A, et al. Landscape of transcription in human cells[J]. Nature, 2012, 489(7414): 101-108.
- [5] Huynh NP, Anderson BA, Guilak F, et al. Emerging roles for long noncoding RNAs in skeletal biology and disease [J]. Connect Tissue Res, 2017, 58(1): 116-141.
- [6] 陈娟,谢丽华,李生强,等. lncRNA 在绝经后骨质疏松症肾阴虚证中的表达特征及调控网络分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(5): 553-559.
- [7] 中国老年学学会骨质疏松委员会“骨质疏松诊断标准”学科组. 中国人骨质疏松症建议诊断标准(第二稿) [J]. 中国骨质疏松杂志, 2000, 6(1): 1-3.
- [8] 李生强,许惠娟,陈娟,等. 绝经后骨质疏松症肾阴虚证关联 lncRNA uc431+ 的表达研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(8): 966-971.
- [9] Julien J, Antonin M, Marina P. History, discovery, and classification of lncRNAs [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 1008: 1-46.
- [10] Fabrizio F, Alessio C, Manuela HC. Revealing protein-lncRNA Interaction[J]. Brief Bioinform, 2016, 17(1): 106-116.
- [11] Peng SP, Cao LH, He SW, et al. An overview of long noncoding RNAs involved in bone regeneration from mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells Int, 2018; 8273648.
- [12] Ju C, Liu RF, Zhang YW, et al. Mesenchymal stem cell-associated lncRNA in osteogenic differentiation [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 115: 108912.
- [13] Wu QY, Li X, Miao ZN, et al. Long non-coding RNAs: A new code for osteoporosis[J]. Front Endocrinol, 2018, 9: 587.
- [14] Silva AM, Moura SR, Teixeira JH, et al. Long noncoding RNAs: a missing link in osteoporosis[J]. Bone Res, 2019, 7: 10.
- [15] 陈桐堂,万雷,刘少津,等. 绝经后骨质疏松症相关的 lncRNA 研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(11): 1631-1636.
- [16] 余杨洋,蒋伟东,朱佩琪,等. lncRNA 调控各类细胞成骨分化的机制研究进展 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(4): 647-652.
- [17] Jiang Y, Wu W, Jiao G, et al. lncRNA SNHG1 modulates p38 MAPK pathway through Nedd4 and thus inhibits osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Life Sci, 2019, 228: 208-214.
- [18] 熊坤,邓江,黄文良,等. 长链非编码 RNA 参与调控成骨细胞分化和破骨细胞的生成 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(14): 2229-2234.
- [19] Nathaniel RW, Benjamin MJ, Ahmed NH. The oncostatin M-stromal cell axis in health and disease [J]. Scand J Immunol, 2018, 88(3): e12694.
- [20] Tolu O, Rachelle WJ. GP130 cytokines in breast cancer and bone [J]. Cancers (Basel), 2020, 12(2): 326.
- [21] Sims NA, Quinn JM. Osteoimmunology: oncostatin M as a pleiotropic regulator of bone formation and resorption in health and disease[J]. Bonekey Rep, 2014, 3: 527.
- [22] Natalie AS. Cell-specific paracrine actions of IL-6 family cytokines from bone, marrow and muscle that control bone formation and resorption[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016, 79: 14-23.
- [23] 冯丽华,夏海斌. 抑瘤素 M 调控骨稳态的研究进展 [J]. 口腔医学研究, 2019, 35(11): 1026-1029.
- [24] Walker EC, Johnson RW, Hu Y, et al. Murine oncostatin M acts via leukemia inhibitory factor receptor to phosphorylate signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) but not STAT1, an effect that protects bone mass [J]. J Biol Chem, 2016, 291(41): 21703-21716.
- [25] Heike MH. Oncostatin M and interleukin-31: Cytokines, receptors, signal transduction and physiology [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2015, 26(5): 545-558.
- [26] 陈娟,谢丽华,李生强,等. JAK/STAT 通路介导的六味地黄丸对绝经后骨质疏松症肾阴虚证的免疫调节作用 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1747-1750.
- [27] 马文博,颜景斌. RNA 修饰对长链非编码 RNA 的调控作用 [J]. 生命科学, 2019, 31(1): 49-54.

(收稿日期: 2020-06-04;修回日期: 2020-06-14)