

· 论 著 ·

补骨脂素诱导 BMSCs 成骨分化中的 LncRNA 表达谱分析

杨锋* 李文雄 康武林 董博 袁普卫

陕西中医药大学 陕西高校青年创新团队, 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712046

中图分类号: R274.9 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 03-0385-07

摘要: **目的** 观察补骨脂诱导骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨分化过程中长链非编码 RNA(lncRNA)的表达谱及相关靶基因和信号通路。**方法** 取 P2 代 BMSCs 分为三组:空白组(含 10 % FBS 的 L-DMEM)、成骨诱导组(含 10 % FBS 及成骨诱导剂的 L-DMEM)、补骨脂素组(含 10 % FBS 的 L-DMEM 及 10 μ mol/L 补骨脂素),同一环境不同诱导条件干预 21 d;利用 Agilent lncRNA 芯片筛选出成骨诱导分化过程中表达差异 2 倍以上的 lncRNA,并通过荧光定量 PCR 对芯片结果进行验证。选取筛选结果中表达差异较大的 lncRNA 进行 GO 和 KEGG 分析。**结果** 成骨诱导分化 21 d 后持续表达超过 2 倍的 lncRNA 共有 446 个差异表达的 lncRNAs。在 BMSCs 成骨分化过程中,共筛选出 5 个 lncRNA 显著上调,4 个 lncRNA 显著下调。其中 XR009483 上调最显著,而 XR007366 下调最显著,经 PCR 验证与芯片结果相符。经 GO 分析富集度较高的为骨及软骨发育、干细胞分化等生物进程,以及胶原合成、骨化和钙化等生物功能。KEGG 分析主要富集于 15 个生物学通路,其中富集评分较高的是 TGF- β 、Wnt、NF- κ B 及 Calcium 等生物学通路。**结论** 补骨脂素诱导 BMSCs 成骨分化过程中 lncRNA 表达谱发生显著变化,提示差异表达的 lncRNA 可能与 BMSCs 成骨分化密切相关,为研究补骨脂素促 BMSCs 成骨分化机制奠定了一定基础。

关键词: 骨髓间充质干细胞;补骨脂素;成骨分化;长链非编码 RNA

Analysis of the expression profile of LncRNA in the differentiation of osteoblasts by psoralen-induced BMSCs

YANG Feng*, LI Wenxiong, KANG Wulin, DONG Bo, YUAN Puwei

The Young Creation Team of Shannxi Universities, Shannxi Chinese Medical University, Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

* Corresponding author; YANG Feng, Email: yangfengdudu@163.com

Abstract: Objective To observe the expression profile of long-chain non-coding RNA (lncRNA) and its related target genes and signal pathways during the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) induced by psoralen.

Methods The second generation of BMSCs were divided into three groups; blank group (L-DMEM containing 10 % FBS), osteogenic induction group (L-DMEM containing 10 % FBS and osteogenic inducers), and psoralen group (L-DMEM containing 10 μ mol/L psoralen and 10 % FBS). After 21-day intervention, the difference of 2-fold variation of lncRNA in the process of osteogenic differentiation was screened using Agilent lncRNA chip. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to verify the result of the chip. The lncRNA, which was highly differentially expressed in screening result was analyzed with Go and KEGG.

Results There were 446 differentially expressed lncRNAs which expressed more than 2 times continuously after 21 days of osteogenic differentiation. In the process of osteogenic differentiation of BMSCs, 5 up-regulated lncRNAs and 4 down-regulated lncRNAs were screened. Among those, XR009483 and XR007366 were most significantly up-regulated and down-regulated, respectively, and the result were confirmed with RT-PCR. The higher concentrations of GO were related to bone and cartilage development, stem cell differentiation, collagen synthesis, ossification, and calcification. Fifteen biological pathways was found in KEGG pathway analysis including TGF- β , Wnt, NF- κ B, and calcium pathways. **Conclusion** The lncRNA expression

基金项目: 国家自然科学基金项目(81973889);陕西省重点科技创新团队项目(2013KCT-26)

* 通信作者: 杨锋, Email: yangfengdudu@163.com

profile of BMSCs changes significantly during osteogenic differentiation induced by psoralen, suggesting that the differential expression of lncRNA may be closely related to the osteogenic differentiation by BMSCs.

Key words: mesenchymal stem cell; psoralen; osteogenic differentiation; long-chain non-coding RNA

长链非编码 RNA (lncRNA) 是近年来发现的重要的表观遗传学调控手段,可多层次调控基因表达,影响干细胞的多能性和发育,从而调控干细胞的命运。作者前期研究^[1]表明一些补肾中药能通过 DNA 甲基化、组蛋白去乙酰化等表观遗传学机制显著促进成骨相关基因及蛋白表达。其中,补肾中药补骨脂的有效组分补骨脂素具有较强的成骨作用,可以诱导骨髓间充质干细胞成骨分化。已有研究^[2]证实多种 lncRNA 参与了 BMSCs 的成骨分化, lncRNA 在调节 BMSCs 增殖与分化方面具有重要作用,与各种骨骼疾病有着密切的关系。但有关中药介导 lncRNA 调控 BMSCs 成骨分化的作用机制报道较少。本研究通过 lncRNA 芯片、生物信息学、Real time RT-PCR 等技术筛选出补骨脂素调控 BMSCs 成骨分化相关的 lncRNA,为揭示 lncRNA 在补骨脂素调控 BMSCs 成骨分化中的表观遗传学机制奠定基础,从而进一步促进中医“肾主骨”理论的转化应用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取 4~6 周龄 SD 大鼠 10 只,清洁级,雌雄各半,体重(90±10)g,由西安交通大学实验动物中心提供(合格证号:61001700000815)。饲养温度 20~25℃,相对湿度 50%,全价营养饲料喂养。

1.2 主要试剂及仪器

L-DMEM (Gibco, Invitrogen, USA)、胎牛血清 (FBS, Gibco, Invitrogen, USA)、DMSO、地塞米松、β-甘油磷酸钠、抗坏血酸、1-3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、吡啶美辛、胰岛素、MTT (Sigma USA)、补骨脂素标准品 (Sigma)、Total RNA 提取试剂盒 (Promega)、RT-PCRKit (Invitrogen, USA)、mRNA 引物 (华大基因)、胰蛋白酶 (Gibco USA)、CO₂ 孵箱 (Thermo, USA)、倒置相差显微镜 (Olympus)、Bechman Epicx 流式细胞仪、水平式电泳仪 (Bio-Rad, Hercules, CA)、凝胶成像分析系统 (Dolphin DOC, Wealtec, USA)、PCR 仪 (Rotor-Gene 3000 Corbett Research, Australia)、酶联免疫标记仪 (Bio-Rad 550)。

1.3 BMSC 体外培养与鉴定

经戊巴比妥麻醉后,无痛下颈椎脱臼法处死;将大鼠在 75% 的乙醇中浸泡 5 min,无菌条件下取出股骨和胫骨,切除干骺端软骨显露髓腔,用 5 mL 注射器吸取 L-DMEM 培养基反复冲洗髓腔。10 cm 培养皿收集骨髓冲洗液,37℃、5% CO₂ 孵箱培养。每 3 d 换液 1 次。第 4 代培养细胞进行流式细胞仪检测,结果显示细胞均一性较好,其中 CD34 表达呈阴性,而 CD90、CD29 表达呈阳性,表达率分别为 1.4%、96.4% 和 97.5%,提示培养所得细胞主要是 BMSCs,非造血性细胞。同时,经成骨、成脂诱导证实该细胞可以分化为成骨细胞和脂肪细胞。细胞计数并调整细胞浓度至 5×10⁴/mL,备用。

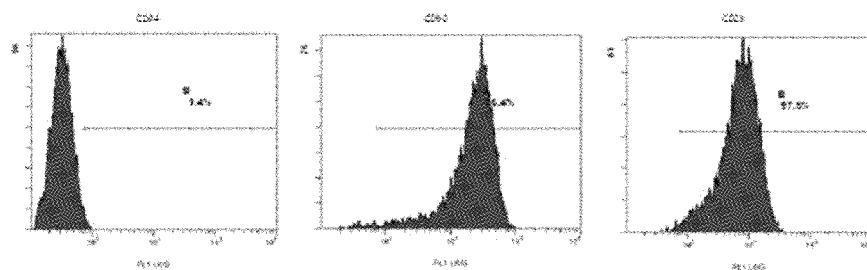


图 1 BMSCs 流式图

Fig.1 Flow cytometry chart of BMSCs

1.4 分组与给药

细胞分 3 组,每组 6 孔,实验重复 3 次。

对照组: L-DMEM, 10% FBS, 1% 青霉素、链霉素。

成骨诱导组: L-DMEM, 20% 胎牛血清, 1% 青霉素、链霉素, 成骨诱导剂 (10⁻⁸ mol/L 地塞米松, 10 mmol/L β-甘油磷酸钠, 0.05 mmol/L L-抗坏血酸)。

补骨脂素组: MTT 实验结果 (见图 2) 表明

0.01、0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 均对体外培养的 BMSCs 具有促进增殖作用,尤以 10 $\mu\text{mol/L}$ 的作用最为明显,但当浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时出现毒性反应。故后续实验选择 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度。

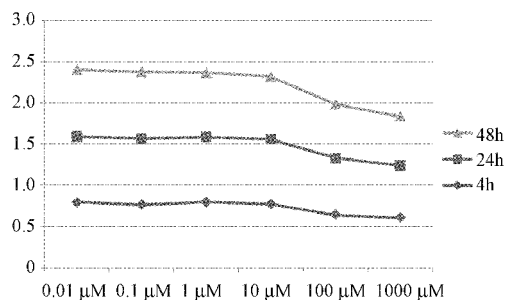


图2 MTT法药物浓度筛选

Fig. 2 Drug concentration screen with MTT method

1.5 碱性磷酸酶染色

诱导第4天取一6孔板,PBS清洗2遍,加入固定液,10 min后加入底物,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴15 min,水洗;再加入苏木精复染10 min,水洗,晾干后镜下观察。

1.6 BMSCs 及其诱导成骨分化中的 lncRNA 表达谱芯片

收集 P2 代 BMSCs, Trizol 一步法提取总 RNA, 用分光光度计定量。取 50~100 μg 总 RNA 用 PEG 方法分离 lncRNA, 用 T4 RNA 连接酶进行荧光标记。然后再用无水乙醇沉淀。将荧光标记后小分子 RNA 溶于 16 μL 杂交液中 (15 % 甲酰胺、0.2 % SDS、3 $\times$ SSC、50 $\times$ Denhardt), 于 42 $^{\circ}\text{C}$ 与 Agilent 大鼠长链非编码 RNA 芯片杂交过夜。杂交结束后, 先在 42 $^{\circ}\text{C}$ 左右在含 0.2 % SDS、2 $\times$ SSC 的液体中漂洗 4 min, 然后在 0.2 $\times$ SSC 液体中室温漂洗 4 min, 甩干。用 Agilent DNA Microarray Scanner (G2505C) 进行扫描。用 Agilent Feature Extraction 软件 (v11.0.1.1) 生成芯片图, 并得到原始数据。

1.7 芯片分析

使用 GeneSpring GX v12.1 软件 (Agilent Technologies) 对数据进行 Quantile 标准化和数据处理。原始数据标准化后经过筛选高质量探针 (某探针在 12 个样品中至少有 3 个被标记为 Present 或 Marginal) 进行进一步分析。两组样品间具有统计学意义的差异表达 lncRNA 或差异表达 mRNA 通过 P-value/FDR 筛选。筛选条件为: FDR 控制在 5 % 以内, Fold change 不低于 2 倍。

1.8 差异性 lncRNAs 的验证

选取高表达的差异 lncRNAs 做 PCR 验证。以

GAPDH 作为看家基因, 差异性 lncRNA 作为目标基因, 与芯片结果进行印证。

1.9 GO 分析和 Pathway 分析

运用 topGo 进行差异 lncRNA 的 GO 分析, 运用 KEGG 等生物软件综合分析长链非编码 RNA 所参与的分子功能和相关信号通路。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用多样本均数比较方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 补骨脂素对 BMSCs 碱性磷酸酶的影响

碱性磷酸酶染色显示补骨脂素组碱性磷酸酶活性较成骨诱导组和对照组明显增强, 见图 3。碱性磷酸酶阳性细胞胞浆呈现浅灰色、灰黑色颗粒沉着, 补骨脂素组较成骨诱导组明显。

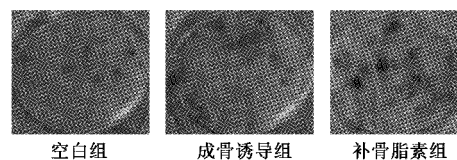


图3 三组细胞碱性磷酸酶染色

Fig.3 ALP staining in cells of the three groups

2.2 lncRNA 芯片

2.2.1 三组细胞 lncRNA 聚类分析 (见图 4): 用 lncRNA 芯片获得大鼠 BMSCs、成骨诱导及补骨脂素干预 21 d 后的 lncRNAs 表达谱。通过各组两两比较, 发现差异倍数 2 倍及以上的共 446 个 lncRNAs。在 BMSCs 成骨分化过程中, 共筛选 5 个 lncRNA 显著上调, 4 个 lncRNA 显著下调 (见表 1)。其中 XR009483 上调最显著, 而 XR007366 下调最显著。

2.2.2 PCR 验证: 选取 2 个差异表达 lncRNA, 引物序列见表 2, 其中 1 个上调 (XR009483)、1 个下调 (XR007366)。Real-time PCR 结果显示, 与对照组比较 XR009483 显著上调 ($P < 0.05$); XR007366 显著下调 ($P < 0.05$), 见表 3。Real-time PCR 验证结果与芯片结果相符。

2.2.3 GO 分析和 Pathway 分析: 经差异分析 (fold change > 2 , $P < 0.001$, $Q < 0.05$) 得到 446 个差异基因。将差异基因分别进行 GO ($P < 0.01$, $FDR < 0.01$) 和 pathway 分析 ($P < 0.05$), 富集得到 351 个 GO term 和 110 条 pathway。表 4 为部分 GO 富集结果, 表 5 为差异最显著的 15 条 pathway。多数为干细胞

成骨分化、骨代谢相关的功能类群,如:间充质干细胞分化、骨骼发育、胶原合成、骨矿化等。pathway 分

析多数为经典信号通路。

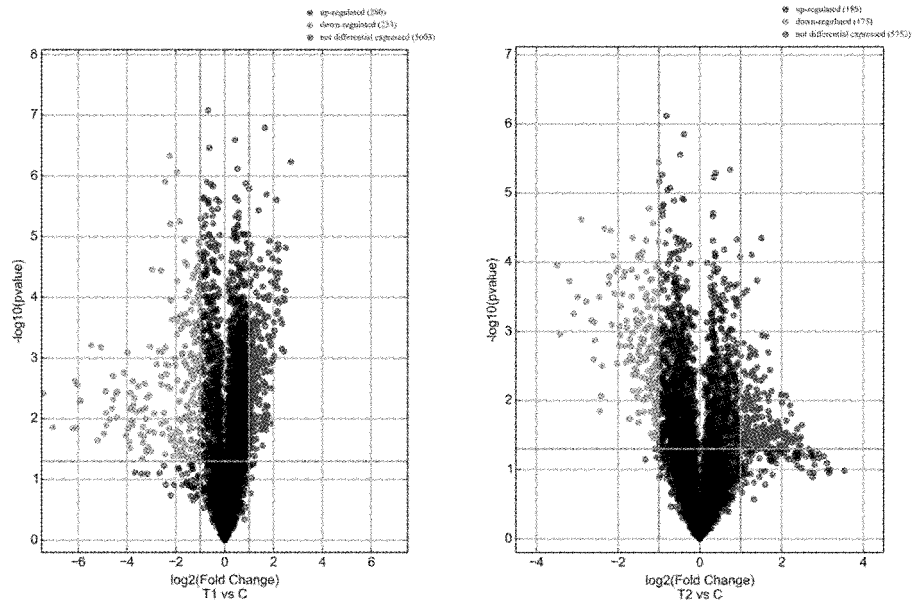


图 4 三组细胞 lncRNA 聚类分析图

Fig.4 Cluster analysis diagram of lncRNA in three groups

表 1 BMSCs 成骨分化差异表达的部分 lncRNA

Table 1 Differential expression of lncRNA in the osteogenic differentiation by BMSCs

Noncoding RNA	P value	Fold Change	Regulation
XR007366	3.13636E-05	15.0105975	down
MRAK149231	0.000450732	13.2746179	down
BC158643	0.000498154	5.6703586	down
MRAK134668	3.86805E-05	4.5393417	down
BC089211	0.000331545	7.1800922	down
MRAK161211	8.41471E-05	8.4400839	down
XR009483	0.00364594	9.2837174	up
BC167759	0.006510463	7.8597101	up
MRAK051693	0.004146963	8.5515873	up
uc.161	0.000487258	7.3579717	up

表 2 lncRNA 引物序列

Table 2 Primer sequences of lncRNA

Name	Primer	Sequence	Size
Rat GAPDH	Forward	5'-GCTCTCTGCTCCTCCCTGTTCTA3'	240 bp
	Reverse	5'-TGGAACCAAGCGTCCGATA3'	
Rat XR009483	Forward	5'-CTGGAAGGATTACGGGGAGT3'	93 bp
	Reverse	5'-CTTCACCAACTTCTCGCTTA3'	
Rat XR007366	Forward	5'-AAGTTCTTGAGCCTACCGATGA3'	59 bp
	Reverse	5'-ATCCTTTCCAGTTCTTGAGTCT3'	

GO 分析结果显示,在生物学进程化 (biological process,BP) 方面,BMSCs 成骨分化过程中持续差异表达 mRNA 基因中有 680 个基因富集于生物学进程,其中富集评分较高的是 mesenchymal development、

表 3 Real-time PCR 检测 BMSCs 成骨分化 lncRNA 的表达水平

Table 3 The expression level of lncRNA in the osteogenic differentiation by BMSCs detected with RT-PCR

lncRNA	对照组	成骨诱导组	补骨脂素组
XR009483	0.170±0.09	0.276±0.05 *	0.693±0.49 *
XR007366	0.239±0.16	0.157±0.03 *	0.104±0.02 *

注:与对照组比较,*P<0.05。

skeletal system development 及 cartilage development 等生物学进程,含有差异表达基因 208 个。在细胞组件 (cellular component,CC) 方面,富集较高的是 extracellular space、extracellular matrix、collagen trimer 等组件,含有差异表达基因 114 个。在分子功能 (molecular function,MF) 方面,BMSCs 成骨分化过程中持续差异表达 mRNA 基因中有 631 个基因富集于分子功能,其中富集评分较高的 collagen biosynthetic process、bone morphogenesis、ossification 及 bone remodeling 等分子功能,含有差异表达基因 158 个。

KEGG 分析结果显示,BMSCs 成骨分化过程中持续差异表达 mRNA 基因中有 427 个基因富集于生物学通路,并主要富集于 15 个生物学通路,其中富集评分较高的是 TGF-beta、Wnt、NF-kappa B 及 Calcium 等生物学通路,含有差异表达基因 143 个。

表 4 部分富集度高的 GO term
Table 4 Highly enriched lncRNAs in GO

GOID	Term	Fisher-P value	FDR	Enrichment Score	genes
GO:0001501	skeletal system development	2.05020188607116e-11	6.85607885379325e-10	10.6882033712908	SULF1/ROR2/CTGF/MMP13/BMP4/MMP16/OSR1/FGFR1/CHSY1/SFRP2/SULF2/CHST11/FGFR2/PDGFR/PRRX1/SIX4/TWIST2/TWIST1/TGFB3/MMP2/PITX1/TIMP1/FGF2/CYR61/GREM1/FST/EPHA2/GDF3/GJA5/MMP9/FBN1/COL3A1/COL1A2
GO:0060485	mesenchyme development	2.01169125935225e-10	5.98394792284669e-09	9.69643867105563	FGFR2/LOXL2/LOXL3/MSX1/TGFB3/SFRP2/VASN/ALDH1A2/CYP26A1/EDN1/EDNRA/FGFR1/PTK7/FGF10/SCX/HES1/PDGFRB/WT1/OSR1/SIX4/BMP4/HAS2
GO:0032964	collagen biosynthetic process	2.04769767968879e-10	6.05758478431014e-09	9.68873416182446	IL6/ADORA2B/PDGFRB/CCL2/BMP4/F2R/TGFB3/IL18/CTGF/SCX/ARG1/SERPINF1/ADAMTS3/COL5A1
GO:0051216	cartilage development	2.83055767298335e-09	6.6650030287534e-08	8.54812799188198	SULF1/ROR2/CTGF/BMP4/SHOX2/OSR1/SCX/FGFR1/CHSY1/SFRP2/SULF2/MSX1/FGF2/CYR61/PRRX2/PITX1/TIMP1/MMP13/EDN1/HOXC4/BMP3/PRRX1/LLM
GO:0001503	ossification	5.22629757295063e-09	1.151726438965e-07	8.28180586621007	SNAT1/GJA1/IGF2/BMP4/CCL3/SHOX2/IL18/MMP2/MMP13/MMP16/SCX/CHSY1/FGFR2/PTGS2/DDR2/GPM6B/TGFB3/OSR1/TNF/ID1/ID3/AREG/FGFR1/ID4/SFRP2/FGF2/BMP3/IGSF10/CTGF/MMP9
GO:0030199	collagen fibril organization	5.79871044529812e-09	1.25888133215666e-07	8.23666857691291	LOX/CYP1B1/LOXL2/SERPINF1/SFRP2/COL14A1/GREM1/SCX/DDR2/LLM/COL3A1/COL1A2/COL5A1
GO:0048863	stem cell differentiation	6.14943756787678e-08	1.12614190018533e-06	7.21116460330383	EFNB1/OV012/EDNRB/KITLG/SNAT1/FGFR2/LOXL2/LOXL3/MSX1/TWIST1/TBX2/GREM1/TGFB3/SFRP2/BMP4/OSR1/HAS2/ASPM/CDH2/TEAD3/PRICKLE1/PDGFR/ADM/HOXA9
GO:0048762	mesenchymal cell differentiation	6.77183214258355e-08	1.21531814185566e-06	7.16929381554438	EFNB1/OV012/EDNRB/KITLG/SNAT1/FGFR2/LOXL2/LOXL3/MSX1/TWIST1/GREM1/TGFB3/SFRP2/VASN/ALDH1A2/CYP26A1/EDN1/EDNRA/FGF10/HES1/BMP4/OSR1/HAS2/FGFR1
GO:0048705	skeletal system morphogenesis	8.42326566755023e-08	1.48691351980624e-06	7.07451950156044	SULF1/ROR2/CTGF/MMP13/BMP4/MMP16/SCX/DDR2/FGFR2/PDGFR/FGF3/CHST11/HOXA9/SHOX2/MMP2/MSX1/GREM1/PDGFRB/ARID5B
GO:0030574	collagen catabolic process	1.38099470960795e-07	2.28075936089853e-06	6.85980798513786	MMP3/MMP13/MMP7/CTSL/CTSK/MRC2/MMP16/MMP2/MMP9
GO:0060349	bone morphogenesis	1.99936980402638e-05	0.000178814070180698	4.69910687121732	MMP13/BMP4/MMP16/SCX/DDR2/SERPINF1/SHOX2/TWIST1/TGFB3/FGFR2/HAS2/CHSY1/SFRP2/CYP26B1/MSX1
GO:0060348	bone development	2.60538720592101e-05	0.000225520976152391	4.58412772384301	MMP13/BMP4/MMP16/SCX/DDR2/SERPINF1/FGFR2/HAS2/CHSY1/SFRP2/CYP26B1/MSX1/SHOX2/TWIST1/TGFB3/GREM1/SULF1/SPARC/SRD5A1/SULF2
GO:0007519	skeletal muscle tissue development	3.7267795031343e-05	0.00030309638738482	4.42866630174706	PITX1/ANKRD1/DMRTA2/SCX/KLF5/BMP4/ERBB2/CAV1/DCN/MEOX2/FOXP1/SIX4/CASQ1/ITCA7
GO:0046849	bone remodeling	0.000386428485212804	0.00242865907258567	3.41293086746677	TGFB3/CTHRC1/CTSK/TNFRSF11B/CD38/VEGFA/GJA1/GREM1/IL6/EFNA4/EPHA2/PTPRV

表 5 部分富集度高的 pathway
Table 5 Highly enriched lncRNAs in the pathway analysis

Pathway ID	Definition	Fisher-P value	FDR	Enrichment Score	genes
rno04380	Osteoclast differentiation	8.578244e-007	8.463867e-005	6.066602	MAPK13/PPARG/TGFB1/TGFB2/TNF
rno04350	TGF-beta signaling pathway	4.416935e-005	8.716085e-004	5.354879	BMP4/CDKN2B/DCN/FST/ID1/ID3/ID4/INHBA/LTBP1/NBL1/SMAD6/SMAD7/TGFB3/TNF
rno04064	NF-kappaB signaling pathway	2.383000e-005	6.878217e-004	4.622876	BCL2/BCL2A1/IL1B/SYK/TICAM2/TLR4/TNF
rno04310	Wnt signaling pathway	2.140839e-002	1.056147e-001	3.66941	APC2/CCND2/DAAM1/LEF1/PLCB2/RAC2/SFRP2/SFRP5/WIF1/WNT6
rno04210	Apoptosis	2.553348e-004	4.723695e-003	3.592890	BCL2/BIRC2/BIRC3/CASP9/CYCT/IKBKG/IL1B/IL1RAP/IL3RA/IRAK2/PIK3CB/PIK3CD/PRKACB/TNF
rno04620	Toll-like receptor signaling pathway	4.951890e-004	6.662542e-003	3.305229	CCL4/CD80/CD86/IKBKG/IL12B/IL1B/IRF5/LY96/MAP3K8/MAPK13/PIK3CB/PIK3CD/TICAM2/TLR4/TNF
rno05323	Rheumatoid arthritis	1.039301e-010	3.076331e-008	3.983259	ATP6V1E2/CCL2/CCL3/CCL5/CXCL12/IL18/IL1A/IL1B/IL6/MMP3/TGFB3/TLR2/TNF/TNFSF13B/VEGFA

续表 5 部分富集度高的 pathway

Continued table 5 Highly enriched lncRNAs in the pathway analysis

Pathway ID	Definition	Fisher-P value	FDR	Enrichment Score	genes
rno04668	TNF signaling pathway	2. 886393e-006	7. 767020e-005	3. 539645	BCL3/CCL2/CCL20/CCL5/CX3CL1/CXCL1/CXCL10/CXCL2/EDN1/IL1B/IL6/MMP3/MMP9/PTGS2/TNF/VCAM1
rno04978	Mineral absorption	5. 485379e-004	5. 237652e-003	3. 260793	ATP1A3/ATP2B1/CYBRD1/SLC11A1/SLC11A2/SLC26A6/SLC30A1/SLC6A19
rno04020	Calcium signaling pathway	3. 054941e-003	2. 825820e-002	2. 514997	ADCY4/ADORA2A/ADRB2/ATP2A3/ATP2B1/ATP2B2/GNA15/ITPKB/PLCB2/PLCG2/PTAFR
rno04550	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	4. 831872e-002	1. 932749e-001	2. 315885	APC2/DUSP9/ID2/ID4/MAPK12/MAPK13/PIK3CB/PIK3CD/WNT6

3 讨论

骨创伤、骨坏死、骨质疏松、骨肿瘤等引起的骨缺损修复一直是骨科领域的难题,随着骨组织工程技术的发展,以生物材料与种子细胞的活体移植为代表的组织工程骨修复骨缺损成为一种全新的治疗模式并日益得到广泛关注。骨髓间充质干细胞(BMSCs)具有强大的自我增殖能力以及多向分化潜能,能分泌多种生物活性物质,包括细胞因子、生长因子等,具有改善微环境、抑制局部炎症反应等作用,是骨组织工程理想的种子细胞。但 BMSCs 的成骨活性受微环境和支架孔隙结构等多因素影响,临床应用受到一定限制。所以,如何维持干细胞的成骨活性成为骨组织工程领域亟待解决的关键问题之一。中医药在“肾主骨”理论指导下应用补肾药物调节干细胞微环境诱导 BMSCs 的成骨分化,可以增强 BMSCs 作为种子细胞的成骨活性。补骨脂是常用的补肾壮骨类中药,我们前期研究^[3]发现补骨脂素明显上调 β -catenin、Runx2 基因的表达水平,多项研究^[4-5]表明补肾中药补骨脂的有效组分补骨脂素具有较强的成骨作用,可以介导 Wnt/ β -catenin 及 BMP/Smad 信号通路诱导 BMSCs 成骨分化,是理想的骨组织工程种子细胞成骨分化诱导剂。

长链非编码 RNA 在 BMSCs 成骨分化中的研究日渐增多。已有的研究表明 lncRNA 对干细胞的自我更新和多向分化起到重要的调控作用。如 Takeda 等^[6]研究发现骨形态发生蛋白 2(BMP2)在诱导间充质干细胞成骨分化过程中,lncRNA-BORG 表达显著上调,说明 lncRNA-BORG 参与间充质干细胞的成骨分化。Zhu 等^[7]发现 lncRNA-ANCR 与 EZH2 相互作用后下调 Runx2 的表达,从而抑制间充质干细胞的成骨分化。Zuo 等^[8]研究鼠间充质干

细胞在早期成骨分化过程中 lncRNA 的表达谱特征,发现 BMP2 处理组与对照组相比,有 116 个 lncRNA 差异表达。孙翔等^[9]利用 Agilent lncRNA 芯片筛选出成骨分化前后差异表达的 lncRNA,对 lncRNA 邻近蛋白编码基因分析表明部分 lncRNA (如 lncRNA ENST0000058553 7.1 和 lncRNA eHIT00001595) 可能在 hMSCs 成骨分化过程中发挥重要作用。罗嘉全等^[10]研究发现 lncRNA -AK096529 和 uc003ups 可能通过正向调控 Smurf1,减少 Runx2 的降解,从而促进 hMSCs 的成骨分化。Liao 等^[11]研究发现 lncRNAH19 可以促进间充质干细胞成骨分化。证明了 lncRNA 在 BMSCs 成骨分化过程中发挥着重要的调节作用。但有关 lncRNA 在中药调控 BMSCs 成骨分化中的机制研究仍然较少。已有的研究仅表明罗汉果苷 V 可通过促进 lncRNA TUG1 表达刺激成骨细胞的增殖与分化^[12]。钟梅^[13]通过分析 lnc RNA 在淫羊藿苷(Icariin, ICA)诱导人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs)成骨分化前后的差异性表达,筛选出与成骨分化密切相关的 lncRNA-p16340 和 lnc RNA-p21662,它们随着成骨诱导时间的增加,其表达逐渐成上升趋势,提示可能与成骨分化的调控密切相关。并无文献报道 lncRNA 在中药调控 BMSCs 成骨分化中的机制研究。

本研究在前期针对补骨脂素诱导成骨过程中基因甲基化、组蛋白乙酰化等表观遗传机制研究的基础上,通过芯片及生物信息学技术发现在补骨脂诱导 BMSCs 成骨过程中 446 个差异表达的 lncRNA,通过聚类分析及 GO 分析和 Pathway 分析共发现 10 个成骨相关的模块及其 mRNA 和 15 条信号通路。可以作为补骨脂素诱导 BMSCs 成骨的潜在靶点。其中,与成骨相关的差异表达 lncRNA 是后续研究

的重点。结合上述 GO 分析和 Pathway 分析结果,与 BMSCs 成骨分化相关的 TGF- β 、Wnt、NF- κ B、Toll 样受体信号通路及钙代谢、矿物质吸收、凋亡、骨重塑等相关的信号分子。从中选择相关的 mRNA 和信号通路作为 lncRNA 表观调控机制的切入点,进一步阐明补骨脂素诱导 BMSCs 成骨分化的作用机制。

芯片及生物学信息分析结果为寻找促进 BMSCs 成骨分化的表观遗传调控途径提供了基础,后续还需要设计过表达及沉默 LncRNA 持续观察转染后的间充质干细胞增殖分化的情况,PH 以此来鉴定该 LncRNA 是否能够影响成骨细胞的分化。并在此基础上明确中药及其有效成分的作用靶点,提高 BMSCs 成骨分化能力,为促成骨中药的研发提供新的思路。

【参 考 文 献】

- [1] 杨锋,潘乐,马秋涛等.左归丸对骨髓间充质干细胞成骨分化相关基因甲基化的影响[J].中医杂志,2015,56(15):1326-1329.
- [2] Huo S, Zhou Y, He X, et al. Insight into the role of long non-coding RNAs during osteogenesis in mesenchymal stem cells[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2018, 13(1): 52-59.
- [3] Tang Dezhi, Yang Feng, Yang Zhou, et al. Psoralen stimulates osteoblast differentiation through Activation of BMP signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 405(2): 256-261.
- [4] Zheng Wenwei, Lin Pingdong, Ma Yuhuan, et al. Psoralen promotes the expression of cyclin D1 in chondrocytes via the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2017, 40: 1377-1384.
- [5] 肖亚平,曾杰,焦琳娜,等.补肾中药对骨质疏松症的治疗及其信号通路调节作用的研究进展[J].中国中药杂志,2018,43(1):21-29.
- [6] Takeda K, Ichijo H, Fujii M, et al. Identification of a novel bone morphogenetic protein-responsive gene that may function as a noncoding RNA [J]. J Biol Chem, 1998, 273(27): 17079-17085.
- [7] Zhu L, Xu F. Downregulated lncRNA-ANCR promotes osteoblast PH differentiation by targeting EZH2 and regulating Runx2 expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 432(4): 612-617.
- [8] Zuo C, Wang Z, Lu H, et al. Expression profiling of lncRNAs in C3H10T1/2 mesenchymal stem cells undergoing early osteoblast differentiation[J]. Mol Med Rep, 2013, 8(2): 463-467.
- [9] 孙翔,赵建江,贾搏,等.人骨髓间充质干细胞成骨分化相关的长链非编码 RNA 表达谱特征[J].广东医学,2015,36(9):1309-1313.
- [10] 罗嘉全,黄路,刘会文,等.hMSC 成骨分化相关 lncRNA 的筛选和初步鉴定[J].中山大学学报,2014,35(2):230-236.
- [11] Liao JY, Yu XY, Hu X, et al. lncRNA H19 mediates BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) through Notch signaling [J]. Oncotarget, 2017, 8: 53581-53601.
- [12] 姚顺晗,韦华成,覃家港,等.罗汉果苷 V 促进 lncRNA TUG1 表达刺激成骨细胞的增殖与分化[J].中国组织工程研究,2020,24(26):4129-4134.
- [13] 钟梅.淫羊藿苷诱导人牙周膜干细胞成骨分化的长链非编码 RNA 表达谱分析[D].兰州:兰州大学,2016.

(收稿日期:2020-03-17;修回日期:2020-07-23)