

· 基础研究 ·

大鼠骨质疏松模型的建立及其骨髓间充质干细胞内差异lncRNA初步分析

刘易昕, 何强, 张大鹏, 严坤, 姚年伟, 钱卫庆*

南京中医药大学附属南京中医院骨伤科, 江苏 南京 210000

[摘要] 目的:分析骨质疏松模型大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)内差异长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)及相关功能。方法:SD大鼠分为骨质疏松模型组和对照组,每组6只,用切除卵巢的方法制备骨质疏松模型,通过双能X线骨密度检测仪测定两组大鼠手术前及3个月后的骨密度。取SD大鼠股骨内骨髓体外培养BMSC,利用基因芯片技术检测骨质疏松模型组(3只)和对照组(3只)大鼠BMSC内lncRNA的表达差异,通过GO功能分析及KEGG通路富集,分析差异lncRNA的生物学功能及相关信号通路。结果:骨质疏松模型组SD大鼠骨密度 $[(157.33 \pm 6.28) \text{mg}/\text{cm}^2]$,较对照组 $[(183.33 \pm 4.50) \text{mg}/\text{cm}^2]$ 显著降低。两组大鼠BMSC内检测出基因片段共计32 759个,差异有统计学意义的有8 454个($P < 0.05$),其中上调3 593个,下调4 861个。检测到的lncRNA基因片段4 992个,差异有统计学意义的共116个($P < 0.05$),其中上调35个,下调81个。差异lncRNA主要参与细胞生长发育生物学过程,并调控蛋白的转运通路。结论:骨质疏松模型大鼠的BMSC内lncRNA表达和正常大鼠存在差异,差异表达的lncRNA参与对BMSC生长发育过程及蛋白转运通路的调控。

[关键词] 骨质疏松;骨髓间充质干细胞;lncRNA;基因芯片**[中图分类号]** R681**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2022)01-030-06**doi:** 10.7655/NYDXBNS20220105

Establishment of rat osteoporosis model and preliminary analysis of the differences of lncRNA in BMSC cells of model rats

LIU Yixin, HE Qiang, ZHANG Dapeng, YAN Kun, YAO Nianwei, QIAN Weiqing*

Department of Orthopedic Surgery, Nanjing TCM Hospital Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210000, China

[Abstract] **Objective:** To analyze the differences of lncRNA in cultured bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in osteoporotic model rats and the functions of the lncRNA. **Methods:** Twelve SD rats were equally divided into the osteoporosis model group and the control group. The osteoporosis model was made by ovariectomy. Bone mineral density (BMD) in ovariectomized rats and sham control were determined by dual-energy X-ray bone mineral density detector. BMSCs from femur bone marrow were cultured *in vitro*. The different expression of lncRNA in BMSCs of osteoporosis model ($n=3$) and control group ($n=3$) was detected by gene chip technology, and the different biological functions of lncRNA and related signaling pathway were analyzed by GO function analysis and the KEGG enrichment. **Results:** BMD in osteoporosis model rats $[(157.33 \pm 6.28) \text{mg}/\text{cm}^2]$, was lower than the control group rats $[(183.33 \pm 4.50) \text{mg}/\text{cm}^2]$ significantly ($P < 0.05$). A total of 32 759 gene fragments were detected in BMSCs in the osteoporosis model group and the control group, and 8 454 lncRNA gene fragments had significant difference ($P < 0.05$), among which 3 593 were up-regulated and 4 861 were down-regulated in osteoporosis model group. Totally 4 992 lncRNA gene fragments were detected, and there were significant differences in 116 lncRNA gene fragments in BMSCs of osteoporosis model rats, with 35 increased and 81 decreased. Differential lncRNAs are mainly involved in the biological process of cell growth and development, and regulate protein transport pathways. **Conclusion:** There were differences in the expression of lncRNA in BMSCs between osteoporosis model rats and normal rats,

[基金项目] 南京市医学科技发展项目(YKK17155)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: fsyy00274@njucm.edu.cn

and the differentially expressed lncRNA involved in the regulation of BMSCs growth and development process or protein transport pathway.

[Key words] osteoporosis; bone marrow mesenchymal stem cell; lncRNA; gene chip

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(01): 030-034, 046]

骨质疏松是全世界范围内的健康难题,其发病与成骨、破骨代谢之间的失衡有关。促进骨形成、探究其相关分子生物学机制,对防治骨质疏松具有重大意义。骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cell, BMSC)是一类具有自我更新和多向分化潜能的细胞群,在体内不同环境下可分化为成骨细胞、软骨细胞以及脂肪细胞,其分化去向在全身的骨代谢中起到了重要作用^[1],外部因素及其信号处理过程如何调控BMSC分化去向是当前研究的热点。长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)是高度结构化的RNA转录本,长度超过200个核苷酸,不直接参与蛋白的翻译过程^[2]。起初认为lncRNA不具备生物学功能,近来研究发现lncRNA可广泛参与基因的表达调控,调节细胞的增殖、分化、凋亡,并与个体的生长发育相关^[2]。研究表明,lncRNA在基因水平对BMSC的调控起重要作用,参与BMSC分化调控过程中复杂的信号通路,从而间接调控骨质疏松疾病的发生和发展^[3-6],但具体调节机制仍不明确。本研究拟通过制备卵巢切除骨质疏松模型,并培养骨质疏松模型大鼠的BMSC,对细胞内lncRNA进行检测,对比研究相关差异lncRNA基因的生物学功能及参与的相关信号通路,为后期进一步的验证及功能研究提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

选取雌性SD大鼠12只,体重(250±10)g,由南京医科大学实验动物中心提供。所有实验均通过南京市中医院伦理委员会批准同意。12只SD大鼠分为对照组和骨质疏松组,每组6只。骨质疏松组采用切除卵巢的方法制作模型,对照组仅采用腹部切开不作卵巢切除,均饲养3个月。3个月后每组取3只SD大鼠的BMSC用于基因芯片检测。

1.2 方法

1.2.1 SD大鼠卵巢切除骨质疏松模型建立

根据文献方法制作SD大鼠骨质疏松模型^[7],采用10%水合氯醛以1 mL/250 g的剂量腹腔内注射麻醉,待麻醉满意后大鼠腹部剪毛,采用碘伏进行局

部皮肤消毒,沿着腹部中线中下部正中作2 cm长切口,将皮肤牵开,切开腹膜,进入腹腔,沿双侧子宫外上角的输卵管找到卵巢,丝线结扎卵巢蒂部,切除大鼠卵巢并取出,缝合腹膜和皮肤切口。对照组SD大鼠仅切开腹部后沿着输卵管显露卵巢,但不作卵巢切除,缝合腹膜及皮肤。

1.2.2 骨密度(bone mineral density, BMD)检测

根据实验设计,在实验开始时和饲养3个月 after 分别检测SD大鼠的骨密度并进行比较。采用10%水合氯醛以1 mL/250 g剂量腹腔内注射麻醉,待麻醉满意后,将其四肢展开俯卧于双能X线吸收测量仪(GE公司,美国)平台上,通过小动物软件测定系统测定各组小鼠全身骨骼的骨密度。

1.2.3 BMSC的分离提取、培养及鉴定

饲养3个月后的SD大鼠,根据文献介绍方法^[8],取大鼠右侧股骨干,无菌条件下沿两侧干骺端剪断,暴露骨髓腔,并以1 mL无菌注射器吸取培养基反复冲洗,直至流出的液体变为清亮并且骨的颜色发白;用移液器将含有小鼠骨髓液的培养基转移至15 mL离心管,轻柔吹打,去除残渣,经离心、重悬后以 1×10^6 个/瓶的浓度接种于培养皿内,置于培养箱中,每隔2 d更换1次培养液,待细胞融合约80%~90%时进行传代操作。选取第3代BMSC,常规消化并制备细胞悬液,1 000 r/min室温离心5 min后PBS缓冲液重悬细胞,并调整浓度 5×10^6 个/mL加入流式细胞管,在避光条件下按说明书每管分别加入荧光标记的CD45、CD90抗体,4 °C避光孵育1 h,对细胞进行1 000 r/min室温离心5 min后PBS洗涤3次,将细胞重悬于加入约1 mL PBS缓冲液,运用流式细胞仪检测并计算阳性细胞的比例,结果显示CD45⁺细胞比例<1%,而CD90⁺细胞比例>95%。

1.2.4 基因芯片检测差异lncRNA

根据实验设计,取饲养3个月后的骨质疏松模型组大鼠3只和对照组大鼠3只,培养其BMSC,利用基因芯片技术检测BMSC内差异lncRNA。

在Illumina TruSeq™ RNA样品准备试剂盒使用说明指导下进行RNA提取及文库的制备,最后进行PCR富集得到最终的cDNA文库。利用Trimmo-

matic(v0.32)进行基因数据质量过滤,保留基因质量在20以上的碱基。基因差异表达的计量数据为基因表达水平分析中得到的readcount数据。采用deseq进行分析,采用Quantile的Normalization方法,选取 $P < 0.05$ 、差异倍数 >2 即 $\log_2FCI > 1$ 的基因作为差异表达的基因列出。

1.2.5 GO功能和KEGG信号通路富集度分析

通过GO分类号和GO数据库相关分析工具将分类与具体基因联系起来,对基因的功能进行描述,通过分析明确差异基因主要参与的生物功能。对差异表达lncRNA的共表达靶基因mRNA做KEGG信号通路富集分析,判定差异基因主要影响的生物学功能或者信号通路。

1.3 统计学方法

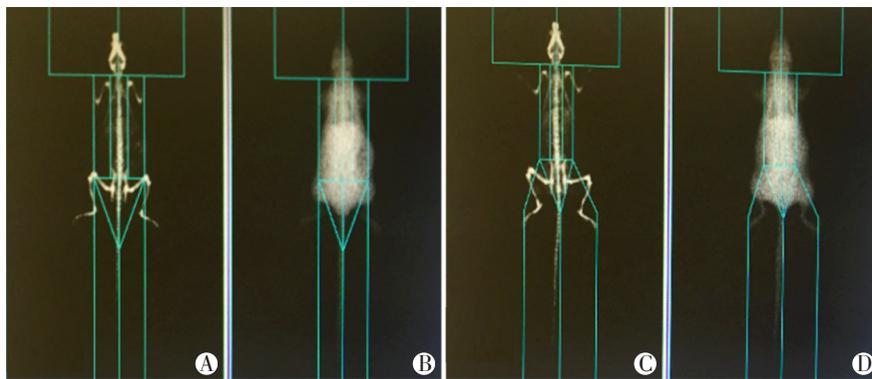
采用SPSS22.0统计学软件包进行数据分析,所

有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用Shapiro-Wilk法检验数据是否服从正态分布,对符合正态分布的计量资料,两组数据比较采用 t 检验,多组数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠骨密度变化

所有12只大鼠均顺利完成手术并饲养3个月。骨质疏松模型组和对照组SD大鼠术前骨密度差异无统计学意义[(182.33 \pm 4.50)mg/cm² vs. (184.17 \pm 4.49)mg/cm², $P > 0.05$];骨质疏松模型组SD大鼠3个月后骨密度为较对照组大鼠显著降低[(157.33 \pm 6.28)mg/cm² vs. (183.33 \pm 4.50)mg/cm², $P < 0.05$],同时较切除卵巢前显著降低($P < 0.05$,图1)。



A:骨质疏松模型组大鼠骨骼影像;B:骨质疏松模型组大鼠大体影像;C:对照组大鼠骨骼影像;D:对照组大鼠大体影像。

图1 SD大鼠骨密度检测

Figure 1 Bone mineral density of SD rats

2.2 大鼠BMSC内lncRNA的差异表达

骨质疏松模型组和对照组SD大鼠BMSC内检测出基因片段共计32 759个,差异有统计学意义($P < 0.05$)的有8 454个,其中上调3 593个,下调4 861个。检测到的lncRNA基因片段共4 992个,按照 $\log_2FCI > 1$ 、 $P < 0.05$ 的评价标准,骨质疏松模型组和对照组大鼠BMSC内共116个lncRNA差异有统计学意义($P < 0.05$),占有lncRNA基因的2.3%,其中上调35个,下调81个。聚类热图和火山图分析结果提示差异谱结果可靠(图2)。

2.3 差异lncRNA高级分析结果

通过高级分析最终筛选出18个lncRNA差异具有统计学意义($P < 0.05$),其 \log_2FCI 值均在6以上,其中上调的基因数为3个,占总数的16.7%,下调的基因个数为15个,占总数的83.3%。通过“cis”调控

机制来预测差异lncRNA的靶基因4 532个,上述 \log_2FCI 值均在6以上的18个lncRNA的预测下游mRNA基因见表1。

对基因芯片技术检测到的差异基因、同时又被预测为差异lncRNA可能调控靶标的编码基因,取交集共计273个基因进行GO分析、KEGG信号通路富集度分析(图3)。根据GO功能分析,生物学过程(BP)中基因分布前5位的分别是发育过程(GO:0032502)、细胞生长(GO:0001558),解剖结构的发育(GO:0048856)、刺激反应(GO:0048583)和细胞蛋白代谢过程(GO:0032268)。细胞成分(CC)方面,显著差异lncRNA主要存在于异染色质、与膜相连的细胞器、核内腔、激活素A复合体内。

差异lncRNA主要富集的KEGG信号通路,前5个信号通路分别是:蛋白的转运通路、味觉的传导

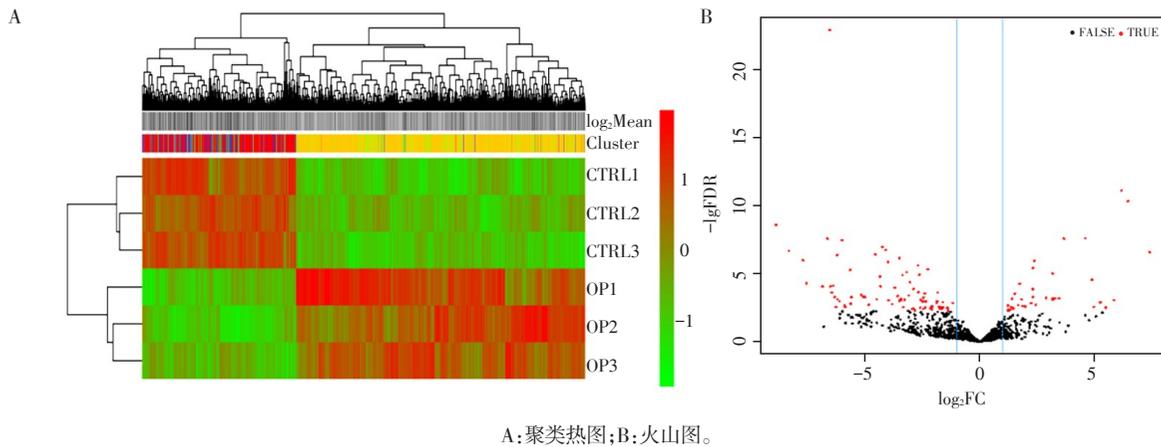


图2 SD大鼠BMSC内的lncRNA表达情况
Figure 2 LncRNA expression in BMSC of SD rats

表1 表达显著差异的lncRNA列表及预测的靶向基因

Table 1 List of significantly differentially expressed lncRNA and predicted target genes

基因号	log ₂ FC	P值	调整的P值	靶基因
XLOC_051633	7.398	2.64×10 ⁻⁷	2.44×10 ⁻⁵	ENSRNOG00000014928
XLOC_021214	6.453	4.58×10 ⁻¹¹	1.70×10 ⁻⁸	ENSRNOG00000014320
XLOC_040901	6.176	7.73×10 ⁻¹²	4.29×10 ⁻⁹	ENSRNOG00000014928
XLOC_041384	-8.866	2.61×10 ⁻⁹	7.24×10 ⁻⁷	ENSRNOG00000016408
XLOC_036673	-8.304	2.05×10 ⁻⁷	2.07×10 ⁻⁵	ENSRNOG00000016585
XLOC_044981	-7.688	1.05×10 ⁻⁶	7.27×10 ⁻⁵	ENSRNOG00000016408
XLOC_014552	-7.534	5.18×10 ⁻⁵	1.92×10 ⁻³	ENSRNOG00000017158
XLOC_029921	-6.845	8.77×10 ⁻⁵	2.79×10 ⁻³	ENSRNOG00000016408
XLOC_052485	-6.629	2.59×10 ⁻⁸	4.18×10 ⁻⁶	ENSRNOG00000013867
XLOC_003345	-6.532	1.17×10 ⁻²³	1.30×10 ⁻²⁰	ENSRNOG00000013257
XLOC_056201	-6.496	8.75×10 ⁻⁵	2.79×10 ⁻³	ENSRNOG00000014031
XLOC_001256	-6.433	2.39×10 ⁻⁴	6.64×10 ⁻³	ENSRNOG00000015220
XLOC_059044	-6.375	7.69×10 ⁻⁵	2.67×10 ⁻³	ENSRNOG00000015239
XLOC_048052	-6.307	5.13×10 ⁻⁴	1.15×10 ⁻²	ENSRNOG00000015440
XLOC_040374	-6.253	2.87×10 ⁻³	3.35×10 ⁻²	ENSRNOG00000017036
XLOC_041383	-6.209	4.36×10 ⁻⁷	3.46×10 ⁻⁵	ENSRNOG00000016963
XLOC_001253	-6.195	7.89×10 ⁻⁴	1.39×10 ⁻²	ENSRNOG00000016585
XLOC_037537	-6.094	1.04×10 ⁻³	1.62×10 ⁻²	ENSRNOG00000016351

通路、核黄素的新陈代谢通路、泛酸盐和辅酶A的生物合成通路与扩张型心肌病相关通路,这些通路可能间接调控骨质疏松的病理生理过程。

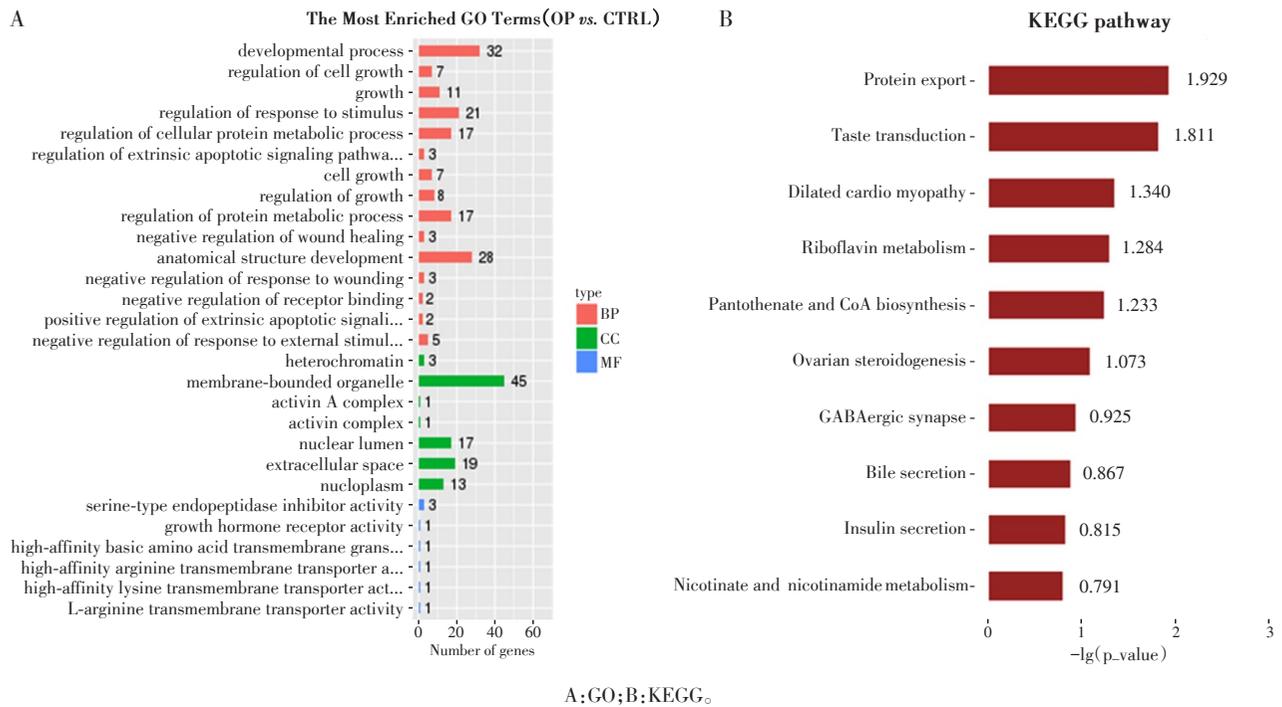
3 讨论

随着社会老年化人口的增加,骨质疏松的发病率越来越高,其发病可以归因于不平衡的成骨和破骨过程,但是其更详细的发病机制尚不清楚。卵巢切除是制作骨质疏松模型的方法之一^[7]。通过对卵巢切除骨质疏松模型与正常大鼠的骨密度结果对

比发现,卵巢切除3个月后,SD大鼠的骨密度显著降低,进一步说明骨质疏松模型制作成功。

BMSC是成骨细胞、破骨细胞和脂肪细胞等的前体干细胞,其向不同方向分化对成骨形成和破骨吸收平衡作用至关重要^[1]。抑制BMSC成脂、破骨分化,促进其成骨分化,纠正骨代谢失衡是治疗骨质疏松的研究方向之一^[9-10]。在骨质疏松的发病过程中,lncRNA参与了细胞增殖、凋亡和炎症反应的调控,lncRNA在骨质疏松中的具体作用机制尚不明确^[11]。

lncRNA对BMSC的成骨分化发挥重要作用。



A:GO;B:KEGG。
图3 差异lncRNA 相关分析
Figure 3 Results of differential lncRNA advanced analysis

通过对人 BMSC 的研究发现, 下调 lncRNA ENST00000502125.2 可导致 BMSC 内的碱性磷酸酶染色强度明显增强, 染色结节的数也显著增多, 表明细胞向成骨性细胞分化^[5]。lncRNA H19 在 BMSC 成骨分化过程中表达显著, miR-140-5p 表达显著降低, 功能分析显示 lncRNA H19 过度表达可抑制 miR-140-5p 表达, 加速成骨 BMSC 分化, 而 lncRNA H19 缺失则抑制了 BMSC 的成骨分化过程, lncRNA H19 可调控 BMSC 分化过程^[3]。同样, lncRNA MEG3 的下调能显著抑制 BMSC 的成骨能力, 其过表达则能提高 BMSC 的成骨能力, 其对成骨分化的调节作用可能是通过激活骨形态发生蛋白 4(BMP-4)来实现的^[6]。

本研究中, 在骨质疏松模型大鼠 BMSC 内有 116 个 lncRNA 的表达差异具有统计学意义, 占有 lncRNA 基因的 2.3%, 其中上调的 lncRNA 35 个, 下调 81 个。根据 GO 功能分析, 这些差异 lncRNA 主要参与细胞生长发育、解剖结构发育的调控、对应激反应的调节、对细胞蛋白代谢过程的调控。差异 lncRNA 主要富集的 KEGG 信号通路包括蛋白的转运通路、味觉的传导通路、核黄素的新陈代谢通路、泛酸盐和辅酶 A 的生物合成通路与扩张型心肌病相关通路, 这些通路可能间接调控骨质疏松的病理过程, 本研究结果可为后续动物体内体外实验、临床

试验等进一步探索并验证 lncRNA 对骨质疏松发病的影响提供基础。

[参考文献]

- [1] MATIC I, ANTUNOVIC M, BRKIC S, et al. Expression of OCT-4 and SOX-2 in bone marrow-derived human mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation [J]. Open Access Maced J Med Sci, 2016, 4(1): 9-16
- [2] CHEN L L. Linking long noncoding RNA localization and function[J]. Trends Biochem Sci, 2016, 41(9): 761-772
- [3] BI H, WANG D, LIU X, et al. Long non-coding RNA H19 promotes osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by regulating microRNA -140-5p/SATB2 axis[J]. J Biosci, 2020, 45:56
- [4] JIN C, JIA L, HUANG Y, et al. Inhibition of lncRNA MIR31HG promotes osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells [J]. Stem Cells, 2016, 34(11):2707-2720
- [5] QIU X, JIA B, SUN X, et al. The critical role of long non-coding RNA in osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Biomed Res Int, 2017, 2017:5045827
- [6] ZHUANG W Z, GE X E, YANG S J, et al. Upregulation of lncRNA MEG3 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients

(下转第 46 页)

automated immature granulocyte counts for assessing disease severity of patients with sepsis [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2008, 38(3):241-246

[7] RELLO J, VALENZUELA-SÁNCHEZ F, RUIZ-RODRIGUEZ M, et al. Sepsis: a review of advances in management[J]. *Adv Ther*, 2017, 34(11):2393-2411

[8] FAIX J D. Biomarkers of Sepsis[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2013, 50(1):23-36

[9] PRIORI R, COLAFRANCESCO S, ALESSANDRI C, et al. Interleukin 18: a biomarker for differential diagnosis between adult-onset Still's disease and Sepsis [J]. *J Rheumatol*, 2014, 41(6):1118-1123

[10] PENG M, NIU D, WANG F, et al. Complement C3 gene: Expression characterization and innate immune response in razor clam *Sinonovacula constricta* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 55:223-232

[11] CARRON P L, CARTIER J C, TRUCHE A S, et al. Complement alternative pathway activation in the course of thrombotic microangiopathy associated with adult-onset Still's disease [J]. *Transfus Apher Sci*, 2013, 49(3):533-534

[12] 郭 珍. 自身免疫性疾病患者血清补体C3检测的临床意义[J]. *中国卫生检验杂志*, 2018, 28(6):762-763, 768

[13] 甘 慧, 杨 军, 孙 萍, 等. 人类补体C3研究进展[J]. *国外医学(临床生物化学与检验学分册)*, 2004(6):519-521

[14] COLAFRANCESCO S, PRIORI R, ALESSANDRI C, et al. IL-18 serum level in adult onset Still's disease: a marker of disease activity [J]. *Int J Inflamm*, 2012, 2012:156890

[15] WILLEMS E, ALKEMA W, KEIZER-GARRITSEN J, et al. Biosynthetic homeostasis and resilience of the complement system in health and infectious disease [J]. *EBio-Medicine*, 2019, 45:303-313

[收稿日期] 2020-08-10
(本文编辑:蒋 莉)

(上接第34页)

by targeting BMP4 transcription[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(6):1985-1997

[7] 张 悦, 李运峰. 骨质疏松症动物模型研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(1):152-156

[8] 李晓峰, 赵劲民, 苏 伟, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的培养与鉴定[J]. *中国组织工程研究*, 2011, 15(10):1721-1725

[9] 王维东, 万博文, 周灵杰, 等. PTH通过Notch信号通路促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(11):1517-1521

[10] 杨显红, 齐新文, 李松军. 遵义医科大学第五附属医院骨二科. 骨髓间充质干细胞治疗骨质疏松性骨折的机制[J]. *医学综述*, 2020, 26(7):1288-1292

[11] 刘莉菲, 周绪昌, 邹 军, 等. 长链非编码RNA对骨质疏松症调控作用的研究进展[J]. *生命科学*, 2019, 31(11):1158-1163

[收稿日期] 2020-11-23
(本文编辑:蒋 莉)