

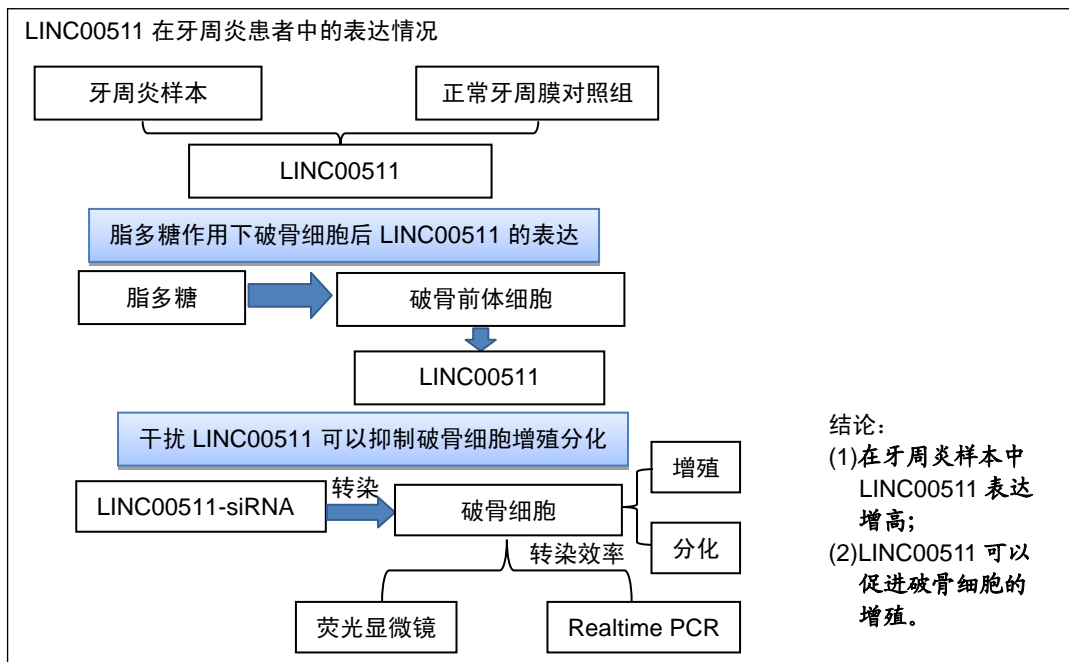
在牙周炎样本中长链非编码RNA LINC00511表达增高并促进破骨细胞增殖

赵祥宇¹, 张桂荣², 郭传波³, 史春⁴, 吴刘中⁵ (沈阳市口腔医院, ¹修复科, ²正畸科, ³口腔颌面外科, ⁵牙周科, 辽宁省沈阳市 110002; ⁴大连医科大学口腔医学院, 辽宁省大连市 116041)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1832

ORCID: 0000-0003-0194-8146(赵祥宇)

文章快速阅读:



赵祥宇, 男, 1981 年生, 辽宁省沈阳市人, 满族, 2010 年中国医科大学毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事口腔修复及种植研究。

通讯作者: 吴刘中, 博士, 副主任医师, 沈阳市口腔医院牙周科, 辽宁省沈阳市 110002

文献标识码:B
稿件接受: 2019-05-23



文题释义:

长链非编码 RNA LINC00511: 定位在 17 号染色体 q24.3 区域, 包含包括 5 个外显子。

破骨细胞: 为多核细胞, 由于破骨细胞本身生存周期较短, 目前对于破骨细胞的培养主要采用破骨前体细胞, 在体外对其进行诱导后形成成熟的破骨细胞。

摘要

背景: LINC00511 是一个较为全新的 Lnc RNA, 研究表明, lincRNA-ANRIL 与牙周病的发生及发展密切相关。

目的: 观察 LINC00511 在牙周炎中的表达情况及对破骨细胞的增殖及分化的影响。

方法: 研究方案经沈阳市口腔医院伦理委员会批准, 参与试验的患病个体及其家属对试验方案完全知情同意。取牙周炎患者及正畸拔牙患者的正常牙周膜组织(对照组), 采用 Realtime PCR 检测牙周炎患者 LINC00511、抗酒石酸酸性磷酸酶及 cathepsin K 的表达; 取第 3 代的破骨前体细胞 RAW264.7 细胞进行破骨细胞诱导并鉴定。将 LINC00511-siRNA 转染破骨细胞, 以未转染的破骨细胞为对照, Realtime PCR 检测转染效率。采用 100 μg/L 的脂多糖作用于 RAW264.7 细胞 0, 24 和 48 h, 检测 LINC00511 的表达; 采用 CCK8 及抗酒石酸酸性磷酸酶检测 LINC00511 对破骨细胞的增殖及分化的影响。

结果与结论: ①人牙周炎样本中 LINC00511、抗酒石酸酸性磷酸酶及 cathepsin K 表达均显著高于对照组; ②脂多糖作用于 RAW264.7 细胞 LINC00511 的表达随着时间增加而增高; ③荧光显微镜观察及 Realtime PCR 检测结果均显示, 与对照组相比, LINC00511-siRNA 转染后细胞 LINC00511 表达显著降低($P < 0.05$); ④LINC00511 促进破骨细胞的增殖及分化; ⑤结果表明, 在牙周炎样本中 LINC00511 表达增高, LINC00511 可以促进破骨细胞的增殖。

关键词:

破骨细胞; 牙周炎; RAW264.7 细胞; 增殖; LINC00511; Lnc RNA

中图分类号: R446; R496; R318

基金资助:

辽宁省自然科学基金(20180550563), 项目负责人: 史春

缩略语:

抗酒石酸酸性磷酸酶: tartrate resistant acid phosphatase, TRAP; 长链非编码 RNA: Long non-coding RNA, Lnc RNA

Zhao Xiangyu, Master, Associate chief physician, Department of Prosthodontics, Stomatology Hospital of Shenyang, Shenyang 110002, Liaoning Province, China

Corresponding author: Wu Liuzhong, MD, Associate chief physician, Department of Periodontology, Stomatology Hospital of Shenyang, Shenyang 110002, Liaoning Province, China

Increased expression of long-chain non-coding RNA LINC00511 in periodontitis promotes osteoclast proliferation

Zhao Xiangyu¹, Zhang Guirong², Guo Chuanbo³, Shi Chun⁴, Wu Liuzhong⁵ (¹Department of Prosthodontics, ²Department of Orthodontics, ³Department of Oral and Maxillofacial Surgery, ⁴Department of Periodontology, Stomatology Hospital of Shenyang, Shenyang 110002, Liaoning Province, China; ⁵Dalian Medical University School of Stomatology, Dalian 116041, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: LINC00511 is a relatively new long-chain non-coding RNA (Lnc RNA). Studies have shown that lincRNA-ANRIL is closely related to the occurrence and development of periodontal disease.

OBJECTIVE: To study the expression of LINC00511 in periodontitis, and to explore LINC00511 effects on osteoblast proliferation and differentiation.

METHODS: The study protocol was approved by the Ethics Committee of Stomatology Hospital of Shenyang. Patients and their relatives were fully informed of study protocol and informed consent was signed prior to the inception of the trial. Periodontal ligament tissues were extracted from patients with periodontitis and patients undergoing orthodontic extraction (control group). The expression of LINC00511, tartrate-resistant acid phosphatase and cathepsin K in periodontitis patients was detected by real-time PCR. The third generation of osteoclast precursor cells RAW264.7 were induced to differentiate into osteoclasts and identified. LINC00511-siRNA was transfected into osteoclasts, and non-transfected osteoclasts were used as control. Transfection efficiency was detected by real-time PCR. RAW264.7 cells were cultured with 100 µg/L lipopolysaccharide for 0, 24, and 48 hours, and the expression of LINC00511 was detected. After LINC00511 transfection, proliferation and differentiation of osteoclasts were detected by cell counting kit-8 and tartrate-resistant acid phosphatase, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: The levels of LINC00511, tartrate-resistant acid phosphatase and cathepsin K in human periodontitis samples were markedly higher than those in the control group. The expression of LINC00511 was time-dependently increased in osteoclasts after lipopolysaccharide treatment. Findings from fluorescence microscopy and real-time PCR showed that the expression of LINC00511 was significantly decreased after LINC00511-siRNA transfection compared with the control group ($P < 0.05$). LINC00511 promoted the proliferation and differentiation of osteoclasts. To conclude, the expression of LINC00511 is increased in periodontitis samples, and LINC00511 can promote the proliferation of osteoclasts.

Key words: osteoclasts; periodontitis; RAW264.7 cells; proliferation; LINC00511; Lnc RNA

Funding: the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20180550563 (to SC)

0 引言 Introduction

牙周炎是口腔内科常见的感染性疾病之一，牙周炎可导致牙槽骨缺损^[1-2]，如果未经治疗，可能会引起全身性疾病，如免疫系统疾病及心血管疾病^[3]。牙周炎是机体对牙周感染物质的免疫应答在牙周组织的局部表现^[4-5]，是一种宿主产生的氧化应激过程，机体组织细胞受到致病菌的侵袭后，将引发一系列炎症反应^[6]。免疫炎症反应长期持续性作用于机体，会发生氧化应激信号传导通路的变化，使骨改建的平衡失调，造成牙周软硬组织的损伤和丧失，当破骨细胞活性大于成骨细胞时，机体表现为骨破坏，当成骨细胞活性大于破骨细胞时，机体表现为骨形成^[7-8]。深入研究牙周病相关的分子机制，可以为牙周病的治疗提供新的可能。由于牙周炎骨改建的平衡失调，成骨细胞的增殖被抑制，且出现了大量的凋亡，造成牙周硬组织的损伤和丧失^[9-10]。研究牙周病相关的分子机制，可以为牙周病的治疗提供新的可能。

长链非编码RNA (Long non-coding RNA, Lnc RNA) 的序列不仅在同一物种上具有进化保守性，还呈现明显的跨物种保守性^[11-13]。Lnc RNA参与转录调控和表观遗传调控，具有多种生物学功能^[12, 14-16]，近年来，对Lnc RNA的研究备受关注。Lnc RNA在牙周病中的作用及相关分子机制报道很少。有研究表明，lincRNA-ANRIL与牙周病的发生及发展密切相关，lincRNA-ANRIL也可以通过NF-κB信号通路调控牙周膜成纤维细胞的炎症反应^[17]。作者在预实验中对于牙周炎的样本进行了Lnc RNA检测，结果显示LINC00511在牙周炎中样本中高表达，所以此次实验选取LINC00511为研究对象，长链非编码RNA LINC00511定位在17号染色体 q24.3区域，包含包括5个外显子^[18-19]。

LINC00511是一个较为全新的Lnc RNA，已有研究报道了其在不同正常组织中的表达情况。目前关于LINC00511的研究主要集中于肿瘤^[20-21]，研究表明，LINC00511可以促进肿瘤细胞的增殖及分化^[22]，其功能在非小细胞肺癌、头颈部鳞癌以及胰腺导管腺癌中表达增高^[23-24]，并且可以促进癌细胞的增殖及迁移侵袭^[25]；也有文献报道指出，LINC00511在人骨肉瘤中表达降低，并且可以抑制人骨肉瘤细胞MG63的增殖及侵袭能力，说明LINC00511可以抑制成骨细胞的增殖能力^[26-27]。那么LINC00511对于破骨细胞的作用及机制如何？LINC00511在骨破坏中的作用如何，目前尚无报道指出。所以文章主要研究LINC00511在牙周炎骨破坏中的功能，并在脂多糖的炎症微环境下检测LINC00511的表达情况，进而采用RNA干扰技术，使LINC00511表达降低，进一步检测LINC00511对于破骨细胞增殖能力及分化的影响，通过以上实验为牙周炎的治疗提供新的靶向基因的实验室依据。

1 对象和方法 Subjects and methods

1.1 设计 牙周炎组织样本实验，细胞学实验。

1.2 时间及地点 于2018年2至12月在沈阳市口腔医院完成。

1.3 对象 2018年2月至6月期间在沈阳市口腔医院就诊牙周炎患者20例及正畸拔牙患者的正常牙周膜组织10例(对照组)。实验方案由沈阳市口腔医院伦理委员会批准，患者对治疗过程及实验方案完全知情同意。所有样本用于检测牙周组织样本中LINC00511的表达情况。

纳入标准^[28]：①正常对照组：没有炎症且患牙需要进行拔除的牙齿；②牙周炎样本：2个或2个以上牙齿探诊深

度(PD)≥ 6 mm, 曲面断层显示出现明显的牙槽骨吸收, 需要进行牙周手术; ③患者在前1个月内未服用非类固醇抗炎药或抗生素。

排除标准: 年龄< 18岁。

1.4 材料 RAW264.7细胞(和元生物); LINC00511(HQ2381)及内参ACT(QCprimer001)引物(吉玛基因); LINC00511-siRNA(吉玛基因); 反转录试剂盒、SYBR® Premix ExTaq™ II、cathepsin K、TRAP及GAPDH引物、XfectRNA转染试剂(TAKARA); RNA提取试剂盒(上海生工); 胎牛血清、DMEM培养基、双抗(Gibco); TRAP检测试剂盒(北京雷根生物科技有限公司)。

1.5 实验方法

1.5.1 样本采取方法 通过牙周手术(牙周翻瓣术、牙龈切除术、磨牙远中楔形瓣切除术)切取牙周袋壁上牙周组织及炎性肉芽组织。

1.5.2 细胞培养及复苏 ①细胞复苏: 在复苏之前打开37 °C水浴箱, 将冻存的RAW264.7细胞从液氮中取出, 迅速放入水浴箱中, 快速摇动使其融化。溶化后的冻存管放置于离心机中离心(800 r/min, 6 min)移至培养皿中, 弃上清后加入1 mL培养基混匀, 置于培养皿后, 37 °C培养箱中培养; ②细胞培养和传代: RAW264.7细胞(1×10⁶)在DMEM高糖培养基中培养, 其含体积分数10%FBS, 1%双抗。细胞在培养箱中培养(37 °C, 体积分数5%CO₂, 90%湿度)。定期换液, 待细胞长到80%时, 0.25%胰酶消化传代。

RAW264.7细胞培养及破骨细胞的诱导和鉴定

细胞来源:	RAW264.7 细胞为和元生物产品
培养基介绍:	DMEM 高糖培养基: 体积分数 10%FBS, 1%双抗
添加材料:	破骨细胞诱导液(RANKL100 μg/L)
培养时间:	将第3代 RAW264.7 细胞培养 24 h, 换液后加入破骨诱导液, 每 2 d 换液 1 次, 培养 7 d
细胞传代:	待细胞长到 80% 时, 0.25% 胰酶消化传代, 取第 3 代细胞进行实验
细胞鉴定:	通过光学显微镜、Real-time PCR 及抗酒石酸酸性磷酸酶染色鉴定破骨细胞诱导成功
伦理学批准情况:	沈阳市口腔医院伦理委员会批准(201901)

1.5.3 破骨细胞诱导 配制破骨细胞诱导液(RANKL 100 μg/L), 将培养至3代的RAW264.7细胞, 细胞培养24 h待细胞贴壁后, 换液后每孔加入破骨诱导液1 mL, 每2 d换液1次。通过光学显微镜、Real-time PCR及抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色鉴定破骨细胞诱导成功。

1.5.4 样本总RNA提取

(1)参考UNIQ-10柱式Trizol提取组织总RNA: ①将液氮中冻存的样本置于研磨钵中迅速研磨; ②加入1 mL Trizol后, 静置20 min, 4 °C, 12 000 r/min, 15 min, 取上清; ③加入200 μL氯仿, 震荡0.5 min, 静置5 min; ④12 000 r/min 4 °C, 离心15 min。取最上层; ⑤加入吸取RNA体积的0.6倍无水乙醇; ⑥上述液体全部加入到吸附

柱中, 静置5 min, 12 000 r/min 4 °C, 离心5 min; ⑦加入500 μL RPE Solution, 静置2 min, 10 000 r/min 4 °C, 离心1 min; ⑧重复上一步骤; ⑨10 000 r/min 4 °C, 离心2 min; ⑩吸附柱置于新的EP管中, 加入30 μL DEPC ddH₂O, 静置5 min, 12 000 r/min, 4 °C, 2 min; ⑪测量所提取的RNA浓度。

(2)去除基因组DNA: ①加入2.0 μL的5xg DNA Eraser Buffer, 1.0 μL的gDNA Eraser, 400 ng的Total RNA, 以补齐到10 μL; ②将上述液体混匀后42 °C, 2 min置于PCR仪去除基因组DNA。

(3)反转录cDNA反应: ①加入2.0 μL的5xg DNA Eraser Buffer, 1.0 μL的gDNA Eraser, 400ng的Total RNA, 以补齐到10 μL, 去除基因组DNA。将上述反应液加入1.0 μL的Prime ScriptRT Enzyme Mix I, 1.0 μL的RT Primer Mix, 4.0 μL的5xPrimeScript Buffer 2, 4.0 μL的RNase Free dH₂O; ②将上述液体混匀后37 °C, 15 min; 85 °C, 5 s置于PCR仪进行反转录cDNA反应。

(4)Real-time qPCR: 按照SYBR® Premix Ex Taq™ II进行实验反应。①加入12.5 μL的SYBR® Premix Ex Taq™ II, 1.0 μL的PCR Forward Primer(10 μmol/L), 1.0 μL的PCR Reverse Primer(10 μmol/L), 2.0 μL的cDNA溶液, 9.5 μL的dH₂O; ②将上述反应液置于Real-time PCR仪, 反应体系为: 95 °C, 30 s; 95 °C, 5 s; 60 °C, 30 s, 共40个循环; 95 °C, 15 s; 60 °C, 30 s; 95 °C, 15 s。检测样本的目的基因与内参的CT值, 采用2^{-ΔΔCT}法来确定目的基因表达相对量, 引物序列见表1。检测LINC00511、TRAP及cathepsin K在牙周炎患者中的表达; 参考文献[29]的方法采用100 μg/L的脂多糖作用于破骨细胞前体细胞RAW264.7细胞0, 24和48 h, 检测LINC00511的表达。

表1 目的基因引物序列

Table 1 Primer sequences of target genes

基因	序列
HQ2381(LINC00511) F	5'-GAC TAC TGT TAC CTC GCT TGG A-3'
HQ2381(LINC00511) R	5'-CTG GCA TGT GAG CAC CTG TA-3'
TRAP F	5'-GGG TCA CTG CCT ACC TGT GT-3'
TRAP R	5'-TCG TTT CTT TGG GGC TTA TCT C-3'
cathepsin K F	5'-CTG TCG GCT GTG GTT CAG T-3'
cathepsin K R	5'-TCC AGG TTA TGG GCA GAG ATT-3'
GAPDH F	5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3'
GAPDH R	5'-TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA-3'

1.5.5 LINC00511-siRNA转染破骨细胞 为进一步分析LINC00511在牙周炎骨破坏中所起的作用, 参考Xfect-RNA转染试剂操作步骤, 提前24 h铺细胞, 使转染时细胞融合度需达到90%。转染试剂(XfectRNA)按配制2个EP管, 分别为Tube 1(RNA)及Tube 2(Transfection Polymer)。其中Tube 1包括5 μL siRNA(LINC00511-siRNA或NC siRNA)和95 μL Xfect反应缓冲液, Tube 2包括10μL XfectsiRNA Polymer和90 μL Xfect反应缓冲液。漩涡混匀各管混合物, 速度漩涡10 s, 室温孵育10 min, 将200 μL复合物逐滴加入细胞培养基中, 8 h后换液, 48 h后通过荧光显微镜、

Real-time PCR检测。通过荧光显微镜及Realtime PCR检测其转染效率。

1.5.6 CCK8细胞增殖试验 将转染LINC00511-siRNA及NC siRNA(对照组)的破骨细胞接种于96孔板中,破骨细胞量为1 000,每孔100 μ L,培养条件为24 h, 37 $^{\circ}$ C,体积分数5%CO₂。孵育0, 24, 48 h。每孔加入CCK8溶液(10 μ L)。培养箱内孵育1 h。酶标仪测定450 nm处的吸光度。检测LINC00511对破骨细胞的增殖影响。

1.5.7 TRAP破骨细胞分化实验 将转染LINC00511-siRNA及NC siRNA(对照组)的破骨细胞接种于96孔板中,破骨细胞量为1 000,每孔100 μ L,培养条件为24 h, 37 $^{\circ}$ C,体积分数5%CO₂。孵育0, 24, 48 h。参考TRAP检测试剂盒(PNP微板法)说明书进行操作。检测LINC00511对破骨细胞的分化的影响

1.6 主要观察指标 ①采用 Realtime PCR 检测 LINC00511、TRAP及cathepsin K在牙周炎患者中的表达;②采用 Realtime PCR 检测脂多糖作用于破骨细胞后 LINC00511的表达;③干扰LINC00511(LINC00511-siRNA)后采用CCK8及TRAP检测LINC00511对破骨细胞的增殖及分化的影响。

1.7 统计学分析 采用SPSS 18.0中方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 参与者数量分析 纳入牙周炎患者20例及正畸拔牙患者10, 试验过程无脱落, 全部进入结果分析。

2.2 两组患者基线资料比较 见表2。

表2 两组患者基线资料比较

Table 2 Baseline data of patients in the two groups

项目	牙周炎组(n=20)	对照组(n=10)	P值
性别(男/女, n)	14/6	4/6	> 0.05
年龄($\bar{x}\pm s$, 岁)	18-53	18-43	> 0.05

2.3 LINC00511在牙周炎患者中的表达情况 结果显示, LINC00511在牙周炎样本中的表达高于正常对照组, 说明LINC00511在牙周炎中表达增高($P < 0.05$)。同时检测了牙周炎的骨破坏标志因子TRAP及cathepsin K, 结果显示在牙周炎样本中, TRAP及cathepsin K表达都增高, 见图1。

2.4 采用Realtime PCR检测脂多糖作用下破骨前体细胞LINC00511的表达 结果显示: 在100 μ g/L的脂多糖作用于破骨前体细胞RAW264.7细胞24 h后, LINC00511表达增高, 随着时间的进展, 在48 h后 LINC00511表达显著高于24 h($P < 0.05$), 见图2。结果说明, 在脂多糖介导的炎症微环境中LINC00511的表达随着时间增高而增高, 其趋势与临床样本结果一致。

2.5 LINC00511-siRNA转染效率的验证 荧光显微镜观察显示, 转染LINC00511-siRNA到破骨细胞, 与对照组相比, LINC00511表达量降低, 见图3。Realtime PCR检测结果显示, 与对照组相比, LINC00511表达显著降低($P < 0.05$), 说明LINC00511-siRNA转染效率较好, 见图4。

2.6 干扰LINC00511可以促进破骨细胞增殖 破骨细胞中转染LINC00511-siRNA后, 通过CCK8实验检测破骨细胞的增殖能力, 结果显示与对照组相比, LINC00511-siRNA组的细胞增殖显著下调($P < 0.05$), 见图5A及表3, 表明LINC00511可以促进破骨细胞的增殖能力。同时通过TRAP检测破骨细胞的分化能力, 结果显示与对照组相比, LINC00511-siRNA组的细胞分化显著下调($P < 0.05$), 见图5B, 表明LINC00511可以促进破骨细胞的分化能力。

表3 干扰LINC00511转染破骨细胞的不同时间的分光光度值 ($\bar{x}\pm s$, n=5, 1/trans)

Table 3 Spectrophotometric values in osteoclasts at different times after interference with LINC00511

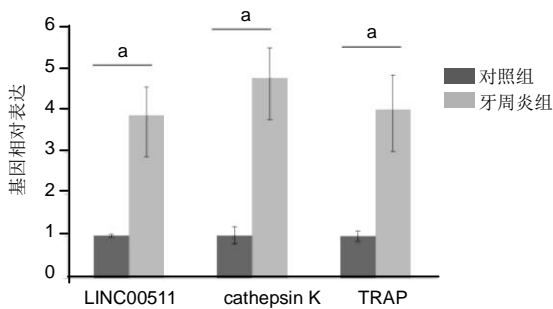
组别	0 h	24 h	48 h
对照组	0.534 \pm 0.01	0.894 \pm 0.021	1.343 \pm 0.05
LINC00511-siRNA组	0.544 \pm 0.03	0.689 \pm 0.032	0.953 \pm 0.034 ^a

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

牙周炎是一种以牙周部位的骨组织破坏为主要临床症状之一的炎症反应疾病^[28-30]。牙周炎的炎症灶内破骨细胞大量增殖, 成骨细胞减少, 导致骨动态平衡失调, 牙槽骨吸收的原因主要是由于其骨组织的丧失, 如果疾病不及时治疗, 患者会出现牙齿脱落^[31]。骨质降解是牙周炎的标志病理症状。一旦受到外来致病菌的侵袭后, 会产生一系列的炎症反应, 激发骨代谢相关的信号通路, 造成了破骨细胞的生成量远远大于成骨细胞, 形成了骨缺损, 牙齿出现脱落。研究表明牙周炎的骨破坏可以被多种因素激活, 包括细胞因子和细菌内毒素如脂多糖, 脂多糖是革兰阴性细菌的细胞膜成分, 在激活炎症和牙周炎骨吸收中起着关键的作用。由于基因治疗的先进性, 目前临床都在寻求牙周炎骨修复治疗的靶向因子, 为牙周炎的骨修复治疗提供新的方法^[32]。

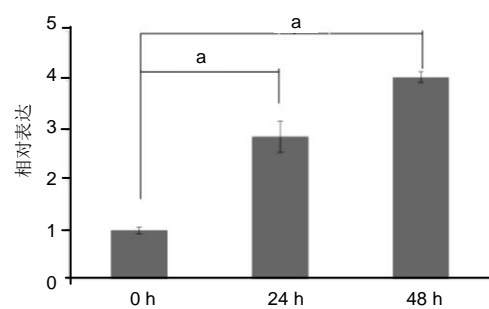
Lnc RNA数量很多, 是一种不能在细胞内翻译出蛋白质的转录物Lnc RNA, Lnc RNA存在相对较长的转录本^[9, 33-36]。在以往的研究中学者主要集中在可以蛋白编码的基因, 而对于Lnc RNA这种非编码基因认为是“垃圾”^[37-38]。其序列不仅在同一物种上具有进化保守性, 还呈现明显的跨物种保守性。Lnc RNA参与转录调控和表观遗传调控, 具有多种生物学功能。近年来, 对Lnc RNA的研究越来越多, Lnc RNA在细胞的增殖、凋亡、侵袭及转移中参与了多种细胞的生物学过程, 与免疫疾病、肿瘤及炎症都存在着密切关系^[39-40]。但是, 研究Lnc RNA在口腔系统疾病中作用的文献依然较少。Lnc RNA在牙周病中的作用及相关分子机制报道很少。作者在预实验中, 通过Lnc RNA芯片分析的方法, 比较牙周病患者与健康对照的临床样本中Lnc RNA的表达水平, 发现牙周病样本中有多种Lnc RNA存在异常表达, 提示Lnc RNA在牙周炎的发生发展过程中发挥重要作用。前期结果显示, 通过Linc芯片筛选出了LINC00511在牙周炎中高表达, 所以此次实验以LINC00511为研究对象。近期研究发现, LINC00511通过结合EZH2抑制p57, 进而促进肿瘤的侵袭及迁移。在此次实验中, 发现LINC00511在牙周炎样本中



图注: LINC00511、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)及 cathepsin K 在牙周炎的表达均显著高于对照组, $^aP < 0.05$ 。

图 1 LINC00511、抗酒石酸酸性磷酸酶及 cathepsin K 在牙周炎的表达

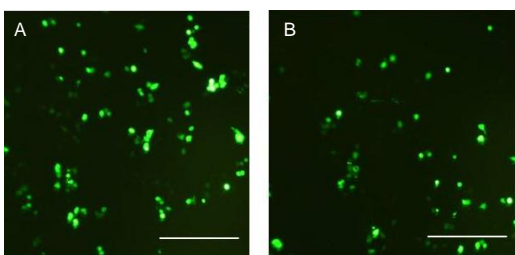
Figure 1 Expression of LINC00511, tartrate-resistant acid phosphatase and cathepsin K in periodontitis patients



图注: 脂多糖作用于 RAW264.7 细胞 LINC00511 的表达随着时间增加而增高, $^aP < 0.05$ 。

图 2 Realtime PCR 检测脂多糖作用后 RAW264.7 细胞 LINC00511 的表达

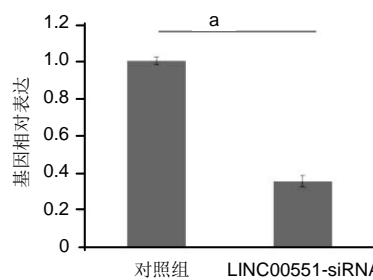
Figure 2 Real-time PCR detection of LINC00511 expression in RAW264.7 cells after treatment with lipopolysaccharide



图注: 图 A 为对照组; B 为 LINC00511-siRNA 组。LINC00511 基因表达量较对照组降低。

图 3 荧光显微镜验证 LINC00511-siRNA 的转染效率(x400)

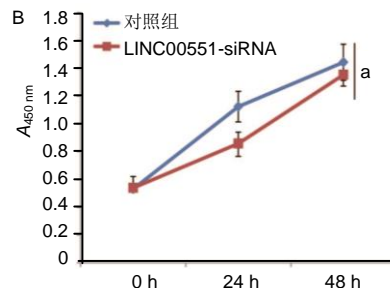
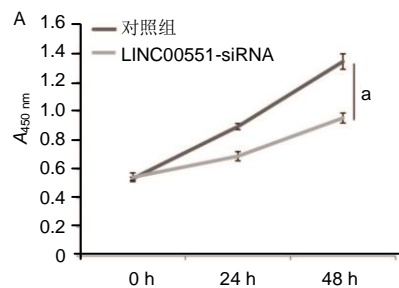
Figure 3 Transfection efficiency of LINC00511-siRNA under fluorescence microscope (x400)



图注: LINC00511 基因表达量较对照组降低 1/3。 $^aP < 0.05$ 。

图 4 LINC00511-siRNA 转染破骨细胞转染效率的验证

Figure 4 Transfection efficiency of LINC00511-siRNA for osteoclasts



图注: 图 A 为检测破骨细胞的增殖能力; B 为检测破骨细胞的分化能力。 $^aP < 0.05$ 。

图 5 干扰 LINC00511 可以抑制破骨细胞增殖及分化能力

Figure 5 Interference with LINC00511 can inhibit osteoclast proliferation and differentiation

表达相对于健康牙周膜表达增高,为了更好的研究 LINC00511 在牙周炎中的作用,采用脂多糖作用于破骨细胞前体细胞 RAW264.7 细胞后,结果发现 LINC00511 的表达也增高,其趋势与临床样本一致。那么 LINC00511 对于破骨细胞的增殖的影响是什么样的呢?通过干扰 LINC00511,将其转染到破骨细胞,结果发现破骨细胞的增殖出现降低,表明 LINC00511 可以促进破骨细胞的增殖。其原因可能是, LINC00511 可以激活 PI3K/Akt 信号通路,进而促进破骨细胞的过度增殖。目前关于 LINC00511 的研究主要集中于肿瘤细胞及骨肉瘤细胞 MG63,结果表明, LINC00511 可以促进肿瘤细胞的增殖、侵袭及转移,机制上来说, LINC00511 结合了一个高度保守的蛋白复合物-组蛋白甲基转移酶 EZH2,通过组蛋白 H3 上的甲基化赖氨酸调节基因表达,作为 EZH2/PRC2 复合体的模块化支架,协调他们的定位、指定靶基因的组蛋白修饰模式,包括 p57,从而改变肿瘤的生物行为^[41-42]。靶向 LINC00511 及其通路可能在治疗恶性肿瘤中有重要意义。也有文献报道指出 LINC00511 会抑制骨肉瘤

细胞 MG63 的增殖,由于 MG63 也是成骨细胞的一种,结合目前的实验结果,所以推测 LINC00511 可以促进破骨细胞的增殖,但是会抑制成骨细胞的增殖,进而造成了破骨细胞的量大于成骨细胞,造成了牙周组织出现了骨缺损。但是其具体的机制仍然需要进行探讨及分析。

研究初步对 LINC00511 在牙周炎中的作用做了研究和阐释,但 Lnc RNA 对疾病的调节往往是一个复杂的网络。但是在牙周炎的骨破坏中, LINC00511 的具体作用机制如何,是否存在 LINC00511 与 mi RNA 的相互作用,其具体方式如何,是未来需要进行探讨和分析的。

作者贡献: 第一作者赵祥宇负责文章设计及实施,第二作者张桂荣负责临床样本收集及论文撰写,第三作者郭传波参与文章实施,第四作者史春进行统计学分析及文章校正,通讯作者吴刘中对文中进行评估修改及审阅。

经费支持: 该文章接受了“辽宁省自然科学基金(20180550563)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 研究方案经沈阳市口腔医院伦理委员会批准(201901)。

知情同意问题: 参与试验的患病个体及其家属对治疗过程及试验方案完全知情同意。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Soares LG, Carvalho EB, Tinoco EMB. Clinical effect of Lactobacillus on the treatment of severe periodontitis and halitosis: A double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Am J Dent*. 2019;32(1):9-13.
- [2] Schuch HS, Nascimento GG, Peres KG, et al. The Controlled Direct Effect of Early Life Socioeconomic Position on Periodontitis in a Birth Cohort. *Am J Epidemiol*. 2019;188(6):1101-1108.
- [3] Yoo YJ, Perinpanayagam H, Oh S, et al. Endodontic biofilms contemporary and future treatment options. *Restor Dent Endod*. 2019;44(1):e7.
- [4] Kaushal S, Singh AK, Lal N, et al. Effect of periodontal therapy on disease activity in patients of rheumatoid arthritis with chronic periodontitis. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2019;9(2):128-132.
- [5] Tobon-Arroyave S I, Celis-Mejia N, Cordoba-Hidalgo MP, et al. Decreased salivary concentration of CD9 and CD81 exosome-related tetraspanins may be associated with the periodontal clinical status. *J Clin Periodontol*. 2019;46(4):470-480.
- [6] Chi L, Cheng X, He X, et al. Increased cortical infarction and neuroinflammation in ischemic stroke mice with experimental periodontitis. *Neuroreport*. 2019;30(6):428-433.
- [7] Silva PHF, Oliveira LFF, Cardoso RS, et al. The impact of predatory bacteria on experimental periodontitis. *J Periodontol*. 2019 Mar 4.
- [8] Eickholz P, Koch R, Kocher T, et al. Clinical benefits of systemic amoxicillin/metronidazole may depend on periodontitis severity and patients' age. An exploratory sub-analysis of the ABPARO-trial. *J Clin Periodontol*. 2019;46(4):491-501.
- [9] Zhang W, Dong R, Diao S, et al. Differential long noncoding RNA/mRNA expression profiling and functional network analysis during osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):30.
- [10] He Y, de Castro L F, Shin M H, et al. p53 loss increases the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Stem Cells*. 2015;33(4):1304-1319.
- [11] Liu G, Wang Y, Zhang M, et al. Long non-coding RNA THRIL promotes LPS-induced inflammatory injury by down-regulating microRNA-125b in ATDC5 cells. *Int Immunopharmacol*. 2019;66:354-361.
- [12] Wang H, Sheng ZG, Dai LZ. Long non-coding RNA LINC01503 predicts worse prognosis in glioma and promotes tumorigenesis and progression through activation of Wnt/beta-catenin signaling. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(4):1600-1609.
- [13] Choi J Y, Shin D, Lee H J, et al. Comparison of long noncoding RNA between muscles and adipose tissues in Hanwoo beef cattle. *Anim Cells Syst (Seoul)*. 2019; 23(1): 50-58.
- [14] Yoshioka H, Yoshiko Y. The Roles of Long Non-Protein-Coding RNAs in Osteo-Adipogenic Lineage Commitment. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6).
- [15] Lignon G, Hotton D, Berdal A, et al. In Situ Hybridization in Mineralized Tissues: The Added Value of LNA Probes for RNA Detection. *Methods Mol Biol*. 2019;1922:181-190.
- [16] Ren K, Ni Y, Li X, et al. Expression profiling of long noncoding RNAs associated with vasculogenic mimicry in osteosarcoma. *J Cell Biochem*. 2019 Mar 1.
- [17] Li C, Lu L, Feng B, et al. The lincRNA-ROR/miR-145 axis promotes invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma via induction of epithelial-mesenchymal transition by targeting ZEB2. *Sci Rep*. 2017; 7(1):4637.
- [18] Yan L, Wu X, Liu Y, et al. LncRNA Linc00511 promotes osteosarcoma cell proliferation and migration through sponging miR-765. *J Cell Biochem*. 2018 Dec 28.
- [19] Lu G, Li Y, Ma Y, et al. Long noncoding RNA LINC00511 contributes to breast cancer tumorigenesis and stemness by inducing the miR-185-3p/E2F1/Nanog axis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):289.
- [20] Kholghi Oskooei V, Geranpayeh L, Omrani M D, et al. Assessment of functional variants and expression of long noncoding RNAs in vitamin D receptor signaling in breast cancer. *Cancer Manag Res*. 2018;10:3451-3462.
- [21] Li J, Li Y, Meng F, et al. Knockdown of long non-coding RNA linc00511 suppresses proliferation and promotes apoptosis of bladder cancer cells via suppressing Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Biosci Rep*. 2018; 38(4). pii: BSR20171701.
- [22] Ding J, Yang C, Yang S. LINC00511 interacts with miR-765 and modulates tongue squamous cell carcinoma progression by targeting LAMC2. *J Oral Pathol Med*. 2018;47(5):468-476.
- [23] Xiao B, Zhang W, Chen L, et al. Analysis of the miRNA-mRNA-lncRNA network in human estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative breast cancer based on TCGA data. *Gene*. 2018;658:28-35.
- [24] Zhao X, Liu Y, Li Z, et al. Linc00511 acts as a competing endogenous RNA to regulate VEGFA expression through sponging hsa-miR-29b-3p in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Cell Mol Med*. 2018;22(1):655-667.
- [25] Xu S, Kong D, Chen Q, et al. Oncogenic long noncoding RNA landscape in breast cancer. *Mol Cancer*. 2017;16(1):129.
- [26] Sun C C, Li S J, Li G, et al. Long Intergenic Noncoding RNA 00511 Acts as an Oncogene in Non-small-cell Lung Cancer by Binding to EZH2 and Suppressing p57. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016;5(11):e385.
- [27] Wei Y, Zhang X. Transcriptome analysis of distinct long non-coding RNA transcriptional fingerprints in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2016 Oct 29. [Epub ahead of print]
- [28] Shi J, Li J, Su W, et al. Loss of periodontal ligament fibroblasts by RIPK3-MLKL-mediated necroptosis in the progress of chronic periodontitis. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 2902.
- [29] Dong M, Yu X, Chen W, et al. Osteopontin Promotes Bone Destruction in Periapical Periodontitis by Activating the NF-kappaB Pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2018;49(3):884-898.
- [30] Jagannathan R, Thayman M, Rao S R. Proinflammatory (CD14+CD16++) monocytes in type 2 diabetes mellitus patients with/without chronic periodontitis. *Dent Res J (Isfahan)*. 2019;16(2):95-103.
- [31] Peddis N, Musu D, Ideo F, et al. Interaction of biologic therapy with apical periodontitis and periodontitis: A systematic review. *Aust Dent J*. 2019 Feb 27.
- [32] Gomes AM, Douglas-de-Oliveira DW, Ferreira SD, et al. Periodontal disease, peri-implant disease and levels of salivary biomarkers IL-1beta, IL-10, RANK, OPG, MMP-2, TGF-beta and TNF-alpha: follow-up over 5 years. *J Appl Oral Sci*. 2019;27:e20180316.
- [33] Miano J M, Long X, Lyu Q. CRISPR links to long noncoding RNA function in mice: A practical approach. *Vascul Pharmacol*. 2019;114:1-12.
- [34] Basavappa M, Cherry S, Henao-Mejia J. Long noncoding RNAs and the regulation of innate immunity and host-virus interactions. *J Leukoc Biol*. 2019;106(1):83-93.
- [35] Biersack B. Relations between approved platinum drugs and non-coding RNAs in mesothelioma. *Noncoding RNA Res*. 2018;3(4):161-173.
- [36] Gu X, Li M, Jin Y, et al. Identification and integrated analysis of differentially expressed lncRNAs and circRNAs reveal the potential ceRNA networks during PDLSC osteogenic differentiation. *BMC Genet*. 2017;18(1):100.
- [37] Zou Y, Zhang W, Zhou HH, et al. Analysis of long noncoding RNAs for acute rejection and graft outcome in kidney transplant biopsies. *Biomark Med*. 2019;13(3):185-195.
- [38] Sheng Y, Ma J, Zhao J, et al. Differential expression patterns of specific long noncoding RNAs and competing endogenous RNA network in alopecia areata. *J Cell Biochem*. 2019;120(6):10737-10747.
- [39] Gurha P. Noncoding RNAs in cardiovascular diseases. *Curr Opin Cardiol*. 2019;34(3):241-245.
- [40] Sun H, Peng G, Ning X, et al. Emerging roles of long noncoding RNA in chondrogenesis, osteogenesis, and osteoarthritis. *Am J Transl Res*. 2019;11(1):16-30.
- [41] Oh TG, Wang SM, Acharya BR, et al. The Nuclear Receptor, RORgamma, Regulates Pathways Necessary for Breast Cancer Metastasis. *EBioMedicine*. 2016;6:59-72.
- [42] Yang F, Lyu S, Dong S, et al. Expression profile analysis of long noncoding RNA in HER-2-enriched subtype breast cancer by next-generation sequencing and bioinformatics. *Onco Targets Ther*. 2016;9:761-772.