

LncRNA-HOTAIR 可调节脂肪间充质干细胞向成骨细胞的分化

<https://doi.org/10.12307/2022.397>黄涛¹, 贾志强², 赵晓光¹, 王磊¹, 方丽萍³, 翟文静⁴, 翟莎菲⁵, 周永新¹

投稿日期: 2021-01-28

采用日期: 2021-04-10

修回日期: 2021-07-20

在线日期: 2021-08-04

中图分类号:

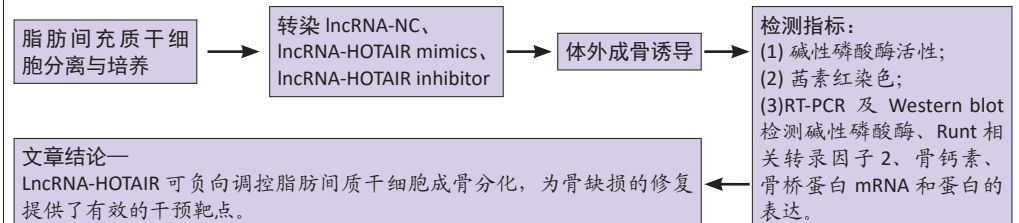
R459.9; R318; R394.2

文章编号:

2095-4344(2022)25-03951-05

文献标识码: A

文章快速阅读:



文题释义:

lncRNA: 是一类长度超过200 bp的长链非编码RNA, 具有十分广泛的生物学功能。lncRNA较编码RNA有更强的细胞特异性和组织特异性, 其表达与多种疾病的发生发展密切相关, 且在细胞增殖、凋亡、分化及发育等过程中发挥重要的调节作用。已有研究表明, lncRNA在间充质干细胞成骨分化过程中起表观遗传调控作用。

HOTAIR: 是由人类染色体12q13.13位点的HOXC簇基因列阵, 以反转录方式调控基因表达。lncRNA HOTAIR在宫颈癌、卵巢癌、冠心病、心肌病和骨关节炎中发挥着重要作用。

摘要

背景: 已有证据表明, lncRNA-HOTAIR能调节骨髓间充质干细胞中成骨相关基因的表达, 但其对脂肪间充质干细胞成骨分化的影响尚未见报道。

目的: 探讨lncRNA-HOTAIR对脂肪间充质干细胞成骨分化的影响。

方法: 体外培养Lewis大鼠脂肪间充质干细胞, 转染lncRNA-NC、lncRNA-HOTAIR mimics、lncRNA-HOTAIR inhibitor并进行成骨诱导, 成骨诱导第7天检测碱性磷酸酶活性, 成骨诱导第14天进行茜素红染色。成骨诱导第6天, 通过RT-PCR及Western blot检测成骨相关基因碱性磷酸酶、Runt相关转录因子2、骨钙素、骨桥蛋白mRNA和蛋白的表达。

结果与结论: ①转染lncRNA-HOTAIR mimic后, 脂肪间充质干细胞中碱性磷酸酶活性及钙化程度显著降低, 而转染lncRNA-HOTAIR inhibitor后则显著增加($P < 0.05$); ②转染lncRNA-HOTAIR mimic后, 脂肪间充质干细胞中碱性磷酸酶、Runt相关转录因子2、骨钙素和骨桥蛋白的表达显著降低($P < 0.05$), 而转染lncRNA-HOTAIR inhibitor后则显著增加($P < 0.05$); ③上述结果表明, lncRNA-HOTAIR能负向调控脂肪间充质干细胞的成骨分化。

关键词: 干细胞; 脂肪间充质干细胞; lncRNA-HOTAIR; mimic; inhibitor; 成骨分化

LncRNA-HOTAIR can regulate differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells into osteoblasts

Huang Tao¹, Jia Zhiqiang², Zhao Xiaoguang¹, Wang Lei¹, Fang Liping³, Zhai Wenjing⁴, Zhai Shafei⁵, Zhou Yongxin¹

¹First Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China; ²Second Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, Henan Province, China; ³Xi'an People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China; ⁴Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China; ⁵School of Stomatology, Xi'an Medical College, Xi'an 710021, Shaanxi Province, China

Corresponding author: Zhou Yongxin, Master, Attending physician, First Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China

Abstract

BACKGROUND: Evidence has shown that lncRNA-HOTAIR can regulate the expression of osteogenic related genes in bone marrow mesenchymal stem cells, but its effect on the osteogenic differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells has not been reported.

OBJECTIVE: To investigate the effect of lncRNA-HOTAIR on the osteogenic differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells.

¹西安医学院第一附属医院, 陕西省西安市 710077; ²河南科技大学第二附属医院, 河南省洛阳市 471000; ³西安市人民医院, 陕西省西安市 710068; ⁴西安交通大学第二附属医院, 陕西省西安市 710061; ⁵西安医学院口腔医学院, 陕西省西安市 710021

第一作者: 黄涛, 男, 1979年生, 安徽省合肥市人, 2009年西安交通大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事脊柱脊髓损伤方面的研究。

通讯作者: 周永新, 硕士, 主治医师, 西安医学院第一附属医院, 陕西省西安市 710077

<https://orcid.org/0000-0002-2828-3271> (周永新)

基金资助: 国家自然科学基金(81801237), 项目参与人: 黄涛

引用本文: 黄涛, 贾志强, 赵晓光, 王磊, 方丽萍, 翟文静, 翟莎菲, 周永新. lncRNA-HOTAIR 可调节脂肪间充质干细胞向成骨细胞的分化 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(25):3951-3955.



METHODS: Adipose derived mesenchymal stem cells of Lewis rats were cultured *in vitro*. lncRNA-NC, lncRNA-HOTAIR mimics, and lncRNA-HOTAIR inhibitor were transfected into adipose derived mesenchymal stem cells and osteogenesis was induced. The alkaline phosphatase activity was detected on the 7th day of osteogenic induction. Alizarin red staining was performed on the 14th day of osteogenic induction. On the 6th day of osteogenic induction, the expression levels of osteogenic-related genes alkaline phosphatase, Runt-related transcription factor 2, osteocalcin, and osteopontin mRNA and protein were detected by RT-PCR and western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) After lncRNA-HOTAIR mimic transfection, alkaline phosphatase activity and calcification degree of adipose derived mesenchymal stem cells were significantly decreased, while lncRNA-HOTAIR inhibitor transfection significantly increased ($P < 0.05$). (2) After lncRNA-HOTAIR mimic transfection, the expression of alkaline phosphatase, Runt-related transcription factor 2, osteocalcin, and osteopontin in adipose derived mesenchymal stem cells decreased significantly ($P < 0.05$), but increased significantly after lncRNA-HOTAIR inhibitor transfection ($P < 0.05$). (3) These results suggest that lncRNA-HOTAIR can negatively regulate the osteogenic differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells.

Key words: stem cells; adipose derived mesenchymal stem cells; lncRNA-HOTAIR; mimic; inhibitor; osteogenic differentiation

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81801237 (to HT)

How to cite this article: HUANG T, JIA ZQ, ZHAO XG, WANG L, FANG LP, ZHAI WJ, ZHAI SF, ZHOU YX. lncRNA-HOTAIR can regulate differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells into osteoblasts. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(25):3951-3955.

0 引言 Introduction

间充质干细胞来源于中胚层，存在于人体多种组织中，因其具有免疫调节、分泌生长因子、组织再生、促进血管形成等特点，对骨创伤修复具有潜在的治疗意义^[1-3]。骨髓间充质干细胞是构建组织工程种子细胞的重要来源之一，但由于骨髓间充质干细胞存在来源受限、提取受限及数量受限等弊端，使其应用受到了很大的限制^[4]。

近年来，脂肪间充质干细胞分离及鉴定技术日趋成熟。脂肪组织具有取材容易、创伤面积小、间充质干细胞提取数量多等优点，使其成为组织工程领域的研究热点^[5-6]。lncRNA 是一类长度超过 200 bp 的长链非编码 RNA，具有十分广泛的生物学功能。已有研究表明，lncRNA 较编码 RNA 有更强的细胞特异性和组织特异性，其表达与多种疾病的发生发展密切相关，且对细胞增殖、凋亡、分化及发育等过程发挥重要的调节作用^[7-8]。近来，通过 lncRNA 调节间充质干细胞定向分化的研究受到广泛关注。HUANG 等^[9]研究发现，lncRNA H19 过表达能显著增强间充质干细胞的成骨能力。XIAO 等^[10]研究发现，lncRNA MALAT1 能促进成骨细胞特异性标志物碱性磷酸酶、骨钙素和骨桥蛋白的表达。HOTAIR 由 12 号染色体 12q13.13 上 HOXC 基因反义链转录，主要调控同源框基因 D(HOXD)^[11-12]。已有研究表明，lncRNA HOTAIR 在宫颈癌、卵巢癌、冠心病、心肌病和骨关节炎中发挥着重要作用^[13-16]。该研究探讨 lncRNA HOTAIR 在脂肪间充质干细胞成骨分化中的调节作用，以期明确 lncRNA HOTAIR 调控脂肪间充质干细胞成骨分化的机制及其治疗骨损伤提供科学依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞生物学实验，组间比较采用独立样本 *t* 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2018 年 7 月至 2020 年 12 月在西安医学院第一附属医院形态学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 4 周龄雄性 Lewis 大鼠 20 只，体质量为 80-100 g，购买于上海加科生物科技有限公司。

1.3.2 实验主要试剂 DMEM 培养基 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); Trizol 试剂、Lipofectamine 3000 转染试剂 (美国 Invitrogen 公司); SYBR Green PCR Master Mix (美

国 Life Technologies 公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (北京全式金公司); lncRNA-HOTAIR mimics、lncRNA-HOTAIR inhibitor、lncRNA-NC (上海 GenePharm 公司); 碱性磷酸酶抗体、Runt 相关转录因子 2 抗体、骨钙素抗体、骨桥蛋白抗体、 β -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗 (美国 Abcam 公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 脂肪间充质干细胞分离和培养 取大鼠腹股沟处脂肪垫，加入 0.1% 胶原酶 I，于 37 °C 水浴中消化 50 min，1 000 r/min 离心 8 min，加入细胞裂解缓冲液于 37 °C 孵育 10 min，弃去上清液，用 DMEM/F12 培养液重悬细胞，之后将其接种至培养瓶内，当细胞生长至 70%-80% 融合时传代。

1.4.2 细胞表面分子标志物的检测 取培养扩增后的第 3 代脂肪间充质干细胞，当细胞长至 70%-80% 融合时，用 2.5 mL 胰酶消化，1 000 r/min 离心 5 min 后收集细胞沉淀，PBS 洗涤 2 次并重悬细胞，制成细胞浓度为 $5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的单细胞悬液，将其加入到 Eppendorf 管中，每管 1×10^6 个细胞，分别加入 2 μL CD29、CD44、CD45 抗体及同型对照，4 °C 条件下孵育 60 min，上流式细胞仪检测，Cell-Quest 软件分析。

脂肪间充质干细胞的培养及鉴定:

细胞来源:	小鼠腹股沟处脂肪垫
原代培养方法:	酶消化法
基础培养基:	DMEM/F12 培养基
添加材料:	体积分数为 10% 无菌胎牛血清
原代培养时间:	原代细胞培养 2 d 开始换液，之后每 2 d 换液 1 次，当细胞融合至 70%-80% 开始传代
细胞传代:	细胞融合至 70%-80% 用 0.2% I 型胶原酶消化传至下 1 代，按 1 : 3 传代，共传 3 代
细胞鉴定:	流式鉴定
伦理学批准:	该实验经过西安医学院第一附属医院动物实验伦理学委员会批准

1.4.3 细胞转染 当第 3 代脂肪间充质干细胞长至 70%-80% 融合时，按照 Lipofectamine 3000 制造商说明书，将 lncRNA-HOTAIR mimics、lncRNA-HOTAIR inhibitor 和 lncRNA-NC 转染至细胞中，转染 24 h 后通过 RT-PCR 检测转染效率。

1.4.4 成骨诱导 将转染 48 h 后的各组脂肪间充质干细胞按 2×10^5 个 / cm^2 的密度接种于 6 孔板中，加入 DMEM 培养基。

当细胞长至 70%–80% 融合时，用成骨诱导培养液进行诱导分化，每 3 d 换 1 次成骨诱导培养液。

1.4.5 碱性磷酸酶活性检测 成骨诱导第 7 天收集各组细胞，通过酶标法检测碱性磷酸酶活性。用细胞裂解液充分裂解收集的细胞，PBS 洗涤 3 次，12 000 r/min 离心 10 min，离心后取上清液，按照试剂盒说明书进行操作，用酶标仪在波长 520 nm 处测定吸光度值。

1.4.6 茜素红染色 成骨诱导第 14 天收集各组细胞，PBS 洗涤 2 次，在常温条件下用 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min，除去固定液，PBS 洗涤 3 次，加入茜素红染液染色 5 min，PBS 洗涤 3 次，在倒置显微镜下观察。

1.4.7 Real-time PCR(RT-PCR) 检测 脂肪间充质干细胞成骨诱导第 0, 3, 7, 14, 21 天，以及转染后各组脂肪间充质干细胞成骨诱导第 6 天，通过 Trizol 法提取细胞中的总 RNA，用分光光度计测定 RNA 浓度，按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA。PCR 体系 (10 μ L): SYBR Premix Ex Taq 5 μ L、ROX Reference Dye II 0.2 μ L、上游引物 0.2 μ L、下游引物 0.2 μ L、cDNA 样本 0.1 μ L、加 ddH₂O 至 10 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 35 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环。用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 | 引物序列
Table 1 | Primer sequences

基因	引物序列 (5'–3')
lncRNA-HOTAIR	Forward GGA GAA CAC UUA AAU AAG UTT
	Reverse ACU UAU UUA AGU GUU CUC CTA
Runt 相关转录因子 2	Forward GAC GAG GCA AGA GTT TCA CC
	Reverse GGT TCC CGA GGT CCA TCT AC
碱性磷酸酶	Forward ATC TTT GGT CTG GCT CCC ATG
	Reverse TTT CCC GTT CAC CGT CCA C
骨桥蛋白	Forward ATC TCC TAG CCC CAC AGA AT
	Reverse CAT CAG ACT GGT GAG AAT CAT C
骨钙素	Forward AGG GCA GCG AGG TAG TGA
	Reverse CCT GAA AGC CGA TGT GGT
U6	Forward GTG CAG GGT CCG AGG T
	Reverse GCG CGT CGT GAA GCG TTC
β -actin	Forward CCC TTC ATT GAC CTC AAC TAC
	Reverse CCA CGA CTC ATA CAG CAC C

1.4.8 Western blot 检测 成骨诱导第 6 天收集各组细胞，PBS 洗涤，通过 BCA 法测定蛋白浓度。经 SDS-PAGE 电泳将蛋白转至硝酸纤维素膜上，TBST 洗涤后用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h，加入 Runt 相关转录因子 2(1 : 200)、碱性磷酸酶 (1 : 400)、骨桥蛋白 (1 : 1 500)、骨钙素 (1 : 2 000) 一抗，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜；TBST 洗涤 3 次，加入二抗 (1 : 3 000)，室温孵育 2 h，TBST 洗涤 3 次，ECL 显影。

1.5 主要观察指标 ①脂肪间充质干细胞的钙化程度及细胞表面钙盐沉积情况；②脂肪间充质干细胞中 lncRNA-HOTAIR、Runt 相关转录因子 2、碱性磷酸酶、骨桥蛋白及骨钙素的基因表达；③脂肪间充质干细胞中 Runt 相关转录因子 2、碱性磷酸酶、骨桥蛋白及骨钙素的蛋白表达。

1.6 统计学分析 所有数据均通过 SPSS 21.0 软件进行统计分析，实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组间比较采用独立样本 *t* 检验，*P* < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

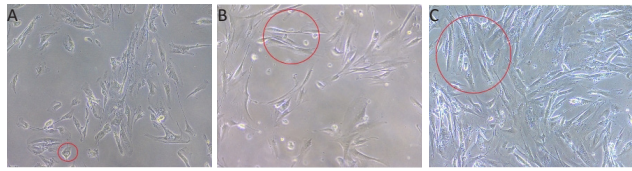
2.1 脂肪间充质干细胞的形态 原代细胞为小圆形且细胞大小不均匀；培养 48 h 后，细胞生出触角，此时细胞为三角形或梭形；当细胞生长至 80% 融合时进行传代，此时细胞呈纤维样生长且具有方向性，细胞形态基本一致；当细胞传至第 3 代时，基本为梭形，细胞大小均一，呈漩涡状排列，且增殖速度较快，见图 1。

2.2 脂肪间充质干细胞的鉴定结果 流式细胞仪检测第 3 代脂肪间充质干细胞表面标志物的表达，CD29 和 CD44 的阳性率分别为 99.4% 和 97.6%，CD45 的阳性率为 3.66%，说明脂肪间充质干细胞纯度较高，见图 2。

2.3 脂肪间充质干细胞成骨分化过程中 lncRNA-HOTAIR、Runt 相关转录因子 2、碱性磷酸酶、骨桥蛋白及骨钙素 mRNA 表达水平的变化 与第 0 天相比，脂肪间充质干细胞成骨诱导第 3, 7, 14, 21 天 lncRNA-HOTAIR mRNA 表达水平显著降低 (*P* < 0.05)，Runt 相关转录因子 2、碱性磷酸酶、骨桥蛋白及骨钙素 mRNA 表达水平显著升高 (*P* < 0.05)；与第 3 天相比，第 7, 14, 21 天细胞中 lncRNA-HOTAIR mRNA 表达水平显著降低 (*P* < 0.05)，Runt 相关转录因子 2、碱性磷酸酶、骨桥蛋白及骨钙素 mRNA 表达水平显著升高 (*P* < 0.05)；与第 7 天相比，第 14, 21 天细胞中 lncRNA-HOTAIR mRNA 表达水平显著降低 (*P* < 0.05)，Runt 相关转录因子 2、碱性磷酸酶、骨桥蛋白及骨钙素 mRNA 表达水平显著升高 (*P* < 0.05)；与第 14 天相比，第 21 天细胞中 lncRNA-HOTAIR 及成骨相关基因的 mRNA 表达差异无显著性意义，见图 3。

2.4 lncRNA-HOTAIR 对脂肪间充质干细胞成骨分化的影响 转染 48 h 后，lncRNA-HOTAIR mimics 组细胞 lncRNA-HOTAIR 表达显著高于 lncRNA-NC 组 (*P* < 0.05)，lncRNA-HOTAIR inhibitor 组细胞 lncRNA-HOTAIR 表达显著低于 lncRNA-NC 组 (*P* < 0.05)，见图 4A。在成骨诱导第 7 天，lncRNA-HOTAIR mimics 组细胞碱性磷酸酶活性显著低于 lncRNA-NC 组 (*P* < 0.05)，lncRNA-HOTAIR inhibitor 组细胞碱性磷酸酶活性显著高于 lncRNA-NC 组 (*P* < 0.05)，见图 4B。在成骨诱导第 14 天，3 组细胞均可见不同程度暗红色钙结节沉积，lncRNA-HOTAIR mimics 组钙结节的大小、数目及颜色深度均显著低于 lncRNA-NC 组 (*P* < 0.05)，而 lncRNA-HOTAIR inhibitor 组则显著高于 lncRNA-NC 组 (*P* < 0.05)，见图 4C。

2.5 各组脂肪间充质干细胞成骨诱导后碱性磷酸酶、Runt 相关转录因子 2、骨桥蛋白、骨钙素的表达 与 lncRNA-NC 组相比，lncRNA-HOTAIR mimics 组细胞中碱性磷酸酶、Runt 相关转录因子 2、骨桥蛋白、骨钙素的 mRNA 及蛋白表达水平显著降低，而 lncRNA-HOTAIR inhibitor 组的表达水平显著升高 (*P* < 0.05)，见图 5。



图注：图中 A-C 分别为原代、第 2 代、第 3 代脂肪间充质干细胞，红色圈所示为每一代典型的细胞形态

图 1 | 脂肪间充质干细胞的形态学观察 (×200)

Figure 1 | Morphological observation of adipose derived mesenchymal stem cells (×200)

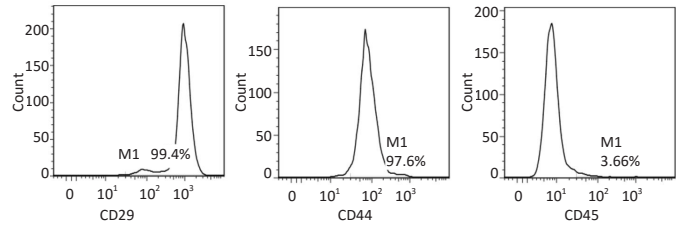
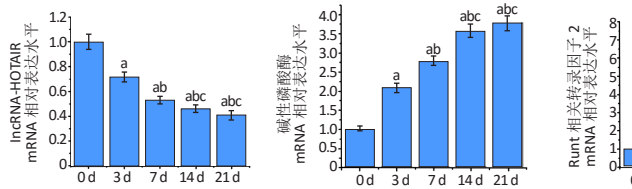


图 2 | 脂肪间充质干细胞表面分子鉴定结果

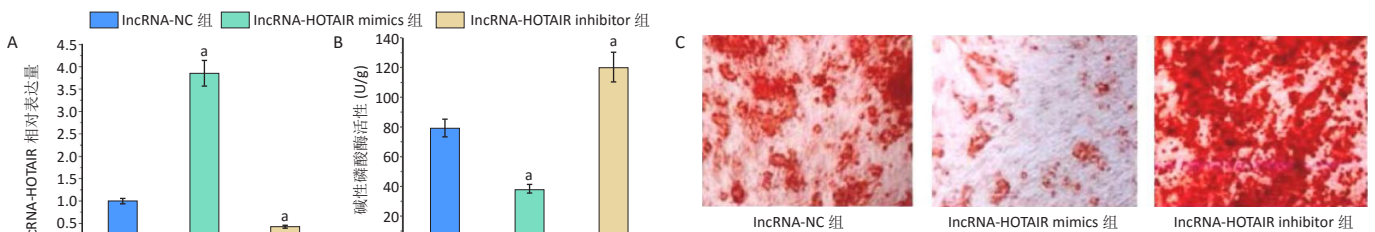
Figure 2 | Molecular identification of adipose derived mesenchymal stem cells



图注：与 0d 比较，^a $P < 0.05$ ；与 3d 比较，^b $P < 0.05$ ；与 7d 比较，^c $P < 0.05$

图 3 | 在脂肪间充质干细胞成骨分化过程中 IncRNA-HOTAIR、Runt 相关转录因子 2、碱性磷酸酶、骨桥蛋白及骨钙素 mRNA 表达水平变化

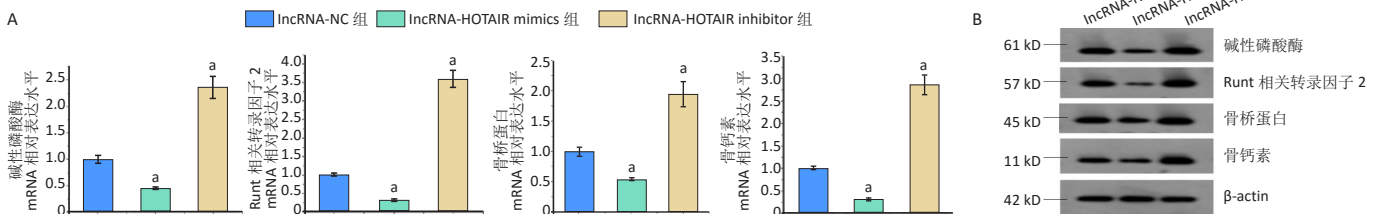
Figure 3 | Changes of IncRNA-HOTAIR, Runt-related transcription factor 2, alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin mRNA expression levels during osteogenic differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells



图注：图中 A 为转染 IncRNA-NC、IncRNA-HOTAIR mimics 及 IncRNA-HOTAIR inhibitor 后，各组细胞 IncRNA-HOTAIR 表达变化；B 为碱性磷酸酶活性分析；C 为茜红染色结果 (×200)。与 IncRNA-NC 组相比，^a $P < 0.05$

图 4 | IncRNA-HOTAIR 对脂肪间充质干细胞成骨分化的影响

Figure 4 | Effect of IncRNA-HOTAIR on osteogenic differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells



图注：图中 A 为碱性磷酸酶、Runt 相关转录因子 2、骨桥蛋白、骨钙素的 mRNA 表达；B 为蛋白表达条带。与 IncRNA-NC 组比较，^a $P < 0.05$

图 5 | 各组脂肪间充质干细胞成骨诱导后碱性磷酸酶、Runt 相关转录因子 2、骨桥蛋白、骨钙素 mRNA 及蛋白表达

Figure 5 | Expression of alkaline phosphatase, Runt-related transcription factor 2, osteopontin, osteocalcin mRNA and protein in adipose derived mesenchymal stem cells of each group after osteogenic induction

3 讨论 Discussion

目前，临床修复骨缺损主要采用骨移植和非生物材料移植的方法。然而，由于骨移植存在来源有限、供体部位术后疼痛、供体骨外形不符等问题，并未在临床上推广；人工骨替代物也因其具有机械性差、生物相容性低、在体内难降解等局限性，未被广泛应用^[17-19]。组织工程技术成为解决骨缺损的最新研究手段，而种子细胞的优化和选择一直是该领域的研究热点。脂肪间充质干细胞是一种具有多向分化潜能和自我更新能力的干细胞，且具有来源广、易获取、机体损伤小、能反复提取等特点^[20-21]。与骨髓间充质干细胞相比，脂肪间充质干细胞中的趋化因子受体表达更高，这能促进细胞的迁移和归巢，更有利于骨损伤的修复，且自身来源的脂

肪间充质干细胞几乎没有免疫原性，是理想的种子细胞^[22-23]。

已有研究显示，IncRNA 是一种可参与包括细胞分化转录、RNA 衰变、表观遗传调控等多种生物学过程的非编码 RNA^[24]。HUYNH 等^[25]发现，IncRNA 是骨质疏松和骨关节炎等骨骼相关疾病的潜在生物标志物和治疗靶点。YOSHIOKA 等^[26]研究表明，IncRNA 在间充质干细胞成骨分化过程中起表观遗传调控作用。毕凤江等^[27]通过实验发现，过表达 IncRNA HOTAIR 能降低骨髓间充质干细胞中成骨相关基因的表达，而敲减 IncRNA HOTAIR 能升高成骨相关基因的表达。该研究结果显示：在脂肪间充质干细胞成骨分化过程中，IncRNA HOTAIR 的表达水平降低，IncRNA HOTAIR 负向调控脂肪间充质干细胞的成骨分化。

碱性磷酸酶是脂肪间充质干细胞成骨分化早期的重要标志物之一,其在脂肪间充质干细胞钙化过程中起十分重要的作用,可直接决定细胞的钙化情况^[28]。脂肪间充质干细胞中碱性磷酸酶的表达水平能直观反映其早期成骨分化情况。骨钙素是一种非胶原蛋白,在骨基质矿化过程中由成骨细胞合成,其表达水平可有效反映细胞的成骨活动^[29-30]。骨桥蛋白是一种分泌型糖基化磷酸化蛋白,在细胞黏附和基质矿化过程中扮演重要角色,可作为成骨细胞分化的重要标志^[31-32]。Runt 相关转录因子 2 是 Runt 家族成员之一,能诱导间充质细胞向成骨细胞分化,有证据表明其可增加细胞中骨钙素及 I 型胶原蛋白等成骨基因的表达^[33-35]。该研究结果显示,转染 lncRNA HOTAIR mimics 后脂肪间充质干细胞中成骨相关基因碱性磷酸酶、Runt 相关转录因子 2、骨钙素、骨桥蛋白 mRNA 及蛋白表达水平显著降低;相反,转染 lncRNA HOTAIR inhibitor 会促进脂肪间充质干细胞中成骨相关基因碱性磷酸酶、Runt 相关转录因子 2、骨钙素、骨桥蛋白 mRNA 及蛋白的表达。这一结果说明, lncRNA HOTAIR 可以抑制脂肪间充质干细胞的成骨分化能力。

综上所述, lncRNA HOTAIR 可负向调控脂肪间充质干细胞内成骨相关基因碱性磷酸酶、Runt 相关转录因子 2、骨钙素及骨桥蛋白的表达,为骨缺损修复提供了有效的干预靶点,但其具体的作用机制还需进一步的深入研究。

作者贡献: 实验设计为周永新, 实验实施为黄涛, 实验评估为贾志强、赵晓光、王磊, 资料收集为方丽萍、翟文静、翟莎菲。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(81801237)”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: 实验方案经西安医学院第一附属医院动物实验伦理委员会批准, 批准号为 YW-LY-2018-030。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

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。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过西安医学院第一附属医院生物统计学专家审核。

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

- WEI X, YANG X, HAN ZP, et al. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(6):747-754.
- PUISSANT B, BARREAU C, BOURIN P, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol.* 2005;129(1):118-129.
- MERRITT EK, CANNON MV, HAMMERS DW, et al. Repair of traumatic skeletal muscle injury with bone-marrow-derived mesenchymal stem cells seeded on extracellular matrix. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(9):2871-2881.
- WAGNER W, WEIN F, SECKINGER A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005;33(11):1402-1416.

- WANKHADE UD, SHEN M, KOLHE R, et al. Advances in Adipose-Derived Stem Cells Isolation, Characterization, and Application in Regenerative Tissue Engineering. *Stem Cells Int.* 2016;2016:3206807.
- LIM MH, ONG WK, SUGII S. The current landscape of adipose-derived stem cells in clinical applications. *Expert Rev Mol Med.* 2014;16:e8.
- XU J, XU Y. The lncRNA MEG3 downregulation leads to osteoarthritis progression via miR-16/SMAD7 axis. *Cell Biosci.* 2017;7:69.
- LI YF, LI SH, LIU Y, et al. Long Noncoding RNA CIR Promotes Chondrocyte Extracellular Matrix Degradation in Osteoarthritis by Acting as a Sponge For Mir-27b. *Cell Physiol Biochem.* 2017;43(2):602-610.
- HUANG Y, ZHENG Y, JIN C, et al. Long Non-coding RNA H19 Inhibits Adipocyte Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells through Epigenetic Modulation of Histone Deacetylases. *Sci Rep.* 2016;6:28897.
- XIAO X, ZHOU T, GUO S, et al. lncRNA MALAT1 sponges miR-204 to promote osteoblast differentiation of human aortic valve interstitial cells through up-regulating Smad4. *Int J Cardiol.* 2017;243:404-412.
- SAYAD A, HAJIFATHALI A, HAMIDIEH AA, et al. HOTAIR Long Noncoding RNA is not a Biomarker for Acute Myeloid Leukemia (AML) in Iranian Patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(6):1581-1584.
- LI J, WANG J, ZHONG Y, et al. HOTAIR: a key regulator in gynecologic cancers. *Cancer Cell Int.* 2017;17:65.
- PANG JL, WANG JW, HU PY, et al. HOTAIR alleviates ox-LDL-induced inflammatory response in Raw264.7 cells via inhibiting NF-κB pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22(20):6991-6998.
- YU Y, ZHANG X, TIAN H, et al. Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR increases cisplatin sensitivity in ovarian cancer by inhibiting cisplatin-induced autophagy. *J BUON.* 2018;23(5):1396-1401.
- 帕提曼·米吉提, 唐努尔·阿不力米提, 凯丽比努尔·艾尔肯, 等. lncRNA HOTAIR 在宫颈鳞癌组织中的表达及其与 miRNA 表达的相关性分析 [J]. 新疆医科大学学报, 2020,43(1):28-32.
- 孙强, 赵铁男, 王远瑞, 等. lncRNA HOTAIR 调控 miR-130a-3p 对骨关节炎软骨细胞增殖和分化的影响 [J]. 中国骨与关节杂志, 2019,8(12):931-937.
- GIANNOUDIS PV, DINOPOULOS H, TSIRIDIS E. Bone substitutes: an update. *Injury.* 2005;36 Suppl 3:S20-27.
- 李建平, 杨琳, 秦毅, 等. 自体骨移植与人工骨移植材料修补颅骨缺损后的并发症 [J]. 中国组织工程研究, 2018,22(30):4794-4799.
- 阮征, 尹庆水, 张余. 关节软骨损伤修复技术的研究与进展 [J]. 中国组织工程研究, 2014,18(29):4724-4729.
- MERCER TR, DINGER ME, MATTICK JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet.* 2009;10(3):155-159.
- YU T, CHUA CK, TAY CY, et al. A generic micropatterning platform to direct human mesenchymal stem cells from different origins towards myogenic differentiation. *Macromol Biosci.* 2013;13(6):799-807.
- 赵刚, 刘微微, 高伟玮, 等. 不同组织来源间充质干细胞体外成骨分化能力的比较研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017,23(5):561-566.
- YANG XF, HE X, HE J, et al. High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci.* 2011;18(1):59.
- RANSOHOFF JD, WEI Y, KHAVARI PA. The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(3):143-157.
- HUYNH NP, ANDERSON BA, GUIJAK F, et al. Emerging roles for long noncoding RNAs in skeletal biology and disease. *Connect Tissue Res.* 2017;58(1):116-141.
- YOSHIOKA H, YOSHIKO Y. The Roles of Long Non-Protein-Coding RNAs in Osteo-Adipogenic Lineage Commitment. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6):1236.
- 毕凤江, 侯庆露, 赵广军, 等. lncRNA 调控绝经后骨质疏松及其机制研究 [J]. 国际感染杂志 (电子版), 2018,7(4):192-193.
- 谭伟源, 陈军平, 宋若愚, 等. 2 型糖尿病性骨质疏松大鼠 ADSCs 成骨能力的研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2019,25(9):1201-1205.
- 严斌, 王春梅, 彭秀银, 等. microRNA-346 对脂肪源性间充质干细胞成骨分化的影响 [J]. 医学理论与实践, 2018,31(23):15-18,21.
- 樊继波, 李莎, 丁小刚, 等. 老年性骨质疏松症患者腰椎及髋关节骨矿含量及骨钙素变化相关性分析 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2013,19(9):927-929.
- BELLAHCÈNE A, CASTRONOVO V, OGBUREKE KU, et al. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(3):212-226.
- 姚克, 陈涛, 王冬, 等. miR-186 靶向调控骨桥蛋白基因表达对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响 [J]. 蚌埠医学院学报, 2017,42(1):30-33.
- KOMORI T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv Exp Med Biol.* 2010;658:43-49.
- 吴顺义, 张晓蓉. Runx2 在成骨细胞和软骨细胞分化中作用的研究进展 [J]. 医学综述, 2019,25(7):60-65.
- KOMORI T. Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. *J Cell Biochem.* 2002;87(1):1-8.

(责任编辑: MZH, ZN, ZJP)