

糖尿病骨质疏松症模型小鼠脂肪干细胞的成骨能力

<https://doi.org/10.12307/2022.135>

投稿日期: 2021-03-18

送审日期: 2021-03-20

采用日期: 2021-04-23

在线日期: 2021-06-15

中图分类号:

R459.9; R318; R782.4

文章编号:

2095-4344(2022)07-00999-06

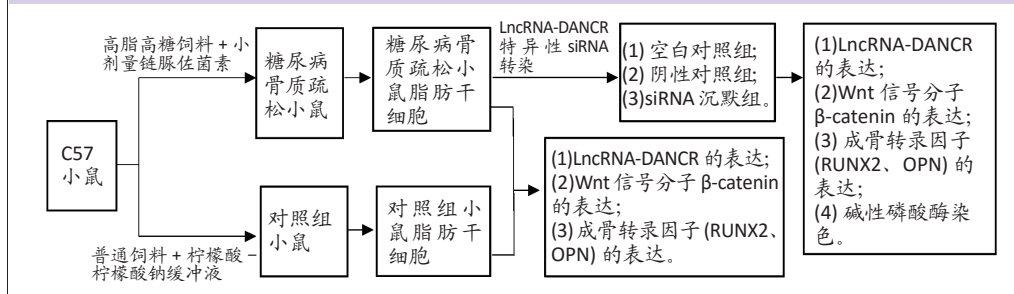
文献标识码: A

高俞锦¹, 彭双麟¹, 马治超¹, 陆诗¹, 曹花月¹, 王浪¹, 肖金刚^{1,2,3}

文章快速阅读:

文章特点一

- △采用高脂高糖饲料结合小剂量链脲佐菌素建立糖尿病骨质疏松小鼠模型;
- △验证了对照小鼠和糖尿病骨质疏松小鼠脂肪干细胞成骨分化及成骨能力的差异;
- △通过转染特异性 siRNA 探究 LncRNA-DANCR 对糖尿病骨质疏松小鼠脂肪干细胞成骨能力的影响。



文题释义:

长链非编码RNA-DANCR: 长链非编码RNA是一类不编码蛋白且长度超过200个核苷酸的RNA, 通过多种方式调控基因表达。分化拮抗非蛋白编码RNA-DANCR作为长链非编码RNA因其抑制祖细胞分化而被关注, 其在细胞分化过程中下调。DANCR在多种疾病模型中显示能够影响细胞的增殖分化。

糖尿病性骨质疏松: 是糖尿病常见的并发症, 常伴发骨量的丧失和骨结构的破坏, 增加骨折风险。

摘要

背景: 长链非编码RNA(long noncoding RNA, LncRNA)-DANCR可调节包括骨代谢的多个生物学过程。课题组基因芯片结果显示糖尿病骨质疏松小鼠脂肪组织中LncRNA-DANCR显著高表达。

目的: 探究LncRNA-DANCR通过Wnt/ β -catenin信号通路对糖尿病骨质疏松小鼠脂肪干细胞成骨能力的影响。

方法: 分离培养糖尿病骨质疏松小鼠和正常对照小鼠脂肪干细胞, 成骨诱导3 d后, 采用qRT-PCR、Western blot检测LncRNA-DANCR、Wnt信号分子 β -catenin以及成骨转录因子(RUNX2、OPN)的表达。设计LncRNA-DANCR特异性siRNA转染糖尿病骨质疏松小鼠脂肪干细胞, 成骨诱导3 d后, 采用qRT-PCR、Western blot和碱性磷酸酶染色检测Wnt信号分子 β -catenin、成骨转录因子(RUNX2、OPN)的表达以及成骨能力改变。

结果与结论: ①成骨诱导3 d后, 糖尿病骨质疏松小鼠脂肪干细胞的LncRNA-DANCR表达水平显著高于正常对照小鼠脂肪干细胞, Wnt信号分子 β -catenin和成骨转录因子RUNX2、OPN的表达显著低于正常对照小鼠脂肪干细胞; ②siRNA转染糖尿病骨质疏松小鼠脂肪干细胞成骨诱导3 d后, β -catenin以及RUNX2、OPN显著高表达, 成骨能力增强; ③结果表明, LncRNA-DANCR通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路降低糖尿病骨质疏松小鼠脂肪干细胞的成骨能力, 沉默LncRNA-DANCR可恢复其成骨能力。

关键词: 长链非编码RNA; Wnt信号通路; 糖尿病; 骨质疏松; 骨向分化; 骨修复

缩略语: 脂肪干细胞: adipose-derived stem cells, ASCs; 长链非编码RNA: long noncoding RNA, LncRNA

Osteogenic ability of adipose stem cells in diabetic osteoporosis mice

Gao Yujin¹, Peng Shuanglin¹, Ma Zhichao¹, Lu Shi¹, Cao Huayue¹, Wang Lang¹, Xiao Jingang^{1,2,3}

¹School of Stomatology of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; ²Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; ³Orofacial Reconstruction and Regeneration Laboratory of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Gao Yujin, Master candidate, School of Stomatology of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Corresponding author: Xiao Jingang, MD, Professor, School of Stomatology of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; Orofacial Reconstruction and Regeneration Laboratory of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

¹西南医科大学口腔医学院, 四川省泸州市 646000; ²西南医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 四川省泸州市 646000; ³西南医科大学口腔颌面修复重建和再生实验室, 四川省泸州市 646000

第一作者: 高俞锦, 女, 1995年生, 浙江省绍兴市人, 西南医科大学在读硕士, 主要从事口腔种植的临床与基础研究。

通讯作者: 肖金刚, 博士, 教授, 西南医科大学口腔医学院, 四川省泸州市 646000; 西南医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 四川省泸州市 646000; 西南医科大学口腔颌面修复重建和再生实验室, 四川省泸州市 646000

<https://orcid.org/0000-0003-1300-7191> (肖金刚)

基金资助: 国家自然科学基金项目(81870746), 项目负责人: 肖金刚; 泸州市人民政府-西南医科大学科技战略合作项目(2020LZXNYDZ09), 项目负责人: 肖金刚

引用本文: 高俞锦, 彭双麟, 马治超, 陆诗, 曹花月, 王浪, 肖金刚. 糖尿病骨质疏松症模型小鼠脂肪干细胞的成骨能力 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(7):999-1004.



Abstract

BACKGROUND: Long noncoding RNA (LncRNA)-DANCR can regulate multiple biological processes, including bone metabolism. Our gene microarray results showed that LncRNA-DANCR was significantly overexpressed in diabetic osteoporosis mice.

OBJECTIVE: To investigate the effect of LncRNA-DANCR on the osteogenic ability of adipose stem cells in diabetic osteoporosis through Wnt/ β -catenin signaling pathway.

METHODS: Diabetic osteoporosis adipose-derived stem cells and control adipose-derived stem cells were isolated and cultured. After 3 days of osteogenic induction, real-time fluorescence quantitative PCR and western blot assay were used to examine the expression of LncRNA-DANCR, Wnt signaling molecules β -catenin and osteogenic transcription factors (RUNX2 and OPN). Diabetic osteoporosis adipose-derived stem cells transfected with LncRNA-DANCR-specific siRNA were designed. After 3 days of osteogenic induction, real-time fluorescence quantitative PCR, western blot assay and alkaline phosphatase staining were used to examine the expression of Wnt signaling molecules β -catenin, osteogenic transcription factors RUNX2 and OPN and osteogenic ability changes.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) After 3 days of osteogenic induction, the expression level of LncRNA-DANCR in diabetic osteoporosis adipose-derived stem cells group was significantly higher than that in control group. The expression levels of Wnt signaling molecule β -catenin and osteogenic transcription factors RUNX2 and OPN were significantly lower than those in control adipose-derived stem cells. (2) After 3 days of osteogenic induction, β -catenin and RUNX2 and OPN were highly expressed in the siRNA silent group, and the ability of bone formation was enhanced. (3) The results confirmed that LncRNA-DANCR decreased the osteogenic capacity of diabetic osteoporosis adipose-derived stem cells by inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Silencing of LncRNA-DANCR can restore the reduced osteogenic capacity.

Key words: long noncoding RNA; Wnt signaling pathway; diabetes; osteoporosis; osteogenic differentiation; bone repair

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81870746 (to XJG); the Science and Technology Strategic Cooperation Project of Luzhou Municipal People's Government-Southwest Medical University, No. 2020LZXNYDZ09 (to XJG)

How to cite this article: GAO YJ, PENG SL, MA ZC, LU S, CAO HY, WANG L, XIAO JG. Osteogenic ability of adipose stem cells in diabetic osteoporosis mice. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2022;26(7):999-1004.

0 引言 Introduction

糖尿病性骨质疏松症是由慢性高血糖、晚期糖化终末产物刺激和氧化应激引起的，是一种糖尿病常见并发症，糖尿病微环境往往破坏骨微结构，增加骨质疏松症的发生率和骨折风险，严重影响患者生活质量^[1-3]。糖尿病骨质疏松以及伴骨折或骨缺损的治疗是目前难以解决的医学难题。

长链非编码 RNA (long noncoding RNAs, LncRNA) 是一类长于 200 个核苷酸的非编码 RNA^[4]，通过多种方式对遗传、转录及转录后水平进行调控，可介导多种疾病的发生发展，其中包括骨质疏松症^[5-6]。

脂肪干细胞 (adipose-derived stem cells, ASCs) 因其具有自我更新能力、高增殖能力和成骨分化潜能，在组织工程和再生医学领域有着广阔的应用前景^[7]。课题组前期基因芯片分析结果表明糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 和对照组小鼠 ASCs 中 LncRNA-DANCR 表达存在统计学差异，糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 中 LncRNA-DANCR 显著高表达^[8]。同时，有研究表明 LncRNA-DANCR 可通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调节细胞成骨能力，激活该通路将导致骨量和骨强度增加，抑制该通路则导致骨量和骨强度降低^[9-10]。然而在糖尿病高糖环境下，LncRNA-DANCR 对糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 成骨能力的作用机制尚不清楚。

此次研究设计针对 LncRNA-DANCR 的 siRNA 转染糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs，检测 LncRNA-DANCR、Wnt 信号分子 β -catenin 以及成骨转录分子 (RUNX2、OPN) 的表达，并进行碱性磷酸酶染色检测糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 的成骨能力改变，探讨 LncRNA-DANCR 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路对糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 成骨能力的影响，以期对糖尿病骨质疏松症伴骨缺损的治疗提供新思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验，组间比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2020 年 5 月至 2021 年 2 月在西南医科大学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 雌性 C57 小鼠 20 只，3 周龄，体质量约 16 g，购于西南医科大学基础医学部实验动物中心。

1.3.2 实验仪器与试剂 荧光倒置显微镜 (OLYMPUS, 日本); 石蜡切片机 (Leica, 德国); 实时荧光定量 PCR 仪 (Thermo, 美国); PAGE 电泳仪和转膜仪 (Bio-Rad, 美国); SELLECK 自动转染仪 (Bimake, 美国); α -MEM 培养基 (Hyclone, 美国); 细胞 RNA 快速提取试剂盒 (天根, 中国); 反转录试剂盒 (Thermo, 美国); 荧光定量 PCR 试剂盒 (Qiagen, 德国); SDS-PAGE 凝胶试剂盒 (碧云天, 中国); C57 小鼠脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基 (赛业, 中国); JM-siRNA 干扰套装 (吉玛基因, 中国); riboFECT CP 转染试剂盒 (Ribobio, 中国); BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒 (Beyotime, 中国)。

1.4 实验方法

1.4.1 建立糖尿病骨质疏松小鼠模型 20 只 C57 小鼠随机分为对照组和糖尿病骨质疏松模型组，每组 10 只，糖尿病骨质疏松模型组小鼠给予高脂高糖饲料喂养 4 周，一次性腹腔注射链脲佐菌素 (120 mg/kg)，注射链脲佐菌素前禁食 (不禁水) 12 h 以上，注射后继续高脂高糖饲料喂养，当隔夜空腹血糖达到 11.2–16.7 mmol/L 为造模成功。对照组小鼠普通饲料喂养 4 周，注射等量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，注射后继续普通饲料喂养。

1.4.2 ASCs 分离、培养及鉴定 断颈法处死糖尿病骨质疏松小鼠和对照组小鼠，体积分数为 75% 乙醇消毒皮肤，沿腹股沟剪开皮肤，暴露皮下组织，仔细剥离腹股沟皮下脂肪组织，洗涤后的脂肪组织盛于洁净的培养皿中，用手术剪剪碎，之后将组织块分散铺于 T25 细胞培养瓶中，静置 5 min 左右，加入适量 α -MEM 培养基 (含体积分数为 10% 胎牛血清，1% 青链霉素)，置于 37 °C，体积分数为 5% CO₂ 恒温培养箱中培养，定期更换培养基，待细胞融合达 90% 后加入胰酶消化，按 1 : 1 比例传代。

将第 3 代 ASCs 常规消化离心，去上清，预冷的 PBS 重悬，分装于 6 个 1.5 mL EP 管中，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，每管加入 300 μ L PBS 重悬，其中 5 个管分别加入流

式抗体 CD29、CD44、CD90.2、CD34 和 CD45，预留 1 个管为空白对照，抗体孵育 20 min 后上流式细胞仪检测。

脂肪干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	C57 小鼠腹股沟脂肪
原代培养方法:	组织块贴壁法
基础培养基:	α -MEM 培养基
添加材料:	体积分数为 10% 无菌胎牛血清、1% 青霉素、1% 链霉素
原代培养时间:	原代细胞培养 24 h 后换液，第 4 天换液，之后 2 d 换液 1 次，培养 7 d 开始传代
细胞传代:	细胞融合至 90% 时加入胰酶消化按 1 : 1 或者 2 : 1 比例传代至第 2 代
细胞鉴定:	流式鉴定
伦理学批准:	实验方案经西南医科大学动物实验伦理委员会批准

1.4.3 基因芯片检测 LncRNA 水平 使用 Arraystar RNA Flag Labeling Kit 对第 3 代 ASCs 进行标记，使用 Agilent SureHyb 进行杂交实验，与芯片杂交后，经 Agilent DNA Microarray scanner 扫描得到荧光信号，Agilent GeneSpring GX v12.1 软件进行芯片标准化分析。

1.4.4 两组 ASCs 的成骨诱导分化 将第 2 代对照组小鼠 ASCs 和糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 以 5×10^4 个细胞密度接种于 6 孔板中，加入成骨诱导分化培养基培养 3 d，提取 RNA 和蛋白，进行 qRT-PCR 和 Western blot 检测。

1.4.5 qRT-PCR 检测 LncRNA-DANCR、Wnt 信号分子 β -catenin 和成骨转录因子 RUNX2、OPN 的 mRNA 表达 成骨诱导 3 d，应用 RNA 提取试剂盒从细胞中分离纯化总 RNA，RT 试剂盒反转录成 cDNA，qRT-PCR 进行 cDNA 扩增。引物序列见表 1。

表 1 | 基因引物序列

Table 1 | Gene primer sequences

基因名称	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
LncRNA-DANCR	CCT TGG TGG TGA GTG TCC TC	AAC TGC TCT ACC CCT CCG TT
β -catenin	GCT GCG TGG ACA ATG GCT ACT C	AGC GTC AAA CTG CGT GGA TGG
RUNX2	GAC TGT GGT TAC CGT CAT GGC	ACT TGG TTT TTC ATA ACA GCG GA
OPN	TCC CTC CCG GTG AAA GTG ACT G	TCC TCG CTC TCT GCA TGG TCT C
GAPDH	GGT GAA GGT CGG TGT GAA CG	CTC GCT CCT GGA AGA TGG TG

1.4.6 Western blot 检测 Wnt 信号分子及成骨转录因子的表达 成骨诱导 3 d，采用全蛋白提取试剂盒提取细胞全蛋白，配制 10% SDS-PAGE 胶，根据目的蛋白切取相应的凝胶，准备合适大小的 PVC 膜，采用湿转法转膜；用 TBST 配制 5% 脱脂奶封闭 PVC 膜 1 h，TBST 漂洗 3 次，10 min/次；加入对应的已稀释的一抗 β -Catenin(1 : 1 000, abcam, ab32572)，RUNX2(1 : 1 000, abcam, ab92336)，OPN(1 : 1 000, abcam, ab8448)，GAPDH(1 : 1 000, CST, 5174)，4 °C 冰箱摇床过夜，回收一抗后 TBST 漂洗 3 次，10 min/次，室温孵育二抗 1 h，TBST 漂洗 2 次，5 min/次。采用 ECL 发光液进行目的蛋白显影，分析各条带灰度值。

1.4.7 细胞转染 将第 2 代糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 以 5×10^4 个细胞密度接种于 6 孔板，分为空白对照组、阴性对照组、siRNA 沉默组，种板 48 h 后参照说明书，应用 SELLECK

自动转染仪进行 siRNA 转染沉默 LncRNA-DANCR，转染 24 h 后更换培养基为成骨诱导液，成骨诱导 3 d 后提取 RNA 和蛋白，通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 LncRNA-DANCR、Wnt 信号分子 β -catenin 和成骨转录因子 RUNX2、OPN 的表达。

1.4.8 碱性磷酸酶活性检测 取第 2 代糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 以 5×10^4 个细胞密度接种于 12 孔板，分为空白对照组、阴性对照组、siRNA 沉默组，种板 48 h 后应用 riboFECT CP 转染试剂盒，按照说明书步骤对细胞进行转染，转染 48 h 后换培养基为成骨诱导液，成骨诱导 3 d 和 5 d，弃孔板中的培养基，PBS 洗涤 1 次后每孔加入 1 mL 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min，丢弃多聚甲醛溶液，PBS 洗涤 1 次，将水完全吸干净，每孔缓慢加入 500 μ L 碱性磷酸酶染液，室温避光孵育 30 min 左右，显色至预期深浅后去除染色工作液，PBS 洗涤一两次后应用照相机拍摄以及荧光倒置显微镜下观察。

1.5 主要观察指标 ① LncRNA-DANCR 的表达；② Wnt 信号通路分子 β -catenin 的表达；③ 成骨分化相关因子 RUNX2、OPN mRNA 和蛋白水平表达；④ 碱性磷酸酶活性。

1.6 统计学分析 数据用 SPSS 17.0 统计软件行单因素方差分析，结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式进行资料描述。双侧 $\alpha=0.05$ ， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 两组小鼠 ASCs 的形态及流式鉴定结果 原代细胞从组织块边上爬出，贴壁，呈长梭形；第 1 代细胞界限清晰，呈长梭形，大小均匀，融合至 70%–80% 时呈漩涡状或者放射状排列，见图 1。流式细胞仪检测 CD29、CD44、CD90 呈阳性表达，CD34 和 CD35 呈阴性表达，见图 2。

2.2 两组小鼠 ASCs LncRNA-DANCR 基因芯片检测结果 在糖尿病性骨质疏松症组小鼠 ASCs 中 LncRNA-DANCR 的表达高于对照组小鼠 ASCs ($P < 0.05$)，见图 3。

2.3 两组小鼠 ASCs LncRNA-DANCR、Wnt 信号分子 β -catenin 和成骨转录因子 RUNX2、OPN 的表达差异 成骨诱导 3 d，与对照组小鼠 ASCs 相比，糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 中 LncRNA-DANCR 水平升高，Wnt 信号分子 β -catenin 以及成骨转录因子 RUNX2 和 OPN 的 mRNA、蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$)，见图 4、5。

2.4 siRNA 沉默糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 后 qRT-PCR 检测结果 与空白对照组和阴性对照组相比，siRNA 沉默组 LncRNA-DANCR 表达显著降低，Wnt 信号通路分子 β -catenin 以及成骨转录因子 RUNX2 和 OPN 表达均升高 ($P < 0.05$)，见图 6。

2.5 siRNA 沉默糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 后 Western blot 分析结果 与空白对照组和阴性对照组相比，siRNA 沉默组 Wnt 信号通路分子 β -Catenin 以及成骨分化相关蛋白 RUNX2 和 OPN 表达均显著增加 ($P < 0.05$)，见图 7。

2.6 碱性磷酸酶染色分析结果 成骨诱导第 3、5 天，与空白对照组和阴性对照组相比，siRNA 沉默组碱性磷酸酶染色更深，活性显著升高，见图 8、9。

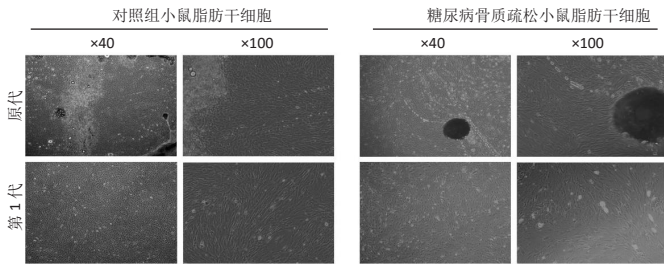
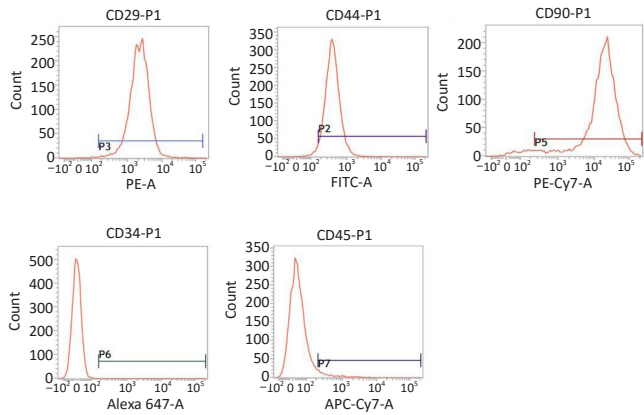


图1 | 原代和第1代对照组和糖尿病骨质疏松小鼠脂肪干细胞
Figure 1 | Passage 0 and Passage 1 of diabetic osteoporosis adipose-derived stem cells and control adipose-derived stem cells



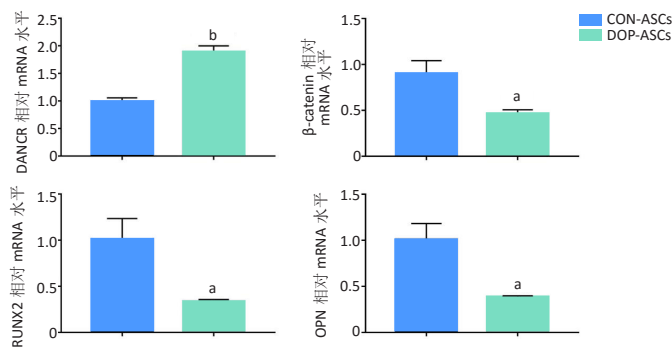
图注: CD29、CD44、CD90 的阳性表达率分别为 99.49%, 97.48%, 95.76%, CD34 和 CD45 的阳性表达率分别为 0.03%, 4.83%

图2 | 脂肪干细胞表面特异性抗原流式鉴定分析

Figure 2 | Flow cytometry analysis of adipose-derived stem cell surface specific antigen



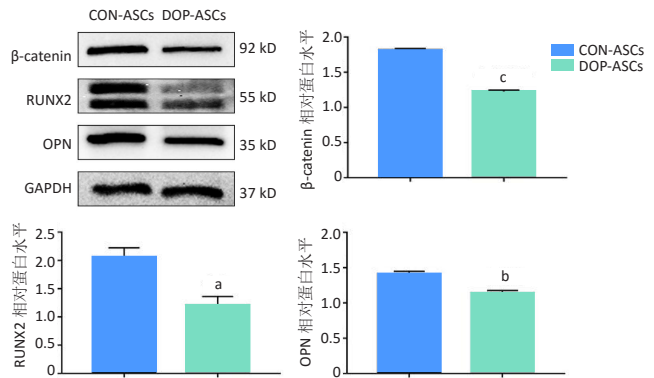
图注: 与 CON-ASCs 比较, $^aP < 0.001$ 。DOP-ASCs: 糖尿病性骨质疏松症小鼠脂肪干细胞; CON-ASCs: 对照组小鼠脂肪干细胞
图3 | 两组小鼠脂肪干细胞基因芯片检测结果
Figure 3 | Gene chip results of LncRNA-DANCR in mouse adipose-derived stem cells of both groups



图注: 与 CON-ASCs 比较, $^aP < 0.01$, $^bP < 0.001$ 。DOP-ASCs: 糖尿病性骨质疏松症小鼠脂肪干细胞; CON-ASCs: 对照组小鼠脂肪干细胞

图4 | qRT-PCR 检测两组小鼠脂肪干细胞中 LncRNA-DANCR、Wnt 信号分子 β -catenin 和成骨转录因子 RUNX2、OPN 的 mRNA 表达

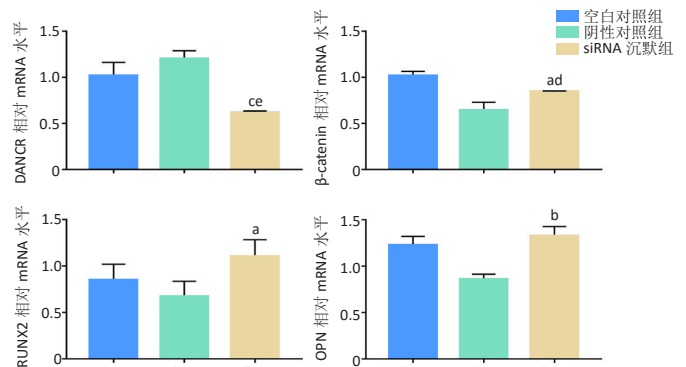
Figure 4 | Real-time fluorescence quantitative PCR results of the mRNA expression of LncRNA-DANCR, Wnt signaling molecule β -catenin and osteogenic transcription factor RUNX2 and OPN in mouse adipose-derived stem cells of both groups



图注: 与 CON-ASCs 比较, $^aP < 0.01$, $^bP < 0.001$, $^cP < 0.0001$ 。DOP-ASCs: 糖尿病性骨质疏松症小鼠脂肪干细胞; CON-ASCs: 对照组小鼠脂肪干细胞

图5 | Western blot 检测两组小鼠脂肪干细胞中 Wnt 信号分子 β -catenin 和成骨转录因子 RUNX2、OPN 的蛋白表达

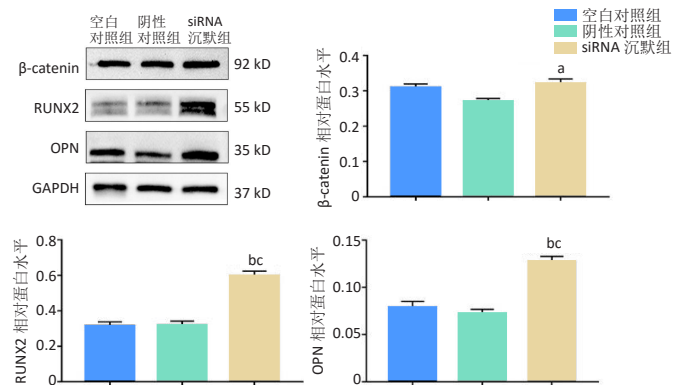
Figure 5 | Western blot assay results of the protein expression of Wnt signaling molecule β -catenin and transcription factor RUNX2 and OPN in mouse adipose-derived stem cells of both groups



图注: 与阴性对照组比较, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$, $^cP < 0.001$; 与空白对照组比较, $^dP < 0.05$, $^eP < 0.01$ 。DOP-ASCs: 糖尿病性骨质疏松症小鼠脂肪干细胞

图6 | qRT-PCR 检测各组 DOP-ASCs 中 LncRNA-DANCR、 β -catenin、RUNX2 和 OPN 的 mRNA 表达

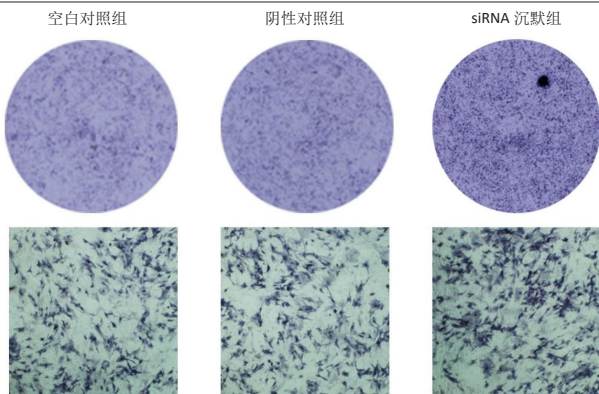
Figure 6 | Real-time fluorescence quantitative PCR results of the mRNA expression of LncRNA-DANCR, β -catenin, RUNX2, and OPN in diabetic osteoporosis adipose-derived stem cells of each group



图注: 与阴性对照组比较, $^aP < 0.01$, $^bP < 0.001$; 与空白对照组比较, $^cP < 0.0001$ 。DOP-ASCs: 糖尿病性骨质疏松症小鼠脂肪干细胞

图7 | Western blot 检测各组 DOP-ASCs 中 β -catenin、RUNX2 和 OPN 的蛋白表达

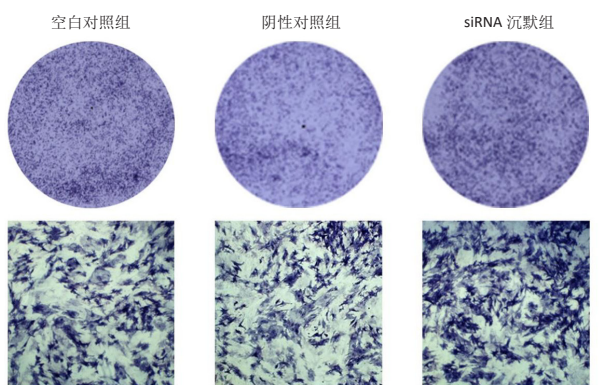
Figure 7 | Western blot assay results of the protein expression of β -catenin, RUNX2, and OPN in diabetic osteoporosis adipose-derived stem cells of each group



图注：与空白对照组和阴性对照组相比，siRNA 沉默组碱性磷酸酶染色更深，活性显著升高

图 8 | 成骨诱导第 3 天各组糖尿病性骨质疏松症小鼠脂肪干细胞的碱性磷酸酶染色结果 (×40)

Figure 8 | Results of alkaline phosphatase staining after three days of osteogenic induction in diabetic osteoporosis adipose-derived stem cells of each group (×40)



图注：与空白对照组和阴性对照组相比，siRNA 沉默组碱性磷酸酶染色更深，活性显著升高

图 9 | 成骨诱导第 5 天各组糖尿病性骨质疏松症小鼠脂肪干细胞的碱性磷酸酶染色结果 (×40)

Figure 9 | Results of alkaline phosphatase staining after 5 days of osteogenic induction in diabetic osteoporosis adipose-derived stem cells of each group (×40)

3 讨论 Discussion

糖尿病性骨质疏松症是糖尿病常见的并发症，其特征是糖尿病并发骨量丧失和骨结构退化。正常骨结构的丧失以及持续的糖尿病微环境可影响新生骨小梁和骨微结构的形成，进一步影响糖尿病性骨质疏松症骨折的愈合^[11-13]。目前，糖尿病骨质疏松症患者骨折或骨缺损的治疗仍面临着巨大挑战。

以种子细胞、支架材料和生长因子为基础的骨组织工程为骨折、骨缺损、肿瘤等引起的骨量不足修复提供了一种有前途的方法^[14-15]。ASCs 作为多功能干细胞，具有多向分化潜能，同时可分泌生长因子，引起旁分泌和自分泌反应，可诱导骨再生。ASCs 可大量获得，获取方式创伤小，较少有供体部位的发病或患者的不适^[14, 16]，由此被认为是用于骨组织工程的很有前景的种子细胞^[17]。该实验获取 C57 小鼠腹股沟脂肪，采用组织块法分离培养 ASCs，发现糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 成骨能力降低，通过基因修饰后再进行成骨诱

导，为骨质疏松症伴骨缺损的骨再生和骨重建提供一种新的选择。

LncRNA 作为表观遗传调节因子，可通过染色质修饰、转录和转录后水平调控基因表达，影响了包括骨代谢在内的多个生物学过程^[18]，可参与调控成骨细胞相关的骨形成和破骨细胞相关的骨重塑^[19]。LncRNA 的异常水平往往与人类疾病的发生发展密切相关^[4]。LncRNA-DANCR 自从被发现可抑制祖细胞分化以来，其在骨代谢失衡疾病中的作用引起了广泛关注^[20]。该实验中，基因芯片和体外验证结果均显示，与对照组小鼠 ASCs 相比，糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 中 LncRNA-DANCR 表达升高，同时成骨转录因子 RUNX2 和 OPN 在 mRNA 和蛋白水平表达均降低，表明高水平的 LncRNA-DANCR 可能减弱糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 的成骨能力。

经典 Wnt 信号通路已被证明参与多种细胞过程，包括干细胞增殖分化以及骨代谢平衡等，通过调节转录共激活因子 β -catenin 的泛素化降解以及核转移控制关键的基因表达程序，包括下游成骨关键信号分子 RUNX2 和 OPN 的表达^[21-23]。有研究表明 LncRNA-DANCR 通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路抑制人牙髓细胞成牙细胞样分化^[24]。JIANG 等^[25]发现 LncRNA-DANCR 可通过影响成骨细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路从而影响其骨向分化。实验结果显示糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 中 β -catenin 表达降低，说明糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 中 Wnt/ β -catenin 信号通路被抑制。随后，实验设计了 LncRNA-DANCR 特异性 siRNA 转染糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs，结果显示 LncRNA-DANCR 表达降低，Wnt 信号分子 β -catenin 和成骨转录因子 RUNX2 和 OPN 在 mRNA 和蛋白水平表达均升高，碱性磷酸酶的分泌及矿化亦增加，说明沉默 LncRNA-DANCR 可激活 Wnt/ β -catenin 信号通路，从而增强糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 的骨向分化和骨形成能力。然而，依据国内外研究结果，LncRNA 可能通过 ceRNA 机制内源性竞争或者通过改变 DNA 甲基化程度调控相关 mRNA 的表达和转录^[8-9]，LncRNA-DANCR 在糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 中表达增高以及对 β -catenin 信号分子的具体作用机制还有待进一步研究。

综上所述，LncRNA-DANCR 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路降低了糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 成骨分化及骨形成能力，沉默 LncRNA-DANCR 可增强糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 的成骨能力，为 LncRNA-DANCR 作为靶点修饰糖尿病性骨质疏松症小鼠 ASCs 治疗糖尿病骨质疏松症伴骨缺损提供实验基础。

作者贡献：实验设计为高俞锦、马治超，实验实施为高俞锦，实验评估为彭双麟、王浪、陆诗，资料收集为曹花月，文章撰写为高俞锦。

经费支持：该文章接受了“国家自然科学基金项目(81870746)”和“泸州市人民政府-西南医科大学科技战略合作项目(2020LZXNYDZ09)”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: 实验方案经西南医科大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 201905-8。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南医科大学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

[1] 唐辉, 姚志浩, 罗道文, 等. 高脂高糖饮食结合链脲佐菌素建立 2 型糖尿病性骨质疏松症大鼠模型 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(8): 1207-1211.

[2] ALA M, JAFARI RM, DEHPOUR AR. Diabetes Mellitus and Osteoporosis Correlation: Challenges and Hopes. *Curr Diabetes Rev.* 2020;16(9): 984-1001.

[3] MOHSIN S, BANIIYAS MM, ALDARMAKI RS, et al. An update on therapies for the treatment of diabetes-induced osteoporosis. *Expert Opin Biol Ther.* 2019;19(9):937-948.

[4] TANIUE K, AKIMITSU N. The Functions and Unique Features of LncRNAs in Cancer Development and Tumorigenesis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2): 632.

[5] 李生强, 谢冰颖, 陈娟, 等. 绝经后骨质疏松症关联长链非编码 RNA uc431+ 相互作用蛋白质组学分析 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(11):1641-1646.

[6] YANG Y, YUJIAO W, FANG W, et al. The roles of miRNA, lncRNA and circRNA in the development of osteoporosis. *Biol Res.* 2020;53(1):40.

[7] KUTERBEKOV M, JONAS AM, GLINEL K, et al. Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stromal Cells: From Bench to Clinics. *Tissue Eng Part B Rev.* 2020;26(5):461-474.

[8] PENG S, SHI S, TAO G, et al. JKAMP inhibits the osteogenic capacity of adipose-derived stem cells in diabetic osteoporosis by modulating the Wnt signaling pathway through intragenic DNA methylation. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):120.

[9] WANG CG, HU YH, SU SL, et al. LncRNA DANCR and miR-320a suppressed osteogenic differentiation in osteoporosis by directly inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Exp Mol Med.* 2020; 52(8):1310-1325.

[10] BARON R, KNEISSEL M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med.* 2013;19(2):179-192.

[11] MOHSIN S, KAIMALA S, SUNNY JJ, et al. Type 2 Diabetes Mellitus Increases the Risk to Hip Fracture in Postmenopausal Osteoporosis by Deteriorating the Trabecular Bone Microarchitecture and Bone Mass. *J Diabetes Res.* 2019;2019:3876957.

[12] SHAO X, YANG Y, TAN Z, et al. Amelioration of bone fragility by pulsed electromagnetic fields in type 2 diabetic KK-Ay mice involving Wnt/ β -catenin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2021;320(5): E951-E966.

[13] 刘梅, 张君, 王旭霞. 糖尿病大鼠牙槽骨密度与全身骨密度变化的相关实验研究 [J]. 华西口腔医学杂志, 2009, 27(4):451-454.

[14] TAJIMA S, TOBITA M, MIZUNO H. Current status of bone regeneration using adipose-derived stem cells. *Histol Histopathol.* 2018;33(7): 619-627.

[15] 彭双麟, 姚志浩, 罗道文, 等. 多孔双相磷酸钙陶瓷修复骨质疏松症大鼠颅骨极量缺损的实验研究 [J]. 口腔医学研究, 2019, 35(4): 377-381.

[16] STORTI G, SCIOLI MG, KIM BS, et al. Adipose-Derived Stem Cells in Bone Tissue Engineering: Useful Tools with New Applications. *Stem Cells Int.* 2019;2019:3673857.

[17] BARBA M, DI TARANTO G, LATTANZI W. Adipose-derived stem cell therapies for bone regeneration. *Expert Opin Biol Ther.* 2017;17(6): 677-689.

[18] MERCER TR, DINGER ME, MATTICK JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet.* 2009;10(3):155-159.

[19] KO NY, CHEN LR, CHEN KH. The Role of Micro RNA and Long-Non-Coding RNA in Osteoporosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14):4886.

[20] PENG S, CAO L, HE S, et al. An Overview of Long Noncoding RNAs Involved in Bone Regeneration from Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2018;2018:8273648.

[21] WANG Y, LI YP, PAULSON C, et al. Wnt and the Wnt signaling pathway in bone development and disease. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2014; 19:379-407.

[22] MAEDA K, KOBAYASHI Y, KOIDE M, et al. The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling. *Int J Mol Sci.* 2019;20(22): 5525.

[23] LI X, YANG J, BAO M, et al. Wnt signaling in bone metastasis: mechanisms and therapeutic opportunities. *Life Sci.* 2018;208:33-45.

[24] CHEN L, SONG Z, HUANG S, et al. lncRNA DANCR suppresses odontoblast-like differentiation of human dental pulp cells by inhibiting wnt/ β -catenin pathway. *Cell Tissue Res.* 2016;364(2):309-318.

[25] JIANG SY, MIAO YX, HIROKAZU T, et al. Effects of lncRNA DANCR on proliferation and differentiation of osteoblasts by regulating the Wnt/ β -catenin pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23(13): 5558-5566.

(责任编辑: MZH, ZN, JY)