

长链非编码 RNA 作为绝经后妇女诊断骨质疏松标志物的可行性研究

彭松林 王尚 王振民 龙灿玲 唐莞泽 贺小琴 陈高扬

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)NONHSAT005760.2 在绝经后骨质疏松妇女和骨量正常妇女外周血中的表达差异, 以及其在人骨髓间充质干细胞(h-BMSCs)成骨分化过程中的作用。方法 收集 2019 年全年在我院体检病人样本, 选取 30 例骨密度 T 值 ≥ -1 SD 妇女纳入骨量正常组, 30 例 T 值 ≤ -2.5 SD 的妇女纳入骨质疏松组。病人年龄为 55~70 岁, 平均为 60 岁。抽取两组病人少量外周血并提取外周血单个核细胞(PBMC)中的 RNA 进行 lncRNA 高通量测序, 通过大数据分析和实时荧光定量 PCR(qPCR)检测外周血 PBMC 细胞中 lncRNA 的差异表达情况。qPCR 检测差异表达的 lncRNA 在 h-BMSCs 成骨分化过程中的差异表达量。结果 与骨量正常组相比, 骨质疏松组病人外周血中 lncRNA(NONHSAT005760.2)含量明显上调($P < 0.01$), 同时在 hBMSC 诱导成骨分化过程中, NONHSAT005760.2 的表达量随着诱导时间延长而降低。结论 NONHSAT005760.2 在骨质疏松病人外周血中高表达, 而在成骨分化过程中含量显著下降, 表明其与骨质疏松密切相关, 有望成为骨质疏松症的分子标志物。

【关键词】 长链非编码 RNA; 绝经后骨质疏松; 高通量测序; 分子标志物

Long Non - coding RNA Expression Profile and the Screening of Potential Biomarkers in Postmenopausal Osteoporosis. PENG Song-lin, WANG Shang, WANG Zhen-min, LONG Can-ling, TANG Wan-ze, HE Xiao-qin, CHEN Gao-yang. Department of Spine Surgery, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, China

Corresponding author: CHEN Gao-yang, E-mail: chen199001207@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression differences of long non - coding RNA (NONHSAT005760.2) in postmenopausal osteoporosis and normal bone mass female patients and its role in osteoblastic differentiation of human bone mesenchymal stem cells (h - BMSCs). **Methods** The samples of patients undergoing physical examinations in our hospital throughout 2019 were collected, and 30 women with bone mineral density T value ≥ -1 SD were selected as the normal bone mass group (30 cases), and 30 women with T value ≤ -2.5 SD served as the osteoporosis group. The age was 55 to 70 years old (mean 60 years old). The relative expression level of lncRNA in blood was detected by lncRNA sequencing and qPCR. qPCR was used to detect the expression of differential lncRNA during osteogenic differentiation of hBMSCs. **Results** As compared with normal bone mass group, the level of lncRNA (NONHSAT005760.2) in the peripheral blood of patients in the osteoporosis group was significantly increased ($P < 0.01$), and that was increased during osteoblastic differentiation of h - BMSCs. **Conclusion** NONHSAT005760.2 is highly expressed in the peripheral blood of patients with osteoporosis, and its content decreases significantly during the process of osteogenic differentiation, indicating that it is closely related to osteoporosis and is expected to become a molecular marker of osteoporosis.

【Key words】 Long non-coding RNA; Postmenopausal osteoporosis; Sequencing; Biomarker

骨质疏松症是一种以骨量减少和骨微结构破坏

为特征, 导致脆性增加, 易发生骨折的复杂、多因素全身性慢性骨骼疾病, 发病人集中在绝经后女性^[1]。随着老龄化现象的加剧, 骨质疏松症的发病人数逐年增加, 给病人带来了全身骨痛、骨折、身高变矮等痛苦和伤害, 同时也给社会和家庭带来了沉重的经济和生活负担^[2-3]。因为骨质疏松发生和发

DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2022.01.012

基金项目: 深圳市科创委项目(JCYJ20180305164659637, JCYJ-20190806160407178, JCYJ20180305164544288, JSGG201805041704-27135, SGLH20180625141602256, JCYJ2017041362104773)

作者单位: 深圳市人民医院脊柱外科, 广东深圳 518020

通信作者: 陈高扬, E-mail: chen199001207@163.com

展的隐匿性,往往是病人发生骨质疏松骨折后入院治疗才得以发现。因此,骨质疏松的早期筛查和诊断是预防和治疗的关键。骨质疏松症的病理过程受诸如局部和全身激素、遗传调节剂和生活条件等复杂因素的影响^[4]。近几年来,作为疾病分子标记物和潜在药物靶点的长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 的相关研究迅速发展,已有研究表明 lncRNA 与人类疾病的发生、发展和防治有密切关联,在免疫系统疾病、心血管疾病和肿瘤等疾病中发挥重要作用^[5-7]。此外,已有研究报道指出 lncRNA 参与了成骨细胞的分化^[8-10],说明 lncRNA 在骨质疏松症中扮演着重要角色。本研究拟从 lncRNA 层面分析骨质疏松和骨量正常绝经后妇女外周血中 lncRNA 的差异表达并检测其在人骨髓间充质干细胞(h-BMSCs)成骨分化过程中的含量变化,探讨其作为诊断骨质疏松分子标志物的可行性。

资料与方法

一、纳入标准与排除标准

纳入标准:①年龄为 55~70 岁;②绝经后女性;③无影响骨代谢药物史;④无其他炎性疾病及外伤。

排除标准:①肿瘤;②原发性或继发性甲状旁腺疾病;③肝肾功能异常;④严重心脏疾病;⑤糖尿病;⑥严重胃肠道疾病,如结直肠癌、炎症性肠病、肠易激综合征、长期腹泻、便秘;⑦严重自免疫型疾病,如类风湿性关节炎、红斑狼疮;⑧正在服用皮质类固醇类激素或近 3 个月曾服用此类激素;⑨近一个月服用抗生素。

二、研究对象

收集 2019 年全年在本院体检女性的临床资料,根据双能 X 射线骨密度扫描结果,选取 30 例骨密度 T 值 ≥ -1 SD 妇女纳入骨量正常组(30 例),30 例 T 值 ≤ -2.5 SD 的妇女为骨质疏松组,建立临床样品库。经病人知情同意后抽取部分外周血,分离其外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)并通过高通量测序检测 PBMC 中 lncRNA 的表达。

三、试剂和设备

BD-10mL EDTA 真空管采血管(沈阳宝康生物工程技术有限公司,中国);人外周血淋巴细胞分离液(深圳市达科为生物技术股份有限公司,中国);RNA 提取试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司,中国);lncRNA 文库构建和测序(深圳市华大基因,中国);逆转录试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司,中国);成骨诱导液(赛业生物科技有限公司,中国);h-

BMSCs 培养基(Gibco,美国);胎牛血清(Gibco,美国);核酸检测仪 nanodrop2000[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,美国];高速离心机[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,美国];qPCR 仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司,美国]。

四、研究方法

(一)外周血中 lncRNA 相对表达水平的检测

取骨质疏松组和骨量正常组外周血 PBMC,严格按照 RNA 提取试剂盒的说明书提取总 RNA, nanodrop2000 检测 RNA 浓度,琼脂糖凝胶检测 RNA 完整性以及基因组污染情况。利用 Qubit2.0 RNA 检测试剂盒对 Total RNA 精确定量,以确定文库构建所加入 Total RNA 的量。根据 VAHTS™ Stranded mRNA-seq Library Prep Kit for Illumina®试剂盒构建 lncRNA 文库并扩增,上机高通量测序分析差异 lncRNA。

(二)PCR 检测外周血 PBMC 中差异表达 lncRNA 的相对表达水平

取 PBMC 细胞,使用 Trizol 提取细胞总 RNA,检测其浓度与纯度,将总 RNA 反转录为 cDNA。反转录条件:37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ 30 min。然后根据实时荧光定量 PCR 进行检测,结果以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法计算目的基因相对表达量。引物序列见表 1。

(三)h-BMSCs 的培养及成骨诱导

h-BMSCs 购自于 ATCC 细胞库,使用的培养基为 α -MEM,内含 10% 胎牛血清与抗生素(青霉素 100 U/mL 和链霉素 100 μ g/mL),于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。h-BMSCs 细胞以 5×10^4 个/皿接种于六孔板,待细胞铺满板底约 60% 时(记为成骨诱导第 0 天),换成成骨诱导液培养。成骨诱导开始后每 2 d 换液,分批次共诱导培养 3、7、14 d。换液时弃原成骨诱导液,然后配置新鲜的成骨诱导液,以每孔 2.5 mL 加入六孔板中,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

(四)茜素红染色检测成骨效果

将 h-BMSCs 接种在 24 孔板中,分为对照组和成骨诱导组。对照组常规培养基培养,成骨诱导组换成成骨诱导液培养 14 d 后,4% 多聚甲醛固定,按照茜素红染液说明书进行染色操作,检测细胞成骨效果。

(五)qPCR 检测诱导过程中成骨相关基因的表达

将成骨诱导分化过程中的 h-BMSCs 细胞(0、3、7、14 d)加入 RNA 提取试剂-Trizol。RNA 提取和逆转录方法同研究方法(二),检测成骨相关基因碱性

表 1 引物序列信息		
基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
NONHSAT005760.2	GATGCTATTGAAGACAGCAGAC	TCGACTCTGAAGTTTCTGGAAG
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGA
OCN	CACTCCTCGCCCTATTGGC	CCCTCCTGCTTGACACAAAG
OPN	GAAGTTTGCAGACCTGACAT	GTATGCACCATTGAACTCTCG
RUNX2	TGGTTACTGTCATGGCGGGTA	TCTCAGATCGTTGAACCTTGCTA
ALP	ACTGGGGCTGAGATACCC	TCGTGTTGACTGGTTAAAGC

磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、Runt 相关转录因子 2(Runx2)、骨钙素(osteocalcin, OCN)及骨桥蛋白(osteopontin, OPN)mRNA 的表达。引物序列见表 1。

(六)qPCR 检测差异表达的 lncRNA 在成骨分化过程中的表达量

提取 0、3、7、14 d 的 h-BMSCs 细胞的 RNA 并按照反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA,最后把其作为模板通过 qPCR 检测差异 lncRNA 的表达水平,内参基因为 GAPDH,上海生工生物工程股份有限公司协助完成引物设计和合成,序列见表 1。

五、统计学分析

采用 SPSS 20.0(IBM 公司,美国)对数据进行统计分析,正态分布的计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、外周血中 lncRNA 的差异表达情况

热图显示,与骨量正常组相比,骨质疏松组外周血 PBMC 细胞中存在 15 个差异表达的 lncRNA ($P < 0.05$)(图 1),其中 NONHSAT005760.2 表达量明显上

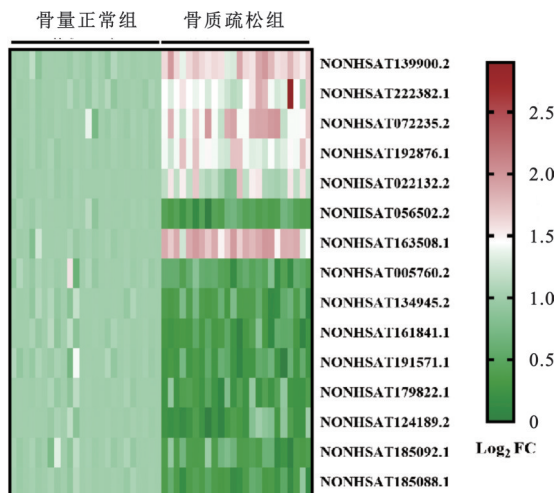


图 1 外周血中 lncRNA 的差异表达情况

调($P < 0.01$)。

二、外周血 PBMC 中 NONHSAT00-5760.2 的相对表达水平

qPCR 检测结果显示,骨质疏松组病人外周血中 NONHSAT005760.2 的表达量明显上升 ($P < 0.05$)

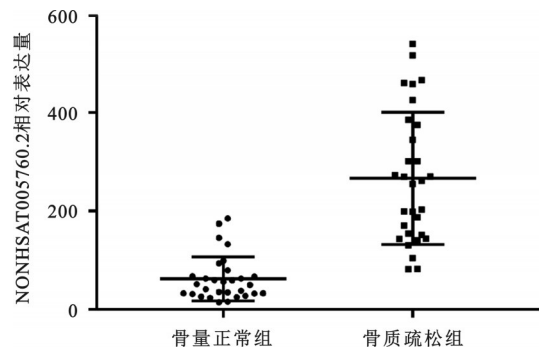


图 2 NONHSAT005760.2 在临床病人外周血中的表达

(图 2)。

三、茜素红染色结果和成骨相关基因表达

在 h-BMSCs 成骨诱导 14 d 过程中,成骨相关基因 ALP、Runx2、OCN、OPN 的表达均明显上调(图 3),同时诱导 14 d 后茜素红染色结果显示钙沉积明显,基因和形态学结果均表明成骨诱导成功(图 4)。

四、NONHSAT005760.2 在 h-BMSCs 成骨分化过程中的表达

qPCR 检测结果显示 NONHSAT005760.2 的表达在 h-BMSCs 成骨分化过程中随着时间延长而降低(图 5),表明 NONHSAT005760.2 的表达与成骨呈负相关。

讨 论

随着高通量测序技术的飞速发展,原本被认为是“转录噪音”的 lncRNA 逐渐被证实在多种不同的生物学过程中发挥着重要作用。lncRNA 是一类长度超过 200 个核苷酸,但不能翻译成蛋白质的 RNA 分子,其主要作用为信号分子,具有作为生物标记物

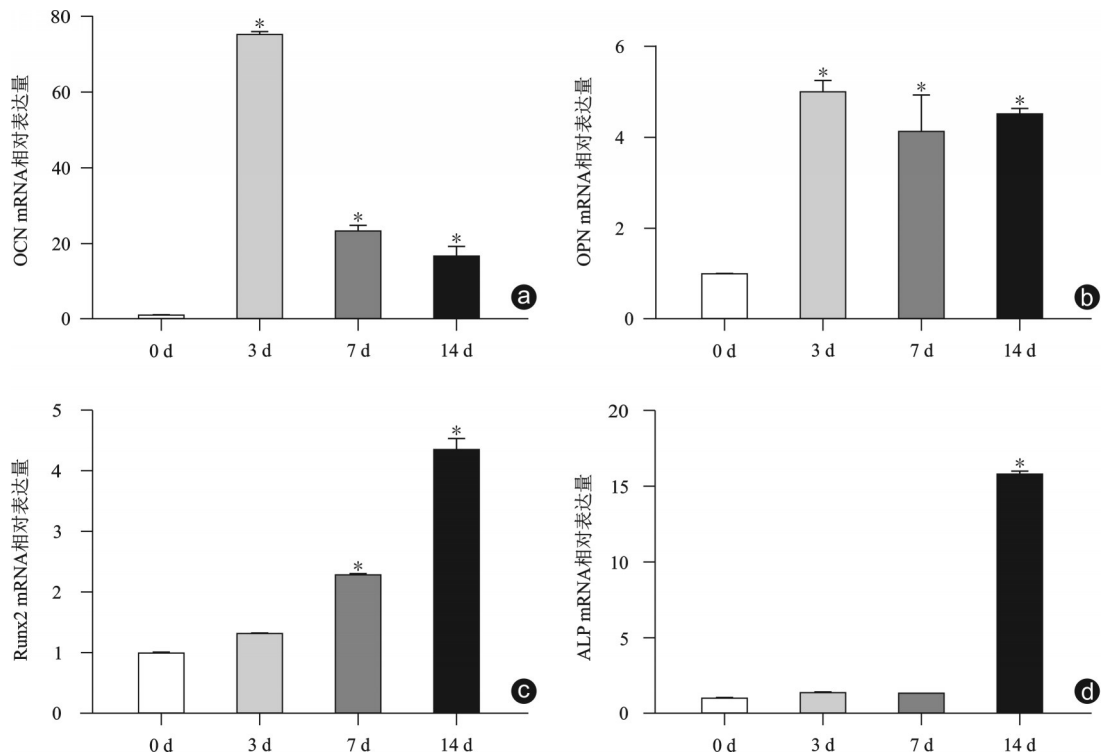


图3 成骨相关基因的表达(与0 d比较, $P < 0.05$)

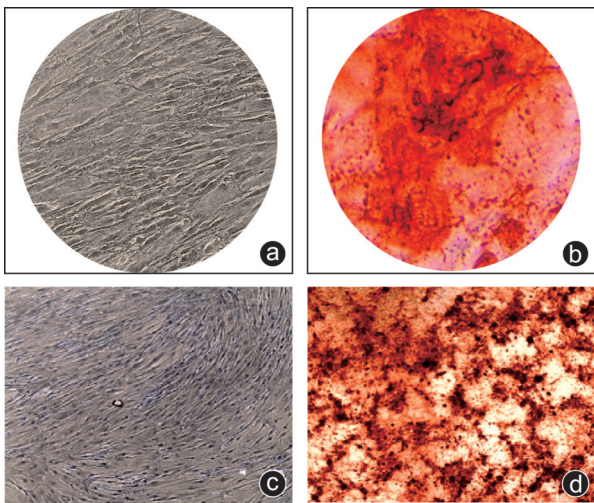


图4 成骨诱导14 d后茜素红染色结果 a: 对照组, $\times 40$; b: 成骨诱导组, $\times 40$; c: 对照组, $\times 100$; d: 成骨诱导组, $\times 100$

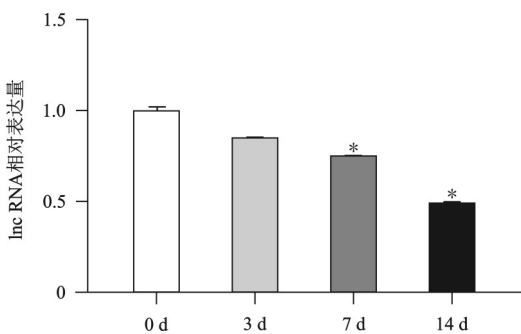


图5 成骨分化过程中lncRNA NONHSAT005760.2的相对表达情况(与0 d比较, $P < 0.05$)

的潜能,且能调控基因转录。lncRNAs作为复杂有机体分子生物学的前沿研究领域,有其独特的生物学特性及待开发潜力。lncRNAs通常比mRNAs的表达水平低,其表达具有细胞和组织特异性,可用于特定疾病的预测和诊断。越来越多研究发现,lncRNAs几乎参与调控基因表达的每一个阶段^[11-13]。

目前研究表明骨质疏松症与遗传、雌激素、营养和生活方式密切相关,主要发病机制是雌激素缺乏导致破骨细胞增殖分化,破骨细胞功能活跃,同时抑制破骨细胞凋亡,从而使骨吸收速度超过骨形成速度,造成骨质有机物和无机物成比例地减少^[14]。另外,雌激素受体、维生素D受体、I型胶原和转化因子- β 等基因多态性也与骨质疏松关系密切^[15]。

目前临床上骨质疏松症病人以绝经后女性居多,其发病隐匿,经常是病人在骨折发生后做手术时才知道患有骨质疏松,因此本研究旨在通过收集绝经后女性外周血样本进行高通量测序,从而寻找骨质疏松相关的早期标志物,以期临床骨质疏松的早期诊断提供参考。关于非编码RNA近年来才展开对其功能的研究^[16],其中lncRNA作为其主要成员之一^[7],在多种疾病中均被发现异常表达,但是其具体是通过何种机制如何发挥功能的,目前还处于一个相对空白的阶段。lncRNA的异常表达,增多或者减少,均提示癌症进展的一些阶段,甚至可以预测

早期癌症治疗的疗效^[17]。然而,当前骨质疏松症 lncRNA 的研究主要采用了芯片技术以及 qPCR 方法,低通量和小样本量进行局部研究。随着二代高通量测序技术的发展,lncRNA 测序技术在该领域研究中将有很大的应用前景和技术优势。在骨质疏松领域,目前有报道发现 lncRNA 在骨质疏松的发生、发展中也发挥着重要作用^[18]。本研究发现 NONHSAT005760.2 在骨质疏松绝经后妇女外周血中明显高表达,同时在 h-BMSCs 成骨分化过程中低表达,表明其与骨质疏松密切相关。可作为预测骨质疏松的指标。提示 lncRNA NONHSAT005760.2 有望成为绝经后妇女骨质疏松诊断的分子标志物,为骨质疏松的防治提供了新的思路。但 lncRNA NONHSAT005760.2 与骨质疏松症的具体作用通路和下游具体分子机制尚不明确, NONHSAT005760.2 的下游通路和对成骨的具体作用机制是我们下一步研究的重要方向,亟待我们进一步探究。

参 考 文 献

- [1] Eastell R, O'Neill TW, Hofbauer LC, et al. Postmenopausal osteoporosis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16069.
- [2] 姜剑魁, 宋晓燕. 绝经后妇女的生殖特征和骨密度相关性研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(3): 330-333, 365.
- [3] 孙国平, 罗选翔, 潘彬. 绝经后骨质疏松症的预防和药物联合序贯治疗[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(33): 5385-5390.
- [4] Chen Y, Wang X, Cheng J, et al. MicroRNA - 20a - 5p targets RUNX3 to regulate proliferation and migration of human hepatocellular cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(6): 3379-3386.
- [5] Khorkova O, Hsiao J, Wahlestedt C. Basic biology and therapeutic implications of lncRNA[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 87: 15-24.
- [6] Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, et al. Expression of a non-coding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase[J]. *Nat Med*, 2008, 14(7): 723-730.
- [7] Wu Z, Liu X, Liu L, et al. Regulation of lncRNA expression[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2014, 19(4): 561-575.
- [8] Zhu L, Xu PC. Downregulated lncRNA - ANCR promotes osteoblast differentiation by targeting EZH2 and regulating Runx2 expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 432(4): 612-617.
- [9] Xu Y, Wang S, Tang C, et al. Upregulation of long non-coding RNA HIF 1 α -anti-sense 1 induced by transforming growth factor- β -mediated targeting of sirtuin 1 promotes osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 7233-7238.
- [10] Tong X, Gu PC, Xu SZ, et al. Long non-coding RNA - DANCR in human circulating monocytes: a potential biomarker associated with postmenopausal osteoporosis[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2015, 79(5): 732-737.
- [11] Wang J, Su Z, Lu S, et al. lncRNA HOXA - AS2 and its molecular mechanisms in human cancer[J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 485: 229-233.
- [12] Yang Z, Jiang S, Shang J, et al. lncRNA: shedding light on mechanisms and opportunities in fibrosis and aging[J]. *Ageing Res Rev*, 2019, 52: 17-31.
- [13] Jarroux J, Morillon A, Pinskaya M. History, discovery, and classification of lncRNAs[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1008: 1-46.
- [14] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation[J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 337-342.
- [15] Riggs LB, Nguyen TV, Melton JL 3rd, et al. The contribution of vitamin D receptor gene alleles to the determination of bone mineral density in normal and osteoporotic women[J]. *J Bone Miner Res*, 1995, 10(6): 991-996.
- [16] Esteller M. Non-coding RNAs in human disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(12): 861-874.
- [17] Matsui M, Corey DR. Non-coding RNAs as drug targets[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3): 167-179.
- [18] 陈娟, 谢丽华, 李生强, 等. lncRNA 在绝经后骨质疏松症肾阴虚证中的表达特征及调控网络分析[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(5): 553-559.

(收稿日期: 2021-01-23)
(本文编辑: 龚哲妮)

引用格式

彭松林, 王尚, 王振民, 等. 长链非编码 RNA 作为绝经后妇女诊断骨质疏松标志物的可行性研究[J]. *骨科*, 2022, 13(1): 52-56. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2022.01.012.