

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.10.002  
文章编号: 1005-8982(2020)10-0006-08

## 长链非编码 RNA MEF2C-AS1 调控 成骨细胞功能的机制研究

何洋洋<sup>1</sup>, 王力刚<sup>2</sup>, 赵玉驰<sup>2</sup>

(1. 南华大学附属邵阳医院 骨科, 湖南 邵阳 422000; 2. 深圳市盐田区人民医院  
骨科, 广东 深圳 518000)

**摘要:** **目的** 探讨长链非编码 RNA MEF2C-AS1 通过肌细胞增强因子 2C (MEF2C) 基因对成骨细胞的影响。**方法** 培养人成骨细胞系 hFOB1.19, 转染过表达 MEF2C-AS1 质粒, 检测过表达 MEF2C-AS1 组的碱性磷酸酶 (ALP) 活性变化; 通过小干扰 RNA 沉默 MEF2C-AS1, 用 qRT-PCR、Western blotting 检测 MEF2C-AS1 水平变化对 MEF2C、SOST 基因的 mRNA、蛋白水平的影响, 再同时过表达 MEF2C-AS1、MEF2C, 检测 SOST 基因表达水平变化。**结果** 过表达 MEF2C-AS1 组 MEF2C、SOST mRNA 和蛋白相对表达量较对照组低 ( $P < 0.05$ )。过表达 MEF2C-AS1 组 ALP 活性较对照组高 ( $P < 0.05$ )。沉默 MEF2C-AS1 组 MEF2C、SOST mRNA 和蛋白相对表达量较对照组高 ( $P < 0.05$ )。过表达 MEF2C-AS1 组 SOST mRNA 和蛋白相对表达量较对照组低 ( $P < 0.05$ )。过表达 MEF2C-AS1+MEF2C 组 SOST mRNA 和蛋白相对表达量较过表达 MEF2C-AS1 组高 ( $P < 0.05$ )。**结论** MEF2C-AS1 可通过抑制 MEF2C 进一步抑制 SOST 基因的表达, 促进成骨细胞的分化成熟。

**关键词:** 骨质疏松症; 成骨细胞; 肌细胞增强因子 2C/ 基因; 骨硬化蛋白 / 蛋白; 长链非编码 RNA  
**中图分类号:** R580 **文献标识码:** A

## Study on mechanism of lncRNA MEF2C-AS1 regulating osteoblast function

Yang-yang He<sup>1</sup>, Li-gang Wang<sup>2</sup>, Yu-chi Zhao<sup>2</sup>

(1. Department of Orthopaedics, Shaoyang Affiliated Hospital of University of South China, Shaoyang, Hunan 422000, China; 2. Department of Orthopaedics, Shenzhen Yantian District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

**Abstract: Objective** To investigate whether long non-coding RNA (lncRNA) MEF2C-AS1 can affect the expression of SOST gene by acting on myocyte enhancer factors 2C (MEF2C) gene, thereby affecting the function of osteoblast. **Methods** Human osteoblast cell line hFOB1.19 was cultured and transfected with overexpressed MEF2C-AS1 plasmid, and the ALP activity of the overexpressed MEF2C-AS1 group was detected. By silencing MEF2C-AS1 with small interfering RNA, qRT-PCR and western blot experiments were conducted to detect the effects of MEF2C-AS1 level changes on the mRNA and protein levels of MEF2C and SOST genes. Then, the overexpression of MEF2C-AS1 and MEF2C was also conducted to detect the changes of SOST gene expression levels. **Results** Compared with control group, the mRNA levels of MEF2C and SOST in the overexpressed MEF2C-AS1 group were decreased ( $P < 0.05$ ), and the protein levels were also decreased ( $P < 0.05$ ), but the ALP activity

收稿日期: 2019-11-26

[通信作者] 赵玉驰, E-mail: ytzyc590407@126.com; Tel: 13332935886

was increased ( $P < 0.05$ ). The mRNA levels of MEF2C and SOST in the silenced MEF2C-AS1 group were increased ( $P < 0.05$ ), and the protein levels were also increased ( $P < 0.05$ ). The mRNA and protein expression levels of SOST gene in the over-expressed MEF2C and MEF2C-AS1 groups were both increased compared with that in the over-expressed MEF2C-AS1 group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** This experiment confirmed that MEF2C-AS1 can inhibit the expression of SOST by inhibiting MEF2C, and promoting the differentiation and maturation of osteoblasts.

**Keywords:** osteoporosis; osteoblasts; myocyte enhancer factors 2C/gene; sost protein/protein; lncRNA

骨质疏松症被定义为全身性、进行性骨骼疾病, 其特点是骨形成与骨吸收之间的不平衡引起骨强度下降从而导致骨折风险增加。骨质疏松的治疗以药物治疗为主, 根据具体治疗机制的不同, 可大致分为基础补充剂、减少骨吸收剂及促进骨合成剂。近年来, 人们一直探索着治疗骨质疏松的新途径, 其中就包括对 *SOST* 基因的研究。*SOST* 基因位于人类基因组的 17q12-21 染色体中, 其编码的骨硬化蛋白通过影响 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号途径对成骨细胞的骨形成起抑制作用<sup>[1]</sup>。有研究发现, 肌细胞增强因子 2C (myocyte enhancer factors 2C, MEF2C) 是 *SOST* 基因的远端增强子 ECR5 依赖性 *SOST* 表达的主要转录调节因子<sup>[2]</sup>。并且发现 *MEF2C* 敲除小鼠表达 *SOST*, 且进行性降低了 40% ~ 70%, 相比对照组小鼠骨密度增加<sup>[3]</sup>。这说明 *MEF2C* 基因是骨细胞表达骨硬化蛋白所必需的。反义长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 作为内源性 RNA, 与其他转录物序列互补, 可在转录及转录后水平调控靶基因的表达<sup>[4]</sup>。反义基因 *MEF2C-AS1* 与正义基因 *MEF2C* 的 5'UTR 区域重叠, 这意味着 lncRNA *MEF2C-AS1* 可能在 *MEF2C* 表达和/或翻译中起作用<sup>[5]</sup>。因此本研究拟通过成骨细胞实验, 观察 *MEF2C-AS1* 对 *MEF2C*、*SOST* 的作用, 揭露其对骨量的潜在作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系及培养

人成骨细胞系 hFOB1.19 购自美国 ATCC 菌种保藏管理中心, 采用 DMEM/F12 培养基 +10% FBS+0.3 mg/ml G418+1% 青霉素-链霉素混合溶液, 于 34℃、5% 二氧化碳及 90% 相对湿度的培养箱中培养。利用人成骨细胞系分别转染 pcDNA3.1a (对照组)、pcDNA3.1a-MEF2C-AS1 (过表达 MEF2C-AS1 组)、Smart Silencer 阴性对照 (阴性对照组)、lncRNA *MEF2C-AS1* Smart Silencer (沉默 MEF2C-AS1 组)、pcDNA3.1a-MEF2C (过表达 MEF2C 组)、pcDNA3.1a-

MEF2C-AS1+pcDNA3.1a-MEF2C (过表达 MEF2C-AS1+MEF2C 组)。

### 1.2 主要仪器和试剂

Tanon 2500 全自动数码凝胶成像分析系统、Tanon 5200Multi 全自动化学发光/荧光图像分析系统购自上海天能科技有限公司, Eppendorf Centrifuge 5418R 高速台式离心机购自德国 Eppendorf 公司, 7900HT Fast real-time PCR 系统购自美国 ABI 公司, T100™ Thermal Cyclor PCR 仪、高流电泳仪电源、Mini-PROTEAN® Tetra 电泳槽、大型水平电泳槽购自美国 Bio-Rad 公司, 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) (型号 MK300) 购自北京宝日医生物技术有限公司, *MEF2C*、*SOST* (qRT-PCR 引物)、si-MEF2C-AS1 购自苏州瑞博生物技术有限公司, *MEF2C*、*SOST* (人、兔抗) 购自武汉爱博泰克生物技术有限公司, 超敏 ECL 化学发光试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、Quickblock™ 封闭液、Western 转膜液、SDS-PAGE 电泳液、Western 洗涤液 (10X) 购自上海碧云天生物技术有限公司, Phusion High-Fidelity DNA Polymerase、PowerUp SYBR Green Master Mix 购自美国 ThermoFisher Scientific 公司)。

### 1.3 质粒构建

**1.3.1 构建 MEF2C-AS1 的过表达载体 pcDNA3.1a-MEF2C-AS1** 克隆 *MEF2C-AS1* 基因的 mRNA 序列, 设计引物: 5'-GGGGTACCAATTATTGCCGATCCTCC CC-3' (*Kpn* I) 和 5'-CGGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTCAGAAAG-3' (*Bam*H I), 由苏州瑞博生物技术有限公司合成。*MEF2C-AS1* 基因的 mRNA 片段 DNA 通过 PCR 从 cDNA 基因文库中获得, 将扩增的 PCR 产物在含溴化乙锭的琼脂糖凝胶上电泳分离后, 获取目的片段, 用胶回收试剂盒回收目的片段。然后利用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 内切酶切下 PCR 产物目的片段及切开 pcDNA3.1a 载体, 将目的片段用 T4 连接酶连接到 pcDNA3.1a 载体中进行双酶切验证。

**1.3.2 构建 MEF2C 基因的过表达载体** 克隆 *MEF2C* 基因的编码序, 设计过表达引物 5'-CGGGATCCATG

GGGAGAAAAAGATTCAG-3' 和 5'-GGGGGGCCCTCATGTTGCCCATCCTTCAG-3', 通过 PCR 扩增得到 *MEF2C* 的编码序列。目的基因片段从人源的 cDNA 中获得, PCR 扩增后回收 DNA, 通过限制性内切酶修饰目的片段和载体, 连接转化。然后再进行双酶切验证。

**1.3.3 沉默 lncRNA** 由瑞博生物技术有限公司设计合成 lncRNA *MEF2C-AS1* 的 Smart Silencer (编号: lnc3190628021353), Smart Silencer 可以在核内和细胞质中全方位抑制 lncRNA, 且抑制效率高。

#### 1.4 细胞转染

在 6 孔板中培养 hFOB1.19 (人 SV40 转染成骨细胞) 至 80% 汇集, 将质粒 DNA/siRNA 按实验方案用脂质体转染试剂盒转入 hFOB1.19 细胞中。

#### 1.5 总 RNA 提取及逆转录

取部分转染后的 hFOB1.19 细胞, 于转染 48 h 后用 PBS 清洗 2 遍, 每孔加入 1 ml Trizol 试剂, 按照 Trizol 试剂说明书提取 hFOB1.19 细胞总 RNA。并按照基因组 DNA 逆转录试剂盒说明书操作, 将 RNA 逆转录为 cDNA, 样本置于 -20℃ 保存。

#### 1.6 碱性磷酸酶成骨活性测定

收集转染 3 d 的成骨细胞, 采用 Triton X-100 的缓冲液裂解细胞。使用 ALP 检测试剂盒测量 ALP 活性。采用 ALP 染色试剂盒进行 ALP 染色。

#### 1.7 qRT-PCR

qRT-PCR 检测 *MEF2C* 正向引物: 5'-GTATAGATGCTTGACAGACCC-3', 反向引物: 5'-GCAGGTTTGTGAGCATTCTTG-3', 产物长度 97 bp。qRT-PCR 检测 *SOST* 正向引物: 5'-TTCCGAAGAGAAGTGAAAGGTTT-3', 反向引物: 5'-GTGCTGGTCTGTGAGTTTGTGAT-3', 产物长度 81 bp。qRT-PCR 检测 18S rRNA 正向引物: 5'-CGGCGACGACCCATTCGAAC-3', 反向引物: 5'-GAATCGAACCCTGATCCCCGTC-3', 产物长度 108 bp, 所检测基因及合成内参 18S 的引物由苏州瑞博生物技术公司合成。根据 ABI7500 qRT-PCR 仪说明书进行操作, 以 18S rRNA 为内参照。PCR 反应体系: 2 × SYBR Green 5 μl, 正向和反向引物各 0.5 μl, ROXI 0.2 μl, cDNA 1 μl, ddH<sub>2</sub>O 2.8 μl, 总体积为 10 μl。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 95℃、15 s 绘制熔解曲线, 共 40 个循环。每个实验至少重复 3 次,

用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法分析。

#### 1.8 Western blotting

取另一部分转染后的 hFOB1.19 细胞用预冷 PBS 清洗 2 遍, 加适量预冷的细胞 RIPA 裂解液 (含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂), 冰上裂解 10 min, 使用刮棒刮取培养孔中的细胞, 收集裂解液, 14 000 r/min 离心 10 min, 上清即为蛋白提取液。利用考马斯亮蓝测定蛋白浓度。加入 6 × SDS 上样缓冲液, 95℃ 变性 5 min。配制 10% SDS-PAGE 凝胶, 将变性后的蛋白上样, 恒压 100 V 电泳 2 h。电泳结束后在 200 mA 恒流条件下 1 h 将蛋白转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 再置于 5% 脱脂牛奶的 TBS 封闭液在摇床上封闭 1 h。将抗体按比例在牛血清白蛋白中稀释, 按千分之一加入叠氮化钠, 使抗体和膜充分接触, 4℃ 孵育过夜。次日, 回收一抗, -20℃ 保存, 一般抗体可重复使用, 用 TBST 洗膜 3 次, 15 min/次。根据一抗的来源选择二抗, 将二抗稀释于 TBS 中, 常温孵育 1 h, 之后用 TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 显影。以 GAPDH 作为内参照, 对曝光条带进行定量分析。

#### 1.9 统计学方法

数据分析采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析及绘图。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用 *t* 检验或方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *MEF2C-AS1* 的表达对 *MEF2C*、*SOST* 基因的影响

两组 *MEF2C*、*SOST* mRNA 和蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05), 过表达 *MEF2C-AS1* 组较对照组低。说明在成骨细胞系中, lncRNA *MEF2C-AS1* 可以抑制 *MEF2C* 及 *SOST* 的表达。见表 1 和图 1。

### 2.2 过表达 *MEF2C-AS1* 对 ALP 活性的影响

过表达 *MEF2C-AS1* 组与对照组 ALP 活性相对表达量分别为 (1.024 ± 0.013) 和 (0.499 ± 0.008), 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 (*t* = 58.898, *P* = 0.000), 过表达 *MEF2C-AS1* 组较对照组高, lncRNA *MEF2C-AS1* 能提高成骨分化过程中早期标志物 ALP 的活性。见图 2、3。

表 1 对照组与过表达 MEF2C-AS1 组 MEF2C、SOST mRNA 和蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	MEF2C mRNA	SOST mRNA	MEF2C 蛋白	SOST 蛋白
对照组	0.946 ± 0.059	1.051 ± 0.049	0.526 ± 0.053	0.118 ± 0.015
过表达 MEF2C-AS1 组	0.038 ± 0.002	0.048 ± 0.005	0.127 ± 0.015	0.034 ± 0.007
<i>t</i> 值	26.822	35.066	12.485	8.594
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.001

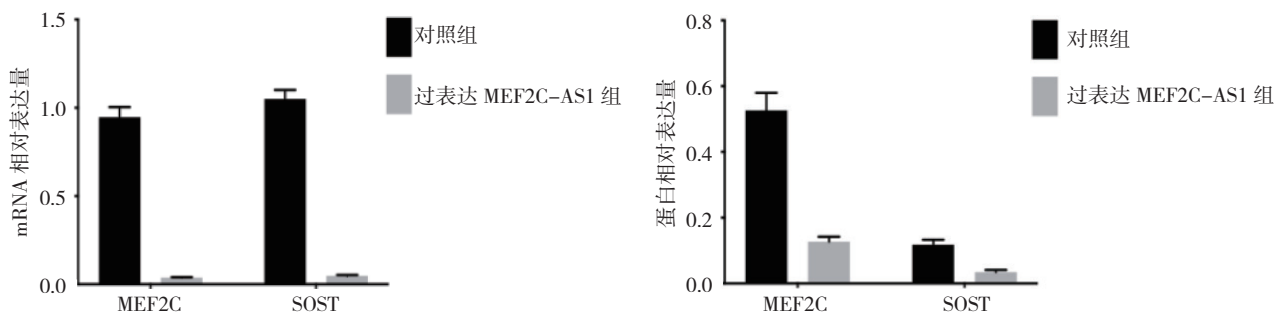


图 1 过表达 MEF2C-AS1 组与对照组 MEF2C、SOST mRNA 和蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

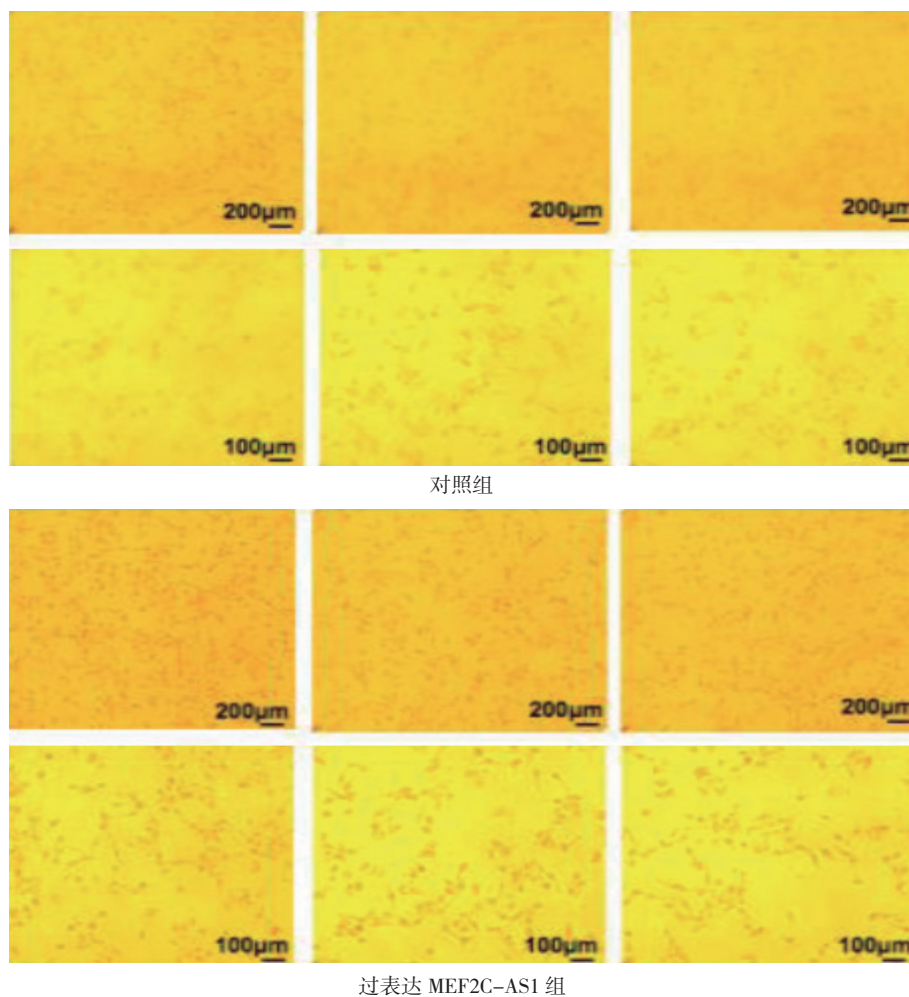


图 2 MEF2C 提高 ALP 活性

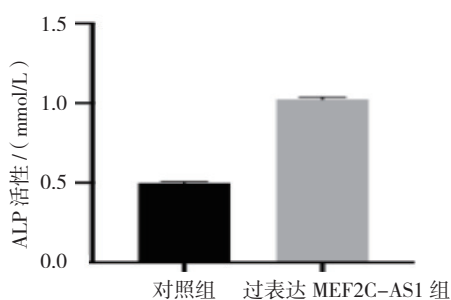


图 3 过表达 MEF2C-AS1 组与对照组 ALP 活性 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 2.3 沉默 MEF2C-AS1 对 MEF2C、SOST 基因表达的影响

两组 MEF2C、SOST mRNA 和蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 沉默 MEF2C-AS1 组较阴性对照组高。结果说明抑制 MEF2C-AS1 能增加 MEF2C、SOST 的表达, 进一步验证了 MEF2C-AS1 对 MEF2C、SOST 的抑制作用。见表 2 和图 4。

表 2 沉默 MEF2C-AS1 组与对照组 MEF2C、SOST mRNA 和蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	MEF2C mRNA	SOST mRNA	MEF2C 蛋白	SOST 蛋白
阴性对照组	0.986 ± 0.028	0.916 ± 0.099	0.163 ± 0.031	0.100 ± 0.016
沉默 MEF2C-AS1 组	5.039 ± 0.576	4.087 ± 0.263	1.180 ± 0.152	0.571 ± 0.071
<i>t</i> 值	12.177	19.532	11.329	11.230
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000

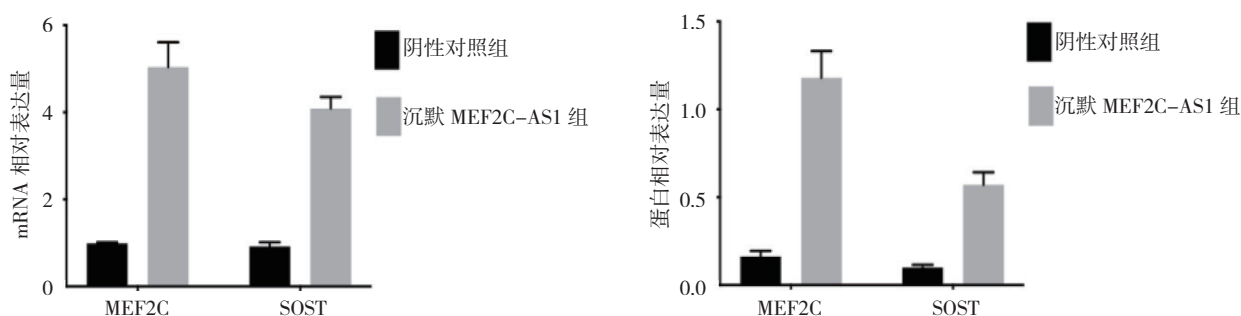


图 4 沉默 MEF2C-AS1 组与阴性对照组 MEF2C、SOST mRNA 和蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 2.4 过表达 MEF2C-AS1+MEF2C 基因对 SOST 表达的影响

经 NCBI Blast 比对, 笔者发现 MEF2C-AS1 与 MEF2C 存在反向互补配对碱基序列, 反向互补片段长度 151 bp, 位于 MEF2C-AS1 (transcript variant 3 NR\_109941.1) 序列和 MEF2C (XM\_024446057.1) 序列的 5'UTR 起始 (见图 5)。这提示 MEF2C-AS1 在某种程度上可能对 MEF2C 起调控作用。各组 MEF2C、SOST mRNA 和蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。进一步两两比较显示, 过表达 MEF2C 组与对照组的 SOST mRNA 和蛋白比较, 差异有统计

学意义 ( $P < 0.05$ ), 过表达 MEF2C 组较对照组高, 说明 MEF2C 能调控 SOST 的表达; 过表达 MEF2C-AS1 组与对照组的 SOST mRNA 和蛋白比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 过表达 MEF2C-AS1 组较对照组低; 过表达 MEF2C-AS1+MEF2C 组与过表达 MEF2C-AS1 组的 SOST mRNA 和蛋白比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 过表达 MEF2C-AS1+MEF2C 组较过表达 MEF2C-AS1 组高。结果提示在过表达 MEF2C-AS1 的基础上加过表达 MEF2C, 原本受抑制的 SOST 表达有所恢复, 说明在成骨细胞中 MEF2C-AS1 是通过抑制 MEF2C 而进一步抑制 SOST 的表达。见表 3 和图 6、7。

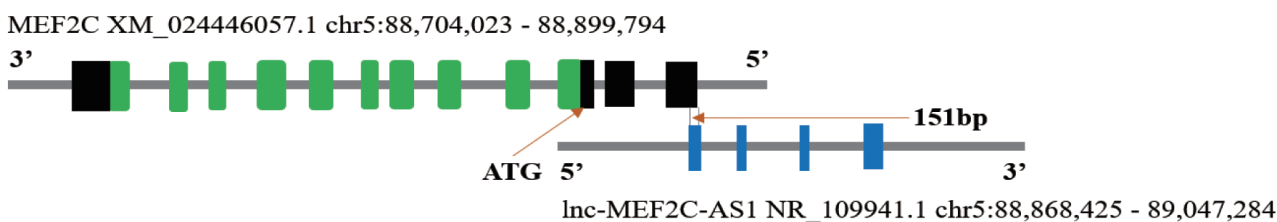
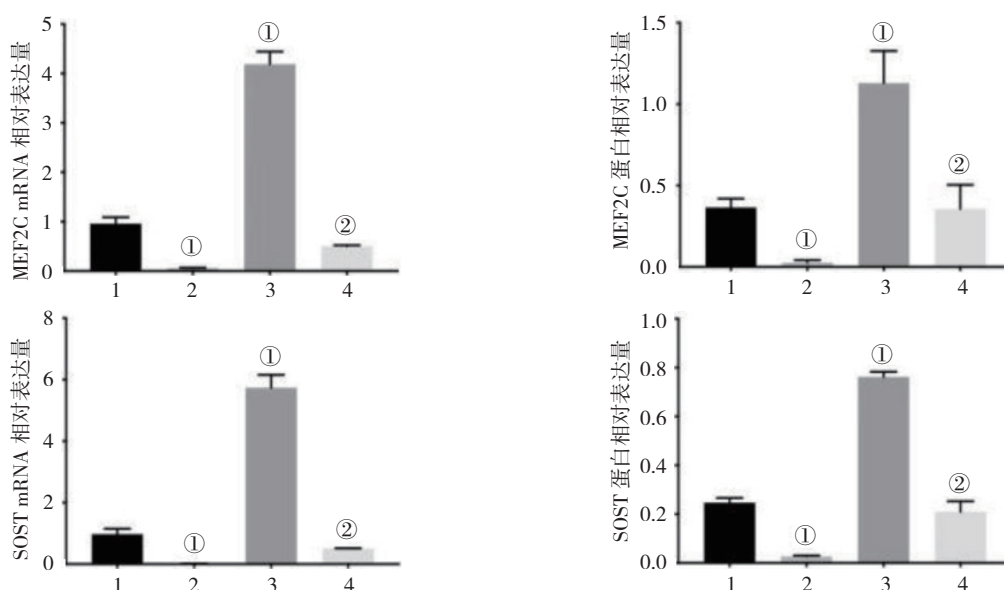


图 5 MEF2C-AS1 与 MEF2C 互补序列示意图

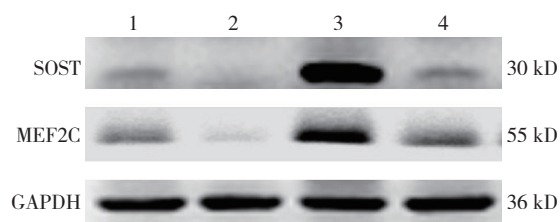
表 3 各组 MEF2C、SOST mRNA 和蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	MEF2C mRNA	MEF2C 蛋白	SOST mRNA	SOST 蛋白
对照组	0.961 ± 0.129	0.366 ± 0.054	0.976 ± 0.174	0.247 ± 0.019
过表达 MEF2C-AS1 组	0.062 ± 0.005 <sup>①</sup>	0.027 ± 0.015 <sup>①</sup>	0.011 ± 0.005 <sup>①</sup>	0.027 ± 0.003 <sup>①</sup>
过表达 MEF2C 组	4.190 ± 0.252 <sup>①</sup>	1.130 ± 0.197 <sup>①</sup>	5.737 ± 0.420 <sup>①</sup>	0.762 ± 0.021 <sup>①</sup>
过表达 MEF2C-AS1+MEF2C 组	0.503 ± 0.018 <sup>②</sup>	0.356 ± 0.149 <sup>②</sup>	0.511 ± 0.007 <sup>②</sup>	0.210 ± 0.043 <sup>②</sup>
F 值	525.520	40.821	406.266	447.214
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与对照组比较,  $P < 0.05$ ; ②与过表达 MEF2C-AS1 组比较,  $P < 0.05$ 。



1: 对照组; 2: 过表达 MEF2C-AS1 组; 3: 过表达 MEF2C 组; 4: 过表达 MEF2C-AS1+MEF2C 组。①与对照组比较,  $P < 0.05$ ; ②与过表达 MEF2C-AS1 组比较,  $P < 0.05$ 。

图 6 各组 MEF2C、SOST mRNA 和蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

1: 对照组; 2: 过表达 MEF2C-AS1 组; 3: 过表达 MEF2C 组; 4: 过表达 MEF2C-AS1+MEF2C 组。

图 7 各组 SOST、MEF2C 蛋白的表达

### 3 讨论

骨代谢需要复杂的调节控制和转录活性来支持基因表达, 以响应骨形成与再吸收谱系细胞中激素、生长因子和细胞因子介导的级联反应。在人类基因组中, 只有极少数被转录为蛋白质, 绝大多数都是非

编码 RNA, 根据其核苷酸长度, 可分为 lncRNA、Piwi 互作 RNA、小干扰 RNA 及 microRNA 等。lncRNA 是指长度  $>200$  核苷酸的转录物家族, 其不编码蛋白质。此类 RNA 可调节基因表达的多个方面, 包括转录、加工和转录后控制途径。同样, lncRNA 也被证实可以调节蛋白功能并组织多蛋白复合物组装。有研究表明 lncRNA 可能参加细胞通信<sup>[6]</sup>。lncRNA 作为非编码 RNA 的一种, 主要作用机制包括: ①可以结合  $\geq 1$  种染色质修饰复合物并将其活性靶向特定的 DNA 基因座; ②介导的染色质修饰可以激活或抑制基因的表达<sup>[7]</sup>; ③ lncRNA 转录可导致染色质重塑, 影响调节因子的结合; ④可以通过结合特异性转运因子来调节基因表达, 从而抑制特定转录因子的核定位<sup>[6]</sup>。

反义 lncRNA 是 lncRNA 的一种, 参与多种生物学行为, 如 X 染色体失活、表观遗传调控, 可以通过

与其他 RNA 的碱基对互补, 形成 RNA 互补双链, 调控特定靶基因的表达<sup>[4, 8]</sup>。例如, 反义基因 *RAB11B-AS1* 与 *RAB11B* 呈负相关, 可通过 *RAB11B* 影响骨肉瘤细胞的恶性生物学行为<sup>[9]</sup>。反义基因 *POSH2-AS1* 可正向调控靶基因 *POSH2*, 从而影响肺癌细胞<sup>[10]</sup>。笔者通过序列比对发现 lncRNA *MEF2C-AS1* 与 *MEF2C* 存在反向互补, 认为 lncRNA *MEF2C-AS1* 能起到调控 *MEF2C* 的作用。已有部分文献发现 lncRNA 与骨质疏松的联系<sup>[11-12]</sup>。本研究着重探究 lncRNA *MEF2C-AS1* 对成骨细胞的影响, 为骨质疏松的治疗探索新的分子靶点。首先过表达 *MEF2C-AS1* 发现 *MEF2C*、*SOST* 的表达下降, 然后抑制 *MEF2C-AS1* 发现 *MEF2C*、*SOST* 的表达升高, 这提示 lncRNA *MEF2C-AS1* 对 *MEF2C*、*SOST* 的表达起抑制作用, 又由于实验中的人成骨细胞系具有分化为成熟的成骨细胞功能, 并可以表达正常成骨细胞的特性。提示该 lncRNA 能通过抑制 *MEF2C*、*SOST* 的表达, 对机体骨量的增加起到积极作用。在此基础上, 为了进一步明确 *MEF2C-AS1* 是通过 *MEF2C* 影响 *SOST* 的表达, 笔者设计了拯救实验, 同时过表达 *MEF2C-AS1* 和 *MEF2C*。实验结果显示, 同时过表达 *MEF2C+MEF2C-AS1* 组相比过表达 *MEF2C-AS1* 组的 *SOST* mRNA 和蛋白相对表达量升高。这一结果提示在过表达 *MEF2C-AS1* 的基础上过表达 *MEF2C*, 使原本受抑制的 *SOST* 表达有所恢复, 说明 *MEF2C-AS1* 是通过抑制 *MEF2C*, 从而进一步抑制 *SOST* 的表达。

ALP 广泛分布于肝脏、骨及小肠中。特别在骨代谢研究领域被作为骨形成指标之一。ALP 由未成熟的成骨细胞分泌, 可作为骨形成的早期标志物, 其表达和分泌会随着成骨分化的增加而增加。本研究发现 *MEF2C-AS1* 能提高成骨分化过程中早期标志物 ALP 的活性。ALP 活性增加是成骨细胞分化成熟的早期标志。这说明 *MEF2C-AS1* 能促进成骨细胞的分化成熟, 因此对增加机体骨量有潜在作用。

骨重塑包括破骨细胞的骨吸收和成骨细胞的骨形成, 这是维系骨骼正常生长及退变的机制, 这种紧密耦合过程的失衡将导致骨质疏松。成骨细胞和破骨细胞可以通过细胞间的直接接触, 以及细胞因子和细胞外基质互相作用, 彼此连通。而且成骨细胞负责骨基质的合成、分泌及矿化, 并产生护骨素、核因子  $\kappa$ B 受体活化体配体等调节破骨细胞的功能<sup>[13]</sup>。所以成骨细胞对于骨形成代谢具有重要作用。既往研究发

现 *SOST* 基因编码的骨硬化蛋白对成骨细胞起负反馈作用, 减少骨的形成, 减少机体骨量<sup>[14]</sup>。此外, *SOST* 基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点 rs2023794 和 rs74252774 的多态性与大量中国绝经后女性腰椎平均骨密度有关<sup>[15]</sup>。2 期临床研究也表明, 绝经后妇女注射骨硬化蛋白抗体可导致脊柱和髌部骨密度增加<sup>[16]</sup>。调控 *SOST* 的表达似乎可以成为治疗骨质疏松的新手段。*MEF2C* 基因可以与 *SOST* 上游的远端增强子 *ECR5* 结合, 从而调节 *SOST* 的表达<sup>[2]</sup>。有研究发现 *MEF2C* 基因 SNP 位点 rs1366594 与骨质疏松存在相关性<sup>[17]</sup>。本实验证实 lncRNA *MEF2C-AS1* 可通过抑制 *MEF2C*, 进而抑制 *SOST*, 促进成骨细胞的分化成熟, 对机体骨量的增加可能产生积极作用。而且有研究通过识别骨质疏松基因 SNP 位点发现 *MEF2C-AS1* 与骨质疏松相关<sup>[18]</sup>。这都提示 lncRNA *MEF2C-AS1* 可通过作用于 *MEF2C*, 成为未来治疗骨质疏松的一个新靶点。但本研究主要针对 *MEF2C-AS1* 对下游基因的表达进行检测, 成骨细胞功能检测还需完善, 也未涉及 *MEF2C-AS1* 调控 *MEF2C* 的具体机制, 其更为复杂的作用仍需进一步研究证实。

#### 参 考 文 献:

- [1] KOIDE M, KOBAYASHI Y. Regulatory mechanisms of sclerostin expression during bone remodeling[J]. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2019, 37(1): 9-17.
- [2] COLLETTE N M, GENETOS D C, ECONOMIDES A N, et al. Targeted deletion of *sost* distal enhancer increases bone formation and bone mass[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(35): 14092-14097.
- [3] KRAMER I, BAERTSCHI S, HALLEUX C, et al. *Mef2c* deletion in osteocytes results in increased bone mass[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2012, 27(2): 360-373.
- [4] 蒋孝明, 邵永富, 肖丙秀, 等. 反义长链非编码 RNA 与基因表达调控 [J]. *生物物理学报*, 2013, 29(7): 471-485.
- [5] ZENG Q, WU K H, LIU K, et al. Genome-wide association study of lncRNA polymorphisms with bone mineral density[J]. *Annals of human genetics*, 2018, 82(5): 244-253.
- [6] GEISLER S, COLLIER J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2013, 14(11): 699-712.
- [7] KHALIL A M, GUTTMAN M, HUARTE M, et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(28): 11667-11672.
- [8] VILLEGAS V E, ZAPHIROPOULOS P G. Neighboring gene regulation by antisense long non-coding RNAs[J]. *International*

- Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(2): 3251-3266.
- [9] 陈志旭. 长链非编码 RNA RAB11B-AS1 在骨肉瘤中的功能研究及机制探讨 [D]. 广州: 南方医科大学, 2018: 1-85.
- [10] 曹翼. 反义长链非编码 RNA POSH2-AS1 调控编码基因 POSH2 在肺癌中的作用及机制研究 [D]. 广州: 广州医科大学, 2018: 14.
- [11] SILVA A M, MOURA S R, TEIXEIRA J H, et al. Long noncoding RNAs: a missing link in osteoporosis[J]. Bone research, 2019, 7(1): 25-40.
- [12] JIN D, WU X W, YU H W, et al. Systematic analysis of lncRNAs, mRNAs, circRNAs and miRNAs in patients with postmenopausal osteoporosis[J]. American journal of translational research, 2018, 10(5): 1498-1510.
- [13] CHEN X, WANG Z Q, DUAN N, et al. Osteoblast-osteoclast interactions[J]. Connective tissue research, 2018, 59(2): 99-107.
- [14] SEBASTIAN A, LOOTS G G. Transcriptional control of Sost in bone[J]. Bone, 2017, 96: 76-84.
- [15] ZHANG H, HE J W, WANG C, et al. Associations of polymorphisms in the SOST gene and bone mineral density in postmenopausal Chinese women[J]. Osteoporosis International, 2014, 25(12): 2797-2803.
- [16] RECKER R R, BENSON C T, MATSUMOTO T, et al. A randomized, double-blind phase 2 clinical trial of blosozumab, a sclerostin antibody, in postmenopausal women with low bone mineral density[J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2015, 30(2): 216-224.
- [17] ROCHA-BRAZ M G M, FERRAZ-DE-SOUZA B. Genetics of osteoporosis: searching for candidate genes for bone fragility[J]. Archives of Endocrinology and Metabolism, 2016, 60(4): 391-401.
- [18] GREENBAUM J, WU K, ZHANG L, et al. Increased detection of genetic loci associated with risk predictors of osteoporotic fracture using a pleiotropic cFDR method[J]. Bone, 2017, 99: 62-68.

(李科 编辑)

本文引用格式: 何洋洋, 王力刚, 赵玉驰. 长链非编码 RNA MEF2C-AS1 调控成骨细胞功能的机制研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(10): 6-13.