

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.21.006
文章编号: 1005-8982 (2022) 21-0031-08

实验研究·论著

小核仁RNA宿主基因5对骨髓间充质干细胞成骨分化和凋亡的影响*

蒋海涛, 郑纪伟, 李芳, 张恺, 秦莹, 夏江澜, 孙晋虎

(徐州医科大学口腔医学院, 江苏 徐州 221018)

摘要: **目的** 探究小核仁RNA宿主基因5(SNHG5)在调控骨髓间充质干细胞成骨分化和凋亡中的作用。**方法** 成骨诱导液诱导骨髓间充质干细胞成骨分化, 不同质粒转染分组, Western blotting法检测成骨标志物(OCN、OSX、COL1A1)的蛋白相对表达量, 茜素红染色和碱性磷酸酶(ALP)检测成骨效果, 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测SNHG5和OCN mRNA相对表达量。将细胞随机分为两组, 实验组下调SNHG5表达, 对照组不下调, 同法进行成骨诱导, 检测OCN、OSX及COL1A1的蛋白相对表达量, 检测成骨效果, 检测OCN、OSX、COL1A1及SNHG5 mRNA相对表达量。采用流式细胞术检测细胞凋亡, 并检测Caspase-3活性。**结果** 成骨诱导后第14天的OCN、OSX及COL1A1蛋白相对表达量高于诱导后第7天和诱导前($P < 0.05$), 诱导后第7天高于诱导前($P < 0.05$)。成骨诱导前、诱导后第7天、诱导后第14天的ALP活性和茜素红浓度比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。成骨诱导前、诱导后第1天、第3天、第5天、第7天、第14天的SNHG5和OCN mRNA相对表达量随时间推移逐渐升高($P < 0.05$)。转染不同质粒后, 各组SNHG5 mRNA相对表达量比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 细胞转染质粒后第14天实验组OCN、OSX及COL1A1 mRNA和蛋白相对表达量低于对照组($P < 0.05$), 细胞转染质粒后第14天实验组ALP活性和茜素红浓度低于对照组($P < 0.05$), 实验组细胞凋亡率和Caspase-3活性高于对照组($P < 0.05$)。**结论** SNHG5参与骨髓间充质干细胞成骨分化和凋亡, 可能在骨质疏松症的发展中起促进作用, 为改善颌骨骨质疏松的治疗提供新靶点。

关键词: 骨质疏松症; 小核仁RNA宿主基因5; 骨髓间充质干细胞; 颌骨

中图分类号: R580

文献标识码: A

Small nucleolar RNA host gene 5 involved in regulation of bone marrow mesenchymal stem cells differentiation and apoptosis*

Hai-tao Jiang, Ji-wei Zheng, Fang Li, Kai Zhang, Ying Qin, Jiang-lan Xia, Jin-hu Sun
(Medical School in Oral, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221018, China)

Abstract: Objective To explore the role of nucleolar small RNA host gene 5 (SNHG5) in regulating osteogenic differentiation and apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells. **Methods** Osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells was induced by osteogenic induction solution. The protein expressions of OCN, OSX, and COL1A1 were detected by Western blotting, and the osteogenic effect was detected by alizarin red staining and alkaline phosphatase; SNHG5 were detected quantitatively by PCR; The cells were randomly divided into two groups. The expression of SNHG5 was knocked down in the experimental group and not in the control group; OCN, OSX, COL1A1, and SNHG5 were detected quantitatively by PCR; The protein expressions of OCN, OSX, and COL1A1 were detected by Western blotting, and the osteogenic effect was detected

收稿日期: 2022-04-22

* 基金项目: 江苏省高校自然科学基金研究计划面上项目(No:12KJB320015)

[通信作者] 郑纪伟, E-mail: zhengkouqiang@163.com; Tel: 15162110674

by alizarin red staining and alkaline phosphatase; Apoptosis was detected by flow cytometry; The activity of Caspase-3 was detected. **Results** Osteogenic induction was successful, the expressions of OCN, OSX, COL1A1, and SNHG5 increased ($P < 0.05$). After effectively inhibiting SNHG5, the expression of OCN, OSX, and COL1A1 in the experimental group was significantly lower than that in the control group, the activity of ALP was lower than that in the control group ($P < 0.05$), the degree of mineralization was lower than that in the control group ($P < 0.05$), the proportion of apoptosis was higher than that in the control group ($P < 0.05$), and the activity of Caspase-3 was higher than that in the control group ($P < 0.05$). The results showed that after inhibiting SNHG5 ($P < 0.05$), the osteogenic activity was inhibited and the apoptosis was accelerated ($P < 0.05$). **Conclusion** SNHG5 participates in the osteogenic differentiation and apoptosis of BMSCs, which may play a promoting role in the development of osteoporosis and become a new target for improving the treatment of maxillofacial osteoporosis.

Keywords: osteoporosis, postmenopausal; small nucleolar RNA host gene 5; mesenchymal stem cells, bone; jawbone

骨质疏松症是一种代谢性和系统性的骨骼疾病, 常见于老年人和绝经后妇女^[1]。该病可累及颌骨, 表现为颌骨骨量减少, 微建筑骨结构破坏, 骨脆性增加。研究表明, 骨质疏松症患者与牙周炎患者的附着丧失和牙槽骨骨丢失高度相关, 因此认为改善骨质疏松是牙周炎防治的一个关键因素^[2]。研究表明, 骨质疏松症对口腔种植体近中和远中的边缘骨丢失有显著影响^[3], 因此其也是种植体周围炎的潜在影响因素。所以控制骨质疏松对临床维持颌骨高度、改善种植修复条件、防治牙周病、提高患者生活质量具有重要意义。既往研究^[4-5]表明, 骨髓间充质干细胞的异常分化导致骨平衡紊乱, 最终导致骨质疏松症。长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 功能紊乱目前已得到相当多的关注, 越来越多的研究揭示了 lncRNA 在包括骨质疏松症在内的多种疾病中的作用越来越大^[6-7]。小核仁 RNA 宿主基因 5 (small nucleolar RNA host gene 5, SNHG5) 是一个位于 6q15 染色体上, 长度为 524 nt 的 lncRNA。已有研究发现 SNHG5 在恶性肿瘤中发挥作用^[8-10], 而在成骨机制中的作用研究较少, 有待进一步揭示。本研究试图揭示 SNHG5 对骨髓间充质干细胞分化和凋亡的调控作用, 有待其成为颌骨骨质疏松治疗的全新靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

人骨髓间充质干细胞 (hBMSCs) (中国赛业生物科技有限公司), α -Minimum Essential 培养基 (美国 HyClone 公司), 胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液 (PBS)、

胎牛血清、链霉素、青霉素 (美国 Gibco 公司), β -甘油磷酸、地塞米松、抗坏血酸、茜素红、4% 多聚甲醛、4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (美国 Sigma 公司), TRIzol (美国 Invitrogen 公司), Prime Script RT Master Mix 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司), SYBR Green 实时荧光定量 PCR 预混液 (日本 Osaka 公司), OCN、OSX、COL1A1、GAPDH 一抗 (英国 Abcam 公司), 碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 原位凋亡检测试剂盒 (日本 TaKaRa 公司), Caspase-3 活性检测试剂盒 (上海 Best Bio 公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞培养和成骨分化诱导 在 α -Minimum Essential 培养基中加入 10% 胎牛血清、链霉素 100 mg/L、青霉素 100 u/L, 在 37°C、5% 二氧化碳培养箱中培养人骨髓间充质干细胞。每 3 天或每 4 天更换 1 次培养基, 当细胞达到 80% ~ 90% 融合时, 培养基中加入 10 mmol/L β -甘油磷酸、100 nmol/L 地塞米松及 200 μ mol/L 抗坏血酸。成骨分化诱导 14 d, 每 3 天更换成骨诱导培养基。

1.2.2 细胞转染及分组 使用 Lipofectamine 2000 试剂盒进行细胞转染, 转染前 24 h 对细胞进行转接, 接种密度约为每孔 1×10^5 个细胞。转染过程: 吸去培养皿中的培养基, 用 PBS 或者无血清培养基清洗 1 次, 更换无血清培养基, 准备转染制备液 (A 液: 用 200 μ L Opti-MEM 稀释 4 μ g 质粒; B 液: 用 200 μ L Opti-MEM 稀释 10 μ L Lipofectamine 2000), 分别将 A 液、B 液轻轻混匀, 静置 5 min, 吸取 B 液加入至 A 液中, 轻轻混匀, 室温静置 20 min, 加入转染试剂到每个孔的培养基中, 6 h 后更换成完全培养基。继续培养 24 h 后观察转染效率。分组: 转

染短发夹 RNA (SH-SNHG5 # 1, SH-SNHG5 # 2, SH-SNHG5 # 3) 用于抑制 SNHG5 表达, 转染 sh-RNA (sh-NC) 作为阴性对照。转染 sh-NC 为对照组, 转染 SH-SNHG5 # 1 为实验组。

1.2.3 Western blotting 检测 OCN、OSX 及 COL1A1 蛋白相对表达量 用裂解缓冲液获得总蛋白后, 经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 并电转移到聚偏氟乙烯膜。随后, 将膜密封在 5% 脱脂牛奶中 1 h, 4°C 下用特异性一抗过夜, 然后二抗孵育, 并使用 GE 增强化学发光法检测系统进行测量。以 GAPDH 作为对照, 检测成骨诱导前后及转染后第 14 天 OCN、OSX 及 COL1A1 蛋白相对表达量。

1.2.4 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 SNHG5、OCN、OSX、COL1A1 mRNA 相对表达量 TRIzol 试剂提取 hBMSCs 总 RNA, 根据说明书, 使用 Prime Script RT Master Mix 试剂盒进行逆转录。然后使用 SYBR Green 实时荧光定量预混液在 ABI Prism 7900HT 荧光定量 PCR 仪中进行逆转录聚合酶链反应。反应体系: 退火反应液 14 μL , M-MLV 酶缓冲液 4 μL , RNA 酶抑制剂 1 μL , M-MLV 逆转录酶 1 μL ; 反应条件: 42°C 预变性 60 min, 95°C 变性 5 min, 4°C 退火 5 min。qRT-PCR 扩增体系为: 5 \times SYBR GreenI PCR 缓冲液 10 μL , 正向引物 (10 pmol/ μL) 1 μL , 反向引物 (10 pmol/ μL) 1 μL , dNTPs (10 mmol/L) 1 μL , Taq 酶 (3 u/ μL) 1 μL , cDNA 5 μL , ddH₂O 31 μL ; 反应条件: 93°C 预变性 3 min, 93°C 变性 30 s, 55°C 退火 45 s, 72°C 延伸 45 s, 共 40 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算成骨诱导前后 SNHG5 和 OCN mRNA 相对表达量, 以及转染后第 14 天 OCN、OSX、COL1A1 mRNA 相对表达量。GAPDH 和 U6 分别作为内参对照, 每个实验至少重复 3 次。引物序列见表 1。

1.2.5 ALP 活性测定 对常规培养以及转染后的各组 hBMSCs 进行成骨分化诱导, 随后接种于 24 孔板 (1 \times 10⁵ 个细胞/孔)。去除培养基, 用 PBS 洗涤 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min 后, 再次清洗, 每孔加入配制好的 ALP 显色剂避光染色 30 min, PBS 冲洗后用倒置光学显微镜观察。为了检测 ALP 活性的定量表达, 先用 PBS 清洗细胞, 每孔加入 100 μL 1% 曲拉通 X-100, 置于冰上裂解 30 min, 混匀后收集细胞裂解液。离心 10 min

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列	引物长度/bp
SNHG5	正向: 5'-CGCTTGGTTAAAACCTGACACT-3'	22
	反向: 5'-CCAAGACAATCTGGCCTCTATC-3'	22
OCN	正向: 5'-GGCGCTACCTGTATCAATGG-3'	20
	反向: 5'-GTGGTCAGCCAACTCGTCA-3'	20
OSX	正向: 5'-TTCTGCGGCAAGAGGTTCACTC-3'	22
	反向: 5'-GTGTTTGCTCAGGTGGTCGCTT-3'	22
COL1A1	正向: 5'-ACTCAGCCGCTCTGTCCTCA-3'	20
	反向: 5'-GGAGCCTCGGTGACATTA-3'	20
GAPDH	正向: 5'-GGGCTGCTTTTAACTCTGGT-3'	20
	反向: 5'-GCAGTTTTTCTAGACGG-3'	18
U6	正向: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	17
	反向: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'	20

(4°C, 12 000 r/min), 取上清液即为待测液。根据 ALP 活性检测试剂盒说明书, 待测液加入 96 孔板, 设置空白对照孔、标准品孔和待测液孔, 按试剂盒说明书加入缓冲液和基质液, 37°C 避光孵育 15 min 后, 于酶标仪 405 nm 波长处测定吸光度值。实验重复 3 次, 最后根据 ALP 酶活性定义, 计算待测液 ALP 活性。

1.2.6 茜素红染色 hBMSCs 用 4% 多聚甲醛溶液固定, 用 2% 茜素红染色, 吸去固定液, 用 1 \times PBS 冲洗细胞 2 次, 光学显微镜下观察拍照。为定量 hBMSCs 的矿化, 本实验从 hBMSCs 中分离茜素红, 用氯化十六烷基吡啶缓冲液孵育 1 h, 在 562 nm 波长处检测茜素红 OD 值, 绘制标准曲线, 计算成骨诱导前后及转染后第 14 天茜素红的浓度。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 取处于对数生长期的第 4 代细胞, 分为对照组 (sh-NC 组)、实验组 (sh-SNHG5 # 1/2/3 组)。将两组细胞按 2 \times 10⁵ 个/孔的密度接种于 6 孔培养板中, 加入培养基至 2 mL, 过夜培养 48 h 后, 待细胞融合度达到 80% ~ 90% 时, 停止培养。PBS 冲洗 3 遍后胰酶消化离心收集细胞沉淀, 加入适量的 PBS 重悬细胞, 再次离心后收集细胞沉淀。加入预冷的 70% 乙醇 (无水乙醇: PBS = 7: 3) 4°C 过夜固定, 加入 100 μL RNaseA 溶液重悬细胞, 放在 37°C 水浴锅中加热 30 min, 加入 400 μL 碘化丙啶 (PI) 染色液, 40°C 避光孵育 30 min, 孵育结束后 PBS 洗 2 次。采用流式细胞仪进行检测: 流式

细胞仪激化光波长用 488 nm, 用波长 > 560 nm 的通带滤器检测 PI 荧, 用一波长为 515 nm 的通带滤器检测 FITC 荧光, 计算转染后第 14 天细胞凋亡率。

1.2.8 酶联免疫吸附试验检测 Caspase-3 活性 用 90 μL 裂解缓冲液裂解 hBMSCs, 然后用 10 μL Ac-DEVD- ρNA 处理细胞裂解液。室温孵育 2 h 后, 经酶标仪测定 405 nm 波长处的吸光度值, 实验重复 3 次, 检测转染后第 14 天 Caspase-3 活性。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 23.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较用 t 检验; 成骨诱导前后、转染不同质粒后的比较用随机区组设计的方差分析, 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 成骨诱导前后各成骨蛋白相对表达量的比较

Western blotting 检测结果显示, 成骨诱导前、诱导后第 7 天、诱导后第 14 天的 OCN、OSX 及 COL1A1 蛋白相对表达量比较, 经随机区组设计的方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 进一步两两比较, 经 LSD- t 检验, 诱导后第 14 天高于诱导后第 7 天和成骨诱导前 ($P < 0.05$), 诱导后第 7 天高于成骨诱导前 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 2。

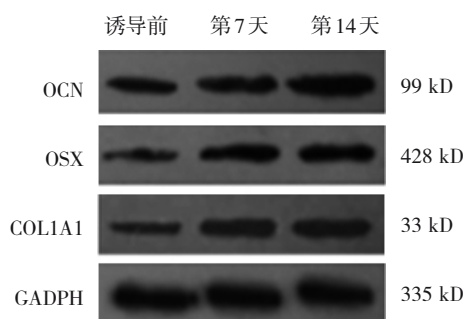


图 1 成骨诱导前后各成骨蛋白的表达

2.2 成骨诱导前后 ALP 活性和茜素红浓度比较

成骨诱导前、成骨诱导第 7 天、成骨诱导第 14 天 ALP 活性和茜素红浓度比较, 经随机区组设计的方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 经 LSD- t 检验, 诱导后第 14 天的 ALP 活性和茜素红浓度大于成骨诱导第 7 天和成骨诱导前 ($P < 0.05$), 成骨诱导第 7 天大于成骨诱导前 ($P < 0.05$) (见表 3)。成骨诱导第 14 天茜素红染色深度

表 2 成骨诱导前后 OCN、OSX、COL1A1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间	OCN 蛋白	OSX 蛋白	COL1A1 蛋白
成骨诱导前	1.000 \pm 0.100	1.000 \pm 0.100	1.000 \pm 0.100
成骨诱导第 7 天	1.652 \pm 0.162 ^①	1.810 \pm 0.182 ^①	1.702 \pm 0.173 ^①
成骨诱导第 14 天	2.301 \pm 0.232 ^{①②}	2.266 \pm 0.222 ^{①②}	2.156 \pm 0.201 ^{①②}
F 值	42.335	40.106	38.042
P 值	0.000	0.000	0.000

注: ①与成骨诱导前比较, $P < 0.05$; ②与成骨诱导第 7 天比较, $P < 0.05$ 。

明显提高, 表明 ALP 活性上升, 钙盐沉积增多, 成骨活性增强 (见图 2、3)。

表 3 成骨诱导前后 ALP 活性及茜素红浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间	ALP 活性/ [$\mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$]	茜素红浓度/ ($\mu\text{mol}/\mu\text{g}$)
成骨诱导前	0.123 \pm 0.026	0.158 \pm 0.028
成骨诱导第 7 天	0.180 \pm 0.027 ^①	0.448 \pm 0.068 ^①
成骨诱导第 14 天	0.242 \pm 0.040 ^{①②}	0.731 \pm 0.139 ^{①②}
F 值	10.488	29.971
P 值	0.011	0.000

注: ①与成骨诱导前比较, $P < 0.05$; ②与成骨诱导第 7 天比较, $P < 0.05$ 。

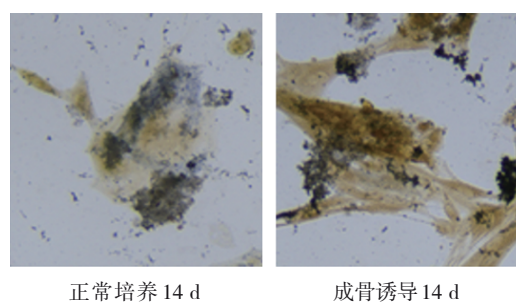


图 2 成骨诱导前后 ALP 染色结果 ($\times 20$)

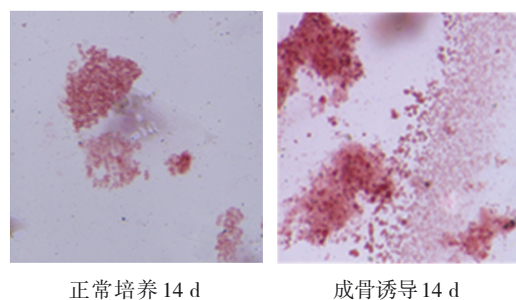


图 3 成骨诱导前后茜素红染色结果 ($\times 20$)

2.3 成骨诱导前后 SNHG5 和 OCN mRNA 相对表达量比较

qRT-PCR 检测结果显示, 成骨诱导前、成骨诱导第 1 天、成骨诱导第 3 天、成骨诱导第 5 天、成骨诱导第 7 天、成骨诱导第 14 天 SNHG5、OCN mRNA 相对表达量比较, 经随机区组设计的方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。SNHG5 和 OCN mRNA 相对表达量随时间推移逐渐升高。见表 4 和图 4。

表 4 成骨诱导前后 SNHG5 和 OCN mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间	SNHG5 mRNA	OCN mRNA
成骨诱导前	1.000 ± 0.173	1.000 ± 0.151
成骨诱导第 1 天	1.201 ± 0.275	1.297 ± 0.229
成骨诱导第 3 天	1.716 ± 0.281	1.755 ± 0.302
成骨诱导第 5 天	2.080 ± 0.511	2.071 ± 0.380
成骨诱导第 7 天	2.478 ± 0.389	2.455 ± 0.417
成骨诱导第 14 天	2.951 ± 0.466	2.922 ± 0.634
F 值	12.399	10.443
P 值	0.000	0.000

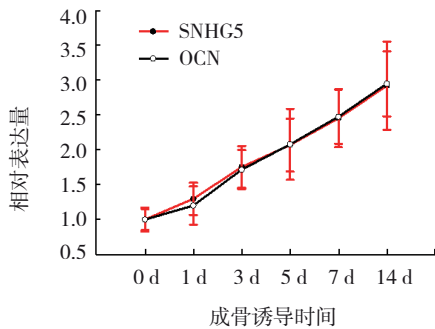


图 4 SNHG5 和 OCN mRNA 相对表达量随时间变化趋势

2.4 转染不同质粒后各组 SNHG5 mRNA 相对表达量比较

转染不同质粒后, sh-NC 组、sh-SNHG5#1 组、sh-SNHG5#2 组及 sh-SNHG5#3 组的 SNHG5 mRNA 相对表达量比较, 经随机区组设计的方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 经 LSD- t 检验, sh-SNHG5#1 组、sh-SNHG5#2 组及 sh-SNHG5#3 组的 SNHG5 的相对表达量低于 sh-NC 组 ($P < 0.05$)。结果表明转染 sh-SNHG5#1/2/3 均可降低骨髓间充质干细胞 SNHG5 表达, 其中以转染 sh-SNHG5#1 最为显著。见表 5。

表 5 转染不同质粒后 SNHG5 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SNHG5 mRNA
sh-NC 组	0.999 ± 0.157
sh-SNHG5#1 组	0.180 ± 0.031 [†]
sh-SNHG5#2 组	0.221 ± 0.042 [†]
sh-SNHG5#3 组	0.290 ± 0.070 [†]
F 值	56.044
P 值	0.000

注: †与 sh-NC 组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 转染后第 14 天 OCN、OSX、COL1A1 蛋白相对表达量比较

两组细胞转染质粒后第 14 天 OCN、OSX、COL1A1 蛋白相对表达量比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 实验组低于对照组。见图 5 和表 6。

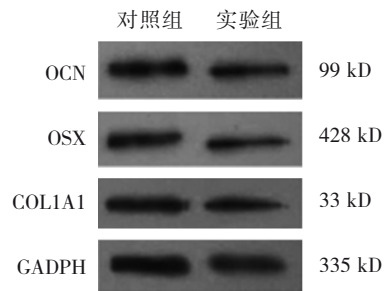


图 5 转染不同质粒后各成骨相关蛋白的相对表达量

表 6 转染不同质粒后两组各成骨标志物蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	OCN 蛋白	OSX 蛋白	COL1A1 蛋白
对照组	1.000 ± 0.100	1.000 ± 0.100	1.000 ± 0.100
实验组	0.380 ± 0.035	0.323 ± 0.035	0.415 ± 0.039
t 值	10.118	11.005	9.434
P 值	0.000	0.000	0.000

2.6 转染质粒后第 14 天 OCN、OSX、COL1A1 mRNA 相对表达量比较

两组细胞转染质粒后第 14 天 OCN、OSX 及 COL1A1 mRNA 相对表达量比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 实验组低于对照组。见表 7。

2.7 细胞转染质粒后 ALP 活性和茜素红浓度比较

细胞转染后第 14 天两组 ALP 活性比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 实验组低于对照

表 7 两组转染质粒后第 14 天 OCN、OSX、COL1A1 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	OCN mRNA	OSX mRNA	COL1A1 mRNA
对照组	1.001 ± 0.228	0.999 ± 0.216	1.000 ± 0.169
实验组	0.344 ± 0.069	0.402 ± 0.074	0.384 ± 0.093
t 值	4.766	4.521	5.529
P 值	0.004	0.005	0.003

组(见表 8)。ALP 染色结果显示, 转染 sh-SNHG5#1 后第 14 天, 实验组 ALP 染色明显浅于对照组, 结果表明 ALP 活性降低, 实验组骨向分化程度低于对照组(见图 6)。细胞转染后第 14 天两组茜素红浓度比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 实验组低于对照组(见表 8)。结果表明下调 SNHG5 可以明显抑制 BMSCs 的骨向分化。茜素红染色结果显示, 转染 sh-SNHG5#1 后第 14 天, 实验组细胞染色明显浅于对照组(见图 7)。表明实验组钙离子沉积较少, 骨向分化程度低, 矿化水平明显低于对照组。

表 8 细胞转染质粒后两组 ALP 活性及茜素红浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ALP 活性/[$\mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$]	茜素红浓度/($\mu\text{mol}/\mu\text{g}$)
对照组	0.240 ± 0.058	0.669 ± 0.165
实验组	0.106 ± 0.018	0.218 ± 0.053
t 值	3.800	4.512
P 值	0.010	0.005

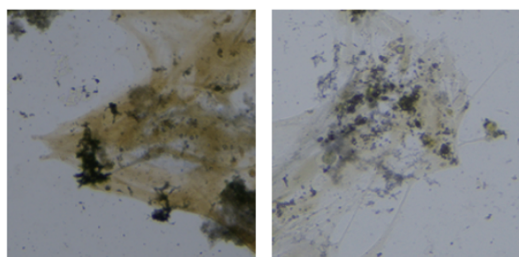


图 6 转染质粒后 ALP 染色结果 ($\times 20$)

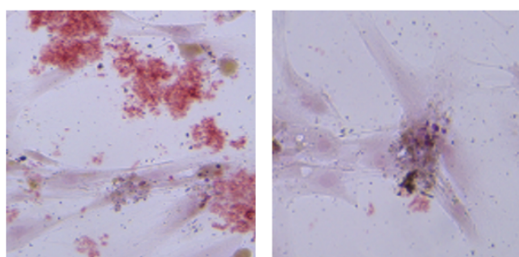


图 7 转染质粒后茜素红染色结果 ($\times 20$)

2.8 两组细胞凋亡率和 Caspase-3 活性比较

流式细胞术实验结果显示, 两组细胞凋亡率和 Caspase-3 活性比较, 经 t 检验分析, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 实验组高于对照组(见表 9)。SNHG5 基因下调后, 早期及晚期凋亡细胞的数量明显增加。见图 8。

表 9 两组细胞凋亡率和 Caspase-3 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

	细胞凋亡率/%	Caspase-3 活性
对照组	2.659 ± 0.270	1.000 ± 0.159
实验组	11.027 ± 1.015	3.496 ± 0.835
t 值	13.795	5.087
P 值	0.000	0.004

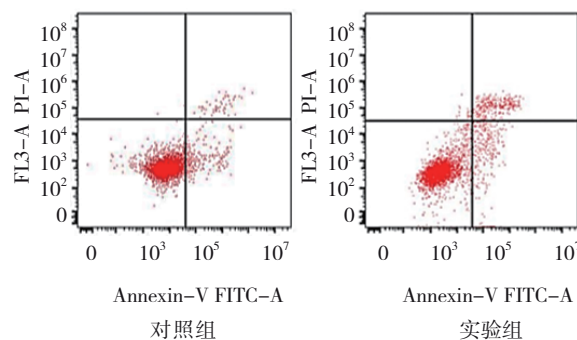


图 8 流式细胞图

3 讨论

随着全球人口老龄化的加剧, 骨质疏松症的发病率不可避免地增长, 骨质疏松症成为一个严峻的公共卫生问题。骨质疏松症在口腔颌面不仅仅体现为牙周附着能力的丧失, 加重牙周病的发展, 导致早期牙齿缺失, 同时由于骨质疏松的发生, 骨量的降低及骨结合能力下降, 对口腔种植体的早期稳定性带来了巨大的挑战, 极大影响种植手术预后效果, 颌骨骨质疏松成为了口腔颌面部功能修复的一大障碍^[1-2]。机械应力、激素波动、营养缺乏及炎症是导致骨质疏松的主要危险因素^[3-4]。

治疗颌骨骨质疏松的方法主要是药物治疗, 包含骨吸收抑制剂(激素治疗法、选择性雌激素受体调节治疗、二磷酸盐治疗)、骨矿化剂(钙剂、维生素 D、锶制剂)和骨形成促进剂(甲状旁腺素)的应用。其中二磷酸盐作为最常见的治疗药物, 其可能导致严重的颌骨坏死, 从而破坏口腔健康, 影

响口腔正常功能, 所以干细胞疗法及生物疗法的研究显得越发重要。

骨髓间充质干细胞具有自我更新功能和分化能力, 在骨质疏松症的进展中起着至关重要的作用。因此, 阐明骨髓间充质干细胞成骨的潜在机制有助于提高骨质疏松症的临床治疗水平。骨髓间充质干细胞是多种成熟细胞的前体细胞, 具有自我更新、高增殖及多向分化能力。骨髓间充质干细胞可以分化为多种间充质细胞谱系, 包括肌细胞、成骨细胞、脂肪细胞及软骨细胞。骨髓间充质干细胞在骨质疏松症的发展中具有重要意义, 因此, 了解骨髓间充质干细胞成骨分化的调控机制, 有助于发现治疗骨质疏松的有效方法。

LncRNAs 被认为是非编码 RNA 分子的重要组成部分, 多个研究表明, lncRNAs 可作为诱饵分子、信号调节蛋白、引导蛋白及支架蛋白参与多种生物活性, 如细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭、分化等^[11-12], 在包括骨质疏松症在内的各种疾病中发挥着十分重要的作用^[6]。其中, 一些参与肿瘤进展的 lncRNA 也可能参与骨质疏松症。例如: lncRNA H19^[13]、lncRNA KCNQ10T1^[14]、SNHG1 等^[15]。SNHG1 的过度表达通过促进神经前体细胞表达发育性下调蛋白 4 (NEDD4) 与 p-p38 之间的相互作用, 从而降低 BMSCs 的分化能力, 且其表达随着成骨进展不断降低。

SNHG5 是一个位于 6q15 染色体、长度为 524 个核苷酸的 lncRNA。SNHG5 的功能已经在很多疾病中得到了探索。SNHG5 可通过 miR-181a-5p/TGFBR3 轴促进软骨细胞增殖, 抑制骨关节炎进展^[6], lncRNA SNHG5 通过激活 miR-132-3p 正向调控直肠癌细胞的分化过程, miR-132-3p 与 SNHG5 表达呈负相关, SNHG5 可以直接结合到 miR-132-3p 的 3'-UTR 区域并抑制其表达^[17]。而研究发现 miR-132-3p 可通过靶向骨形成蛋白 2 (BMP-2) 抑制骨髓源性干细胞 (BMSC) 成骨分化, 抑制 miR-132-3p 可显著提高 BMSCs 的成骨能力^[18]。SNHG5 可能通过 miR-132-3p 参与成骨分化过程。然而 SNHG5 对于成骨机制相关的研究较少, 尚无有力证据。

本研究通过检测成骨诱导后 SNHG5 的表达, 发现在 hBMSCs 成骨分化过程中, 相关成骨标志物 (OCN、OSX、COL1A1) 蛋白的相对表达量均上调,

与此同时, SNHG5 mRNA 相对表达量也显著提高; 而通过短发夹 RNA 抑制 SNHG5 的表达后, 再行成骨诱导, 成骨相关蛋白相对表达量相较于对照组显著下降, ALP 活性明显降低, 矿化水平也大大下降, 充分证实了降低 SNHG5 表达后, hBMSCs 成骨活性被抑制。这可能与 miR-132-3p 等成骨相关 miRNA 水平的变化有关, 需要进一步探究。与此同时, SNHG5 下调导致凋亡细胞比例上升且 Caspase-3 活性明显提升, 证明了 SNHG5 下调促进了 hBMSCs 的凋亡, 这与 SNHG5 的下调诱导软骨细胞^[15]及肺癌细胞^[17]凋亡有相同的趋势。本研究结果表明, 通过对患者临床标本检测 SNHG5 可用于指导临床上骨质疏松的治疗。然而骨质疏松受很多因素的影响, 成骨分化作为其中的重要一环, 仍受到其他因素 (如激素水平改变等) 的影响及制约, 而本实验只是对 SNHG5 参与 hBMSCs 成骨分化及细胞凋亡的初步探究, 尚不完善。因此, 未来需要侧重于骨质疏松患者临床标本 (如血浆等) 中 SNHG5 的研究, SNHG5 可能成为全新的骨质疏松症的检测指标, 为不同治疗策略和高危人群早期诊断带来更有意义的临床价值。同样, SNHG5 有可能成为治疗骨质疏松的靶基因, 对于后续实验的推进有着极大的价值, 从而推动基因治疗骨质疏松症的进程。

综上所述, SNHG5 参与调控骨髓间充质干细胞成骨分化和凋亡, 可能是一种很有前途的治疗骨质疏松症的新靶点。然而, SNHG5 在骨质疏松症中的价值需要进一步探讨, 激活下游通路中的蛋白表达可能成为后续的研究方向, 并需要临床和体内实验进一步证明, 进而为临床上治疗颌面部骨质疏松与颌骨缺损提供新思路及新选择。

参 考 文 献 :

- [1] BONACCORSI G, RIZZATI M, SALANI L, et al. Postmenopausal osteoporosis: risk evaluation and treatment options[J]. *Minerva Obstet Gynecol*, 2021, 73(6): 714-729.
- [2] MANJUNATH S H, RAKHEWAR P, NAHAR P, et al. Evaluation of the prevalence and severity of periodontal diseases between osteoporotic and nonosteoporotic subjects: a cross-sectional comparative study[J]. *J Contemp Dent Pract*, 2019, 20(10): 1223-1228.
- [3] ROMANDINI M, LIMA C, PEDRINACI I, et al. Prevalence and risk/protective indicators of peri-implant diseases: a university-

- representative cross-sectional study[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2021, 32(1): 112-122.
- [4] MAO L W, GUO J M, HU L H, et al. The effects of biophysical stimulation on osteogenic differentiation and the mechanisms from ncRNAs[J]. *Cell Biochem Funct*, 2021, 39(6): 727-739.
- [5] CHEN W C, ZHANG B Z, CHANG X. Emerging roles of circular RNAs in osteoporosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(19): 9089-9101.
- [6] KO N Y, CHEN L R, CHEN K H. The role of micro RNA and long-non-coding RNA in osteoporosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(14): 4886.
- [7] SMOLARZ B, ZADROŻNA-NOWAK A, ROMANOWICZ H. The role of lncRNA in the development of tumors, including breast cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8427.
- [8] HU X H, HONG Y, SHANG C. Knockdown of long non-coding RNA SNHG5 inhibits malignant cellular phenotypes of glioma via Wnt/CTNNB1 signaling pathway[J]. *J Cancer*, 2019, 10(5): 1333-1340.
- [9] GAO J, ZENG K, LIU Y, et al. LncRNA SNHG5 promotes growth and invasion in melanoma by regulating the miR-26a-5p/TRPC3 pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 169-179.
- [10] HAN Y N, YANG Q L, HUANG Y P, et al. Long non-coding RNA SNHG5 promotes the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via the miR-212-3p/GDF5/SMAD pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 130.
- [11] LI Z W, WANG F F, ZHANG S B. Knockdown of lncRNA MNX1-AS1 suppresses cell proliferation, migration, and invasion in prostate cancer[J]. *FEBS Open Bio*, 2019, 9(5): 851-858.
- [12] ZHANG Q J, CHENG Z J, YU Z B, et al. Role of lncRNA uc.457 in the differentiation and maturation of cardiomyocytes[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(6): 4927-4934.
- [13] CHEN S X, LIU D, ZHOU Z M, et al. Role of long non-coding RNA H19 in the development of osteoporosis[J]. *Mol Med*, 2021, 27(1): 122.
- [14] YANG J J, PENG W X, ZHANG M B. LncRNA KCNQ1OT1 promotes osteogenic differentiation via miR-205-5p/RICTOR axis[J]. *Exp Cell Res*, 2022, 415(1): 113119.
- [15] JIANG Y P, WU W L, JIAO G J, et al. LncRNA SNHG1 modulates p38 MAPK pathway through Nedd4 and thus inhibits osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Life Sci*, 2019, 228: 208-214.
- [16] SHEN H J, WANG Y, SHI W D, et al. LncRNA SNHG5/miR-26a/SOX2 signal axis enhances proliferation of chondrocyte in osteoarthritis[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018, 50(2): 191-198.
- [17] ZHANG M B, LI Y, WANG H B, et al. LncRNA SNHG5 affects cell proliferation, metastasis and migration of colorectal cancer through regulating miR-132-3p/CREB5[J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 20(4): 524-536.
- [18] LI Y M, CHEN G H, HE Y, et al. Selenomethionine-modified polyethylenimine-based nanoparticles loaded with miR-132-3p inhibitor-biofunctionalized titanium implants for improved osteointegration[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2021, 7(10): 4933-4945.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 蒋海涛, 郑纪伟, 李芳, 等. 小核仁 RNA 宿主基因 5 对骨髓间充质干细胞成骨分化和凋亡的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(21): 31-38.

Cite this article as: JIANG H T, ZHENG J W, LI F, et al. Small nucleolar RNA host gene 5 involved in regulation of bone marrow mesenchymal stem cells differentiation and apoptosis[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(21): 31-38.