

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.18.002

长非编码 RNA GMDS-DT 在骨质疏松发生中的作用和机制探索*

王璟 何学智 王晶 王婵 刘星辰 刘博阳 苗登顺[△]

(南京医科大学基础医学院人体解剖与组织胚胎学系 骨与干细胞研究中心 江苏南京 211100)

摘要 目的:探究长非编码 RNA(LncRNA)GMDS-DT 在骨质疏松发生发展中的作用及其潜在分子机制。**方法:**利用测序筛选并通过 qRT-PCR 验证 GMDS-DT 在正常和骨质疏松 (Osteoporosis, OP) 患者椎体松质骨组织中的表达情况。通过 qRT-PCR 检测 GMDS-DT 在不同月龄小鼠体内的表达情况。在骨髓间充质干细胞 (Bone mesenchymal stem cells, BMSC) 中,利用小干扰 RNA (Small interfering RNA, siRNA) 及质粒敲低或过表达 GMDS-DT,通过 Western Blot、qRT-PCR、MTT、克隆形成、EDU、流式细胞术和成骨分化诱导实验检测其对 BMSC 衰老、增殖、成骨分化及氧化应激产生的影响。通过 RNA pull-down 和 RIP 实验分析 GMDS-DT 与 HNRNPA1 之间的调控关系。**结果:**GMDS-DT 在 OP BMSC 中的表达显著下调,小鼠 BMSC 中 GMDS-DT 水平随着月龄的增大也明显下降。在 BMSC 中敲低 GMDS-DT 减弱细胞抗氧化能力,抑制其增殖和成骨分化,促进 BMSC 衰老,而过表达能缓解这些影响。机制研究发现,GMDS-DT 经 HNRNPA1 促进 BMSC 抗氧化酶类基因的表达,增强细胞的增殖和成骨分化能力,延缓细胞衰老。**结论:**LncRNA GMDS-DT 通过其抗氧化作用,调节 BMSC 的增殖和分化能力,延缓骨质疏松的发生发展。

关键词:骨质疏松;长非编码 RNA;GMDS-DT;HNRNPA1

中图分类号:R33;R336;R592 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)18-3407-08

Effect and Mechanism of Long Non-coding RNA GMDS-DT in Osteoporosis*

WANG Jing, HE Xue-zhi, WANG Jing, WANG Chan, LIU Xing-chen, LIU Bo-yang, MIAO Deng-shun[△]

(Department of Anatomy, Histology and Embryology, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 211100, China)

ABSTRACT Objective: To explore the role of long non-coding RNA (lncRNA) GMDS-DT in the development of osteoporosis and its potential molecular mechanism. **Methods:** GMDS-DT expression in normal and osteoporosis (OP) bone tissues was screened and validated by qRT-PCR. GMDS-DT expression in mouse of different months was also detected by qRT-PCR. Small interfering RNA (siRNA) and plasmid were used to knock down or overexpress GMDS-DT in bone mesenchymal stem cells (BMSC). Western Blot, qRT-PCR, MTT, colony forming assay, EDU, Flow cytometry, and osteoblast differentiation test were used to detect its effects on BMSC senescence, proliferation, differentiation and oxidative stress. The interaction between GMDS-DT and HNRNPA1 was explored by RNA pull-down and RIP. **Results:** GMDS-DT was significantly downexpressed in OP BMSC. The level of GMDS-DT in mouse BMSC also decreased with the increase of age. Knocking down GMDS-DT could reduce cell antioxidant capacity, reduce cell proliferation and differentiation, accelerate cell senescence, while overexpression of GMDS-DT could reverse these effects. Mechanistic studies revealed that GMDS-DT could interact with HNRNPA1, thereby promoting the expression of antioxidant enzyme genes in BMSC, enhancing cell proliferation and osteogenic differentiation, and delaying cell senescence. **Conclusion:** LncRNA GMDS-DT regulates the proliferation and differentiation of BMSC through its antioxidant effect, delaying the occurrence and development of osteoporosis.

Key words: OP; Long non-coding RNA; GMDS-DT; HNRNPA1

Chinese Library Classification(CLC): R33; R336; R592 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)18-3407-08

前言

骨质疏松症是一种以骨量减少,导致骨强度降低和骨折风险性增加为特征的全身性骨病^[1,2]。研究表明,骨质疏松与增龄相关,50岁以上人群中约 70-80%的骨折与骨质疏松相关^[3]。由于人口老龄化加重,中老年人骨质疏松骨折发生率增加^[4],造成

患者生活质量下降、残疾、过早死亡,并对患者生活造成一定的经济负担^[5-7],因此骨质疏松的早期诊断和治疗非常重要。双膦酸盐是目前临床上应用最为广泛的抗骨质疏松症药物,它可以降低 40%-70%的 OP 性骨折,但也有一些毒副作用被报道,包括急性肾功能衰竭、胃肠道不耐受、肌肉骨骼疼痛等^[8]。在极少数情况下,长期使用双膦酸盐会增加股骨骨折和颌骨坏死的风

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(82172504)

作者简介:王璟(1999-),女,硕士,主要研究方向:RNA 组学与骨质疏松,E-mail: 940685030@qq.com

[△] 通讯作者:苗登顺,男,博士生导师,教授,主要研究方向:衰老与肿瘤,E-mail: miaoenjmu@sina.com

(收稿日期:2024-02-18 接受日期:2024-03-10)

险^[9]。因此,深入研究 OP 的发病机制,发现防治 OP 的新靶点非常迫切。

长非编码 RNA (Long noncoding RNAs, lncRNAs) 是长度超过 200nt 且无合成蛋白质潜力的 RNA^[10]。lncRNA 的表达具有高度的细胞类型特异性,其复杂功能与其在整个细胞中的分布相关,功能包括表观遗传学、转录和转录后调控等^[11]。越来越多的研究表明,lncRNA 参与骨质疏松的发生和发展过程,lncRNA 在 OP 模型中表达失调,被作为此病发生中一种新的关键调控分子。例如,lncRNA MALAT1 通过 miR-124-3p/IGF2BP1/Wnt/ β -catenin 轴促进 BMSC 的成骨分化并抑制其破骨分化^[12],SNHG14 通过调控 miR-493-5p/Mef2c 轴激活自噬从而缓解 OP 进展^[13],lncRNA GM15416 表达减少导致 c-Fos/Fas 表达降低,阻碍成骨细胞凋亡从而促进成骨^[14]。然而,大多数 lncRNA 在骨质疏松发生中的功能尚不清楚。因此,深入研究 lncRNA 的作用机制对骨质疏松的预防和治疗具有重要意义。

BMSC 可以分化成多种细胞类型并进行自我更新,在维持骨稳态,促进骨修复和骨再生中起重要作用^[15,16]。研究证实,BMSC 衰老导致的分化异常与 OP 的发生密切相关。有关 lncRNA 在骨质疏松发生中的研究发现,多条 lncRNA 能通过表观遗传修饰、抑制 miRNA 功能、参与信号通路调控等方式调节 BMSC 的成骨分化过程,并通过旁分泌作用影响破骨细胞的分化和活性^[12],参与骨质疏松的发生发展。因此,进一步探索 lncRNA 在 BMSC 的分化机制有助于确定有效的 OP 防治方法^[17]。

通过对正常和 OP 患者骨组织的测序分析,我们发现了在 OP 患者骨组织中低表达的 lncRNA GMDS-DT。GMDS-DT 位于六号染色体上,目前尚未有研究讨论 GMDS-DT 与骨质疏松的联系。通过研究,我们发现 lncRNA GMDS-DT 能够增强 BMSC 的抗氧化能力,促进 BMSC 的增殖和成骨分化,延缓细胞衰老和骨质疏松的发生。本文首次揭露 lncRNA GMDS-DT 在 OP 发生和发展中的作用,为 OP 的诊断和治疗提供了新的靶点和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

α -MEM 培养基、血清替代物、Opti-MEM 培养基均购买于 Gibco(上海,中国);Trizol 试剂和转染试剂 Lipofectamine 2000 购买于 Invitrogen(上海,中国);逆转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒购买于诺唯赞(南京,中国);核质分离试剂盒购买于 Ambion(美国);EDU 试剂盒购买于锐博(广州,中国);MTT 试剂购买于 Sigma Aldrich(美国); β -gal 试剂盒购买于碧云天(上海,中国);RIP 试剂盒购买于 Millipore(美国);RNA pull-down 试剂盒、细胞核细胞质提取试剂盒和 NanoDrop 2000 微量紫外光度计为 Thermo 公司(美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 BMSC 培养液为 α -MEM 培养基加入 5% 血清替代物、1% PS 和 0.02% 的肝素,放入 37 °C 且含有 5% CO₂ 的培养箱中进行培养。当细胞密度达到 90% 时,用 0.25% 的胰酶消化并以 1:2 的比例进行传代。

1.2.2 细胞转染 将细胞铺在六孔板中,当细胞密度达到

60-70% 时进行转染:分别在无菌无酶的 EP 管中加入 250 μ L 的 Opti-MEM 培养基,其中一个 EP 管中加入 10 μ L Lipofectamine 2000 转染试剂,另一个 EP 管中加入 100 pmol 的 siRNA 序列,室温孵育 5 min;将两个 EP 管中溶液混匀,室温孵育 20 min;将孵育好的溶液均匀滴入培养皿中,在 37 °C 培养箱内培养 6 h 后换成原细胞培养液;转染 24 h 或 48 h 后进行下一步实验。本文采用的 GMDS-DT 的 siRNA 序列为:TACCTTAATTGATTTTGAAT,GMDS-DT 的过表达质粒委托上海捷锐公司构建。

1.2.3 提取细胞 RNA 和实时荧光定量 PCR 实验 采用 Trizol 法提取细胞 RNA:每个皿内加 500 μ L 的 Trizol 溶液,反复吹打裂解液将细胞吹落,将裂解液转移进无菌无酶 EP 管中;加入 100 μ L 的三氯甲烷,剧烈振荡后冰上静置 10 min;在 4 °C 以 12000 \times g 离心 15 min 后将上清转移进新的 EP 管中;加入与上清等体积的异丙醇混匀,冰上静置 20 min;在 4 °C 以 12000 \times g 离心 10 min 离心后弃掉异丙醇;加入 75% 冰乙醇清洗 RNA 沉淀;在 4 °C 以 7500 \times g 离心 8 min 离心后弃掉 75% 乙醇;根据 RNA 沉淀大小加入 DEPC 水溶解 RNA。使用 NanoDrop 2000 微量紫外光度计来测定 RNA 的浓度。使用逆转录试剂盒,根据试剂盒说明书进行逆转录实验。逆转录实验产物进行实时荧光定量 PCR 实验,实验中涉及引物见表 1。

1.2.4 核质分离实验 用胰酶消化细胞后加培养基终止消化,将细胞转移至 EP 管中,冰 PBS 清洗 2 遍,使用 Paris kit 试剂盒进行实验,后续步骤按照试剂盒中的说明书进行实验操作。

1.2.5 EDU 实验 在六孔板中铺上细胞,贴壁后转染,转染 24 h 后,使用 EDU 细胞增殖试剂盒,用 EDU 溶液标记细胞 2 h,接着将细胞固定 30 min,Apollo 染液孵育 30 min;Hoechst 染液孵育 30 min 进行 DNA 染色,最后使用荧光显微镜拍照。

1.2.6 MTT 实验 在六孔板中铺上细胞,贴壁后转染,转染 24 h 后进行细胞计数,在 96 孔板每孔内加 3000 个细胞/200 μ L,每一组细胞加 6 个副孔,共加 5 块 96 孔板,放入 37 °C 培养箱培养;在 0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 各取一块 96 孔板,每孔加 20 μ L 的 MTT 工作液,培养箱内孵育 4 h;弃掉孔内液体,每孔加 150 μ L 二甲亚砜,振荡 10 min 后使用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度。

1.2.7 克隆形成实验 贴壁后转染,转染 24 h 后进行细胞计数,六孔板每孔内加入 1500 个细胞/100 μ L,每一组细胞加 3 个副孔,待长出克隆斑后甲醇固定并用结晶紫染色,拍照分析。

1.2.8 流式细胞术检测细胞周期 取各组细胞用胰酶消化并加入流式管中,1500 r 离心 5 min,弃上清并用 PBS 清洗,1500 r 离心 5 min,加 75% 冰酒精吹匀,放 -20 °C 冰箱过夜后用流式细胞仪检测。

1.2.9 Western Blot 实验 在六孔板中铺上细胞,贴壁后转染,转染 48 h 后提蛋白并检测蛋白浓度计算上样量,SDS-PAGE 凝胶电泳后,转膜,封闭,孵育一抗,孵育二抗,然后使用显影液进行曝光成像。

1.2.10 成骨分化实验 配制成骨培养基:完全培养基中加入 β -甘油磷酸钠配成 10 mM 体系、地塞米松配成 0.01 nM 体系、维生素 C 配成 50 μ g/mL 体系。成骨分化 7 天进行 ALP 染色,21 天进行茜素红染色。

表 1 相关基因引物序列

Table 1 Primer sequences involved in qRT-PCR

Sequences	
GMDS-DT-F	5'-ACTGCAAGACCAGAGTGACG-3'
GMDS-DT-R	U1-R 5'-TCGTATCTGCGAGACCTGGA-3'
GAPDH-F	5'-ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG-3'
GAPDH-R	5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'
U1-F	5'-GGGAGATACCATGATCACAAGGT-3'
U1-R	5'-CCACAAATTATGCAGTCGAGTTTCCC-3'
IL-1 β -F	5'-ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA-3'
IL-1 β -R	5'-GTCGGAGATTCGTAGCTGGA-3'
p16-F	5'-GATCCAGGTGGGTAGAAGGTC-3'
p16-R	5'-CCCCTGCAAACCTTCGTCCT-3'
p53-F	5'-CAGCACATGACGGAGGTTGT-3'
p53-R	5'-TCATCCAAATACTCCACACGC-3'
CDK4-F	5'-ATGGCTACCTCTCGATATGAGC-3'
CDK4-R	5'-CATTGGGGACTCTCACACTCT-3'
CDK6-F	5'-TCTTCATTACACCGAGTAGTGC-3'
CDK6-R	5'-TGAGGTTAGAGCCATCTGGAAA-3'
Cyclin D1-F	5'-GCTGCGAAGTGAAACCATC-3'
Cyclin D1-R	5'-CCTCCTTCTGCACACATTTGAA-3'
OSX-F	5'-CCTCTGCGGGACTCAACAAC-3'
OSX-R	5'-AGCCCATTAGTGCTTGTAAAGG-3'
OCN-F	5'-CACTCTCGCCCTATTGGC-3'
OCN-R	5'-CCCTCCTGCTTGGACACAAAG-3'
ALP-F	5'-ACCACCACGAGAGTGAACCA-3'
ALP-R	5'-CGTTGCTGAGTACCAGTCCC-3'
RUNX2-F	5'-TGTTACTGTATGCGGGGTA-3'
RUNX2-R	5'-TCTCAGATCGTTGAACCTTGCTA-3'
HNRNPA1-F	5'-TCAGAGTCTCCTAAAGAGCCC-3'
HNRNPA1-R	5'-ACCTGTGTGGCCTTGCAT-3'
SOD2-F	5'-GCTCCGTTTTGGGGTATCTG-3'
SOD2-R	5'-GCGTTGATGTGAGGTTCCAG-3'
SOD1-F	5'-GGTGGGCCAAAGGATGAAGAG-3'
SOD1-R	5'-CCACAAGCCAAACGACTTCC-3'

1.2.11 β -gal 实验 在六孔板中铺上细胞,贴壁后转染,转染 48 h 后进行辐照诱导氧化应激,24 h 后根据试剂盒说明书进行染色并拍照分析。

1.2.12 流式细胞术检测 ROS 取各组细胞用胰酶消化并加入流式管中,1500 r 离心 5 min,弃上清并用 ROS 缓冲液清洗 2 遍,1500 r/min 离心 5 min,加 500 μ L ROS 缓冲液重悬细胞并加入 0.5 μ L DCFH-DA 探针,放 37 $^{\circ}$ C 烘箱孵育 30 min 后用 ROS 缓冲液清洗 2 遍,重悬后送流式细胞仪检测。

1.2.13 RNA pull-down 实验 将细胞铺在超大皿中,待细胞

长至 60 % 时进行转染,转染后 48 h 根据 RNA pull-down 试剂盒说明书进行操作。

1.2.14 RIP 实验 将细胞铺在超大皿中,待细胞长至 60 % 时进行转染,转染后 48 h 根据 RIP 试剂盒说明书进行操作,得到的 RNA 产物进行逆转录和 qRT-PCR 实验。

1.2.15 核质蛋白分离实验 在六孔板中铺上细胞,贴壁后转染,转染 48 h 后根据细胞核和细胞质提取试剂盒说明书进行提取,然后进行 Western Blot 实验并分析。

1.3 统计学分析

每一个实验均重复至少三次,通过 Microsoft Excel 和 Graphpad prism 9 软件进行统计分析,采用 Student's t 检验进行统计学检测,各组所得数据以均值 \pm 标准差表示。 P 值在结果图中表示,其中 * P <0.05,** P <0.01,*** P <0.001 表明具有显著性差异。

2 结果

2.1 GMDS-DT 在 OP BMSC 中低表达

我们对正常和 OP 患者椎体松质骨组织进行测序分析,筛选到在 OP 骨组织中低表达的 lncRNA GMDS-DT(图 1,A)。提取 14 对正常和 OP 患者的 BMSC 并利用 qRT-PCR 证实 GMDS-DT 在 OP BMSC 中表达降低(图 1,B)。我们又提取 1-12 月龄小鼠的 BMSC 进行 qRT-PCR 发现 Gmids-dt 的表达随小鼠年龄增长而降低(图 1,C)。由此可见,GMDS-DT 在 BMSC 中的低表达可能参与了骨质疏松的发生发展过程。细胞核质分离实验结果显示,OP BMSC 中 lncRNA GMDS-DT 主要分布在细胞质中(图 1,D)。

2.2 GMDS-DT 对 BMSC 衰老的作用

为了研究 GMDS-DT 在 BMSC 中的作用,我们利用 siRNA 及质粒对 BMSC 进行转染,通过 qRT-PCR 检测发现转染 siRNA 及质粒能有效敲低或过表达 GMDS-DT(图 2,A)。通过 Western Blot 和 qRT-PCR 检测衰老相关分泌型(Senescence-associated secretory phenotype, SASP),发现敲低 GMDS-DT 后 SASP 显著上调,过表达 GMDS-DT 后 SASP 表达下降(图 2,B-D)。通过 MTT、克隆形成、EDU 掺入实验发现,敲低 GMDS-DT 后,细胞的增殖能力显著降低,而过表达相反(图 2,E-I)。通过流式细胞术检测细胞周期进程,发现敲低 GMDS-DT 能够使细胞周期滞留于 G1/G2 期,而过表达 GMDS-DT 能加速细胞周期(图 2,J)。通过 qRT-PCR 检测细胞周期相关蛋白 CDK4、CDK6、Cyclin D1 的表达,发现敲低 GMDS-DT 可以降低这些蛋白的表达,抑制细胞周期进程,过表达则促进细胞周期进程(图 2,K)。

为了探究 GMDS-DT 是否参与调节 BMSC 的成骨分化,我们诱导 BMSC 分化并对分化 7 天的细胞进行 ALP 染色,对分化 21 天的细胞进行茜素红染色,结果表明敲低 GMDS-DT 后 ALP 和茜素红阳性细胞百分率降低,BMSC 成骨分化速度和钙化能力降低,而过表达 GMDS-DT 能加速进程(图 2,L-O)。通过 Western Blot 和 qRT-PCR 检测成骨相关指标 RUNX2、OSX、OCN、ALP 的表达,发现敲低 GMDS-DT 降低了成骨指标的表达水平,从而抑制成骨进程,而过表达则促进成骨分化(图 2,P-Q)。综上所述,GMDS-DT 能够增强 BMSC 的增殖和成骨分化能力,延缓细胞衰老。

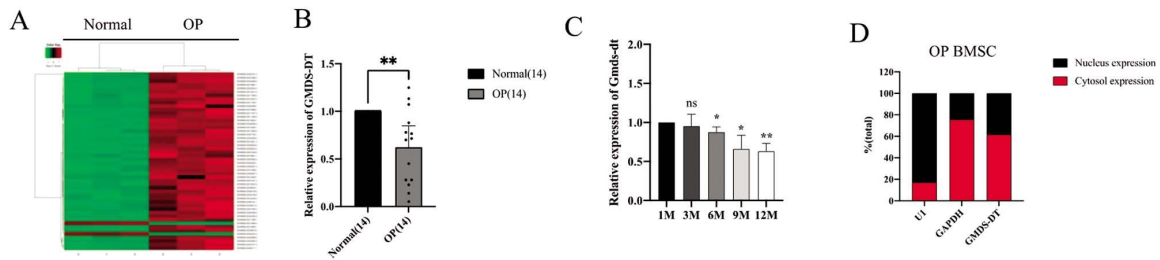


图1 LncRNA GMDS-DT 在 BMSC 中的表达水平
Fig.1 Expression level of lncRNA GMDS-DT in BMSC

Note: A. Sequencing results of LncRNAs differentially expressed in the OP and normal patients; B. Expression of GMDS-DT in 14 pairs of BMSC from OP and normal patients; C. Expression of Gmids-dt in mice of different months; D. Nucleocytoplasmic separation of lncRNA GMDS-DT in OP BMSC, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.3 GMDS-DT 对 BMSC 氧化应激的作用

研究表明,氧化应激是导致细胞衰老,引发骨质疏松症的重要原因之一^[18]。为了验证 GMDS-DT 是否会影响 BMSC 的氧化应激水平,我们利用流式细胞术检测 ROS 水平,发现敲低 GMDS-DT 后 ROS 水平增加,过表达 GMDS-DT 能降低 ROS 水平(图 3,A)。Western Blot、qRT-PCR 证实敲低 GMDS-DT 后 BMSC 的抗氧化酶 SOD2、SOD1 的基因和蛋白表达水平均降低,而过表达 GMDS-DT 能促进抗氧化酶 SOD2、SOD1 的表达(图 3,B-D)。辐照处理敲低或过表达 GMDS-DT 的 BMSC,β-gal 染色显示与对照组相比,敲低 GMDS-DT 降低细胞的抗氧化能力,衰老细胞明显增多,而过表达 GMDS-DT 则相反(图 3,E-F)。综上所述,GMDS-DT 能增强 BMSC 的抗氧化能力,降低细胞的氧化应激。

2.4 GMDS-DT 经 HNRNPA1 调控 BMSC 的氧化应激和衰老

为了探究 GMDS-DT 调控 BMSC 氧化应激的机制,我们通过 RNA pull-down 并进行质谱分析找到了 4 个 RNA 结合蛋白(RNA-binding protein, RBP):HNRNPA1、MYH10、COL12A1、RPS3A(图 4,A)。接着我们通过 RIP 实验证实这 4 个 RBP 中,只有 HNRNPA1 与 GMDS-DT 发生结合(图 4,B)。HNRNPA1 属于核不均一核糖核蛋白(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP)家族,它通过对相关基因的剪接调控在细胞衰老及应激中发挥重要作用^[19,20]。

为了研究 HNRNPA1 在 GMDS-DT 调控 BMSC 氧化应激中的作用,我们在过表达 GMDS-DT 的 BMSC 中敲低 HNRNPA1 并通过 qRT-PCR 验证其效率(图 4,C)。对 BMSC 进行成骨分化并对分化 7 天的细胞进行 ALP 染色,结果表明敲低 HNRNPA1 后成骨分化速度降低(图 4,D-E)。通过 Western Blot 和 qRT-PCR 检测 SASP、成骨相关指标和氧化应激相关指标的表达,发现敲低 HNRNPA1 上调细胞氧化应激和 SASP 的水平,降低成骨相关基因的表达水平,从而抑制成骨进程(图 5,F-H)。综上所述,GMDS-DT 经 HNRNPA1 调控 BMSC 的氧化应激和衰老。

3 讨论

随着世界老龄化人口增加,全球骨质疏松患病率也在逐年递增,超过 2 亿人被确诊骨质疏松,使得骨质疏松成为一个重要的公共卫生问题^[21,22]。骨质疏松分为原发性、继发性两类,原发性骨质疏松症又分为绝经后、老年性和特发性骨质疏松。骨

质疏松治疗的目标是预防骨折,双膦酸盐是目前使用最广泛的抗骨吸收剂^[8],但长时间使用双膦酸盐可能增加颌骨坏死的风险^[9],因此需要寻找预防和治疗骨质疏松的新靶点。

最近的研究表明,lncRNA 通过反义 RNA、内源性小干扰 RNA、内源性竞争 miRNA、RBP 或翻译等途径,在转录或转录后的调控中发挥重要作用^[23,24]。这些 lncRNA 在多种生理和病理过程,尤其是在骨质疏松中发挥着关键作用^[25],例如,雌激素通过 miR-532-3p/SIRT1 轴促进 lncRNA H19 表达调节 BMSCs 成骨分化^[26],lncRNA-ANCR 通过靶向 EZH2 和 RUNX2 促进细胞成骨^[27],lncRNA AK077216 通过 NFATc1 促进 RANKL 诱导的破骨细胞生成和骨吸收^[28]。

lncRNA GMDS-DT 能够抑制肺腺癌和肝细胞癌的进展^[29-31],但尚未有研究证明 GMDS-DT 在骨质疏松中的作用。本研究发现,在 OP 骨组织和 OP BMSC 中 lncRNA GMDS-DT 表达降低。进一步的功能实验证实,敲低 GMDS-DT 能够加速 BMSC 的衰老,抑制其增殖和成骨分化。

细胞氧化应激过程中,RBP 是调控 RNA 命运和功能的关键因素^[32],例如 TTR-RBP 家族能调控 ROS 下游 mRNA 的稳定性^[33]。HNRNPA1 是一种 RBP,研究发现抑制 lnc-OPHN1-5 的表达能够加强 HNRNPA1 与 AR-mRNA 的结合并促进 AR 的翻译^[34]。我们的研究发现,GMDS-DT 能够与 HNRNPA1 互作影响下游基因表达,通过调控 BMSC 的氧化应激水平影响骨质疏松的进程。这一发现揭示了 lncRNA 在调控骨质疏松的发生和发展中的新机制。

需要指出的是,本研究仅初步阐明了 GMDS-DT 在细胞水平上的作用和分子机制以及 GMDS-DT 在不同月龄小鼠体内的表达情况,其在 lncRNA 敲除动物模型和临床样本中的表达和意义有待进一步验证。此外,GMDS-DT 除了与 HNRNPA1 互作外,还可能通过其他途径参与骨质疏松的发生和发展,因此 GMDS-DT 对骨质疏松的调控作用是否还有其他潜在机制也值得深入探讨。

总之,我们的研究发现 lncRNA GMDS-DT 在骨质疏松骨组织中表达降低,并通过 HNRNPA1 调节骨质疏松的发生发展。这为骨质疏松的早期诊断和分子靶向治疗提供了新的潜在靶点,对于指导临床实践和改善患者预后具有重要意义。

参考文献(References)

[1] Ayers C, Kansagara D, Lazur B, et al. Effectiveness and Safety of Treatments to Prevent Fractures in People with Low Bone Mass or

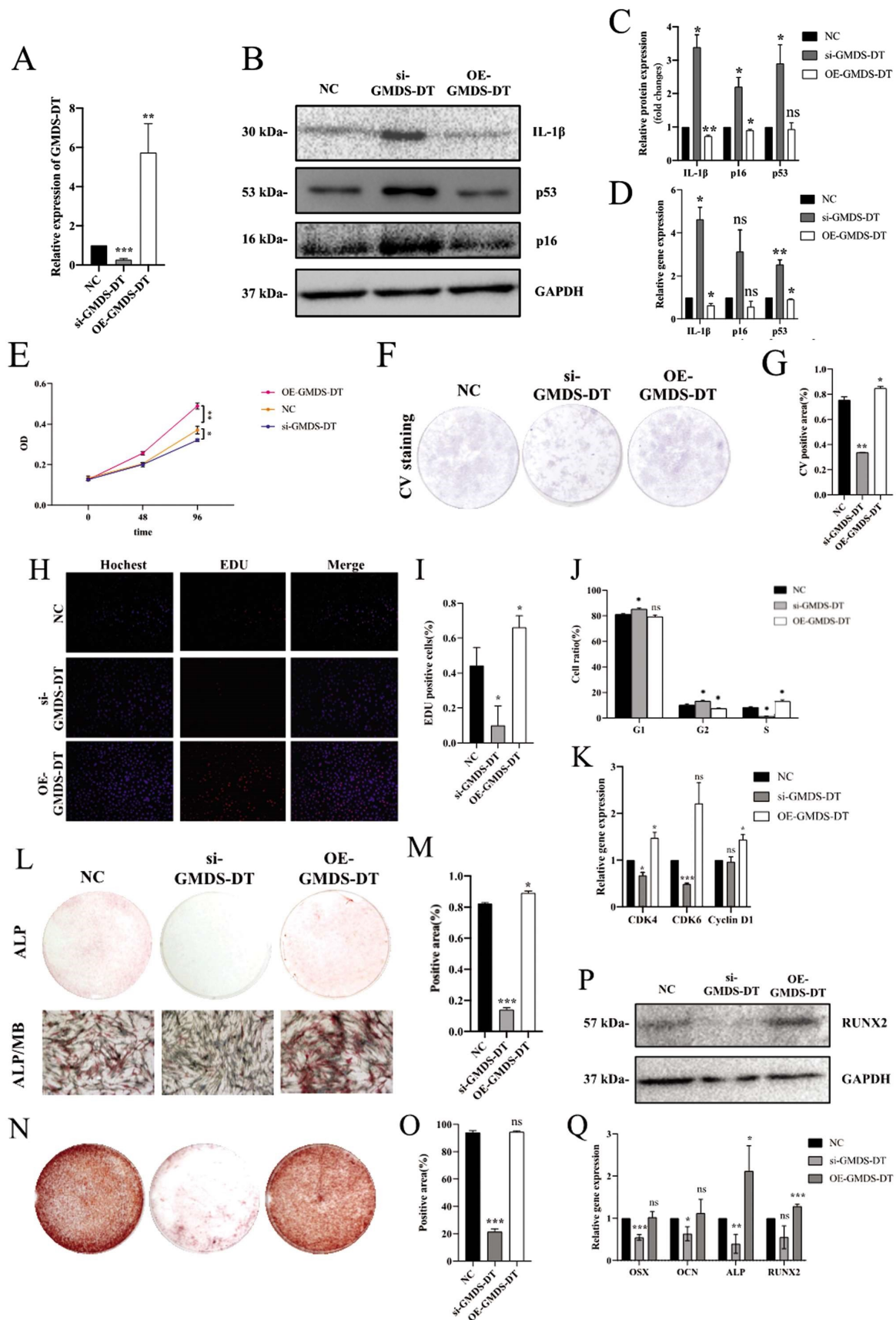


图2 LncRNA GMDS-DT 对 BMSC 衰老、增殖和成骨分化的影响

Fig.2 Effect of lncRNA GMDS-DT on senescence, proliferation and differentiation in BMSC

Note: A. Knockdown and overexpression efficiency of GMDS-DT in BMSC; B-D. Western Blot and qRT-PCR were used to detect the expression of SASP in BMSC; E-I. MTT, colony forming assay, EDU were used to detect cell viability in BMSC; J-K. Flow cytometry and qRT-PCR were used to detect the cell cycle in BMSC; L-Q. ALP staining, alizarin staining, Western Blot and qRT-PCR were used to detect phenotypes involved in osteoblastic differentiation, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

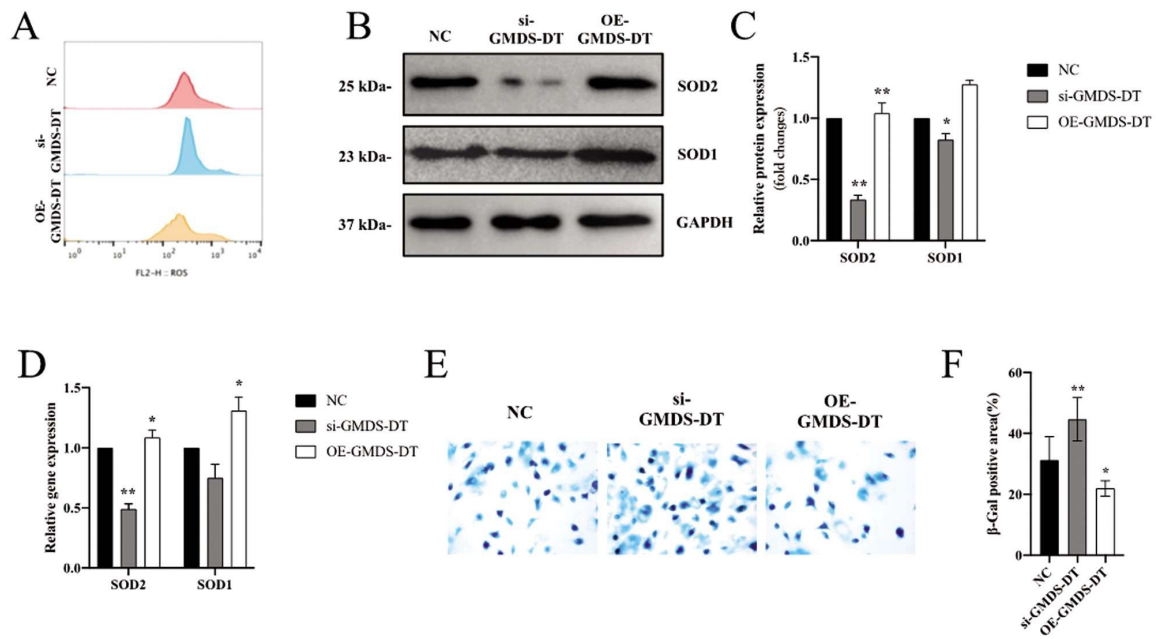


图3 LncRNA GMDS-DT 通过氧化应激调节 BMSC 功能

Fig.3 LncRNA GMDS-DT affects the function of BMSC through oxidative stress

Note: A. Level of ROS was detected by flow cytometry; B-D. Western Blot and qRT-PCR were used to detect the expression of protein and gene related to oxidative stress; E-F. β -gal was used to evaluate oxidative stress level, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Primary Osteoporosis: A Living Systematic Review and Network Meta-analysis for the American College of Physicians [J]. *Ann Intern Med*, 2023, 176(2): 182-195.

[2] Li J, Chen X, Lu L, et al. The relationship between bone marrow adipose tissue and bone metabolism in postmenopausal osteoporosis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2020, 52: 88-98.

[3] Bessette L, Ste-Marie L G, Jean S, et al. The care gap in diagnosis and treatment of women with a fragility fracture[J]. *Osteoporos Int*, 2008, 19(1): 79-86.

[4] Aspray T J, Hill T R. Osteoporosis and the Ageing Skeleton [J]. *Subcell Biochem*, 2019, 91: 453-476.

[5] Brown J P, Adachi J D, Schemitsch E, et al. Mortality in older adults following a fragility fracture: real-world retrospective matched-cohort study in Ontario[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2021, 22(1): 105.

[6] Tarride J, Adachi J D, Brown J P, et al. Incremental costs of fragility fractures: a population-based matched -cohort study from Ontario, Canada[J]. *Osteoporos Int*, 2021, 32(9): 1753-1761.

[7] Miller P D. Management of severe osteoporosis [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2016, 17(4): 473-488.

[8] Reid I R, Billington E O. Drug therapy for osteoporosis in older adults [J]. *Lancet*, 2022, 399(10329): 1080-1092.

[9] Jung S M, Han S, Kwon H Y. Dose-Intensity of Bisphosphonates and the Risk of Osteonecrosis of the Jaw in Osteoporosis Patients [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 796.

[10] Zheng R, Gao F, Mao Z, et al. LncRNA BCCE4 Genetically Enhances the PD-L1/PD-1 Interaction in Smoking-Related Bladder Cancer by Modulating miR-328-3p-USP18 Signaling [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(30): e2303473.

[11] Herman A B, Tsitsipatis D, Gorospe M. Integrated lncRNA function upon genomic and epigenomic regulation[J]. *Mol Cell*, 2022, 82(12): 2252-2266.

[12] Li X. LncRNA metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript-1 promotes osteogenic differentiation of bone marrow stem cells and inhibits osteoclastic differentiation of $M\phi$ in osteoporosis via the miR-124-3p/IGF2BP1/Wnt/ β -catenin axis [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2022, 16(3): 311-329.

[13] Xue J, Liu L, Liu H, et al. LncRNA SNHG14 activates autophagy via regulating miR-493-5p/Mef2c axis to alleviate osteoporosis progression[J]. *Commun Biol*, 2023, 6(1): 1120.

[14] Zhao D, He J, Zhao X, et al. A novel lncRNA GM15416 regulates osteoblast apoptosis and differentiation through the c-Fos/Fas axis and mitigates osteoporosis[J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 254(Pt 2): 127824.

[15] Li M, Yang N, Hao L, et al. Melatonin Inhibits the Ferroptosis Pathway in Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Activating the PI3K/AKT/mTOR Signaling Axis to Attenuate Steroid-Induced Osteoporosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 8223737.

[16] Ning K, Liu S, Yang B, et al. Update on the effects of energy metabolism in bone marrow mesenchymal stem cells differentiation [J]. *Mol Metab*, 2022, 58: 101450.

[17] Zhi F, Ding Y, Wang R, et al. Exosomal hsa_circ_0006859 is a potential biomarker for postmenopausal osteoporosis and enhances adipogenic versus osteogenic differentiation in human bone marrow mesenchymal stem cells by sponging miR-431-5p [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 157.

[18] Kimball J S, Johnson J P, Carlson D A. Oxidative Stress and Osteoporosis[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2021, 103(15): 1451-1461.

[19] Mollieux A, Temirov J, Lee J, et al. Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization[J]. *Cell*, 2015, 163(1): 123-33.

[20] Guo L, Shorter J. Biology and Pathobiology of TDP-43 and Emergent Therapeutic Strategies [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2017, 7(9): a024554.

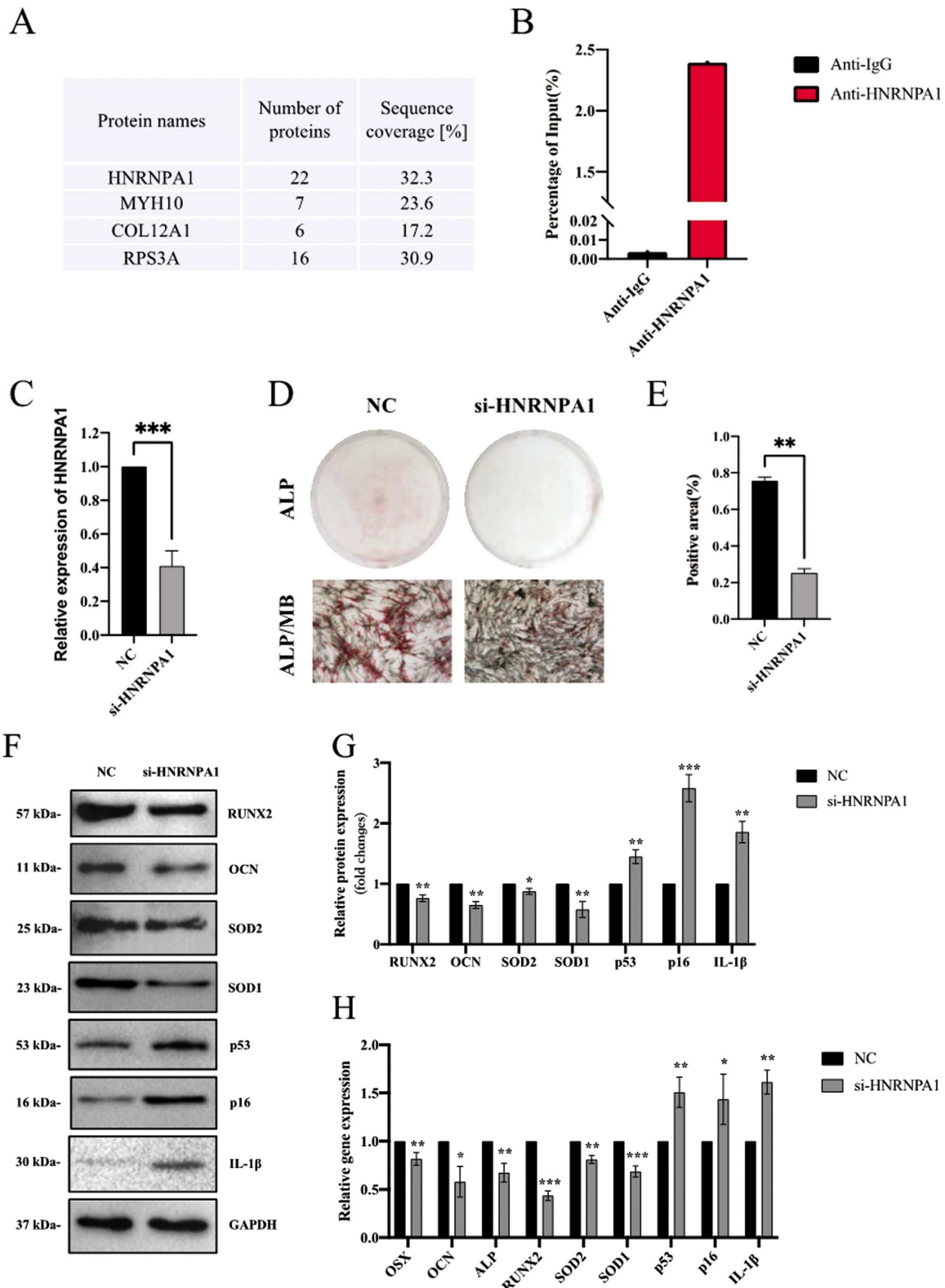


图4 LncRNA GMDS-DT 对 HNRNPA1 的调控机制

Fig.4 Mechanism of lncRNA GMDS-DT in regulation of HNRNPA1

Note: A. RNA pull-down and mass spectrometry analysis of BMSC after knocking down GMDS-DT; B. RIP was used to confirm the interaction of GMDS-DT and HNRNPA1; C. Knockdown efficiency of GMDS-DT in BMSC; D-E. ALP staining was used to detect the phenotype in osteoblastic differentiation; F-H. Western Blot and qRT-PCR were used to detect the expression of protein and gene related to senescence, differentiation and oxidative stress, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

[21] Dall T M, Gallo P D, Chakrabarti R, et al. An aging population and growing disease burden will require a large and specialized health care workforce by 2025 [J]. Health Aff (Millwood), 2013, 32(11):

2013-2020.
[22] Li X, Wu J, Liu S, et al. miR-384-5p Targets Gli2 and Negatively Regulates Age-Related Osteogenic Differentiation of Rat Bone

- Marrow Mesenchymal Stem Cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2019, 28(12): 791-798.
- [23] Chen Y, Zhang J, Liu J, et al. The Expression and Clinical Significance of PCNAP1 in Hepatocellular Carcinoma Patients [J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 1817694.
- [24] Bridges M C, Daulagala A C, Kourtidis A. LNCcation: lncRNA localization and function[J]. *J Cell Biol*, 2021, 220(2): e202009045.
- [25] An F, Wang X, Wang C, et al. Research progress on the role of lncRNA-miRNA networks in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in osteoporosis[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1210627.
- [26] Li T, Jiang H, Li Y, et al. Estrogen promotes lncRNA H19 expression to regulate osteogenic differentiation of BMSCs and reduce osteoporosis via miR-532-3p/SIRT1 axis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2021, 527: 111171.
- [27] Cai N, Li C, Wang F. Silencing of lncRNA-ANCR Promotes the Osteogenesis of Osteoblast Cells in Postmenopausal Osteoporosis via Targeting EZH2 and RUNX2[J]. *Yonsei Med J*, 2019, 60(8): 751-759.
- [28] Liu C, Cao Z, Bai Y, et al. lncRNA AK077216 promotes RANKL-induced osteoclastogenesis and bone resorption via NFATc1 by inhibition of NIP45[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2): 1606-1617.
- [29] Peng W, Jiang J, Fu J, et al. lncRNA GMDS-AS1 restrains lung adenocarcinoma progression via recruiting TAF15 protein to stabilize SIRT1 mRNA[J]. *Epigenomics*, 2023, 15(7): 417-434.
- [30] Huang J, Zhong T, Li G, et al. Epigenetic inhibition of lncRNA GMDS-AS1 by methyltransferase ESET promoted cell viability and metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Transl Oncol*, 2023, 25(6): 1793-1804.
- [31] Zhao M, Xin X F, Zhang J Y, et al. lncRNA GMDS-AS1 inhibits lung adenocarcinoma development by regulating miR-96-5p/CYLD signaling[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(3): 1196-1208.
- [32] Backlund M, Stein F, Rettel M, et al. Plasticity of nuclear and cytoplasmic stress responses of RNA-binding proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(9): 4725-4740.
- [33] Abdelmohsen K, Kuwano Y, Kim H H, et al. Posttranscriptional gene regulation by RNA-binding proteins during oxidative stress: implications for cellular senescence [J]. *Biol Chem*, 2008, 389(3): 243-55.
- [34] Zhang M, Sun Y, Huang C P, et al. Targeting the lnc-OPHN1-5/androgen receptor/hnRNPA1 complex increases Enzalutamide sensitivity to better suppress prostate cancer progression[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(10): 855.

(上接第 3469 页)

- [16] 陈锐. 内质网应激蛋白 CHOP 通路参与动脉粥样硬化发生发展的机制研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2021.
- [17] 黄为俊, 张帆, 李同社, 等. 内质网应激蛋白、可溶性细胞间黏附分子与冠心病患者血管内皮细胞损伤的相关性 [J]. *现代医学*, 2019, 47(2): 145-149.
- [18] 王聪. 非折叠蛋白应答 IRE1 及 CHOP 信号转导通路与颈动脉粥样硬化斑块稳定性的关系[D]. 辽宁: 大连医科大学, 2019.
- [19] 任何, 汪洁, 张东伟, 等. 血清 FKN、COMP、LTBP-2 表达水平与冠心病严重程度的关系 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2021, 19(10): 1694-1696.
- [20] 邓静, 陈垦, 杨大春, 等. 血清 CTX、PINP、COMP 表达水平与冠心病发生发展及疾病严重程度的相关性 [J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(18): 3899-3901.
- [21] 何雨峰, 李宁侠, 李建华, 等. 冠心病患者血清软骨寡聚基质蛋白水平变化及其与冠状动脉钙化的关系[J]. *中国医学装备*, 2018, 15(11): 87-90.
- [22] 李丹, 郝昆, 孟繁宇, 等. 冠心病慢性心力衰竭患者血清腱糖蛋白-C 水平与心功能和心肌重构的关系[J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(20): 4275-4277.
- [23] 费亚林. 术前血清肌腱蛋白 -C 水平与冠心病介入术后再狭窄的关系研究[J]. *山西医药杂志*, 2021, 50(6): 964-966.
- [24] 韩文君, 李欣, 林丽娜, 等. 急性冠状动脉综合征经皮冠状动脉介入术后主要不良心脏事件的预测研究 [J]. *北京医学*, 2023, 45(2): 95-99.
- [25] Palm DS, Drame A, Moliterno DJ, et al. Acute Coronary Syndromes Among Patients with Prior Coronary Artery Bypass Surgery [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2022, 24(11): 1755-1763.
- [26] 矫春峰, 贾晓宁, 王玉慧. 急性冠脉综合征患者 PCI 术后发生心血管事件的危险因素分析[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2022, 14(7): 875-877.