

## 幼羊颅骨缺损修复中 LncRNA 的差异性表达及作用

刘岩<sup>1,2,3</sup> 邵国<sup>1,2,3\*</sup> 张春阳<sup>1,2,3</sup>

**摘要** 目的 探讨长链非编码 RNA(LncRNA) 基因在幼羊颅骨缺损修复的差异性表达及改善颅骨缺损的作用。方法 将 12 只 1 月龄的小尾寒羊分成 2 组: 原生骨组织组、新生骨组织组, 每组 6 只。通过高通量测序检测两组骨组织内 LncRNA 的表达变化, 通过 Real-time PCR 验证测序 LncRNA 表达量的变化。ELISA 法检测血清中碱性磷酸酶( ALP) 和钙调蛋白( OCN); Western blot 检测 Wnt/ $\beta$ -catenin 的蛋白表达水平。结果 与原生骨组织组相比, 新生骨组织中 LncRNA ODSM、LncRNA UCA1 表达上调, LncRNA H19、LncRNA MEG3 的表达下调; 新生骨组织组幼羊血清中 ALP、OCN 的含量升高; 新生骨内的 Wnt/ $\beta$  蛋白的表达升高。结论 LncRNA ODSM、UCA1 可能调控 Wnt/ $\beta$  信号通路参与缺损部位颅骨组织的修复。

**关键词** 长链非编码 RNA; 颅骨缺损; Wnt/ $\beta$ -catenin; 碱性磷酸酶

中图分类号 R 651

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)01-0082-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.01.016

颅骨缺损修补是神经外科的一个难题, 多种因素可以影响缺损区颅骨的生长。长链非编码 RNA (long noncoding RNA, LncRNA) 能与 DNA、RNA、蛋白质结合形成由 LncRNA 参与的复杂的基因表达调控网, 进而参与骨损伤后的修复<sup>[1]</sup>。Bu et al<sup>[2]</sup> 发现 LncRNA t6 通过下调 miR-30a-5p, 促进颗粒诱导的成骨细胞凋亡。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP) 是一种由骨细胞分泌的磷酸酯酶, 在骨组织广泛存在。骨钙素(osteocalcin, OCN) 可间接反映成骨细胞的活跃水平。ALP、OCN 的含量反应机体骨组织的代谢情况。在颅骨组织损伤时, 骨的吸收和代谢因子发生变化, 如血清 ALP、OCN 等<sup>[3-4]</sup>。然而在幼羊颅骨缺损再生中 ALP、OCN 的表达情况还没有被明确。

该研究通过测序探究在原生、新生骨组织中 LncRNA 的差异性表达与其联系的 MicroRNA、Wnt/ $\beta$  调控骨生长的关系, 确定差异性表达的 LncRNA 在幼羊颅骨缺损修复表达调控的意义, 为临床上颅骨缺损的治疗提供新的理论基础。

2020-09-09 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81660214、81960238)

作者单位: 内蒙古科技大学包头医学院<sup>1</sup> 第一附属医院神经外科、  
<sup>2</sup> 神经外科疾病研究所(转化医学), 包头 014040

<sup>3</sup> 内蒙古自治区骨组织再生与损伤修复工程技术中心, 包头 014040

作者简介: 刘岩, 男, 硕士研究生;

张春阳, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhangchunyang\_1964@aliyun.com

\* 对本文具有同等贡献

group, and HEL experimental group. Cells of CM-Dil group were transplanted into zebrafish yolk sac of HEL experimental group by microinjection, and PBS experimental group was injected with PBS. The three groups of zebrafish were cultured in an incubator at 34 °C, and whether the model was established successfully was identified through *in vivo* and *in vitro* proliferation experiments and *in vivo* fluorescence observation, the successfully identified zebrafish were exposed to cytarabine drug, divided into 50, 100, 200 nmol/L group and model control group, the proliferation and migration of leukemia cells in xenograft tumor models after drug exposure in each group were observed. **Results** The proliferation status of HEL cells in the CM-Dil group and the blank group was similar, and the difference was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). The proliferation of HEL cells in zebrafish was confirmed by *in vitro* and *in vivo* proliferation experiments; The number of zebrafish in the HEL experimental group was lower than that in the blank control group and PBS injection group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model control group, the proliferation of the three concentrations of cytarabine drug exposure group was lower ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Human acute erythroleukemia HEL cells can be proliferated after transplantation into zebrafish embryos, and the proliferative activity can be interfered by cytarabine, confirming the successful establishment of the xenograft model.

**Key words** zebrafish; acute erythroleukemia; xenograft; human erythroleukemia cell; cytarabine

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及试剂、仪器** 普通级雄性 1 月龄小尾寒羊 12 只, 体质量( $5.5 \pm 0.5$ ) kg, 来源于内蒙古科技大学包头医学院动物实验室 [SCXK(蒙) K2016-0003], 无菌手术在内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院中心实验室 [SYXK(蒙) K 2005-0019] 进行, 动物实验由内蒙古科技大学包头医学院医学动物实验伦理审查委员会通过, 伦理审批 IACUC 号: 2016-033。

RIPA 裂解液及蛋白酶抑制剂(PMSF) 购于上海碧云天生物技术有限公司(货号: P0013C, ST505); 兔源 Wnt(货号: 1243243-89-1)、 $\beta$ -catenin(货号: ab6302)、 $\beta$ -actin(货号: ab8227) 抗体购于美国 Abcam 公司; BCA 蛋白定量试剂盒(货号: A53225) 购于美国 Thermo 公司; ECL 化学发光显色试剂盒(货号: P1010) 购于北京普利莱公司; 反转录试剂盒、ODSM、UCA1、H19、MEG3 和内参  $\beta$ -actin 基因引物购于上海生物工程股份有限公司; Real-time PCR MasterMix 荧光探针购于南京博尔迪公司; SYBR Green 荧光染料(美国 TaRaKa 公司); 超声波破碎仪(型号: FB 505220) 购于上海睿安生物科技有限公司; 全自动化学发光成像分析系统(型号: Tanon 5800) 购于北京中西远大科技有限公司; 酶标仪(型号: MultiskanFC)、实时荧光定量 PCR 仪(型号: ABI7900HT)、ABI7900 荧光定量 PCR 扩增仪(型号: ABI7900HT FAST) 购于美国 Thermo 公司。

**1.2 实验方法** 建立幼羊颅骨缺损模型, 12 只 1 月龄的小尾寒羊分成 2 组: 原生骨组织组、新生骨组织组, 每组 6 只, 按照 1 ml/kg 的剂量给予幼羊注射戊巴比妥钠, 待完全麻醉后, 俯卧固定于手术台, 去除表皮上的毛发, 碘伏、乙醇消毒, 在颅骨中线部位切开颅骨表面皮肤, 暴露颅骨, 分离骨膜, 用铣刀在中线部位切一直径为 3 cm 大小的颅骨, 不要损伤硬脑膜, 建立颅骨缺损模型(原生骨组只给予颅骨表面皮肤切开), 双氧水和庆大霉素反复冲洗手术区域防止感染, 缝合头皮(图 1)。术后每只羊给予青霉素 320 万 U, 早晚各 1 次肌肉注射, 连续给药 5~7 d 后拆线。1 个月后分别取缺损区新生的骨组织及其邻近的原生骨组织置于事先做好标记的冻存管中, 储存在  $-80$  °C 的冰箱中备用。部分样品送至南京派森诺基因科技有限公司测序。

**1.3 ELISA 检测血清 ALP、OCN 的含量** 使用酶联免疫吸附法在建立颅骨缺损模型前对 2 组幼羊进



图 1 幼羊颅骨缺损模型

行血清 ALP、OCN 含量的检测, 模型组完成建立模型 3 个月后, 再对 2 组幼羊进行 ALP、OCN 含量的检测。羊的颈静脉位于臂头肌和胸头肌构成的颈静脉沟内, 对其周围进行去毛、消毒, 入针点通常选择在颈部中部偏上。取血完毕后静置 2 h 取上清液  $-80$  °C 冻存。进行后续检测。

**1.4 Western blot 检测 Wnt、 $\beta$ -catenin 蛋白的差异性表达** 研磨每组的骨组织, 加入裂解液及蛋白酶抑制剂, 于冰上裂解 30 min, BCA 法对其进行蛋白定量, 计算每孔的加样体积, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳 2 h 将样品转移至 PVDF 膜上, 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h, 剪出目的条带及内参, 加入一抗 Wnt、 $\beta$ -catenin、 $\beta$ -actin(1 : 1 000) 工作液于 4 °C 过夜, 第 2 天加入 HRP 标记的羊抗兔二抗于室温孵育 2 h, ECL 化学发光显示蛋白条带, 使用 Image J 计算蛋白条带灰度值。

**1.5 荧光定量 PCR 验证差异性表达** 取出冻存的骨组织, 研磨后, 用 TRIzol 法提取总的 RNA, Nano-drop 2000 测定  $OD_{230}$ 、 $OD_{260}$ 、 $OD_{280}$  的值计算纯度,  $OD_{260}/OD_{280}$  在 1.8~2.2 之间,  $OD_{260}/OD_{230}$  在 2.0~2.2 之间可用于实验。按照试剂盒进行反转录, 采用 ABI7900 型荧光定量 PCR 仪, SYBR Green 荧光染料(美国 TaRaKa 公司) 为 PCR 反应原料, 反应体系参考说明书。利用 Prime 5 软件设计定量 PCR 所需引物及内参序列, 引物序列 UCA1: (上游) 5'-TT-TATGCTTGAGCCTTG-3', (下游) 5'-CTTGCTGAAATACTTG-3'; MEG3: (上游) 5'-ATAGCGCCCCTATTCATGC-3', (下游) 5'-GGGAGCAGCTATGGATCAC-3'; H19: (上游) 5'-CGTAGCAGTGACGAATGTG-3', (下游) 5'-TCTCATTGCCGAACACCT-3'; ODSM: (上游) 5'-GCUCUCUCCCUGACUGUUATT-3', (下游) 5'-U AACAGUCAGGGAGAGAGCTT-3';  $\beta$ -actin: (上游) 5'-TGGCGTGTAAAGTCACCACC-3', (下

游) 5'-CGAGCTCTGAGCACTGGAGA-3',引物由上海生物工程科技有限公司合成,以  $\beta$ -actin 为内参,  $2^{-\Delta CT}$  方法计算相对差异表达。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 原生骨、新生骨组织样品间 LncRNA 表达水平相关性检测 样品间 LncRNA 表达水平相关性是检验实验可靠性和样本选择是否合理的重要指标,在做差异表达分析之前,应先检查样品间 LncRNA 的表达水平相关性。本研究用皮尔逊相关系数表示样品间 LncRNA 的表达水平相关性,相关系数大于 0.9,见图 2。提示样品间 LncRNA 的表达水平相关性较好。

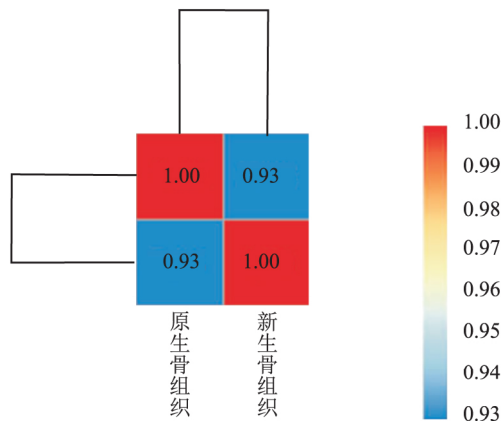


图2 样品相关性检验

2.2 LncRNA 差异分析结果 采用 DESeq 对 LncRNA 表达进行差异分析,筛选差异表达基因条件为  $|\log_2(\text{表达量差异倍数})| > 1$  且  $P < 0.05$ 。不同分组之间的 LncRNA 差异表达统计结果显示,在原生骨组织组与新生骨组织组中共计有 171 个基因发生变化,其中有 95 个 LncRNA 被上调,76 个 LncRNA 被下调。

2.3 LncRNA 表达差异分析比较 在所有表达差异的 LncRNA 中,选取 LncRNA ODSM、LncRNA H19、LncRNA UCA1、LncRNA MEG3 等差异明显的基因进行验证 RNA 的表达量,RT-PCR 检测的结果显示,与原生骨组织组相比,新生骨组织组中 LncRNA ODSM 的表达升高且差异有统计学意义( $t = 5.000, P < 0.01$ )、LncRNA UCA1 表达上升且差异具有统计学意义( $t = 7.205, P < 0.01$ ) (图 3A、3B)。

而与原生骨组织组相比,新生骨组织组中 LncRNA H19 的表达降低且差异具有统计学意义( $t = 7.412, P < 0.01$ )、LncRNA MEG3 表达降低且差异具有统计学意义( $t = 6.482, P < 0.01$ ) (图 3C、3D)。Real-time PCR 结果与高通量测序结果相符。

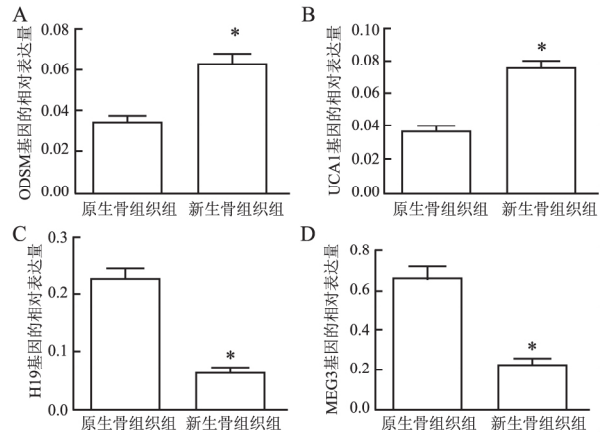


图3 Real-time PCR 检测 LncRNA 表达

A: LncRNA ODSM 表达; B: LncRNA UCA1 表达; C: LncRNA H19 表达; D: LncRNA MEG3 表达; 与原生骨组织组比较: \*  $P < 0.05$

2.4 MicroRNA 表达变化的分析 通过之前的测序结果显示 miRNA-139b-3p 的表达在两组实验中有差异,根据  $|\log_2(\text{表达量差异倍数})| > 1$  且  $P < 0.05$  进行筛选表明 miRNA-139b-3p 表达量有差异,再进行 RT-PCR 验证,结果显示原生骨组织中 miRNA-139b-3p 的相对丰度值为  $(0.065 \pm 0.014)$ ,新生骨组织中 miRNA-139b-3p 的相对丰度值为  $(0.175 \pm 0.036)$ 。新生骨组织内的 miRNA-139b-3p 的表达水平高于原生骨组织( $t = 6.399, P = 0.0002$ )。

2.5 血清 ALP、OCN 表达结果 分别对两组幼羊进行血清 ALP、OCN 含量的检测,结果显示,原生骨组织中 ALP 的含量为  $(59.13 \pm 10.06)$ 、OCN 的含量为  $(79.29 \pm 9.36)$ ,在建立颅骨缺损模型前 2 组幼羊的血清 ALP、OCN 含量差异不具有统计学意义( $P > 0.05$ ),而模型组建立 3 个月后,比较血清 ALP、OCN 的含量:与原生骨组织组相比,新生骨组织组血清的 ALP 含量  $(87.73 \pm 12.25)$  升高且差异具有统计学意义( $t = 4.420, P < 0.01$ ),新生骨组织组血清的 OCN 含量  $(108.89 \pm 15.70)$  升高且差异具有统计学意义( $t = 3.967, P < 0.01$ )。

2.6 骨组织中 Wnt、 $\beta$ -catenin 蛋白表达 Western blot 检测表明,与原生骨组织组相比,新生骨组织组中 Wnt 蛋白的表达升高且差异具有统计学意义( $t = 4.038, P < 0.01$ )。与原生骨组织组相比,新生骨组

组织中  $\beta$ -catenin 蛋白的升高且差异有统计学意义 ( $t=7.033$ ,  $P<0.01$ )。见图 4。

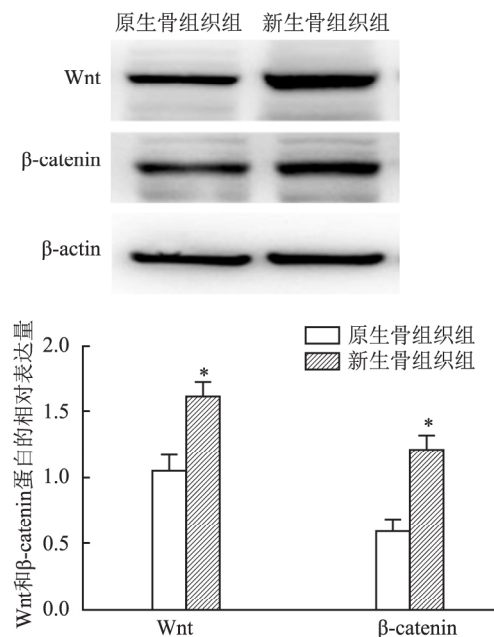


图4 Western blot 检测 Wnt 和  $\beta$ -catenin 蛋白表达与原生骨组织组相比较: \*  $P<0.05$

### 3 讨论

近年来,临床关于幼年儿童颅骨缺损是否修补仍存在争议,在广泛缺血性脑卒中、重型颅脑损伤(TBI)和颅内出血(ICH)患者均行减压开颅术,以治疗或避免顽固性颅内高压的严重后果。去骨瓣减压手术能有效地缓解和降低颅内压,能及时地防止脑疝等急重症的发生。临床研究<sup>[5]</sup>表明,对于重度的颅脑损伤的病人,及时行去骨瓣减压术能有效地促进患者神经功能的恢复,且术后并发症也相对较少。

研究<sup>[6]</sup>表明,非编码 RNA 在骨组织、软骨组织的生长调节中扮演了很重要的角色。有研究<sup>[7]</sup>表明 LncRNA ODSM 的靶向过表达可在体内和体外调节成骨细胞功能。同时, Liu et al<sup>[8]</sup>发现沉默 LncRNA MEG3 可调节 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路来治愈胫骨损伤。在与骨疾病相关的代谢中 GAS8-AS1 可能通过下调致癌 LncRNA UCA1 抑制骨肉瘤细胞迁移和侵袭<sup>[9]</sup>。而 H19 通过与之竞争的 miRNA 调控 STAT2 在 ADSCs 软骨分化过程中发挥其调节作用<sup>[10]</sup>。MicroRNA-139-3p 通过靶向 ELK1 并与 LncRNA ODSM 相互作用来调节成骨细胞的分化和凋亡<sup>[11]</sup>。同时 MicroRNA-19b-3p 通过与 LncRNA H19 相互作用促进 BMSCs 的细胞增殖和成骨分化<sup>[12]</sup>。

本研究表明在幼羊颅骨缺损区域新生的骨组织中检测到 95 个基因的上调及 76 个基因的下调,通过对骨组织进行 PCR 的验证显示,与原生的骨组织相比,新生骨内 LncRNA ODSM、UCA1 表达上调, H19、MEG3 的表达下调,表明在新生骨组织中 LncRNA 的变化参与了新生骨的调节。

Wnt 蛋白会通过旁分泌与自分泌的方式与细胞膜上的卷曲蛋白受体(FZD)和低密度脂蛋白受体(LRPs)相结合并激活下游散乱蛋白(Dsh)解除下游糖原合成酶激酶-3 $\beta$ 、轴抑制蛋白 1,抑制  $\beta$ -catenin 降解使其在胞质中不断积累,浓度的升高加速  $\beta$ -catenin 入核,激活相关靶基因,并发挥相应的生物学效应<sup>[13]</sup>。该通路主要在细胞的增殖、分化、迁移以及凋亡中发挥作用。骨特异性碱性磷酸酶(bone specific alkaline phosphatase, BALP)、OCN 作为骨形成的标志物在骨的生长过程中扮演了很重要的角色, BALP 是成骨细胞的一种细胞外酶,其主要作用是在成骨过程中水解磷酸酶,为羟基磷灰石的沉积提供磷酸,同时水解焦磷酸盐,解除其对骨盐形成的抑制作用,有利于成骨<sup>[14]</sup>。临床研究表明, ALP 的水平与成骨细胞呈线性关系,且对于 ALP 的检测已经成为临床上检测成骨细胞活跃的标志。有研究<sup>[15]</sup>显示在成骨细胞 MC3T3-E1 中, PS-GOS 通过调节 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路上调了 BMP-2 和 Runx2 的 mRNA 和蛋白表达水平,并伴有 ALP 和 OCN 活性的增加。与先前的研究一致,该研究显示建立颅骨缺损模型 3 个月后,与原生骨组织相比,新生骨组织 Wnt、 $\beta$ -catenin 蛋白的表达升高, ALP 及 OCN 的表达也升高,数据表明 Wnt/ $\beta$  信号通路蛋白表达的增加能促进 ALP、OCN 的上调而修复缺损部位骨组织的生长。

测序及 PCR 实验表明,与原生骨组织组相比,幼羊颅骨缺损部位 LncRNA 表达量存在差异,上调的及下调的 LncRNA 可能通过调控骨生长代谢过程中经典的 Wnt/ $\beta$  信号通路而起作用, 4 种 LncRNA 可作为调节骨代谢、骨生长的新靶点,其具体的调控通路及所涉及的机制仍有待研究。该研究以幼年小尾寒羊为研究对象,此大动物模型接近幼年儿童颅骨损伤修复过程,其中涉及的基因与幼年儿童颅骨损伤修复过程中的基因更接近。该研究可为指导临床幼年颅骨损伤的外科修补治疗提供实验依据。

### 参考文献

[1] Yin Z, Guan D, Fan Q, et al. LncRNA expression signatures in re-



- sponse to enterovirus 71 infection[J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 430: 629–33.
- [2] Bu Y, Zheng D, Wang L, et al. LncRNA TSIX promotes osteoblast apoptosis in particle-induced osteolysis by down-regulating miR-30a-5p[J]. *Connect Tissue Res* 2018 59(6): 534–41.
- [3] Zhang L, Gong Z. Clinical characteristics and prognostic factors in bone metastases from lung cancer[J]. *Med Sci Monit* 2017 23: 4087–94.
- [4] Wang T, Zhang C, Wu C, et al. miR-765 inhibits the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells by targeting BMP6 via regulating the BMP6/Smad1/5/9 signaling pathway[J]. *Stem Cell Res Ther* 2020 11(1): 62.
- [5] 吴昭镇. 标准去骨瓣减压术与常规去骨瓣减压术对重型颅脑损伤治疗效果及安全性分析[J]. *泰山医学院学报* 2017 38(9): 1049–51.
- [6] Belaya Z, Grebennikova T, Melnichenko G, et al. Effects of active acromegaly on bone mRNA and microRNA expression patterns[J]. *Eur J Endocrinol* 2018 178(4): 353–64.
- [7] Wang Y, Wang K, Zhang L, et al. Targeted overexpression of the long noncoding RNA ODSM can regulate osteoblast function *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cell Death Dis* 2020 11(2): 133.
- [8] Liu Y B, Lin L P, Zou R, et al. Silencing long non-coding RNA MEG3 accelerates tibia fraction healing by regulating the wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *J Cell Mol Med* 2019 23(6): 3855–66.
- [9] Zha Z, Han Q, Liu W, et al. lncRNA GAS8-AS1 downregulates lncRNA UCA1 to inhibit osteosarcoma cell migration and invasion[J]. *J Orthop Surg Res* 2020 15(1): 38.
- [10] Pang H L, Zhao Q Q, Ma Y, et al. Long noncoding RNA H19 participates in the regulation of adipose-derived stem cells cartilage differentiation[J]. *Stem Cells Int* 2019 2019: 2139814.
- [11] Xiaoling G, Shuaibin L, Kailu L. MicroRNA-19b-3p promotes cell proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs by interacting with lncRNA H19[J]. *BMC Med Genet* 2020 21(1): 11.
- [12] Wang Y, Wang K, Hu Z, et al. MicroRNA-139-3p regulates osteoblast differentiation and apoptosis by targeting ELK1 and interacting with long noncoding RNA ODSM[J]. *Cell Death Dis* 2018 9(11): 1107.
- [13] Clevers H, Nusse R. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease[J]. *Cell* 2012 149: 1192–205.
- [14] 张萌萌, 张秀珍, 邓伟民, 等. 骨代谢生化指标临床应用专家共识(2019)[J]. *中国骨质疏松杂志* 2019 25(10): 1357–72.
- [15] Yodthong T, Kedjarune-Leggat U, Smythe C, et al. Enhancing activity of pleurotus sajor-caju (Fr.) sing $\beta$ -1,3-Glucanoglycosaccharide (Ps-GOS) on proliferation, differentiation, and mineralization of MC3T3-E1 cells through the involvement of BMP-2/Runx2/MAPK/Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Biomolecules* 2020 10(2): 190.

## Differential expression and role of LncRNA in the repair of young sheep's skull defect

Liu Yan<sup>1 2 3</sup>, Shao Guo<sup>1 2 3</sup>, Zhang Chunyang<sup>1 2 3</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College,

<sup>2</sup>Institute of Neurosurgical Diseases of Baotou Medical College, Translational Medicine,

Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040; <sup>3</sup>Engineering Technology

Center for Bone Tissue Regeneration and Injury Repair in Inner Mongolia Autonomous Region, Baotou 014040)

**Abstract Objective** To investigate the differential expression of long noncoding RNA (LncRNA) gene in the regeneration of skull defects in young sheep and its effects in improving skull defects. **Methods** Twelve 1-month-old small-tailed Han sheep were divided into the primary bone tissue group and the skull defect group, with 6 in each group. High-throughput sequencing was used to detect the expression changes of LncRNA in the two groups of bone tissues, and Real-time PCR was used to verify the changes in the expression of sequencing LncRNA. The serum alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OCN) were detected by ELISA. The protein expression levels of Wnt and  $\beta$ -catenin were detected by Western blot. **Results** The expressions of LncRNA ODSM and LncRNA UCA1 were up-regulated, while the expressions of LncRNA H19 and LncRNA MEG3 were down-regulated in the new bone tissue; the content of ALP and OCN in serum of the new bone group increased; the expression of Wnt/ $\beta$  protein in bone increased compared with the original bone tissue group. **Conclusion** LncRNA ODSM and UCA1 may regulate Wnt/ $\beta$  signaling pathway and participate in the regeneration of skull tissue at the defect site.

**Key words** LncRNA; skull defect; Wnt/ $\beta$ -catenin; alkaline phosphatase