

lncRNA H19 调控 miR-149-5p/BMP2 轴对 BMSCs 的成骨分化及足骨骨折小鼠骨再生的影响

张怀贵, 姑再阿依·买买提, 唐卫东

(新疆维吾尔自治区人民医院整形外科, 乌鲁木齐 830000)

摘要 **目的** 研究长链非编码 RNA (lncRNA) H19 在足骨骨折小鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 成骨分化及足骨骨折小鼠骨再生中的作用及其机制。**方法** 将 BMSCs 分为微小 RNA-149-5p (miR-149-5p) - 模拟物阴性对照 (miR-mimic-NC) 组和 miR-149-5p-模拟物 (miR-mimic) 组并分别转染 lncRNA H19-wt 和 lncRNA H19-mut 重组质粒, 或分别转染骨形成蛋白 2 (BMP2) 3' UTR-wt 和 BMP2 3' UTR-mut 重组质粒, 双荧光素酶报告基因检测实验检测各组的荧光素酶活性。体外研究 lncRNA H19 对成骨分化的调控作用与机制, 将 BMSCs 分为对照组和成骨诱导组 (成骨组), 对成骨诱导下的 BMSCs 分别转染相应的质粒后分为成骨 + si-NC 组、成骨 + si-H19 组、成骨 + si-H19 + miR-inhibitor-NC 组、成骨 + si-H19 + miR-inhibitor 组、成骨 + si-H19 + pcDNA-NC 组、成骨 + si-H19 + pcDNA-BMP2 组。采用碱性磷酸酶 (ALP) 活性实验和茜素红染色评估成骨分化。另建立小鼠足骨骨折模型, 将 36 只小鼠随机分为假手术组、模型组、模型 + pcD-null 组、模型 + pcD-H19 组, 每组 9 只。采用 ALP 活性实验评估成骨分化。实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测 lncRNA H19、miR-149-5p、BMP2 的表达, Western blot 检测 BMP2、骨钙蛋白 (OCN)、骨基质细胞分化因子 osterix (OSX)、Runt 相关转录因子 2 (RUNX2)、骨桥蛋白 (OPN) 的表达。**结果** 在转染 lncRNA H19-wt 的细胞中, miR-mimic 组的荧光素酶活性低于 miR-mimic-NC 组 ($P < 0.05$), 在转染 BMP2 3' UTR-wt 的细胞中, miR-mimic 组的荧光素酶活性低于 miR-mimic-NC 组 ($P < 0.05$)。与对照组比, 成骨组的 ALP 活性、细胞矿化程度以及 lncRNA H19、BMP2、OCN、OSX、RUNX2、OPN 的表达增加, miR-149-5p 的表达降低 ($P < 0.05$)。与成骨 + si-NC 组比, 成骨 + si-H19 组的 ALP 活性、细胞矿化程度以及 lncRNA H19、BMP2、OCN、OSX、RUNX2、OPN 的表达降低, miR-149-5p 的表达增加 ($P < 0.05$)。与成骨 + si-H19 + miR-inhibitor-NC 组比, 成骨 + si-H19 + miR-inhibitor 组 ALP 活性、细胞矿化程度以及 lncRNA H19、BMP2、OCN、OSX、RUNX2、OPN 的表达增加, miR-149-5p 的表达降低 ($P < 0.05$)。与成骨 + si-H19 + pcDNA-NC 组比, 成骨 + si-H19 + pcDNA-BMP2 组 ALP 活性、细胞矿化程度以及 BMP2、OCN、OSX、RUNX2、OPN 的表达增加 ($P < 0.05$)。与假手术组比、模型组的 ALP 活性以及 lncRNA H19、BMP2、OCN、OSX、RUNX2、OPN 的表达降低, miR-149-5p 的表达增加 ($P < 0.05$)。与模型 + pcD-null 组比, 模型 + pcD-H19 组的 ALP 活性以及 lncRNA H19、BMP2、OCN、OSX、RUNX2、OPN 的表达增加, miR-149-5p 的表达降低 ($P < 0.05$)。**结论** lncRNA H19 通过 miR-149-5p/BMP2 轴促进 BMSCs 成骨分化及足骨骨折小鼠的骨再生。

关键词 lncRNA H19; 成骨分化; 足骨骨折; 小鼠; 骨形成蛋白 2; 碱性磷酸酶

中图分类号 R 683

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492 (2025) 06 - 1059 - 10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2025.06.012

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是具有多向分化潜能的成体干细胞, 可分化为成骨细胞、软骨细胞等, 在骨组织工程及骨折修复中发挥关键作用^[1-3]。其成骨分化受转录及转录后水平的多重信号通路调控, 其中长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 通过调控基因表达参与该过程^[4]。研究^[5-7]表明, lncRNA 可作为微小 RNA (microRNA, miRNA) 的“分子海绵”, 通过吸附 miRNA 解除其对靶基因的抑制作用,

从而诱导 BMSCs 成骨分化。如 lncRNA H19 通过抑制 miR-141、miR-22 及吸附 miR-149-5p 促进成骨分化。然而, lncRNA H19 是否通过 miR-149-5p/骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2) 轴调控 BMSCs 成骨分化, 并加速体内骨折愈合的分子机制尚未明确。

该研究通过验证 lncRNA H19 对 miR-149-5p/BMP2 轴调控作用, 观察其对 BMSCs 成骨分化的影响, 并在小鼠足骨骨折模型中探讨了其对骨折修复的调控效应, 旨在揭示 lncRNA H19 通过 miR-149-5p/BMP2 轴调控成骨分化的分子机制, 为足骨骨折的靶向治疗提供新策略。

2025 - 04 - 30 接收

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (编号: 2023D01C318)

作者简介: 张怀贵, 男, 本科, 副主任医师, 通信作者, E-mail: pan096

@sina.com

1 材料与方法

1.1 主要材料 人 BMSCs 购自武汉普诺赛生物技术有限公司。36 只成年雄性 C57BL/6 小鼠购自新疆医科大学实验动物中心,生产许可证号:SCXK(新)2023-0001。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Gibco 公司。杜氏改良培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养基购自美国 Thermo Fisher 公司。Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司。lncRNA H19 野生型(wild type, wt)或突变型(mutant type, mut)质粒、BMP2 3'UTR wt 或 BMP2 3'UTR-mut 质粒、miR-149-5p 的模拟物(miR-mimic)或模拟物阴性对照物(negative control of mimic, miR-mimic-NC)、针对沉默 lncRNA H19 的小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)载体质粒(si-lncRNA H19)、siRNA 的阴性对照(negative control of siRNA, si-NC)、针对过表达 lncRNA H19 的 pcDNA3.1(+)重组质粒(pcD-H19)、pcD-H19 的空质粒对照(pcD-null)、针对过表达 BMP2 的 pcDNA3.1(+)重组质粒(pcDNA-BMP2)、pcDNA-BMP2 的阴性对照(negative control of pcDNA-BMP2, pcDNA-NC)、miR-149-5p 抑制剂阴性对照(negative control of miR-149-5p inhibitor, inhibitor-NC)、miR-149-5p 的抑制剂(miR-149-5p-inhibitor)均购自上海吉玛公司。TRIzol 试剂、SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒、PrimeScript RT 试剂盒均购自美国 Thermo Fisher 公司。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测试剂盒、茜素红染色试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。兔抗-骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)、骨基质细胞分化因子 osterix(OSX)、Runt 相关转录因子 2(Runt-related transcription factor2, RUNX2)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的一抗以及对应的山羊抗兔 IgG 二抗均购自英国 Abcam 公司。

1.2 体外实验

1.2.1 BMSCs 细胞的培养 在 37 ℃、5% CO₂ 的湿润培养箱中, BMSCs 细胞使用含 10% FBS 和 100 U/ml 青链霉素的 DMEM 培养基进行培养,每 2 d 换液 1 次。

1.2.2 双荧光素酶报告试验 lncRNA H19 和 miR-149-5p 的碱基结合位点用 StarBase(ENCORI)数据库(<https://rnasysu.com/encori/>)进行预测分

析。进一步验证 lncRNA H19 与 miR-149-5p 的关系。含预测 miR-149-5p 结合位点的野生型和突变型 lncRNA H19(分别为 lncRNA H19-wt 和 lncRNA H19-mut)的荧光素酶转染载体以及含预测 miR-149-5p 结合位点的野生型和突变型 BMP2 3'UTR(分别为 BMP2 3'UTR-wt 和 BMP2 3'UTR-mut)的荧光素酶转染载体均构建于上海吉玛公司。根据操作说明书,将 BMSCs 细胞接种在 6 孔板中并使用 Lipofectamine 3000 联合转染 miR-mimic 和 lncRNA H19-wt 或 lncRNA H19-mut,对照为 lipofectamine 3000 联合转染 miR-mimic-NC 和 lncRNA H19-wt 或 lncRNA H19-mut,将 BMSCs 细胞接种在 6 孔板中并使用 Lipofectamine 3000 联合转染 miR-mimic 和 BMP2 3'UTR-wt 或 BMP2 3'UTR-mut,对照为 lipofectamine 3000 联合转染 miR-mimic-NC 和 BMP2 3'UTR-wt 或 BMP2 3'UTR-mut。转染后 24 h 收集细胞,最后,用双荧光素酶报告分析系统(美国 Promega)分析 lncHAGLR 的荧光素酶活性。

1.2.3 BMSCs 细胞的分组 首先,为研究 lncRNA H19 对 miR-149-5p 和 BMP2 的表达的调控作用以及 miR-149-5p 对 BMP2 的表达的调控作用,将 BMSCs 细胞分为 si-NC 组、si-H19 组、miR-mimic-NC 组、miR-mimic 组。其次,为研究 lncRNA H19 是否通过调控 miR-149-5p 对细胞成骨分化具有调控作用,将 BMSCs 培养于成骨分化诱导培养基中,命名为成骨诱导组(成骨组),正常培养的细胞为对照组。另外,对成骨诱导培养下的细胞分别转染 si-NC 质粒、si-H19 质粒、si-H19 联合 miR-inhibitor-NC 的混合质粒、si-H19 联合 miR-inhibitor 的混合质粒、si-H19 联合 pcDNA-NC 的混合质粒及 si-H19 联合 pcDNA-BMP2 的混合质粒,分别命名为成骨 + si-NC 组、成骨 + si-H19 组、成骨 + si-H19 + miR-inhibitor-NC 组、成骨 + si-H19 + miR-inhibitor 组、成骨 + si-H19 + pcDNA-NC 组、成骨 + si-H19 + pcDNA-BMP2 组。具体转染方法为用含有 5 μl Lipofectamine® 3000 和 5 μg/ml 的单质粒或混合质粒成骨诱导培养基孵育细胞 24 h。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, qPCR) 将各组细胞收集后置于冰上,加入 TRIzol 裂解 5~10 min,将液体排入 EP 管,加入 1/5 体积的三氯甲烷;液体混合后在 4 ℃下放置 10~15 min。随后,将混合物在 4 ℃下离心 15 min;取出 400~500 μl 上清液并放入新的 EP 管中。加入等体积的异丙醇,在 4 ℃下孵育 10 min,然后在 12 000

r/min 下离心 10 min。所得颗粒用 75% 乙醇洗涤,干燥后加入 50 μl 焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)水溶液使颗粒完全溶解,然后储存在 -80 ℃。根据制造商的方案,使用 TRIzol 试剂提取总细胞 RNA 或总 miRNA。通过在溴化乙锭染色的 1% 琼脂糖凝胶上电泳确认 RNA 的完整性。使用 PrimeScript RT 试剂盒从收集的 1 μg RNA 合成 cDNA。采用 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒进行 qPCR 检测,结果采用 2^{-ΔΔC_t}法计算基因的相对表达。*GAPDH* 作为 *lncRNA H19* 的内参基因,*U6* 作为 *miR-149-5p* 的内参基因。引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列
Tab.1 qPCR primer sequences

Genes	Primer sequences (5'-3')
<i>lncRNA H19</i>	F: GATGGAGAGGACAGAAGGACAGT
	R: GAGAGCAGCAGAGATGTGTTAGC
<i>GAPDH</i>	F: TGCCATGTAGACCCCTTGAAG
	R: ATGGTACATGACAAGCTGCCG
<i>miR-149-5p</i>	F: 5GTTTGTGGCTCCGTGT
	R: CAGTGCCTGTCGTGGAGT
<i>U6</i>	F: CTCGCTTCGGCAGCAC
	R: AACGCTTCACGAATTTCGT

1.2.5 ALP 检测实验 用 Triton X-100 裂解各组 BMSCs, 10 000 r/min 离心 15 min 提取蛋白。按照 ALP 检测试剂盒的说明书进行 ALP 染色。在蛋白质中加入 50 μl ALP 底物反应液和显色剂。使用酶标仪(型号: CLARIOstar Plus, 德国 BMG LABTECH 公司)测定 405 nm 波长处的吸光度(*A*₄₀₅),并计算 BMSCs 的 ALP 活性。

1.2.6 茜素红细胞矿化实验 细胞接种于 6 孔板内,诱导培养至 28 d 时进行茜素红染色。具体染色步骤:取出 6 孔板,弃尽原培养液,无菌 PBS 漂洗 2 次;4% 多聚甲醛固定 15 min;弃固定液,双蒸水漂洗 3 次;每孔加入 0.2% 茜素红染液 2 ml,染色 30 min;弃去染料,双蒸水漂洗 5 次;充分漂洗后,每孔加入适量双蒸水防止孔内干燥,显微镜下观察拍照,用 Image J 软件分析矿化百分比。

1.2.7 Western blot 实验 使用 RIPA 缓冲液提取 BMSCs 细胞中的总蛋白,并使用 Bicinchoninic 酸测定试剂盒进行鉴定。然后将平均蛋白用 10% SDS-PAGE 分离,转移到 PVDF 膜上。然后在室温下将膜在 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h,并在 4 ℃ 下孵育兔抗-BMP2、OCN、OSX、RUNX2、OPN、GAPDH 的特异性抗体过夜。随后,将膜在二抗(1 : 1 000)中孵育 1

h。最后,根据摘要,由 ECL 检测系统试剂进行蛋白条带的显示,并根据 Image J 软件分析条带的灰度值。

1.3 体内实验

1.3.1 动物造模和分组 本研究中的涉及的所有动物实验均通过该院伦理委员会的审查和批准(批号:KY20231221516)。将 36 只成年雄性 C57BL/6 小鼠(6 周龄)分笼喂养,每笼 4 只,室内温度 24 ℃,自然光照射,湿度 30% ~ 40% 的实验室[使用许可证号:SYXK(新)2023-0004],适应性常规喂养 1 周。随机选取 9 只小鼠命名为假手术组,用体积分数 10% 的水合氯醛按 3 ml/kg 剂量腹腔注射麻醉,暴露第一跖骨随后缝合,其余操作与模型组一致。随机选取 9 只小鼠命名为模型组,同假手术组进行腹腔注射麻醉。麻醉生效后,取仰卧位,将四肢固定在操作台上,右侧后足常规消毒铺无菌巾,在第一跖骨处做一长 1 cm 的切口,小心牵拉暴露第一跖骨,确保视野清晰。使用微型电动锯或专用骨钻代替止血钳,在预定切割处标记位置,确保切口平行且精准。沿标记线切割第一跖骨,保持切割速度均匀,力度适中,避免对骨头造成额外损伤。使用显微镊子或微型刮匙小心去除两横截面之间的骨组织,确保骨缺损的宽度为 1 mm。使用生理盐水冲洗切口,清除骨屑和其他碎屑,确保手术区域清洁。检查骨折对线对位情况,确保无旋转畸形,如有需要,可以使用微型钢板或可吸收固定材料进行临时固定,以保持对位。彻底止血后,依次缝合肌肉、皮下组织和皮肤,采用细针细线缝合,减少组织损伤,促进愈合。术后肌注青霉素 8 万 U,每日 1 次,连注 3 d。模型 + pcD-null 组的操作同模型组,于手术后 24 h 在第一跖骨横截面处的中心部位注射 10 mg/kg 的 pcD-null,注射前使用显微镜定位并标记注射点以确保精准,每周 1 次,连续注射 3 周。模型 + pcD-H19 组的操作同模型组,于手术后 24 h 在第一跖骨横截面处的中心部位(用显微镜定位)注射 10 mg/kg 的 pcD-H19,每周 1 次,连续注射 3 周。8 周后取 3 mm³ 的小鼠的骨折处骨组织检测 ALP 活性以及 *lncRNA H19*、*miR-149-5p*、*BMP2*、*OCN*、*OSX*、*RUNX2*、*OPN* 的表达。

1.3.2 骨折部位成骨分化能力的检测 各组组织匀浆后,用 Triton X-100 裂解,10 000 r/min 离心 15 min 提取蛋白。其余方法同 1.2.5。

1.3.3 骨折部位 *lncRNA H19* 和 *miR-149-5p* 表达的检测 将各组组织置于冰上,进行匀浆,加入

TRIzol 裂解 5 ~ 10 min,其余方法同 1. 2. 4。

1. 3. 4 骨折部位 BMP2、OCN、OSX、RUNX2、OPN 蛋白表达的检测 用 RIPA 缓冲液提取匀浆后组织中的总蛋白,其余方法同 1. 2. 7。

1. 4 统计学处理 采用 SPSS 22. 0 软件进行统计分析,符合正态分布的数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。*t* 检验分析两组的差异。多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0. 05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2. 1 BMSCs 中 lncRNA H19 靶向调控 miR-149-5p 通过生物信息学预测软件 StarBase 预测发现 miR-149-5p 含有 lncRNA H19 的潜在结合位点。在 BMSCs 中使用野生型或突变型 lncRNA H19 荧光素酶载体 (lncRNA H19-wt 或 lncRNA H19-mut) 进行了荧光素酶报告基因检测。与 miR-mimic-NC 组比较, miR-mimic 组 lncRNA H19-wt 的荧光素酶活性降低, 差异有统计学意义 ($P < 0. 05$), 而 lncRNA H19-mut 的荧光素酶活性没有明显降低 ($P > 0. 05$)。此外, 与 si-NC 组比, si-H19 组的 miR-149-5p 表达水平升高 ($P < 0. 05$)。见图 1A ~ D。

2. 2 BMSCs 中 miR-149-5p 靶向调控 BMP2 在 BMSCs 中使用野生型或突变型 BMP2 3'UTR 荧光素

酶载体 (BMP2 3'UTR-wt 或 BMP2 3'UTR-mut) 进行荧光素酶报告基因检测。结果显示, 与 miR-mimic-NC 组相比, miR-mimic 组的 BMP2 3'UTR- wt 荧光素酶活性降低 ($P < 0. 05$), 而 BMP2 3'UTR-mut 荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P > 0. 05$)。此外, 与 miR-mimic-NC 组相比, miR-mimic 组的 miR-149-5p 表达水平升高 ($P < 0. 05$), BMP2 的表达水平降低 ($P < 0. 05$); 与 si-NC 组相比, si-H19 组的 BMP2 的表达水平降低 ($P < 0. 05$)。见图 2。

2. 3 敲低 lncRNA H19 通过调控 miR-149-5p/BMP2 轴抑制 BMSCs 的成骨分化 与对照组比, 成骨组中 ALP 活性、细胞矿化程度、lncRNA H19 和 BMP2 的表达水平都增高, miR-149-5p 的表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0. 05$)。与成骨 + si-NC 组比, 成骨 + si-H19 组 ALP 活性、细胞矿化程度、lncRNA H19 和 BMP2 的表达水平都降低, miR-149-5p 的表达水平增高, 差异有统计学意义 ($P < 0. 05$)。与成骨 + si-H19 + miR-inhibitor-NC 组比, 成骨 + si-H19 + miR-inhibitor 组 ALP 活性、细胞矿化程度和 BMP2 的表达水平都增加, miR-149-5p 的表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0. 05$)。与成骨 + si-H19 + pcDNA-NC 组比, 成骨 + si-H19 + pcDNA-BMP2 组 ALP 活性、细胞矿化程度和 BMP2 的表达水平都增加, 差异有统计学意义 ($P < 0. 05$)。见图 3。

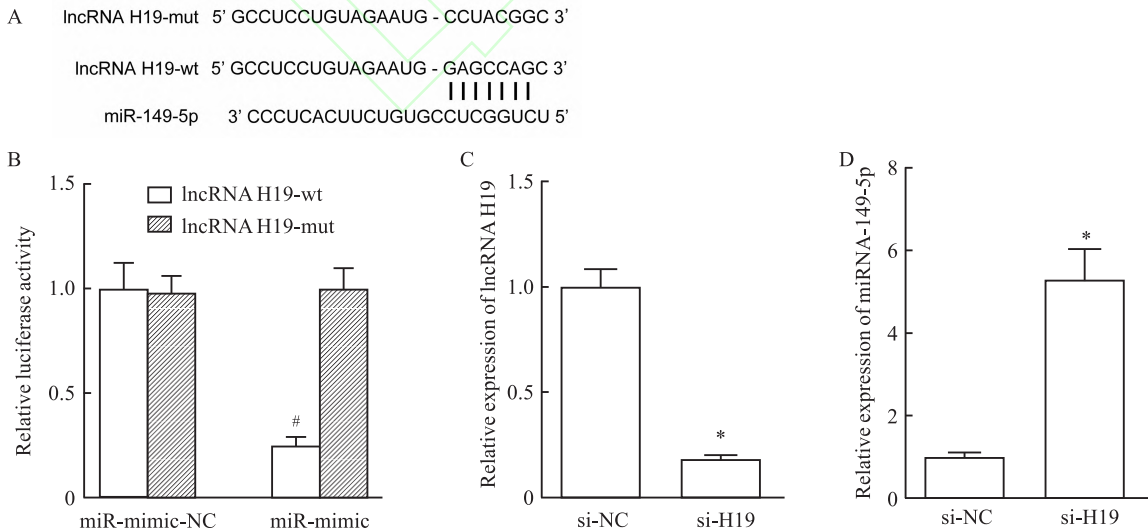


图 1 miR-149-5p 是 lncRNA H19 靶点

Fig. 1 miR-149-5p was confirmed to be the target of lncRNA H19

A: The StarBase database provided the presumed binding sites of lncRNA H19 and miR-149-5p; B: Dual luciferase reporter gene assay confirm the binding between lncRNA H19 and miR-149-5p; C: The expression of lncRNA H19 was detected by qPCR; D: The expression of miR-149-5p was detected by qPCR; * $P < 0. 05$ vs si-NC group; # $P < 0. 05$ vs miR-mimic-NC group.

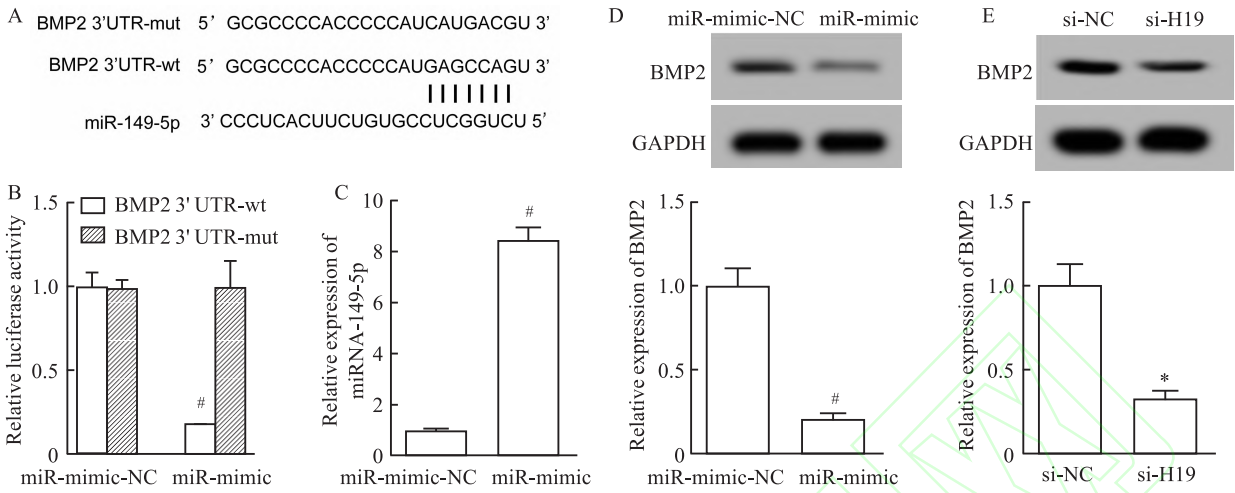


图2 BMP2 是 miR-149-5p 的靶点

Fig.2 BMP2 was confirmed to be the target of miR-149-5p

A: The StarBase database provided putative binding sites for BMP2 3'UTR and miR-149-5p; B: Dual luciferase reporter gene assay confirmed the binding between BMP2 3'UTR and miR-149-5p; C: The expression of miR-149-5p was detected by qPCR; D, E: Western blot analysis of BMP2 expression; [#] $P < 0.05$ vs miR-mimic-NC group; ^{*} $P < 0.05$ vs si-NC group.

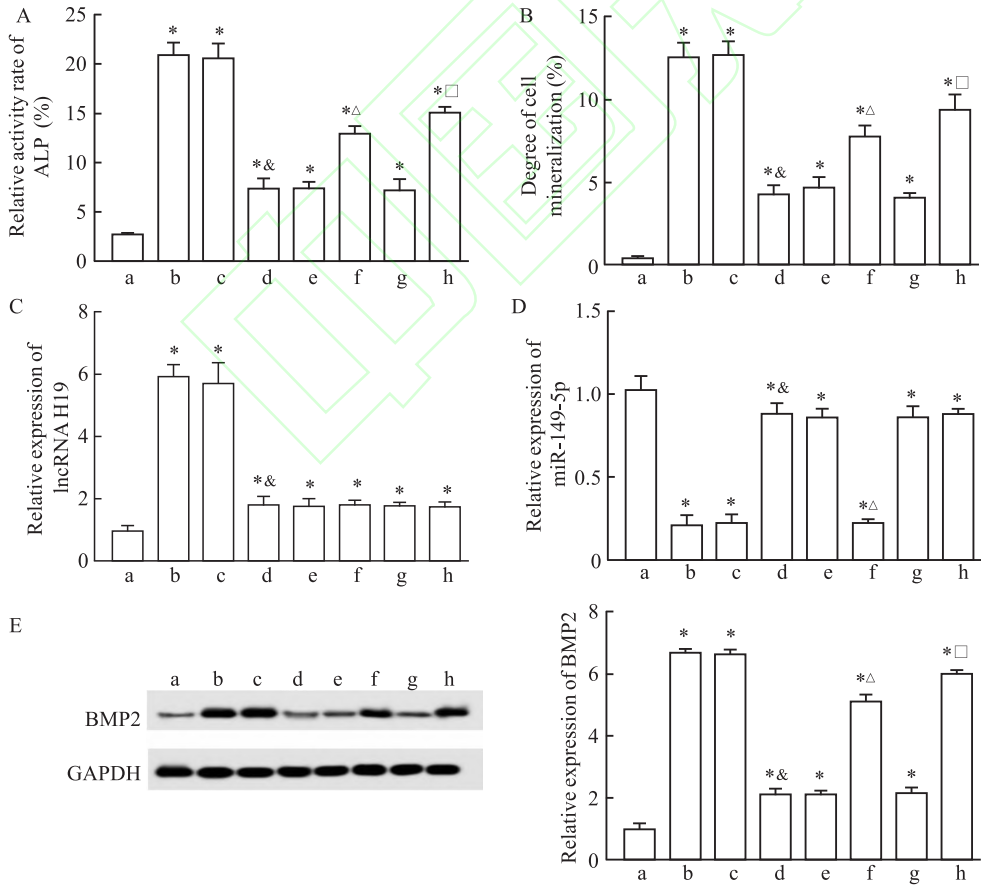


图3 敲低 lncRNA H19 通过调控 miR-149-5p/BMP2 轴抑制 BMSCs 的成骨分化

Fig.3 Knocking down lncRNA H19 inhibited osteogenic differentiation of BMSCs by regulating the miR-149-5p/BMP2 axis

A: ALP activity test results; B: Alizarin red mineralization test results; C, D: qPCR were used to detect the expression of lncRNA H19 and miR-149-5p; E: Western blot was used to detect the expression of BMP2; a: control group; b: osteogenesis group; c: osteogenesis + si-NC group; d: osteogenesis + si-H19 group; e: osteogenesis + si-H19 + miR-inhibitor-NC group; f: osteogenesis + si-H19 + miR-inhibitor group; g: osteogenesis + pcDNA-NC group; h: osteogenesis + pcDNA-BMP2 group; ^{*} $P < 0.05$ vs control group; [&] $P < 0.05$ vs osteogenesis + si-NC group; [△] $P < 0.05$ vs osteogenesis + si-H19 + miR-inhibitor-NC group; [□] $P < 0.05$ vs osteogenesis + pcDNA-NC group.

2.4 敲低 lncRNA H19 通过调控 miR-149-5p/BMP2 轴抑制 BMSCs 的 OCN、OSX、RUNX2、OPN 的蛋白表达 与对照组比,成骨组中 OCN、OSX、RUNX2、OPN 的表达水平都增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与成骨组或成骨 + si-NC 组比,成骨 + si-H19 组 OCN、OSX、RUNX2、OPN 的表达水平都降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与成骨 + si-H19 组或成骨 + si-H19 + miR-inhibitor-NC 组比,成骨 + si-H19 + miR-inhibitor 组 OCN、OSX、RUNX2、OPN 的表达水平都增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与成骨 + si-H19 组或成骨 + si-H19 + pcDNA-NC 组比,成骨 + si-H19 + pcDNA-BMP2 组 OCN、OSX、RUNX2、OPN 的表达水平都增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 过表达 lncRNA-H19 对小鼠足骨成骨分化的影响 与假手术组比,模型组的 ALP 活性和 lncRNA-H19、BMP2 的表达降低,而 miR-149-5p 的表达增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组或模型 + pcD-null 组相比,模型 + pcD-H19 组的 ALP 活性和 lncRNA-H19、BMP2 的表达都增加,而

miR-149-5p 的表达降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5。

2.6 过表达 lncRNA-H19 对 OCN、OSX、RUNX2、OPN 表达的影响 与假手术组比,模型组的 OCN、OSX、RUNX2、OPN 的表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组或模型 + pcD-null 组相比,模型 + pcD-H19 组的 OCN、OSX、RUNX2、OPN 的表达都增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 6。

3 讨论

随着人口老龄化趋势加剧,骨折患者显著增多,寻找新型有效的骨再生治疗策略成为当前研究重点之一^[8]。lncRNA 作为非编码 RNA 的一类,近年来在干细胞命运调控中的作用逐渐受到重视,尤其是在成骨分化过程中的调控机制,如染色质重塑、转录调控和作为竞争性内源 RNA (ceRNA) 调节 miRNA 活性等^[7]。本研究旨在探讨 lncRNA H19 在 BMSCs 成骨分化中的作用机制,并揭示其通过 miR-149-5p/BMP2 轴实现的调控网络,为骨再生治疗提供新的分子靶点。

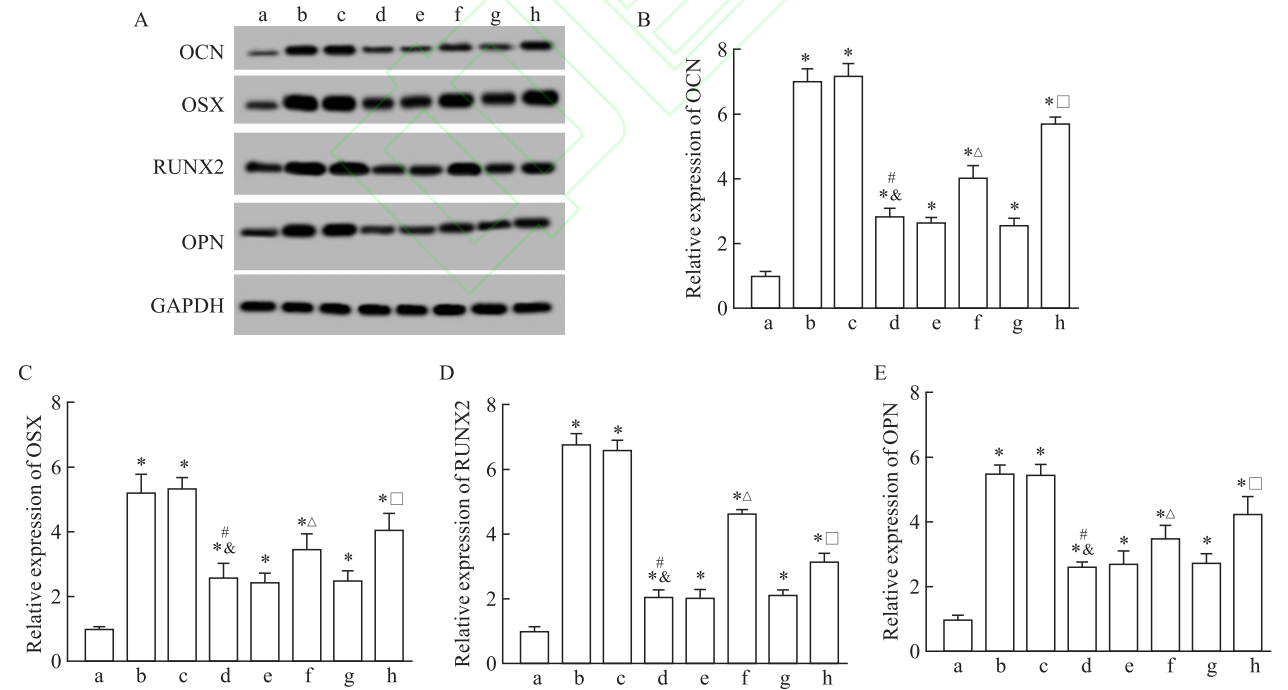


图 4 敲低 lncRNA H19 通过调控 miR-149-5p/BMP2 轴抑制 BMSCs 的 OCN、OSX、RUNX2、OPN 的蛋白表达

Fig. 4 Down-tapping of lncRNA H19 inhibited the protein expression of OCN, OSX, RUNX2, and OPN in BMSCs by regulating the miR-149-5p/BMP2 axis

A - E: Western blot analysis of OCN, OSX, RUNX2, OPN expression; a: control group; b: osteogenesis group; c: osteogenesis + si-NC group; d: osteogenesis + si-H19 group; e: osteogenesis + si-H19 + miR-inhibitor-NC group; f: osteogenesis + si-H19 + miR-inhibitor group; g: osteogenesis + pcDNA-NC group; h: osteogenesis + pcDNA-BMP2 group; * $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs osteogenesis group; & $P < 0.05$ vs osteogenesis + si-NC group; Δ $P < 0.05$ vs osteogenesis + si-H19 + miR-inhibitor-NC group; □ $P < 0.05$ vs osteogenesis + pcDNA-NC group.

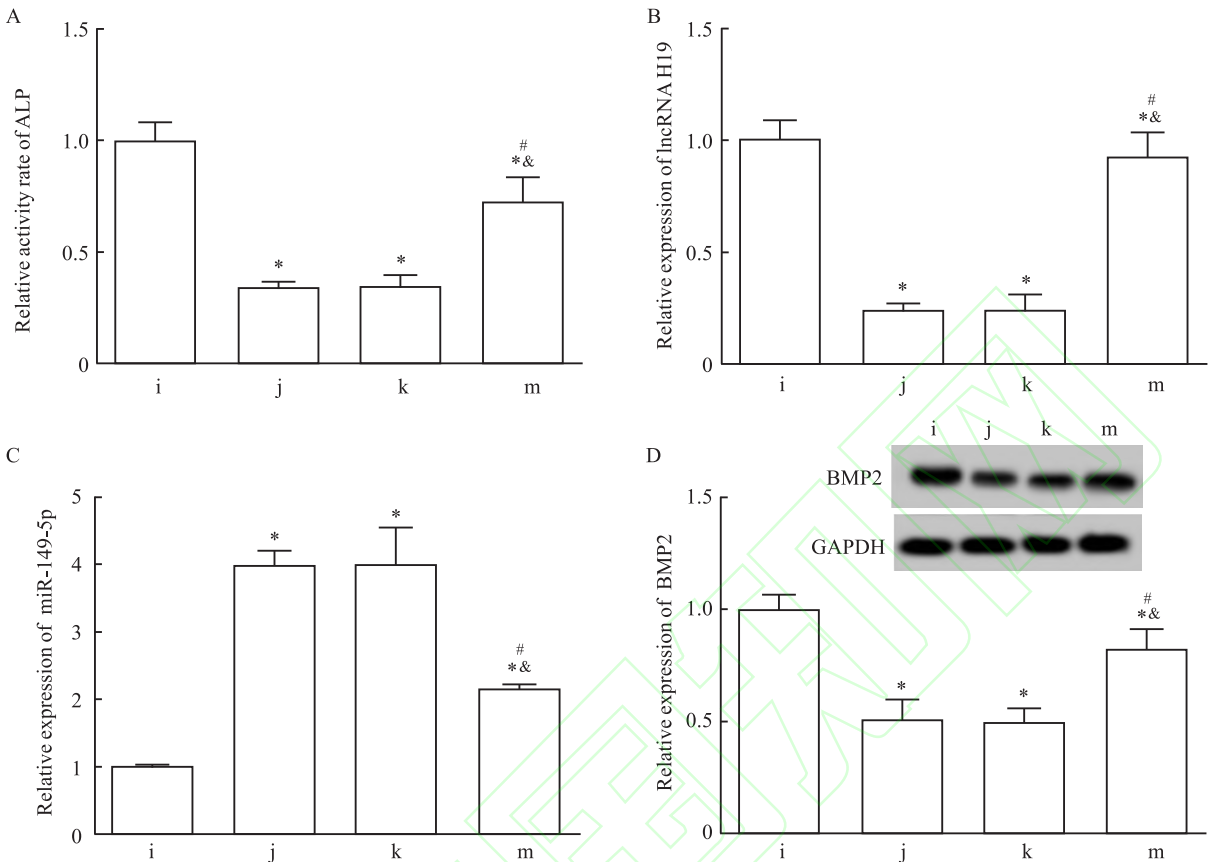


图5 过表达 lncRNA-H19 对小鼠足骨成骨分化的影响

Fig. 5 The effects of the overexpression of lncRNA-H19 on mice foot bone osteogenesis differentiation

A: The influence of alkaline phosphatase activity test results; B, C: qPCR were used to detect the expression of lncRNA H19 and miR-149-5p; D: The expression of BMP2 was detected by Western blot; i: sham group; j: model group; k: model + pcD-null group; m: model + pcD-H19 group; * $P < 0.05$ vs sham group; & $P < 0.05$ vs model + pcD-null group; # $P < 0.05$ vs model group.

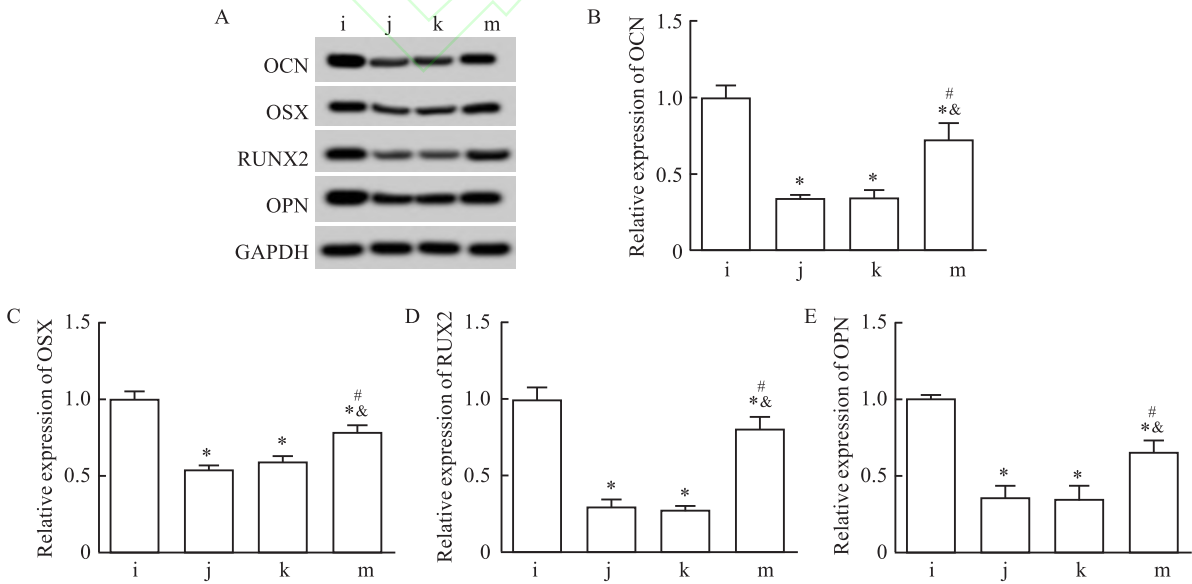


图6 过表达 lncRNA-H19 对 OCN、OSX、RUNX2、OPN 表达的影响

Fig. 6 The effects of lncRNA-H19 overexpression on OCN, OSX, RUNX2, and OPN expression

A – E: Western blot analysis of OCN, OSX, RUNX2, OPN expression; i: sham group; j: model group; k: model + pcD-null group; m: model + pcD-H19 group; * $P < 0.05$ vs sham group; & $P < 0.05$ vs model + pcD-null group; # $P < 0.05$ vs model group.

本实验验证了 lncRNA H19 与 miR-149-5p 之间的靶向结合关系,并发现 lncRNA H19 的下调可促进 miR-149-5p 表达,进一步抑制 BMP2 表达,影响 BMSCs 的成骨功能。与先前研究中 lncRNA H19 对软骨细胞或成骨前体细胞分化的调控作用类似^[8-9]。本研究进一步明确了其在 miR-149-5p 这一新的靶点路径下的作用机制,从而拓展了对 lncRNA H19 调控网络的认识。miR-149-5p 此前在骨相关疾病中被发现上调^[10],但其在 BMSCs 成骨过程中的作用研究较少,本研究证实其负向调控 BMP2 表达,表明 miR-149-5p 可能作为成骨分化的抑制因子,值得在骨退行性疾病治疗中进一步评估。更为关键的是,本研究通过细胞和小鼠模型系统性展示了 lncRNA H19/miR-149-5p/BMP2 调控轴的功能效应。在 BMSCs 成骨分化诱导过程中,lncRNA H19 高表达伴随 miR-149-5p 下调与 BMP2 表达上升,提示 lncRNA H19 可能通过“海绵”miR-149-5p 解除其对 BMP2 的抑制,从而促进成骨关键因子如 ALP、OCN、RUNX2、OSX、OPN 的表达与细胞矿化。与已有研究中 lncRNA H19 对 miR-141、miR-22 的调节相似^[11-12],本研究提出的这一新型轴线不仅丰富了 lncRNA H19 在成骨调控中的分子谱系,也提供了更为具体的靶向机制支持。

从机制角度看,BMP2 作为经典的成骨诱导因子,在调控 MSC 向成骨细胞分化的信号路径中占据核心地位^[13]。本研究发现 lncRNA H19 下调可引起 BMP2 表达抑制,从而影响 ALP 活性与基质矿化,并减少 OCN 等关键成骨标志蛋白表达,说明该调控机制具有系统性和连贯性。尤其是体内实验中,lncRNA H19 过表达显著提高骨折小鼠的骨生成相关指标,进一步验证其在骨修复过程中的功能价值。先前的研究表明,诱导 OCN 过表达可以促进培养的成骨 MC3T3-E1 细胞的骨再生^[14]。绝经后骨质疏松后,BMSCs 显示 ALP 活性显著降低,矿化结节减少,RUNX2、OSX 和 OCN 下调^[15]。此外,当归多糖显著提高 BMSCs 的细胞活力,增加 RUNX2、OCN 和 ALP 活性,这一作用被 lncRNA H19 敲除逆转^[16]。本研究中,BMSCs 成骨诱导培养后沉默 lncRNA H19 明显抑制了 ALP 活性和 BMSCs 的矿化作用,抑制了 OCN、RUNX2、OSX、OPN 的表达水平。而在足骨骨折小鼠体内过表达 lncRNA H19,导致骨折部位组织的 ALP 活性、细胞矿化作用,以及 OCN、RUNX2、OSX、OPN 的表达水平平均上调。表明 lncRNA H19 通过调控 miR-149-5p/BMP2 轴促进 BMSCs 成骨分

化,提示 lncRNA H19 可作为成骨分化和骨生成的关键靶点。

综上所述,该研究表明沉默 lncRNA H19 可以通过促进 miR-149-5p 的表达,进而下调 BMP2,从而抑制 BMSCs 的成骨分化。此外,体内实验证明,过表达 lncRNA H19 可以促进骨折愈合过程中骨的形成功能。在理论上,本研究拓展了对 lncRNA H19 功能机制的认识,揭示了其通过特定 miRNA 调节经典骨生成信号的路径,为干细胞骨组织工程提供了潜在调控靶点。在应用上,lncRNA H19 可能作为成骨能力受损患者的治疗切入点,未来可开发为基因治疗或核酸药物的候选分子。基于本研究结果,后续可在不同病理背景下对 lncRNA H19 调控轴进行更深入探讨,并尝试通过靶向调节 lncRNA H19 或 miR-149-5p 开发新型骨再生治疗策略。

参考文献

- [1] Guo J, Wang F, Hu Y, et al. Exosome-based bone-targeting drug delivery alleviates impaired osteoblastic bone formation and bone loss in inflammatory bowel diseases[J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4(1): 100881. doi: 10.1016/j.xcrm.2022.100881.
- [2] 李伟琼, 张雨晴, 徐建光, 等. BoneCeramic 与 Bio-Oss 促进大鼠 PAOO 术后成骨与骨髓基质细胞成骨分化效果的比较研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(9): 1430-5. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.017.
- [3] Li W Q, Zhang Y Q, Xu J G, et al. Comparative study on the effect of BoneCeramic and Bio-Oss on promoting osteogenesis after PAOO in rats and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57(9): 1430-5. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.017.
- [4] Wu D, Chang X, Tian J, et al. Bone mesenchymal stem cells stimulation by magnetic nanoparticles and a static magnetic field: Release of exosomal miR-1260a improves osteogenesis and angiogenesis[J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 209. doi: 10.1186/s12951-021-00958-6.
- [5] 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. doi: 10.1016/j.yexcr.2022.113119.
- [6] Gong Y Y, Peng M Y, Yin D Q, et al. Long non-coding RNA H19 promotes the osteogenic differentiation of rat ectomesenchymal stem cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(24): 8805-13. doi: 10.26355/eur-rev_201812_16648.
- [7] Zhang L, Liu T, Wang P, et al. Overexpression of long noncoding RNA H19 inhibits cardiomyocyte apoptosis in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage through the miR-149-5p/LIF/PI3K/Akt axis[J]. *Biopreserv Biobank*, 2021, 19(5): 376-85. doi: 10.1089/bio.2020.0088.
- [8] Li G, Yun X, Ye K, et al. Long non-coding RNA-H19 stimulates osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via the microRNA-149/SDF-1 axis[J]. *J Cell Mol Med*, 2020,

- 24(9): 4944–55. doi: 10.1111/jcmm.15040.
- [8] 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. doi: 10.1155/2019/2139814.
- [9] Huang Y, Zheng Y, Jia L, et al. Long noncoding RNA H19 promotes osteoblast differentiation *via* TGF- β 1/Smad3/HDAC signaling pathway by deriving miR-675 [J]. *Stem Cells*, 2015, 33 (12): 3481–92. doi: 10.1002/stem.2225.
- [10] Xiao J, Lv D, Zhao Y, et al. miR-149 controls non-alcoholic fatty liver by targeting FGF-21 [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(8): 1603–8. doi: 10.1111/jcmm.12848.
- [11] Liang W C, Fu W M, Wang Y B, et al. H19 activates Wnt signaling and promotes osteoblast differentiation by functioning as a competing endogenous RNA[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20121. doi: 10.1038/srep20121.
- [12] Fan J, Li S, Wang D. microRNA-149 suppresses osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells *via* inhibition of AKT1-dependent Twist1 phosphorylation[J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8 (1): 2. doi: 10.1038/s41420-021-00618-6.
- [13] Liu J, Yao X T, Feng X L, et al. BMP2 induces osteogenic differentiation through ACKR3 in mesenchymal stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 664: 59–68. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.04.097.
- [14] Ma F, Zhang Y, Hu L, et al. Strontium laminarin polysaccharide modulates osteogenesis-angiogenesis for bone regeneration[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 181: 452–61. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.136.
- [15] Kou J, Zheng X, Guo J, et al. microRNA-218-5p relieves postmenopausal osteoporosis through promoting the osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(2): 1216–26. doi: 10.1002/jcb.29355.
- [16] Xie X, Liu M, Meng Q. Angelica polysaccharide promotes proliferation and osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells by regulation of long non-coding RNA H19: an animal study [J]. *Bone Joint Res*, 2019, 8(7): 323–32. doi: 10.1302/2046-3758.87. BJR-2018-0223. R2.

The role of lncRNA H19 in regulating the miR-149-5p/BMP2 axis on osteogenic differentiation of BMSCs and bone regeneration in metatarsal fracture

Zhang Huaigui, Guzaiaiyi Maimaiti, Tang Weidong

(Dept of Plastic Surgery, Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Urumqi 830000)

Abstract Objective To investigate the role and mechanism of long non-coding RNA (lncRNA) H19 in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and bone regeneration in mice with foot fracture. **Methods** BMSCs were divided into microrNA-149-5p (miR-149-5p)-mimic negative control (miR-mimic-NC) group and miR-149-5p-mimic (miR-mimic) group and transfected with lncRNA H19-wt and lncRNA H19, respectively. Mut recombinant plasmid, or bone morphogenetic protein 2 (BMP2) 3'UTR-wt and BMP2 3'UTR-mut recombinant plasmid were transfected, respectively. Dual-luciferase reporter gene assay was used to detect the luciferase activity of each group. To study the regulatory effect and mechanism of lncRNA H19 on osteogenic differentiation *in vitro*, BMSCs were divided into control group and osteogenic induction group (osteogenic group). After osteogenic induction, BMSCs were transfected with corresponding plasmids and divided into osteogenic + si-NC group, osteogenic + si-H19 group, osteogenic + si-H19 + miR-inhibitor-NC group, osteogenic + si-H19 + miR-inhibitor group, osteogenic + si-H19 + pcDNA-NC group, and osteogenic group si-H19 + pcDNA-BMP2 group. Osteogenic differentiation was evaluated by alkaline phosphatase (ALP) activity assay and alizarin red staining. A mouse foot fracture model was established, and 36 mice were randomly divided into sham operation group, model group, model + pcD-null group, and model + pcD-H19 group, with 9 mice in each group. Osteogenic differentiation was assessed by ALP activity assay. Real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) was used to detect the expression of lncRNA H19, miR-149-5p, and BMP2. Western blot was used to detect the expression of BMP2, OCN, OSX, RUNX2, and OPN. **Results** In cells transfected with lncRNA H19-wt, the luciferase activity in miR-mimic group was lower than that in miR-mimic-NC group ($P < 0.05$). The luciferase activity of miR-mimic group was lower than that of miR-mimic-NC group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the alkaline phosphatase activity, the degree of cell mineralization and the expression of lncRNA H19, BMP2, OCN, OSX, RUNX2 and OPN increased, and the expression of miR-149-5p decreased in the osteogenic group ($P < 0.05$). Compared with the osteogenesis + si-NC group, the alkaline phosphatase activity, the degree of cell mineralization

ATF3 与 Smad4 在翼状胬肉中的表达及相互作用

华 耘^{1,2}, 韩欢欢², 陈冬梅², 刘佳琳², 赵新荣¹

(¹石河子大学第一附属医院眼科, 石河子 832003; ²石河子大学医学院, 石河子 832003)

摘要 **目的** 初步探究转录激活因子 3(ATF3)与 Smad 家族成员 4(Smad4)在翼状胬肉中的表达及其相互作用。**方法** 通过生物信息学方法来分析 NCBI 数据库中的两套数据集 GSE51995 和 GSE2513, 筛选出以正常结膜作为对照时, 翼状胬肉的关键差异表达基因 ATF3。并通过实时荧光定量反转录聚合酶链反应(RT-qPCR)进一步检测生物信息学分析找出的差异基因。最后结合文献查找并通过基因转录调控数据库(GTRD)预测是否存在可能与目标基因结合的靶基因 Smad4, RT-qPCR 验证 Smad4 在正常结膜与翼状胬肉组织中的表达情况, 并通过免疫共沉淀(Co-IP)探究 ATF3 与 Smad4 蛋白在翼状胬肉中是否存在相互作用。**结果** 生物信息学分析结果显示, 以正常结膜组织为对照, 翼状胬肉组织中存在有显著性差异的低表达基因 ATF3($P < 0.05$)。RT-qPCR 实验显示, 与正常结膜组织相比, ATF3 在翼状胬肉组织中低表达($P < 0.001$)。数据库(GTRD)中检索出 Smad4 基因与 ATF3 有两个结合位点, 提示可能与 ATF3 存在相互作用。与正常结膜相比, RT-qPCR 显示翼状胬肉组织中 Smad4 表达下调($P < 0.01$), Co-IP 结果显示, 在使用 ATF3 抗体进行免疫沉淀时, 翼状胬肉组织中 Smad4 结合量增加($P < 0.05$)。**结论** ATF3 与 Smad4 在翼状胬肉中存在相互作用, 二者在翼状胬肉组织中的低表达及其相互作用可能与翼状胬肉的发病相关。

关键词 翼状胬肉; ATF3; Smad4; 相互作用; 初步探究

中图分类号 R 77

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)06-1068-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.06.013

2025-04-26 接收

项目基金:国家自然科学基金(编号:82060171)

作者简介:华 耘,女,硕士研究生;

赵新荣,女,博士,副主任医师,硕士生导师,通信作者, E-mail: zxr_yk@163.com

翼状胬肉是一种主要侵犯角膜,以结膜纤维血管增生为特征性疾病。该病的主要临床表现是眼睛疲劳、刺激、干燥、流泪、异物感、视觉不适和视力下降,其发病机制与转化生长因子- β (transforming growth factor beta, TGF- β)/Smad 信号通路异常活化

and the expression of lncRNA H19, BMP2, OCN, OSX, RUNX2 and OPN significantly decreased, and the expression of miR-149-5p increased in the osteogenesis + si-H19 group ($P < 0.05$). Compared with the osteogenesis + si-H19 + miR-inhibitor-NC group, the ALP activity, the degree of cell mineralization and the expression of lncRNA H19, BMP2, OCN, OSX, RUNX2 and OPN increased in the osteogenesis + si-H19 + miR-inhibitor group. The expression of miR-149-5p significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the osteogenic + si-H19 + pcDNA-NC group, the alkaline phosphatase activity, the degree of cell mineralization and the expression of BMP2, OCN, OSX, RUNX2 and OPN significantly increased in the osteogenic + si-H19 + pcDNA-BMP2 group ($P < 0.05$). Compared with the sham-operation group and the model group, the alkaline phosphatase activity and the expression of lncRNA H19, BMP2, OCN, OSX, RUNX2 and OPN decreased, and the expression of miR-149-5p increased ($P < 0.05$). Compared with the model + pcD-null group, the alkaline phosphatase activity and the expression of lncRNA H19, BMP2, OCN, OSX, RUNX2 and OPN significantly increased, and the expression of miR-149-5p decreased in the model + pcD-H19 group ($P < 0.05$). **Conclusion** lncRNA H19 promotes osteogenic differentiation of BMSCs and bone regeneration in mice with foot fracture through miR-149-5p/BMP2 axis.

Key words lncRNA H19; osteogenic differentiation; foot fracture; mice; bone morphogenetic protein 2; alkaline phosphatase

Fund program Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 2023D01C318)

Corresponding author Zhang Huaigui, E-mail: pan096@sina.com