

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.02.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20201229.1613.015.html\(2020-12-30\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20201229.1613.015.html(2020-12-30))LncRNA H19 调控 Runx2 表达对非创伤性
股骨头坏死的影响*宋 强¹,王振海²,李敬武³,穆胜凯⁴(1. 沈阳市骨科医院研究所创伤科 110044;2. 联勤部保障部队第 967 医院骨科,辽宁大连 116011;
3. 中国医科大学附属第一医院疼痛科,沈阳 110003;4. 沈阳市骨科医院脊柱科 110044)

[摘要] **目的** 探讨长链非编码 RNA H19(lncRNA H19)对非创伤性股骨头坏死(NONFH)发生、发展的影响及其机制。**方法** 收集 42 例 NONFH 患者和 30 例健康志愿者的血清标本,采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测血清 lncRNA H19 和 Runt 相关转录因子 2(Runx2)表达水平;培养人骨髓间充质干细胞(hMSC-BM),将重组人骨形态发生蛋白-2(BMP-2)加入培养基中,诱导 hMSC-BM 成骨分化,并检测 lncRNA H19 表达水平;将 lncRNA H19 的小干扰 RNA(siRNA)导入细胞中,检测沉默 lncRNA H19 对 Runx2 表达的影响;CCK-8 增殖实验评估 lncRNA H19 和 Runx2 对细胞增殖能力的影响。**结果** 与健康志愿者相比,NONFH 患者血清 lncRNA H19 和 Runx2 表达水平明显下降($P < 0.05$);BMP-2 诱导的 hMSC-BM 中 lncRNA H19 表达水平明显增高($P < 0.05$)。lncRNA H19 可以影响 Runx2 在 hMSC-BM 中的表达,抑制 lncRNA H19 的表达后,Runx2 表达随之下降;抑制 lncRNA H19 表达后,细胞增殖能力减弱,在此基础上过表达 Runx2,细胞增殖能力恢复。**结论** lncRNA H19 可能通过调控 Runx2 表达参与 NONFH 的发生、发展。

[关键词] 股骨头坏死;RNA,长链非编码;Runt 相关转录因子 2;间充质干细胞**[中图分类号]** R681.8**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)02-0193-05Effect of LncRNA H19 in non-traumatic osteonecrosis
of femoral head by upregulating Runx2*SONG Qiang¹,WANG Zhenhai²,LI Jingwu³,MU Shengkai⁴

(1. Department of Traumatology, Orthopedic Hospital of Shenyang City, Shenyang, Liaoning 110044, China; 2. Department of Orthopedics, the 967 Hospital of Joint Support Unit of PLA, Dalian, Liaoning 116011, China; 3. Department of Pain Treatment, The First Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110003, China; 4. Department of Spine Treatment, Orthopedic Hospital of Shenyang City, Shenyang, Liaoning 110044, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of long non-coding RNA H19 (lncRNA H19) on the occurrence and development of non-traumatic femoral head necrosis (NONFH). **Methods** Serum samples were collected from 42 NONFH patients and 30 healthy volunteers. RT-PCR was used to detect the expression levels of H19 and RUNX family transcription factor 2 (Runx2) in serum. Osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells (hMSC-BM) was induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and lncRNA H19 expression was detected. Small interfering RNA (siRNA) of lncRNA H19 was introduced into cells, the effect of silencing lncRNA H19 on Runx2 expression was detected. CCK-8 was used to evaluate the effects of lncRNA H19 and Runx2 on cell proliferation. **Results** Compared with healthy volunteers, the expressions of lncRNA H19 and Runx2 in serum of NONFH patients decreased significantly ($P < 0.05$). After induced by BMP-2, the expression level of lncRNA H19 in hMSC-BM significantly increased ($P < 0.05$). lncRNA H19 affected Runx2 protein expression in hMSC-BM. After lncRNA H19 expression was inhibited, Runx2 protein expression decreased. After lncRNA H19 expression was inhibited, cell proliferation was reduced, and then restored after Runx2 overexpression. **Conclusion** lncRNA H19 may be involved in the occurrence and development of NONFH by regulating Runx2 protein expression.

[Key words] femur head necrosis; RNA, long noncoding; RUNX family transcription factor 2; mesenchymal stem cells

骨质破坏性疾病多由凝血和纤溶系统紊乱或血液供应不足引起,股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head, ONFH)作为其中之一的致残疾病,通常出现进行性的股骨头塌陷和继发性关节炎,对患者生存质量产生巨大影响,需行全髋关节置换术^[1]。ONFH 可分为创伤性和非创伤性(non-traumatic osteonecrosis of femoral head, NONFH)两种亚型, NONFH 常出现在 30~50 岁的患者,多出现在类固醇皮质激素治疗炎性疾病后^[2]。有研究指出, NONFH 同人类免疫缺陷病毒感染、自身免疫性疾病、酗酒、使用糖皮质激素及凝血障碍有关^[3]。也有研究显示,间充质干细胞(MSCs)成骨分化能力的改变导致骨坏死和骨再生失衡,是 NONFH 发病的关键因素。各因素诱导 MSCs 向脂肪细胞分化,使细胞增殖和分化能力下降,导致机体自身修复能力降低, ONFH 加重。但到目前为止, NONFH 发病的具体分子机制仍不清楚^[4]。

近年来,随着人类基因组计划的完成和高通量测序技术的进步,研究人员已逐渐将研究中心放在非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)的生物学功能上。ncRNAs 在调控基因表达中起着至关重要的作用^[5]。其中,长度超过 200 个核苷酸的长链非编码 RNAs(long noncoding RNAs, lncRNAs)广泛参与生物体的生命过程,包括表观遗传学、转录和转录后调控等^[6]。LncRNAs 作为“脚手架”介导蛋白质间的相互作用^[7-8];作为“引导员”促进蛋白质和基因的启动子结合;作为“信号”调节邻近基因的转录;作为“诱饵”与微 RNA(miRNA)或蛋白质竞争性结合,影响 mRNA 的转录^[9]。但目前有关 lncRNAs 参与 NONFH 发生、发展的研究并不多见。Runt 相关转录因子 2(RUNX family transcription factor 2, Runx2)的表达是 MSCs 向成骨细胞谱系分化的充分且必要条件,是成骨细胞分化的标志^[10]。Runx2 高表达促进成骨细胞分化,而 Runx2 表达水平下调可能促进 NONFH 的进展^[11-12]。因此,本研究分析 NONFH 患者 lncRNA H19 表达情况,并分析其可能的机制,为 NONFH 的诊断和治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本采集

选取 2014 年 1 月至 2018 年 12 月在本院治疗的 42 例 NONFH 患者(NONFH 组),男 25 例,女 17 例;年龄 30~69 岁,平均(49.2±8.3)岁;病程 1~11 年,平均(5.7±2.5)年。同时选取年龄、性别分布相近的 30 名健康志愿者作为对照组,排除高血压、糖尿病、凝血和纤溶系统紊乱、心脑血管疾病及其他慢性

疾病。对照组男 17 例,女 13 例;年龄 28~72 岁,平均(48.3±6.6)岁。本研究经本院伦理委员会批准,所有受试者均签署知情同意书。入院当天所有受试者抽取全血 20 mL,室温静置 90 min,1 250×g 室温离心 20 min,制备血清标本。

1.1.2 主要仪器与试剂

用于 H19 基因敲降的小干扰 RNA(si-RNA)慢病毒、对照病毒及 Runx2 过表达质粒均购自上海吉凯基因化学技术公司。实时荧光定量 PCR(RT-PCR)仪购自瑞士 Roche 公司,PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;鼠抗人 Runx2 抗体(1:200)、兔抗人 GAPDH 抗体(1:1 000)及二抗(1:2 000)均购自美国 Boster 公司。人骨髓间充质干细胞(hMSC-BM)购自美国 ScienCell 研究实验室。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

hMSC-BM 培养于含 10%胎牛血清和 1%抗生素-抗真菌溶液(美国 Invitrogen 公司)的高糖 DMEM 培养基,37℃、50 mL/L CO₂ 培养,当细胞生长至 80%~90%时,收集、传代。对于成骨细胞分化实验,将培养基替换为含 10%胎牛血清和 100 ng/mL 重组人骨形态发生蛋白-2(BMP-2,美国 R&D Systems 公司)的培养基,培养 6 d。

1.2.2 RT-PCR

TRIzol 法提取总 RNA,并检测纯度及浓度。依据日本 TaKaRa 公司试剂盒说明书进行逆转录和 PCR 反应。H19 的上游引物序列为 5'-GGT TGG AGT TGT GGA GAC-3',下游引物序列为 5'-GCG TAA TGG AAT GCT TGA A-3';Runx2 上游引物序列为 5'-CGG CCC TCC CTG AAC TCT-3',下游引物序列为 5'-TGC CTG CCT GGG GTC TGT A-3';U6 的上游引物序列为 5'-TTA TGG GTC CTA GCC TGA C-3',下游引物序列为 5'-CAC TAT TGC GGG CTG C-3'。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算二者的相对表达水平。ΔCt=Ct_{标记物}-Ct_{U6}。以 U6 作为内参进行相对定量,重复 3 次。

1.2.3 细胞转染

Lipofectamine 2000 将过表达和沉默载体转染进入细胞,转染 48 h 后,观察细胞生长情况,收集细胞用于进一步研究。Si-H19 # 1(5'-3'):CCU CUA GCU UGG AAA UGA AUA(引导链),UUC AUU UCC AAG CUA GAG GGU(过客链);Si-H19 # 2(5'-3'):GCA CUA CCU GAC UCA GGA AUC(引导链),UUC CUG AGU CAG GUA GUG CAG(过客链)。

1.2.4 Western blot

提取细胞总蛋白,制备 8%聚丙烯酰胺凝胶,每孔 20 μg 上样;80 V 积层胶,120 V 分离胶进行电泳,100 V 转聚偏氟乙烯(PVDF)膜 90 min,5%牛血清蛋白(BSA)封闭 PVDF 膜 1 h,加一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 振荡过夜。TBST 洗涤后滴加二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,显影成像。GAPDH 作为内参,ImageJ 软件获取灰度值。

1.2.5 CCK-8 增殖实验

细胞转染后 24、48、72 h 加入 CCK-8 试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 2 h,多功能酶标仪测定 450 nm 处吸光度值(A_{450} 值)。每组设 2 个复孔,实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

用 SPSS22.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用两独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

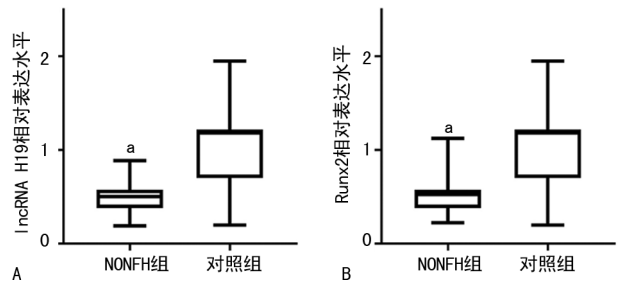
2 结 果

2.1 NONFH 患者及健康受试者血清 lncRNA H19、Runx2 表达情况

RT-PCR 结果显示,lncRNA H19 在 NONFH 患者血清中的表达水平为 0.43 ± 0.07 ,较 lncRNA H19 在健康受试者血清中表达水平(1.03 ± 0.18)降低,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1A)。而 Runx2 在 NONFH 患者血清中的表达水平为 0.54 ± 0.10 ,低于健康受试者血清中 Runx2 表达水平(1.05 ± 0.13),差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1B)。

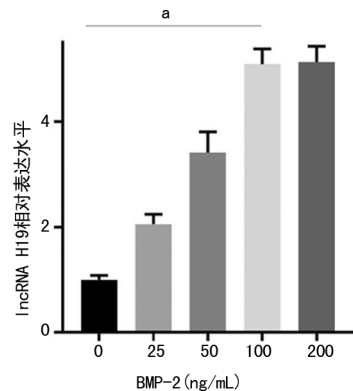
2.2 BMP-2 促进 lncRNA H19 在 hMSC-BM 中表达

应用不同浓度的 BMP-2 诱导 hMSC-BM 的成骨分化,分别采用 0、25、50、100、200 ng/mL BMP-2 处理 hMSC-BM,RT-PCR 检测 lncRNA H19 表达水平变化,随着 BMP-2 加入量的增加,lncRNA H19 的表达水平明显上升($P < 0.05$),但在 BMP-2 加入至 100 ng/mL 后,lncRNA H19 表达不再明显增加($P > 0.05$),见图 2。



A:血清 lncRNA H19 相对表达水平比较;B:血清 Runx2 相对表达水平比较;^a: $P < 0.05$,与对照组比较。

图 1 NONFH 患者和健康志愿者血清 lncRNA H19 和 Runx2 表达水平比较

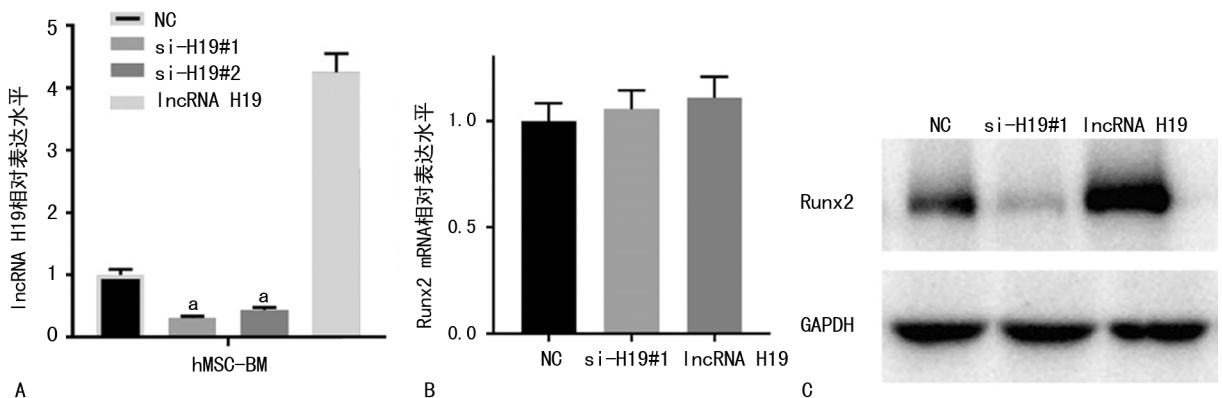


^a: $P < 0.05$ 。

图 2 lncRNA H19 在不同浓度 BMP-2 处理的 hMSC-BM 中的表达变化

2.3 lncRNA H19 表达对 Runx2 的影响

在 hMSC-BM 中分别过表达和沉默 lncRNA H19,确定基因操作工具有效,其中 si-H19#1 具有更优的沉默效率($P < 0.05$,图 3A);采用 RT-PCR 和 Western blot 检测过表达或沉默 lncRNA H19 后 Runx2 表达水平的变化,结果显示 lncRNA H19 的表达变化并不引起 Runx2 mRNA 表达变化($P > 0.05$,图 3B),而对 Runx2 水平变化影响明显($P < 0.05$,图 3C)。

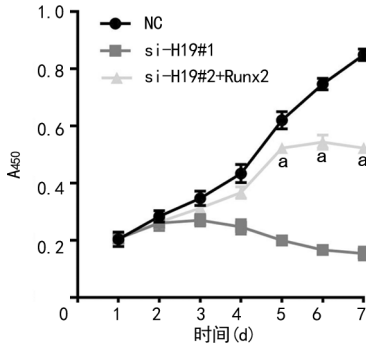


A:转染 si-H19 和过表达质粒前后 lncRNA H19 表达情况;B:转染 si-H19 和过表达质粒前后 Runx2 mRNA 表达情况;C:转染 si-H19#1 和过表达质粒前后 Runx2 表达情况;NC:对照病毒质粒;^a: $P < 0.05$,与 NC 比较。

图 3 hMSC-BM 转染 si-H19 和过表达质粒前后 lncRNA H19 和 Runx2 表达情况

2.4 lncRNA H19 和 Runx2 对 hMSC-BM 增殖能力的影响

CCK-8 验证 lncRNA H19 和 Runx2 对 hMSC-BM 增殖能力的影响。将 si-H19 #1 序列转染进入 hMSC-BM 后,细胞的增殖能力明显下降。在此基础上过表达 Runx2,被抑制的细胞的增殖能力部分恢复 ($P < 0.05$),见图 4。



NC:对照病毒质粒; a: $P < 0.05$,与 si-H19 #1 比较。

图 4 CCK-8 验证 H19 和 Runx2 对 hMSC-BM 增殖能力的影响

3 讨论

NONFH 病因复杂,可由多种原因引起,对股骨头的损伤尤为突出,目前其病因和致病机制尚不清楚。日本第 4 次全国 NONFH 流行病学调查数据显示,致病因素中激素占 50%,酒精占 27%,酒精+激素性占 2%,其他因素占 21%^[13]。目前针对 NONFH 早期患者以口服降脂药、抗凝药和双磷酸盐药物等为主,易引起胃肠道不适反应,并可能对肝、肾功能造成损伤,疗效欠佳^[14]。对于中晚期患者多采取手术治疗,坏死晚期采用人工关节置换术,但手术存在费用高、创伤大、并发症多等缺点。因此,进一步探究 NONFH 的发生、发展机制,从分子水平探究其发病原因,给予针对性的靶向治疗,可能是临床治疗的突破口。

在过去的 20 年里,高通量测序技术的发展极大地加速了基因表达调控的相关研究。大量研究认为,ncRNA 的表达改变是疾病发生的驱动因素之一^[15-16],广泛参与生物体的生命过程,如染色体重构、细胞分化及免疫应答等^[17]。NONFH 的发生需要 ncRNA 的参与。LI 等^[18]在 1 项糖皮质激素诱导的 NONFH 研究中发现了 11 个可能参与 NONFH 发生、发展的 miRNAs,而 WEI 等^[19]和 CHEN 等^[20]分别发现了 lncRNA HOTAIR 和 lncRNA AWPPH 可能参与 NONFH 相关成骨基因的转录调控。本研究发现,lncRNA H19 在 NONFH 患者血清中表达水平明显降低,可能参与 NONFH 的病理生理过程。lncRNA H19 定位于人 11p15.5,是第一个被证实为具有印记特性的基因^[21],在胚胎期表达,出生后表达下降,而往往在肿瘤及其他疾病中再次出现^[22]。lncRNA H19 过表达同血管生成和细胞增殖密切相

关^[21,23]。同时,过表达的 lncRNA H19 可以诱导卵巢癌细胞的上皮间质转化(EMT),促进其侵袭转移^[23]。有研究认为,lncRNA H19 介导 MSCs 的多种分化过程,参与肌肉骨骼系统的再生,并对骨代谢过程进行调控^[24]。

骨的形成主要是由骨祖细胞、软骨祖细胞及细胞外基质协同作用完成,而细胞增殖分化、细胞外基质成熟、矿化和细胞凋亡是成骨细胞在骨形成中的 4 个主要阶段。成骨细胞分化改变是 NONFH 发生、发展过程中的关键病理变化^[11],而 BMP-2 能够诱导成骨细胞分化^[25]。本研究发现,lncRNA H19 在 hMSC-BM 中的表达水平同 BMP-2 加入剂量相关,BMP-2 以浓度依赖的方式促进 lncRNA H19 在 hMSC-BM 中的表达,提示 lncRNA H19 参与了成骨细胞分化的调控。本研究结果显示,lncRNA H19 和 Runx2 在 NONFH 患者血清中均表达降低;而在 hMSC-BM 中过表达 lncRNA H19 后能够在转录后水平促进 Runx2 的表达;相反,在抑制了 lncRNA H19 的表达后 Runx2 的表达也随之降低。而在细胞增殖的回补实验中发现,抑制 lncRNA H19 后细胞的增殖能力减弱,而过表达 Runx2 后,细胞的增殖能力部分恢复,提示 lncRNA H19 对细胞增殖能力的影响是通过 Runx2 实现的。

综上所述,与健康对照相比,NONFH 患者 lncRNA H19 表达下调。lncRNA H19 能够促进 hMSC-BM 中 Runx2 表达,并诱导细胞增殖。因此,lncRNA H19 可能通过影响 Runx2 表达参与 NONFH 的发生、发展,但二者之间调控的具体机制仍需进一步探讨。此外,血管内凝血学说认为各种系统疾病激活的血管内凝血也可能是引起骨内血栓和骨坏死的重要途径,NONFH 患者往往存在血小板活性程度增高、凝血趋势增加的高凝和低纤容状态。lncRNA H19 和 Runx2 在这其中扮演的角色仍不明确,这也是后期基础向临床转化的一个重要讨论方向。

参考文献

- [1] CHOI H R,STEINBERG M E,Y CHENG E. Osteonecrosis of the femoral head: diagnosis and classification systems[J]. Curr Rev Musculoskelet Med,2015,8(3):210-220.
- [2] OKAZAKI S,NAGOYA S,MATSUMOTO H,et al. Development of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head requires toll-like receptor 7 and 9 stimulations and is boosted by repression on nuclear factor kappa B in rats[J]. Lab Invest,2015,95(1):92-99.
- [3] ASSOULINE-DAYAN Y,CHANG C,GREENSPAN A,et al. Pathogenesis and natural his-

- tory of osteonecrosis [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2002, 32(2):94-124.
- [4] LEE J S, LEE J S, ROH H L, et al. Alterations in the differentiation ability of mesenchymal stem cells in patients with nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: comparative analysis according to the risk factor[J]. *J Orthop Res*, 2006, 24(4):604-609.
- [5] SCHMITT A M, CHANG H Y. Long noncoding RNAs in cancer pathways[J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(4):452-463.
- [6] BARTONICEK N, MAAG J L, DINGER M E. Long noncoding RNAs in cancer: mechanisms of action and technological advancements[J]. *Mol Cancer*, 2016, 15(1):43.
- [7] MORRIS K V, MATTICK J S. The rise of regulatory RNA[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(6):423-437.
- [8] MATTICK J S, RINN J L. Discovery and annotation of long noncoding RNAs[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22(1):5-7.
- [9] SALMENA L, POLISENO L, TAY Y, et al. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? [J]. *Cell*, 2011, 146(3):353-358.
- [10] ZHANG X, YANG M, LIN L, et al. Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose: derived stem cells in vitro and in vivo[J]. *Calcif Tissue Int*, 2006, 79(3):169-178.
- [11] PENGDE K, FUXING P, BIN S, et al. Lovastatin inhibits adipogenesis and prevents osteonecrosis in steroid-treated rabbits[J]. *Joint Bone Spine*, 2008, 75(6):696-701.
- [12] MATSUBARA T, KIDA K, YAMAGUCHI A, et al. BMP2 regulates osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(43):29119-29125.
- [13] FUKUSHIMA W, FUJIOKA M, KUBO T, et al. Nationwide epidemiologic survey of idiopathic osteonecrosis of the femoral head[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2010, 468(10):2715-2724.
- [14] ALDRIDGE J M 3RD, URBANIAK J R. Avascular necrosis of the femoral head: etiology, pathophysiology, classification, and current treatment guidelines[J]. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*, 2004, 33(7):327-332.
- [15] SULLENGER B A, NAIR S. From the RNA world to the clinic [J]. *Science*, 2016, 352(6292):1417-1420.
- [16] SCHMITZ S U, GROTE P, HERRMANN B G. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(13):2491-2509.
- [17] MUERS M. RNA: genome-wide views of long non-coding RNAs[J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(11):742.
- [18] LI Z, JIANG C, LI X, et al. Circulating microRNA signature of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. *Cell Prolif*, 2018, 51(1):e12418.
- [19] WEI B, WEI W, ZHAO B, et al. Long non-coding RNA HOTAIR inhibits miR-17-5p to regulate osteogenic differentiation and proliferation in non-traumatic osteonecrosis of femoral head [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2):e0169097.
- [20] CHEN X, LI J, LIANG D, et al. LncRNA AWPPH participates in the development of non-traumatic osteonecrosis of femoral head by up-regulating Runx2[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(1):153-159.
- [21] MATOUK I, RAVEH E, OHANA P, et al. The increasing complexity of the oncofetal h19 gene locus: functional dissection and therapeutic intervention[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(2):4298-4316.
- [22] RAVEH E, MATOUK I J, GILON M, et al. The H19 long non-coding RNA in cancer initiation, progression and metastasis: a proposed unifying theory[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14:184.
- [23] MATOUK I J, RAVEH E, ABU-LAIL R, et al. Oncofetal H19 RNA promotes tumor metastasis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(7):1414-1426.
- [24] HUANG G, KANG Y, HUANG Z, et al. Identification and characterization of long non-coding RNAs in osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(3):1037-1050.
- [25] NISHIMURA R, KATO Y, CHEN D, et al. Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(4):1872-1879.