

· 骨肌疾病 ·

成骨不全14种长链非编码RNA差异表达分析*

1. 济南大学、山东省医学科学院医学与生命科学学院 (山东 济南 250022)
 2. 山东省医学科学院 卫生部生物技术药物重点实验室 山东省罕见病重点实验室 山东省医药生物技术研究中心 (山东 济南 250062)
 3. 天津市武清区人民医院骨三科 (天津 301700)
 4. 山东省立医院 (山东 济南 250021)
- 滕元伟^{1,2} 任秀智³ 王延宙⁴ 张宇昂^{1,2} 韩振忠^{1,2} 韩金祥² 鲁艳芹²

【摘要】目的 研究14种长链非编码RNA (Long non-coding RNA, lncRNA) 在成骨不全骨组织中的表达。方法 采用先天性髋关节脱位患者骨组织作为对照, 应用RT-qPCR分析成骨不全骨组织中14种lncRNA (ATB、EBIC、HEIH、hLACR1、HOTAIR、PVT1、LET、Loc285194、SRHC、LSINCTS、Nbla10727、Nbla12061、PRNCR1与UC.388) 的表达, 使用REST-2009软件进行数据统计分析。结果 与对照组相比, 14种lncRNA中仅PRNCR1表达下调并具有显著性差异; ATB、EBIC、HOTAIR、PVT1、LET、Loc285194、SRHC等7种lncRNA表达差异均小于2倍, LSINCTS表达下调, HEIH、hLACR1、Nbla10727、Nbla12061与UC.388等5种lncRNA表达上调, 但均无统计学意义。结论 PRNCR1在成骨不全骨组织中低表达, 其在成骨不全疾病的功能尚有待于进一步研究。

【关键词】成骨不全; lncRNA; 骨组织; PRNCR1

【中图分类号】R319

【文献标识码】A

【基金项目】中国罕见疾病防治研究与示范(2013BAI07B00)

DOI: 10.3969/j.issn.1009-3257.2016.02.021

The Differential Expression of 14 Kinds of Long Non-coding RNAs in Osteogenesis Imperfect*

TENG Yuan-wei, REN Xiu-zhi, WANG Yan-yu, et al., School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan-Shandong; Academy of Medical Sciences, Jinan 250022, China

[Abstract] **Objective** To explore the differential expression of 14 kinds of long non-coding RNAs in bone tissues derived from osteogenesis imperfecta patients. **Methods** RT-qPCR was performed to detect the expression level of 14 Kinds of lncRNAs including ATB, EBIC, HEIH, hLACR1, HOTAIR, PVT1, LET, Loc285194, SRHC, LSINCTS, Nbla10727, Nbla12061, PRNCR1 and UC.388 in bone tissues derive from osteogenesis imperfect (OI) patients who received corrective surgery. Bone tissues from developmental dysplasia of the hip (DDH) were used as control. REST-2009 was performed to analyze the results. **Results** The expression of PRNCR1 was significantly down-regulated in OI bone tissues. There's no differential expression was observed in other thirteen lncRNAs, though the expression of HEIH, hLACR1, Nbla10727, Nbla12061 and UC.388 were up-regulated and LSINCTS was down-regulated. The expression of ATB, EBIC, HOTAIR, PVT1, LET, Loc285194 and SRHC was less than 2-fold of DDH control. **Conclusions** Low expression of PRNCR1 was observed in bone tissue from OI patients. The functions of PRNCR1 in OI need further study.

[Key words] Osteogenesis Imperfecta; lncRNA; Bone Tissue; PRNCR1

长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类转录本长度200~100,000个核苷酸的RNA, 它们无编码蛋白质的能力或很少有编码蛋白质的能力^[1]。lncRNA可通过表观遗传调控、转录调控以及转录后调控等途径调控相关靶基因的表达^[2]。

随着人类基因组内越来越多的lncRNA被发现, lncRNA与神经系统形成^[3]、心血管形成^[4]以及癌症发生、发展^[5]之间的关系也随之被报道。并且, 其表达水平与疾病的发生发展阶段有紧密联系^[5]。成骨不全 (osteogenesis imperfecta, OI) 是一类I型胶原蛋

作者简介: 滕元伟, 男, 药学专业, 硕士研究生, 主要研究方向: 成骨不全相关lncRNA表达差异筛选

通讯作者: 鲁艳芹

白合成和代谢障碍引起的遗传性结缔组织病^[6,7]。主要临床表现为易骨折、骨质疏松,部分患者会伴有蓝巩膜、牙本质发育不全、听力下降、肌肉薄弱、关节韧带松弛等症状^[8]。本研究拟分析14种长链非编码RNA在成骨不全患者骨组织中的差异表达,为研究骨相关lncRNA及其功能奠定基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 液氮、无水乙醇、异丙醇、氯仿(国药集团化学试剂有限公司)、dNTP Mixture, 10mM each(Takara)、Random Primers 50pM(Takara)、5×PrimeScript Buffer(Takara)、PrimeScript II Reverse Transcriptase 200U/ul(Takara)、DEPC、Trizol(Invitrogen)、SYBR Green荧光定量试剂盒(Roche)

1.2 方法 经山东省医学科学院伦理委员会通过,本实验在天津市武清区人民医院和山东省立医院共收集被确诊的成骨不全患者和先天性髌关节脱位患者术中废弃的骨组织样本各9例。其中,成骨不全患者平均年龄在7岁,5男4女。先天性髌脱位患者平均年龄6.8岁,5男4女。

1.2.1 骨组织总RNA提取: 采用Trizol试剂提取总RNA, RNase-free water溶解RNA, 测定RNA纯度和浓度, A260/A280比值均在1.8-2.0之间。

1.2.2 逆转录反应: 采用两步法, 总反应体系为20 μL。第一步: 反应体系为10 μL, 其中RNA 2 μg, Random Primers (50pM) 1 μL, dNTP Mixture(10mM each) 1 μL, 用RNase free water补足至10 μL。反应程序: 65℃ 5min, 冰上急冷2min以上。第二步: Template RNA/Primer mixture 10 μL, 5×PrimeScript Buffer 4 μL, PrimeScript II Reverse Transcriptase(200U/μL) 1 μL, RNase Inhibitor(40U/μl) 0.5 μL, RNase free water 4.5 μL。反应程序: 30℃ 10min, 42℃ 60min, 70℃ 15min^[9]。

1.2.3 qPCR反应: 反应体系为10 μL。包括cDNA 1 μL, 2×MIX 5 μL, 上下游引物各0.4 μL, RNase free water补足至10 μL。β-actin作为内参, 引物序列为: 上游5' -AGAAAATCTGGCACCACACC-3', 下游5' -TAGCACAGCCTGGATAGCAA-3'。定量PCR反应程序: 95℃预变性5min, 扩增反应95℃ 10s, 60℃ 10s, 72℃ 15s, 共45个循环。

1.3 数据分析 实验中所有数据均为三次重复lncRNA之间差异分析是由REST-2009(版本2.0.13)处理, 采用随机性检测方法。

2 结果

14种lncRNA表达散点图如图1所示, 图2为lncRNA的相对表达量, 结果表明ATB、EBIC、HOTAIR、PVT1、LET、Loc285194、SRHC等7种lncRNA表达差异均小于2倍; HEIH、hLACR1、Nbla10727、Nbla12061、UC. 388等5种lncRNA在成骨不全骨组织中表达上调, 上调幅度在2.68-7.32倍之间, 但无统计学差异; LSINCTS、PRNCR1等2种lncRNA表达下调, 其中PRNCR1表达(P值<0.05), 具有统计学差异。

3 讨论

lncRNA较编码蛋白质的RNA研究开始较晚, 随着lncRNA研究的深入, 越来越多的lncRNA被发现。lncRNA的研究多在肿瘤中报道, 关于骨相关疾病报

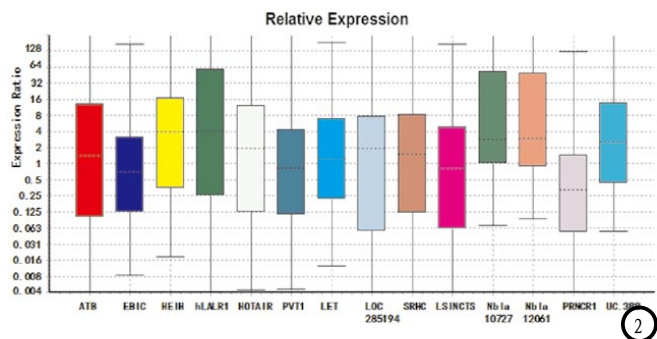
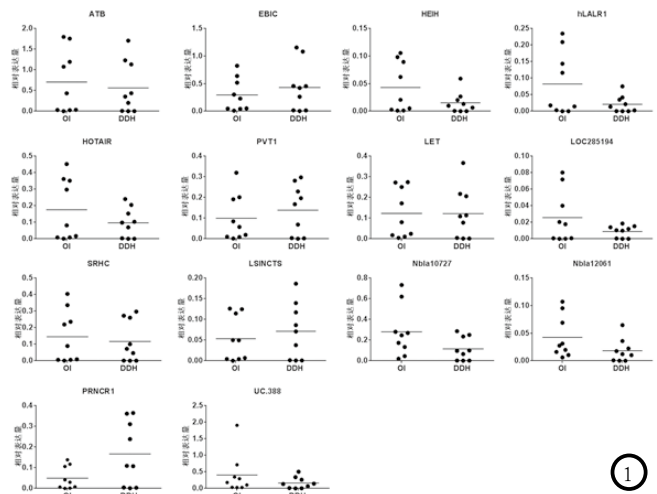


图1 成骨不全骨组织14种lncRNA相对表达分析散点图。图2 成骨不全骨组织14种lncRNA相对表达。

道较少。但是有与lncRNA关联基因突变而引起骨相关疾病的研究,例如,UC.388的相关基因TCF12^[10],而TCF12基因发生突变会引起新生儿颅缝早闭^[11];LOC285194缺失会引起肿瘤抑制基因(编码的边缘系统相关膜蛋白)拷贝数的改变,从而引起骨肉瘤的发生,并且LOC285194可以通过调控凋亡和细胞转录等方面促进成骨细胞增殖^[12]。

本研究探讨了HOTAIR等14种lncRNA在成骨不全患者骨组织中的表达情况,发现PRNCR1低表达,但仍然需要后续的进一步扩大样本以及血样样本的验证。目前关于PRNCR1的研究多限于肿瘤研究,通过siRNA降低PRNCR1表达可抑制前列腺癌细胞生长,同时反式激活雄激素受体,表明PRNCR1可能通过调控雄激素受体活性来影响前列腺癌的发生、发展^[13]。在结肠直肠癌中,PRNCR1下降会使处于G0/G1细胞比例减少,处于S期的细胞明显增加,从而促进癌细胞的增值^[14]。PRNCR1的低表达在成骨不全中的作用尚有待于进一步研究。

另外,该研究中所差异变化没有显著性意义的一些lncRNA有一些在肿瘤组织中有差异表达。例如,HOTAIR在乳腺癌细胞中高表达,诱导全基因组重新定位起始复合物2,导致H3K27甲基化和改变基因表达模式,增加了侵袭性和转移性^[15]。

成骨不全作为遗传性结缔组织疾病,具有表型与基因型异质性,致病基因数量多且致病分子机制复杂多样。但是绝大多数成骨不全患者是由于I型胶原蛋白结构基因COL1A1和COL1A2基因突变所致^[16]。对成骨不全lncRNA的分析,能为该类疾病的分子标记物以及机制的研究奠定基础。

参考文献

- [1] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. *Cell* 2009, 136(4): 629–641.
- [2] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(3): 155–159.
- [3] Ng SY, Johnson R, Stanton LW. Human long non-coding RNAs promote pluripotency and neuronal differentiation by association with chromatin modifiers and transcription factors[J]. *EMBO J*, 2012, 31(3): 522–533.
- [4] Nicole S, Harvey RP, Mattick JS. Long Noncoding RNAs in Cardiac Development and Pathophysiology[J]. *Circ Res*, 2012, 111(10): 1349–1362.
- [5] Silva A, Bullock M, Calin G. The Clinical Relevance of Long Non-Coding RNAs in Cancer[J]. *Cancers*, 2015, 7(4): 2169–2182.
- [6] Glorieux F. Osteogenesis Imperfecta[J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008, 22(1): 85–100.
- [7] 韩金祥,崔亚洲,周小艳. 罕见疾病研究现状及展望[J]. *罕见疾病杂志*, 2011, 18(1): 1–6.
- [8] Sillence DO, Senn A, Danks DM. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta[J]. *Journal of Medical Genetics* 1979;16: 101–116.
- [9] 韩峰,鲁艳芹,王延宙,等. IFITM5在不同癌细胞系中的差异表达[J]. *罕见疾病杂志*, 2015, (2): 49–51.
- [10] Sana J, Hankeova S, Svoboda M, et al. Expression levels of transcribed ultraconserved regions uc.73 and uc.388 are altered in colorectal cancer[J]. *Oncology*, 2012, 82(2): 114–118.
- [11] Sharma VP, Fenwick AL, Brockop MS, et al. Mutations of TCF12, encoding a basic-helix-loop-helix partner of TWIST1, are a frequent cause of coronal craniosynostosis[J]. *Nat Genet*, 2013, 45(3): 304–307.
- [12] Ivan P, Adam S, Durbin AD, et al. Abstract 3400: Recurrent focal copy-number changes and loss-of-heterozygosity implicate two non-coding RNAs and one tumor-suppressor gene at chromosome 3q13.31 in osteosarcoma[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(1): 160–171.
- [13] Liuqing Y, Chunru L, Chunyu J, et al. lncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs[J]. *Nature*, 2013, 500(7464): 598–602.
- [14] Yang L, Qiu M, Xu Y, et al. Upregulation of long non-coding RNA PRNCR1 in colorectal cancer promotes cell proliferation and cell cycle progression[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(1): 318–324.
- [15] Zhi-Yuan X, Qi-Ming Y, Yi-An D, et al. Knockdown of Long Non-coding RNA HOTAIR Suppresses Tumor Invasion and Reverses Epithelial-mesenchymal Transition in Gastric Cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2013, 9(6): 587–597.
- [16] Frank R, Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta[J]. *Lancet*, 2004, 363(9418): 1377–1385.

【收稿日期】2016-04-08