

· 基础研究 ·

## LncRNA HIF1A-AS2 对人骨髓间充质干细胞的影响<sup>△</sup>

肖 飞, 王俊文\*, 焦 竞

(武汉市第四医院骨科, 湖北武汉 430073)

**摘要:** [目的] 探讨 LncRNA HIF1A-AS2 对骨髓间充质干细胞成骨分化的作用及机制。[方法] 人骨髓间充质干细胞 (human bone marrow mesenchymal stem cells, hMSCs) 分为 6 组, 为空白组、骨诱导组、AS2 NC 过表达组、AS2 过表达组、AS2 NC 干扰组、AS2 干扰组。后 4 组分别体外转染相应的 LncRNA HIF1A-AS2 的慢病毒载体, 再将除空白组外的 hMSCs 进行成骨诱导培养。检测细胞凋亡、细胞增殖和细胞钙化沉积情况。检测 HIF1A-AS2、MMP2 和 VEGF165 mRNA 的表达水平及 MMP2 和 VEGF165 蛋白的表达水平。[结果] RT-PCR 结果显示, 成骨诱导分化最强时间点为 7 d。细胞凋亡率由高至低依次为, 空白组 > AS2 干扰组 > AS2 NC 过表达组 > AS2 NC 干扰组 > 骨诱导组 > AS2 过表达组, 整体差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。细胞增殖 OD 值由低至高依次为: 空白组 < AS2 干扰组 < AS2 NC 干扰组 < 骨诱导组 < AS2 NC 过表达组 < AS2 过表达组, 整体差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。AS2 过表达组的红色钙化结节沉积较为显著, AS2 干扰组的红色钙化结节沉积数量相对较少。AS2 过表达组的 MMP2 和 VEGF165 的 mRNA 和蛋白表达水平显著高于 AS2 干扰组 ( $P < 0.05$ )。[结论] LncRNA HIF1A-AS2 过表达会促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 增加 MMP2 和 VEGF165 的表达水平, 促进 hMSCs 细胞分化为成骨细胞。

**关键词:** 人骨髓间充质干细胞, LncRNA HIF1A-AS2, 细胞增殖, 细胞凋亡, 成骨分化

**中图分类号:** R318      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1005-8478 (2022) 22-2074-07

**Effects of LncRNA HIF1A-AS2 on human bone marrow mesenchymal stem cells // XIAO Fei, WANG Jun-wen, JIAO Jing. Department of Orthopedics, Wuhan Fourth Hospital, Wuhan 430073, China**

**Abstract:** [Objective] To investigate the effect of LncRNA HIF1A-AS2 on osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells (hMSCs). [Methods] The hMSCs were divided into six groups, including blank group, osteoinduction group, AS2 NC overexpression group, AS2 overexpression group, AS2 NC interference group and AS2 interference group. The later four groups were respectively transfected with the corresponding LncRNA HIF1A-AS2 lentivirus vector in vitro, and then the hMSCs except the blank group were cultured for osteogenic induction. The cell apoptosis, cell proliferation and cell calcification were detected, in addition, the mRNA expression levels of HIF1A-AS2, MMP2 and VEGF165 and the protein expression levels of MMP2 and VEGF165 were detected. [Results] RT-PCR showed that the time of maximum osteogenic differentiation was 7 d after the culture. The apoptosis rate was ranked from high to low as blank group > AS2 interference group > AS2 NC overexpression group > AS2 NC interference group > osteoinduction group > AS2 overexpression group, with statistically significant differences among them ( $P < 0.05$ ). The OD value of cell proliferation was arranged from low to high as blank group < AS2 interference group < AS2 NC interference group < osteoinduction group < AS2 NC overexpression group < AS2 overexpression group, with the statistically significant overall difference ( $P < 0.05$ ). The deposition of calcified nodules revealed by alizarin red staining was more significant in the AS2 overexpression group, whereas which was less in the AS2 interference group. The mRNA and protein expression levels of MMP2 and VEGF165 in the AS2 overexpression group were significantly higher than those in the AS2 interference group ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] The LncRNA HIF1A-AS2 overexpression promotes cell proliferation, inhibit cell apoptosis, increase the expression levels of MMP2 and VEGF165, and promote the differentiation of hMSCs into osteoblasts.

**Key words:** human bone marrow mesenchymal stem cells, LncRNA HIF1A-AS2, cell proliferation, apoptosis, osteogenic differentiation

骨再生对于因肿瘤、骨缺损、骨折等引起的骨丢失是优选。骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem

DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2022.22.12

△基金项目:武汉市卫健委基金项目(编号:WX19C09)

作者简介:肖飞,副主任医师,研究方向:骨外科学,(电话)18971381951,(电子信箱)xoofoo@163.com

\*通信作者:王俊文,(电话)13886061010,(电子信箱)xoofoo@163.com

cell, MSCs) 是发现于骨髓中的原代细胞之一, 具有分化为成骨细胞、张力细胞、脂肪细胞和软骨细胞等多种分化的能力<sup>[1]</sup>。由于 MSCs 具有多能分化、长期自我更新、免疫调节等潜在活性, 能够实现骨形成和再生<sup>[2, 3]</sup>, 已成为组织工程和细胞替代治疗的重要细胞来源。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 在多种物种中表达, 通过多种机制与生理和病理过程相联系<sup>[4, 5]</sup>。许多研究表明, lncRNA 在骨髓间充质干细胞成骨分化中发挥重要作用, 调节下游 mRNA 的表达<sup>[6]</sup>。最新研究发现, lncRNA HIF1A-AS2 在结直肠癌、乳腺癌、胶质母细胞瘤、膀胱癌和胃癌等几种肿瘤中表达异常, 能促进细胞增殖和侵袭<sup>[7]</sup>。研究证实 lncRNA HIF1A-AS2 在成骨诱导的脂肪源性干细胞高表达, 通过磷酸肌醇 3 激酶 (phosphoinositol 3 kinase, PI3K) /蛋白激酶 Akt 信号通路调控脂肪源性干细胞成骨分化<sup>[8]</sup>。但关于 HIF1A-AS2 与 MSCs 成骨分化及血管生成之间关系的研究还未见报道。因此, 本研究拟在体外构建 lncRNA HIF1A-AS2 过表达载体, 转染人骨髓间充质干细胞 (human bone marrow mesenchymal stem cells, hMSCs), 检测细胞增殖、凋亡情况, 检测 MMP2 和 VEGF165 的表达水平, 探讨 lncRNA HIF1A-AS2 对骨髓间充质干细胞成骨分化和血管生成的作用及机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与主要试剂

hMSCs 细胞来源中国科学院上海细胞库。 $\alpha$ -MEM 购自 Hyclone 公司, 货号: SH3026501; Gluta-max 购自 invitrogen 公司, 货号: 35050061; 抗坏血酸购自阿拉丁公司, 货号: A103533; 胎牛血清购自 TBD, 货号: TBD11HT; 成人 hMSCs 成骨诱导分化培养基购自 cyagen, 货号: HUXMA-90021; 10 $\times$ 多聚赖氨酸购自索莱宝公司, 货号: P2100; 茜素红钙质染色试剂盒购自上海歌凡生物科技有限公司, 货号: M040; CCK8 购自上海贝博生物科技公司, 货号: BB-4202; AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自邦景, 货号: BJ-10153; Trizol 购自 ambion 公司, 货号: 15596026; 反转录所用试剂购自 Takara 公司, SYBR Green 染料购自 KAPA Biosystems 公司, 货号: KM4101, PCR 引物由武汉天一华煜基因科技有限公司合成; RIPA (强) 组织细胞快速裂解液和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自 solarbio 公司, 货号:

R0010 和 PC0020; MMP2、VEGF165 和 GAPDH 均购自 bioswamp 公司, 货号: PAB30618、PAB30096 和 PAB36269。

### 1.2 细胞分组与体外处理

将 hMSCs 细胞分为 6 组, 分别给予以下处理: (1) 空白组, hMSCs 细胞正常培养; (2) 骨诱导组, hMSCs 细胞行成骨分化培养基培养; (3) AS2 NC 过表达组, hMSCs 细胞转染 lncRNA HIF1A-AS2 过表达空载质粒后行成骨分化培养基培养; (4) AS2 过表达组, hMSCs 细胞转染 lncRNA HIF1A-AS2 过表达质粒后行成骨分化培养基培养; (5) AS2 NC 干扰组, hMSCs 细胞转染 lncRNA HIF1A-AS2 干扰空载质粒后行成骨分化培养基培养; (6) AS2 干扰组, hMSCs 细胞转染 lncRNA HIF1A-AS2 干扰质粒后行成骨分化培养基培养。

将体外构建 lncRNA HIF1A-AS2 的空载、过表达载体和干扰载体 HIF1A-AS2-shRNA1、HIF1A-AS2-shRNA2、HIF1A-AS2-shRNA3 进行慢病毒包装, 包装完成后进行转染。转染前 24 h 在 2 ml 完全培养基中接种  $5 \times 10^5$  个细胞, 接种于 6 孔板, 待细胞融合度为 90% 时进行转染。按照 Invitrogen 公司的 Lipofectamine 2000 转染步骤转染至 hMSCs 细胞中, 48 h 后 RT-PCR 检测各组细胞中 HIF1A-AS2 的表达水平, 鉴定转染效率。

hMSCs 细胞加入 2 ml 预热的 hMSCs 成骨诱导分化完全培养基, 分别诱导 3、5、7、14 d 后茜素红染色和荧光定量 PCR 检测 HIF1A-AS2 的表达以确认分化最强时间点。

### 1.3 检测方法

#### 1.3.1 流式细胞检测

收集重悬各组处理好的 hMSCs 细胞, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min 弃上清, 将细胞重悬于 200  $\mu$ l PBS。加入 10  $\mu$ l Annexin V-FITC 和 10  $\mu$ l PI, 轻轻混匀, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。加入 300  $\mu$ l PBS, 随即进行流式检测, 使用 NovoExpress 分析软件进行分析。

#### 1.3.2 CCK-8 检测

将细胞接种于 96 孔板, 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜使细胞贴壁。按照不同分组处理细胞后继续培养。培养结束后, 每孔加入 10  $\mu$ l CCK8 溶液, 继续培养 4 h, 在酶联免疫检测仪 450 nm 处测量各孔的吸光值。

#### 1.3.3 茜素红染色

预检测茜素红染色和荧光定量 PCR 检测 HIF1A-AS2 的表达确认分化最强时间点进行检测。成骨诱导

分化结束后，弃去培养基，PBS清洗后加入4%中性甲醛溶液固定30 min。弃去固定液，加入1 ml 茜素红染液染色，PBS洗涤后置于显微镜下观察成骨染色效果并拍照。用Image Pro Plus软件测量目标区域的积分光密度( IOD)和面积( Area)，计算平均光密度值(  $MOD=IOD/Area$ )。

#### 1.3.4 RT-PCR 检测

检测 HIF1A-AS2、MMP2 和 VEGF165 的 mRNA 表达水平。采用 Trizol 试剂分别提取各组细胞的总 RNA，按照 Takara 逆转录试剂盒说明方法逆转录获得 cDNA。Real-Time PCR 扩增体系：SYBR FAST qPCR Master Mix 10  $\mu$ l，上游引物( 10  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ l，下游引物( 10  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ l，cDNA 模板 1  $\mu$ l，ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu$ l，总体积为 20  $\mu$ l。反应条件：95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min，扩增 95 $^{\circ}$ C 5 s，56 $^{\circ}$ C 10 s，72 $^{\circ}$ C 25 s 共计 40 个循环，最后 65 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C 制备溶解曲线，依据 Ct 值计算  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ，以 GAPDH 为内参基因计算相对表达量。

#### 1.3.5 Western blot 检测

检测 MMP2 和 VEGF165 蛋白表达水平。取出细胞，弃去培养液，预冷的 PBS 洗涤后加入含有蛋白酶和磷酸抑制剂的裂解液 200  $\mu$ l，置于 4 $^{\circ}$ C 充分裂解细胞，12 000 g 离心 10 min，取上清进行蛋白质浓度测定并定量。将配制好的 PAGE 胶放入电泳槽中，上样后电泳，湿转膜，5%脱脂奶粉室温封闭 4 $^{\circ}$ C 过

夜。根据说明书稀释抗体( 1 : 1 000)，室温孵育 1 h，PBST 洗涤 3 次。随后根据用量，按照 1 : 10 000 稀释 HRP 标记的二抗，与膜室温孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次后滴加 ECL 化学发光液，置于全自动化学发光分析仪中检测，获取相关条带灰度值。

#### 1.4 统计学方法

采用 Graph pad 8.0 软件对数据进行统计分析，计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示，资料符合正态分布时，采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 法；资料不符合正态分布时，采用 Krushal -Wallis H 检验，两两比较采用 Mann-whitney U 检验。P<0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成骨诱导最强时间点确认

为了确认成骨诱导分化 hMSCs 细胞最强时间点，应用茜素红染色和 RT-PCR 检测 HIF1A-AS2 mRNA 的表达水平。茜素红染色结果显示，随着时间的推移，大量钙化结节沉积呈红色，尤以 7 d 和 14 d 最为明显。RT-PCR 结果显示，在 3 d 时，HIF1A-AS2 mRNA 的表达水平无明显变化(  $P>0.05$ )，5、7、14 d 时，HIF1A-AS2 mRNA 的表达水平显著提高，但 14 d 时 HIF1A-AS2 mRNA 的表达水平明显低于 7 d(  $P<0.05$ )，说明成骨诱导分化最强时间点为 7 d。结果见图 1。

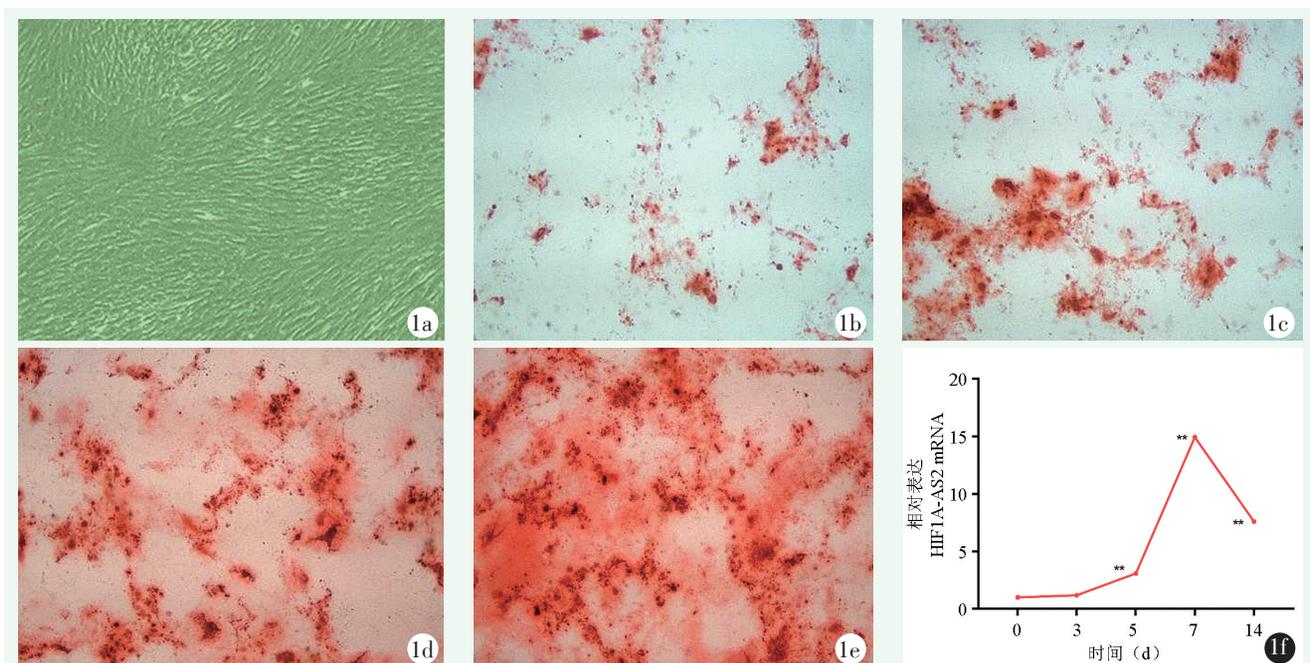


图1 骨诱导分化时间点确认 1a: 即刻倒置显微镜所见 1b~1e: 分别为骨诱导培养后 3、5、7 d 和 14 d 的茜素红染色所见，可见随时间推移，染色强度显著增加 1f: HIF1A-AS2 mRNA 的表达水平的变化线图

2.2 细胞凋亡

检测结果见图 2 和表 1, 细胞凋亡率由高至低依次为, 空白组>AS2 干扰组>AS2 NC 过表达组>AS2 NC 干扰组>骨诱导组>AS2 过表达组, 整体差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。与空白组比较, 骨诱导组的细

胞凋亡率明显降低 ( $P<0.05$ )。与骨诱导组相比, AS2 NC 过表达组和 AS2 NC 干扰组的细胞凋亡率无明显变化 ( $P>0.05$ ), AS2 过表达组的细胞凋亡率明显低于骨诱导组, AS2 干扰组的细胞凋亡率明显高于骨诱导组 ( $P<0.05$ )。

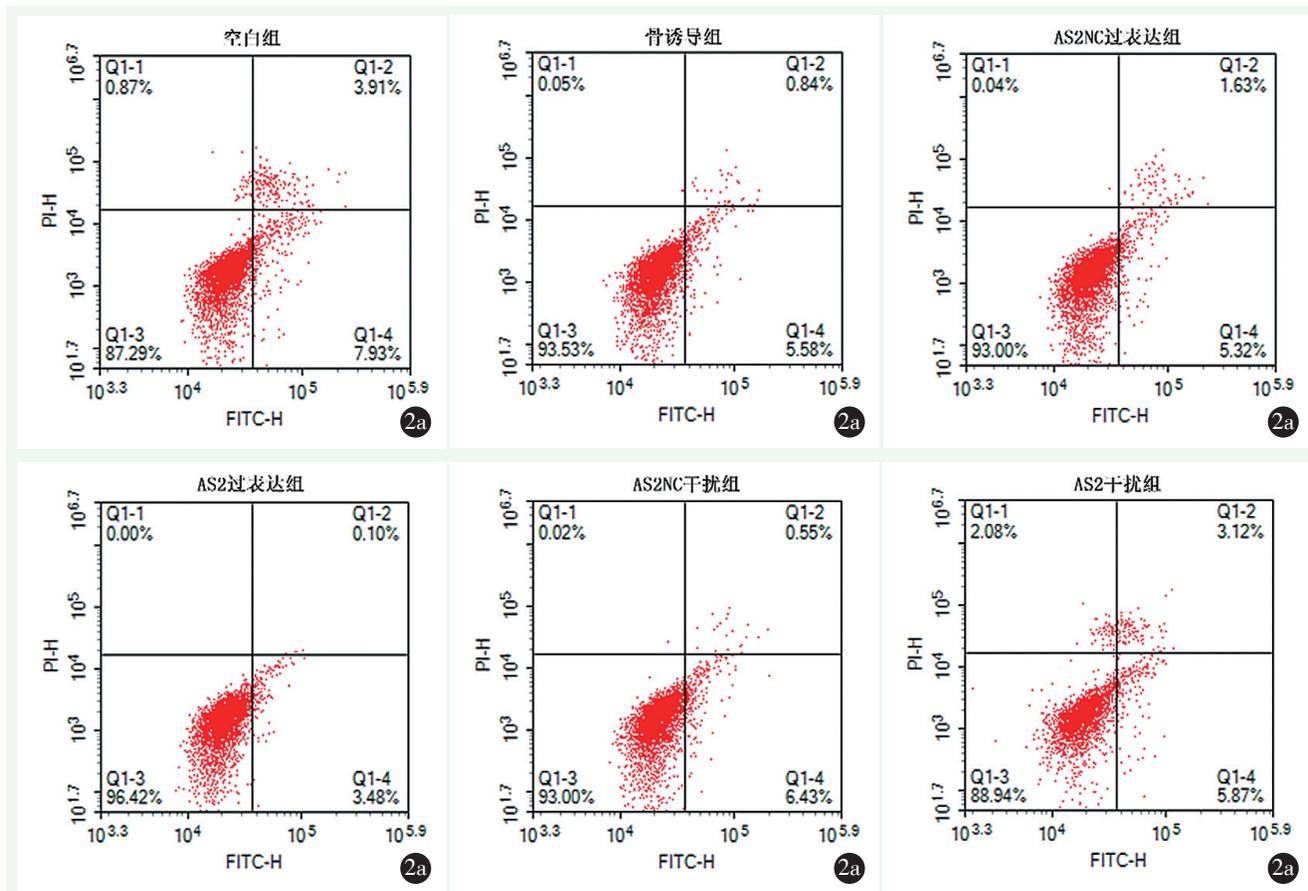


图 2 6 组细胞流式细胞仪检测细胞凋亡检测结果 2a: 空白组 2b: 骨诱导组 2c: AS2 NC 过表达组 2d: AS2 过表达组 2e: AS2 NC 干扰组 2f: AS2 干扰组

表 1 6 组细胞检测结果 ( $\bar{x} \pm s$ ) 与比较

指标	空白组 (n=3)	骨诱导组 (n=3)	AS2 NC 过表达组 (n=3)	AS2 过表达组 (n=3)	AS2 NC 干扰组 (n=3)	AS2 干扰组 (n=3)	P 值
流式细胞仪检测							
细胞凋亡率 (%)	12.11±0.77	7.01±0.71	7.44±0.55	4.49±1.25	7.31±1.14	8.96±0.16	<0.001
CCK-8 检测细胞增殖							
OD 值	1.76±0.01	2.03±0.02	2.04±0.02	2.13±0.01	2.03±0.02	1.92±0.01	<0.001
茜素红染色							
细胞钙沉积 (MOD)	0.00±0.00	0.64±0.02	0.66±0.03	0.84±0.04	0.62±0.03	0.39±0.04	<0.001
RT-PCR 检测 mRNA							
HIF1A-AS2	1.00±0.05	5.03±0.25	5.51±0.29	16.95±0.27	6.35±0.28	2.50±0.02	<0.001
MMP2	1.00±0.08	3.66±0.14	3.51±0.14	14.03±0.44	4.23±0.19	1.50±0.05	<0.001
VEGF165	1.00±0.03	3.37±0.17	3.56±0.22	12.94±0.33	4.15±0.01	1.65±0.19	<0.001
Western blot 检测蛋白							
MMP2 (/GAPDH)	0.47±0.04	0.93±0.04	0.87±0.03	0.95±0.04	0.76±0.03	0.51±0.02	<0.001
VEGF165 (/GAPDH)	0.45±0.05	0.57±0.01	0.52±0.01	0.67±0.03	0.53±0.02	0.51±0.03	<0.001

### 2.3 细胞增殖

CCK-8 检测结果见表 1, 细胞增殖 OD 值由低至高依次为: 空白组 < AS2 干扰组 < AS2 NC 干扰组 < 骨诱导组 < AS2 NC 过表达组 < AS2 过表达组, 整体差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。两两比较, 骨诱导组的 OD 值明显高于空白组, AS2 过表达组的 OD 值显著高于骨诱导组 ( $P < 0.05$ ), AS2 干扰组的 OD 值显著低于骨诱导组 ( $P < 0.05$ )。结果见表 2。

### 2.4 细胞钙化沉积

如图 3、表 1 所示, 骨诱导组、AS2 NC 过表达组和 AS2 NC 干扰组呈大量红色钙化结节沉积, 但 AS2 过表达组的红色钙化结节沉积较为显著, AS2 干扰组的红色钙化结节沉积数量相对较少。MOD 值从低至高依次为: 空白组 < AS2 干扰组 < AS2 NC 干扰组 < 骨诱导组 < AS2 NC 过表达组 < AS2 过表达组。

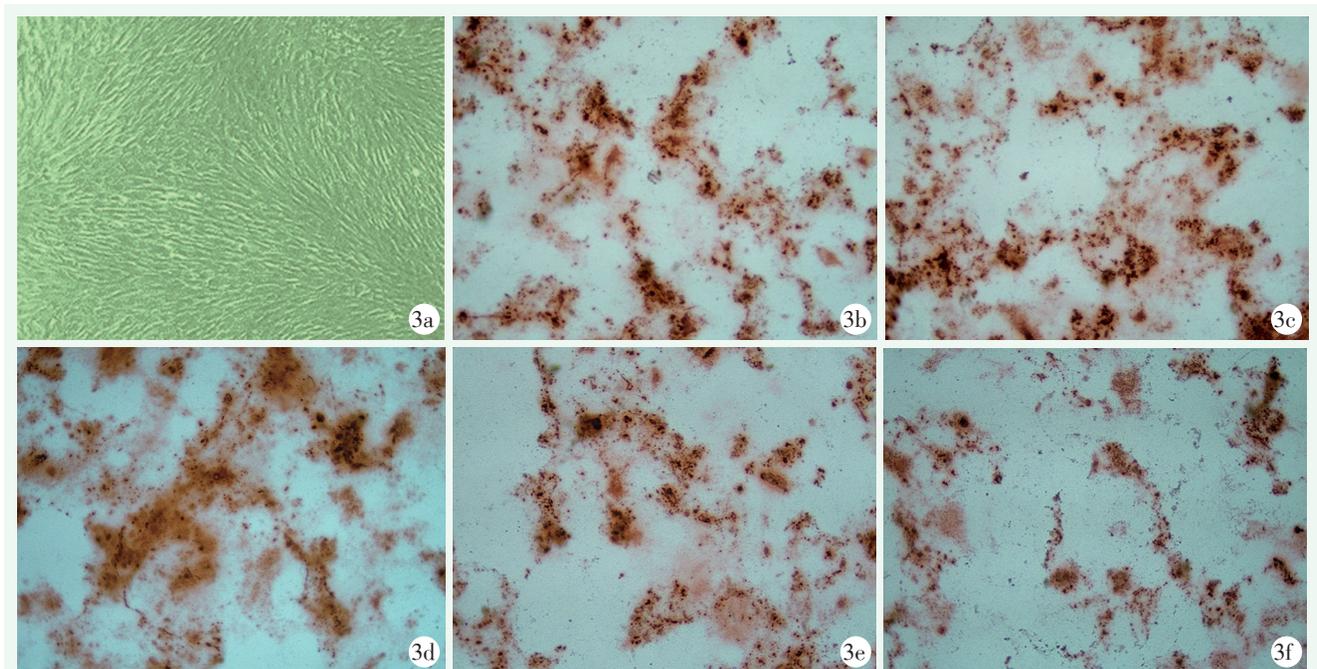


图 3 茜素红染色结果 3a: 空白组 3b: 骨诱导组 3c: AS2 NC 过表达组 3d: AS2 过表达组 3e: AS2 NC 干扰组 3f: AS2 干扰组

### 2.5 RT-PCR 检测 mRNA 表达

为了鉴定 LncRNA HIF1A-AS2 过表达及干扰载体的转染效率, 应用 RT-PCR 检测 HIF1A-AS2 mRNA 的表达水平。结果显示转染后, LncRNA HIF1A-AS2 NC 组的 HIF1A-AS2 mRNA 的表达水平为 ( $1.19 \pm 0.07$ ), 与空白组比较无明显差异 ( $P > 0.05$ ), AS2 过表达组 HIF1A-AS2 mRNA 的表达水平为 ( $210.17 \pm 38.69$ ), 明显高于空白组 ( $P < 0.05$ ), HIF1A-AS2-shRNA1、HIF1A-AS2-shRNA2、HIF1A-AS2-shRNA3 的 HIF1A-AS2 mRNA 表达水平分别为 ( $0.23 \pm 0.01$ )、( $0.45 \pm 0.02$ )、( $0.40 \pm 0.04$ ), 均显著低于空白组 ( $P < 0.05$ ), 说明 LncRNA HIF1A-AS2 过表达及干扰载体转染效率成功。

6 组细胞 RT-PCR 检测 mRNA 表达结果见表 1, 与空白组相比, 成骨诱导分化后, HIF1A-AS2、MMP2 和 VEGF165 mRNA 的表达水平显著增加 ( $P <$

$0.05$ )。与骨诱导组相比较, AS2 过表达组的 HIF1A-AS2、MMP2 和 VEGF165 mRNA 的表达水平显著增加 ( $P < 0.05$ ), AS2 干扰组的 HIF1A-AS2、MMP2 和 VEGF165 mRNA 的表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。

### 2.6 Western blot 检测蛋白表达

检测结果见表 1, 与空白组相比, 骨诱导组 MMP2 和 VEGF165 的蛋白表达水平显著增加 ( $P < 0.05$ )。与骨诱导组相比较, AS2 NC 干扰组和 AS2 干扰组的 MMP2 的蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), AS2 过表达组 VEGF165 的蛋白表达水平增加 ( $P < 0.05$ ), 其余各组的 MMP2 和 VEGF165 的蛋白水平无明显差异 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

本研究通过构建 LncRNA HIF1A-AS2 过表达和

干扰载体, 转染 hMSCs 细胞, 结果发现 LncRNA HIF1A-AS2 过表达促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 茜素红染色后大量红色钙化结节沉积, 表明 LncRNA HIF1A-AS2 促进 hMSCs 细胞分化为成骨细胞。

骨具有通过再生过程治愈骨损伤而不形成纤维瘢痕的独特能力, 这种骨再生过程对于维持人一生中的钙稳态至关重要<sup>[9, 10]</sup>。MSCs 作为组织修复的良好细胞来源, 能够促进骨再生, 避免传统的手术技术, 在组织工程和骨发育策略中发挥着重要作用<sup>[11, 12]</sup>, 且研究 MSCs 在成骨分化过程中的机制及相关因子一直是组织工程领域的热点。研究报道, lncRNA HIF1A-AS2 的过度表达会导致 HIF1- $\alpha$  积聚增加, 从而触发促血管生成因子的上调, 启动一系列新的血管形成<sup>[13]</sup>, 但 HIF1A-AS2 对 MSCs 成骨分化的作用仍需进一步探索。因此本研究通过体外构建 LncRNA HIF1A-AS2 过表达和干扰载体, 转染 hMSCs, 明确 LncRNA HIF1A-AS2 对骨髓间充质干细胞成骨分化和血管生成的作用及机制。本研究检测了 LncRNA HIF1A-AS2 对 hMSCs 活力、凋亡和钙化沉积的影响, 结果显示, 过表达 LncRNA HIF1A-AS2 能够促进 hMSCs 的增殖和钙化沉积, 抑制 hMSCs 的凋亡, 而干扰 LncRNA HIF1A-AS2 后作用相反, 提示 LncRNA HIF1A-AS2 具有促进成骨分化的作用, 这与 Chen 等<sup>[14]</sup>的研究结果一致。

MMPs 是一种依赖锌和钙的蛋白酶, 可降解基质蛋白, 在动脉粥样硬化和新生血管的发展过程中参与血管重构<sup>[15, 16]</sup>。MMP-2 是来自血管平滑肌细胞的主要基质金属蛋白酶, 可降解纤维胶原、胰岛素生长因子结合蛋白和成纤维细胞生长因子受体, 并能激活 MMP-1、MMP-9 和 MMP-13<sup>[17, 18]</sup>。有学者发现 MMP-2 和其他基质金属蛋白酶介导胶原断裂的过程, 是骨形成与骨吸收的重要耦合步骤<sup>[19]</sup>。这些研究表明 MMP-2 可能参与了骨修复再生的过程。本研究结果显示, 过表达 LncRNA HIF1A-AS2 能够促进成骨诱导的 hMSCs 中 MMP2 mRNA 和蛋白的表达, 而干扰 LncRNA HIF1A-AS2 的表达会抑制 MMP2 的表达, 提示 LncRNA HIF1A-AS2 能够通过调节 MMP2 的表达参与骨修复再生过程。VEGF 是愈合过程中最重要的血管生成生长因子之一, 能诱导内皮细胞的迁移和增殖, 改善血管通透性同时调节成骨生长因子的分泌<sup>[20, 21]</sup>。正如文献报道, VEGF 蛋白能促进小鼠股骨骨折、兔桡骨节段性缺损和大鼠骨钻孔缺损等动物模型的骨再生<sup>[22, 23]</sup>。有研究表明 VEGF 参与产后骨修复和再生, 调节炎症细胞和 MSCs 的数

量, 在骨骼发育中起着决定性的作用<sup>[24, 25]</sup>。本研究结果显示 LncRNA HIF1A-AS2 过表达组能够升高促进成骨诱导的 hMSCs 中 VEGF165 mRNA 和蛋白的表达水平, 且 LncRNA HIF1A-AS2 干扰组 VEGF165 的表达显著降低, 提示 LncRNA HIF1A-AS2 能够通过调节 VEGF165 的表达, 达到刺激成骨分化和血管生成的目的。

综上所述, LncRNA HIF1A-AS2 能够促进细胞增殖和钙化结节沉积, 降低细胞凋亡, 促进 hMSCs 细胞分化为成骨细胞。LncRNA HIF1A-AS2 过表达会增加 MMP2 和 VEGF165 的表达水平, 刺激成骨分化和血管生成, 为临床用于加速骨组织再生提供新策略。

#### 参考文献

- [1] Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, et al. Human bone marrow - derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (19): 9142-9149.
- [2] Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche [J]. *Nature*, 2010, 466 (7308): 829-834.
- [3] 李晔, 孙仁义, 吕明, 等. HDAC2 转染对骨髓干细胞成骨细胞分化的影响 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2021, 29 (12): 1119-1123.
- [4] Guttman M, Amit I, Garber M, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals [J]. *Nature*, 2009, 458 (7235): 223-227.
- [5] 梁彦虎, 苑龙, 李雪松, 等. 脂多糖诱导的小胶质细胞长链非编码 RNA 表达 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2020, 28 (15): 1414-1417.
- [6] Wang J, Liu S, Shi J, et al. The role of lncRNAs in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2019, 15 (3): 243-249.
- [7] Lin J, Shi Z, Yu Z, et al. LncRNA HIF1A-AS2 positively affects the progression and EMT formation of colorectal cancer through regulating miR-129-5p and DNMT3A [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98: 433-439.
- [8] Wu R, Ruan J, Sun Y, et al. Long non-coding RNA HIF1A-AS2 facilitates adipose-derived stem cells (ASCs) osteogenic differentiation through miR-665/IL6 axis via PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9 (1): 348.
- [9] Seeman E. Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2008, 22 (5): 701-722.
- [10] Shin RL, Lee CW, Shen OY, et al. The crosstalk between mesenchymal stem cells and macrophages in bone regeneration: a systematic review [J]. *Stem Cells Int*, 2021, 2021: 8835156.
- [11] Trubiani O, Marconi GD, Pierdomenico SD, et al. Human oral stem cells, biomaterials and extracellular vesicles: a promising tool in bone tissue repair [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (20): 4987.

- [12] 张山锋, 马中希, 叶志伟, 等. 缝隙连接蛋白 43 在淫羊藿苷成骨诱导中的作用研究 [J]. 中国矫形外科杂志, 2018, 26 (15): 1418-1422.
- [13] Ewida HA, Zayed RK, Darwish HA, et al. Circulating lncRNAs HIF1A-AS2 and LINLK-A: a role and relation to hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in cerebral stroke patients [J]. Mol Neurobiol, 2021, 58 (9): 4564-4574.
- [14] Chen D, Wu L, Liu L, et al. Comparison of HIF1A-AS1 and HIF1A-AS2 in regulating HIF-1 $\alpha$  and the osteogenic differentiation of PDLs under hypoxia [J]. Int J Mol Med, 2017, 40 (5): 1529-1536.
- [15] Cheng XW, Song H, Sasaki T, et al. Angiotensin type 1 receptor blocker reduces intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein e-deficient mice [J]. Hypertension, 2011, 57 (5): 981-989.
- [16] Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2017, 147: 1-73.
- [17] Yasmin S, McEniery CM, Wallace S, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25 (2): 372.
- [18] Bassiouni W, Ali MAM, Schulz R. Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease [J]. FEBS J, 2021, 288 (24): 7162-7182.
- [19] Parikka V, Väänänen A, Risteli J, et al. Human mesenchymal stem cell derived osteoblasts degrade organic bone matrix in vitro by matrix metalloproteinases [J]. Matrix Biol, 2005, 24 (6): 438-447.
- [20] Pizzicannella J, Gugliandolo A, Orsini T, et al. Engineered extracellular vesicles from human periodontal-ligament stem cells increase VEGF/VEGFR2 expression during bone regeneration [J]. Front Physiol, 2019, 10: 512.
- [21] Piard C, Luthcke R, Kamalidinov T, et al. Sustained delivery of vascular endothelial growth factor from mesoporous calcium-deficient hydroxyapatite microparticles promotes in vitro angiogenesis and osteogenesis [J]. J Biomed Mater Res A, 2021, 109 (7): 1080-1087.
- [22] Ogilvie CM, Lu C, Marcucio R, et al. Vascular endothelial growth factor improves bone repair in a murine nonunion model [J]. Iowa Orthop J, 2012, 32: 90-94.
- [23] Si HP, Lu ZH, Lin YL, et al. Transfect bone marrow stromal cells with pcDNA3.1-VEGF to construct tissue engineered bone in defect repair [J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125 (5): 906-911.
- [24] Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, et al. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing [J]. J Surg Res, 2009, 153 (2): 347-358.
- [25] 张聪, 刘洪美, 李庆伟, 等. VEGF165 过表达对 BMP2 成骨细胞分化影响的实验研究 [J]. 中国矫形外科杂志, 2015, 23 (8): 727-732.

(收稿:2021-12-09 修回:2022-06-15)

(同行评议专家: 朱建福 李 舰 陈 东)

(本文编辑: 宁 桦)

## 读者·作者·编者

### 关于建立《中国矫形外科杂志》同行评议专家库的通知

为促进期刊更好的发展, 服务于国家医疗卫生事业和全民健康, 更广泛的动员骨科及相关专业人员参与本刊建设, 公开公正、高效及时处理作者来稿, 以不断提升本刊影响力、公信力和学术质量, 并动态化更新发展本刊编辑委员会, 现决定逐步建立与完善《中国矫形外科杂志》同行评议专家库。采用个人申请, 所在单位同意, 动态考察的方法逐步推开。

凡从事骨科及相关临床、康复、护理、教学、基础研究和医疗辅助工作 10 年以上, 副高职称, 或获得博士学位人员均可报名。本刊原有编辑委员亦应重新申报入库。可在本刊远程投稿系统 (<http://jxwk.ijournal.cn>) 下载入库须知和申请表。填写并加盖所在单位公章后, 制成 PDF 文件, 上传至本刊电子信箱: [jxwxms@126.com](mailto:jxwxms@126.com), 完成入库。编辑部将依据您的专业特长, 向您分发需审阅评议的稿件。

评议工作为志愿性, 但您的工作会在本刊留下有价值的印迹。专家库采用动态管理, 将以您的评议质量、效率和工作量作为您改选进入, 或再次当选编辑委员会委员的依据。

《中国矫形外科杂志》编辑部

2021 年 1 月 30 日