



多种重要生命过程。lncRNA可以通过与DNA/RNA结合或者与蛋白质结合而行使其功能,在表观遗传水平、转录水平和转录后水平等多个层面上调控基因的表达,从而影响机体生长、发育、衰老、死亡等重要生命活动以及疾病的发生和发展。研究发现,定位于细胞核内的lncRNA主要通过位于细胞核中的异核蛋白或染色质修饰复合体结合发挥作用,定位于细胞质内的lncRNA可作为竞争性内源RNA隔离微小RNA(microRNA, miRNA/miR)来恢复信使RNA(messenger RNA, mRNA)翻译,或者可通过一个算术逻辑单元(arithmetic logic unit, ALU)元件,促进由切缘双链RNA结合蛋白1介导的mRNA衰减来发挥调控作用<sup>[5]</sup>。阐明间充质干细胞的调控机制可对多向分化调控甚至临床治疗产生重大影响,lncRNA作为近期发现的基因富矿,其应该在间充质干细胞分化调控中发挥重要作用。

## 1 lncRNA与间充质干细胞的成骨分化

左长清等<sup>[6]</sup>采用基因芯片分析发现,有116个lncRNA在间充质干细胞成骨过程中显著差异表达,细胞实验进一步证实lncRNA AK089560的表达值在C3H10T1/2细胞成骨分化的2、4和6 d显著下降,推测其可能的机制是参与维持间充质干细胞处于未分化的状态;进一步的研究<sup>[7]</sup>发现,116个差异表达的lnc-RNA中,59个上调表达,57个下调表达,其中60.3%位于基因间结构区域,另20.7%位于编码区域,且24个lncRNA都能够找到相对应的邻近基因,提示这些邻近基因可能是lncRNA的靶基因。Wang等<sup>[8]</sup>同样采用基因芯片技术检测了间充质干细胞成骨分化中差异表达的lncRNA,并证实lncRNA H19和uc022axw.1的表达上调,可能参与了间充质干细胞成骨分化过程。罗嘉全等<sup>[9]</sup>利用生物信息软件分析成骨过程中Smad泛素调节因子(Smad ubiquitination regulatory factor, Smurf)1、肌节同源盒基因(muscle segment homeobox gene, MSX)1、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)1相关的lncRNA,包括uc003ups、AK096529、AK024937、AK129811和AK056311等,发现大多数lncRNA在间充质干细胞成骨分化后表达下调,其中3个lncRNA(AK-096529、uc003ups和AK056311)的变化具有统计学意义,推测其可能的作用机制是通过正向调控

Smurf1,促使Smurf1表达下调,进而减少核心结合蛋白因子(runt-related transcription factor, Runx)2的降解,促进间充质干细胞的成骨作用。Qu等<sup>[10]</sup>利用基因芯片技术检测出人牙周膜干细胞经成骨诱导后共有994个lncRNA出现上调表达,1177个lncRNA下调表达;有1578个mRNA上调表达,1979个mRNA下调表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)验证结果与芯片检测基本吻合;通路分析显示,共有83条信号通路参与了人牙周膜干细胞成骨分化过程,包括有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、血管内皮生长因子及转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- $\beta$ 等通路;编码-非编码基因共表达(coding-noncoding gene co-expression, CNC)分析结果显示,出现差异表达的lncRNA与这些成骨相关mRNA之间存在着潜在的调控关系,其中有131对基因之间存在负相关,262对基因之间存在正相关。

目前关于lncRNA在间充质干细胞成骨分化方面的研究主要集中在基因芯片和生物信息学分析水平,但也有少量研究进行了机制方面的探讨。Zhu等<sup>[11]</sup>研究报告称,反分化非编码RNA(anti-differentiation ncRNA, ANCR)能通过与靶基因果蝇zeste基因增强子同源物(enhancer of zeste homolog, EZH)2相互作用,抑制重要成骨转录因子Runx2的表达,从而导致成骨细胞骨分化的下降,下调ANCR表达可以促进成骨细胞的骨向分化。Zhuang等<sup>[12]</sup>发现,上调表达肿瘤抑制基因lncRNA母系印记(maternally expressed, MEG)3的基因能够促进间充质干细胞的成骨向分化,其可能机制是通过靶向调控激活邻近基因即BMP4的转录因子性别决定区Y框蛋白(recombinant sex determining region Y box protein, SOX)2发挥作用。Jia等<sup>[13]</sup>发现,抑制lncRNA ANCR的表达后会促进人牙周膜干细胞的成骨分化,并且该调控过程与经典Wnt信号通路相关。Huang等<sup>[14]</sup>发现,lncRNA H19促进人骨髓间充质干细胞的成骨分化,过表达H19后成骨能力显著增加;进一步的机制研究发现,H19通过miR-675/TGF- $\beta$ 1/Smad3/组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDAC)途径调控了间充质干细胞的成骨分化。近期有研究<sup>[15]</sup>提出,H19以竞争性内源RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)角色调控人骨髓间充

质干细胞的成骨分化。ceRNA代表一种全新的基因表达调控模式,比miRNA调控网络更为精细和复杂,涉及更多RNA分子,包括mRNA、lncRNA和miRNA等。该研究提示,H19作为ceRNA,可以竞争性地结合对间充质干细胞的成骨分化和Wnt/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)通路均起到负向调控作用的miR-141和miR-22,拮抗miR-141和miR-22的功能,导致miR-141和miR-22的共同靶基因(编码 $\beta$ -连环蛋白的基因)脱抑制,进而激活Wnt/ $\beta$ -连环蛋白通路,增强成骨作用。Wang等<sup>[16]</sup>通过对比牙周炎患者与正常人的牙周膜干细胞中与成骨细胞损伤相关的lncRNA,以微阵列分析并筛选出牙周炎患者牙周膜干细胞lncRNA,发现其与牙周膜干细胞成骨分化呈正相关。qRT-PCR及荧光素酶报告发现,牙周炎患者牙周膜干细胞lncRNA可能是miR-182的ceRNA,可共同激活编码叉头框蛋白(forkhead box protein, Fox)O1的基因,从而促进成骨分化。

## 2 lncRNA与间充质干细胞的成软骨分化

Wang等<sup>[17]</sup>采用基因芯片技术分析人间充质干细胞在成软骨分化过程中lncRNA的表达,结果发现有3 638个lncRNA差异表达(倍数变化 $>2.0$ 或 $<-2.0$ , $P<0.05$ ),其中2 166个lncRNA上调表达,1 472个lncRNA下调表达;进一步采用CNC分析发现,2个上调表达的lncRNA(ZBED3-AS1和CTA-941F9.9)可能在成软骨分化过程中起到重要作用。目前,关于间充质干细胞成软骨分化过程中lncRNA的表达和功能的研究还很少,较多的研究集中在骨关节炎的软骨组织上。Liu等<sup>[18]</sup>比较了关节炎软骨和正常软骨的lncRNA表达,结果发现152个lncRNA出现8倍差异表达,其中82个上调表达,70个下调表达,沉默软骨损伤相关lncRNA表达可促进胶原形成以及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)13和聚蛋白多糖酶5高表达,提示软骨损伤相关性lncRNA可能促进胞外基质的降解,从而在骨关节炎中发挥重要作用。Steck等<sup>[19]</sup>发现H19在骨关节炎的软骨组织中的表达明显升高。Kim等<sup>[20]</sup>将骨关节炎软骨组织与正常软骨组织进行比较,发现lncRNA PTENP1、HOTAIR、TUG1、HOTTIP和GAS5表达明显上调,SNHG4、Emx2os、DISC2下调,HOTTIP的表达水平上调10倍以上,同时HOTTIP的靶基因同

源异形盒基因A13(homeobox A13, Hoxa13)的表达水平下调。

## 3 lncRNA与间充质干细胞的成脂分化

Xiao等<sup>[21]</sup>发现,在人骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化的过程中,成脂诱导分化非编码RNA(adipogenic differentiation induced noncoding RNA, ADINR)显著上调表达;敲除ADINR后,间充质干细胞向脂肪细胞分化能力显著下降;进一步机制研究发现其主要通过正向调控重组人转录因子CCAAT增强子结合蛋白 $\alpha$ (transcription factor CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$ , C/EBP $\alpha$ )基因发挥作用。Huang等<sup>[22]</sup>通过表观遗传学研究发现,在间充质干细胞成脂分化过程中,H19及miR-675的表达明显下降,过表达H19和miR-675可以抑制脂肪细胞形成,抑制其表达可以促进间充质干细胞向脂肪细胞分化。通过进一步的机制研究发现,miR-675可以靶向作用HDAC 4-6转录本的3'端非翻译区,使其过表达,从而促进脂肪细胞的分化;抑制HDAC后,可减少H19上游基因的印记控制区域与CCCTC结合因子的结合,使H19的表达显著下调。这说明CTCF/H19/miR-675/HDAC通路可能是调节间充质干细胞成脂分化的重要通路。

## 4 lncRNA与间充质干细胞的其他分化

间充质干细胞除了可以向成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞分化外,还可以分化为神经细胞和肌肉细胞等。Wu等<sup>[23]</sup>通过基因芯片检测发现,人骨髓间充质干细胞向神经细胞分化过程中,在分化3 h有56个lncRNA差异表达(24个上调,32个下调),分化6 h,有64个lncRNA差异表达(27个上调,37个下调);qRT-PCR验证了H19、Esco2、Pcdhb18和RGD1560277的表达。该研究提示lncRNA可能在间充质干细胞向神经细胞分化中起到重要作用。目前对间充质干细胞向肌肉细胞分化中lncRNA的功能研究大多集中在间充质干细胞来源的细胞,如人或动物的骨骼肌细胞、心肌细胞,或动物的间充质干细胞等;多为研究lncRNA在肌源性疾病的功能及作用机制,如比较肌营养不良、肌肉强制性疾病中异常的肌肉细胞与正常肌肉细胞间lncRNA的表达差异及调控机制。但

是，对于lncRNA在间充质干细胞成肌肉向分化中的功能及机制研究仍然空白，这可能成为今后lncRNA成肌肉分化的研究热点。

### 5 lncRNA在间充质干细胞多向分化中的研究展望

综上所述，笔者发现lncRNA可能在间充质干细胞的多向分化过程中起到重要作用（表1），目前对于间充质干细胞向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和神经细胞分化的研究中，研究方法主要集中在基因芯片检测以及生物信息学分析的层次上，对其相互作用的机制研究仍然欠缺，许多

lncRNA的生物学功能尚未得到阐明，如何区分功能性和非功能性非编码转录物依然不易，研究仍需要进一步的深入，探讨关键lncRNA可能的作用机制。另外，因lncRNA转录本长度超过200 nt，容易形成二级结构，作用机制多样、复杂，不同的lncRNA研究结果之间的借鉴意义不高。因此，需要更多、更有效的研究方法用于系统性研究lncRNA的结构及其功能，例如高分辨率的活体成像技术、高通量的蛋白质检测技术、高灵敏的lncRNA检测技术、高效预测lncRNA二级结构和靶标的生物信息学技术等。这也将是lncRNA在今后研究中的热点和重点。

表 1 间充质干细胞成骨、成软骨及成脂过程中lncRNA总结

Tab 1 Summary of lncRNAs in the process of osteogenesis, chondrogenesis and adipogenesis of mesenchymal stem cells

基因名称	基因类型	间充质干细胞类型	功能	靶基因或作用通路
ANCR	基因间	人成骨细胞系hFoB1.19 人牙周膜干细胞	抑制成骨	果蝇 <i>zeste</i> 基因增强子同源物2 经典Wnt信号通路
AK089560	基因间	小鼠间质干细胞C3H10T1/2	抑制成骨	与基因 <i>Sema3a</i> 形成重叠，与 <i>Sema3a</i> 同向转录表达
AK096529, uc003ups, AK056311	—	人骨髓间充质干细胞	促进成骨	正向调控Smurf1，促使在成骨分化中Smurf1表达 下调，进而减少Runx2的降解
MEG3	基因间	多发性骨髓瘤病患的骨 髓间充质干细胞	促进成骨	靶向作用BMP4
母本印记表达转录本H19	基因间	人骨髓间充质干细胞	促进成骨 促进成脂肪	通过miR-675/TGF-β1/Smad3/HDAC途径调控 通过CTCF/H19/miR-675/HDAC途径调控细胞成 脂分化
POIR	基因间	牙周炎病患的牙周膜干细胞	促进成骨	miR-182的ceRNA，激活 <i>FoxO1</i> 基因
ZBED3-AS1, CTA-941F9.9	反义，基因间	人骨髓间充质干细胞	促进成软骨	与成软骨分化相关的mRNA
ADINR	基因间	人骨髓间充质干细胞	促进成脂肪	调控重组人CCAAT增强子结合蛋白α基因表达

### 6 参考文献

[1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multi-lineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411):143-147.

[2] Jin HJ, Bae YK, Kim M, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(9): 17986-18001.

[3] Quinodoz S, Guttman M. Long noncoding RNAs: an emerging link between gene regulation and nuclear organization[J]. Trends Cell Biol, 2014, 24(11):651-

663.

[4] Vučićević D, Corradin O, Ntini E, et al. Long ncRNA expression associates with tissue-specific enhancers [J]. Cell Cycle, 2015, 14(2):253-260.

[5] Villegas VE, Zaphropoulos PG. Neighboring gene regulation by antisense long non-coding RNAs[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(2):3251-3266.

[6] 左长清, 卢旱云, 钟月春, 等. 长链非编码RNA AK089560在间质干细胞成骨与成脂分化中的表达[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(23):3732-3738.

Zuo CQ, Lu HY, Zhong YC, et al. The expression of long non-coding RNA AK089560 in mesenchymal stem cells undergoing osteogenic and adipogenic differentiation[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2014, 18

- (23):3732-3738.
- [7] Zuo C, Wang Z, Lu H, et al. Expression profiling of lncRNAs in C3H10T1/2 mesenchymal stem cells undergoing early osteoblast differentiation[J]. Mol Med Rep, 2013, 8(2):463-467.
- [8] Wang L, Wang Y, Li Z, et al. Differential expression of long noncoding ribonucleic acids during osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Int Orthop, 2015, 39(5):1013-1019.
- [9] 罗嘉全, 黄路, 刘会文, 等. hMSC成骨分化相关 lncRNA的筛选和初步鉴定[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2014, 35(2):230-236.
- Luo JQ, Huang L, Liu HW, et al. Screening and primary identification of lncRNA involved in osteogenic differentiation of hMSC[J]. J Sun Yat-sen Univ (Med Sci), 2014, 35(2):230-236.
- [10] Qu Q, Fang F, Wu B, et al. Potential role of long non-coding RNA in osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells[J]. J Periodontol, 2016, 87(7):e127-e137.
- [11] Zhu L, Xu PC. Downregulated lncRNA-ANCR promotes osteoblast differentiation by targeting EZH2 and regulating Runx2 expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 432(4):612-617.
- [12] Zhuang W, Ge X, Yang S, et al. Upregulation of lncRNA MEG3 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients by targeting BMP4 transcription[J]. Stem Cells, 2015, 33(6):1985-1997.
- [13] Jia Q, Jiang W, Ni L. Down-regulated non-coding RNA (lncRNA-ANCR) promotes osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells[J]. Arch Oral Biol, 2015, 60(2):234-241.
- [14] Huang Y, Zheng Y, Jia L, et al. Long noncoding RNA H19 promotes osteoblast differentiation via TGF- $\beta$ 1/Smad3/HDAC signaling pathway by deriving miR-675[J]. Stem Cells, 2016, 33(12):3481-3492.
- [15] Liang WC, Fu WM, Wang YB, et al. H19 activates Wnt signaling and promotes osteoblast differentiation by functioning as a competing endogenous RNA [J]. Sci Rep, 2016, 6:20121.
- [16] Wang L, Wu F, Song Y, et al. Long noncoding RNA related to periodontitis interacts with miR-182 to upregulate osteogenic differentiation in periodontal mesenchymal stem cells of periodontitis patients [J]. Cell Death Dis, 2016, 7(8):e2327.
- [17] Wang L, Li Z, Li Z, et al. Long noncoding RNAs expression signatures in chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 456(1):459-464.
- [18] Liu Q, Zhang X, Dai L, et al. Long noncoding RNA related to cartilage injury promotes chondrocyte extracellular matrix degradation in osteoarthritis[J]. Arthritis Rheumatol, 2014, 66(4):969-978.
- [19] Steck E, Boeuf S, Gabler J, et al. Regulation of H19 and its encoded microRNA-675 in osteoarthritis and under anabolic and catabolic *in vitro* conditions[J]. J Mol Med, 2012, 90(10):1185-1195.
- [20] Kim D, Song J, Han J, et al. Two non-coding RNAs, MicroRNA-101 and HOTTIP contribute cartilage integrity by epigenetic and homeotic regulation of integrin- $\alpha$ 1[J]. Cell Signal, 2013, 25(12):2878-2887.
- [21] Xiao T, Liu L, Li H, et al. Long noncoding RNA ADINR regulates adipogenesis by transcriptionally activating C/EBP $\alpha$ [J]. Stem Cell Rep, 2015, 5(5):856-865.
- [22] Huang Y, Zheng Y, Jin C, et al. Long noncoding RNA H19 inhibits adipocyte differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells through epigenetic modulation of histone deacetylases[J]. Sci Rep, 2016, 6:28897.
- [23] Wu AM, Ni WF, Huang ZY, et al. Analysis of differentially expressed lncRNAs in differentiation of bone marrow stem cells into neural cells[J]. J Neurol Sci, 2015, 351(1/2):160-167.

(本文编辑 胡兴戎)