

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2026.03.002

✦基础医学研究✦

# 长链非编码 RNA AK146527 通过靶向 miR-15/16 调控骨形成的分子机制

禹欣池<sup>1</sup>, 于瑾舒<sup>1</sup>, 焦丽<sup>2</sup>, 梁骑<sup>1,3</sup>, 印崇<sup>1,3</sup>

(1. 川北医学院检验医学院转化医学研究中心, 四川 南充 637000; 2. 中国医学科学院医学生物学研究所, 云南 昆明 650000; 3. 川北医学院附属医院检验科, 四川 南充 637000)

**【摘要】目的:** 检测 AK146527 对成骨分化和骨形成的调控作用; 研究 AK146527 靶向 miR-15/16 促进骨形成的分子机制, 并探究 AK146527 功能区的原位促成骨作用。**方法:** 利用 RT-PCR 检测小鼠股骨组织中 AK146527 表达水平和骨形成标志因子的相关性; 在 MC3T3-E1 前成骨细胞中转染 AK146527 的过表达质粒和 siRNA 检测 AK146527 对成骨细胞分化的作用; 对转染 AK146527 后 MC3T3-E1 前成骨细胞中的成骨分化关键转录因子的活性进行了初步筛选, 检测 AK146527 对成骨分化调控的具体信号通路; 用 AK146527 的过表达质粒或 siRNA 转染 MC3T3-E1 细胞, 并检测转染后细胞中 miR-15/16 家族的水平, 研究其对 miR-15/16 家族的靶向调控作用; 在 MC3T3-E1 细胞和 C57BL/6 小鼠中转染了 AK146527 不同区域过表达质粒, 并检测转染后细胞成骨分化水平和小鼠骨形成水平, 证明 AK146527 与 miR-15/16 的结合序列可以调控成骨细胞分化和骨形成; 构建了去卵巢 OP 小鼠模型, 并在小鼠颅骨皮下局部转染了 AK146527 结合区过表达质粒, 研究 AK146527 结合区对 OP 的治疗效果; 最后, 通过类器官技术证明了 AK146527 结合区的原位促成骨效果。**结果:** (1) AK146527 表达水平与骨形成相关; (2) AK146527 可促进骨形成; (3) AK146527 对成骨分化的调控可能是基于 wnt 信号通路; (4) AK146527 可通过其结合区域结合 miR-15/16 家族, 从而起到抑制作用, 具有专一性; (5) AK146527 通过 miR-15/16 结合位点调控成骨分化; (6) AK146527 结合区具有原位促成骨作用, 在骨缺损修复中表现出良好的应用潜力。**结论:** AK146527 与骨形成高度相关, 并可通过靶向 miR-15/16 促进成骨分化和骨形成。其与 miR-15/16 结合区可以对去卵巢骨质疏松小鼠的骨形成有恢复效果。此外 AK146527 功能区在颅骨缺损小鼠植入类器官后具有原位促成骨和原位骨修复的效果。本研究对骨形成的机制研究提供了新的理论和实验基础, 并为提高骨形成相关 LncRNA 的调控效率提供了新策略。

**【关键词】** 长链非编码 RNA; 成骨细胞分化; miRNA; 骨形成

**【中图分类号】** R684.3 **【文献标志码】** A

## Molecular mechanism of long non coding RNA AK146527 regulating bone formation by targeting miR-15/16

YU Xin-chi<sup>1</sup>, YU Jin-shu<sup>1</sup>, JIAO Li<sup>2</sup>, LIANG Qi<sup>1,3</sup>, YIN Chong<sup>1,3</sup>

(1. Translational Medicine Research Center of the School of Laboratory Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan; 2. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming 650000, Yunnan; 3. Department of Laboratory, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

**【Abstract】Objective:** To investigate the regulatory role of AK146527 in osteogenic differentiation and bone formation, explore the molecular mechanism by which AK146527 promotes bone formation through targeting miR-15/16, and assess the in situ osteogenic effect of the functional region of AK146527. **Methods:** RT-PCR was performed to detect the expression levels of AK146527 in mouse femoral tissues, and the correlation between AK146527 expression and bone formation markers was analyzed. MC3T3-E1 pre-osteoblasts were transfected with AK146527 overexpression plasmids or siRNA to evaluate the effect of AK146527 on osteoblast differentiation. The activity of key transcription factors involved in osteogenic differentiation was preliminarily screened in MC3T3-E1 cells after AK146527 transfection to explore the specific signaling pathways through which AK146527 regulates osteogenic differentiation. MC3T3-E1 cells were transfected with AK146527 overexpression plasmids or siRNA, and the levels of miR-15/16 family members were measured to investigate the targeted regulation of the miR-15/16 family by AK146527. MC3T3-E1 cells and C57BL/6 mice were transfected with overexpression plasmids targeting different

**基金项目:** 国家自然科学基金(82101640); 四川省自然科学基金项目(23NSFSC6012); 四川省卫健委项目(21PJ101)

**作者简介:** 禹欣池(1999-), 男, 硕士研究生。E-mail: 654101098@qq.com

**通讯作者:** 印崇。E-mail: yinchong42@nsmc.edu.cn

regions of AK146527, and osteogenic differentiation levels in cells and bone formation levels in mice were assessed to confirm that the binding sequence of AK146527 with miR-15/16 regulates osteoblast differentiation and bone formation. An ovariectomized (OP) mouse model was established, and overexpression plasmids containing the AK146527 binding region were locally transfected into the subcutis of the mouse skull to evaluate the therapeutic effect of the AK146527 binding region on OP. Finally, the in situ osteogenic effect of the AK146527 binding region was validated using organoid technology. **Results:** The expression level of AK146527 was correlated with bone formation. AK146527 promoted bone formation. The regulatory effect of AK146527 on osteogenic differentiation may involve the Wnt signaling pathway. AK146527 specifically bound to and inhibited the miR-15/16 family through its binding region. AK146527 regulated osteogenic differentiation via the miR-15/16 binding site. The binding region of AK146527 exhibited in situ osteogenic effects and demonstrated promising potential for application in bone defect repair. **Conclusion:** AK146527 is highly correlated with bone formation and promotes osteogenic differentiation and bone formation by targeting miR-15/16. Its binding region with miR-15/16 can restore bone formation in ovariectomized osteoporotic mice. Additionally, the functional region of AK146527 exhibits in situ osteogenic and bone repair effects after implantation into organoids in a mouse skull defect model. This study provides a novel theoretical and experimental foundation for understanding the mechanisms of bone formation and offers a new strategy to enhance the regulatory efficiency of bone formation-related LncRNAs.

**【Key words】** Long non-coding RNA; Osteoblast differentiation; miRNA; Bone formation

骨质疏松 (osteoporosis, OP) 是一种十分常见的代谢性骨病, 临床表现为骨脆性增加及易发生骨折<sup>[1]</sup>。随着社会老龄化加剧, OP 已成为人类健康的潜在威胁<sup>[2-3]</sup>。长链非编码 RNA (Long non-coding RNA, LncRNA) 是一种 200 碱基以上的非编码 RNA<sup>[4]</sup>, 对 OP 的发生起重要调控作用<sup>[5-8]</sup>。然而, 当前大部分骨形成相关 LncRNA 的研究几乎都是一条 LncRNA 通过靶向单个 miRNA 或单个蛋白进而影响骨形成, 存在调控精度差、调控效率低的问题<sup>[9-11]</sup>。因此, 找到一条通过多个因子调控骨形成的 LncRNA, 对于 LncRNA 转化医学应用和 OP 的分子机制研究具有重要意义。

在前期研究<sup>[12-13]</sup>中, 课题组发现 LncRNA AK146527 序列上有多个可能结合 miR-15/16 家族的结合位点, 而 miR-15/16 家族则是抑制骨形成的关键 miRNA。因此, 课题组推测 AK146527 可能是潜在的骨形成高效调控因子, 通过靶向 miR-15/16 家族促进骨形成。本研究通过体内外实验检测了 AK146527 对成骨分化和骨形成的调控作用, 并深入研究了 AK146527 靶向 miR-15/16 促进骨形成的分子机制, 采用类器官技术研究了 AK146527 功能区的原位促成骨作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

1.1.1 细胞和动物来源 前成骨细胞系 MC3T3-E1 购自陕西润德生物科技有限公司, C57BL/6 小鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司。

1.1.2 主要试剂及来源 RNA 反转录试剂盒及荧光定量 PCR 试剂 (SYBR<sup>®</sup> Premix Ex TaqTM II) 均购自 Takara 公司; BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显

色试剂盒购自碧云天公司; 茜素红、钙黄绿素购自 sigma 公司; OCT 购自 Leica 公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 成骨细胞的培养 小鼠前成骨细胞系 MC3T3-E1 细胞由完全培养基 ( $\alpha$ -MEM 溶液, 添加 10% 胎牛血清、10 mmol/L L-谷氨酰胺、100  $\mu$ g/mL 青霉素、100  $\mu$ g/mL 硫酸链霉素) 培养。细胞培养条件为 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>。

1.2.2 成骨细胞分化诱导及检测 将 MC3T3-E1 前成骨细胞使用成骨分化培养基 (完全培养基添加 0.005% 维生素 C、10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠) 诱导分化, 培养 3 d 后使用碱性磷酸酶染色检测细胞 ALP 活性, 采用 real time PCR 检测细胞成骨分化相关基因表达水平; 培养 18 d 后使用茜素红染色检测细胞矿化结节生成速率。

1.2.3 成骨细胞转染 将 AK146527 全长序列 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AK146527>) 和 miR-15/16 结合区/非结合区分别插入到 pCDNA3.1 质粒, 使用 Engreen Entranster<sup>TM</sup> H4000 转染试剂转染至 MC3T3-E1 前成骨细胞。构建 miR-15a-5p、miR-15b-5p、miR-16-5p 的 mimic/inhibitor 和 AK146527 的 siRNA, 采用 lipofectamine 2000 转染试剂转染至 MC3T3-E1 前成骨细胞<sup>[5]</sup>。

1.2.4 报告基因检测 为检测 AK146527 对不同成骨分化相关转录因子活性的调控作用, 将不同转录因子的 motif 序列插入到 PNL 1.3 报告基因质粒中, 并与 AK146527 共转染 MC3T3-E1 细胞, 培养 72 h 后, 采用 Promega Nano-Luc 荧光素酶报告基因检测试剂盒 (N1110), 通过多功能酶标仪检测

各转录因子活性。为检测 AK146527 与 miR-15a-5p、miR-15b-5p、miR-16-5p 的结合作用,将两者的结合位点序列插入 pMIR-Reporter 报告基因质粒,并插入突变的结合位点序列作为阴性对照质粒。将报告基因质粒与 miR-15a-5p、miR-15b-5p、miR-16-5p 的 mimic/inhibitor 共转染 MC3T3-E1 前成骨细胞,采用 Promega 双荧光素酶报告基因检测试剂盒(E1 910)检测 AK146527 与 miR-15a-5p、miR-15b-5p、miR-16-5p 的结合作用。

**1.2.5 去卵巢 OP 小鼠模型的构建** 选取 2 月龄 C57BL/6 小鼠随机分为 OVX 对照(Sham)组、去卵巢(ovx)组、转染试剂(mock)组、空白载体(vec)组和 AK146527 结合位点(bind)组。小鼠经戊巴比妥钠麻醉后,酒精消毒并剃去背部毛发,在脊肋角沿正中腰部作一 0.8 cm 切口。钝性分离打开腹腔,找到并切除卵巢,缝合切口后用碘伏消毒。术后第 34 天取样。动物实验全部流程均经过川北医学院实验动物管理委员会批准(024,2023)。

**1.2.6 小鼠骨形成水平检测** 分别在小鼠处死前 10 d 和 3 d,按照 20 mg/kg 腹腔注射钙黄绿素。处死小鼠后取颅骨前部,经 4%多聚甲醛溶液固定后,使用 OCT 包埋并用冰冻切片机切成 4  $\mu\text{m}$  厚度的切片。采用荧光显微镜拍照并使用 Image J 软件对两条骨形成线之间的距离进行测量,分析小鼠颅骨矿物沉积速率。

**1.2.7 类器官培养与鉴定** 分别对 MC3T3-E1 细胞转染空白 pCDNA3.1 质粒和插入 AK146527 与 miR-15/16 家族结合区的 pCDNA3.1 质粒,将转染 48 h 后的细胞悬液加入 HAMA 粉末中并均匀混合,通过光交联方法形成水凝胶结,进而加入新型仿生骨支架制备为类器官。随后,将构建的类器官在微流控系统中进行动态三维培养,以模拟体内微环境;采用凯基生物公司的活细胞/死细胞双染色法检测类器官中的细胞活性。

**1.2.8 颅骨骨缺损模型小鼠的构建和治疗** 选取 16 只 2 月龄雄性 C57BL/6 小鼠( $25.0 \pm 0.5$ )g 用于建立颅骨骨缺损模型。小鼠经麻醉后,使用牙科钻头在小鼠颅骨表面钻出直径为 1.2 mm 的缺损孔。将类器官植入小鼠颅骨缺损部位。术后 3 周,采用 CO<sub>2</sub> 窒息法处死小鼠,采集颅骨样本,检测颅骨骨缺损部位附件骨形成水平,采用显微 CT 技术检测骨缺损位置的骨显微结构,评估核酸药物的治疗效果。动物实验全部流程均经过川北医学院实验动物管理委员会批准(078,2023)。

### 1.3 统计学分析

使用 Prism9.4 软件及 SPSS26.0 软件对数据进行分析。计量资料均采用( $\bar{x} \pm s$ )形式描述,分析前对数据进行正态性检验与方差齐性检验,若数据服从正态分布且方差齐,则采用独立样本 *t* 检验;若数据服从正态分布但方差不齐,则采用校正 *t* 检验(Welch 法);若数据不服从正态分布,则采用非参数 Mann-Whitney *U* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 AK146527 表达水平与骨形成相关

为了研究 AK146527 表达水平与小鼠 OP 的关系,分别对 6 月龄和 18 月龄 C57BL/6 小鼠股骨组织中的不同 LncRNA 表达水平进行 RT-PCR 检测。结果表明,在众多 LncRNA 中,18 月龄 C57BL/6 小鼠股骨组织中 AK146527 表达水平低于 6 月龄小鼠( $P < 0.001$ )。见图 1A。

为检测 AK146527 表达水平和骨形成标志因子的相关性,在不同年龄的小鼠股骨原代 BMSC 中,检测了 AK146527 和骨形成标志因子 Alp 和 Ocn 的表达水平,并进行相关性分析。结果表明,在不同年龄的小鼠原代 BMSC 中,AK146527 和 Alp/Ocn 的表达水平呈正相关( $P < 0.05$ )。见图 1B-C。

### 2.2 AK146527 对成骨细胞分化和骨形成的影响

为了研究 AK146527 对成骨细胞分化的影响,在 MC3T3-E1 前成骨细胞中成功转染了 AK146527 的过表达质粒和 siRNA(图 2A-B),采用碱性磷酸酶染色和茜素红染色分别检测细胞的碱性磷酸酶活性和矿化结节生成速率,并使用 Real-time PCR 技术检测成骨分化标志基因 Alp 和 Runx2 表达水平。结果表明:在转染 AK146527 过表达质粒后,MC3T3-E1 前成骨细胞系的碱性磷酸酶活性和矿化结节生成速率相比空白载体组升高( $P < 0.05$ ),成骨分化标志基因 Alp 和 Runx2 表达水平亦升高( $P < 0.05$ ),而转染 si-AK146527 则会降低成骨细胞分化水平( $P < 0.05$ )(图 2E-H)。

为了研究 AK146527 对骨形成的影响,在小鼠颅骨皮下局部转染 AK146527 的过表达质粒和 siRNA(图 2C-D),检测了小鼠。结果表明,AK146527 可以促进小鼠的颅骨骨形成速率( $P < 0.05$ ),而 si-AK146527 则会降低小鼠骨形成速率( $P < 0.05$ )(图 2I-J)。

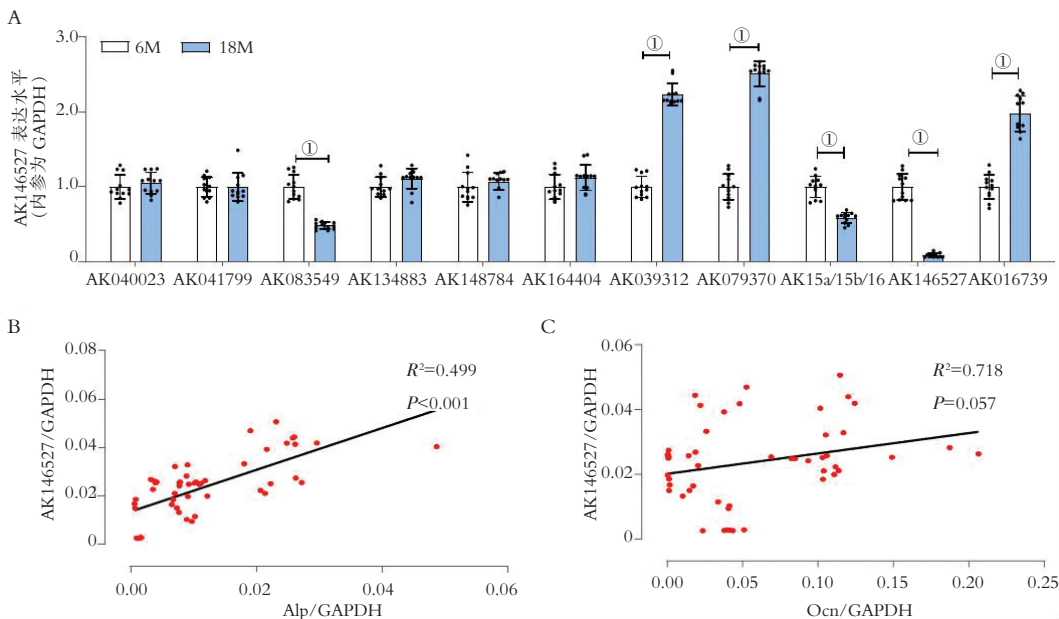


图 1 AK146527 表达水平与骨形成的相关性

A. AK146527 在老龄 OP 小鼠骨组织中的表达水平; B-C. AK146527 在不同年龄小鼠股骨原代 BMSC 中与 Alp 和 Ocn 的表达水平相关性。① $P<0.001$ 。

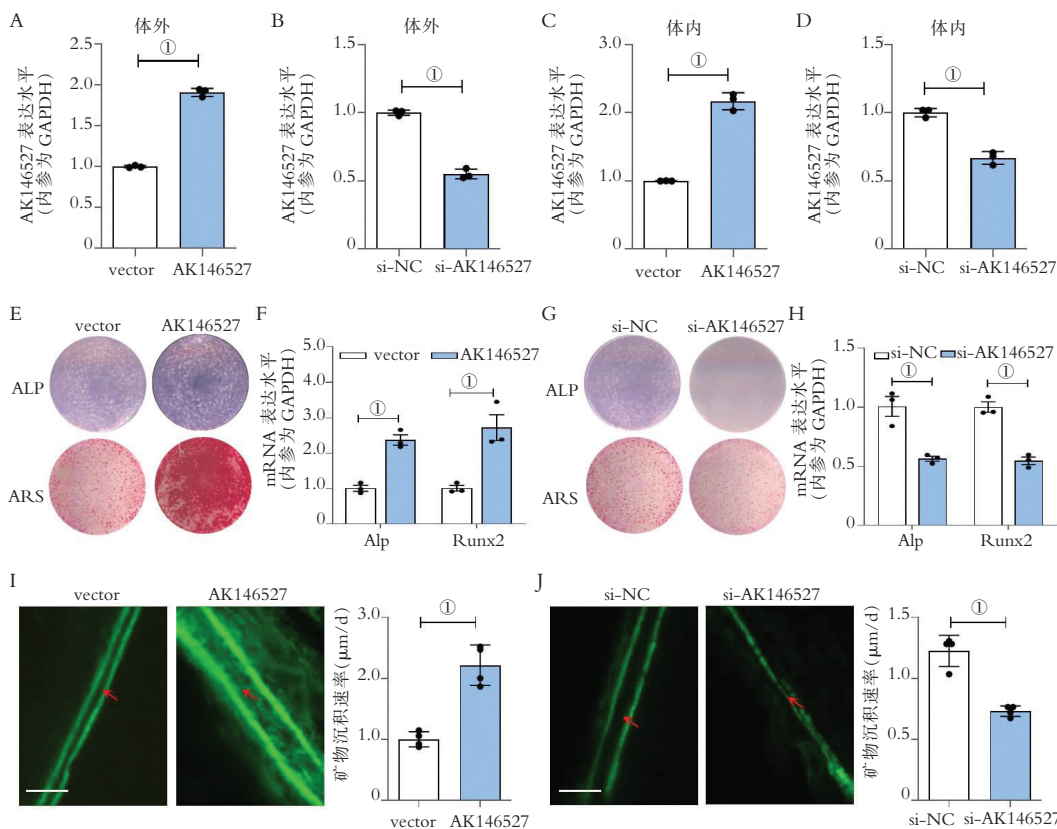


图 2 AK146527 对成骨细胞分化和骨形成的影响

A-D. AK146527 过表达质粒和 siRNA 在体外和体内对 AK146527 表达水平的影响; E-H. MC3T3-E1 前成骨细胞在转染 AK146527 的过表达质粒或 siRNA 后的 Alp 和 Runx2 基因表达水平, 以及 ALP 和茜素红染色结果; I-J. 转染 AK146527 过表达质粒或 siRNA 后的 C57BL/6 小鼠的颅骨矿化沉积速率。vector: 空白质粒组; AK146527: AK146527 过表达质粒组; si-NC: siRNA-NC 组; si-AK146527: AK146527-siRNA 组; ALP: Alp 染色结果; ARS: 茜素红染色结果。标尺为 10  $\mu\text{m}$ 。① $P<0.001$ 。

### 2.3 AK146527 对成骨分化相关信号通路的影响

为了研究 AK146527 对成骨细胞分化的作用机制,对转染 AK146527 后 MC3T3-E1 前成骨细胞中的成骨分化关键转录因子 CEBP、CLi1、HES1、HIF1、SMAD4、PPAR、SMAD2 和 TCF7 的活性进行了初步筛选。结果表明,转染 AK146527 后,

TCF7 和 LEF1 活性升高 ( $P < 0.05$ ),且与 AK146527 对成骨分化的促进作用一致(图 3A-H)。进一步研究表明,在不同年龄小鼠的原代 BMSC 中,Tcf7 和 Lef1 的表达水平和 AK146527 呈正相关( $P < 0.05$ )(图 3I-J)。

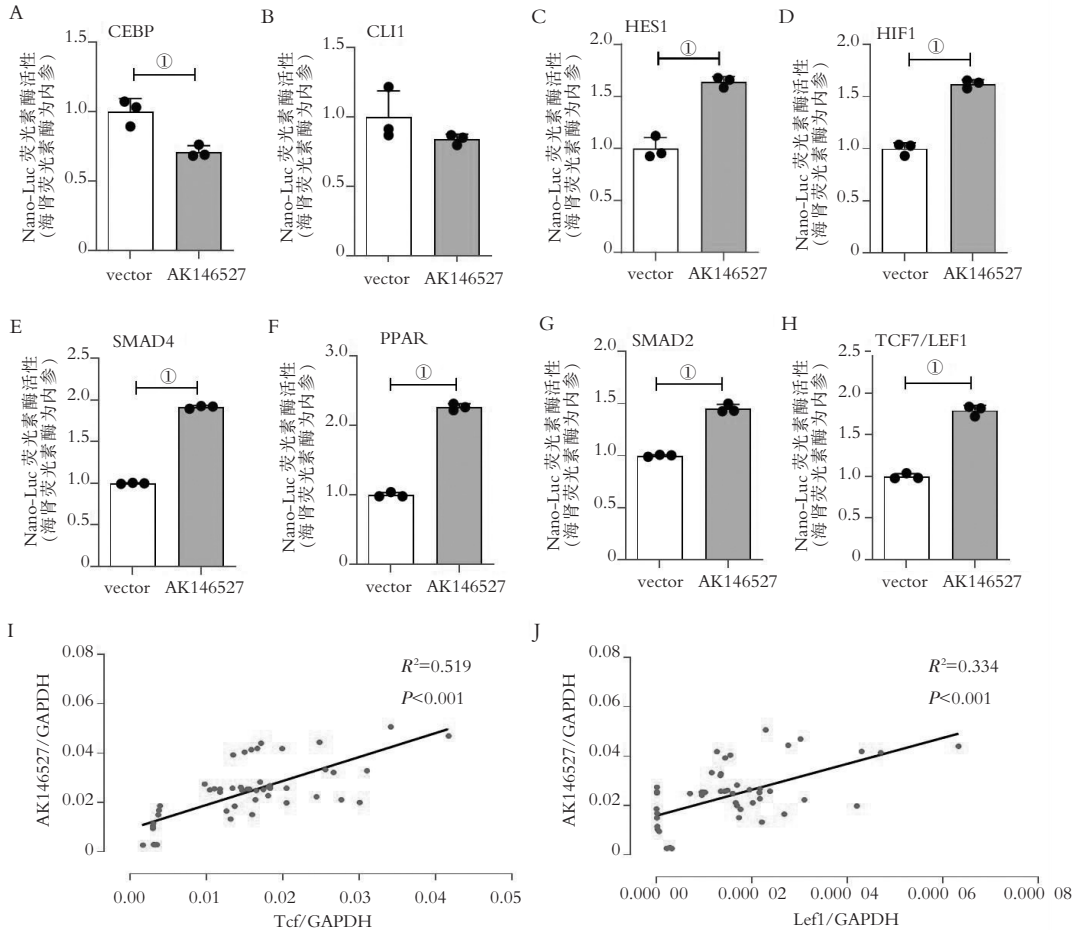


图3 AK146527对成骨分化相关信号通路的调控作用

A-H. 过表达 AK146527 对成骨分化相关转录因子 CEBP、CLi1、HES1、HIF1、SMAD4、PPAR、SMAD2 和 TCF7 活性的影响;I-J. AK146527 在不同年龄小鼠股骨原代 BMSC 中与 Tcf7 和 Lef1 的表达水平相关性。vector: 空白质粒组, AK146527: AK146527 过表达质粒组。①  $P < 0.01$ 。

### 2.4 AK146527 对 miR-15/16 家族的靶向调控作用

通过结构分析和 RNA22 v2 预测发现, AK146527 序列上有多个 miR-15/16 家族的结合位点(图 4A)。miR-15/16 家族主要包括 miR-15a-5p、miR-15b-5p、miR-16-5p,是可以靶向 wnt 信号通路的 miRNA 家族<sup>[12-13]</sup>。在阐明 AK146527 可以促进 wnt 的基础上,课题组进一步研究了 AK146527 对 miR-15/16 家族的调控作用。

为检测 AK146527 对 miR-15a-5p 的调控作用。分别用 AK146527 的过表达质粒或 siRNA 转染 MC3T3-E1 细胞,并检测转染后细胞中 miR-15a-5p 的水平。结果表明,过表达 AK146527 可以促进 miR-15a-5p 的水平,而敲低 AK146527 则可以抑制 miR-15a-5p 水平 ( $P < 0.05$ ) (图 4B-C)。根据

AK146527 的序列结构,课题组分别构建了包含 AK146527 与 miR-15/16 家族结合区和非结合区的过表达质粒,并将这两种质粒分别和 AK146527 全长质粒一起分别转染 MC3T3-E1 前成骨细胞,并检测转染后细胞中 miR-15a-5p 水平。结果发现,包含 AK146527 与 miR-15/16 家族结合区的质粒,在转染后可以使 miR-15a-5p 水平降低 ( $P < 0.05$ );而包含 AK146527 与 miR-15/16 家族非结合区的质粒,却不能改变 miR-15a-5p 水平(图 4D)。

为了确定 AK146527 与 miR-15a-5p 的结合关系,课题组在 pMIR-Reporter 荧光素酶报告基因质粒上的 Luciferase 片段下游 3'-UTR 区插入了 AK146527 与 miR-15/16 家族结合区(luc-WT),使用荧光素酶报告基因检测技术检测了 AK146527 与

miR-15a-5p 的结合关系。结果显示, 当在 MC3T3-E1 中共转染 luc-WT 和 agomiR-15a-5p 时, 细胞的荧光素酶活性降低 ( $P < 0.05$ ) (图 4E), 从而证明了 miR-15a-5p 与 AK146527 的结合作用。为了进一步证明 AK146527 与 miR-15a-5p 的结合关系, 在 pMIR-Reporter 质粒分别插入了 AK146527 与 miR-15/16 家族结合序列、非结合序列及 AK146527 全长序列。荧光素酶报告结果表明, 当在 MC3T3-E1 细胞中将 AK146527 结合序列或全长序列与 agomiR-15a-5p 共转染时, 细胞的荧光素酶活性降低 ( $P < 0.05$ ); 将 AK146527 结合序列或全长序列与 antagomiR-15a-5p 共转染时, 细胞的荧光素酶活性升高 ( $P < 0.05$ ) (图 4F-G)。同时, 对 miR-15b-5p 和 miR-16-5p 的实验也证实了同样的结果 (图 5)。

课题组还检测 AK146527 对其他骨形成相关 miRNA 的调控作用。通过 RNA22 v2 预测, 发现 AK146527 还可以结合另外两条骨形成相关 miRNA: miR-705 和 miR-542-3p, 且结合位点均在 AK146527 与 miR-15/16 家族结合位点附近。分别用 AK146527 的过表达质粒或 siRNA 转染 MC3T3-E1 细胞, 检测转染后细胞中 miR-705 和 miR-542-3p 的水平。结果表明, 过表达和敲低

AK146527 均对 miR-705 和 miR-542-3p 水平无明显影响 ( $P > 0.05$ ) (图 6)。

## 2.5 AK146527 通过 miR-15/16 家族调控成骨分化和骨形成

为证明 AK146527 与 miR-15/16 的结合序列可以调控成骨细胞分化和骨形成, 课题组在 MC3T3-E1 细胞和 C57BL/6 小鼠中转染了 AK146527 不同区域过表达质粒, 并检测转染后成骨细胞分化水平和小鼠骨形成水平。结果表明, AK146527 与 miR-15/16 的结合序列和 AK146527 全长序列一样, 具有促进成骨细胞分化和骨形成的功能 ( $P < 0.05$ ), 而非结合区和突变的结合序列则对成骨分化和骨形成无调控作用 ( $P > 0.05$ ) (图 7)。

为证明 AK146527 通过结合 miR-15/16 调控成骨细胞分化和骨形成, 对 MC3T3-E1 细胞敲低 miR-15/16 家族, 并转染 AK146527-miR-15/16 结合区。Real-time PCR 和报告基因检测表明, 当 miR-15/16 被抑制后, AK146527-miR-15/16 结合区对 Alp、Runx2、GSK3 $\beta$  水平和 TCF7 活性都没有影响 ( $P > 0.05$ ) (图 8)。说明 AK146527 通过 miR-15/16 结合位点调控成骨分化, AK146527-miR-15/16 的结合区可能是其功能区。

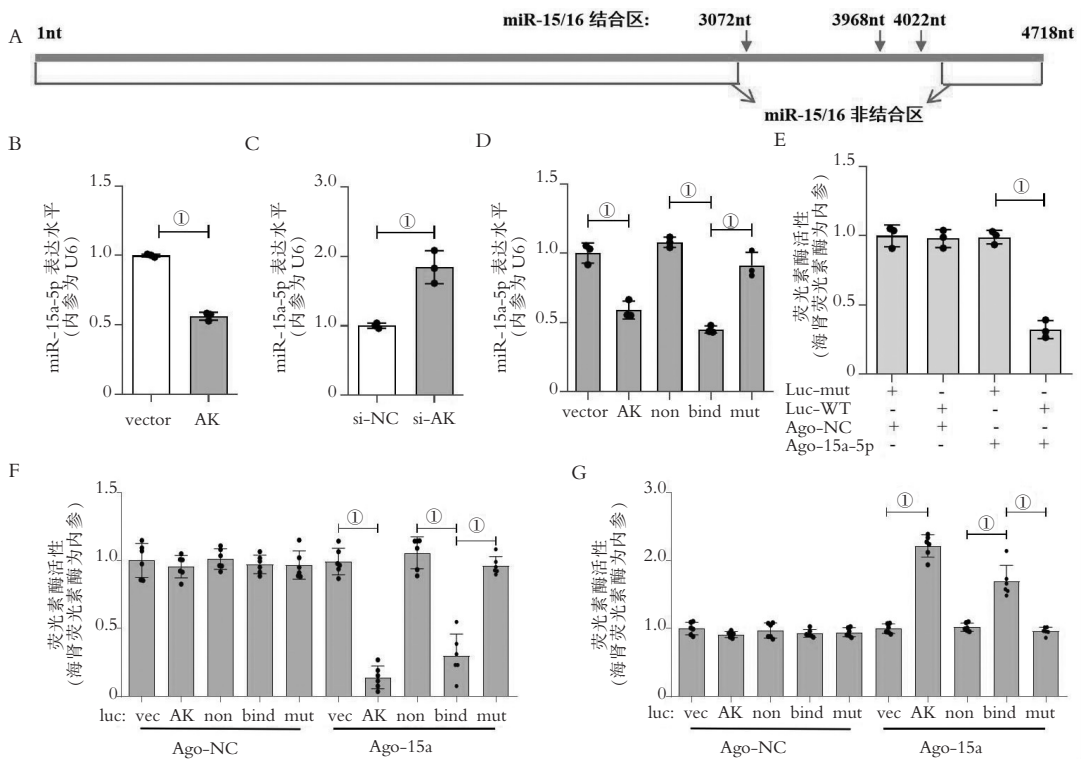


图 4 AK146527 对 miR-15a-5p 的调控作用

A. AK146527 的结构; B-C. MC3T3-E1 前成骨细胞在转染 AK146527 的过表达质粒和 siRNA 后的 miR-15a-5p 表达水平; D. MC3T3-E1 前成骨细胞在转染 AK146527 的不同区域序列后的 miR-15a-5p 表达水平; E-G. 报告基因检测 AK146527 与 miR-15a-5p 的结合作用。vector: 空白质粒组; AK146527: AK146527 过表达质粒组; si-NC: siRNA-NC 组; si-AK146527: siRNA-AK146527 组; non: AK146527 与 miR-15a-5p 非结合区组; bind: AK146527 与 miR-15a-5p 结合区组; mut: 突变的 AK146527 与 miR-15a-5p 结合区组。①  $P < 0.01$ 。

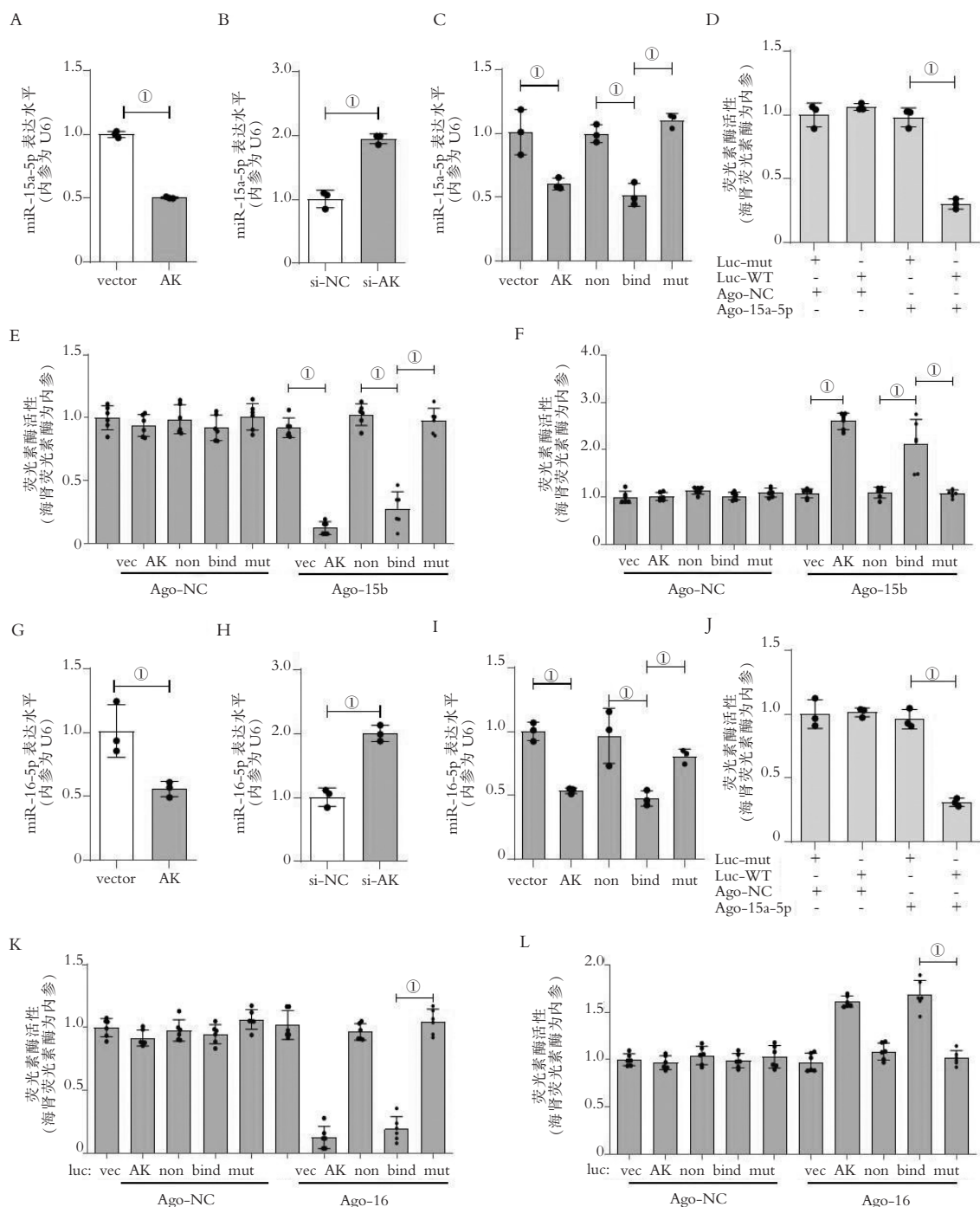


图5 AK146527对miR-15b-5p和miR-16-5p的调控作用

A-B. MC3T3-E1前成骨细胞在转染AK146527的过表达质粒和siRNA后的miR-15b-5p表达水平;C. MC3T3-E1前成骨细胞在转染AK146527的不同区域序列后的miR-15b-5p表达水平;D-F. 报告基因检测AK146527与miR-15b-5p的结合作用。G-H MC3T3-E1前成骨细胞在转染AK146527的过表达质粒和siRNA后的miR-16-5p表达水平;I. MC3T3-E1前成骨细胞在转染AK146527的不同区域序列后的miR-16-5p表达水平;j-L. 报告基因检测AK146527与miR-16-5p的结合作用;vector: 空白质粒组;AK146527: AK146527过表达质粒组;si-NC: siRNA-NC组;si-AK146527: siRNA-AK146527组;non: AK146527与miR-15b-5p/miR-16-5p非结合区组;bind: AK146527与miR-15b-5p/miR-16-5p结合区组;mut: 突变的AK146527与miR-15b-5p/miR-16-5p结合区组。① $P < 0.001$ 。

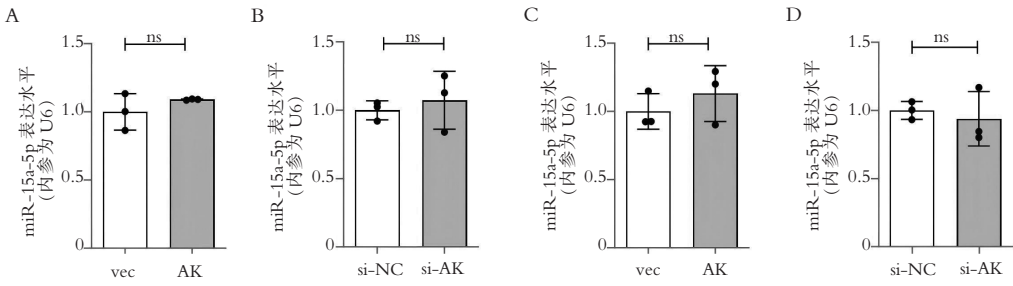


图 6 AK146527 对 miR-705 和 miR-542-3p 的调控作用

A-B. AK146527 的过表达质粒和 siRNA 转染 MC3T3-E1 细胞后 miR-705 的表达水平;C-D. AK146527 的过表达质粒和 siRNA 转染 MC3T3-E1 细胞后 miR-542-3p 的表达水平。vector: 空白质粒组;AK146527:AK146527 过表达质粒组;si-NC: siRNA-NC 组;si-AK: siRNA-AK146527 组。ns $P>0.05$ 。

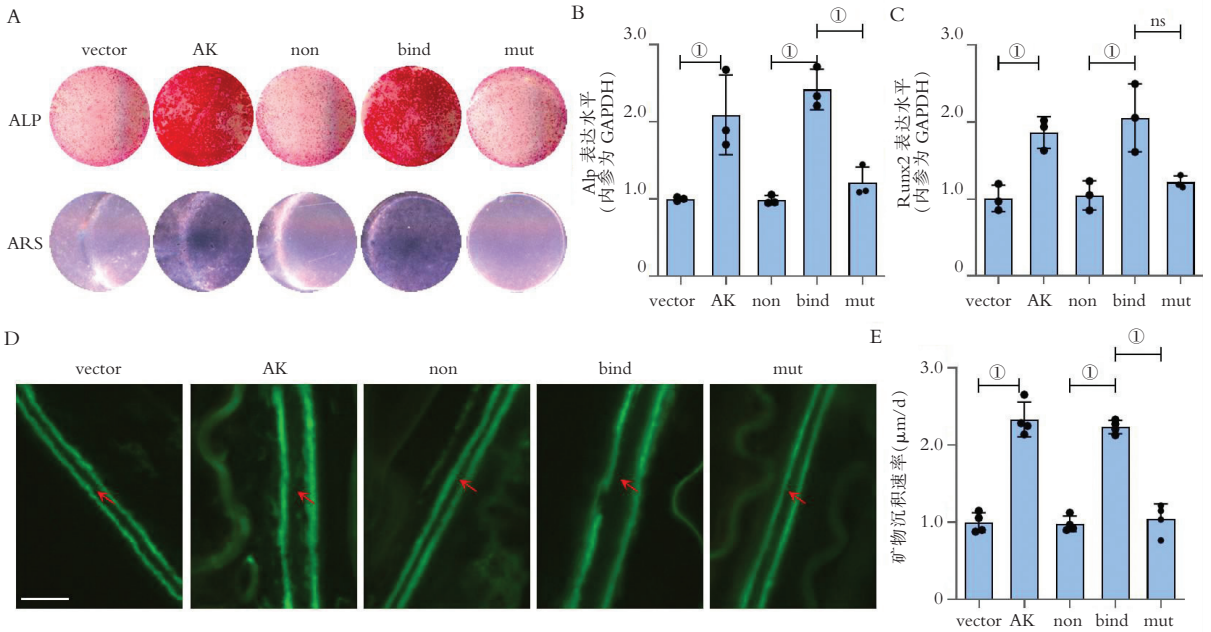


图 7 AK146527 结合区对成骨细胞分化和骨形成的调控作用

A-C. MC3T3-E1 前成骨细胞在转染 AK146527 的不同区域序列后的成骨分化水平;D-E. C57BL/6 小鼠颅骨皮下在转染 AK146527 的不同区域序列后的颅骨矿物沉积速率。vector: 空白质粒组,AK146527:AK146527 过表达质粒组,non: AK146527 与 miR-15a-5p 非结合区组,bind: AK146527 与 miR-15a-5p 结合区组,mut: 突变的 AK146527 与 miR-15a-5p 结合区组。标尺为 10  $\mu\text{m}$ 。ns $P>0.05$ ;① $P<0.05$ 。

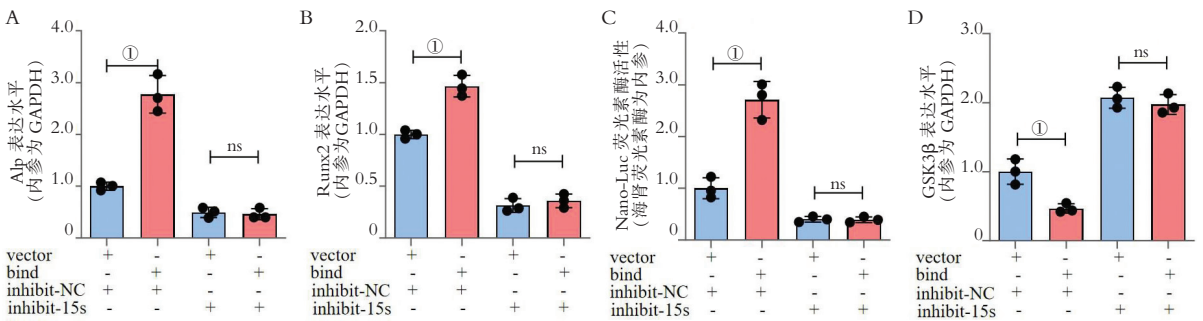


图 8 AK146527 结合区对 miR-15/16 家族低表达成骨细胞分化的调控作用

A-B,D. miR-15/16 家族低表达 MC3T3-E1 前成骨细胞在转染 AK146527-miR-15/16 结合区后的 AlP、Runx2、GSK3 $\beta$  表达水平; C. 转染后细胞的 TCF7 活性;vector: 空白质粒组;bind: AK146527-miR-15/16 结合区组。ns $P>0.05$ ;① $P<0.01$ 。

## 2.6 AK146527 结合区对去卵巢 OP 小鼠骨形成的治疗效果

为了进一步研究 AK146527 结合区对 OP 的治

疗效果,课题组构建了去卵巢 OP 小鼠模型,并在小鼠颅骨皮下局部转染了 AK146527 结合区过表达质粒。采用钙黄绿素标记技术检测小鼠颅骨矿物沉积

速率。结果发现,去卵巢手术降低小鼠的颅骨矿物沉积速率( $P < 0.05$ ),而转染了 AK146527 结合区

的去卵巢小鼠,颅骨矿物沉积速率则被升高( $P < 0.05$ )。见图 9。

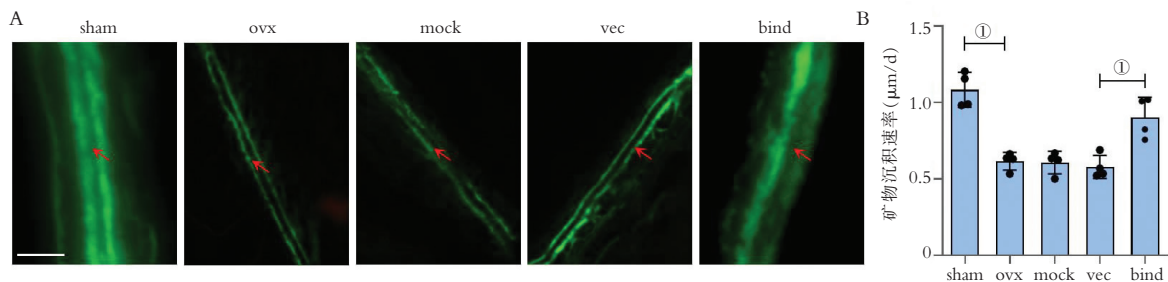


图9 AK146527 结合区对去卵巢 OP 小鼠颅骨矿物沉积速率的恢复效果。

sham: 对照组;ovx: 去卵巢组;mock: 转染试剂组;vec: 空白载体组;bind: AK146527 结合组。① $P < 0.01$ 。

### 2.7 AK146527 结合区的原位促成骨效果

课题组进一步通过类器官技术证明了 AK146527 结合区的原位促成骨效果。课题组将转染了 AK146527 结合区的 MC3T3-E1 细胞和 HA-MA 混合在一起,通过光交联方法制备水凝胶,并和课题组先前研发的新型仿生骨支架材料结合,构建骨组织类器官。将构建的类器官进行体外培养,使用活/死细胞染色法对类器官进行染色鉴定类器官中细胞活性。结果显示,培养 48 h 后,类器官中的 MC3T3-E1 细胞仍具有高活性(图 10A)。构建小鼠

颅骨骨缺损模型,将类器官植入小鼠颅骨缺损部位,评估其原位骨形成和骨修复效果。小鼠颅骨骨矿物沉积速率分析表明,AK146527 结合区组的骨矿物沉积速率高于对照组( $P < 0.05$ )(图 10B-C)。显微 CT 成像结果显示,AK146527 结合区组的骨密度(BMD)、骨体积分数(BV/TV)、骨总量(BMC)均增加( $P < 0.05$ )(图 10D-G)。进一步表明 AK146527 结合区在类器官中具有较强的促进原位骨组织再生的能力。

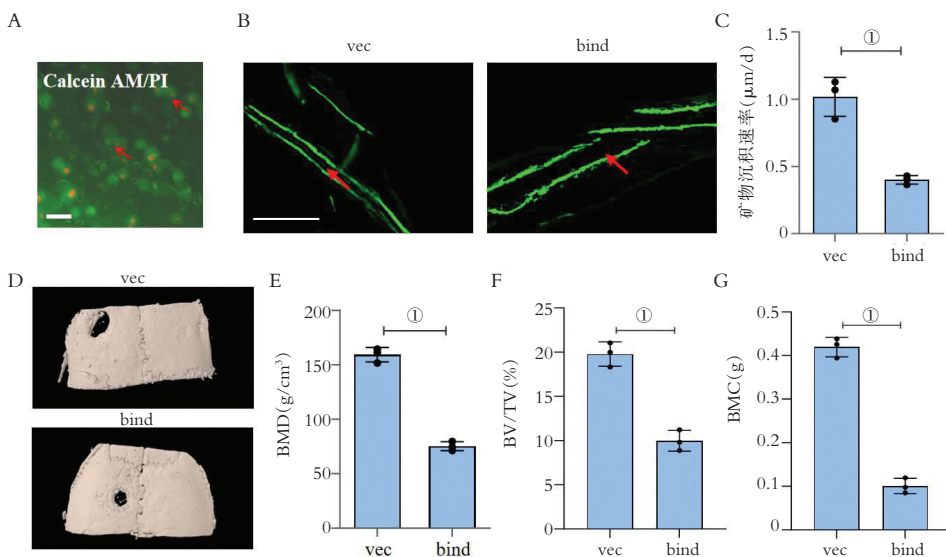


图10 AK146527 结合区在类器官中的原位促成骨效果

A. 细胞活/死细胞染色结果;B-C. 类器官植入位置附件的骨矿物沉积速率;D-G. 通过显微 CT 检测的骨显微结构。vector: 空白质粒组;bind: AK146527-miR-15/16 结合区组。标尺为 20 µm,① $P < 0.01$ 。

## 3 讨论

OP 是一种十分常见的骨骼系统疾病,其症状具体表现为骨量减少,骨组织微结构破坏,骨骼强度降低,并且会提高骨折的发生率<sup>[1]</sup>。OP 常见于老年人和绝经后妇女,随着人口老龄化越来越严重,

OP 将成为老年人健康的重大威胁<sup>[2-3]</sup>。诱发 OP 的因素很多,如遗传、激素失衡、营养不良、外界环境等<sup>[14-17]</sup>,而由老龄和绝经后激素失衡所造成的成骨细胞分化水平降低,进而导致骨形成-骨吸收失衡,是导致 OP 的重要原因之一。

成骨细胞分化受到多种因素的影响,包括物理、

化学、生物因素等等。其中, LncRNA 是一类有重要调控作用的非编码 RNA。研究<sup>[18-20]</sup>发现, 多条 LncRNA 可以通过结合 miRNA, 影响成骨细胞分化和骨形成。然而, 当前发现的大部分骨形成相关 LncRNA 都有调控精度差和调控效率低的问题, 其主要原因是大部分 LncRNA 仅通过单一结合区来靶向调控 miRNA 或目的蛋白, 而结合区以外的序列则很可能具有其他功能。在课题组前期研究中, 发现了一条具有特殊结构的 LncRNA, 即 Lnc-DIF, 其拥有一个特殊的重复序列, 可以通过多个靶点同时结合多个 miR-489-3p, 从而极大提高了调控的效率和精准度<sup>[5]</sup>。课题组进一步研究<sup>[12-13]</sup>发现, 另一条长链非编码 RNA—AK146527 序列上有多个 miR-15/16 家族的结合位点, 而 miR-15/16 家族可以靶向成骨分化最关键信号通路—wnt 信号通路, 进而抑制骨形成。这提示 AK146527 可能也是另一条可以高效精确调控骨形成的 LncRNA, 利用 AK146527 与 miR-15/16 家族的结合区域, 可能会对 OP 起到治疗效果。

在先前的研究<sup>[5]</sup>中, 课题组按照 Lnc-DIF 与 miR-489-3p 的结合作用将其分为结合区和非结合区, 并且证明了 Lnc-DIF 通过其 miR-489-3p 结合区调控成骨分化。在本研究中, 课题组同样对 AK146527 划分为 miR-15/16 结合区和非结合区。体内外研究均表明, AK146527 与 miR-15/16 的结合区可以靶向 miR-15a-5p、miR-15b-5p 和 miR-16-5p, 并促进成骨分化和骨形成, 而非结合区和突变的结合区则没有靶向 miR-15/16 的作用, 亦没有调控成骨分化的功能。由此可以推测, AK146527 是通过其序列上的结合区来结合 miR-15/16, 促进成骨分化和骨形成。

AK146527 与 miR-15/16 家族的结合区域经预测还可以结合另外两条骨形成 miRNA: miR-705 和 miR-542-3p, 前者可以靶向 HOXA10 和 FoxO1 抑制 MSC 增殖与分化<sup>[21]</sup>, 后者通过靶向 BMP7 一种骨形成<sup>[22]</sup>。本研究证明了 AK146527 不影响 miR-705 和 miR-542-3p 水平, 该结果与 Lnc-DIF 的研究<sup>[5]</sup>类似。这表明, 类似 Lnc-DIF 和 AK146527 这样的 LncRNA 可能对目标 miRNA 的调控作用具有一定的专一性, 但其具体原因尚有待阐明。

本研究还发现, 在降低 miR-15/16 家族水平后, AK146527-miR-15/16 结合区对成骨分化无影响。在对 Lnc-DIF 的研究<sup>[5]</sup>中, 当 Lnc-DIF 下游的 miR-489-3p 被基因编辑技术敲除后, Lnc-DIF 不再对成骨分化具有调控功能。本研究中无法用基因编辑技术同时敲除三条 miRNA, 因而采用了转染

miRNA inhibitor 的手段, 而结果和 Lnc-DIF 研究相同, 均说明在下游 miRNA 被抑制后, LncRNA 失去了其调控功能。

在了解 AK146527 结合区可以促进骨形成的基础上, 课题组进一步探索了该结合区对 OP 的治疗效果。在先前的研究<sup>[23]</sup>中, 课题组采用颅骨皮下转染的方式, 研究了非编码 RNA 的骨形成调控作用。本研究中, 同样将 AK146527 结合区转染至去卵巢 OP 小鼠颅骨皮下, 证明了 AK146527 结合区序列对 OP 小鼠有治疗效果。也提示课题组, AK146527 结合区可能是一种潜在的 OP 治疗药物。

本研究通过新兴的类器官技术进一步验证了 AK146527 结合区的原位促成骨效果。课题组采用了团队新研发的一种新型骨组织类器官, 该类器官具有和天然骨小梁组织相近的成分和结构, 并且可以在骨愈合过程中和天然骨组织融合<sup>[24]</sup>。在本研究中, 转染了 AK146527 结合区的 MC3T3-E1 细胞生成的骨组织类器官可以有效促进小鼠颅骨修复, 如果能将 AK146527 结合区制成核酸药物, 并和新型类器官技术结合, 可能会进一步发挥 AK146527 在治疗 OP 和骨缺损修复中的应用潜力。

综上, 本研究发现长链非编码 RNA AK146527 通过靶向 miR-15/16 促进骨形成的机制, 及其结合序列对去卵巢 OP 小鼠有良好的恢复作用, 结合序列在类器官中具备促原位成骨和骨修复功能。为深入理解成骨分化和骨形成的机制提供了新的理论和实验基础, 并为 LncRNA 针对 OP 的转化治疗应用提供了新的思路。

#### 参考文献

- [1] Clarke BL, Khosla S. Physiology of bone loss[J]. Radiologic Clinics of North America, 2010, 48(3): 483-495.
- [2] Salari N, Ghasemi H, Mohammadi L, et al. The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis[J]. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 2021, 16(1): 609.
- [3] Gonzalez RE, Debrach-Schneider AC, Lamy O. Ostéoporose [J]. Revue Médicale Suisse, 2022, 18(764): 56-58.
- [4] Meng L, Ward AJ, Chun S, et al. Towards a therapy for Angelman syndrome by targeting a long non-coding RNA[J]. Nature, 2015, 518(7539): 409-412.
- [5] Yin C, Tian Y, Li D, et al. Long noncoding RNA Lnc-DIF inhibits bone formation by sequestering miR-489-3p [J]. iScience, 2022, 25(3): 103949.
- [6] Yang X, Yang J, Lei P, et al. LncRNA MALAT1 shuttled by bone marrow-derived mesenchymal stem cells-secreted exosomes alleviates osteoporosis through mediating microRNA-34c/SATB2 axis[J]. Aging, 2019, 11(20): 8777-8791.
- [7] Behera J, Kumar A, Voor MJ, et al. Exosomal lncRNA-H19

- promotes osteogenesis and angiogenesis through mediating Angpt1/Tie2-NO signaling in CBS-heterozygous mice [J]. *Theranostics*,2021,11(16):7715-7734.
- [8] 蒋洋洋,朱浩,张海.人类与小鼠同源 lncRNA 基因及其表观遗传调控靶基因分析[J]. *南方医科大学学报*,2018,38(6):731-735.
- [9] Wang X,Guo B,Li Q,*et al.* miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation[J]. *Nature Medicine*,2013,19(1):93-100.
- [10] 曾浩,章晓云,陈锋,等. miRNA、lncRNA 和 circRNA 调节骨代谢治疗骨质疏松症的研究进展[J]. *现代预防医学*,2022,49(19):3572-3578.
- [11] Ko NY,Chen LR,Chen KH. The role of micro RNA and long-non-coding RNA in osteoporosis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*,2020,21(14):4886.
- [12] Duan L,Zhao H,Xiong Y,*et al.* miR-16-2 \* interferes with WNT5A to regulate osteogenesis of mesenchymal stem cells [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 51 ( 3 ): 1087-1102.
- [13] Han SH, Han JH, Chun WJ, *et al.* Nobiletin inhibits non-small-cell lung cancer by inactivating WNT/ $\beta$ -catenin signaling through downregulating miR-15-5p [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 2021: 7782963.
- [14] Marie PJ. Cellular and molecular alterations of osteoblasts in human disorders of bone formation[J]. *Histology and Histopathology*,1999,14(2):525-538.
- [15] Gambacciani M. The relative contributions of menopause and aging to postmenopausal osteoporosis[J]. *Climacteric*,2020,23(1):105.
- [16] Sambrook PN. 1. osteoporosis[J]. *Medical Journal of Australia*,1996,165(6):332-336.
- [17] Lindsay R. The menopause and osteoporosis[J]. *Obstetrics & Gynecology*,1996,87(2):16S.
- [18] Yu X,Rong PZ,Song MS,*et al.* lncRNA SNHG1 induced by SP1 regulates bone remodeling and angiogenesis via sponging miR-181c-5p and modulating SFRP1/Wnt signaling pathway [J]. *Molecular Medicine*,2021,27(1):141.
- [19] Peng S,Gao Y,Shi S,*et al.* lncRNA-AK137033 inhibits the osteogenic potential of adipose-derived stem cells in diabetic osteoporosis by regulating Wnt signaling pathway via DNA methylation[J]. *Cell Proliferation*,2022,55(1):e13174.
- [20] Wang CG, Hu YH, Su SL, *et al.* lncRNA DANCR and miR-320a suppressed osteogenic differentiation in osteoporosis by directly inhibiting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Experimental & Molecular Medicine*,2020,52(8):1310-1325.
- [21] Yang XH, Yang K, An YL, *et al.* microRNA-705 regulates the differentiation of mouse mandible bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *PeerJ*,2019,7:e6279.
- [22] Kureel J, Dixit M, Tyagi AM, *et al.* miR-542-3p suppresses osteoblast cell proliferation and differentiation, targets BMP-7 signaling and inhibits bone formation[J]. *Cell Death & Disease*,2014,5(2):e1050.
- [23] Yin C, Tian Y, Yu Y, *et al.* Long noncoding RNA AK039312 and AK079370 inhibits bone formation via miR-199b-5p[J]. *Pharmacological Research*,2021,163:105230.
- [24] Meng F, Yu Y, Yu J, *et al.* A trabeculae-like biomimetic bone-filling material as a potential organoid for bone defect treatment[J]. *Organoid Research*,2025,1(2):025040003.

(收稿日期:2025-05-28

修回日期:2025-11-24)