

Linc01135 对过氧化氢作用的成骨细胞增殖分化及氧化应激损伤的影响

吴文明 赵汝岗 张强

(首都医科大学附属北京地坛医院骨科, 中国 北京 100015)

【摘要】 目的 探讨 Linc01135 对过氧化氢作用的成骨细胞增殖分化及氧化应激损伤的影响及机制。方法 人成骨细胞 hFOB 1.19 分为 Con 组、H₂O₂ 组、H₂O₂ + pcDNA 组、H₂O₂ + pcDNA-Linc01135 组及 H₂O₂ + pcDNA-Linc01135 + SB203580 组。四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT) 检测细胞活力; 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡; 蛋白质印迹 (Western blot) 法检测 Runt 相关基因 2 (Runx2)、骨钙素 (OCN)、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Cleaved-caspase3)、caspase3 前体 (Pro-caspase3)、磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p-p38MAPK) 蛋白表达; 试剂盒检测超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、总抗氧化能力 (T-AOC)、丙二醛 (MDA) 含量; 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 Linc01135 表达水平。**结果** 过氧化氢作用的成骨细胞中细胞 OD 值降低, G0-G1 期细胞所占比例升高, S 期细胞所占比例降低, Runx2、OCN 蛋白表达水平降低, 细胞凋亡率升高, Cleaved-caspase3 表达水平升高, Pro-caspase3 表达水平降低, T-AOC 及 SOD 活性降低, MDA 含量升高, Linc01135 表达水平降低, p-p38MAPK 蛋白表达水平降低 (均 $P < 0.05$)。过表达 Linc01135 后, 成骨细胞中细胞 OD 值升高, G0-G1 期细胞所占比例降低, S 期细胞所占比例升高, Runx2、OCN 蛋白表达水平升高, 细胞凋亡率降低, Cleaved-caspase3 表达水平降低, Pro-caspase3 表达水平升高, T-AOC 及 SOD 活性升高, MDA 含量降低, p-p38MAPK 蛋白表达水平升高 (均 $P < 0.05$)。p38MAPK 信号通路阻断剂可减弱 Linc01135 对过氧化氢作用的成骨细胞增殖分化及氧化应激损伤的影响。**结论** 过表达 Linc01135 可能通过激活 p38MAPK 信号通路促进成骨细胞增殖、分化, 抑制过氧化氢作用的成骨细胞凋亡及氧化应激损伤。

【关键词】 Linc01135; p38MAPK 信号通路; 成骨细胞; 增殖; 分化; 氧化应激损伤

【中图分类号】 R681 **【文献标志码】** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.01.011

Effects of Linc01135 on proliferation and differentiation of osteoblasts and oxidative stress injury treated by hydrogen peroxide

WU Wenming, ZHAO Rugang, ZHANG Qiang

(Department of Orthopedics, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the effect and mechanism of Linc01135 on the proliferation and differentiation of osteoblasts and oxidative stress injury induced by hydrogen peroxide. **Methods** Human osteoblast hFOB 1.19 were divided into Con group, H₂O₂ group, H₂O₂ + pcDNA group, H₂O₂ + pcDNA-Linc01135 group, H₂O₂ + pcDNA-Linc01135 + SB203580 group. Methyl thiazolyl tetrazolium assay (MTT) was used to detect cell viability. The flow cytometry was used to detect cell cycle and apoptosis. Western blot method was used to detect Runt-related genes 2 (Runx2) and osteocalcin (OCN), cleaved cysteine-containing aspartate-specific proteases-3 (Cleaved-caspase3), caspase3 precursor (Pro-caspase3), phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38MAPK) protein expression. The kits was used to detect superoxide dismutase (SOD) activity, total antioxidant capacity (T-AOC), malondialdehyde (MDA) content. The real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) to detect the expression of Linc01135. **Results** The OD value of osteoblasts affected by hydrogen peroxide was decreased. The proportion of G0-G1 phase cells was increased, the proportion of S phase cells was decreased. The expressions of Runx2 and OCN proteins were decreased, and the apoptosis rate was increased. Cleaved-caspase3 expression was increased, Pro-caspase3 expression was decreased. T-AOC and SOD activity were decreased, MDA content was increased, Linc01135 expression was decreased,

通信作者: 张强, 博士, 主任医师, Tel: 13718271838

引用本文: 吴文明, 赵汝岗, 张强. Linc01135 对过氧化氢作用的成骨细胞增殖分化及氧化应激损伤的影响 [J]. 西部医学, 2022, 34(1): 57-62.

DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.01.011

p-p38MAPK protein expression was decreased ($P < 0.05$). After overexpression of Linc01135, the OD value of osteoblasts was increased, the proportion of cells in G0-G1 phase was decreased, the proportion of cells in S phase was increased, the expressions of Runx2 and OCN protein were increased, and the apoptosis rate was decreased. Cleaved-caspase3 expression was decreased, Pro-caspase3 expression was increased, T-AOC and SOD activity were increased, MDA content was decreased, p-p38MAPK protein expression was increased ($P < 0.05$). The p38MAPK signaling pathway blocker can attenuate the effects of Linc01135 on the proliferation and differentiation of osteoblasts and oxidative stress injury induced by hydrogen peroxide. **Conclusion** Overexpression of Linc01135 may promote the proliferation and differentiation of osteoblasts by activating p38MAPK signaling pathway, and inhibit the apoptosis and oxidative stress damage of osteoblasts induced by hydrogen peroxide.

【Key words】 Linc01135; p38MAPK signaling pathway; Osteoblasts; Proliferation; Differentiation; Oxidative stress injury

骨质疏松症是一种以骨量减少,骨质量受损及骨强度降低,导致骨脆性增加、易发生骨折为特征的全身体代谢性骨病。由于人口老龄化,骨质疏松症的发生率逐渐增加^[1-2]。因此,需探讨骨质疏松症发生、发展的作用机制,寻找治疗骨质疏松症的新策略。氧化应激在骨质疏松症中发挥重要作用,影响骨形成相关细胞的增殖分化,进而影响骨质疏松的发生、发展。因此,抗氧化应激对预防骨质疏松症具有重要意义^[3-4]。lncRNA 与骨质疏松密切相关,还参与调控骨代谢相关信号通路,将可为骨质疏松症诊断、治疗及判断预后提供新的靶向目标^[5-6]。有研究报道,人炎症牙周膜干细胞中 Linc01135 表达降低,上调 Linc01135 可促进人炎症牙周膜干细胞在 12% 静态牵张力作用下的成骨分化^[7]。然而 Linc01135 对成骨细胞增殖分化及氧化应激的影响及机制尚不清楚。丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路参与骨质疏松的发生与发展, p38MAPK 是 MAPK 信号通路的一种, p38MAPK 可以通过磷酸化相关成骨转录因子调控成骨细胞基因的表达,进而影响其功能^[8-9]。活化 p38 MAPK 通路促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞转化^[10]。葛根素通过激活细胞外调节蛋白激酶(Extracellular regulated protein kinases, ERK)1/2 和 p38MAPK 信号通路刺激成骨分化和骨形成^[11]。但 p38MAPK 信号通路对成骨细胞氧化应激损伤的影响尚不清楚。本研究用过氧化氢作用的成骨细胞,以模拟体外骨质疏松的病理环境,旨在探讨 Linc01135 对过氧化氢作用的成骨细胞增殖分化及氧化应激损伤的影响及其机制是否与 p38 MAPK 信号通路有关。

1 材料与方法

1.1 材料 人成骨细胞 hFOB 1.19 购自上海恒科生物科技有限公司;RPMI-1640 培养基、胎牛血清、双抗购自美国 Hyclone 公司; p38MAPK 抑制剂(SB203580)购自北京百奥莱博科技有限公司;MTT

试剂盒、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自厦门研科生物技术有限公司;RIPA 蛋白裂解液、二辛可宁酸(BCA)试剂盒、SDS-PAGE 试剂盒购自碧云天生物技术研究;超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、总抗氧化能力(Total antioxidant capacity, T-AOC)、丙二醛(Malonaldehyde, MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;荧光定量 RT-qPCR 试剂盒购自上海经科化学科技有限公司。

1.2 细胞处理与分组 人成骨细胞 hFOB 1.19 用含 15% 胎牛血清和双抗的 RPMI-1640 培养基培养在 37℃, 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中。将其分为 Con 组、H₂O₂ 组、H₂O₂ + pcDNA 组、H₂O₂ + pcDNA-Linc01135 组及 H₂O₂ + pcDNA-Linc01135 + SB203580 组。正常培养的细胞作为 Con 组;0.1 mmol/L H₂O₂ 处理的细胞作为 H₂O₂ 组,将 pcDNA、pcDNA-Linc01135 分别转染至 hFOB 1.19 中,再用 0.1 mmol/L H₂O₂ 处理,记为 H₂O₂ + pcDNA 组和 H₂O₂ + pcDNA-Linc01135 组;将 pcDNA-Linc01135 转染至 hFOB 1.19 中,再加入 10 μM SB203580 和 0.1 mmol/L H₂O₂ 处理,记为 H₂O₂ + pcDNA-Linc01135 + SB203580 组。

1.3 MTT 法检测细胞活力 各组细胞培养 48 h,加入 20 μL 的 MTT 溶液,继续培养 4 h,加入 DMSO,振荡反应 10 min,用酶标仪检测波长 490 nm 处吸光度(OD)值,即代表细胞活力。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期 收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤 3 次,离心弃上清;重悬细胞后加入预冷的 80% 乙醇,4℃ 固定过夜;PBS 洗涤 3 次,加入核糖核酸酶 A(RNase A),37℃ 孵育 30 min,加入碘化脒(PD)染色液,4℃ 染色 15 min,上机检测激发波长 488 nm 处红色荧光,用流式细胞仪和 DNA 细胞周期分析软件对细胞周期进行分析。

1.5 蛋白质印迹(Western blot)法检测 Runx2、OCN、Cleaved-caspase3、Pro-caspase3、p-p38MAPK

蛋白表达 提取各组细胞总蛋白,用 BCA 试剂盒进行定量。各组蛋白经 SDS-PAGE 后,转移至 PVDF 上。用 5% 脱脂牛奶封闭,加入一抗 4℃ 孵育过夜,加入二抗室温孵育 2 h,暗室中曝光显影,定影,用 Quantity One 软件测定各组蛋白条带灰度值,以目的条带和 GAPDH 条带的比值作为蛋白表达水平。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡 取各组培养 48 h 的细胞,用冷 PBS 漂洗 2 次,加入 10 μL 的 Annexin V-FITC,再加入 5 μL 的 PI,混匀后避光孵育 10 min;用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.7 SOD 活性、T-AOC 及 MDA 含量的检测 细胞培养 48 h 后,收集各组细胞及细胞培养上清液,按试剂盒说明书进行操作。

1.8 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 Linc01135 表达水平 各组细胞培养 48 h 后提取细胞总 RNA,反转录成 cDNA,Linc01135 以 β-actin 为内参进行 PCR 扩增,相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。Linc01135 上游引物序列:5'-CTCATAAATACATA CAGCCCAC-3',下游引物序列:5'-GAGATTCCTCA TAGAAATAGCC-3';β-actin 上游引物序列:5'-CTA CAATGAGCTGCGTGTGG-3',下游引物序列:5'-A AGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3'。

1.9 统计学分析 数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组比较行 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间

两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Linc01135 对过氧化氢作用的成骨细胞增殖分化的影响 与 Con 组相比, H_2O_2 组和 $H_2O_2 + pcDNA$ 组细胞 OD 值降低,G0-G1 期细胞所占比例升高,S 期细胞所占比例降低,Runx 相关基因 2(Runx2)、骨钙素(OCN)蛋白表达水平降低(均 $P < 0.05$);与 H_2O_2 组和 $H_2O_2 + pcDNA$ 组相比, $H_2O_2 + pcDNA-Linc01135$ 组细胞 OD 值升高,G0-G1 期细胞所占比例降低,S 期细胞所占比例升高,Runx2、OCN 蛋白表达水平升高(均 $P < 0.05$),见图 1、表 1。

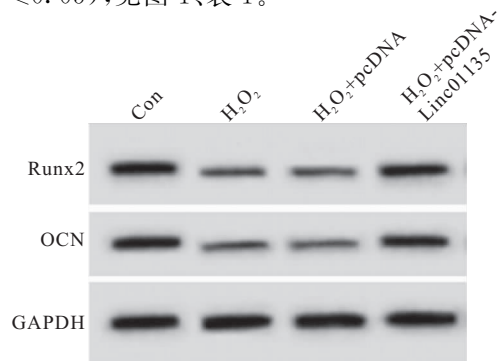


图 1 Linc01135 对过氧化氢作用的成骨细胞中 Runx2、OCN 蛋白表达的影响

Figure 1 Effect of Linc01135 on Runx2 and OCN protein expression in osteoblasts treated with hydrogen peroxide

表 1 Linc01135 对成骨细胞增殖分化的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 The effect of Linc01135 on the proliferation and differentiation of osteoblasts

组别	OD 值	G0-G1	S	G2-M	Runx2	OCN
Con 组	0.85±0.03	33.59±0.40	33.42±0.40	32.98±0.36	0.74±0.03	0.84±0.03
H_2O_2 组	0.36±0.01 ^①	45.75±0.45 ^①	21.48±0.26 ^①	32.77±0.32	0.13±0.01 ^①	0.25±0.01 ^①
$H_2O_2 + pcDNA$ 组	0.36±0.01 ^①	45.77±0.47 ^①	21.43±0.23 ^①	32.80±0.36	0.13±0.01 ^①	0.24±0.01 ^①
$H_2O_2 + pcDNA-Linc01135$ 组	0.70±0.02 ^{②③}	35.82±0.36 ^{②③}	31.02±0.33 ^{②③}	33.13±0.35	0.58±0.02 ^{②③}	0.68±0.03 ^{②③}
F	489.267	699.577	1219.995	0.699	783.200	556.150
P	<0.001	<0.001	<0.001	0.579	<0.001	<0.001

注:与 Con 组相比,① $P < 0.05$;与 H_2O_2 组相比,② $P < 0.05$;与 $H_2O_2 + pcDNA$ 组相比,③ $P < 0.05$

2.2 Linc01135 对过氧化氢作用的成骨细胞氧化应激损伤的影响 与 Con 组相比, H_2O_2 组和 $H_2O_2 + pcDNA$ 组细胞凋亡率升高,活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Cleaved-caspase3)表达水平升高,caspase3 前体(Pro-caspase3)表达水平降低,T-AOC 及 SOD 活性降低,MDA 含量升高(均 $P < 0.05$);与 H_2O_2 组和 $H_2O_2 + pcDNA$ 组相比, $H_2O_2 + pcDNA-Linc01135$ 组细胞凋亡率降低,Cleaved-caspase3 表达水平降低,Pro-caspase3 表达水平升高,T-AOC 及 SOD 活性升高,MDA 含量降低(均 $P < 0.05$),见图 2、表 2。

2.3 Linc01135 对过氧化氢作用的成骨细胞中 p38MAPK 信号通路的影响 与 Con 组相比, H_2O_2

组和 $H_2O_2 + pcDNA$ 组 Linc01135 表达水平降低,p-p38MAPK 蛋白表达水平降低(均 $P < 0.05$);与 H_2O_2 组和 $H_2O_2 + pcDNA$ 组相比, $H_2O_2 + pcDNA-Linc01135$ 组 Linc01135 表达水平升高,p-p38MAPK 蛋白表达水平升高(均 $P < 0.05$),见图 3、表 3。

2.4 p38MAPK 信号通路阻断剂可减弱 Linc01135 对过氧化氢作用的成骨细胞增殖分化的影响 与 $H_2O_2 + pcDNA-Linc01135$ 组相比, $H_2O_2 + pcDNA-Linc01135 + SB203580$ 组细胞 OD 值降低,G0-G1 期细胞所占比例升高,S 期细胞所占比例降低,Runx2、OCN 蛋白表达水平降低(均 $P < 0.05$),见图 4、表 4。

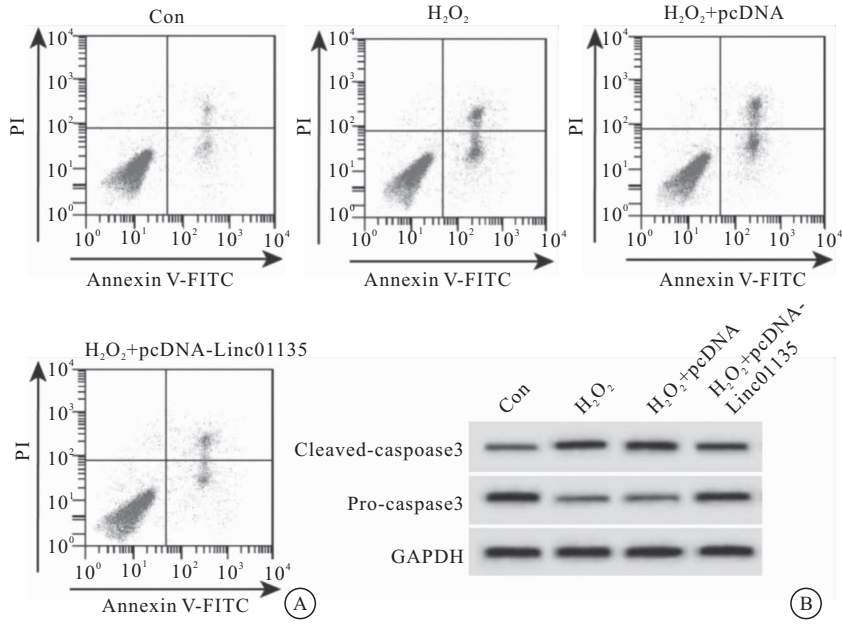


图 2 Linc01135 对过氧化氢作用的成骨细胞凋亡及 caspase3 蛋白表达的影响

Figure 2 Effect of Linc01135 on osteoblast apoptosis and caspase3 protein expression under hydrogen peroxide

注: A. Linc01135 对过氧化氢作用的成骨细胞凋亡的影响; B. Linc01135 对过氧化氢作用的 caspase3 蛋白表达的影响

表 2 Linc01135 对成骨细胞氧化应激损伤的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Linc01135 on oxidative stress injury of osteoblasts

组别	凋亡率($\times 10^{-2}$)	Cleaved-caspase3	Pro-caspase3	SOD(U/mg)	T-AOC(U/mL)	MDA(nmol/mg)
Con 组	7.28 ± 0.22	0.23 ± 0.01	0.72 ± 0.03	55.27 ± 0.85	8.58 ± 0.26	1.07 ± 0.03
H ₂ O ₂ 组	22.09 ± 0.52 ^①	0.68 ± 0.04 ^①	0.19 ± 0.01 ^①	24.55 ± 0.47 ^①	3.38 ± 0.11 ^①	4.24 ± 0.08 ^①
H ₂ O ₂ + pcDNA 组	22.13 ± 0.46 ^①	0.69 ± 0.04 ^①	0.19 ± 0.01 ^①	24.61 ± 0.51 ^①	3.45 ± 0.17 ^①	4.25 ± 0.09 ^①
H ₂ O ₂ + pcDNA-Linc01135 组	11.24 ± 0.33 ^{②③}	0.34 ± 0.02 ^{②③}	0.57 ± 0.02 ^{②③}	43.96 ± 0.83 ^{②③}	7.24 ± 0.10 ^{②③}	1.93 ± 0.04 ^{②③}
F	1082.209	179.568	582.067	1459.969	711.814	1859.971
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与 Con 组相比, ①P<0.05; 与 H₂O₂ 组相比, ②P<0.05; 与 H₂O₂ + pcDNA 组相比, ③P<0.05

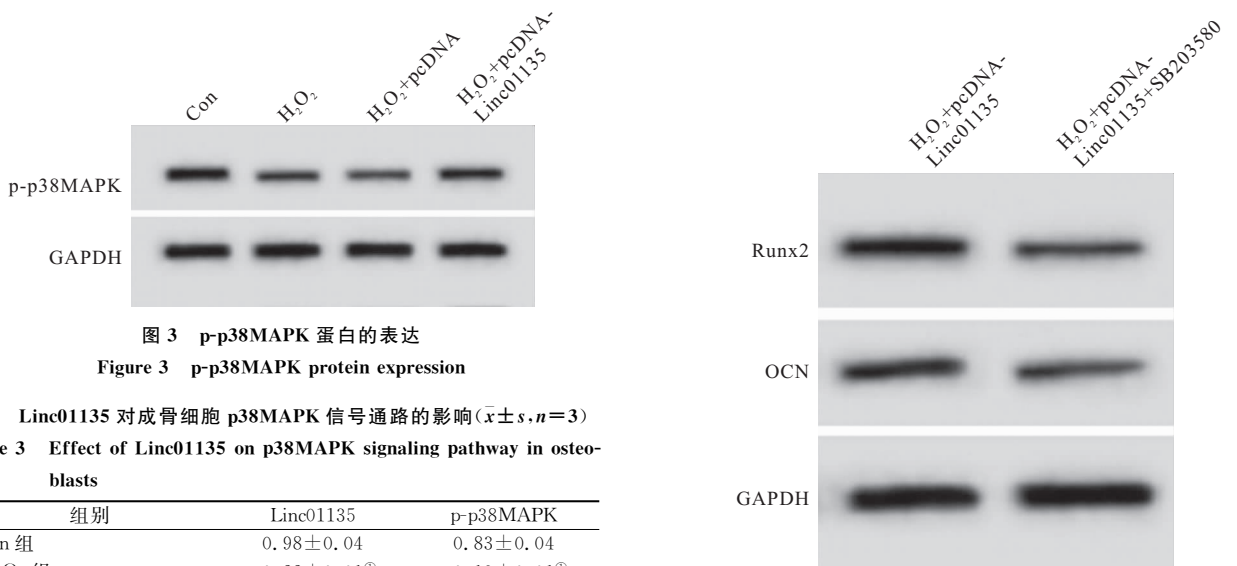


图 3 p-p38MAPK 蛋白的表达

Figure 3 p-p38MAPK protein expression

表 3 Linc01135 对成骨细胞 p38MAPK 信号通路的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Linc01135 on p38MAPK signaling pathway in osteoblasts

组别	Linc01135	p-p38MAPK
Con 组	0.98 ± 0.04	0.83 ± 0.04
H ₂ O ₂ 组	0.22 ± 0.01 ^①	0.19 ± 0.01 ^①
H ₂ O ₂ + pcDNA 组	0.22 ± 0.01 ^①	0.19 ± 0.01 ^①
H ₂ O ₂ + pcDNA-Linc01135 组	0.78 ± 0.02 ^{②③}	0.58 ± 0.03 ^{②③}
F	828.364	439.222
P	<0.001	<0.001

注: 与 Con 组相比, ①P<0.05; 与 H₂O₂ 组相比, ②P<0.05; 与 H₂O₂ + pcDNA 组相比, ③P<0.05

图 4 SB203580 可减弱 Linc01135 成骨细胞中 Runx2、OCN 蛋白表达的影响

Figure 4 SB203580 could attenuate the expression of Runx2 and OCN protein in Linc01135 osteoblasts

表 4 SB203580 可减弱 Linc01135 成骨细胞增殖分化的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 SB203580 could reduce the effects of Linc01135 osteoblast proliferation and differentiation

组别	OD 值	G0-G1	S	G2-M	Runx2	OCN
H ₂ O ₂ + pcDNA-Linc01135 组	0.70 ± 0.02	35.83 ± 0.33	31.02 ± 0.29	33.15 ± 0.43	0.58 ± 0.02	0.69 ± 0.03
H ₂ O ₂ + pcDNA-Linc01135 + SB203580 组	0.43 ± 0.01 ^①	41.16 ± 0.39 ^①	25.84 ± 0.37 ^①	33.00 ± 0.38	0.24 ± 0.01 ^①	0.33 ± 0.01 ^①
<i>t</i>	20.914	18.070	19.085	0.453	26.336	19.718
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	0.674	<0.001	<0.001

注:与 H₂O₂ + pcDNA-Linc01135 组相比,① $P < 0.05$

2.5 p38MAPK 信号通路阻断剂可减弱 Linc01135 对过氧化氢作用的成骨细胞氧化应激损伤的影响
与 H₂O₂ + pcDNA-Linc01135 组相比, H₂O₂ + pcDNA-Linc01135 + SB203580 组细胞凋亡率升高, Cleaved-

caspase3 表达水平升高, Pro-caspase3 表达水平降低, T-AOC 及 SOD 活性降低, MDA 含量升高(均 $P < 0.05$), 见图 5、表 5。

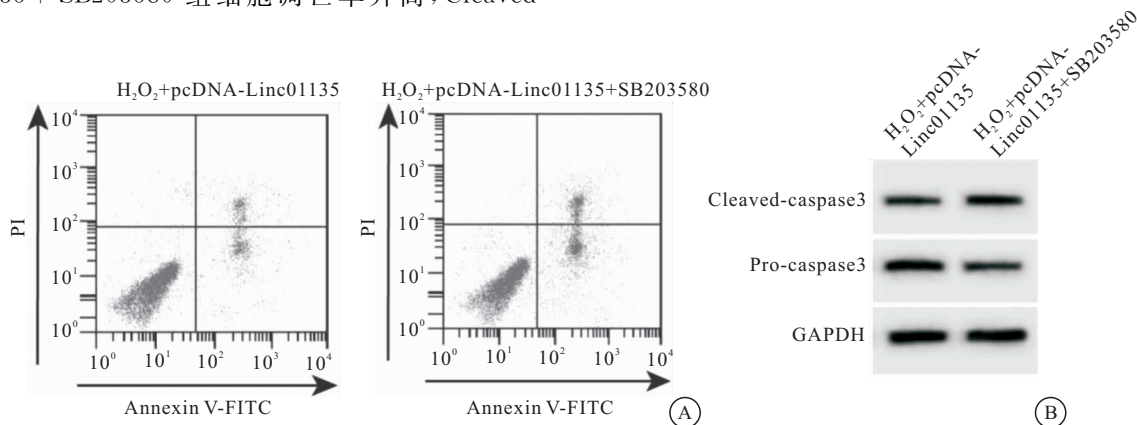


图 5 SB203580 可减弱 Linc01135 成骨细胞凋亡及 caspase3 蛋白表达的影响

Figure 5 SB203580 could reduce the effects of Linc01135 osteoblast apoptosis and caspase3 protein expression

注:A. SB203580 可减弱 Linc01135 成骨细胞凋亡; B. SB203580 可减弱 caspase3 蛋白表达

表 5 SB203580 可减弱 Linc01135 成骨细胞氧化应激损伤的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 SB203580 could reduce the effect of Linc01135 osteoblast oxidative stress injury

组别	凋亡率($\times 10^{-2}$)	Cleaved-caspase3	Pro-caspase3	SOD(U/mg)	T-AOC(U/mL)	MDA(nmol/mg)
H ₂ O ₂ + pcDNA-Linc01135 组	11.33 ± 0.26	0.34 ± 0.02	0.56 ± 0.03	43.93 ± 0.53	7.27 ± 0.11	2.00 ± 0.04
H ₂ O ₂ + pcDNA-Linc01135 + SB203580 组	18.89 ± 0.56 ^①	0.55 ± 0.03 ^①	0.28 ± 0.02 ^①	31.49 ± 0.49 ^①	4.15 ± 0.16 ^①	3.58 ± 0.10 ^①
<i>t</i>	21.208	10.088	13.451	29.851	27.832	25.409
<i>P</i>	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 H₂O₂ + pcDNA-Linc01135 组相比,① $P < 0.05$

3 讨论

骨质疏松是一种全身性骨骼疾病,骨形成不足或骨量丢失是其发病的重要原因,成骨细胞是骨形成的重要细胞,增强成骨细胞的骨形成是治疗骨质疏松症的理想策略^[12]。骨量的丢失与氧化应激有关,且氧化应激可抑制成骨细胞分化,促进骨质疏松的发展^[13-14]。过氧化氢可诱导成骨细胞凋亡和功能障碍,造成氧化损伤^[15-16]。本实验用过氧化氢作用成骨细胞后细胞 OD 值降低, G0-G1 期细胞所占比例升高, S 期细胞所占比例降低, Runx2、OCN 蛋白表达水平降低, 细胞凋亡率升高, Cleaved-caspase3 表达水平升高, Pro-caspase3 表达水平降低, T-AOC 及 SOD 活性降低, MDA 含量升高。Runx2 和 OCN 是成骨细胞活性及分化的指标, 其高表达促进成骨分化^[17-18]。SOD

是抗氧化酶,可减轻氧化应激反应;MDA 是脂质过氧化的终产物,其含量可反应细胞氧化应激水平^[19]。本研究结果表明,过氧化氢可抑制成骨细胞增殖、分化,诱导细胞凋亡和氧化应激,体外骨质疏松模型建立成功。

lncRNA 参与骨质疏松的发展过程,影响成骨细胞增殖分化等,如 lncRNA NEAT1 可抑制成骨细胞分化诱发骨质疏松^[20]。lncRNA AK045490 通过 β -catenin/T 细胞因子 1(T cell factor-1, TCF1)/Runx2 信号轴促进成骨细胞分化和骨形成^[21]。上调 Linc01135 可促进炎症牙周膜干细胞成骨分化^[7]。本实验结果显示,过氧化氢作用的成骨细胞中 Linc01135 表达水平降低,过表达 Linc01135 后成骨细胞中细胞 OD 值升高, G0-G1 期细胞所占比例降低, S 期细胞所占比例升高, Runx2、OCN 蛋白表达水平

升高, 细胞凋亡率降低, Cleaved-caspase3 表达水平降低, Pro-caspase3 表达水平升高, T-AOC 及 SOD 活性升高, MDA 含量降低。这表明过表达 Linc01135 可促进成骨细胞增殖、分化, 抑制过氧化氢诱导的成骨细胞凋亡和氧化应激损伤。

细胞松弛素 D 可上调 Runx2、OCN 和 OSX 的表达, 通过 p38-MAPK 信号通路促进 MC3T3 细胞的成骨分化^[22]。淫羊藿次苷 II 可通过 p38MAPK 信号通路促进成骨细胞分化^[23]。柠檬烯通过激活 p38MAPK 和蛋白激酶 B (Protein kinase B, AKT) 信号通路诱导成骨细胞分化和葡萄糖摄取^[24]。以上研究表明, 激活 p38MAPK 信号通路可促进成骨细胞分化。有研究报道, lncRNA MALAT1 可通过 p38MAPK 途径促进人晶状体上皮细胞的凋亡和氧化应激^[25]。本实验结果显示, 过氧化氢作用的成骨细胞中 p-p38MAPK 蛋白表达水平降低, 过表达 Linc01135 可提高 p-p38MAPK 蛋白表达水平, 表明过表达 Linc01135 可能活化 p38MAPK 信号通路。本实验还发现, p38MAPK 信号通路阻断剂可减弱 Linc01135 对过氧化氢作用的成骨细胞增殖分化及氧化应激损伤的影响。Linc01135 可能通过 p38MAPK 信号通路影响成骨细胞增殖分化及氧化应激。

4 结论

过表达 Linc01135 可能通过激活 p38MAPK 信号通路促进成骨细胞增殖、分化, 抑制过氧化氢作用的成骨细胞凋亡及氧化应激损伤。

【参考文献】

- ASPRAY TJ, HILL TR. Osteoporosis and the ageing skeleton [J]. *Subcell Biochem*, 2019, 91(1): 453-476.
- JOHNSTON CB, DAGAR M. Osteoporosis in Older Adults [J]. *Medical Clinics of North America*, 2020, 104(5): 873-884.
- GENG Q, GAO H, YANG R, *et al.* Pyrroloquinoline quinone prevents estrogen deficiency-induced osteoporosis by inhibiting oxidative stress and osteocyte senescence [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(1): 58-68.
- CHEN L, WANG G, WANG Q, *et al.* N-acetylcysteine prevents orchietomy-induced osteoporosis by inhibiting oxidative stress and osteocyte senescence [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(7): 4337-4347.
- 马智勇, 郭成龙. lncRNA 对骨质疏松骨代谢相关信号通路影响的研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(4): 547-551.
- YANG Y, YUJIAO W, FANG W, *et al.* The roles of miRNA, lncRNA and circRNA in the development of osteoporosis [J]. *Biol Res*, 2020, 53(1): 40.
- 邹宛桦, 秦文, 徐悦蓉, 等. 长链非编码 RNA linc-01135 对静态牵张力作用下炎症牙周膜干细胞成骨分化的影响 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2018, 34(2): 193-197.
- 张波, 耿彬, 谭小义, 等. MAPK 信号通路与骨质疏松关系的研究进展 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2014, 22(23): 2161-2164.
- RODRÍGUEZ-CARBALLO E, GÁMEZ B, FRANCESC V. p38 MAPK Signaling in Osteoblast Differentiation [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2016, 4(21): 40.
- 聂义珍, 闫朝岐, 付红梅, 等. 冷刺激对骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化的影响 [J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2018, 11(6): 577-583.
- 钟海波, 郭祥, 黄琳惠. 葛根素通过 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路刺激成骨分化和骨形成的机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(2): 84-89.
- 刘扬捷, 龚晓健, 王永庆. 成骨细胞的功能与损伤和骨质疏松的防治 [J]. *药学与临床研究*, 2019, 27(3): 201-205.
- BONACCORSI G, PIVA I, GRECO P, *et al.* Oxidative stress as a possible pathogenic cofactor of post-menopausal osteoporosis: Existing evidence in support of the axis oestrogen deficiency-redox imbalance-bone loss [J]. *Indian J Med Res*, 2018, 147(4): 341-351.
- DOMAZETOVIC V. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants [J]. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 2017, 14(2): 209-216.
- TIAN X, CONG F, GUO H, *et al.* Downregulation of Bach1 protects osteoblasts against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in vitro by enhancing the activation of Nrf2/ARE signaling [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 309(1): 108706.
- TIAN X, CONG F, GUO H, *et al.* Downregulation of Bach1 protects osteoblasts against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in vitro by enhancing the activation of Nrf2/ARE signaling [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 309: 108706.
- HOU Z, WANG Z, TAO Y, *et al.* KLF2 regulates osteoblast differentiation by targeting of Runx2 [J]. *Lab Invest*, 2019, 99(2): 271-280.
- LI W, ZHANG S, LIU J, *et al.* Vitamin K2 stimulates MC3T3-E1 osteoblast differentiation and mineralization through autophagy induction [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(5): 3676-3684.
- MAO W, ZHU Z. Parthenolide inhibits hydrogen peroxide-induced osteoblast apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(6): 8369-8376.
- 洪宇桁, 雪原. lncRNA NEAT1 过表达促进破骨细胞分化并抑制成骨细胞分化诱发骨质疏松 [J]. *天津医科大学学报*, 2019, 25(1): 11-15, 29.
- LI D, TIAN Y, YIN C, *et al.* Silencing of lncRNA AK045490 promotes osteoblast differentiation and bone formation via β -catenin/TCF1/Runx2 signaling axis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6229.
- LIU Q, ZHUANG Y, OUYANG N, *et al.* Cytochalasin D promotes osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells via p38-MAPK signaling pathway [J]. *Curr Mol Med*, 2019, 20(1): 79-88.
- 龚一听, 刘尚全, 袁媛, 等. 淫羊藿次苷 II 通过 p38 MAPK 调控成骨细胞护骨素表达的体外研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(12): 1790-1793, 1794.
- SOUNDHARRAJAN I, KIM DH, SRISHESHARAM S, *et al.* Limonene promotes osteoblast differentiation and 2-deoxy-d-glucose uptake through p38MAPK and Akt signaling pathways in C2C12 skeletal muscle cells [J]. *Phytomedicine*, 2018, 45(1): 41-48.
- GONG W, ZHU G, LI J, *et al.* LncRNA MALAT1 promotes the apoptosis and oxidative stress of human lens epithelial cells via p38MAPK pathway in diabetic cataract [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 144(1): 314-321.

(收稿日期: 2020-12-28; 修回日期: 2021-02-03; 编辑: 郭翠)