

# 干扰环状核糖核酸 zeste 基因增强子同源物 2 促进骨髓间充质干细胞成骨分化的机制研究

阮锋<sup>1</sup> 李贺伟<sup>1△</sup> 龚艳琳<sup>2</sup> 刘佳丽<sup>1</sup> 刘平<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探究环状核糖核酸(RNA) zeste 基因增强子同源物 2(circEZH2)调控骨形态发生蛋白 2 (BMP2)对骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨分化的影响。方法:使用生长培养基培养骨髓间充质干细胞,将骨髓间充质干细胞随机分为对照组、si-NC 组、si-circEZH2 组、si-circEZH2 + si-NC 组和 si-circEZH2 + si-BMP2 组;qRT-PCR 法检测各组骨髓间充质干细胞中 circEZH2 及 BMP2 mRNA 表达水平,CCK-8 法检测各组骨髓间充质干细胞增殖能力,流式细胞仪检测各组骨髓间充质干细胞凋亡情况,碱性磷酸酶(ALP)活性检测试剂盒检测 ALP 活性,蛋白免疫印迹法(Western Blotting)检测各组骨髓间充质干细胞中 BMP2、成骨相关蛋白骨钙素(OC)、RUNT 相关转录因子 2(Runx2)和骨桥蛋白(OPN)表达水平。结果:相较于对照组和 si-NC 组,si-circEZH2 组骨髓间充质干细胞中 circEZH2 的表达水平、细胞增殖抑制率、凋亡率显著降低( $P < 0.05$ ),BMP2 mRNA 表达水平、ALP 活性、BMP2、OC、Runx2 及 OPN 表达显著升高( $P < 0.05$ );相较于 si-circEZH2 组,si-circEZH2 + si-NC 组及 si-circEZH2 + si-BMP2 组骨髓间充质干细胞中 circEZH2 mRNA 的表达水平、细胞增殖抑制率、凋亡率显著升高( $P < 0.05$ ),BMP2 mRNA 表达水平、ALP 活性、BMP2、OC、Runx2、OPN 表达显著降低( $P < 0.05$ )。结论:circEZH2 低表达可能通过促进 BMP2 过表达来增强骨髓间充质干细胞成骨分化,从而改善骨质疏松症。

**[关键词]** 骨质疏松;环状 RNA zeste 基因增强子同源物 2;骨形态发生蛋白 2;骨髓间充质干细胞;成骨分化;增殖;凋亡;碱性磷酸酶

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2022)10-0007-06

## Mechanism Study of Interfering with Circular RNA Zeste Gene Enhancer Homolog 2 to Promote Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

RUAN Feng<sup>1</sup> LI Hewei<sup>1△</sup> GONG Yanlin<sup>2</sup> LIU Jiali<sup>1</sup> LIU Ping<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Osteology, Liyuan Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, China;

<sup>2</sup> Department of Endocrinology, Wuhan First Hospital, Wuhan 430030, China.

**Abstract Objective:** To explore the efficacy of circular RNA zeste gene enhancer homolog 2 (circEZH2) regulating bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs).

**Methods:** BMSCs cells were cultured with growth medium, and BMSCs cells were randomly divided into control group, si-NC group, si-circEZH2 group, si-circEZH2 + si-NC group and si-circEZH2 + si-BMP2 group. qRT-PCR method was used to detect the expression levels of circEZH2 and BMP2 mRNA in BMSCs cells in each group, CCK-8 method was used to detect cell proliferation ability of BMSCs in each group, flow cytometry was used to detect the apoptosis of BMSCs in each group, alkaline phosphatase (ALP) activity detection kit was used to detect ALP activity, Western Blotting was used

to detect the expression levels of BMP2, osteogenic proteins osteocalcin (OC), RUNT related transcription factor2 (Runx2) and osteopontin (OPN) in BMSCs cells of each group. **Results:** Compared with the control group and the si-NC group, the expression level of circEZH2, the cell proliferation inhibition rate and the apoptosis rate in the BMSCs of

基金项目:武汉市卫生健康委员会资助项目(武卫通[2019]87号)

<sup>1</sup> 华中科技大学同济医学院附属梨园医院骨科(武汉,430077)

<sup>2</sup> 武汉市第一医院内分泌科

<sup>△</sup>通信作者 E-mail:lhwl982l@163.com

the si-circEZH2 group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ), and the expression level of BMP2 mRNA, ALP activity, the expression of BMP2, OC, Runx2, OPN proteins were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with si-circEZH2 group and si-circEZH2+si-NC group, the expression level of circEZH2, the cell proliferation inhibition rate and the apoptosis rate in the BMSCs of the si-circEZH2+si-BMP2 group were significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the expression level of BMP2 mRNA, ALP activity, the expression of BMP2, OC, Runx2, OPN proteins were significantly reduced ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The low expression of circEZH2 may enhance the osteogenic differentiation of BMSCs by promoting the over-expression of BMP2 to improve osteoporosis.

**Keywords:** osteoporosis; circular RNA zeste gene enhancer homolog 2; bone morphogenetic protein 2; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; proliferation; apoptosis; alkaline phosphatase (ALP)

骨质疏松症(Osteoporosis)是一种慢性骨疾病,特征有骨密度低、骨结构恶化,可能会导致骨折和骨脆性<sup>[1]</sup>。目前,由于骨质疏松症的机制复杂和缺乏潜在的治疗靶点,阻碍了其预防和治疗的改进<sup>[2]</sup>,因此迫切需要寻找新的生物标志物来检测和治疗骨质疏松症。骨质疏松症的发病机制之一是骨髓间充质干细胞(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell, BMSCs)向成骨细胞和脂肪细胞分化失衡,导致成骨细胞减少,脂肪细胞增加<sup>[3]</sup>。因此,对人骨髓间充质干细胞成骨分化过程的深入研究将有助于更好地阐明骨质疏松症的发病机制。据报道环状核糖核酸(circRNA)通过影响骨吸收与骨形成参与骨质疏松症进程<sup>[4]</sup>, circRNA zeste 基因增强子同源物 2(circEZH2)来源于 EZH2 基因的 2~8 号外显子,由内含子套锁方式形成,能够促进胶质瘤细胞迁移和肿瘤浸润深度<sup>[5]</sup>,但其在骨质疏松症中的作用尚未明确。骨形态发生蛋白 2(Bone Morphogenetic Protein 2, BMP2)是转化生长因子- $\beta$ 1 超家族成员,具有调控生长发育的作用<sup>[6]</sup>。骨形态发生蛋白 2 的激活可以促进骨髓间充质干细胞成骨分化,从而缓解骨质疏松症的进展<sup>[7]</sup>,然而,目前还没有研究表明 circEZH2 和骨形态发生蛋白 2 在骨质疏松症中的作用和潜在机制。因此本实验以骨髓间充质干细胞为研究对象,探究 circEZH2 与骨形态发生蛋白 2 调控关系及其对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响,以期骨质疏松症临床治疗提供理论基础,为研制靶向药物提供方向。

## 1 材料和方法

### 1.1 骨髓间充质干细胞获得

来源于正常人的骨髓间充质干细胞、生长培养基(货号为 PT-2501 和 PT-3001)购自北京泽平科技有限责任公司。

### 1.2 主要试剂

细胞计数试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK-8, 货号为 C0039)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(货号为 C1062S)购自上海碧云天生物技术有限公司;碱性磷

酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP)活性检测试剂盒(货号为 E-BC-K091-S)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒(货号为 C3206)购自北京华夏远洋科技有限公司;Lipofectamine™3000 转染试剂盒(货号为 L3000001)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;总 RNA 提取试剂盒、通用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(货号为 R1200、RP1100)购自北京索莱宝科技有限公司;骨形态发生蛋白 2、骨钙素(Osteocalcin, OC, YB-01221)、RUNT 相关转录因子 2(Runx2)、骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)、 $\beta$ -actin 兔源一抗、山羊抗兔 IgG 抗体(货号为 GTX14933、GTX02043、GTX00792、GTX109639、GTX109639、GTX213110-01)购自 GeneTex 公司。

### 1.3 实验仪器

细胞培养箱(型号为 H301)购自香港万浩科技有限公司;多功能酶标仪 PerkinElmer EnVision(型号为 EnVision)购自珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司;实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(型号为 ABI7500)购自 Applied Biosystems 公司。

### 1.4 方法

**1.4.1 骨髓间充质干细胞培养** 使用生长培养基培养骨髓间充质干细胞,培养条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>, 每 3 d 换培养液 1 次,骨髓间充质干细胞融合达到 80%及以上进行传代,取第 3 代生长良好的骨髓间充质干细胞培养于含有  $1 \times 10^{-8}$  mol/L 地塞米松、10 mmol/L  $\beta$ -磷酸甘油、100 mmol/L 人工淀粉合成代谢途径(AsAp)的生长培养基中,于 24 孔培养板进行培养,每 3 d 换培养液 1 次,后续实验使用骨髓间充质干细胞作为研究对象。

**1.4.2 骨髓间充质干细胞分组及处理** 取 2.1 节第 3 代对数生长期成骨诱导的骨髓间充质干细胞,  $2 \times 10^5$  个/孔重悬于 24 孔培养板。随机选择骨髓间充质干细胞进行分组培养,分组如下:对照组, si-NC 组, si-circEZH2 组, si-circEZH2 + si-NC 组, si-circEZH2 + si-BMP2 组。对每组成骨的骨髓间充质干细胞分别处

理如下:正常培养成骨的骨髓间充质干细胞,si-NC 和 Lipo-fectamine3000 加入成骨的骨髓间充质干细胞共同培养,Lipo-fectamine3000 和 si-circEZH2 加入成骨的骨髓间充质干细胞共同培养,Lipofectamine™3000、si-circEZH2 和 si-NC 加入成骨的骨髓间充质干细胞共同培养,Lipofectamine™3000、si-骨形态发生蛋白 2 和 si-circEZH2 加入成骨的骨髓间充质干细胞共同培养。

1.4.3 检测骨髓间充质干细胞中 circEZH2 及骨形

表 1 circEZH2 及骨形态发生蛋白 2 引物序列

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
circEZH2	ATTGCGGCCGCTGGGGCACCTGAGATTGAT	CGGCTCGAGCCTCCTGTTTGTGTTCAGGC
BMP2	ACCAGACTATTGGACACCAG	AATCCTCACATGTCTCTTTGG
GAPDH	CTATGAGGACCAGGTTGTCT	TTGTCATACCAGGAAATGAGC

1.4.4 检测骨髓间充质干细胞增殖能力 取 2.3 节各组骨髓间充质干细胞于 24 孔培养板中,2×10<sup>5</sup>个/孔培养48 h,培养条件:37℃,5%CO<sub>2</sub>,每孔加入10 μL CCK-8溶液,细胞培养箱中孵育 2 h 后测定吸光度值(Optic Density,OD),记录各孔细胞在 490 nm 处吸光度值,骨髓间充质干细胞增殖抑制率(%)=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%,实验重复 3 次。

1.4.5 检测骨髓间充质干细胞凋亡情况 取 2.3 节各组骨髓间充质干细胞于 24 孔培养板中,2×10<sup>5</sup>个/孔培养48 h,加入 10 μL 磷脂酰肌醇(PI)(20 μg/mL)及 5 μL AnnexinV/FITC 混匀,常温避光孵育30 min,将各组骨髓间充质干细胞上机,检测各组骨髓间充质干细胞凋亡情况。

1.4.6 检测碱性磷酸酶活性 取 2.3 节各组骨髓间充质干细胞于 24 孔培养板中,2×10<sup>5</sup>个/孔培养 48 h,严格按照碱性磷酸酶活性检测试剂盒操作说明进行实验,实验反应完成后测定吸光度值,检测 520 nm 吸光度值,依据标准曲线获得碱性磷酸酶活性值。

1.4.7 检测骨髓间充质干细胞中骨形态发生蛋白 2、成骨相关蛋白表达水平 取 2.3 节各组骨髓间充质干细胞于 24 孔培养板中,2×10<sup>5</sup>个/孔培养 48 h,使用 RIPA 液裂解细胞,反复吹打细胞使蛋白充分释放,12 000g离心获得总蛋白。检测总蛋白浓度及纯度后进行 12.5% SDS-PAGE 电泳,设置功率为 2.5 W,45 min,将分离的蛋白进行转膜,设置 100 V 电压,2 h,5%脱脂牛奶进行封闭,加入一抗骨形态发生蛋白 2、骨钙素、Runx2、骨桥蛋白,以 β-actin 作为内参,按照说明书稀释一抗,4℃在细胞培养箱中孵育过夜,加入山羊抗兔 IgG 抗体孵育 1 h 后,使用 EZ-ECL 发光试剂盒进行显色,凝胶成像系统扫描观察,Quantity one 软件分析骨形态发生蛋白 2、骨钙素、Runx2、骨桥蛋白灰度值,计算各蛋白含量(设置 3 个重复)。

态发生蛋白 2 mRNA 表达水平 取 2.3 节各组细胞,加入 Trizol 分离和蛋白复合体,将上层溶液转至 EP 管中,12 000g 离心 15 min,取上清于 EP 管中,加入 0.5 mL 异丙醇进行 RNA 沉淀,检测提取 mRNA 的浓度,符合浓度要求后对 mRNA 进行反转录,获得 circEZH2 及骨形态发生蛋白 2 的 cDNA,引物及内参序列见表 1,以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 分析表达 circEZH2 及骨形态发生蛋白 2 mRNA 的表达水平。

1.5 统计学方法

SPSS25.0 软件处理数据,以  $\bar{x} \pm s$  形式表示分析结果,多组间数据比较行单因素方差分析,数据进一步两两比较行 snk-q 检验, $P < 0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞中 circEZH2 与骨形态发生蛋白 2 mRNA 的表达水平

相较于对照组,si-NC 组骨髓间充质干细胞成骨细胞中 circEZH2 mRNA 与骨形态发生蛋白 2 mRNA 的表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),si-circEZH2 组骨髓间充质干细胞成骨细胞中 circEZH2 mRNA 的表达水平显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),骨形态发生蛋白 2 mRNA 的表达水平显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );相较于 si-circEZH2 组,si-circEZH2+si-NC 组骨髓间充质干细胞成骨细胞中 circEZH2 mRNA 与骨形态发生蛋白 2 mRNA 的表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),si-circEZH2+si-BMP2 组骨髓间充质干细胞成骨细胞中 circEZH2 mRNA 的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),骨形态发生蛋白 2 mRNA 的表达水平显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 骨髓间充质干细胞成骨细胞中 circEZH2 及骨形态发生蛋白 2 mRNA 表达水平( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	circEZH2 mRNA/ BMP2 mRNA/ GAPDH GAPDH	
对照组	1.27±0.14	1.13±0.14
si-NC 组	1.22±0.18	1.15±0.19
si-circEZH2 组	0.51±0.06 <sup>1)</sup>	2.13±0.24 <sup>1)</sup>
si-circEZH2+si-BMP2 组	0.61±0.05	0.72±0.21 <sup>2)</sup>
F	34.560	26.678
P	<0.001	<0.001

注:1)相较于对照组, $P < 0.05$ ;2)相较于 si-circEZH2 组, $P < 0.05$ 。

2.2 骨髓间充质干细胞增殖情况

相较于对照组, si-NC 组骨髓间充质干细胞成骨细胞增殖抑制率差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), si-circEZH2 组骨髓间充质干细胞成骨细胞增殖抑制率显著降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 相较于 si-circEZH2 组, si-circEZH2+si-NC 组骨髓间充质干细胞成骨细胞增殖抑制率差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), si-circEZH2+si-BMP2 组骨髓间充质干细胞成骨细胞增殖抑制率显著升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 见表 3。

表 3 骨髓间充质干细胞成骨细胞增殖抑制率( $\bar{x}\pm s, n=3$ )	
组别	细胞增殖抑制率/%
对照组	0.00
si-NC 组	1.07 $\pm$ 0.01
si-circEZH2 组	-20.53 $\pm$ 4.09 <sup>1)</sup>
si-circEZH2+si-NC 组	-21.05 $\pm$ 4.01
si-circEZH2+si-BMP2 组	-3.21 $\pm$ 1.14 <sup>2)</sup>
<i>F</i>	65.722
<i>P</i>	<0.001

注: 1) 相较于对照组,  $P<0.05$ ; 2) 相较于 si-circEZH2 组,  $P<0.05$ 。

2.3 骨髓间充质干细胞凋亡情况

相较于对照组, si-NC 组骨髓间充质干细胞成骨细胞凋亡率差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), si-circEZH2 组骨髓间充质干细胞成骨细胞凋亡率显著降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 相较于 si-circEZH2 组, si-circEZH2+si-NC 组骨髓间充质干细胞成骨细胞凋亡率差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), si-circEZH2+si-BMP2 组骨髓间充质干细胞成骨细胞凋亡率显著升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 见表 4 和图 1。

表 4 骨髓间充质干细胞成骨细胞凋亡情况( $\bar{x}\pm s, n=3$ )	
组别	凋亡率/%
对照组	40.05 $\pm$ 1.81
si-NC 组	42.33 $\pm$ 1.21
si-circEZH2 组	26.59 $\pm$ 1.04 <sup>1)</sup>
si-circEZH2+si-NC 组	29.10 $\pm$ 1.69
si-circEZH2+si-BMP2 组	35.18 $\pm$ 1.77 <sup>2)</sup>
<i>F</i>	58.481
<i>P</i>	<0.001

注: 1) 相较于对照组,  $P<0.05$ ; 2) 相较于 si-circEZH2 组,  $P<0.05$ 。

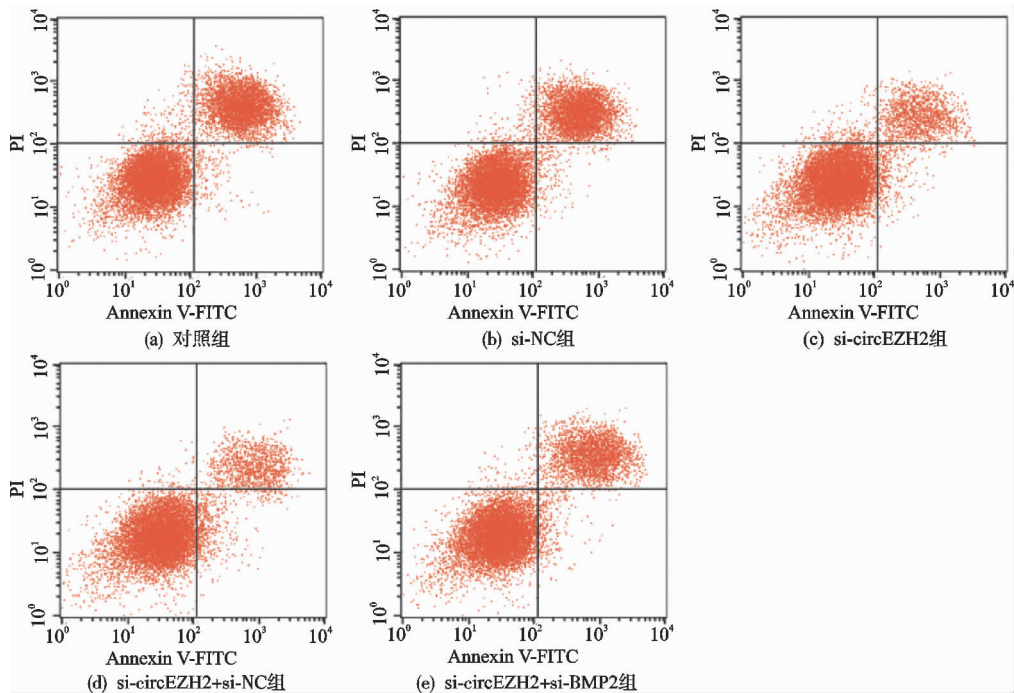


图 1 骨髓间充质干细胞成骨细胞凋亡情况

2.4 骨髓间充质干细胞碱性磷酸酶活性

相较于对照组, si-NC 组骨髓间充质干细胞成骨细胞碱性磷酸酶活性差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), si-circEZH2 组骨髓间充质干细胞成骨细胞碱性磷酸酶活性显著升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 相较于 si-circEZH2 组, si-circEZH2+si-NC 组骨髓间充质干细胞成骨细胞碱性磷酸酶活性差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), si-circEZH2+si-BMP2 组骨髓间充质干细胞成骨细胞碱性磷酸酶活性显著降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 见表 5。

表 5 各组成骨细胞碱性磷酸酶活性比较( $\bar{x}\pm s, n=3$ )	
组别	碱性磷酸酶活性/(U $\cdot$ mg <sup>-1</sup> )
对照组	4.08 $\pm$ 0.86
si-NC 组	3.97 $\pm$ 0.85
si-circEZH2 组	9.11 $\pm$ 1.13 <sup>1)</sup>
si-circEZH2+si-NC 组	8.93 $\pm$ 1.03
si-circEZH2+si-BMP2 组	6.41 $\pm$ 0.31 <sup>2)</sup>
<i>F</i>	24.046
<i>P</i>	<0.001

注: 1) 相较于对照组,  $P<0.05$ ; 2) 相较于 si-circEZH2 组,  $P<0.05$ 。

### 2.5 骨髓间充质干细胞中骨形态发生蛋白 2 及成骨相关蛋白表达水平

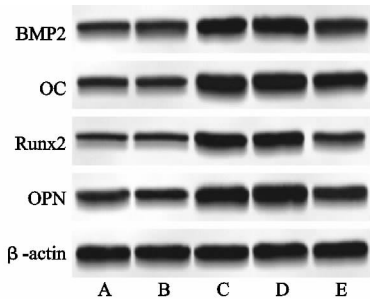
相较于对照组, si-NC 组骨髓间充质干细胞成骨细胞中骨形态发生蛋白 2、骨钙素、Runx2、骨桥蛋白表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ), si-circEZH2 组骨髓间充质干细胞成骨细胞中骨形态发生蛋白 2、骨钙素、Runx2、骨桥蛋白表达显著升高, 差异有统计学意

义( $P<0.05$ ); 相较于 si-circEZH2 组, si-circEZH2 + si-NC 组骨髓间充质干细胞成骨细胞中骨形态发生蛋白 2、骨钙素、Runx2、骨桥蛋白表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ), si-circEZH2 + si-BMP2 组骨髓间充质干细胞成骨细胞中骨形态发生蛋白 2、骨钙素、Runx2、骨桥蛋白表达显著降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 见表 6 和图 2。

表 6 骨髓间充质干细胞成骨细胞中骨形态发生蛋白 2 及成骨相关蛋白表达水平( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	BMP2/ $\beta$ -actin	OC/ $\beta$ -actin	Runx2/ $\beta$ -actin	OPN/ $\beta$ -actin
对照组	0.52 $\pm$ 0.07	0.55 $\pm$ 0.06	0.32 $\pm$ 0.04	0.52 $\pm$ 0.08
si-NC 组	0.62 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.07	0.37 $\pm$ 0.05	0.54 $\pm$ 0.09
si-circEZH2 组	1.25 $\pm$ 0.16 <sup>1)</sup>	1.52 $\pm$ 0.13 <sup>1)</sup>	1.09 $\pm$ 0.09 <sup>1)</sup>	1.12 $\pm$ 0.22 <sup>1)</sup>
si-circEZH2 + si-NC 组	1.18 $\pm$ 0.02	1.59 $\pm$ 0.04	1.11 $\pm$ 0.01	1.31 $\pm$ 0.08
si-circEZH2 + si-BMP2 组	0.89 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>	0.91 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>	0.57 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>	0.76 $\pm$ 0.05 <sup>2)</sup>
<i>F</i>	45.373	118.740	174.236	25.989
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 1) 相较于对照组,  $P<0.05$ ; 2) 相较于 si-circEZH2 组,  $P<0.05$ 。



A-对照组; B-si-NC组; C-si-circEZH2组; D-si-circEZH2+si-NC组; E-si-circEZH2+si-BMP2组。

图 2 骨髓间充质干细胞成骨细胞中骨形态发生蛋白 2 及成骨相关蛋白表达水平

### 3 讨论

骨质疏松是由于成骨细胞与破骨细胞分化失调导致骨重塑异常, 破骨细胞过度活化的结果<sup>[8]</sup>。随着科学技术的不断发展, 对诱发骨质疏松的了解不断深入, 调节破骨细胞和成骨细胞的代谢是目前治疗骨质疏松的主要方法<sup>[9]</sup>。骨髓间充质干细胞具有成骨分化与成脂分化的潜能, 其分化平衡紊乱目前被认为是骨质疏松发病机制之一<sup>[10]</sup>。因此, 研究调节骨髓间充质干细胞成骨分化的分子机制有助于了解骨质疏松的疾病进展, 从而开发潜在的治疗骨质疏松的新靶点。

CircRNA 可能在调节骨髓间充质干细胞成骨分化和骨形成中发挥重要作用。到目前为止, 已有一些 CircRNAs 与成骨分化相关的报道。例如, Circ\_0076690 被证明可以通过充当 miR-152 海绵促进成骨分化<sup>[11]</sup>。Circ\_0076906 通过 miR-1305/OGN 通路缓解骨质疏松, 促进成骨分化<sup>[12]</sup>。circEZH2 是近年来新发现的一种 circRNA, 已被证明在胃癌和胶质瘤细胞中高表达, 其特异性表达水平促进了肿瘤细胞恶化行为<sup>[13-14]</sup>。但目前尚未有 circEZH2 在骨髓间充质干

细胞方面的报道。本研究发现沉默 circEZH2 可促进骨髓间充质干细胞增殖并抑制凋亡。为明确沉默 circEZH2 与成骨分化的关系, 本研究检测了碱性磷酸酶的活性及成骨相关蛋白的表达情况, 结果显示沉默 circEZH2 可以升高碱性磷酸酶活性、骨钙素、Runx2、骨桥蛋白的表达水平, 提示干扰 circEZH2 表达可以增强成骨相关蛋白因子表达, 进而增强成骨分化。Runx2 的特异性表达能够影响成骨相关基因的转录, 进而促进骨的形成<sup>[15]</sup>。骨钙素参与基质矿化骨和形成的过程<sup>[16]</sup>, 骨桥蛋白是一种细胞外蛋白, 被鉴定为骨细胞、破骨细胞、成骨细胞所产生的骨基质蛋白, 在破骨细胞的分化与激活过程中具有重要调控作用, 骨钙素、骨桥蛋白与其他蛋白质共同促进骨的发育、生长的作用<sup>[17]</sup>。本实验结果与上述研究结果一致, 表明抑制 circEZH2 的表达可以通过增强成骨相关蛋白因子表达促进成骨分化。因此, 可以认为 circEZH2 是一个对骨髓间充质干细胞骨形成和成骨分化至关重要的 circRNA, 但 circEZH2 影响骨髓间充质干细胞成骨分化的机制仍不清楚。

骨形态发生蛋白 2 具有诱导人类滑膜来源间充质干细胞成软骨分化的作用, 为关节软骨疾病的临床治疗提供理论参考<sup>[18]</sup>。上调骨形态发生蛋白 2 表达时, 小鼠成骨前体细胞 MC3T3-E1 的增殖和成骨分化能力均有显著提高<sup>[19]</sup>。通过红曲可以激活腺苷酸活化蛋白激酶活性, 诱导骨形态发生蛋白 2 上调, 最终能明显改善大鼠骨质疏松症<sup>[20]</sup>。本研究表明沉默骨形态发生蛋白 2 表达可以逆转干扰 circEZH2 对骨髓间充质干细胞成骨分化的促进作用, 提示调控骨形态发生蛋白 2 表达水平可能是 circEZH2 介导骨髓间充质干细胞成骨分化的作用机制。然而, circEZH2 对骨形态

发生蛋白 2 的调控作用是直接的还是间接的,还需进一步研究证实。

综上所述,本研究首次揭示 circEZH2 可以调控骨髓间充质干细胞成骨分化,其可能是改善骨质疏松症的一个靶点。干扰 circEZH2 表达可能通过促进成骨相关蛋白因子表达来增强骨髓间充质干细胞成骨分化,这可能与上调骨形态发生蛋白 2 表达有关,为骨髓间充质干细胞成骨分化机制的研究和骨质疏松症临床治疗的分子机制研究提供可能的参考依据。然而本研究为细胞实验,还未在临床患者和动物中进行相关研究,后期将通过收集骨质疏松症患者的临床资料和构建骨质疏松症动物模型,进一步探究 circEZH2 的作用机制,为 circEZH2 调控骨髓间充质干细胞成骨分化提供进一步的证据。

### 参考文献

- [1] KIM B H, CHO Y J, LIM W B. Osteoporosis therapies and their mechanisms of action (Review)[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(6): 1379-1393.
- [2] TU K N, LIE J D, WAN C K V, et al. Osteoporosis: a review of treatment options[J]. *Pharmacy & Therapeutics*, 2018, 43(2): 92-104.
- [3] HU L, YIN C, ZHAO F, et al. Mesenchymal stem cells: cell fate decision to osteoblast or adipocyte and application in osteoporosis treatment[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 360-379.
- [4] ZHONG D, XU G Z, WU J Z, et al. Circ-ITCH sponges miR-214 to promote the osteogenic differentiation in osteoporosis via upregulating YAP1 [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4): 340-354.
- [5] GAO F, DU Y, ZHANG Y, et al. Circ-EZH2 knockdown reverses DDAH1 and CBX3-mediated cell growth and invasion in glioma through miR-1265 sponge activity[J]. *Gene*, 2020, 726(1): 144196-144218.
- [6] 孙琛, 朱青青, 王佳琼, 等. BMP2/Smads 通路介导富血小板纤维蛋白对人牙髓干细胞成骨分化的作用研究[J]. *口腔颌面修复学杂志*, 2021, 22(5): 333-337.
- [7] ZHANG N, HU X, HE S, et al. LncRNA MSC-AS1 promotes osteogenic differentiation and alleviates osteoporosis through sponging microRNA-140-5p to upregulate BMP2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 519(4): 790-796.
- [8] KIM H, LEE K, JIN M K, et al. Selenoprotein W ensures physiological bone remodeling by preventing hyperactivity of osteoclasts[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2258-2271.

- [9] YANG T L, SHEN H, LIU A, et al. A road map for understanding molecular and genetic determinants of osteoporosis[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 16(2): 91-103.
- [10] GAO L, GONG F, MA L, et al. Uncarboxylated osteocalcin promotes osteogenesis and inhibits adipogenesis of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells via the PKA-AMPK-SIRT1 axis[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(2): 880-893.
- [11] HAN S, KUANG M, SUN C, et al. Circular RNA hsa\_circ\_0076690 acts as a prognostic biomarker in osteoporosis and regulates osteogenic differentiation of hBMSCs via sponging miR-152 [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(14): 15011-15020.
- [12] WEN J, GUAN Z, YU B, et al. Circular RNA hsa\_circ\_0076906 competes with OGN for miR-1305 binding site to alleviate the progression of osteoporosis[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2020, 122(1): 105719-105749.
- [13] WEN J, LI X, DING Y, et al. Lidocaine inhibits glioma cell proliferation, migration and invasion by modulating the circEZH2/miR-181b-5p pathway [J]. *Neuroreport*, 2021, 32(1): 52-60.
- [14] 裴雷, 渠辉恒, 夏加增. 环状 RNA circEZH2 在胃癌中的表达及临床意义[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2020, 27(S1): 2-3.
- [15] 李微, 朱汉民, 王鑫, 等. 左归丸干预卵巢摘除骨质疏松模型小鼠骨形态发生蛋白 2 信号通路的变化[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 26(8): 1229-1235.
- [16] CAO S, LI T, SHAO Y, et al. Regulation of bone phosphorus retention and bone development possibly by related hormones and local bone-derived regulators in broiler chicks[J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2021, 12(1): 88-104.
- [17] JANI L, MEERI H, MIHO N, et al. Osteoclasts secrete osteopontin into resorption lacunae during bone resorption[J]. *Histochem Cell Biol*, 2019, 151(6): 1-13.
- [18] XIAO P, ZHU Z, DU C, et al. Silencing Smad7 potentiates BMP2-induced chondrogenic differentiation and inhibits endochondral ossification in human synovial-derived mesenchymal stromal cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 132-148.
- [19] 杨斯迪, 王倩, 许诺, 等. 上调骨形态发生蛋白 2 促进成骨细胞增殖分化的硅酸钙类材料 Biodentine[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(4): 540-544.
- [20] 冷明昊, 张卫华, 陈东, 等. 红曲通过激活腺苷酸活化蛋白激酶上调骨形态发生蛋白 2 表达对去卵巢大鼠骨质疏松症的改善作用[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2021, 29(3): 7-11.

(收稿日期: 2022-05-04)