文章编号 1006-8147(2019)01-0005-05

论 著

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

洪宇桁[1],雪 原[2]
(1.天津医科大学医学影像学院,天津 300203;2.天津医科大学总医院骨科,天津 300052)

摘要 目的:研究长链非编码RNA NEAT1在骨质疏松症中的表达及对成骨细胞和破骨细胞分化的作用。**方法:**收集正常人和骨质疏松症患者的骨组织,运用Real-time PCR检测NEAT1的表达水平。在卵巢去势(OVX)和鼠尾悬吊(TS)诱导的小鼠疏松股骨中,在小鼠前成骨细胞系MC3T3-E1和人间充质干细胞hMSC向成骨分化过程中以及小鼠巨噬细胞系RAW264.7向破骨分化过程中,检测NEAT1的表达水平。利用敲低Neat1的慢病毒感染MC3T3-E1和RAW264.7细胞,分别采用碱性磷酸酶(ALP)染色确定成骨细胞活性以及抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色观察破骨细胞活性变化。**结果:**NEAT1在患者疏松的骨组织中、小鼠的疏松股骨组织中以及RAW264.7细胞破骨分化过程中表达明显增多;而在MC3T3-E1和hMSC成骨分化过程中表达明显降低。ALP染色显示敲低Neat1显著加重成骨细胞活性,TRAP染色显示敲低Neat1显著抑制破骨细胞活性。**结论:**长链非编码RNA NEAT1在成骨分化过程中低表达,在破骨分化过程中过表达,并通过促进破骨细胞分化及抑制成骨细胞分化诱发骨质疏松。

关键词 长链非编码RNA;NEAT1;成骨细胞;破骨细胞;骨质疏松症;基因表达
中图分类号 Q7 **文献标志码** A

Over -expression of long noncoding RNA NEAT1 induces osteoporosis via promoting osteoclaste differentiation and inhibiting osteoblast differentiation

HONG Yu-heng[1], XUE yuan[2]
(1.School of Medical Imaging,Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China; 2.Department of Orthopaedics, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract Objective: To examine the expression of lncRNA NEAT1 in osteoporotic bone tissue and its effect on the osteoclaste andosteoblast differentiation. **Methods:** The transcript of NEAT1 in human normal and osteoporotic bone tissues was carried out; ovariectomized (OVX) and hindlimb-unloaded induced osteoporosis in the femurs of mice; process of hMSCs and MC3T3-E1 cells differentiating to osteoblast and the process of RAW264.7 cells differentiating toosteoclast were detected by Real-time PCR,respectively. Moreover,when NEAT1 was silenced,the activity of osteoblast was determined by ALP staining and the activity of osteoclast was determined by TRAP staining. **Results:** NEAT1 was significantly up-regulated in the osteoporotic bone tissues of the patients and the osteoporotic mice models as well as in the process of osteoclast differentiation.Furthermore,NEAT1 was down-regulated in the process ofosteoblast differentiation.In addition,when NEAT1 was silenced,the expression of Ctsk and the activity of osteoclast were decreased while the expression of Alp and the activity of osteoblast were increased. **Conclusion:** lnc-NEAT1 may induce osteoporosis viapromoting osteoclaste differentiation and inhibitosteoblastdifferentiation, providing experimental evidence for NEAT1 as a potential therapeutic target for osteoporosis.

Key words lncRNA; NEAT1; osteoblast; osteoclast; osteoporosis; gene expression

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是好发于老年人的常见骨科疾病,其特征表现为骨量降低、骨组织显微结构发生改变[1]。据统计全球50岁以上发生骨折的女性中有1/3罹患骨质疏松,在男性中这一比例为1/5[1-2]。过去的30年间,我国骨质疏松症患者增加了3倍,达到了9千万人,数量已居世界首位[3]。目前OP的治疗药物分3类:基础药物(vitD、钙剂)、抗吸收药物和骨生成药物。这些药物虽然针对全身的骨质疏松,但前两类不具备诱导骨生成的能力且副作用较大。甲状旁腺激素1-34(parathroid hormone 1-34, PTH1-34)虽然可以刺激骨生成,但却面临受体饱和及PTH分泌轴紊乱等问题[2]。因此,探究成骨机理,可为治疗或缓解OP提供新方法。

目前,越来越多的研究表明长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)与很多疾病相关[4-11],但lncRNA在OP中的作用鲜见报道。NEAT1(nuclear enriched abundant transcript 1)是定位在细胞核内

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81471403,81271360)
作者简介 洪宇桁(1997-),女,学士在读,研究方向:疾病发生机理;
通信作者:雪原,E-mail: xueyuan@medmail.com.cn。

的一个 lncRNA，可以与一些核内蛋白结合形成亚核结构旁斑[12]。研究表明 NEAT1 在多种肿瘤中高表达，且参与肿瘤的进展[13-17]。然而，NEAT1 在骨科疾病特别是在 OP 中的作用仍不清楚。本研究首次发现在 OP 患者的疏松骨组织中、小鼠的疏松股骨组织中以及 RAW264.7 细胞破骨分化过程中 NEAT1 过表达；而在 MC3T3-E1 和 hMSC 细胞成骨分化过程中 NEAT1 表达明显降低。碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）染色显示敲低 Neat1 后成骨细胞活性显著增加，TRAP 染色显示敲低 Neat1 后破骨细胞活性被明显抑制。本研究为 NEAT1 成为 OP 的潜在治疗靶点提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验对象 MC3T3-E1 细胞（小鼠前成骨细胞系）、RAW264.7 细胞（小鼠单核巨噬细胞系）、hMSC（人间充质干细胞）均购自中国科学院细胞库。C57BL/6 雌性小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。实验小鼠在天津医科大学实验动物中心繁育，所有的程序按照天津医科大学实验动物中心的操作规范流程进行。

1.1.2 主要试剂 DMEM 高糖和 MEMα 培养基购自英潍捷基公司，逆转录试剂盒购自 Thermo fisher 公司，Trizol、SYBG 购自 Takara 公司，Recombinant Human sRANK Ligand 购自派普泰克公司，抗坏血酸、β-磷酸甘油、地塞米松、茜素红染液和 TRAP 染液购自 Sigma 公司，ALP 染色试剂盒购自碧云天公司。

1.2 研究方法

1.2.1 RNA 的提取、逆转录和 Real-time PCR 用 Trizol 裂解细胞，震荡并室温静置 3 min 后，12 000 r/min 离心 30 min，吸取上层无色透明溶液并加入 500 μL 异丙醇混匀，-20 ℃静置过夜，次日 12 000 r/min 离心 20 min 后去掉上清，加入 75%的乙醇洗涤沉淀，离心后弃上清，所得沉淀即为 RNA，加入 DEPC 水溶解 RNA。用 DEPC 水适当稀释 RNA 后，测定 OD 值，计算 RNA 纯度及产量。根据逆转录试剂盒说明逆转录合成 cDNA，Real-time PCR 采用 Roche 的 SYBR green 染料说明指导，用 LightCycler® 仪器检测基因表达情况。homo NEAT1 上游：CTTCCTCCCTTTAACTTATCCATTCAC；下游：CTCTTCCTCCACCATTACC AACAATAC；musNEAT1 上游：GGGAAGGGTGTGGTCAGAAG；下游：GGCAGGTTGGCTCCTACAAT；homoALP 上游：AACATCAGGGACATTGACGTG；下游：GTATCTCGGTTTGAAGCTCTTCC；mus ALP 上游：ACACCTTGACTGTGGTTACTGCTGA；下游：CCTTGTAGCCAGGCCCGTTA；mus Ctsk 上游：GAAGAAGACTCACCAGAAGCAG；下游：TCCAGGTTATGGGCAGAGATT；homo GAPDH 上游：ACCCAGAAGACTGTGGATGG；下游：TTCAGCTCAGGGATGACCTT；mus GAPDH 上游：AGCAAGGACACTGAGCAAGA；下游：GGGTCTGGGATGGAAATTGT。

1.2.2 细胞培养与分化诱导 用含 10%胎牛血清和 1%双抗的 MEMα 培养基，在 37 ℃和 5%CO_2 条件下培养 MC3T3-E1 和 hMSC 细胞并传代。诱导成骨分化时在培养液中加入 50 μg/mL 抗坏血酸、10 mmol/L β-磷酸甘油和 10^{-7} mmol/L 地塞米松，每两天换液一次。用含 10%的胎牛血清和 1%双抗的 MEMα 培养基，在 37 ℃和 5%CO_2 条件下培养 RAW264.7 细胞，诱导破骨细胞时在培养基中加入 100 ng/mL 的诱导因子 RANKL，诱导时间为 6 d，每 2 d 换液一次。

1.2.3 TRAP 染色 将 RAW264.7 细胞铺于 96 孔板中，密度为每孔 1.5×10^4 个细胞。用含有 100 ng/mL 的 RANKL 的 DMEM 高糖培养基诱导培养 6 d 后进行抗酒石酸酸性磷酸酶（TRAP）染色。染色时移除细胞培养基后，用 PBS 洗 3 遍；4%多聚甲醛固定 10 min，PBS 洗 3 遍；0.1%Triton X100 通透 10 min，PBS 洗 3 遍；PBST 孵育 10 min；按照 96 孔板每孔 100 μL 的量加入新鲜的 TRAP 染色液，置于 37 ℃烘箱反应 1 h；向每孔加入 100 μL PBS，显微镜下观察，含有 3 个及 3 个以上细胞核的细胞被视为破骨细胞并计数。

1.2.4 ALP 染色 将诱导成骨分化 7 d 的细胞用 4%多聚甲醛固定 30 min，PBS 洗 3 遍，按照试剂盒的说明配置成 BCIP/NBT 染色工作液，最后一次洗涤完成后，去除洗涤液，加入适量 BCIP/NBT 染色工作液，确保能覆盖住样品，室温避光孵育 5~30 min 至染色到预期深浅。去除染色工作液，用蒸馏水洗涤 2 次即可终止显色反应，显微镜下观察拍照。

1.2.5 慢病毒构建 设计并合成靶基因的 siRNA 序列，Mouse siNeat1-1：GGGUCAUCUUACUAGAUAATT；Mouse siNeat1-2：GAUUGAAGCUUCUUAGAAATT。根据 pSUPER 的质粒图谱选择两个单一酶切位点（BglII 和 HindIII）。在 20 μL 体系中设置梯度退火程序，合成 shRNA。退火产物取 1 μL 稀释 150 倍，充分混匀后取 10 μL，用 3%浓度琼脂糖凝胶电泳，鉴定其退火产物长度是否正确。用 BglII 和 HindIII 酶切 pSUPER 质粒，将 pSUPER 片段与退火 shRNA 连接，将 pSUPER-shRNA 转化 DH5α 感受态细胞，涂布有氨苄霉素的 LB 平板，37 ℃过夜培养；转天挑

取单个菌落 15~20 个并留种,通过菌落 PCR 筛选阳性者摇菌过夜;使用康为公司的小抽质粒提取盒提取质粒,测浓度分装后-20 ℃保存;取提好的质粒用 EcoRI 和 XhoI 酶切 2 h,在 2%琼脂糖凝胶电泳后鉴定,酶切片段长度为 300 bp 即为构建好的阳性质粒(阴性为空白载体酶切片段长度是 240 bp);挑 3 个阳性质粒送 invitrogen 公司测序。将 277 质粒分别用 EcoRV 和 XhoI 酶切 1h,得到线性质粒 277;同时用 EcoRI 酶切 pSUPER-shRNA,并用 T4 DNA 聚合酶处理酶切产物,XhoI 酶切 90 min 后, 再进行 3%浓度琼脂糖凝胶电泳, 得到 300 bp 包含 shRNA 的条带,切胶回收;连接线性 277 和 shRNA,将产物转化 DH5α 感受态细胞,菌落 PCR 鉴定,小抽质粒提取盒提取质粒,酶切鉴定(BamHI 和 Xhol 酶切),阳性酶切片段长度为 800 bp,空载体酶切片段长度是 500 bp;挑选 3 个阳性质粒送金唯智公司进行测序,得到合适序列的 277-shRNA 。

1.2.6　卵巢去势致骨质疏松模型　选用 3 个月龄的健康雌性 C57BL/6 小鼠, 实验室常规喂养 1 周。2%戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔麻醉,取俯卧位,术区剃毛,碘酒乙醇消毒。选背侧入路,在小鼠髂嵴顶部外上方 1 cm 左右,腰椎骶棘肌两侧做纵向切口长约 0.8 cm,打开后腹膜,切除双侧卵巢,清理伤口后分两层缝合皮肤和基层。卵巢为深粉红色颗粒状组织,多被其周围脂肪组织所掩盖,术中需拨开这些组织,方能将其显露。对照组手术方法与实验组相同,但打开腹腔后不切除卵巢。术后正常饮食,6 个月即可建立骨质疏松模型。

1.2.7　鼠尾悬挂致骨质疏松模型　选用 6 周龄的健康雌性 C57BL/6 小鼠,实验室常规喂养 1 周。采用小鼠尾部悬吊法,将小鼠单笼饲养,尾部悬吊,前肢着地,后肢悬空,身体长轴与水平面呈 30°,使其在笼内能自由活动, 进食进水,28 d 即可建立骨质疏松模型。

1.3　统计学方法　运用统计软件 SPSS17.0 进行数据处理,计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,样本间均数的比较采用单因素方差分析(one-way,ANOVA)的方法进行比较。所有统计结果以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　正常骨组织和骨质疏松症患者骨组织中 NEAT1 的转录本　从天津医科大学总医院收集了手术切除的正常骨组织和骨质疏松症患者的疏松骨组织各 6 例,提取总 RNA 后进行 Real-time PCR,结果显示骨质疏松症患者骨组织中 NEAT1 的转录本高于正常骨组织,差异具有统计学意义($P<0.05$)(图 1)。

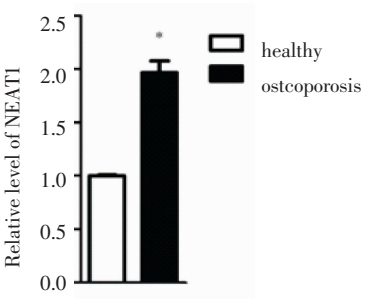

图 1　正常骨组织和骨质疏松骨组织中 NEAT1 的转录本

Fig1　The transcript of NEAT1 in normal and osteoporotic bone tissue

2.2　卵巢去势(OVX)和鼠尾悬吊(TS)诱导的骨质疏松小鼠模型的疏松股骨中 Neat1 的表达改变　将正常对照小鼠、卵巢去势(OVX)6 个月后以及鼠尾悬吊(TS)21 d 后的小鼠分别处死取股骨组织,提取总 RNA 后进行 Real-time PCR。实验结果表明,与对照相比,OVX6 个月以及 TS 21 d 后成骨相关基因 Alp 的表达量显著降低,而 Neat1 的表达水平升高(图2),差异具有统计学意义($P<0.05$)。

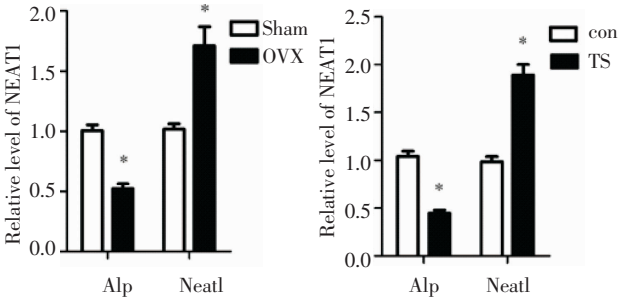

图 2　卵巢去势和鼠尾悬吊诱导的小鼠疏松股骨中 Neat1 的表达

Fig 2　The expression ofNeat1 and Alp in theosteoporotic femur of the model mouse

2.3　成骨细胞分化过程中 NEAT1 的表达变化　在 hMSC 以及 MC3T3-E1 细胞的培养液中添加成骨分化诱导因子 10 nmol 地塞米松、10 mmol β-甘油磷酸钠、50 μg/mL 抗坏血酸,每隔 2 d 换液,诱导第 18 天后检测 ALP 和 NEAT1 的表达改变。实验结果表明,与对照组相比 hMSC 和 MC3T3-E1 成骨分化后 ALP 表达量显著增多, 而 NEAT1 的表达量明显降低(图 3),差异具有统计学意义($P<0.05$)。

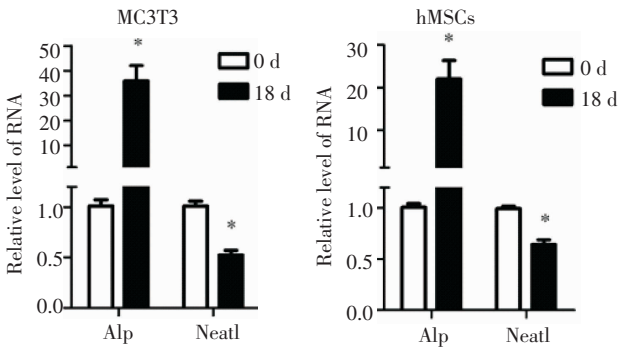

图 3　成骨细胞分化过程中 NEAT1 的表达

Fig 3　The expressions ofNEAT1 and ALPduring osteogenic differentiation

2.4 破骨细胞分化过程中 Neat1 的表达变化 在 RAW264.7 细胞的培养液中添加 100 ng/mL 的诱导因子 RANKL,每两天换液。诱导 6 d 后检测破骨基因 Ctsk 和 Neat1 的表达改变。实验结果表明,与对照组相比,RAW264.7 细胞在诱导破骨分化后 Ctsk 和 Neat1 的表达量均显著增多(图 4),差异具有统计学意义($P<0.05$)。

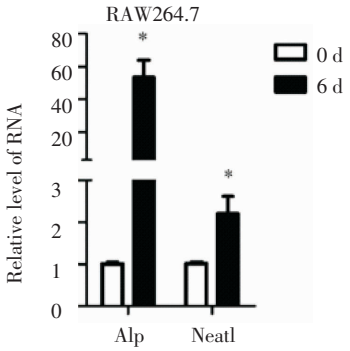

图 4 破骨细胞分化过程中 Ctsk 与 Neat1 的表达

Fig 4 The expressionsofCtskand Neat1 during osteoclast differentiation

2.5 下调 Neat1 对成骨细胞分化的影响 在成骨诱导第 4 天的 MC3T3-E1 细胞中感染敲低 Neat1 的慢病毒或对照慢病毒,72 h 后 Real-time PCR 检测 Neat1 及 Alp 的表达改变。实验结果表明敲低 Neat1 后,与对照组相比细胞中 Alp 的表达水平增多,差异具有统计学意义($P<0.05$)。ALP 染色的结果进一步证实敲低 Neat1 后 ALP 的活性增高(图 5),说明 Neat1 可抑制 MC3T3-E1 细胞向成骨方向分化。

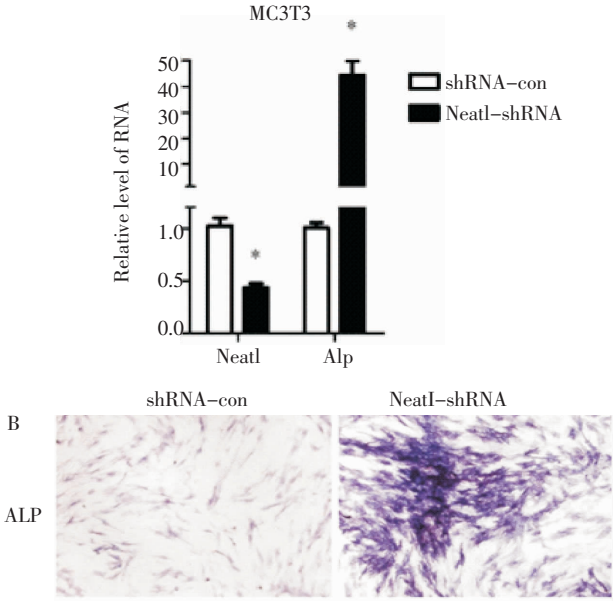

图 5 沉默 Neat1 对成骨活性的影响

Fig 5 The effect of silencing Neat1 on osteogenic differentiation. qPCR was performed to detect the Neat1 and Alp when Neat1 was silenced (A). ALP staining was performed after silencing Neat1 (B).

2.6 下调 Neat1 对破骨细胞分化的影响 在诱导破骨第 3 天的 RAW264.7 细胞中感染敲低 Neat1 的慢病毒或对照慢病毒,72 h 后 Real-time PCR 检测 Neat1 及 Ctsk 的表达改变。实验结果表明敲低 NEAT1 后,与对照组相比细胞中 Ctsk 的表达水平降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。TRAP 染色的结果进一步证实敲低 Neat1 后破骨细胞活性减低。表明 Neat1 可促进 RAW264.7 细胞向破骨方向分化(图 6)。

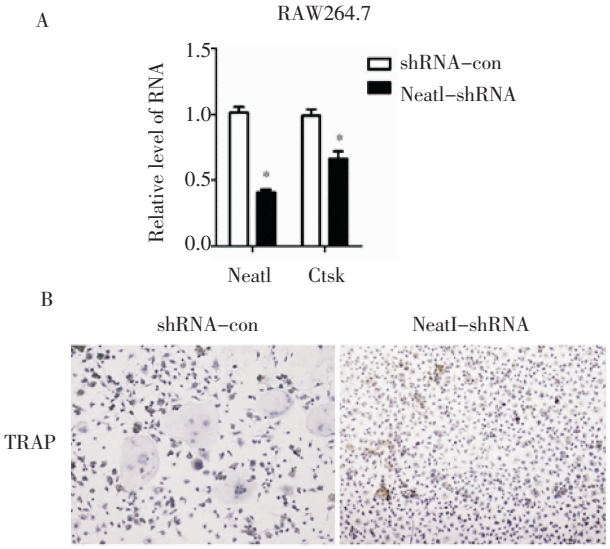

图 6 沉默 Neat1 对破骨活性的影响

Fig 6 Silencing Neat1 influences osteoporotic differentiation. qPCR was performed to detect the Neat1 and Ctsk when Neat1 was silenced (A). TRAP staining was performed after silencing Neat1 (B)

3 讨论

骨的生长主要表现为成骨分化作用的增强及破骨分化作用的减弱。骨质疏松症主要是由于成骨分化作用的减弱,而破骨分化作用的增强所导致[1]。因此,针对能够靶向成骨和破骨分化活性的基因进行研究具有十分重要的意义。先前的研究主要集中在编码蛋白的基因上,研究表明成骨和破骨分化调节是一个有多种细胞因子和多条信号通路共同参与的复杂过程。TGF-β 通路、BMP2 通路、Wnt 通路、Notch 通路、Hedgehog 通路、MAPK 通路、PTH 通路等众多细胞信号通路交互影响,共同介导成骨和破骨分化过程,从而调节骨质疏松症的病理过程[18]。近年来,一些研究表明 miRNAs 在包括骨质疏松症在内的多种疾病中发挥重要的作用,与 miRNA 相比,在细胞内转录比例更高的 lncRNAs 更具有极其复杂而重要的生物学功能,从而不再认为它是“暗物质”,其功能和作用机制也越来越受关注[19]。

近年来大量的研究显示，lncRNAs 可以从转录和转录后水平参与调控蛋白质编码基因，例如参与了 X 染色体沉默、基因组印记以及染色质修饰、转录激活、转录干扰、核内运输等多种重要的调控过程。此外 lncRNAs 的异常表达与人类疾病相关，例如肝纤维化、阿尔茨海默病(AD) 、心血管疾病、糖尿病和癌症等[4-11]。然而，lncRNAs 在骨科中的研究主要集中在骨肿瘤，有关 lncRNA 在成骨和破骨分化过程中的作用尚缺乏深入的研究。目前发现的在成骨分化过程中异常表达的 lncRNAs 有 MIR31HG、H19、MEG3、MAIT 和 NONHSAT009968[20-24]。MIR31HG 可直接与 IκBα 结合并激活 NF-κB 通路，形成一个正反馈环，从而抑制成骨分化[23]。而 H19 促进成骨分化主要是通过 ceRNA 的机制竞争结合 miR-141 和 miR-22，从而激活 Wnt/β-catenin 通路并促进成骨分化[24]。目前尚未见 lncRNA-NEAT1 与 OP 及成骨和破骨分化相关的研究。本研究首次发现了 NEAT1 在 OP 患者的疏松骨组织中、小鼠的疏松股骨组织中以及 MC3T3-E1 和 hMSC 成骨分化过程中表达明显降低；而在 RAW264.7 破骨分化过程中表达明显增多，提示 NEAT1 参与调节成骨与破骨分化及骨质疏松症。NEAT1 又称为 MENε/β，它是从人类第 11 号染色体由 RNA 聚合酶Ⅱ转录而来，具有多聚腺苷酸尾。NEAT1 主要定位在细胞核内的亚核结构旁斑上，其参与旁斑的形成[12]。研究发现 NEAT1 在神经胶质瘤中显著上调，其通过 ceRNA 的机制抑制 miR-449-5p 对致癌基因 c-Met 的作用，从而促进胶质瘤细胞的增殖、转移和侵袭[25]。此外，NEAT1 在肝细胞癌、前列腺癌以及乳腺癌中表达同样显著增高，且与这些肿瘤的转移、预后密切相关[13-18]。在本研究中，我们通过构建敲低 NEAT1 慢病毒载体，随后用 Real-time PCR 结果证实了在小鼠前成骨细胞系 MC3T3-E1 和人间充质干细胞 hMSC 中敲低 NEAT1 后引起 ALP mRNA 水平明显升高。同时 ALP 染色也证实敲低 NEAT1 促进成骨活性。而在小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 中敲低 NEAT1 可引起破骨细胞标志物基因 Ctsk 表达降低，TRAP 染色结果证实敲低 NEAT1 抑制破骨活性。以上结果说明 NEAT1 促进破骨细胞分化并抑制成骨细胞分化，为 NEAT1 成为治疗骨质疏松症的潜在靶点提供了一定的理论基础和实验依据。

参考文献：

[1] Ensrud K E, Crandall C J. Osteoporosis[J]. Ann Intern Med，2018，168(4): 306

[2] Zhao Y, Xue R,Shi N,et al. Aggravation of spinal cord compromise following new osteoporotic vertebral compression fracture prevented by terip aratide in patients with surgical c ontraindications[J]. Osteoporos Int,2016,27(11) : 3309

[3] Chen P, Li Z, Hu Y. Prevalence of osteoporosis in China: a meta-analysis and systematic review[J]. BMC Public Health,2016, 16(1): 1039

[4] Yang F, Zhang L, Huo XS, et al. Long noncoding RNA high expression in hepatocellular carcinoma facilitates tumor growth through enhancer of zeste homolog 2 in humans[J]. Hepatology,2011, 54(5):1679

[5] Zhang K, Han XH, Zhang Z, et al. The liver-enriched lnc-LFAR1 promotes liver fibrosis by activating TGFβ and Notch pathways[J]. Nat Commun,2017,8(1): 144

[6] Chang YN, Zhang K, Hu ZM, et al. Hypoxia-regulated lncRNAs in cancer[J]. Gene, 2015, 575(1): 1

[7] Shi ZM, Han YW, Han XH, et al. Upstream regulators and down-stream effectors of NF-kB in Alzheimer´s disease[J]. J Neurol Sci, 2016, 366: 127

[8] Yang F, Huo X S, Yuan S X, et al. Repression of the long noncoding RNA -LET by histone deacetylase 3 contributes to hypoxia -mediated metastasis[J]. Mol Cell,2013, 49(6):1083

[9] Bernard D, Prasanth K V, Tripathi V, et al. A long nuclear-retained non -coding RNA regulates synaptogenesis by modulating gene expression[J]. EMBO J,2010, 29(18):3082

[10] Rapicavoli N A,Qu K, Zhang J, et al. A mammalian pseudogene lncRNA at the interface of inflammation and anti -inflammatory therapeutics[J]. Elife,2013, 2:e00762

[11] Xie H, Ma H, Zhou D. Plasma HULC as a promising novel biomarker for the detection of hepatocellular carcinoma[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013:136106

[12] Naganuma T, Hirose T. Paraspeckle formation during the biogenesis of long non-coding RNAs[J]. RNA Biol,2013,10(3):456

[13] Yu X, Li Z, Zheng H, et al. NEAT1: A novel cancer-related long non-coding RNA[J]. Cell Prolif,2017,50(2): doi:10.111/cpr12329. Epub 2017 Jan 19

[14] Li W, Zhang Z, Liu X, et al. The FOXN3-NEAT1-SIN3A repressor complex promotes progression of hormonally responsive breast cancer[J]. J Clin Invest,2017,127(9):3421

[15] Chakravarty D, Sboner A, Nair SS, et al. The oestrogen receptor alpha-regulated lncRNA NEAT1 is a critical modulator of prostate cancer[J]. Nat Commun,2014,5:5383

[16] Liu X, Liang Y, Song R, et al. Long non-coding RNA NEAT1-modulated abnormal lipolysis via ATGL drives hepatocellular carcinoma proliferation[J]. Mol Cancer,2018,17(1):90

[17] Jen J, Tang YA, Lu YH, et al. Oct4 transcriptionally regulates the expression of long non-coding RNAs NEAT1 and MALAT1 to promote lung cancer progression[J]. Mol Cancer,2017,16(1):104

[18] Lee W C, Guntur A R, Long F, et al. Energy Metabolism of the Osteoblast: Implications for Osteoporosis[J]. Endocr Rev,2017,38(3): 255

[19] Zhang K, Shi Z M, Chang Y N, et al. The ways of action of long non-coding RNAs in cytoplasm and nucleus[J]. Gene,2014, 547(1):1

[20] Chen R, Wang G, Zheng Y, et al. Long non-coding RNAs in osteosarcoma[J]. Oncotarget,2017, 8(12):20462

（下转第 23 页）

接近。大多数化合物对正常细胞作用很弱,远低于阳性对照药,呈现高效低毒特性。

呋喃系列衍生物:对 T 淋巴细胞的增殖抑制活性,当引入呋喃环时其活性降低,当 5-位有吸电子基硝基的存在时其活性明显提高,引入卤素溴原子时其活性较土槿乙酸虽有提高,但比硝基取代时活性低,引入四氢呋喃酸时其活性则完全丧失。由此而推测当引入有吸电子基取代呋喃环时,形成了迈克尔反应受体,这种呋喃环的电子共轭体系导致了药理活性增加。B6 化合物活性接近于阳性对照药,而 B5 则完全失去活性,二者结构区别仅仅是-烯酸的取代位置不同,由此推测,引入呋喃丙烯酸有助于提高其药理活性,且 2 位取代优于 3 位。

芳香共轭体系系列衍生物:对 T 淋巴细胞的增殖抑制活性,其化合物活性 B7>B8>B9,而 B10 无活性。表明肉桂酸的引入有助于提高活性,当其芳环上有吸电子基取代时其活性降低,至于 B10,F 和 Br 原子的引入则导致完全丧失活性。据此而推测,吸电子基团不利于活性的提高,可能是通过吸电子基的引入降低了芳香环的电子云密度,进而影响与靶标的结合。

乙酸 C-18 醇成酯类化合物,引入呋喃环,抑制 T、B 淋巴细胞增殖活性明显增加, 引入具有共轭体系的呋喃环时活性更佳,并且毒性降低。对土槿乙酸构效关系的研究将促进新型免疫抑制剂的开发。

参考文献:

[1] 崔青云, 王小德. 金钱松研究进展与展望[J]. 北方园艺, 2010(20): 202

[2] 李晓翠, 苗爱东, 张洪峰, 等.土荆皮的研究进展[J].现代中西医结合杂志, 2014, 23(29):3301

[3] 李珠莲,陈科,潘德济, 等.土槿皮新二萜成分的研究Ⅲ. 土槿甲酸苷和土槿乙酸苷的分离及化学结构测定[J].化学学报, 1985, 43(8):786

[4] Li T,Wang W,Zhao J H,et al. Pseudolaric acid B inhibits T-cell mediated immune response in vivo viap38MAPK signal cascades and PPARγ activation[J]. Life Sciences,2015, 121:88

[5] 李覃, 董小青, 王翼腾, 等.土槿乙酸抑制接触性超敏反应的药效学研究及机制探讨[J].中国药理学通报,2014, 30(11): 1552

[6] 孟爱国, 刘春艳. 土槿乙酸诱导人胃癌 AGS 细胞凋亡机制的研究[J]. 肿瘤,2010, 30(6): 495

[7] Ma G Y, Li C, Li X C.Selective inhibition of human leukemia cell growth and induction of cell cycle arrest and apoptosis by pseudolaric acid B[J]. J Cancer Res ClinOncol, 2010, 136(9): 1333

[8] Gan L S,Yang S P, Fan C Q. Lignans and Their Degraded Derivatives from Sarcostemmaacidum [J]. J Natural Products, 2005, 68(2): 221

[9] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司西安公司,2004:379

(2018-04-20 收稿)

(上接第 9 页)

[21] Jin C, Zheng Y, Huang Y, et al. Long non-coding RNA MIAT knockdown promotes osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells[J]. Cell Biol Int,2017, 41(1):33

[22] Cui Y, Lu S, Tan H, et al. Silencing of long non-coding RNA NONHSAT009968 ameliorates the staphylococcal protein a-inhibited osteogenic differentiation in human bone mesenchymal stem cells[J]. Cell Physiol Biochem,2016, 39(4):1347

[23] Jin C, Jia L, Huang Y, et al. Inhibition of lncRNA MIR31HG promotes osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells[J]. Stem Cells,2016, 34(11):2707

[24] Liang W C, Fu W M, Wang Y B, et al. H19 activates Wnt signaling and promotes osteoblast differentiation by functioning as a competing endogenous RNA[J]. Sci Rep, 2016,6:20121

[25] Zhen L, Yun-Hui L, Hong-Yu D, et al. Long noncoding RNA NEAT1 promotes glioma pathogenesis by regulating miR-449b-5p/c-Met axis[J]. Tumour Biol,2016,37(1):673

[26] 张飞飞,深南,唐元家.LncRNA NEAT1 参与 TLR2 介导的炎症因子的表达[J].现代免疫学,2015,35(4):316

(2018-07-04 收稿)