

# Lnc-1708对体外人骨髓间充质干细胞成骨分化的抑制效应

曹峻川<sup>1</sup>, 孙翔<sup>2</sup>, 赵建江<sup>2</sup>

(南方医科大学 1. 口腔医学院, 2. 口腔医院口腔颌面外科, 广东 广州 510260)

**摘要:**【目的】探讨长链非编码 RNA-1708 (lncRNA-1708) 在人骨髓间充质干细胞(hBMSC)成骨分化中的表达差异及其对 hBMSC 成骨分化的影响。【方法】将购买的 3 组不同来源的 hBMSC 进行体外增殖培养, 并用实时荧光定量逆转录-多聚酶链反应(qRT-PCR)方法检测 3 组 hBMSC 成骨诱导分化前后 lncRNA-1708 的表达, 分析其与 hBMSC 成骨分化的关系。分别转染 lncRNA-1708 过表达慢病毒及 lncRNA-1708 干扰质粒, 获得稳定的 hBMSC 细胞株后成骨诱导分化 14 d, 用 qRT-PCR 检测 Runt 相关转录因子 2(*RUNX2*)、碱性磷酸酶(*ALP*) mRNA 的表达并行碱性磷酸酶染色。【结果】相较成骨诱导分化前, 3 组 hBMSC 成骨诱导分化 7 d 后 lncRNA-1708 表达量均降低( $P < 0.001$ )。在稳定高表达 lncRNA-1708 和低表达 lncRNA-1708 的 hBMSC 细胞株中 lncRNA-1708 的表达量较其对应的阴性对照相比有明显变化(lncRNA-1708 过表达细胞株: 48 h,  $P < 0.05$ ; lncRNA-1708 低表达细胞株: 48 h,  $P < 0.01$ )。与阴性对照组相比, 转染过表达 lncRNA-1708 的 hBMSC 中成骨相关基因 *RUNX2*、*ALP* 表达水平降低( $0.46 \pm 0.03$  vs.  $1.00 \pm 0.02$ ,  $0.15 \pm 0.07$  vs.  $1.02 \pm 0.28$ ,  $P$  均  $< 0.01$ )。相反, 沉默 lncRNA-1708 的 hBMSC 中的 *RUNX2*、*ALP* 表达水平与其对应的阴性对照组相比则升高了( $1.62 \pm 0.18$  vs.  $1.00 \pm 0.04$ ,  $1.58 \pm 0.11$  vs.  $1.01 \pm 0.18$ ,  $P$  均  $< 0.01$ )。【结论】lncRNA-1708 可能有抑制 hBMSC 的成骨分化的作用。

**关键词:** 人骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 长链非编码 RNA-1708; 抑制效应

**中图分类号:** R782.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2019)03-0343-08

## Inhibitory Effect of Lnc-1708 on Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in vitro

CAO Jun-chuan<sup>1</sup>, SUN Xiang<sup>2</sup>, ZHAO Jian-jiang<sup>2</sup>

(1. School of Stomatology, 2. Department of Surgery of Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510260, China)

Correspondence to: ZHAO Jian-jiang; E-mail: zjj2521@sina.com

**Abstract:** 【Objective】To investigate the differential expression of long non-coding RNA-1708 (lncRNA-1708) in osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSC) and its effect on osteogenic differentiation of hBMSC. 【Methods】Purchased 3 groups of hBMSC from different sources and cultured in vitro. qRT-PCR was used to detect the expression of lncRNA-1708 after osteogenic differentiation of three groups of hBMSC, and the relationship between lncRNA-1708 and hBMSC osteogenic differentiation was analyzed. lncRNA-1708 overexpressing lentivirus and lncRNA-1708 interferenced plasmid were transfected respectively, to obtain stable hBMSC cell line. After 14-day osteogenic differentiation on transfected hBMSC, RT-PCR was used to detect the expressions of runt-related transcription factor 2 (*RUNX2*) and alkaline phosphatase (*ALP*) mRNA, and alkaline phosphatase staining was made. 【Results】The expression of lnc-1708 decreased after osteogenic differentiation of hBMSC for 7 d ( $P < 0.001$ ). Two cell lines, which respectively express high lncRNA-1708 and low lncRNA-1708, were constructed successfully. In lnc-1708-overexpressed hBMSC, the mRNA levels of osteogenic markers *RUNX2* and *ALP* were both significantly down-regulated ( $0.46 \pm 0.03$  vs.

收稿日期: 2018-11-21

基金项目: 国家自然科学基金(81670950)

作者简介: 曹峻川, 硕士, 医师, E-mail: cjcpossessionflag@163.com; 赵建江, 通信作者, 博士, 主任医师, E-mail: zjj2521@sina.com

1.00±0.02, 0.15±0.07 vs. 1.02±0.28,  $P < 0.01$ ). On the contrary, in the lnc-1708-silencing BMSC, the expressions of *RUNX2* and *ALP* mRNA level were significantly up-regulated (1.62±0.18 vs. 1.00±0.04, 1.58±0.11 vs. 1.01±0.18,  $P < 0.01$ ). 【Conclusion】 LncRNA-1708 may have an inhibitory effect on osteogenic differentiation of hBMSC.

**Key words:** Human bone marrow mesenchymal stem cells; Osteogenesis; LncRNA-1708; inhibition

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(2): 343-350]

颌面部发生的外伤、肿瘤、先天畸形和牙缺失后导致的牙槽骨吸收等常引发患者颌面部骨组织缺损,造成颜面畸形,引起语言、咀嚼、呼吸等机能障碍,在患者的生理和心理上造成不良的影响。常规的自体及异体骨移植在兼具形态和功能的修复缺陷上,存在着各自的利弊和局限性。而骨组织工程的兴起为骨缺损修复开辟了新的方法<sup>[1]</sup>。骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMSC)是骨组织工程的重要种子细胞,有稳定的自我更新和增殖的能力,同时具有多种分化潜能,能够诱导分为成骨、成软骨、脂肪细胞等细胞谱系<sup>[2-3]</sup>。因此研究hBMSC成骨分化作用的机制,对探索颌面部骨缺损修复方法有着十分重要的意义。Long non-coding RNA(lncRNA)是目前被认知较多的一种非编码RNA,目前人类基因组计划(版本20, GRCH38)已经识别了24 489个lncRNA以及14 470个lncRNA基因转录本<sup>[4]</sup>。虽然越来越多的研究证实lncRNA参与了干细胞增殖分化的调控,但目前仅有少数已知的lncRNA,如lncRNA-NONHSAT009968, lncRNA-H19, lncRNA HoxA-AS3等<sup>[5-7]</sup>,被证实有调控hBMSC成骨分化的作用。本课题组前期通过高通量测序技术发现了未知lncRNA-1708,并发现其在hBMSC成骨分化前后具有表达差异性。因此,本研究用PCR检测lncRNA-1708在hBMSC成骨诱导分化前后的表达量,探讨其与hBMSC成骨分化的关系,同时通过构建慢病毒载体及干扰质粒调控lncRNA-1708在hBMSC中的表达,探讨lncRNA-1708对hBMSC成骨分化的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料及试剂

原代人骨髓间充质干细胞(scienccell-7500, 美国),成骨分化培养基(scienccell-7531, 美国); lncRNA-1708过表达慢病毒,慢病毒空载体阴性对

照(空载体, pBABE pure), lncRNA-1708干扰质粒(sh-lncRNA-1708), lncRNA-1708干扰质粒的阴性对照[sh-lncRNA-1708 negative control (PLKO.1)](苏州金唯智生物科技, 中国); 293FT细胞(invitrogen, 美国); cDNA反转录试剂盒-RR047A(TAKARA-RR047A, 日本); 荧光定量PCR试剂盒(TAKARA-FP215, 日本); 碱性磷酸酶染色试剂盒(sigma-85L1-1KT, 美国)。

### 1.2 细胞的复苏及传代培养

将冻存的原代hBMSC迅速放入37℃水浴中至完全融化,按 $5 \times 10^3$  /cm<sup>2</sup>接种密度将原代hBMSC接种于多聚赖氨酸包被的T-75培养瓶中,置37℃、体积分数为5%的CO<sub>2</sub>培养箱中培养。次日更换培养基以去除残留的DMSO和未贴壁细胞。此后每3d更换一次培养基,待细胞达到90%融合时应用适量0.25%胰酶/0.02%EDTA消化,按1:3传代扩增,进传代培养至P3代。

### 1.3 荧光定量PCR(RT-PCR)验证lncRNA-1708的表达情况

根据本实验前期的测序实验结果,取3组来源于不同个体hBMSC(货号均为scienccell-7500),按成骨分化前后分别设置实验组与对照组(P1-N1, P2-N2, P3-N3)。具体步骤:按每孔 $2 \times 10^4$  /cm<sup>2</sup>个细胞的密度将P3代的hBMSC接种于6孔板上,待细胞生长融合超过70%时,更换为间充质干细胞成骨分化培养基,每3d用新鲜成骨分化培养基完全替换培养基,成骨诱导分化7d后收集细胞。按照Trizol试剂盒操作说明书步骤提取细胞总RNA。引物序列, forward: 5'-CGTCACCTCTAC-CTCCTTAATAC-3', reverse: 5'-CAGGTTTTACTGCATATGTAGATAGTG-3'。

### 1.4 慢病毒包装

lncRNA-1708慢病毒载体和lncRNA-1708沉默质粒(sh-lnc-1708)均购买自苏州金唯智生物科技。在6孔板中接种120万细胞/孔(6孔板中),16h后,将构建好的载体按Lipofectamine 2000



抽提RNA, RT-PCR 检测 lnc-1708 的表达。

### 1.6 RT-PCR 检测成骨相关因子的表达

P3 代 hBMSC 以  $2 \times 10^4$  个/cm<sup>2</sup> 孔接种于 96 孔板中, 以每竖列的 3 孔为一组, 分别转染 lncRNA-1708 过表达慢病毒载体、sh-lncRNA-1708 干扰质粒及其相对应的阴性对照、转染后成骨诱导分化培养 14 d, 14 d 后收集细胞, RT-PCR 检测相关成骨基因 *RUNX2* 和 *ALP* mRNA 的表达量。引物设计, *RUNX2* forward: 5'-TTCACCTTGACCATAACCGTC-3', reverse: 5'-GGCGGTCAGAGAACAAGT-AG-3'; *ALP* forward: 5'-AGAATCTGGTGCAGGAA-TGG-3', reverse: 5'-TCGTATTCATGTCTCCAGG-C-3'; Sh-lncRNA-1708 forward: CCGGGTCACCTCTACCTCCTTAATACTCGAGTATTAAGGAGGTAG-AGGTGACTTTTTG, reverse: AATTCAAAAAGTCA-CCTCTACCTCCTTAATACTCGAGTATTAAGGAGG-TAGAGGTGAC。

### 1.7 碱性磷酸酶染色

将转染 lncRNA-1708 过表达慢病毒或 sh-lncRNA-1708 或相关阴性对照的间充质骨髓干细胞以每孔  $2 \times 10^4$  个细胞接种于 6 孔板内, 成骨诱导培养 14 d 后, 按碱性磷酸酶染色试剂盒说明书进行 ALP 染色。实验组及相关阴性对照细胞吸去培养基, 用 PBS 洗一遍, 加入 40 g/L 多聚甲醛溶液, 室温固定 3 min, 固定好的细胞中加入适量配好的染液, 避光静置 15~30 min, 15 min 之后每隔 5 min 观察一次, 待染色效果良好时, 再用 PBS 洗一遍, 即可观察染色结果。

### 1.8 构建 lncRNA-1708 的 CNC 共表达网络

对本次实验前期的测序结果, 我们采用了生物信息学软件 Cytoscape 对差异表达 lncRNA 和 mRNA 数据进行相关性分析, 并根据结果构建了 lncRNA-1708 与目标靶基因的 CNC 共表达网络。设置 lncRNA 和 mRNA 之间 Pearson 相关系数  $\geq 0.9$ , 以进一步讨论 lncRNA-1708 的机制研究。

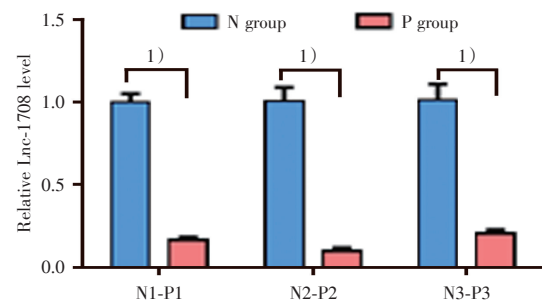
### 1.9 数据处理

采用 GraphPad Prism 7 制作统计学图, 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, lncRNA-1708、ALP、*RUNX2* 表达量采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算, 用 Shapiro-wilk 方法进行正态性检验, 并进行方差齐性检验。各组与对照组表达量的比较使用两独立样本 *t* 检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$  表示组间差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 lncRNA-1708 在 3 组人骨髓间充质干细胞成骨分化前后的差异性表达

将 3 组来自不同个体 hBMSC 的实验组 (P group) P3 代细胞经成骨诱导分化培养 7 d 后测定 lncRNA-1708 表达量, 与各组成骨诱导分化前 (N group) 相比较 (N1-P1, N2-P2, N3-P3), 3 组中的 lncRNA-1708 表达量均较成骨诱导分化前降低。各组成骨诱导分化前后的 lncRNA-1708 表达量差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ ; 图 2)。



After osteogenic differentiation, the expression levels of lnc-1708 decreased in the three groups while the *t* values were -14.706, -10.281, -7.927; *P* values were 0.000, 0.001, 0.001 respectively. Mean  $\pm$  SD,  $n=3$ , 1)  $P < 0.001$  between two groups.

图2 hBMSC 成骨诱导分化前与成骨分化后的 lncRNA-1708 表达量比较

Fig.2 Comparison of relative expression of lncRNA-1708 after osteogenic differentiation of hBMSC

### 2.2 lncRNA-1708 功能验证实验

2.2.1 lncRNA-1708 过表达慢病毒及 sh-lncRNA-1708 的转染效率的检测 hBMSC 分别转染 lncRNA-1708 过表达慢病毒、sh-lncRNA-1708 及其相对应的阴性对照, 2 d 后 qRT-PCR 检测 lncRNA-1708 的表达量。在 hBMSC 转染 lncRNA-1708 过表达慢病毒后, 较转染 pBABE pure 对照的细胞, lncRNA-1708 表达量明显升高 ( $P < 0.05$ )。在转染 sh-lncRNA-1708 的 hBMSC 后, 较转染 PLKO.1 载体对照的细胞, lncRNA-1708 的表达量明显下降 ( $P < 0.01$ ; 表 1)。

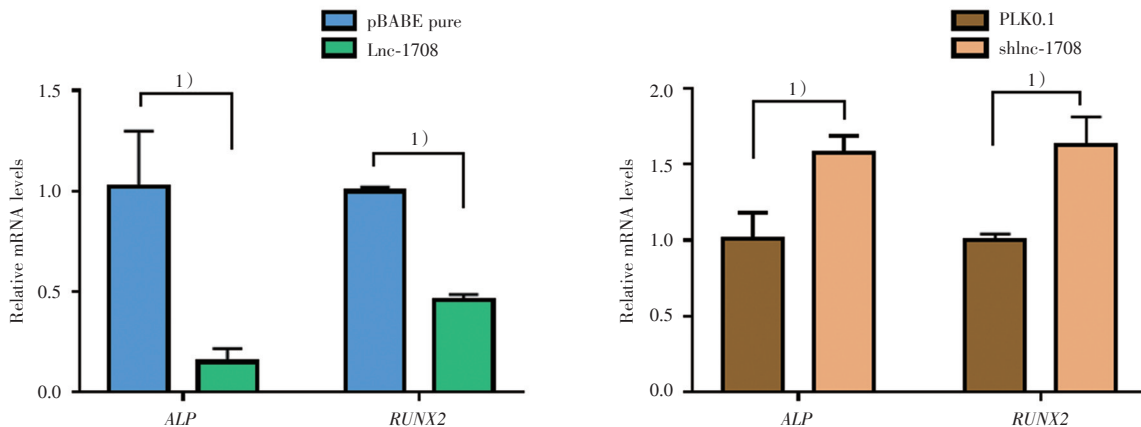
2.2.2 上调或下调 lncRNA-1708 对成骨相关因子的影响 成骨诱导分化培养转染后的 hBMSC, 14 d 后 RT-PCR 检测成骨标志因子 *RUNX2*、*ALP* 的

表1 hBMSC 中 Lnc-1708 转染效率检测  
Table 1 Expression of lnc1708 in hBMSC after transfection

Group	n	lncRNA-1708 expression	P	t
LncRNA-1708 overexpression lentivirus	3	26.979±5.718	0.015	-7.763
pBABE pure Control	3	1.138±0.741		
sh-lncRNA-1708	3	0.551±0.047	0.002	7.014
PLKO.1 Control	3	1.003±0.100		

mRNA 表达量。在上调 lncRNA-1708 的 hBMSC 中, *RUNX2* 及 *ALP* 的平均表达量分别是  $0.46 \pm 0.03$ 、 $0.15 \pm 0.07$  ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ); 在对照组转染 pBABE pure 的 hBMSC 中 *RUNX2* 及 *ALP* 的平均表达量分别是  $1.00 \pm 0.02$ 、 $1.02 \pm 0.28$ 。差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ; 图 3A)。而在转染 shlnc-1708

的 hBMSC 中, *RUNX2* 及 *ALP* 的平均表达量分别是  $1.62 \pm 0.18$ 、 $1.58 \pm 0.11$  ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ), 在转染对照组 PLKO.1 空白载的 hBMSC 中 *RUNX2* 及 *ALP* 的平均表达量分别是  $1.00 \pm 0.04$ 、 $1.01 \pm 0.18$ 。差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ; 图 3B)。



A: Compared with the control group (pBABE pure), the mRNA expressions of *ALP* and *RUNX2* were remarkably down-regulated in lnc1708-overexpressed hBMSC. B: The mRNA expressions of *ALP* and *RUNX2* were significantly up-regulated in the lnc-1708-silencing hBMSC compared to control group (PLKO.1). 1)  $P < 0.01$ .

图3 差异表达 lnc-1708 的 hBMSC 中相关 mRNA 的表达量

Fig.3 The expression of mRNA in hBMSC of differential expression in cRNA-1708

### 2.3 过表达或沉默 lncRNA-1708 对人骨髓间充质干细胞成骨分化的碱性磷酸酶染色结果

在成骨分化的过程中,碱性磷酸酶实验能够直观地判断成骨分化后的效果,它可反映出成骨细胞的活性状况。*ALP* 染色细胞质呈红色,提示 *ALP* 染色阳性。成骨诱导分化 14 d 后光镜下观察如图 4, *ALP* 染色直观图如图 5。

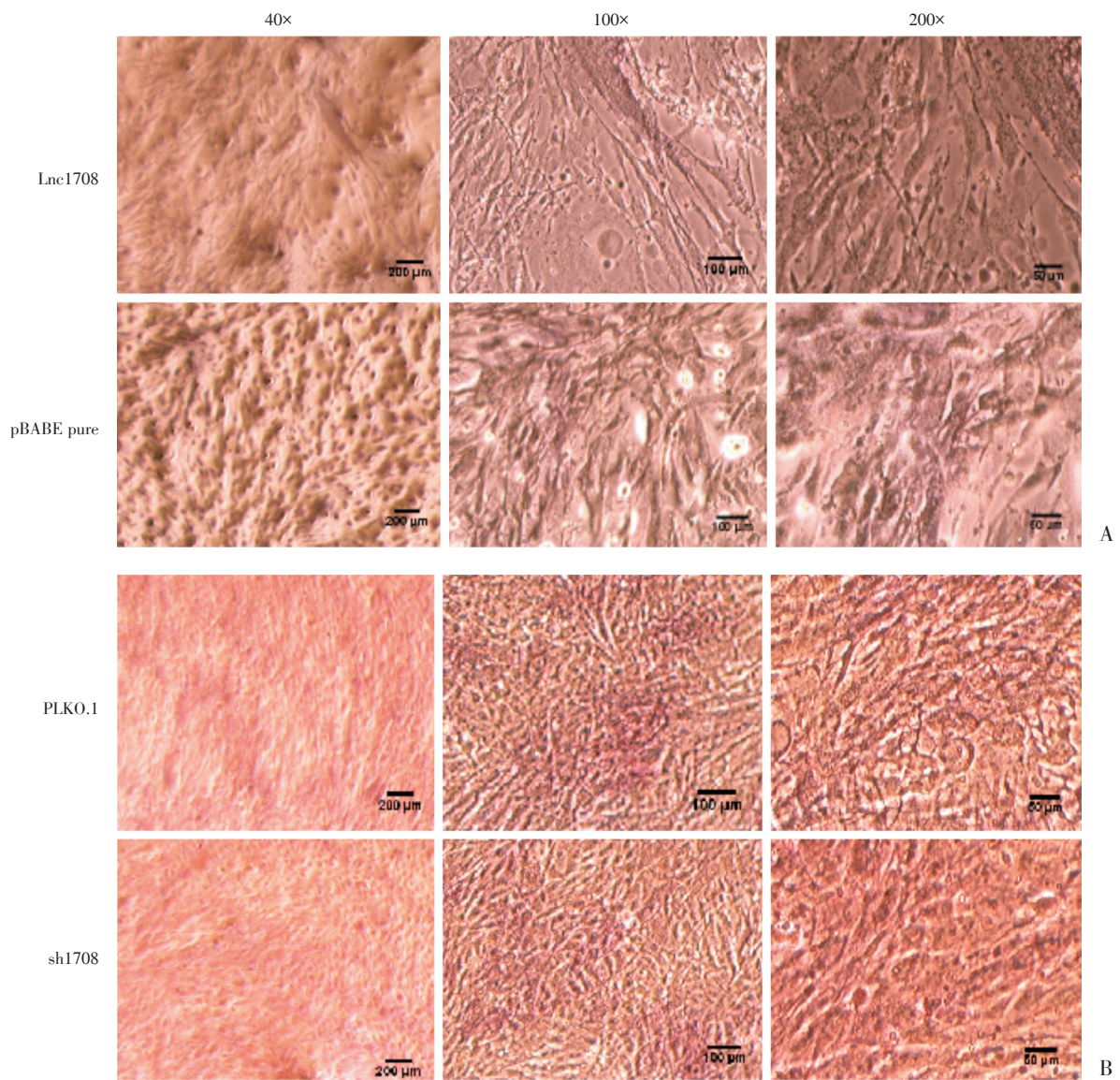
### 2.4 lncRNA-1708 和 mRNA 共表达分析结果

我们采用生物信息学软件 Cytoscape 对差异表达 mRNA 进行相关性分析,其中 pearson 相关系

数(皮尔逊相关系数)  $\geq 0.9$  的共有 13 条 mRNA (如图 6)。

## 3 讨论

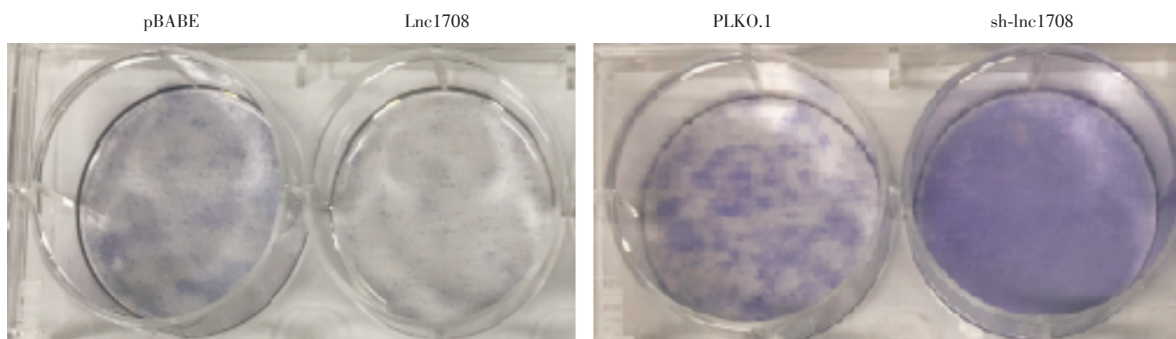
骨髓间充质干细胞是骨髓组织中的非造血干细胞,其具有多向分化潜能和高度的自我更新及增殖能力。在一定条件下骨髓间充质干细胞可以分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等多种细胞,是人体组织修复的重要细胞来源,是目前骨组



A: ALP staining lncRNA-1708-overexpressed hBMSC and their negative controls were compared at 40, 100, and 200 original magnification, respectively. B: The comparison of lncRNA-1708-silencing hBMSC and their negative controls, stained by ALP.

图4 成骨诱导分化14 d后碱性磷酸酶染色结果

Fig.4 Alkaline phosphatase staining results 14 d after induction



The right panel is lnc-1708-overexpressed hBMSC and negative control, the left panel is lnc-1708-silencing hBMSC and its negative control.

图5 成骨诱导分化14 d后碱性磷酸酶染色直观图

Fig.5 Alkaline phosphatase staining under naked eyes 14 d after induction

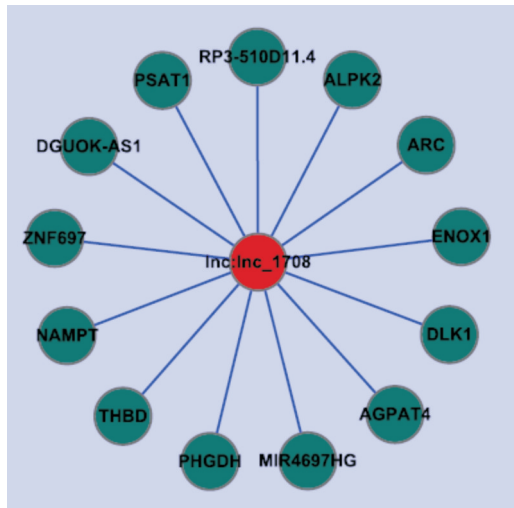


图6. LncRNA-1708的CNC共表达网络图

Fig.6 The coding-non-coding gene co-expression network of lncRNA-1708

织工程研究领域的理想细胞谱系<sup>[8]</sup>。对其机制的探究有助于骨组织工程的临床运用。

LncRNA是一种长度超过200 nt的非编码RNA,占ncRNAs总量的80%以上<sup>[9]</sup>。许多功能性的lncRNA具有稳定的二级结构、独特的亚细胞定位以及组织特异性表达模式。越来越多的研究表明虽然lncRNA不直接参与蛋白质的编码,但却能够通过参与DNA甲基化,参与调节基因的激活或沉默以及作为miRNA海绵及小分子RNA前体等多种方式来调节细胞的增殖和分化过程<sup>[10]</sup>。近年来,越来越多的研究发现lncRNA参与调节BMSC成骨分化。如Cao等<sup>[11]</sup>报道高糖环境通过抑制lncRNA AK028326和CXCL13的表达来抑制鼠类BMSC的成骨分化。Liang等<sup>[12]</sup>研究发现,H19可以作为miR-141和miR-22的海绵,通过经典的Wnt/ $\beta$ -catenin通路途径来调节hBMSC的表达。Shang等<sup>[13]</sup>发现TCONS\_00041960通过作为miR-204-5p和miR-125a-3p内源性竞争RNA来调节大鼠的BMSC成骨分化。Wang等<sup>[14]</sup>研究发现在绝经后骨质疏松病人中,lncRNA MEG3通过增强miR-133a-3p的表达抑制了BMSC的成骨分化,

加速骨质疏松症的发生。

LncRNA-1708是我们hBMSC成骨分化过程中利用高通量测序技术筛选出的差异表达倍数较大的全新长链非编码RNA,目前尚未有关于其与成骨分化的相关研究报道。为探讨LncRNA-1708在hBMSC成骨分化中的功能意义,本研究对LncRNA-1708进行了RT-PCR验证。验证的样本来自3个不同个体的骨髓间充质干细胞,成骨诱导分化7 d后,3组样本中的LncRNA-1708表达量均明显降低,证实了我们之前的测序结果。同时,也提示LncRNA-1708可能作为抑制成骨分化的lncRNA参与hBMSC生理活动。

ALP、RUNX2是成骨分化过程中重要的转录因子,是成骨细胞分化的标志基因,在骨形成及骨代谢的信号通路中发挥着重要作用<sup>[15-16]</sup>。本次研究通过构建lncRNA-1708过表达慢病毒及干扰质粒转染hBMSC的方法,发现lncRNA-1708的表达量与RUNX2、ALP的表达量呈现负相关,这进一步提示lncRNA-1708在hBMSC成骨分化中起着负向调节作用。

有文献报道称DLK1通过激活经典的NF- $\kappa$ B途径介导增加炎症细胞因子Cxcl2、Ccl3的产生,以及上调免疫应答相关基因Tnfa、Il7来促进破骨细胞的生成和抑制成骨细胞的分化与活性<sup>[17-18]</sup>。而在lncRNA-1708的CNC共表达网络中,我们发现lncRNA-1708和DLK1呈现高度相关,而且在之前的测序结果中lncRNA-1708和DLK1均表达下调。因此,我们提出设想,lncRNA-1708可能通过调控蛋白编码基因DLK1的表达来抑制hBMSC的成骨分化。

综上所述,本研究探究了在hBMSC体外成骨分化中LncRNA-1708的负向调控作用,但目前我们尚未对LncRNA-1708在hBMSC成骨分化中的具体作用机制进行研究,后续将探讨LncRNA-1708与其高度相关的DLK1等基因的关系,探究LncRNA-1708是否可以作为一条新的调节路径来调节成骨分化,以为骨组织工程的临床应用提供帮助。

#### 参考文献

[1] Kinoshita Y, Maeda H. Recent developments of functional scaffolds for craniomaxillofacial bone tissue engineering applications[J]. Sci World J, 2013,

2013:1-21.

[2] Frith JE, Thomson B, Genever PG. Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2010, 16(4):

- 735-749.
- [3] Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(4):313-319.
- [4] Tye CE, Gordon J AR, Martin-Buley LA, et al. Could lncRNAs be the missing links in control of mesenchymal stem cell differentiation? [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(3):526-534.
- [5] Huang Y, Zheng Y, Jia L, et al. Long noncoding RNA H19 promotes osteoblast differentiation via TGF-beta1/Smad3/HDAC signaling pathway by deriving miR-675 [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(12):3481-3492.
- [6] 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):1347-1359.
- [7] Zhu XX, Yan YW, Chen D, et al. Correction: Long non-coding RNA HoxA-AS3 interacts with EZH2 to regulate lineage commitment of mesenchymal stem cells [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(25):17978.
- [8] Panetta NJ, Gupta DM, Quarto N, et al. Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering [J]. *Panminerva Med*, 2009, 51(1):25-41. PMID: 19352307
- [9] Wang KC, Chang HY. Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs [J]. *Mol Cell*, 2011, 43(6):904-914.
- [10] Qin W, Li X, Xie L, et al. A long non-coding RNA, APOA4-AS, regulates APOA4 expression depending on HuR in mice [J]. *Nucl Acids Res*, 2016, 44(13):6423-6433.
- [11] Cao B, Liu N, Wang W. High glucose prevents osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via lncRNA AK028326/CXCL13 pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84:544-551.
- [12] Liang W, Fu W, Wang Y, et al. H19 activates Wnt signaling and promotes osteoblast differentiation by functioning as a competing endogenous RNA [J]. *Sci Reports*, 2016, 6(1).
- [13] Shang G, Wang Y, Xu Y, et al. Long non-coding RNA TCONS\_00041960 enhances osteogenesis and inhibits adipogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cell by targeting miR-204-5p and miR-125a-3p [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(8):6041-6051.
- [14] Wang Q, Li Y, Zhang Y, et al. LncRNA MEG3 inhibited osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from postmenopausal osteoporosis by targeting miR-133a-3p [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89:1178-1186.
- [15] Vimalraj S, Arumugam B, Miranda PJ, et al. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation [J]. *IntJ Bio Macromol*, 2015, 78:202-208.
- [16] Xu X, Jiang H, Li X, et al. Bioinformatics analysis on the differentiation of bone mesenchymal stem cells into osteoblasts and adipocytes [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4):1571-1576.
- [17] Abdallah BM, Ditzel N, Mahmood A, et al. DLK1 is a novel regulator of bone mass that mediates estrogen deficiency-induced bone loss in mice [J]. *J Bone Mineral Res*, 2011, 26(7):1457-1471.
- [18] Abdallah BM, Boissy P, Tan Q, et al. dlk1/FA1 regulates the function of human bone marrow mesenchymal stem cells by modulating gene expression of pro-inflammatory cytokines and immune response-related factors [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(10):7339-7351.

(编辑 刘清海)