

TUG1 对地塞米松诱导小鼠 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响*

刘亚楠^{1▲} 王 娜² 梁秋华² 张艳芳² 黄园园^{1▲} 于世鹏^{2△}
(¹ 济宁医学院临床医学院, 济宁 272013; ² 济宁医学院附属医院, 济宁 272029)

摘 要 **目的** 探讨长链非编码 RNA-TUG1 对地塞米松诱导小鼠 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响。**方法** 体外培养 MC3T3-E1 细胞, 建立细胞凋亡模型, 诱导凋亡 24h 后 qPCR 检测 TUG1 的表达。将重组质粒导入 MC3T3-E1 细胞, 获得稳定转染的细胞株, 实验分为对照组、地塞米松组、地塞米松 + TUG1 过表达质粒组、地塞米松 + 阴性质粒组, qPCR 检测 TUG1 的表达, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, 免疫荧光观察 Bcl-2 的表达, 计算平均荧光强度。**结果** 细胞凋亡模型成功建立, 荧光显微镜显示质粒转染 MC3T3-E1 细胞, qPCR 验证质粒转染成功 ($P < 0.05$); 地塞米松 + TUG1 过表达质粒组细胞凋亡明显低于地塞米松组和地塞米松 + 阴性质粒组, Bcl-2 的表达在地塞米松 + TUG1 过表达质粒组明显高于地塞米松组和地塞米松 + 阴性质粒组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** TUG1 可以通过上调 Bcl-2 的表达抑制地塞米松诱导的小鼠 MC3T3-E1 细胞凋亡, TUG1 可能是糖皮质激素诱导的成骨细胞凋亡的保护性因素。

关键词 成骨细胞; 细胞凋亡; 糖皮质激素; 长链非编码 RNA; TUG1

中图分类号: R34 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2019)06-153-05

Effect of TUG1 on dexamethasone-induced apoptosis in mouse MC3T3-E1 cells

LIU Yanan¹, WANG Na², LIANG Qiuhua², ZHANG Yanfang², HUANG Yuanyuan¹, YU Shipeng²
(¹ School of Clinical Medicine, Jining Medical University, Jining 272013, China;
² Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of long non-coding RNA-TUG1 in dexamethasone-induced mice MC3T3-E1 cell apoptosis. **Methods** MC3T3-E1 cells were cultured in vitro to establish a model of apoptosis. After induction of apoptosis for 24h, qPCR was used to detect the expression of TUG1. The recombinant plasmid was introduced into MC3T3-E1 cells to obtain a stably transfected cell line. The experiment was divided into control group, dexamethasone group, dexamethasone + TUG1 overexpression plasmid group and dexamethasone + negative plasmid group. qPCR was used to detect the expression of TUG1, and the apoptosis was detected by flow cytometry. Bcl-2 expression was observed by immunofluorescence, and the mean fluorescence intensity was calculated. **Results** The apoptosis model was successfully established. Fluorescence microscopy showed that plasmid transfected cells were correctly transfected with qPCR ($P < 0.05$). Apoptosis of dexamethasone + TUG1 overexpressing plasmid group was significantly lower than that of dexamethasone group and dexamethasone + negative plasmid group. Meanwhile, the expression of Bcl-2 was significantly higher in the dexamethasone + TUG1 overexpression plasmid group than in the dexamethasone group and the dexamethasone + negative plasmid group ($P < 0.05$). **Conclusion** TUG1 can inhibit the apoptosis of mouse MC3T3-E1 cells induced by dexamethasone by up-regulating the expression of Bcl-2. TUG1 may be a protective factor for glucocorticoid-induced osteoblast apoptosis.

Keywords: Osteoblasts; Apoptosis; Glucocorticoid; Long non-coding RNA; TUG1

* [基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划项目 (2016WS0168)

△ [通信作者] 于世鹏, E-mail: yushipeng@vip.sina.com

▲ 刘亚楠, 黄园园, 济宁医学院 2016 级研究生

继发性骨质疏松症是指由于药物或疾病原因导致的骨量减少、骨微结构破坏、骨脆性增加和易于骨折的代谢性疾病^[1]。在继发性骨质疏松中,以糖皮质激素性骨质疏松最为常见。当糖皮质激素直接或间接导致成骨细胞凋亡、功能下降时,或者影响破骨细胞功能时,会导致骨量丢失,促进骨质疏松的发生^[2]。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)在调控生长发育、细胞定向分化、增殖和凋亡方面具有重要作用^[3]。研究表明, lncRNA 在成骨细胞的分化中发挥着作用,过表达 ANCR 可以有效地抑制成骨细胞的分化^[4]。TUG1 是一种长度为 7.1kb 的 lncRNA,可影响细胞周期调控基因的表达^[5]。有研究发现, TUG1 基因的敲除可以抑制小鼠视网膜的发育, TUG1 的表达下调会抑制骨肉瘤细胞的增殖并促进骨肉瘤细胞的凋亡^[6-7]。由于成骨细胞为骨肉瘤的前体细胞^[8],我们推测, TUG1 在成骨细胞凋亡过程中通过信号通路发挥着一定作用。本实验中我们以地塞米松诱导小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 凋亡,将 TUG1 过表达质粒转染小鼠成骨细胞 MC3T3-E1,观察 TUG1 对小鼠成骨细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

MC3T3-E1 细胞(美国 ATCC 公司);DMEM 培养基、胎牛血清(Fatal Bovine Serum, FBS)、山羊血清(美国 Gibco 公司);0.25% 胰蛋白酶、地塞米松(Dexamethasone)、氨苄青霉素(Ampicillin)(美国 sigma 公司);青霉素、链霉素、细胞培养板、细胞培养瓶(美国 Labserve 公司);质粒小提试剂盒、RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);cDNA 第一链合成试剂盒、qPCR 预混体系(广州复能基因有限公司);AnnexinV-FITC、细胞裂解液(江苏碧云天生物技术研究);ELISA 细胞凋亡检测试剂盒、DAPI(德国 Roche 公司);Bcl-2 一抗、HRP 标记的山羊抗兔二抗(英国 Abcom 公司);Lipofectamine 2000 Reagent(美国 Invitrogen 公司);曲拉通 X-100(上海阿拉丁生化科技有限公司);抗荧光淬灭封片剂(北京索莱宝科技有限公司);TUG1 过表达质粒由上海吉凯基因化学技术有限公司编码测序。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

细胞复苏后接种于 25cm² 培养瓶中,用含有 10% 胎牛血清、1% 双抗(青霉素、链霉素)的 DMEM 培养,将细胞置于 37℃, 5% CO₂ 细胞培养箱内,隔天换液,待细胞汇片后以 0.25% 胰蛋白酶(含 EDTA)消化进行传代培养^[9]。

1.2.2 MC3T3-E1 细胞凋亡模型的建立 将细胞接种于 6 孔板上,待细胞汇片,实验分为 3 组,即对照组(DMEM 完全培养基)、无血清饥饿组(不含血清的 DMEM 培养基培养)、地塞米松组(DMEM 完全培养基 + 10μM 地塞米松),每组设 3 个平行实验,干预 24h 后行 qPCR 检测 TUG1 的表达。

1.2.3 TUG1 基因测序 lncRNA TUG1 基因序列为 GATCCCAGGGACTTGCAACCTGGTTATCTCGAGATAACCAGGTTGCAAGTCCCTTTTTTGGGA,该序列的设计合成以及测序均由上海吉凯基因化学技术有限公司完成。质粒扩增使用 TOP10 感受态细胞,使用质粒小提试剂盒完成质粒抽提。

1.2.4 PCR 引物设计 PCR 引物的设计合成是由上海生物工程有限公司完成,引物序列如下:

表 1 PCR 引物序列

名称	引物序列
上游引物	5'-GAGACACGACTCACCAGCA-3'
下游引物	5'-GAAGGTCAATTGGCAGGTCCA-3'

1.2.5 TUG1 过表达质粒转染 将小鼠 MC3T3-E1 细胞以 5×10^4 /孔接种到 6 孔板中,每孔加入 2ml 的 DMEM(含 10% 胎牛血清、1% 双抗)培养基中培养,细胞接种 24h 后,实验分 4 组:对照组、地塞米松组、地塞米松 + 阴性质粒组、地塞米松 + TUG1 过表达质粒组。以质粒 1.5μg/Lipo 2000 5μl 为转染条件,转染过程中使用不含胎牛血清的 DMEM 培养基培养细胞,转染 4h 后换液(DMEM 培养基含 10% 胎牛血清、1% 双抗),按分组加入 10μl 的地塞米松溶液。48h 后显微镜下观察荧光与细胞状态,以观察转染效率,使用荧光定量 PCR 检测 TUG1 表达,使用流式细胞术检测细胞凋亡。

1.2.6 TUG1 mRNA 检测 取干预结果的细胞,弃去培养基,用 PBS 冲洗 3 次,提取细胞总 RNA,合成 cDNA。根据 qPCR 试剂盒说明书进行 PCR 扩增,反应体系为:PCR Mix 10μl,上下游引物(2μmol/L)各 2μl,模板 2μl,加双蒸水至 20μl。扩增程序为:95℃ 10min 后,95℃ 10s,60℃ 20s,72℃ 30s,40 个循环。

1.2.7 细胞凋亡检测 吸出细胞培养基,使用 PBS 洗涤细胞 1 次,加入适量不含 EDTA 的蛋白胰酶消化液;室温孵育至贴壁细胞可轻轻吹打下来,吸除胰蛋白酶消化液,加入细胞培养液轻轻吹打细胞,1000g 离心 5min,弃上清,使用 PBS 重悬细胞并计数;根据上述的细胞计数,取 5 万的重悬细胞,1000g 离心 5min,弃上清,加入 195 μ l AnnexinV-FITC 结合液轻轻重悬细胞;加入 5 μ l AnnexinV-FITC 混匀;加入 10 μ l 碘化丙啶染色液,混匀;室温(20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C)避光孵育 20min,随后置于冰浴中;1 ~ 2h 完成上机。

1.2.8 Bcl-2 表达检测 细胞培养 24h 后转染,转染 48h 后采取免疫荧光法检测 Bcl-2,步骤如下:使用 0.3% 的曲拉通 X-100 破膜 10min, PBS 洗涤 3 次;10% 的山羊血清室温(25 $^{\circ}$ C)封闭 1h;使用避光湿盒一抗孵育过夜(20h), PBS 洗涤 3 次;使用避光湿盒二抗孵育 1h, PBS 洗涤 3 次;DAPI 染色 10min, PBS 洗涤 3 次,使用抗荧光淬灭封片剂封片,避光保存。

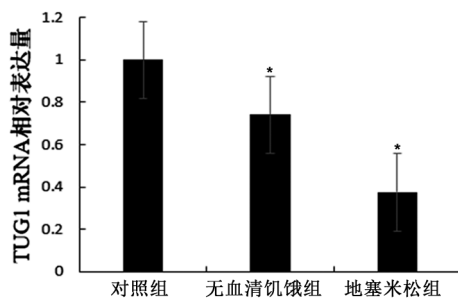
1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本间的均数比较采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TUG1 在小鼠 MC3T3-E1 的表达情况

与对照组相比,在地塞米松、无血清饥饿诱导的 MC3T3-E1 细胞中, TUG1 的表达显著降低,其中 TUG1 的表达下调在地塞米松诱导的 MC3T3-E1 细胞凋亡最明显,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

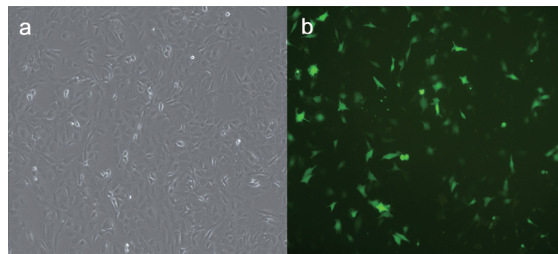


注:与对照组相比较, * $P < 0.05$, $n = 3$

图 1 无血清饥饿和地塞米松诱导的小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 凋亡对 TUG1 表达的影响

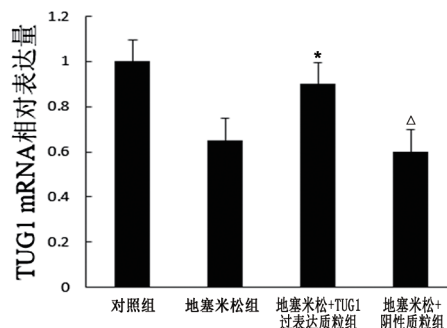
2.2 TUG1 转染小鼠 MC3T3-E1 细胞情况

如图 2 所示, TUG1 过表达质粒转染 MC3T3-E1 细胞后 48h 显微镜下细胞可见较多量绿色荧光。行荧光定量 PCR 检测 TUG1 的表达,结果显示 TUG1 mRNA 在地塞米松 + TUG1 过表达质粒组的表达较地塞米松组显著增多(图 3),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。



注:a. 明视野;b. 暗视野

图 2 TUG1 过表达质粒转染小鼠 MC3T3-E1 细胞后明、暗视野图片($\times 100$)



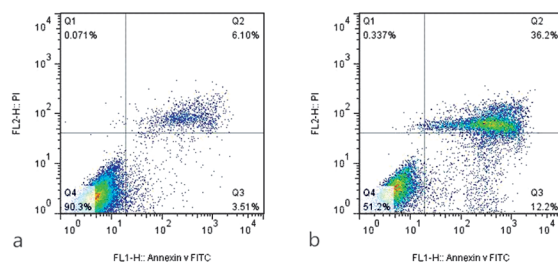
注:与地塞米松组比较, * $P < 0.05$;

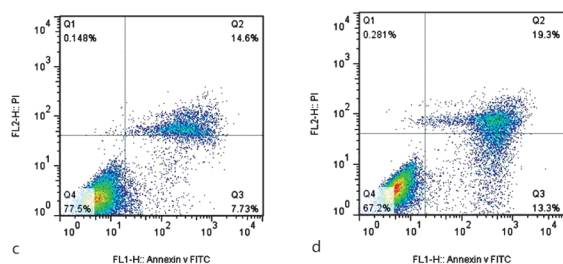
与地塞米松组比较, ^ $P > 0.05$, $n = 3$ 。

图 3 转染质粒后 MC3T3-E1 细胞中 TUG1 mRNA 的表达情况

2.3 TUG1 对地塞米松诱导小鼠 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响

质粒转染细胞后,地塞米松 + TUG1 过表达质粒组细胞凋亡比地塞米松组明显减少,而地塞米松 + 阴性质粒组没有明显变化。见图 4。



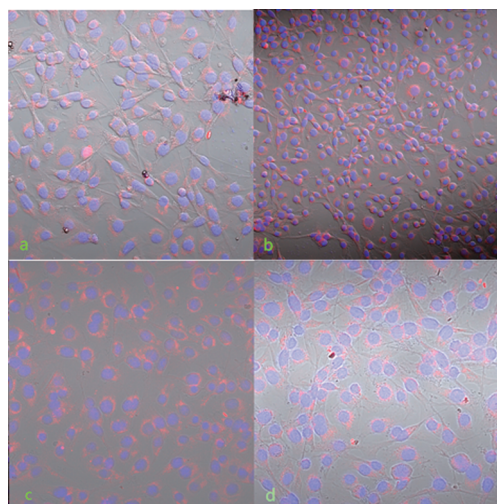


注: a. 对照组; b. 地塞米松组; c. 地塞米松 + TUG1 过表达质粒组; d. 地塞米松 + 阴性质粒组

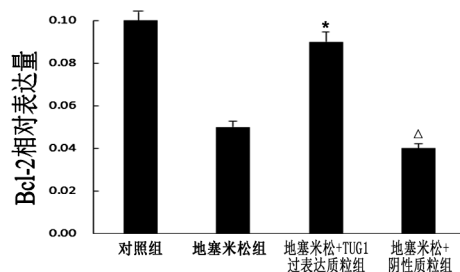
图 4 流式细胞术检测 TUG1 对地塞米松诱导的 MC3T3-E1 细胞凋亡的影响

2.4 TUG1 对 Bcl-2 表达的影响

结合 Image J 软件荧光定量分析, TUG1 过表达质粒组 Bcl-2 的表达较地塞米松组显著增加(图 5), 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 阴性对照组没有明显变化。



注: 比例尺, a-d, 50 μ m。Bcl-2 为红色荧光, DAPI 为蓝色荧光。a. 对照组(200 $\times$); b. 地塞米松组(200 $\times$); c. 地塞米松 + TUG1 过表达质粒组(200 $\times$); d. 地塞米松 + 阴性质粒组(200 $\times$)



注: 与地塞米松组比较, * $P < 0.05$;

与地塞米松组比较, $\Delta P > 0.05$, $n = 3$

图 5 TUG1 过表达质粒对 Bcl-2 表达的影响

3 讨论

在继发性骨质疏松症中以糖皮质激素诱导的

骨质疏松 (Glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP) 最为多见, 糖皮质激素通过减少成骨细胞的寿命和抑制新的成骨细胞的形成来抑制骨质形成, 因此糖皮质激素打破了成骨细胞和破骨细胞之间的动态平衡, 导致骨量减少, 甚至发生骨质疏松^[10]。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 在细胞生长、凋亡过程中发挥着作用。Ozgur 等^[11]研究发现, 遗传毒性应激所导致的 HeLa 和 MCF-7 细胞凋亡可以调控某些特定的 lnc-RNA 分化。在主动脉钙化中, TUG1 的敲除在体内和体外均可抑制成骨细胞的分化, TUG1 通过抑制 miR-204-5p 实现向调节 Runx2 的表达, 以此促进主动脉钙化性疾病中成骨细胞的分化^[12]。TUG1 在各种癌症类型中发挥重要作用, 其中包括骨肉瘤。TUG1 的敲除可以抑制骨肉瘤细胞的增殖促进其凋亡, 可以通过调节 miR-212-3p/FOXA1 轴来实现^[13-14]。成骨细胞是骨肉瘤的前体细胞, 我们可推测在成骨细胞凋亡过程中, TUG1 可能发挥着一定的作用, 然而目前关于二者相互作用的机制研究尚不明确。

在本实验中, 我们使用地塞米松、无血清饥饿诱导 MC3T3-E1 细胞凋亡, 用 qPCR 检测 TUG1 的表达。通过实验我们发现, TUG1 在地塞米松诱导的小鼠 MC3T3-E1 凋亡中表达显著降低, 提示 TUG1 与地塞米松诱导的成骨细胞凋亡密切相关, 这为我们后续的实验奠定了基础。随后, 我们构建 TUG1 过表达质粒, 使用该质粒转染 MC3T3-E1 细胞, qPCR 检测 TUG1 的表达, 结果显示地塞米松 + TUG1 过表达质粒组中 TUG1 表达上调较地塞米松组明显 ($P < 0.05$), 地塞米松 + 阴性质粒组则没有明显变化, 提示质粒转染成功。用流式细胞术检测细胞凋亡, 与对照组相比较, TUG1 过表达质粒组细胞凋亡显著减少, 提示 TUG1 可以抑制地塞米松诱导的 MC3T3-E1 细胞凋亡, 这说明在地塞米松诱导的 MC3T3-E1 细胞中, TUG1 是一种保护性因素。细胞凋亡为程序性凋亡, 线粒体在细胞凋亡过程中发挥重要作用^[15]。线粒体外膜的完整性由 Bcl-2 家族调控, Bcl-2 属于细胞溶质蛋白家族, 由抗凋亡蛋白 (如 Bcl-2, Bcl-XL) 和促凋亡蛋白 (如 Bax, Bak) 组成^[16]。当促进细胞凋亡的信号超过抗凋亡信号时, 抗凋亡因子 Bcl-2 蛋白的表达就会受到影响。为了进一步明确 TUG1 调控地塞米松诱导的 MC3T3-E1 细胞凋亡的具体机制, 我们使用免疫荧光检测在地塞米松诱导的 MC3T3-E1 细胞中 Bcl-2

的表达,结合荧光定量分析,结果显示,TUG1 过表达可显著上调 Bcl-2 的表达,提示 TUG1 可能通过上调 Bcl-2 的表达抑制地塞米松诱导的小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 细胞凋亡。

综上所述,地塞米松可以诱导小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 细胞凋亡,TUG1 是地塞米松诱导的成骨细胞凋亡的关键保护性因子。明确 TUG1 与成骨细胞凋亡的机制,可能会给我们在临床上治疗骨质疏松提供新的研究方向。鉴于作用机制的复杂性,在接下来的实验中,我们将进行体内实验,进一步探讨其可能的作用机制。

参考文献:

- [1] Liu K, Jing Y, Zhang W, et al. Silencing miR-106b accelerates osteogenesis of mesenchymal stem cells and rescues against glucocorticoid-induced osteoporosis by targeting BMP2[J]. Bone, 2017, 97: 130-138. DOI: 10. 1016/j. bone. 2017. 01. 014.
- [2] Huang ZF, Cheng C, Wang J, et al. Icarin regulates the osteoblast differentiation and cell proliferation of MC3T3-E1 cells through microRNA-153 by targeting Runt-related transcription factor 2[J]. Exp Ther Med, 2018, 15 (6) : 5159-5166. DOI: 10. 3892/etm. 2018. 6127
- [3] Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease[J]. Cell, 2013, 152(6): 1298-1307. DOI: 10. 1016/j. cell. 2013. 02. 012.
- [4] Zhu L, Xu PC. Downregulated LncRNA-ANCR promotes osteoblast differentiation by targeting EZH2 and regulating Runx2 expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 432 (4) : 612-617. DOI: 10. 1016/j. bbrc. 2013. 02. 036.
- [5] Han YH, Liu YC, Gui YT, et al. Long intergenic non-coding RNA TUG1 is overexpressed in urothelial carcinoma of the bladder[J]. J Surg Oncol, 2013, 107(5): 555-559. DOI: 10. 1002/jso. 23264.
- [6] Zhang Q, Geng PL, Yin P, et al. Down-regulation of long non-coding RNA TUG1 Inhibits osteosarcoma cell proliferation and Promotes apoptosis[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(4): 2311-5.
- [7] Xie CH, Chen BW, Wu BY, et al. LncRNA TUG1 promotes cell proliferation and suppresses apoptosis in osteosarcoma by regulating miR-212-3p/FOXA1 axis[J].

- Biomed Pharmacother, 2018, 97: 1645-1653. DOI: 10. 1016/j. biopha. 2017. 12. 004.
- [8] Sottnik JL, Campbell B, Mehra R, et al. Osteocytes serve as a progenitor cell of osteosarcoma[J]. J Cell Biochem, 2014, 115(8): 1420-1429. DOI: 10. 1002/jcb. 24793.
- [9] Liu WL, Zhao ZQ, Na YY, et al. Dexamethasone-induced production of reactive oxygen species promotes apoptosis via endoplasmic reticulum stress and autophagy in MC3T3-E1 cells[J]. Int J Mol Med, 2018, 41 (4) : 2028-2036. DOI: 10. 3892/ijmm. 2018. 3412.
- [10] Huyut Z, Bakan NR, Yildirm S, et al. Effects of the phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitors, avanafil and zaprinast, on bone remodeling and oxidative damage in a rat model of glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. Med Sci Monit Basic Res, 2018, 24: 47-58. DOI: 10. 12659/MSMBR. 908504.
- [11] Özgür E, Mert U, Isin M, et al. Differential expression of long non-coding RNAs during genotoxic stress-induced apoptosis in HeLa and MCF-7 cells[J]. Clin Exp Med, 2013, 13 (2) : 119-126. DOI: 10. 1007/s10238-012-0181-x.
- [12] Yu C, Li LF, Xie F, et al. LncRNA TUG1 sponges miR-204-5p to promote osteoblast differentiation through up-regulating Runx2 in aortic valve calcification[J]. Cardiovasc Res, 2018, 114(1): 168-179. DOI: 10. 1093/cvr/cvx180.
- [13] Jiang NX, Xia JW, Jiang B, et al. TUG1 alleviates hypoxia injury by targeting miR-124 in H9c2 cells[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 1669-1677. DOI: 10. 1016/j. biopha. 2018. 04. 191.
- [14] Li G, Liu KY, Du XH. Long non - coding RNA TUG1 promotes proliferation and inhibits apoptosis of osteosarcoma cells by sponging miR-132-3p and upregulating SOX4 expression[J]. Original Article. 2018, 59 (2) : 226-235. DOI: 10. 3349/ymj. 2018. 59. 2. 226.
- [15] Wei M, Duan DM, Liu YJ, et al. Autophagy may protect MC3T3-E1 cells from fluoride-induced apoptosis[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(6): 2309-2315. DOI: 10. 3892/mmr. 2014. 2079.
- [16] Liang QH, Liu Y, Wu SS, et al. Ghrelin inhibits the apoptosis of MC3T3-E1 cells through ERK and AKT signaling pathway[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 272 (3) : 591-597. DOI: 10. 1016/j. taap. 2013. 07. 018.

(收稿日期 2019-03-18)

(本文编辑:石俊强)