

LncRNA HAGLR 激活 RUNX2 并抑制 NLRP3 炎症小体对胫骨骨折愈合的影响

王 文,陈新宇,黄兹艺,邓杨柳,崔红旺

摘要 目的 研究长链非编码 RNA(LncRNA) HAGLR 对胫骨骨折(TF)小鼠的 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体表达和骨折愈合的影响并探讨机制。方法 体外对成骨细胞 MC3T3-E1 沉默 HAGLR, CCK-8 法检测细胞活力, TUNEL 法检测细胞凋亡, qPCR 法检测骨碱性磷酸酶(BALP)和骨钙素的表达。Western blot 法检测 RUNX2、磷酸化 RUNX2(p-RUNX2)以及 NLRP3、半胱天冬酶 1(Caspase1)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)的表达。通过小鼠 TF 手术建立 TF 小鼠模型,在模型小鼠体内过表达 HAGLR,并在过表达 HAGLR 的基础上沉默 RUNX2 或加入炎症小体抑制剂 MCC950。qPCR 法检测 HAGLR 和 RUNX2 的表达, Western blot 法检测胰岛素样生长因子-1(IGF-1)的表达。microCT 测量小鼠骨痂体积(MBV),称量小鼠的全长胫骨湿重。结果 沉默 HAGLR 导致 MC3T3-E1 细胞活力降低且凋亡率增加($P < 0.05$),且 RUNX2、p-RUNX2、BALP 和骨钙素表达量均降低($P < 0.05$), NLRP3、Caspase1、ASC、IL-1 β 的表达量都增加($P < 0.05$)。与健康组织比较,TF 小鼠体内 HAGLR 和 RUNX2 表达量降低($P < 0.05$)。过表达 HAGLR 促进 TF 小鼠体内的 HAGLR 和 RUNX2 表达,并增加 MBV 和全长胫骨湿重以及 IGF-1 的表达量($P < 0.05$)。在过表达 HAGLR 的基础上沉默 RUNX2 导致 TF 小鼠的 MBV、全长胫骨湿重和 IGF-1 表达量都降低($P < 0.05$)。而在过表达 HAGLR 的基础上加入 NLRP3 炎症小体抑制剂 MCC950 导致 MBV、全长胫骨湿重和 IGF-1 表达又增加($P < 0.05$)。结论 LncRNA HAGLR 通过激活 RUNX2 并抑制 NLRP3 炎症小体促进 TF 的愈合。

关键词 胫骨骨折;同源框 D 基因簇反义生长相关的长非编码 RNA;Runt 相关转录因子 2;NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3;炎症小体

中图分类号 R 683

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0830-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.021

骨折愈合是一个复杂且漫长的过程,多种生长

因子和细胞炎症因子参与骨折的愈合过程,负责调节细胞活化和成骨细胞增殖^[1-3]。研究^[4]发现,NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor pyrin domain-associated protein 3, NLRP3)炎症小体不仅能激活炎症反应而且还参与了骨质疏松进展的调控,在延迟骨折愈合的过程中扮演重要角色。然而,其上下游的调控机制并不清楚。长非编码 RNA(long non-coding RNA, LncRNA)是一类大于 200 个核苷酸的非编码转录本家族^[5],通过调节 Runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2, RUNX2)和炎症小体密切参与骨折愈合的调控^[6-8]。同源框 D 基因簇反义生长相关的长非编码 RNA(homeobox D gene cluster antisense growth-associated long noncoding RNA, HAGLR)是一种关键的 LncRNA^[9-11]。已知 HAGLR 在股骨颈骨折中表达降低^[12],但对胫骨骨折(tibial fracture, TF)的调控作用仍不清楚。该研究拟建立 TF 模型,探讨 HAGLR 对骨折的愈合作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 购于武汉普诺赛生命科技有限公司。DMEM 培养基购于美国 GIBCO 公司;胎牛血清购于美国 Merck Millipore 公司;沉默 HAGLR 的阴性对照(si-NC)、沉默 HAGLR 的小干扰 RNA 载体(si-HAGLR)、pcDNA3.1 空载体(pcDNA-null)、pcDNA3.1-HAGLR 过表达载体(pcDNA-HAGLR)、短发夹 RNA 载体阴性对照(sh-NC)、沉默 RUNX2 的短发夹 RNA 载体(sh-RUNX2)构建于上海吉玛制药技术有限公司;NLRP3 炎症小体抑制剂 MCC950 购于美国 MCE 公司;Lipofectamine 2000 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司;CCK-8 试剂盒、TUNEL 染色试剂盒、RIPA 裂解缓冲液购于上海碧云天生物技术有限公司;TRIzol 试剂购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司;TransScript 和 cDNA 合成试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;Universal SYBR Green Fast qPCR

2022-11-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81760260)

作者单位:海南医学院第一附属医院急诊和创伤外科,海口 570100

作者简介:王 文,男,主治医师;

崔红旺,男,博士,副主任医师,责任作者, E-mail: cqchw2013@sina.com

Mix Kit 购于美国 ABclonal 公司; GAPDH 购于美国 Cell Signaling Technology 公司; HRP 标记的亲山羊抗兔鼠 IgG (H + L) 二抗购于美国 Protein Tech Group 公司; PVDF 购于上海碧云天生物技术有限公司; RUNX2 一抗、p-RUNX2 一抗、胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 一抗购于美国 Cell Signaling Technology 公司; NLRP3、Caspase1、ASC、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的一抗购于北京生工生物工程有限公司。

1.1.2 实验动物 100 只成年雄性 C57BL/6 小鼠, 10 周龄, 体质量 (31.25 \pm 1.66) g, 购于海南药物研究有限责任公司 (许可证号: SCXK2020-0007)。所有小鼠均在受控温度 (21 ~ 23 $^{\circ}$ C) 下喂养, 12 h/12 h 光/暗周期模拟白天/夜晚变化, 并自由获取食物和水。本研究中使用的所有动物都按照机构动物护理指南接受了人道护理。所有手术和实验程序均通过海南医学院第一附属医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与建模 TF 小鼠建模方法按文献^[13]提供的方法, 用 1% 戊巴比妥钠按 1 ml/kg 腹腔注射麻醉小鼠后, 备皮、消毒小鼠右下肢, 在小鼠右侧膝关节下切开约 0.5 cm 纵行切口, 由腓腱处插入 22 G/0.41 mm 髓内固定针, 于胫骨中上 1/3 处分离肌肉及筋膜, 使用锯片锯断胫骨骨干后立即使用 0.9% 生理盐水冲洗胫骨表面, 再将髓内固定针完全插入并对合。逐层缝合切口, 制成 TF 模型小鼠。将 20 只小鼠按随机数表法分为健康组 (Normal 组, 正常饲养, $n = 10$) 和 TF 组 ($n = 10$)。另, 将 80 只雄性 C57BL/6 小鼠在 TF 术后 10 d, 随机分为 8 组进行治疗: pcDNA-null + TF 组 [pcDNA-null 以 20 μ g/(kg \cdot d) 静脉注射]; pcDNA-HAGLR + TF 组 [pcDNA-HAGLR 以 20 μ g/(kg \cdot d) 静脉注射]; sh-NC + TF 组 [sh-NC 以 20 μ g/(kg \cdot d) 静脉注射]; sh-RUNX2 + TF 组 [sh-RUNX2 以 20 μ g/(kg \cdot d) 静脉注射]; sh-NC + pcDNA-HAGLR + TF 组 [sh-NC 以 20 μ g/(kg \cdot d) 静脉注射, pcDNA-HAGLR 以 20 μ g/(kg \cdot d) 静脉注射]; sh-RUNX2 + pcDNA-HAGLR + TF 组 [sh-RUNX2 以 20 μ g/(kg \cdot d) 静脉注射, pcDNA-HAGLR 以 20 μ g/(kg \cdot d) 静脉注射]; saline + pcDNA-HAGLR + TF 组 [联合注射, 其中 saline 以 100 μ l/(kg \cdot d) 静脉注射, pcDNA-HAGLR 以 20 μ g/(kg \cdot d) 静脉注射]; MCC950 + pcDNA-HAGLR + TF 组 [联合注射: MCC950 以 20 mg/100 μ l/(kg \cdot d) 静脉注射, pcDNA-HAGLR 以 20 μ g/

(kg \cdot d) 静脉注射]。每组 10 只小鼠, 连续注射 4 周后分离全长胫骨并称湿重。随后将各组小鼠的胫骨组织保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中。

1.2.2 MC3T3-E1 细胞培养 使用含 10% 胎牛血清和 1% 青 - 链霉素的 DMEM 培养基在 37 $^{\circ}$ C 下, 含 95% 空气和 5% CO₂ 的培养箱中培养 MC3T3-E1 细胞。细胞每 2 d 换液一次, 取处于对数生长期的细胞用于后续实验。

1.2.3 MC3T3-E1 细胞转染 si-HAGLR 采用 Lipofectamine 2000 将 10 nmol/L si-NC 或 si-HAGLR 转染入 MC3T3-E1 细胞中。24 h 后收集细胞用于 qPCR 检测。

1.2.4 qPCR 检测 HAGLR、BALP、骨钙素和 RUNX2 的表达 收集 si-NC 组和 si-HAGLR 组细胞用于检测 HAGLR、骨碱性磷酸酶 (bone alkaline phosphatase, BALP)、骨钙素的表达。收集 Normal 组、TF 组、pcDNA-null + TF 组、pcDNA-HAGLR + TF 组、sh-NC + TF 组、sh-RUNX2 + TF 组、sh-NC + pcDNA-HAGLR + TF 组、sh-RUNX2 + pcDNA-HAGLR + TF 组骨组织 (用于检测 HAGLR 和 RUNX2 的表达, 骨组织研磨后浸入液氮粉化)。使用 Trizol 法提取待测组织或细胞的总 RNA。用 DNase I 处理 1 μ g 总 RNA, 进行逆转录。并根据制造商的说明, 使用 SYBR[®] Green PCR 进行 qPCR 分析。qPCR 引物序列见表 1。在 96 孔光学反应板中进行 40 个循环进行扩增, 1 个循环中 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 63 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s。以 GAPDH 作内参基因, 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算分析目的基因的表达水平。

表 1 qPCR 引物序列

基因	引物序列 (5'-3')
HAGLR	F: TCTGAAAGAAGGACCAAAGTAA R: ATTC AAGGACAGTCACAGG
BALP	F: TTACTCCGTTTAGAAAGGT R: TTGGAAGTAAAGCCCTGGA
osteocalcin	F: GTGTGTTATGTGGTCC R: CCCCTTAGACAGGTGTG
RUNX2	F: TCGAAAGCATGAAGGACAACG R: AGCACTCAGTCAACGTCTCAC
GAPDH	F: GAGTATGTGATTTATGCTAAG R: AGATGTAGTATTAGTAGTATT

1.2.5 CCK-8 检测 MC3T3-E1 细胞的增殖 根据生产商提供的说明, 将转染 si-NC 或 si-HAGLR 的 MC3T3-E1 细胞接种至 96 孔板中, 培养 24、48、72、96 h 后去除培养液, 在避光下向每孔加入 100 μ l 含

10% CCK-8 溶液的 DMEM 完全培养液,37 °C 孵育 4 h 后终止培养,室温下置于摇床振荡 5 min。在酶标仪上测定 450 nm 处吸光度值。实验重复 3 次。

1.2.6 TUNEL 检测 MC3T3-E1 细胞的凋亡 根据生产商提供的说明,于细胞爬片上培养 MC3T3-E1 细胞并转染 si-NC 或 si-HAGLR,培养 24 h 后去除培养液,在避光下向每孔加入 50 μ l TUNEL 试剂盒工作液,并继续孵育 12 h。DAPI 核染 15 min 后加入抗荧光淬灭液封片,荧光显微镜上观察拍照。细胞凋亡率 = TUNEL 阳性细胞/总细胞 \times 100%。

1.2.7 Western blot 检测 RUNX2 和 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达 收集各组细胞和每组小鼠股骨组织,将组织匀浆后,在冰上于 RIPA 裂解缓冲液中裂解细胞和组织。BCA 法测定细胞与组织中的蛋白浓度。取 50 μ g 蛋白样品,SDS-PAGE 凝胶进行分离。随后,转移蛋白到 PVDF 上。将 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭后,加入 RUNX2 和 p-RUNX2、NLRP3、Caspase1、ASC、IL-1 β 、IGF-1 一抗,并在在 4 °C 下孵育过夜。次日,加入 HRP 标记二抗在室温下孵育 2 h。随后用增强的化学发光试剂显色,并使用 Image J 软件进行分析。

1.2.8 微计算机断层扫描 (micro-computed tomography, micro-CT) 测量小鼠骨痂骨体积 (mouse bone volume, MBV) 近端干骺端区域内的骨形态测量使用 micro-CT 对胫骨进行量化。在背腹方向扫描 250 个切片(厚度 13 μ m)。使用三角测量算法进行骨骼的三维重建。测量小鼠骨痂骨尺寸,并生成 MBV 值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验分析两组的差异,使用单因素方差分析多组间差异,组间两两比较采用 LSD- t 检验分。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TF 小鼠骨折组织中 HAGLR 的表达 图 1A 为 TF 后不同周的 TF 小鼠的 X 光片。在第 1 周和第 2 周无骨愈合特征,第 4 周出现了骨愈合组织和骨折形态,这表明 TF 模型小鼠造模成功。qPCR 法检测结果显示:与 Normal 组比较,HAGLR 在 TF 组小鼠骨组织中表达下调[(7.05 \pm 1.21) vs (2.61 \pm 0.49)], $t = 8.662, P = 0.031$,差异有统计学意义,见

图 1B。

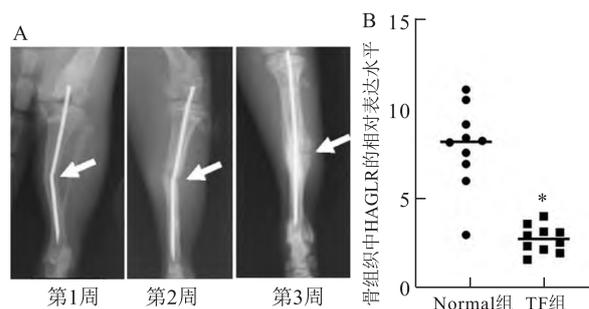


图 1 TF 模型观察及骨折组织中 HAGLR 的表达

A:TF 小鼠第 1、2、4 周代表性 X 光片,箭头指示骨折部位;B: qPCR 法检测小鼠骨折组织中 HAGLR 的表达,与 Normal 组比较;* $P < 0.05$

2.2 敲低 HAGLR 诱导小鼠成骨细胞的凋亡和 NLRP3 炎症小体的表达 qPCR 结果显示:与 si-NC 组比较,si-HAGLR 组 MC3T3-E1 细胞中 HAGLR 表达显著降低[(1.00 \pm 0.12) vs (0.46 \pm 0.03)], $t = 13.216, P = 0.002$,图 2A)。CCK-8 实验结果显示:与 si-NC 组比较,si-HAGLR 组 MC3T3-E1 细胞的增殖活力明显降低($F = 9.662, P = 0.014$,图 2B)。TUNEL 染色结果显示:与 si-NC 组比较,si-HAGLR 组 MC3T3-E1 细胞的凋亡率显著升高[(4.12 \pm 0.43)% vs (8.51 \pm 0.92)%], $t = 11.602, P = 0.003$,图 2C)。随后,通过 qPCR 检测 BALP mRNA 和骨钙素 mRNA 的表达水平来评估 HAGLR 对成骨细胞活性的调节作用,结果显示:与 si-NC 组比较,si-HAGLR 组 MC3T3-E1 细胞 BALP 和骨钙素的 mRNA 水平平均明显下调(BALP: $t = 15.236, P = 0.002$;骨钙素: $t = 13.251, P = 0.003$,图 2D、E)。Western blot 检测 NLRP3 炎症小体相关蛋白 NLRP3、Caspase1、ASC、IL-1 β 表达,结果显示:与 si-NC 组比较,si-HAGLR 组 MC3T3-E1 细胞中 NLRP3、Caspase1、ASC、IL-1 β 蛋白表达均明显升高(NLRP3: $t = 9.503, P = 0.035$;Caspase1: $t = 15.446, P = 0.003$;ASC: $t = 10.305, P = 0.007$;IL-1 β : $t = 8.528, P = 0.022$,图 2F~J)。

2.3 HAGLR 调控 RUNX2 的表达 在 MC3T3-E1 细胞中,与 si-NC 比较,si-HAGLR 组中 RUNX2 的 mRNA 和蛋白水平均显著降低($t = 17.089, 12.887, P = 0.001, 0.019$,图 3A、B),且 p-RUNX2 蛋白水平也降低($t = 12.007, P = 0.008$,图 3C)。在小鼠骨组织中,与 Normal 组比较,RUNX2 的 mRNA 在 TF 组

织中的表达水平明显降低 ($t = 7.669, P = 0.025$, 图3D)。在小鼠体内沉默 RUNX2 或者过表达 HAGLR, qPCR 结果显示: 与 pcDNA-null 组比较, pcD-

NA-HAGLR 组的 HAGLR 和 RUNX2 mRNA 表达水平平均明显升高 (HAGLR: $t = 12.606, P = 0.003$; RUNX2: $t = 14.662, P = 0.002$)。但与 sh-NC 组比

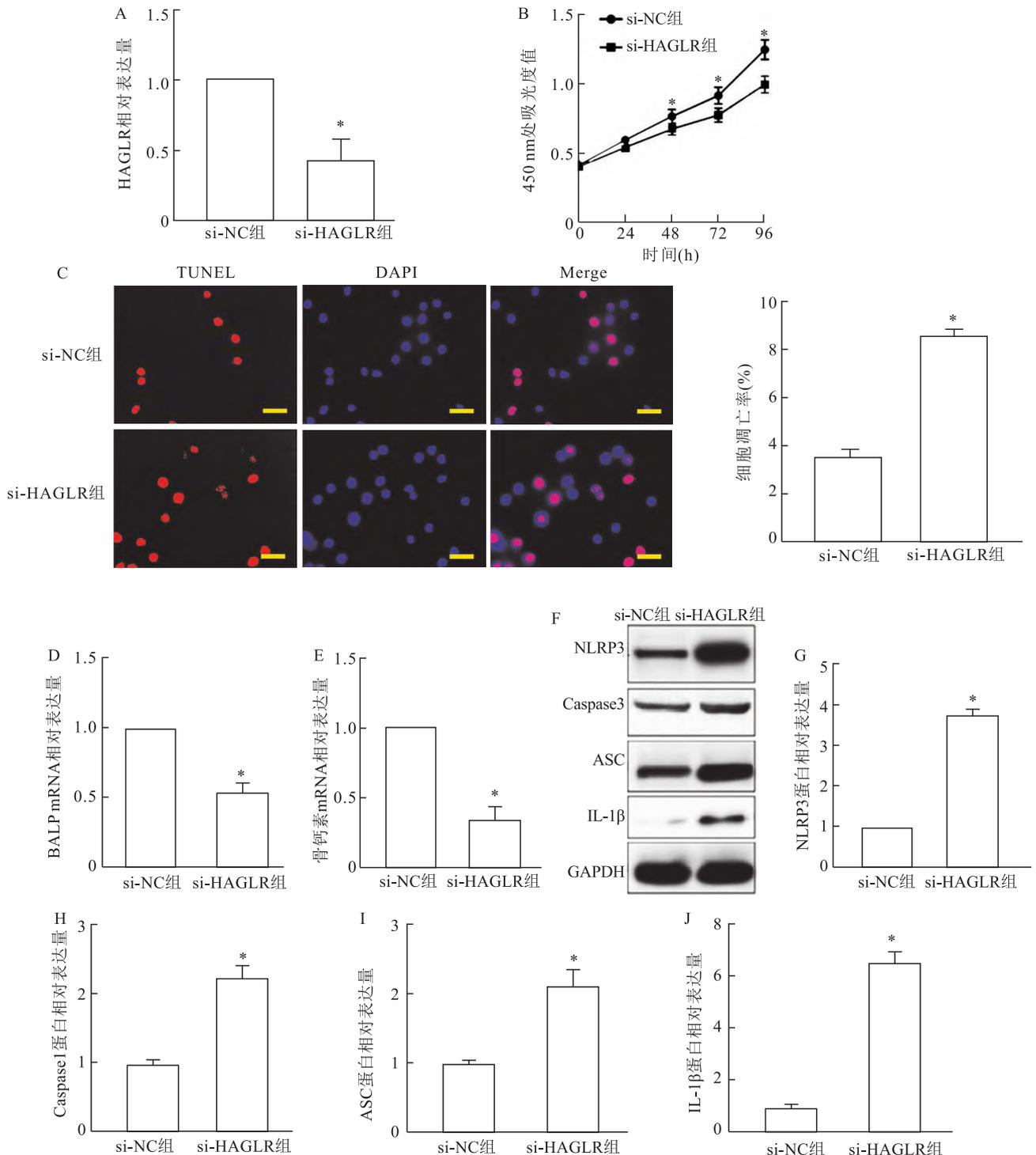


图2 敲低 HAGLR 诱导小鼠成骨细胞的凋亡和 NLRP3 炎症小体表达的影响

A: qPCR 检测 HAGLR 的表达; B: CCK-8 实验检测细胞增殖活性; C: TUNEL 实验检测细胞凋亡 (红色荧光: TUNEL 阳性, 蓝色荧光: DAPI 染色, $\times 400$); D、E: qPCR 检测 BALP 和骨钙素的表达; F ~ J: Western blot 法检测 NLRP3、Caspase1、ASC、IL-1 β 蛋白的相对表达量; 与 si-NC 组比较: * $P < 0.05$

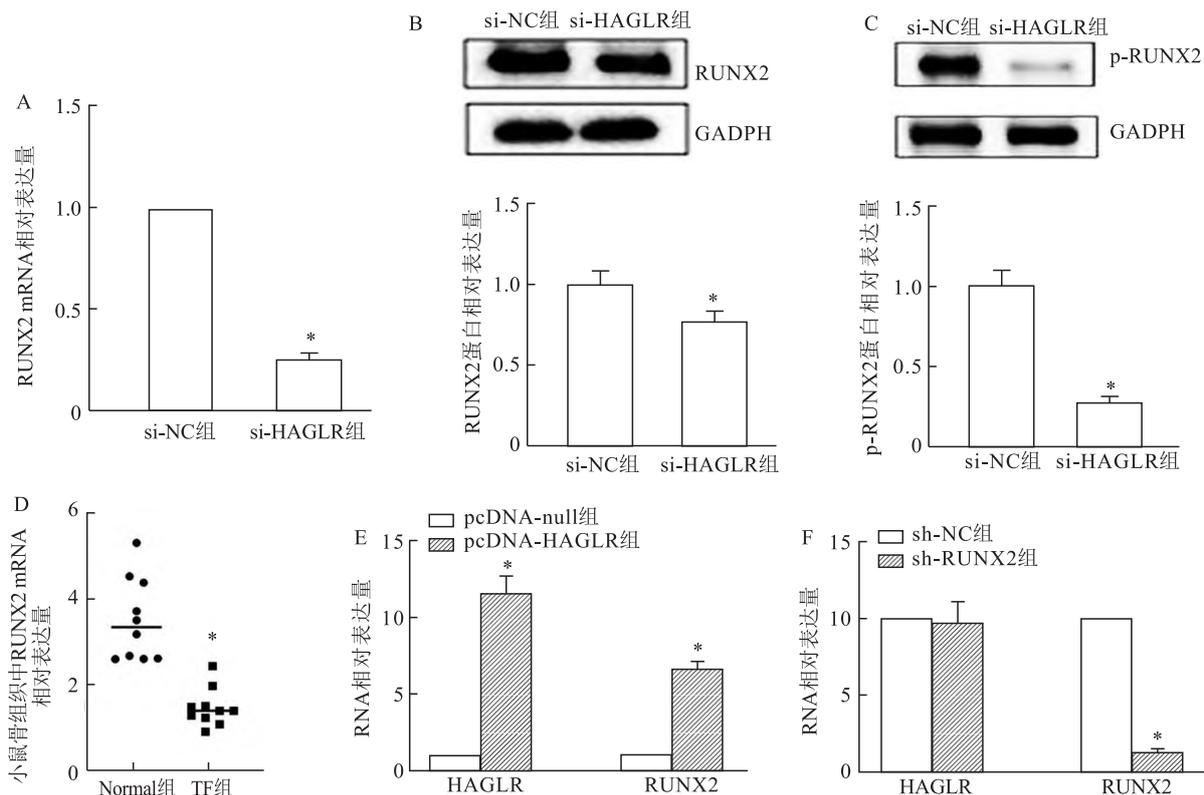


图3 HAGLR对RUNX2表达的影响

A~C: qPCR和Western blot检测RUNX2和p-RUNX2的表达,与si-NC组比较: * $P < 0.05$; D: qPCR检测TF小鼠骨折组织中RUNX2 mRNA的表达,与Normal组比较: * $P < 0.05$; E: TF组小鼠用pcDNA-null和pcDNA-HAGLR静脉治疗,qPCR检测RUNX2和HAGLR的表达,与pcDNA-null组比较: * $P < 0.05$; F: TF小鼠用sh-NC和sh-RUNX2静脉治疗,qPCR检测RUNX2和HAGLR的表达,与sh-NC组比较: * $P < 0.05$

较,sh-RUNX2组的HAGLR水平变化差异无统计学意义($t = 2.544, P = 0.179$),RUNX2 mRNA表达明显降低($t = 10.570, P = 0.016$),见图3E、F。

2.4 沉默RUNX2逆转HAGLR对小鼠骨组织愈合的促进作用 各组TF造模4周后骨组织愈合指标的比较结果显示:与Normal组比较,TF组、pcDNA-null + TF组、pcDNA-HAGLR + TF组、sh-NC + pcDNA-HAGLR + TF组和sh-RUNX2 + pcDNA-HAGLR + TF组的MBV($F = 116.332, P = 0.002$)、全长胫骨湿重($F = 103.899, P = 0.006$)、IGF-1蛋白表达水平($F = 96.177, P = 0.018$)均明显升高。与TF组比较,pcDNA-null + TF组的上述指标变化差异无统计学意义($P > 0.05$)。与pcDNA-null + TF组比较,pcDNA-HAGLR + TF组和sh-NC + pcDNA-HAGLR + TF组的MBV、全长胫骨湿重、IGF-1蛋白表达水平均明显增加($P < 0.05$)。而与sh-NC + pcDNA-HAGLR + TF组比较,sh-RUNX2 + pcDNA-HAGLR + TF组MBV、全长胫骨湿重、IGF-1蛋白表达均降低($P < 0.05$)。见图4。

2.5 抑制NLRP3炎症小体促进HAGLR对小鼠骨组织的愈合作用 用NLRP3炎症小体选择性抑制剂MCC950抑制NLRP3炎症小体的表达后比较各组小鼠骨组织愈合指标。结果显示:与Normal组比较,TF组、pcDNA-null + TF组、pcDNA-HAGLR + TF组、saline + pcDNA-HAGLR + TF组和MCC950 + pcDNA-HAGLR + TF组的MBV($F = 254.889, P = 0.001$)、全长胫骨湿重($F = 90.065, P = 0.022$)、IGF-1的蛋白表达水平($F = 108.254, P = 0.005$)差异均有统计学意义;与pcDNA-null + TF组比较,pcDNA-HAGLR + TF组和saline + pcDNA-HAGLR + TF组的MBV、全长胫骨湿重、IGF-1的蛋白表达水平差异均有统计学意义($P < 0.05$);与saline + pcDNA-HAGLR + TF组比较,MCC950 + pcDNA-HAGLR + TF组MBV、全长胫骨的湿重、IGF-1的蛋白相对表达量均明显增加($P < 0.05$)。见图5。

3 讨论

本实验在体内外水平探究了HAGLR调控TF

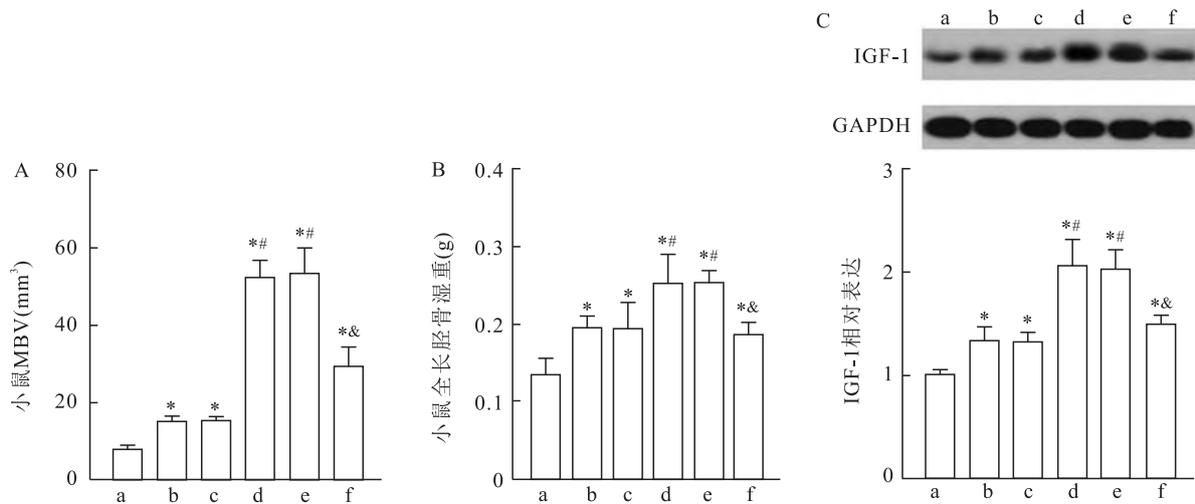


图4 沉默 RUNX2 逆转 HAGLR 对小鼠骨组织愈合的促进作用

A: 各组小鼠 MBV 的比较; B: 各组小鼠全长胫骨湿重的比较; C: Western blot 检测各组小鼠骨组织中 IGF-1 的蛋白表达水平; a: Normal 组; b: TF 组; c: pcDNA-null + TF 组; d: pcDNA-HAGLR + TF 组; e: sh-NC + pcDNA-HAGLR + TF 组; f: sh-RUNX2 + pcDNA-HAGLR + TF 组; 与 Normal 组比较: * $P < 0.05$; 与 pcDNA-null + TF 组比较: # $P < 0.05$; 与 sh-NC + pcDNA-HAGLR + TF 组比较: & $P < 0.05$

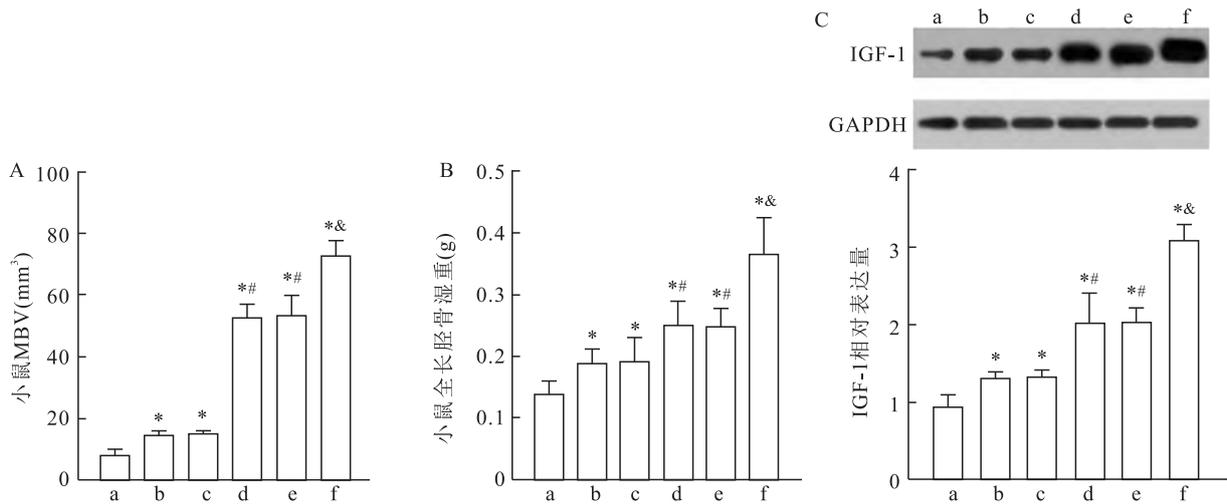


图5 抑制炎症小体促进 HAGLR 对小鼠骨组织愈合的促进作用

A: 各组小鼠 MBV 的比较; B: 各组小鼠全长胫骨湿重的比较; C: Western blot 检测各组 IGF-1 的蛋白表达水平; a: Normal 组; b: TF 组; c: pcDNA-null + TF 组; d: pcDNA-HAGLR + TF 组; e: saline + pcDNA-HAGLR + TF 组; f: MCC950 + pcDNA-HAGLR + TF 组; 与 Normal 组比较: * $P < 0.05$; 与 pcDNA-null + TF 组比较: # $P < 0.05$; 与 saline + pcDNA-HAGLR + TF 组比较: & $P < 0.05$

愈合的潜力,结果表明 HAGLR 在 TF 小鼠骨组织中表达降低,沉默 HAGLR 后小鼠成骨细胞中成骨标志物和 RUNX2 的表达均降低,但细胞凋亡率和 NLRP3 炎症小体表达水平增加。在 TF 小鼠中过表达 HAGLR 后不仅可促进 RUNX2 的表达增加,还明显改善了 MBV、全长胫骨湿重和 IGF-1 的蛋白表达量。沉默 RUNX2 则可明显抑制过表达 HAGLR 对 TF 小鼠 MBV、全长胫骨湿重、IGF-1 表达的上调功能,而抑制 NLRP3 炎症小体则进一步促进了 TF 小

鼠 MBV、全长胫骨湿重、IGF-1 的表达,提示 HAGLR 在 TF 骨折愈合中扮演重要角色。

既往研究^[11]报道称 HAGLR 在股骨骨折组织中下调,且可通过调控细胞增殖和凋亡参与调控骨折的愈合。本研究结果同样表明,HAGLR 在 TF 组织中的表达降低,且过表达 HAGLR 可以明显促进骨痂生长,而沉默 HAGLR 可以明显抑制前成骨细胞的增殖并促进凋亡,提示过表达 HAGLR 可能具有促进骨折愈合的功能。

影响骨折愈合的主要因素为骨折端的血供不良,导致骨营养缺乏。RUNX2 是促进骨折愈合的关键标志物,其可通过激活骨形态发生蛋白 2 通过 Smad 信号通路诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,从而促进骨折愈合^[14]。已有研究发现 LncRNA KCNQ1OT1 可上调 RUNX2 和骨钙素^[15],而且 lncRNA MEG3 也具有类似效果^[16],表明 LncRNA 可作为一种潜在的成骨细胞分化的重要分子。有研究^[17]报道 RUNX2 表达与骨形成密切相关,并且 RUNX2 的表达水平升高代表骨折愈合增加。本研究结果观察到 TF 骨组织中 RUNX2 表达降低,而过表达 HAGLR 则可以恢复 RUNX2 和 p-RUNX2 的表达,但沉默 HAGLR 则可以抑制成骨细胞中的 RUNX2 和 p-RUNX2,表明 HAGLR 会促进骨折愈合,与 RUNX2 的调控密切相关。研究^[17]发现,骨骼生长刺激因子 IGF-1 的缺乏对骨骼结构发育具有负面影响,如在快速生长和骨骼成熟的青春期,循环系统中 IGF-1 的含量明显增加,而敲除 IGF-1 表达则能抑制骨骼的生长。本研究在体内观察到 TF 小鼠过表达 HAGLR 不仅导致 MBV 和全长胫骨重量的明显增加,且过表达 HAGLR 也可导致 IGF-1 的表达量明显增加;而在过表达 HAGLR 基础上沉默 RUNX2 则可以明显抑制过表达 HAGLR 对 TF 小鼠 MBV、全长胫骨湿重、IGF-1 表达的上调功能,提示过表达 HAGLR 可能通过激活 RUNX2 促进 TF 的愈合。

研究^[18]表明,特异性抑制 NLRP3 炎症小体可明显增加糖尿病诱导的骨折模型中的 MBV、骨体积分数并抑制骨折组织中 IFN- γ 、TNF- α 和 IL-6 的表达,抑制小鼠 NLRP3 炎症小体还可以促进牙槽骨缺损的愈合,表明 NLRP3 炎症小体的抑制药可能是骨折愈合的潜在治疗药物。本研究发现沉默 HAGLR 后小鼠成骨细胞的凋亡率和 NLRP3 炎症小体均明显增加,在过表达 HAGLR 的基础上使用 NLRP3 炎症小体选择性抑制剂 MCC950 抑制 NLRP3 炎症小体的激活后 TF 小鼠的 MBV、全长胫骨的湿重和 IGF-1 的蛋白相对表达量都明显增加,表明过表达 HAGLR 可通过抑制 NLRP3 炎症小体促进 TF 的愈合。

综上所述,HAGLR 在 TF 中的表达明显降低,且其可通过促进 RUNX2 表达和抑制 NLRP3 炎症小体促进骨折愈合。本研究仍然存在一些局限性,如

缺乏对小鼠骨折愈合过程中 HAGLR 分子机制深入探讨,下一步课题组将进一步开展研究探讨。

参考文献

- [1] Pesciallo C A, Garabano G, Alamino L P, et al. Effectiveness of nail dynamization in delayed union of tibial shaft fractures: relationship between fracture morphology, callus diameter, and union rates [J]. *Indian J Orthop*, 2021, 56(3): 386-91.
- [2] Tarrant S M, Balogh Z J. The global burden of surgical management of osteoporotic fractures [J]. *World J Surg*, 2020, 44(4): 1009-19.
- [3] 曾昭池, 汤勇, 张先慧, 等. 外源性 Apelin-13 通过调控 VEGF/P13K/Akt 信号通路促进大鼠股骨骨折愈合 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(1): 48-53.
- [4] Jiang N, An J, Yang K, et al. NLRP3 inflammasome: a new target for prevention and control of osteoporosis? [J]. *Front Endocrinol*, 2021, 12(1): 1231-42.
- [5] Bridges M C, Daulagala A C, Kourtidis A. LNCcation; lncRNA localization and function [J]. *J Cell Biol*, 2021, 220(2): 1-10.
- [6] Liu Y B, Lin L P, Zou R, et al. Silencing long non-coding RNA MEG3 accelerates tibia fracture healing by regulating the Wnt/ β -catenin signalling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(6): 3855-66.
- [7] Ling Z, Wu L, Shi G, et al. Increased Runx2 expression associated with enhanced Wnt signaling in PDLA internal fixation for fracture treatment [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(5): 2085-93.
- [8] Gong Y Y, Peng M Y, Yin D Q, et al. Long non-coding RNA H19 promotes the osteogenic differentiation of rat ectomesenchymal stem cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(24): 8805-13.
- [9] Rao L, Luo L, Luo L, et al. Identification of plasma exosomes long non-coding RNA HAGLR and circulating tumor cells as potential prognosis biomarkers in non-small cell lung cancer [J]. *Transl Cancer Res*, 2019, 8(6): 2264-73.
- [10] Sun W, Nie W, Wang Z, et al. LncRNA HAGLR promotes colon cancer progression through sponging miR-185-5p and activating CDK4 and CDK6 *in vitro* and *in vivo* [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13(1): 5913-25.
- [11] Xie S C, Yang Y J, Zhang J Q, et al. HOXD-ASI: a novel oncogenic long intergenic non-coding RNA in humans [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(7): 2898-907.
- [12] Pan L X, Ding W. LncRNA HAGLR accelerates femoral neck fracture healing through negatively regulating miRNA-19a-3p [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(8): 4080-7.
- [13] 温轩, 谢杨丽, 苏楠, 等. 小鼠胫骨稳定性骨折模型制作及评价 [J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(5): 404-7.
- [14] Zhu Z, Xie Q, Huang Y, et al. Aucubin suppresses Titanium particles-mediated apoptosis of MC3T3-E1 cells and facilitates osteogenesis by affecting the BMP2/Smads/RunX2 signaling pathway

- [J]. *Mol Med Rep*,2018,18(3):2561–70.
- [15] Gao X, Ge J, Li W, et al. LncRNA KCNQ1OT1 promotes osteogenic differentiation to relieve osteolysis *via* Wnt/ β -catenin activation [J]. *Cell Biosci*,2018,8(1):1–12.
- [16] Liu Y B, Lin L P, Zou R, et al. Silencing long non-coding RNA MEG3 accelerates tibia fraction healing by regulating the Wnt/ β -catenin signalling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23 (6): 3855–66.
- [17] Qiu W X, Ma X L, Lin X, et al. Deficiency of Macf1 in osterix expressing cells decreases bone formation by Bmp2/Smad/Runx2 pathway [J]. *J Cell Mol Med*,2020,24(1):317–27.
- [18] Yang X, Qu C, Jia J, et al. NLRP3 inflammasome inhibitor glyburide expedites diabetic-induced impaired fracture healing [J]. *Immunobiology*,2019,224(6):786–91.

LncRNA HAGLR activates RUNX2 and inhibits NLRP3 inflammasome to promote tibial fracture healing

Wang Wen, Chen Xinyu, Huang Ziyi, Deng Yangliu, Cui Hongwang

(*Emergency and Trauma Surgery, The First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570100*)

Abstract Objective To study the effect of long non-coding RNA (LncRNA) HAGLR on the expression of NOD-like receptor pyrin domain-associated protein 3 (NLRP3) inflammasome and fracture healing in tibial fracture (TF) mice and to explore the mechanism. **Methods** First, HAGLR in osteoblast MC3T3-E1 was silenced by *in vitro*. Cell viability was detected by CCK-8 assay, cell apoptosis was detected by TUNEL assay, and the expressions of bone alkaline phosphatase (BALP) and osteocalcin were detected by qPCR. Western blot assay was used to detect the expressions of RUNX2, phosphorylated RUNX2 (p-RUNX2), NLRP3, cysteine aspartic protease 1 (Caspase1), apoptosis-associated spot-like protein (ASC) and interleukin-1 β . TF mouse models were established by tibial fracture operation in mice. HAGLR was overexpressed in the model mice, and RUNX2 was silenced or an inflammatory body inhibitor MCC950 was added on the basis of overexpression of HAGLR. The expressions of HAGLR and RUNX2 were detected by qPCR, and the expressions of insulin-like growth factor (IGF-1) were detected by Western blot. microCT was used to measure the volume of mouse callus (MBV) and the total tibial wet weight. **Results** The apoptosis rate of MC3T3-E1 cells increased and the expression levels of RUNX2, p-RUNX2, BALP and osteocalcin decreased ($P < 0.05$). The expressions of NLRP3, Caspase1, ASC and IL-1 β increased ($P < 0.05$). Compared with healthy tissue, the expressions of HAGLR and RUNX2 in TF mice decreased. Overexpression of HAGLR promoted the expressions of HAGLR and RUNX2 in TF mice, and increased the expression of MBV and tibia wet weight and IGF-1 ($P < 0.05$). Silencing RUNX2 on the basis of overexpression of HAGLR resulted in decreased expression of MBV, tibial wet weight and IGF-1 in TF mice ($P < 0.05$). However, the addition of NLRP3 inflammasome inhibitor MCC950 on top of the overexpression of HAGLR resulted in increased expressions of MBV, full-length tibia wet weight and IGF-1 ($P < 0.05$). **Conclusion** LncRNA HAGLR promotes the healing of tibial fractures by activating RUNX2 and inhibiting NLRP3 inflammasome.

Key words tibial fracture; homeobox D gene cluster antisense growth-related long non-coding RNA; Runt-related transcription factor 2; NOD-like receptor pyrin domain-associated protein 3; inflammasome