

·研究论著·

小鼠颌骨发育过程中 DMP1 基因相关 lncRNA 的表达研究

夏昕 阮毅 陈绛媛 孔祥波 伍虹

【摘要】目的 研究 C57 小鼠不同发育时期颌骨中 DMP1 基因附近长链非编码 RNA (lncRNA) 的表达变化情况。**方法** 利用 lncRNA 测序技术和实时定量 PCR (RT-PCR) 检测孕 18 d (E18D) 及出生后 2 周 (2W) 的 C57 小鼠颌骨组织样本中 DMP1 基因位置附近的 lncRNA 表达变化, 分析其与 DMP1 基因表达变化的关系。**结果** E18D 组与 2W 组间有 6 617 条差异表达的 lncRNA ($|\log_2 (2W/E18D)| > 1$ 且控制错误发现率 < 0.01), 其中有 5 条 lncRNA 在 DMP1 基因上游或下游 300 000 bp 以内。RT-PCR 分析显示, 2W 组中 DMP1 和 lnc19450 的表达较 E18D 组降低, 而 lnc30219、lnc8292、lnc30219 和 lnc32865 的表达较 E18D 组上升 (P 均 < 0.05)。**结论** lnc19450 的表达与 DMP1 基因的表达趋势一致, lnc30219、lnc8292、lnc30219 和 lnc32865 的表达与 DMP1 基因的表达趋势相反, 推测 lnc19450、lnc30219、lnc8292、lnc30219 和 lnc32865 可能在 DMP1 基因的表达调控起着重要的作用。

【关键词】 长链非编码核糖核酸; 牙本质基质蛋白 1 基因; 小鼠颌骨发育

Study of expression levels of DMP1 gene related-lncRNA in different developmental stages of jawbone in mice Xia Xin, Ruan Yi, Chen Jiangyuan, Kong Xiangbo, Wu Hong. Department of Stomatology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

Corresponding author, Wu Hong, E-mail: carriewh@hotmail.com

【Abstract】Objective To analyze the changes in the expression of long non-coding RNA (lncRNA) adjacent to the DMP1 gene in different developmental stages of jawbone in C57 mice. **Methods** The lncRNA sequencing and quantitative real-time PCR (RT-PCR) were performed to detect the expression profile of DMP1 gene-related lncRNAs at the embryonic day 18 (E18D) and 2 weeks after birth (2W) in the jawbone of C57 mice, and analyze the relationship between lncRNA expression and the changes in the expression of DMP1. **Results** Compared with the E18D group, 6 617 lncRNAs were differentially expressed in the 2W group ($|\log_2 (2W/E18D)| > 1$ and $FDR < 0.01$), among which, 5 lncRNAs were at the upstream or downstream of DMP1 gene position within 300 kb. RT-PCR demonstrated that the expression levels of DMP1 and lnc19450 in the 2W group were lower than those in the E18D group, whereas the expression levels of lnc30219, lnc8292, lnc30219 and lnc32865 were higher compared with those in the E18D group (all $P < 0.05$). **Conclusions** The expression trends of lnc19450 and DMP1 are consistent, whereas the expression patterns of lnc30219, lnc8292, lnc30219 and lnc32865 are opposite with that of DMP1 gene, suggesting that lnc19450, lnc30219, lnc8292, lnc30219 and lnc32865 may play a vital role in regulating the expression of DMP1 gene.

【Key words】 Long non-coding RNA; DMP1 gene; Mouse jawbone development

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2018.12.005

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (81200825); 广东省自然科学基金自由申请项目 (2017A030313501)

作者单位: 510120 广州, 中山大学孙逸仙纪念医院口腔科

通讯作者, 伍虹, E-mail: carriewh@hotmail.com

长链非编码 RNA (lncRNA) 是一类转录本长度超过 200 nt 的 RNA 分子, 不编码蛋白, 在生物体重要生命活动中发挥着极广泛的调控作用^[1-3]。lncRNA 的功能多样, 最重要的作用是参与基因表达的调节。目前研究表明, lncRNA 可以在启动子区通过顺式作用元件 (启动子或增强子) 或反式作用因子 (各种 DNA 结合因子) 调控相关基因的表达^[4-5]。牙本质基质蛋白 1 (DMP1) 是骨和牙本质特异性蛋白, 在牙和颌骨的分化、成熟过程以及正确调节骨和牙本质的矿化中具有复杂而重要的作用^[6-7]。DMP1 基因的正常表达是骨和牙齿正常发育、钙化、干细胞向骨和牙本质分化以及正常的矿物质代谢的基础^[8-9]。因此, 研究 DMP1 基因表达调控的变化具有重要意义。本研究利用 lncRNA 测序技术和实时定量 PCR (RT-PCR) 检测孕 18 d (E18D) 及出生后 2 周 (2W) 的 C57 小鼠下颌骨组织样本中 DMP1 基因位置附近的 lncRNA 的表达变化, 并分析它们与 DMP1 基因表达的趋势。

材料与方法

一、实验动物

孕 18 d 以及出生后 2 周的 C57 小鼠, 体质量 10~15 g, 购自中山大学动物实验中心, 饲养于中山大学 (大学城) 实验动物中心, 饲养环境为室温 20~22℃、12 h 光照-黑暗循环, 动物可自由取食及饮水。本研究的所有操作均遵守中山大学动物实验伦理规定。

二、主要试剂及仪器

Trizol 提取液和 RT-PCR 试剂盒均购自日本 Takara 公司; 引物由上海生工合成; Nanodrop2000 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; RT-PCR 仪 (ABI Stepone Plus) 购自美国 Applied Biosystems 公司; lncRNA-seq 高通量基因测序仪 (Illumina HiSeq™2000) 购自美国 Illumina 公司。

三、方 法

1. 取 材

取 2 只日龄为 14 d 的雄性 C57 小鼠与 6 只日龄为 16 d 的雌性 C57 小鼠分别合笼 (雄: 雌=1: 3), 次日通过观察雌鼠阴道栓情况确定是否受孕, 受孕

小鼠定义为孕 1 d, 以此精确记录怀孕时间获得 E18D C57 小鼠。对 E18D (3 只) 以及 2W (4 只) 小鼠逐只称重, 按体质量 0.01 ml/g 腹腔注射 5% 水合氯醛麻醉小鼠, 麻醉后的小鼠固定于干冰解剖台上, 于显微镜下解剖分离完整下颌骨组织, 液氮速冻, 保存于 -80℃ 冰箱。取材完成后, 采用颈部脱臼法处死小鼠, 按实验动物死亡处理方式处理, 麻醉及后续处理方法参考文献^[10]。

2. 总 RNA 抽提

取适量 (50~100 mg) 小鼠下颌骨组织样本, 用研钵在液氮环境下研磨, 按照试剂盒说明书步骤, 分别抽提 E18D 及 2W 小鼠的下颌骨组织总 RNA。对提取得到的 RNA 通过 Nanodrop2000 测定光密度值以及琼脂糖凝胶电泳检测完整性, 检测合格后, 其中一部分送基迪奥生物进行 lncRNA-Seq 高通量基因测序分析, 剩余部分用于后续的 RT-PCR 验证分析。

3. lncRNA 测序数据分析

采用 Illumina HiSeq™ 2000 进行测序, 对下机数据去除掉质量不合格的碱基序列及核糖体 RNA, 将得到的非编码序列与 Ensemble 基因组数据库进行比对。测序结果的统计分析基于泊松分布模型, 根据 lncRNA 的表达量 (RPKM 值) 计算该 lncRNA 在 E18D 组和 2W 组中的差异表达倍数 [$\log_2 (2W/E18D)$], 对差异检验的 *P* 值作多重假设检验校正, 通过控制错误发现率 (FDR) 决定 *P* 值的域值, 其中 $|\log_2 (2W/E18D)| > 1$ 且 $FDR < 0.01$ 的 lncRNA 为差异表达的 lncRNA。

4. RT-PCR

对 E18D 组和 2W 组样本中的 DMP1 基因以及在 DMP1 基因附近 (300 000 bp 以内) 差异表达的 lncRNA 进行 RT-PCR 分析。取 2 μg 总 RNA 按照逆转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit 步骤完成逆转录, 取 2 μl 逆转录产物使用 SYBR Green qPCR SuperMix 反应体系, 在 ABI Stepone Plus 系统上进行 RT-PCR 扩增, 引物序列见表 1。反应条件: 50℃ 2 min, 95℃ 2 min, 95℃ 15 s, 60℃ 32 s, 40 个循环。PCR 产物的特异性根据熔解曲线判定, 融解曲线分析温度 60~95℃。基因的相对表达量采用

表 1 RT-PCR 引物序列

引物	正向(5'→3')	反向(5'→3')	产物长度(bp)
GAPDH	GGCCTCCAAGGAGTAAGAAA	GCCCTCCTGTTATTATGG	141
DMP1	TGGTATCAGGTCGGAAGAATC	CCCTGCTGTTGCTGTCAGTA	161
lnc19450	TCAAGCAAGCTCACCAGACA	CCGTCAGCATGACAGTTCCA	150
lnc30219	AATACCCAAACATAGCAG	TATCGCCTCAAACCTACT	108
lnc8292	ACAAAGGACAGAGCCCAGAG	ATCCCACAAGCCAGGAAA	75
lnc17290	CGACTCTGGTTGTTTTGC	CACTCGTGTTAAAGCACACT	104
lnc32865	CTCAGCATCTCTGGTAAGGT	AGGTAGGGCATGGACTAGAA	130

2^{-ΔΔCt}法分析,内参基因为 GAPDH, E18D 组的目标基因表达设置为 1。每个样品均平行做 3 个复孔。

四、统计学处理

使用 SPSS 22.0 进行统计分析。E18D 组与 2W 组的基因相对表达量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、E18D 组和 2W 组中差异表达 lncRNA 的分析

通过 lncRNA 测序技术在 E18D 组和 2W 组中共鉴定到 38 566 条 lncRNA,其中 6 617 条在 E18D 组和 2W 组样本中差异表达,其中 $RPKM_{E18D} > RPKM_{2W}$ 共 3 720 条, $RPKM_{E18D} < RPKM_{2W}$ 的共 2 897 条。

二、DMP1 基因附近差异表达 lncRNA 的分析

对 6 617 条小鼠颌骨不同发育时期差异表达的 lncRNA 在基因组的位置以及其相对 DMP1 基因(5 号染色体, 104202613-104214102, Ensemble 数据库编号为 ENSMOSG00000029370)的距离进行分析,在 DMP1 基因附近获得 5 条差异表达的 lncRNA,见表 2。其中 lnc30219 和 lnc17290 在 DMP1 基因的上游,而 lnc19450、lnc8282 和 lnc32865 在

DMP1 基因的下游, lnc19450 距离 DMP1 基因最近,为 16 505 bp。

三、E18D 组和 2W 组中 DMP1 及其基因附近 5 条 lncRNA 的 RT-PCR 分析

DMP1 基因在 2W 组相对表达水平低于 E18D 组(*P* < 0.05)。E18D 与 2W 组间差异表达且位于 DMP1 基因附近的 5 条 lncRNA 中, lnc19450 在 2W 组中相对 E18D 组的表达水平下降, lnc30219、lnc8292、lnc30219 和 lnc32865 在 2W 组中相对 E18D 组的表达水平上升(*P* 均 < 0.05),其中 lnc32865 相对表达水平最高,见图 1、表 3。

讨 论

lncRNA 在生物体重要生命活动中发挥极广泛的调控作用^[9]。大多数的 lncRNA 在组织分化发育过程中,具有明显的时空表达特异性、组织或细胞特异性^[10]。目前对于在颌骨发育过程中起着重要作用的 lncRNA 未见报道,为了筛选出在小鼠颌骨不同发育时期差异表达的 lncRNA,我们采用 E18D 和 2W 的 C57 小鼠下颌骨组织为研究材料,利用 Illumina HiSeq™2000 平台的 lncRNA 测序技术在 E18D

表 2 DMP1 基因附近差异表达的 lncRNA

lncRNA 编号	基因组位置(5号染色体)		相对 DMP1 基因的位 置及距离	长度 (bp)	log2 (2W/E18D)	FDR
	起始位置坐标	终止位置坐标				
lnc19450	104230607	104234939	下游 16 505 bp	771	-11.17	0.000004
lnc30219	104133267	104133960	上游 68 707 bp	644	1.96	0.004651
lnc8292	104462096	104462392	下游 248 044 bp	247	1.13	0.009706
lnc17290	103904369	103904979	上游 297 638 bp	632	1.85	0.007760
lnc32865	104512656	104513788	下游 298 554 bp	1133	6.28	0.003469

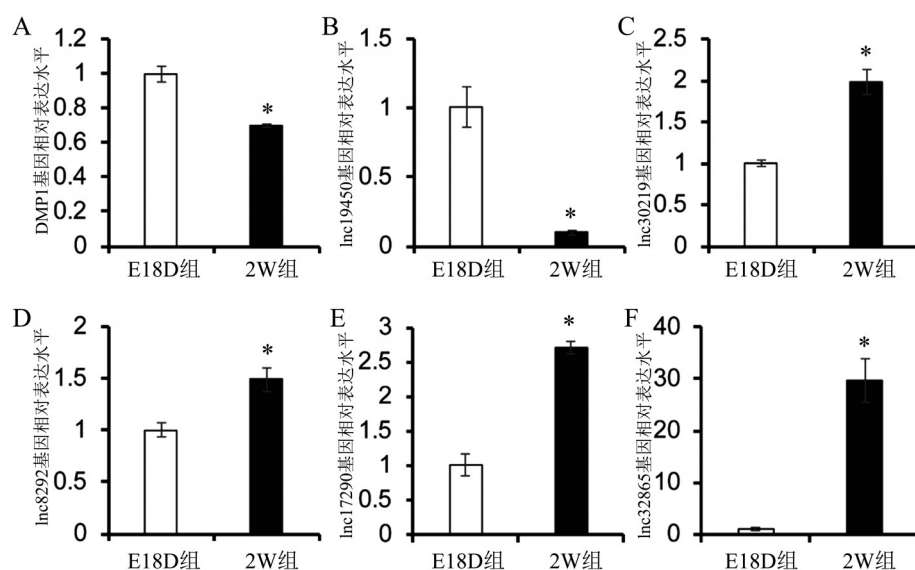


图1 E18D组和2W组中DMP1基因及附近5条lncRNA的相对表达水平
与E18D组相比, * $P<0.05$

表3 E18D组和2W组中DMP1基因及附近5条lncRNA的相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

基因或lncRNA名称	E18D组($n=3$)	2W组($n=4$)	t 值	P 值
DMP1	1.00±0.04	0.69±0.01	11.371	<0.001
lnc19450	1.00±0.09	0.09±0.01	10.492	<0.001
lnc30219	1.00±0.04	1.98±0.15	10.369	<0.001
lnc8292	1.00±0.06	1.48±0.11	6.403	0.003
lnc17290	1.00±0.15	2.71±0.09	16.084	<0.001
lnc32865	1.01±0.20	29.77±4.21	11.811	<0.001

组和2W组样本中,共检测出38 566条lncRNA。通过差异表达倍数(2倍及以上)和多重假设检验校正($FDR<0.01$)分析,共获得6 617条在E18D组和2W组样本中差异表达的lncRNA,其中 $RPKM_{E18D}>RPKM_{2W}$ 共3 720条, $RPKM_{E18D}<RPKM_{2W}$ 的共2 897条,上述结果提示在小鼠颌骨不同发育时期差异表达的lncRNA可能在小鼠颌骨发育过程起着重要的作用。

lncRNA可以通过多种方式调节基因的转录,如通过表观遗传修饰途径包括组蛋白修饰(乙酰化、甲基化等)方式或DNA甲基化等调控基因的表达水平^[12-13]。lncRNA也可以作用于启动子、转录因子,抑制下游蛋白质基因的表达;抑制目的基因转录,转录干扰等在基因转录水平进行调控^[14-16]。DMP1在牙和颌骨的分化、成熟过程以及正确调节骨和牙本质的矿化中具有复杂而重要的作用,骨细

胞中DMP1基因表达的时空特异性可能受非编码区的顺式调节区调控^[17]。lncRNA具有时空表达特异性,并可以通过顺式作用元件调节机制调控目的基因的表达。为了筛选出可能通过顺式作用元件调节机制参与调控DMP1基因表达的lncRNA,本研究对6 617条lncRNA在基因组的位置以及其相对DMP1基因的距离进行初步分析,在距离DMP1基因300 000 bp以内区域获得5条差异表达lncRNA,分别为lnc19450、lnc30219、lnc8292、lnc30219和lnc-32865,其中lnc19450距离DMP1基因最近。为了对lncRNA测序的结果进行验证,本研究采用RT-PCR对DMP1基因以及5条lncRNA在E18D组和2W组样本中的表达水平进行分析。在2W组中,DMP1基因的表达水平相比E18D组降低,这一结果也与已经发表的文献报道一致^[18-20]。E18D组与2W组中5条lncRNA的表达水平比较差异均有统计学意义,

与 lncRNA 测序结果一致。lnc19450 的表达与 DMP1 基因的表达趋势一致，而 lnc30219、lnc8292、lnc30219 和 lnc32865 的表达在 2W 组中上升，与 DMP1 基因的表达趋势相反，其中 lnc32865 相对表达水平最高。由此推测，lnc19450、lnc30219、lnc8292、lnc30219 和 lnc32865 可能在 DMP1 基因的表达调控中起着重要的作用，其中距离 DMP1 基因较近的 lnc19450 和相对表达水平较高的 lnc32865 可能与 DMP1 的关系较为密切。上述研究结果为进一步阐明 lncRNA 调控 DMP1 基因表达的分子机制提供了基础，在后续实验中，我们将运用过表达或小干扰 RNA 沉默技术，阐明相应 lncRNA 在过表达或抑制后 DMP1 的表达情况，探讨 lncRNA19450 或 lncRNA32865 对 DMP1 的 mRNA 表达的调控作用以及成骨细胞矿化作用的影响，再通过 RNA 结合蛋白免疫沉淀、凝胶迁移实验和启动子双荧光素实验等分析手段，揭示 lncRNA19450 或 lncRNA32865 是否通过结合 DMP1 基因的启动子区形成组蛋白修饰复合物的分子机制调控 DMP1 基因的表达，从而明确其在颌骨发育过程中的作用及相关作用机制。

参 考 文 献

- [1] Bassett AR, Akhtar A, Barlow DP, Bird AP, Brockdorff N, Duboule D, Ephrussi A, Ferguson-Smith AC, Gingeras TR, Haerty W, Higgs DR, Miska EA, Ponting CP. Considerations when investigating lncRNA function in vivo. *Elife*, 2014, 3: e03058.
- [2] Tuo YL, Li XM, Luo J. Long noncoding RNA UCA1 modulates breast cancer cell growth and apoptosis through decreasing tumor suppressive miR-143. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19 (18): 3403-3411.
- [3] Zhao W, An Y, Liang Y, Xie XW. Role of HOTAIR long noncoding RNA in metastatic progression of lung cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18 (13): 1930-1936.
- [4] Marchese FP, Raimondi I, Huarte M. The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function. *Genome Biol*, 2017, 18 (1): 206.
- [5] Long Y, Wang X, Youmans DT, Cech TR. How do lncRNAs regulate transcription? *Sci Adv*, 2017, 3 (9): eaao2110.
- [6] Ravindran S, George A. Dentin matrix proteins in bone tissue engineering. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 881: 129-142.
- [7] Jing B, Zhang C, Liu X, Zhou L, Liu J, Yao Y, Yu J, Weng Y, Pan M, Liu J, Wang Z, Sun Y, Sun YE. Glycosylation of dentin matrix protein 1 is a novel key element for astrocyte maturation and BBB integrity. *Protein Cell*, 2018, 9 (3): 298-309.
- [8] Sun Y, Lu Y, Chen L, Gao T, D'Souza R, Feng JQ, Qin C. DMP1 processing is essential to dentin and jaw formation. *J Dent Res*, 2011, 90 (5): 619-624.
- [9] Liao Q, Liu C, Yuan X, Kang S, Miao R, Xiao H, Zhao G, Luo H, Bu D, Zhao H, Skogerboe G, Wu Z, Zhao Y. Large-scale prediction of long non-coding RNA functions in a coding-non-coding gene co-expression network. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39 (9): 3864-3878.
- [10] 邓鹏辉, 黄传君, 赵方正, 宫晓丹, 李春晓, 张才擎. TGF- β 1、VEGF 在哮喘小鼠的表达及细辛脑的干预作用. *新医学*, 2018, 49 (1): 25-29.
- [11] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*, 2009, 136 (4): 629-641.
- [12] Schmitz SU, Grote P, Herrmann BG. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73 (13): 2491-2509.
- [13] Spadaro PA, Flavell CR, Widagdo J, Ratnu VS, Troup M, Ragan C, Mattick JS, Bredy TW. Long noncoding RNA-directed epigenetic regulation of gene expression is associated with anxiety-like behavior in mice. *Biol Psychiatry*, 2015, 78 (12): 848-859.
- [14] Terashima M, Tange S, Ishimura A, Suzuki T. MEG3 long noncoding RNA contributes to the epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cell lines. *J Biol Chem*, 2017, 292 (1): 82-99.
- [15] Wang Y, Zhong H, Xie X, Chen CY, Huang D, Shen L, Zhang H, Chen ZW, Zeng G. Long noncoding RNA derived from CD244 signaling epigenetically controls CD8⁺ T-cell immune responses in tuberculosis infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112 (29): E3883-E3892.
- [16] Ding G, Li W, Liu J, Zeng Y, Mao C, Kang Y, Shang J. LncRNA GHET1 activated by H3K27 acetylation promotes cell tumorigenesis through regulating ATF1 in hepatocellular carcinoma. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94: 326-331.
- [17] Thotakura SR, Karthikeyan N, Smith T, Liu K, George A. Cloning and characterization of rat dentin matrix protein 1 (DMP1) gene and its 5'-upstream region. *J Biol Chem*, 2000, 275 (14): 10272-10277.
- [18] Chen S, Chen L, Jahangiri A, Chen B, Wu Y, Chuang HH, Qin C, MacDougall M. Expression and processing of small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins in mouse odontoblastic cells. *Arch Oral Biol*, 2008, 53 (9): 879-889.
- [19] Mashhadi Abbas F, Sichani Fallahi H, Khoshzaban A, Mahdavi N, Bagheri SS. Expression of odontogenic genes in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell J*, 2013, 15 (2): 136-141.
- [20] Kamiya N, Takagi M. Differential expression of dentin matrix protein 1, type I collagen and osteocalcin genes in rat developing mandibular bone. *Histochem J*, 2001, 33 (9-10): 545-552.

(收稿日期: 2018-10-22)

(本文编辑: 林燕薇)