



赵方歆,魏奥,凌宇,房君,朱纯霄,焦如月,赵赞瑶,韩静,吴凯峰,李雪琼,李涛,曹俊伟,周欢敏,张焱如,刘春霞. 马 BMSCs 成软骨细胞诱导分化及其关键 lncRNAs-mRNAs 的筛选分析[J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(02): 94-106.

ZHAO Fangxin, WEI Ao, LING Yu, FANG Jun, ZHU Chunxiao, JIAO Ruyue, ZHAO Yunyao, HAN Jing, WU Kaifeng, LI Xueqiong, LI Tao, CAO Junwei, ZHOU Huanmin, ZHANG Yanru, LIU Chunxia. Induction differentiation of equine BMSCs into chondrocytes and screening analysis of key lncRNAs-mRNAs [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(02): 94-106.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.02.09

马 BMSCs 成软骨细胞诱导分化及其关键 lncRNAs-mRNAs 的 筛选分析

赵方歆 魏奥 凌宇 房君 朱纯霄 焦如月 赵赞瑶 韩静 吴凯峰
李雪琼 李涛 曹俊伟 周欢敏 张焱如 刘春霞*

(内蒙古农业大学 生命科学学院/内蒙古自治区生物制造重点实验室, 呼和浩特 010018)

摘要 为进一步筛选 BMSCs (Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 成软骨细胞诱导分化中关键 lncRNAs、mRNAs, 本研究以马 BMSCs 为研究对象, 对向软骨细胞诱导不同分化阶段的细胞开展全转录组测序, 筛选出在 BMSCs 成软骨细胞分化中具有重要功能的 lncRNAs 和 mRNAs, 并对 mRNAs 和 lncRNAs 及其靶基因进行验证, 并构建 lncRNAs 对 BMSCs 成软骨细胞分化的调控网络。结果表明: 1) 体外成功建立了马 BMSCs 系, 并成功诱导分化成软骨细胞。2) 对不同分化阶段的 BMSCs 进行高通量转录组测序后, 共鉴定出 3 592 个 lncRNAs, 其中, 差异高表达的 lncRNAs 有 250 个, 低表达的 116 个, 差异高表达的 mRNAs 有 280 条, 低表达的 105 条。3) 筛选并验证了 5 个调控马 BMSCs 向软骨细胞诱导分化中的潜在候选因子, 包括 lnc-cpm、lnc-traf3、lnc-22173、lnc-acvr2a 及 lnc-pde4d, 以及 9 个对应靶标基因 *MDM2*、*TRAF3*、*USP25*、*ACVR2A*、*PDE4D*、*BCL2*、*WAF1*、*SIRT1* 及 *NRF2*。4) 构建了差异表达的 lncRNA 与 mRNA 互作调控网络, 主要富集于 Wnt 信号通路、p53 信号通路、MAPK 及 NF- κ B 信号通路中。综上, 本研究经全转录组测序与分析, 成功筛选到马 BMSCs 分化为软骨细胞过程中表达显著的差异基因, 可为后续进一步揭示软骨细胞分化过程中 lncRNAs 与靶基因的互作机制奠定了必要的前期基础, 为 BMSCs 用于软骨修复的细胞治疗提供了科学依据。

关键词 马; BMSCs; 诱导分化; 软骨细胞; lncRNA

中图分类号 Q813.1

文章编号 1007-4333(2025)02-0094-13

文献标志码 A

Induction differentiation of equine BMSCs into chondrocytes and screening analysis of key lncRNAs-mRNAs

ZHAO Fangxin, WEI Ao, LING Yu, FANG Jun, ZHU Chunxiao, JIAO Ruyue,
ZHAO Yunyao, HAN Jing, WU Kaifeng, LI Xueqiong, LI Tao, CAO Junwei,
ZHOU Huanmin, ZHANG Yanru, LIU Chunxia*

(College of Life Sciences/Inner Mongolia Autonomous Region Key Laboratory of Biomanufacture, Inner Mongolia
Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract In order to further screen for the key lncRNAs and mRNAs of bone marrow mesenchymal stem cells induced differentiation into chondrocytes, equine BMSCs were selected as the research object, and whole transcriptome sequencing of cells were carried out at three different induced differentiation stages

收稿日期: 2023-12-20

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2020MS03045); 国家自然科学基金项目(32260871)

第一作者: 赵方歆(ORCID:0009-0005-8657-7154), 硕士研究生, E-mail: 1319414815@qq.com

通讯作者: 刘春霞(ORCID:0000-0003-3258-455X), 教授, 主要从事动物干细胞研究, E-mail: lcx.imau@163.com

into chondrocyte. And then lncRNAs and mRNAs with important functions in the differentiation of BMSCs into chondrocytes were screened out. At the same time, mRNAs, lncRNAs and their target genes were verified, and then the regulatory network of lncRNAs in the differentiation of BMSCs into chondrocytes were constructed. The results showed that: 1) Equine BMSCs line was established *in vitro* and the cells were successfully induced and differentiated into chondrocytes. 2) A total of 3 592 lncRNAs were identified by high-throughput transcriptome sequencing of BMSCs at different differentiation stages, including 250 differentially high expression lncRNAs and 116 differentially low expression lncRNAs, 280 differentially high expression mRNAs, and 105 differentially low expression mRNAs. 3) Five potential candidate factors regulating the differentiation of horse BMSCs into chondrocytes were screened and validated, including *lnc-cpm*, *lnc-traf3*, *lnc-22173*, *lnc-acvr2a*, *lnc-pde4d*, as well as nine corresponding target genes *MDM2*, *TRAF3*, *USP25*, *ACVR2A*, *PDE4D*, as well as *BCL2*, *WAF1*, *SIRT1*, *NRF2*. 4) A differentially expressed lncRNA-mRNA interaction regulatory network was constructed, which was mainly enriched in following signaling pathway, including Wnt, p53, MAPK and NF- κ B. To sum up, in this study, differential genes were successfully screened out during the equine BMSCs into chondrocytes through whole transcriptome sequencing and analysis, which will lay a necessary foundation for further revealing the interaction mechanism between lncRNAs and mRNAs during chondrocyte differentiation, and provide a scientific basis for BMSCs been used in cell therapy for cartilage repair.

Keywords horse; BMSCs; induced differentiation; chondrocyte; lncRNA

随着我国经济的快速发展,马术行业也随之应运而生,其中速度赛马是最吸引人的项目之一。但马匹由于经历长时间高强度训练,关节处软骨发生过度摩擦,从而导致受伤,因此为避免马匹软骨挫伤导致运动性能下降,研究者开始尝试各类预防及治疗措施,其中细胞因子、种子细胞等是近年来针对软骨修复研究的热点^[1]。间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs),可从骨髓、脂肪、肌肉、软骨、骨膜^[2]等组织中分离出来,在再生组织工程方面有着广泛的应用前景^[3-4]。上个世纪七十年代,Friedenstein等^[5]和Wakitani等^[6]首先采用骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)进行体外贴附,发现其具有向成骨、成软骨细胞分化的潜力。上世纪九十年代,BMSCs已成功实现向肌肉和脂肪组织分化^[7]。BMSCs具有免疫原性低、体外易扩增、富集和多向分化潜力的特点,是组织工程细胞治疗中理想的种子细胞^[8-9]。根据研究资料显示,干细胞转录因子 *Sox2*, 整合素 *CD29* 以及细胞表面标志物 *CD44*、*CD90* 和 *CD105* 是干细胞鉴定的标志基因,而 *collegel2*、*aggrecan* 和软骨分化相关基因 *Sox9* 是软骨细胞鉴定的标志基因^[10]。有研究发现小鼠 BMSCs 具有明显抑制膝关节骨性关节炎的作用,并能加速半月板的生长^[11]。软骨缺损的治疗方法分为自体软骨细胞和种子细胞移植。自体软骨细胞能够提供持续、透明的软骨^[12],但其局限性也很大,现在诸多研究都

采用种子细胞来进行软骨修复。因此,优质种子细胞的分离和诱导分化对软骨修复是至关重要的。

长链非编码 RNA (lncRNA) 通过调节基因在转录和转录后水平的表达,参与了基因的表达修饰^[13-14]。研究表明 lncRNAs 在人和许多动物发育、生理代谢及细胞分化中发挥着重要的调控作用^[15]。Wang 等^[16]通过基因芯片技术对人成软骨细胞内 lncRNAs 的表达进行了研究,结果表明有 2 个高水平的 lncRNAs (ZBED3-AS1 和 CTA-941 F9.9) 参与了成软骨的分化。信使 RNA (mRNA), 是由 DNA 的一条链作为模板转录而来的、携带遗传信息能指导蛋白质合成的一类单链核糖核酸。Wang 等^[17]利用大鼠骨折模型和体外骨折环境证实了 PIA 加速 BMSCs 增殖和迁移的作用。采用高通量测序和 RT-PCR 对组织外泌体 lncRNAs-mRNAs 网络进行分析,结果显示 PIA 处理大鼠的组织来源外泌体在 BMSCs 中 49 个基因及 3 个 lncRNAs 上调, 28 个基因及 1 个 lncRNA 下调。

研究表明, BMSCs 体外分离培养及鉴定已在人、小鼠、大鼠、绵羊、兔子等中被相继突破^[18-20],但在马中研究较少,且马 BMSCs 分化为软骨细胞相关 lncRNAs-mRNAs 调控机理尚未有相关研究。因此,本研究以蒙古马为研究对象,建立其 BMSCs 体外分离培养、分化培养及鉴定体系,对 BMSCs 分化获得的软骨细胞进行转录组测序,应用生物信息学方法

筛选蒙古马 BMSCs 分化为软骨细胞过程中差异表达显著的 lncRNAs、mRNAs, 筛选鉴定关键 lncRNAs-mRNAs, 并分析其与靶基因的互作关系, 探讨 lncRNAs 分子在 BMSCs 向软骨细胞分化过程中可能发挥的调控作用。本研究可为体外培养软骨细胞分化效率的提升奠定必要的基础, 对蒙古马 BMSCs 分化为软骨细胞机制的阐明提供理论支持, 为 BMSCs 应用于赛马运动损伤的临床细胞治疗提供科学依据, 同时对人类临床医学的细胞治疗提供方法借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用 2 岁蒙古马(公马)1 匹, 来自内蒙古农业大学动物医学学院, 安乐处死后, 采集股骨备用。本试验经内蒙古农业大学动物实验伦理委员会批准(批准号: NND2021102)。

1.2 试验方法

1.2.1 马 BMSCs 的原代培养

将股骨骨头用 75% 酒精擦拭后, 放入超净台, 将股骨两端的松质骨粉碎, 用含有 1% 青霉素(P)与硫酸链霉素(S)的 PBS 将含有骨髓的红色浆体冲出并收集在 15 mL 离心管中, 1 200 r/min 离心 5 min。弃上清, 用 5 mL 完全培养液(含 10% FBS 及 1% PS 的低糖 DMEM/F12)重悬细胞沉淀, 以 1×10^5 个/瓶接种于 T25 卡式瓶中, 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养, 2 d 后首次半量换液。

1.2.2 马 BMSCs 的传代培养

当细胞长至 70%~80% 汇合时进行传代。PBS 冲洗 1 次后, 加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶, 置于 37 °C 培养箱中消化 40 s。当大部分细胞形态由长梭形回缩变圆时, 加入等体积的完全培养液终止消化, 后将细胞悬液移至 15 mL 离心管中, 离心 5 min(1 200 r/min)。弃掉上清液, 用 1 mL 完全培养液重悬细胞, 进行细胞传代培养, 分别于培养 7、12 和 17 d 时观察记录细胞生长形态变化。

1.2.3 马 BMSCs 向软骨细胞的诱导分化

将 BMSCs 接种至 4 个 35 mm 的培养皿中进行传代培养, 当细胞生长到培养皿 70%~80% 时, 分为分化组和对照组。将分化组更换为软骨细胞诱导培养液(含高糖 DMEM、0.1% PS、0.1% ITS、100 ng/mL BMP7、10 ng/mL TGF- β 3、 10^{-6} mol/L

地塞米松、50 μ g/mL 抗坏血酸)培养, 对照组更换为无血清的完全培养液(含低糖 DMEM/F12, 1% PS)培养, 分别在诱导 0、7、12 和 17 d 时观察拍照记录细胞生长形态变化。

1.2.4 马 BMSCs 向软骨细胞诱导分化后的阿尔新蓝染色鉴定

将诱导 0、7、12 和 17 d 的细胞进行阿尔新蓝染色鉴定, 每个 35 mm 培养皿中加入 1 mL PBS, 清洗 3 次; 用 10% 多聚甲醛固定 30 min 后弃液, 再用 PBS 洗涤 3 次, 加入 Alcian 酸化液浸泡 3 min 后, 弃液; 加入 Alcian 染色液染色 30 min。流水冲洗 1 min。加入核固红染色液复染 5 min。流水冲洗 1 min 后, 显微镜下观察, 拍照。

1.2.5 马 BMSCs 向软骨细胞诱导分化后的细胞表面标志物鉴定

马 BMSCs 生长到培养皿 70%~80% 时, 更换培养液为软骨细胞诱导培养液, 诱导 0、7、12 和 17 d 收集细胞, 提取 RNA, 进行反转录后, 鉴定 CD44、CD34、CD45、CD90 和 CD105、整合素 CD29 以及干细胞转录因子 Sox2。根据 NCBI 上公布的马 mRNA 基因序列来设计引物, 引物全部由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 相关引物信息见表 1。

PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 退火 30 s(退火温度见表 1), 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min; 4 °C 保存。

1.2.6 马 BMSCs 向软骨细胞诱导分化中差异表达 lncRNAs 和 mRNAs 的筛选及分析

1.2.6.1 lncRNA 转录组测序分析 将培养 0 d 的对照组和诱导 14 和 21 d 的分化组分别进行液氮处理(生物学重复 3 次), 用于全转录测序和后续的试验验证。然后利用生物信息学软件对不同分化阶段的数据开展 lncRNAs 和 mRNAs 的筛选, 从中发现具有显著差异表达的 lncRNAs 和 mRNAs, 并确定它们之间的交互作用。

通过最新的转录本组装软件 StringTie 对 Reads 进行组装后, 去除已知的 mRNA 和小于 200 bp 的转录本, 再对余下的转录本进行 lncRNA 预测。预测软件为 CPC(Coding potential calculator)和 CNCI(Coding-non-coding index)。通过严密的过滤条件, 最后得到 lncRNA 序列。

利用 StringTie 通过计算 FPKM 来判断 lncRNA

表 1 干性基因及软骨细胞标志基因引物序列表

Table 1 Primer sequence listing of stem genes and chondrocyte marker genes

基因 Gene	引物序列 (5'→3') Primer sequences (5'→3')	退火温度 /℃ Annealing temperature	产物大小 /bp Product size
<i>Nanog</i>	F:GGCCGAAGACTAGCAACAGT R:TTGCTGTGTTGCGTTATGGC	60.1	377
<i>Sox2</i>	F:GTAACAACCGGAGCGCTGAC R:ACAAAAGTTTCCACTCGGCG	60	343
<i>CD29</i>	F:TGAGATGTGTCAGACGTGCC R:CGGATTTTCTTGCGTGTCCC	59.9	454
<i>CD34</i>	F:CTAGGGTGTGCTCCTTGCTC R:CTCTTCCCCCAGCCTTTCTC	60	305
<i>CD45</i>	F:TGATTCCCAGAAATGACCATGTA R:ACATTTTGGGCTTGTCCTGTAAC	55	122
<i>CD44</i>	F:GGATCCACCCCAACTCCATC R:GGCTCGGTCTTTGGTAGTGG	60	413
<i>CD90</i>	F:TGAGAATACCACCGCCACAC R:TGACCAGTTTGTCTCGGAGC	60	266
<i>CD105</i>	F:TCGTCAACCTCCTGTCAAGC R:GGGATACAGGGCTATGGTGC	60.1	389
<i>GAPDH</i>	F:TTCAACGGCACAGTCAAG R:TACTCAGCACCAGCATCA	57	128
<i>Sox9</i>	F:CACACGCTGACCACGCTGAG R:GCTGCTGCTGCTCGCTGTAG	55	135
<i>aggrecan</i>	F:GCTACGACGCCATCTGCTACAC R:TGATGTCCTCCTCGCCACTCAC	57	155
<i>collagen II</i>	F:CAGCAAGAGCAAGGAGAA R:GGACAGTAGACGGAGGAA	56	175

和 mRNA 的表达水平。通过 perl 脚本选择 100 000 个上游和下游的编码基因,之后利用内部脚本分析 lncRNA 的靶基因,以 $\log_2 > 1$ 或 $\log_2 < -1$, $P < 0.05$ 的条件筛选靶基因。

1.2.6.2 筛选出的 lncRNAs 和 mRNAs 荧光定量 PCR 验证 根据 TAKARA 公司公布的 lncRNA 转录说明书,利用 lncRNA 自身序列作为 5' 端引物,所有的 lncRNA 3' 端引物来自 TAKARA 公司 lncRNA 反转录试剂盒。引物序列见表 2。

荧光定量 PCR 反应条件:1)预变性:模式:Reps: 1; 95 °C 30 s; 2)PCR 反应:模式:Reps: 40; 95 °C 5 s; 58 °C 30 s; 3)溶解曲线:模式:Reps: 1; 95 °C 5 s; 60 °C 1 min; 95 °C; 4)降温:模式:Reps: 50 °C 30 s。

2 结果与分析

2.1 马 BMSCs 形态鉴定及向软骨细胞分化的鉴定

马 BMSCs 经原代与传代培养后,BMSCs 呈现长的纺锤型或成纤维细胞型,细胞中央有卵圆形核,生长密度较高时呈涡旋状或放射状(图 1(b))。

经 RT-PCR 鉴定,分离培养的马 BMSCs 表达 MSCs 表面标志物 *CD44*、*CD90* 和 *CD105*、整合素 *CD29* 以及干细胞转录因子 *Nanog* 和 *Sox2*,均未表达 *CD34* 和 *CD45* 等造血细胞因子,由此可证实分离细胞为 BMSCs(图 1(a))。在培养 7、12 和 17 d 后,对照组的细胞形态并没有随时间增加而改变。随着诱导时间的增加分化组细胞形态由长梭形逐渐转变为三角形;7 d 后大多数细胞形态呈多边形;12 d 后,呈现软骨细胞典型“铺路石”形态;17 d

表2 lncRNAs和mRNAs引物序列表
Table 2 Primer sequence listing of lncRNAs and mRNAs

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	退火温度/℃ Annealing temperature	产物大小/bp Product size
<i>NRF2</i>	F:GCCCAGCTTCGGGCATTTAT R:TATGGTCCGTAGTGCCTGGG	58	189
<i>TRAF3</i>	F:CAGCTACAATGGCGTGCTGA R:CGTCCCCGTTCAGGTAGACT	58	155
<i>MDM2</i>	F:TAAGCGGCTGTACGACGAGAGG R:CGGCTGATTGACGACCACCAAG	61	151
<i>ACVR2A</i>	F:CCGGAGGTATATGGCTCCAGAGG R:GCGGCAGTACAGCGAGAAGC	58	126
<i>Bcl-2</i>	F:CTGAATACCTGAACCGGCACCTG R:GCAGCGCCTTCAGAGACAGC	55	129
<i>WAF1</i>	F:ATGGTCAGTGCCTTGTTGGATGC R:GTCTGCCAGGTTGGTCAGTAAGC	58	111
<i>lnc-cpm</i>	F:AGCACCACATCGGGAGTTCT R:CAGTGCTCATCTCACGAGGC	57	195
<i>lnc-acvr2a</i>	F:CGAGGAAGACCCAGGGAAGT R:GAACGCCAACTTTGCAGCAG	57	94
<i>lnc-22171</i>	F:AGCATGGTATCTCCCACCCA R:AGGCAATTGGTAGAGAACAAGCC	58	178
<i>lnc-traf3</i>	F:GGACTGAGGTGAGGGAGCTT R:AGGGCAGGCTCCAGAAACAT	56	208
<i>lnc-pde4d</i>	F:TCCAGAGCTACAAGGAGACCACAG R:GCACATGCTGCATTACTGAGACAG	56	85

后,软骨细胞的形态变得更为清晰,初步判定BMSCs分化为软骨细胞(图1(b))。

阿尔新蓝对蛋白聚糖染色结果表明,随着诱导时间增加,分化组细胞颜色逐渐加深,表明蛋白质聚糖含量逐渐增多,对照组细胞未见着色(图1(c))。之后以 *GAPDH* 为内参基因,通过PCR对软骨细胞标志基因 *college II* 和 *aggrecan*、软骨分化相关基因 *Sox9* 进行鉴定。结果表明, *college II*、*aggrecan* 和 *Sox9* 在分化组中均表达,而对照组不表达。表明经诱导的BMSCs已分化为软骨细胞,并表达了软骨细胞特异标记基因(图1(d))。

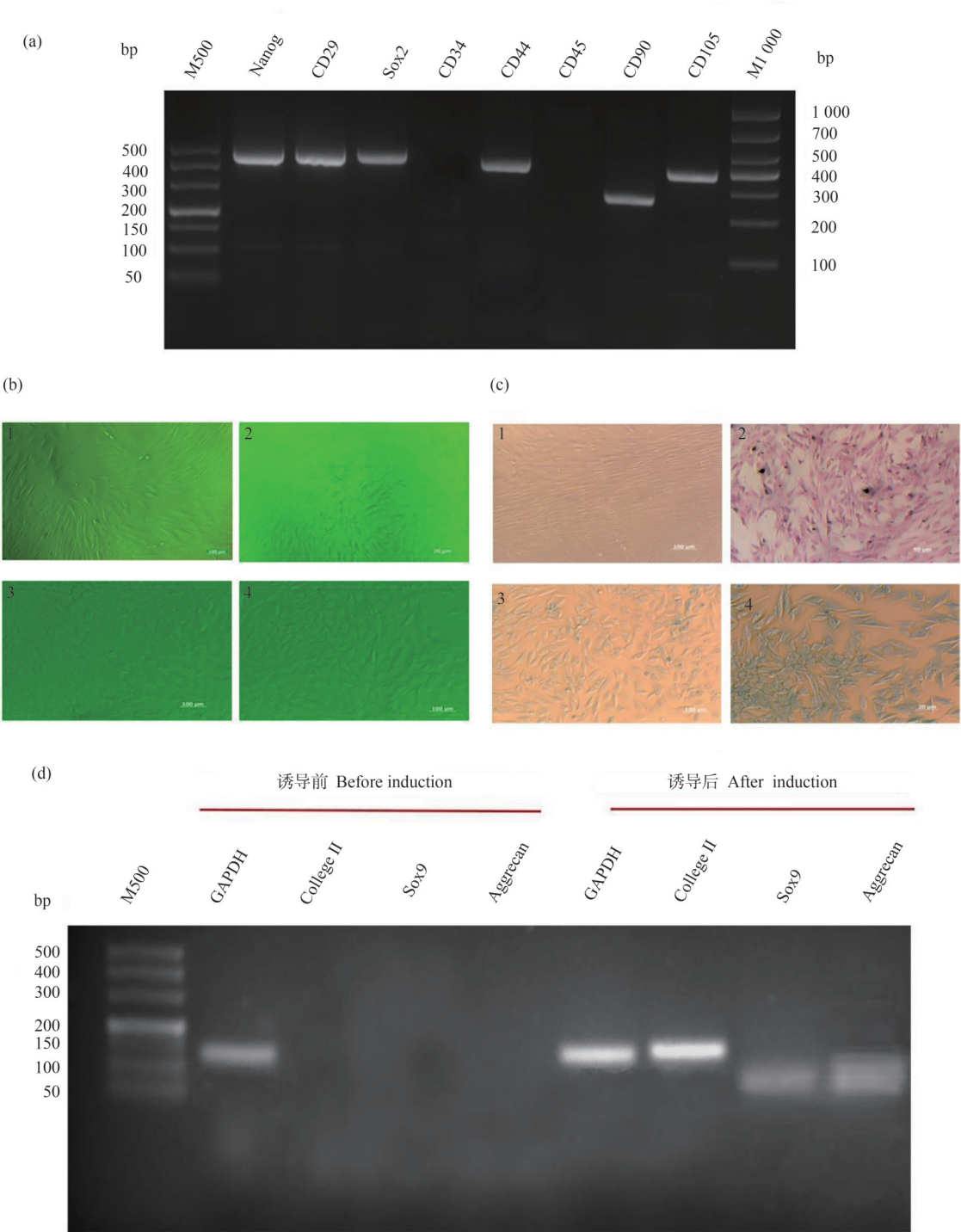
2.2 马BMSCs向软骨细胞诱导分化中差异表达lncRNA和mRNA的筛选

根据RNA 6 000试剂盒说明书在Agilent 2100上进行测试,测试结果均满足RNA质量检验需求。利用Cuffdiff软件FPKM分析了分化组与对照组基因的差异,并利用FPKM=1筛选出表达差异显

著的lncRNAs、mRNAs。结果显示:lncRNAs与mRNAs均高表达(图2(a))。为评估分化组与对照组在不同试验条件下lncRNAs及mRNAs的表达差异,采用 $\log_2>1$ 或 $\log_2<-1$, $P<0.05$ 的条件筛选出差异表达显著的lncRNAs和mRNAs。其中lncRNAs显著上调表达的有250个,显著下调表达的有116个(图2(b)),mRNAs显著上调的有280个,显著下调的有105个(图2(c))。将差异表达量较高的5个lncRNAs和9个mRNAs作为重点进行后续分析。

2.3 马BMSCs向软骨细胞诱导分化中差异lncRNAs和mRNAs的GO和KEGG分析

通过对lncRNAs共表达的蛋白编码基因进行GO功能注释和KEGG通路分析(图3(a)~(b)),结果表明,许多GO条目与软骨细胞的分化和增殖相关,如软骨细胞分化、软骨细胞转录调控及软骨细胞生物过程等。KEGG富集分析显示,蛋白质主要

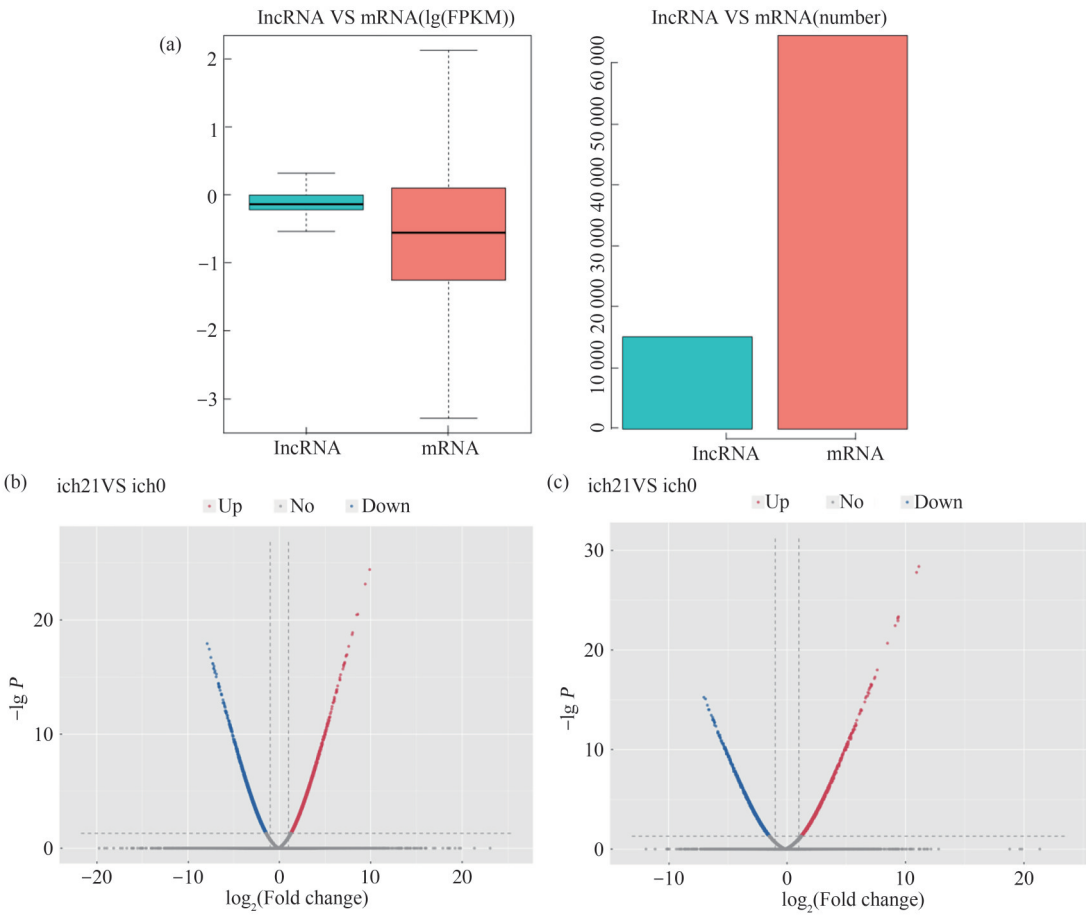


(a) BMSCs 标记基因 PCR 鉴定; (b) BMSCs 向软骨细胞诱导分化细胞形态; 1: 对照组; 2: 分化组 7 d; 3: 分化组 12 d; 4: 分化组 17 d; (c) 软骨细胞阿尔新蓝染色; 1: 对照组; 2: 分化组 7 d; 3: 分化组 12 d; 4: 分化组 17 d; (d) 软骨细胞标志基因 PCR 鉴定。

(a) PCR identification of BMSCs marker genes; (b) Cell morphology of BMSCs induced differentiation into chondrocytes; 1: Control group; 2: Differentiation for 7 d; 3: Differentiation for 12 d; 4: Differentiation for 17 d; (c) Alcian blue staining of chondrocytes; 1: Control group; 2: Differentiation for 7 d; 3: Differentiation for 12 d; 4: Differentiation for 17 d; (d) PCR identification of chondrocyte marker genes.

图 1 马 BMSCs 及向软骨细胞分化的鉴定

Fig. 1 Identification of equine BMSCs and differentiation into chondrocytes



(a)分化组与对照组 lncRNAs 和 mRNAs 差异表达;(b)分化组和对照组差异表达的 lncRNAs;(c)分化组和对照组差异表达的 mRNAs(蓝色代表差异性 lncRNAs/ mRNAs 低表达;红色代表差异性 lncRNAs/ mRNAs 高表达)。

(a) Differential expression of lncRNAs and mRNAs in differentiation group and control group; (b) Differentially expressed lncRNAs in the differentiation group and control group; (c) Differentially expressed mRNAs in the differentiation group and control group; (Blue represents low expression of differential lncRNAs/ mRNAs; red represents high expression of differential lncRNAs/ mRNAs).

图2 马 BMSCs 向软骨细胞诱导分化中差异表达 lncRNAs 和 mRNAs 的筛选

Fig. 2 Screening of differentially expressed lncRNAs and mRNAs during the induction and differentiation of equine BMSCs into chondrocytes

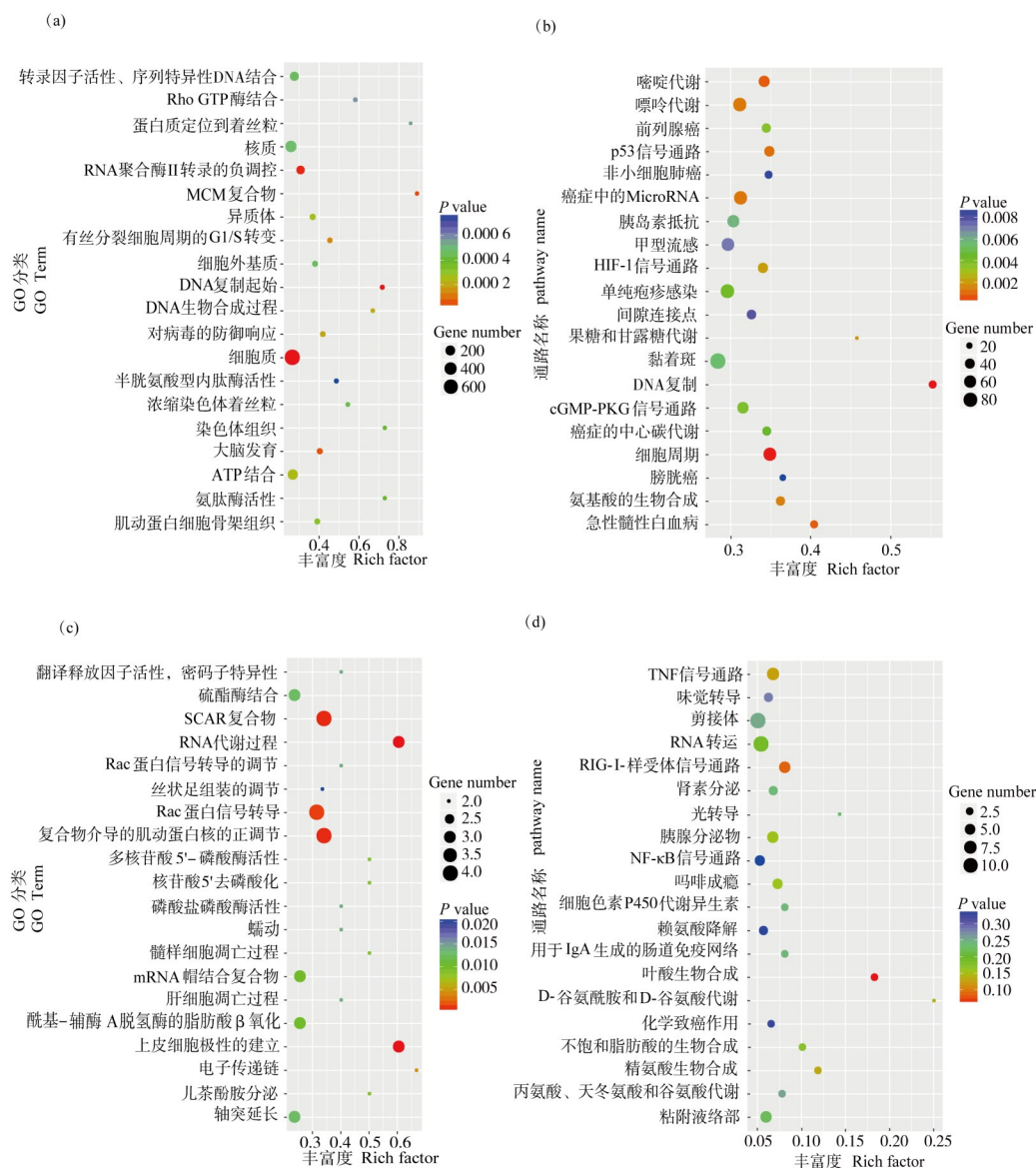
富集在黏连功能、TNF 信号、RIG-i 样受体信号转导及 NF- κ b 信号通路等。

对差异 mRNAs 进行 GO 和 KEGG 富集分析(图 3(c)~(d)),GO 分析结果显示($P<0.05$),在分子功能方面,靶基因主要在蛋白质结合、聚合物结合及锌离子结合中显著富集。对细胞成分方面,靶基因在细胞核、细胞质、膜的整体成分显著富集。在生物过程方面,靶基因主要在转录调控、DNA 模板及 RNA 聚合酶 II 的转录调控显著富集。KEGG 信号通路分析显示($P<0.005$),差异 mRNAs 在 8 条通路中显著富集,主要包括细胞周期、嘌呤代谢、癌症相关微小 RNA、嘧啶代谢、p53、氨基酸生物

合成、HIF-1 及 cGMP-PKG 信号通路等。

2.4 与软骨细胞形成相关 lncRNAs 和 mRNAs 的荧光定量 PCR 验证

筛选出 5 个可能调控软骨细胞形成的 lncRNAs(*lnc-acvr2a*、*lnc-pde4d*、*lnc-22173*、*lnc-cpm* 和 *lnc-traf3*)进行 RT-qPCR 验证。结果显示,RT-qPCR 结果与测序结果表达趋势一致,证明测序数据的准确性,如图 4(a)所示。通过对与 lncRNAs 靶向作用的 5 个靶基因(*USP25*、*TRAF3*、*PDE4D*、*MDM2* 和 *ACVR2A*)及参与 p53 信号通路、NK- κ b 信号通路的 4 个基因(*BCL2*、*WAF1*、*SIRT1* 和 *NRF2*)进行验证,结果如图 4(b)所示。分析 p53 信



(a) 差异表达 lncRNAs GO 分类; (b) 差异表达 lncRNAs 的 KEGG 分类热图; (c) 差异表达 mRNAs GO 分类; (d) 差异表达 mRNAs 的 KEGG 分类热图。

(a) GO classification of differential expression lncRNAs; (b) KEGG classification heat map of lncRNAs with differential expression; (c) GO classification of differential expression mRNAs; (d) KEGG classification heat map of mRNAs with differential expression.

图 3 马 BMSCs 向软骨细胞诱导分化中差异 lncRNAs 和 mRNA 的 GO 和 KEGG 分析

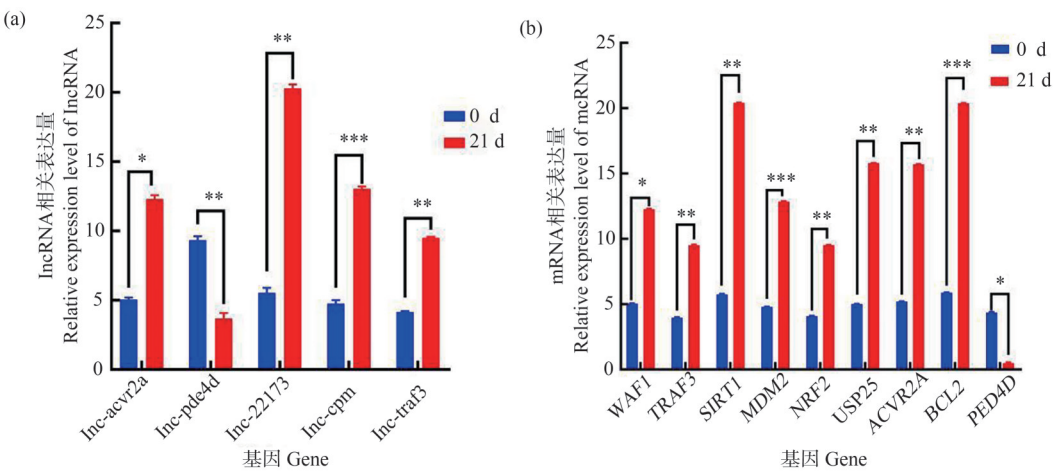
Fig. 3 GO and KEGG analysis of differential expression lncRNAs and mRNAs during equine BMSCs differentiation into chondrocytes

号通路 and NF- κ B 信号通路基因以 *GAPDH* 为内参, *WAF1*、*TRAF3*、*SIRT1*、*MDM2*、*NRF2*、*USP25*、*ACVR2A*、*BCL2* 和 *PDE4d* 在分化组和对照组中的表达情况。结果显示, 与对照组相比除 *PDE4d* 表达下调外, 其他基因全部上调表达, 与测序结果显示的基因表达趋势一致。通过 GO、KEGG 信号通路分析发现, lncRNAs 可能与软骨细胞分化相关。*lnc-cpm*、*lnc-traf3*、*lnc-22171* 和 *lnc-acvr2a* 的表达明

显升高, 而 *lnc-pde4d* 的表达明显降低。利用软件 TargetScan 对差异表达的 lncRNAs 进行了靶标分析, 结果表明, 其中多数 lncRNAs 与 NF- κ B 相关。为随后进行的验证性试验奠定基础(表 3)。成功筛选到马 BMSCs 分化为软骨细胞过程中差异表达显著的 5 个 lncRNAs 和 9 个 mRNAs。

2.5 差异 lncRNA 及其靶基因功能信号通路分析

基于 GO 和 KEGG 信号通路分析结果, 进一步



数据以平均值±SEM(n=3)表示。*P<0.05,**P<0.01,***P<0.0001。
Data are presented as mean±SEM (n=3). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.0001。
(a) 差异 lncRNAs 表达;(b)差异 lncRNAs 靶标 mRNAs 的表达。

(a)Differential lncRNAs expression; (b)Expression of differential lncRNAs target mRNAs.

图4 与软骨形成相关lncRNAs和mRNAs的qPCR验证

Fig. 4 qPCR validation of lncRNAs and mRNAs associated with chondrogenic formation

表3 软骨细胞分化过程中差异表达基因KEGG富集分析显著性结果

Table 3 Significant results of KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes during chondrocyte differentiation

通路编号 ID	通路方向	P 值	通路连接
Pathway ID	Pathway direction	P value	Pathway link
Ko00790	Folate biosynthesis	0.06	\\KEGG_Pictures\\bta00790.html
Ko04622	RIG-I-like receptor signaling pathway	0.09	\\KEGG_Pictures\\bta04622.html
Ko04668	TNF signaling pathway	0.13	\\KEGG_Pictures\\bta04668.html
Ko04520	Adherens junction	0.22	\\KEGG_Pictures\\bta04520.html
Ko04064	NF-kappa b signaling pathway	0.34	\\KEGG_Pictures\\bta04064.html
Ko04014	Ras signaling pathway	0.69	\\KEGG_Pictures\\bta04014.html
Ko04215	Apoptosis multiple species	0.71	\\KEGG_Pictures\\bta04215.html
Ko04024	cAMP signaling pathway	0.73	\\KEGG_Pictures\\bta04024.html
Ko04540	Gap junction	0.77	\\KEGG_Pictures\\bta04540.html
Ko04115	p53 signaling pathway	0.82	\\KEGG_Pictures\\bta04115.html
Ko04015	Rap1 signaling pathway	0.86	\\KEGG_Pictures\\bta04015.html

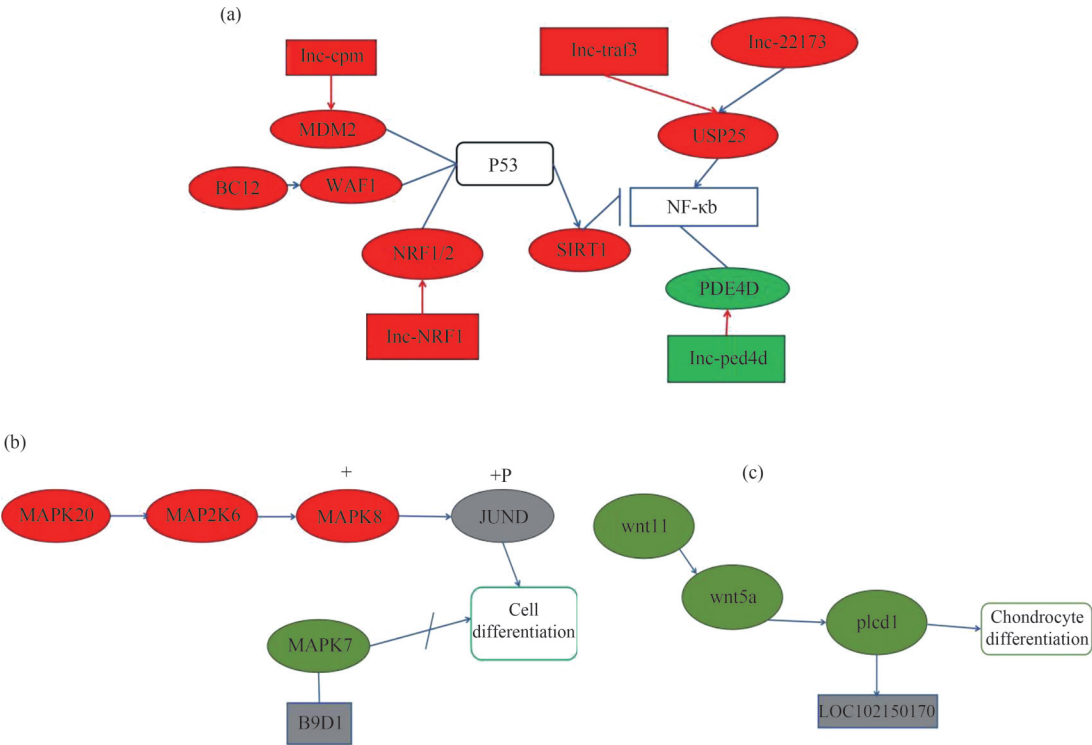
对筛选到的 P53、NF-κb、MAPK 及 Wnt 信号通路进行研究。相关通路调节机制见图 5(a)~(c)。由图 5(a)可知，p53 活性的关键负调节细胞因子 MDM2 上调时，抑制 p53 活性，调控 BCL2 抑制凋亡因子表达上调，导致 BCL2 下游靶基因 WAF1 的上调，维持软骨细胞的形成。而 BMP-2 的表达也诱

导 WAF1 的上调表达，表明其参与软骨形成功能。线粒体呼吸因子 NRF2 的上调，正调节 SIRT1 蛋白，抑制 NF-κb 表达，导致 PDE4D 下调表达，从而阻止破骨细胞形成，抑制软骨基质的降解。USP25 上调减少泛素化，抑制 TRAF3 降解，阻止破骨细胞生成，有利于软骨细胞的存活。从图 5(b)可知，

表 4 与软骨细胞形成相关 lncRNA 靶向作用的候选基因

Table 4 Candidate genes for lncRNA targeting associated with chondrocyte formation

长链非编码 RNA lncRNA	表达量 Expression level	染色体数量 Chromosome	正/反义链 Positive/Negative Strand	信使 RNA mRNA
<i>lnc-cpm</i>	Up	6	+	<i>MDM2</i>
<i>lnc-acvr2a</i>	Up	18	+	<i>ACVR2A</i>
<i>lnc-22173</i>	Up	26	—	<i>USP25</i>
<i>lnc-traf3</i>	Up	24	+	<i>TRAF3</i>
<i>lnc-pde4d</i>	Down	21	+	<i>PDE4d</i>



椭圆形代表靶基因;长方形代表 lncRNA;红色代表上调表达;绿色代表下调表达。
Ovals represent target genes; rectangles represent lncRNA; red represents up-regulated expression; green represents down-regulated expression.
(a) p53 信号通路及 NF-κb 信号通路; (b) MAPK 信号通路; (c) Wnt 信号通路。
(a) P53 signaling pathway and NF-κb signaling pathway; (b) MAPK signaling pathway; (c) Wnt signal pathway.

图 5 差异 lncRNAs 及其靶基因信号通路分析

Fig. 5 Signaling pathway analysis of differential lncRNAs and their target genes

MAPK20 上调导致 *MAP2K6* 上调引起 *MAPK8* 表达增加,引起更多 *JUND* 磷酸化,会导致软骨细胞分化。*lncRNA-B9D1* 靶向引起 *MAPK7* 下调,抑制软骨细胞的分化。说明激活 MAPK 信号通路引起磷酸化增加可以调控软骨细胞分化。图 5(c)分析可得, *Wnt5a* 和 *Wnt11* 的下调表达,会引起 *plcd1* 下调,导致 *RUNX1* 降低,抑制 MSCs 向成骨分化,导致

MSCs 向软骨细胞的诱导分化,促进软骨细胞的形成。
上述信号途径分别从 P53、NF-κb、MAPK 和 Wnt 信号途径等多个层面对软骨细胞的分化和功能进行了深入研究。结合之前的数据分析显示, *lnc-cpm*、*lnc-traf3*、*lnc-22171*、*lnc-acvr2a* 表达上调, *lnc-pde4d* 表达下调,其中 *MDM2* 为 *lnc-cpm* 靶标;

ACVR2A 是 *lnc-acvr2a* 靶标; *USP25* 是 *lnc-22173* 靶标; *TRAF3* 是 *lnc-traf3* 靶标; *plcd1* 是 *lnc102150170* 的靶标; *MAPK7* 是 *lnc-B9D1* 的靶标。

3 讨论

BMSCs 来源于中胚层,除具有分泌多种细胞因子及生长因子外,还有多向分化潜能^[21],且 BMSCs 来源于多种组织,由于广泛的易得性和多向分化潜能使其在组织工程领域备受关注^[22]。

软骨是在骨骼发育初期形成的,在胚胎时期, MSCs 增殖和聚集,然后定型和分化为软骨细胞, MSCs 填充合成早期的骨骼细胞,并利用这些细胞的生长和增殖来促进软骨细胞的生长和分化。大多数终末分化后的软骨细胞出现了凋亡,少数转化为成骨细胞^[23-24]。在由 MSCs 向软骨到软骨转变为硬骨的过程中,有大量的转录因子、细胞信号分子和 *GLI* 基因的整合作用,其中包括 *Sox9*、*RUNX2* 和 *GLI* 蛋白家族,成纤维细胞生长因子(*FGF*), *Hedgehog*, 骨形态发生蛋白(*BMP*), 转化生长因子(*TGF- β*)和 Wnt 信号通路共同调控软骨和骨骼的发育^[25-26]。随着转录组测序技术的不断发展,大多数的非编码 RNA 在机体基础代谢和生理功能中扮演了非常重要的角色,是调节细胞生长和发育的关键因素^[27-29]。但目前有关 lncRNAs 调控软骨细胞生成机制的研究较少。本研究利用转录组测序技术,从不同角度筛选出差异表达的 lncRNAs,从而建立起 lncRNAs 的调控网络。通过对马 BMSCs 成软骨细胞分化后 0、14 和 21 d 进行基因数据分析,发现 BMSCs 向软骨细胞诱导分化中,有 365 个差异显著的 lncRNAs。采用荧光定量 PCR 方法对 5 个候选 lncRNAs 进行了检测,并与目标基因的相关性进行了检测。结果表明,RT-qPCR 的表达趋势与 lncRNAs 测序结果相符,从而证明了测序数据的正确性。

通过分析 lncRNAs 及其靶基因,本研究主要针对对软骨发育过程中细胞凋亡信号通路以及 Nk-kb 信号通路进行深入分析,其中 *BCL2*、*WAF1*、*SIRT1* 构成一条通路,通过激活细胞周期抑制蛋白/分化因子(*p21/WAF1*)抑制软骨细胞凋亡,对软骨分化具有积极影响。在软骨形成过程中,线粒体生物发生是一个复杂的过程,涉及线粒体基因组与细胞核

之间的密切合作^[30]。当靶基因 *SIRT1* 脱乙酰化并激活线粒体生物发生的转录因子、核呼吸因子(*NRF1/2*)增加氧耗率和细胞内 ATP 水平以促进软骨合成^[31]。且 *SIRT1* 上调表达抑制了 NF-kb 信号通路进而遏制破骨细胞的生成^[32],防止软骨细胞走向凋亡或衰老^[33]。

软骨形成中丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)在软骨形态发生和组织模式中起重要作用。作为非经典 Wnt 信号, *Wnt5a* 在阶段特异性环境中特异性地促进软骨细胞肥大^[34]。研究表明抑制 *Wnt5a* 表达会延缓软骨细胞的成熟和骨骼形成的发生^[35]。另一方面,几种非经典 Wnt 同种型如 *Wnt5a* 和 *Wnt11* 参与 IL-1 β 诱导的关节软骨细胞去分化^[36]。同时抑制内源性 *Wnt5a* 促进 PKC α 和 p38 MAPK 活性,增加 TGF β 3 刺激软骨形成^[37]。软骨细胞的增殖、分化在软骨形成过程中发挥重要作用,揭示抑制该组基因(*Wnt11*、*Wnt5a*、*plcd1*)则会抑制成骨细胞的分化,促进软骨细胞的形成。而且通过 lncRNAs-mRNAs 的调控网络, *plcd1* 的下调可能受到 *lnc102150170* 的调控。MAPK 是真核细胞中关键细胞内信号转导物,影响到细胞分化^[38]、增殖^[39]、迁移^[40]和细胞凋亡^[41]。数据分析显示 MAPK 家族成员(*MAPK20*、*MAPK8*、*MAP2K6*)显著上调表达,引起 *JUND* 磷酸化,磷酸化的 *JUND* 可促进软骨细胞的分化,因此 MAPK 信号通路对于维持软骨细胞的分化是必要的。

综上, MSCs 向软骨分化过程中 lncRNAs 可能存在重要调控作用,但目前的研究方法主要在生物信息学分析的层次上,对于大部分 lncRNAs 的生物学功能、相互作用机制以及如何区分功能性和非功能性非编码转录物仍需要进一步的深入研究。

此外,因 lncRNAs 转录本长度超过 200 nt,容易形成二级结构,作用机制复杂多样,且不同的 lncRNAs 研究结果之间一致性较差,需要更多有效的方法系统性研究 lncRNAs 的结构及其功能,例如高分辨率的活体成像技术、高通量的蛋白质检测技术、高灵敏的 lncRNAs 检测技术、高效预测 lncRNAs 二级结构和靶标基因的生物信息学技术等,这也将是 lncRNAs 今后研究中的热点和重点。

4 结 论

本研究成功分离建立了马 BMSCs 系并诱导为软骨细胞。经全转录组测序与分析,筛选到马 BMSCs 分化为软骨细胞过程中差异表达显著的 5 个 lncRNAs 和 9 个 mRNAs。经 GO 和 KEGG pathway 分析,初步明确了关键 lncRNAs 与 mRNAs 参与的生物学过程及主要信号通路。对细胞凋亡信号通路及 NF- κ B 炎症信号通路分析发现,相关 lncRNAs 通过调控靶标 mRNAs 的表达来促进软骨细胞的增殖,抑制软骨细胞胞外基质降解,进而阻遏软骨细胞凋亡及破骨细胞生成。

参考文献 References

- [1] Lolli A, Penolazzi L, Narcisi R, Gerjo J V M, Osch V, Piva R. Emerging potential of gene silencing approaches targeting anti-chondrogenic factors for cell-based cartilage repair [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 2017, 74(19):3451-3465
- [2] Solchaga L A, Gao J, Dennis J E, Awadallah A, Lundberg M. Treatment of sot eochondral defects with autologous bone marrow in a hyaluronan-based delivery vehicle [J]. *Tissue Engineering*, 2002, 8:333-347
- [3] Im F L, Kim D Y, Shin J H. Repair of cartilage defect with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow [J]. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 2001, 83:289-294
- [4] Friedenstein A J, Piatetzky-Shapiro I I, Petrakova K V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells [J]. *Romanian Journal Of Morphology And Embryology*, 1966, 16:381-390
- [5] Friedenstein A, Kuralesova A I. Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras [J]. *Transplantation*, 1971, 12(2):99-108
- [6] Wakitani S, Saito T, Caloan A I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine [J]. *Muscle & Nerve*, 1995, 18:1417-1426
- [7] Johnstone B, Yoo J arry F P, Hering T M, Caplan A I. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchmal progenitor cells [J]. *Experimental Cell Research*, 1998, 238:265-272
- [8] Pittenger M F. Multilineage potential of adult human mesenchmal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411):145-147
- [9] Kurpda R, Usas A, Kubo S, Corsi K A, Huard J. Cartilage repair using bone morphogenetic protein and muscle-derived stem cells [J]. *Arthritis & Rheumatology*, 2006, 54(2):433-442
- [10] Duan W, Lopez M J. Effects of cryopreservation on canine multipotent stromal cells from subcutaneous and infrapatellar adipose tissue [J]. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2016, 12(2):257-268
- [11] Browne J E, Branch T P. Surgical alternatives for the treatment of articular cartilage lesions [J]. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 2000, 8(3):180-189
- [12] Zhang Z, Zhong X, Ji H, Tang Z, Liu A. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation for the treatment of chondral defects of the knees in Chinese pat ients [J]. *Drug Design Development & Therapy*, 2014, 8(5):2439-2448
- [13] Ponting C P, Oliver P L, Reik W. Reik. Evolution and functions of long noncoding RNAs [J]. *Cell*, 2009, 136:629-641
- [14] Bergmann J H, Spector D L. Long non-coding RNAs: Modulators of nuclear structure and function [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2014, 26:10-18
- [15] Vučićević D, Corradin O, Ntini E, Seacheri P C, Orom U A. Long ncRNA expression associates with tissue-specific enhancers [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(2):253-260
- [16] Wang L, Li Z Y, Li Z Q, Yu B, Wang Y P. Long noncoding RNAs expressing signatures in chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 456(1):459-464
- [17] Wang D, Diao S, Zhou X, Zhou J, Liu Y. A new method regulates bone fracture tissue exosome lncRNA-mRNA to promote mesenchymal stem cell proliferation and migration [J]. *Injury*, 2024, 55(2):111210
- [18] Futrega K, Music E, Robey P G. Characterisation of ovine bone marrow-derived stromal cells (oBMSC) and evaluation of chondrogenically induced micro-pellets for cartilage tissue repair in vivo [J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2021, 12(1):26
- [19] Qing C, We D C, Wei M F. Co-culture of chondrocytes and bone marrow mesenchymal stem cells in vitro enhances the expression of cartilaginous extracellular matrix components [J]. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, 2011, 44(4):303-310
- [20] Zhang L, Tang Y, Zhu X, Tu T, Sui L, Han Q, Yu L, Meng S, Zheng L, Valverde P, Tang J, Murray D, Zhou X, Drissi H, Dard MM, Tu Q, Chen J. Overexpression of miR-335-5p promotes bone formation and regeneration in mice [J]. *Journal Of Bone and Mineral Research*, 2017, 32(12):2466-2475
- [21] Luo S, Tong L. Molecular basis for the recognition of methylated adenines in RNA by the eukaryotic YTH domain [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(38):13834-13849
- [22] Theler D, Dominguez C, Blatter M, Julien B, Frédéric H A. Solution structure of the YTH domain in complex with N6-methyladenosine RNA: a reader of methylated RNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(22):13911-13919
- [23] Liang C, Hu X D, Xie H, Xue T T, Wang A C, Pan Z, Lin Y, Xiong F Q, Cao C C, Yan L, Chen P, Cheng K K, Zha Y, Sun, Guo D, Liu C Y, Yu Y Q, Hu R Y, Wu T, Zhou B B, . Mi, Guo H, . MiR-1224-5p modulates osteogenesis by coordinating osteoblast/osteoclast differentiation via the Rap1 signaling target ADCY2 [J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2022, 54(7):961-972
- [24] Zhou X, Von der, Mark K, Henry S, Norton W, Adams H, Crombrughe B, Warman M L. Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice [J]. *Plos Genetics*, 2014, 10(12):10-20
- [25] Zhang W T, Wang N G, Yang M, Yang M, Sun T Z, Zhang J, Zhao Y T, Huo N, Li Z H. Periosteum and development of the tissue-engineered periosteum for guided bone regeneration [J]. *Journal of Orthopaedic Translation*, 2022, 33:41-54
- [26] El-Derany M O, Noureldein M H. Bone marrow mesenchymal stem cells and their derived exosomes resolve doxorubicin-induced chemobrain: critical role of their miRNA cargo [J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2021, 12(1):322
- [27] Yagmurulu A, Harmon C M, Georgeson K E. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem by enhancing express of cartilage extracellular matrix genes [J]. *Surgical Endoscopy & Other Interventional*, 2006, 24(6):1487-1495
- [28] Shang C L, Li Y, He T H, Liao Y D, Du Q Q, Wang P, Qiao J, Guo H G. The prognostic miR-532-5p-correlated ceRNA-mediated lipid droplet accumulation drives nodal metastasis of cervical cancer [J]. *Journal of*

- Advanced Research*, 2022, 37:169-184
- [29] Zhang W T, Wang N G, Yang M, Sun T Z, Zhang J, Zhao Y T, Huo N, Li Z H. Periosteum and development of the tissue-engineered periosteum for guided bone regeneration [J]. *Journal of Orthopaedic Translation*, 2022,33:41-54
- [30] He Y Z, Ding Q H, Chen W L, Lin C J, Ge L J, Ying C T, Xu K, Wu Z P, Xu L H, Ran J S, Chen W P, Wu L D. LONP1 downregulation with ageing contributes to osteoarthritis via mitochondrial dysfunction[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2022,191:176-190
- [31] Li Y X, Shu J, Kou N N, Chen H B, Guo L M, Yuan Y, He S X, Zhao G. FGF1 reduces cartilage injury in osteoarthritis via regulating AMPK/Nrf2 pathway[J]. *Journal of Molecular histology*, 2023,(5):54
- [32] Prakash A N, Prasad N, Puppala E R, Panda S R I, Jain S, Ravichandiran V, Singh M, Naidu V G M 4. Loganic acid protects against ulcerative colitis by inhibiting TLR4/NF- κ B mediated inflammation and activating the SIRT1/Nrf2 anti-oxidant responses *invitro* and *invivo* [J]. *International Immunopharmacology*, 2023,122:110585
- [33] Huang Y H, Peng Y H, Li H, Li C, Wu Y J, Wang X M, Chang J, Miao C G. Wilforine inhibits rheumatoid arthritis pathology through the Wnt11/ β -catenin signaling pathway axis [J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2023, 25(1):243
- [34] Yang Y Z, Topol L L, Lee H J, Wu J L. Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation[J]. *Development*, 2003, 130:1003-1015
- [35] Hartmann C, Tabin C J. Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb[J]. *Development*, 2000, 127:3141-3159
- [36] Liu F Y, Wang M Q, Liu M M, Li T, Wang X H, Jiang F, Wu X J, Cheng J, Cai L, Li R. Therapeutic effects of shikonin on adjuvant-induced arthritis in rats and cellular inflammation, migration and invasion of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes via blocking the activation of Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Phytomedicine*, 2023,25:116:154857
- [37] Carneiro I, Quintela-Vieira F, Lobo J, Moreira-Barbosa C, Menezes F D, Martins A T, Oliveira J, Silva R, Jerónimo C, Henrique R. Expression of EMT-related genes CAMK2N1 and WNT5A is increased in locally invasive and metastatic prostate cancer [J]. *Journal of Cancer*, 2019, 10(24):5915-5925
- [38] Abell A N, Rivera-Perez J A, Cuevas B D, Uhlik M T, Sather S, Johnson N L, Minton S K, Lauder J M, Winter-Vann A M, Nakamura K, Magnuson T, Vaillancourt R R, Heasley L E, Johnson G L. Ablation of MEKK4 kinase activity causes neurulation and skeletal patterning defects in the mouse embryo [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005, 25:8948-8959
- [39] Longobardi L, O'Rear L, Aakula S, Johnstone B, Shimer K, Chytil A, Horton W A, Moses H L, Spagnoli A. Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF- β signaling [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2006, 21:626-636
- [40] Kuang D, Zhao X, Xiao G X, Ni J, Feng Y M, Wu R L, Wang G P. Stem cell factor/c-kit signaling mediated cardiac stem cell migration via activation of p38 MAPK[J]. *Basic Research in Cardiology*, 2007, 103:265-273
- [41] Wang H L, Wang Z L, Chen J H, Wu J. Apoptosis induced by NO via phosphorylation of p38 MAPK that stimulates NF- κ B, p53 and caspase-3 activation in rabbit articular chondrocytes[J]. *Cell Biology International*, 2007, 31:1027-1035

责任编辑:秦梅



第一作者简介: 赵方歆,在读硕士研究生,目前就读于内蒙古农业大学生命科学学院,本科毕业于内蒙古农业大学生命科学学院。主要研究方向是马干细胞基因组。本科期间获校级三等奖学金1次;研究生期间获校一等奖学金2次,自治区学业奖学金1次。参与国家自然科学基金项目1项、内蒙古自治区“揭榜挂帅”项目1项及内蒙古自治区自然科学基金项目1项。



通讯作者简介: 刘春霞,博士,教授,硕士生导师。主要从事草食动物细胞增殖与分化调控机制、高原特色动物适应性调节机制、牛羊胚胎发育表观组、体细胞克隆、基因编辑动物、人畜共患病感病机制及鉴别诊断试剂开发等方面的研究。作为项目负责人先后主持国家及省部级课题5项,发表科技论文30余篇,其中SCI论文14篇,获批发明专利8项,出版国家级教材4部。“家畜种质材料创制创新人才团队”“草原英才”工程产业创新创业人才团队骨干成员。多次获得校级表彰奖励,2023年第九届中国国际“互联网+”大学生创新创业大赛(企业赛道)自治区优秀指导教师,教学团队获第三届全国高校教师教学创新大赛二等奖。