

# LncRNA 在骨重建及骨相关疾病中的作用

韦淑萍<sup>1,2</sup>, 张西正<sup>1</sup>

(1. 军事科学院 卫勤保障技术研究所, 天津 300161; 2. 武警后勤学院 人体解剖与组织胚胎学教研室, 天津 300309)

**摘要:**骨重建可保持骨生物力学特性稳定,对维持骨强度具有重要意义。正常骨骼的生长和发育需要转录调控网络、信号传导通路、力学生物学及生物力学因素的紧密协调,而力学环境的改变,多种信号途径失调,影响骨的发育。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度大于 200 nt、生物来源广泛、2 级及 3 级结构高度保守的 RNA 分子。研究显示,许多 lncRNA 参与骨骼系统的正常发育或平衡,调控成骨细胞的分化,以及参与骨肉瘤的发生。LncRNA 表达失调与关节炎、骨质疏松症和骨癌等多种骨疾病密切相关,有望作为预测骨疾病的生物标志物。综述 lncRNA 的特征、参与骨重塑的 lncRNA 及其可能的作用机理,并讨论 lncRNA 作为生物标志物应用于治疗包括骨关节炎、骨质疏松症、骨癌等骨骼系统疾病的可能性,旨在为更好地理解和研究 lncRNA 在生物体内的作用提供参考。

**关键词:**长链非编码 RNA; 骨重塑; 力学生物学; 成骨; 生物标志物

**中图分类号:** R 318.01 **文献标志码:** A

**DOI:** 10.16156/j.1004-7220.2018.06.015

## The Role of LncRNA in Bone Remodeling and Skeletal Diseases

WEI Shuping<sup>1,2</sup>, ZHANG Xizheng<sup>1</sup>

(1. Institute of Medical Service and Technology, Academy of Military Science, Tianjin 300161, China;  
2. Department of Anatomy, Logistics University of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China)

**Abstract:** Bone remodeling can keep the biomechanical properties, which is of great significance to maintain bone strength. Normal skeletal development requires tight coordination of transcriptional networks, signaling pathways and biomechanical cues, and many of these pathways are dysregulated in pathological conditions affecting bone. lncRNA is a group of RNAs with broad biogenesis, which are longer than 200 nt and highly conserved in their secondary and tertiary structures. Studies show that many lncRNAs are involved in normal development or balance of the skeletal system, the regulation of osteoblast differentiation, and the pathogenesis of osteosarcoma. Dysregulation of lncRNA expression is closely related to many bone diseases and it is expected to be a biomarker for predicting bone diseases. In this review, the characteristics and mechanisms of lncRNA involved in bone remodeling and its possible role were summarized, and the likely utility of lncRNAs as biomarkers and therapeutic targets for diseases of the skeletal system was discussed, including osteoarthritis, osteoporosis, and cancers of the skeletal system, so as to provide references for the better understanding and study on lncRNA biological function in organisms.

**Key words:** long non-coding RNA (lncRNA); bone remodeling; mechanobiology; osteogenesis; biomarker

骨是维持人体生命的重要器官,也是人体承担力学载荷的主要结构。骨疾病研究已经成为临床医学一个非常重要的研究领域。骨重建是成熟骨组织的一种重要替换机制。在外伤骨折等骨疾病的治疗与康复以及预防骨组织疲劳损伤的积累过程中,骨重建可以保持骨的生物力学特性稳定,对维持骨强度具有重要意义。正常骨骼的生长和发育需要转录调控网络、信号传导通路、力学生物学及生物力学因素的紧密协调。在骨相关疾病的治疗与康复过程中,长期制动导致骨质疏松、骨折坚强内固定,由于应力遮挡现象产生的骨质丢失以及宇航员在失重状态下的骨质丢失等现象,都反映了骨在不同力学环境下进行骨重建的结果,表明力学环境是控制和影响骨重建的重要因素。在生理状态下,骨处于最佳力学环境中。当骨的力学环境变化时,力学信号被转化为细胞内化学信号,并经一系列信号通路导致基因和蛋白质发生变化,进而调控细胞的形态与功能,影响骨的发育。最近,随着测序技术发展,成千上万长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 被发现在骨组织的多种细胞里发挥关键性作用,在调控细胞表观遗传性、维护干细胞多能性、调控细胞分化、决定细胞或组织命运和调控骨重塑当中扮演重要角色<sup>[1]</sup>。

基因组测序结果表明组成人体的 30 亿个碱基对中,仅有 1% ~ 2% 的核酸序列用于蛋白质编码,其余 98% 的序列为非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA)<sup>[2]</sup>。ncRNA 根据其功能可分为持家 ncRNA (housekeeping ncRNA 和调控 ncRNA (regulatory ncRNA)。持家 ncRNA 主要包含 rRNA、tRNA、核内小 RNA (small nuclear RNA, snRNA) 以及核仁小 RNA (small nucleolar RNA, snoRNA)。调控 ncRNA 根据其分子链长度可进一步分为长度小于 200 nt 的短链非编码 RNA (small non-coding RNA, sncRNA) 和大于 200 nt 的长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)<sup>[3]</sup>。以 miRNA (microRNA)、siRNA (small interfering RNA)、piwiRNA 为代表的 sncRNA 在过去 10 年中作为分子生物学领域的研究热点,已被证实能在转录及转录后水平对细胞表型的调控发挥重要的作用。相较于 sncRNA, lncRNA 研究才刚起步,其表达量更低、分子结构更为复杂,成为分子生物学领域内的新星,在近年来取得了迅猛的发展。本文主要综述

lncRNA 的特征、参与骨重塑的 lncRNA 及其可能的作用机理,并讨论 lncRNA 作为生物标志物应用于治疗包括骨关节炎、骨质疏松症、骨癌等骨骼系统疾病的可能性。

## 1 LncRNA 的特征

LncRNA 是长度大于 200 bp (200 bp ~ 100 kbp)、无蛋白质编码功能的 ncRNA; 其表达量低、分子结构复杂,外显子少,缺少开放阅读框 (open reading frame, ORF) 及典型的起始密码子和终止子; 组织特异性远强于蛋白质编码 RNA, 不仅不同组织间的表达量不同,甚至同一组织不同部位的 lncRNA 都存在不同的表达模式; 具有很强的时空特异性,同一 lncRNA 的表达量在同一组织或器官的不同发育阶段均有较大差异。最新的 GENCODE 数据表明: 目前已发现 15 941 个人类 lncRNA 和 8 793 个鼠 lncRNA, 它们在细胞质、细胞核、细胞器均有分布,其中细胞核分布最多,可能与其调控基因表达有关; 细胞质中 lncRNA 可与蛋白分子伴侣相互作用,通过与 mRNA 碱基配对上调蛋白翻译,或者与 mRNA 间形成双链 RNA 结构,募集蛋白来调节 mRNA 降解; 还有些 lncRNA 与核孔复合体连接以调节蛋白运输至细胞核<sup>[4-5]</sup>。

## 2 LncRNA 在骨重塑中的作用

骨骼是一个极其复杂、高度机化和不断变化的组织,而且它不断地进行着重建。骨组织内含有 3 种细胞类型: 成骨细胞 (合成骨细胞外基质 ECM)、破骨细胞 (再吸收骨) 和骨细胞 (深嵌在骨里的机械传感细胞)。骨重建过程包括破骨细胞黏附在旧骨区域,分泌酸性物质溶解矿物质、分泌蛋白酶消化骨基质,形成骨吸收陷窝; 其后,成骨细胞移行至被吸收部位,分泌骨基质,骨基质矿化而形成新骨。骨吸收与骨形成过程的平衡是维持正常骨量的关键。成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,负责骨基质的合成、分泌和矿化,并且是骨组织中的力学敏感细胞。到目前为止,关于 LncRNA 在骨重建中的作用的研究主要集中在成骨细胞及干细胞上,对于破骨细胞及骨细胞的相关研究很少。最近的研究表明, H19 在成骨形成过程中表达上调,能促进成骨形成。研究显示, H19 被加工成 miR-675, 而后者可以降解 TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$  信号可以通过诱导

异染色质聚集阻碍骨形成;同时 H19/miR-675 可下调 HDAC4/5 的水平,促进成骨细胞的基因表达<sup>[6]</sup>。Yuan 等<sup>[7]</sup>研究发现,lncRNA DANCR 通过招募多梳抑制复合体成分 EZH2 至成骨调节因子 Runx2 的启动子,调控其表达,从而抑制成骨形成<sup>[7]</sup>。Chen 等<sup>[8]</sup>关于人牙周膜干细胞的研究显示,DANCR上调了细胞  $\beta$ -catenin/Wnt 信号传导通路,并促进成骨细胞形成。组蛋白去乙酰化酶 SIRT1 是一个重要的正向调节成骨形成和骨量的因子。研究显示,HBMSCs 里 lncRNA HIF1A-AS1 依赖 SIRT1 发挥调控成骨形成的作用;过表达 SIRT1 使 HIF1A-AS1 的表达下调,而敲除或药理学阻断 SIRT1 则上调 HIF1A-AS1 表达<sup>[9]</sup>。在多发骨髓瘤患者的骨髓间充质干细胞成骨分化过程中 MEG3 表达增加,但其总体表达量降低;而敲除正常细胞 MEG3 会降低成骨分化能力及减少 BMP4 的转录;异位 MEG3 过表达或外源性 BMP4 可用以治疗多发骨髓瘤患者的 MSCs 成骨缺损。具体来说,MEG3 通过扰乱 SOX2 转录因子与 BMP4 启动子之间的相互作用来调控 BMP4 基因转录<sup>[10]</sup>。有趣的是,来自多发骨髓瘤患者 MSCs 的 MEG3 过表达也提高了软骨细胞分化,提示这种 lncRNA 在软骨细胞分化中同样发挥作用。

### 3 LncRNA 在骨相关疾病中的作用

骨质疏松(osteoporosis, OP)是一种以低骨量和骨组织微结构破坏为特征,导致骨质脆性增加和易于骨折的全身性骨代谢性疾病。研究发现,免疫系统与骨代谢存在关联<sup>[11]</sup>,循环单核细胞是破骨细胞的前体细胞,直接参与并影响破骨细胞的分化。Tong 等<sup>[12]</sup>通过对比绝经后骨质疏松与绝经后非骨质疏松女性血液单核细胞中的 lncRNA 发现,绝经后骨质疏松患者血液中单核细胞的 lncRNA DANCR 表达显著升高。陈娟等<sup>[13]</sup>通过基因芯片比较绝经后健康与骨质疏松女性的 lncRNA,筛选出 8 个差异表达的 lncRNA,通过 Pathway 进一步分析发现,差异表达的 lncRNA 与 Jak/STAT 信号通路、MAPK 信号通路等与骨质疏松有密切关系的信号通路密切相关。

关节炎是一种滑膜关节渐进性、退行性病变,主要累及关节软骨及其他关节组织,如滑膜和软骨下骨。正常情况下,由于软骨细胞的活性,成熟关节软骨的合成与分解处于动态的平衡。多种因素

影响着关节炎的发生和发展,如外伤引起关节力学载荷的改变,软骨体内平衡就可能被打破。由于关节软骨几乎没有再生能力,关节炎的治疗非常困难。当关节炎发生时,多种生长因子和细胞因子、炎症因子、氧化应激、趋化因子等均发生改变。然而,没有任何一种治疗措施能有效改善和阻止关节炎的发展。目前研究发现,关节炎对表观遗传学修饰(如 DNA 甲基化、组蛋白修饰)易感,可能为关节炎的替代疗法开辟新的路径。LncRNA 对软骨体内平衡与骨关节炎有重要影响。Chang 等<sup>[14]</sup>报道,lncRNA H19 在成熟原代关节软骨细胞中高表达,并被 SOX9 调控;而敲除 H19 基因会减少 COL2A1 水平。H19 又是 miRNA miR-675 的前体,可以推论 H19 的敲除效应可经过表达 miR-675 而恢复,miR-675 可能是 H19 调控软骨细胞表型的重要功能性组分<sup>[6]</sup>。Steck 等<sup>[15]</sup>报道,在缺氧条件与骨关节炎患者软骨组织中,H19 表达水平升高,而促炎因子会导致 H19 水平降低;可以推测 H19 在应力条件下调控软骨细胞新陈代谢以及诱导软骨细胞合成代谢方面扮演重要角色。Kim 等<sup>[16]</sup>研究显示,HOTTIP 在关节炎病人软骨细胞表达水平升高,同时伴随 HOXA13 表达水平的降低;然而,HOTTIP 可促进 H3K4 甲基化并发挥活化远端 HOX 基因的功能。微阵列分析显示,关节炎软骨细胞中有 121 个 lncRNA 表达水平出现变化,其中 73 个表达显著上调,包括 HOTAIR、GAS5、PMS2L2、RP11-445H22.4、H19 和 CTD-2574D22.4<sup>[17]</sup>。Liu 等<sup>[18]</sup>研究显示,在关节炎软骨细胞中有 152 个 lncRNA 表达水平出现变化,经 qPCR 证实 lncRNA-CIR 表达水平升高 10 倍不止;lncRNA-CIR 的基因敲除和过表达研究则显示,lncRNA-CIR 能够通过增加 MMP13 和 ADAMTS-5 表达来诱导软骨细胞的分解代谢活动。另有研究显示,关节炎软骨中 GAS5 表达增加,RNA FISH 分析显示健康软骨细胞里 GAS5 定位于细胞核,而在关节炎软骨细胞里呈现细胞质分布;体外培养的软骨细胞,过表达 GAS5 后,金属蛋白酶表达增加,与自噬相关的标记分子及 miR-21 表达下降<sup>[19]</sup>。Pearson 等<sup>[20]</sup>通过 RNA-seq 分析了人原发性髌关节炎与软骨细胞 lncRNA 的关系,在检测的 983 个 lncRNA 中,有 125 个差异表达的 lncRNA,包括 PACER (p5-associated COX2-extragenic RNA) 和软骨细胞炎症相关 lncRNA (CILinc01 and

CIInc02);体外试验中,这3个lncRNA的表达水平是增加的。

骨肉瘤是骨癌的一种类型,在小儿恶性肿瘤中发生率为5%。成骨细胞骨肉瘤是高度矿化的组织,其内含由大量多核细胞组成的类骨质。随着外科、治疗及放射医学的进步,骨肉瘤患者的存活率从过去40年的20%增加到了70%。然而,阐明疾病发生和发展的分子基础,需要建立更好的治疗方案。最近的研究确定,一些lncRNA在骨肉瘤组织中差异表达。LncRNA MALAT-1(转移相关的肺腺癌基因1)是1个保守的6.8 kb转录体,3'末端不是多聚腺苷化,而是折叠成三螺旋结构,这种独特的结构保护RNA不被核酸酶降解。研究表明,MALAT-1基因敲除后骨肉瘤细胞不仅增殖下降,同时也诱导细胞凋亡;体内研究中MALAT-1基因敲除也会降低骨肉瘤生长和转移。此外,一项利用MG63细胞株进行的研究表明,高剂量的雌激素可以下调细胞MALAT-1,同时降低细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[21]</sup>。与MALAT-1一样,lncRNA SNHG12(核仁小RNA宿主基因)在骨肉瘤患者体内上调,其表达与AMOT(Angiomotin)相关。AMOT为骨肉瘤中1个未知功能的基因,而调节SNHG12表达随之改变AMOT表达<sup>[22]</sup>。同样,lncRNA HULC在骨肉瘤组织中也表达上调,体外试验中敲除HULC可抑制骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[23]</sup>。相反,lncRNA TUSC7在骨肉瘤中显著下降,其低表达与骨肉瘤患者的不良预后正相关。相对于MALAT-1,抑制TUSC7将增加细胞增殖或减少细胞凋亡。体内移植的研究也表明,TUSC7沉默促进肿瘤生长<sup>[24]</sup>。LncRNA DANCR、PACER、HOTAIR、HOTTIP和H19等在软骨细胞或成骨细胞分化中发挥功能,而在骨肉瘤中它们的功能失调。就像MALAT-1,在骨肉瘤细胞株敲除DANCR会减少细胞增殖,导致细胞周期阻滞。同样,lncRNA PACER、HOTAIR和HOTTIP在骨肉瘤中被证明是上调,敲除这些lncRNA可抑制骨肉瘤细胞的增殖或侵袭。这些初步的数据表明,研究者可能最终能够利用lncRNA作为一个生物标志物去推测骨肉瘤的预后状况。

## 4 结论

lncRNA可在基因的表现遗传学修饰、转录调控、转录后调控以及翻译后调控等多层次对细胞命运和功能发挥重要的调节作用。在骨力学生物学

研究领域,已经发现一些lncRNA能够通过多种机制调控骨组织相关细胞功能,参与骨骼系统疾病的病理过程。对于骨形成,lncRNA如何调节干/祖细胞向成骨细胞谱系分化的研究仍处于起步阶段;同样,lncRNA是如何控制成熟骨的平衡尚不明确。然而,随着这方面研究的不断深入,将了解更多参与骨发育调控的lncRNA,对理解骨骼疾病(如骨性关节炎和骨质疏松症)及确定治疗疾病策略产生深刻影响。研究发现,lncRNA也存在于细胞外囊(即分泌体),这可能会增加它们的体内半衰期以及作为生物标志物的潜力。在这方面,lncRNA有可能作为关节炎或关节修复过程的生物标志物,尽管关于lncRNA和关节炎严重程度之间的关系仍需进一步探索。同样,未来的研究将揭示lncRNA是否可以作为预测骨疾病(如骨质疏松症)的生物标志物。

LncRNA的生物学是相对年轻的领域,目前有许多技术已被用来研究具有明显特征的lncRNA及它们的功能。

(1)关于lncRNA功能最有说服力的指标是其亚细胞定位,用其潜在结合组分和信号,以及洞察其在转录水平和转录后水平调控基因重排的能力。其中,单分子RNA原位杂交,同时结合荧光显微镜,不仅可以提供lncRNA在核或胞质的定位信息,而且能够知道是否接近于推测的细胞内mRNA或基因组靶标。

(2)可以通过杂交法分离细胞内与lncRNA相互作用的DNA、RNA或蛋白,随后以新一代测序技术进一步鉴定,将会产生一系列与其功能相关的信息。

(3)利用基因敲除动物模型研究蛋白质编码基因的功能十分必要,但lncRNA类似模型的设计更具挑战性。

随着细胞培养和体内遗传模型的建立,以及CRISPR-Cas技术发展,特别是靶向敲入技术效率的提高,将很有可能促进lncRNA靶向研究的速度<sup>[25-27]</sup>。

## 参考文献:

- [1] IYER MK, NIKNAFS YS, MALIK R, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome [J]. Nat Genet, 2015, 47(3): 199-208.
- [2] CUNNINGHAM F, AMODE MR, BARRELL D, et al. Ensembl 2015 [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43: D662-669.

- [ 3 ] MATTICK JS, RINN JL. Discovery and annotation of long noncoding RNAs [ J ]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22( 1 ) : 5-7.
- [ 4 ] CABILI MN, DUNAGIN MC, MCCLANAHAN PD, *et al.* Localization and abundance analysis of human lncRNAs at single-cell and single-molecule resolution [ J ]. *Genome Biol*, 2015, 16( 1 ) : 20.
- [ 5 ] WERNER MS, RUTHENBURG AJ. Nuclear fractionation reveals thousands of chromatin-tethered noncoding RNAs adjacent to active genes [ J ]. *Cell Rep*, 2015, 12( 7 ) : 1089-1098.
- [ 6 ] 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.
- [ 7 ] YUAN SX, WANG J, YANG F, *et al.* Long noncoding RNA DANCR increases stemness features of hepatocellular carcinoma by derepression of CTNBN1 [ J ]. *Hepatology*, 2016, 63( 2 ) : 499-511.
- [ 8 ] CHEN L, SONG Z, HUANG S, *et al.* lncRNA DANCR suppresses odontoblast-like differentiation of human dental pulp cells by inhibiting wnt/beta-catenin pathway [ J ]. *Cell Tissue Res*, 2016, 364( 2 ) : 309-318.
- [ 9 ] ZAINABADI K, LIU CJ, CALDWELL ALM, *et al.* SIRT1 is a positive regulator of *in vivo* bone mass and a therapeutic target for osteoporosis [ J ]. *PLoS One*, 2017, 12( 9 ) : e0185236.
- [ 10 ] ZHUANG W, GE X, YANG S, *et al.* Upregulation of lncRNA MEG3 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients by targeting BMP4 transcription [ J ]. *Stem Cells*, 2015, 33( 6 ) : 1985-1997.
- [ 11 ] NICOLIN V, LACC D, VALENTINI R, *et al.* Osteoimmunology represents a link between skeletal and immune system [ J ]. *Ital J Anat Embryol*, 2016, 121( 1 ) : 37-42.
- [ 12 ] TONG X, GU PC, XU SZ, *et al.* Long non-coding RNA-DANCR in human circulating monocytes: A potential biomarker associated with postmenopausal osteoporosis [ J ]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2015, 79( 5 ) : 732-737.
- [ 13 ] 陈娟, 谢丽华, 李生强, 等. lncRNA 在绝经后骨质疏松症肾阴虚证中的表达特征及调控网络分析 [ J ]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21( 5 ) : 553-559.
- [ 14 ] CHANG T, XIE J, LI H, *et al.* MicroRNA-30a promotes extracellular matrix degradation in articular cartilage via downregulation of Sox9 [ J ]. *Cell Prolif*, 2016, 49( 2 ) : 207-218.
- [ 15 ] STECK E, BOEUF S, GABLER J, *et al.* Regulation of H19 and its encoded microRNA-675 in osteoarthritis and under anabolic and catabolic *in vitro* conditions [ J ]. *J Mol Med*, 2012, 90( 10 ) : 1185-1195.
- [ 16 ] KIM D, SONG J, HAN J, *et al.* Two non-coding RNAs, MicroRNA-101 and HOTTIP contribute cartilage integrity by epigenetic and homeotic regulation of integrin-alpha1 [ J ]. *Cell Signalling*, 2013, 25( 12 ) : 2878-2887.
- [ 17 ] FU M, HUANG G, ZHANG Z, *et al.* Expression profile of long noncoding RNAs in cartilage from knee osteoarthritis patients [ J ]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, 23( 3 ) : 423-432.
- [ 18 ] LIU Q, ZHANG X, DAI L, *et al.* Long noncoding RNA related to cartilage injury promotes chondrocyte extracellular matrix degradation in osteoarthritis [ J ]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66( 4 ) : 969-978.
- [ 19 ] SONG J, AHN C, CHUN CH, *et al.* A long non-coding RNA, GAS5, plays a critical role in the regulation of miR-21 during osteoarthritis [ J ]. *J Orthopaedic Res*, 2014, 32( 12 ) : 1628-1635.
- [ 20 ] PEARSON MJ, PHILIP AM, HEWARD JA, *et al.* Long intergenic noncoding RNAs mediate the human chondrocyte inflammatory response and are differentially expressed in osteoarthritis cartilage [ J ]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68( 4 ) : 845-856.
- [ 21 ] FANG D, YANG H, LIN J, *et al.* 17beta-estradiol regulates cell proliferation, colony formation, migration, invasion and promotes apoptosis by upregulating miR-9 and thus degrades MALAT-1 in osteosarcoma cell MG-63 in an estrogen receptor-independent manner [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 457( 4 ) : 500-506.
- [ 22 ] RUAN W, WANG P, FENG S, *et al.* Long non-coding RNA small nucleolar RNA host gene 12 ( SNHG12 ) promotes cell proliferation and migration by upregulating angiomin gene expression in human osteosarcoma cells [ J ]. *Tumour Biol*, 2016, 37( 3 ) : 4065-4073.
- [ 23 ] SUN XH, YANG LB, GENG XL, *et al.* Increased expression of lncRNA HULC indicates a poor prognosis and promotes cell metastasis in osteosarcoma [ J ]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8( 3 ) : 2994-3000.
- [ 24 ] CONG M, LI J, JING R, *et al.* Long non-coding RNA tumor suppressor candidate 7 functions as a tumor suppressor and inhibits proliferation in osteosarcoma [ J ]. *Tumour Biol*, 2016, 37( 7 ) : 9441-9450.
- [ 25 ] SUBRAMANIAN RR, WYSK MA, OGILVIE KM, *et al.* Enhancing antisense efficacy with multimers and multi-targeting oligonucleotides ( MTOs ) using cleavable linkers [ J ]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43( 19 ) : 9123-9132.
- [ 26 ] THAKORE PI, D'IPPOLITO AM, SONG L, *et al.* Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements [ J ]. *Nat Methods*, 2015, 12( 12 ) : 1143-1149.
- [ 27 ] HILTON IB, D'IPPOLITO AM, VOCKLEY CM, *et al.* Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33( 5 ) : 510-517.