

hsa-miR-378对人牙髓干细胞向成牙本质分化的影响与机制探讨

马秀花 晁晓芹 涂子锋 韩强 周洁 姚毅章*

(青海省第五人民医院口腔科, 西宁 810000)

摘要 该文旨在探讨人微小核糖核酸-378(hsa-miR-378)通过靶向骨形态发生蛋白-2(BMP-2)/SMAD1信号通路影响人牙髓干细胞向成牙本质分化的作用。自牙髓组织分离并培养人牙髓干细胞, 转染携带阴性对照(NC)、hsa-miR-378抑制剂(hsa-miR-378 inhibitor)、hsa-miR-378模拟物(hsa-miR-378 mimics)的慢病毒载体, 分别记为NC组、hsa-miR-378 inhibitor组、hsa-miR-378 mimics组, 另取未处理细胞记为Blank组(仅添加等量无菌生理盐水)。间充质干细胞分子标记物STRO-1、CD105、CD90阳性表达率高, 造血干细胞分子标记物CD34、CD45阳性表达率低; NC组、hsa-miR-378 inhibitor组和hsa-miR-378 mimics组细胞的转染效率高; 与Blank组和NC组相比, hsa-miR-378 mimics组细胞碱性磷酸酶(ALP)染色变浅, ALP活性和细胞吸光度值降低($P<0.01$), 矿化结节数目明显减少, hsa-miR-378 inhibitor组细胞ALP染色加深, ALP活性和细胞吸光度值上升($P<0.01$), 矿化结节数目明显增多; 与Blank组和NC组比, hsa-miR-378 mimics组细胞hsa-miR-378表达上升($P<0.01$), BMP-2、SMAD1、牙本质基质蛋白1(DMP-1)、牙本质涎磷蛋白(DSPP)、骨钙素(OCN) mRNA和蛋白表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), hsa-miR-378 inhibitor组细胞hsa-miR-378表达下降($P<0.01$), BMP-2、SMAD1、DMP-1、DSPP、OCN mRNA和蛋白表达上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$); hsa-miR-378可介导BMP-2表达。miR-378低表达可促进牙髓干细胞向成牙本质分化, 这可能与靶向激活BMP-2/SMAD1信号通路相关。

关键词 人微小核糖核酸-378; 骨形态发生蛋白-2; SMAD1; 成牙本质分化

Effect of hsa-miR-378 on the Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells and Its Mechanism

MA Xiuhua, CHAO Xiaoqin, TU Zifeng, HAN Qiang, ZHOU Jie, YAO Yizhang*

(Department of Stomatology, Qinghai Fifth People's Hospital, Xining 810000, China)

Abstract This study is aimed to investigate the effect of hsa-miR-378 (human micro ribonucleic acid-378) on the differentiation of human dental pulp stem cells into odontoblasts through targeting BMP-2 (bone morphogenetic protein-2)/SMAD1 signaling pathway. Human dental pulp stem cells were isolated from dental pulp tissue and cultured. Lentivirus vectors carrying NC (negative control), hsa-miR-378 inhibitor and hsa-miR-378 mimics were transfected, and they were recorded as NC group, hsa-miR-378 inhibitor group and hsa-miR-378 mimics group, respectively. In addition, untreated cells were recorded as Blank group (only the same amount of sterile normal saline was added). The positive expression rates of STRO-1, CD105 and CD90 were high, respectively. The positive expression rates of CD34 and CD45 were low. The transfection efficiency of human dental pulp stem cells in

收稿日期: 2022-08-23

接受日期: 2022-10-19

*通讯作者。Tel: 13639781598, E-mail: 2439684209@qq.com

Received: August 23, 2022

Accepted: October 19, 2022

*Corresponding author. Tel: +86-13639781598, E-mail: 2439684209@qq.com

NC group, hsa-miR-378 mimics group and hsa-miR-378 inhibitor group were high. Compared with Blank group and NC group, ALP (alkaline phosphatase) staining was lighter, and ALP activity and cell optical density were decreased ($P<0.01$). The number of mineralized nodules was decreased in hsa-miR-378 mimics group, and ALP staining was deepened, ALP activity and cell optical density were increased ($P<0.01$), and the number of mineralized nodules was increased in hsa-miR-378 inhibitor group. Compared with Blank group and NC group, the hsa-miR-378 expression was increased ($P<0.01$), and the mRNA and protein expression levels of BMP-2, SMAD1, DMP-1 (dentin matrix protein 1), DSPP (dentin sialophosphorin) and OCN (osteocalcin) protein were decreased in hsa-miR-378 mimics group ($P<0.05$ or $P<0.01$); the hsa-miR-378 expression was decreased ($P<0.01$), and the mRNA and protein expression levels of BMP-2, SMAD1, DMP-1, DSPP and OCN were increased in hsa-miR-378 inhibitor group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$ or $P<0.01$). hsa-miR-378 can mediate BMP-2 expression. Low expression of hsa-miR-378 can promote the differentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts, which may be related to the targeted activation of BMP-2/SMAD1 signaling pathway.

Keywords human micro ribonucleic acid-378; bone morphogenetic protein-2; SMAD1; odontoblast differentiation

牙髓干细胞是一种具有多向分化及自我更新能力的牙源性成体间充质干细胞。牙髓干细胞可分化为成牙本质、成骨细胞、成软骨细胞、神经细胞及脂肪细胞,其中牙髓干细胞分化为成牙本质的能力是牙髓再生、自体牙再造、颌面部骨缺损修复与再生等领域的基础^[1]。在牙齿发育过程中,成牙本质细胞可分泌牙本质基质,然而其在体外很难分离培养,因此诱导牙髓干细胞向成牙本质细胞分化尤为重要^[2]。微小核糖核酸(micro ribonucleic acid, miRNA)是一种长度为18~25 nt的非编码小分子单链RNA,可通过碱基互补配对方式抑制或降解靶基因mRNA,参与组织形态发生、器官形成、细胞分化与增殖等重要进程^[3],有报道指出hsa-miR-378可通过促进成骨相关基因碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素(osteocalcin, OCN)蛋白的表达促进间充质干细胞向成骨细胞分化^[4],而这些成骨相关基因在牙髓干细胞向成牙本质分化时也发挥重要功能^[5],因此本研究小组推测hsa-miR-378的表达变化可能与牙髓干细胞向成牙本质分化的过程密切相关,但尚需进一步研究验证。骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)是影响成牙分化的关键分子之一,有研究指出BMP-2/SMAD1信号通路参与调控牙髓细胞向成牙本质细胞分化^[6]。有研究表明,miR-378可靶向BMP-2调控骨髓基质细胞向破骨细胞分化从而调控骨质疏松症^[7],但miR-378能否通过靶向BMP-2调控牙髓干细胞向成牙本质分化依然未知。鉴于此,本研究选取

人牙髓干细胞进行体外细胞实验,研究hsa-miR-378靶向BMP-2/SMAD1信号通路对人牙髓干细胞向成牙本质分化的作用与机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 于2020年1月选取本院1例正畸患者,取正畸减数拔除的健康恒牙用于后续实验。患者对本研究知情同意,且本研究已经过青海省第五人民医院伦理委员会批准(审批号:202001-002)。

1.1.2 实验试剂 鼠抗人别藻蓝蛋白标记STRO-1(STRO-1 APC)抗体、兔抗人异硫氰酸荧光素标记CD105(CD105 FITC)抗体、兔抗人CD90 PE抗体、兔抗人CD34 PE抗体、兔抗人CD45 PE抗体(批号分别为orb179924、orb465960、orb490522、orb495128、orb498993)均购自武汉博欧特生物科技有限公司;脂质体(Lipofectamine™ 3000)转染试剂盒(批号:L3000001)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;携带阴性对照(NC,合成序列:正义链5'-UCA GCG ACU UCG GAG UAC UUC C-3',反义链5'-CUC GAA CUG AAG UAU UCC G-3')的慢病毒载体、携带hsa-miR-378 inhibitor(合成序列:正义链5'-GCC UUC UGA CUC CAA GUC CAG U-3',反义链5'-CUC GAA CUG AAG UAU UCC G-3')的慢病毒载体、携带hsa-miR-378模拟物(hsa-miR-378 mimics,合成序列:正义链5'-ACU GGA CUU GGA GUC AGA AGG C-3',反义链5'-CUU CUG ACU

CCA AGU CCA GUU U-3')的慢病毒载体、携带 hsa-miR-378 mimics对照(miR-NC, 合成序列: 正义链 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UUU-3', 反义链 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA AUU-3')的慢病毒载体、野生型和突变型 BMP-2 报告基因质粒(野生型和突变型 pmirGLO-BMP-2)均由杭州开泰生物技术有限公司构建与合成; 对甲苯胺蓝(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, BCIP)/硝基四氮唑蓝(nitro blue tetrazolium, NBT) ALP 显色试剂盒、茜素红 S 染色试剂盒(批号分别为 ZY81224、ZY121105)均购自上海泽叶生物科技有限公司; ALP 染色试剂盒(偶氮偶联法)(批号: FK-F1523)购自上海延慕实业有限公司; BMP-2、SMAD1、牙本质基质蛋白 1(dentin matrix protein 1, DMP-1)、牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphorin, DSPP)、OCN、磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物由上海闪晶分子生物科技有限公司合成; Trizol 试剂(批号: 15596018)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 总核糖核酸(RNA)提取试剂盒(批号: DP419)购自天根生化科技(北京)有限公司; 总蛋白提取试剂盒(批号: PE001)购自美国 SAB 公司; 鼠抗人 BMP-2(批号: MA5-23764)、鼠抗人 SMAD1(批号: MA5-37738)、兔抗人 p-SMAD1(批号: ab226821)、鼠抗人 DMP-1(批号: H00001758-M01)、兔抗人 DSPP(批号: PA5-72040)、鼠抗人 OCN(批号: MA1-20786)、鼠抗人 GAPDH(批号: MA5-15738)单克隆抗体(一抗), 羊抗鼠辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记 BMP-2(批号: 31430)、SMAD1(批号: 31439)、DMP-1(批号: A28177)、OCN(批号: 62-6520)、GAPDH(批号: 32430)多克隆抗体、羊抗兔 HRP 标记 p-SMAD1(批号: 32460)、DSPP(批号: A16116)多克隆抗体(二抗)均购自北京义翘神州科技股份有限公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒(批号 11402ES60)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司。

1.1.3 实验设备 GTR16-2 型高速台式冷冻离心机购自北京新时代北利医疗器械有限公司; FACSCalibur 型流式细胞仪购自美国 BD 公司; BX53 型荧光显微镜、IX51 型倒置显微镜购自日本 Olympus 公司; DR-200B 型酶标仪购自无锡华卫德朗仪器有限公司; LC96 型 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司; 1645050 型电泳

仪购自美国 Bio-Rad 公司; GelSMART 型凝胶成像仪购自大龙兴创实验仪器(北京)股份公司。

1.2 方法

1.2.1 人牙髓干细胞分离与培养 收集本院患者的正畸减数健康恒牙, 采用组织块-酶消化法^[8]获取人牙髓干细胞: 无菌操作分离牙髓组织, 剪碎后加入 I 型胶原蛋白酶, 室温孵育 1 h, 3 000 r/min 离心 5 min, 取沉淀, 将细胞接种至 6 孔板, 加入含 20% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素 G 钠、100 U/mL 链霉素的杜氏改良培养液(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM), 进行常规培养; 当细胞密度达 2×10^5 个/孔时将细胞置于不含双抗的培养液中培养, 当细胞汇合度达 80% 时进行传代培养。

1.2.2 流式细胞术检测人牙髓干细胞表面标志物表达情况 取第 3 代人牙髓干细胞, 胰酶消化后, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗细胞, 制备密度为 1×10^6 个/mL 的细胞悬液, 分别加 STRO-1 APC、CD105 FITC、CD90 PE、CD34 PE、CD45 PE 抗体(稀释比例均为 1:1 000), 冰上避光孵育 1 h, 重悬细胞后用流式细胞仪检测人牙髓干细胞表面标志物的表达情况。

1.2.3 细胞转染与分组 取第 3 代人牙髓干细胞, 调整细胞密度为 5×10^5 个/mL, 将细胞接种至 6 孔板中培养, 当细胞融合度约为 80% 时, 采用脂质体转染法严格按照试剂盒说明分别向人牙髓干细胞中转染携带 NC 的慢病毒载体、携带 hsa-miR-378 inhibitor 的慢病毒载体、携带 hsa-miR-378 mimics 的慢病毒载体, 分别记为 NC 组、hsa-miR-378 inhibitor 组和 hsa-miR-378 mimics 组, 另取未处理细胞记为 Blank 组, 每组均设置 6 个复孔。转染 48 h 后, 用荧光显微镜观察细胞转染效率, 随机选取 5 个不重复视野计算荧光与普通视野下的细胞数量, 然后计算细胞转染效率, 其中细胞转染效率 = 荧光视野下的细胞数量 / 普通视野下细胞数量 $\times 100\%$ 。

1.2.4 ALP 染色及 ALP 活性检测 转染 48 h 后, 用 4% 多聚甲醛室温固定细胞 2 h, PBS 清洗细胞后加 2 mL ALP 染色工作液(依据 BCIP/NBT ALP 显色试剂盒说明书进行配制), 37 °C 避光孵育 30 min, 终止反应后倒置显微镜下观察 ALP 染色情况。ALP 活性检测: 按照 ALP 活性检测试剂盒配制磷酸对硝基苯酯(p-nitrophenyl phosphate, PNPP)反应液, PBS 清洗细胞后, 加 100 μ L PNPP 反应液于 37 °C 孵育 30 min, 加氢氧化

表1 用于PCR反应的引物序列
Table 1 Primer sequences for PCR reaction

基因 Gene	引物序列 Primer sequences	扩增产物长度/bp Amplification product length /bp
hsa-miR-378	Upstream primer: 5'-CTA TTA AAC GAC TGG ACT TGG AG-3' Downstream primer: 5'-TAT GCT TGT TCT CGT C-TC TGT GTC-3'	76
U6	Upstream primer: 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3' Downstream primer: 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'	112
BMP-2	Upstream primer: 5'-GTC CTG AGC GAG TTC GAG TT-3' Downstream primer: 5'-TGA AGC TCT GCT GAG GTG AT-3'	308
SMAD1	Upstream primer: 5'-GGC AAC CGA GTA ACT GTG T-3' Downstream primer: 5'-ATG GAA CGC TTC ACC CAC AC-3'	689
DMP-1	Upstream primer: 5'-ACC ACA ATA CTG AAT CTG AAA GCT C-3' Downstream primer: 5'-TGC TGT CCG TGT GGT CAC TA-3'	141
DSPP	Upstream primer: 5'-ATG GGC CAT TCC AGT TCC TC-3' Downstream primer: 5'-GGG GTC ATT GAT GGC AAC AAT A-3'	187
OCN	Upstream primer: 5'-CAA GTC CCA CAC AGC AGC TT-3' Downstream primer: 5'-AAA GCC GAG CTG CCA GAG TT-3'	370
GAPDH	Upstream primer: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC A-3' Downstream primer: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'	450

钠终止反应后,于波长为405 nm处测定吸光度(D)值,分析ALP活性。

1.2.5 茜素红S染色观察细胞矿化结节形成情况 转染48 h后,取细胞接种至96孔板(5×10^3 个/孔),用75%乙醇固定细胞,双蒸水冲洗细胞后,加茜素红染料于37 °C染色30 min,在倒置显微镜下观察细胞矿化结节形成情况。采用十六烷基吡啶进行定量分析,计算吸光度(D)值。

1.2.6 实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测细胞hsa-miR-378表达以及BMP-2、SMAD1、DMP-1、DSPP、OCN mRNA表达情况 转染48 h后,用Trizol试剂提取细胞总RNA,逆转录后以脱氧核糖核酸为模板进行PCR反应,扩增目的基因的反应程序:95 °C预变性3 min;95 °C变性15 s;60 °C退火30 s;39个循环,最后74 °C延伸5 min。引物序列见表1,PCR反应体系:2 μ L $10 \times$ 扩增缓冲液,1 μ L dNTP,引物各0.5 μ L,2 μ L模板DNA,0.25 μ L TaqDNA聚合酶,0.5 μ L Mg^{2+} 溶液,加双蒸水至20 μ L。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[9]对目的基因的表达情况进行定量分析。

1.2.7 蛋白质免疫印迹法检测人牙髓干细胞中BMP-2、SMAD1、DMP-1、DSPP、OCN蛋白表达量及p-SMAD1水平 转染48 h后,收集人牙髓干细胞。采用预冷的PBS洗涤细胞2次,加入细胞裂解液(含蛋白酶抑制剂),用二喹啉甲酸法提取总蛋白并定量。取20 μ g蛋白上样,进行聚丙烯酰胺凝

胶电泳。电泳后转膜,用5%脱脂奶粉于室温封闭1 h,与相应的一抗(稀释倍数为1:1 000)于4 °C孵育过夜;再与HRP标记的二抗(稀释倍数为1:2 000)于室温孵育1 h。电化学发光法曝光显影,凝胶成像仪分析目的蛋白条带。将目的蛋白条带的灰度值与内参 β -actin条带的灰度值的比值记为目的蛋白的相对表达量。

1.2.8 双荧光素酶报告基因检测hsa-miR-378是否靶向BMP-2 利用TargetScan数据库预测BMP-2为hsa-miR-378的潜在靶基因。委托杭州开泰生物技术有限公司构建野生型和突变型pmirGLO-BMP-2报告基因质粒,采用脂质体转染法将两者分别与miR-NC和hsa-miR-378 mimics共转染至人牙髓干细胞内,转染48 h后,按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书检测各组细胞的相对荧光强度,相对荧光强度=萤火虫荧光素酶荧光强度/海肾荧光素酶荧光强度。

1.3 统计学分析

用SPSS 22.0进行统计学分析,本研究数据用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本资料间采用单因素方差分析,样本间比较采用SNK-q检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 人牙髓干细胞鉴定

间充质干细胞分子标记物STRO-1、CD105、

CD90的阳性表达率分别为(97.71±14.95)%、(86.43±10.71)%、(99.11±13.10)%。造血干细胞分子标记物CD34、CD45的阳性表达率分别为(0.06±0.02)%、(0.15±0.03)% (图1)。

2.2 各组细胞转染情况

转染成功的细胞呈绿色荧光。hsa-miR-378 mimics组荧光视野和普通视野细胞数均高于NC组, hsa-miR-378 inhibitor组荧光视野和普通视野细胞数均低于NC组和hsa-miR-378 mimics组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (图2)。NC组、hsa-miR-378 mimics组和hsa-miR-378 inhibitor组的转染效率分别为(90.14±15.37)%、(91.08±13.52)%、(89.14±11.82)%。

2.3 miR-378影响人牙髓干细胞ALP表达

与Blank组和NC组相比, hsa-miR-378 mimics组

细胞的ALP染色变浅、ALP活性降低 ($P < 0.01$), hsa-miR-378 inhibitor组细胞的ALP染色加深、ALP活性上升 ($P < 0.01$); 与hsa-miR-378 mimics组相比, hsa-miR-378 inhibitor组细胞的ALP染色加深、ALP活性上升 ($P < 0.01$) (图3和图4)。

2.4 miR-378影响人牙髓干细胞的矿化能力

与Blank组和NC组相比, hsa-miR-378 mimics组细胞的矿化结节数目明显减少, hsa-miR-378 inhibitor组细胞的矿化结节数目明显增多; 与hsa-miR-378 mimics组相比, hsa-miR-378 inhibitor组细胞的矿化结节数目明显增多。定量分析结果显示, 与Blank组和NC组相比, hsa-miR-378 mimics组细胞的吸光度 (D) 值降低 ($P < 0.01$), hsa-miR-378 inhibitor组细胞的 D 值上升 ($P < 0.01$); 与hsa-miR-378 mimics组相比, hsa-miR-378 inhibitor组细胞的 D 值上升 ($P < 0.01$) (图5和图6)。

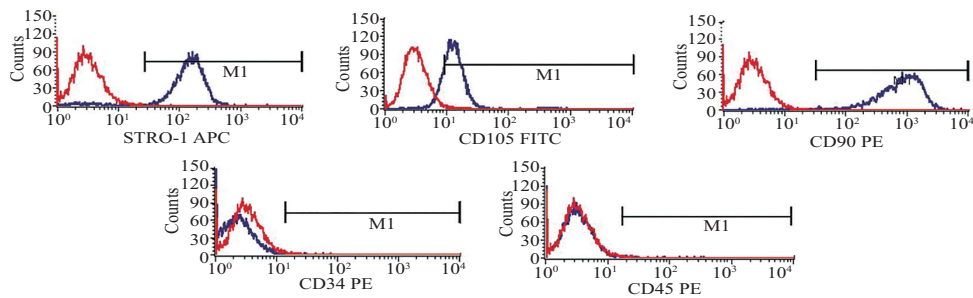
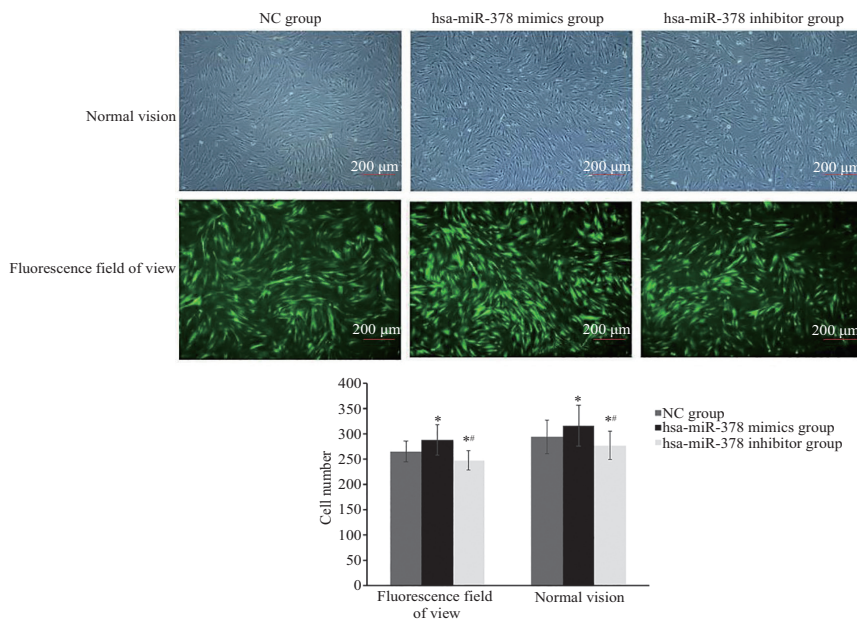


图1 用流式细胞仪鉴定人牙髓干细胞标志物

Fig.1 Identification of human dental pulp stem cell markers by flow cytometry



* $P < 0.05$, 与NC组相比; ** $P < 0.05$, 与hsa-miR-378 mimics组相比。

* $P < 0.05$ compared with NC group; ** $P < 0.05$ compared with hsa-miR-378 mimics group.

图2 荧光显微镜检测细胞转染效率

Fig.2 Cell transfection efficiency detected by fluorescence microscope

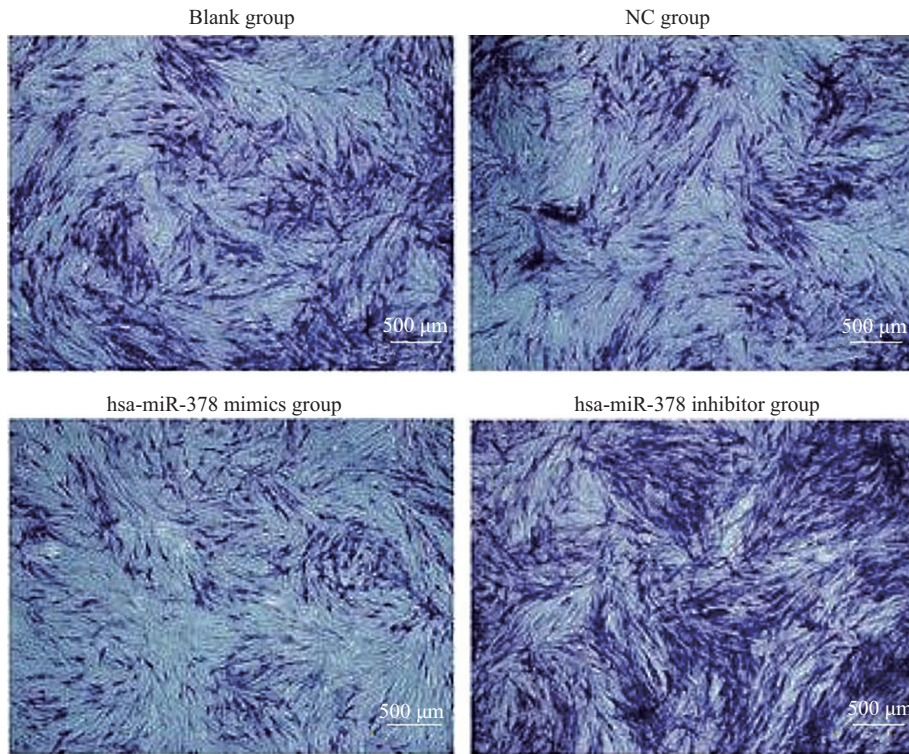
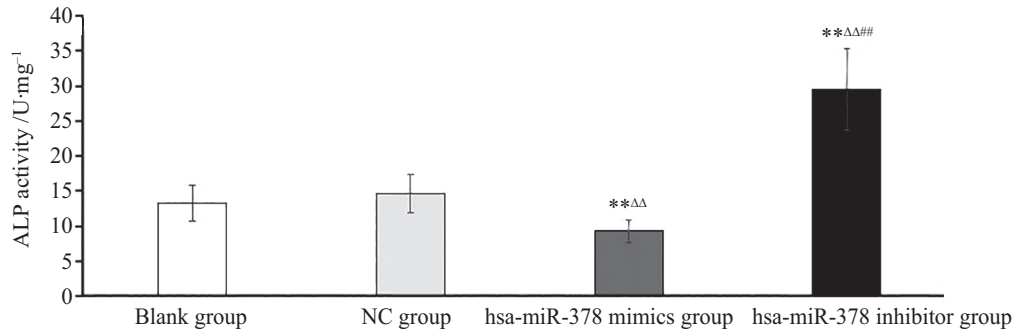


图3 各组细胞的ALP染色结果

Fig.3 ALP staining results of cells in each group



** $P < 0.01$, 与空白组相比; $\Delta\Delta P < 0.01$, 与阴性对照组相比; $\#\# P < 0.01$, 与hsa-miR-378 mimics组相比。

** $P < 0.01$ compared with Blank group; $\Delta\Delta P < 0.01$ compared with NC group; $\#\# P < 0.01$ compared with hsa-miR-378 mimics group.

图4 各组细胞的ALP活性

Fig.4 ALP activity of cells in each group

2.5 miR-378影响人牙髓干细胞 hsa-miR-378表达以及 BMP-2、SMAD1、DMP-1、DSPP、OCN mRNA表达

与Blank组和NC组相比, hsa-miR-378 mimics组细胞中 hsa-miR-378表达上升 ($P < 0.01$), BMP-2、SMAD1、DMP-1、DSPP、OCN mRNA表达量降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), hsa-miR-378 inhibitor组细胞中 hsa-miR-378表达量下降 ($P < 0.01$), BMP-2、SMAD1、DMP-1、DSPP、OCN mRNA表

达上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 hsa-miR-378 mimics组相比, hsa-miR-378 inhibitor组细胞中 hsa-miR-378表达量下降 ($P < 0.01$), BMP-2、SMAD1、DMP-1、DSPP、OCN mRNA表达量上升 ($P < 0.01$) (表2)。

2.6 miR-378影响人牙髓干细胞中的 BMP-2、SMAD1、DMP-1、DSPP、OCN蛋白表达及 p-SMAD1水平

与Blank组和NC组相比, hsa-miR-378 mimics组细胞中的BMP-2、SMAD1、DMP-1、DSPP、OCN

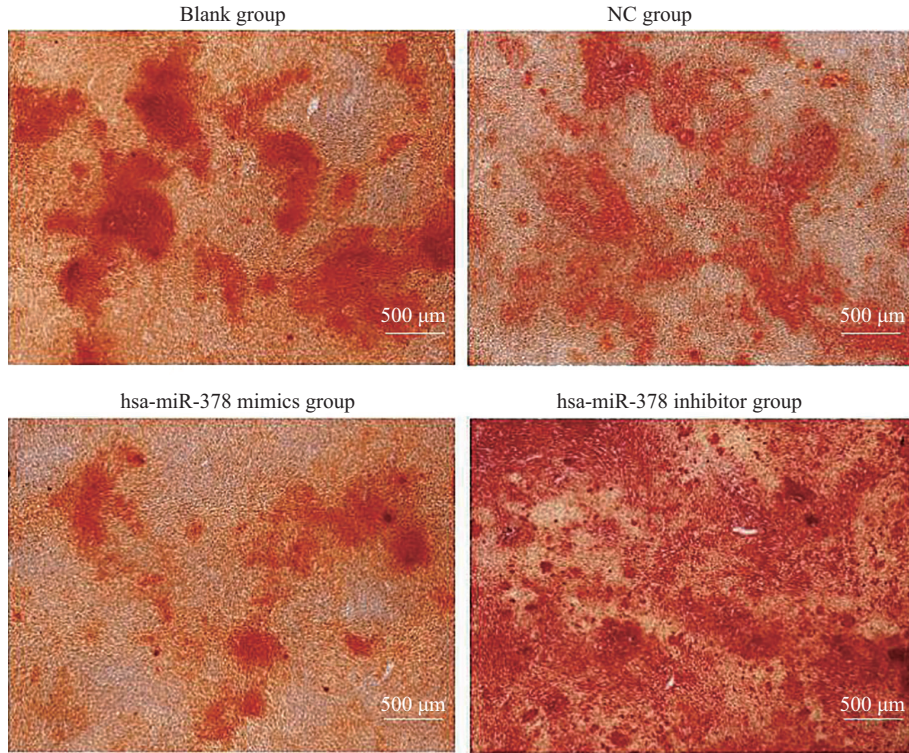
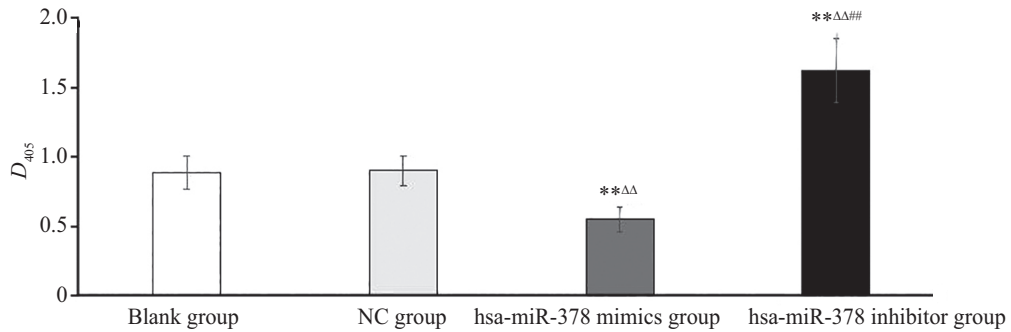


图5 各组细胞吸光度比较

Fig.5 Comparison of the absorbance of cells in each group



** $P < 0.01$, 与空白组相比; $\Delta\Delta P < 0.01$, 与阴性对照组相比; $\#\# P < 0.01$, 与hsa-miR-378 mimics组相比。

** $P < 0.01$ compared with Blank group; $\Delta\Delta P < 0.01$ compared with NC group; $\#\# P < 0.01$ compared with hsa-miR-378 mimics group.

图6 各组细胞吸光度值的比较

Fig.6 Comparison of cell optical density in each group

蛋白表达及p-SMAD1、p-SMAD1/SMAD1水平降低 ($P < 0.01$), hsa-miR-378 inhibitor组细胞中的BMP-2、SMAD1、DMP-1、DSPP、OCN蛋白表达及p-SMAD1、p-SMAD1/SMAD1水平上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 hsa-miR-378 mimics组相比, hsa-miR-378 inhibitor 组细胞中的BMP-2、SMAD1、DMP-1、DSPP、OCN 蛋白表达及p-SMAD1、p-SMAD1/SMAD1水平上升 ($P < 0.01$)(图7和表3)。

2.7 hsa-miR-378靶向BMP-2

TargetScan数据库预测结果显示, hsa-miR-378 与BMP-2存在特异结合位点。在转染野生型 pmir-GLO-BMP-2细胞中, hsa-miR-378 mimics组细胞的相对荧光强度低于miR-NC组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 在转染突变型 pmirGLO-BMP-2的细胞中, hsa-miR-378 mimics组细胞的相对荧光强度与miR-NC组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)(图8)。

表2 各组细胞中hsa-miR-378表达以及BMP-2、SMAD1、DMP-1、DSPP、OCN mRNA表达

Table 2 Expression levels of hsa-miR-378, and BMP-2, SMAD1, DMP-1, DSPP and OCN mRNA in each group of cells

组别 Groups	人微小核糖核酸-378 hsa-miR-378	骨形态发生蛋白-2 BMP-2	SMAD1	牙本质基质蛋白1 DMP-1	牙本质涎磷蛋白 DSPP	骨钙素 OCN
Blank group	0.97±0.13	1.05±0.18	1.03±0.19	0.96±0.17	0.97±0.14	0.96±0.15
NC group	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
hsa-miR-378 mimics group	2.24±0.35** ^{△△}	0.63±0.10** ^{△△}	0.62±0.10** ^{△△}	0.41±0.07** ^{△△}	0.75±0.13* [△]	0.66±0.10** ^{△△}
hsa-miR-378 inhibitor group	0.59±0.07** ^{△△##}	1.47±0.20** ^{△△##}	1.36±0.23* ^{△##}	1.40±0.23** ^{△△##}	1.32±0.25* ^{△##}	1.57±0.26** ^{△△##}
F	59.125	22.478	16.785	31.385	11.336	22.675
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与空白组相比; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$, 与阴性对照组比; ^{##} $P < 0.01$, 与hsa-miR-378 mimics组相比。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with Blank group; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ compared with NC group; ^{##} $P < 0.01$ compared with hsa-miR-378 mimics group.

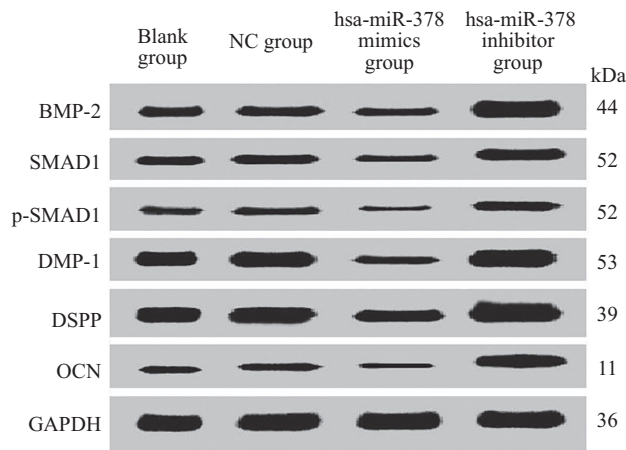


图7 各组中的BMP-2、SMAD1、DMP-1、DSPP、OCN蛋白表达及p-SMAD1水平

Fig.7 Expression of BMP-2, SMAD1, DMP-1, DSPP, OCN proteins and the level of p-SMAD1 in each group

3 讨论

牙髓干细胞是一种可向成牙本质分化的间充质干细胞,是牙再生组织工程中重要的“种子细胞”之一^[10]。在牙齿发育过程中,如何控制牙髓干细胞的成牙本质向分化是当前再生医学的研究热点。

本研究表明,从实验小组中成功分离出人牙髓干细胞,各组细胞转染效率均高于80%,表明各组细胞均成功转染,可进行后续实验。此外,hsa-miR-378低表达可促进ALP表达并上调ALP活性,促进细胞矿化结节形成,发挥促进人牙髓干细胞向成牙本质分化的功能。ALP是人牙髓干细胞向牙本质分化的重要分子之一^[11],YOU等^[12]指出,miR-378过表达可促进ALP表达,从而减轻高糖对成骨分化的抑制。本研究结果与上述研究相反,这可能与hsa-miR-378在不同细胞系中参与不同的信号通路相关。

本研究结果还表明,hsa-miR-378低表达可促进BMP-2、SMAD1、DMP-1、DSPP、OCN mRNA和蛋白表达,上调p-SMAD1水平,发挥促进人牙髓干细胞向成牙本质分化的作用;hsa-miR-378可直接靶向BMP-2。BMP-2在成牙本质形成和矿化过程发挥重要功能,ZHONG等^[13]指出,通过增加BMP-2表达量可促进人牙髓干细胞成牙本质分化;SONG等^[14]指出,通过经典通路BMP-2/SMAD1信号通路可调节人牙髓干细胞向成牙本质分化。DMP-1是牙本质形成和矿化的重要机制蛋白,DSPP在牙本质发育过程发挥调节作用,ZHANG^[15]等指出,增加DMP-1和DSPP的表达量可促进牙髓干细胞向成牙本质分化;LIU等^[16]指出,激活BMP/SMAD信号通路可增加DMP-1、DSPP表达量,进而促进成牙本质形成。ALP、OCN参与调控牙髓干细胞向成牙本质细胞分

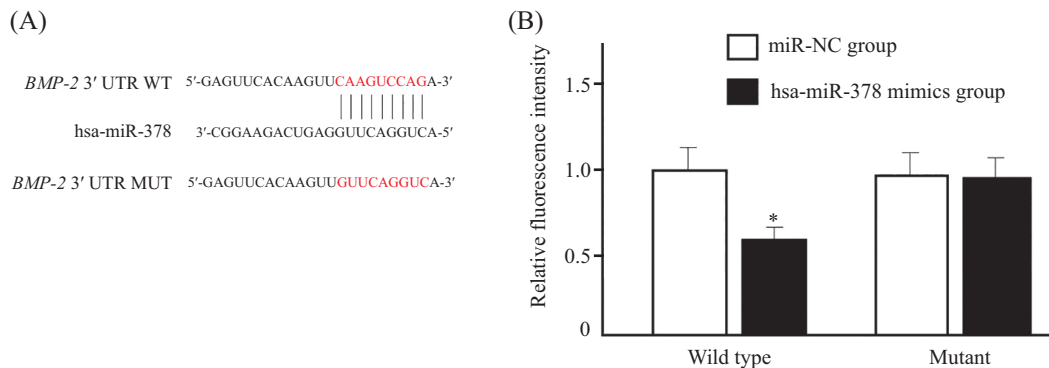
表3 各组细胞中的BMP-2、SMAD1、DMP-1、DSPP、OCN蛋白相对表达量和p-SMAD1水平

Table 3 Relative expression levels of BMP-2, SMAD1, DMP-1, DSPP and OCN proteins and p-SMAD1 levels in each group of cells

组别 Groups	骨形态发生蛋白-2 BMP-2	SMAD1	p-SMAD1	p-SMAD1/ SMAD1	牙本质基质蛋白1 DMP-1	牙本质涎磷蛋白 DSPP	骨钙素 OCN
Blank group	0.53±0.10	0.49±0.08	0.29±0.05	0.59±0.08	0.82±0.14	0.91±0.17	0.34±0.06
NC group	0.52±0.09	0.46±0.06	0.28±0.04	0.61±0.09	0.83±0.15	0.87±0.14	0.35±0.05
hsa-miR-378 mimics group	0.35±0.06*** ^{ΔΔ}	0.28±0.05*** ^{ΔΔ}	0.12±0.02*** ^{ΔΔ}	0.43±0.07*** ^{ΔΔ}	0.36±0.05*** ^{ΔΔ}	0.65±0.11* ^Δ	0.19±0.03*** ^{ΔΔ}
hsa-miR-378 inhibitor group	1.12±0.21*** ^{ΔΔ##}	0.64±0.10* ^{ΔΔ##}	0.47±0.08*** ^{ΔΔ##}	0.74±0.11* ^{Δ##}	1.19±0.19*** ^{ΔΔ##}	1.26±0.21* ^{ΔΔ##}	0.71±0.12*** ^{ΔΔ##}
<i>F</i>	41.410	23.280	45.064	12.311	34.399	14.600	54.682
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

P*<0.05, *P*<0.01, 与空白组相比; ^Δ*P*<0.05, ^{ΔΔ}*P*<0.01, 与阴性对照组相比; ^{##}*P*<0.01, 与hsa-miR-378 mimics组相比。

P*<0.05, *P*<0.01 compared with Blank group; ^Δ*P*<0.05, ^{ΔΔ}*P*<0.01 compared with NC group; ^{##}*P*<0.01 compared with hsa-miR-378 mimics group.



A: BMP-2为hsa-miR-378的潜在靶基因, 红色序列表示酶切位点识别的碱基序列; B: 双荧光素酶检测结果。**P*<0.05, 与miR-NC组相比。

A: BMP-2 is a potential target gene of hsa-miR-378, and the red sequence represents the base sequence recognized by the enzyme digestion sites; B: dual luciferase assay results. **P*<0.05 compared with miR-NC group.

图8 hsa-miR-378介导BMP-2表达的双荧光素酶报告基因检测结果

Fig.8 Double luciferase reporter gene detection results of hsa-miR-378 mediating BMP-2 expression

化的过程, WU等^[17]指出增加ALP、OCN表达量可促进人牙髓干细胞的成牙分化; 李彩玉等^[18]指出, 促进ALP、DMP-1、DSPP表达可增强牙髓干细胞的成牙本质分化能力。本研究结果与上述研究结果一致, 提示hsa-miR-378可通过靶向BMP-2/SMAD1信号通路, 调控DMP-1、DSPP、OCN表达, 参与牙髓干细胞向成牙本质分化。

综上所述, miR-378低表达可促进牙髓干细胞向成牙本质分化, 这可能与靶向BMP-2, 上调SMAD1、DMP-1、DSPP、OCN表达及p-SMAD1水平, 增强

ALP的活性有关。

参考文献 (References)

- [1] SUI B, WU D, XIANG L, et al. Dental pulp stem cells: from discovery to clinical application [J]. J Endod, 2020, 46(9): 46-55.
- [2] ZHAO L, ITO S, ARAI A, et al. Odontoblast death drives cell-rich zone-derived dental tissue regeneration [J]. Bone, 2021, 150(1): 116010.
- [3] MAZZIOTTA C, LANZILLOTTI C, IAQUINTA M R, et al. MicroRNAs modulate signaling pathways in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2362.

- [4] 俞小琴, 文继锐, 王景阁, 等. 低强度振动经miR-378a-3p促进老年骨质疏松大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化[J]. 医用生物力学(YU X Q, WEN J R, WANG J G, et al. Low-intensity vibration promotes the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into osteoblasts in aged osteoporotic rats via miR-378a-3p [J]. *Journal of Medical Biomechanics*), 2019, 34(S1): 58.
- [5] 梅笑寒, 仇珺, 张贝蒂, 等. 外泌体诱导3D纳米纤维小管中牙髓干细胞成骨/成牙本质向分化的作用研究[J]. 中国实用口腔科杂志(MEI X H, QIU J, ZHANG B D, et al. Study on the effect of exosomes on osteo/odontogenic differentiation of dental pulp stem cells cultured in 3D nanofibrous tubules scaffold [J]. *Chinese Journal of Practical Stomatology*), 2022, 15(1): 76-82.
- [6] KONG Y, HU X, ZHONG Y, et al. Magnesium-enriched microenvironment promotes odontogenic differentiation in human dental pulp stem cells by activating ERK/BMP2/Smads signaling [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 378.
- [7] LIU S, WANG C, BAI J, et al. Involvement of circRNA_0007059 in the regulation of postmenopausal osteoporosis by promoting the microRNA-378/BMP-2 axis [J]. *Cell Biol Int*, 2021, 45(2): 447-55.
- [8] LI N, ZHANG Y, NEPAL N, et al. Dental pulp stem cells overexpressing hepatocyte growth factor facilitate the repair of DSS-induced ulcerative colitis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 30.
- [9] KUMAR A, LORAND D. Robust $\Delta\Delta\text{ct}$ estimate [J]. *Genomics*, 2021, 113(1): 420-7.
- [10] ZHANG W, YELICK P C. Tooth repair and regeneration: potential of dental stem cells [J]. *Trends Mol Med*, 2021, 27(5): 501-11.
- [11] MENG H, HU L, ZHOU Y, et al. A sandwich structure of human dental pulp stem cell sheet, treated dentin matrix, and matrigel for tooth root regeneration [J]. *Stem Cells Dev*, 2020, 29(8): 521-32.
- [12] YOU L, GU W, CHEN L, et al. MiR-378 overexpression attenuates high glucose-suppressed osteogenic differentiation through targeting CASP3 and activating PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(10): 7249-61.
- [13] ZHONG J, TU X, KONG Y, et al. LncRNA H19 promotes odontoblastic differentiation of human dental pulp stem cells by regulating miR-140-5p and BMP-2/FGF9 [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 202.
- [14] SONG Y, WANG C, GU Z, et al. CKIP-1 suppresses odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells via BMP2 pathway and can interact with NRP1 [J]. *Connect Tissue Res*, 2019, 60(2): 155-64.
- [15] HAO J, YANG H, CAO Y, et al. IGFBP5 enhances the odontoblasts potential of dental pulp stem cells via JNK and Erk signaling pathways [J]. *J Oral Rehabil*, 2020, 47(12): 1557-65.
- [16] LIU Z, ZHAN A, FAN S, et al. DNCP induces the differentiation of induced pluripotent stem cells into odontoblasts by activating the Smad/p-Smad and p38/p-p38 signaling pathways [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(6): 1361.
- [17] WU J, LI N, FAN Y, et al. The conditioned medium of calcined tooth powder promotes the osteogenic and odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells via MAPK signaling pathways [J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019(1): 4793518.
- [18] 李彩玉, 郑雷蕾, 张燕, 等. 人脱落乳牙牙髓干细胞与恒牙牙髓干细胞成牙本质分化能力的比较[J]. 中南大学学报(医学版)(LI C Y, ZHENG L L, ZHANG Y, et al. Comparison of odontoblast differentiation capacity between stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells [J]. *Journal of Central South University, Medical Science*), 2020, 45(6): 678-83.