

人骨髓间充质干细胞外泌体来源的 miR-335-5p 促进人牙周膜干细胞的成骨分化 基于下调 DKK1 表达

刘 屿¹, 曾 莲², 王卫红¹, 杨艳玲², 王 洲², 刘建启², 李 卫², 孙婧宇², 余晓宏²

¹昆明医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 云南 昆明 650106; ²云南大学附属医院(云南省第二人民医院、云南省眼科医院)口腔内科, 云南 昆明 650021

摘要:目的 探讨人骨髓间充质干细胞(hBMMSCs)外泌体来源的 miR-335-5p 调控 DKK1 对人牙周炎中牙周膜干细胞(PDLSCs)成骨分化的影响及其作用机制。方法 提取 hBMMSCs 外泌体, 通过透射电镜、Western blot 以及 PKH67 标记鉴定外泌体, 通过 TNF- α 诱导 PDLSCs 构建牙周炎细胞模型。提取的外泌体与 TNF- α 诱导的 PDLSCs 共同培养。qRT-PCR 检测 miR-335-5p, 促炎因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和成骨标志基因 RunX2、OCN、BMP-2 mRNA 表达。茜素红和 ALP 染色检测钙结节, Western blot 检测 DKK1 蛋白表达, 双荧光素酶报告实验验证 miR-335-5p 与 DKK1 的靶向关系。结果 提取的 hBMMSCs 外泌体中 CD9 和 CD81 显著表达($P < 0.05$)。hBMMSC 外泌体降低 TNF- α 诱导的 hPDLSCs 中促炎细胞因子 IL-1 β ($P < 0.01$)、IL-6($P < 0.05$)、IL-8($P < 0.05$)的 mRNA 表达并促进成骨标志基因 RunX2($P < 0.01$)、OCN($P < 0.05$)、BMP-2($P < 0.001$) mRNA 和钙结节生成。miR-335-5p 在 hBMMSCs 外泌体中高表达, 过表达 miR-335-5p 靶向下调 DKK1($P < 0.001$), 抑制促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8 的表达($P < 0.001$), 促进成骨标志物 BMP-2、OCN、RunX2 的 mRNA 表达以及钙结节生成($P < 0.001$)。结论 hBMMSC 外泌体来源的 miR-335-5p 靶向下调 DKK1, 促进 hPDLSCs 成骨分化, 抑制牙周炎的发展进程。

关键词:牙周炎; 骨髓间充质干细胞; 外泌体; miR-335-5p; 牙周膜干细胞; 成骨分化

Human bone marrow mesenchymal stem cell exosome-derived miR-335-5p promotes osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells to alleviate periodontitis by downregulating DKK1

LIU Yu¹, ZENG Lian², WANG Weihong¹, YANG Yanling², WANG Zhou², LIU Jianqi², LI Wei², SUN Jingyu², YU Xiaohong²

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Stomatology Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650106, China;

²Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Yunnan University (Second People's Hospital of Yunnan Province, Yunnan Province Ophthalmology Hospital), Kunming 650021, China

Abstract: Objective To observe the effect of miR-335-5p derived from human bone marrow mesenchymal stem cell (hBMMSCs) exosomes on osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cell (PDLSCs) model of periodontitis and explore its mechanism. **Methods** The exosomes extracted from hBMMSCs were identified by transmission electron microscopy, Western blotting and PKH67 labeling. The human PDLSC model of TNF- α -induced periodontitis were co-cultured with the extracted exosomes, and qRT-PCR was performed to detect the changes in the expressions of miR-335-5p and the mRNA levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and IL-8) and the osteogenic marker genes (RunX2, OCN and BMP-2). Alizarin red staining and ALP staining were used to detect the formation of calcium nodules in the treated cells, and the expression level of DKK1 protein was detected with Western blotting. Dual luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between miR-335-5p and DKK1. **Results** High expressions of CD9 and CD81 were detected in the extracted hBMMSC exosomes ($P < 0.05$). In TNF- α -induced hPDLSCs, treatment with the extracted exosomes significantly reduced the mRNA expressions of IL-1 β , IL-6 and IL-8, enhanced the mRNA expressions of RunX2, OCN, and BMP-2, and promoted the formation of calcium nodules. MiR-335-5p was highly expressed in hBMMSC-derived exosomes, and overexpression of miR-335-5p significantly downregulated DKK1 protein expression, inhibited the mRNA expressions of IL-1 β , IL-6 and IL-8, and promoted the mRNA expressions of osteogenic markers and the formation of calcium nodules in hPDLSCs. **Conclusion** HBMMSC exosome-derived miR-335-5p promotes osteogenic differentiation of hPDLSCs and inhibits the development of periodontitis by downregulating DKK1.

Keywords: periodontitis; bone marrow mesenchymal stem cells; exosomes; miR-335-5p; periodontal ligament stem cells; osteogenic differentiation

牙周炎会损害牙龈、牙周韧带和牙槽骨,并导致成

骨能力下降和牙周骨组织损伤^[1,2]。目前临床治疗慢性牙周炎主要通过洗牙和牙周刮治清除牙周细菌^[3],对于较严重的患者还可服用抗生素。然而目前的治疗方法对30%以上的重度牙周炎患者是无效的^[4],因此亟需新的治疗方式。近来利用人牙周膜干细胞(hPDLSCs)增殖和分化为牙周组织已经成为治疗牙周病的新手段^[5,6],然而在炎症状态下 hPDLSCs 的增殖和再生能力不足以修复牙周

收稿日期:2022-09-28

基金项目:云南省科学技术厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目(NO.2019FE001(-251); NO.202001AY070001-254; NO.202101AY070001-193); 云南省创新团队项目(NO.202105AE160004)

作者简介:刘 屿,硕士,主治医师,E-mail: 383321966@qq.com

通信作者:余晓宏,硕士,主治医师,E-mail: joyyao100@hotmail.com

组织,因而疗效不佳。人骨髓间充质干细胞(hBMMSCs)可以通过分泌外泌体促进hPDLSCs的增殖和分化,从而促进牙周组织再生和牙周炎的愈合^[7,8],然而hBMMSCs通过外泌体促进牙周组织再生和牙周炎愈合的机制尚不清楚。外泌体中有大量的miRNA,miRNA可以作为牙周炎诊断的分子标志研究标志^[9]。miR-335-5p是近来发现的短链非编码RNA,研究表明miR-335-5p可以促进小鼠成骨分化^[10],且miR-335-5p在人牙周炎牙周组织中表达下调^[11]。但目前尚没有hBMMSCs外泌体miR-335-5p在牙周炎成骨分化中的研究报道。因此,本研究推测hBMMSCs外泌体可能通过miR-335-5p促进hPDLSCs增殖分化从而促进牙周组织再生和牙周炎的愈合,并通过实验进一步探究具体的调控机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和诱导

hBMMSCs和hPDLSCs购自武汉普诺赛生命科技有限公司。hBMMSCs经免疫荧光检测,CD29和CD90阳性率达90%以上。hPDLSCs经免疫荧光检测,CD44阳性率达90%以上。接种于含有双抗和10% FBS完全培养基中。待细胞融合至70%~80%时,重悬细胞,将细胞浓度调整为 1×10^5 /mL,接种后培养24 h,待其贴壁后饥饿处理再进行后续实验。取生长良好的hPDLSCs,培养在添加100 nmol/L地塞米松、200 μ mol/L L-抗坏血酸和10 mmol/L β -磷酸甘油的标准生长培养基中以诱导成骨分化,2 d次换液。

1.2 外泌体的分离和鉴定

采用细胞上清液外泌体提取试剂盒(普利莱,中国)提取hBMMSCs上清液中外泌体。使用扫描透射电镜观察细胞形态和Western blot检测外泌体中CD9、CD81的表达用于外泌体的鉴定。

1.3 外泌体摄取实验

外泌体用PKH67染色并加到hPDLSCs培养基中,分别在加入外泌体后的3、6、12、24、36、48、72 h在荧光显微镜(Olympus)下观察并获取图像,使用ImageJ计算荧光强度。

1.4 细胞转染

将mimic NC或miR-335-5p mimic转染进hBMMSCs后提取外泌体。牙周炎细胞模型采用10 ng/mL TNF- α 诱导hPDLSCs 12 h后再加入提取的外泌体进行处理,如需转染pcDNA-DKK1或pcDNA-NC,则在诱导炎症状态后再转染。细胞转染为当细胞生长至融合度为80%~90%时使用Lipofectamine 3000(Invitrogen)进行转染,上述序列均由广州锐博生物合成。加入外泌体处理3 d后,进行后续检测。

1.5 细胞分组

将细胞分为6组:Ctrl组(hPDLSCs),TNF- α 组

(hPDLSCs+10 ng/mL TNF- α),TNF- α +Exo组(hPDLSCs+10 ng/mL TNF- α +hBMMSCs-Exo),TNF- α +Exo/miR-NC组(hPDLSCs+10 ng/mL TNF- α +hBMMSCs-Exo/miR-NC),TNF- α +Exo/miR-335-5p组(hPDLSCs+10 ng/mL TNF- α +hBMMSCs-Exo/miR-335-5p mimic),TNF- α +Exo/miR-335-5p+DKK1组(hPDLSCs+10 ng/mL TNF- α +hBMMSCs-Exo/miR-335-5p mimic+pcDNA-DKK1)。

1.6 Western blot

RIPA裂解细胞,提取总蛋白,BCA法进行蛋白浓度测定,外泌体标志蛋白不需要提取直接用BCA法测定蛋白浓度。用10% SDS-PAGE凝胶分离蛋白,分离后转移到PVDF膜上,并用5%的脱脂奶粉在室温下封闭1 h,和一抗CD9(1/2000, abcam)、CD81(1/1000, abcam)、Wnt(1/1000, abcam)、 β -catenin(1/1000, abcam)孵育过夜,PBST洗膜后和在室温下和二抗孵育1 h,再次洗膜后用ECL系统检测,灰度值用Image J测量。

1.7 qRT-PCR

用Trizol法提取细胞中总RNA,用分光光度法测定RNA浓度,使用逆转录酶试剂盒(赛默飞)将RNA逆转录为cDNA。然后在qRT-PCR反应体系中进行扩增和测序。mRNA以GAPDH为内参,miRNA以U6为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算RNA相对表达量。qRT-PCR扩增引物序列见表1。

表1 qRT-PCR引物序列

Tab.1 Primer sequences for qRT-PCR

Target	Primer sequences (F: forward, R: reverse, 5'-3')
miR-335-5p	F: GCTCAGTGCCTACAGAAC
	R: GCTGTCAACGATACGCTACG
IL-1 β	F: ATGGCAGAAGTACCTAAGCTCGC
	R: ACACAAATTGCATGGTGAAGTCAGTT
IL-6	F: ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC
	R: GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG
IL-8	F: ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT
	R: TCTCAGCCCTCTCAAAAACCTTCTC
RunX2	F: TGGTTACTGTTCATGGCGGGTA
	R: TCTCAGATCGTTGAACCTTGCTA
OCN	F: GCAGCCACCGAGACACCAT
	R: AGAGCGACACCCTAGACCG
BMP-2	F: TCTGCGGTCTCTAAAGGTC
	R: GGAAGCAGCAACGCTAGAAG
U6	F: GCTTCGGCAGCACATATACTAA
	R: CGAATTTGCGTGTTCATCCTT
GAPDH	F: CGAATTTGCGTGTTCATCCTT
	R: CGAATTTGCGTGTTCATCCTT

1.8 茜素红染色

茜素红染色用于检测骨结节的形成。细胞处理14 d后,用4%多聚甲醛固定25 min,用PBS清洗后加入

40 mmol/L 茜素红染液染色 10 min, 然后用 PBS 清洗直至透明。

1.9 Alkaline phosphatase (ALP) 染色

ALP 染色可以检测 ALP 在细胞中的表达量。细胞处理 3 d 后, 用 10% 福尔马林固定细胞 10 min, 之后用 0.1% 萘酚 AS-MX、0.1% 耐晒兰 BB 盐和 0.1 Tris-buffer (pH 9.2) 在 37 °C 下染色, 30 min 后用蒸馏水洗涤。

1.10 双荧光素酶报告基因实验

ENCORI 数据库预测 miR-335-5p 的靶基因为 DKK1。将 DKK1 和 miR-335-5p 结合的位点进行点突变, 克隆并扩增野生型 (WT) 和突变型 (MUT) 的 DKK1 的 3'-UTR, 将 PCR 产物插入 pMirGlo Dual-Luciferase 载体, 分别将荧光载体和 miR-335-5p mimic 或 mimic NC 转染进 293T 细胞。转染 48 h 后, 用荧光素酶检测试

剂盒 (Promega) 检测细胞中的荧光素酶活性。

1.11 统计学分析

所有数据采用 GraphPad Prism 9.0 进行分析并作图, 定量数据采用均数±标准差表示, 多组比较采用 One-Way ANOVA 分析, 通过 Student's-*t* test 分析两组之间的差异。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 外泌体的鉴定和摄取

分离纯化后的外泌体, 用透射电子显微镜观察发现, 分离出的物质为双层膜的圆形或椭圆形囊泡, 直径约为 100 nm (图 1A)。进一步采用 Western blot 检测显示, CD9 和 CD81 在分离纯化得到的囊泡中高表达 (P<0.05, 图 1B~D)。结果显示成功提取外泌体。

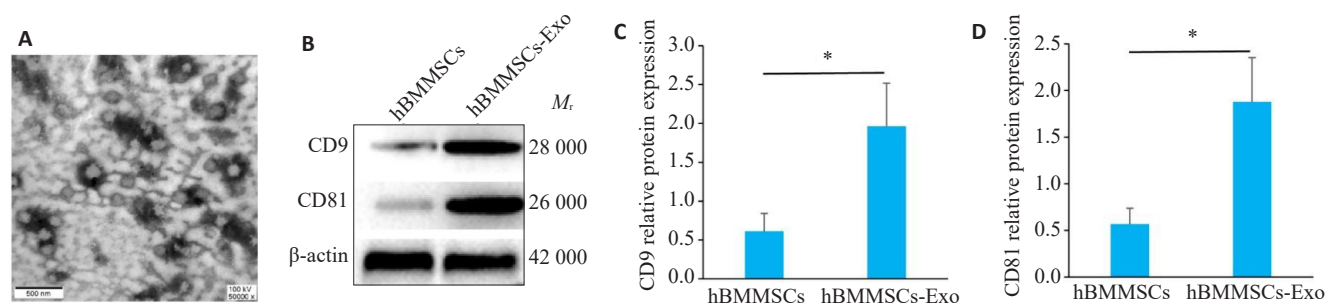


图1 hBMMSCs 中外泌体鉴定

Fig.1 Identification of exosomes from human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMMSCs). A: Transmission electron microscopy of the exosomes. B-D: Western blotting for detecting the expressions of CD9 and CD81 in the exosomes. *P<0.05.

为确定 hPDLSCs 能否摄取 hBMMSCs 外泌体及最佳处理时间, 将 PHK67 标记的外泌体加入 hPDLSCs 细胞中, 不同时间点用荧光显微镜观察显示, 6 h 后荧光强度最强 (图 2A, B)。后续实验中, 外泌体处理的时间均为 6 h。qRT-PCR 检测结果显示, miR-335-5p 在外泌体中高表达 (P<0.01, 图 2C)。

2.2 hBMMSCs 来源的外泌体促进慢性牙周炎 hPDLSCs 成骨分化

将 10 ng/mL hPDLSCs 培养 12 h 后, 加入 10 ng/mL 外泌体。6 h 后, qRT-PCR 检测显示, TNF-α 组中促炎细胞因子 IL-1β、IL-6、IL-8 水平高于 NC 组 (均 P<0.001, 图 3A~C), 加入 hBMMSC-exo 降低促炎因子的表达 (均 P<0.05)。在 TNF-α 诱导下细胞中成骨分化标志基因 RunX2、OCN、BMP-2 mRNA 表达降低 (均 P<0.001, 图 3D~F), 加入 hBMMSCs-exo 后 RunX2、OCN、BMP-2 表达高于 TNF-α 组 (均 P<0.05)。茜素红和 ALP 染色结果显示, TNF-α 处理降低了细胞中钙结节的数量, 而 hBMMSCs 来源的外泌体增加了细胞中钙结节的数量 (图 3G, H)。

2.3 hBMMSCs-exo 来源的 miR-335-5p 调控 hPDLSCs 成骨分化

qRT-PCR 检测显示, miR-335-5p 在炎症状态下明显下调 (P<0.0001, 图 4A)。同时, 将转染 mimic NC 和 miR-335-5p mimic 的 hBMMSCs-exo 与 hPDLSCs 共培。RT-qPCR 检测发现, TNF-α+Exo/miR-335-5p 组中 miR-335-5p 的表达高于 TNF-α+Exo/miR-NC 组 (P<0.01, 图 4A)。

相比于 TNF-α 组, TNF-α+Exo/miR-NC 组中促炎因子 IL-1β (P<0.0001)、IL-6 (P<0.01)、IL-8 mRNA (P<0.01) 水平升高 (图 4B~D); 成骨细胞标志物 BMP-2、OCN、RunX2 mRNA 表达降低 (P<0.01, 图 4E~G)。TNF-α+Exo/miR-335-5p 组中 IL-1β、IL-6、IL-8 表达低于 TNF-α+Exo/miR-NC 组 (P<0.05), BMP-2、OCN (P<0.001)、RunX2 上水平高于 TNF-α+Exo/miR-NC 组。此外茜素红染色和 ALP 染色的结果也显示, TNF-α 诱导的炎症状态下细胞中钙结节和 ALP 减少, 而外泌体作用增加了 hPDLSCs 中钙结节和 ALP, miR-335-5p mimic 的转染进一步增加了 ALP 和钙结节的数量 (图 4H, I)。

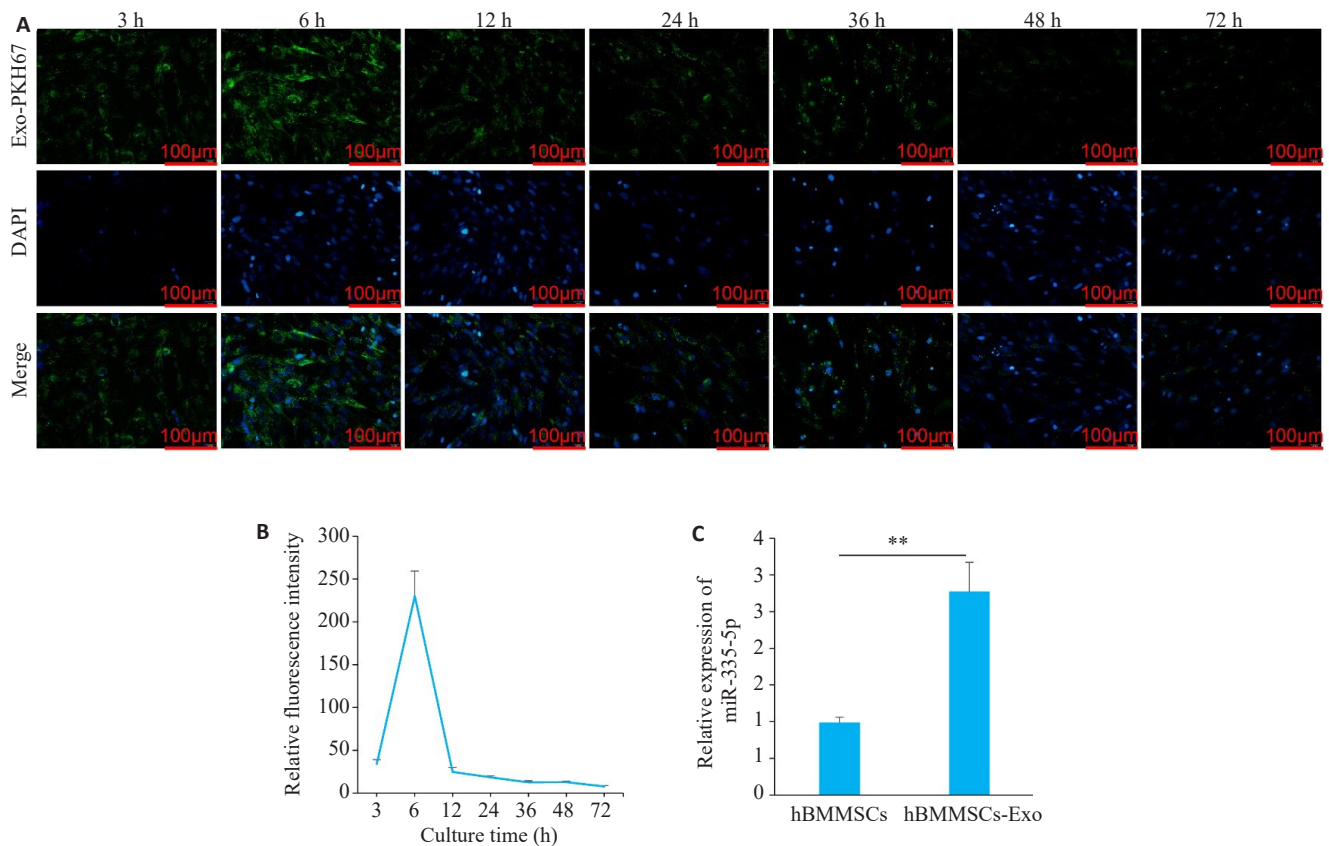


图2 hBMMSCs外泌体摄取实验

Fig.2 Exosome uptake assay of hBMMSCs. A: PKH67 labeling (green) of the exosomes and DAPI staining (blue) of the nuclei. B: Changes of average fluorescence intensity overtime in human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs) co-cultured with the exosomes. C: qRT-PCR for detecting miR-335-5p expression. ** $P < 0.01$.

2.4 hBMMSCs 外泌体来源的 miR-335-5p 靶向 DKK1 调控 hPDLSCs 成骨分化

通过 starbase 数据库预测 miR-335-5p 的下游靶标,发现 DKK1 和 miR-335-5p 具有潜在结合位点(图 5A)。双荧光素酶报告基因实验显示,过表达 miR-335-5p 可抑制野生型 DKK1 的荧光素酶活性($P < 0.001$, 图 5B),对突变型 DKK1 荧光素酶活性无明显作用。Western blot 检测 hPDLSCs 中 DKK1 的表达显示,与 Ctrl 组相比,在 TNF- α 组 DKK1 表达明显上调($P < 0.001$, 图 5C)。hBMMSCs 外泌体处理后 hPDLSCs 中 DKK1 的表达下调($P < 0.001$),过表达 miR-335-5p 进一步降低 DKK1 的表达($P < 0.01$),pcDNA-DKK1 可逆转过表达 miR-335-5p 对 DKK1 表达的抑制作用($P < 0.01$)。

进一步通过探索 hBMMSCs 外泌体来源的 miR-335-5p 通过 DKK1 对 hPDLSCs 成骨分化的调控作用。qRT-PCR 结果显示,同时过表达 miR-335-5p 和 DKK1 组中促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8 mRNA 水平明显高于仅过表达 miR-335-5p(均 $P < 0.05$, 图 5E~J),成骨细胞标志基因 RunX2、OCN、BMP-2 mRNA 表达水平明显低于仅过表达 miR-335-5p(均 $P < 0.05$, 图 5H~J)。茜素红染色和 ALP 染色也显示 miR-335-5p 通过下调 DKK1

表达促进 hPDLSCs 成骨分化(图 5K、L)。

3 讨论

消除牙周组织的炎症可以阻断牙周炎的进展,牙周组织的再生和重建是牙周炎治疗的关键^[11-14]。干细胞是一种未充分分化的细胞,已被应用于再生医学,可增殖分化修复再生组织^[15]。hPDLSCs 是来源于牙周组织的一种成体干细胞^[5],是牙周组织修复和再生中的关键细胞。而牙周炎患者牙周组织处于炎症状态,hPDLSCs 的增殖和分化能力受到限制^[16]。研究发现 hBMMSCs 外泌体可以促进 hPDLSCs 成骨分化^[17]。本研究通过提取并鉴定 hBMMSCs 外泌体,发现其在 TNF- α 诱导的炎症状态下可促进 hPDLSCs 成骨分化,为牙周炎的牙周再生机制提供了一定的理论基础。

外泌体可以通过传递其包含的 miRNA 参与调控多种疾病的发展进程^[18],以及细胞的成骨分化。研究报道,机械力诱导的小鼠骨样细胞 MLO-Y4 来源的外泌体 miR-181b-5p 促进人牙周韧带干细胞的增殖和成骨分化^[19]。破骨细胞来源的外泌体 miR-23a-5p 通过抑制 Runx2,促进 Yap 介导的 MT1DP 有效抑制成骨分化^[20]。骨髓间充质干细胞外泌体 miR-101 通过抑制

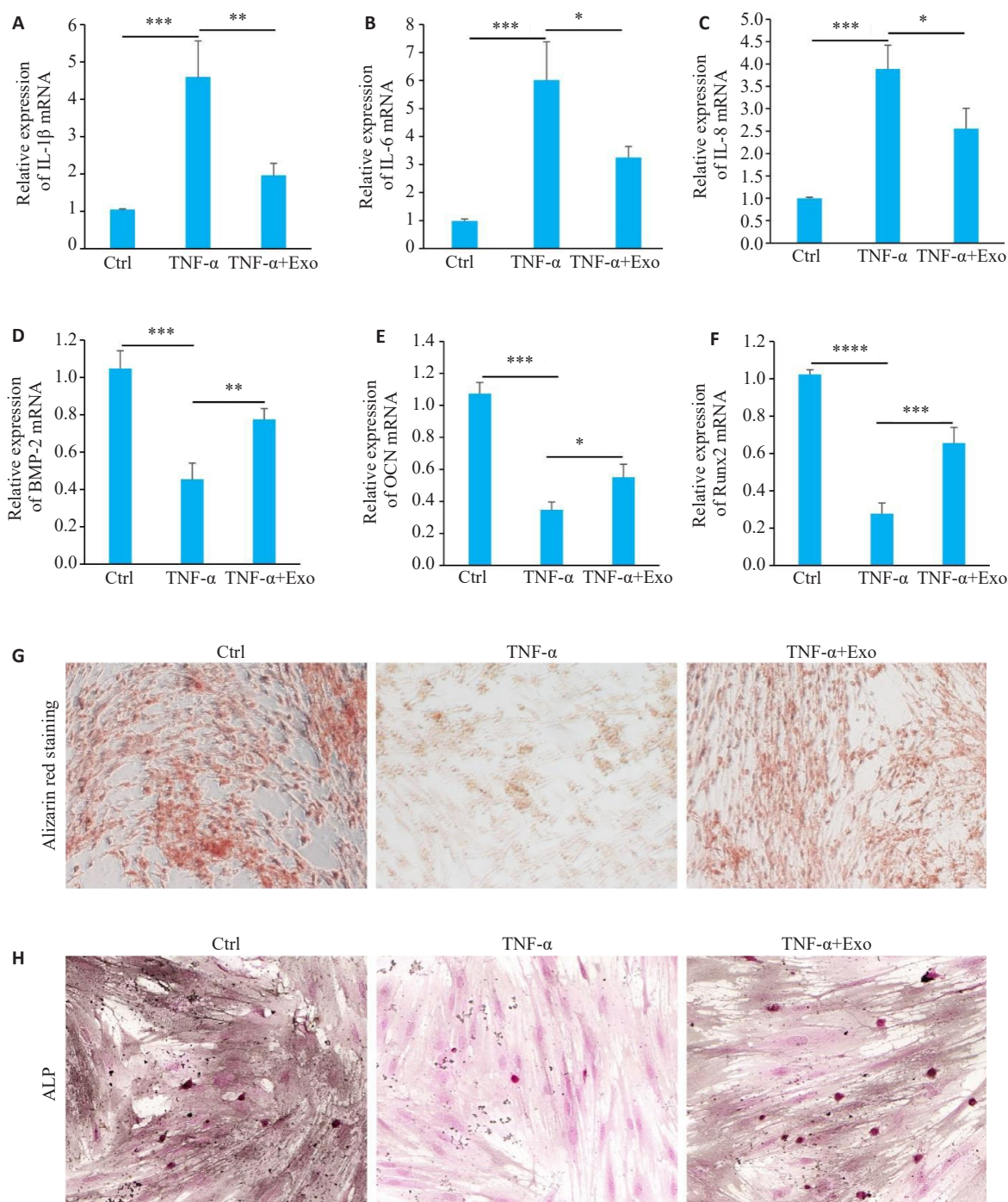


图3 hBMMSCs外泌体促进成骨分化

Fig.3 Exosomes derived from hBMMSCs promote osteogenic differentiation of hPDLSCs *in vitro*. A-F: qRT-PCR detection of mRNA expressions of IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-8 (C), BMP-2 (D), OCN (E), and RunX2 (F). G: Alizarin red staining of hPDLSC cultures ($\times 200$). H: ALP staining of hPDLSC cultures (Original magnification: $\times 200$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

FBXW7增强间充质干细胞的成骨分化能力^[21]。本研究发现,在hBMMSCs来源外泌体中过表达miR-335-5p降低了hPDLSCs中炎症细胞因子IL-1 β 、IL-6、IL-8的表达,促进成骨标志基因RunX2、OCN、BMP-2的表达以及ALP表达和钙结节的生成,说明hBMMSCs中miR-335-5p可以降低hPDLSCs中的炎症水平并促进细胞成骨分化。

miRNA是一种非编码短链RNA,通过和下游靶基因结合而调控靶基因的表达来发挥作用^[22]。大量证据表明,miRNA在细胞分化、增殖、凋亡和转移等多种生理过程中发挥关键作用^[23,24]。过表达miR-452-3p靶向抑制SMAD4,抑制成骨细胞分化和骨形成^[25]。miR-143通过靶向HDAC7,促进血管形成和细胞的成骨分化^[26]。本研究发现,miR-335-5p在TNF- α 诱导的

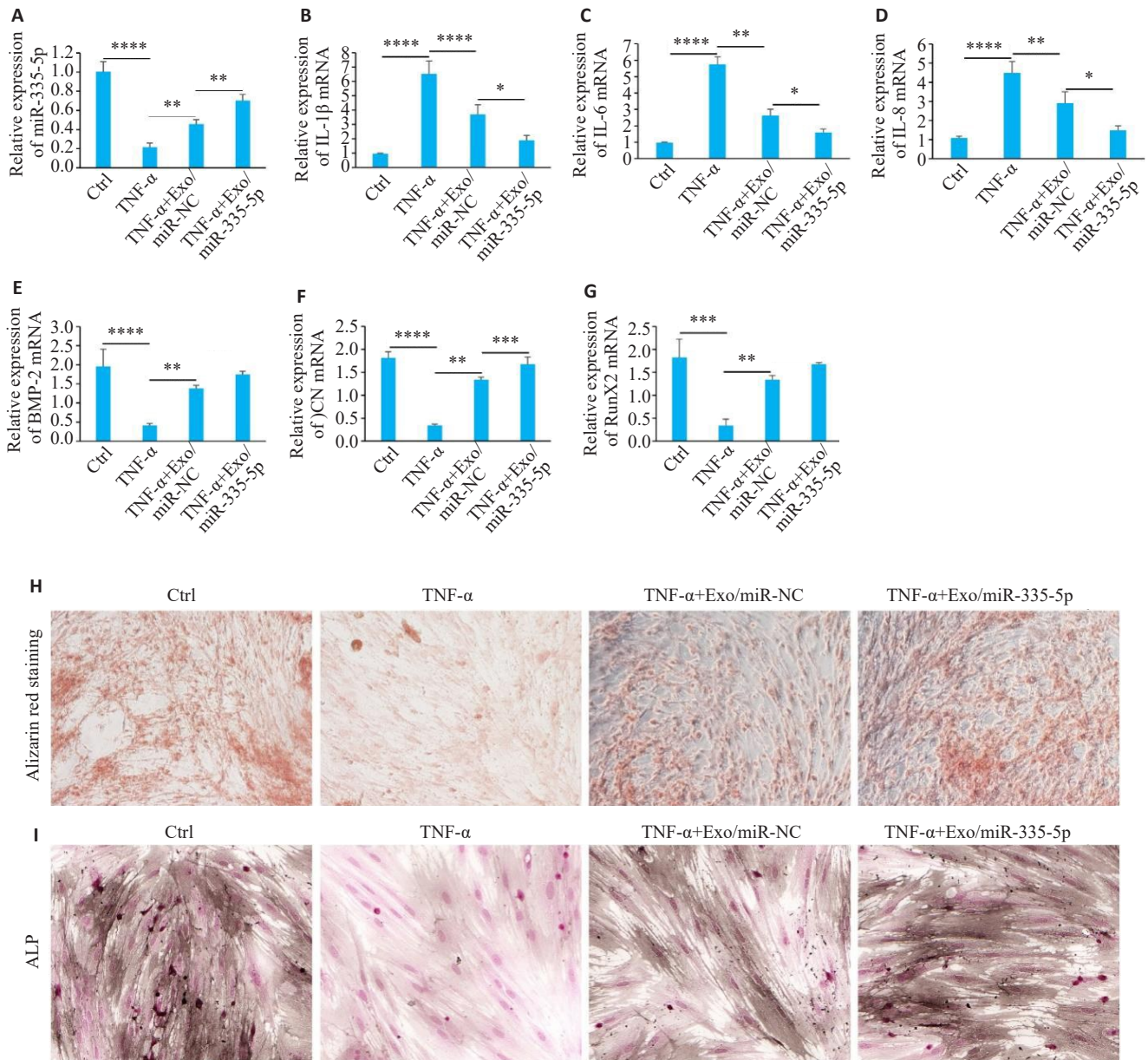


图4 hBMMSCs-exo来源的miR-335-5p调控hPDLSCs成骨分化

Fig.4 MiR-335-5p derived from hBMMSCs exosomes regulates osteogenic differentiation of hPDLSCs. A-G: qRT-PCR detected expression of miR-335-5p (A) and mRNA levels of IL-1β (B), IL-6 (C), IL-8 (D), BMP-2 (E), OCN (F), RUNX2 (G). H: Alizarin red staining of hPDLSC cultures (×200). I: ALP staining of hPDLSC cultures (×200). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

hPDLSCs中低表达,hBMMSCs来源的外泌体处理可明显促进hPDLSCs的成骨分化,且在外泌体中过表达miR-335-5p进一步促进细胞的成骨分化能力。miR-335-5p也被报道促进软骨细胞的凋亡介导骨关节炎的发展^[27]以及作为肿瘤细胞的抑制因子,抑制肺腺癌^[28]、胃癌^[29]、子宫平滑肌瘤^[30]和乳腺癌细胞的恶性生物学行为^[31]。

Dickkopf-related protein 1 (DKK1)可与LRP5/LRP6受体特异性结合,从而抑制Wnt/β-Catenin信号通路^[32],在多种疾病中发挥复杂的细胞和生物学作用。有研究报道,抑制DKK1表达可逆转胃癌细胞的多药耐药性^[33]。DKK1通过抑制β-catenin并促进β-catenin的磷

酸化水平,抑制非小细胞肺癌的侵袭和迁移^[34]。本研究发现,DKK1是miR-335-5p的靶基因,在hBMMSCs外泌体中过表达miR-335-5p可显著下调DKK1,抑制hPDLSCs的炎症反应促进细胞的成骨分化。此外,有研究认为TGF-β1治疗可通过抑制DKK1,抑制成骨细胞分化的基质矿化^[35]。

综上所述,本研究发现hBMMSCs外泌体来源的miR-335-5p在TNF-α诱导的hPDLSCs中表达降低,在hBMMSCs外泌体中过表达miR-335-5p通过靶向下调DKK1,抑制hPDLSCs的炎症水平促进细胞的成骨分化。miR-335-5p/DKK1分子轴可为牙周炎的临床治疗提供新的分子依据和理论基础。

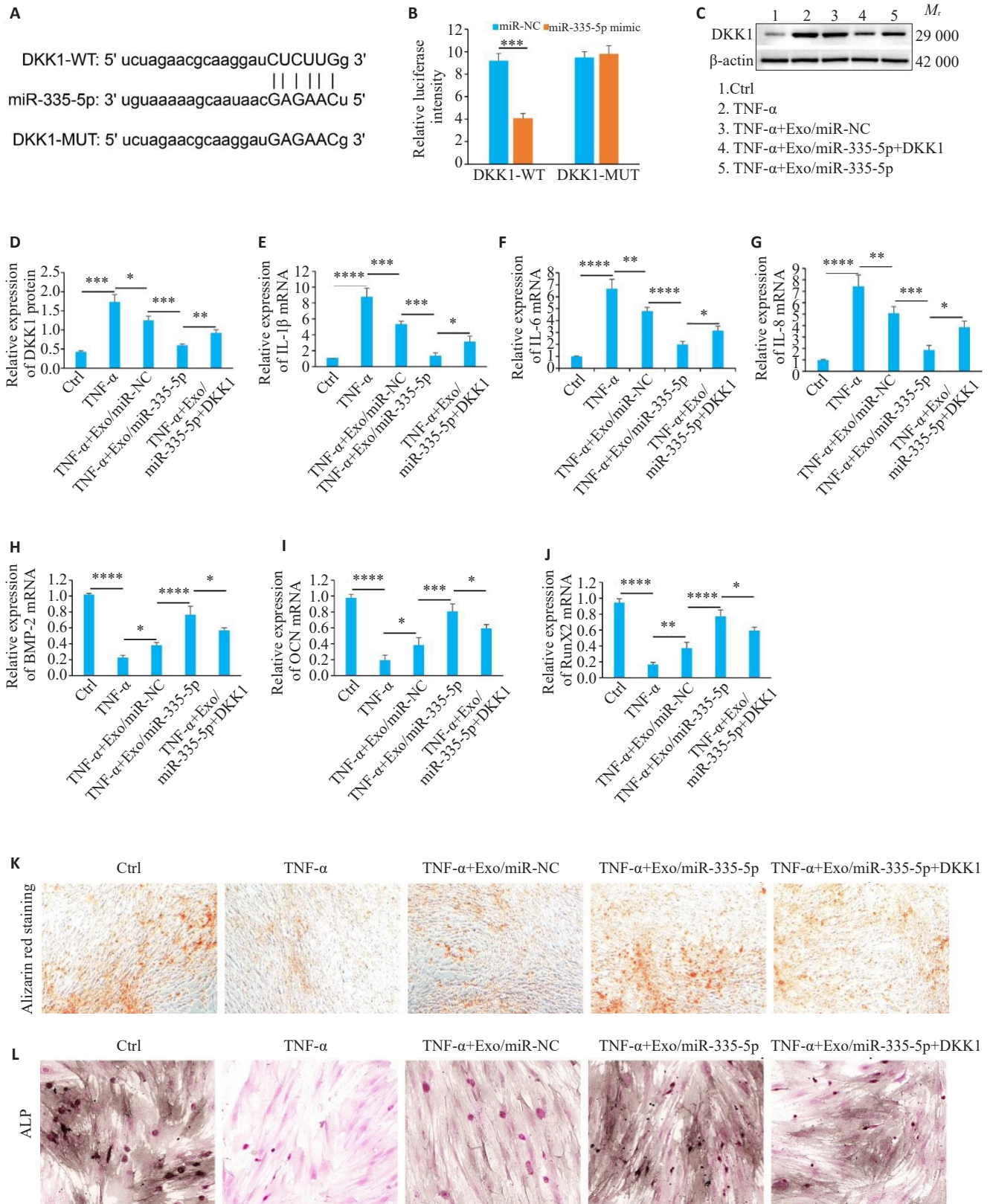


图5 hBMMSCs外泌体来源的miR-335-5p通过DKK1促进hPDLSCs成骨分化

Fig.5 MiR-335-5p from hBMMSC exosomes promote osteogenic differentiation of hPDLSCs *via* DKK1. **A:** Starbase database analysis for predicting the binding sequences between miR-335-5p and DKK1. **B:** Dual-luciferase reporter gene assay for verifying the targeting relationship between miR-335-5p and DKK1. **C, D:** Western blotting for detecting DKK1 protein expression in hPDLSCs. **E-J:** qRT-PCR for detecting mRNA levels of IL-1 β (**E**), IL-6 (**F**), IL-8 (**G**), BMP-2 (**H**), OCN (**I**), and RunX2 (**J**). **K:** Alizarin red staining of hPDLSC cultures ($\times 200$). **L:** ALP staining of hPDLSC cultures ($\times 200$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

参考文献:

- [1] Sanz M, Ceriello A, Buyschaert M, et al. Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International diabetes Federation and the European Federation of Periodontology [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 137: 231-41.
- [2] Kinane DF, Stathopoulou PG, Papananou PN. Periodontal diseases [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17038-45.
- [3] Rajendran M, Looney S, Singh N, et al. Systemic antibiotic therapy reduces circulating inflammatory dendritic cells and treg-Th17 plasticity in periodontitis [J]. *J Immunol*, 2019, 202(9): 2690-9.
- [4] Preus HR, Gjermo P, Baelum V. A randomized double-masked clinical trial comparing four periodontitis treatment strategies: 5-year tooth loss results [J]. *J Periodontol*, 2017, 88(2): 144-52.
- [5] Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament [J]. *Lancet*, 2004, 364(9429): 149-55.
- [6] Liu Y, Zheng Y, Ding G, et al. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(4): 1065-73.
- [7] 李晓光, 王一珠, 郭斌. 慢性牙周炎中肿瘤坏死因子 α 对骨髓间充质干细胞成骨分化的调控作用 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2017, 35(3): 334-8.
- [8] 朱斌, 李楠, 田自锋, 等. 骨髓间充质干细胞来源的外泌体促进牙周再生的体外研究 [J]. *中国实用口腔科杂志*, 2016, 9(12): 709-13.
- [9] Asa'ad F, Garaicoa-Pazmiño C, Dahlin C, et al. Expression of microRNAs in periodontal and peri-implant diseases: a systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 4147-56.
- [10] Zhang L, Tang Y, Zhu XF, et al. Overexpression of miR-335-5p promotes bone formation and regeneration in mice [J]. *J Bone Miner Res*, 2017, 32(12): 2466-75.
- [11] Lian JX, Wu XW, Liu Y, et al. Potential roles of miR-335-5p on pathogenesis of experimental periodontitis [J]. *J Periodontol Res*, 2020, 55(2): 191-8.
- [12] Zhang J, Tu Q, Bonewald LF, et al. Effects of miR-335-5p in modulating osteogenic differentiation by specifically down-regulating Wnt antagonist DKK1 [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(8): 1953-63.
- [13] Hoare A, Soto C, Rojas-Celis V, et al. Chronic inflammation as a link between periodontitis and carcinogenesis [J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019: 1029857.
- [14] Xu XY, Li X, Wang J, et al. Concise review: periodontal tissue regeneration using stem cells: strategies and translational considerations [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(4): 392-403.
- [15] Yin Y, Li X, He XT, et al. Leveraging stem cell homing for therapeutic regeneration [J]. *J Dent Res*, 2017, 96(6): 601-9.
- [16] Lee JS, Lee JB, Cha JK, et al. Chemokine in inflamed periodontal tissues activates healthy periodontal-ligament stem cell migration [J]. *J Clin Periodontol*, 2017, 44(5): 530-9.
- [17] Lv LW, Sheng CH, Zhou YS. Extracellular vesicles as a novel therapeutic tool for cell-free regenerative medicine in oral rehabilitation [J]. *J Oral Rehabil*, 2020, 47(Suppl 1): 29-54.
- [18] Qin YH, Sun RX, Wu CL, et al. Exosome: a novel approach to stimulate bone regeneration through regulation of osteogenesis and angiogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): 712.
- [19] Lv PY, Gao PF, Tian GJ, et al. Osteocyte-derived exosomes induced by mechanical strain promote human periodontal ligament stem cell proliferation and osteogenic differentiation via the miR-181b-5p/PTEN/AKT signaling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 295-305.
- [20] Yang JX, Xie P, Li YS, et al. Osteoclast-derived miR-23a-5p-containing exosomes inhibit osteogenic differentiation by regulating Runx2 [J]. *Cell Signal*, 2020, 70: 109504.
- [21] Li YH, Wang J, Ma YC, et al. miR-101-loaded exosomes secreted by bone marrow mesenchymal stem cells requires the FBXW7/HIF1 α /FOXO3 axis, facilitating osteogenic differentiation [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(6): 4258-72.
- [22] Lu TX, Rothenberg ME. microRNA [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(4): 1202-7.
- [23] Chava S, Reynolds CP, Pathania AS, et al. miR-15a-5p, miR-15b-5p, and miR-16-5p inhibit tumor progression by directly targeting MYCN in neuroblastoma [J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(1): 180-96.
- [24] Yin N, Zhu LZ, Ding L, et al. miR-135-5p promotes osteoblast differentiation by targeting HIF1AN in MC3T3-E1 cells [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2019, 24: 51-60.
- [25] Wu M, Wang HY, Kong DC, et al. miR-452-3p inhibited osteoblast differentiation by targeting Smad4 [J]. *PeerJ*, 2021, 9: e12228.
- [26] Wang RK, Zhang H, Ding WB, et al. miR-143 promotes angiogenesis and osteoblast differentiation by targeting HDAC7 [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(3): 179-85.
- [27] Lu XK, Li Y, Chen HM, et al. miR-335-5P contributes to human osteoarthritis by targeting HBP1 [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(2): 1090-13.
- [28] Wang XY, Xiao HQ, Wu DQ, et al. miR-335-5p regulates cell cycle and metastasis in lung adenocarcinoma by targeting CCNB2 [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 6255-63.
- [29] Gao Y, Wang YF, Wang XF, et al. miR-335-5p suppresses gastric cancer progression by targeting MAPK10 [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 71-9.
- [30] Zhao W, Zhao YY, Chen L, et al. miR-335-5p inhibits progression of uterine leiomyoma by targeting ARGLU1 [J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022: 2329576-88.
- [31] Song GQ, Ma Y, Ma YH, et al. miR-335-5p targets SDC1 to regulate the progression of breast cancer [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2022, 32(6): 21-31.
- [32] Zheng W, Pollard JW. What DKK1 tells where to metastasize [J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(10): 1146-8.
- [33] Khakbaz P, Panahizadeh R, Vatankhah MA, et al. Allicin reduces 5-fluorouracil-resistance in gastric cancer cells through modulating MDR1, DKK1, and WNT5A expression [J]. *Drug Res (Stuttg)*, 2021, 71(8): 448-54.
- [34] Zhang J, Zhang XT, Zhao XT, et al. DKK1 promotes migration and invasion of non-small cell lung cancer via β -catenin signaling pathway [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(7): 1010428317703820.
- [35] Nam B, Park H, Lee YL, et al. TGF β 1 suppressed matrix mineralization of osteoblasts differentiation by regulating SMURF1-C/EBP β -DKK1 axis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24): 9771-8.