

活化的Mir-30a-wnt/ β -catenin信号轴通过上调组织蛋白酶K的表达促进牙周膜干细胞向成牙骨质细胞分化

刘芬^{1,2,3}, 周志斐⁴, 薛洋⁵, 朱斌⁴, 吴补领⁶, 陈发明²

¹西北妇女儿童医院口腔科, 陕西 西安 710000; ²第四军医大学口腔医院²牙周病科, ⁵颌面外科, 陕西 西安 710000; ³南方医科大学深圳医院颌面外科, 广东 深圳 518000; ⁴西藏军区总医院口腔科, 西藏 拉萨 850000; ⁶南方医科大学深圳口腔医院(坪山), 广东 深圳 518000

摘要:目的 探讨牙周膜干细胞(PDLSC)成牙骨质向分化过程中mir-30a-wnt/ β -catenin信号轴调控组织蛋白酶K(CTSK)表达的功能作用。**方法** 极限稀释法分离培养PDLSC, 釉基质蛋白衍生物(EMD)诱导细胞成牙骨质向分化。在细胞分化过程中, 通过microRNA芯片筛选差异表达的microRNA。首先, 给予不同分组细胞EMD诱导和/或抑制microRNA表达等处理, 无干预组细胞作为对照。利用qPCR和Western blot技术首先验证差异表达的microRNA是否能够调控CTSK的表达。之后, 将细胞膜片复合陶瓷支架材料植入裸鼠皮下, 利用免疫组织化学方法观察成牙骨质细胞标记蛋白CAP和CEMP-1的表达变化, 明确受microRNA调控的CTSK表达变化是否参与了PDLSC成牙骨质分化。在此基础上, 从蛋白水平观察wnt信号通路在microRNA调节CTSK表达过程中是否发挥了相应功效。**结果** EMD诱导PDLSC成牙骨质向分化过程中, 多种microRNA表达发生变化, 其中miR-30a表达出现特异性上调($P < 0.05$)。表达上调的miR-30a进一步调节CTSK的表达($P < 0.05$), 促进PDLSC异位形成类牙骨质样结构, 高表达成牙骨质细胞标记蛋白CAP和CEMP-1。抑制wnt/ β -catenin信号通路, miR-30a对CTSK的表达调控作用出现相应减弱。**结论** EMD可能通过上调miR-30a的表达激活wnt/ β -catenin信号通路从而经mir-30a-wnt/ β -catenin信号轴调控CTSK诱导PDLSC向成牙骨质细胞方向分化。

关键词: 牙周膜干细胞; 组织蛋白酶K; 成牙骨质向分化; 微小RNA; wnt信号通路

Activation of mir-30a-wnt/ β -catenin signaling pathway upregulates cathepsin K expression to promote cementogenic differentiation of periodontal ligament stem cells

LIU Fen^{1,2,3}, ZHOU Zhifei⁴, XUE Yang⁵, ZHU Bin⁴, WU Buling⁶, CHEN Faming²

¹Department of Oral Medicine, Northwest Women's and Children's Hospital, Xi'an 710000, China; ²Department of Periodontology, ⁵Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710000, China; ³Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Shenzhen Hospital Affiliated to Southern Medical University, Shenzhen 518000, China; ⁴Department of Oral Medicine, General Hospital of Tibetan Military Command, Lhasa 850000, China; ⁶Shenzhen Stomatology Hospital (Pingshan), Southern Medical University, Shenzhen 518000, China

Abstract: Objective To explore the role of cathepsin K (CTSK) regulated by mir-30a-wnt/ β -catenin signaling pathway in cementogenic differentiation of periodontal ligament stem cells (PDLSCs). **Methods** Human PDLSCs isolated by limiting dilution culture were induced by enamel matrix protein derivative (EMD) for differentiation into cementoblast-like cells. MicroRNA chip technique was employed to screen the differentially expressed microRNAs in the cells during induced differentiation. The effect of inhibiting miR-30a on CTSK expression in the induced cells was examined using RT-PCR and Western blotting. Ceramic scaffolds coated with PDLSCs treated with EMD and transfected with the miR-30a inhibitor or a lentiviral vector for CTSK overexpression were prepared and implanted subcutaneously in nude mice, and 8 weeks later the cellular expressions of cementoblast markers CAP and CEMP-1 were detected with immunohistochemistry to verify whether CTSK participate in cementogenic differentiation of PDLSCs. The role of wnt signaling pathway in miR-30a-mediated regulation of CTSK expression was explored by examining CTSK protein expressions after blocking wnt signaling in PDLSCs. **Results** In PDLSCs with EMD-induced differentiation into cementoblast-like cells, multiple microRNAs exhibited differential expressions; and among them, miR-30a was specifically and significantly up-regulated ($P < 0.05$). Up-regulation of miR-30a obviously increased the expression of CTSK ($P < 0.05$) and promoted PDLSCs to form cementum-like tissues with high

expressions of CAP and CEMP-1. The regulatory effect of miR-30a on CTSK expression was obviously attenuated after inhibiting wnt/ β -catenin signaling pathway. **Conclusion** EMD induces cementogenic differentiation of PDLSCs possibly by up-regulating the expression of miR-30a, which further activates the wnt/ β -catenin signaling pathway to enhance the expression of CTSK.

Keywords: periodontal ligament stem cells; cathepsin K; cementogenic differentiation; microRNA; wnt signaling pathway

收稿日期: 2021-08-04

基金项目: 国家自然科学基金(81530050); 陕西省重点研发计划一般项目(2020SF-047); 陕西省青年科技新星项目(2021KJXX-24); 西藏自治区重点研发计划项目(XZ202001ZY0059G)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81530050).

作者简介: 刘芬, 主治医师, 博士, E-mail: fenfen2alei@163.com

通信作者: 陈发明, 教授, 博士生导师, E-mail: cfmsunhh@fmmu.edu.cn

牙周炎是牙齿支持组织在炎性侵犯下受到破坏的一类疾病^[1]。流行病学调查研究结果提示约10%的成年人和30%的50岁以上人群患有重度牙周炎。牙周炎不仅造成口腔局部组织损害,还是多种全身系统性疾病的高危因素^[2]。牙周治疗的最终目标是实现牙周组织再生^[3]。近年来,以干细胞为主导的组织工程技术逐渐成为实现稳定牙周再生的研究热点和临床趋势。组织工程技术的临床转化应用为牙周炎患牙的存留和预后改善提供了极大可能^[4]。

牙骨质是覆盖牙根表面的薄层矿化组织。只有当牙骨质存在时,以胶原纤维为主要结构的牙周膜才能穿通其中,建立类似天然牙的Sharpy's纤维结构并发挥作用效应。因此,骨质质的再生重建是整个牙周组织功能性再生的前提,也是牙周组织再生研究中的难点与挑战。

釉基质蛋白衍生物(EMD)是最早用于牙周炎临床治疗的辅助药物^[5]。动物学和人体组织学研究结果均提示EMD局部应用可有效促进牙骨质再生^[6]。然而EMD促进牙骨质再生的机制并不清楚,一定程度上限制了其临床应用的疗效优化。组织蛋白酶K(CTSK)是硬组织代谢的重要调节因子^[7]。已经证实,CTSK基因突变可导致致密性成骨不全综合征,这类患者口腔改变中较为典型的表现即为显著的牙骨质增厚,但增厚的牙骨质结构异常。意味着CTSK基因突变可导致正常牙骨质生成障碍^[8]。提示CTSK在牙骨质发育过程中可能发挥调节作用,是牙骨质再生的重要调控因子^[9]。

作者在前期研究中也已证实EMD作用能够促进牙周膜干细胞(PDLSC)成牙骨质向分化,在细胞成牙骨质向分化过程中CTSK表达特异性上调^[10]。在此基础上,通过体内外实验进一步印证表达上调的CTSK对PDLSC成牙骨质向分化具有促进作用^[10]。然而,EMD上调CTSK表达的具体作用机制仍有待阐明。

本实验拟首先通过microRNA芯片筛选EMD诱导PDLSC过程中差异表达的microRNA,之后验证相关microRNA同CTSK表达及PDLSC成牙骨质向分化的相互作用关系。并观察wnt信号通路在microRNA调节过程中是否发挥了相应功效。以期揭示PDLSC成牙骨质分化过程中CTSK表达升高的机制提供实验基础,为明确调控PDLSC成牙骨质向分化的关键通路,实现更好的定向诱导提供理论依据。

1 资料和方法

1.1 样本来源

本研究所用细胞来自第四军医大学口腔医学院牙槽外科因正畸治疗需要而减数拔除的前磨牙或第三磨牙。所有供体牙齿均呈无龋健康状态。在拔除前影像学检查均提示无急慢性炎症表现。所有牙齿来源的供

体无全身系统性疾病,在近1年内无吸烟史及影响全身状况的特殊药物服用史。样本年龄分布为14~35岁,均值为21.5岁。

本研究实验方案已获口腔医学院伦理审查委员会批准,且在实验开始前面向每个患者及其监护人告知实验目的与牙齿收集的用途,在获得知情同意之后正式签署书面同意书。

1.2 PDLSC的分离与培养

PDLSC的分离培养步骤按照前期研究进行^[11]。首先利用无菌磷酸盐缓冲液(Beyotime Biotechnology)冲洗新鲜拔除的牙齿。之后仔细刮除根中1/3牙周膜组织并剪成大小约1×mm×1×mm×1×mm的小块。利用5倍于组织块体积的0.1% I型胶原酶(Sigma-Aldrich, Spruce)37℃消化牙周膜组织15 min,之后加入等体积含有10%胎牛血清(HyClone)的 α -MEM培养液(HyClone)终止消化。离心弃去含胶原酶的混合液后用含10%胎牛血清,100 U/mL青霉素(Invitrogen)和100 mg/mL链霉素(Invitrogen)双抗的原代 α -MEM培养液重悬牙周膜组织。最后,将牙周膜组织接种于六孔板,放置于37℃,含95%空气和5% CO₂的孵箱中培养。

当组织块周围细胞融合,利用0.25%胰蛋白酶(pH=8.0~9.0, Beyotime)消化细胞。极限稀释法收集单克隆增殖的细胞集落体外扩大培养获得PDLSC^[11]。本研究使用第2~4代PDLSC进行后续实验。

1.3 EMD诱导

EMD(Biora)溶解于1 ml/L醋酸(Ruimen, Jinan)溶液中保存,其终浓度为10 mg/mL,保存温度为-20℃。将EMD诱导组的PDLSC以1×10⁴/孔密度接种于六孔板中。24 h后待细胞贴壁,更换含有终浓度为100 mg/L EMD的 α -MEM培养液^[10]。EMD诱导48 h后取样观察相关信号通路及调控因子的表达改变。

1.4 microRNA芯片检测

MicroRNA芯片检测样本分为2组:实验组为EMD诱导作用组PDLSC,对照组为无特殊处理PDLSC。EMD诱导终止细胞培养后,弃去培养液,利用PBS荡洗2遍。分别向实验组和对照组PDLSC中加入裂解/结合缓冲液(lysis/binding buffer, Invitrogen),裂解细胞制成细胞悬液。吹打细胞悬液呈均匀状态后转移至EP管行microRNA芯片检测(Aksomics, Agilent Human miRNA Microarray, Release 21.0)。

1.5 RNA提取和RT-qPCR检测

根据商品说明书,利用Trizol(Invitrogen)试剂提取RNA。之后利用反转录试剂盒(TAKARA)将所得的RNA反转录成cDNA。实时定量PCR的反应体系为20 μ L,基于RT-qPCR试剂盒(SYBR Premix Ex Taq™ II, Takara)的使用说明进行。RT-qPCR在CFX

Connect™ 实时 PCR 检测系统(Bio-Rad, Hercules)内开展。对于每种检测基因,独立重复3次实验检测。在本实验中所使用的引物序列如下(表1)。其中,由于miR-30a成熟形式差异通常较为轻微,因此在本研究中扩增其前体形式来比较miR-30a的表达差异。

表1 本研究所使用的引物序列

Tab.1 Primer sequence used in this study

Gene	Primer
miR-144-3p	UGUGGUACUAGAAUGUAUAGAU
miR-143	UACCUUAACAGAGUGAUGUUCA
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
pre-miR-30a-F	5'-GCGACTGTAAACATCCTCGA-3'
pre-miR-30a-R	5'-GCAGCTGCAAACATCCGACT-3'

F: Forward primer; R: Reverse primer.

1.6 miR-30a 抑制剂转染

首先设计 miR-30a 抑制剂序列: CUUCCAGUCGAGGAUGUUACA; 并同时设计阴性对照序列: CAGUACUUUUGUGUAGUACAA。在进行抑制剂转染前,PDLSC 的培养液更换为不含抗生素的 α -MEM 以保证理想的转染效率。对 miR-30a 抑制剂和阴性对照序列分别进行稀释,使其终浓度为 100 nmol/ μ L。首先将 10 μ L 抑制剂稀释至 250 μ L,稀释液为 opti-MEM,作用 10 min。此后,用 250 μ L opti-MEM 稀释 5 μ L lip 2000,作用 10 min。最后将两者混合,轻轻吹打均匀后室温作用 20 min。用无血清的 α -MEM 将六孔板中的细胞清洗 2 次后每孔加入 3 mL 无血清 α -MEM 及抑制剂转染体系。放入孵箱作用 6 h 后弃去无血清培养液,加入正常含 10% 胎牛血清的 α -MEM,继续孵育 18 h。

1.7 蛋白提取和 Western blot 检测

Western blot 检测按照前期研究步骤进行^[12]。本实验所用一抗如下:小鼠抗人磷酸化 GSK-3 β 一抗(1:200 稀释, Santa Cruz Biotechnology);羊抗人 DKK1 一抗(1:200 稀释, Abcam);小鼠抗人 active- β -catenin 一抗(1:100 稀释, Millipore);羊抗人 CTSK 一抗(1:100 稀释, Santa Cruz)及小鼠抗人 β -actin 一抗(1:2000 稀释, CWBiotech)。本实验所用二抗为结合辣根过氧化物酶的羊抗小鼠二抗(1:5000 稀释, Jacson Immuno Research, West Grove)和驴抗羊二抗(1:5000 稀释, CWBiotech)。

1.8 动物实验

为进一步研究 PDLSC 体内异位成牙骨质向分化,将不同处理(EMD 诱导,miR-30a 抑制剂转染,CTSK 慢病毒激活颗粒转染)的细胞膜片包被孔状陶瓷羟基磷灰石材料(四川大学)植入裸鼠背部皮下。实验步骤参照文

献[13]的方法进行。实验动物的购买、饲养及处理方案经空军军医大学动物伦理委员会审查和批准。不同处理(EMD 诱导,miR-30a 抑制剂转染,CTSK 慢病毒激活颗粒转染)的 PDLSC 首先按照 2×10^5 /孔的密度植入六孔板中,含 10% 胎牛血清(Hyclone)的 α -MEM 标准培养基培养 24 h。之后换做 EMD 诱导培养液继续培养 14 d 直至细胞膜片形成。孔状陶瓷羟基磷灰石材料被加工成 3 mm \times 5 mm 的圆柱形用作细胞支架。细胞-支架材料复合材料植入裸鼠(6 周龄雄性,空军军医大学动物实验中心)背部皮下。8 周后处死实验动物。取出复合材料通过免疫组织化学检测分析相关改变。

1.9 免疫组织化学检测

孔状陶瓷羟基磷灰石材料固定后在 10% EDTA 溶液中脱钙 15 d。制备 6 μ m 厚度的连续石蜡切片时,垂直圆柱形材料的长轴进行切取。本研究开展免疫组织化学检测时所用的一抗有小鼠抗人 CAP 一抗(1:500 稀释, Santa Cruz)及羊抗人 CEMP-1 一抗(1:500 稀释, Santa Cruz)。滴加二抗及辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素(ZSGB-Bio)室温孵育后利用 DAB 显色液(Hat Biotechnology)进行显色。Image Pro Plus 6.0(Azure Biosystems)软件分析所拍摄的图像。

1.10 CTSK 慢病毒激活颗粒转染

消化后将 2×10^5 细胞接种于 6 孔板,待其贴壁并生长至 6 孔板底部约 60% 面积时准备进行 CTSK 慢病毒激活颗粒(Santa Cruz)转染。首先在 α -MEM 培养液中加入 5 μ g/mL 聚凝胺(Polybrene[®], Santa Cruz)作用 12 h,之后将慢病毒颗粒添加入细胞培养体系。应用包含有 5 μ g/mL 二盐酸嘌呤霉素(Santa Cruz),300 μ g/mL 潮霉素 B(Santa Cruz)以及 10 μ g/mL 盐酸杀稻瘟菌素 S(Santa Cruz)的 α -MEM,针对表达稳定的含有 CTSK 慢病毒激活颗粒细胞进行挑选。每间隔 3 d 更换 1 次培养液。

1.11 统计分析

各实验使用不同批次细胞独立重复 3 次,各指标以均数 \pm 标准差表示。使用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计学分析。不同组间的样本对比使用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EMD 作用 PDLSC 后差异表达 microRNA 的芯片检测

芯片检测结果提示(表 2),EMD 诱导 48 h 后,15 种 microRNA 表达出现下调,21 种 microRNA 表达出现上调。在表达发生变化的 36 种 microRNA 中,同细胞增殖相关的 microRNA 有 14 种,分别为:miR-100,miR-1183,miR-144-3p,miR-182,miR-134,miR-141,miR-143、

miR-21、miR-101-3p、miR-30a、miR-1、miR-1060、miR-424、miR-138。同细胞分化相关的microRNA有16种,分别为:miR-31、miR-144-3p、miR-214、miR-9、miR-145、miR-143、miR-451、miR-486、miR-24、miR-21、miR-210、miR-223、miR-133、miR-1256、miR-30a、miR-155。同细胞增殖与分化均密切相关的microRNA有4种,分别为:miR-144-3p、miR-143、miR-21、miR-30a。其中,miR-144-3p和miR-143表达下调,miR-21和miR-30a表达上调。

2.2 EMD作用后PDLSC差异表达microRNA的筛选

对初筛的4种microRNA进行实时定量PCR检测(图1):EMD作用24 h后,miR-144-3p表达下调,这一下调趋势持续至48 h($P < 0.05$)。至EMD作用72 h,miR-144-3p表达同对照组相比已无统计学差异($P > 0.05$,图1A)。而对于miR-143,在各个检测时间点其表达变化差异均无统计学意义($P > 0.05$,图1B),这一结果与microRNA基因芯片结果相悖。在EMD诱导24 h后,miR-30a的表达无显著改变($P > 0.05$),但在48 h后,

表2 差异表达microRNA芯片检测结果

Tab.2 MicroRNA chip results for screening differentially expressed microRNA

miRNA	Regulation	P	Fold change	Sequence
hsa-miR-100	down	0.0266	1.571	AACCCGUAGAUCGGAACUUGUG
hsa-miR-31	down	0.0148	1.132	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCUGU
hsa-miR-1183	down	<0.001	2.082	CACUGUAGGUGAUGGUGAGAGUGGGCA
hsa-miR-144-3p	down	0.0101	2.391	CUACAGUAUAGAUGAUGUACU
hsa-miR-182	down	0.0076	1.115	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU
hsa-miR-214	down	0.0051	1.642	UGCCUGUCUACACUUGCUGUGC
hsa-miR-9	down	0.0141	1.039	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
hsa-miR-134	down	0.0219	1.702	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG
hsa-miR-141	down	0.0014	2.031	CAUCUCCAGUACAGUGUUGGA
hsa-miR-145	down	<0.001	1.054	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU
hsa-miR-143	down	0.0100	2.061	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC
hsa-miR-451	down	0.0114	1.833	AAACCGUUACCAUUACUGAGUUU
hsa-miR-486	down	<0.001	1.095	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG
hsa-miR-320c-1	down	0.0183	2.078	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU
hsa-miR-498	down	0.0241	1.909	UUUCAAGCCAGGGGGCGUUUUUC
hsa-miR-24	up	0.0347	2.154	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG
hsa-miR-21	up	0.0075	2.010	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
hsa-miR-210	up	0.0053	1.595	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA
hsa-miR-101-3p	up	0.0310	1.377	CAGUUAUCACAGUGCUGAUGC
hsa-miR-223	up	<0.001	2.318	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCAA
hsa-miR-133	up	0.0116	1.671	CAAUGUUUCCACAGUGCAUCAC
hsa-miR-1256	up	0.0072	1.490	AGGCAUUGACUUCUCACUAGCU
hsa-miR-548	up	0.0054	1.791	CCCUGAGACCCUAACCUUAA
hsa-miR-575	up	0.0238	2.297	GAGCCAGUUGGACAGGAGC
hsa-miR-218	up	<0.001	1.303	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU
hsa-miR-454	up	0.0110	1.821	ACCCUAUCAAAUUAUGUCUCUGC
hsa-miR-30a	up	0.0101	2.118	UGUAAACAUCUCGACUGGAAG
hsa-miR-1	up	<0.001	1.307	ACAUACUUCUUUAUAUGCCCAU
hsa-miR-331-3p	up	0.0255	1.307	CUAGGUAUGGUCCAGGGAUCC
hsa-miR-266	up	0.0429	1.983	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC
hsa-miR-155	up	0.0103	1.389	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGUU
hsa-miR-1060	up	0.0067	1.372	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU
hsa-miR-758	up	0.0324	1.595	GAUGGUUGACCAGAGAGCACAC
hsa-miR-424	up	0.0188	1.609	CAGCAGCAAUUAUGUUUUGAA
hsa-miR-138	up	<0.001	2.254	AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG
hsa-miR-4539	up	0.0108	1.354	GCUGAACUGGGCUGAGCUGGGC

miR-30a的表达逐渐升高,且呈时间依赖性($P<0.05$,图1C)。而miR-21的表达在EMD作用延长至96 h时,上调趋势得到抑制,差异同EMD作用24 h相比不具有

统计学意义($P>0.05$,图1D)。后续实验选择miR-30a为研究对象。

2.3 miR-30a在EMD上调PDLSC CTSK表达中的作用

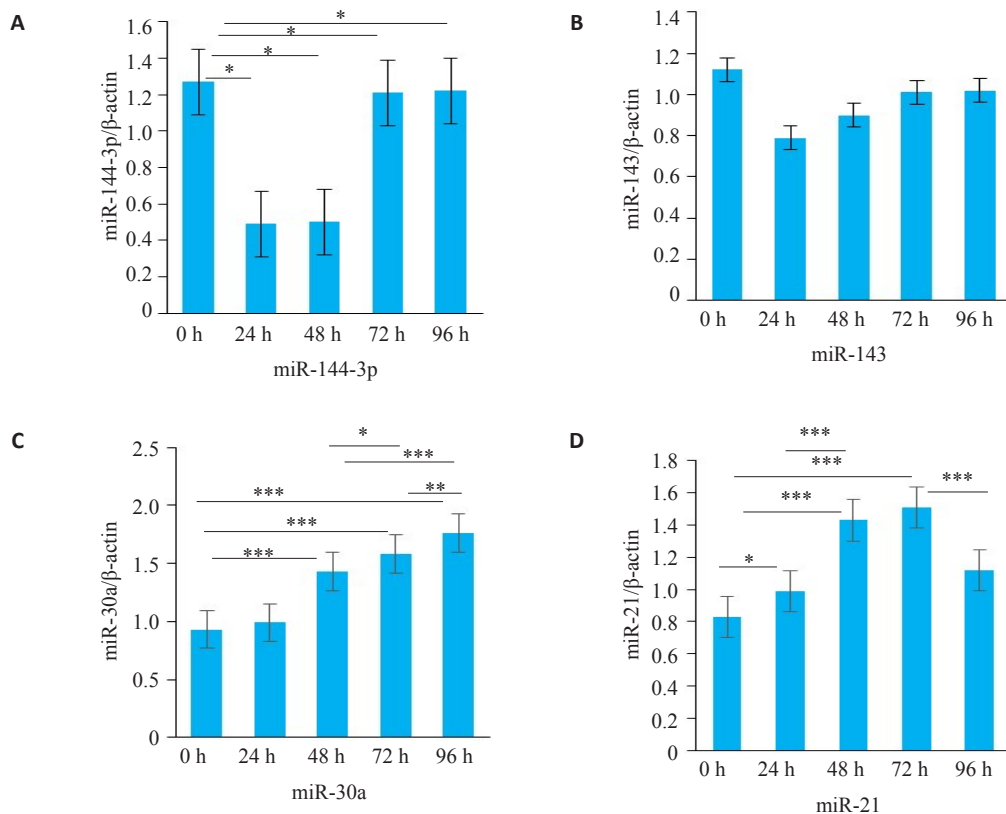


图1 RT-qPCR验证差异表达microRNAs

Fig.1 Verification of the differentially expressed microRNAs using RT-qPCR. A, B: qPCR results of miR-144-3p and miR-143 (down-regulated after EMD induction according to microRNA chip data); C, D: qPCR results of miR-30a and miR-21 (up-regulated after EMD induction according to microRNA chip data). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

首先通过miR-30a抑制剂沉默PDLSC中miR-30a的表达。细胞模型构建成功后利用实时定量PCR进行验证(图2)。EMD诱导48 h后,PDLSC中miR-30a表达上调($P<0.05$)。miR-30a抑制剂作用组的细胞miR-30a表达下调,差异同样具有统计学意义($P<0.05$)。miR-30a抑制剂作用组的细胞在EMD作用下miR-30a表达上调的趋势得到逆转。

当抑制PDLSC中miR-30a的表达后,CTSK无论mRNA(图3A)还是蛋白(图3B)的表达上调趋势均得到抑制,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

进一步将不同处理的PDLSC复合支架材料植入裸鼠皮下,观察细胞在体内异位成牙骨质向分化的情况(图4)。EMD作用后PDLSC成牙骨质向分化作用显著增强。而在miR-30a表达被沉默后,细胞在EMD诱导环境中定向分化能力减弱。但在增强miR-30a表达沉默PDLSC中CTSK的活性后,miR-30a抑制剂对PDLSC成牙骨质向分化的抑制作用得到逆转。

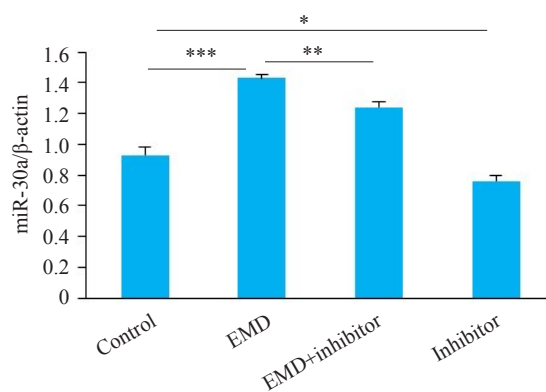


图2 EMD及miR-30a抑制剂对PDLSC miR-30a表达变化的影响

Fig.2 Effects of EMD and miR-30a inhibitor toward the expression of miR-30a in PDLSC. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

2.4 miR-30a通过wnt/β-catenin信号通路调节PDLSC CTSK的表达

Western blot检测显示在EMD诱导48 h后,PDLSC

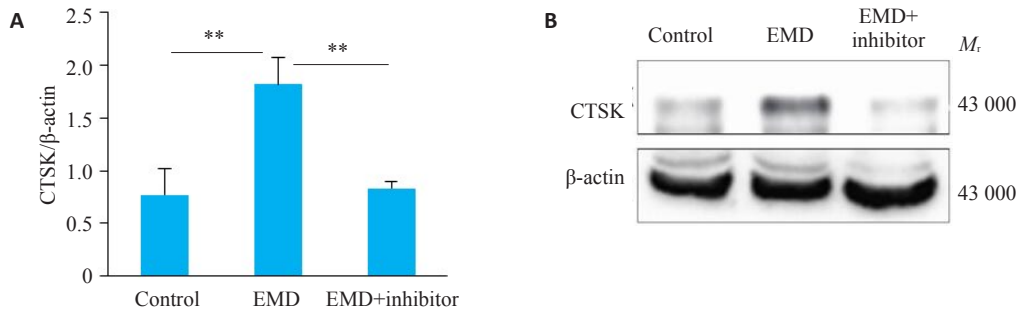


图3 EMD及miR-30a抑制剂对PDLSC CTSK表达变化的影响

Fig.3 Effects of EMD and miR-30a inhibitor on expression of CTSK in PDLSC. A: qPCR results showing the effect of miR-30a inhibition on CTSK mRNA expression in PDLSC with EMD induction. B: Western blotting results of CTSK protein expression. ** P <0.01.

中wnt/ β -catenin信号通路被特异性激活,表现为磷酸化GSK-3 β 表达上调,活化型 β -catenin表达显著升高(图5)。而wnt通路的抑制因子DKK1表达降低。当利用miR-

30a抑制剂沉默PDLSC miR-30a表达后,EMD对wnt信号通路的活化作用减弱。

而当利用wnt信号通路特异性阻断剂DKK1

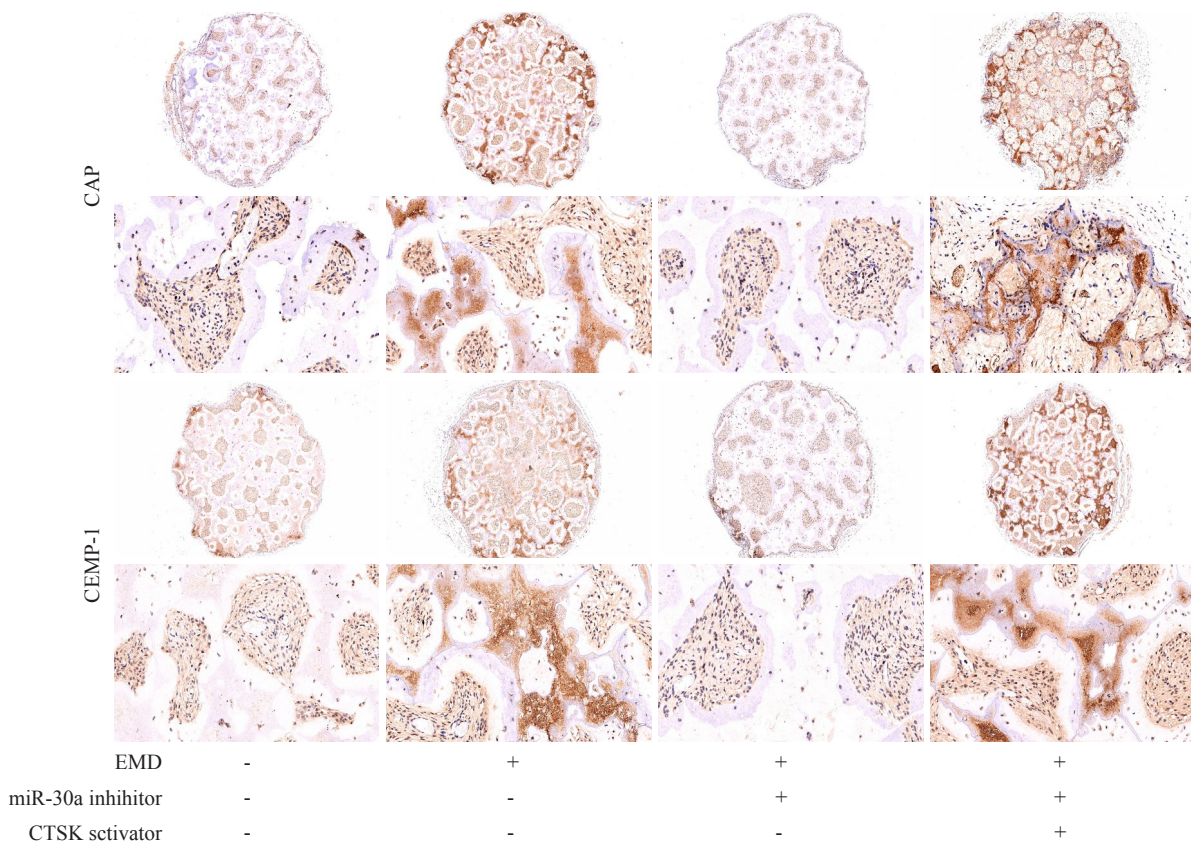


图4 miR-30a调控PDLSC CTSK表达对细胞成牙骨质向分化的影响

Fig.4 Effects of miR-30a inhibitor and CTSK activator on cementogenic differentiation of PDLSCs. Up: Original magnification: $\times 40$; Down: $\times 200$.

(10 ng/mL)阻断PDLSC wnt信号通路后,qPCR检测显示EMD诱导环境中PDLSC CTSK表达上调的趋势得到部分逆转,差异具有统计学意义(P <0.05,图6A)。蛋白检测结果(图6B)进一步印证了mRNA检测发现。

3 讨论

本实验通过microRNA基因芯片结合qPCR验证发现EMD诱导PDLSC成牙骨质向分化过程中miR-30a表达特异性上调。EMD通过miR-30a调控CTS κ

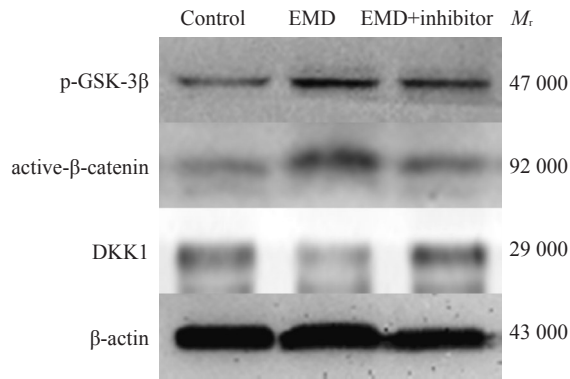


图5 EMD及miR-30a抑制剂对PDLSC wnt通路相关因子蛋白表达的影响

Fig.5 Effects of EMD and miR-30a inhibitor on expressions of related proteins of wnt signaling pathway in PDLSCs.

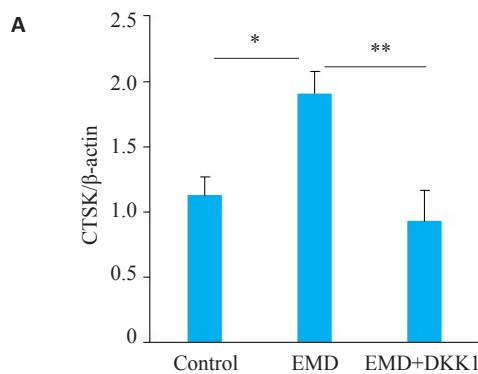
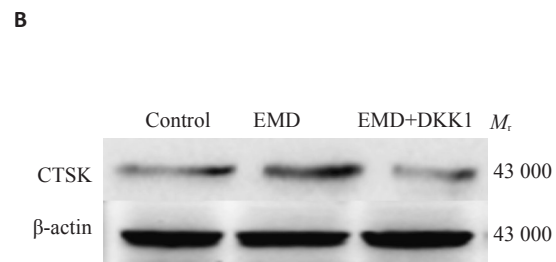


图6 EMD及DKK1对PDLSC CT SK表达变化的影响

Fig.6 Effects of EMD and DKK1 on expression of CT SK in PDLSC. A: qPCR results of CT SK mRNA expression in PDLSCs with EMD induction after inhibiting the wnt signaling pathway. B: Western blotting of CT SK protein expression. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表达促进PDLSC成牙骨质向分化。而miR-30a调节CTSK表达进而发挥功能效应可能经由wnt/ β -catenin信号通路。

MicroRNA同干细胞分化密切相关。包括肿瘤间质细胞在内的多种干细胞或前体细胞中广泛存在microRNA的表达,不同表达量的microRNA对细胞功能的影响发挥着不同作用,影响着细胞增殖和分化等基本功能^[14]。因此,microRNA在多种疾病的病理发生和病程调节中发挥关键效应。在皮肤组织中,microRNA能够调控基底细胞的“干性”促进新陈代谢,维持皮肤组织稳态^[15]。肌细胞中,以miR-206为代表的microRNA其主要作用就在于促进肌细胞的前体细胞分化形成肌肉组织^[16]。在骨髓间充质干细胞成骨分化过程中,也存



在microRNA表达谱的改变,提示这一过程同样受microRNA调控^[17]。MicroRNA主要通过作用于目标mRNA发挥调节作用,因此其在细胞中的效应机制较为复杂。多个microRNA可能作用于同一个mRNA,也有可能单个microRNA下游存在多个可能的靶向mRNA。在本实验中,我们通过microRNA芯片对PDLSC成牙骨质向分化过程中差异性表达的microRNA进行了筛选,结果也提示15种microRNA表达下调,21种microRNA表达上调。提示microRNA对PDLSC的分化也发挥着可能的调控作用。

在表达发生改变的microRNA中,miR-144-3p^[18-19]、miR-143^[20-21]、miR-30a^[22-23]和miR-21^[24-25]同细胞增殖及分化均密切相关。结合实时定量PCR结果,最终选择miR-30a作为后续研究的目标。miR-30a作为同细胞分化和增殖均密切相关的microRNA,在EMD作用后的PDLSC中表达上调且表达趋势较为稳定。通过体内实验我们也证实其参与了PDLSC成牙骨质向分化和对这

一过程关键因子CTSK的表达调控。这一发现与前期研究类似。学者已经发现miR-30a是间充质细胞成软骨分化过程中的重要调节因子^[26]。不仅能够通过相关转录因子直接影响细胞分化,还可能同淋巴细胞等相互作用发挥免疫抑制效应间接对细胞分化产生影响^[23]。在口腔牙周组织中,miR-30a不仅参与了牙周组织炎症损伤,也调节着牙周炎患者组织修复过程^[27],这一发现与本研究类似。本实验研究结果扩大了对miR-30a在干细胞分化尤其是口腔牙周组织来源间充质干细胞多向分化过程中的认识。

在明确miR-30a对CTSK发挥调控作用进而调节PDLSC成牙骨质向分化后,我们观察了wnt信号通路在这一调节过程中发挥的可能分子机理。既往已有多个研究证实wnt/ β -catenin信号通路是矿化组织发生和再生的调节通路^[28]。它可以通过调控包括PDLSC在内的间充质干细胞增殖和分化促进骨及类骨组织形成^[29]。在本研究中,结果发现EMD诱导作用下wnt通路相关

因子p-GSK-3 β 和核心调控因子活化型 β -catenin表达均出现上调,而通路抑制因子DKK1表达则显著下调。提示在PDLSC成牙骨质向分化过程中伴随wnt/ β -catenin信号通路的激活。但较之于骨髓间充质干细胞及其他组织来源间充质干细胞,wnt信号通路在牙周组织稳态的维持中功能作用发挥仍有一定争议。虽然体外实验证实wnt通路能够上调牙周膜组织来源细胞表达成骨分化标志物如Osterix,Runx2和ALP^[30],也有学者发现wnt通路能够抑制牙周膜细胞成牙骨质向分化,这一结果与本实验结果相悖,作者考虑与诱导微环境存在关联。Wnt通路在PDLSC牙周再生应用或成牙骨质向分化中的具体作用机制尚需进一步研究^[31]。

Wnt信号通路不仅参与以PDLSC作为种子细胞的牙周组织再生,其功能作用发挥也受microRNA的调节。MiR-128通过调控wnt通路能够影响大鼠骨髓间充质干细胞向神经元样细胞分化^[32];wnt3a受miR-410的负性调控从而促进人骨髓间充质干细胞向成软骨方向分化^[33],而miR-27则可以靶向作用于APC激活wnt信号通路促进成牙本质细胞分化^[34]。具体到miR-30a,已有学者证实miR-30a可以靶向作用于PR结构域蛋白1基因通过DKK1调控wnt信号通路从而促进神经胶质瘤的生长。此外,miR-30a和wnt/ β -catenin信号通路之间的交互作用也为骨髓瘤的治疗提供了新的思路^[35]。我们的研究结果也提示,EMD诱导作用下,PDLSC miR-30a的表达和wnt信号通路的激活间存在相关性,且wnt信号通路的激活影响PDLSC成牙骨质向分化重要调控因子CTSK的表达。

MicroRNA功能作用的发挥多在于其通过负性调控靶基因的表达进而影响下游通路。在本研究中,我们初步探讨了PDLSC成牙骨质向分化过程中CTSK表达上调的机制,即EMD上调miR-30a的表达进而通过激活wnt信号通路上调CTSK表达。由此作者推测MiR-30a上调wnt信号通路的可能途径有两条:其一在于直接靶向作用于wnt通路的负性调控因子,但相关机制有赖于进一步生物信息学的验证;其二在于间接作用于下游的靶向转录因子进而间接抑制wnt通路。因此,在后续研究中,作者将进一步通过生信分析来明确miR-30a激活wnt通路的目标靶基因并通过系列实验进行验证。此外,miR-30a-wnt/ β -catenin信号轴在PDLSC成牙骨质向分化过程中除调节CTSK的表达外,是否可能存在其他功能作用,也是后续研究的方向之一。

结合前期研究,本实验结果进一步表明CTSK是EMD通过miR-30a调控PDLSC成牙骨质向分化的关键靶点。然而,现有文献缺乏CTSK在wnt通路作用下自身表达调控及调控干细胞定向分化的效应机制相关报道。在后续研究中,作者将结合转录因子芯片及生物

信息学分析等技术,以CTSK为中心,深入开展效应机制的探索。

综上所述,PDLSC成牙骨质向分化过程中,EMD可能通过上调miR-30a的表达激活wnt/ β -catenin信号通路从而经CTSK诱导PDLSC向成牙骨质细胞方向分化。本研究有望为揭示PDLSC成牙骨质向分化过程中CTSK表达升高的机制提供实验基础,也为明确调控PDLSC成牙骨质向分化的关键通路实现更好的定向诱导提供理论依据。

参考文献:

- [1] Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases [J]. *Lancet*, 2005, 366(9499): 1809-20.
- [2] Wojtkowska A, Zapolski T, Wysokińska-Miszczuk J, et al. The inflammation link between periodontal disease and coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: case-control study[J]. *BMC Oral Health*, 2021, 21(1): 5.
- [3] Kumar NS, Sowmya N, Singh VP, et al. Dual role of subepithelial connective tissue grafting in regeneration of periodontal attachment apparatus[J]. *Dent Updat*, 2017, 44(5): 459-61.
- [4] Al-Habib M, Huang GT. Dental mesenchymal stem cells: dental pulp stem cells, periodontal ligament stem cells, apical papilla stem cells, and primary teeth stem cells-isolation, characterization, and expansion for tissue engineering[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1922: 59-76.
- [5] Heijl L, Heden G, Svärdröm G, et al. Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects[J]. *J Clin Periodontol*, 1997, 24(9 pt 2): 705-14.
- [6] Ding T, Li J, Zhang X, et al. Super-assembled core/shell fibrous frameworks with dual growth factors for in situ cementum-ligament-bone complex regeneration[J]. *Biomater Sci*, 2020, 8(9): 2459-71.
- [7] Dai R, Wu Z, Chu HY, et al. Cathepsin K: the action in and beyond bone[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 433.
- [8] Xue Y, Wang L, Xia D, et al. Dental abnormalities caused by novel compound heterozygous CTSK mutations[J]. *J Dent Res*, 2015, 94(5): 674-81.
- [9] Wen X, Yi LZ, Liu F, et al. The role of cathepsin K in oral and maxillofacial disorders[J]. *Oral Dis*, 2016, 22(2): 109-15.
- [10] Liu F, Zhou ZF, An Y, et al. Effects of cathepsin K on Emdogain-induced hard tissue formation by human periodontal ligament stem cells[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017, 11(10): 2922-34.
- [11] Rodríguez-Lozano FJ, Collado-González M, Tomás-Catalá CJ, et al. GuttaFlow Bioseal promotes spontaneous differentiation of human periodontal ligament stem cells into cementoblast-like cells [J]. *Dent Mater*, 2019, 35(1): 114-24.
- [12] Wang C, Li Y, Yu K, et al. HOXA10 inhibit the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells by regulating β -catenin localization and DKK1 expression[J]. *Connect Tissue Res*, 2021, 62(4): 393-401.
- [13] Kim SH, Kim KH, Seo BM, et al. Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow

- stem cells in a canine peri-implant defect model: a pilot study[J]. *J Periodontol*, 2009, 80(11): 1815-23.
- [14] Chai Z, Yin X, Chen J, et al. MicroRNA-101 modulates cisplatin chemoresistance in liver cancer cells via the DNA-PKcs signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(4): 3655-63.
- [15] Yi R, Poy MN, Stoffel M, et al. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness' [J]. *Nature*, 2008, 452(7184): 225-9.
- [16] Torma F, Gombos Z, Fridvalszki M, et al. Blood flow restriction in human skeletal muscle during rest periods after high-load resistance training down-regulates miR-206 and induces Pax7 [J]. *J Sport Health Sci*, 2021, 10(4): 470-7.
- [17] Baglio SR, Devescovi V, Granchi D, et al. MicroRNA expression profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation reveals Osterix regulation by miR-31 [J]. *Gene*, 2013, 527(1): 321-31.
- [18] Wang W, Ge L, Xu XJ, et al. LncRNA NEAT1 promotes endometrial cancer cell proliferation, migration and invasion by regulating the miR-144-3p/EZH2 axis [J]. *Radiol Oncol*, 2019, 53(4): 434-42.
- [19] Sun ZB, Wu F, Yang Y, et al. MiR-144-3p inhibits BMSC proliferation and osteogenic differentiation via targeting FZD4 in steroid-associated osteonecrosis [J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(45): 4806-12.
- [20] Song B, Tang YJ, Zhang WG, et al. MiR-143 regulates proliferation and apoptosis of myelocytic leukemia cell HL-60 via modulating ERK1 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(11): 3333-41.
- [21] Wang R, Zhang H, Ding W, et al. miR-143 promotes angiogenesis and osteoblast differentiation by targeting HDAC7 [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(3): 179.
- [22] Wang Y, Wang F, He J, et al. miR-30a-3p targets MAD2L1 and regulates proliferation of gastric cancer cells [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 11313-24.
- [23] Xu Z, Ji JJ, Xu JJ, et al. MiR-30a increases MDSC differentiation and immunosuppressive function by targeting SOCS3 in mice with B-cell lymphoma [J]. *FEBS J*, 2017, 284(15): 2410-24.
- [24] Zhu J, Liu B, Wang Z, et al. Exosomes from nicotine-stimulated macrophages accelerate atherosclerosis through miR-21-3p/PTEN-mediated VSMC migration and proliferation [J]. *Theranostics*, 2019, 9(23): 6901-19.
- [25] Kang J, Li Z, Zhi Z, et al. MiR-21 derived from the exosomes of MSCs regulates the death and differentiation of neurons in patients with spinal cord injury [J]. *Gene Ther*, 2019, 26(12): 491-503.
- [26] Tian Y, Guo R, Shi B, et al. MicroRNA-30a promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells through inhibiting Delta-like 4 expression [J]. *Life Sci*, 2016, 148: 220-8.
- [27] Elazazy O, Amr K, Abd El Fattah A, et al. Evaluation of serum and gingival crevicular fluid microRNA-223, microRNA-203 and microRNA-200b expression in chronic periodontitis patients with and without diabetes type 2 [J]. *Arch Oral Biol*, 2021, 121: 104949.
- [28] Okuchi Y, Reeves J, Ng SS, et al. Wnt-modified materials mediate asymmetric stem cell division to direct human osteogenic tissue formation for bone repair [J]. *Nat Mater*, 2021, 20(1): 108-18.
- [29] Min Swe NM, Kobayashi Y, Kamimoto H, et al. Aberrantly activated Wnt/β-catenin pathway co-receptors LRP5 and LRP6 regulate osteoblast differentiation in the developing coronal sutures of an Apert syndrome (Fgfr2S252W/+) mouse model [J]. *Dev Dyn*, 2021, 250(3): 465-76.
- [30] Heo JS, Lee SY, Lee JC. Wnt/β-catenin signaling enhances osteoblastogenic differentiation from human periodontal ligament fibroblasts [J]. *Mol Cells*, 2010, 30(5): 449-54.
- [31] Li S, Shao J, Zhou Y, et al. The impact of Wnt signalling and hypoxia on osteogenic and cementogenic differentiation in human periodontal ligament cells [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(6): 4975-82.
- [32] Wu R, Tang Y, Zang W, et al. MicroRNA-128 regulates the differentiation of rat bone mesenchymal stem cells into neuron-like cells by Wnt signaling [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 387(1/2): 151-8.
- [33] Zhang Y, Huang X, Yuan Y. MicroRNA-410 promotes chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells through down-regulating Wnt3a [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(1): 136-45.
- [34] Park MG, Kim JS, Park SY, et al. MicroRNA-27 promotes the differentiation of odontoblastic cell by targeting APC and activating Wnt/β-catenin signaling [J]. *Gene*, 2014, 538(2): 266-72.
- [35] Hu S, Mao G, Zhang Z, et al. MicroRNA-320c inhibits development of osteoarthritis through downregulation of canonical Wnt signaling pathway [J]. *Life Sci*, 2019, 228: 242-50.

(编辑:孙昌朋)