

- [3] 何璐, 张玉顺. 卵圆孔未闭与不明原因脑卒中的最新诊治策略[J]. 中国实用内科杂志, 2019, 39(7): 575-578.
- [4] DAVIS D, GREGSON J, WILLEIT P, et al. Patent foramen ovale, ischemic stroke and migraine: systematic review and stratified meta-analysis of association studies[J]. Neuroepidemiology, 2013, 40(1): 56-67.
- [5] 麻姣姣, 翟妮娜, 杨柳, 等. 隐源性脑梗死患者反常性栓塞量表评分与右向左分流严重程度的关系[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2018, 39(2): 271-275.
- [6] KATSANOS AH, PSALTOPOULOU T, SERGENTANIS TN, et al. Transcranial Doppler versus transthoracic echocardiography for the detection of patent foramen ovale inpatients with cryptogenic cerebral ischemia: a systematic review and diagnostic test accuracy metaanalysis[J]. Ann Neurol, 2016, 79(4): 625-635.
- [7] 全国第四届脑血管病学术会议. 各类脑血管疾病的诊断要点[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29(6): 370-380.
- [8] 郭雨竹, 邢英琦. 对比增强经颅多普勒超声诊断右向左分流相关问题探讨[J]. 中国卒中杂志, 2016, 11(7): 515-529.
- [9] KENT DM, RUTHAZER R, WEIMAR C, et al. An index to identify stroke-related vs incidental patent foramen ovale in cryptogenic stroke[J]. Neurology, 2013, 81(7): 619-625.
- [10] 于长申, 王新平. 隐源性卒中合并卵圆孔未闭治疗进展[J]. 中国城乡企业卫生, 2018, 33(1): 39-41.
- [11] 赵兰, 任梅影, 周婷. 卵圆孔未闭引起脑梗死及心肌梗死1例[J]. 局解手术学杂志, 2018, 27(5): 384-386.
- [12] 姜惠悦, 姚公志, 周璇, 等. 超声检测脑卒中患者颈、椎动脉粥样硬化与血流动力学临床分析[J]. 中国现代医药杂志, 2018, 20(2): 77-79.
- [13] FIGUEROA CORDOBA AV, BERTAZZO BB, GONZALEZ GRIMA J, et al. Effectiveness of transthoracic echocardiogram in patent foramen ovale diagnosis. Systematic review of last ten years[J]. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba, 2019, 76(4): 211-216.
- [14] 罗晓惠, 杜亚娟, 张玉顺. 卵圆孔未闭患者标准化右心声学造影与传统方法的比较[J]. 心脏杂志, 2018, 30(5): 571-574.
- [15] 赵秋霞, 刘蓉, 董芝芝, 等. 经胸超声心动图声学造影与经颅多普勒超声声学造影同步试验对卵圆孔未闭的诊断价值[J]. 中国循环杂志, 2020, 35(2): 175-180.
- [16] STASZEWSKI J, TOMCZYKIEWICZ K, PIUSIŃSKA-MACOCH A, et al. Prevalence and extent of right-to-left shunt on contrast-enhanced transcranial Doppler in patients with chronic hyperventilation syndrome: results of a case-control study[J]. Neurol Neurochir Pol, 2019, 53(1): 90-94.
- [17] 王宇星, 宋强, 刘维军, 等. 经颅多普勒超声声学造影与经胸超声心动图造影对卵圆孔未闭右向左分流诊断的比较[J]. 心脏杂志, 2015, 27(4): 390-393.
- [18] 刘章峰, 孟祥宁, 冯文萍. 经颅多普勒超声造影在不明原因偏头痛及脑梗塞患者卵圆孔未闭中的诊断价值[J]. 临床医学研究与实践, 2019, 4(5): 143-144.
- [19] WESSLER BS, KENT DM, THALER DE, et al. The RoPE score and right-to-left shunt severity by transcranial Doppler in the CODICIA Study[J]. Cerebrovasc Dis, 2015, 40(2): 52-58.
- [20] 袁树华, 李艾帆, 李永芳, 等. RoPE量表结合cTCD对隐源性脑卒中的应用价值[J]. 卒中与神经疾病, 2019, 26(3): 286-289.

(收稿日期: 2020-05-29, 修回日期: 2020-08-07)

引用本文: 马文贤, 黄琼, 董振耀. 微小RNA-218-5p靶向Jagged 1调控人牙周膜干细胞的活性和骨向分化[J]. 安徽医药, 2021, 25(12): 2503-2508. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.12.040.

◇临床医学◇



微小RNA-218-5p靶向Jagged 1调控人牙周膜干细胞的活性和骨向分化

马文贤^{1a}, 黄琼^{1b}, 董振耀²

作者单位:¹西宁市口腔医院,^a口腔外科,^b牙周科,青海 西宁810000;

²青海省第五人民医院口腔科,青海 西宁810007

摘要: **目的** 研究微小RNA-218-5p(miR-218-5p)对人牙周膜干细胞(hPDLSCs)活性和骨向分化的影响并探讨其机制,为牙周炎的治疗提供研究基础。**方法** 将anti-miR-218-5p组(转染anti-miR-218-5p)、anti-miR-NC组(转染anti-miR-NC)、pcDNA组(转染pcDNA)、pcDNA-JAG1组(转染pcDNA-JAG1)、anti-miR-218-5p+si-NC组(共转染anti-miR-218-5p和si-NC)、anti-miR-218-5p+si-JAG1组(共转染anti-miR-218-5p和si-JAG1),用脂质体法转染至hPDLSCs细胞;运用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测细胞中miR-218-5p、I型胶原蛋白(Col-1)、骨钙素、Runt相关转录因子2(Runx2)的表达;蛋白质印迹法(Western blotting)检测细胞中Jagged 1(JAG1)的蛋白表达;MTT法检测细胞活性;茜素红染色实验检测细胞的矿化结节;双荧光素酶报告基因检测实验检测细胞的荧光活性。**结果** 与anti-miR-NC组相比,anti-miR-218-5p组hPDLSCs细胞培养48、72 h时,细胞活性升高[48 h: (0.44±0.04)比(0.62±0.06); 72 h: (0.53±0.05)比(0.83±0.08); $P<0.001$],细胞的矿化结节明显升高,Col-1[(0.26±0.03)比(0.74±0.07)]、骨钙素[(0.21±0.02)比(0.54±0.05)]、Runx-2[(0.29±0.03)比(0.61±0.06)]蛋白相对表达量均显著升高(均 $P<0.001$)。与pcDNA组相比,pcDNA-JAG1组hPDLSCs细胞培养48、72 h时,细胞活性显著升高[48 h: (0.42±0.04)比(0.59±0.05); 72 h: (0.55±0.05)比(0.81±0.08); $P<0.001$],Col-1[(0.34±0.03)比(0.71±0.07)]、骨钙素[(0.23±0.02)比

(0.48 ± 0.04)、Runx-2 [(0.25 ± 0.03) 比 (0.56 ± 0.05)]蛋白表达量均显著升高(均 $P < 0.001$)。miR-218-5p可靶向调控JAG1的表达。抑制JAG1可逆转抑制miR-218-5p对hPDLSCs的活性和骨向分化作用。结论 抑制miR-218-5p可促进人牙周膜干细胞活性和骨向分化,其机制与靶向JAG1有关。

关键词: 微小RNA-218-5p; Jagged 1; 牙周韧带; 人牙周膜干细胞; 骨向分化

MicroRNA-218-5p regulates the activity and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells by targeting Jagged 1

MA Wenxian^{1a}, HUANG Qiong^{1b}, DONG Zhenyao²

Author Affiliations:^{1a}Department of Oral Surgery, ^{1b}Department of Periodontist, Xining Stomatology Hospital, Xining, Qinghai 810000, China; ²Department of Stomatology, The Fifth People's Hospital of Qinghai Province, Xining, Qinghai 810007, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of microRNA-218-5p (miR-218-5p) on the activity and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs) and to explore its mechanism, and to provide research basis for the treatment of periodontitis. **Methods** Cells were divided into anti-miR-218-5p group (transfected with anti-miR-218-5p), anti-miR-NC group (transfected with anti-miR-NC), pcDNA group (transfected with pcDNA), pcDNA-JAG1 group (transfected with pcDNA-JAG1), anti-miR-218-5p+si-NC group (co-transfected with anti-miR-218-5p and si-NC), anti-miR-218-5p+si-JAG1 group (co-transfected with anti-miR-218-5p and si-JAG1), transfected into hPDLSCs cells by liposome method. Real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) method was used to detect miR-218-5p, type I collagen (Col-1), osteocalcin (OCN), Runt-related transcription factor 2 (Runx2) in cells; Western blotting method was used to detect the protein expression of Jagged 1 (JAG1) in cells; tetramethylazolylazolyl salt microenzyme reaction colorimetric method (MTT) was used to detect cell viability; alizarin red staining test was used to detect mineralized nodules of cells; dual luciferase reporter assay was used to detect the fluorescence activity of cells. **Results** Compared with the anti-miR-NC group, the cell viability of hPDLSCs in the anti-miR-218-5p group was increased at 48 and 72 h [48 h: (0.44 ± 0.04), (0.62 ± 0.06); 72 h: (0.53 ± 0.05), (0.83 ± 0.08); $P < 0.001$]; the mineralized nodules of cells were significantly increased, and the relative expressions of Col-1, OCN, and Runx-2 proteins were significantly increased [Col-1 protein: (0.26 ± 0.03), (0.74 ± 0.07); OCN protein: (0.21 ± 0.02), (0.54 ± 0.05); Runx-2 protein: (0.29 ± 0.03), (0.61 ± 0.06); $P < 0.001$]. Compared with the pcDNA group, the cell viability of hPDLSCs in the pcDNA-JAG1 group was significantly increased when cultured for 48 and 72 h [48 h: (0.42 ± 0.04), (0.59 ± 0.05); 72 h: (0.55 ± 0.05), (0.81 ± 0.08); $P < 0.001$], the expression of Col-1, OCN, and Runx-2 proteins all were increased significantly [Col-1 protein: (0.34 ± 0.03), (0.71 ± 0.07); OCN protein: (0.23 ± 0.02), (0.48 ± 0.04); Runx-2 protein: (0.25 ± 0.03), (0.56 ± 0.05); $P < 0.001$]. miR-218-5p can target the expression of JAG1. Inhibition of JAG1 reversibly inhibited the activity and osteogenic differentiation of hPDLSCs by miR-218-5p. **Conclusions** Inhibition of miR-218-5p can promote the activity and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. The mechanism is related to the targeting of JAG1.

Key words: MicroRNA-218-5p; Jagged 1; Periodontal ligament; Human periodontal ligament stem cells; Osteogenic differentiation

微小RNA(miRNA)为长度在19~23个核苷酸之间的短链非编码微小RNA,其在多种疾病中均具有调控功能,其中包括牙周炎^[1-2]。微小RNA-218-5p(miR-218-5p)在牙周炎中的作用虽然已得到部分学者的肯定,但其调控机制与Notch信号通路的关系尚未清楚。Notch信号通路在维持细胞生长、分化方面具有关键作用,其在疾病的进程中具有重要作用^[3-4]。Notch信号通路通过Notch蛋白与相邻细胞上的配体Jagged 1(JAG1)蛋白结合而被激活,Notch蛋白的裂解在细胞内发生,导致Notch细胞内结构域易位到细胞核中并进一步调节Notch靶基因表达^[5-6]。Notch信号通路参与成骨分化过程和破骨细胞生成的诱导过程^[7-8]。但是miR-218-5p与JAG1在

人牙周膜干细胞(hPDLSCs)中的作用关系尚不清楚。2018年12月至2019年9月,本研究拟以人牙周膜干细胞hPDLSCs为研究对象,观察抑制miR-218-5p、过表达JAG1对hPDLSCs细胞活性、分化的影响,揭示其机制,为牙周膜干细胞治疗牙周炎,促进牙周骨组织再生提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 hPDLSCs购自ATCC;兔抗人JAG1、I型胶原蛋白(Col-1)、骨钙素、Runt相关转录因子2(Runx2)多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)抗体均购自Santa Cruz;pcDNA 3.1载体购自康为世纪; α -MEM培养基购自Hyclone公司;胎牛血清均购自Gibco公司;噻唑蓝

(MTT)试剂盒购自美国GIBCO公司;转染试剂Lipofectamine™2000购自北京索莱宝科技有限公司;BCA蛋白定量试剂盒购自上海源叶生物公司;逆转录试剂盒购自大连Takara公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜购自德国罗氏诊断有限公司;ECL发光液购自北京普利莱基因技术有限公司;RIPA裂解液购自碧云天生物技术公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自美国Promega公司。实验中所有引物的合成及序列均由上海吉玛公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含10%胎牛血清的 α -MEM培养基培养人牙周膜干细胞hPDLSCs,置于37℃,5%二氧化碳的培养箱中常规培养。

1.2.2 细胞转染 将未做任何处理的hPDLSCs细胞标记为对照组;anti-miR-218-5p、anti-miR-NC、pcDNA、pcDNA-JAG1、anti-miR-218-5p+si-NC、anti-miR-218-5p+si-JAG1按照脂质体Lipofectamine™2000说明书操作步骤要求转染至正常培养的hPDLSCs细胞,分别标记为anti-miR-218-5p组、anti-miR-NC组、pcDNA组、pcDNA-JAG1组、anti-miR-218-5p+si-NC组、anti-miR-218-5p+si-JAG1组,转染48 h后,用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测转染效率。转染成功后,用于后续试验。

1.2.3 qRT-PCR检测细胞中miR-218-5p、Col-1、骨钙素、Runx-2的表达 为了观察miR-218-5p、JAG1对hPDLSCs细胞中Col-1、骨钙素、Runx-2的mRNA表达的调控,本探究通过抑制miR-218-5p、过表达JAG1、敲减JAG1检测其中Col-1、骨钙素、Runx-2的mRNA表达情况。将对照组、anti-miR-218-5p组、anti-miR-NC组、pcDNA组、pcDNA-JAG1组、anti-miR-218-5p+si-NC组、anti-miR-218-5p+si-JAG1组细胞,遵照RNA抽提试剂盒说明书要求操作提取RNA,进行定量,然后按逆转录试剂盒按照说明书操作合成互补DNA(cDNA),相关序列信息见表1。最后按qRT-PCR试剂盒说明书操作进行miR-218-5p、Col-1、骨钙素、Runx-2检测。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算miR-218-5p、Col-1、骨钙素、Runx-2的表达。

1.2.4 MTT法检测细胞活性 调整对照组、anti-miR-218-5p组、anti-miR-NC组、pcDNA组、pcDNA-JAG1组、anti-miR-218-5p+si-NC组、anti-miR-218-5p+si-JAG1组细胞密度至 10^5 /mL,取200 μ L,加入20 μ L 5 g/L的MTT溶液,培养4 h,然后弃去上清,每孔加入150 μ L二甲亚砜(DMSO),震荡,使结晶溶解,在490 nm波长下检测细胞吸光度。

1.2.5 茜素红染色实验 将对照组、anti-miR-218-5p组、anti-miR-NC组hPDLSCs细胞调整至 10^5 /mL,

表1 相关序列信息

名称	序列信息
anti-miR-218-5p	5'-ACAUGGUUAGAUAAGCACAA-3'
miR-218-5p引物	正向:5'-TTGCGGATGGTTCCGTCA AGCA-3', 反向:5'-ATCCAGTCAGGGTCCGAGG-3'
Col-1引物	正向:5'-GCAAGGTGTTGTGCGATGA-3', 反向:5'-TGGTGCGGTGGGTGACTCTG-3'
骨钙素引物	正向:5'-CCCAGGCGCTACCTGTATCAA-3', 反向:5'-GGTCAGCCAACTCGTCACAGTC-3'
Runx-2引物	正向:5'-CACTGGCGCTGCAACAAGA-3', 反向:5'-CACTGGCGCTGCAACAAGA-3'
JAG1引物	正向:5'-CAACTGGACAAACAAACAGGA- CAAC-3',反向:5'-CCTCAGACTGGGATAC- GACAACA-3'
pcDNA-JAG1 序列	5'-AGGAAGAGAGAAAATTTTGGAGTTAG- GTTTGT-3'
si-JAG1序列	5'-ACGAGGCCAAACCTTGTGTAAG-3'

然后接种在6孔板中进行常规培养,弃去未贴壁的细胞和培养液,用10 nmol/L地塞米松、10 mmol/L β 甘油酸钠及50 mg/L维生素C的 α -MEM成骨诱导液或者10 μ g/L转化生长因子 β 1(TGF- β 1)的 α -MEM成骨诱导液处理hPDLSCs。每2~3天换液,分别培养14 d、21 d、28 d,在倒置显微镜下观察矿化结节的形成。

1.2.6 蛋白质印迹法(Western blotting)实验检测细胞中JAG1、Col-1、骨钙素、Runx-2的蛋白表达 收集对照组、anti-miR-218-5p组、anti-miR-NC组、pcDNA组、pcDNA-JAG1组、anti-miR-218-5p+si-NC组、anti-miR-218-5p+si-JAG1组细胞,调整细胞密度至 10^5 /mL,加入裂解液,冰上裂解30 min。12 000 r/min离心10 min。取上清置于离心管,加入5 $\times$ SDS上样缓冲液,沸水煮沸10 min。电泳后用转膜仪将蛋白转移至PVDF膜;5%脱脂奶粉将膜封闭2 h,洗膜,加入I抗(1:500倍稀释的兔抗人JAG1、Col-1、骨钙素、Runx-2多克隆抗体),4℃过夜孵育,洗膜,加II抗(1:1 000倍稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG),4℃,2 h。加发光液,曝光。

1.2.7 双荧光素酶报告基因检测实验 将目的基因JAG1-WT和JAG1-MUT进行Xho I和Not I酶切,并回收目的片段,克隆至PUC-T载体。再将目的序列与psiCHECK-2载体链接,点击法插入DH5 α 感受态细胞,再用500 μ L LB液体培养基进行摇菌和优势菌落挑选,扩大优势菌落培养,最后提取质粒DNA。用脂质体法将psiCHECK2-JAG1-3'非翻译区(UTR)WT、psiCHECK2-JAG1-3'UTR MUT转染至对照组、miR-218-5p组、miR-NC组细胞。最后按双荧光素酶报告基因检测试剂盒技术手册要求操作。psiCHECK2载体以萤火虫荧光素酶活性为内参,

psiCHECK2-JAG1-3'UTR WT 和 psiCHECK2-JAG1-3'UTR MUT 的表达为对照,检测荧光强度。海肾荧光素酶的发光强度与萤火虫荧光素酶发光强度的比值反映 miR-218-5p 与 JAG1 的结合力。

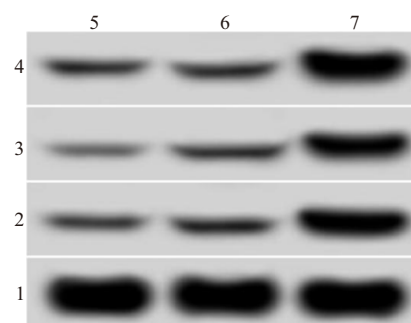
1.3 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较采用单因素方差分析+LSD-*t* 检验,两组比较采用两独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制 miR-218-5p 表达对 hPDLSCs 活性的影响 与 anti-miR-NC 组相比,anti-miR-218-5p 组 hPDLSCs 细胞中 miR-218-5p 表达显著降低 ($P < 0.001$),48、72 h 时,细胞活性显著升高 (均 $P < 0.001$)。见表 2。

2.2 抑制 miR-218-5p 表达对 hPDLSCs 骨向分化的影响 与 anti-miR-NC 组相比,anti-miR-218-5p 组

hPDLSCs 细胞的矿化结节明显升高,Col-1、骨钙素、Runx-2 的 mRNA 和蛋白的相对表达量均显著升高 (均 $P < 0.001$)。见图 1、图 2、表 3。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—Runt 相关转录因子 2(Runx-2);3—骨钙素;4—I 型胶原蛋白(Col-1);5—对照组;6—anti-miR-NC 组;7—anti-miR-218-5p 组。

图 2 蛋白质印迹法检测抑制 miR-218-5p 表达后人牙周膜干细胞(hPDLSCs)骨向分化时 Col-1、骨钙素、Runx-2 蛋白电泳图

表 2 抑制 miR-218-5p 表达对人牙周膜干细胞(hPDLSCs)活细胞数的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-218-5p	细胞增殖(490 nm 吸光度)		
			24 h	48 h	72 h
对照组	9	1.00±0.10	0.30±0.03	0.42±0.04	0.51±0.04
anti-miR-NC 组	9	1.02±0.08	0.32±0.03	0.44±0.04	0.53±0.05
anti-miR-218-5p 组	9	0.38±0.04 ^①	0.33±0.04	0.62±0.06 ^①	0.83±0.08 ^①
<i>F</i> 值		198.600	0.794	48.176	82.629
<i>P</i> 值		<0.001	0.464	<0.001	<0.001

注:①与 anti-miR-NC 组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 JAG1 过表达对 hPDLSCs 活性和骨向分化的影响 与 pcDNA 组相比,pcDNA-JAG1 组 hPDLSCs 细胞中 JAG1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.001$),48、72 h 时,细胞活性显著升高 (均 $P < 0.001$),Col-1、骨钙素、Runx-2 的 mRNA 的相对表达量和蛋白表达量均显著升高 (均 $P < 0.001$)。见表 4。

2.4 miR-218-5p 靶向调控 JAG1 的表达 运用 miRcode 数据库预测到 miR-218-5p 与 JAG1 3'UTR 存在结合位点(图 3);双荧光素酶活性检测结果显示,与 miR-NC 组相比,miR-218-5p 组 WT-JAG1 细胞中荧光活性显著降低 ($P < 0.001$),MUT-JAG1 细胞中

表 3 抑制 miR-218-5p 表达对人牙周膜干细胞(hPDLSCs)骨向分化的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	mRNA 相对表达量			蛋白相对表达量		
		Col-1	骨钙素	Runx-2	Col-1	骨钙素	Runx-2
对照组	9	1.00±0.10	1.00±0.09	1.00±0.11	0.27±0.02	0.20±0.02	0.30±0.03
anti-miR-NC 组	9	1.01±0.08	1.00±0.07	0.98±0.08	0.26±0.03	0.21±0.02	0.29±0.03
anti-miR-218-5p 组	9	2.96±0.21 ^①	2.01±0.17 ^①	2.03±0.19 ^①	0.74±0.07 ^①	0.54±0.05 ^①	0.61±0.06 ^①
<i>F</i> 值		568.577	219.115	178.335	327.629	306.273	165.500
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:Col-1 为 I 型胶原蛋白,Runx2 为 Runt 相关转录因子 2。

①与 anti-miR-NC 组比较, $P < 0.05$ 。

表 4 JAG1 过表达对入牙周膜干细胞(hPDLSCs)活性和骨向分化的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	JAG1 蛋白	细胞增殖(490 nm 吸光度)			mRNA 相对表达量			蛋白相对表达量		
			24 h	48 h	72 h	Col-1	骨钙素	Runx-2	Col-1	骨钙素	Runx-2
对照组	9	0.45±0.04	0.30±0.03	0.42±0.04	0.51±0.04	1.00±0.10	1.00±0.09	1.00±0.11	0.27±0.02	0.20±0.02	0.30±0.03
pcDNA 组	9	0.46±0.05	0.31±0.03	0.42±0.04	0.55±0.05	0.99±0.08	0.98±0.09	1.01±0.07	0.34±0.03	0.23±0.02	0.25±0.03
pcDNA-JAG1 组	9	0.86±0.07 ^①	0.32±0.03	0.59±0.05 ^①	0.81±0.08 ^①	2.87±0.19 ^①	1.96±0.18 ^①	1.98±0.19 ^①	0.71±0.07 ^①	0.48±0.04 ^①	0.56±0.05 ^①
<i>F</i> 值		164.100	1.000	51.632	68.229	602.691	174.296	161.136	373.949	265.875	173.930
<i>P</i> 值		<0.001	0.383	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:JAG1 为 Jagged-1,Col-1 为 I 型胶原蛋白,Runx-2 为 Runt 相关转录因子 2。

①与 pcDNA 组比较, $P < 0.05$ 。

荧光活性不受影响($P=0.308$),见表5。对照组、miR-NC组、miR-218-5p组、anti-miR-NC组及anti-miR-218-5p组细胞中JAG1蛋白相对表达量分别为 (0.45 ± 0.04) 、 (0.52 ± 0.05) 、 (0.21 ± 0.03) 、 (0.49 ± 0.04) 及 (0.84 ± 0.08) ($F=175.396$, $P<0.001$);与miR-NC组相比,miR-218-5p组JAG1蛋白相对表达显著降低($P<0.001$),与anti-miR-NC组相比,anti-miR-218-5p组JAG1蛋白相对表达显著升高($P<0.001$)。

WT-JAG1 3' UTR 5' auugugugaacuuggAAGCACAc 3'
miR-218-5p 3' uguaccaaucuagUUCGUGUu 5'
MUT-JAG1 3' UTR 5' auugugugaacuuggCCUAUGGc 3'

图3 Jagged-1(JAG1)的3'非翻译区(UTR)中含有与miR-218-5p互补的核苷酸序列

表5 双荧光素酶报告实验/ $\bar{x} \pm s$

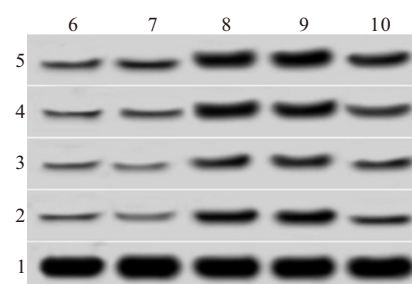
组别	重复次数	WT-JAG1	MUT-JAG1
对照组	9	1.00±0.09	1.00±0.10
miR-NC组	9	1.01±0.08	1.04±0.07
miR-218-5p组	9	0.36±0.04 ^①	1.00±0.09
<i>F</i> 值		232.602	0.626
<i>P</i> 值		<0.001	0.543

注:WT-JAG1和MUT-JAG1分别为JAG1野生型和突变型荧光素酶报告载体。

①与miR-NC组比较, $P<0.05$ 。

2.5 抑制JAG1表达逆转了抑制miR-218-5p表达对hPDLSCs活性骨向分化的作用 结果如图4和表6所示,与anti-miR-NC组相比,anti-miR-218-5p组hPDLSCs细胞中JAG1蛋白表达显著升高($P<0.001$),48、72 h时,活细胞数显著升高(均 $P<0.001$),Col-1、骨钙素、Runx-2的mRNA和蛋白的相对表达量均显著升高(均 $P<0.001$);与anti-miR-218-5p+si-NC组相比,anti-miR-218-5p+si-JAG1组hPDLSCs细胞中JAG1蛋白表达显著降低($P<0.001$),

48、72 h时,细胞增殖显著降低(均 $P<0.001$),Col-1、骨钙素、Runx-2的mRNA和蛋白的相对表达量均显著降低(均 $P<0.001$)。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—Runt相关转录因子2(Runx-2);3—骨钙素;4—I型胶原蛋白(Col-1);5—Jagged 1(JAG1)蛋白;6—对照组;7—anti-miR-NC组;8—anti-miR-218-5p组;9—anti-miR-218-5p+si-NC组;10—anti-miR-218-5p+si-JAG1组。

图4 蛋白质印迹法检测人牙周膜干细胞(hPDLSCs)JAG1、Col-1、OCN、Runx-2蛋白电泳图

3 讨论

miRNA在人类各种疾病的发生发展中均具有调节作用,其中包括牙周组织流失^[9-10]。Hao等^[11]使用微阵列分析成骨分化期间的miRNA表达谱发现,miR-218-5p是其中差异表达的miRNA之一。李建嘉等^[12]通过诱导hPDLSCs发生成骨分化,检测其中miR-218-5p及成骨相关基因的表达发现,诱导分化后miR-218-5p表达下调,miR-218-5p在hPDLSCs成骨分化过程中可能起负调控作用。最近Guo等^[13]在研究中发现,miR-218的过度表达可以抑制I型和IV型胶原蛋白和牙本质唾液蛋白(DSP)的降解,抑制破骨细胞的形成,并抑制促炎细胞因子的分泌,其机制与靶向基质金属蛋白酶9(MMP9)相关。Zhong等^[14]研究发现,LncRNA CCAT1通过负调控miR-218促进牙周膜细胞细胞增殖和分化。本研究运用MTT、qRT-PCR法检测了抑制miR-218-5p的

表6 抑制JAG1表达逆转了抑制miR-218-5p表达对人牙周膜干细胞(hPDLSCs)增殖骨向分化的作用/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	JAG1蛋白	细胞增殖(490 nm吸光度)			mRNA相对表达量			蛋白相对表达量		
			24 h	48 h	72 h	Col-1	骨钙素	Runx-2	Col-1	骨钙素	Runx-2
对照组	9	0.45±0.04	0.30±0.03	0.42±0.04	0.51±0.04	1.00±0.10	1.00±0.09	1.00±0.11	0.27±0.02	0.20±0.02	0.30±0.03
anti-miR-NC组	9	0.47±0.05	0.31±0.03	0.41±0.04	0.53±0.05	1.00±0.08	0.99±0.07	1.01±0.08	0.24±0.03	0.22±0.02	0.28±0.03
anti-miR-218-5p组	9	0.79±0.07 ^①	0.33±0.04	0.66±0.05 ^①	0.89±0.08 ^①	3.01±0.22 ^①	2.06±0.19 ^①	2.04±0.18 ^①	0.72±0.07 ^①	0.55±0.05 ^①	0.62±0.06 ^①
anti-miR-218-5p+si-NC组	9	0.81±0.08	0.34±0.03	0.65±0.06	0.86±0.07	3.03±0.25	2.08±0.21	2.03±0.16	0.74±0.07	0.57±0.06	0.63±0.06
anti-miR-218-5p+si-JAG1组	9	0.61±0.05 ^②	0.32±0.03	0.49±0.05 ^②	0.64±0.06 ^②	1.14±0.11 ^②	1.07±0.12 ^②	1.11±0.09 ^②	0.41±0.04 ^②	0.37±0.03 ^②	0.39±0.04 ^②
<i>F</i> 值		73.106	2.163	56.555	76.571	378.184	138.743	158.973	205.264	177.519	123.241
<i>P</i> 值		<0.001	0.091	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:JAG1为Jagged-1,Col-1为I型胶原蛋白,Runx-2为Runt相关转录因子2。

①与anti-miR-NC组比较, $P<0.05$ 。②与anti-miR-218-5p+si-NC组比较, $P<0.05$ 。

hPDLSCs 细胞的活性和成骨相关基因 Col-1、骨钙素、Runx-2 的表达发现,细胞活性显著增强,成骨相关基因 Col-1、骨钙素、Runx-2 的表达水平明显上调,说明抑制 miR-218-5p 具有促进 hPDLSCs 细胞成骨分化的功能,提示 miR-218-5p 具有促进人牙周膜干细胞分化的潜力。而 Guo 等^[13]在牙周炎的研究中支持过表达 miR-218 能够通过减轻牙周炎病人的骨吸收和炎症达到保护作用,这说明 miR-218-5p 在牙周膜干细胞中的功能与在牙周炎病人中的功能存在差异,但本课题组并没有在实验动物体内进行验证,这也为临床试验提供参考。深入研究,通过生物信息学、双荧光素酶报告基因检测实验验证 miR-218-5p 与 JAG1 存在靶向负调控的关系,这为 miR-218-5p 在成骨分化中的作用机制研究奠定基础。

JAG1 和 Notch1 是 Notch 信号通路的关键基因,该通路是细胞间发生作用的重要机制,近几年其在成骨分化中的功能成为研究的热点^[15-16]。袁萍等^[17]报道,在牙周炎病人牙周膜干细胞中 Notch 信号通路受到抑制,而在轻微牙周炎病人中,激活 Notch 信号通路有助于病人缺损牙槽骨的成骨分化。张文等^[18]研究发现,在 hPDLSCs 细胞不发生增殖的情况下,成骨相关基因及 Notch 信号通路的配体表达发生上调。最近,马玉等^[19]研究显示,在 PDLSCs 发生增殖时,成骨标志基因的表达量发生下调,Notch 信号通路相关分子 JAG1 发生下调,提示 Notch 信号通路可调控 PDLSCs 的骨向分化能力。本研究发现,过表达 JAG1 可增强细胞的活性,促进成骨相关基因 Col-1、骨钙素、Runx-2 的表达,可见,过表达 JAG1 具有促进 hPDLSCs 细胞发生骨向分化的功能,这与前人的激活 Notch 信号通路可治疗牙周炎牙槽缺损的实验结果相一致,这是首次在体外验证 Notch 信号通路关键基因 JAG1 具有促进 hPDLSCs 细胞骨向分化的功能。深入研究发现,抑制 JAG1 表达可逆转抑制 miR-218-5p 对 hPDLSCs 的活性和骨向分化作用。

综上所述,抑制 miR-218-5p 可促进人牙周膜干细胞发生成骨分化,其作用机制与靶向 JAG1 相关,为牙周膜干细胞用于治疗人牙周疾病奠定理论基础。

(本文图 1 见插图 12-3)

参考文献

- [1] RATNADIWAKARA M, MOHENSKA M, ĀNKÖ ML. Splicing factors as regulators of miRNA biogenesis - links to human disease [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 79(1): 113-122.
- [2] LUAN X, ZHOU X, NAQVI A, et al. MicroRNAs and immunity in periodontal health and disease [J]. *Int J Oral Sci*, 2018, 10(3): 24.

- [3] HE L, HUANG J, PERRIMON N. Development of an optimized synthetic Notch receptor as an in vivo cell-cell contact sensor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(21): 5467-5472.
- [4] ZHANG R, ENGLER A, TAYLOR V. Notch: an interactive player in neurogenesis and disease [J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 371(1): 73-89.
- [5] LEE SY, LONG F. Notch signaling suppresses glucose metabolism in mesenchymal progenitors to restrict osteoblast differentiation [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(12): 5573-5586.
- [6] DENES BJ, BOLTON C, ILLSLEY CS, et al. Notch signalling coordinates periodontal ligament maturation through regulating Lamin A [J]. *J Dent Res*, 2019, 98(12): 1357-1366.
- [7] 邱中彩, 龙晏, 陈晓燕, 等. 超表达 Notch 胞内结构域对人牙周膜干细胞增殖及成骨分化的影响 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2019, 54(5): 315-321.
- [8] GOEL PN, MOHARRER Y, HEBB JH, et al. Suppression of notch signaling in osteoclasts improves bone regeneration and healing [J]. *J Orthop Res*, 2019, 37(10): 2089-2103.
- [9] LIU Z, CHEN X, ZHANG Z, et al. Nanofibrous spongy microspheres to distinctly release miRNA and growth factors to enrich regulatory T cells and rescue periodontal bone loss [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(10): 9785-9799.
- [10] BOURBOUR S, BEHESHTI M, KAZEMIAN H, et al. Effects of micro RNAs and their targets in periodontal diseases [J]. *Infect Disord Drug Targets*, 2018, 18(3): 183-191.
- [11] HAO Y, GE Y, LI J, et al. Identification of microRNAs by microarray analysis and prediction of target genes involved in osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells [J]. *J Periodontol*, 2017, 88(10): 1105-1113.
- [12] 李建嘉, 葛逸弘, 房付春, 等. microRNA-218-5p 在人牙周膜干细胞成骨分化过程的表达研究 [G]// 中华口腔医学会老年口腔医学专业委员会. 第十三次全国老年口腔医学学术年会论文汇编. 武汉: 中华口腔医学会, 2018: 139-141.
- [13] GUO J, ZENG X, MIAO J, et al. MiRNA-218 regulates osteoclast differentiation and inflammation response in periodontitis rats through Mmp9 [J/OL]. *Cell Microbiol*, 2019, 21(4): e12979. DOI 10.1111/cmi.12979.
- [14] ZHONG YX, LI WS, LIAO LS, et al. LncRNA CCAT1 promotes cell proliferation and differentiation via negative modulation of miRNA-218 in human DPSCs [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(9): 3575-3583.
- [15] SEMENOVA D, BOGDANOVA M, KOSTINA A, et al. Dose-dependent mechanism of Notch action in promoting osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *Cell Tissue Res*, 2020, 379(1): 169-179.
- [16] VIJAYARAGHAVAN J, OSBORNE BA. Notch and T cell function - a complex tale [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1066(1): 339-354.
- [17] 袁萍, 李淑慧, 于莉, 等. Notch 信号通路相关分子在牙周膜干细胞中的表达及意义 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2016, 32(3): 149-153.
- [18] 张文, 方明, 鲍东昱, 等. DAPT 对牙周膜干细胞体外增殖及成骨分化的影响 [J]. *口腔生物医学*, 2018, 9(1): 7-11.
- [19] 马玉, 李淑慧, 丁欣欣, 等. 肿瘤坏死因子- α 对牙周膜干细胞骨向分化及 Notch 信号通路的影响 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2018, 36(2): 184-189.

(收稿日期: 2019-11-20, 修回日期: 2020-01-02)