doi:10.11659/jjssx.03E024103

·基础研究·

miR-1260b通过靶向ATF6β调控牙周膜干细胞成骨分化的作用研究

柳 强[1],刘亚辉[2],李立坤[3],郭建茹[1] (1.唐山职业技术学院附属医院口腔牙周科,河北 唐山 063000;2.唐山职业技术学院附属医院检验科,河北 唐山 063000;3.唐山职业技术学院附属医院病理科,河北 唐山 063000)

[摘 要] **目的** 探究miR-1260b靶向活化转录因子6β(ATF6β)在人牙周膜干细胞(hPDLSCs)成骨分化中的作用。**方法** 从牙周炎患者拔除的第三磨牙上刮取牙周膜组织,并分离培养hPDLSCs。使用流式细胞术检测CD34、CD45、CD29、CD90、CD105阳性细胞的比例,免疫荧光染色检测vimentin和pan-cytokeratin表达。采用双荧光素酶报告基因实验分析miR-1260b mimic+WT/MUT组(转染miR-1260b mimic和ATF6β-WT/MUT)、mimic-NC组(转染miR-NC和ATF6β-WT/MUT)中ATF6β-WT和ATF6β-MUT的细胞荧光素酶活性。另外将细胞分为miR-1260b mimic组(单独转染miR-1260b mimic)、ATF6β-OE组(单独转染ATF6β过表达载体)、联合组(同时转染miR-1260b mimic和ATF6β过表达载体)及NC组(转染空载体)。对NC组、miR-1260b mimic组、ATF6β-OE组、联合组hPDLSCs进行茜素红S及碱性磷酸酶染色,同时采用qRT-PCR检测各组细胞miR-1260b、ATF6β、Runt相关转录因子2(Runx2)、骨钙素(OCN)、骨桥蛋白(OPN)的mRNA表达水平。采用Western blot检测各组细胞葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、C/EBP同源蛋白(CHOP)、蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)蛋白表达。**结果** 流式细胞术检测显示,分离培养的细胞表面CD29、CD90、CD105呈阳性,CD34、CD45呈阴性;免疫荧光染色显示,细胞vimentin呈阳性,pan-cytokeratin呈阴性,符合hPDLSCs的特征。荧光素酶检测显示,miR-1260b mimic能显著降低ATF6β-WT的荧光素酶活性($P<0.05$),而对ATF6β-MUT荧光素酶活性无明显影响($P>0.05$)。茜素红S染色显示,hPDLSCs培养3 d、5 d、7 d染色逐渐加深,提示成骨分化能力增强;随着hPDLSCs成骨分化能力增强,细胞内miR-1260b表达呈逐渐升高趋势,而ATF6β的mRNA及蛋白表达水平则呈逐渐下降趋势($P<0.05$)。茜素红S染色和碱性磷酸酶染色结果显示,miR-1260b mimic组细胞的阳性面积占比高于NC组($P<0.05$),ATF6β-OE组和联合组细胞的阳性面积占比则低于NC组($P<0.05$)。miR-1260b mimic组细胞ATF6β mRNA及蛋白水平低于NC组($P<0.05$),ATF6β-OE组和联合组细胞ATF6β mRNA及蛋白水平高于NC组($P<0.05$)。miR-1260b mimic组细胞Runx2、OCN、OPN的mRNA水平显著高于NC组($P<0.05$);ATF6β-OE组和联合组细胞Runx2、OCN、OPN的mRNA水平显著低于NC组($P<0.05$)。miR-1260b mimic组细胞GRP78、CHOP、PERK蛋白表达水平显著低于NC组($P<0.05$);ATF6β-OE组和联合组细胞GRP78、CHOP、PERK蛋白表达水平显著高于NC组($P<0.05$)。**结论** miR-1260b可通过靶向ATF6β抑制hPDLSCs内质网应激水平,促进hPDLSCs成骨分化。

[关键词] miR-1260b;活化转录因子6β;人牙周膜干细胞;成骨分化;内质网应激

[中图分类号] R781.4 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-03-20

miR-1260b regulates osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells by targeting ATF6β

LIU Qiang[1], LIU Ya-hui[2], LI Li-kun[3], GUO Jian-ru[1] (1. Department of Oral Periodontology, Affiliated Hospital of Tangshan Vocational and Technical College, Tangshan Hebei 063000, China; 2. Laboratory Department, Affiliated Hospital of Tangshan Vocational and Technical College, Tangshan Hebei 063000, China; 3. Pathology Department, Affiliated Hospital of Tangshan Vocational and Technical College, Tangshan Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To explore the role of miR-1260b targeting activating transcription factor 6β (ATF6β) in osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs). **Methods** The periodontal ligament tissue was scraped from the third molar extracted from the patient with periodontitis, and hPDLSCs were isolated and cultured. The proportions of positive cells of CD34, CD45, CD29, CD90 and CD105 were detected by flow cytometry, and the expression of vimentin and pan-cytokeratin were detected by immunofluorescence staining. The cellular luciferase activities of ATF6β-WT and ATF6β-MUT in the miR-1260b mimic+WT/MUT group (transfected with miR-1260b mimic and ATF6β-WT/MUT) and the mimic-NC group (transfected with miR-NC and ATF6β-WT/MUT) were analyzed by the dual luciferase reporter gene assay. In addition, the cells were divided into the miR-1260b mimic group (transfected with miR-1260b mimic alone), the ATF6β-OE group (transfected with the ATF6β overexpression vector alone), the combined group (transfected with miR-1260b mimic and ATF6β overexpression vector simultaneously), and the NC group (transfected with empty vector). Alizarin red S staining and alkaline phosphatase staining were performed on hPDLSCs in the NC group, the miR-1260b mimic group, the ATF6β-OE group

[基金项目] 河北省医学科学研究课题(20211544)

[通信作者] 柳 强,E-mail:lqwy1662024@126.com

and the combined group. Meanwhile, the mRNA expression levels of miR-1260b, ATF6β, Runt-related transcription factor 2 (Runx2), osteocalcin (OCN), and osteopontin (OPN) in each group of cells were detected by qRT-PCR. The protein expressions of glucose-regulated protein 78 (GRP78), C/EBP homologous protein (CHOP), and protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in each group of cells were detected by Western blot. **Results** The flow cytometry detection showed that CD29, CD90 and CD105 on the surface of the isolated and cultured cells were positive, while CD34 and CD45 were negative. Immunofluorescence staining showed that vimentin in the cells was positive and pan-cytokeratin was negative, which was in line with the characteristics of hPDLSCs. Luciferase assay showed that miR-1260b mimic could significantly reduce the luciferase activity of ATF6β-WT (P<0.05), but had no significant effect on the luciferase activity of ATF6β-MUT (P>0.05). After alizarin red S staining, the staining of hPDLSCs gradually deepened after 3 days, 5 days and 7 days of culture, suggesting an enhanced osteogenic differentiation ability. With the enhancement of osteogenic differentiation ability of hPDLSCs, the expression of miR-1260b in the cells showed a gradually increasing trend, while the mRNA and protein expression levels of ATF6β showed a gradually decreasing trend (P<0.05). The results of alizarin red S staining and alkaline phosphatase staining showed that the proportions of positive area in the miR-1260b mimic group were higher than those in the NC group (P<0.05), while the proportions of positive area in the ATF6β-OE group and the combined group were lower than those in the NC group (P<0.05). The mRNA and protein levels of ATF6β in the miR-1260b mimic group were lower than those in the NC group (P<0.05), while the mRNA and protein levels of ATF6β in the ATF6β-OE group and the combined group were higher than those in the NC group (P<0.05). The mRNA levels of Runx2, OCN and OPN in the miR-1260b mimic group were significantly higher than those in the NC group (P<0.05). The mRNA levels of Runx2, OCN and OPN in the ATF6β-OE group and the combined group were significantly lower than those in the NC group (P<0.05). The protein expression levels of GRP78, CHOP and PERK in the miR-1260b mimic group were significantly lower than those in the NC group (P<0.05). The protein expression levels of GRP78, CHOP and PERK in the ATF6β-OE group and the combined group were significantly higher than those in the NC group (P<0.05). **Conclusion** miR-1260b can inhibit endoplasmic reticulum stress level and promote osteogenic differentiation of hPDLSCs by targeting ATF6β.

Keywords: miR-1260b; activating transcription factor 6β; human periodontal ligament stem cells; osteogenic differentiation; endoplasmic reticulum stress

牙周炎主要是由局部因素引起的牙周支持组织慢性炎症，早期多因无明显自觉症状而易被忽视，待有症状时已较严重，甚至已不能保留牙齿[1]。牙周炎最理想的治疗方法是促使牙周组织再生，即通过外科或者组织工程方法使已被破坏的牙周组织再生[2]。但目前对于牙周炎的临床治疗仅能阻止炎症的进展，不能促进已被破坏的牙周组织再生。人牙周膜干细胞（human periodontal ligament stem cells，hPDLSCs）是位于牙周组织中的一群未分化的、具有自我更新和克隆形成特性的成体干细胞。研究显示，hPDLSCs不仅能促进牙槽骨组织再生和修复，同时还能调节牙周组织分化，其成骨分化能力直接决定牙槽骨修复及牙周稳态的维持情况，是牙周组织再生和骨质缺损修复的重要种子细胞[3-4]。但目前hPDLSCs成骨分化的分子机制仍未完全明确，值得深入研究。miRNA是一种短的（20~25个核苷酸）小RNA序列，可通过与靶mRNA结合，促进其降解或抑制其转录与翻译，降低靶基因蛋白水平，继而调控相关生物过程[5]。miRNA可调控多种生物学行为，如生物体发育进程、干细胞分化、细胞凋亡、疾病及肿瘤发生等，近年来受到广泛重视[6]。miR-1260b作为miRNA中的一员，可通过介导活化转录因子6β（activating transcription factor 6β，ATF6β）调控骨肉瘤细胞成骨分化[7]。由于骨肉瘤细胞与hPDLSCs均来源于间充质干细胞谱系，共享部分成骨分化调控通路，因此，我们推测miR-1260b介导ATF6β极有可能也是调控hPDLSCs成骨分化的主要机制之一。本研究通过体外分离培养hPDLSCs，探究miR-1260b对其成骨分化的调控作用，现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

α-MEM培养基、青霉素-链霉素、胎牛血清购自美国ThermoFisher公司；TRIzol试剂、反转录试剂盒、SYBR Green PCR master mix购自北京天根生化公司；碱性磷酸酶检测试剂盒、茜素红S染色试剂盒、RIPA裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司；pan-cytokeratin抗体、vimentin抗体、ATF6β抗体、葡萄糖调节蛋白78（glucose regulated protein 78kD，GRP78）抗体、C/EBP同源蛋白（C/EBP homologous protein，CHOP）抗体、蛋白激酶RNA样ER激酶（protein kinase RNA-like ER kinase，PERK）抗体、GAPDH抗体及HRP标记二抗购自英国Abcam公司；质粒载体由北京博恒科创生物科技有限公司制备。

1.2 hPDLSCs分离及鉴定

收集于本院接受拔牙治疗的青年牙周炎患者拔除的第三磨牙，在超净台内使用无菌PBS充分清洗牙

根表面,并用手术刀片轻轻刮取牙根中1/3牙周膜组织,将分离出的牙周膜组织放入1.5 mL离心管,加入500 μL的Ⅰ型胶原酶(4 mg/L),37 ℃下消化45 min,加入完全培养基(含10%胎牛血清的α-MEM)终止消化,以1 000 r/min离心5 min,重悬后将悬液接种于6孔板中,于细胞培养箱内培养,待细胞密度达到80%~90%时,采用有限稀释法挑选单克隆细胞,并接种于96孔板,扩大培养。取第2代hPDLSCs,消化并调整细胞浓度为1×10^7/mL,加入BV-421CD34、FITC-CD45、PE-CD29、PerCP-CD90、APC-CD105和同型对照抗体,室温孵育30 min,然后使用流式细胞术检测CD34、CD45、CD29、CD90、CD105阳性细胞的比例。另取第2代hPDLSCs,PBS冲洗3次,4%多聚甲醛固定20 min,移除固定液,PBS冲洗3次,加入1 mL 1%的Triton X-100溶液10 min,随后PBS冲洗3次,采用5%牛血清白蛋白封闭30 min,然后按1∶500加入抗pan-cytokeratin、抗vimentin抗体,4 ℃下孵育12 h,PBS冲洗3次,加入FITC标记二抗,荧光显微镜下拍照。

1.3 荧光素酶活性检测

hPDLSCs用含100 g/L胎牛血清的DMEM高糖培养液于37 ℃、5%CO_2、饱和湿度条件下培养并传代,取对数生长期细胞进行实验。查找ATF6β基因序列并通过PCR进行扩增,将扩增产物插入荧光素酶报告载体pGL3,构建野生型ATF6β载体(ATF6β-WT),同时对ATF6β序列中与miR-1260b结合的位点进行TCGCA到ATCGG的点突变,构建突变型ATF6β载体(ATF6β-MUT),按照操作说明使用lipofectamine TM 3000将以上质粒与miR-1260b mimic或mimic-NC共转染hPDLSCs 48 h,分别设为miR-1260b mimic+WT/MUT组(miR-1260b mimic+ATF6β-WT/MUT)、mimic-NC组(miR-NC+ATF6β-WT/MUT),利用双荧光素酶报告基因试剂盒检测miR-1260b mimic+WT/MUT组、mimic-NC组中ATF6β-WT和ATF6β-MUT的细胞荧光素酶活性,实验重复3次。

1.4 细胞转染与分组

将hPDLSCs接种至6孔板中培养,然后分为miR-1260b mimic组(单独转染miR-1260b mimic)、ATF6β-OE组(单独转染ATF6β过表达载体)、联合组(同时转染miR-1260b mimic和ATF6β过表达载体)及NC组(转染空载体)。培养1周后,收集各组细胞进行后续实验。

1.5 细胞染色

取各组分别培养3 d、5 d、7 d的细胞,弃培养基后,用PBS清洗3次,然后加入1 mL的4%多聚甲醛室温固定30 min,移除固定液,加洗涤液500 μL清洗2次;加入现配的碱性磷酸酶染色液、茜素红S染色反应工作液500 μL,37 ℃染色30 min,加入洗涤液500 μL清洗2次,显微镜下观察细胞染色情况并拍照。

1.6 qRT-PCR

收集各组细胞,采用TRIzol法提取hPDLSCs中RNA,然后反转录获得cDNA,采用qRT-PCR检测hPDLSCs中miR-1260b、ATF6β、Runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2,Runx2)、骨钙素(osteocalcin,OCN)、骨桥蛋白(osteopontin,OPN)的mRNA表达水平,目的基因表达用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算,其中miR-1260b以U6作为内参,ATF6β、Runx2、OCN、OPN以GAPDH为内参。引物名称及序列见表1。

表1 引物名称及序列

引物名称	引物序列
miR-1260b	正向:5′-CGGAGCCAAGATTTGATCGA-3′
	反向:5′-GTGCGCCTGATAAGTAGCAA-3′
ATF6β	正向:5′-ATGCACCTGCAGAGGTATAG-3′
	反向:5′-AGAGGAGGTTCGCAACTCTA-3′
Runx2	正向:5′-TCGAGAATGCCATGGTACGA-3′
	反向:5′-CCATAGTGGCTAAGCTAGGA-3′
OCN	正向:5′-TGGTCACGAGGAGATAACCT-3′
	反向:5′-GTCAGCTTAAGGCATAGGCA-3′
OPN	正向:5′-GGAGTGACCATATATAGCGC-3′
	反向:5′-GTAGAGGTACCAATGCATCG-3′
GAPDH	正向:5′-AGGTAGCCGAATGACCGTTA-3′
	反向:5′-GAATTGAGTCCCTGGACAGA-3′
U6	正向:5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′
	反向:5′-AACGCTTCACGAATTTG-3′

1.7 Western blot

取各组细胞,弃培养基,用PBS清洗3次,然后加入1 mL RIPA裂解液,冰上裂解10 min后4 ℃下以2 500 r/min离心5 min,取上清液;上清液中加入上样缓冲液;SDS-PAGE凝胶电泳、转膜,转印蛋白的膜用5%脱脂奶粉37 ℃封闭2 h后,加入兔抗人ATF6β、GRP78、CHOP、PERK、GAPDH抗体4 ℃孵育12 h,然后使用HRP标记的二抗37 ℃孵育1 h,最后加入ECL发光液曝光。用Quantity One软件分析蛋白条带灰度值,以GAPDH作为内参。

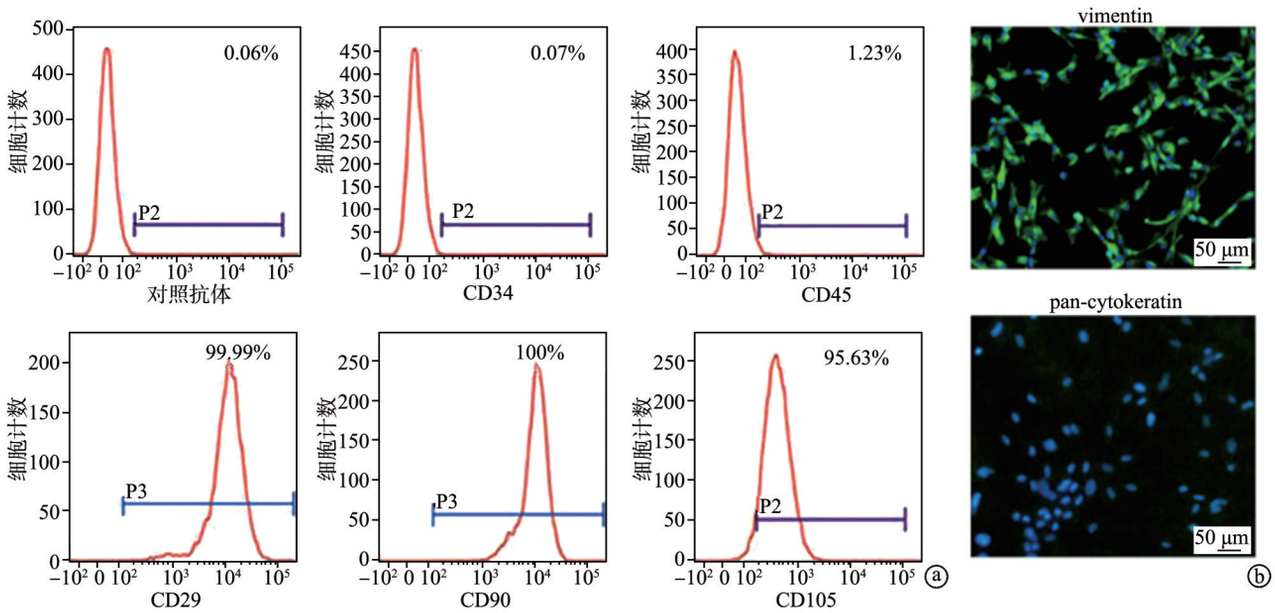
1.8 统计学处理

数据采用GraphPad 8.0软件进行统计学分析,计量资料先进行正态检验,符合正态分布的数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用*LSD-t*检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hPDLSCs鉴定

流式细胞术检测发现，分离培养的细胞表面CD29、CD90、CD105呈阳性，CD34、CD45呈阴性；免疫荧光染色显示，细胞vimentin呈阳性，pan-cytokeratin呈阴性（图1），符合hPDLSCs特征。



a：流式细胞术检测，b：免疫荧光染色

图1 hPDLSCs的鉴定

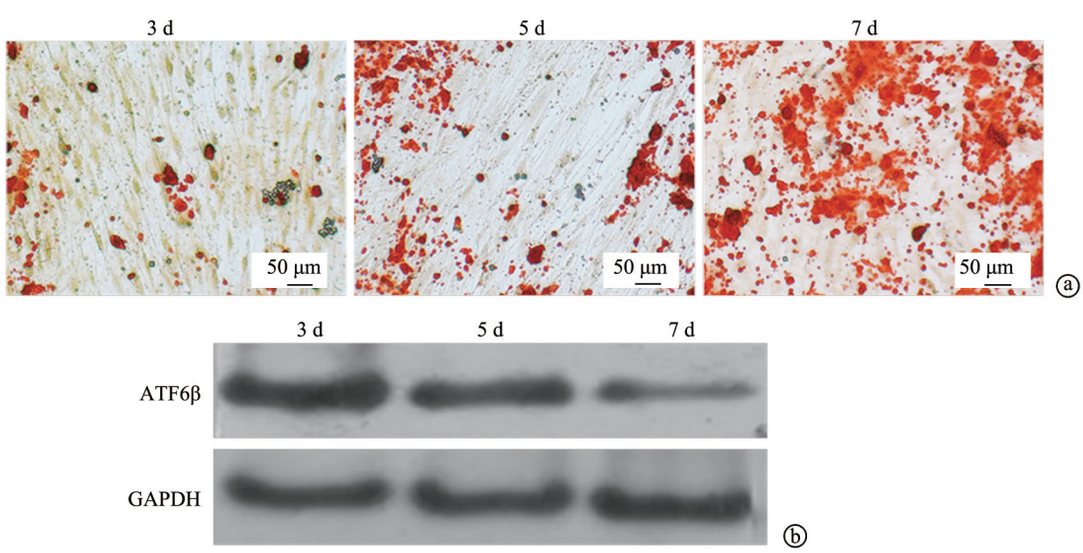
2.2 不同培养时间hPDLSCs中miR-1260b和ATF6β水平变化

茜素红S染色显示，hPDLSCs培养3 d、5 d、7 d染色逐渐加深，提示成骨分化能力增强；qRT-PCR及Western blot结果显示，随着hPDLSCs成骨分化能力增强，细胞内miR-1260b表达呈逐渐升高趋势，而ATF6β的mRNA及蛋白表达水平则呈逐渐下降趋势，差异均有统计学意义（$P<0.05$），见图2、表2。

表2 不同培养时间hPDLSCs中miR-1260b、ATF6β mRNA及蛋白水平变化（$\bar{x}\pm s$）

培养时间	miR-1260b	ATF6β mRNA	ATF6β蛋白
3 d	1.02±0.05	1.04±0.08	1.78±0.23
5 d	5.49±0.68**	0.71±0.11**	1.15±0.15**
7 d	10.79±2.13**##	0.38±0.08**##	0.46±0.10**##
F	21.835	26.770	30.732
P	<0.001	<0.001	<0.001

**：与培养3 d相比，$P<0.01$；##：与培养5 d相比，$P<0.01$



a：茜素红S染色图；b：Western blot检测蛋白条带图

图2 不同培养时间hPDLSCs的成骨分化水平及细胞中ATF6β表达

2.3　各组细胞相对荧光素酶活性比较

荧光素酶检测发现，与mimic-NC组相比，miR-1260b mimic能够显著降低ATF6β-WT荧光素酶活性（$P<0.05$），而对ATF6β-MUT荧光素酶活性无明显影响（$P>0.05$），见表3。

2.4　各组hPDLSCs茜素红S及碱性磷酸酶染色结果比较

miR-1260b mimic组细胞茜素红S染色和碱性磷酸酶染色的阳性面积占比均高于NC组（$P<0.05$），ATF6β-OE组和联合组细胞茜素红S染色和碱性磷酸酶染色的阳性面积占比则均低于NC组（$P<0.05$），见图3、表4。

表3　各组相对荧光素酶活性比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	ATF6β-WT	ATF6β-MUT
mimic-NC组	0.96±0.12	0.99±0.13
miR-1260b mimic+WT/MUT组	0.61±0.11**	1.03±0.12

**：与mimic-NC组相比，$P<0.01$

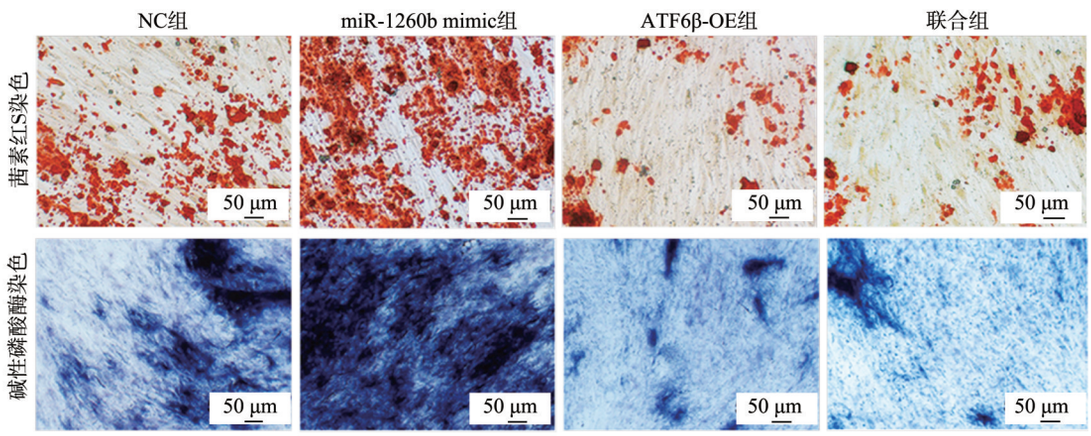


图3　各组细胞茜素红S染色和碱性磷酸酶染色图

表4　茜素红S染色和碱性磷酸酶染色细胞阳性面积占比（$\bar{x}\pm s$，%）

组别	茜素红S染色	碱性磷酸酶染色
NC组	34.67±5.79	38.69±6.99
miR-1260b mimic组	65.73±7.50**	88.91±12.62**
ATF6β-OE组	12.82±1.87**	12.92±1.92**
联合组	11.56±1.63**	11.17±1.70**
F	35.703	29.893
P	<0.001	<0.001

**：与NC组相比，$P<0.01$

2.5　各组hPDLSCs中ATF6β mRNA及蛋白水平变化

Western blot结果显示，与NC组相比，miR-1260b mimic组细胞ATF6β mRNA及蛋白水平均显著下调（$P<0.05$），ATF6β-OE组和联合组细胞ATF6β mRNA及蛋白水平均显著上调（$P<0.05$），见图4、表5。

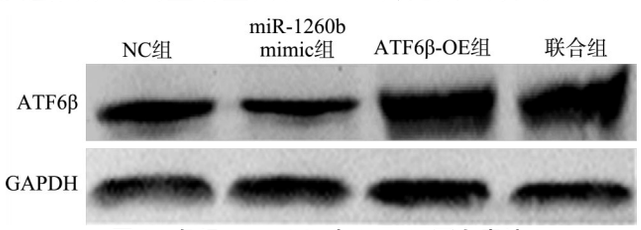


图4　各组hPDLSCs中ATF6β蛋白表达

2.6　各组hPDLSCs中Runx2、OCN、OPN的mRNA水平比较

miR-1260b mimic组细胞Runx2、OCN、OPN的mRNA水平显著高于NC组（$P<0.05$）；ATF6β-OE组和联合组细胞Runx2、OCN、OPN的mRNA水平显著低于NC组（$P<0.05$），见表6。

表5　各组hPDLSCs中ATF6β mRNA及蛋白水平变化（$\bar{x}\pm s$）

组别	ATF6β mRNA	ATF6β蛋白
NC组	1.02±0.06	1.32±0.16
miR-1260b mimic组	0.65±0.10**	0.75±0.09**
ATF6β-OE组	1.79±0.36**	3.31±0.67**
联合组	1.81±0.39**	3.25±0.61**
F	15.609	17.810
P	<0.001	<0.001

**：与NC组相比，$P<0.01$

表6　各组hPDLSCs中Runx2、OCN、OPN mRNA表达（$\bar{x}\pm s$）

组别	Runx2	OCN	OPN
NC组	1.03±0.08	1.02±0.07	0.99±0.06
miR-1260b mimic组	7.80±0.77**	5.38±0.56**	8.11±0.93**
ATF6β-OE组	0.73±0.13**	0.69±0.09**	0.76±0.08**
联合组	0.75±0.15**	0.74±0.12**	0.70±0.11**
F	24.703	21.092	25.825
P	<0.001	<0.001	<0.001

**：与NC组相比，$P<0.01$

2.7　各组hPDLSCs中GRP78、CHOP、PERK蛋白水平比较

Western blot检测结果显示，miR-1260b mimic组细胞GRP78、CHOP、PERK蛋白表达水平显著低于NC组（$P<0.05$）；ATF6β-OE组和联合组细胞GRP78、CHOP、PERK蛋白表达水平显著高于NC组（$P<0.05$），见图5、表7。

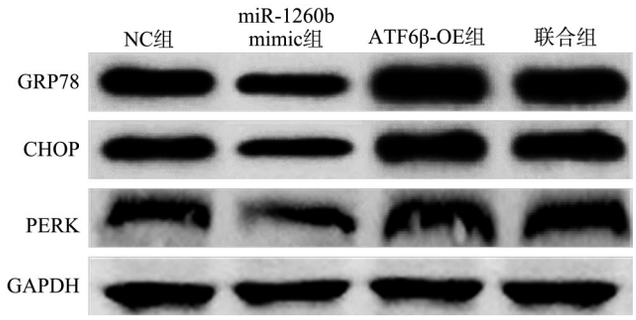


图5 各组hPDLSCs中相关蛋白水平变化

表7 各组hPDLSCs中GRP78、CHOP、PERK蛋白表达($\bar{x}\pm s$)

组别	GRP78	CHOP	PERK
NC组	1.26±0.13	0.89±0.08	0.92±0.10
miR-1260b mimic组	0.88±0.08**	0.58±0.05**	0.46±0.04**
ATF6β-OE组	3.12±0.49**	1.89±0.19**	1.77±0.26**
联合组	3.03±0.57**	1.73±0.15**	1.69±0.25**
F	21.937	17.365	18.640
P	<0.001	<0.001	<0.001

**:与NC组相比,P<0.01

3 讨论

牙周炎是一种破坏性的牙周炎症性疾病,其病理特征是牙周组织炎症、牙周袋形成、牙槽骨吸收和进行性附着丧失。研究表明,牙周炎多由宿主对病原微生物及其毒性产物产生过度炎症反应,进一步导致牙周组织破坏所引起[2]。对于牙周组织被破坏的患者,牙周治疗的首要目标是通过促进病变组织的修复与再生来恢复其原有的形态、结构和功能。尽管临床对牙周炎的发生发展进行了广泛的研究,但目前牙周炎的发病机制仍未明确。hPDLSCs是存在于牙周膜中的一种未分化的间充质干细胞,具有向成骨细胞或成牙骨质细胞分化的潜能。有研究显示,hPDLSCs可以在体内形成牙骨质-牙周膜-牙槽骨样结构,从而构建新的牙周组织结构,重建牙周附着[8]。因此,对于因创伤或牙周病引起牙周损伤的患者,hPDLSCs有望成为细胞疗法的理想候选细胞。

越来越多的证据表明,miRNA可以通过转录后机制调节干细胞的分化潜能。目前,miRNA已被发现参与调控多种细胞的成骨分化和骨形成[9-10]。miR-1260b作为miRNA中的一员,能够促进骨肉瘤细胞成骨分化[7]。本研究双荧光素酶报告实验进一步发现,转染miR-1260b mimic后ATF6β-WT荧光素酶活性低于mimic-NC组,而转染mimic-NC后ATF6β-MUT荧光素酶活性与mimic-NC组比较无统计学差异。这提示miR-1260b可靶向调节ATF6β表达,即ATF6β是miR-1260b的直接靶分子,二者之间存在靶向作用,miR-1260b通过种子序列与ATF6β mRNA的3′非翻译区结合,抑制翻译或促进降解,调控其蛋白表达。本研究显示,随着hPDLSCs成骨分化能力的增强,miR-1260b的表达呈逐渐升高趋势,而ATF6β的mRNA及蛋白表达水平则呈逐渐下降趋势,提示miR-1260b/ATF6β可能参与调控hPDLSCs的成骨分化。

以往研究证实,Runx2、OCN、OPN是hPDLSCs成骨分化的标志蛋白,参与hPDLSCs的成骨分化[11]。本研究qRT-PCR检测显示,miR-1260b mimic组细胞Runx2、OCN、OPN的mRNA水平显著高于NC组;ATF6β-OE组和联合组细胞Runx2、OCN、OPN的mRNA水平显著低于NC组,这提示miR-1260b表达会促进hPDLSCs的Runx2、OCN、OPN表达,而过表达ATF6β会使Runx2、OCN、OPN表达下调,同时过表达miR-1260b和ATF6β则可在一定程度上逆转miR-1260b对Runx2、OCN、OPN表达的促进作用。上述结果表明,miR-1260b可通过靶向抑制ATF6β表达,促进hPDLSCs的成骨分化。

有研究显示,内质网应激被证实对hPDLSCs的成骨分化过程有着明显影响,抑制内质网应激能够促进hPDLSCs的成骨分化[12]。ATF6β是内质网未折叠蛋白反应(unfolded protein response,UPR)中关键的应激蛋白,当其受到压力时会被切割为具有转录因子活性的蛋白,并从高尔基体膜转位至细胞核中,激活靶基因的表达,参与调控内质网应激反应,维持细胞内蛋白质稳态[13]。作为内质网应激通路的关键转录因子,ATF6β可激活UPR中下游基因(如CHOP)来诱导细胞凋亡或抑制分化,从而抑制hPDLSCs的成骨分化。在内质网应激的初始阶段,UPR被激活。GRP78作为UPR的主要调节因子,在细胞应激状态下被激活。GRP78是位于内质网的伴侣蛋白,是评估内质网应激是否被诱导的经典分子标志物之一。当UPR累积时,GRP78从跨膜蛋白中解离,通过二聚化被激活,引发下游通路蛋白反应,启动内质网应激信号转导通路。PERK与GRP78解离后最先被激活[14-15]。PERK是一种丝氨酸苏氨酸激酶,从GRP78解聚后通过自身磷酸化和二聚化被激活。PERK的激活导致eIF2α的α亚基的磷酸化,磷酸化的eIF2α会驱动应激蛋白CHOP的转录,增强各种蛋白编码基因的表达和蛋白合成[16]。CHOP的表达在诱导细胞转化中具有重要意义。因此,GRP78、CHOP、PERK均为内质网应激相关蛋白,其表达越高,提示hPDLSCs内质网应激水平越高。本研究结果显示,miR-1260b mimic组细胞GRP78、CHOP、PERK蛋白表达显著低于NC组;ATF6β-OE组和联合组细胞GRP78、CHOP、PERK蛋白表达显著高

于NC组。上述结果提示,miR-1260b可通过靶向抑制ATF6β表达,下调GRP78、CHOP、PERK表达,进而抑制内质网应激,为hPDLSCs成骨分化创造有利条件,也说明了内质网应激引起的细胞凋亡及自噬是影响hPDLSCs成骨分化的关键,miR-1260b高表达有利于抑制ATF6β对促凋亡通路的激活,同时打破ATF6β诱发的"内质网-成骨抑制"恶性循环,为成骨分化提供更稳定的微环境[16]。研究认为,外泌体miRNA可通过影响骨髓间充质干细胞、成骨细胞、破骨细胞的生物学活性,参与骨代谢、血管生成过程来调控骨质疏松症患者的骨代谢[17]。miR-1260b也被证实可通过负调控ATF6β来抑制内质网应激,促进老年骨质疏松患者的成骨分化,改善成骨与破骨细胞平衡,减少骨流失[18]。由此可见,基于miR-1260b靶点的研究不仅有助于口腔疾病的治疗,也可使老年骨质疏松患者受益。

综上所述,miR-1260b可通过靶向ATF6β抑制hPDLSCs的内质网应激水平,促进hPDLSCs成骨分化。

[参考文献]

[1] Kwon TH, Lamster IB, Levin L. Current concepts in the management of periodontitis[J]. Int Dent J, 2021, 71(6): 462-476. doi: 10.1111/idj.12630.

[2] Orlandi M, Munoz Aguilera E, Marletta D, et al. Impact of the treatment of periodontitis on systemic health and quality of life: a systematic review[J]. J Clin Periodontol, 2022, 49(24): 314-327. doi: 10.1111/jcpe.13554.

[3] Di Vito A, Bria J, Antonelli A, et al. A review of novel strategies for human periodontal ligament stem cell ex vivo expansion: are they an evidence-based promise for regenerative periodontal therapy?[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(9): 7798-7806. doi: 10.3390/ijms24097798.

[4] Magalhaes FD, Sarra G, Carvalho GL, et al. Dental tissue-derived stem cell sheet biotechnology for periodontal tissue regeneration: a systematic review[J]. Arch Oral Biol, 2021, 129(1): 105182. doi: 10.1016/j.archoralbio.2021.105182.

[5] Diener C, Keller A, Meese E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic[J]. Trends Genet, 2022, 38(6): 613-626. doi: 10.1016/j.tig.2022.02.006.

[6] Shang R, Lee S, Senavirathne G, et al. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation[J]. Nat Rev Genet, 2023, 24(12): 816-833. doi: 10.1038/s41576-023-00611-y.

[7] Li J, Xu K, Cui Y, et al. ECM1-associated miR-1260b promotes osteogenic differentiation by targeting GDI1[J]. Acta Histochemica, 2024, 126(1): 152133-152136. doi: 10.1016/j.acthis.2024.152133.

[8] Li P, Ou Q, Shi S, et al. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells/dental stem cells and their therapeutic applications[J]. Cell Mol Immunol, 2023, 20(6): 558-569. doi: 10.1038/s41423-023-00998-y.

[9] Iaquinta MR, Lanzillotti C, Mazziotta C, et al. The role of microRNAs in the osteogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and bone pathologies[J]. Theranostics, 2021, 11(13): 6573-6591. doi: 10.7150/thno.55664.

[10] Zhu Z, Xiong J. miR-141-3p regulates EZH2 to attenuate porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-caused inflammation and inhibition of osteogenic differentiation in human periodontal ligament stem cells[J]. Comput Math Methods Med, 2022, 25(28): 4634925. doi: 10.1155/2022/4634925.

[11] Gupta A, Singh S. Potential role of growth factors controlled release in achieving enhanced neuronal trans-differentiation from mesenchymal stem cells for neural tissue repair and regeneration[J]. Mol Neurobiol, 2022, 59(2): 983-1001. doi: 10.1007/s12035-021-02646-w.

[12] Huang W, Gong Y, Yan L. ER stress, the unfolded protein response and osteoclastogenesis: a review[J]. Biomolecules, 2023, 13(7): 1050. doi: 10.3390/biom13071050.

[13] Jiang J, Zhang N, Song H, et al. Oridonin alleviates the inhibitory effect of lipopolysaccharide on the proliferation and osteogenic potential of periodontal ligament stem cells by inhibiting endoplasmic reticulum stress and NF-κB/NLRP3 inflammasome signaling[J]. BMC Oral Health, 2023, 23(1): 1-11. doi: 10.1186/s12903-023-02827-0.

[14] Wu T, Jiang Y, Shi W, et al. Endoplasmic reticulum stress: a novel targeted approach to repair bone defects by regulating osteogenesis and angiogenesis[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 480-486. doi: 10.1186/s12967-023-04328-8.

[15] Chen X, Shi C, He M, et al. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 352-361. doi: 10.1038/s41392-023-01570-w.

[16] Marciniak SJ, Chambers JE, Ron D. Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress in disease[J]. Nat Rev Drug Discov, 2022, 21(2): 115-140. doi: 10.1038/s41573-021-00320-3.

[17] Bhattarai KR, Riaz TA, Kim HR, et al. The aftermath of the interplay between the endoplasmic reticulum stress response and redox signaling[J]. Exp Mol Med, 2021, 53(2): 151-167. doi: 10.1038/s12276-021-00560-8.

[18] Hayashi C, Fukuda T, Kawakami K, et al. miR-1260b inhibits periodontal bone loss by targeting ATF6β mediated regulation of ER stress[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 30(10): 1061216. doi: 10.3389/fcell.2022.1061216.

(编辑:魏 源)