论著

文章编号:1000-5404(2011)11-1132-04

人牙髓细胞中差异表达 miRNA 的筛选及靶基因预测

杨明聪[1],向学熔[1],范小平[2] (400015 重庆,重庆医科大学附属口腔医院:牙周黏膜科[1],正畸科[2])

【摘要】 **目的** 筛选人牙髓细胞(human dental pulp cells,HDPCs)在未分化状态及在矿化诱导液中差异表达的miRNA并预测其靶基因。**方法** 体外分离培养临床就诊患者来源的人牙髓细胞并鉴定后,分别在普通培养基和矿化诱导培养基中培养,用矿化诱导液诱导细胞向成牙本质细胞方向分化,对细胞结节形成情况进行观察并用 Vonkossa 染色确定 HDPCs 分化情况。取培养21 d的细胞用miRNA芯片检测差异表达的miRNA,并通过miRGen数据库预测其靶基因,通过GO和KEGG Pathway进行靶基因功能富积分析。**结果** 矿化诱导的HDPCs较未诱导的HDPCs,有72种miRNA发生1.5倍以上表达上调,61种miRNA发生1.5倍以上表达下调。通过miRNA靶标预测工具分析发现,带有靶标基因的miRNA有35个,35个miRNA的靶标基因总和1 327个,miRNA和靶标基因关系对总共2158个。**结论** 成功筛选出HDPCs miRNAs表达谱,预测到部分靶基因。

【关键词】 miRNAs;牙髓细胞;微阵列分析;靶基因预测
【中图法分类号】 R781.3;R318.04;R394.2 【文献标志码】 A

Screening differential expression microRNAs and forecasting target genes in human dental pulp cells during *in vitro* mineralization

Yang Mingcong[1], Xiang Xuerong[1], Fan Xiaoping[2] ([1]Department of Paradental Mucosal Diseases, [2]Department of Orthodontics, Affiliated Stomatology Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400015, China)

【**Abstract**】 **Objective** To screen the differential expression microRNAs in human dental pulp cells under the undifferentiation condition and in the mineralization induction fluid, and forecast target genes. **Methods** After human dental pulp cells were isolated from outpatients and then identified, these cells were separately cultured in the ordinary culture medium or the mineralization induction culture medium. The formation of cellular nodules were observed, and the cell differentiation was observed by Vonkossa staining. The differential expression of microRNA was detected by microRNA chip, and target genes were forecast by miRGen database. Functional rich products of these target genes were assayed by GO and KEGG Pathway. **Results** Compared with the human dental pulp cells cultured in the ordinary culture medium, there were 72 microRNAs expressing over 1.5-fold up-regulated and 61 microRNAs expressing over 1.5-fold down-regulated in the mineralization induction culture medium. There were 35 miRNAs with target genes by microRNA target forecast tool analysis. The total target genes of 35 miRNAs was 1 327, and the total relations of miRNA and target gene were 2 158. **Conclusion** We screen miRNAs signature of human dental pulp cells and forecast some target genes.

【**Key words**】 miRNAs;dental pulp cells;micro array analysis;target gene forecast

Supported by the Science Foundation of Chongqing Municipal Health Bureau (2008-2-253). Corresponding author: Fan Xiaoping, Tel: 86-23-88860029; E-mail: cqzxfxp@sina.com

牙髓组织是疏松的结缔组织,具有形成牙本质感觉、营养和防御的功能。牙髓组织中含有多种细胞成分,包括成纤维细胞、组织细胞及未分化的间充质细胞,体内实验表明,当成熟的恒牙牙髓受到损伤后,间充质细胞可以分化为成牙本质细胞并分泌牙本质。最近的体外研究发现,人牙髓细胞经诱导可以形成牙髓-牙本质样复合体[1-2],认为人牙髓中具有自我更新和多向分化能力的细胞。而对于牙髓干细胞的自我更新和分化的机制的研究过去主要集中在基因和转录因子等方面,目前越来越多的证据表明,miRNAs对于干细胞的自我更新和多向分化的调控有着非常重要的作

【基金项目】 重庆市卫生局科研基金(2008-2-253)
【通信作者】 范小平,电话:(023)88860029,E-mail:cqzxfxp@sina.com

用[3]。在干细胞的分化潜能方面，miRNAs 下调细胞内维持干细胞未分化状态的某些基因，同时激活干细胞谱系特异性基因，促进干细胞的定向分化[4-6]。同时，对于不同类别的干细胞，参与调控自我更新和多向分化的 miRNAs 也不尽相同。目前在胚胎类干细胞、造血干细胞、骨髓间充质干细胞及其分化细胞中相关 miRNAs 的研究已经较多，但在牙髓细胞中的研究报道甚少。

芯片技术的发展使 miRNA 基因组研究成为可能，包含所有已知哺乳动物 miRNA 序列的基因芯片随着 miRNA 数据库的不断扩展而发展[7]，本实验利用 miRNA 基因芯片技术，检测了人牙髓细胞及其诱导分化的成牙本质细胞中 miRNAs 的表达谱，分析并筛选在 HDPCs 分化过程中差异表达的 miRNA，并通过 miRGen 数据库预测其靶基因，为进一步探讨 miRNAs 对 HDPCs 生物学功能的调控作用提供了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 实验牙髓细胞取自重庆医科大学附属口腔医院颌面外科门诊，女性，平均 15 岁，2010 年 1 月至 3 月期间因正畸治疗需要拔除的健康、完整和无龋坏的牙齿 20 颗。

1.1.2 主要试剂 Ⅰ型胶原酶、DMEM/F12、优等胎牛血清(Fetal bovine serum，FBS)及青霉素、链霉素、胰蛋白酶/细胞Ⅰ型胶原、波形蛋白(vimentin)抗体(Sigma，USA)。Trizol：Invitrogen 公司产品。RNeasy mini kit 购自 QIAGEN。芯片由威斯腾生物技术服务中心研制。

1.2 方法

1.2.1 人牙髓细胞的体外培养和分离鉴定 用组织块法行 HDPCs 的原代培养，原代培养后每 24 小时镜下观察组织块周围细胞生长情况，当细胞达到 80% 融合后，胰酶消化，1∶1传代，取第 4 代对数生长期 HDPCs，用 SABC 法检测细胞Ⅰ型胶原、波形蛋白(vimentin)的表达，鉴定细胞来源后，用矿化诱导液诱导细胞向成牙本质细胞方向分化，对细胞结节形成情况进行观察并用 Vonkossa 染色确定 HDPCs 分化情况。

1.2.2 利用基因芯片进行牙髓细胞 miRNAs 表达谱分析 取在普通培养基和矿化培养基中培养 21 d 的细胞，细胞数在 1×10^6 ~ 1×10^7，PBS 清洗细胞，吸干 PBS 后用 TRIzol 试剂及 RNeasy mini kit 抽提 RNA。应用 miRCURY™ Hy3™/Hy5™标记试剂盒标记 miRNA，得到用于与芯片杂交的探针。将标记好的探针与芯片杂交，杂交后将芯片从杂交袋中取出，用 Wash buffer kit 洗片。使用 Axon GenePix 4000B 芯片扫描仪扫描芯片的荧光强度。

1.2.3 差异 miRNA 靶基因的预测及功能富积分析 使用来自 miRNA 靶标基因数据库 miRGen 3.0[8]。此数据库集成 PicTar、miRanda、DIANA-microT 和 TargetScanS 4 个流行的 miRNA 靶标预测工具得到最完备的 miRNA 的靶标基因。解析该数据库得到 miRNA 与带有 HUGO 基因术语的基因靶标关系对[9]。构建人所有的 miRNA 和它们调控的靶标基因的网络。为了减少假阳性，取 4 个流行的miRNA 靶标预测工具中的任意 3 个有交集的确定是 miRNA 和基因存在靶标关系。针对每个 GO 和 KEGG Pathway 计算 35 个 miRNA 靶标基因在该功能集中的数目，以及 136 个 miRNA 靶标基因在该功能集中的总数，形成四格子表，计算富积得分，该富积得分就是比值比(Odd Ratio)，利用超几何模型检验计算统计上显著性程度 P 值，通过 BH(Benjamini，Hochberg)方法纠正 P 值来降低假阳性。

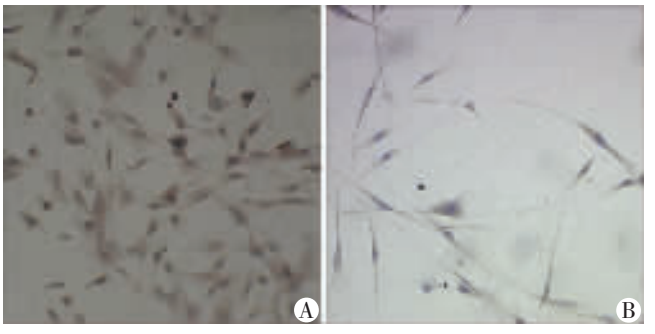
1.3 图像处理及统计学方法

对芯片图像进行分析，把图像信号转化为数字信号。将各个 miRNA 的原始值减去背景后的数值除以各张芯片的中位数做标准化得到的数值叫标准值，选取一批次实验中在每张芯片上修正值都≥50 的非 control 探针做标准化，以这部分探针中值(median)作为标准化因子对整张芯片的点做标准化处理，即各个 miRNA 修正值/median = Normalized Data(标准值)。应用 SPSS 11.0 软件，采用两样本 t 检验分析。

2 结果

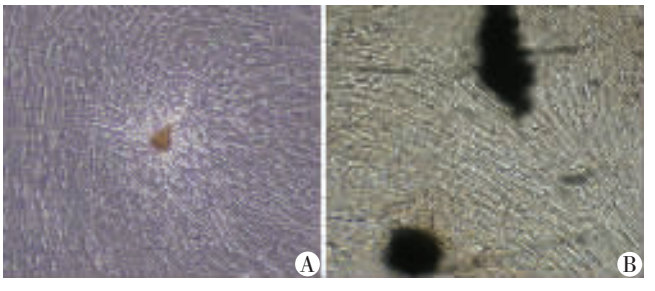
2.1 人牙髓细胞鉴定及诱导分化结果

用酶消化法培养单个离散的牙髓细胞，接种第 2 天后细胞贴壁生长，3 d 完全换液，弃去悬浮未贴壁细胞，相差显微镜下观察贴壁细胞为长梭形的成纤维样细胞，其中少数几个细胞增殖迅速，培养 14 d 左右形成细胞克隆，呈巢式或集落状生长，SABC 法细胞免疫化学染色显示胞质中细胞Ⅰ型胶原、波形蛋白呈阳性表达(图 1)。矿化诱导 1 周后部分细胞出现细长单极细胞质突起，3 周时细胞呈复层生长，倒置显微镜下观察见有矿化结节形成，Vonkossa 染色阳性(图 2)。



A：HDPCs Ⅰ型胶原；B：HDPCs 波形蛋白

图 1 HDPCs 细胞爬片阳性染色细胞形态学观察 (SABC ×100)



A：镜下所见矿化结节；B：Vonkossa 染色

图 2 HDPCs 矿化诱导 21d 后形态学观察 (倒置显微镜 ×100)

2.2 RNA提取及质量鉴定结果

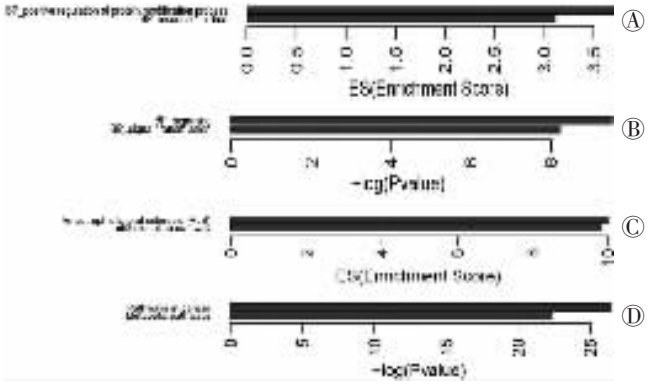
Trizol一步法提取细胞中的总RNA，通过异丙醇沉淀法浓缩RNA，用分光光度计定量，样品总RNA的$D(260)/D(280)$值在1.8~2.0之间。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳结果显示条带清晰，28S:18S RNA条带亮度接近2:1，RNA完好无降解，质量符合miRNAs芯片的质量要求。

2.3 未分化和分化牙髓细胞差异表达miRNAs芯片数据分析

2个样品中的人牙髓细胞及其诱导分化的成牙本质细胞进行了两张单通道miRNA检测，芯片结果显示：分化为牙本质细胞组较牙髓细胞组相比，miRNAs差异表达显著。有96种miRNA发生1.5倍以上表达上调(Fold Change上调≥1.50，$P<0.05$)，71种miRNA发生1.5倍以上表达下调(Fold Change下调≥1.50，$P<0.05$)(包括hsa-miRPlus，sv40-miR和hsv1-miR标记的miRNA)。具有统计学差异显著性的167种miRNA中，has-miRPlus属于尚未被miRBase数据库所记录，暂不列入研究范围；另外SV40-miR及hsv1-miR为病毒性miRNA也不列入研究范围。根据数据中上下调1.5倍筛选得到上调72个，下调61个，总共133个，可获得相应基因列表进行后续研究。

2.4 差异表达miRNA靶基因的预测及功能富积分析结果

通过miRNA靶标预测工具分析牙髓细胞组和矿化诱导成牙本质细胞组133个表达有显著性差异的miRNA，发现带有靶标基因的miRNA有35个，35个miRNA的靶标基因总和1327个，miRNA和靶标基因关系对总共2158个，针对每个GO和KEGG Pathway计算35个miRNA靶标基因在该功能集中的数目，得到差异miRNA的靶标基因体现的功能，主要集中在信号转导，细胞增殖，转录调控等方面(图3)。



A：miRNAs GO富积得分分析；B：miRNAs GO的-log10Pvalue得分分析；C：miRNAs KEGG Pathway富积得分分析；D：miRNAs KEGG Pathway的-log10Pvalue得分分析

图3 HDPCs中差异表达miRNA靶标基因功能富积分析

3 讨论

一直以来牙髓修复、牙再生等就是口腔医学领域迫切需要解决的问题，成牙本质细胞是牙齿的特异性细胞，是一种终末分化细胞，适宜做牙髓修复及牙再生的种子细胞，牙髓细胞经诱导可向成牙本质细胞分化并形成牙本质样结构，预示了其在牙本质再生中作为种子细胞的应用前景[10]。

而随着人类基因组计划的完成，RNA在生物体内的功能及在生命进程中所扮演的角色越来越受到人们的重视，大量的研究亦表明miRNAs可能成为细胞维持、增殖、分化、凋亡等现象的新的内源性转录后调控途径[11]。目前检测miRNAs的方法包括Northern blot法、实时荧光定量PCR(Real-time PCR)法及芯片技术，而芯片技术由于其高通量和并行处理的特点在基因信息分析中占据重要地位。Krichevsky等[12]利用基因芯片研究了脑发育过程中miRNA的情况，发现9个miRNA在脑发育过程中差异明显，即miR-131、miR-124a、miR-128、miR-19b、miR-29、miR-178、miR-125b、miR-103、miR-26b，并用Northern blotting进一步做了验证；Ahmed等[13]利用基因芯片技术筛选出人骨髓间充质干细胞和诱导分化的成骨细胞中表达的差异性miRNAs，其中高表达的4个，低表达的8个，并对其中两个差异基因has-miR-30a-5p和hsa-miR-210进行了验证；可以看出miRNA基因芯片是一种快速有效检测miRNA表达谱的方法。

随着对各种细胞中大量的miRNA基因以及其在细胞发育分化中的差异表达的研究进展，人们认为在细胞不同的发育分化阶段都可能存在特异的miRNA的表达，它们对细胞的分化起着重要的调控作用[14]。但对于微小RNA在牙髓细胞及牙髓细胞分化和调控的作用尚少见报道。作为机体内源性RNA，miRNA很可能在牙髓细胞及牙髓细胞的生长分化中起到重要的调控作用。因此，阐明miRNA与牙髓细胞自我更新和多向分化的联系，将有助于揭示牙髓细胞发育分化的基因调控机制，为牙髓细胞的应用研究提供新的理论依据。

本实验采用组织块法，成功分离培养出HDPCs[15]，并采用SABC法鉴定细胞来源，同时本实验所选用的矿化诱导液是研究体外培养中细胞矿化常用的一种培养液，用于骨和牙本质等矿化组织的诱导形成。目前最常用的矿化液是含一定比例的地塞米松、维生素C、β-甘油磷酸钠的培养液[16]。Couble[17]证实，在β-甘油磷酸钠的作用下，体外培养的牙髓细胞可分化为成牙本质细胞。我们观察到牙髓细胞早矿化诱导液作用下，部分细胞一侧细胞质突起伸长，呈现牙本质样细胞形态改变。随着诱导时间的延长，细胞失去接触抑制，

呈现复层生长,具有矿化趋势,形成细胞结节并钙化,这说明牙髓细胞在矿化诱导液的作用下,具有向成牙本质方向分化的可能。

Gronthos 等[1]认为牙髓细胞分化为成牙本质细胞与骨髓基质细胞分化为成骨细胞的生物学途径相似。有研究表明,利用基因芯片筛选骨髓基质干细胞及其诱导分化细胞的差异 miRNAs 是可行的[18]。故本研究利用 miRNA 芯片检测牙髓细胞及其诱导分化为成牙本质细胞中差异 miRNAs,也是可行的,同时对于探明 miRNA 在牙髓细胞向成牙本质细胞方向分化的作用,建立了一条简便快捷的技术路线。本研究发现诱导形成的牙本质细胞较未诱导的 HDPCs,72 种 microRNA 发生 1.5 倍以上表达上调,61 种 microRNA 发生 1.5 倍以上表达下调。诱导分化的牙本质细胞和牙髓细胞中 miRNAs 表达差异显著。随后采用 miRGen 基因靶标数据库初步预测差异表达的 miRNA 靶基因,通过 miRNA 靶标预测工具分析发现,带有靶标基因的 miRNA 有 35 个,35 个 miRNA 的靶标基因总和 1327 个,miRNA 和靶标基因关系对总共 2158 个。靶标基因功能富积分析结果提示,差异 miRNA 的靶标基因多参与信号转导,细胞增殖,转录调控等方面,从而参与牙髓细胞的发育,并形成 miRNAs 基因网络,在牙髓细胞发育进程中起协同或提起拮抗的作用。同时本实验亦表明 miRNA 广泛表达于人牙髓细胞中,并且在人牙髓细胞向成牙本质细胞的诱导分化后发生了表达谱的改变,如 has-miR-620、hsa-miR-150 等在诱导分化后的成牙本质细胞中高表达,而 has-miR-374a 和 has-miR-Plus-E1258 等在诱导分化后的成牙本质细胞中低表达,这说明 miRNAs 可能在牙髓细胞的成牙本质分化过程中起着一定的调控作用。

虽然研究表明利用基因芯片筛选人牙髓细胞及其诱导分化成牙本质细胞的差异 miRNAs 是可行的,但是由于芯片检测存在一定的假阳性率,不稳定性及可重复性较差等缺点,针对芯片所得结果应通过其他方法如实时荧光定量 PCR 或 Northern blot 来加以验证。同时研究 miRNAs 在牙髓细胞分化潜能中的调控机制,是在建立了牙髓细胞相关 miRNA 表达谱后急需解决的工作。因此通过芯片初步筛选牙髓细胞及其诱导分化细胞中的 miRNAs 表达情况,为探讨 miRNAs 参与人牙髓细胞生物学特性的调控提供了实验依据,同时为进一步探讨其调控人牙髓细胞定向分化的机制奠定了基础,但对筛选出的差异 miRNAs 进行验证和功能学的研究则有待进一步的深入探讨。

参考文献:

[1] Gronthos S, Brahim J, Li W, *et al*. Stem cell properties of human dental pulp stem cells[J]. J Dent Res, 2002, 81(8):531-535.
[2] 侯延华,谭颖徽,姚韶武,等. 人牙髓干细胞体外二维和三维培养的实验研究[J]. 第三军医大学学报,2006,28(9):949-951.
[3] 谭彬,何俊琳,刘学庆,等. 自然流产模型小鼠子宫蜕膜组织 miRNAs 的表达[J]. 第三军医大学学报,2010,32(15):1663-1666.
[4] Bagga S, Bracht J, Hunter S, *et al*. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation[J]. Cell, 2005, 122(4):553-563.
[5] Zhang B, Pan X, Anderson T A. MicroRNA:a new player in stem cells[J]. J Cell Physiol, 2006, 209(2):266-269.
[6] Houbaviy H B, Murray M F, Sharp P A. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs[J]. Dev Cell, 2003, 5(2):351-358.
[7] Ishii H, Saito T. Radiation-induced response of micro RNA expression in murine embryonic stem cells[J]. Med Chem, 2006, 2(6):555-563.
[8] Barad O, Meiri E, Avniel A, *et al*. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays:system establishment and expression profiling in human tissues[J]. Genome Res, 2004, 14(12):2486-2494.
[9] Alexiou P, Vergoulis T, Gleditzsch M, *et al*. miRGen 2.0:a database of microRNA genomic information and regulation[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38 :D137-D141.
[10] 王雪飞,张纲,裘松波,等. 构建 siRNA 慢病毒载体调控人牙髓干细胞 Delta1 表达的实验研究[J]. 第三军医大学学报,2010,32(1):30-32.
[11] Eyre T A, Ducluzeau F, Sneddon T P, *et al*. The HUGO Gene Nomenclature Database, 2006 updates[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34:D319-D321.
[12] Krichevsky A M. MicroRNA profiling:from dark matter to white matter, or identifying new players in neurobiology[J]. ScientificWorldJournal, 2007, 7:155-166.
[13] Ahmed F E. Role of miRNA in carcinogenesis and biomarker selection:a methodological view[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2007, 7(5):569-603.
[14] Suh M R, Lee Y, Kim J Y, *et al*. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs [J]. Dev Biol, 2004, 270(2):488-498.
[15] Coppe C, Zhang Y, Den-Besten P K. Characterization of primary dental pulp cells in vitro[J]. Pediatr Dent, 2009, 31(7):467-471.
[16] 胡静,谭颖徽,何飞,等. IGF-1、bFGF 对人牙髓干细胞的体外诱导分化的影响[J]. 第三军医大学学报,2006,28(8):778-780.
[17] Durand S H, Romeas A, Couble M L, *et al*. Expression of the TGF-beta/BMP inhibitor EVI1 in human dental pulp cells[J]. Arch Oral Biol, 2007, 52(8):712-719.
[18] Arthur A, Shi S, Zannettino A C, *et al*. Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance[J]. Stem Cells, 2009, 27(9):2229-2237.

(收稿 2010-10-27 修回 2010-12-02)
(编辑 栾 嘉)