doi:10.11659/jjssx.03E023057

·基础研究·

circRNA_079813抑制牙髓细胞损伤的机制研究

周 洋,张 悦,刘 景 (新疆医科大学第五附属医院口腔科,新疆 乌鲁木齐 830011)

[摘 要] **目的** 探讨circRNA_079813对脂多糖(LPS)诱导的人牙髓细胞(hDPCs)损伤的作用和机制。**方法** 原代分离培养脱落乳牙牙髓细胞,用免疫荧光化学法鉴定原代分离培养的hDPCs。将培养的hDPCs分为vector组、过表达circRNA_079813的重组载体组(circRNA_079813组)、腺相关病毒(AAV)空载体组(AAV-Null组)、Smad1过表达重组AAV载体组(AAV-Smad1组)、小干扰RNA(siRNA)沉默Smad1的重组载体组(si-Smad1组)以及siRNA阴性对照组(si-NC组)。另外,将hDPCs分为空白对照组(Control组)、LPS组、LPS+vector组、LPS+circRNA_079813组、LPS+circRNA_079813+si-NC组、LPS+circRNA_079813+si-Smad1组。采用CCK-8法和流式细胞术分别检测hDPCs的增殖活力和凋亡水平。ELISA法检测白细胞介素(IL)-1β和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平。检测碱性磷酸酶(ALP)活性、ALP蛋白表达水平以及茜素红S(ARS)染色程度以评估成骨分化能力。Western blot检测runt相关转录因子2(RUNX2)以及Smad1的蛋白水平。**结果** 在LPS诱导的hDPCs中过表达circRNA_079813可增加hDPCs的增殖活性,提高成骨分化能力,抑制hDPCs的凋亡和炎症反应,提高Smad1和RUNX2的蛋白表达,差异均有统计学意义($P<0.05$)。在LPS基础上过表达Smad1与过表达circRNA_079813对hDPCs的影响一致($P<0.05$),而沉默Smad1逆转了过表达circRNA_079813的上述效果($P<0.05$)。**结论** 过表达circRNA_079813通过Smad/RUNX2信号通路改善LPS诱导的hDPCs损伤。

[关键词] circRNA_079813;人牙髓细胞;成骨分化;细胞凋亡;Smad/RUNX2信号通路
[中图分类号] R781.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2023-03-10

Mechanism of circRNA_079813 inhibiting dental pulp cells injury

ZHOU Yang, ZHANG Yue, LIU Jing (Department of Stomatology, Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830011, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of circRNA_079813 on lipopolysaccharide (LPS)-induced injury of human dental pulp cells (hDPCs). **Methods** Primary pulp cells of deciduous teeth were isolated and cultured, and the hDPCs were identified by immunofluorescence chemistry. The cultured hDPCs were divided into the vector group, the overexpressed circRNA_079813 recombinant

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2021D01C431)
[通信作者] 刘 景,E-mail:8200119@qq.com

[14] Luo Y, Liu L, Li X, et al. Avasimibe inhibits the proliferation, migration and invasion of glioma cells by suppressing linc00339 [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 130(1): 1-11. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110508.
[15] Chen K, Zhang L. LINC00339 regulates ROCK1 by miR-152 to promote cell proliferation and migration in hepatocellular carcinoma[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(9): 14431-14443. doi: 10.1002/jcb.28701.
[16] Zhou RS, Zhang EX, Sun QF, et al. Integrated analysis of lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA network in squamous cell carcinoma of tongue [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 779-789. doi: 10.1186/s12885-019-5983-8.
[17] Wu J, Huang H, Huang W, et al. Analysis of exosomal lncRNA, miRNA and mRNA expression profiles and ceRNA network construction in endometriosis[J]. Epigenomics, 2020, 12(14): 1193-1213. doi:10.2217/epi-2020-0084.
[18] Matsuzaki S, Gremeau AS, Pouly JL. Impaired pathogen-induced autophagy and increased IL-1β and TNFα release in response to pathogenic triggers in secretory phase endometrial stromal cells of endometriosis patients[J]. Reprod Biomed Online, 2020, 41(5): 767-781. doi:10.1016/j.rbmo.2020.06.011.
[19] Wu RF, Yang HM, Zhou WD, et al. Effect of interleukin-1β and lipoxin A4 in human endometriotic stromal cells: proteomic analysis [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2017, 43(2): 308-319. doi: 10.1111/jog.13201.
[20] Kang AR, Cho JH, Lee NG, et al. Radiation-induced IL-1β expression and secretion promote cancer cell migration/invasion via activation of the NF-κB-RIP1 pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 534(1):973-979. doi:10.1016/j.bbrc.2020.10.057.

(编辑:贺绍梅)

vector group (the circRNA_079813 group), the adeno-associated virus (AAV) empty vector group (the AAV-Null group), the Smad1-overexpressed recombinant AAV vector group (the AAV-Smad1 group) and the small interference RNA (siRNA) silencing Smad1 recombinant vector group (the si-Smad1 group) and the siRNA negative control group (the si-NC group). In addition, hDPCs were divided into the blank control group (the Control group), the LPS group, the LPS+vector group, the LPS+circRNA_079813 group, the LPS+circRNA_079813+si-NC group, and the LPS+circRNA_079813+si-Smad1 group. CCK-8 method and flow cytometry were used to detect the proliferative activity and apoptosis level of hDPCs. ELISA was used to detect the levels of interleukin (IL)-1β, tumor necrosis factor-α (TNF-α). Alkaline phosphatase (ALP) activity, ALP protein expression level, and alizarin red S (ARS) staining degree were detected to evaluate the osteogenic differentiation ability. The protein levels of runt-associated transcription factor 2 (RUNX2) and Smad1 were detected by Western blot. **Results** Overexpression of circRNA_079813 in LPS-induced hDPCs might increase the proliferative activity of hDPCs, improve the osteogenic differentiation ability, inhibit the apoptosis and inflammation response of hDPCs, and increase the protein expression of Smad1 and RUNX2, with statistically significant differences ($P<0.05$). Overexpression of Smad1 on the basis of LPS had the same effect on hDPCs as overexpression of circRNA_079813 ($P<0.05$), while silencing Smad1 reversed the above effect of overexpression of circRNA_079813 ($P<0.05$). **Conclusion** Overexpression of circRNA_079813 improves LPS-induced hDPCs injury through the Smad/RUNX2 signaling pathway.

Keywords: circRNA_079813; human dental pulp cells; osteogenic differentiation; cell apoptosis; Smad/RUNX2 signaling pathway

牙髓炎是一种由共生口腔微生物的机会性感染引起的疾病,可导致患牙缺失,降低患者的生活质量,其发病机制目前尚不清楚[1-2]。研究表明,改善人牙髓细胞(human dental pulp cells,hDPCs)的炎症损伤并激活成骨分化是治疗牙髓炎的关键[3],但是目前仍缺乏改善hDPCs炎症损伤并促进成骨分化的分子靶标。

环状RNA(circular RNA,circRNA)是一种无5′端帽子和3′端多聚腺苷酸尾巴的内源性非编码RNA,稳定性高[4]。circRNA与细胞凋亡、代谢和炎症密切相关,能诱导runt相关转录因子2(runt-associated transcription factor 2, RUNX2)的表达或激活Smad1信号,从而促进成骨过程[5-8]。circRNA_079813是新发现的circRNA,其在成骨诱导的条件下表达下调[9],推测其可能参与了成骨分化,但是目前仍缺乏circRNA_079813的研究报道。因此,本研究检测circRNA_079813在内毒素脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导hDPCs损伤中的表达,并基于Smad/RUNX2信号通路探讨circRNA_079813调控hDPCs损伤的作用,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 hDPCs的分离培养与处理

牙髓组织分离自1名接受正畸治疗志愿者的健康第三磨牙(志愿者本人和家属均知情同意)。分离牙髓组织并用PBS冲洗,用2 mg/mL胶原酶和0.25%胰蛋白酶消化30 min。将悬液离心(4 ℃,1 200 r/min,5 min)后,收集hDPCs。本研究通过我院医学伦理委员会的审查(20210325-08)。

hDPCs在37 ℃、含5%CO_2及10%胎牛血清的α-MEM中培养14 d。并以1×10^{10}/L的细胞浓度培养48 h后,在倒置显微镜下进行拍照观察,随后用免疫荧光化学法检测表面标志物骨钙蛋白的表达:将hDPCs单细胞悬液接种于有盖玻片的培养皿中,培养48 h后取细胞爬片。4%多聚甲醛室温固定后用PBS洗涤,加入兔抗人骨钙蛋白抗体(1:400),37 ℃孵育60 min,用PBS洗涤,加入生物素化山羊抗兔IgG,37 ℃孵育30 min,PBS洗涤后,再加入异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC),37 ℃孵育30 min后避光封片,并用荧光显微镜进行拍照观察。

将hDPCs分为Control组和LPS组。LPS组在体外模拟牙髓炎的炎症状态,即在含100 ng/mL LPS(美国Sigma-Aldrich公司)的α-MEM中培养hDPCs 24 h。Control组hDPCs进行常规培养且不进行任何处理。当LPS诱导hDPCs中促炎性细胞因子的表达显著性增加且上调程度不低于1倍,则认为体外牙髓炎的炎症状态模拟成功。

1.2 hDPCs的转染和分组

首先,将hDPCs分为vector组、circRNA_079813组、si-Smad1组、si-NC组、AAV-Smad1组、AAV-Null组、LPS+circRNA_079813组、LPS+vector组、LPS+circRNA_079813+si-Smad1组、LPS+circRNA_079813+si-NC组。vector组按照说明书将空载体vector转染至hDPCs。circRNA_079813组将过表达circRNA_079813的pcDNA3.1重组载体转染至hDPCs。si-Smad1组hDPCs转染沉默Smad1的小干扰RNA(small interference RNA,siRNA)。si-NC组hDPCs转染siRNA的阴性对照(si-NC)。AAV-Smad1组和AAV-Null组分别将针对Smad1过表达的腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)重组载体(AAV-Smad1)和AAV-

Smad1的阴性对照(AAV-Null)转染至hDPCs。以上载体均购自上海吉玛公司。LPS+circRNA_079813组将过表达circRNA_079813的pcDNA3.1重组载体转染至hDPCs,并联合100 ng/mL LPS孵育hDPCs。LPS+ vector组将空载体vector转染至hDPCs,并联合100 ng/mL LPS孵育hDPCs。LPS+circRNA_079813+si-Smad1组将过表达circRNA_079813的pcDNA3.1重组载体和沉默Smad1的siRNA(si-Smad1)共同转染至hDPCs,并联合100 ng/mL LPS孵育hDPCs。LPS+circRNA_079813+si-NC组将过表达circRNA_079813的pcDNA3.1重组载体和si-NC共同转染至hDPCs,并联合100 ng/mL LPS孵育hDPCs。各组细胞均孵育24 h。

1.3 qPCR检测circRNA_079813的表达

使用PARIS™Kit(美国Invitrogen公司)从hDPCs的细胞核和细胞质中分离RNA。总RNA用TRIzol试剂(美国Invitrogen公司)分离,NanoDrop ND-1000定量。RNase R(3 U/μg, Geneseed)用3 μg总RNA在37 ℃下处理30 min。使用反转录系统试剂盒(日本Takara公司)将总RNA逆转录为互补DNA,随后使用SYBR预混剂ExTaq(日本Takara公司)进行qPCR分析。GAPDH作为内参,基因的相对表达量用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法测定。引物序列(5′-3′):circRNA_079813正向GCATTATCCGGAGAACCAAA,反向TGGGGCTTTCTTCATTGTTC;GAPDH正向AGAAGGCTGGGGCTCATTTG,反向AGGGGCCATCCACAGTCTTC。

1.4 CCK-8法检测细胞增殖活性

将hDPCs接种于96孔板(5×10^3个/孔)过夜,用10 μL CCK-8溶液(北京Solarbio公司)在37 ℃下反应2 h。随后用酶标仪测定450 nm处的吸光度。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡情况

用PBS重悬各组hDPCs至1×10^6/mL。将5 μL FITC和5 μL碘化丙啶(美国BestBio公司)作为染色工作液,在避光条件下将1 mL细胞悬液与染色工作液孵育15 min,并在1 h内利用流式细胞仪(美国Applied Biosystems公司)进行凋亡分析。

1.6 Western blot检测Bcl-2、C-caspase3、Bax、RUNX2、Smad1和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的表达

用RIPA缓冲液(上海Beyotime公司)裂解hDPCs,提取总蛋白,随后使用双胞二酸法定量总蛋白的浓度。取40 μg蛋白的样品,使用SDS-PAGE凝胶分离蛋白,并用湿转法将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜(美国Millipore公司)上;在膜上加入5%脱脂牛奶密封1 h;在4 ℃下将膜与一抗孵育24 h。一抗包括Bcl-2(1∶1 200)、C-caspase3(1∶500)、Bax(1∶200)、RUNX2(1∶1 000)、Smad1(1∶500)和ALP(1∶1 000)。将膜与HRP偶联的山羊抗兔IgG (1∶2 000)孵育1 h。应用ECL试剂显示蛋白条带,并使用ImageJ软件分析每个条带的灰度值。

1.7 ELISA检测白细胞介素(interleukin, IL)-1β和肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)水平

从各组hDPCs中收集细胞培养物的上清液样本。按照ELISA试剂盒(美国Abcam公司)说明书,将20 μL细胞上清液与50 μL抗体在37 ℃下孵育2 h。通过计算450 nm和570 nm处的吸光度,从而确定IL-1β和TNF-α的水平。

1.8 ALP染色检测ALP活性

将hDPCs在含有成骨培养基的12孔板中培养2周。用4%多聚甲醛固定10 min,然后使用NBT/BCIP染色试剂盒(美国Cwbiotech公司)进行ALP染色。使用ALP检测试剂盒(上海Beyotime公司)测定ALP活性,于倒置显微镜(美国Bio-Rad公司)下观察ALP染色情况。

1.9 茜素红S(alizarin red S, ARS)染色检测细胞矿化程度

将hDPCs接种到12孔板中,在成骨培养基中培养21 d。4%多聚甲醛固定30 min后,使用2%ARS溶液在37 ℃下染色10 min,然后用十六烷基氯化吡啶(100 mmol/L,美国Sigma-Aldrich公司)洗脱1 h。利用微孔板阅读器(美国Bio-Rad公司)在562 nm处测量吸光度,以确定细胞的矿化程度。

1.10 统计学分析

使用GraphPad PRISM 5.01进行数据录入和统计学分析。正态分布的数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。使用t检验评估2组之间的差异;使用单因素方差分析(*ANOVA*)评估多组间的差异,多重比较采用*LSD-t*检验。检验水准设为$\alpha=0.05$,$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

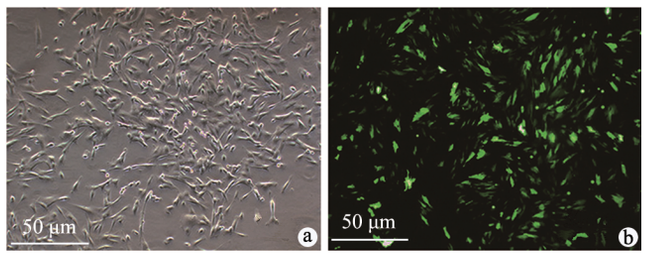
2.1 原代分离的hDPCs的形态特征和成骨分化标志物表达的鉴定

hDPCs培养10 d的形态见图1a。倒置显微镜下观察到hDPCs的生长状态良好,细胞形态呈梭形。hDPCs培养10~15 d后传代培养3代(每代5 d)。本研究使用第3代hDPCs进行检测。经过免疫荧光化学法

鉴定,骨钙蛋白的阳性率在80%以上(图1b)。

2.2 circRNA_079813的表达特征及其过表达对LPS诱导的hDPCs损伤的影响

与Control组比较,LPS组circRNA_079813的表达降低($P<0.05$),见图2a;与vector组比较,circRNA_079813组的circRNA_079813明显上调($P<0.05$),见图2b。与Control组比较,LPS组的细胞活力、ALP相对活性、ARS相对量、Bcl-2和ALP蛋白相对表达水平均降低($P<0.05$),而细胞凋亡率和Bax、C-caspase3、IL-1β及TNF-α的表达均增加($P<0.05$)。与LPS+vector组比较,LPS+circRNA_079813组的细胞活力、ALP相对活性、ARS相对量、Bcl-2和ALP蛋白相对表达水平均增加($P<0.05$),而细胞凋亡率和Bax、C-caspase3、IL-1β及TNF-α的表达均降低($P<0.05$),见图2c~j。

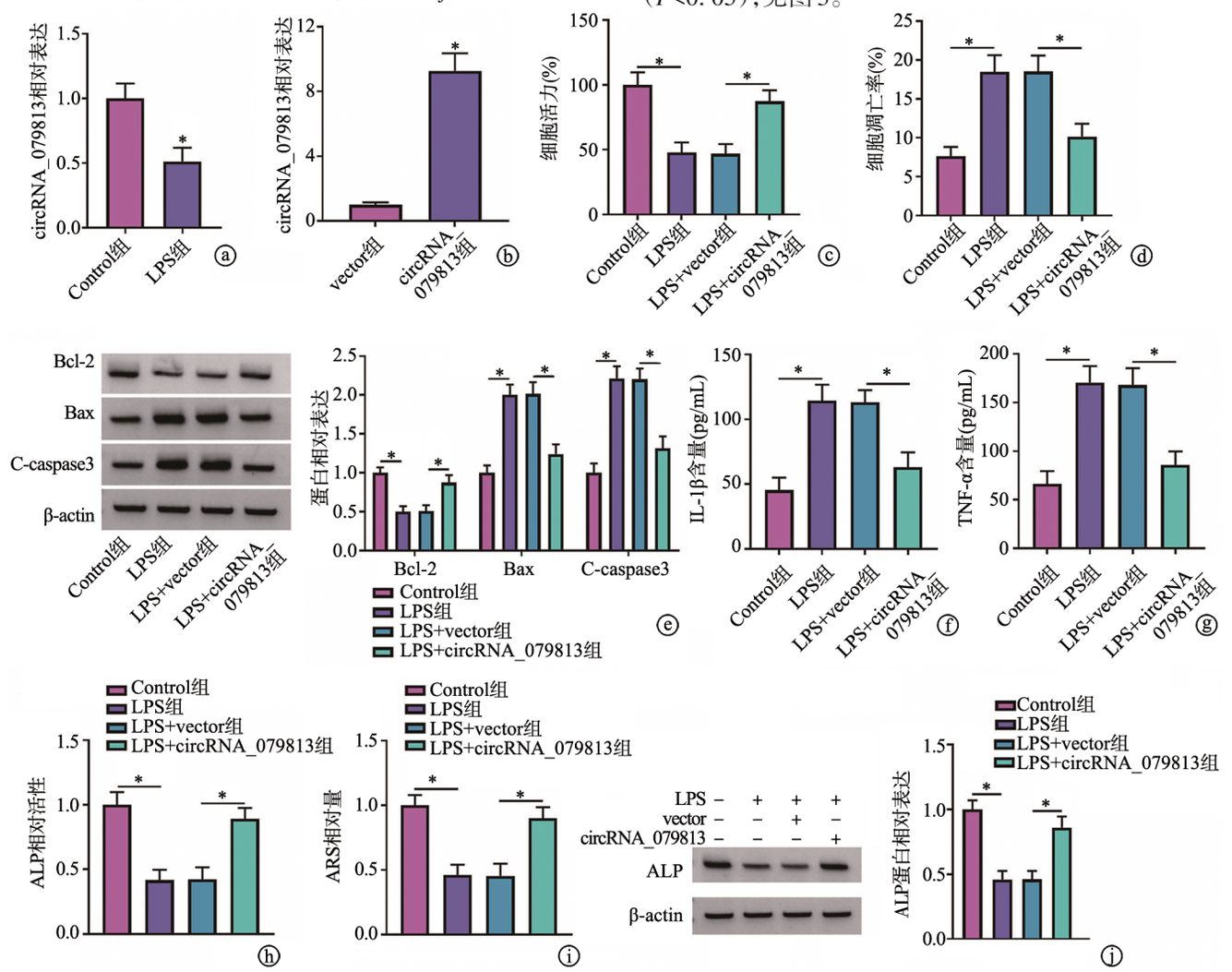


a:hDPCs培养10 d;b:免疫荧光化学法检测hDPCs中骨钙蛋白阳性的细胞

图1 hDPCs的形态特征和成骨分化标志物鉴定

2.3 circRNA_079813激活Smad1/RUNX2信号通路

与Control组比较,LPS组的Smad1和RUNX2的表达均降低($P<0.05$)。与LPS+vector组比较,LPS+circRNA_079813组的Smad1和RUNX2的表达均增加($P<0.05$),见图3。



a:qPCR检测circRNA_079813水平;b:circRNA_07981过表达的转染效率;c:CCK-8法检测细胞活力;d:流式细胞术检测细胞凋亡水平;e:Western blot检测hDPCs中Bax、C-caspase3和Bcl-2蛋白水平;f、g:ELISA检测hDPCs中IL-1β和TNF-α的水平;h:ALP相对活性的统计图;i:ARS相对量的统计图;j:Western blot检测成骨分化标志物ALP水平 *:$P<0.05$

图2 circRNA_079813过表达对LPS诱导的hDPCs损伤的影响

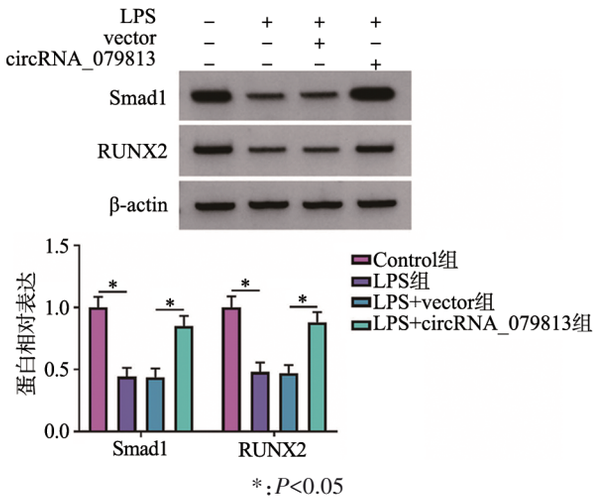


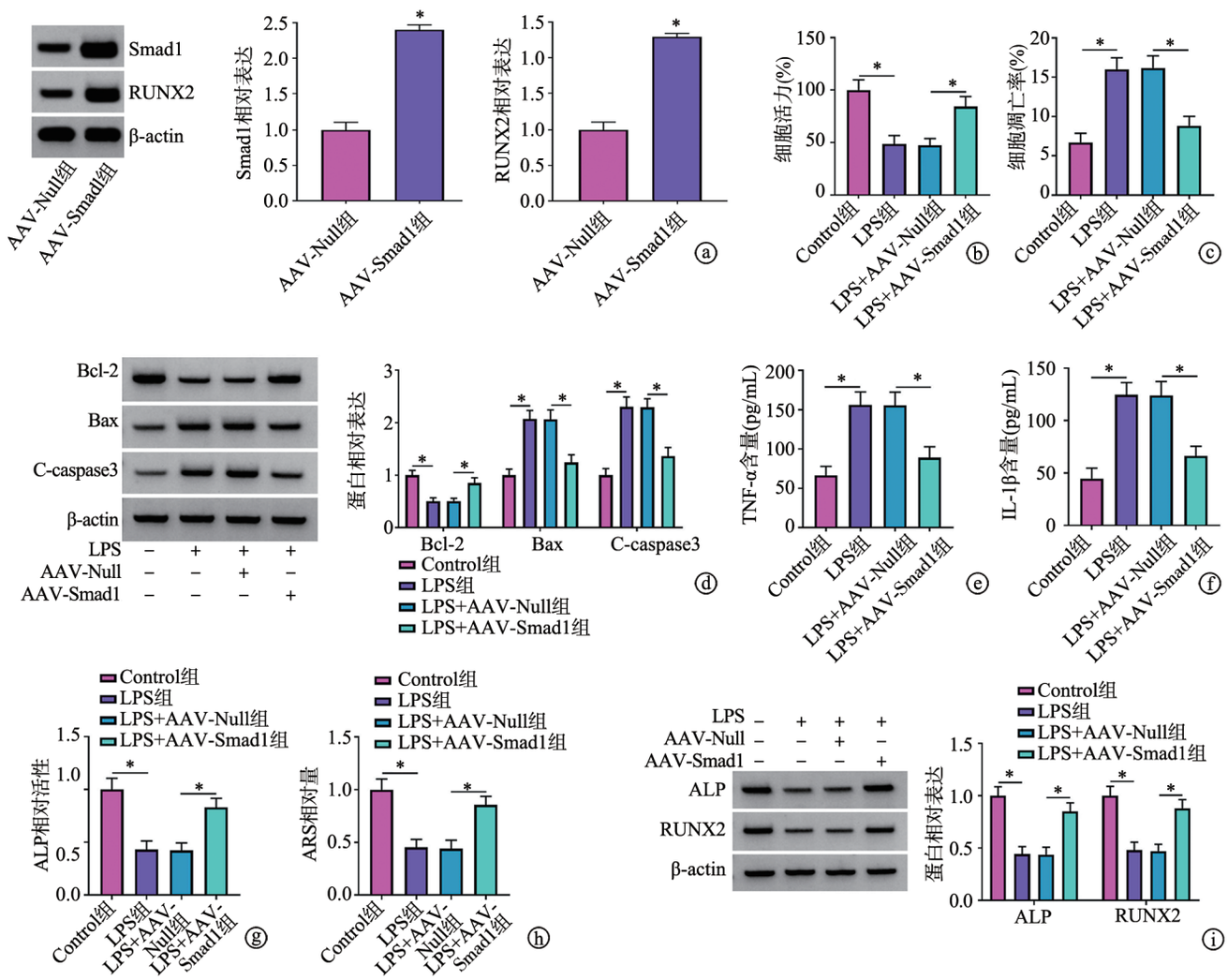
图3　过表达circRNA_079813对LPS诱导下Smad1和RUNX2表达的影响

2.4　过表达Smad1对LPS诱导的hDPCs损伤的影响

与AAV-Null组比较，AAV-Smad1组的Smad1和RUNX2的表达均明显上调（$P<0.05$），见图4a。与LPS+AAV-Null组比较，LPS+AAV-Smad1组的细胞活力、ALP相对活性、ARS相对量及Bcl-2、ALP、RUNX2蛋白相对表达水平均增加（$P<0.05$），而细胞凋亡率和Bax、C-caspase3、IL-1β及TNF-α的表达均减少（$P<0.05$），见图4b~i。

2.5　circRNA_079813通过Smad1/RUNX2信号通路改善LPS诱导的hDPCs损伤

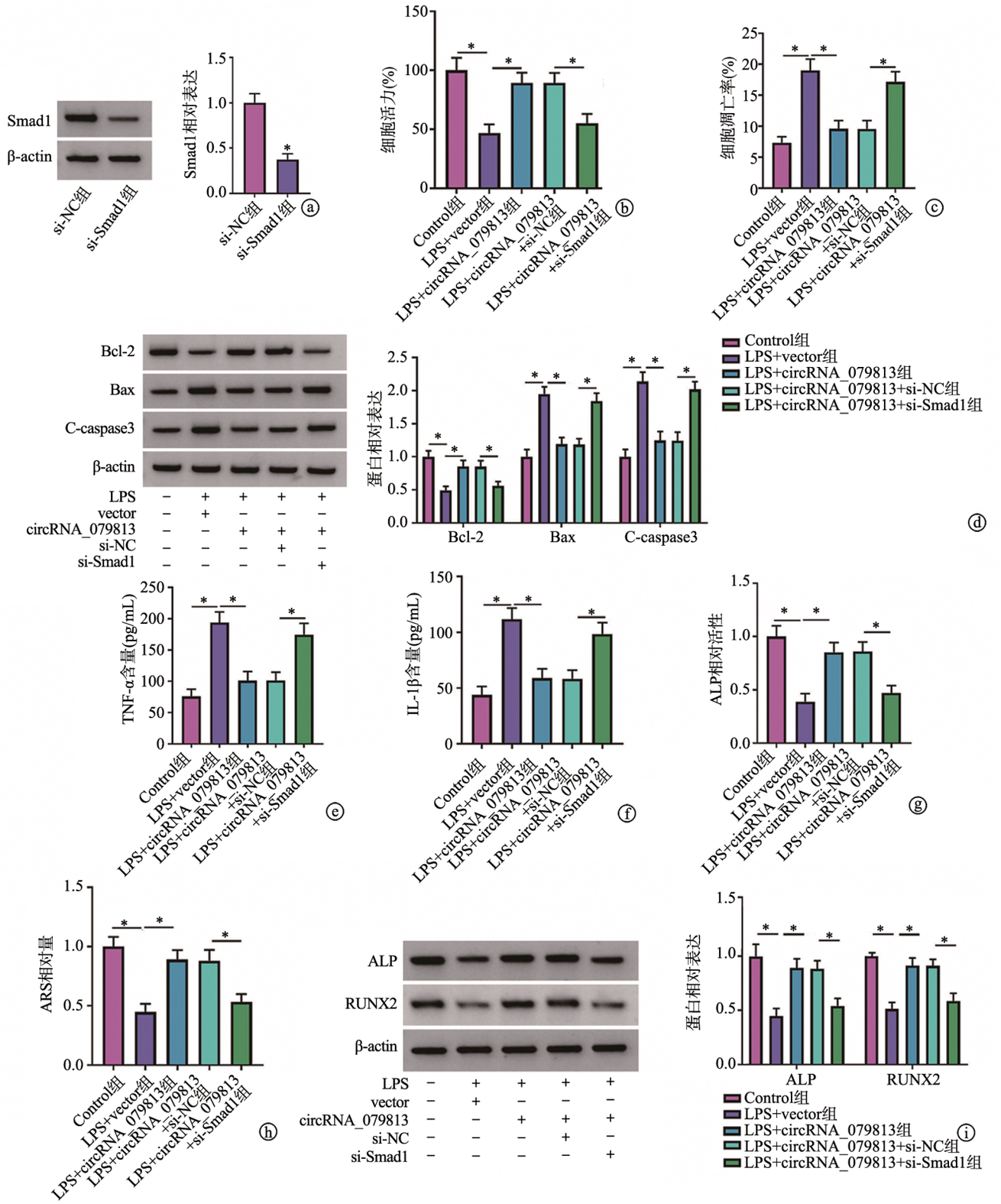
与si-NC组比较，si-Smad1组Smad1表达明显下调（$P<0.05$），见图5a。与LPS+circRNA_079813+si-NC组比较，LPS+circRNA_079813+si-Smad1组的细胞活力、ALP相对活性、ARS相对量及Bcl-2、ALP、RUNX2



a：Western blot检测Smad1和RUNX2的表达；b：CCK-8法检测细胞活力；c：流式细胞术检测细胞凋亡水平；d：Western blot检测hDPCs中Bax、C-caspase3和Bcl-2蛋白水平；e、f：ELISA检测hDPCs中TNF-α和IL-1β水平；g：ALP相对活性的统计图；h：ARS相对量的统计图；i：Western blot检测成骨分化标志物ALP和RUNX2水平　*：$P<0.05$

图4　过表达Smad-1对LPS诱导的hDPCs损伤的影响

蛋白相对表达水平均下调($P<0.05$),而细胞凋亡率和 Bax、C-caspase3、IL-1β 及 TNF-α 的表达均上调($P<0.05$),见图5b~i。



a:Western blot 检测 Smad1 的表达;b:CCK-8 法检测细胞活力;c:流式细胞术检测细胞凋亡水平;d:Western blot 检测 hDPCs 中 Bax、C-caspase3 和 Bcl-2 蛋白水平;e、f:ELISA 检测 hDPCs 中 TNF-α 和 IL-1β 的水平;g:ALP 相对活性统计图;h:ARS 相对量的统计图;i:Western blot 检测成骨分化标志物 ALP 和 RUNX2 的水平 *:$P<0.05$

图5 过表达 Smad-1 对 LPS 诱导的 hDPCs 损伤的影响

3 讨论

研究表明,炎症反应在牙髓炎中发挥着重要作用[10-11],在临床和动物实验中已广泛观察到牙髓炎的发生伴随炎症细胞因子的过度释放[12]。LPS来源于革兰氏阴性菌的外膜,可触发炎症牙髓组织中促炎性细胞因子(如IL-6和TNF-α等)的产生。本研究观察到LPS暴露组中IL-6和TNF-α的表达量显著性上调1倍以上,说明本研究使用LPS诱导的hDPCs在体外成功模拟了牙髓炎的炎症状态。此建模方案是研究体外牙髓炎中hDPCs功能的常用方法,如LPS刺激牙髓干细胞后在体外形成了明显的促炎反应和细胞凋亡[13-14]。本研究不仅观察到LPS诱导了hDPCs中促炎性细胞因子的显著增加和hDPCs凋亡,还观察到hDPCs增殖活力降低。表明LPS在体外诱导了hDPCs的炎症反应,抑制了细胞增殖,并增加了细胞凋亡。

非编码RNA已成为国内外学者的研究热点之一,其中circRNA的结构相对于其他非编码RNA而言更加稳定,且具有分布广泛、保守性高、特异性表达等特点[15-17]。circRNA在成骨分化中具有重要作用。Bahn等[18]发现circRNA可能在牙源性细胞成牙本质及成骨向分化过程中起着重要的作用;张雄等[19]发现在骨向诱导21 d的人牙周膜干细胞中circRNA8433显著高表达,并认为circRNA8433可能是人牙周膜干细胞成骨向分化新的生物学标记物。Li等[6]发现circRNA CDRlas可通过激活Smad1通路,促进牙周膜干细胞的成骨分化。circRNA_079813是一种新发现的circRNA,关于其功能的研究报道较少。Chen等[9]报道circRNA_079813的表达随着牙髓细胞的牙源性诱导而降低,推测其可能在牙髓炎治疗靶点的筛选中有重要价值。然而,其在牙髓炎进展中的作用和机制仍有待阐明。本研究结果显示,circRNA_079813在LPS诱导的hDPCs中显著降低;此外,circRNA_079813过表达保护hDPCs免受LPS诱导的炎症损伤,表明circRNA_079813是LPS诱导hDPCs效应的关键抑制因素,其有望成为牙髓炎治疗的新靶点。本研究发现在hDPCs中过表达circRNA_079813逆转了LPS诱导的细胞凋亡和炎症,促进了hDPCs的成骨分化,并改善了细胞的增殖活性。表明circRNA_079813参与了牙髓炎的发病过程。

Smad/RUNX2信号通路可以调节成骨细胞的分化和骨关节的炎症损伤。如丝氨酸蛋白酶通过Smad/RUNX2信号通路促进大鼠原代成骨细胞的成骨分化[20]。此外,Smad和RUNX2的激活可以促进成骨分化,如Smad1/5/8被激活后增强后纵韧带骨化中人骨髓间充质干细胞的成骨分化,而且RUNX2被激活后也促进了人骨髓间充质干细胞的成骨分化[21-22]。本研究表明,circRNA_079813过表达激活Smad1/RUNX2信号通路,而且过表达Smad1激活Smad1/RUNX2信号通路也呈现出与circRNA_079813类似的抗hDPCs损伤的效果。已知Smad1/RUNX2信号通路可被多种circRNA所调控,从而促进成骨分化,Li等[6]发现circRNA CDRlas可通过激活Smad1通路促进牙周膜干细胞的成骨分化,从而改善牙周疾病。另外,circRNA_0011269也可通过激活RUNX2,从而促进成骨细胞的分化[22]。提示circRNA通过激活Smad1/RUNX2信号通路,从而改善受损的hDPCs增殖活性和成骨分化功能。为验证circRNA_079813过表达是否通过Smad1/RUNX2信号通路而改善hDPCs损伤,本研究在circRNA_079813过表达的基础上沉默Smad1以抑制因circRNA_079813过表达而导致的Smad1/RUNX2信号通路激活。结果表明,在LPS暴露的hDPCs中,沉默Smad1明显逆转了circRNA_079813对细胞增殖活性和成骨分化的正向调控作用,也逆转了过表达circRNA_079813对细胞凋亡和炎症反应的负向调控作用。本研究结果均表明,circRNA_079813通过Smad1/RUNX2信号通路抑制了hDPCs的炎症损伤,并促进了成骨分化。

综上所述,在LPS诱导的体外牙髓炎模型中,circRNA_079813可以通过Smad1/RUNX2信号通路有效抑制hDPCs的凋亡和炎症反应,并促进细胞增殖和成骨分化。本研究为circRNA_079813在牙髓炎中的作用模式提出了新的见解,并提供了牙髓炎的潜在治疗靶点。

[参考文献]

[1] Wigsten E, Kvist T, Jonasson P, et al. Comparing quality of life of patients undergoing root canal treatment or tooth extraction [J]. J Endod, 2020, 46(1): 19-28. e1. doi: 10. 1016/j. joen. 2019. 10. 012.

[2] Liu M, Chen L, Wu J, et al. Long noncoding RNA MEG3 expressed in human dental pulp regulates LPS-induced inflammation and odontogenic differentiation in pulpitis [J]. Exp Cell Res, 2021, 400(2): 112495. doi: 10. 1016/j. yexcr. 2021. 112495.

[3] Liu Y, Chen L, Gong Q, et al. Hypoxia-induced mitophagy regulates proliferation, migration and odontoblastic differentiation of human den-

tal pulp cells through FUN14 domain-containing 1[J]. Int J Mol Med, 2022,49(5):72. doi:10.3892/ijmm.2022.5128.

[4] Li X, Yang L, Chen LL. The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs[J]. Mol Cell, 2018, 71(3):428-442. doi:10.1016/j.molcel.2018.06.034.

[5] Zheng J, Zhu X, He Y, et al. CircCDK8 regulates osteogenic differentiation and apoptosis of PDLSCs by inducing ER stress/autophagy during hypoxia[J]. Ann N Y Acad Sci, 2021, 1485(1):56-70. doi:10.1111/nyas.14483.

[6] Li X, Zheng Y, Zheng Y, et al. Circular RNA CDR1 as regulates osteoblastic differentiation of periodontal ligament stem cells via the miR-7/GDF5/SMAD and p38 MAPK signaling pathway[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1):232. doi:10.1186/s13287-018-0976-0.

[7] Zhao PP, Hu HR, Liu JY, et al. Gadolinium phosphate/chitosan scaffolds promote new bone regeneration via Smad/RUNX2 pathway[J]. Chem Eng J, 2019, 359: 1120-1129. doi: 10.1016/j.cej.2018.11.071.

[8] Zhao PP, Ge YW, Liu XL, et al. Ordered arrangement of hydrated GdPO4 nanorods in magnetic chitosan matrix promotes tumor photothermal therapy and bone regeneration against breast cancer bone metastases[J]. Chem Eng J, 2020, 381: 122694. doi: 10.1016/j.cej.2019.122694.

[9] Chen M, Yang Y, Zeng J, et al. circRNA expression profile in dental pulp stem cells during odontogenic differentiation[J]. Stem Cells Int, 2020(1):1-19. doi:10.1155/2020/5405931.

[10] Park SH, Ye L, Love RM, et al. Inflammation of the dental pulp[J]. Mediators Inflamm, 2015:980196. doi:10.1155/2015/980196.

[11] Hui T, Wang C, Chen D, et al. Epigenetic regulation in dental pulp inflammation[J]. Oral Dis, 2017, 23:22-28. doi:10.1111/odi.12464.

[12] Khorasani MMY, Hassanshahi G, Brodzikowska A, et al. Role(s) of cytokines in pulpitis: latest evidence and therapeutic approaches[J]. Cytokine, 2020, 126:154896. doi:10.1016/j.cyto.2019.154896.

[13] Zhang P, Cui Z, Li S. The protective effects of S14G-humanin (HNG) against lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in human dental pulp cells (hDPCs) mediated by the TLR4/MyD88/NF-κB pathway[J]. Bioengineered, 2021, 12(1):7552-7562. doi:10.1080/21655979.2021.1979914.

[14] Wang X, Sun H, Hu Z, et al. NUTM2A-AS1 silencing alleviates LPS-induced apoptosis and inflammation in dental pulp cells through targeting let-7c-5p/HMGB1 axis[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 96:107497. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107497.

[15] Qu S, Yang X, Li X, et al. Circular RNA: a new star of noncoding RNAs[J]. Cancer Lett, 2015, 365(2):141-148. doi:10.1016/j.canlet.2015.06.003.

[16] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. RNA, 2013, 19(2):141-157. doi:10.1261/rna.035667.112.

[17] Salzman J, Chen RE, Olsen MN, et al. Cell-type specific features of circular RNA expression[J]. PLoS Genet, 2013, 9(9): e1003777. doi:10.1371/journal.pgen.1003777.

[18] Bahn JH, Zhang Q, Li F, et al. The landscape of microRNA, Piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva[J]. Clin Chem, 2015, 61(1):221-230. doi:10.1373/clinchem.2014.230433.

[19] 张 雄,陈良娇,兰泽栋. 基因芯片筛选人牙周膜干细胞成骨分化生物学标记物的研究[J]. 广东医学, 2016, 37(14):2080-2083. doi:10.13820/j.cnki.gdyx.2016.14.006.

[20] Zhang X, Ma Y, Fu X, et al. RUNX2-modified adipose-derived stem cells promote tendon graft integration in anterior cruciate ligament reconstruction[J]. Sci Rep, 2016, 6(1):19073. doi:10.1038/srep19073.

[21] Cai Z, Wu B, Ye G, et al. Enhanced osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in ossification of the posterior longitudinal ligament through activation of the BMP2-Smad1/5/8 pathway[J]. Stem Cells Dev, 2020, 29(24):1567-1576. doi:10.1089/scd.2020.0117.

[22] Xu X, Chen Y, Tan B, et al. Circular RNA circ_0011269 sponges miR-122 to regulate RUNX2 expression and promotes osteoporosis progression[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(12):4819-4826. doi:10.1002/jcb.29709.

(编辑:贺绍梅)