

lncRNA MALAT1 调节 miR-150-5p/XBP1 轴对人牙周膜干细胞增殖和成骨分化的实验研究

张 千, 唐欣轶, 汪 烈 (武汉市第三医院口腔科, 武汉 430000)

摘要: 目的 探讨长链非编码 RNA (lncRNA) 肺腺癌转移相关转录子 1 (MALAT1) 调节 miR-150-5p/X-框结合蛋白 1 (XBP1) 轴对人牙周膜干细胞 (PDLSCs) 增殖和成骨分化的影响及机制。方法 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测未分化及已分化 PDLSCs 中 lncRNA MALAT1, miR-150-5p 及 XBP1 mRNA 表达。取传至第三代的 PDLSCs, 将其分为对照组、pcDNA 组、pcDNA-lncRNA MALAT1 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-150-5p 组、pcDNA-lncRNA MALAT1+mimic NC 组和 pcDNA-lncRNA MALAT1+miR-150-5p mimic 组。qRT-PCR 检测 lncRNA MALAT1, miR-150-5p 及 XBP1 mRNA 在 PDLSCs 中的表达; CCK-8, 克隆形成实验检测 PDLSCs 增殖; 对硝基酚磷酸底物法检测碱性磷酸酶 (ALP) 活性; 茜素红染色检测矿化结节形成率; Western blot 检测 XBP1, 细胞周期素 D1 (Cyclin D1)、骨钙素 (OCN)、Runt 相关转录因子 2 (RUNX2) 和骨桥蛋白 (OPN) 表达; 双荧光素酶实验验证 lncRNA MALAT1 与 miR-150-5p 及 miR-150-5p 与 XBP1 的靶向关系。结果 与未分化组比较, 已分化组 PDLSCs 中 lncRNA MALAT1 表达 (1.95 ± 0.14 vs 1.00 ± 0.00) 及 XBP1 mRNA 表达 (1.63 ± 0.12 vs 1.00 ± 0.00) 升高, miR-150-5p 表达 (0.26 ± 0.01 vs 1.00 ± 0.00) 降低, 差异具有统计学意义 ($t=16.622, 12.860, 181.262$, 均 $P < 0.001$)。过表达 lncRNA MALAT1 或下调 miR-150-5p 均可促进 PDLSCs 增殖和成骨分化 ($t=13.693 \sim 45.518$), miR-150-5p mimic 逆转了 lncRNA MALAT1 过表达对 PDLSCs 增殖及成骨分化的促进作用 ($t=9.229 \sim 27.854$), 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。双荧光素酶实验证实, miR-150-5p 过表达降低了转染 lncRNA MALAT1-WT, XBP1-WT 细胞的荧光素酶活性 ($t=56.546, 89.826$, 均 $P < 0.001$)。结论 过表达 lncRNA MALAT1 可能通过下调 miR-150-5p 促进 XBP1 表达进而促进 PDLSCs 增殖和成骨分化。

关键词: 长链非编码 RNA; 肺腺癌转移相关转录子 1; 微小 RNA-150-5p; 牙周膜干细胞; X-框结合蛋白 1; 成骨分化
中图分类号: R781.42; R392.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2025) 04-079-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2025.04.014

Experimental Study of lncRNA MALAT1 on Proliferation and Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells by Regulating miR-150-5p/XBP1 Axis

ZHANG Qian, TANG Xinyi, WANG Lie (Department of Stomatology, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of long non coding RNA (lncRNA) metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) on the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells (PDLSCs) by regulating the miR-150-5p/X-box binding protein 1 (XBP1) axis. **Methods** Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of lncRNA MALAT1, miR-150-5p and XBP1 mRNA in undifferentiated and differentiated PDLSCs. The third generation PDLSCs were divided into control group, pcDNA group, pcDNA-lncRNA MALAT1 group, anti-miR-NC group, anti-miR-150-5p group, pcDNA-lncRNA MALAT1+mimic NC group and pcDNA-lncRNA MALAT1+miR-150-5p mimic group. The expression of lncRNA MALAT1, miR-150-5p and XBP1 mRNA of PDLSCs were detected by qRT-PCR. CCK-8 and the clone formation assay were used to detect the proliferation of PDLSCs. P-nitrophenolphosphate substrate method was used to detect alkaline phosphatase (ALP) activity. Alizarin red staining was applied to detect the formation rate of mineralized nodules. Western blot was used to detect XBP1, Cyclin D1, osteocalcin (OCN), Runt related transcription factor 2 (RUNX2) and osteopontin (OPN) proteins. Dual luciferase assay was used to verify the targeting relationship between lncRNA MALAT1 and miR-150-5p, and between miR-150-5p and XBP1 was validated. **Results** Compared with the undifferentiated group, the expression of lncRNA MALAT1 (1.95 ± 0.14 vs 1.00 ± 0.00) and XBP1 mRNA expression (1.63 ± 0.12 vs 1.00 ± 0.00) increased in the differentiated PDLSCs, the expression of miR-150-5p decreased (0.26 ± 0.01 vs 1.00 ± 0.00) in differentiated group, with the differences were statistical significance ($t=16.622, 12.860, 181.262$, all $P < 0.001$). Overexpression of lncRNA MALAT1 or down-regulation of

基金项目: 武汉市医学科研项目 [健康发展 (西医类) 面上项目] (WX23A03)。

作者简介: 张千 (1993-), 女, 硕士, 医师, 研究方向: 口腔医学, E-mail: qq13if7@163.com。

通讯作者: 汪烈 (1982-), 男, 硕士, 主任医师, 研究方向: 口腔医学, E-mail: 4325130@qq.com。

miR-150-5p could promote the proliferation and osteogenic differentiation of human PDLSCs ($t=13.693 \sim 45.518$), miR-150-5p mimic reversed the effects of overexpression of lncRNA MALAT1 on proliferation and osteogenic differentiation of PDLSCs ($t=9.229 \sim 27.854$), and the differences were statistically significant (all $P<0.05$), respectively. Dual luciferase assay confirmed that overexpression of miR-150-5p reduced the luciferase activity in transfected lncRNA MALAT1-WT and XBP1-WT cells ($t=56.546, 89.826$, all $P<0.001$). **Conclusion** Overexpression of lncRNA MALAT1 may promote XBP1 expression by downregulating miR-150-5p, thereby promoting proliferation and osteogenic differentiation of human PDLSCs.

Keywords: long non coding RNA; metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1; microRNA-150-5p; periodontal ligament stem cells; X-box binding protein 1; osteogenic differentiation

牙周炎是最普遍的口腔疾病,给公共卫生造成巨大的经济负担^[1]。严重的牙周炎会引起牙槽骨萎缩和吸收,从而导致牙齿松动和脱落,严重影响患者生活质量^[2]。现有的临床治疗技术,如牙龈清洁和牙龈下刮根平整,只能防止炎症发展,但不能促进已破坏牙周炎组织的再生^[3]。随着细胞治疗研究发展,间充质干细胞正在成为骨再生的理想种子细胞之一。牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSCs)作为牙周组织中间充质干细胞的主要来源,具有成骨分化能力,有助于牙周组织再生^[4]。因此,深入探究PDLSCs的增殖和成骨分化机制对于牙周炎的治疗意义重大。肺腺癌转移相关转录子1(metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)是位于人类染色体11q13上的一个长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)^[5],其过表达促进PDLSCs成骨分化^[6]。相关研究显示,抑制miR-150-5p表达可促进人PDLSCs成骨分化^[7];X-框结合蛋白1(X-box binding protein 1, XBP1)可增强人牙周韧带细胞的增殖和成骨能力^[8]。且生信分析显示,lncRNA MALAT1与miR-150-5p,miR-150-5p与XBP1存在结合位点。但lncRNA MALAT1能否通过调节miR-150-5p/XBP1轴影响人PDLSCs增殖和成骨分化尚未报道。基于此,本实验主要探究lncRNA MALAT1对PDLSCs增殖和成骨分化的影响及分子机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 人原代PDLSCs(美国ATCC公司)。在37℃,5%(v/v)CO₂培养箱中,将原代PDLSCs置于含10g/dl胎牛血清、1%(w/v)青霉素-链霉素α-MEM培养液中培养,待其贴壁后消化处理,进行后续传代培养。

1.2 主要试剂及仪器 lncRNA MALAT1过表达物(pcDNA-lncRNA MALAT1)及其阴性对照pcDNA,miR-150-5p抑制物(anti-miR-150-5p)及其阴性对照anti-miR-NC,miR-150-5p模拟物(miR-150-5p mimic)及其阴性对照mimic NC(艾迪基因科技有限公司);成骨诱导液(批号:HUXUC-90021,赛业生物科技有限公司);CCK-8试剂盒(批号:JN-

E3226,上海纪宁生物科技有限公司);碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(货号:P0321,上海碧云天生物技术有限公司);茜素红S溶液(批号:130-22-3,上海康朗生物科技有限公司);兔源一抗XBP1,细胞周期素D1(Cyclin D1)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、Runt相关转录因子2(runt related transcription factor 2, RUNX2)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)及二抗(批号:ab37152, ab134175, ab133612, ab192256, ab8245, ab214050, ab6721, 英国Abcam公司);Q5荧光定量PCR仪(美国ABI公司);MK3酶标仪(美国赛默飞世尔公司);BX53光学显微镜(日本奥林巴斯公司);DYCZ-24DN蛋白电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.3 方法

1.3.1 细胞分组及处理:取传至第三代的PDLSCs,分为未分化组和已分化组,未分化组PDLSCs用α-MEM培养液正常培养,已分化组PDLSCs用含有成骨诱导液的α-MEM培养液诱导成骨分化14天。另取传至第三代的PDLSCs,分为对照组(正常培养),pcDNA组(转染pcDNA),pcDNA-lncRNA MALAT1组(转染pcDNA-lncRNA MALAT1),anti-miR-NC组(转染anti-miR-NC),anti-miR-150-5p组(转染anti-miR-150-5p),pcDNA-lncRNA MALAT1+mimic NC组(共转染pcDNA-lncRNA MALAT1和mimic NC),pcDNA-lncRNA MALAT1+miR-150-5p mimic组(共转染pcDNA-lncRNA MALAT1和miR-150-5p mimic)。各转染组均转染24h后,收集细胞用于后续实验。对于PDLSCs的成骨分化诱导,先按照上述各组进行相应转染处理后,再在含有成骨诱导液的α-MEM(alpha-minimum essential medium)培养液中诱导成骨分化14天,最后用于实验。

1.3.2 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测lncRNA MALAT1,miR-150-5p及XBP1 mRNA表达:取1.3.1中各组PDLSCs,使用TRIzol试剂从hPDLSCs中提取总RNA,将500ng总RNA合成第一链互补DNA(complementary DNA, cDNA)后,以第一链cDNA为模板

进行定量 PCR 反应。反应条件: 95℃ 预变性 10min; 然后 95℃ 20s, 62℃ 30s, 75℃ 30s, 43 个循环。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 lncRNA MALAT1, miR-150-5p 及 XBP1 mRNA 表达。引物: lncRNA MALAT1: F: 5'-GGGAGTGGTCT-TAACAGGGAGGAG-3', R: 5'-AACAGCATAGCAGTACACGCCTTC-3'; XBP1: F: 5'-CACCTGAGCCCCGAG-GAGAA-3', R: 5'-AACAGCAAGTGGTAGATTTA-3'; GAPDH: F: 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3', R: 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'; miR-150-5p: F: 5'-ACACTCCAGCTGGGTCTCCCAACCCTTGAC-CA-3', R: 5'-CTCAACTGGTGTCTGGA-3'; U6: F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', R: 5'-AACGCTTCAC-GAATTTGCGT-3'。

1.3.3 CCK-8 检测增殖: PDLSCs 在 96 孔板上培养, 密度为 5×10^3 个/孔, 培养 24h 后, 各孔加 $10 \mu\text{l}$ CCK-8 试剂。吸光度值在 450 nm 波长下读取。

1.3.4 克隆形成实验检测克隆形成: PDLSCs 以 500 个/孔的密度置于 6cm 培养板中, 细胞贴壁后, 在 6cm 培养板上对应转染处理, 培养 14 天后, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤三次, 加入 4g/dl 多聚甲醛固定细胞, 丢弃细胞固定液, 加入结晶紫染色, 并统计克隆形成率。

1.3.5 对硝基酚磷酸底物法检测 ALP 活性: 取成骨分化 14 天后的各组 PDLSCs, 使用含有 0.1g/dl Triton X-100, 1mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐和 5mmol/L 氯化镁的裂解缓冲液裂解细胞, 收集细胞裂解液。将细胞裂解液与对硝基酚磷酸、2-氨基-2-甲基-1-丙醇和 2mmol/L 氯化镁在 37℃ 下孵育 15min。加入 0.1 mol/L 氢氧化钠终止反应。在波长 410nm 处测定吸光度。使用 Qubit® 测定总蛋白浓度。ALP 活性以 U/mg 蛋白单位表示。

1.3.6 茜素红染色检测 PDLSCs 矿化结节形成率: 取成骨分化 14 天后的各组 PDLSCs, 用 PBS 洗涤后用冷甲醇在 4℃ 下固定 20min。用蒸馏水 (pH=4.2) 洗涤细胞 3 次, 2% (w/v) 茜素红 S 溶液染色后再用蒸馏水洗涤 3 次。显微镜下可见矿化为红色结节。接着用 10g/dl 十六烷基氯化吡啶洗脱每个孔, 定量测定矿化结节形成率。

1.3.7 Western blot 检测 XBP1, Cyclin D1, OCN, RUNX2 和 OPN 蛋白: 取各组 PDLSCs, 用预冷 PBS 洗涤细胞, 并在放射免疫沉淀法缓冲液中裂解。蛋白经定量后, 电泳分离蛋白质样品, 将分离的蛋白质转移到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上。PVDF 膜在 5g/dl 脱脂牛奶中室温封闭 1h, 用 PBS 冲洗, 与目标抗体 XBP1 (1:3 000), Cyclin D1 (1:2 000), OCN (1:5 000), RUNX2 (1:4 000), GAPDH (1:6 000), OPN (1:3 000) 在 4℃ 下过夜孵育。再与二

抗 (1:6 000) 孵育 2h, 冲洗除去二抗后, 增强型化学发光试剂检测 PVDF 膜, 并用 ImageJ 定量蛋白表达量。

1.3.8 靶向关系验证: 利用 T4 DNA 连接酶将目标片段插入荧光素酶载体 pmirGLO, 构建荧光素酶报告质粒野生型 (WT)-lncRNA MALAT1, 突变型 (MUT)-lncRNA MALAT1, WT-XBP1, MUT-XBP1 将 WT-lncRNA MALAT1, MUT-lncRNA MALAT1, WT-XBP1, MUT-XBP1 与 mimic NC 或 miR-150-5p mimic 共转染到 PDLSCs 中。48h 后, 使用双荧光素酶报告分析系统测量荧光素酶活性。

1.4 统计学分析 所有数据均符合正态分布, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示, 使用 GraphPad Prism 8 统计软件进行处理。两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析及事后 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA MALAT1, miR-150-5p 及 XBP1 mRNA 在未分化及已分化 PDLSCs 中的表达 qRT-PCR 结果显示, 与未分化组比较, 已分化组 PDLSCs 中 lncRNA MALAT1 (1.95 ± 0.14 vs 1.00 ± 0.00) 及 XBP1 mRNA (1.63 ± 0.12 vs 1.00 ± 0.00) 表达均明显升高, miR-150-5p 表达 (0.26 ± 0.01 vs 1.00 ± 0.00) 明显降低, 差异具有统计学意义 ($t=16.622, 12.860, 181.262$, 均 $P < 0.001$)。

2.2 过表达 lncRNA MALAT1 或抑制 miR-150-5p 表达对 PDLSCs 中 miR-150-5p 及 XBP1 mRNA 表达的影响 见表 1。qRT-PCR 结果显示, 与 pcDNA 组比较, pcDNA-lncRNA MALAT1 组 lncRNA MALAT1 及 XBP1 mRNA 表达明显升高 ($t=23.212, 18.075$), miR-150-5p 表达明显降低 ($t=40.083$), 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 与 anti-miR-NC 组比较, anti-miR-150-5p 组 miR-150-5p 表达明显降低 ($t=45.518$), XBP1 mRNA 表达明显升高 ($t=13.693$), 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 与 pcDNA-lncRNA MALAT1+mimic NC 组比较, pcDNA-lncRNA MALAT1+miR-150-5p mimic 组 miR-150-5p 表达明显升高 ($t=27.854$), XBP1 mRNA 表达明显降低 ($t=12.598$), 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

2.3 过表达 lncRNA MALAT1 或抑制 miR-150-5p 表达对 PDLSCs 增殖的影响 见图 1 和表 2。与对照组比较, pcDNA-lncRNA MALAT1 组, anti-miR-150-5p 组细胞 A_{450nm} 、克隆形成率明显升高, 差异具有统计学意义 ($t=14.218, 36.757; 16.214, 42.744$, 均 $P < 0.05$); 与 pcDNA 组比较, pcDNA-lncRNA MALAT1 组细胞 A_{450nm} 、克隆形成率明显升高, 差异具有统计学意义 ($t=13.719, 36.618$, 均 $P < 0.05$); 与 anti-miR-NC 组比较, anti-miR-150-5p 组细胞 A_{450nm} 、克隆形成率明显升高, 差异具有统计学意义 ($t=15.466, 42.488$, 均

$P<0.05$) ; 与 pcDNA-lncRNA MALAT1+mimic NC 组比较, pcDNA-lncRNA MALAT1+miR-150-5p mimic 组细胞

A_{450nm} 、克隆形成率明显降低, 差异具有统计学意义 ($t=9.229, 25.530$, 均 $P<0.05$)。

表 1 过表达 lncRNA MALAT1 或抑制 miR-150-5p 表达对 PDLSCs 中 miR-150-5p 及 XBP1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

项目	对照组	pcDNA 组	pcDNA-lncRNA MALAT1 组	anti-miR-NC 组	anti-miR-150-5p 组	pcDNA-lncRNA MALAT1+mimic NC 组	pcDNA-lncRNA MALAT1+miR-150-5p mimic 组	F	P
lncRNA MALAT1	1.00±0.00	1.02±0.01	1.85±0.13	1.01±0.01	1.00±0.01	1.88±0.14	1.90±0.13	169.017	<0.001
miR-150-5p	1.00±0.00	1.02±0.02	0.43±0.03	1.03±0.02	0.36±0.03	0.45±0.04	0.86±0.07	437.670	<0.001
XBP1mRNA	1.00±0.00	1.01±0.01	1.67±0.12	1.01±0.02	1.51±0.11	1.69±0.13	1.23±0.11	74.518	<0.001

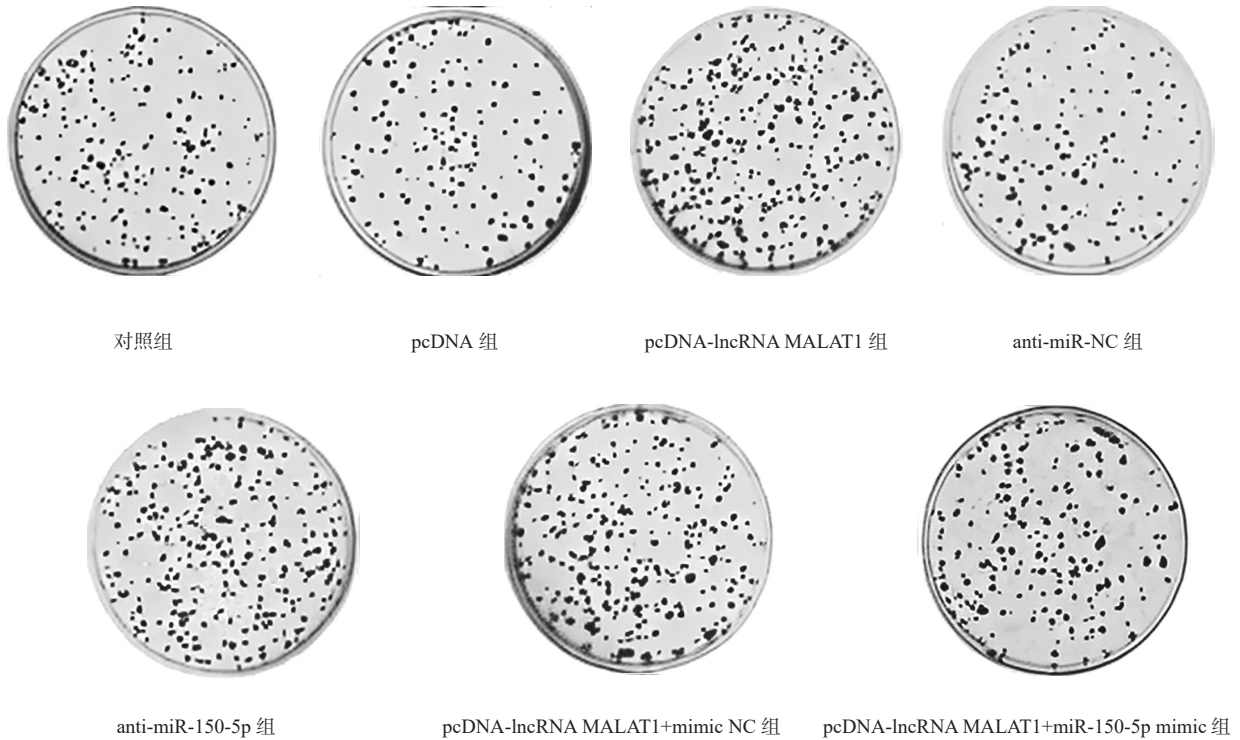


图 1 克隆形成实验检测 PDLSCs 增殖

表 2 过表达 lncRNA MALAT1 或抑制 miR-150-5p 表达对 PDLSCs 增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

项目	对照组	pcDNA 组	pcDNA-lncRNA MALAT1 组	anti-miR-NC 组	anti-miR-150-5p 组	pcDNA-lncRNA MALAT1+mimic NC 组	pcDNA-lncRNA MALAT1+miR-150-5p mimic 组	F	P
A_{450nm}	0.86±0.08	0.88±0.07	1.43±0.12	0.89±0.07	1.51±0.10	1.45±0.13	1.08±0.10	54.667	<0.001
克隆形成率 (%)	12.77±0.56	12.83±0.61	28.55±1.37	12.88±0.65	31.12±1.43	28.69±1.41	17.73±0.85	387.790	<0.001

2.4 过表达 lncRNA MALAT1 或抑制 miR-150-5p 表达对 PDLSCs ALP 活性及矿化结节形成率的影响 见表 3。与对照组比较, pcDNA-lncRNA MALAT1 组, anti-miR-150-5p 组 PDLSCs ALP 活性及矿化结节形成率明显升高, 差异具有统计学意义 ($t=22.040, 39.826; 25.557, 41.352$, 均 $P<0.05$); 与 pcDNA 组比较, pcDNA-lncRNA MALAT1 组 PDLSCs ALP 活性及矿化结节形成率明显升高, 差异具有统计学意义 ($t=25.571,$

39.768, 均 $P<0.05$); 与 anti-miR-NC 组比较, anti-miR-150-5p 组 PDLSCs ALP 活性及矿化结节形成率明显升高, 差异具有统计学意义 ($t=24.619, 41.127$ 均 $P<0.05$); 与 pcDNA-lncRNA MALAT1+mimic NC 组比较, pcDNA-lncRNA MALAT1+miR-150-5p mimic 组 PDLSCs ALP 活性及矿化结节形成率明显降低, 差异具有统计学意义 ($t=11.254, 17.204$, 均 $P<0.05$)。

表3 过表达 lncRNA MALAT1 或抑制 miR-150-5p 表达对 PDLSCs ALP 活性及矿化结节形成率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

项目	对照组	pcDNA 组	pcDNA-lncRNA MALAT1 组	anti-miR-NC 组	anti-miR-150-5p 组	pcDNA-lncRNA MALAT1 +mimic NC 组	pcDNA-lncRNA MALAT1+miR-150-5p mimic 组	F	P
ALP 活性 (U/mg)	0.71±0.07	0.73±0.06	1.65±0.13	0.75±0.07	1.80±0.14	1.63±0.12	1.15±0.11	129.495	<0.001
矿化结节形成率 (%)	31.16±1.46	31.22±1.45	71.88±3.15	31.39±1.58	73.44±3.22	70.97±3.23	53.38±2.54	399.775	<0.001

2.5 过表达 lncRNA MALAT1 或抑制 miR-150-5p 表达对 PDLSCs 中 XBP1, Cyclin D1, OCN, RUNX2, OPN 蛋白表达的影响 见表4, 图2。Western blot 结果显示, 与 pcDNA 组比较, pcDNA-lncRNA MALAT1 组 PDLSCs 中 XBP1, Cyclin D1, OCN, RUNX2, OPN 蛋白明显升高, 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$) ; 与 anti-miR-NC 组比较, anti-miR-150-5p 组

PDLSCs 中 XBP1, Cyclin D1, OCN, RUNX2, OPN 蛋白明显升高, 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$) ; 与 pcDNA-lncRNA MALAT1+mimic NC 组比较, pcDNA-lncRNA MALAT1+miR-150-5p mimic 组 PDLSCs 中 XBP1, Cyclin D1, OCN, RUNX2, OPN 蛋白明显降低, 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$) 。

表4 过表达 lncRNA MALAT1 或抑制 miR-150-5p 表达对 PDLSCs 中 XBP1, Cyclin D1, OCN, RUNX2, OPN 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

项目	对照组	pcDNA 组	pcDNA-lncRNA MALAT1 组	anti-miR-NC 组	anti-miR-150-5p 组	pcDNA-lncRNA MALAT1 +mimic NC 组	pcDNA-lncRNA MALAT1+miR-150-5p mimic 组	F	P
XBP1/GAPDH	0.43 ± 0.04	0.46 ± 0.04	1.33 ± 0.12 [#]	0.45 ± 0.04	1.56 ± 0.14 [@]	1.30 ± 0.11	0.93 ± 0.08 ^{&△}	170.387	<0.001
Cyclin D1/GAPDH	0.88 ± 0.07	0.90 ± 0.08	2.18 ± 0.15 [#]	0.91 ± 0.07	2.34 ± 0.13 [@]	2.20 ± 0.14	1.50 ± 0.10 ^{&△}	224.007	<0.001
OCN/GAPDH	0.61 ± 0.05	0.59 ± 0.05	1.54 ± 0.11 [#]	0.60 ± 0.05	1.72 ± 0.14 [@]	1.56 ± 0.12	1.03 ± 0.09 ^{&△}	175.209	<0.001
RUNX2/GAPDH	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.03	1.12 ± 0.10 [#]	0.38 ± 0.03	1.29 ± 0.12 [@]	1.15 ± 0.11	0.75 ± 0.06 ^{&△}	167.827	<0.001
OPN/GAPDH	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.78 ± 0.07 [#]	0.14 ± 0.02	0.86 ± 0.07 [@]	0.76 ± 0.06	0.31 ± 0.03 ^{&△}	323.020	<0.001

注: * 与对照组比较, $t=24.366, 28.863, 24.264, 24.121, 35.041; t=30.593, 32.416, 28.960, 29.446, 39.288$, 均 $P<0.05$; # 与 pcDNA 组比较, $t=23.554, 28.419, 24.786, 23.494, 33.448$, 均 $P<0.05$; & 与 pcDNA-lncRNA MALAT1 组比较, $t=10.830, 15.098, 13.306, 11.591, 24.953$, 均 $P<0.05$; @ 与 anti-miR-NC 组比较, $t=30.052, 31.750, 29.221, 28.507, 38.227$, 均 $P<0.05$; △ 与 pcDNA-lncRNA MALAT1+mimic NC 组比较, $t=10.017, 15.542, 13.828, 12.530, 23.892$, 均 $P<0.05$ 。

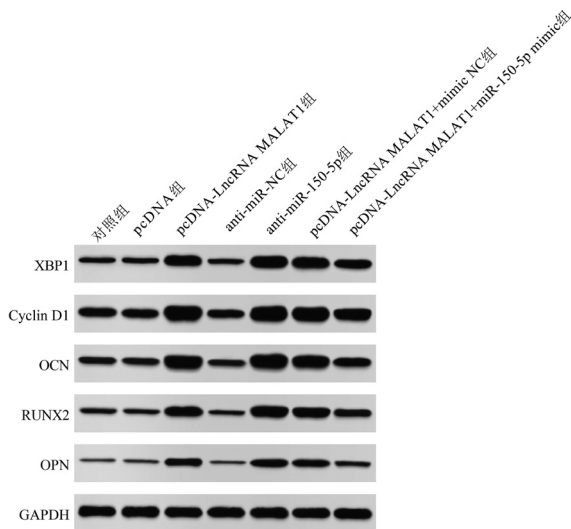


图2 PDLSCs 中 XBP1, Cyclin D1, OCN, RUNX2, OPN 蛋白的 Western blot 检测

2.6 lncRNA MALAT1 靶向调节 miR-150-5p/XBP1

轴 见图3。Targetscan 网站发现 lncRNA MALAT1 与 miR-150-5p, miR-150-5p 与 XBP1 可结合。miR-150-5p mimic 和 lncRNA MALAT1-WT 共转染组 (0.29 ± 0.03) 的荧光素酶活性明显低于 mimic NC 和 lncRNA MALAT1-WT 共转染组 (1.02 ± 0.01) , 差异具有统计学意义 ($t=56.546, P<0.001$) ; miR-150-5p mimic 和 lncRNA MALAT1-MUT 共转染组 (1.01 ± 0.06) 的荧光素酶活性与 mimic NC 和 lncRNA MALAT1-MUT 共转染组 (1.03 ± 0.08) 差异无统计学意义 ($t=0.490, P=0.635$) 。miR-150-5p mimic 和 XBP1-WT 共转染组 (0.19 ± 0.01) 的荧光素酶活性明显低于 mimic NC 和 XBP1-WT 共转染组 (1.01 ± 0.02) , 差异具有统计学意义 ($t=89.826, P<0.001$) ; miR-150-5p mimic 和 XBP1-MUT 共转染组 (0.99 ± 0.05) 的荧光素酶活性与 mimic NC 和 XBP1-MUT 共转染组 (1.02 ± 0.06) 差异无统计学意义 ($t=0.941, P=0.369$) 。



图3 lncRNA MALAT1 与 miR-150-5p, miR-150-5p 与 XBP1 的结合位点图

3 讨论

牙周炎是一种发生在牙周组织中的慢性炎症^[9]。在世界范围内,尤其是中国,牙周炎发病率非常高^[10-11]。PDLSCs 是具有多向分化潜能的细胞,也是牙周炎患者牙周组织和骨再生的理想候选细胞^[12-13]。因此,确定促进 PDLSCs 增殖和成骨分化的分子靶点,对于牙周炎患者的临床治疗至关重要。

最近的研究表明, lncRNA 在调节干细胞增殖、分化方面具有至关重要的作用^[14]。如沉默 lncRNA MALAT1 抑制人 PDLSCs 成骨分化^[15]; lncRNA MALAT1 过表达促进人 PDLSCs 增殖^[16]; PDLSCs 成骨分化后 lncRNA MALAT1 表达上调^[17]。本研究首先发现,已分化组 PDLSCs 中 lncRNA MALAT1 表达高于未分化组,这提示 lncRNA MALAT1 可能参与了 PDLSCs 的分化过程。于是对 PDLSCs 进行了过表达 lncRNA MALAT1 的处理,结果发现过表达 lncRNA MALAT1 促进 PDLSCs 增殖及成骨分化。此外, Cyclin D1 是增殖相关蛋白,其表达水平升高表明 PDLSCs 增殖能力增强^[18]; OCN, RUNX2, OPN 是成骨相关基因,有助于诱导 PDLSCs 成骨分化^[19]。本研究中的 pcDNA-lncRNA MALAT1 组 PDLSCs 中上述蛋白高于 pcDNA 组,再次从蛋白水平上证明了上调 lncRNA MALAT1 表达对 PDLSCs 增殖及成骨分化的促进作用。本研究在前人研究的基础上再次验证了过表达 lncRNA MALAT1 对 PDLSCs 增殖及成骨分化的促进作用,为 lncRNA MALAT1 在 PDLSCs 增殖及成骨分化中扮演重要角色提供了更坚实的理论基础。提示 lncRNA MALAT1 可能成为治疗牙周炎的潜在有效靶点之一。但具体分子机制尚不完全明确。

目前已有 lncRNA MALAT1 调节 miR-150-5p 影响 IL-1 β 刺激的软骨细胞增殖的研究^[20]。miR-150-5p 是在多种疾病中失调的 miRNA,已有研究报道,miR-150-5p 在牙周炎患者中显著上调,且与病情的严重程度和牙周指数密切相关^[21]。本研究发现抑制 miR-150-5p 表达促进了 PDLSCs 增殖及成骨分化。

且过表达 lncRNA MALAT1 可抑制 PDLSCs 中 miR-150-5p 表达, lncRNA MALAT1 可靶向负调控 miR-150-5p 表达,于是推测过表达 lncRNA MALAT1 可能通过抑制 miR-150-5p 表达促进了 PDLSCs 增殖及成骨分化。为了验证上述推测,本实验用 miR-150-5p 模拟物 miR-150-5p mimic 进行了回复实验,结果 miR-150-5p mimic 逆转了过表达 lncRNA MALAT1 对 PDLSCs 增殖及成骨分化的促进作用。证实了推测的合理性。

miRNA 通过靶向 mRNA 的 3' 非翻译区在 mRNA 的转录后调控中发挥关键作用,导致 mRNA 降解或翻译抑制^[22]。为了进一步探究 lncRNA MALAT1/miR-150-5p 轴调控 PDLSCs 增殖及成骨分化的分子机制,本实验证实了 XBP1 为 miR-150-5p 的靶基因。XBP1 是一种转录因子,据报道,过表达 XBP1 促进了牙龈卟啉单胞菌来源的脂多糖诱导的脂肪细胞胰岛素信号通路的激活^[23]。本研究中, XBP1 mRNA 在已分化 PDLSCs 中高表达,亦提示 XBP1 可促进 PDLSCs 分化。且过表达 lncRNA MALAT1 后, PDLSCs 中 miR-150-5p 下调表达, XBP1 mRNA 及蛋白表达上调,与此同时 miR-150-5p mimic 逆转了过表达 lncRNA MALAT1 对 PDLSCs 中 XBP1 mRNA 及蛋白表达的促进作用。这证明了过表达 lncRNA MALAT1 可能通过调控 miR-150-5p/XBP1 轴促进人 PDLSCs 增殖和成骨分化。然而 PDLSCs 增殖和成骨分化分子机制复杂且多样,本研究仅局限在体外细胞水平, lncRNA MALAT1 的调控作用和机制还需通过体内实验进一步深入挖掘。

综上所述,过表达 lncRNA MALAT1 可能通过下调 miR-150-5p 促进 XBP1 表达进而促进人 PDLSCs 增殖和成骨分化。该研究可能为牙周炎的治疗提供新的参考依据。

参考文献:

- [1] ZHAO Ying, QUAN Yue, LEI Ting, et al. The role of inflammasome NLPR3 in the development and therapy of periodontitis[J]. International Journal of Medical Sciences, 2022, 19(10): 1603-1614.
- [2] SUN Xuefei, LI Zhidan, DONG Shaojie, et al. Long

- non-coding RNA SNHG5 promotes osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via mediating miR-23b-3p/Runx2 axis[J]. International Journal of Medical Sciences, 2023, 20(7): 958-968.
- [3] HAN Ruiqi, ZHANG Wenjuan, ZHANG Lina, et al. Notoginsenoside R1 promotes proliferation and osteogenic differentiation of hPDLSCs via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Drug Design, Development and Therapy, 2022, 16: 4399-4409.
- [4] WANG Hong, GAO Shuting, DISSANAYAKA W L. Circ_0003764 regulates the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells[J]. International Dental Journal, 2024, 74(5): 1110-1119.
- [5] ZHOU Yuan, XU Zhuo, WANG Yuanyi, et al. LncRNA MALAT1 mediates osteogenic differentiation in osteoporosis by regulating the miR-485-5p/WNT7B axis[J]. Frontiers in Endocrinology (Lausanne), 2023, 13: 922560.
- [6] GU Nan, WANG Yao, LI Lingfeng, et al. The mechanism of lncRNA MALAT1 targeting the miR-124-3p/IGF2BP1 axis to regulate osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells[J]. Clinical Oral Investigations, 2024, 28(4): 219.
- [7] 陈静涛, 王燕, 李宝东, 等. MiR-150-5p 下调通过激活 Wnt 信号通路促进人牙周膜干细胞成骨分化及 MMP2 表达 [J]. 临床与病理杂志, 2021, 41(12): 2763-2770.
- CHEN Jingtao, WANG Yan, LI Baodong, et al. MiR-150-5p downregulation facilitates osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells and MMP2 expression via activating Wnt signaling pathway[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2021, 41(12): 2763-2770.
- [8] CUI Ziwei, QIN Ruoshan, FENG Jianbao, et al. XBP1s gene of endoplasmic reticulum stress enhances proliferation and osteogenesis of human periodontal ligament cells [J]. Tissue and Cell, 2023, 83: 102139.
- [9] TELES F, COLLMAN R G, MOMINKHAN D, et al. Viruses, periodontitis, and comorbidities[J]. Periodontology 2000, 2022, 89(1): 190-206.
- [10] HERRERA D, SANZ M, KEBSCHULL M, et al. Treatment of stage IV periodontitis: the EFP S3 level clinical practice guideline[J]. Journal of Clinical Periodontology, 2022, 49 (Suppl 22): 4-71.
- [11] MOLINA A, SANZ-SÁNCHEZ I, SANZ-MARTÍN I, et al. Complications in sinus lifting procedures: classification and management[J]. Periodontology 2000, 2022, 88(1): 103-115.
- [12] MOHEBICHAMKHORAMI F, FATTAHI R, NIKNAM Z, et al. Periodontal ligament stem cells as a promising therapeutic target for neural damage[J]. Stem Cell Research & Therapy, 2022, 13(1): 273.
- [13] ZHANG Yunfan, DOU Xueyu, ZHANG Lingyun, et al. Facile fabrication of a biocompatible composite gel with sustained release of aspirin for bone regeneration [J]. Bioactive Materials, 2021, 11: 130-139.
- [14] TU Shaoqin, CHEN Yihua, FENG Yi, et al. LncRNA CYTOR facilitates osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells by modulating SOX11 via sponging miR-6512-3p [J]. Stem Cells International, 2023, 2023: 5671809.
- [15] HUA Li, ZHANG Xiaohong. MALAT1 regulates osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells through mediating miR-155-5p/ETS1 axis [J]. Tissue and Cell, 2021, 73: 101619.
- [16] CHEN Pei, HUANG Yanhong, WANG Yarong, et al. MALAT1 overexpression promotes the proliferation of human periodontal ligament stem cells by upregulating fibroblast growth factor 2[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2019, 18(3): 1627-1632.
- [17] GU Yingzhi, BAI Yuxing. LncRNA MALAT1 promotes osteogenic differentiation through the miR-93-5p/SMAD5 axis[J]. Oral Diseases, 2024, 30(4): 2398-2409.
- [18] YING Ming, ZHANG Bin. Daidzein promotes the proliferation and osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cell[J]. Oral Diseases, 2023, 29(3): 1226-1233.
- [19] FAN Chun, LI Zhiyuan, JI Qiuxia, et al. Carboxymethyl chitin or chitosan for osteoinduction effect on the human periodontal ligament stem cells[J]. Dental Materials Journal, 2022, 41(3): 392-401.
- [20] ZHANG Ying, WANG Fuyou, CHEN Guangxing, et al. LncRNA MALAT1 promotes osteoarthritis by modulating miR-150-5p/AKT3 axis [J]. Cell & Bioscience, 2019, 9: 54.
- [21] HUANG Jing, XU Yuejing, HUANG Pengcheng. Salivary miR-150-5p as an indicator of periodontitis severity and regulator of human periodontal ligament fibroblast behavior by targeting AIFM2[J]. Journal of Periodontal Research, 2024, 59(1): 187-194.
- [22] 廖烘, 刘伟, 龙运峰. LncRNA NEAT1 通过调节 miR-125b-5p/IGFBP5 轴对血管瘤内皮细胞增殖、凋亡、迁移的实验研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2023, 38(3): 65-71.
- LIAO Hong, LIU Wei, LONG Yunfeng. Experimental study on lncRNA NEAT1 on proliferation, apoptosis and migration of hemangioma endothelial cells by regulating miR-125b-5p/IGFBP5 axis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2023, 38(3): 65-71.
- [23] 陆佳艺, 伍倩琪, 陈伊燕, 等. 牙龈卟啉单胞菌来源的脂多糖通过 X 盒结合蛋白 1 调控脂肪细胞胰岛素信号通路的机制研究 [J]. 华西口腔医学杂志, 2022, 40(2): 148-154.
- LU Jiayi, WU Qianqi, CHEN Yiyan, et al. Mechanism of porphyromonas gingivalis-lipopolysaccharide in regulating the insulin signaling pathway in adipocytes via x-box binding protein 1[J]. West China Journal of Stomatology, 2022, 40(2): 148-154.

收稿日期: 2024-08-22

修回日期: 2024-12-27