

miR-338-5p靶向Runx2对牙槽骨成骨细胞增殖、凋亡及成骨分化的影响

喜天娇, 丁蓓

(西部战区总医院口腔颌面外科 四川 成都 610000)

[摘要]目的: 探究miR-338-5p靶向Runt-相关转录因子2 (Runt-related transcription factor 2, Runx2) 对牙槽骨成骨细胞增殖、凋亡及成骨分化的影响。方法: 分离人牙槽骨成骨细胞, 并对其进行转染。细胞分为过表达miR-338-5p组 (miR-338-5p组) 及其对照组 (miR-NC组)、过表达Runx2组 (Runx2组) 及其对照组 (NC组)、过表达miR-338-5p+Runx2组 (miR-338-5p+Runx2组) 及其对照组 (miR-338-5p+NC组)。双荧光素酶实验验证miR-338-5p对Runx2的调控作用; 细胞计数试剂盒-8 (Cell counting kit-8, CCK-8)、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-Ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 染色检测细胞增殖能力; 流式细胞术检测细胞凋亡能力; 碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, ALP) 染色检测细胞成骨分化能力; RT-qPCR检测细胞miR-338-5p、Runx2 mRNA水平; Western Blot检测细胞Runx2、增殖细胞核抗原 (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、Ki67、B细胞淋巴瘤/白血病-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白 (Bcl-2 related X protein, Bax)、ALP、骨钙素 (Osteocalcin, OCN)、骨桥蛋白 (Osteopontin, OPN) 蛋白水平。结果: miR-338-5p靶向调控Runx2。过表达miR-338-5p后, 细胞存活率、EdU阳性细胞率及成骨分化能力降低, 细胞凋亡率升高, miR-338-5p、Bax蛋白水平升高, Runx2 mRNA和蛋白水平、PCNA、Ki67、Bcl-2、ALP、OCN、OPN蛋白水平降低 ($P < 0.05$); 过表达Runx2后, 细胞存活率、EdU阳性细胞率及成骨分化能力升高, 细胞凋亡率降低, miR-338-5p、Bax蛋白水平降低, Runx2 mRNA和蛋白水平、PCNA、Ki67、Bcl-2、ALP、OCN、OPN蛋白水平升高 ($P < 0.05$); 过表达Runx2能够减弱过表达miR-338-5p对细胞增殖、凋亡及成骨分化能力的影响 ($P < 0.05$)。结论: miR-338-5p靶向Runx2表达抑制牙槽骨成骨细胞增殖和成骨分化能力, 并促进细胞凋亡。

[关键词] miR-338-5p; Runt-相关转录因子2 (Runx2); 牙槽骨成骨细胞; 增殖; 成骨分化

[中图分类号] R781.42 [文献标志码] A [文章编号] 1008-6455 (2025) 05-0006-06

The Effect of MiR-338-5p on Proliferation, Apoptosis and Osteogenic Differentiation of Alveolar Bone Osteoblasts by Targeting Runx2

XI Tianjiao, DING Bei

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Western War Zone General Hospital, Chengdu 610000, Sichuan, China)

Abstract: Objective To explore the effect of miR-338-5p on proliferation, apoptosis and osteogenic differentiation of alveolar bone osteoblasts by targeting Runt-related transcription factor 2 (Runx2). **Methods** Human alveolar bone osteoblasts were isolated and transfected, Osteoblasts divided into Overexpression of miR-338-5p group (miR-338-5p group) and its control group (miR-NC group), overexpression of Runx2 group (Runx2 group) and its control group (NC group), overexpression of miR-338-5p+Runx2 group (miR-338-5p+Runx2 group) and its control group (miR-338-5p+NC group). The dual luciferase report experiment was used to verify the regulatory effect of miR-338-5p on Runx2; cell counting kit-8 (CCK-8) and 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining were used to detect cell proliferation ability; AnnexinV FITC/PI method was used to detect cell apoptosis ability; Alkaline phosphatase (ALP) staining was used to detect cell osteogenic differentiation ability; RT-qPCR was used to detect miR-338-5p, Runx2 mRNA levels; Western blot was used to detect Runx2, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Ki67, B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 related X protein (Bax), ALP, osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN) levels. **Results** miR-338-5p targeted Runx2. After overexpression of miR-338-5p, cell viability, EdU positive cell rate and osteogenic differentiation ability were decreased, Apoptosis rate was increased. miR-338-5p, Bax protein levels were increased, Runx2 mRNA and protein levels, PCNA, Ki67, Bcl-2, ALP, OCN, OPN protein levels were decreased ($P < 0.05$). After overexpression of Runx2, cell viability, EdU positive cell rate and osteogenic differentiation ability were increased,

Apoptosis rate was decreased. miR-338-5p, Bax protein levels were decreased, Runx2 mRNA and protein levels, PCNA, Ki67, Bcl-2, ALP, OCN, OPN protein levels were increased ($P<0.05$); Overexpression of Runx2 could weaken the effects of overexpression of miR-338-5p on cell proliferation, apoptosis and osteogenic differentiation ($P<0.05$). **Conclusion** miR-338-5p inhibits alveolar bone osteoblast proliferation and osteogenic differentiation, and promotes alveolar bone osteoblast apoptosis by targeting Runx2.

Keywords miR-338-5p; Runt-related transcription factor 2(Runx2); alveolar bone osteoblast; proliferation; osteogenic differentiation

牙周炎是一种常见的口腔疾病,是由牙菌斑中的细菌感染引发的慢性炎症,能够导致牙周组织破坏。随着牙槽骨的吸收和牙龈的退缩,最终可能导致牙齿松动甚至缺失^[1]。然而牙周组织的缺损为临床口腔种植带来了极大困难。牙槽骨是骨骼中非常活跃的部分,具有高度可塑性,其吸收与新生的动态平衡是临床牙齿种植的重要生理基础^[2]。成骨细胞是参与骨形成的主要细胞,提高成骨细胞活性和成熟是减少骨丢失的关键因素。因此促进牙槽骨成骨细胞的增殖及成骨分化,并抑制其凋亡,对牙槽骨形成至关重要^[3]。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类长度约20个核苷酸的非编码RNA,其通过特异性结合靶mRNA的3'非翻译区(3'-Untranslated region, 3'-UTR),来抑制靶基因的表达^[4]。研究表明miRNA能够调控成骨细胞的增殖、凋亡及成骨分化^[5]。一项研究显示,miR-338能够抑制成骨细胞MC-3T3-E1和成软骨细胞中Runt-相关转录因子2(Runx2)的表达^[6]。另一项研究显示, circRBM23通过充当miR-338-3p的海绵,增强Runx2的表达,以此促进间充质干细胞从成脂向成骨分化的转变^[7]。上述研究表明miR-338可能通过调控Runx2表达参与成骨分化。Runx2是Runx家族成员,是骨形成过程中最早表达的基因之一,也是成骨细胞分化的标志物^[8]。Runx2能够调节成骨细胞的增殖和分化,并激活下游成骨基因表达,对骨形成和骨代谢的调控具有重要作用^[9]。Target Scan数据库显示miR-338-5p和Runx2间存在结合位点。然而miR-338-5p是否通过调控Runx2表达影响牙槽骨成骨细胞增殖、凋亡及成骨分化尚不清楚。因此本研究拟探究miR-338-5p靶向Runx2表达对牙槽骨成骨细胞增殖、凋亡和成骨分化的影响,以期为牙周炎的治疗提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 人健康牙槽骨标本:本研究使用的健康牙槽骨样本由西部战区总医院颌面外科患者提供,患者因阻生牙或正畸需求需进行拔牙。患者年龄22~38岁,其牙龈健康,无牙根尖病变及牙槽骨吸收,无骨代谢疾病。本研究已获得患者和家属同意,患者均自愿提供牙槽骨标本。本研究经过笔者医院伦理委员会批准,批准号为20220324。牙槽骨标本采集:术中患者牙槽窝内壁少量的牙槽骨被收集,并放置在预冷的低糖DMEM培养液中备用。

1.2 主要试剂和仪器:细胞计数试剂盒-8(CCK-8)购自北京奥秘佳得医药科技有限公司(货号:0mc-03);细

胞凋亡检测试剂盒购自北京百奥莱博科技有限公司(货号:QN1317);ALP、茜素红S染色试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司(货号分别为:P0321S、C0148S);Runx2、增殖细胞核抗原(PCNA)、Ki67、B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体购自北京博奥森生物技术有限公司(货号分别为:bsm-52672R、bs-2007R、bs-23104R、bsm-33411M、bsm-33283M)。碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(OCN)、骨桥蛋白(OPN)抗体购自英国Abcam公司(货号分别为:ab229126、ab133612、ab254514)。

Steril GARD超净工作台购自美国Thermo公司;5418R低温高速离心机购自德国Eppendorf公司;NanoDropOneC紫外分光光度计购自美国Thermo公司;实时荧光定量PCR仪购自美国Applied Biosystems公司。

1.3 人牙槽骨成骨细胞的培养和鉴定

1.3.1 牙槽骨成骨细胞的培养:收集牙槽骨组织,用磷酸盐缓冲液(PBS)溶液漂洗3次,去除表面杂质;将牙槽骨组织剪碎成体积约 1 mm^3 的骨粒,继续用PBS溶液漂洗至骨粒透亮。用0.25%胰蛋白酶和0.1% I型/II型胶原酶混合液,在37℃下消化30 min。离心收集骨粒,并使用改良伊格培养基(DMEM)培养基清洗,以去除未消化完全的组织。将骨粒接种于含10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素的DMEM培养基中,进行常规培养,培养前3 d避免挪动,此后每隔3天换液1次,当细胞密度达到80%时,用0.25%胰蛋白酶消化3 min,然后加入DMEM培养基并反复吹打细胞,用反复贴壁法进行纯化,纯化后的细胞继续进行常规培养,取第3代牙槽骨成骨细胞进行鉴定。

1.3.2 牙槽骨成骨细胞的鉴定

1.3.2.1 形态鉴定:在第3代牙槽骨成骨细胞培养过程中,通过倒置显微镜观察细胞形态,以确定其是否符合成骨细胞的特征。

1.3.2.2 ALP染色:将第3代牙槽骨成骨细胞接种于成骨诱导液(含10%胎牛血清+1%青霉素/链霉素+10 mM 3-甘油磷酸钠+0.2 mM抗坏血酸+100 nM地塞米松)中,每两天换液1次,成骨诱导3周后,进行细胞爬片,细胞爬满玻片后,用PBS溶液清洗细胞,然后加入ALP固定液,室温孵育3 min。之后用PBS溶液再次清洗细胞,加入ALP孵育液,避光孵育20 min。最后用PBS溶液清洗细胞,并进行镜检,以观察ALP染色结果。

1.3.2.3 茜素红染色:当第3代牙槽骨成骨细胞产生钙化

结节后,用Genmed清理液清洗细胞,然后加入Genmed固定液,室温孵育10 min。接着用Genmed清理液清洗细胞,加入Genmed染色液,室温孵育至橙红色。最后用Genmed清理液清洗细胞,并进行镜检,以观察茜素红染色结果。

1.4 细胞处理和分组:取第3代牙槽骨成骨细胞,常规培养,当密度达到80%时,进行转染。参照LipofectamineTM3000说明书,将miR-338-5p模拟物(miR-338-5p mimic)及其对照(NC mimic)、pcDNA3.1-Runx2质粒及其对照(pcDNA3.1质粒)分别或联合与Lipofectamine 3000溶液混合,将混合后的溶液加入到牙槽骨成骨细胞中,分别标记为过表达miR-338-5p组(miR-338-5p组)及其对照组(miR-NC组)、过表达Runx2组(Runx2组)及其对照组(NC组)、过表达miR-338-5p+Runx2组(miR-338-5p+Runx2组)及其对照组(miR-338-5p+NC组)。转染4 h后更换培养基,继续培养24 h。使用RT-qPCR技术检测各组细胞中miR-338-5p、Runx2 mRNA水平。培养结束后,收集各组细胞备用。

1.5 靶基因预测和双荧光素酶实验:利用Target Scan数据库(https://www.targetscan.org/vert_72/)预测miR-338-5p和Runx2的结合位点。分别构建野生型质粒pMIR-Runx2-WT和突变型质粒pMIR-Runx2-MUT。利用LipofectamineTM3000分别将两种质粒与miR-338-5p mimic及miR-NC mimic混合物转染至牙槽骨成骨细胞中,转染24 h后,利用双荧光素酶检测试剂盒检测荧光素酶活性。

1.6 细胞增殖能力检测

1.6.1 CCK-8法检测细胞存活率:将各组培养后的细胞收集起来,更换为含10% CCK-8溶液的培养基,然后在37℃下孵育1 h。之后检测各组样品在450 nm处的吸光度值,并计算细胞存活率。

1.6.2 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)染色检测细胞增殖:将各组培养后的细胞收集起来,加入EdU工作液,在37℃下孵育2.5 h,弃去培养液,加入4%多聚甲醛固定15 min,再用漂洗液漂洗3次,加入曲拉通X-100(Triton X-100)透化处理15 min,漂洗液漂洗3次,之后加入Click反应液,避光孵育30 min,漂洗液漂洗3次,最后加入4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色液避光孵育10 min,漂洗液漂洗3次,进行镜检。

1.7 细胞凋亡能力检测:采用AnnexinV-FITC/碘化丙啶(PI)法。将各组培养后的细胞收集起来,PBS溶液清洗后,用结合缓冲液重悬细胞,接着,加入Annexin V-FITC和PI染色液,充分混匀后,室温避光孵育15 min,最后,加入结合缓冲液来终止反应,并使用流式细胞仪进行细胞凋亡的检测。

1.8 RT-qPCR检测:将各组培养后的细胞收集起来,加入Trizol裂解液裂解细胞,离心取上清液,加入氯仿/异丙醇进行RNA抽提,用75%乙醇漂洗RNA沉淀,加入无酶水溶解RNA,通过电泳检测并定量RNA。利用cDNA反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA(反应条件:37℃,15 min;

85℃,5 s)。使用SYBR Green试剂盒进行扩增(反应条件:95℃,5 min;95℃,10 s,60℃,30 s,40个循环)。以U6、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参,校正待测基因的Ct值。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算miR-338-5p、Runx2 mRNA相对表达量。PCR引物序列如下。miR-338-5p上游引物:5'-ACGGTACTAACAATATCCTGG-3';miR-338-5p下游引物:5'-AGTGCAGGGTCCGAGG-3';Runx2上游引物:5'-CCTCTGACTTCTGCCTCTGG-3';Runx2下游引物:5'-ATGAAATGCTTGGGAAGTGC-3';U6上游引物:5'-GTCACCTTCTGGTGGCGGTAA-3';U6下游引物:5'-GTTTCAGTAGAGGGTCAAAA-3';GAPDH上游引物:5'-GGTTGTCTCCTGCGACTTCA-3';GAPDH下游引物:5'-CCCTAGGCCCTCTGTAT-3'。

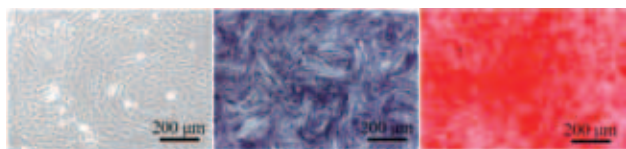
1.9 Western Blot检测:将各组培养后的细胞收集起来,加入RIPA裂解液进行匀浆,离心后取上清液。使用蛋白测定试剂盒检测样品蛋白浓度。将各组等量蛋白与上样缓冲液混合,沸水浴变性10 min。准备分离胶和浓缩胶,将胶板放入电泳槽中,加入电泳缓冲液。将各组待测样品和蛋白Marker依次上样,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(90 V,20 min;120 V,60 min)。电泳结束后进行电转(100 V,90 min)。转膜结束后,将聚偏二氟乙烯膜在5%脱脂奶粉中室温封闭2 h,含吐温-20的Tris盐酸缓冲液(TBST)漂洗后,加入Runx2、PCNA、Ki67、Bcl-2、Bax、ALP、OCN、OPN一抗(1:2 000)4℃孵育过夜,TBST漂洗后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000)室温孵育2 h。TBST漂洗后,加入增强型化学发光(ECL)发光液,进行曝光、显影,使用Image J软件分析各蛋白条带灰度值。

1.10 统计学分析:使用SPSS 16.0软件进行统计学分析。细胞存活率、EdU阳性率、细胞凋亡率、ALP活性、miR-338-5p、Runx2 mRNA、Runx2、PCNA、Ki67、Bcl-2、Bax、ALP、OCN、OPN蛋白水平均为计量数据,均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间计量数据的比较使用单因素方差分析,多组间两两比较使用LSD-t检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 牙槽骨成骨细胞的鉴定:镜检结果显示,第3代牙槽骨成骨细胞多呈现椭圆形、立方形或不规则形,细胞体积较大,胞核呈圆形,胞质丰富。ALP染色显示细胞内存在大量蓝紫色颗粒。茜素红染色显示细胞内存在大量橙红色钙化结节。见图1。

2.2 miR-338-5p和Runx2之间的调控关系:靶标预测显示,miR-338-5p与Runx2 mRNA存在结合位点。荧光素酶实验显示,与miR-NC组相比,miR-338-5p组野生型Runx2荧光素酶活性明显降低($P < 0.05$),而突变型Runx2荧光素酶活性没有明显变化($P > 0.05$)。RT-qPCR和

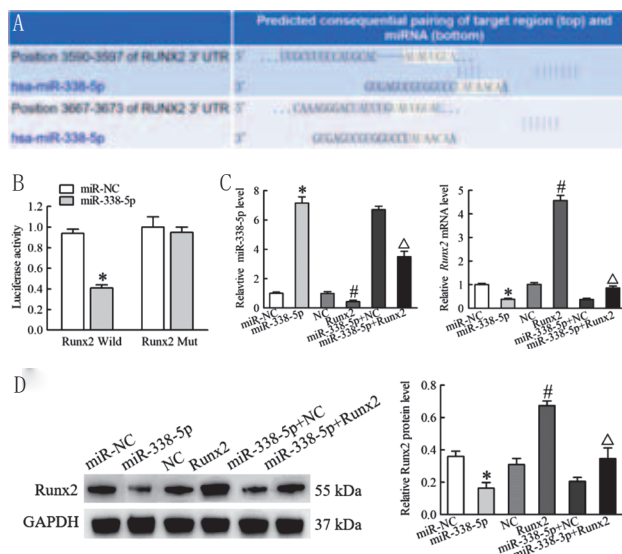


注: A. 第3代牙槽骨成骨细胞形态观察; B. ALP染色; C. 茜素红染色

图1 牙槽骨成骨细胞的鉴定

Western blot结果显示,与miR-NC组相比,miR-338-5p组细胞miR-338-5p水平明显升高,Runx2 mRNA和蛋白水平明显降低($P < 0.05$);与NC组相比,Runx2组miR-338-5p水平明显降低,Runx2 mRNA和蛋白水平明显升高($P < 0.05$);与miR-338-5p+NC组相比,miR-338-5p+Runx2组miR-338-5p水平明显降低,Runx2 mRNA和蛋白水平明显升高($P < 0.05$)。见图2。

2.3 miR-338-5p靶向Runx2对牙槽骨成骨细胞增殖的影响: CCK-8、EdU染色结果显示,与miR-NC组相比,miR-338-5p组细胞存活率、EdU阳性率明显降低($P < 0.05$);与NC组相比,Runx2组细胞存活率、EdU阳性率明显升高($P < 0.05$);与miR-338-5p+NC组相比,miR-338-5p+Runx2组细胞存活率、EdU阳性率明显升高($P < 0.05$)。Western blot结果显示,与miR-NC组相比,miR-338-5p组细胞PCNA、Ki67蛋白水平明显降低($P < 0.05$);与NC组相比,Runx2组细胞PCNA、Ki67蛋白水平明显升高($P < 0.05$);与miR-338-5p+NC组

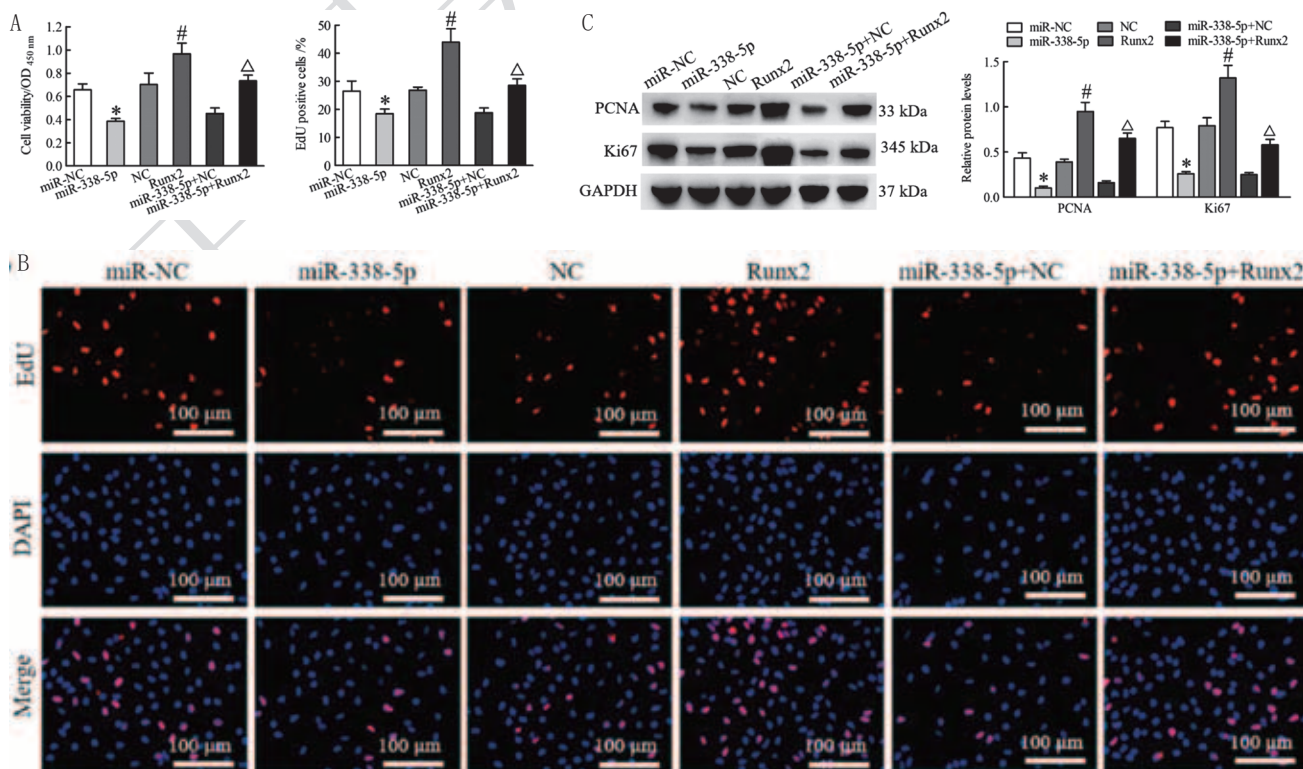


注: A. miR-338-5p和Runx2的结合示意图; B. 荧光素酶实验; C. RT-qPCR检测细胞miR-338-5p、Runx2 mRNA水平; D. Western blot检测细胞Runx2蛋白水平。*表示与miR-NC组比较, $P < 0.05$; #表示与NC组比较, $P < 0.05$; ^表示与miR-338-5p+NC组比较, $P < 0.05$

图2 miR-338-5p和Runx2之间的调控关系

相比,miR-338-5p+Runx2组细胞PCNA、Ki67蛋白水平明显升高($P < 0.05$)。见图3。

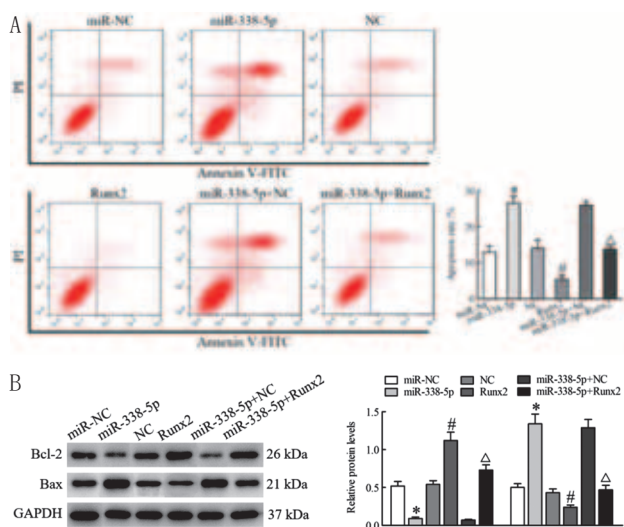
2.4 miR-338-5p靶向Runx2对牙槽骨成骨细胞凋亡的影响: 流式细胞术结果显示,与miR-NC组相比,miR-338-5p组细



注: A. CCK-8实验检测细胞存活率; B. EdU染色检测细胞增殖; C. Western blot检测细胞PCNA、Ki67蛋白水平。*表示与miR-NC组比较, $P < 0.05$; #表示与NC组比较, $P < 0.05$; ^表示与miR-338-5p+NC组比较, $P < 0.05$

图3 miR-338-5p靶向Runx2对牙槽骨成骨细胞增殖的影响

胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$)；与NC组相比，Runx2组细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$)；与miR-338-5p+NC组相比，miR-338-5p+Runx2组细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$)。Western blot结果显示，与miR-NC组相比，miR-338-5p组细胞Bcl-2蛋白水平明显降低，Bax蛋白水平明显升高 ($P < 0.05$)；与NC组相比，Runx2组细胞Bcl-2蛋白水平明显升高，Bax蛋白水平明显降低 ($P < 0.05$)；与miR-338-5p+NC组相比，miR-338-5p+Runx2组细胞Bcl-2蛋白水平明显升高，Bax蛋白水平明显降低 ($P < 0.05$)。见图4。



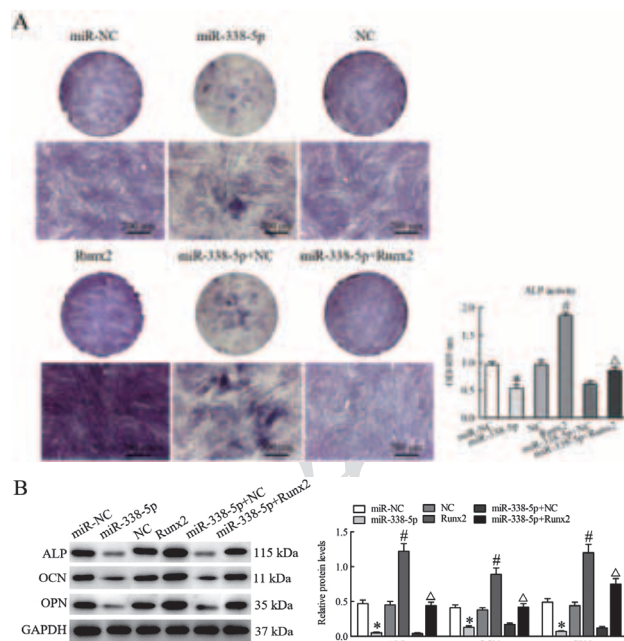
注：A. 流式细胞术检测细胞凋亡；B. Western blot检测细胞Bcl-2、Bax蛋白水平。*表示与miR-NC组比较， $P < 0.05$ ；#表示与NC组比较， $P < 0.05$ ；△表示与miR-338-5p+NC组比较， $P < 0.05$

图4 miR-338-5p靶向Runx2对牙槽骨成骨细胞凋亡的影响

2.5 miR-338-5p靶向Runx2对牙槽骨成骨细胞成骨分化的影响：ALP染色结果显示，与miR-NC组相比，miR-338-5p组细胞蓝紫色染色较浅，ALP活性明显降低 ($P < 0.05$)；与NC组相比，Runx2组细胞蓝紫色染色加深，ALP活性明显升高 ($P < 0.05$)；与miR-338-5p+NC组相比，miR-338-5p+Runx2组细胞蓝紫色染色加深，ALP活性明显升高 ($P < 0.05$)。Western blot结果显示，与miR-NC组相比，miR-338-5p组细胞ALP、OCN、OPN蛋白水平明显降低 ($P < 0.05$)；与NC组相比，Runx2组细胞ALP、OCN、OPN蛋白水平明显升高 ($P < 0.05$)；与miR-338-5p+NC组相比，miR-338-5p+Runx2组细胞ALP、OCN、OPN蛋白水平明显升高 ($P < 0.05$)。见图5。

3 讨论

牙槽骨成骨细胞是参与牙槽骨形成的主要细胞，其活性和成熟度对于骨形成具有关键作用。研究表明，miRNA对成骨细胞的增殖、凋亡及成骨分化能力具有调控作用^[10-11]。一项研究显示，miR-338-3p在去卵巢小鼠中表



注：A. ALP染色；B. Western blot检测细胞ALP、OCN、OPN蛋白水平。*表示与miR-NC组比较， $P < 0.05$ ；#表示与NC组比较， $P < 0.05$ ；△表示与miR-338-5p+NC组比较， $P < 0.05$

图5 miR-338-5p靶向Runx2对牙槽骨成骨细胞成骨分化的影响

达上调，过表达miR-338-3p能够抑制成骨细胞分化标志物如成骨细胞特异性转录因子 (Osterix, Osx) 的表达，从而减少成骨向分化^[12]。另一项研究显示，miR-338-3p通过抑制ALP、OCN、OPN、Runx2水平，负调控骨髓间充质干细胞的成骨分化，从而加剧骨质疏松症^[13]。尽管已有研究表明miR-338-3p具有抑制成骨分化的作用，但关于miR-338-5p在调控成骨细胞增殖、凋亡及成骨分化方面的研究尚未见报道。本研究首次构建了过表达miR-338-5p的牙槽骨成骨细胞，并发现过表达miR-338-5p后，细胞存活率、EdU阳性细胞率、成骨分化水平均明显降低，细胞凋亡率升高。同时检测了与细胞增殖、凋亡和成骨分化相关的蛋白表达水平，发现过表达miR-338-5p能够降低PCNA、Ki67、Bcl-2、ALP、OCN、OPN、Runx2蛋白水平，提高Bax蛋白水平。这些结果证明了miR-338-5p是牙槽骨成骨细胞中的重要调节因子，能够抑制牙槽骨成骨细胞的增殖和成骨分化，并促进其凋亡。

Runx2是Runx家族的核心成员，它在骨形成过程中扮演着至关重要的角色^[14]。作为成骨细胞分化的重要标志物，Runx2能够调控成骨细胞的增殖和分化，进而影响骨形成和骨代谢的过程^[15]。之前的研究显示，茶多酚可以提高人牙槽骨成骨细胞中Runx2的表达，从而促进成骨细胞的增殖并抑制其凋亡^[16]。另外，敲除Runx2基因能够抑制MC3T3-E1细胞的成骨分化^[17]。本研究构建了过表达Runx2的牙槽骨成骨细胞模型，并发现过表达Runx2后，细胞的存活率、

EdU阳性细胞率以及成骨分化水平都有所升高,而细胞凋亡率明显降低。同时与细胞增殖、凋亡和成骨分化相关的蛋白表达水平也发生了相应的变化。这些结果进一步证实了Runx2在促进牙槽骨成骨细胞的增殖和成骨分化,以及抑制其凋亡方面的重要作用。此外,通过Target Scan数据库预测和双荧光素酶实验验证,本研究发现miR-338-5p和Runx2之间存在直接的结合位点,这意味着miR-338-5p可以靶向调控Runx2的表达。更为重要的是,本研究首次发现过表达Runx2能够部分逆转过表达miR-338-5p对牙槽骨成骨细胞增殖、凋亡及成骨分化的调节作用。见图6。

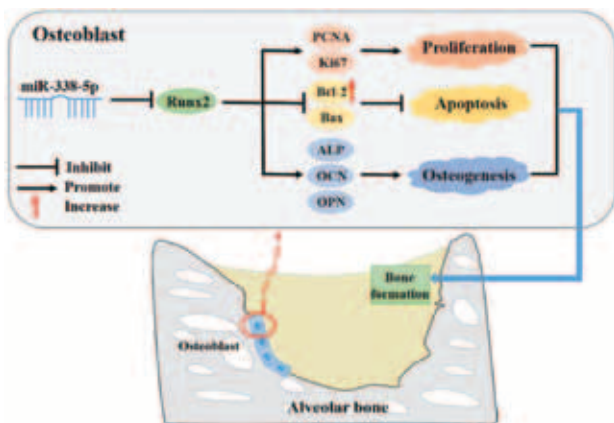


图6 miR-338-5p靶向Runx2表达对牙槽骨成骨细胞增殖、凋亡和成骨分化的影响

综上所述,miR-338-5p靶向Runx2表达抑制牙槽骨成骨细胞增殖和成骨分化能力,并促进细胞凋亡。这为进一步了解牙槽骨成骨细胞的调控机制提供了新的视角,并为牙周组织再生和牙周疾病的治疗提供了潜在的靶点。

[参考文献]

- [1]杜美娟,胡庆玲,安圣洁,等.即刻种植联合PRF对前牙缺失患者牙槽骨吸收及龈沟液骨代谢指标的影响[J].中国美容医学,2022,31(6):145-148.
- [2]Cao Y X, Zhang X M, Hu M L, et al. CYLD inhibits osteoclastogenesis to ameliorate alveolar bone loss in mice with periodontitis[J]. J Cell Physiol, 2023,238(5):1036-1045.
- [3]Yang L N, Liu J, Shan Q S, et al. High glucose inhibits proliferation and differentiation of osteoblast in alveolar bone by inducing pyroptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020,522(2):471-478.
- [4]陈国勇,吴芳. miRNA-132通过Wnt/ β -catenin信号通路促进牙周膜干细胞成骨分化的研究[J].中国美容医学,2022,31(6):88-92,109.
- [5]Miao M M, Zhang Y, Wang X P, et al. The miRNA-144-5p/IRS1/AKT axis regulates the migration, proliferation, and mineralization of osteoblasts: A mechanism of bone repair in diabetic osteoporosis[J].

Cell Biol Int, 2022,46(12):2220-2231.

- [6]Zhang Y, Xie R L, Croce C M, et al. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011,108(24):9863-9868.
- [7]Gao J W, Song M K, Wu D Z, et al. CircRBM23 regulates the switch between osteogenesis and adipogenesis of mesenchymal stem cells via sponging miR-338-5p[J]. Clin Sci (Lond), 2023,137(6):495-510.
- [8]Shang N, Bhullar K S, Hubbard B P, et al. Tripeptide IRW initiates differentiation in osteoblasts differentiation via the RUNX2 pathway[J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2019,1863(6):1138-1146.
- [9]Li M, Zhang C, Li X H, et al. Isoquercitrin promotes the osteogenic differentiation of osteoblasts and BMSCs via the RUNX2 or BMP pathway[J]. Connect Tissue Res, 2019,60(2):189-199.
- [10]Li Z Y, Liu Y X, Huang Y Y, et al. Circ_0000888 regulates osteogenic differentiation of periosteal mesenchymal stem cells in congenital pseudarthrosis of the tibia[J]. iScience, 2023,26(10):107923.
- [11]刘国樑,秦明照. miR-338-3p通过靶向RUNX2负调控人骨髓间充质干细胞成骨分化且促进骨质疏松[J].川北医学院学报, 2021,36(5):551-556.
- [12]朱丽璇,崔玥,罗静. 99Tc-MDP通过miR-338-3p靶向下调RANKL抑制破骨细胞活性机制研究[J].中国骨质疏松杂志,2020,26(2):170-174,185.
- [13]Tong J, Zhang M, Li X, et al. MicroRNA-338-3p regulates age-associated osteoporosis via targeting PCSK5[J]. Mol Med Rep, 2021,23(2):136.
- [14]Jiang Y, Zhu J Q, Chen Z J, et al. CircRNA ARHGAP10 promotes osteogenic differentiation through the miR-335-3p/ RUNX2 pathway in aortic valve calcification[J]. J Thorac Dis, 2023,15(11):5971-5991.
- [15]Liu C Y, Zhang Y J, Guo J, et al. Overexpression of microRNA-93-5p and microRNA-374a-5p suppresses the osteogenic differentiation and mineralization of human aortic valvular interstitial cells through the BMP2/Smad1/5/RUNX2 signaling pathway[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2023,82(2):138-147.
- [16]王海琴,闫冰,李成. 茶多酚通过miR-33a-5p/RUNX2介导人牙槽骨成骨细胞增殖和凋亡[J].中国药师, 2021,24(6):1069-1075.
- [17]Liu D D, Zhang C Y, Liu Y, et al. RUNX2 regulates osteoblast differentiation via the BMP4 signaling pathway[J]. J Dent Res, 2022,101(10):1227-1237.

[收稿日期]2024-01-04

本文引用格式: 喜天娇,丁蓓. miR-338-5p靶向Runx2对牙槽骨成骨细胞增殖、凋亡及成骨分化的影响[J].中国美容医学,2025,34(5):6-11.