

Lin28 过表达部分通过 mTOR 信号通路促进人牙髓干细胞的增殖并抑制成骨分化

邹雨希^{1*}, 孙晶^{2*}, 孙玉¹, 索溪¹, 周文凯¹, 杨建光^{1,3}, 刘岩^{1,3}

摘要 目的 研究 Lin28 过表达通过哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路对人牙髓干细胞(hDPSCs)增殖和成骨分化的影响。方法 通过慢病毒介导稳定转染 Lin28 基因到 hDPSCs 中, qRT-PCR 检测 Lin28 相对表达量。CCK-8 法检测 Lin28 过表达对细胞增殖活性的影响; qRT-PCR 法检测成骨相关基因碱性磷酸酶(ALP)、骨桥素(OPN)和骨钙素(OCN)的 mRNA 相对表达水平; Western blot 法检测 ALP 和 OPN 的蛋白表达水平; 茜素红染色检测细胞矿化能力。结果 与对照组比较, 转染组增殖能力增强($P < 0.05$); 转染组 ALP、OPN、OCN mRNA 及蛋白表达水平显著低于对照组($P < 0.05$); 茜素红染色结果显示转染组形成的矿化结节大小与数目均显著低于空载体组($P < 0.05$)。加入 mTOR 抑制剂雷帕霉素(rapamycin)后, ALP 和 OPN mRNA 表达水平降低($P < 0.05$)。过表达 Lin28 的同时加入 rapamycin, 相比对照组 LV-Lin28 组, OPN 和 OCN 的表达增强($P < 0.05$)。结论 Lin28 过表达可能部分通过 mTOR 信号通路抑制成骨分化。

关键词 Lin28 基因; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 人牙髓干细胞; 增殖; 成骨分化

中图分类号 R 781.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)09-1507-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.012

作为牙髓组织中一类来源于神经嵴的成体干细胞^[1], 牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)可作为组织工程应用的理想种子细胞^[2]。研究^[3]表

明, 在生长因子、受体分子、基因调节和机械刺激等的作用下, 人牙髓干细胞(human dental pulp stem cells, hDPSCs)可分化为成骨细胞、脂肪细胞、成牙本质细胞以及神经细胞等, 对于组织工程学治疗发挥着至关重要的调控作用。

DPSCs 在细胞增殖过程中的干性受到影响, 限制了其在组织工程中的应用, 因此, 如何优化 DPSCs 的干性至关重要。Lin28 可通过调控微小 RNA(miRNA, miRNA)的成熟及稳定对干细胞性能进行调节^[4-6]。近年来, 研究^[7-8]发现, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路在调节 DPSCs 的增殖分化方面发挥着重要作用。但关于 Lin28 调控 hDPSCs 的增殖与分化是否涉及 mTOR 信号通路的相关研究甚少, 该课题将探究 Lin28 对 DPSCs 增殖与分化的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与设备 ① 试剂: I 型胶原酶(Sigma-Aldrich, 美国); 0.25% 胰蛋白酶(HyClone, Thermo Fisher scientific, 美国); α -MEM 培养基、胎牛血清、PBS 缓冲液(Gibco, Thermo Fisher scientific, 美国); CCK-8 试剂盒(碧云天生物试剂有限公司, 上海); 茜素红钙染色试剂盒(Genmed Scientifics INC, 美国); 兔抗 IgG、鼠抗 IgG(Trans 有限公司, 苏州); RNA 裂解液、RIPA 裂解液(碧云天生物技术有限公司, 上海); BCA 蛋白检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司, 上海); 逆转录试剂盒、SYBRPremix Ex Tag™试剂盒(Takara Bio, 日本)。② 设备: 荧光倒置显微镜(Teneo VS, FEI, 美国); 5% CO₂ 细胞培养箱、高速冷冻离心机、PCR 仪(Thermo Fisher Scientific, 美国); Tanon4500 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司, 上海); 酶标仪(Biotek, 美国); 电泳仪、电泳转印系统(BIO-RAD, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 hDPSCs 的分离和培养 收集来自徐州市口腔医院 16~25(19.81 ± 2.83) 周岁患者(知情同意)

2023-05-04 接收

基金项目: 江苏省高等学校基础科学研究面上省资助项目(编号: 22KJB320024); 徐州市重点研发计划项目(编号: KC22218)

作者单位: ¹徐州医科大学口腔医学院, 徐州 221004

²山东大学齐鲁医学院口腔医学院, 济南 250014

³徐州医科大学附属口腔医院, 徐州 221002

作者简介: 邹雨希, 女, 本科生;

杨建光, 男, 博士, 讲师, 责任作者, Email: 852342747@qq.com

刘岩, 女, 博士, 讲师, 责任作者, Email: 1563625177@qq.com

* 对本文具有同等贡献

因阻生或正畸拔除的新鲜完整无龋坏的前磨牙或第三磨牙,获得徐州医科大学伦理委员会批准(伦理编号:202207S125)。在无菌操作台中,对牙齿进行消毒冲洗,凿开牙齿,取出牙髓组织,0.01 mmol/L PBS 反复冲洗,放至含有 3.3 mg/ml 浓度胶原酶的 ep 管中,无菌手术剪剪碎,放入 37 °C,5% CO₂ 培养箱中消化 40 min 后,800 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 10 % 胎牛血清的 α-MEM 培养基重悬,接种于培养皿。每隔 3 d 更换一次新鲜培养基继续培养。约 1~2 周显微镜下可见细胞从组织块中爬出,当细胞汇合至 80 % 时按 1:4 比例传代或冻存,以备后续实验使用。(见图 1)。

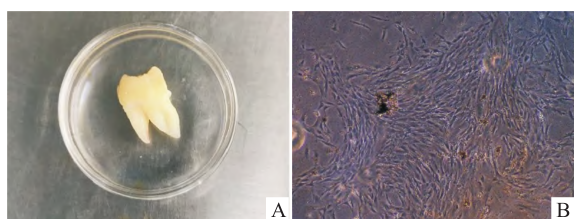


图1 原代 hDPSCs 的分离培养

A:新鲜完整无龋坏的第三磨牙;B:培养 1~2 w 长梭形细胞从组织块中爬出 ×10

1.2.2 实验分组 取对数生长期的第 3 代 hDPSCs 进行实验,以下是本实验的设计及分组:第一部分实验:探索 Lin28 过表达对 hDPSCs 的增殖与分化的影响。将第 3 代 hDPSCs 随机分为两组:①Lin28 慢病毒转染的过表达组(Lentivirus-Lin28,即 LV-Lin28),②转染空载体的对照组(Lentivirus-NC,即 LV-NC)。第二部分实验:进一步探索影响 hDPSCs 增殖与分化的机制是否涉及 mTOR 信号通路。采用 mTOR 信号通路抑制剂 rapamycin,寻找对 mTOR 信号通路抑制的最佳浓度,将细胞随机分为 6 组:①正常对照组;②10 nmol/L rapamycin 组;③50 nmol/L rapamycin 组;④100 nmol/L rapamycin 组;⑤900 nmol/L rapamycin 组;⑥1 μmol/L rapamycin 组。选取最佳抑制浓度进行后续实验,随机分为两组:①10 nmol/L rapamycin 组;②不加抑制剂的正常对照组 control 组。探究抑制 mTOR 通路后对细胞增殖和成骨分化能力的影响。第三部分实验:根据第二部分实验可得出 rapamycin 的最佳浓度,研究 Lin28 与 rapamycin 共同作用对 hDPSCs 增殖及分化的影响,将细胞随机分为 4 组:①LV-NC + DMSO 组;②LV-NC + 10nmol/L rapamycin 组;③LV-Lin28 + DMSO 组;④LV-Lin28 + 10nmol/L rapamycin 组。

1.2.3 慢病毒转染 构建慢病毒包装的 Lin28 基

因过表达载体。通过前期实验确定最适慢病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)及嘌呤霉素(Puromycin)最佳筛选浓度,以达到最显著实验效果。将第 3 代 hDPSCs 接种于 24 孔板中,按 MOI 值 = 200 加入慢病毒,转染 24 h 后更换为含 1 μg/ml 嘌呤霉素的新鲜培养基筛选稳转细胞株,转染 72 h 后荧光显微镜下观察细胞转染效率并及时更换新鲜培养基。稳转细胞株于转染后 72 h 进行收集,通过 qRT-PCR 法检测 Lin28 基因的转染效率。(F = 12.223,见图 2,3)。

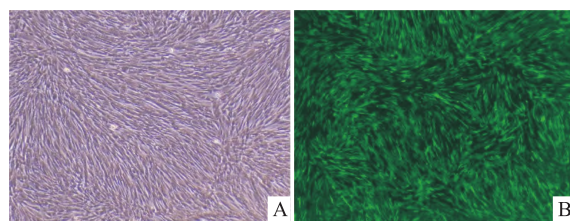


图2 Lin28 慢病毒转染 hDPSCs ×10

A:明场显微镜下;B:荧光显微镜下

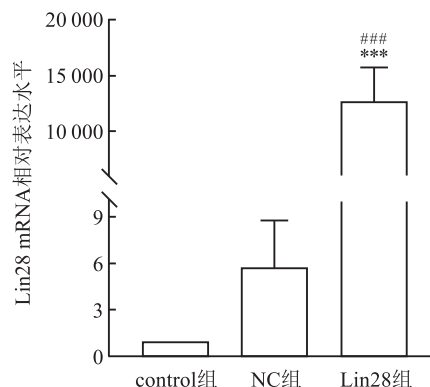


图3 qRT-PCR 检测 hDPSCs 中 Lin28 mRNA 表达水平

与 control 组比较:*** P < 0.001;与 NC 组比较:### P < 0.001

1.2.4 CCK-8 检测细胞增殖活性 按前述分组,将对数生长期的第 3 代 hDPSCs 按 2 × 10³ 个/孔密度接种于 96 孔板中,分别培养至 24、48、72 h 时加入 10 μL/孔 CCK-8 试剂,培养箱静置温育 2 h,酶标仪检测 450 nm 处吸光度值(OD_{450nm}),各孔 OD_{450nm} 代表该孔 hDPSCs 增殖活性。实验重复 3 次,以对照组为参照进行统计学分析。

1.2.5 实时定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测目的基因表达水平 按实验分组设计,将对数生长期的第三代 hDPSCs 按 2 × 10⁵ 个/孔密度接种于 6 孔板,培养 72 h 后提取细胞总 RNA。每孔加入 1 ml RNA 裂解液冰上裂解 5 min,提取细胞样本总 RNA,分光光度仪检测 RNA 浓度及纯度,选择 RNA 纯度(A260 nm/A280 nm)介于 1.8~2.1 的样本进行后

续实验步骤。参照 TAKARA 反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA,并根据 SYBR® Premix Ex Tag™ 试剂盒说明以 cDNA 为模板配置 20 μ l 反应体系,设置预变性 95 $^{\circ}$ C、30 s,1 个循环,PCR 反应 95 $^{\circ}$ C、5 s,60 $^{\circ}$ C、30 s,40 个循环的反应程序。每个样本设置 3 个复孔,以 β -actin 为内参,采用 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 法进行标准化校正,检测 Lin28、ALP、OPN 及 OCN mRNA 的相对表达量。引物由上海捷瑞生物工程有限公司设计合成(见表 1)。

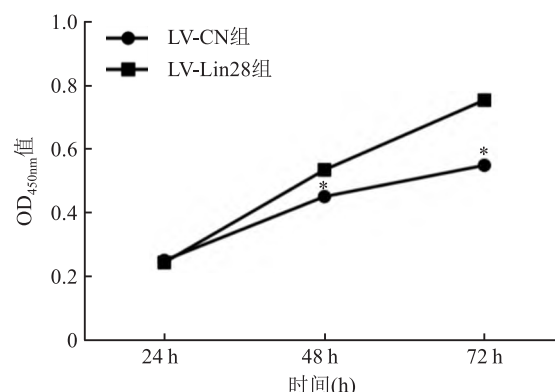
表 1 引物序列表(5'-3')

基因	序列(5'-3')
Lin28	F: GCACCAGATAAGCTGCACA R: GAATAGCCCCACCCATTGT
ALP	F: GTCACCTCTGCCTTCACCAT R: CTTTCCAGAGCCTTCCACAG
OPN	F: GCCGTGGGAAGGACAGTTAT R: GCTCATTGCTCTCATCATTGG
OCN	F: TGAGAGCCCTCACACTCCTC R: ACCTTTGTCTGGACTCTGCAC
β -actin	F: AGCGAGCATCCCCAAAGTT R: GGGCACGAAGGCTCATCATT

1.2.6 Western blot 法检测目的蛋白表达水平 细胞样本用预冷 PBS 洗涤后加入 RIPA 裂解液(含 0.01% PMSF)冰上裂解 10 min,提取细胞样本总蛋白,BCA 法定量测定蛋白浓度。按 1/4 蛋白样品量加入 SDS-蛋白上样缓冲液 100 $^{\circ}$ C、5 min 煮沸变性;根据蛋白分子量大小配置适宜浓度十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶,将蛋白电泳分离并转移到 PVDF 膜上;5% 脱脂牛奶封闭膜上非特异性结合位点,室温摇床 1 h,TBST 洗膜 3 次,10 min/次;分别加入 Lin28 抗体、ALP 抗体、OPN 抗体(1:1 000 稀释)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;第二天(d),TBST 洗涤 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗(1:10 000 稀释),室温摇床孵育 1.5 h;然后 TBST 洗涤 3 次,避光配置 ECL 发光液,A 液、B 液按 1:1 吹打混匀滴于 PVDF 膜上蛋白标记位置,待显影,使用 Tanon4500 成像系统进行曝光并可视化印迹。以内参 β -actin 的灰度值为标准,利用 Image. J 软件对 Lin28 蛋白的表达水平进行分析,计算目的蛋白相对表达量。

1.2.7 成骨诱导及茜素红染色 按前述分组将第 3 代 DPSCs 以密度为 2×10^5 /孔接种于在六孔板中,培养至汇合度达 80% 时,改用新鲜配置的成骨诱导液(含 10% FBS,10 mmol/L β -甘油磷酸钠,50 μ g/mL 维生素 C,0.1 μ mol/L 地塞米松)分别诱导 7、

14、21 d,PBS 洗涤,加入 40 mmol/L 茜素红染液 1 ml,室温静置 20~30 min,PBS 洗涤至呈淡红色,倒置显微镜下察看、拍摄。

图 4 Lin28 过表达对 hDPSCs 增殖的影响
与 LV-NC 组比较: * $P < 0.05$

1.3 统计学处理 应用 SPSS 27.0 进行统计学分析,实验所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验进行两两比较,单因素方差分析及 SNK 法进行多组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Lin28 过表达对 hDPSCs 增殖活性的影响

CCK-8 结果表明:与 LV-NC 组相比, LV-Lin28 组的 OD_{450nm} 值在 24、48、72 h 三个时间点呈逐渐上升趋势,且 LV-Lin28 组的 OD_{450nm} 值明显高于 LV-NC 组,差异有显著性意义($P < 0.05$)。提示 Lin28 基因过表达促进了 hDPSCs 的增殖活性。(见图 4)。

2.2 Lin28 过表达对 hDPSCs 成骨分化能力的影响

在 hDPSCs 成骨诱导后的第 21 d 对细胞样本进行茜素红染色,并检测各组细胞成骨相关基因及蛋白的表达水平。如图 5A 所示,在相同条件下进行成骨诱导,染色后于倒置显微镜下观察到 LV-Lin28 组形成橘红色矿化结节的大小与数目均显著低于 LV-NC 组;采用 qRT-PCR 法对细胞成骨相关基因进行检测,可见 LV-Lin28 组 ALP、OPN、OCN mRNA 相对表达水平均显著低于 LV-NC 组,差异显著(0.075 ± 0.005 ; 0.279 ± 0.123 ; 0.207 ± 0.015 ; $P < 0.05$,图 5B);由 Western blot 实验结果可知, LV-Lin28 组的细胞 ALP、OPN、OCN 蛋白的相对表达水平与对照组相比呈明显降低趋势(ALP: 0.961 ± 0.007 , $F = 10.951$; OPN: 0.507 ± 0.017 , $F = 15.740$; OCN: 0.820 ± 0.023 , $F = 15.956$, $P < 0.05$,图 5C)。由此可知, Lin28 过表达抑制 hDPSCs 的成骨分化。

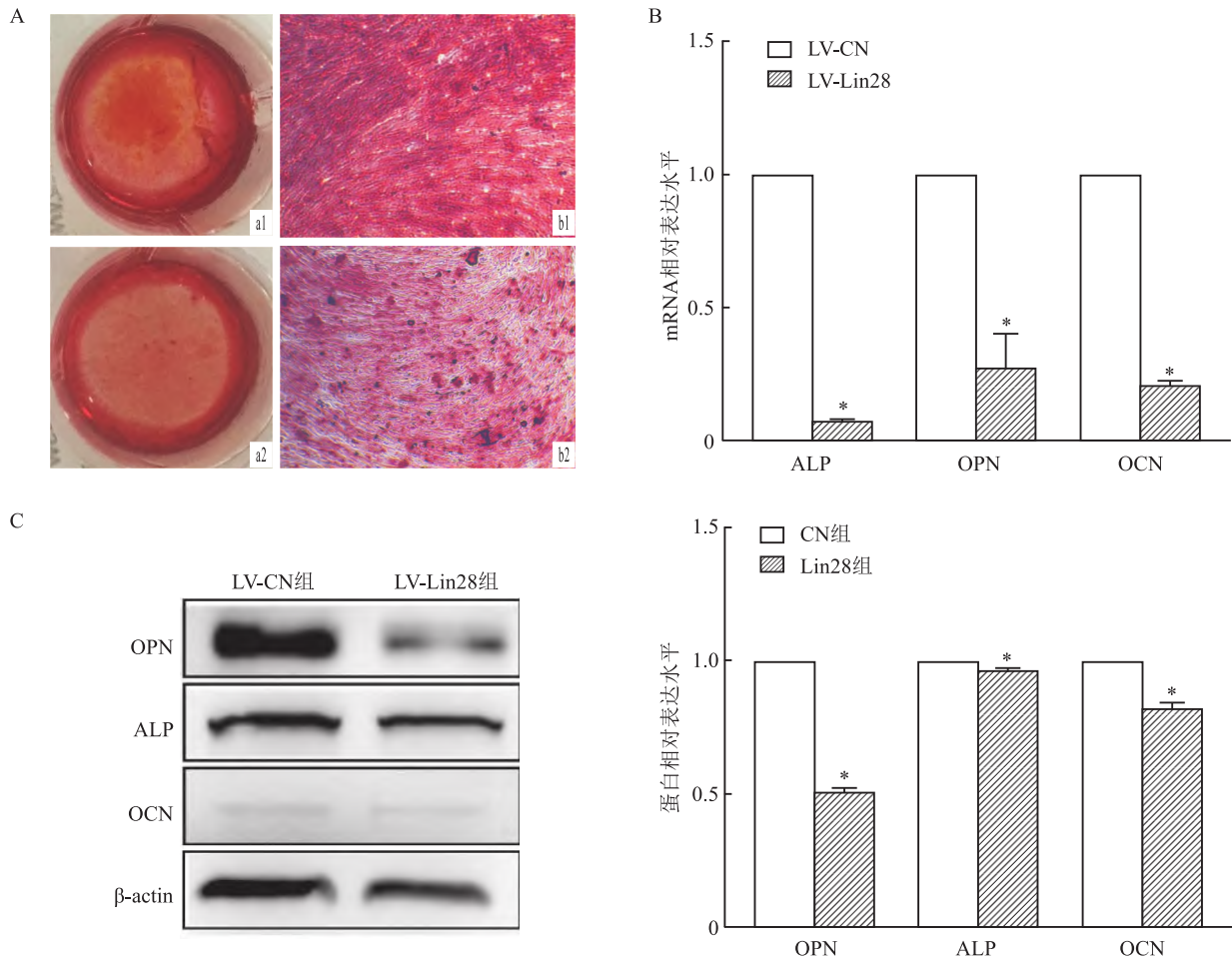


图5 Lin28 过表达对 hDPSCs 成骨分化能力的影响

A:成骨诱导 21 d 后茜素红染色,1:control 组,2:Lin28 组;a:肉眼观察,b:显微镜下观察矿化结节形成情况 ×10;B:成骨诱导 21 d 后 qRT-PCR 检测 ALP、OPN、OCN mRNA 相对表达量;与 LV-NC 组比较; * $P < 0.05$;C:成骨诱导 21 d 后 Western blot 检测 ALP、OPN、OCN 蛋白表达情况;与 LV-NC 组比较; * $P < 0.05$

2.3 mTOR 信号通路对 hDPSCs 增殖活性的影响

为进一步探究 mTOR 信号通路对 hDPSCs 增殖的影响,实验中使用 mTOR 信号通路靶向抑制剂 rapamycin 并进行细胞增殖活性的检测。CCK-8 结果显示,rapamycin 处理的 hDPSCs 在 48 h、72 h 时间点处的增殖活性均显著低于对照组 ($P < 0.05$)。此外,48 h 和 72 h 时的 OD_{450nm} 值随着 rapamycin 的浓度升高呈不同程度的下降趋势,且 10 nmol/L 处的 OD_{450nm} 值已存在明显差异 (control 组: 1.257 ± 0.110 , 10 nmol/L rapamycin 组: 0.876 ± 0.006 , $F = 11.912$, $P < 0.05$)。因此,为降低抑制剂对细胞的毒性作用,选取浓度为 10 nmol/L 的 rapamycin 作为抑制细胞增殖活性的最优浓度。(见图 6)。

2.4 mTOR 信号通路对 hDPSCs 成骨分化能力的影响

根据 2.3 实验结果,选取 10 nmol/L rapamycin 进行后续实验,探究 mTOR 信号通路是否会对

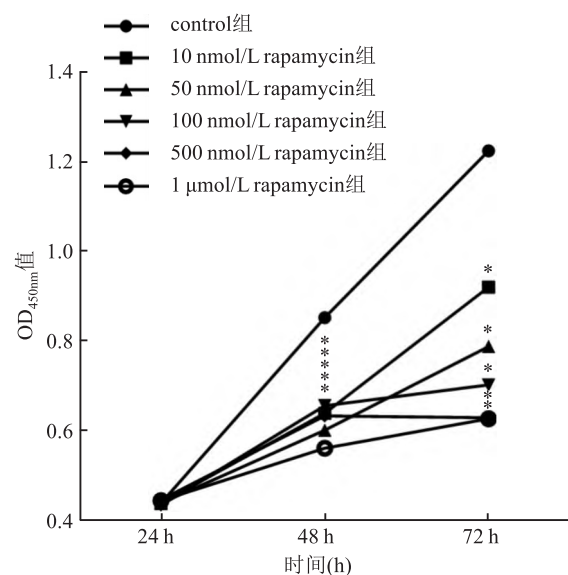


图6 加入 rapamycin 后对 hDPSCs 增殖活性的影响
与 control 组比较; *** $P < 0.001$

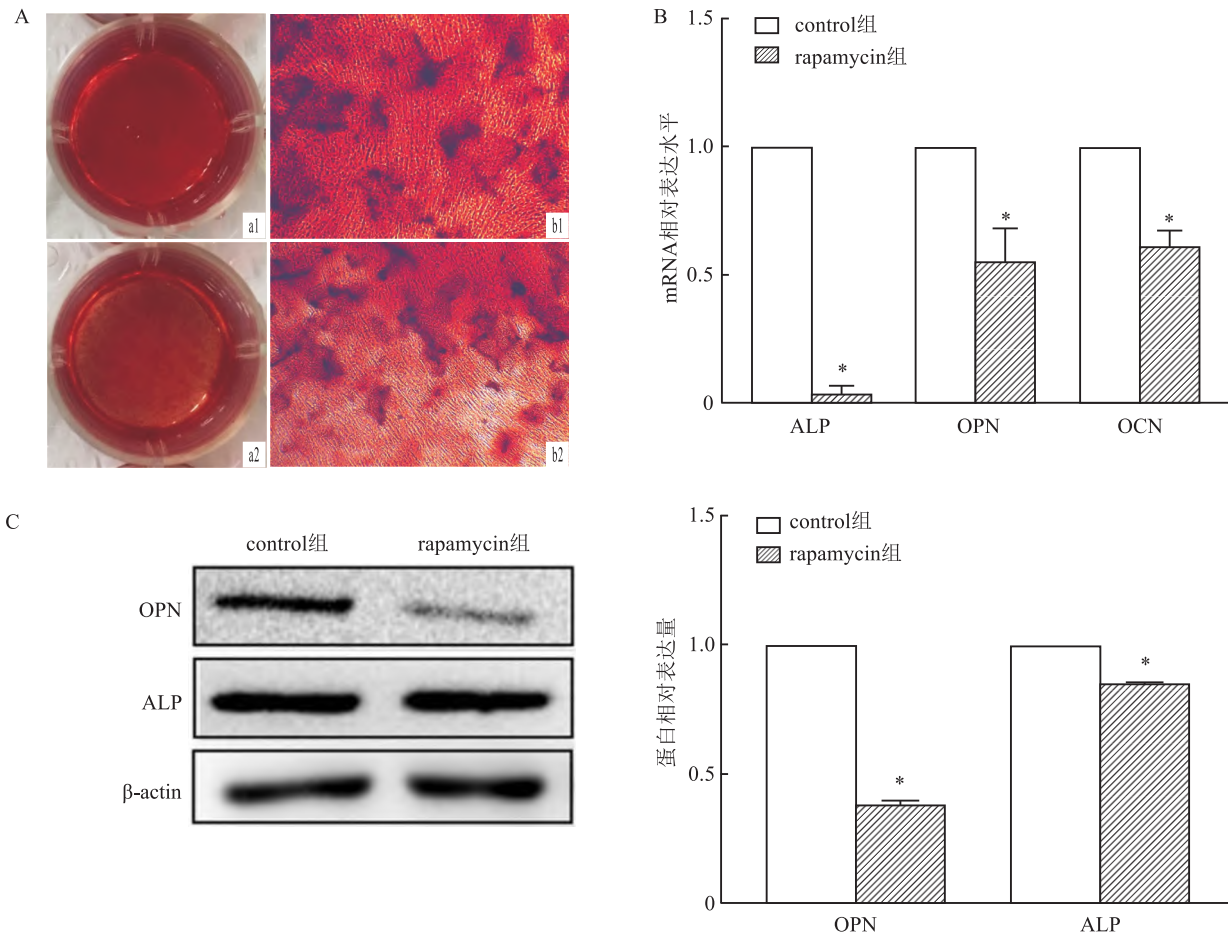


图7 加入 rapamycin 对 hDPSCs 成骨分化能力的影响

A:成骨诱导 21 天后茜素红染色;1:control 组,2:Lin28 组;a:肉眼观察;b:显微镜下观察矿化结节形成情况 $\times 10$;B:成骨诱导 21 d 后 qRT-PCR 检测 ALP、OPN、OCN mRNA 相对表达量;与 control 组比较;* $P < 0.05$;C:成骨诱导 21 d 后 Western blot 检测 ALP、OPN、OCN 蛋白表达情况

hDPSCs 成骨分化能力产生影响。各组细胞在相同环境下成骨诱导 21 d 后进行茜素红染色,结果表明,rapamycin 组的颜色浅于对照组,且形成的矿化结节大小和数目均显著低于对照组(见图 7A);qRT-PCR 结果显示,与对照组相比,rapamycin 组成骨相关基因 ALP、OPN、OCN 表达水平均显著降低(0.049 ± 0.026 ; 0.547 ± 0.129 ; 0.610 ± 0.062 ; $P < 0.05$,见图 7B);Western blot 结果表明,rapamycin 组 ALP 与 OPN 蛋白相对表达水平与对照组相比均呈降低趋势(ALP: 0.849 ± 0.005 , $F = 10.442$; OPN: 0.380 ± 0.014 , $F = 10.845$, $P < 0.05$,见图 7C),OCN 未见明显改变。综上所述,抑制 mTOR 信号通路与 hDPSCs 成骨分化能力的降低密切相关。

2.5 Lin28 过表达通过 mTOR 信号通路对 hDPSCs 增殖与成骨分化的影响 上述结果证实,Lin28 过表达促进 hDPSCs 的增殖、抑制成骨分化。为进一步探索此过程是否涉及 mTOR 信号通路,选取 10 nmol/L rapamycin 对 Lin28 过表达的 hDPSCs 进行处

理,发现相比 LV-Lin28 组,加入 rapamycin 后过表达 Lin28 的 hDPSCs 增殖能力降低,但在 48 h 和 72 h 的时间点仍比 LV-NC 组增强($F = 12.490$, $P = 0.046$; $F = 3.106$, $P = 0.043$, $P < 0.05$,见图 8A)。此外,采用 qRT-PCR 法对成骨相关基因进行检测,与 LV-Lin28 组相比,加入 rapamycin 后的 LV-Lin28 + rapamycin 组细胞中 OPN 及 OCN mRNA 表达水平均升高($F = 6.321$, $P < 0.001$; $F = 5.587$, $P < 0.001$,见图 8B),但 ALP 表达水平无增强,仍低于对照组($P < 0.05$)。提示 Lin28 过表达组加入 rapamycin 后成骨分化能力得以增强。综合考虑上述结果,Lin28 过表达可能部分激活了 mTOR 信号通路,从而促进 hDPSCs 的增殖与抑制成骨分化。

3 讨论

hDPSCs 作为间充质干细胞的成员之一,在组织器官再生中的应用研究越来越受到人们关注^[9-10]。DPSCs 主要通过由细胞因子调控的一系列级联反应

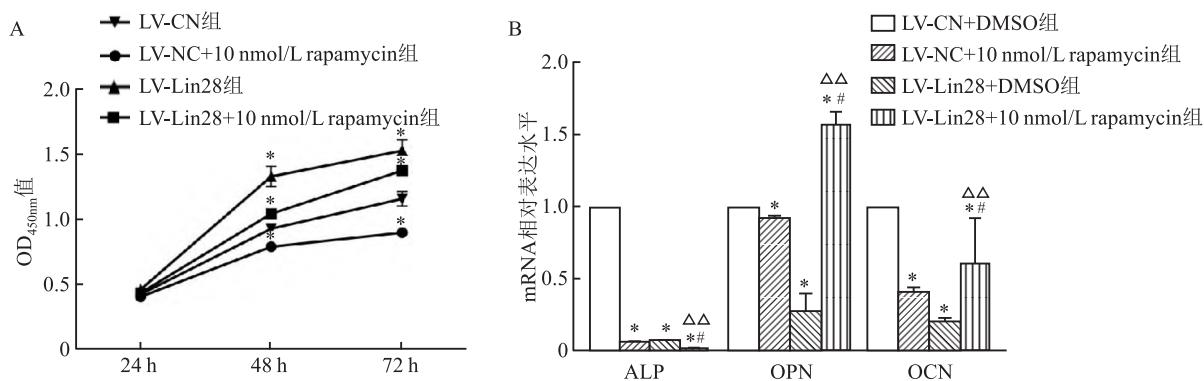


图8 Lin28 过表达部分通过 mTOR 信号通路对 hDPSCs 增殖与成骨分化产生影响

A: CCK-8 法检测随时间变化细胞的增殖情况; B: 成骨诱导 21 d 后 qRT-PCR 检测 ALP、OPN、OCN mRNA 相对表达量; 与 LV-NC 组比较: * $P < 0.05$; 与 10 nmol/L rapamycin 组比较; # $P < 0.05$; 与 LV-Lin28 组比较; $\Delta\Delta P < 0.05$

和一些外源性诱导刺激而产生应答,但具体机制尚不清晰。研究^[11]表明,干性因子和信号通路相关分子,为组织再生提供稳定适宜的微环境。

拥有“青春基因”称号^[12]的 Lin28 基因作为一种高度保守的 RNA 结合蛋白。通过与下游 Let-7 microRNA 特定序列的结合有效阻止转录后的加工过程,提高细胞的增殖活性,改善机体组织器官的代谢功能,可在一定程度上促进损伤的修复、组织器官的再生、血液的自我更新等^[12]。但 Lin28 家族是一种“致癌基因”,在人类的原发肿瘤和肿瘤细胞系中均呈高表达水平,如慢粒白血病、wilms 瘤、肝癌等^[13]。因此,临床中应重视损伤后组织器官的 Lin28 基因稳定、持续、高效地表达,避免因细胞“干性”的异常表达而失去对正常细胞的监控作用。

本实验通过细胞增殖活性和分化能力的检测,发现 Lin28 过表达可促进 hDPSCs 的增殖。ALP、OCN 和 OPN 作为矿化组织特异性蛋白,研究^[14]证实,ALP 和 OCN 是骨形成的生化标志物。ALP 参与骨的形成,是成熟成骨细胞及具备活性的标志,被视作骨形成的最精确标志物之一。同时,OCN 主要是由成骨细胞、成牙本质细胞及成牙骨质细胞生成,在骨组织非胶原蛋白含量中最为丰富,反映骨代谢的总体水平。此外,OPN 也是一种非胶原蛋白,约占骨基质的 2%,是联系 HA(羟基磷灰石)与细胞的桥梁。在不同的条件下,具有促进成骨与激活破骨的双重作用。因此,OPN 在骨改建中也起着重要的作用。通过 qRT-PCR 对其进行检测,发现 Lin28 过表达使 ALP、OPN、OCN mRNA 的表达水平均降低,且茜素红染色实验结果与之相一致,提示 Lin28 过表达抑制了 hDPSCs 的成骨分化。

mTOR 是一种 Ser/Thr 激酶,具有调节细胞生长、增殖、分化和自噬^[15]等多种代谢过程。本实验为研究 Lin28 是否可通过 mTOR 信号通路影响 hDPSCs 的增殖与分化,采用靶向抑制剂 rapamycin 抑制 mTOR 通路,探究其对 hDPSCs 生物学特性的影响。CCK-8、茜素红染色、qRT-PCR 及 Western blot 实验结果显示,rapamycin 抑制 hDPSCs 的增殖与成骨分化。选取 rapamycin 最优浓度处理 Lin28 过表达的 hDPSCs 发现,细胞的增殖能力下降。然而,在 Lin28 过表达的 hDPSCs 中加入 rapamycin 后 ALP、OPN、OCN 三者 mRNA 表达水平变化不一致。OPN 与 OCN mRNA 表达水平提高,但 ALP mRNA 表达水平仍低于对照组(LV-NC)。由此可知, Lin28 过表达的 hDPSCs 加入 rapamycin 后,其成骨分化能力有所增强,但仍弱于对照组(LV-NC)。这表明 Lin28 过表达可能部分通过 mTOR 信号通路影响 hDPSCs 的增殖与分化。

综上所述,本实验证实 Lin28 过表达部分通过 mTOR 信号通路促进 hDPSCs 的增殖,抑制其分化,为 hDPSCs 应用于组织工程学及再生医学提供更多的思路。但是,在临床应用中,为避免癌症的发生发展,如何在合适的范围内调控 Lin28 的表达有待进一步研究。此外,在该过程中 mTOR 信号通路可能与其他信号通路存在交叉作用,因此有必要对相关通路进行深入研究及鉴别。最后,由于 hDPSCs 再生领域的体外实验和动物实验远远多于临床实验,尚且具有一定的偏差性,需要积极推进相关体内实验来进行验证,以充分发挥临床应用的的优势。

参考文献

[1] 李阳阳,张茂林,杨 驰,等. 骨髓干细胞的生物学性能及临床

- 应用研究进展[J]. 口腔医学,2022,42(1):1-7.
- [2] Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(25):13625-30.
- [3] Honda M, Ohshima H. Biological characteristics of dental pulp stem cells and their potential use in regenerative medicine[J]. J Oral Biosci, 2022, 64(1):26-36.
- [4] Kulthanaamondhita P, Kornsuthisopon C, Photichailert S, et al. Specific microRNAs regulate dental pulp stem cell behavior[J]. J Endod, 2022, 48(6):688-98.
- [5] Zou H, Luo J, Guo Y, et al. RNA-binding protein complex LIN28/MSI2 enhances cancer stem cell-like properties by modulating Hippo-YAP1 signaling and independently of Let-7[J]. Oncogene, 2022, 41(11):1657-72.
- [6] G ibadulinova A, Bullova P, Strnad H, et al. CAIX-Mediated control of LIN28/let-7 axis contributes to metabolic adaptation of breast cancer cells to hypoxia[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(12):4299.
- [7] Anfimova P A, Pankrasheva L G, Moiseev K Y, et al. Ontogenetic changes in the expression of the Lin28 protein in the rat hypothalamic tuberal nuclei[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(21):13468.
- [8] Xu H, Zhao J, Chen G, et al. Effects of BMAL1 on dentinogenic differentiation of dental pulp stem cells via PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Int Endod J, 2022, 55(5):505-16.
- [9] Katata C, Sasaki J I, Li A, et al. Fabrication of vascularized DPSC constructs for efficient pulp regeneration[J]. Journal of dental research, 2021, 100(12):1351-8.
- [10] Liu P, Zhang Y, Ma Y, et al. Application of dental pulp stem cells in oral maxillofacial tissue engineering[J]. Int J Med Sci, 2022, 19(2):310-20.
- [11] 程晨, 彭杉, 杨桐, 等. 基于牙髓干细胞的神经系统疾病治疗新进展[J]. 实用口腔医学杂志, 2021, 37(6):853-8.
- [12] Sun Z, Yu H, Zhao J, et al. LIN28 coordinately promotes nucleolar/ribosomal functions and represses the 2C-like transcriptional program in pluripotent stem cells[J]. Protein Cell, 2022, 13(7):490-512.
- [13] Liu L, Li X, Bu W, et al. Carbon dots enhance extracellular matrix secretion for dentin-pulp complex regeneration through PI3K/Akt/mTOR pathway-mediated activation of autophagy[J]. Materials Today Bio, 2022, 16:10344.
- [14] Zhang J, Zhang W, Dai J, et al. Overexpression of Dlx2 enhances osteogenic differentiation of BMSCs and MC3T3-E1 cells via direct upregulation of Osteocalcin and Alp[J]. Int J Oral Sci, 2019, 11(2):119-30.
- [15] 王月涵, 黄颖. HDAC3 负性调控 mTOR 促进低氧诱导 H9C2 心肌细胞自噬[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(10):1575-9.

Lin28 overexpression promotes proliferation and inhibits osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in part through the mTOR signaling pathway

Zou Yuxi¹, Sun Jing², Sun Yu¹, Suo Xi¹, Zhou Wenkai¹, Yang Jianguang^{1,3}, Liu Yan^{1,3}

(¹Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004; ²School and Hospital of Stomatology,

Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan 250014;

³Affiliated Stomatological Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002)

Abstract Objective To investigate the effects of Lin28 overexpression on the proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells (hDPSCs) through mTOR signaling pathway. **Methods** After transfecting lentiviral vectors of Lin28 gene in hDPSCs, the relative expression of Lin28 was detected by Real-time PCR. CCK-8 assay was applied to detect the effect on cell proliferation. qRT-PCR was used to research the expression levels of alkaline phosphatase (ALP), osteopontin (OPN) and osteocalcin (OCN). Western blot assay was processed to investigate the effects on the relative expression levels of ALP and OPN proteins. Alizarin red staining was utilized to detect the mineralized nodules. **Results** Compared with the control group, the cell proliferation of transfection group was promoted ($P < 0.05$); The mRNA and protein expression levels of ALP, OPN and OCN in transfection group were significantly lower than those in control group ($P < 0.05$), the expression level of ALP apparently decreased after the addition of mTOR inhibitor rapamycin ($P < 0.05$); Alizarin red staining showed that the size and number of mineralized nodules formed in transfection group were markedly declined compared with empty carrier group ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of Lin28 can inhibit the osteogenic differentiation of hDPSCs through suppress mTOR signaling pathway.

Key words Lin28; mTOR; human dental pulp stem cells; proliferation; osteogenic differentiation