

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2018.08.002

· 基础研究 ·

miR-27a 调控比格犬上颌窦黏膜干细胞成骨分化的研究

张静¹, 朱双喜², 荣琼³, 彭伟², 李祥², 陈松龄²

1. 广州中医药大学祈福医院口腔科, 广东 广州(511495); 2. 中山大学附属第一医院口腔科, 广东 广州(510080); 3. 云南省第一人民医院口腔科、昆明理工大学附属医院口腔科, 云南 昆明(650032)

【摘要】 目的 检测 miR-27a 在犬上颌窦黏膜干细胞(maxillary sinus membrane stem cells, MSMSCs)成骨分化过程中的表达情况,探讨其在犬上颌窦黏膜干细胞成骨分化中的作用。方法 体外培养犬上颌窦黏膜干细胞,经成骨诱导培养后,RT-PCR 检测 miR-27a 的表达。犬上颌窦黏膜干细胞转染 pre-miR-27a 和 anti-miR-27a 后,RT-PCR 检测 Runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2, Runx2)和骨桥蛋白(osteopontin, OPN) mRNA 的表达,Western blot 检测 Runx2 和 OPN 蛋白的表达。转染 pre-miR-27a 的细胞成骨诱导培养后与 Bio-Oss 复合,建立裸鼠皮下异位成骨模型,观察 miR-27a 体内抑制成骨情况。结果 犬上颌窦黏膜干细胞经成骨诱导培养后,miR-27a 表达量降低。miR-27a 1 d ($t_0 = 3.795, P = 0.023$), 3 d ($t_0 = 4.493, P = 0.011$), 7 d ($t_0 = 11.591, P < 0.001$), 14 d ($t_0 = 12.542, P < 0.001$), 21 d ($t_0 = 5.621, P = 0.008$) 的表达量均高于 0 d 组。转染 pre-miR-27a 的犬上颌窦黏膜干细胞经成骨诱导培养后,与阴性对照组相比,成骨标志物 Runx2 mRNA ($t = 4.923, P = 0.007$) 及蛋白($t = 4.425, P = 0.008$)和 OPN mRNA ($t = 5.253, P = 0.006$) 及蛋白($t = 5.132, P = 0.006$) 表达量明显降低。相反,转染 anti-miR-27a 的犬上颌窦黏膜干细胞经成骨诱导培养后,Runx2($t = 3.925, P = 0.013$)和 OPN ($t = 3.712, P = 0.019$) mRNA 表达量比阴性对照组明显升高。单纯培养细胞与 Bio-Oss 复合后,在裸鼠皮下有成骨表现;但转染 pre-miR-27a 的犬上颌窦黏膜干细胞与 Bio-Oss 复合后,犬上颌窦黏膜干细胞在裸鼠皮下异位新骨形成面积减少($t = 7.219, P = 0.002$)。结论 miR-27a 负向调控上颌窦黏膜干细胞成骨分化。

【关键词】 miR-27a; 上颌窦黏膜干细胞; 成骨分化; Runt 相关转录因子 2; 骨桥蛋白

【中图分类号】 R782.13 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2018)08-0484-07

【引用著录格式】 张静,朱双喜,荣琼,等. miR-27a 调控犬上颌窦黏膜干细胞成骨分化的研究[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(8): 484-490.

Role of miR-27a in the osteogenic differentiation of beagle maxillary sinus membrane stem cells ZHANG Jing¹, ZHU Shuangxi², RONG Qiong³, PENG Wei², LI Xiang², CHEN Songling². 1. Department of Stomatology, Clifford Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 511495, China; 2. Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Stomatology, The First People's Hospital of Yunnan Province, The Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650032, China.

Corresponding author: CHEN Songling, Email: surgman@sohu.com, Tel: 0086-20-87755766

【Abstract】 Objective To detect the expression level of miR-27a during the osteogenic differentiation of beagle maxillary sinus membrane stem cells (MSMSCs) and explore the role of miR-27a in the osteogenic differentiation of MSMSCs. **Methods** Beagle MSMSCs were cultured in vitro. The expression level of miR-27a was detected via RT-

【收稿日期】 2018-01-13; **【修回日期】** 2018-03-26

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81371111); 广东省医学科学技术研究基金项目(A2018419); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项项目(2017FE468-168)

【作者简介】 张静, 主治医师, 本科, Email: 544967651@qq.com

【通信作者】 陈松龄, 教授, 博士, Email: chensongling@hotmail.com

PCR after an osteogenic inductive culture was prepared. The mRNA expression levels of Runx2 and OPN were examined via RT-PCR, and the protein expression levels of Runx2 and OPN were examined via Western blot after the cells were transfected with pre-miR-27a or anti-miR-27a. Finally, osteoprogenitor cells transfected with pre-miR-27a were composited with Bio-Oss particles and subcutaneously implanted into nude mice to form ectopic bone formation models, and then the inhibition of bone formation from miR-27a was observed in vivo. **Results** The expression level of miR-27a in the beagle MSMSCs decreased after osteogenic inductive culturing. The relative miR-27a levels were significantly decreased at day 1 ($t = 3.795$, $P = 0.023$), day 3 ($t = 4.493$, $P = 0.011$), day 7 ($t = 11.591$, $P < 0.001$), day 14 ($t = 12.542$, $P < 0.001$), and day 21 ($t = 5.621$, $P = 0.008$) compared with day 0. In addition, the expression levels of Runx2 mRNA ($t = 4.923$, $P = 0.007$) and protein ($t = 4.425$, $P = 0.008$) were reduced after the cells were transfected with pre-miR-27a. The expression levels OPN mRNA ($t = 5.253$, $P = 0.006$) and protein ($t = 5.132$, $P = 0.006$) were also reduced. In contrast, the mRNA expression levels of Runx2 ($t = 3.925$, $P = 0.013$) and OPN ($t = 3.712$, $P = 0.019$) were increased after the cells were transfected with anti-miR-27a, and bone formation was observed after the subcutaneous implantation of beagle MSMSCs composited with Bio-Oss in nude mice. Nevertheless, ectopic bone formation was inhibited by pre-miR-27a-transfected beagle MSMSCs composited with Bio-Oss ($t = 7.219$, $P = 0.0020$). **Conclusion** MiR-27a negatively regulates the osteogenic differentiation of MSMSCs.

【Key words】 MiR-27a; Maxillary sinus membrane stem cells; Osteogenic differentiation; RUNX2; OPN

随着口腔种植技术的发展,牙种植已成为解决患者牙列缺损或牙列缺失问题的理想修复方法之一。上颌窦底提升术是解决上颌后牙区骨量不足的有效方式,已广泛用于上颌后牙区牙种植。目前已有报道表明上颌窦黏膜干细胞具有成骨能力,其在上颌窦底提升成骨过程中可能发挥重要作用^[1-2],也有研究证实了上颌窦黏膜干细胞具有成骨分化能力^[3]。但上颌窦黏膜干细胞的成骨机制未见报道。

miRNAs 是一类广泛存在于各类生物体中的非蛋白质编码调控的小分子 RNA,长度 16~29 nt,平均长度为 22 nt^[4]。广泛参与各种生理和病理过程的调控,影响细胞增殖、分化、凋亡、个体生长发育、器官形成、器官衰老、炎症反应、血管形成,创伤修复和肿瘤发生发展^[5-10]。近年来研究发现 miR-27a 可以调控骨髓间充质干细胞的成骨分化^[11-13]。但 miR-27a 对上颌窦黏膜干细胞的作用尚未见报道。

本研究拟分析犬上颌窦黏膜干细胞成骨诱导分化前后 miR-27a 的表达变化。通过细胞转染技术使 miR-27a 过表达或低表达,检测成骨标志物的表达变化,以探讨 miR-27a 在上颌窦黏膜干细胞成骨分化中的作用。通过转染 miR-27a 的细胞复合 Bio-Oss 骨粉植入裸鼠皮下探讨 miR-27a 在体内成骨中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物和主要试剂

年龄 1~2 岁 Beagle 犬,体质量 15~20 kg,购自高要市康达实验动物科技有限公司。

胎牛血清(Gibco,美国);II型胶原酶(Gibco,美国);中性蛋白酶(Roche,美国); α -MEM基础培养基(武汉博士德公司,中国)含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素、2 mmol/L L-谷氨酰胺; α -MEM成骨诱导培养基(武汉博士德公司,中国)含 α -MEM基础培养基、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 mg/L维生素C、 10^{-7} mol/L地塞米松;LipofectamineTM 2000(Invitrogen,美国);pre-miR-27a和anti-miR-27a(Ambion,美国);Cy-3标记的pre-miR negative control和anti-miR negative control(Ambion,美国);TRIzol Reagent(Invitrogen,美国);DAB试剂盒(Abcam,英国);荧光定量PCR检测试剂盒(Takara,日本);兔抗犬Runx2、OPN多克隆抗体(Abcam,英国);羊抗兔IgG-HRP(Abcam,英国);Bio-Oss骨粉(Geistlich,瑞士);图像Pro 5.0分析系统(Media Cybernetics,美国)。

1.2 犬上颌窦黏膜干细胞的分离培养

Beagle犬上颌窦黏膜取材按已报道的手术方法采集^[14]。酶消化法进行细胞原代培养,至70%~80%汇合率时传代,按1:3比例传代扩增培养。免疫磁珠法分选CD146阳性细胞。将小

鼠抗犬 CD146 单克隆抗体按 4 μg/mL 的浓度加入单细胞悬液中,4℃下孵育 30 min 后用 PBS 漂洗细胞两次,去除多余的抗体。选用包被好的小鼠抗犬 IgG 免疫磁珠,使用前将磁珠用 PBS 漂洗两次以去除游离的抗体,并稀释 20 倍。将预处理的磁珠按 4 μL/mL 的浓度放入与一抗充分结合的细胞悬液中,均匀混合后置于室温下孵育 30 min。将结合了磁珠的细胞悬液放入高强磁场中静置 5 min,轻洗吸去试管中的液体,将试管脱离磁场并以 PBS 冲洗试管壁,将粘附在管壁上的细胞(即 CD146 阳性细胞)冲洗下来制成单细胞悬液,取样品滴于

载玻片及细胞计数器上,分别用于细胞纯度分析和活力测定。倒置相差显微镜观察细胞生长情况和细胞形态。

1.3 犬上颌窦黏膜干细胞成骨诱导培养后 miR-27a 检测

生长活力旺盛的 P1 代细胞以 1 × 10⁴ 个/孔接种于 24 孔板中,每组设孔 3 个,α-MEM 成骨诱导培养基培养,诱导第 1、3、7、14、21 天收集细胞,RT-PCR 检测 miR-27a 表达。对照组(0 d)为诱导开始细胞。根据 Gene Bank 数据库中犬 miR-27a 和 U44 的序列设计引物。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Sequence of primers

Gene	Primer	Productlength (bp)
miR-27a	RT:5'-GTCGTATCCAGTGCCTGTCGTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACcggaac -3	73
	F:5'-GGG TTCACACTGGCTAA-3'	
	R:5'-CAGTGCCTGTCGTGGAGT-3'	
U44	F:5'-CCTGTATGATGATAAGCAA-3'	102
	R:5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'	
Runx2	F:5'-GATCATCGCTGACCACCC-3'	165
	R:5'-GACAGTAACCACAGTCCCATCT-3'	
OPN	F:5'-CATGGTTGGCCTTATCCTG-3'	146
	R:5'-CGATGCTGATCCCAATGTAG-3'	
GAPDH	F:5'- ATTCCACGGCACAGTCAAG -3'	418
	R:5'- ATACTCAGCACCAGCATCAC -3'	

1.4 犬上颌窦黏膜干细胞转染 pre-miR-27a 和 anti-miR-27a

生长活力旺盛的 P3 代细胞,胰酶消化,24 孔培养板 α-MEM 培养基悬浮细胞至密度为 1 × 10⁵/mL,99 μL α-MEM 稀释 1 μL Lipofectamine™ 2000 转染试剂,室温放置 10 min,另用 95 μL α-MEM 培养基对 5 μL pre-miR-27a 或 anti-miR-27a 进行稀释。将转染剂的稀释液与 pre-miR-27a 或 anti-miR-27a 的稀释液等体积轻轻混合,室温孵育 10 min,形成转染复合物,将其加入至空白的 24 孔培养板中,每孔 200 μL。然后将 200 μL 细胞悬液加入到转染复合物中,轻轻混匀。每组重复 3 孔,同时设阴性对照组(细胞转染 pre-miR negative control 或 anti-miR negative control),37℃,5%体积分数的 CO₂ 培养。于转染 8 h 后,对转染带 cy3 标记的 negative control 的细胞进行显微镜拍照。

1.5 RT-PCR 检测 Runx2 和 OPN mRNA 的表达

生长活力旺盛的 P3 代犬上颌窦黏膜干细胞以

1 × 10⁴ 个/孔接种于 24 孔板中,分别转染 pre-miR-27a、pre-miR negative control、anti-miR-27a 和 anti-miR negative control,转染后更换 α-MEM 成骨诱导培养基培养 3 d。每组重复 3 孔。3 d 后收集细胞,RT-PCR 检测 Runx2 和 OPN mRNA 的表达。根据 Gene Bank 数据库中犬 Runx2、OPN 和 GAPDH 的 mRNA 序列设计引物。引物序列见表 1。

1.6 Western Blot 检测 Runx2 和 OPN 蛋白的表达

生长活力旺盛的 P3 代犬上颌窦黏膜干细胞以 1 × 10⁴ 个/孔接种于 24 孔板中,分别转染 pre-miR-27a、pre-miR negative control、anti-miR-27a 和 anti-miR negative control,转染后更换 α-MEM 成骨诱导培养基培养 3 d,3 d 后收集细胞,用 RIPA 裂解液充分裂解细胞,12 000 g 于 4℃离心 5 min,提取上清蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。用 5 × 上样缓冲液调整蛋白浓度至适宜范围,99℃煮沸 5 min,在 5%的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中电泳,每孔上样量为 20 μL,内参蛋白为 GAPDH。半干法电转移至

PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,以免抗犬Runx2或OPN多克隆抗体(稀释比例1:400)作为一抗,4℃孵育过夜,羊抗兔IgG-HRP(稀释比例1:500)作为二抗,室温孵育1 h,增强化学发光法显影,Alpha Innotech凝胶成像系统获取图像。结果用Runx2或OPN与内参GAPDH的蛋白条带灰度值比值表示。

1.7 Bio-Oss骨粉复合细胞裸鼠体内异位成骨研究

BALB/c裸鼠于无菌条件下常规饲养。取生长活力旺盛的P₁代犬上颌窦黏膜干细胞,转染pre-miR-27a,转染后更换α-MEM成骨诱导培养基培养3 d。将细胞0.1 mL(4×10⁶个)与40 mg Bio-Oss在37℃的摇床(20 r/min)中复合1 h。水合氯醛按430 mg/kg腹腔注射麻醉裸鼠,将复合有细胞的Bio-Oss骨粉移植入背部皮下,缝合。单纯成骨诱导培养3 d的细胞复合40 mg Bio-Oss作为对照组。各组3只,术后12周处死,取出成形的移植块,4%的多聚甲醛固定12 h,5%的硝酸组织脱钙液脱钙2 h,石蜡包埋,HE染色,拍照。每组随机选择3个切片,利用图像Pro 5.0分析系统计算新骨面积,结果用新骨面积/总截面面积的百分比表示。

1.8 统计方法

采用SPSS 19.0软件进行统计,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数的比较采用t检验。不同时点miRNA表达量采用重复测量的方差分析,组间两两比较采用Dunnett-t检验。检验水平为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 miR-27a在犬上颌窦黏膜干细胞成骨诱导培养过程中的表达变化

犬上颌窦黏膜干细胞经成骨诱导培养后,不同时间点各组比较差异有统计学意义($F = 27.34, P = 0.002$);与0 d比较,1 d ($t_0 = 3.795, P = 0.023$)、3 d ($t_0 = 4.493, P = 0.011$)、7 d ($t_0 = 11.591, P < 0.001$)、14 d ($t_0 = 12.542, P < 0.001$)、21 d ($t_0 = 5.621, P = 0.008$)的miR-27a表达量差异均有统计学意义。随着时间的增加,miR-27a表达量逐渐降低,14 d时表达量降到最低(图1)。

2.2 pre-miR-27a和anti-miR-27a转染效率检测

细胞转染带Cy3标记的阴性对照后,细胞形态无明显改变,仍呈长梭形或多角形,细胞胞质可见红色荧光信号(图2)。

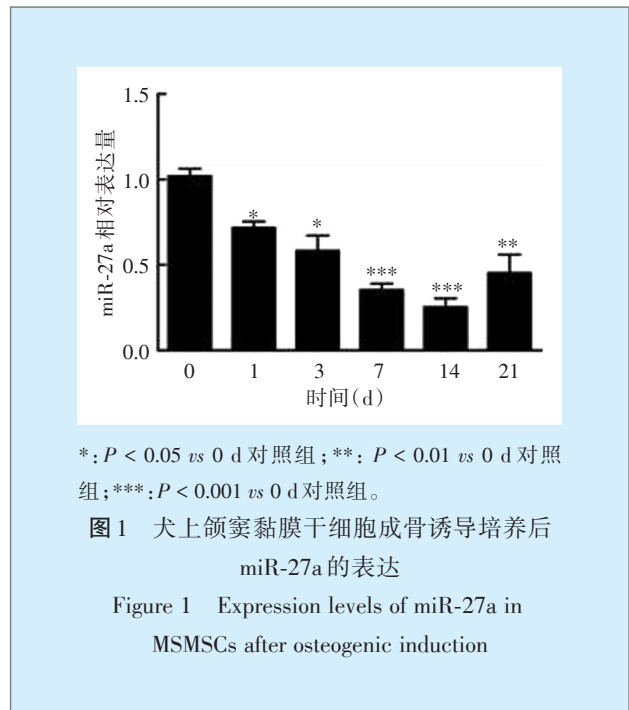
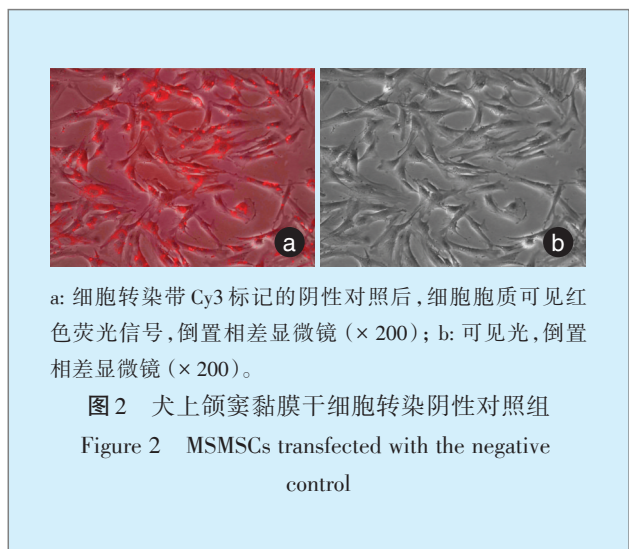


图1 犬上颌窦黏膜干细胞成骨诱导培养后miR-27a的表达

Figure 1 Expression levels of miR-27a in MSMSCs after osteogenic induction

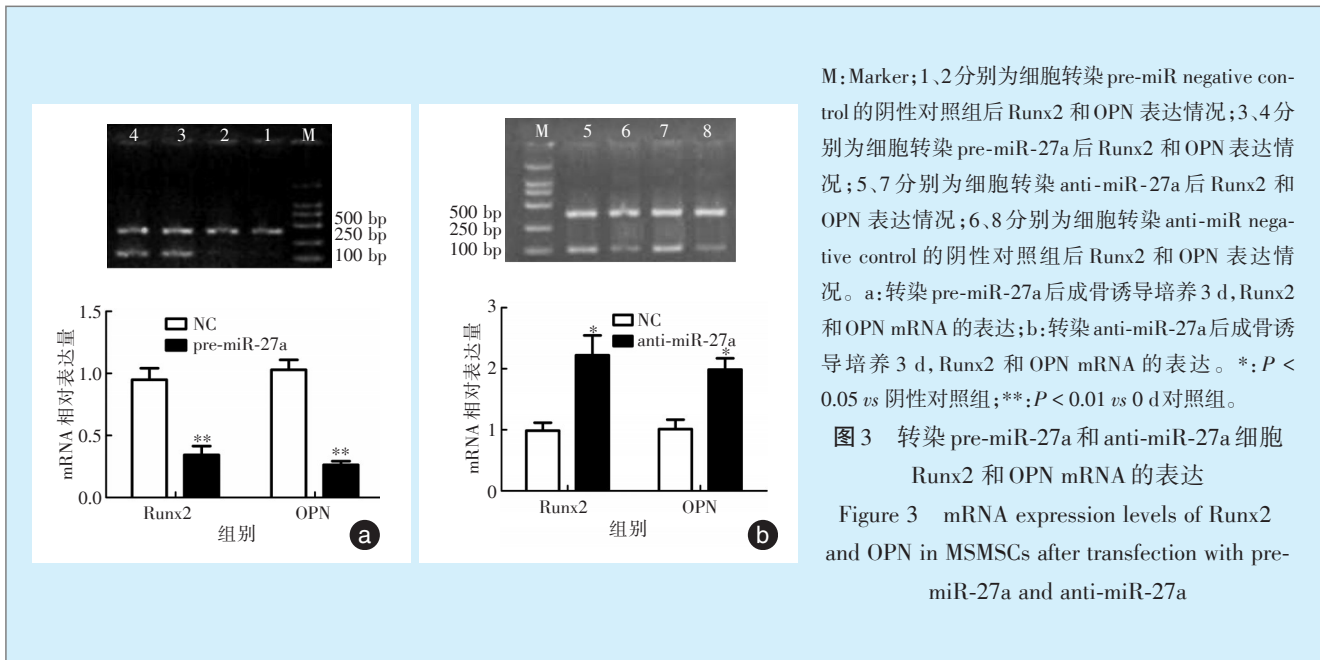


a: 细胞转染带Cy3标记的阴性对照后,细胞胞质可见红色荧光信号,倒置相差显微镜(×200); b: 可见光,倒置相差显微镜(×200)。

图2 犬上颌窦黏膜干细胞转染阴性对照组
Figure 2 MSMSCs transfected with the negative control

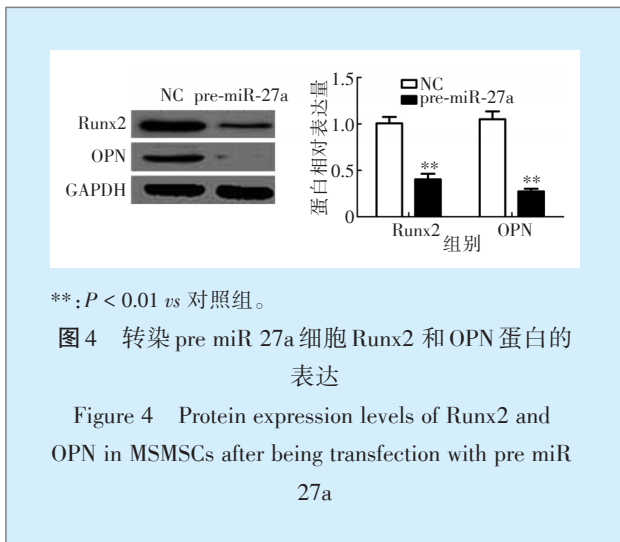
2.3 miR-27a调节犬上颌窦黏膜干细胞表达Runx2和OPN mRNA的情况

细胞转染pre-miR-27a后成骨诱导培养3 d,Runx2 ($t = 4.923, P = 0.007$)和OPN ($t = 5.253, P = 0.006$) mRNA表达量明显降低,与转染pre-miR negative control的阴性对照组相比,两组表达量差异均有统计学意义(图3a)。细胞转染anti-miR-27a成骨诱导培养3 d后,Runx2 ($t = 3.925, P = 0.013$)和OPN ($t = 3.712, P = 0.019$) mRNA表达量升高明显,与转染anti-miR negative control的阴性对照组相比,两组表达量差异均有统计学意义(图3b)。



2.4 miR-27a 调节犬上颌窦黏膜干细胞表达 Runx2 和 OPN 蛋白的情况

细胞转染 pre-miR-27a 成骨诱导培养 3 d 后, Runx2 蛋白表达量明显降低, 与阴性对照组相比, 两组间表达量差异有统计学意义 ($t = 4.425, P = 0.008$); OPN 蛋白表达量明显降低, 与阴性对照组相比, 两组间表达量差异有统计学意义 ($t = 5.132, P = 0.006$, 图 4)。



2.5 复合 Bio-Oss 骨粉裸鼠皮下异位成骨情况

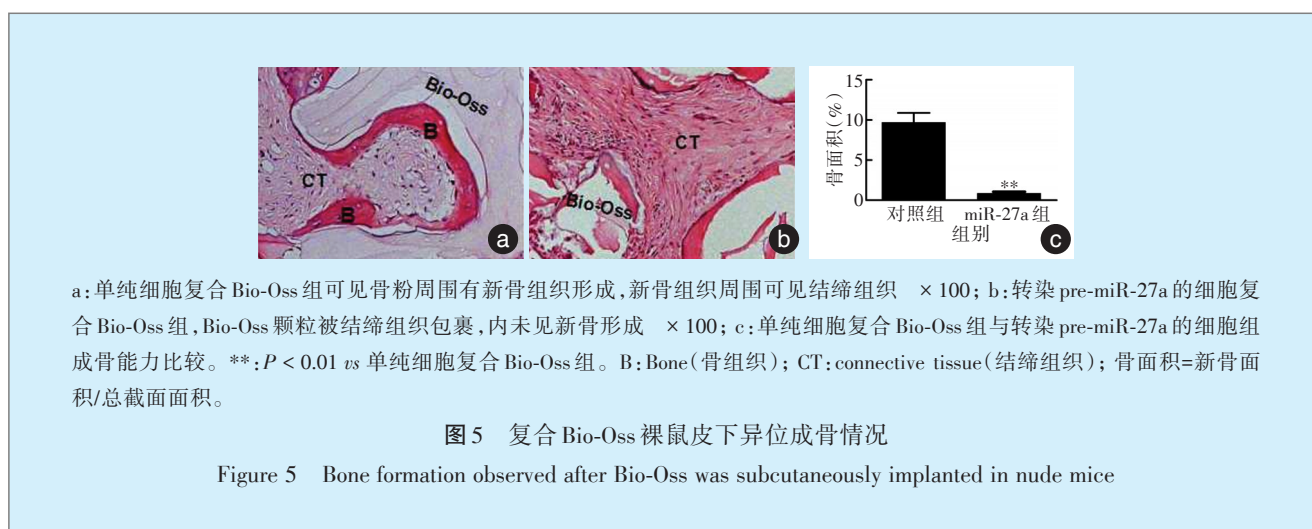
细胞复合 Bio-Oss 骨粉植入裸鼠皮下 12 周, 单纯细胞复合 Bio-Oss 组可见骨粉周围有新骨组织形成, 新骨组织周围可见结缔组织 (图 5a)。转染 pre-

miR-27a 的细胞组 Bio-Oss 颗粒被结缔组织包裹, 内含大量毛细血管, 未见新骨形成 (图 5b)。与单纯细胞复合 Bio-Oss 组相比, 转染 pre-miR-27a 的细胞组新骨形成面积明显降低 ($t = 7.219, P = 0.0020$, 图 5c)。

3 讨论

近年来研究表明上颌窦黏膜干细胞具有成骨作用, 其在上颌窦底提升成骨过程可能发挥重要作用, 研究上颌窦黏膜干细胞的成骨机制, 探索利用上颌窦黏膜干细胞促进上颌窦底提升术后成骨效果对于提高牙种植成功率具有重要意义。

miRNAs 是一类真核生物内源性的小分子单链 RNA, 在调控干细胞的分化中具有重要作用^[13]。有研究发现 miR-27a 的编码基因位于 19 号染色体, 其与多种恶性肿瘤的发生、发展、转移及预后关系密切^[15-18]。研究证明 miR-27a 在成骨过程中也可以发挥重要作用。Gong 等^[13]发现在 Satb2 诱导的 BMSCs 成骨分化的过程中, miR-27a 表达降低, BMSCs 转染过表达 miR-27a 的慢病毒载体后, 成骨标志物 Runx2、ALP、OPN 和 OC 表达明显降低, ALP 活性降低, 茜素红染色钙结节明显减少, 表明 miR-27a 负向调控 BMSCs 成骨分化。Hassan 等^[19]认为 miR-27a 是成骨分化早期重要的负向调控因子, 抑制 MC3T3-E1 细胞早期成骨分化, miR-27a 发挥负向调控的作用是通过其靶基因 SATB2 实现的。Schoolmeesters 等^[20]报道 miR-27a 在 BMSCs 成骨分



化过程中发挥重要的调控作用。miR-27a 的抑制剂可明显促进 BMSCs 成骨分化。Palmieri 等^[21]通过研究发现 miR-27a 可能在早期成骨中发挥作用。Wang 等^[22]则认为 miR-27 在成骨过程中起正向调控作用。

本实验发现犬上颌窦黏膜干细胞经成骨诱导分化后, miR-27a 表达明显降低, miR-27a 随着时间的推移表达量逐渐降低, 14 d 时表达量降到最低。说明上颌窦黏膜干细胞在成骨分化过程中, miR-27a 表达量呈时间依赖性下调。将细胞转染 miR-27a 的前体序列 pre-miR-27a, 促使 miR-27a 过表达, 然后将细胞成骨诱导培养 7 d, 发现成骨标志物 Runx2 和 OPN mRNA 表达量明显降低; Western blot 检测发现 Runx2 和 OPN 在蛋白水平表达也明显降低。实验结果表明 miR-27a 可能在上颌窦黏膜干细胞成骨分化过程中发挥负向调控作用。为了验证 miR-27a 负向调控成骨分化作用, 又将上颌窦黏膜干细胞转染反义核苷酸序列 anti-miR-27a, miR-27a 的表达抑制后, Runx2 和 OPN mRNA 表达量显著升高, 实验结果从反面证实了 miR-27a 负向调控成骨分化作用。这与 Gong^[13]、Hassan^[19] 和 Schoolmeesters^[20] 的报道一致。但与 Wang 等^[22] 的研究结果则相反。究其原因, 可能是细胞种类不同, 即使是同一种 miRNA, 其所表现出的生物学行为也可能不一致。

体内实验能更好地了解 miRNA 在成骨中的作用。本实验将转染 pre-miR-27a 的细胞复合 Bio-Oss 骨粉植入裸鼠皮下探讨 miR-27a 在体内成骨中的作用, 发现单纯经成骨诱导培养的犬上颌窦黏膜干细胞复合 Bio-Oss 骨粉植入裸鼠皮下 12 周后,

骨粉周围有新骨组织形成, 这与报道的人上颌窦黏膜干细胞裸鼠皮异位成骨结果相似^[3]。这再次证实了上颌窦黏膜干细胞具有成骨能力。而转染 pre-miR-27a 的细胞组 Bio-Oss 颗粒被结缔组织包裹, 未见新骨形成。体内实验结果表明 miR-27a 具有抑制上颌窦黏膜干细胞成骨作用, miR-27a 负向调控上颌窦黏膜干细胞成骨分化。这对于研究利用 miR-27a 作为特异性靶点提高上颌窦底成骨能力具有一定的应用前景。

但对于上颌窦黏膜干细胞成骨机制, 小分子 RNA 的研究尚处于探索阶段。虽然本实验结果表明 miR-27a 具有抑制上颌窦黏膜干细胞成骨作用, 但除了 miR-27a 外, 犬上颌窦黏膜干细胞成骨分化过程中还应有其它相关小分子 RNA 调控。前期研究也发现 miR-1827、miR-27b-3p、Lnc-NTF3-5 和 LncRNA-MODR 等其它小分子 RNA 也在上颌窦黏膜干细胞成骨分化过程中发挥作用^[23-26]。因此, 上颌窦黏膜干细胞的小分子网络调控机制需有待进一步深入的研究。

参考文献

- [1] Graziano A, Benedetti L, Massei G, et al. Bone production by human maxillary sinus mucosa cells[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(9): 3278-3281.
- [2] Yun KI, Kim DJ, Park JU. Osteogenic potential of adult stem cells from human maxillary sinus membrane by simvastatin in vitro: preliminary report[J]. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg, 2013, 39(4): 150-155.
- [3] Guo J, Weng J, Rong Q, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human maxillary sinus membrane[J]. Sci Rep, 2015, 5:11660.
- [4] Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal devel-

- opment and human disease[J]. *Development*, 2005, 132(21): 4653-4662.
- [5] Kuninty PR, Bojmar L, Tjomsland V, et al. MicroRNA-199a and-214 as potential therapeutic targets in pancreatic stellate cells in pancreatic tumor[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13):16396-16408.
- [6] Patel Y, Shah N, Lee JS, et al. A novel double-negative feedback loop between miR-489 and the HER2-SHP2-MAPK signaling axis regulates breast cancer cell proliferation and tumor growth[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14): 18295-18308.
- [7] Garg D, Cohen SM. miRNAs and aging: a genetic perspective[J]. *Ageing Res Rev*, 2014, 17(3):3-8.
- [8] Lee J, Park E J, Kiyono H. MicroRNA-orchestrated pathophysiologic control in gut homeostasis and inflammation[J]. *Bmb Rep*, 2016, 49(5):263.
- [9] Banerjee J, Sen CK. microRNA and wound healing[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 888:291-305.
- [10] Zhang X, Peng Y, Jin Z, et al. Integrated miRNA profiling and bioinformatics analyses reveal potential causative miRNAs in gastric adenocarcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(32): 32878-32889.
- [11] Gong Y, Lu J, Yu X, et al. Expression of Sp7 in Satb2-induced osteogenic differentiation of mouse bone marrow stromal cells is regulated by microRNA-27a[J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 417(1/2): 7-16.
- [12] Gu C, Xu Y, Zhang S, et al. miR-27a attenuates adipogenesis and promotes osteogenesis in steroid-induced rat BMSCs by targeting PPAR γ and GREM1[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:38491.
- [13] Gong Y, Xu F, Zhang L, et al. MicroRNA expression signature for Satb2-induced osteogenic differentiation in bone marrow stromal cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 387(1/2): 227-239.
- [14] 荣琼, 朱双喜, 陈松龄, 等. 犬上颌窦底黏膜骨原细胞的培养和成骨性能的研究[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2013, 34(3): 378-386.
- [15] Nikolić Z, Savić Pavićević D, Vučić N, et al. Assessment of association between genetic variants in microRNA genes hsa-miR-499, hsa-miR-196a2 and hsa-miR-27a and prostate cancer risk in Serbian population[J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 99(1): 145-150.
- [16] Peng H, Wang X, Zhang P, et al. miR-27a promotes cell proliferation and metastasis in renal cell carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(2): 2259-2266.
- [17] Pan W, Wang H, Jianwei R, et al. MicroRNA-27a promotes proliferation, migration and invasion by targeting MAP2K4 in human osteosarcoma cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(2): 402-412.
- [18] Bai RP, Weng Y, Su LL, et al. Association of a pre-miR-27a polymorphism with cancer risk: an updated meta-analysis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(23): 10107-10114.
- [19] Hassan MQ, Gordon JA, Beloti MM, et al. A network connecting Runx2, SATB2, and the miR-23a~27a~24-2 cluster regulates the osteoblast differentiation program[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(46): 19879-19884.
- [20] Schoolmeesters A, Eklund T, Leake D, et al. Functional profiling reveals critical role for miRNA in differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5605.
- [21] Palmieri A, Pezzetti F, Brunelli G, et al. Anorganic bovine bone (Bio-Oss) regulates miRNA of osteoblast-like cells[J]. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2010, 30(1): 83-87.
- [22] Wang T, Xu Z. miR-27 promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 402(2): 186-189.
- [23] Zhu S, Peng W, Li X, et al. miR-1827 inhibits osteogenic differentiation by targeting IGF1 in MSMSCs[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:46136.
- [24] Peng W, Zhu S, Li X, et al. miR-27b-3p suppressed osteogenic differentiation of maxillary sinus membrane stem cells by targeting Sp7[J]. *Implant Dent*, 2017, 26(4): 492-499.
- [25] Peng W, Zhu SX, Wang J, et al. Lnc-NTF3-5 promotes osteogenic differentiation of maxillary sinus membrane stem cells via sponging miR-93-3p[J]. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2017(3).
- [26] Weng J, Peng W, Zhu S, et al. Long noncoding RNA sponges miR-454 to promote osteogenic differentiation in maxillary sinus membrane stem cells[J]. *Implant Dent*, 2017, 26(2): 178-186.

(编辑 罗燕鸿, 孟文霞)