

长链非编码 RNA TP53TG1 促进根尖牙乳头干细胞成牙本质及成骨分化

黎庭悦^{1, 2, 3}, 郭倩², 何文喜³, 吴家媛¹

<https://doi.org/10.12307/2025.563>

投稿日期: 2024-09-11

采用日期: 2024-11-13

修回日期: 2024-12-17

在线日期: 2024-12-31

中图分类号:

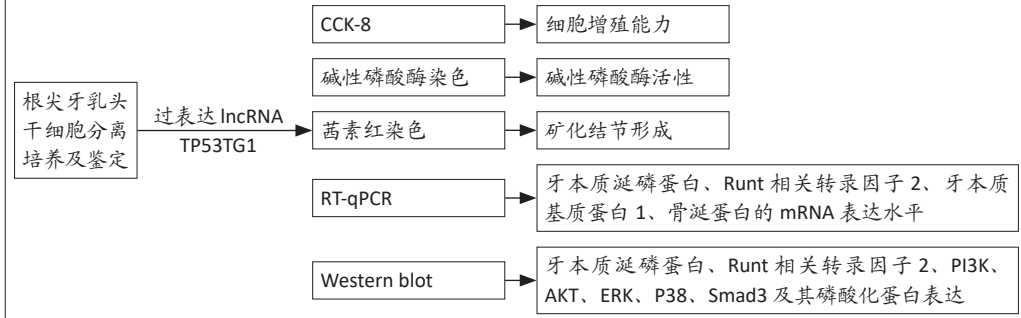
R459.9; R318; R781

文章编号:

2095-4344(2025)36-07776-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 长链非编码 RNA TP53TG1 调控根尖牙乳头干细胞成牙本质及成骨分化的机制



文题释义:

长链非编码RNA TP53TG1: 长链非编码RNA是指一类不编码蛋白质, 长度大于200 个核苷酸的RNA转录本, 参与多种细胞过程, 如细胞周期、分化、代谢等。TP53TG1是编码P53靶基因1的长链非编码RNA, 在多种癌症相关细胞中发挥重要作用。

根尖牙乳头干细胞: 一种从人牙根尖顶端分离出来的牙源性干细胞, 与发育中的牙根密切相关, 已被证明可以促进再生牙髓病学中的内源性牙齿再生。

摘要

背景: 长链非编码RNA TP53TG1(lncRNA TP53TG1)参与调控多种癌症细胞的增殖、迁移、侵袭、凋亡, 但在其他细胞中的作用报道甚少。

目的: 探讨lncRNA TP53TG1对人根尖牙乳头干细胞增殖和分化的影响及途径。

方法: 分离、培养人根尖牙乳头干细胞, 转染lncRNA TP53TG1过表达慢病毒, RT-qPCR检测lncRNA TP53TG1的过表达效率, Western blot检测PI3K、AKT、ERK、P38、Smad3及其磷酸化蛋白的相对表达量。将人根尖牙乳头干细胞分为慢病毒空载体组和过表达lncRNA TP53TG1组, 采用CCK-8法检测细胞增殖情况; 成骨诱导第5天采用碱性磷酸酶染色检测碱性磷酸酶活性, 成骨诱导第21天采用茜素红染色检测矿化结节形成情况; 成骨诱导第3, 7, 14天采用RT-qPCR检测牙本质涎磷蛋白、Runt相关转录因子2、牙本质基质蛋白1、骨涎蛋白的mRNA表达水平; 成骨诱导第3, 7, 14天采用Western blot检测牙本质涎磷蛋白和Runt相关转录因子2的蛋白表达水平。

结果与结论: ①RT-qPCR检测结果显示慢病毒成功整合到根尖牙乳头干细胞基因组中, Western blot检测结果显示, 过表达lncRNA TP53TG1上调了p-PI3K、p-AKT的蛋白水平而不影响其他通路磷酸化蛋白的表达; ②从细胞培养第3天开始, 过表达lncRNA TP53TG1显著促进根尖牙乳头干细胞的增殖; ③在诱导根尖牙乳头干细胞牙源性分化过程中, 过表达lncRNA TP53TG1促进成牙本质及成骨分化相关基因和蛋白的表达, 碱性磷酸酶活性和矿化结节形成显著增加; ④结果表明: lncRNA TP53TG1可能通过激活PI3K/AKT信号通路促进根尖牙乳头干细胞成牙本质及成骨分化。

关键词: 根尖牙乳头干细胞; 长链非编码RNA; lncRNA TP53TG1; 病毒转染; 成牙本质向分化; PI3K/AKT信号通路; 工程化干细胞

Long noncoding RNA TP53TG1 promotes odontogenic and osteogenic differentiation of stem cells from the apical papilla

Li Tingyue^{1, 2, 3}, Guo Qian², He Wenxi³, Wu Jiayuan¹

¹Stomatological Medical School of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; ²State Key Laboratory of Military Stomatology, Key Laboratory of Shaanxi Province Stomatology, Department of Dental Pulp Diseases, The Third Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China; ³Department of Stomatology, Special Medical Center, Air Force Medical University, Beijing 100142, China

Li Tingyue, Master candidate, Stomatological Medical School of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; State Key Laboratory of Military Stomatology, Key Laboratory of Shaanxi Province Stomatology, Department of Dental Pulp Diseases, The Third Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China; Department of Stomatology, Special Medical Center, Air Force Medical University, Beijing 100142, China

Corresponding author: Wu Jiayuan, MD, Chief physician, Master's supervisor, Stomatological Medical School of Zunyi Medical University, Zunyi 563000,

¹遵义医科大学口腔医学院, 贵州省遵义市 563000; ²军事口腔医学国家重点实验室, 陕西省口腔医学重点实验室, 空军军医大学第三附属医院牙体牙髓病科, 陕西省西安市 710032; ³空军军医大学特色医学中心口腔科, 北京市 100142

第一作者: 黎庭悦, 女, 1997年生, 重庆市人, 汉族, 遵义医科大学在读硕士, 主要从事口腔内科方向研究。

通讯作者: 吴家媛, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 遵义医科大学口腔医学院, 贵州省遵义市 563000

并列通讯作者: 何文喜, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 空军军医大学特色医学中心口腔科, 北京市 100142

<https://orcid.org/0000-0001-5300-1267> (吴家媛)

基金资助: 国家自然科学基金项目 (82460190), 项目负责人: 吴家媛; 贵州省科技计划项目 (黔科合基础-ZK[2022]一般 638), 项目负责人: 吴家媛; 北京市自然科学基金项目 (7242140), 项目负责人: 何文喜; 陕西自然科学基金研究计划-重点项目 (2022JZ-42), 项目负责人:

何文喜

引用本文: 黎庭悦, 郭倩, 何文喜, 吴家媛. 长链非编码 RNA TP53TG1 促进根尖牙乳头干细胞成牙本质及成骨分化 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(36):7776-7782.



Guizhou Province, China

Co-corresponding author: He Wenxi, MD, Chief physician, Master's supervisor, Department of Stomatology, Special Medical Center, Air Force Medical University, Beijing 100142, China

Abstract

BACKGROUND: Long noncoding RNA TP53TG1 (lncRNA TP53TG1) is involved in regulating the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of various cancer cells, but there are few reports on its role in other cells.**OBJECTIVE:** To investigate the effects and pathways of lncRNA TP53TG1 on the proliferation and differentiation of human stem cells from the apical papilla.**METHODS:** Human stem cells from the apical papilla were isolated and cultured, and then transfected with lncRNA TP53TG1 overexpression lentivirus. RT-qPCR was used to detect the overexpression efficiency of lncRNA TP53TG1. Western blot assay was used to detect the relative expression levels of PI3K, AKT, ERK, P38, Smad3, and their phosphorylated proteins. Human stem cells from the apical papilla were divided into the empty lentiviral vector transfection group and the lncRNA TP53TG1 overexpression group. CCK-8 assay was used to measure the cell proliferation. Alkaline phosphatase activity was detected by alkaline phosphatase staining on day 5 of osteogenic induction. Formation of mineralized nodules was detected by alizarin red staining on day 21 of osteogenic induction. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression levels of dentin sialophosphoprotein, Runt-related transcription factor 2, dentin matrix protein 1, and bone sialoprotein on days 3, 7, and 14 of osteogenic induction. Western blot assay was used to detect the protein expression levels of dentin sialophosphoprotein and Runt-related transcription factor 2 on days 3, 7, and 14 of osteogenic induction.**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) RT-qPCR results showed that the lentivirus was successfully integrated into the genome of stem cells from the apical papilla. Western blot assay results showed that overexpression of lncRNA TP53TG1 up-regulated the protein levels of p-PI3K and p-AKT without affecting the expression of phosphorylated proteins in other pathways. (2) Starting from day 3 of cell culture, overexpression of lncRNA TP53TG1 significantly promoted the proliferation of stem cells from the apical papilla. (3) In the process of inducing odontogenic differentiation of stem cells from the apical papilla, overexpression of lncRNA TP53TG1 promoted the expression of odontogenic and osteogenic differentiation-related genes and proteins, significantly increased alkaline phosphatase activity and mineralized nodule formation. (4) The results show that lncRNA TP53TG1 may promote the odontogenic and osteogenic differentiation of stem cells from the apical papilla by activating the PI3K/AKT signaling pathway.**Key words:** stem cell from the apical papilla; long noncoding RNA; lncRNA TP53TG1; virus transfection; dentinogenesis; PI3K/AKT signaling pathway; engineered stem cell**Funding:** National Natural Science Foundation of China, No. 82460190 (to WJY); Guizhou Science and Technology Plan Project, No. ZK[2022]638 (to WJY); Beijing Natural Science Foundation, No. 7242140 (to HWX); Shaanxi Natural Science Basic Research Plan - Key Project, No. 2022JZ42 (to HWX)**How to cite this article:** LI TY, GUO Q, HE WX, WU JY. Long noncoding RNA TP53TG1 promotes odontogenic and osteogenic differentiation of stem cells from the apical papilla. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2025;29(36):7776-7782.

0 引言 Introduction

牙根是使牙能稳定存在于牙槽骨的主要结构^[1],但在新生牙萌出后 3~5 年牙根才能逐渐发育完成,在牙根发育完全之前的牙称为年轻恒牙^[2],而多种疾病如龋病、牙创伤等可能导致年轻恒牙的牙根发育提前终止^[3]。近年来基于牙源性干细胞的再生治疗为重启年轻恒牙牙根发育进程提供可能^[4]。2006 年,SONOYAMA 等首次从人牙根尖分离出根尖牙乳头干细胞,随后证实了根尖牙乳头干细胞具有迁移到牙根并分化为成牙细胞的能力,根尖牙乳头干细胞也被认为是组织工程与再生医学中的重要牙源性干细胞^[5-6]。

长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA) 是指一类不编码蛋白质, RNA 转录本长度大于 200 个核苷酸的小分子结构^[7],作为基因表达和细胞功能调节因子而受到广泛关注^[8]。lncRNA 与多种牙组织来源干细胞增殖和分化之间存在关联,例如 CHEN 等^[9]首次使用微阵列分析鉴定出多种 lncRNA 在人牙髓干细胞牙源性分化过程中的调控机制;lncRNA MALAT1 加速牙周韧带干细胞的成骨分化^[10];而 lncRNA SNHG8 是牙周韧带干细胞成骨分化的负向调控因子^[11]。lncRNA 对根尖牙乳头干细胞的增殖行为及牙源性分化的影响及具体机制仍少见报道。

lncRNA TP53TG1 首次在结肠癌细胞系中发现是 TP53 诱导的基因^[12],在多种癌症相关细胞中发挥作用。例如,LU 等^[13]发现 TP53TG1 通过激活 ERK 信号通路诱导肝癌细胞的增殖和迁移,敲低 TP53TG1 有助于肝癌治疗药物发挥肿瘤抑制效应^[14];ZHANG 等^[15]则认为在肝癌细胞中

TP53TG1 通过降解 PRDX4 介导 WNT/ β -catenin 信号通路失活发挥肿瘤抑制作用。此外,TP53TG1 通过充当 miR-96 和 miR-33a-5p 分子海绵促进胰腺导管腺癌和宫颈癌的发展^[16-17]。这些结果表明 lncRNA TP53TG1 有着高度的细胞和组织特异性作用。此前有研究报道在炎症浸润的人牙髓组织中发现高表达 lncRNA TP53TG1, lncRNA TP53TG1 在诱导牙髓干细胞向成牙本质细胞分化过程中表达上调,并通过靶向 miRNA/Smad3、JNK1/2 信号轴调控牙髓干细胞增殖、迁移及细胞周期^[18]。但 lncRNA TP53TG1 是否调控根尖牙乳头干细胞增殖及成牙本质/成骨分化?其细胞内分子机制如何?目前国内外尚未见报道。为验证 lncRNA TP53TG1 对根尖牙乳头干细胞功能的调控作用,该研究通过体外实验阐明 lncRNA TP53TG1 调控根尖修复反应的分子机制,为临床上重启根尖发育与牙髓再生提供新的治疗策略。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外实验。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 6 月至 2024 年 6 月在陕西省军事口腔医学国家重点实验室牙体牙髓病科完成。

1.3 材料

1.3.1 牙齿样本 实验经空军军医大学第三附属医院伦理委员会批准(伦理批件号:IRB-REV-2022067),经患者及家属知情同意后,收集口腔颌面外科门诊 14~20 岁因正畸需求或阻生拔除的根尖发育未完全的健康前磨牙及第三磨牙。

1.3.2 主要试剂与仪器 胎牛血清 (浙江天杭生物); 0.25% 胰蛋白酶-EDTA、 α -MEM 培养液 (美国 Gibco); 青霉素-链霉素 (美国 MCE); β -甘油磷酸钠、抗坏血酸、地塞米松 (美国 Sigma); 人相关干细胞成脂、成软骨诱导分化试剂盒 (广州赛业生物); 碱性磷酸酶显色试剂盒、Western 封闭液、抗体稀释液 (上海碧云天); 1% 茜素红 S 染液 (北京索莱宝); 10%SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒 (美国 Bio-Rad); 牙本质涎磷蛋白 (dentin sialophosphoprotein, DSPP)、Runt 相关转录因子 2 (runt-related protein 2, RUNX2)、GAPDH 抗体 (美国 Santa); IncRNA TP53TG1 过表达慢病毒、空载慢病毒 (中国汉恒生物); 倒置荧光显微镜、倒置相差显微镜 (日本 Olympus)。

1.4 实验方法

1.4.1 根尖牙乳头干细胞分离、培养 收集因正畸或者阻生拔除的 14-20 岁带有根尖牙乳头的恒牙, 用含 1% 青霉素-链霉素的 PBS 清洗后使用无菌组织剪分离根尖牙乳头, 剪碎至 1 mm^3 , 加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 质量浓度为 4 mg/mL 的 I 型胶原酶消化 15 min , 用含体积分数 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基终止消化, 用含体积分数 20% 胎牛血清的 α -MEM 培养基重悬后接种于 6 孔板, 置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养, 3 d 后换液, 待细胞从组织块中爬出, 以有限稀释法进行克隆化培养^[19-22]。

1.4.2 根尖牙乳头干细胞多向分化能力鉴定 选取对数生长长期的第 3 代根尖牙乳头干细胞, 以 1×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板中, 用含体积分数 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基培养, 待细胞融合度达 70% 后更换成骨、成脂诱导液培养, 每 3 d 换液 1 次, 连续诱导 21 d 后进行茜素红染色和油红 O 染色, 倒置相差显微镜下采集图像。

1.4.3 流式细胞术鉴定细胞表面标记物 选取对数生长长期的第 3 代根尖牙乳头干细胞, 以 1×10^6 的细胞数接种于 10 cm 培养皿中, 待细胞生长至 80% 融合时, 用胰蛋白酶消化, PBS 重悬, 将细胞收集于 EP 管中, 再分别加入荧光素标记的 CD105-PE、CD34-FITC、CD45-FITC、CD29-PE、CD90-PE、STRO-1-PE 抗体, 避光孵育 30 min , 流式细胞仪上机检测。

1.4.4 细胞转染 选取对数生长长期的第 3 代根尖牙乳头干细胞, 以 1×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板中, 设置空载体组和过表达 IncRNA TP53TG1 组, 待细胞生长至 60% 汇合度时, 更换不含血清的 α -MEM 培养基, 以 $\text{MOI}=50$ 转染空载体慢病毒或 IncRNA TP53TG1 过表达慢病毒, 4 h 后更换完全培养基继续培养 24 h , 以 $1.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素筛选稳定转染细胞, 转染 72 h 后, 倒置荧光显微镜下观察绿色荧光, RT-qPCR 检测 IncRNA TP53TG1 的过表达效率。

1.4.5 CCK-8 实验 将成功转染空载体慢病毒或过表达 IncRNA TP53TG1 慢病毒的根尖牙乳头干细胞以 3×10^3 /孔密度接

种于 96 孔板中, 用含体积分数 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养, 分别于培养 1, 3, 5, 7 d 加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ CCK-8 试剂后继续避光培养 2 h , 酶标仪检测 450 nm 处各孔吸光度值。

1.4.6 碱性磷酸酶染色及活性检测 将成功转染空载体慢病毒或过表达 IncRNA TP53TG1 慢病毒的根尖牙乳头干细胞以 1×10^5 /孔密度接种于 6 孔板中, 待细胞生长至 70% 汇合度时, 更换成骨诱导液连续诱导 5 d 后, PBS 清洗, 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min , 按照碧云天碱性磷酸酶染色试剂盒说明书配置 BCIP/NBT 混合试剂, 每孔加入 1 mL 混合试剂染色 1 h , 倒置相差显微镜下拍照, 然后加入细胞裂解液提取蛋白样本, 根据碧云天碱性磷酸酶活性检测试剂盒说明书在 96 孔板中设置标准品孔以及样品孔, 每组设置 5 个副孔, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 10 min , 酶标仪检测 450 nm 处吸光度值, 计算各组碱性磷酸酶活性。

1.4.7 茜素红染色及定量分析 将成功转染空载体慢病毒或过表达 IncRNA TP53TG1 慢病毒的根尖牙乳头干细胞以 1×10^5 /孔密度接种于 6 孔板中, 待细胞生长至 70% 汇合度时, 更换成骨诱导液连续诱导 21 d 后, PBS 清洗, 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min , 每孔加入 1 mL 茜素红染色液 ($\text{pH}=4.2$) 避光染色 10 min , 倒置相差显微镜下观察矿化结节形成情况, 然后用 PBS 清洗, 每孔加入 1 mL 配置好的 10% 氯化十六烷基吡啶溶液, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中直至矿化结节完全溶解, 在 96 孔板中每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 溶解产物, 每组设置 5 个副孔, 酶标仪检测 562 nm 处吸光度值。

1.4.8 实时荧光定量 PCR 检测 将成功转染空载体慢病毒或过表达 IncRNA TP53TG1 慢病毒的根尖牙乳头干细胞以 1×10^5 /孔密度接种于 6 孔板中, 待细胞生长至 70% 汇合度时, 更换成骨诱导液连续诱导 3, 7, 14 d 后, 采用 Trizol 法分别提取各组细胞的总 RNA, 分光光度计检测 RNA 浓度, 无酶水调整 RNA 质量浓度至 $500\text{ }\mu\text{g/mL}$, 根据反转录试剂盒说明书, 依次加入 $4\text{ }\mu\text{L}$ 反转录酶、 $4\text{ }\mu\text{L}$ 总 RNA、 $12\text{ }\mu\text{L}$ 无酶水配置 $20\text{ }\mu\text{L}$ 反转录体系, 以 $25\text{ }^\circ\text{C}$, 10 min ; $42\text{ }^\circ\text{C}$, 15 min ; $85\text{ }^\circ\text{C}$, 5 min ; 降温至 $10\text{ }^\circ\text{C}$ 在 PCR 仪上反转录获得 cDNA; 根据 SYBR Green PCR 试剂盒说明书, 依次加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 含 Rox Reference Dye 的 Master Mix、 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 上游引物、 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 下游引物、 $5\text{ }\mu\text{L}$ cDNA 和 $4\text{ }\mu\text{L}$ 无酶水配置 $20\text{ }\mu\text{L}$ 扩增体系, 在 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪上以 $95\text{ }^\circ\text{C}$, 10 min ; $95\text{ }^\circ\text{C}$, 15 s 循环 40 次; $60\text{ }^\circ\text{C}$, 1 min 进行扩增。以 GAPDH 为内参, 根据公式 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算 IncRNA TP53TG1、DSPP、RUNX2、牙本质基质蛋白 1 (dentin matrix protein 1, DMP-1)、骨涎蛋白 (bone sialoprotein, BSP) mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

1.4.9 Western blot 检测 将成功转染空载体慢病毒或过表达 IncRNA TP53TG1 慢病毒的根尖牙乳头干细胞以 1×10^5



表 1 | 引物序列

Table 1 | Primer sequences

基因名称	引物序列 (5'-3')
GAPDH	F: GGA GTC CAC TGG CGT CTT CA R: GTC ATG AGT CCT TCC ACG ATA CC
lncRNA TP53TG1	F: GAG CTG TCC TAA CTC TGC GG R: GAG GGT TGG GTA CCT TCG TG
DSPP	F: GCA TTT GGG CAG TAG CAT GG R: CAC TGG CAT TTA ACT CAT CCT GT
RUNX2	F: TGG TTA CTG TCA TGG CGG GTA R: TCT CAG ATC GTT GAA CCT TGC TA
DMP-1	F: TGT CTC AGG TGA GAA GAG GAA TG R: ACC CTT CCA TTC TTC AGA ATC C
BSP	F: GGA CTG CCA GAG GAA GCA AT R: TGC CCT GAA CTG GAA ATC GT

表注：DSPP 为牙本质涎磷蛋白，RUNX2 为 Runt 相关转录因子 2，DMP-1 为牙本质基质蛋白 1，BSP 为骨涎蛋白。

密度接种于 6 孔板中，待细胞生长至 70% 汇合度时，更换成骨诱导液连续诱导 3，7，14 d 后，PBS 清洗，每孔加入 200 μ L 含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞，超声破碎仪破碎 10 s，12 000 r/min 离心 20 min 后收集上清，根据 BCA 蛋白定量试剂盒说明书检测蛋白质浓度，与 5 $\times$ Loading buffer 按 1 : 4 比例混合后 95 $^{\circ}$ C 加热变性，配置 10% SDS 凝胶，15 μ g 蛋白样本以恒压 250 V，30 min 电泳，以恒流 400 mA，70 min 转膜，TBST 清洗，用封闭液室温封闭 30 min，加入 DSPP(1 : 1 000)、RUNX2(1 : 1 000)、GAPDH(1 : 8 000) 一抗，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，TBST 清洗，加入二抗 (1 : 5 000)，室温摇床上孵育 1 h，TBST 清洗，ECL 发光液浸泡，BIO-RAD 成像系统显影，Image J 软件进行灰度值分析。

另外，收集转染慢病毒 48 h 后空载体组和 lncRNA TP53TG1 过表达组的蛋白样本，以上述方式检测 PI3K、AKT、ERK、P38、Smad3 及其磷酸化蛋白的相对表达量。

1.5 主要观察指标 过表达 lncRNA TP53TG1 对根尖牙乳头干细胞增殖、分化能力及相关信号通路分子表达水平的影响。

1.6 统计学分析 使用 GraphPad Prism 9.5.0 软件进行统计学分析和绘图，以 $\bar{x}\pm s$ 描述计量资料，采用独立样本 *t* 检验计算统计学差异，*P* < 0.05 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过遵义医科大学统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 根尖牙乳头干细胞的分离培养及鉴定结果 收集根尖孔未闭合完全的年轻恒牙，根尖部可见质地坚韧的根尖牙乳头组织 (图 1A)。组织块消化培养 5 d 后，镜下可见梭形细胞从组织块中央呈放射状爬出，即为原代根尖牙乳头干细胞 (图 1B)。根尖牙乳头干细胞经成骨诱导 21 d 后，茜素红染色镜下可观察到红褐色矿化结节沉积 (图 1C)；经成脂诱导 21 d 后，油红 O 染色镜下可见红色脂滴形成 (图 1D)，表明获得的根尖牙乳头干细胞具有多向分化潜能。

流式细胞术结果显示，根尖牙乳头干细胞高表达间充质干细胞标志物 CD29、CD105、CD90 和 STRO-1，而不表达造血干细胞标志物 CD34、CD45 (图 1E)，符合根尖牙乳头干细胞免疫表型特点。

2.2 慢病毒转染诱导根尖牙乳头干细胞中 lncRNA TP53TG1 的表达 利用慢病毒转染技术，将携带绿色荧光标签的空载体慢病毒或过表达 lncRNA TP53TG1 的慢病毒转染至根尖牙乳头干细胞，24 h 后通过嘌呤霉素筛选慢病毒感染成功的根尖牙乳头干细胞，72 h 后通过荧光显微镜观察到两组均强烈表达绿色荧光 (图 2A，B)。此外，相比于空载体慢病毒组，lncRNA TP53TG1 过表达组根尖牙乳头干细胞中 lncRNA TP53TG1 mRNA 表达显著增高 (图 2C，*P* < 0.001)，可用于后续实验。

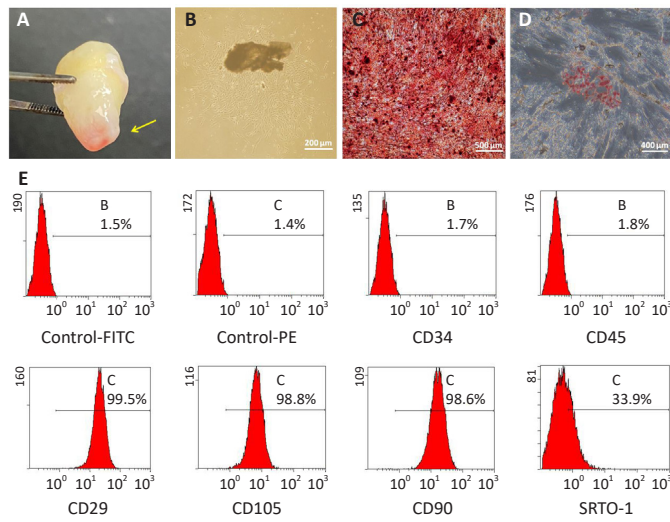
2.3 过表达 lncRNA TP53TG1 促进根尖牙乳头干细胞增殖和成骨分化 使用 CCK-8 法检测过表达 lncRNA TP53TG1 对根尖牙乳头干细胞增殖的影响。结果显示，从第 3 天开始，过表达 lncRNA TP53TG1 显著增强根尖牙乳头干细胞的增殖能力 (图 3A，*P* < 0.000 1)。碱性磷酸酶染色结果显示，与空载体组相比，过表达 lncRNA TP53TG1 组形成颜色更深的蓝紫色沉淀 (图 3B)，碱性磷酸酶活性检测结果也显示过表达 lncRNA TP53TG1 显著增强根尖牙乳头干细胞中碱性磷酸酶活性 (图 3C，*P* < 0.001)。茜素红染色结果显示 lncRNA TP53TG1 过表达组根尖牙乳头干细胞形成更多的红褐色矿化结节 (图 3D，E，*P* < 0.000 1)。

2.4 过表达 lncRNA TP53TG1 诱导根尖牙乳头干细胞成牙本质 / 成骨向分化相关指标的表达 RT-qPCR 结果显示，矿化诱导 3，7，14 d，与空载体组相比，lncRNA TP53TG1 过表达组根尖牙乳头干细胞成牙本质向分化相关基因 DSPP 和 DMP-1 以及成骨向分化相关基因 BSP 和 RUNX2 的 mRNA 表达水平上调 (*P* < 0.05)。同时，Western blot 结果显示，矿化诱导 7，14 d，与空载体组相比，lncRNA TP53TG1 过表达组 DSPP 和 RUNX2 的蛋白表达水平也上调，差异有显著性意义 (*P* < 0.05)，见图 4。

2.5 过表达 lncRNA TP53TG1 激活 PI3K/AKT 信号通路 Western blot 结果显示，与空载体组相比，过表达 lncRNA TP53TG1 后多条信号通路总蛋白表达水平基本相同，但 PI3K 及 AKT 的磷酸化蛋白水平升高 (*P* < 0.05)，而 ERK1/2、p38、Smad3 磷酸化蛋白的表达并未表现出有统计学差异 (*P* > 0.05)，见图 5，提示 lncRNA TP53TG1 可通过上调根尖牙乳头干细胞中 PI3K 及 AKT 的磷酸化水平而激活 PI3K/AKT 信号通路。

3 讨论 Discussion

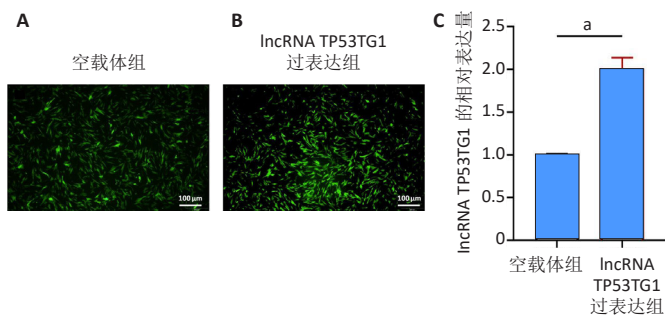
目前已知的大多数 lncRNA 没有明确功能，但许多研究证实 lncRNA 与基因转录的调控有关^[23]，这些



图注：图 A 为人根尖牙乳头（黄色箭头）；B 为原代根尖牙乳头干细胞从组织块中爬出；C 为成骨诱导 21 d 后茜素红染色，可见红褐色矿化结节沉积；D 为成脂诱导 21 d 后油红 O 染色，可见红色脂滴形成；E 为根尖牙乳头干细胞表面抗原标记物的流式细胞术鉴定结果。

图 1 | 人根尖牙乳头干细胞的分离培养及鉴定

Figure 1 | Isolation, culture and identification of stem cells from the apical papilla



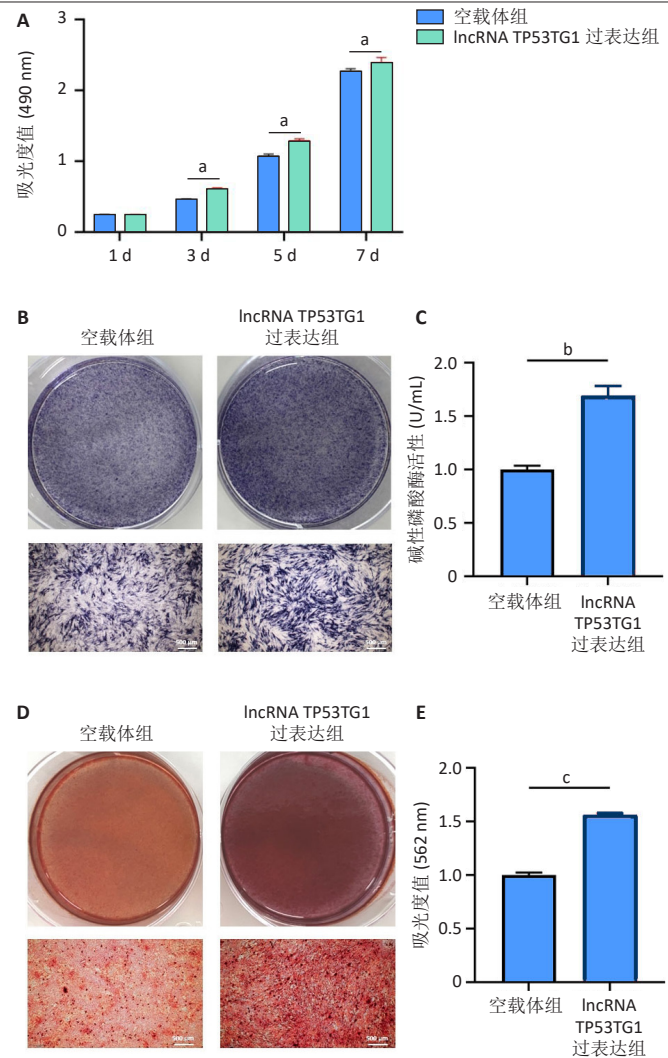
图注：图 A 为转染空载体慢病毒组绿色荧光表达；B 为转染过表达 IncRNA TP53TG1 慢病毒组绿色荧光表达；C 为 RT-qPCR 检测根尖牙乳头干细胞中 IncRNA TP53TG1 mRNA 表达水平。^a $P < 0.001$ ($n=3$)。IncRNA：长链非编码 RNA。

图 2 | 慢病毒转染根尖牙乳头干细胞

Figure 2 | Lentivirus infection of stem cells from the apical papilla

IncRNA 或是在空间上与相邻的 mRNA 直接作用，或是参与转录本的起始、延伸以及加工过程等，从而调节邻近基因的转录^[24]。重要的是，不同 IncRNA 的表型可以导致其靶基因沉默或表达增加。例如，IncRNA TUG1 和 IncRNA MALAT1 分别与生长控制基因启动子上甲基化和未甲基化的 Polycomb 小体结合，实现其下游基因在抑制环境和激活环境之间的转变^[25]。事实上，多数研究都支持 IncRNA 在牙源性干细胞成牙本质/成骨向分化过程中的正向调控作用^[26-30]。

该研究选择一种与根尖牙乳头干细胞增殖及分化相关的长链非编码 RNA 即 IncRNA TP53TG1。通过转染慢病毒获得高表达 IncRNA TP53TG1 的人根尖牙乳头干细胞，CCK-8 实验证实过表达 IncRNA TP53TG1 显著促进根尖牙乳头干细胞的增殖，这与 LU 等^[13]在肝细胞癌细胞中获得的

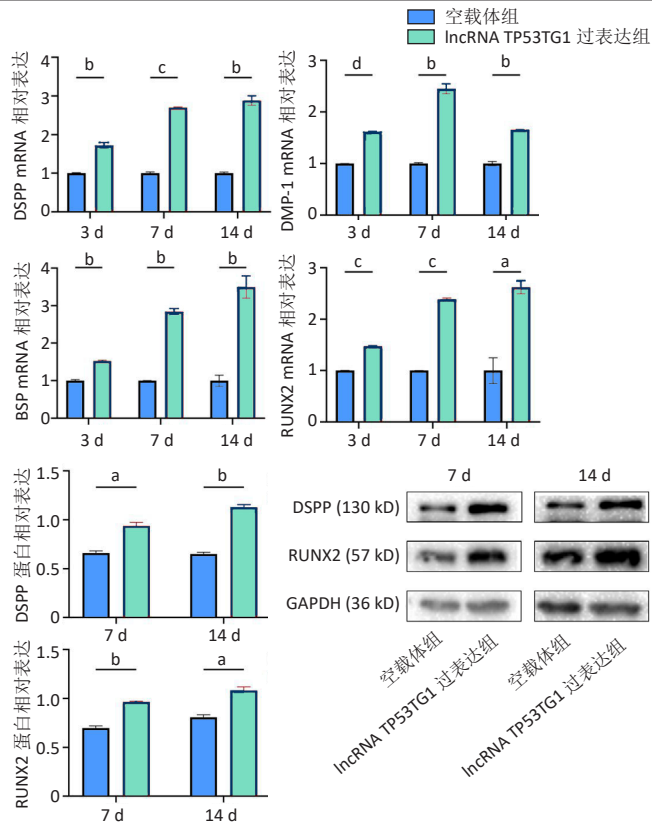


图注：图 A 为 CCK-8 检测细胞增殖第 1, 3, 5, 7 天的吸光度值 ($n=5$, ^a $P < 0.0001$)；B 为碱性磷酸酶染色，标尺为 500 μm ；C 为碱性磷酸酶活性定量分析 ($n=3$, ^b $P < 0.001$)；D 为茜素红染色，标尺为 500 μm ；E 为茜素红染色定量分析 ($n=5$, ^c $P < 0.0001$)。IncRNA：长链非编码 RNA。

图 3 | IncRNA TP53TG1 对根尖牙乳头干细胞增殖及成骨分化的影响

Figure 3 | Effect of IncRNA TP53TG1 on proliferation and osteogenic differentiation of stem cells from the apical papilla

结果相一致。然后探讨了 IncRNA TP53TG1 对根尖牙乳头干细胞成牙本质及成骨分化的调控作用。DSPP、DMP-1、RUNX2、BSP 是常用于测定牙本质组织分化与矿化的标志物^[31]。DSPP 是维持牙母细胞谱系分化以及形成正常的牙本质厚度和矿物质密度所必需的^[32]；DMP-1 是一种在牙本质和骨骼中发现的非胶原基质蛋白，参与牙体硬组织的发育及矿化过程，在牙生成的早期和晚期都具有重要意义^[33]；RUNX2 是骨骼发育的基本转录因子，与牙齿发育后期的矿化组织形成密切相关，并调节牙槽骨重塑过程^[34]；BSP 仅存在于矿化组织中，在羟基磷灰石形成的初始阶段发挥作用，并在修复性牙本质生成过程中激活和表达^[35]。该研究结果显示过表达 IncRNA TP53TG1 的根尖牙乳头干细胞在矿化诱导 3, 7, 14 d 时 DSPP、DMP-1、RUNX2、BSP 的表达显著上调，碱性磷酸酶活性和矿化结节形成明



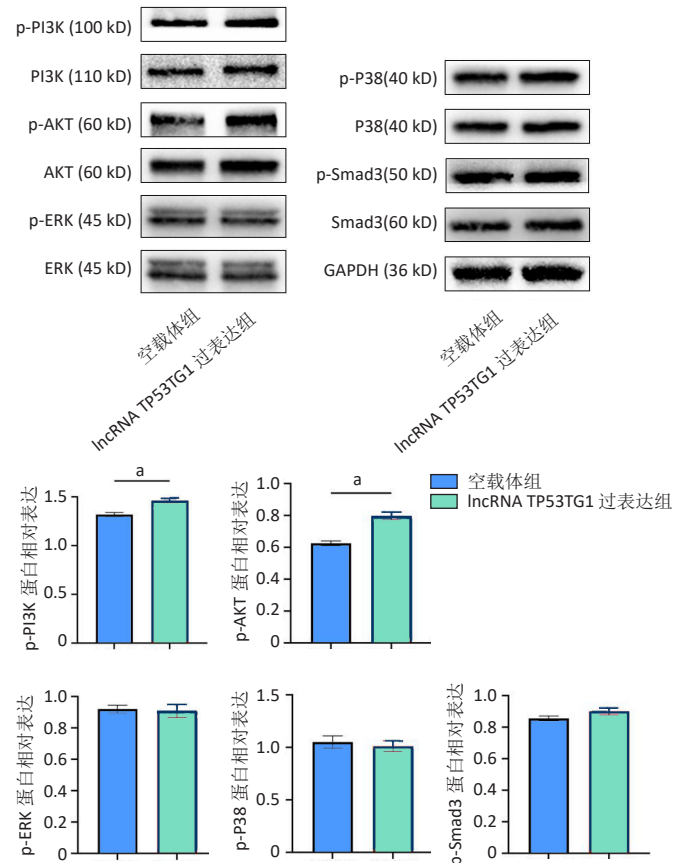
图注: $n=3$, $^aP<0.05$, $^bP<0.01$, $^cP<0.001$, $^dP<0.0001$. IncRNA: 长链非编码 RNA; DSPP: 牙本质涎磷蛋白; RUNX2: Runt 相关转录因子 2; DMP-1: 牙本质基质蛋白 1; BSP: 骨涎蛋白。

图 4 | IncRNA TP53TG1 对根尖牙乳头干细胞成牙本质 / 成骨分化相关基因及蛋白表达水平的影响

Figure 4 | Effects of IncRNA TP53TG1 on odontogenic/osteogenic differentiation-related genes mRNA and protein expression levels of stem cells from the apical papilla

显增加, 表明 IncRNA TP53TG1 在根尖牙乳头干细胞向成牙本质细胞及成骨细胞分化的不同阶段具有正向调节作用。

细胞在受到外源性及内源性刺激时能快速激发多种信号转导途径, 通过激活胞质及胞核内磷酸化底物来参与细胞生命活动, 包括细胞增殖、迁移、定向分化以及转录和翻译活动^[36-37]。此前文献报道多种信号通路参与调节根尖牙乳头干细胞的牙源性分化过程^[38-42], 例如雌激素通过激活 ERK 和 JNK/MAPK 信号通路刺激患有牙髓感染的根尖组织中根尖牙乳头干细胞的分化, 以恢复中断的根发育^[43]; 而甲状旁腺激素则通过激活 JNK 和 P38 MAPK 通路影响根尖牙乳头干细胞分化标志物的表达^[44]; 绿茶的天然成分 EGCG 通过上调 Smad1/5/9 磷酸化水平激活 Smad 信号通路促进根尖牙乳头干细胞的成牙本质 / 成骨分化^[45]; 抗菌肽 LL-37 和乙酰水杨酸通过上调 AKT 的磷酸化水平加速根尖牙乳头干细胞体外牙源性分化, 这与该研究结果一致^[46-47]。PI3K/AKT 通路是在调节细胞代谢和各种类型细胞分化过程中非常重要的细胞内信号通路, 其下游基因 (如 RUNX2、碱性磷酸酶和 GSK3) 与成骨分化有关^[48]。值得注意的是, TANAKA 等^[49]利用小干扰 RNA 特异性抑



图注: $n=3$, $^aP<0.05$. IncRNA: 长链非编码 RNA。

图 5 | IncRNA TP53TG1 对根尖牙乳头干细胞相关信号通路蛋白表达的影响
Figure 5 | Effect of IncRNA TP53TG1 on the expression of stem cells from the apical papilla-related signaling pathway proteins

制 AKT 表达以及 PI3K 抑制剂 LY294002 增强了根尖牙乳头干细胞的体内和体外成骨 / 牙本质分化能力, 但 PI3K 抑制剂对根尖牙乳头干细胞的增殖没有影响^[50]。此研究分析了过表达 IncRNA TP53TG1 对根尖牙乳头干细胞中 ERK/P38 MAPK、PI3K/AKT 以及 Smad3 通路蛋白分子及其磷酸化水平的影响, 结果发现过表达 IncRNA TP53TG1 增强了根尖牙乳头干细胞中 PI3K 及 AKT 的磷酸化水平而不影响 MAPK 及 Smad3 信号通路。结合上述研究结果, 作者推测 IncRNA TP53TG1 通过上调根尖牙乳头干细胞中 PI3K 及 AKT 的磷酸化水平从而促进根尖牙乳头干细胞体外成牙本质 / 成骨分化, 这些数据表明 IncRNA TP53TG1 是根尖牙乳头干细胞增殖及牙源性分化的重要调节因子, 在这一过程中可能涉及到 PI3K/AKT 信号通路的调控。

作者贡献: 何文喜负责实验设计, 吴家媛负责实验评估, 郭倩负责实验指导, 黎庭悦负责实验实施和论文撰写。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

- HEBOYAN A, AVETISYAN A, KAROBARI MI, et al. Tooth root resorption: A review. *Sci Prog.* 2022;105(3):368504221109217.
- MURRAY PE. Review of guidance for the selection of regenerative endodontics, apexogenesis, apexification, pulpotomy, and other endodontic treatments for immature permanent teeth. *Int Endod J.* 2023;56 Suppl 2:188-199.
- SHAH A, PEACOCK R, ELIYAS S. Pulp therapy and root canal treatment techniques in immature permanent teeth: an update. *Br Dent J.* 2022;232(8):524-530.
- LIU Q, GAO Y, HE J. Stem Cells from the Apical Papilla (SCAPs): Past, Present, Prospects, and Challenges. *Biomedicines.* 2023;11(7):2047.
- DRIESEN RB, GERVOIS P, VANGANSEWINKEL T, et al. Unraveling the Role of the Apical Papilla During Dental Root Maturation. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:665600.
- GAO X, RUZBARSKY JJ, LAYNE JE, et al. Stem Cells and Bone Tissue Engineering. *Life (Basel).* 2024;14(3):287.
- KHORKOVA O, STAHL J, JOJI A, et al. Long non-coding RNA-targeting therapeutics: discovery and development update. *Expert Opin Drug Discov.* 2023;18(9):1011-1029.
- BRIDGES MC, DAULAGALA AC, KOURTIDIS A. LNCcation: lncRNA localization and function. *J Cell Biol.* 2021;220(2):e202009045.
- CHEN Z, ZHANG K, QIU W, et al. Genome-wide identification of long noncoding RNAs and their competing endogenous RNA networks involved in the odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):114.
- GU Y, BAI Y. lncRNA MALAT1 promotes osteogenic differentiation through the miR-93-5p/SMAD5 axis. *Oral Dis.* 2024;30(4):2398-2409.
- ZHANG Z, HE Q, YANG S, et al. Mechanical force-sensitive lncRNA SNHG8 inhibits osteogenic differentiation by regulating EZH2 in hPDLSCs. *Cell Signal.* 2022;93:110285.
- TAKEI Y, ISHIKAWA S, TOKINO T, et al. Isolation of a novel TP53 target gene from a colon cancer cell line carrying a highly regulated wild-type TP53 expression system. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998;23(1):1-9.
- LU Q, GUO Q, XIN M, et al. lncRNA TP53TG1 Promotes the Growth and Migration of Hepatocellular Carcinoma Cells via Activation of ERK Signaling. *Noncoding RNA.* 2021; 7(3):52.
- LU Q, XIN M, GUO Q, et al. Knockdown of lncRNA TP53TG1 Enhances the Efficacy of Sorafenib in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Noncoding RNA.* 2022; 8(4):61.
- ZHANG Y, YANG H, DU Y, et al. Long noncoding RNA TP53TG1 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma development by acting as a molecular sponge of microRNA-96. *Cancer Sci.* 2019;110(9):2760-2772.
- LIAO D, LIU X, YUAN X, et al. Long non-coding RNA tumor protein 53 target gene 1 promotes cervical cancer development via regulating microRNA-33a-5p to target forkhead box K2. *Cell Cycle.* 2022;21(6):572-584.
- FERRER J, DIMITROVA N. Transcription regulation by long non-coding RNAs: mechanisms and disease relevance. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2024;25(5):396-415.
- 代子寒, 王明浩, 王胜朝, 等. lncRNA TP53TG1 在牙髓中的表达和对牙髓干细胞转录炎症因子的影响 [J]. 空军军医大学学报, 2024,45(7):833-837.
- DU L, YANG P, GE S. Isolation and characterization of human gingiva-derived mesenchymal stem cells using limiting dilution method. *J Dent Sci.* 2016;11(3):304-314.
- LIU F, WANG X, XU J, et al. Preliminary study on the mechanism by which exosomes derived from human exfoliated deciduous teeth improve the proliferation and osteogenic inhibitory effect of glucocorticoid-induced BMSCs. *Gene.* 2024;923:148575.
- 甄蕾, 刘宏伟. 人牙周膜干细胞的初步鉴定及体外成骨诱导 [J]. 口腔颌面外科杂志, 2008,18(5):318-322.
- KUMAR A, RAIK S, SHARMA P, et al. Primary Culture of Dental Pulp Stem Cells. *J Vis Exp.* 2023;(195):e65223.
- SHIELDS EJ, PETRACOVICI AF, BONASIO R. lncRNAs: biochemically and biologically versatile: biochemical and biological functions of long noncoding RNAs. *Biochem J.* 2019;476(7):1083-1104.
- GEISLER S, COLLIER J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(11):699-712.
- YANG L, LIN C, LIU W, et al. ncRNA- and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs. *Cell.* 2011;147(4):773-788.
- YU S, GUO J, YANG D, et al. The ATF4-regulated lncRNA MALAT1 promotes odontoblastic differentiation of human dental pulp stem cells via histone demethylase JMJD3: An in vitro study. *Int Endod J.* 2024;57(1):50-63.
- YANG C, XU X, LIN P, et al. Overexpression of long noncoding RNA MCM3AP-AS1 promotes osteogenic differentiation of dental pulp stem cells via miR-143-3p/IGFBP5 axis. *Hum Cell.* 2022;35(1):150-162.
- WANG D, ZHU N, XIE F, et al. Long non-coding RNA IGFBP7-AS1 promotes odontogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth through autophagy: An in vitro study. *Arch Oral Biol.* 2022;141:105492.
- TU S, CHEN Y, FENG Y, et al. lncRNA CYTOR Facilitates Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells by Modulating SOX11 via Sponging miR-6512-3p. *Stem Cells Int.* 2023;2023:5671809.
- SUFIANOV A, BEILERLI A, BEGLIARZADE S, et al. The role of noncoding RNAs in the osteogenic differentiation of human periodontal ligament-derived cells. *Noncoding RNA Res.* 2022;8(1):89-95.
- ARORA S, COOPER PR, RATNAYAKE JT, et al. A critical review of in vitro research methodologies used to study mineralization in human dental pulp cell cultures. *Int Endod J.* 2022;55 Suppl 1(Suppl 1):3-13.
- LIM D, WU KC, LEE A, et al. Dspp dosage affects tooth development and dentin mineralization. *PLoS One.* 2021;16(5):e0250429.
- SUZUKI S, HARUYAMA N, NISHIMURA F, et al. Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Arch Oral Biol.* 2012;57(9):1165-1175.
- CAMILLERI S, MCDONALD F. Runx2 and dental development. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114(5):361-373.
- VIJAYKUMAR A, DYRKACZ P, VIDOVIC-ZDRILIC I, et al. Expression of BSP-GFPtpz Transgene during Osteogenesis and Reparative Dentinogenesis. *J Dent Res.* 2020; 99(1):89-97.
- ZHANG W, YELICK PC. Tooth Repair and Regeneration: Potential of Dental Stem Cells. *Trends Mol Med.* 2021;27(5):501-511.
- WEN X, JIAO L, TAN H. MAPK/ERK Pathway as a Central Regulator in Vertebrate Organ Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1464.
- LAV R, KRIVANEK J, ANTHWAL N, et al. Wnt signaling from Gli1-expressing apical stem/progenitor cells is essential for the coordination of tooth root development. *Stem Cell Reports.* 2023;18(4):1015-1029.
- TAKIMOTO K, WIDBILLER M, DIOGENES A. Expression of Toll-like Receptors in Stem Cells of the Apical Papilla and Its Implication for Regenerative Endodontics. *Cells.* 2023;12(20):2502.
- LI Z, GE X, LU J, et al. MiR-141-3p regulates proliferation and senescence of stem cells from apical papilla by targeting YAP. *Exp Cell Res.* 2019;383(2):111562.
- JIN L, CAO Y, YU G, et al. SFRP2 enhances the osteogenic differentiation of apical papilla stem cells by antagonizing the canonical WNT pathway. *Cell Mol Biol Lett.* 2017;22:14.
- ZHAO Q, REN H, WANG N, et al. NOTUM plays a bidirectionally modulatory role in the odontoblastic differentiation of human stem cells from the apical papilla through the WNT/ β -catenin signaling pathway. *Arch Oral Biol.* 2024;160:105896.
- WANG Y, LU Y, LI Z, et al. Oestrogen receptor α regulates the odonto/osteogenic differentiation of stem cells from apical papilla via ERK and JNK MAPK pathways. *Cell Prolif.* 2018;51(6):e12485.
- PANG X, ZHUANG Y, LI Z, et al. Intermittent Administration of Parathyroid Hormone Enhances Odonto/Osteogenic Differentiation of Stem Cells from the Apical Papilla via JNK and P38 MAPK Pathways. *Stem Cells Int.* 2020;2020:5128128.
- LIU Z, LIN Y, FANG X, et al. Epigallocatechin-3-Gallate Promotes Osteo-/Odontogenic Differentiation of Stem Cells from the Apical Papilla through Activating the BMP-Smad Signaling Pathway. *Molecules.* 2021;26(6):1580.
- CHENG Q, ZENG K, KANG Q, et al. The Antimicrobial Peptide LL-37 Promotes Migration and Odonto/Osteogenic Differentiation of Stem Cells from the Apical Papilla through the Akt/Wnt/ β -catenin Signaling Pathway. *J Endod.* 2020;46(7):964-972.
- TANAKA Y, SONODA S, YAMAZA H, et al. Acetylsalicylic Acid Treatment and Suppressive Regulation of AKT Accelerate Odontogenic Differentiation of Stem Cells from the Apical Papilla. *J Endod.* 2019;45(5):591-598.e6.
- WANG Z, CHEN C, SUN L, et al. Fibroblast growth factor 2 promotes osteo/odontogenic differentiation in stem cells from the apical papilla by inhibiting PI3K/AKT pathway. *Sci Rep.* 2024;14(1):19354.
- TANAKA Y, SONODA S, YAMAZA H, et al. Suppression of AKT-mTOR signal pathway enhances osteogenic/dentinogenic capacity of stem cells from apical papilla. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):334.
- CHEN X, LIU JY, YUE L, et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase and Protein Kinase C Signaling Pathways Are Involved in Stromal Cell-derived Factor-1 α -mediated Transmigration of Stem Cells from Apical Papilla. *J Endod.* 2016;42(7):1076-1081.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZLJ)