

# 过表达甲基转移酶样3修复炎症来源牙周膜干细胞的成骨能力

陈欣 张校晨 秦文 金作林

军事口腔医学国家重点实验室,国家口腔疾病临床医学研究中心,陕西省口腔疾病临床医学研究中心,空军军医大学第三附属医院口腔正畸科,西安 710032

通信作者:金作林,Email:zuolinj@163.com

**【摘要】 目的** 探讨N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤(m<sup>6</sup>A)修饰与甲基转移酶样3(METTL3)在牙周膜干细胞(PDLSC)成骨分化和成脂分化中的作用。**方法** 使用流式细胞术、细胞集落形成实验分别鉴定PDLSC的表面标志物和增殖能力。通过茜素红染色和油红O染色分别检测PDLSC的成骨和成脂分化潜能。在人牙周膜干细胞(hPDLSC)和炎症来源牙周膜干细胞(pPDLSC)中分别构建METTL3过表达和敲低模型,成骨诱导一定时间,通过实时定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)、蛋白免疫印迹(Western blot)、茜素红染色和油红O染色分别在mRNA水平、蛋白水平和宏观水平检测成骨和成脂的变化。两样本比较使用独立样本 $t$ 检验,多组样本比较使用单因素方差分析。**结果** (1)流式细胞术结果显示,hPDLSC和pPDLSC均阳性表达CD29(100.0%,98.0%)、CD105(100.0%,99.5%)和CD146(31.5%,17.8%),阴性表达CD34(1.3%,0.4%)和CD45(1.4%,0.4%)。(2)细胞集落形成实验结果显示,hPDLSC和pPDLSC的集落形成数量分别为 $55 \pm 5$ 和 $72 \pm 8$ ,hPDLSC的细胞增殖能力较pPDLSC低( $t=3.16, P=0.034$ )。(3)茜素红染色和油红O染色说明,两种细胞均具有成骨和成脂分化能力,hPDLSC具有更强的成骨分化能力( $t=27.77, P<0.001$ ),而pPDLSC具有更强的成脂分化能力( $t=5.02, P=0.007$ )。(4)成骨诱导培养7 d后的慢病毒转染模型中,METTL3过表达组比过表达对照组的成骨关键基因Runx2的mRNA表达水平高,在hPDLSC和pPDLSC中的METTL3过表达组的表达量是 $3.63 \pm 1.15$ 和 $1.61 \pm 0.38$ ,分别是其过表达对照组的3.39倍( $t=3.777, P=0.020$ )和1.71倍( $t=2.948, P=0.042$ );而在METTL3敲低组较敲低对照组低,在hPDLSC和pPDLSC中的METTL3敲低组的表达量是 $0.16 \pm 0.03$ 和 $0.26 \pm 0.07$ ,分别是其敲低对照组的0.15倍( $t=9.669, P<0.001$ )和0.26倍( $t=8.767, P<0.001$ )。同样地,Runx2的蛋白表达水平也发生相同改变。将转染后的细胞进行21 d的成骨诱导培养后进行茜素红染色,结果显示METTL3过表达组较过表达对照组染色深且钙化结节较大,定量分析结果显示在hPDLSC和pPDLSC中的METTL3过表达组是 $28.47\% \pm 3.82\%$ 和 $8.55\% \pm 0.43\%$ ,分别是其过表达对照组的1.78倍( $t=5.012, P=0.007$ )和1.76倍( $t=7.293, P=0.002$ ),而在METTL3敲低组较敲低对照组染色浅且钙化结节较小,定量分析结果显示在hPDLSC和pPDLSC中的METTL3敲低组是 $6.36\% \pm 2.00\%$ 和 $3.78\% \pm 0.56\%$ ,分别是其敲低对照组的0.35倍( $t=4.444, P=0.011$ )和0.43倍( $t=5.337, P=0.006$ );将转染后的细胞进行21 d的成脂诱导培养,再进行油红O染色,结果显示脂滴的大小及数量在METTL3过表达组较过表达对照组少,定量分析结果显示在hPDLSC和pPDLSC中的METTL3过表达组是 $0.89\% \pm 0.11\%$ 和 $1.10\% \pm 1.15\%$ ,分别是其过表达对照组的0.24倍( $t=5.454, P=0.006$ )和0.49倍( $t=2.935, P=0.043$ ),而在METTL3敲低组则比敲低对照组的脂滴更大且多,定量分析结果显示在hPDLSC和pPDLSC中的METTL3敲低组是 $3.60\% \pm 1.08\%$ 和 $5.34\% \pm 1.31\%$ ,分别是其敲低对照组的1.94倍( $t=2.794, P=0.049$ )和2.93倍( $t=4.131, P=0.015$ )。**结论** pPDLSC的METTL3表达水平低于hPDLSC;METTL3的过表达可促进hPDLSC和pPDLSC的成骨分化,并抑制两者的成脂分化。

**【关键词】** 甲基转移酶样3; N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤修饰; 牙周膜干细胞; 成骨分化

**基金项目:**国家自然科学基金(81970960,82001079);国家口腔疾病临床医学研究中心2020年度专项课题(LCA202009)

**引用著录格式:**陈欣,张校晨,秦文,等.过表达甲基转移酶样3修复炎症来源牙周膜干细胞的成骨能力[J/OL].中华口腔医学研究杂志(电子版),2023,17(1):15-25.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2023.01.003

### Overexpression of methyltransferase-like 3 repairs the osteogenic ability of periodontal mesenchymal stem cells in patients with periodontitis

Chen Xin, Zhang Xiaochen, Qin Wen, Jin Zuolin

State Key Laboratory of Military Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Shaanxi Clinical Research Center for Oral Diseases, Department of Orthodontics, School of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: Jin Zuolin, Email: zuolinj@163.com

**[Abstract] Objective** To investigate the role of methyltransferase-like 3 (METTL3) in osteogenic and adipogenic differentiation of periodontal mesenchymal stem cells (PDLSCs). **Methods** Flow cytometry and colony formation assay were used to identify the surface markers and proliferation ability of PDLSCs. The osteogenic and adipogenic differentiation potential of PDLSCs was detected by alizarin red staining and oil red O staining, respectively. Human periodontal mesenchymal stem cells (hPDLSCs) and periodontal mesenchymal stem cells in patients with periodontitis (pPDLSCs) were used to construct METTL3 overexpression and knockdown models, respectively. The changes of osteogenesis and adipogenesis were detected by RT-PCR, Western blot, alizarin red staining and oil red O staining at mRNA level, protein level and macroscopic level, respectively. Two samples were compared using independent sample *t* test, and multiple groups were compared using One-Way ANOVA. **Results** Flow cytometry showed that hPDLSCs and pPDLSCs were positive for CD29 (100.0%, 98.0%), CD105 (100.0%, 99.5%) and CD146 (31.5%, 17.8%), and negative for CD34 (1.3%, 0.4%) and CD45 (1.4%, 0.4%). The results of colony formation experiment showed that the number of colonies formed of hPDLSCs and pPDLSCs was  $55 \pm 5$  and  $72 \pm 8$ , respectively, and the cell proliferation ability of hPDLSCs was lower than that of pPDLSCs ( $t = 3.16, P = 0.034$ ). Alizarin red staining and oil red O staining showed that both cells had osteogenic and adipogenic differentiation ability. hPDLSCs had stronger osteogenic differentiation ability ( $t = 27.77, P < 0.001$ ), while pPDLSCs had stronger adipogenic differentiation ability ( $t = 5.02, P = 0.007$ ). In the lentivirus transfection model, after 7 days of osteogenic induction culture, the mRNA expression level of *Runx2* in the METTL3 overexpression group was higher than that in the overexpression control group. The expression level of *Runx2* in the METTL3 overexpression group was  $3.63 \pm 1.15$  and  $1.61 \pm 0.38$  for hPDLSCs and pPDLSCs, respectively, which was 3.39 times ( $t = 3.777, P = 0.020$ ) and 1.71 times ( $t = 2.948, P = 0.042$ ) of the control group. The expression level of *Runx2* in the METTL3 knockdown group was  $0.16 \pm 0.03$  and  $0.26 \pm 0.07$  for hPDLSCs and pPDLSCs, respectively, which was 0.15 times ( $t = 9.669, P < 0.001$ ) and 0.26 times ( $t = 8.767, P < 0.001$ ) of the control group. *Runx2* protein expression level changed in the same way. After 21 days of osteogenic induction culture, the transfected cells were stained with alizarin red. The results showed that the METTL3 overexpression group had deeper staining and larger calcified nodules than the overexpression control group. The quantitative analysis results showed that the values of METTL3 overexpression group in hPDLSCs and pPDLSCs were  $28.47\% \pm 3.82\%$  and  $8.55\% \pm 0.43\%$ , which were 1.78 times ( $t = 5.012, P = 0.007$ ) and 1.76 times ( $t = 7.293, P = 0.002$ ) of the METTL3 overexpression control group. The staining was lighter and the calcified nodules were smaller in the knockdown group. The results of quantitative analysis showed that *Runx2* protein expression level in the METTL3 knockdown group was  $6.36\% \pm 2.00\%$  and  $3.78\% \pm 0.56\%$  for hPDLSCs and pPDLSCs, respectively, which was 0.35 times ( $t = 4.444, P = 0.011$ ) and 0.43 times ( $t = 5.337, P = 0.006$ ) of the knockdown control group. The transfected cells were cultured for lipid induction for 21 days, and then stained with oil red O. The results showed that the size and number of lipid droplets in the METTL3 overexpression group were less than that in the overexpression control group. The quantitative analysis results showed that the values of lipid droplets in the METTL3 overexpression group in hPDLSCs and pPDLSCs were  $0.89\% \pm 0.11\%$  and  $1.10\% \pm 1.15\%$ , which were 0.24 times ( $t = 5.454, P = 0.006$ ) and 0.49 times ( $t = 2.935, P = 0.043$ ) of the control. The lipid droplets in the METTL3 knockdown group were larger and more than those in the knockdown control group. The quantitative analysis results showed that the values of lipid droplets in the METTL3 knockdown group in hPDLSCs and pPDLSCs were  $3.60\% \pm 1.08\%$  and  $5.34\% \pm 1.31\%$ , which were 1.94 times ( $t = 2.794, P = 0.049$ ) and 2.93 times ( $t = 4.131, P = 0.015$ ) of

the control group, respectively. **Conclusions** The METTL3 expression level in pPDLSCs was lower than that in hPDLSCs. Overexpression of METTL3 can promote the osteogenic differentiation of hPDLSCs and pPDLSCs, and inhibit the adipogenic differentiation.

**【Key words】** Methyltransferase-like 3 (METTL3); N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A); Periodontal mesenchymal stem cells (PDLSCs); Osteogenic differentiation

**Fund programs:** National Natural Science Foundation of China (81970960, 82001079); 2020 Special Project of National Clinical Research Center for Oral Diseases (LCA202009)

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2023.01.003

随着牙周再生医学在口腔医学领域掀起的浪潮,口腔组织再生的关键细胞——牙周膜干细胞(periodontal mesenchymal stem cell, PDLSC)也随之进入学者们的眼帘<sup>[1-2]</sup>。与间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)相似, PDLSC也表现出自我更新和多向分化的潜能<sup>[2]</sup>。牙周炎作为引起牙齿丧失的一大顽固疾病,与多种系统性疾病也密切相关。在牙周炎微环境中, PDLSC也发挥着一定的作用。已有大量研究证明,牙周炎微环境会降低PDLSC的成骨分化能力,导致牙槽骨进一步丢失<sup>[3]</sup>。同时, PDLSC在牙周炎微环境中所发挥的作用多介于细胞信号通路,包括Wnt信号通路、核转录因子κB(nuclear transcription factor-kappa B, NF-κB)信号通路和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号<sup>[4-6]</sup>。由于PDLSC的干细胞特性,仍有必要探讨以PDLSC为中心的牙周炎成骨分化的具体调控机制。

得益于高通量测序技术的发展,表观遗传学的神秘面纱也将被层层揭开, N<sup>6</sup>-甲基腺嘌呤(N<sup>6</sup>-methyladenosine, m<sup>6</sup>A)修饰作为表观修饰领域的明星分子,已被证明在多种正常生理过程和疾病发展过程中发挥重要作用<sup>[7-8]</sup>。m<sup>6</sup>A甲基化修饰存在三类相关蛋白,包括甲基化转移酶、去甲基化酶和甲基化阅读蛋白。甲基转移酶样3(methyltransferase-like 3, METTL3)和METTL14作为甲基化转移酶,可以形成m<sup>6</sup>A甲基化修饰;脂肪和肥胖相关蛋白(fat mass and obesity-associated protein, FTO)和烷基化修复蛋白B同源物5(alkB homolog 5, ALKBH5)作为去甲基化酶,可以擦除m<sup>6</sup>A甲基化修饰。YTH结构域家族蛋白1/2/3(YTH domain family, YTHDF1/2/3)和胰岛素样生长因子2 mRNA结合蛋白1/2/3(insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins, IGF2BP1/2/3)作为甲基化阅读蛋白可以识别m<sup>6</sup>A甲基化修饰。近期,已有一些学者发现干细胞中的m<sup>6</sup>A甲基化修饰能够发挥一定的调控作用。METTL3/

IGF2BP3介导pre-miR-34A的m<sup>6</sup>A甲基化修饰可以促进MSC分泌miR-34a-5p,从而改善肠黏膜屏障功能<sup>[9]</sup>。急性髓细胞性白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者的MSC中METTL3表达下降,从而使得蛋白激酶B(又称AKT serine/threonine kinase-1, AKT-1)的mRNA上的m<sup>6</sup>A修饰水平下降,导致AKT蛋白表达增加,最终使得脂肪形成增多产生AML化疗耐药<sup>[10]</sup>。此外,癌症干细胞的产生和维持需要m<sup>6</sup>A甲基化修饰的参与,癌症的发生和发展也是如此<sup>[11]</sup>。一项研究表明,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)处理后, PDLSC中m<sup>6</sup>A甲基化修饰被激活<sup>[12]</sup>。另一项研究表明, LPS抑制人牙周成纤维细胞成骨分化的过程可能受到DNA高甲基化的影响<sup>[13]</sup>。基于以上研究,本课题组推测pPDLSC成骨能力减弱与m<sup>6</sup>A甲基化修饰有关。

## 材料与方法

### 一、材料与试剂

α-培养基(α-MEM)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.25%胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)(GIBICO, 美国);双抗(Hyclone, 美国);I型胶原酶(Sigma, 美国);抗CD29、CD34、CD45、CD105、CD146流式抗体(Bioscience, 美国);rabbit anti-Runx2抗体(ab236639, Abcam, 美国);rabbit anti-METTL3抗体(E3F2A, CST, 美国);rabbit anti-GAPDH抗体(10494-1-AP)、goat anti-Rabbit IgG(H+L)(Proteintech, 美国);Western blot及IP细胞裂解液、蛋白酶抑制剂、BCA蛋白浓度测定试剂盒、结晶紫、BCIP/NBT碱性磷酸酯酶显色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);PVDF膜(Thermo, 美国);蛋白-marker、快速封闭液、ECL化学发光试剂盒抗体稀释液[米鼠(西安)生物科技有限公司];12.5%SDSPAGE胶(上海雅酶生物医药科技有限公司);茜素红、油红O、OriCell人骨髓间质干细胞成骨诱导分化试剂盒、OriCell人骨髓间质干细胞成脂诱导分化试剂盒(Cyagen, 美国);



5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液(电泳液)和10×电泳转移缓冲液(转膜液)(上海尚宝生物科技有限公司);甲醇(天津市富宇精细化工有限公司),4%多聚甲醛溶液(biosharp,北京兰杰柯科技有限公司);AG RNAex Pro RNA提取试剂、Evo M-MLV反转录预混型试剂盒、SYBR® Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司)。

## 二、实验方法

1. 样本获取:分别从8例患者(31~40岁)获得牙齿,并培养人牙周膜干细胞(human periodontal mesenchymal stem cell, hPDLSC)和炎症来源牙周膜干细胞(periodontal mesenchymal stem cell in patients with periodontitis, pPDLSC)<sup>[14]</sup>。hPDLSC来源于正畸原因需要拔除的前磨牙或第三磨牙,纳入标准:(1)患者无系统病史和手术史;(2)该牙的牙槽骨无吸收;(3)该牙的牙周袋深度小于或等于3 mm。排除标准:(1)患者有系统病史及手术史;(2)该牙的牙槽骨存在吸收或炎症;(3)该牙的牙周袋深度大于3 mm。pPDLSC则来源于被诊断为牙周炎而被拔除的患牙,纳入标准:(1)患者无系统病史和手术史;(2)患牙的牙槽骨有2/3及以上程度的吸收;(3)患牙的牙周袋深度至少存在1个位点大于或等于5 mm。排除标准:(1)患者有系统病史及手术史;(2)患牙的牙槽骨吸收程度小于2/3;(3)患牙的牙周袋深度均小于5 mm。所得牙齿放于盛有 $\alpha$ -MEM的离心管中,并通过冰盒运输至实验室,在拔出后2 h内进行细胞分离工作。所有样本均来自空军军医大学第三附属医院颌面外科,并获得受试者的知情同意。

2. 分离和培养细胞:使用加有双抗的无菌PBS反复冲洗所收集牙齿的牙根,直至肉眼不可见明显血污存在。用无菌手术刀片将牙齿颈部牙结石刮掉,再次使用PBS冲洗若干次。使用无菌手术刀片将牙根中1/3的牙周膜组织刮下,用眼科剪将组织块剪成体积为1 mm<sup>3</sup>的碎屑,置于PBS内并收集于离心管中离心(1 000 r/min, 5 min, 离心半径9.5 cm)。弃去上清液,用I型胶原酶浸泡组织块并置于37℃的 $\varphi=5\%$  CO<sub>2</sub>的孵箱中消化30 min。结束后加入等体积基础培养基(含 $\varphi=1\%$ 双抗和 $\varphi=10\%$  FBS的 $\alpha$ -MEM)重悬,离心,弃上清。加入5 mL基础培养基,重悬沉淀后接种于六孔板内,在孵箱中培养,每3天换1次基础培养基,直到细胞爬出<sup>[14]</sup>。期间使用倒置显微镜观察细胞增殖情况,当细胞增殖至80%汇合度,使用胰蛋白酶进行细胞传代操作。所有实验

均使用第三代(P3)和P4细胞。

3. 流式细胞术:流式细胞术是一种可对单细胞进行多参数分析的方法<sup>[15]</sup>,在此用于鉴定hPDLSC和pPDLSC的细胞表面标志物。分别对两种细胞孵育相应抗体,如抗CD29、抗CD34、抗CD45、抗CD105和抗CD146抗体<sup>[16]</sup>。向细胞培养瓶内加入5 mL胰蛋白酶,放入孵箱5 min,倒置显微镜可见细胞呈亮点状漂浮在液体中时,再加入等体积基础培养基中和,并停止反应。将液体收集于离心管,离心后弃上清。加入无菌PBS重悬,离心弃上清,重复洗涤3次。将两种细胞以10<sup>6</sup>的数量各自分装在6个EP(eppendorf)管内,分别用100  $\mu$ L的PBS重悬每个EP管内的细胞,并根据抗体使用说明书,分别在各管内加入体积为5  $\mu$ L上述5种抗体,剩余1管作为空白对照组。将所有EP管放置在4℃环境孵育1 h,结束后离心弃上清,再加入500  $\mu$ L的无菌PBS洗涤3次,最后向各管加入400  $\mu$ L的PBS重悬,待测。使用流式细胞仪(Beckman Coulter, 美国)进行细胞表面标志物的检测及分析。

4. 细胞集落形成实验:将P3的hPDLSC和pPDLSC消化,细胞计数板计数后,分别向直径10 cm的大皿接种细胞500个,并加入10 mL基础培养基,震荡使细胞均匀接种于皿内,放入孵箱培养,每3天更换基础培养基,并在倒置显微镜下观察细胞增殖情况。培养约2周,在倒置显微镜下可见细胞形成集落时,吸出培养液,加入PBS洗涤3次,各皿加入6 mL的4%多聚甲醛,常温固定1 h,倒掉固定液,加入PBS洗涤3次,再加入6 mL的3%结晶紫溶液,常温染色10 min后,倒掉染液,使用PBS洗涤若干次直至多余染液褪去,最后进行细胞集落计数分析,并分别使用相机和倒置显微镜拍照记录。

5. 成骨分化能力鉴定:(1)成骨诱导培养:将P3的hPDLSC和pPDLSC均以10<sup>5</sup>/孔的密度接种于十二孔板内,各孔加入1.5 mL基础培养基,放入孵箱培养,2 d后在倒置显微镜下观察,细胞已增殖至60%~80%融合度。在避光条件下,吸弃基础培养基,各孔加入1.5 mL成骨诱导液,放置孵箱避光培养,每3天更换1次成骨诱导液,期间使用倒置显微镜观察细胞变化及矿化结节生成。(2)碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色:ALP是一种水解酶,可用于成骨能力的检测。在成骨诱导培养7 d后,去除成骨诱导液并使用PBS洗涤3次,然后使用4%多聚甲醛溶液固定细胞1 h,倒掉固定液并使用PBS洗涤



3次,各孔加入配置好的ALP染色工作液2 mL(根据商品说明书,ALP显色缓冲液:BCIP溶液:NBT溶液=10 mL:33  $\mu$ L:66  $\mu$ L),室温避光孵育30 min。结束后去除染液,PBS洗涤3次即可终止染色反应,待晾干后使用相机和倒置显微镜拍照记录。(3)茜素红染色:茜素红是茜素磺酸钠盐,能与钙盐螯合形成橙红色复合物,可用于成骨诱导培养后钙化结节的检测。在成骨诱导21 d后,可在倒置显微镜下观察到细胞间存在黑色菱形的固体,去除成骨诱导液并使用PBS轻柔洗涤3次,然后使用4%多聚甲醛溶液固定细胞1 h,倒掉固定液并使用PBS轻柔洗涤3次,各孔加入茜素红染液2 mL,室温染色5 min,吸除染液并使用PBS轻柔洗涤若干次,直至去净多余染液,使用相机和倒置显微镜拍照记录。

6. 成脂分化能力鉴定:(1)成脂诱导培养:将P3的hPDLSC和pPDLSC均以 $10^5$ /孔的密度接种于十二孔板内,各孔加入1.5 mL基础培养基,放入孵箱培养,3 d后在倒置显微镜下观察,细胞已增殖至90%~100%融合度。在避光条件下,吸弃基础培养基,各孔加入1.5 mL成脂诱导A液(根据商品说明书配置),放置孵箱避光培养,3 d后吸弃A液并加入1.5 mL成脂诱导B液,1 d后吸弃B液更换为A液,A液和B液交替使用,共诱导21 d,期间使用倒置显微镜观察细胞变化及脂滴生成。(2)油红O染色:油红O可与脂肪结合使之显色,可用于成脂诱导生成的脂滴检测。在成脂诱导21 d后,可在倒置显微镜下观察到细胞内形成脂滴,去除成脂诱导液并使用PBS轻柔洗涤3次,然后使用4%多聚甲醛溶液固定细胞1 h,倒掉固定液并使用PBS轻柔洗涤3次,各孔加入2 mL油红O染色工作液(根据商品说明书,油红O储存液:蒸馏水=3:2),室温染色30 min,吸除染液并使用PBS轻柔洗涤若干次,直至去净多余染液,使用倒置相差显微镜拍照记录。

7. 实时定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR):  
(1)细胞总RNA提取:全程在冰盒上操作,吸弃六孔板内的基础培养基,PBS洗涤3次,待晾干后,各孔加入1 mL RNAex Pro RNA提取试剂,无RNA酶枪头充分吹打使之完全与细胞接触,并将裂解液转移至无RNA酶EP管中静止5 min。每管加入200  $\mu$ L氯仿,剧烈震荡使之混匀,室温静置5 min后可见分层现象,离心(4  $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 15 min, 离心半径8.4 cm)。取上清液至新的无RNA酶EP管中,加入等体积异丙醇,上下颠倒混匀,室温静置10 min,离

心(4  $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 10 min, 离心半径8.4 cm),弃上清,加入200  $\mu$ L  $\varphi$ =75%乙醇/DEPC水溶液,洗涤沉淀,离心(4  $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 5 min, 离心半径8.4 cm),用无RNA酶枪头吸弃上清,开盖放置5 min使之干燥,加入20  $\mu$ L DEPC水,放入56  $^{\circ}$ C水浴5 min促沉淀溶解。(2)RNA定量及反转录:取2  $\mu$ L提取的mRNA混合液,紫外分光光度仪检测吸光度,并计算RNA浓度。构建10  $\mu$ L反转录体系(包含500 ng mRNA、2  $\mu$ L反转录酶和DEPC水补足体积)进行反转录(程序:37  $^{\circ}$ C 15 min, 85  $^{\circ}$ C 5 s, 4  $^{\circ}$ C),获得cDNA后直接用于实时定量RT-PCR或-20  $^{\circ}$ C保存。(3)实时定量RT-PCR:配置10  $\mu$ L RT-PCR的反应体系(5  $\mu$ L SYBR<sup>®</sup>预混液,0.2  $\mu$ L上游引物,0.2  $\mu$ L下游引物,1  $\mu$ L cDNA, 2.6  $\mu$ L DEPC水),加入八连管。使用CFX96实时定量PCR仪(Bio-Rad, 美国),检测程序设定为:95  $^{\circ}$ C变性3 min,重复40次15 s 95  $^{\circ}$ C和30 s 62  $^{\circ}$ C,程序结束后进行定量分析(引物序列见表1,均由艾科瑞生物公司设计并合成)。

表1 实时定量RT-PCR引物序列

| 基因                              | 引物序列                               |
|---------------------------------|------------------------------------|
| <i>Runx2</i>                    | 正向:5'-CCCCTGGCCTTCAAGGT-3'         |
|                                 | 反向:5'-CGTTACCCGCCATGACAGTA-3'      |
| <i><math>\beta</math>-actin</i> | 正向:5'-TGCCACCCAGCACAATGAA-3'       |
|                                 | 反向:5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3' |
| <i>METTL3</i>                   | 正向:5'-TGGGGGTATGAACGGGTAGA-3'      |
|                                 | 反向:5'-CCTTTGACACCAACCAAGCAG-3'     |

8. 蛋白免疫印迹(Western blot):(1)蛋白样品提取:全程在冰盒上操作,吸弃六孔板内的基础培养基,PBS洗涤3次,待晾干后,各孔加入90  $\mu$ L Western blot及IP细胞裂解液(已添加蛋白酶抑制剂),冰上裂解15 min后,使用干净的细胞刮收集细胞至EP管内。使用超声裂解EP管内蛋白15 s(3 s  $\times$  5次),结束后离心(4  $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 15 min, 离心半径8.4 cm),取上清进行蛋白浓度检测,配置BCA试剂工作液(A液:B液=50:1)。稀释标准品蛋白质量浓度为:0、0.25、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL加入96孔板作为对照,各蛋白样本稀释10倍后加到孔内,并添加200  $\mu$ L/孔BCA试剂工作液,37  $^{\circ}$ C孵育30 min。酶标仪检测吸光度,绘制标准曲线,并计算各蛋白样本的浓度。制备蛋白样本(质量浓度为3  $\mu$ g/2  $\mu$ L),100  $^{\circ}$ C加热15 min使蛋白变性,-20  $^{\circ}$ C保存。(2)Western blot:配置12.5%的SDS-PAGE胶,并固定于电泳槽的夹板中。加入电泳缓冲液,在上样

孔内加入 20  $\mu\text{L}$  的蛋白样本(总蛋白量一致)及 marker,调至恒压 80 V 电泳 30 min,再调至恒压 120 V 电泳 1 h,待目标蛋白条带完全分离,终止电泳。用甲醇预激活 PVDF 膜 5 min,取出电泳胶并将多余空白部分裁剪,按顺序将电泳胶、PVDF 膜和滤纸等放入转膜夹中(三明治法),加入转膜液使之浸没转膜夹,以恒流 200 mA 冰浴转膜 1.5 h。转膜结束后取出 PVDF 膜并做好标记,使用快速封闭液封闭 15 min。配置一抗浓度 anti-METTL3 (1:1 000)、anti-Runx2 (1:1 000)、anti-GAPDH (1:2 000),4  $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育 PVDF 膜。一抗孵育后的 PVDF 膜以 TBST 摇床洗涤 10 min,重复 3 次。二抗 goat anti-Rabbit IgG(H+L)以 1:10 000 浓度配置,室温二抗孵育 PVDF 膜 2 h,TBST 摇床洗涤 5 min,重复 3 次;配置 ECL 化学发光液(根据商品说明书,试剂 A 液:B 液=1:1),使 PVDF 膜表面浸润发光液,置于显影仪(Bio-Rad,美国)中显影并拍照,并使用软件 ImageJ 进一步进行条带定量分析。

**9. METTL3 慢病毒转染:**将 P3 的 hPDLSC 和 pPDLSC 以  $10^5$ /孔的密度接种于十二孔板中,1 d 后可见细胞增殖至 60% 融合度,吸弃原液,进行慢病毒转染。根据预实验确定慢病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 30,计算所需的过表达载体、过表达对照、敲低载体和敲低对照的体积分别是 30、3、3 和 5  $\mu\text{L}$ ;同时向各孔加入 1  $\mu\text{L}$  的 Polybrene 以促进转染,混匀后放入孵箱培养,24 h 后吸弃含病毒的培养基,更换基础培养基或者成骨诱导液,进行后续实验。

### 三、统计学处理方法

各实验使用不同个体来源细胞独立重复 3 次,实验数据由  $\bar{x} \pm s$  来呈现。应用 SPSS 19.0 软件统计分析数据,所有数据首先进行正态分布检验和方差齐性检验,两组样本之间的对比进行独立样本  $t$  检验,多组样本之间的对比进行单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、牙周膜干细胞的生物学特性

通过流式细胞术实验分析发现,hPDLSC 和 pPDLSC 的表面均阳性表达 CD29(100.0%,98.0%)、CD105(100.0%,99.5%)和 CD146(31.5%,17.8%),阴性表达 CD34(1.3%,0.4%)和 CD45(1.4%,0.4%) (图1)。通过分析细胞集落形成实验得到 hPDLSC 和 pPDLSC 的集落形成的数量分别为  $55 \pm 5$  和  $72 \pm 8$

( $P = 0.034$ ),说明 pPDLSC 的增殖能力比 hPDLSC 强(图2)。茜素红染色中 hPDLSC 的颜色较深,定量分析结果显示 hPDLSC 矿化结节面积占比为  $6.37\% \pm 0.27\%$ ,为 pPDLSC 的 6.74 倍( $t = 27.77, P < 0.001$ ),说明 hPDLSC 的成骨分化能力比 pPDLSC 强(图3);油红 O 染色中 pPDLSC 的脂滴较大且多,定量分析结果显示 pPDLSC 脂滴面积占比为  $7.45\% \pm 2.03\%$ ,为 hPDLSC 的 4.86 倍( $t = 5.02, P = 0.007$ ),说明 pPDLSC 的成脂分化能力比 hPDLSC 强(图4)。

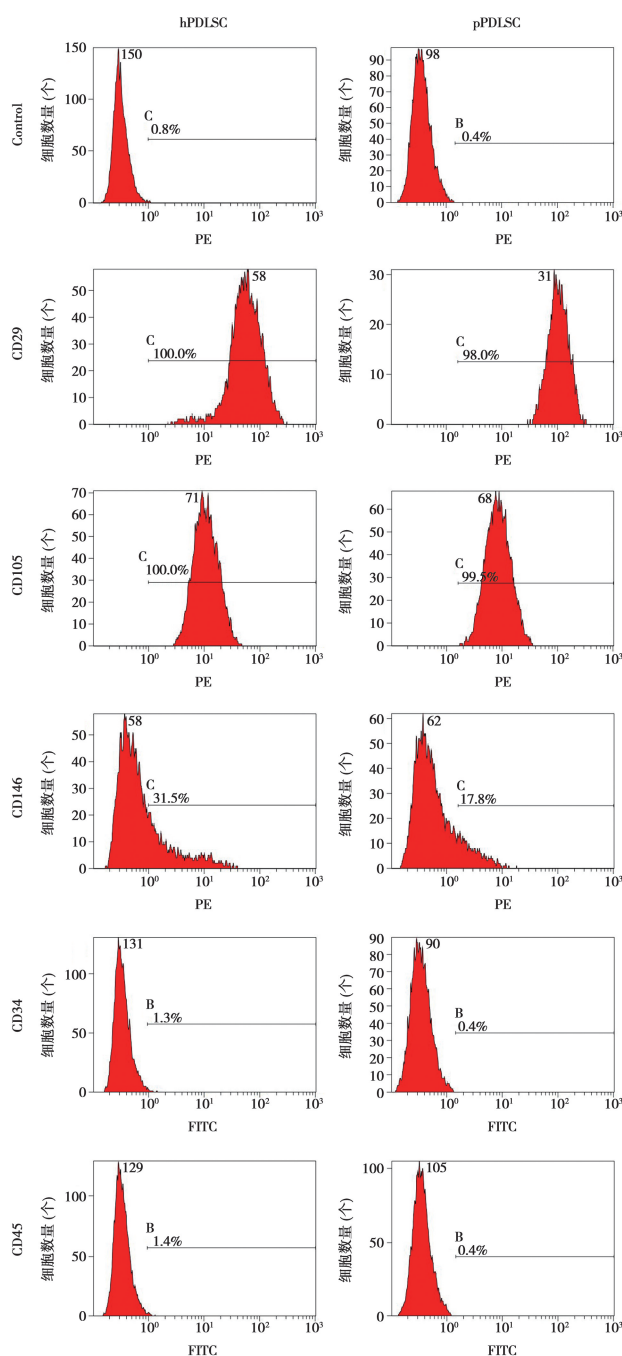


图1 流式细胞术鉴定人牙周膜干细胞(hPDLSC)和炎症来源牙周膜干细胞(pPDLSC)表面标志物

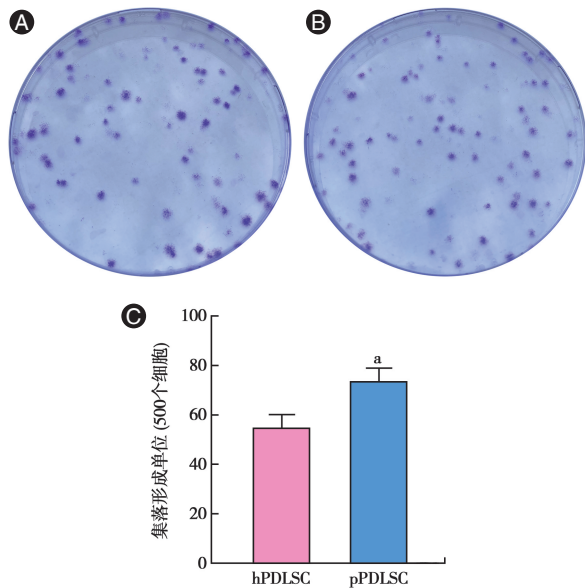


图2 细胞集落形成实验鉴定人牙周膜干细胞(hPDLSC)和炎症来源牙周膜干细胞(pPDLSC)细胞增殖能力 A:hPDLSC;B:pPDLSC;C:定量分析统计图,组间比较,差异有统计学意义(\* $P < 0.05$ )。

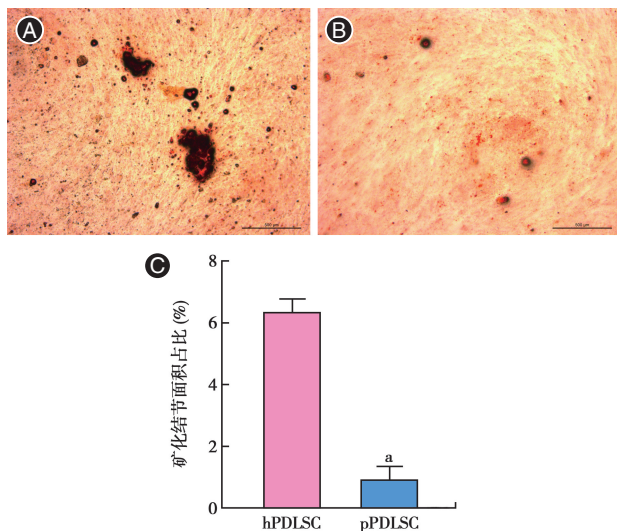


图3 茜素红染色鉴定人牙周膜干细胞(hPDLSC)和炎症来源牙周膜干细胞(pPDLSC)成骨分化能力 A:hPDLSC;B:pPDLSC;C:定量分析统计图,组间比较,差异有统计学意义(\* $P < 0.001$ )。

## 二、健康牙周膜干细胞和炎症来源牙周膜干细胞中甲基转移酶样3的表达水平

通过对课题组前期m<sup>6</sup>A芯片的结果进行分析,推测m<sup>6</sup>A甲基化修饰相关蛋白METTL3在hPDLSC和pPDLSC中表达不同。因此,本研究对m<sup>6</sup>A甲基转移酶METTL3进行检测。实时定量RT-PCR和Western blot的结果均发现,pPDLSC中的METTL3在mRNA水平和蛋白水平都较hPDLSC低(图5)。METTL3 mRNA的表达水平在hPDLSC中是 $1.01 \pm 0.15$ ,为pPDLSC的3.11倍,差异有统计学意义( $t = 7.924, P = 0.002$ )。

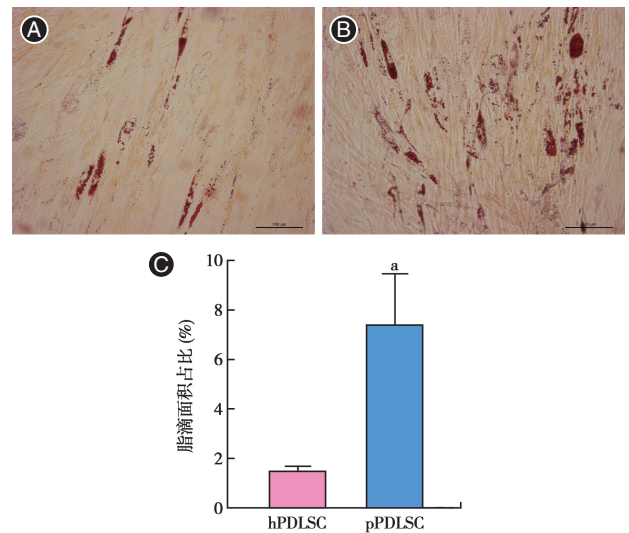


图4 油红O染色鉴定人牙周膜干细胞(hPDLSC)和炎症来源牙周膜干细胞(pPDLSC)成脂分化能力 A:hPDLSC;B:pPDLSC;C:定量分析统计图,组间比较,差异有统计学意义(\* $P < 0.05$ )。

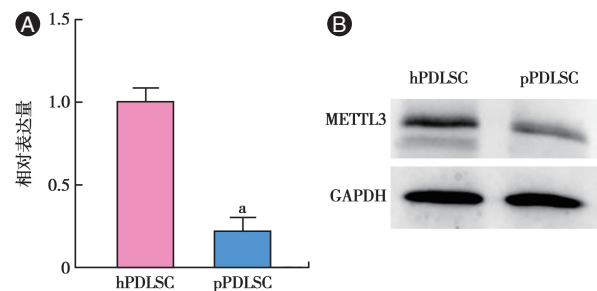


图5 甲基转移酶样3(METTL3)在人牙周膜干细胞(hPDLSC)和炎症来源牙周膜干细胞(pPDLSC)中含量的检测 A:mRNA表达水平,组间比较,差异有统计学意义(\* $P < 0.05$ );B:蛋白表达水平。

## 三、甲基转移酶样3促进牙周膜干细胞成骨分化

1. METTL3促进PDLSC成骨分化过程中成骨关键基因的表达:为了进一步探究甲基转移酶METTL3对于PDLSC成骨分化能力的作用,本研究将METTL3的过表达载体、敲低载体及空载体分别转染入hPDLSC和pPDLSC中,通过实时定量RT-PCR检测转染效率(图6A)。将转染后的细胞进行7 d的成骨诱导培养,并提取RNA和蛋白,进行实时定量RT-PCR和Western blot实验,结果显示成骨相关基因Runx2的mRNA水平在METTL3过表达组较过表达对照组高,在hPDLSC和pPDLSC中的METTL3过表达组的表达量是 $3.63 \pm 1.15$ 和 $1.61 \pm 0.38$ ,分别是其过表达对照组的3.39倍( $t = 3.777, P = 0.020$ )和1.71倍( $t = 2.948, P = 0.042$ );而在METTL3敲低组较敲低对照组低,在hPDLSC和pPDLSC中的METTL3敲低组的表达量是 $0.16 \pm 0.03$ 和 $0.26 \pm 0.07$ ,分别是其敲低对照组的0.15倍( $t = 9.669, P < 0.001$ )和0.26倍( $t = 8.767, P < 0.001$ )(图6B)。同时,Runx2的蛋白表达水平也发生相同改变(图7)。



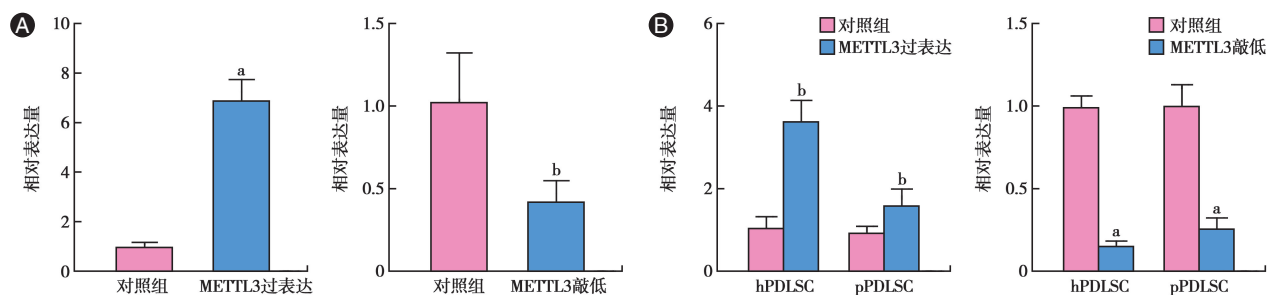


图6 甲基转移酶样3(METTL3)促进人牙周膜干细胞(hPDLSC)和炎症来源牙周膜干细胞(pPDLSC)成骨分化 A:实时定量RT-PCR检测慢病毒转染效率;B:METTL3慢病毒转染后Runx2 mRNA表达水平的变化;组间比较,差异有统计学意义(\* $P < 0.001$ ,<sup>b</sup> $P < 0.05$ )。

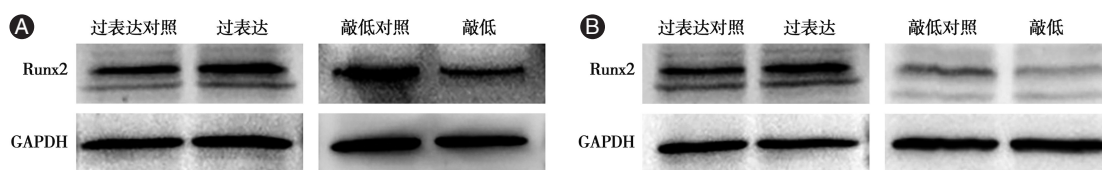


图7 Western blot检测甲基转移酶样3(METTL3)慢病毒转染后Runx2蛋白表达水平的变化 A:人牙周膜干细胞(hPDLSC);B:炎症来源牙周膜干细胞(pPDLSC)。

2. METTL3促进PDLSC成骨分化过程中ALP的表达:将转染后的细胞进行7 d的成骨诱导培养后进行ALP染色,结果显示METTL3过表达组较过表达对照组的蓝色深,定量分析结果显示ALP染色区域面积占比在hPDLSC和pPDLSC中的METTL3过表达组是 $49.99\% \pm 3.34\%$ 和 $41.96\% \pm 4.33\%$ ,分别是

其过表达对照组的1.59倍( $t = 6.645$ ,  $P = 0.003$ )和1.65倍( $t = 5.326$ ,  $P = 0.006$ ),而METTL3敲低组较敲低对照组的蓝色浅,定量分析结果显示在hPDLSC和pPDLSC中的METTL3敲低组是 $26.97\% \pm 4.69\%$ 和 $23.15\% \pm 5.10\%$ ,分别是其敲低对照组的0.67倍( $t = 3.863$ ,  $P = 0.018$ )和0.57倍( $t = 4.971$ ,  $P = 0.008$ ,图8)。

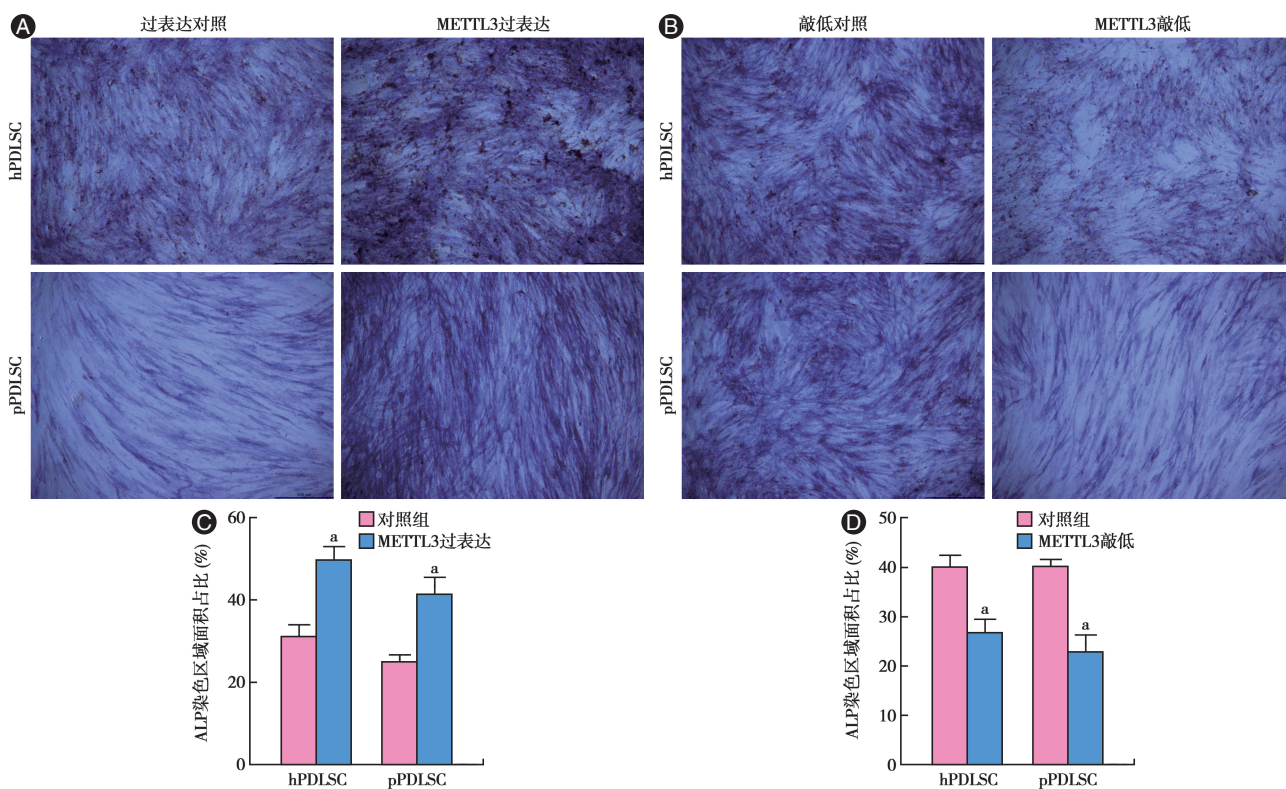


图8 甲基转移酶样3(METTL3)慢病毒转染后碱性磷酸酶(ALP)染色的变化及染色定量分析 A:METTL3过表达慢病毒转染后ALP染色;B:METTL3敲低慢病毒转染后ALP染色;C:METTL3过表达慢病毒转染后定量分析统计图;D:METTL3敲低慢病毒转染后定量分析统计图;组间比较,差异有统计学意义(\* $P < 0.05$ )。hPDLSC:人牙周膜干细胞;pPDLSC:炎症来源牙周膜干细胞。

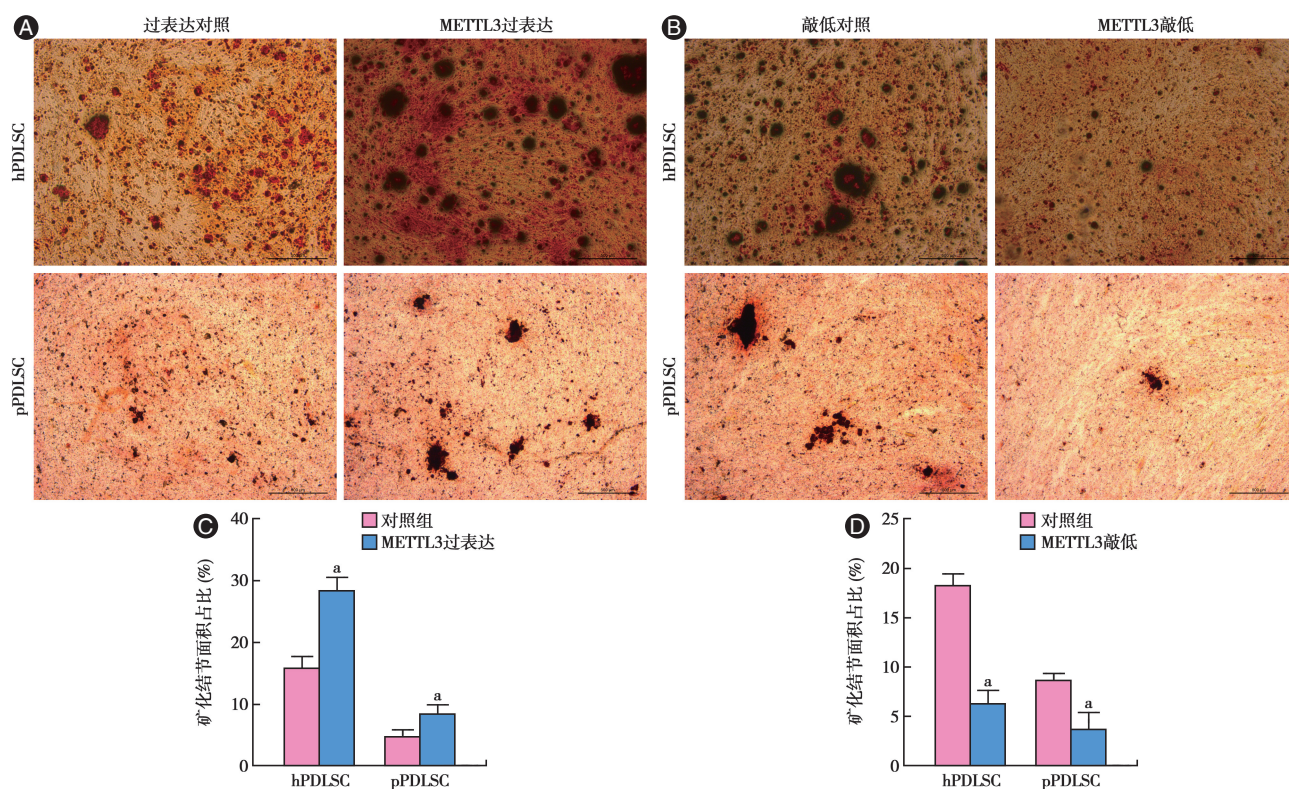


图9 甲基转移酶3(METTL3)慢病毒转染后茜素红染色的变化及染色定量分析 A:METTL3过表达慢病毒转染后茜素红染色;B:METTL3敲低慢病毒转染后茜素红染色;C:METTL3过表达慢病毒转染后定量分析统计图;D:METTL3敲低慢病毒转染后定量分析统计图;组间比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。hPDLSC:人牙周膜干细胞;pPDLSC:炎症来源牙周膜干细胞。

3. METTL3促进PDLSC成骨分化过程中矿化结节的生成:将转染后的细胞进行21 d的成骨诱导培养后进行茜素红染色,结果显示METTL3过表达组较过表达对照组染色深且钙化结节较大,定量分析结果显示矿化结节面积占比在hPDLSC和pPDLSC中的METTL3过表达组是 $28.47\% \pm 3.82\%$ 和 $8.55\% \pm 0.43\%$ ,分别是其过表达对照组的1.78倍( $t = 5.012, P = 0.007$ )和1.76倍( $t = 7.293, P = 0.002$ ),而在METTL3敲低组较敲低对照组染色浅且钙化结节较小,定量分析结果显示在hPDLSC和pPDLSC中的METTL3敲低组是 $6.36\% \pm 2.00\%$ 和 $3.78\% \pm 0.56\%$ ,分别是其敲低对照组的0.35倍( $t = 4.444, P = 0.011$ )和0.43倍( $t = 5.337, P = 0.006$ ,图9)。

#### 四、甲基转移酶3抑制牙周膜干细胞成脂分化

同样方法构建细胞模型,探索METTL3对PDLSC成脂分化的作用。将转染后的细胞进行21 d的成脂诱导培养,再进行油红O染色,结果显示脂滴的大小及面积占比在METTL3过表达组较过表达对照组少,定量分析结果显示在hPDLSC和pPDLSC中的METTL3过表达组是 $0.89\% \pm 0.11\%$ 和 $1.10\% \pm 1.15\%$ ,分别是其过表达对照组的0.24倍( $t = 5.454,$

$P = 0.006$ )和0.49倍( $t = 2.935, P = 0.043$ ,图10A),而在METTL3敲低组则比敲低对照组的脂滴更大且多,定量分析结果显示在hPDLSC和pPDLSC中的METTL3敲低组是 $3.60\% \pm 1.08\%$ 和 $5.34\% \pm 1.31\%$ ,分别是其敲低对照组的1.94倍( $t = 2.794, P = 0.049$ )和2.93倍( $t = 4.131, P = 0.015$ ,图10B)。

## 讨 论

本研究发现METTL3表达水平在pPDLSC中显著降低,且METTL3促进了hPDLSC和pPDLSC的成骨分化,并抑制了成脂分化。因此,pPDLSC的成骨分化能力的减弱和成脂分化能力的增强可能与降低的METTL3表达水平密切相关。结合课题组之前的研究<sup>[17-18]</sup>,推测METTL3对于PDLSC的成骨分化及成脂分化的影响是介于长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)的m<sup>6</sup>A甲基化修饰。METTL3可能通过改变lncRNA的m<sup>6</sup>A甲基化修饰水平从而影响hPDLSC和pPDLSC的成骨和成脂分化能力,而这一推测还需要进一步探索。

m<sup>6</sup>A甲基化修饰近年来得到了广泛的研究,已被证实参与mRNA的剪接,调节mRNA的核输出,调节



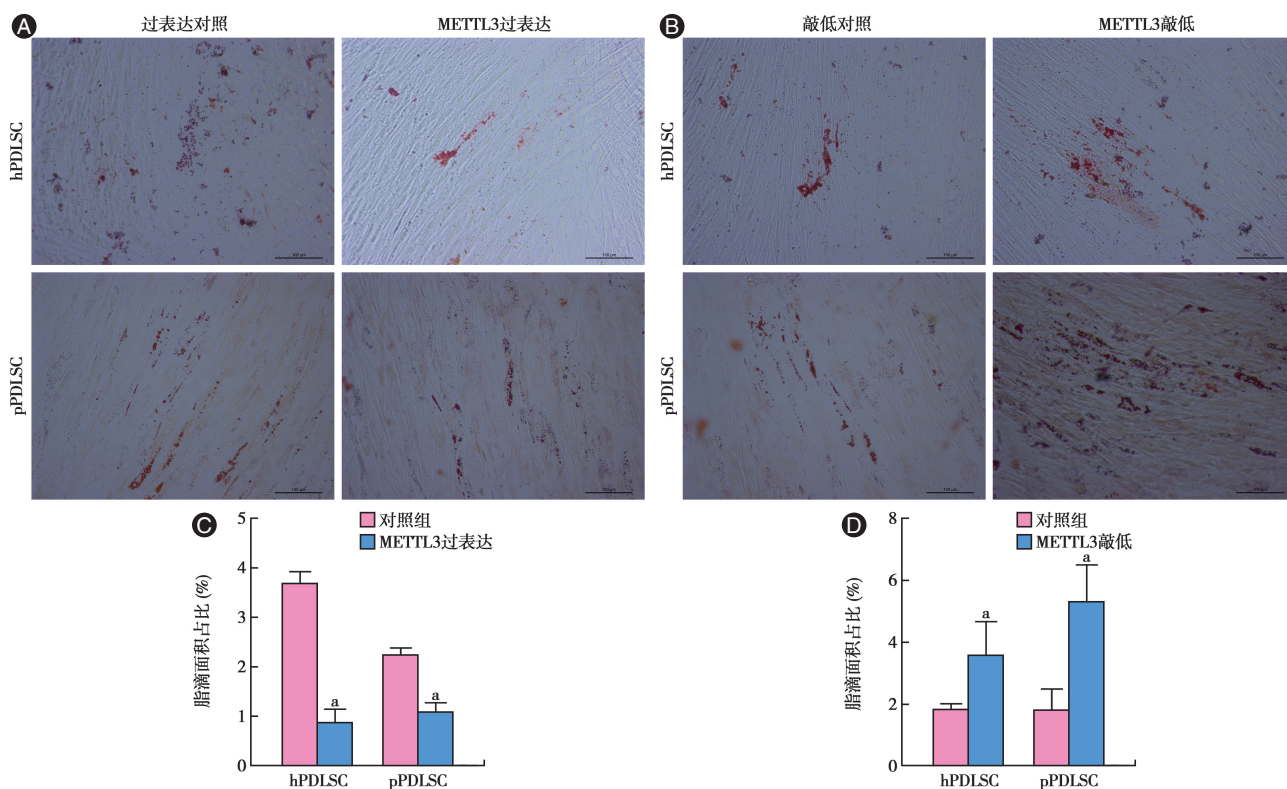


图10 甲基转移酶样3(METTL3)慢病毒转染后脂滴形成变化及染色定量分析 A: METTL3 过表达慢病毒转染后油红O染色; B: METTL3 敲低慢病毒转染后油红O染色; C: METTL3 过表达慢病毒转染后定量分析统计图; D: METTL3 敲低慢病毒转染后定量分析统计图; 组间比较, 差异有统计学意义(\* $P < 0.05$ )。hPDLSC: 人牙周膜干细胞; pPDLSC: 炎症来源牙周膜干细胞。

mRNA的翻译,影响mRNA的稳定性<sup>[19-20]</sup>。例如,研究表明METTL3介导的m<sup>6</sup>A甲基化修饰通过增强肝素结合生长因子(heparin binding growth factor, *HDGF*) mRNA的稳定性来促进胃癌血管生成和糖酵解<sup>[21]</sup>。METTL3通过调节转录因子EB(transcription factor EB, *TEFEB*) mRNA的m<sup>6</sup>A甲基化修饰,降低*TEFEB* mRNA的表达,从而抑制心肌细胞的自噬,且这一现象可被ALKBH5逆转<sup>[22]</sup>。此外,关于METTL3介导的m<sup>6</sup>A甲基化修饰对lncRNA作用的研究也涉及许多疾病,且已有研究认为METTL3介导的m<sup>6</sup>A甲基化修饰可调节lncRNA的表达和稳定性<sup>[23]</sup>。Song等<sup>[24]</sup>发现, METTL3通过调节m<sup>6</sup>A修饰水平和lncRNA(RP11-44N12.5)表达水平激活MAPK信号通路,从而促进人脂肪来源干细胞(human adipose-derived stem cell, hADSC)的成骨分化。Yuan等<sup>[25]</sup>发现, METTL3/lncRNA XIST/miR-302a-3p/USP8轴可调节后纵韧带骨化(ossification of the posterior longitudinal ligament, OPLL),并且这一过程是通过METTL3调控lncRNA XIST的m<sup>6</sup>A甲基化修饰水平实现的。一项研究表明, METTL3介导的m<sup>6</sup>A甲基化修饰通过调控miR-320而促进*Runx2*表达,从而调控骨髓间充质干细胞

(bone marrow derived mesenchymal stem cell, BMSC)的成骨分化<sup>[26]</sup>。与该研究相似,本课题组也证明了METTL3介导的m<sup>6</sup>A修饰是成骨分化的正向调控因子。

本研究仅探讨了甲基转移酶METTL3在PDLSC中对于成骨和成脂分化过程的作用,缺乏动物实验的验证,并且没有深入探讨相关机制研究,因此具有一定的局限性。今后,本课题组将继续展开该方面的相关研究,补充机制研究及体内验证实验,为m<sup>6</sup>A甲基化修饰在PDLSC中的功能做进一步诠释。

综上所述,本实验证明了pPDLSC的METTL3表达水平相较hPDLSC降低,且过表达METTL3可促进PDLSC的成骨分化并抑制成脂分化,而敲低METTL3可抑制PDLSC的成骨分化并促进成脂分化。因此, pPDLSC生物学性能改变与甲基转移酶METTL3有关。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 陈欣:实验操作、论文撰写、整理数据、统计学分析; 张校晨:整理数据、统计学分析; 秦文、金作林:研究指导、论文修改、经费支持

## 参考文献

- [1] Nuñez J, Vignoletti F, Caffesse RG, et al. Cellular therapy in periodontal regeneration [J]. Periodontology 2000, 2019, 79(1): 107-116. DOI:10.1111/prd.12250.



- [2] Tomokiyo A, Wada N, Maeda H. Periodontal ligament stem cells: Regenerative potency in periodontium [J]. *Stem Cells Dev*, 2019, 28(15): 974-985. DOI: 10.1089/scd.2019.0031.
- [3] Zheng W, Wang S, Wang J, et al. Periodontitis promotes the proliferation and suppresses the differentiation potential of human periodontal ligament stem cells [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(4): 915-922. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2314.
- [4] Cheng M, Zhou Q. Targeting EZH2 ameliorates the LPS - Inhibited PDLSC osteogenesis via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. *Cells Tissues Organs*, 2020, 209(4-6): 227-235. DOI: 10.1159/000511702.
- [5] Wang P, Tian H, Zhang Z, et al. EZH2 regulates lipopolysaccharide-induced periodontal ligament stem cell proliferation and osteogenesis through TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Stem Cells Int*, 2021; 7625134. DOI: 10.1155/2021/7625134.
- [6] Li X, Zheng Y, Zheng Y, et al. Circular RNA CDR1as regulates osteoblastic differentiation of periodontal ligament stem cells via the miR-7/GDF5/SMAD and p38 MAPK signaling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 232. DOI: 10.1186/s13287-018-0976-0.
- [7] Zhang L, Xia J. N6-methyladenosine methylation of mrna in cell senescence [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2021. DOI: 10.1007/s10571-021-01168-2.
- [8] Li M, Zha X, Wang S. The role of N6-methyladenosine mRNA in the tumor microenvironment [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1875(2): 188522. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188522.
- [9] Li YJ, Xu QW, Xu CH, et al. MSC promotes the secretion of exosomal miR-34a-5p and improve intestinal barrier function through METTL3-mediated pre-miR-34A m<sup>6</sup>A modification [J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(8): 5222-5235. DOI: 10.1007/s12035-022-02833-3.
- [10] Pan ZP, Wang B, Hou DY, et al. METTL3 mediates bone marrow mesenchymal stem cell adipogenesis to promote chemoresistance in acute myeloid leukaemia [J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(6): 1659-1672. DOI: 10.1002/2211-5463.13165.
- [11] Ma Z, Ji J. N6-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) RNA modification in cancer stem cells [J]. *Stem Cells*, 2020. DOI: 10.1002/stem.3279.
- [12] Diomedea F, Thangavelu SR, Merciaro I, et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide stimulation in human periodontal ligament stem cells: Role of epigenetic modifications to the inflammation [J]. *Eur J Histochem*, 2017, 61(3): 2826. DOI: 10.4081/ejh.2017.2826.
- [13] Uehara O, Abiko Y, Saitoh M, et al. Lipopolysaccharide extracted from Porphyromonas gingivalis induces DNA hypermethylation of runt-related transcription factor 2 in human periodontal fibroblasts [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2014, 47(3): 176-181. DOI: 10.1016/j.jmii.2012.08.005.
- [14] Wu RX, Bi CS, Yu Y, et al. Age-related decline in the matrix contents and functional properties of human periodontal ligament stem cell sheets [J]. *Acta Biomater*, 2015, 22: 70-82. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.04.024.
- [15] McKinnon KM. Flow cytometry: An overview [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2018, 120: 5.1.1-5.1.11. DOI: 10.1002/cpim.40.
- [16] Gao LN, An Y, Lei M, et al. The effect of the coumarin-like derivative osthole on the osteogenic properties of human periodontal ligament and jaw bone marrow mesenchymal stem cell sheets [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(38): 9937-9951. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.017.
- [17] Wang L, Wu F, Song Y, et al. Long noncoding RNA related to periodontitis interacts with miR-182 to upregulate osteogenic differentiation in periodontal mesenchymal stem cells of periodontitis patients [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(8): e2327. DOI: 10.1038/cddis.2016.125.
- [18] Xu Y, Qin W, Guo D, et al. LncRNA-TWIST1 promoted osteogenic differentiation both in PDLSCs and in HPDLSCs by inhibiting TWIST1 expression [J]. *Biomed Res Int*, 2019: 8735952. DOI: 10.1155/2019/8735952.
- [19] Frye M, Harada BT, Behm M, et al. RNA modifications modulate gene expression during development [J]. *Science*, 2018, 361(6409): 1346-1349. DOI: 10.1126/science.aau1646.
- [20] Wang S, Lv W, Li T, et al. Dynamic regulation and functions of mRNA m<sup>6</sup>A modification [J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 48. DOI: 10.1186/s12935-022-02452-x.
- [21] Wang Q, Chen C, Ding Q, et al. METTL3-mediated m<sup>6</sup>A modification of HDGF mRNA promotes gastric cancer progression and has prognostic significance [J]. *Gut*, 2020, 69(7): 1193-1205. DOI: 10.1136/gutjnl-2019-319639.
- [22] Song H, Feng X, Zhang H, et al. METTL3 and ALKBH5 oppositely regulate m<sup>6</sup>A modification of *TFEB* mRNA, which dictates the fate of hypoxia/reoxygenation-treated cardiomyocytes [J]. *Autophagy*, 2019, 15(8): 1419-1437. DOI: 10.1080/15548627.2019.1586246.
- [23] Chang YZ, Chai RC, Pang B, et al. METTL3 enhances the stability of MALAT1 with the assistance of HuR via m<sup>6</sup>A modification and activates NF- $\kappa$ B to promote the malignant progression of IDH-wildtype glioma [J]. *Cancer Lett*, 2021, 511: 36-46. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.04.020.
- [24] Song Y, Pan Y, Wu M, et al. METTL3-mediated lncRNA m<sup>6</sup>A modification in the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells induced by NEL-like 1 protein [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2021, 17(6): 2276-2290. DOI: 10.1007/s12015-021-10245-4.
- [25] Yuan X, Shi L, Guo Y, et al. METTL3 regulates ossification of the posterior longitudinal ligament via the lncRNA XIST/miR-302a-3p/USP8 axis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 629895. DOI: 10.3389/fcell.2021.629895.
- [26] Yan G, Yuan Y, He M, et al. m<sup>6</sup>A methylation of precursor-miR-320/RUNX2 controls osteogenic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 421-436. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.12.001.

(收稿日期: 2022-10-18)

(本文编辑: 王嫚)