

网络出版时间: 2021-11-25 8:30 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20211124.1048.019.html>

miR-223-3p 通过抑制 VHL 促进牙髓干细胞成骨分化的研究

陆蓓蓓 朱友明

摘要 目的 探讨 miR-223-3p 通过抑制希佩尔林道(VHL)基因促进人牙髓干细胞(hDPSCs)成骨分化中的研究。方法 低氧诱导 DPSCs 细胞 24 h(氧浓度 1%)。通过 MTT 实验观察细胞增殖的变化。生物信息学预测 miR-223-3p 的 miRNA 通过 luciferase 验证 miR-223-3p 与 VHL 的关系。合成的 miR-223-3p 模拟物或 miR-223-3p 抑制剂转染至 DPSCs 细胞,通过 qRT-PCR 和 Western blot 法检测 miR-223-3p、VHL、HIF-1 α 、Runx2、BMP2 信使 RNA(mRNA)和 VHL、HIF-1 α 蛋白的表达。结果 miR-223-3p 在低氧诱导的 DPSCs 细胞中表达增多($P < 0.05$)。MTT 结果表明 miR-223-3p mimics 对 DPSCs 细胞的增殖有促进作用($P < 0.05$)。且 miR-223-3p 通过靶向 VHL 3'-UTR 调控 VHL 的表达水平。qRT-PCR 和 Western blot 法检测 miR-223-3p 成功转染,显著促进 HIF-1 α 、Runx2、BMP2 基因的表达($P < 0.05$)。结论 miR-223-3p 通过抑制 VHL 基因促进牙髓干细胞成骨分化。

关键词 人牙髓干细胞;低氧诱导因子-1 α ;VHL;miR-223-3p;成骨

中图分类号 R 782

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)12-1949-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.019

人牙髓干细胞(human dental pulp stem cells, hDPSCs)是人牙髓组织中具有自我更新功能的多能细胞,可诱导分化为成骨细胞、神经细胞、成软骨细胞和脂肪细胞^[1]。微小 RNA(microRNA, miR)是在真核生物中内源性表达长度为 18~25 个核苷酸的单链非编码 RNA。有研究^[2]表明,miR-223-3p 上调碱性磷酸酶(ALP)活性,扩增矿化结节数量,上调牙本质涎蛋白(DSPP)和牙本质基质蛋白 1(DMP-1)的蛋白水平,促进 DPSCs 成牙本质分化。低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)是 HIF-1 的活性单位,其调节数百个参与骨髓血管生成、血管反应和动脉血管生成的基因的转录活性^[3]。HIF-1 α 和希佩尔林道(Von Hippel-Lindau, VHL)基因是肿瘤低氧反应的关键调控因子,在肿瘤血管生成和肿瘤侵袭中发挥重要作用。目前尚无文献报道 HIF-1 α 、VHL 与 miR-223-3p 表达的关系。在这项研究中检测 miR-223-3p 在低氧诱导 DPSCs 细胞中的表达,研究其对牙髓干细胞增殖能力的影响,预测 miR-223-3p 的结合靶点,并研究其与 miR-223-3p 的关系,检测 VHL 及 HIF-1 α 基因在 DPSCs 细胞中的表达,探究 HIF-1 α 、VHL 与 miR-223-3p 的

2021-10-03 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31970677)

作者单位:安徽医科大学口腔医学院,安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032

作者简介:陆蓓蓓,女,硕士研究生;

朱友明,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: 95640021@qq.com

treated by cold atmospheric plasma(CAP) for 10 s, 20 s, 30 s, 40 s and 50 s to form PAS. The PBS with 0 s CAP treatment was taken as the control group. The pH value and active medium concentration of PAS was detected by electronic pH meter and kit respectively. CCK-8 kit was used to detect cell proliferation. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. Western blot was used to detect the expression of kinase B(AKT), phosphorylated AKT(p-AKT), phosphatidylinositol-3 kinase(PI3K) and phosphorylated PI3K(p-PI3K) protein in the HemECs. **Results**

Compared with the control group, the pH value of PAS gradually decreased in a dose-dependent manner. And the concentration of active mediums such as NO₃⁻, H₂O₂ and O₃ in PAS increased in a dose-dependent manner. Compared with the control group, PAS significantly increased the level of ROS in HemECs, inhibited the proliferation and promoted the apoptosis. Compared with the control group, the expression of p-PI3K had no significant change, and the expression of p-AKT had no significant change at 10 s. However, the expression of p-AKT decreased rapidly, when the processing time increased to 20 s, 30 s, 40 s, and 50 s. **Conclusion** PAS can inhibit proliferation and promote apoptosis of HemECs. This effect is related to the increase of intracellular ROS level and the down-regulation of AKT phosphorylation level.

Key words cold atmospheric plasma; plasma-activated solution; HemECs; activated oxygen species

表达在牙髓干细胞成骨分化过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 细胞来源 实验牙髓干细胞来源于临床收集年轻因正畸需要拔除的健康前磨牙或阻生齿。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司) ,miR-223-3p 模拟物(miR-223-3p mimics) 、miR-223-3p 抑制剂(miR-223-3p inhibitor) 、乱序 RNA (scrambled RNA) (上海吉玛制药技术有限公司) ,胎牛血清(美国 HyClone 公司) ,RNA 抽提试剂 TRIzol(上海碧云天生物技术有限公司) ,实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR ,qRT-PCR) 试剂盒(日本 TaKaRa 公司) ,Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司) ,反转录(reverse transcription ,RT) 试剂盒(日本 TaKaRa 公司) 。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 在无菌条件下 ,劈开牙齿 ,取出牙髓并切成碎片。首先滴 1 滴培养液在培养皿中 ,用消毒的镊子把破碎的组织放入培养液。注意组织铺平不要重叠。在盖玻片的 4 角涂上无菌凡士林 ,轻轻地将盖玻片盖在组织上 ,使其贴壁生长;不要产生气泡。将 DPSCs 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中 ,加入链霉素和青霉素 ,在 5% CO₂、饱和湿度、37 °C 培养箱中培养。培养 1 周后 ,细胞爬出 ,待细胞长到汇合度 90% ~ 95% 时进行传代。实验所用牙髓干细胞为第 2 ~ 4 代。倒置显微镜观察细胞生长情况 ,细胞传代后 ,每 3 d 换液 1 次。

1.2.2 低氧处理 DPSCs 细胞 DPSCs 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养至对数生长期后 ,低氧处理 DPSCs 细胞 24 h (O₂ 浓度 1% ,CO₂ 浓度 5%) 。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖能力 取对数生长期的 DPSCs 细胞 ,分为 miR 对照组和 miR-223-3p mimics 组 ,每孔 1 800 个细胞均匀接种于 96 孔板上 ,每孔加 200 μ l 培养基培养。每组设 4 个复孔 ,倒置显微镜观察细胞。原则上细胞贴壁后 ,按时间梯度添加 miR-223-3p mimics 处理 DPSCs 细胞 ,加入 20 μ l MTT 溶液 (MTT 浓度为 5 g/L) ,5% CO₂ ,37 °C 继续孵育 4 h 后吸走上清液 ,每孔加入二甲基亚砷(DMSO) 150 μ l ,摇床低速振荡 10 min ,用酶联免疫检测仪测定各孔吸光度值 ,绘制细胞生长曲线图。

1.2.4 qRT-PCR 法测定目的基因 miR-223-3p、VHL 和 HIF-1 α 以及成骨相关因子 (Runx2、BMP2) 的 mRNA 的表达 总 RNA 提取及 cDNA 合成: TRIzol 法提取细胞总 RNA ,测浓度后 ,放在冰上待用。再进行逆转录获得 cDNA ,置 -20 °C 保存备用。qRT-PCR 法检测 miR-223-3p、VHL 和 HIF-1 α 以及成骨相关因子 (Runx2、BMP2) 的 mRNA 的相对表达水平 ,设计合成经 GenBank 检索的 miR-223-3p、VHL、HIF-1 α 、Runx2、BMP2 的引物。扩增条件为 94 °C 预变性 2 min ,94 °C 变性 30 s ,56 °C 退火 1 min ,72 °C 延伸 2 min ,共 35 个循环。反应结束后 ,用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应产物 ,并在紫外灯下观察电泳带并拍照。

1.2.5 Western blot 法检测 HIF-1 α 蛋白以及 VHL 蛋白的表达 收集细胞 RIPA 冰上裂解 40 min (加入蛋白酶抑制剂) ,每隔 5 min 摇匀 1 次。于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min。取上清液到新管中 ,BCA 法测定蛋白质浓度 ,加入等体积 2 $\times$ SDS 蛋白上样缓冲液 ,95 °C 煮 15 min。使用 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 ,用湿式电转移法把蛋白转移到 PVDF 膜。TBST 冲洗 5 次 ,每次 8 min ,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液孵育一抗 ,4 °C 过夜。一抗稀释比例 β -actin 1 : 500 ,HIF-1 α 1 : 200 ,VHL 1 : 1 000。第 2 天在室温下孵育二抗 1 h 后 TBST 洗涤 5 次 ,每次 8 min。二抗用 TBST 稀释 1 : 5 000。配制新鲜 HRP 底物 (A 液和 B 液 1 : 1 混合 ,避光) ,在化学发光检测仪上曝光检测。 β -actin 为内参。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 20.0 软件进行分析 ,实验数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,两组间比较采用 t 检验 ,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-223-3p 在低氧诱导的 DPSCs 中的表达增多 低氧诱导 DPSCs 细胞 24 h (O₂ 浓度 1% ,CO₂ 浓度 5%) ,并选择常氧下培养 24 h (O₂ 浓度 21% ,CO₂ 浓度 5%) 的 DPSCs 细胞作为 Ctr 组。24 h 后提取细胞总 RNA ,收集蛋白。应用 qRT-PCR 以及 Western blot 方法检测低氧诱导组与 Ctr 组的 miR-223-3p mRNA 相对表达水平以及 HIF-1 α 蛋白的表达。结果表明低氧诱导组 DPSCs 细胞中 miR-223-3p mRNA 相对表达水平明显高于 Ctr 组 DPSCs 细胞 (图 1A) ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。用 Western blot 方法检测 2 组 DPSCs 细胞 HIF-1 α 蛋白表达水平。正常情况下 ,HIF-1 α 蛋白在 DPSCs 细胞中的

表达较低。低氧诱导 DPSCs 细胞 24 h (O₂ 浓度 1%, CO₂ 浓度 5%), HIF-1 α 蛋白表达明显增多(图 1B)。

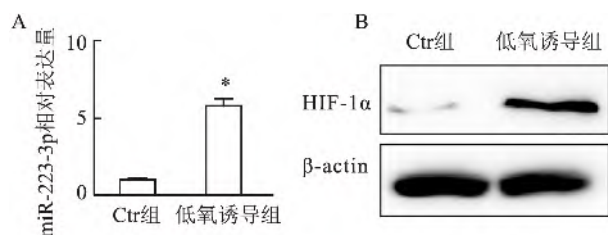


图 1 miR-223-3p 在低氧诱导的 DPSCs 中的表达

A: 2 组 DPSCs 细胞中 miR-223-3p mRNA 相对表达水平; B: 2 组 DPSCs 细胞 HIF-1 α 蛋白表达水平; 与 Ctr 组比较: * $P < 0.05$

2.2 miR-223-3p 靶向调控 VHL

2.2.1 筛选 miR-223-3p 靶向作用的基因 通过生物信息学的方法,在 targetscan 上对 miR-223-3p 的潜在结合位点进行预测,显示 miR-223-3p 潜在靶向 VHL 3'-UTR 146 ~ 152 位之间的碱基(图 2)。

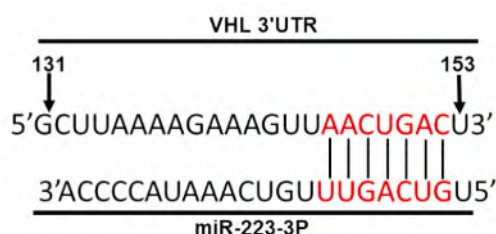


图 2 miR-223-3p 潜在靶向 VHL 3'-UTR 146 ~ 152 位之间的碱基

2.2.2 荧光报告基因验证 miR-223-3p 靶向调控 VHL 为进一步证明上述观点,该实验将野生型 VHL (wt-VHL) 与突变型 VHL (mut-VHL) 的 3'-UTR 区与双荧光报道载体 pmirGLO 连接。将重组载体与 miR-223-3p mimics 或 scramble RNA 两两组合共转染到 hDPSCs 细胞中,比较各组荧光信号的强弱。结果(图 3)显示,mut-VHL 和 miR-223-3p mimics 共转染细胞后,细胞的荧光信号值与 mut-VHL 和 scramble RNA 共转染组相比无明显变化,而将 wt-VHL 和 miR-223-3p mimics 共转染细胞后的荧光信号值与 wt-VHL 和 scramble RNA 共转染组比较显著降低 ($P < 0.05$)。即与 miR 对照组相比,miR-223-3p 显著抑制了野生型报告基因的相对活性,但没有抑制突变型报告基因的相对活性。

2.2.3 细胞学验证 miR-223-3p 靶向调控 VHL 将 miR-223-3p mimics 在脂质体介导下转染至 DPSCs

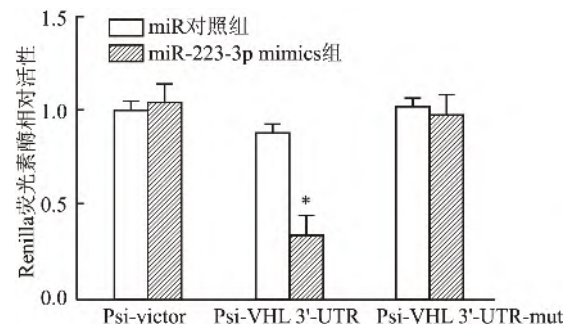


图 3 luciferase 实验表明 miR-223-3p 靶向作用于 VHL 与 miR 对照组比较: * $P < 0.05$

细胞,并选择表达 scramble RNA 的 DPSCs 细胞作为 miR 对照组。转染 48 h 后提取细胞总 RNA 和蛋白,用 qRT-PCR 检测 miR-223-3p mimics 组及对照组 DPSCs 细胞中 miR-223-3p、VHL 的 mRNA 的表达情况。结果表明,与 miR 对照组相比,表达 miR-223-3p mimics 的 DPSCs 细胞中 miR-223-3p 的 mRNA 表达水平发生上调(图 4A),VHL 的 mRNA 表达水平发生下调(图 4B) ($P < 0.05$)。通过 Western blot 方法检测 HIF-1 α 、VHL 蛋白表达水平。结果表明,与 miR 对照组相比,表达 miR-223-3p mimics 的 DPSCs 细胞中 HIF-1 α 蛋白的表达上调,VHL 蛋白的表达下调(图 4C) ($P < 0.05$)。

用 miR-223-3p inhibitor 反向验证 miR-223-3p 的作用,将 miR-223-3p inhibitor 在脂质体介导下转染至 DPSCs 细胞,并选择表达 scramble RNA 的 DPSCs 细胞作为 miR 对照组。转染 48 h 后提取细胞总 RNA 和蛋白,用 qRT-PCR 检测 miR-223-3p inhibitor 组及对照组 DPSCs 细胞中 miR-223-3p、VHL 的 mRNA 的表达情况。结果显示,与 miR 对照组相比,表达 miR-223-3p inhibitor 的 DPSCs 细胞中 miR-223-3p 的 mRNA 表达水平发生下调(图 5A),VHL 的 mRNA 表达水平发生上调(图 5B) ($P < 0.05$)。通过 Western blot 方法检测 HIF-1 α 、VHL 蛋白表达水平。结果表明,与 miR 对照组相比,表达 miR-223-3p inhibitor 的存在显著下调了 HIF-1 α 蛋白的表达水平,显著上调了 VHL 蛋白的表达(图 5C) ($P < 0.05$)。

2.3 miR-223-3p 对细胞增殖的影响 将 miR-223-3p mimics 在脂质体介导下转染至 DPSCs 细胞,并选择表达 scramble RNA 的 DPSCs 细胞作为 miR 对照组。转染 0、12、24、48、72 h 后,通过 MTT 实验检测 miR 对照组和 miR-223-3p mimics 组 DPSCs 细胞增殖能力。在培养 DPSCs 细胞 72 h 后,miR-223-3p

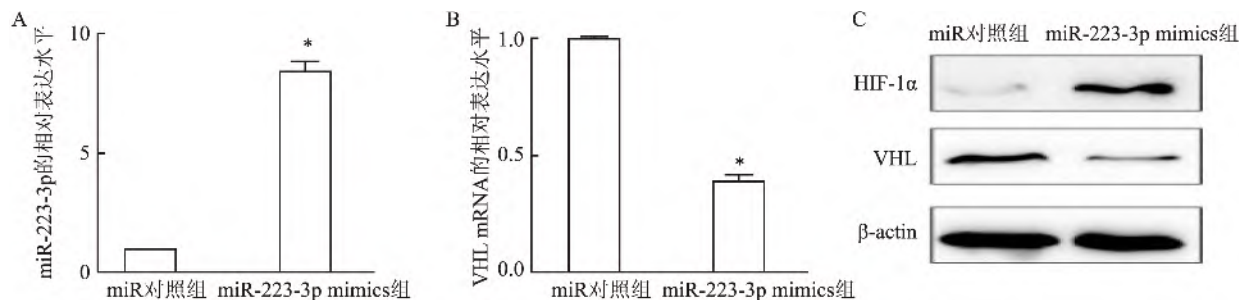


图4 转染后2组 miR-223-3p 和 VHL 的 mRNA 及 HIF-1α、VHL 蛋白表达水平变化

A: miR 对照组和 miR-223-3p mimics 组的 miR-223-3p 表达情况; B: miR 对照组和 miR-223-3p mimics 组的 VHL mRNA 表达情况; C: miR 对照组和 miR-223-3p mimics 组的 HIF-1α、VHL 蛋白表达情况; 与 miR 对照组比较: * $P < 0.05$

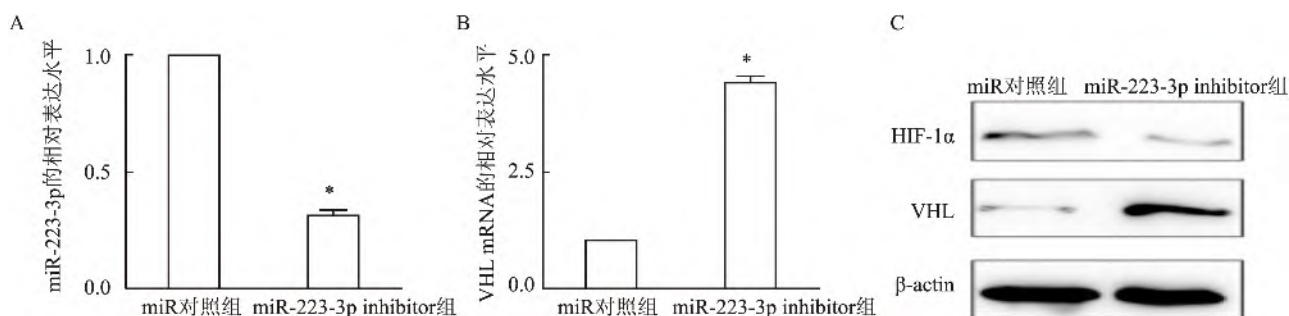


图5 转染后2组 miR-223-3p 和 VHL 的 mRNA 及 HIF-1α、VHL 蛋白表达水平变化

A: miR 对照组和 miR-223-3p inhibitor 组的 miR-223-3p 表达情况; B: miR 对照组和 miR-223-3p inhibitor 组的 VHL mRNA 表达情况; C: miR 对照组和 miR-223-3p inhibitor 组的 HIF-1α、VHL 蛋白表达情况; 与 miR 对照组比较: * $P < 0.05$

mimics 组较 miR 对照组细胞增殖能力则明显升高 (图6), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。研究结果表明 miR-223-3p 可能促进 DPSCs 细胞增殖能力。

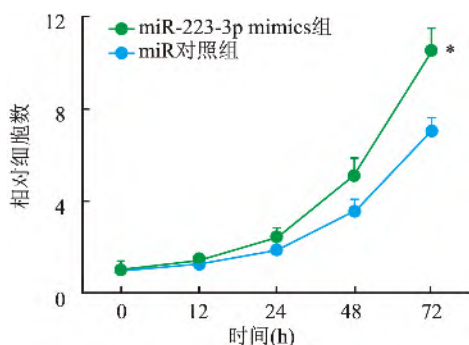


图6 miR-223-3p 对细胞增殖的影响

与 miR 对照组比较: * $P < 0.05$

2.4 miR-223-3p 促进成骨相关因子 (Runx2、BMP2) 的 mRNA 的表达 将 miR-223-3p mimics 转染至 DPSCs 细胞, 并选择表达 scramble RNA 的 DPSCs 细胞作为 miR 对照组。分别于转染 0、1、4、7、14、21 d 后检测 miR-223-3p、VHL、HIF-1α 和 2 个

与成骨密切相关的基因。与 miR 对照组相比, 随着转染时间的增加, 自第 4 天起 HIF-1α、Runx2 和 BMP2 的 mRNA 表达显著增高, 至第 21 天仍维持高水平, 而 VHL mRNA 的表达水平自第 1 天起显著下降, 之后一直维持着低水平 ($P < 0.05$)。以上结果显示, miR-223-3p、HIF-1α、Runx2、BMP2 的 mRNA 表达水平与转染时间呈正相关, VHL 的 mRNA 表达水平与转染时间呈负相关。miR-223-3p 促进成骨相关因子 (HIF-1α、Runx2、BMP2) mRNA 的表达。见图 7。

3 讨论

HIF-1 是一种异源二聚体, 由两个亚基组成, 即 O_2 调节的 HIF-1α 亚基和组成性表达的 HIF-1β 亚基^[4]。正常氧浓度下, HIF-1α 合成和降解的动态平衡使 HIF-1α 保持在低浓度, 而在低氧条件下, HIF-1α 的降解被抑制并在细胞内积累。HIF-1 作为氧信号通路的核心, 其生物活性可受到多种低氧诱导因子的调控, 并影响其下游基因的转录。可以在整个人类基因组的数千个位点形成活跃的转录复合物, 激活适应低氧的蛋白质的基因转录, 包括促红细

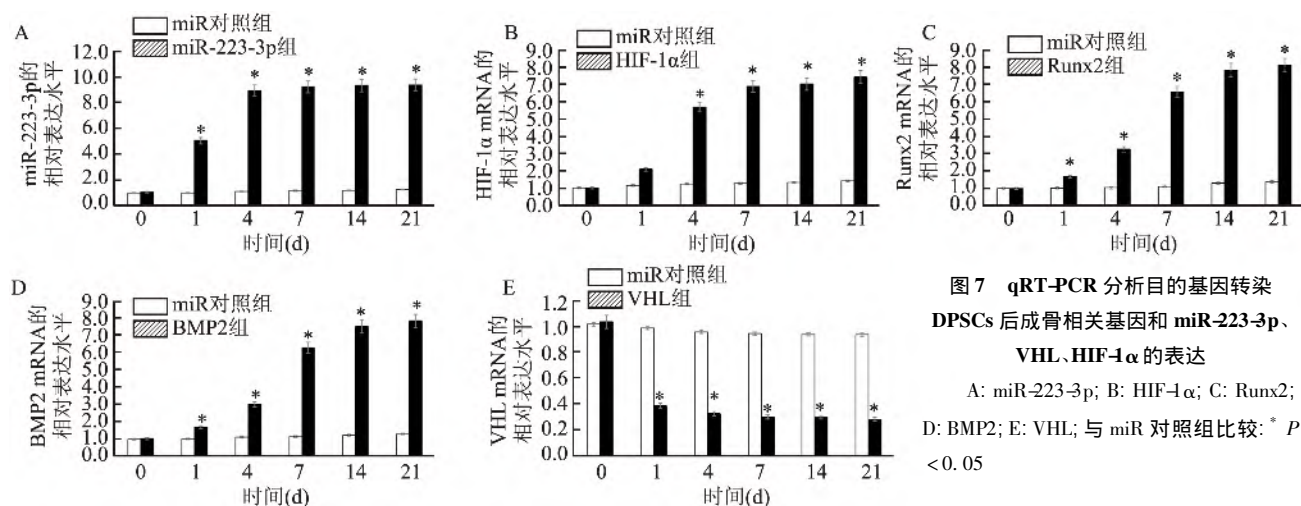


图7 qRT-PCR分析目的基因转染 DPSCs 后成骨相关基因和 miR-223-3p、VHL、HIF-1α 的表达
A: miR-223-3p; B: HIF-1α; C: Runx2; D: BMP2; E: VHL; 与 miR 对照组比较: * P < 0.05

胞生成素(EPO)、VEGF和糖酵解酶等,促进机体对低氧环境的适应。研究^[5]显示在牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSCs)中敲除VEGF可降低成骨相关基因RUNX2、碱性磷酸酶(ALP)和I型胶原(COL1)的表达,低氧可增强PDLSCs成骨早期ALP、COL1和骨钙素(OCN)的表达。

VHL是一个编码pVHL抑癌蛋白的抑癌基因,pVHL参与E3泛素连接酶复合物(VCBC)的组成,VCBC由pVHL、延长蛋白B、C和Cul2蛋白等形成^[6]。常氧情况下,VCBC可直接和HIF-1α经pVHL结合,泛素化修饰后被蛋白酶体降解。低氧环境中(或者细胞缺乏pVHL)HIF-1α积聚在细胞核中并与HIF-1β形成HIF-1二聚体,HIF-1转录激活100~200个促进适应低氧环境的基因^[7]。有研究^[8]显示,泛素偶联酶E2S(ubiquitin-conjugating enzyme E2S,UBE2S)可通过泛素-蛋白酶体系统和VHL/HIF-1α/STAT3途径增强上皮间充质转变(epithelial-mesenchymal transition, EMT)。Frost et al^[9]首次揭示了一种有效的选择性化合物,一种名为VH298的VHL抑制剂,它为HIF靶向治疗增加了一个新的维度。研究^[10]表明VH298通过抑制羟甲基化HIF-1泛素化途径有效地激活HIF-1信号通路,显著增加成纤维细胞增殖、血管生成和I型胶原-α2(I) (Col1-α2(I))、血管内皮生长因子A(VEGF-A)和胰岛素样生长因子1(IGF-1)的基因表达。

有研究^[11]表明,miR-223-3p通过靶向SHOX2抑制口腔鳞癌的增殖和转移。研究^[12]通过检测50例口腔癌患者治疗前后血清miR-223-3p的变化,显

示血清中miR-223-3p的相对表达水平在研究中低于对照组,治疗后miR-223-3p表达明显高于治疗前。另有研究^[13]显示,抑制miR-223-3p可在转录水平和翻译水平显著降低VEGFA的表达,过表达miR-223-3p可显著提高VEGFR2的表达。

该实验通过低氧诱导DPSCs细胞显示miR-223-3p的mRNA相对表达水平明显高于Ctr组,推测miR-223-3p可能与HIF-1α的表达相关。通过生物信息学的方法预测miR-223-3p的潜在结合靶点,显示miR-223-3p可能靶向VHL 3'-UTR 146~152位的之间的碱基。且经luciferase实验表明,将miR-223-3p mimics转染至DPSCs细胞中,显示VHL的mRNA表达水平下调,HIF-1α蛋白表达水平上调,VHL蛋白表达水平下调;而将miR-223-3p inhibitor转染至DPSCs细胞中,显示VHL的mRNA表达水平上调,HIF-1α蛋白的表达水平显著下调,VHL蛋白表达水平上调。该研究表明miR-223-3p靶向VHL 3'-UTR抑制HIF-1α的降解使HIF-1α在细胞内过表达。将miR-223-3p mimics成功转染后检测miR-223-3p、VHL、HIF-1α和2个与成骨密切相关基因的表达情况。初步证实了体外miR-223-3p通过抑制VHL基因促进HIF-1α表达来促进骨髓干细胞成骨分化,体外实验结果给体内动物实验的研究奠定了基础。另有研究^[14]通过构建慢病毒载体转染DPSCs结果显示其中突变组可以在常氧条件下稳定表达HIF-1α。在体外,HIF-1α通过促进VEGF的表达促进DPSCs血管向分化。

参考文献

- [1] Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. Stem cell properties of human

- dental pulp stem cells[J]. *J Dent Res*, 2002, 81(8): 531–5.
- [2] Huang X, Liu F, Hou J, et al. Inflammation – induced overexpression of microRNA-223-3p regulates odontoblastic differentiation of human dental pulp stem cells by targeting SMAD3[J]. *Int Endod J* 2019, 52(4): 491–503.
- [3] Rey S, Semenza G L. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86(2): 236–42.
- [4] Schödel J, Grampp S, Maher E R, et al. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factors, and renal cancer[J]. *Eur Urol*, 2016, 69(4): 646–57.
- [5] Xu Q, Liu Z, Guo L, et al. Hypoxia mediates runt-related transcription factor 2 expression *via* induction of vascular endothelial growth factor in periodontal ligament stem cells[J]. *Mol Cells*, 2019, 42(11): 763–72.
- [6] Clifford S C, Cockman M E, Smallwood A C, et al. Contrasting effects on HIF-1 α regulation by disease-causing pVHL mutations correlate with patterns of tumorigenesis in von Hippel-Lindau disease[J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(10): 1029–38.
- [7] Semenza G L. Oxygen sensing, homeostasis, and disease[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(6): 537–47.
- [8] Wang L, Liang Y, Li P, et al. Oncogenic activities of UBE2S mediated by VHL/HIF-1 α /STAT3 signal *via* the ubiquitin-proteasome system in PDAC[J]. *Oncotargets Ther*, 2019, 12: 9767–81.
- [9] Frost J, Galdeano C, Soares P, et al. Potent and selective chemical probe of hypoxic signalling downstream of HIF- α hydroxylation *via* VHL inhibition[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13312.
- [10] Qiu S, Jia Y, Sun Y, et al. Von Hippel-Lindau (VHL) protein antagonist VH298 improves wound healing in streptozotocin-induced hyperglycaemic rats by activating hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) signalling[J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019: 1897174.
- [11] Sun C, Liu X H, Sun Y R. MiR-223-3p inhibits proliferation and metastasis of oral squamous cell carcinoma by targeting SHOX2[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(16): 6927–34.
- [12] Li C, Feng Y, Shao W. Changes of serum miR-223-3p in patients with oral cancer treated with TPF regimen and the prognosis[J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(3): 2527–32.
- [13] Qin L, Zhong M, Adah D, et al. A novel tumour suppressor lncRNA F630028010Rik inhibits lung cancer angiogenesis by regulating miR-223-3p[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(6): 3549–59.
- [14] 邓立方, 朱友明, 王银龙. HIF-1 α 基因介导的牙髓干细胞在体外的成血管作用[J]. *安徽医科大学学报* 2016, 51(8): 1120–4.

miR-223-3p promotes osteogenic differentiation of dental pulp stem cells by inhibiting VHL

Lu Beibei, Zhu Youming

(School of Stomatology, Anhui Medical University, Laboratory of Anhui Oral Disease Research Center, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of miR-223-3p on osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells (hDPSCs) by inhibiting Von Hippel-Lindau (VHL) gene. **Methods** Hypoxia induced hDPSCs for 24 h (oxygen concentration 1%). The changes of cell proliferation were observed by MTT assay. The miRNA of miR-223-3p was predicted by bioinformatics, and the relationship between miR-223-3p and VHL was verified by luciferase. The expression of miR-223-3p mimics or miR-223-3p was transfected into DPSCs, and the expression of miR-223-3p, VHL, hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), runt-related transcription factor 2 (Runx2), bone morphogenetic protein 2 (BMP2) mRNA, VHL, HIF-1 α was detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** miR-223-3p increased in the hypoxic-induced DPSCs ($P < 0.05$). The MTT results showed that miR-223-3p mimics promoted the proliferation of DPSCs ($P < 0.05$). Moreover, miR-223-3p regulated the expression level of VHL by targeting VHL 3'-UTR. The transfection of miR-223-3p was detected by qRT-PCR and Western blot, which significantly promoted the expression of HIF-1 α , Runx2 and BMP2 genes ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-223-3p promotes osteogenic differentiation of dental pulp stem cells by inhibiting VHL gene.

Key words human dental pulp stem cells; hypoxia inducible factor-1 α ; VHL; miR-223-3p; osteogenesis