·论著·

KCNQ1OT1靶向miR-218对脂多糖诱导的人牙周膜干细胞增殖和成骨分化的影响

王思青,张茂奇,胡婷婷,叶芳
(南昌大学附属口腔医院牙周科,南昌 330000)

摘要 目的 探究KCNQ1重叠转录物1(KCNQ1OT1)靶向miR-218对脂多糖(LPS)诱导的人牙周膜干细胞(hPDLSC)增殖和成骨分化的影响。**方法** 体外培养hPDLSC,随机分为hPDLSC组、LPS组、pcDNA-KCNQ1OT1组、pcDNA组、miR-218组、miR-NC组。观察各组细胞增殖和茜素红染色情况,分别检测细胞碱性磷酸酶(ALP)活性,KCNQ1OT1和miR-218表达水平,白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)水平,以及细胞中骨桥蛋白(OPN)、骨钙素(OCN)、Runt相关转录因子2(RUNX2)、骨形态发生蛋白2(BMP2)表达水平。双萤光素酶实验验证KCNQ1OT1和miR-218的关系。**结果** LPS组与hPDLSC组相比,miR-218组与pcDNA-KCNQ1OT1组相比,细胞增殖率、ALP活性、KCNQ1OT1以及OPN、OCN、RUNX2、BMP2表达水平降低,miR-218表达水平以及IL-1β、IL-6、TNF-α水平升高($P < 0.05$);pcDNA-KCNQ1OT1组与LPS组相比,细胞增殖率、ALP活性、KCNQ1OT1以及OPN、OCN、RUNX2、BMP2表达水平升高,miR-218表达水平以及IL-1β、IL-6、TNF-α水平降低($P < 0.05$)。hPDLSC组、pcDNA-KCNQ1OT1组、miR-NC组钙化结节较多,为暗红色,LPS组、pcDNA组、miR-218组暗红色钙化结节较少。KCNQ1OT1和miR-218间有靶向关系。KCNQ1OT1-WT+miR-218组萤光素酶活性低于KCNQ1OT1-WT+miR-NC组($P < 0.05$)。**结论** KCNQ1OT1能够下调miR-218,促进LPS诱导的hPDLSC的增殖和成骨分化。

关键词 长链非编码RNA;KCNQ1重叠转录物1;miR-218;人牙周膜干细胞;成骨分化;脂多糖
中图分类号 R329.2 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2025)06-0559-06
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20250606.1518.012
DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2025.06.014

Effects of KCNQ1OT1 on lipopolysaccharide-induced proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells by targeting miR-218

WANG Siqing, ZHANG Maoqi, HU Tingting, YE Fang
(Department of Periodontics, Affiliated Stomatological Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000, China)

Abstract Objective To investigate the effects of the long noncoding RNA (lncRNA), KCNQ1 overlapping transcript 1 (KCNQ1OT1), on lipopolysaccharide (LPS)-induced proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs) by targeting miR-218. **Methods** HPDLSCs were cultured in vitro and randomly assigned into hPDLSC, LPS, pcDNA-KCNQ1OT1, pcDNA, miR-218, or miR-NC groups. Cell proliferation and alizarin red staining of the cells were observed. The activity of alkaline phosphatase, the expression of KCNQ1OT1 and miR-218, the levels of interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor α (TNF-α), and the expression of osteopontin (OPN), osteocalcin (OCN), Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) in cells were detected. A dual luciferase assay was performed to verify the relationship between KCNQ1OT1 and miR-218. **Results** Compared with the hPDLSC group, the cell proliferation rate, the alkaline phosphatase activity, and the expression of KCNQ1OT1, OPN, OCN, RUNX2, and BMP2 were significantly decreased, while the expression of miR-218 and the levels of IL-1β, IL-6, and TNF-α were significantly increased in the LPS group ($P < 0.05$). Compared with the pcDNA-KCNQ1OT1 group, all the above indicators had the same trend in the miR-218 group ($P < 0.05$). Compared with the LPS group, the cell proliferation rate, the alkaline phosphatase activity, and the expression of KCNQ1OT1, OPN, OCN, RUNX2, and BMP2 were significantly increased, while the expression of miR-218 and the levels of IL-1β, IL-6, and TNF-α were significantly decreased in the pcDNA-KCNQ1OT1 group ($P < 0.05$). There was a targeting relationship between KCNQ1OT1 and miR-218. The luciferase activity in the KCNQ1OT1-WT+miR-218 group was significantly lower than that in the KCNQ1OT1-WT+miR-NC group ($P < 0.05$). **Conclusion** KCNQ1OT1 can downregulate miR-218 and promote LPS-induced proliferation and osteogenic differentiation of hPDLSCs.

基金项目: 江西省应用研究培育计划(20212BAG70019)
作者简介: 王思青(1994-),女,医师,硕士.
通信作者: 叶芳,E-mail:g55bko@163.com
收稿日期: 2024-06-28
网络出版时间: 2025-06-09 14:23:40

Keywords　long noncoding RNA; KCNQ1 overlapping transcript 1; miR-218; human periodontal ligament stem cell; osteogenic differentiation; lipopolysaccharide

牙周炎会导致牙周韧带、牙骨质和骨骼破坏，而人牙周膜干细胞（human periodontal ligament stem cell，hPDLSC）在诱导培养条件下表现出成骨潜力，能与周围炎症微环境相互作用，产生牙周膜组织，促进牙周组织再生[1]。因此，分析hPDLSC成骨分化并探索其潜在机制具有重要意义。KCNQ1重叠转录物1（KCNQ1 overlapping transcript 1，KCNQ1OT1）是一种长链非编码RNA（long noncoding RNA，lncRNA），可吸附多种微RNA（microRNA，miRNA），并调节下游靶点，参与多种疾病的发病机制[2]。既往研究[3]报道，KCNQ1OT1在hPDLSC成骨诱导过程中上调，能靶向miR-24-3p调节成骨基因表达，加速hPDLSC成骨分化。miRNA可靶向成骨标志物或成骨相关途径，参与人牙周膜细胞中成骨基因调节，影响成骨分化，从而改善牙周病[4]。miR-218在人牙髓干细胞、hPDLSC中下调，能通过调节成骨相关蛋白表达影响细胞增殖和成骨分化[5]。以上研究提示，KCNQ1OT1和miR-218是治疗牙周炎的潜在靶点。研究[6]表明，KCNQ1OT1能靶向miR-218-5p，激活PI3K/AKT/mTOR通路，减少软骨细胞功能障碍发生。因此推测，KCNQ1OT1可能通过调控miR-218影响hPDLSC增殖和成骨分化。本研究以脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导的hPDLSC为研究对象，分析KCNQ1OT1和miR-218对LPS诱导的hPDLSC增殖、成骨分化的影响，并探究KCNQ1OT1和miR-218的关系。

1　材料与方法

1.1　材料

hPDLSC（武汉益普生物科技有限公司）；DMEM培养基（武汉艾美捷科技有限公司）；lipofectamine 3000转染试剂（美国ThermoFisher Scientific公司）；LPS（美国MCE公司）；KCNQ1OT1的pcDNA序列（pcDNA-KCNQ1OT1）、空白pcDNA、miR-218模拟物、miR-NC［汉恒生物科技（上海）有限公司］；Premix Ex Taq™ Ⅱ（日本TaKaRa公司）；碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）活性染色试剂盒，白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）、白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor α，TNF-α）酶联免疫吸附试剂盒，双萤光素酶试剂盒，成骨细胞茜素红染色试剂盒（武汉纯度生物科技有限公司）；骨桥蛋白（osteopontin，OPN）、骨钙素（osteocalcin，OCN）、Runt相关转录因子2（Runt-related transcription factor 2，RUNX2）、骨形态发生蛋白2（bone morphogenetic protein 2，BMP2）、GAPDH、二抗（英国abcam公司）。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养与处理：将hPDLSC置于DMEM培养基中，37 ℃、5% CO_2条件下培养、传代。取第3代对数期hPDLSC置于含1 μg/mL LPS的培养基中[7]，分别培养12、24、48 h。

1.2.2　CCK-8法测定细胞增殖：hPDLSC于96孔板（2×10^3/孔）中培养24 h，加入10 μL CCK-8液，37 ℃孵育2 h，检测450 nm处吸光度，计算细胞增殖率。

1.2.3　实时定量PCR：hPDLSC融合度至80%时，采用TRIzol试剂分离各组细胞总RNA，逆转录为cDNA。使用Premix Ex Taq™ Ⅱ在CFX96实时定量PCR系统中进行PCR。反应条件：94 ℃ 60 s，循环40次：94 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 60 s。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算KCNQ1OT1和miR-218表达，*β-actin*和*U6*为内参。引物序列：KCNQ1OT1，正向5'-ACTCACTCACTCACTCACT-3'，反向5'-CTGGCTCCTTCTATCACATT-3'；*U6*，正向5'-GCTGGACTCTAGGGTGCAAG-3'，反向5'-GAGCATACCAGGTGGTAGTAG-3'；miR-218，正向5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'，反向5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'；*β-actin*，正向5'-ACACTCCAGCTGGGTTGATCTAA-3'，反向5'-GGAAGATGGTGATGGGATT-3'。

1.2.4　细胞分组：将细胞分为hPDLSC组、LPS组、pcDNA-KCNQ1OT1组、pcDNA组、pcDNA-KCNQ1OT1+miR-218组、pcDNA-KCNQ1OT1+miR-NC组。hPDLSC组细胞常规培养24 h；LPS组细胞用1 μg/mL LPS处理24 h；pcDNA-KCNQ1OT1组细胞用lipofectamine 3000转染试剂转染pcDNA-KCNQ1OT1 24 h后再用1 μg/mL LPS处理24 h；pcDNA组细胞转染pcDNA 24 h后再用1 μg/mL LPS处理24 h；pcDNA-KCNQ1OT1+miR-218组细胞转染pcDNA-KCNQ1OT1+miR-218 24 h后再用1 μg/mL LPS处理24 h；pcDNA-KCNQ1OT1+miR-NC

组细胞转染pcDNA-KCNQ1OT1+miR-NC 24 h后再用1 μg/mL LPS处理24 h。收集细胞备用。

1.2.5　ALP活性检测：裂解hPDLSC，取上清液，按照试剂盒说明书加反应液，37 ℃孵育10 min，终止反应，检测405 nm处吸光度，分析ALP活性。

1.2.6　茜素红染色：hPDLSC接种至6孔板（1×10^6/孔），PBS洗涤，2 mL 4%聚甲醛固定30 min，洗涤后用2 mL茜素红染色10 min，再次洗涤后加2 mL PBS，于倒置显微镜下观察钙化结节。

1.2.7　IL-1β、IL-6、TNF-α水平检测：hPDLSC消化后离心取上清液，按试剂盒说明将上清液加入至已包被抗原的板孔中，依次加酶标抗体、显色液、终止液孵育，检测450 nm处吸光度，计算IL-1β、IL-6、TNF-α水平。

1.2.8　Western blotting：RIPA液提取hPDLSC总蛋白，BCA法定量，电泳，转膜封闭。用OPN、OCN、RUNX2、BMP2（1 ∶ 1 000）、GAPDH（1 ∶ 10 000）一抗4 ℃培养过夜，再与HRP标记的山羊抗大鼠IgG二抗（1 ∶ 5 000）室温避光2 h，用ECL试剂将蛋白条带可视化，通过条带灰度值分析蛋白表达。

1.2.9　双萤光素酶实验：在ENCORI网站（https://rnasysu.com/encori/agoClipRNA.php?source=lncRNA）预测KCNQ1OT1和miR-218的结合位点。将KCNQ1OT1野生型或突变型序列插入到pmirGLO中，生成KCNQ1OT1-WT和KCNQ1OT1-MUT，用lipofectamine 3000将KCNQ1OT1-WT和KCNQ1OT1-MUT与miR-218或miR-NC共转染至hPDLSC，48 h后用双萤光素酶报告基因检测系统检测萤光素酶活性。

1.3　统计学分析

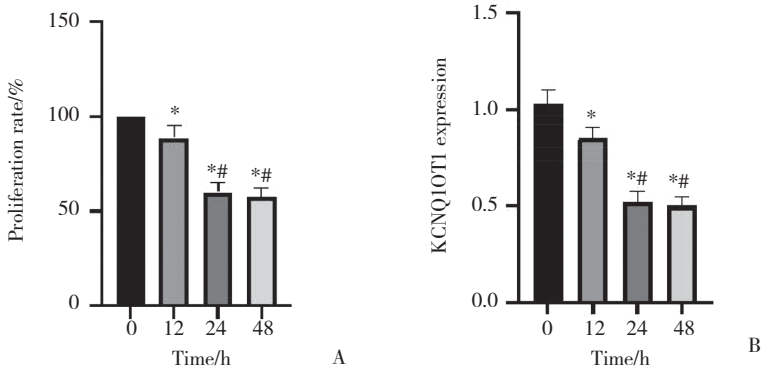
采用SPSS 26.00处理数据。符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用SNK-q检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　LPS诱导hPDLSC增殖和KCNQ1OT1表达

与0 h比较，LPS诱导12、24、48 h时hPDLSC增殖率和KCNQ1OT1表达水平降低（$P<0.05$），24 h和48 h比较，细胞增殖率和KCNQ1OT1表达水平的差异无统计学意义（$P>0.05$）。因此，本研究选择24 h作为后续实验中LPS处理时间。见图1。

2.2　各组细胞增殖率的比较



A，proliferation rates at different times；B，KCNQ1OT1 expression at different times. * $P<0.05$ vs. 0 h；# $P<0.05$ vs. 12 h.

图1　LPS诱导hPDLSC增殖和KCNQ1OT1表达

Fig.1　Proliferation rate and KCNQ1OT1 expression in hPDLSCs induced by LPS

与hPDLSC组比较，LPS组细胞增殖率明显降低（$P<0.05$）；与LPS组比较，pcDNA-KCNQ1OT1组细胞增殖率明显升高（$P<0.05$）；与pcDNA-KCNQ1OT1组比较，pcDNA-KCNQ1OT1+miR-218组增殖率明显降低（$P<0.05$），见表1。

2.3　各组细胞KCNQ1OT1和miR-218表达水平的比较

与hPDLSC组比较，LPS组细胞中KCNQ1OT1表达水平明显降低，miR-218表达水平明显升高（$P<0.05$）；与LPS组比较，pcDNA-KCNQ1OT1组KCNQ1OT1表达水平明显升高，miR-218表达水平明显降低（$P<0.05$）；与pcDNA-KCNQ1OT1组比较，pcDNA-KCNQ1OT1+miR-218组KCNQ1OT1表达水平明显降低，pcDNA-KCNQ1OT1+miR-218表达水平明显升高（$P<0.05$）。见表1。

2.4　各组细胞ALP活性的比较

与hPDLSC组比较，LPS组细胞中ALP活性明显降低（$P<0.05$）；与LPS组比较，pcDNA-KCNQ1OT1组细胞中ALP活性明显升高（$P<0.05$）；与pcDNA-KCNQ1OT1组比较，pcDNA-KCNQ1OT1+miR-218组细胞中ALP活性明显降低（$P<0.05$）。见表1。

表1　各组hPDLSC增殖率、ALP活性以及KCNQ1OT1和miR-218表达水平的比较

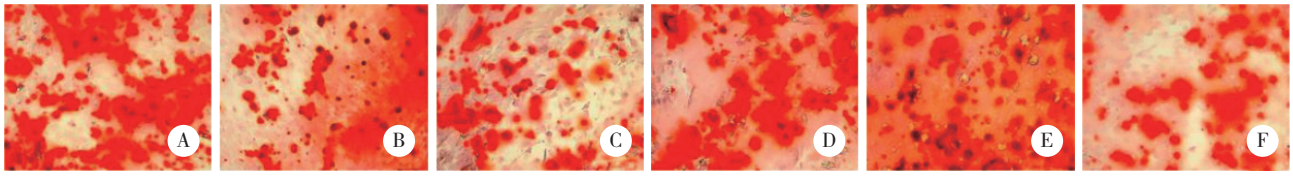
Tab.1　Comparison of cell proliferation rate, alkaline phosphatase activity, and expression levels of KCNQ1OT1 and miR-218 in hPDLSCs of each group

Group	Cell proliferation rate (%)	KCNQ1OT1 expression level	miR-218 expression level	Alkaline phosphatase activity
hPDLS	100.00 ± 0.00	1.03 ± 0.07	1.02 ± 0.10	5.93 ± 0.11
LPS	60.32 ± 4.75[1)]	0.52 ± 0.06[1)]	2.38 ± 0.14[1)]	2.25 ± 0.07[1)]
pcDNA	61.05 ± 4.33	0.53 ± 0.05	2.40 ± 0.16	2.23 ± 0.09
pcDNA-KCNQ1OT1	85.79 ± 5.06[2)]	0.99 ± 0.08[2)]	1.15 ± 0.09[2)]	5.56 ± 0.10[2)]
pcDNA-KCNQ1OT1+miR-218	58.61 ± 3.58[3)]	0.56 ± 0.07[3)]	2.27 ± 0.15[3)]	2.75 ± 0.08[3)]
pcDNA-KCNQ1OT1+miR-NC	86.17 ± 5.64	0.97 ± 0.09	1.12 ± 0.11	5.61 ± 0.12

1) $P<0.05$ vs. hPDLSC group; 2) $P<0.05$ vs. LPS group; 3) $P<0.05$ vs. pcDNA-KCNQ1OT1 group.

2.5　各组细胞成骨分化能力比较

hPDLSC组、pcDNA-KCNQ1OT1组、miR-NC组hPDLSC中钙化结节较多，为暗红色，LPS组、pcDNA组、miR-218组hPDLSC中暗红色钙化结节较少。见图2。



A, hPDLSC group; B, LPS group; C, pcDNA group; D, pcDNA-KCNQ1OT1 group; E, pcDNA-KCNQ1OT1+miR-NC group; F, pcDNA-KCNQ1OT1+miR-218 group.

图2　各组hPDLSC茜素红染色情况　×40

Fig.2　Alizarin red staining of hPDLSCs in each group　×40

2.6　各组细胞中IL-1β、IL-6、TNF-α水平的比较

与hPDLSC组比较，LPS组IL-1β、IL-6、TNF-α水平明显升高（$P<0.05$）；与LPS组比较，pcDNA-KCNQ1OT1组IL-1β、IL-6、TNF-α水平明显降低（$P<0.05$）；与pcDNA-KCNQ1OT1组比较，pcDNA-KCNQ1OT1+miR-218组IL-1β、IL-6、TNF-α水平明显升高（$P<0.05$）。见表2。

2.7　各组细胞中OPN、OCN、RUNX2、BMP2蛋白表达水平的比较

与hPDLSC组比较，LPS组OPN、OCN、RUNX2、BMP2蛋白表达水平明显降低（$P<0.05$）；与LPS组比较，pcDNA-KCNQ1OT1组OPN、OCN、RUNX2、BMP2蛋白表达水平明显升高（$P<0.05$）；与pcDNA-KCNQ1OT1组比较，pcDNA-KCNQ1OT1+miR-218组OPN、OCN、RUNX2、BMP2蛋白表达水平明显降低（$P<0.05$）。见表2、图3。

2.8　验证KCNQ1OT1和miR-218的关系

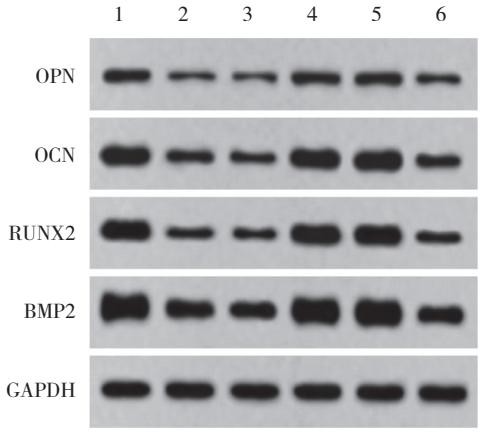
ENCORI网站显示，KCNQ1OT1和miR-218间可能有靶向关系。见图4。KCNQ1OT1-WT+miR-NC组、KCNQ1OT1-WT+miR-218组、KCNQ1OT1-MUT+miR-NC组、KCNQ1OT1-MUT+miR-218组的萤光素酶活性分别为1.33 ± 0.11、0.45 ± 0.06、1.28 ± 0.09、1.31 ± 0.08，与KCNQ1OT1-WT+miR-NC组比较，KCNQ1OT1-WT+miR-218组萤光素酶活性明显降低（$P<0.05$）。

表2　各组hPDLSC中IL-1β、IL-6、TNF-α水平以及OPN、OCN、RUNX2、BMP2蛋白表达水平比较

Tab.2　Comparison of the levels of IL-1β, IL-6, and TNF-α and the expression levels of OPN, OCN, RUNX2, and BMP2 in hPDLSCs of each group

Group	IL-1β(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	TNF-α(pg/mL)	OPN	OCN	RUNX2	BMP2
hPDLSC	12.34 ± 1.35	35.63 ± 3.74	62.37 ± 6.86	0.75 ± 0.08	1.63 ± 0.11	1.50 ± 0.13	2.35 ± 0.26
LPS	45.72 ± 5.31[1)]	95.26 ± 10.15[1)]	177.25 ± 18.73[1)]	0.31 ± 0.05[1)]	0.76 ± 0.08[1)]	0.68 ± 0.09[1)]	1.06 ± 0.10[1)]
pcDNA	43.61 ± 5.88	95.73 ± 9.97	175.83 ± 18.46	0.27 ± 0.04	0.73 ± 0.07	0.65 ± 0.06	1.12 ± 0.12
pcDNA-KCNQ1OT1	19.85 ± 2.42[2)]	56.12 ± 6.51[2)]	101.32 ± 11.45[2)]	0.71 ± 0.07[2)]	1.57 ± 0.13[2)]	1.43 ± 0.15[2)]	2.23 ± 0.21[2)]
pcDNA-KCNQ1OT1+miR-218	40.06 ± 4.24[3)]	87.85 ± 8.92[3)]	168.43 ± 17.59[3)]	0.41 ± 0.06[3)]	0.88 ± 0.09[3)]	0.73 ± 0.08[3)]	1.22 ± 0.15[3)]
pcDNA-KCNQ1OT1+miR-NC	18.97 ± 2.53	55.49 ± 5.83	98.77 ± 10.38	0.68 ± 0.07	1.52 ± 0.12	1.39 ± 0.14	2.19 ± 0.18

1) $P < 0.05$ vs. hPDLSC group; 2) $P < 0.05$ vs. LPS group; 3) $P < 0.05$ vs. pcDNA-KCNQ1OT1 group.



1, hPDLSC group; 2, LPS group; 3, pcDNA group; 4, pcDNA-KCNQ1OT1 group; 5, pcDNA-KCNQ1OT1+miR-NC group; 6, pcDNA-KCNQ1OT1+miR-218 group.

图3　各组hPDLSC中OPN、OCN、RUNX2、BMP2蛋白表达

Fig.3　Expressions of OPN, OCN, RUNX2, and BMP2 in hPDLSCs of each group

3　讨论

牙周炎是牙周组织的慢性炎症，由龈下菌斑的积累和革兰氏阴性厌氧菌的作用引起，可造成牙齿支撑组织逐渐破坏，最终导致牙齿脱落，且与各种全身性疾病的发生或进展有关[8]。因此，探究牙周炎的发病机制可能对改善口腔健康和避免全身性疾病的发展具有临床意义。hPDLSC是位于牙周韧带组织中的间充质干细胞，具有恢复受损牙周组织的成骨和再生潜力，能迁移到牙周病部位介导牙周再生，而LPS可产生促炎性细胞因子，抑制hPDLSC活力，导致牙周膜细胞分化紊乱，破坏微环境稳态并损害牙周组织，已被广泛用于构建牙周炎体外实验模型[8]。因此，本研究以LPS诱导的hPDLSC为研究对象，分析其增殖和成骨分化能力，并探索机制。

miRNA	GeneID	GeneName	GeneType	TargetSite	Alignment
hsa-miR-218-5p	ENSG00000269821	KCNQ1OT1	lncRNA	chr11:2659982-2660002[-]	Target: 5' GAAUGAAAAGACAAAGCACAG 3' miRNA : 3' UGUACCAAUCUAGUUCGUGUU 5'
hsa-miR-218-5p	ENSG00000269821	KCNQ1OT1	lncRNA	chr11:2644630-2644650[-]	Target: 5' CAGAUACCAGUGUAAGCACAC 3' miRNA : 3' UGUACCAAUCUAGUUCGUGUU 5'

图4　KCNQ1OT1和miR-218的关系

Fig.4　Relationship between KCNQ1OT1 and miR-218

目前，已发现几种lncRNA和miRNA会影响成骨过程。其中，KCNQ1OT1能与miRNA、mRNA和蛋白质相互作用，影响基因表达和各种细胞功能，从而影响疾病进展[9]。研究[10]显示，KCNQ1OT1在骨髓间充质干细胞成骨分化过程中上调，能增强ALP活性，促进钙化和成骨分化。研究[11]报道，KCNQ1OT1在成骨分化过程中表达增加，能促进细胞成骨分化和钙化，加速骨形成。本研究中，LPS刺激后hPDLSC细胞增殖率、ALP活性降低，暗红色钙化结节较少，细胞中KCNQ1OT1、OPN、OCN、RUNX2、BMP2表达水平降低，miR-218表达水平和IL-1β、IL-6、TNF-α水平升高，说明LPS能通过诱导炎症反应，抑制ALP活

性和钙化形成，进而抑制成骨分化。上调KCNQ1OT1后，细胞增殖率、ALP活性、KCNQ1OT1、OPN、OCN、RUNX2、BMP2表达水平升高，暗红色钙化结节增多，miR-218表达水平和IL-1β、IL-6、TNF-α水平降低。BMP2是成骨分化的正调节因子，能诱导成骨分化，*RUNX2*是骨发育和成骨分化的主要基因，而OPN、OCN能促进组织愈合和新生血管生成，进而促进成骨细胞分化[12]。本研究表明，上调KCNQ1OT1能逆转LPS对hPDLSC的伤害，通过促进成骨相关蛋白表达和ALP活性，提高细胞增殖率，消除炎症，进而促进成骨分化。

特定的miRNA和信号通路能参与人牙髓来源的间充质干细胞分化的调节，其中，has-miR-140-5p、has-miR-143和has-miR-218是最常报道的抑制成骨分化的miRNA[13]。已有研究[14]表明，miR-218-5p下调能增强hPDLSC活力，促进细胞成骨分化。还有研究[15]表明，miR-218-5p可增强LPS介导的hPDLSC活性，减缓细胞凋亡，并下调炎性细胞因子表达。本研究发现，同时上调KCNQ1OT1和miR-218后，hPDLSC的增殖率和ALP活性降低，暗红色钙化结节减少，miR-218表达水平和IL-1β、IL-6、TNF-α水平升高，KCNQ1OT1、OPN、OCN、RUNX2、BMP2表达水平降低，说明miR-218过表达能抵消KCNQ1OT1上调引发的hPDLSC增殖和成骨分化能力。KCNQ1OT1和miR-218间有靶向关系。KCNQ1OT1-WT+miR-218组萤光素酶活性降低，说明KCNQ1OT1可能通过靶向miR-218影响hPDLSC的增殖和成骨分化。

综上所述，KCNQ1OT1能靶向下调miR-218，促进LPS诱导的hPDLSC的增殖和成骨分化。但本研究未设置单独转染miR-218组进行分析，miR-218是否直接或间接参与hPDLSC的成骨分化还需进一步研究，且研究结果还需体内实验验证。

参考文献：

[1] DI VITO A，BRIA J，ANTONELLI A，et al. A review of novel strategies for human periodontal ligament stem cell ex vivo expansion：are they an evidence-based promise for regenerative periodontal therapy? [J]. Int J Mol Sci，2023，24（9）：7798. DOI：10.3390/ijms24097798.

[2] TAHERI M，SHIRVANI-FARSANI Z，HARSIJ A，et al. A review on the role of KCNQ1OT1 lncRNA in human disorders [J]. Pathol Res Pract，2024，255：155188. DOI：10.1016/j.prp.2024.155188.

[3] 庞鸣，韦红霞，陈茜. 长链非编码RNA钾离子电压门控通道亚家族Q成员1重叠转录本1通过靶向miR-24-3p调控人牙周膜干细胞增殖和成骨分化 [J]. 华西口腔医学杂志，2021，39（5）：547-554. DOI：10.7518/hxkq.2021.05.008.

[4] 李彧婷，张儒雅，林莉. 牙周相关长链非编码RNA研究进展 [J]. 中国实用口腔科杂志，2019，12（7）：439-443. DOI：10.19538/j.kq.2019.07.012.

[5] ZHONG YX，LI WS，LIAO LS，et al. LncRNA CCAT1 promotes cell proliferation and differentiation via negative modulation of miRNA-218 in human DPSCs [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci，2019，23（9）：3575-3583. DOI：10.26355/eurrev_201905_17779.

[6] LIU Y，ZHAO D，WANG X，et al. LncRNA KCNQ1OT1 attenuates osteoarthritic chondrocyte dysfunction via the miR-218-5p/PIK3C2A axis [J]. Cell Tissue Res，2021，385（1）：115-126. DOI：10.1007/s00441-021-03441-8.

[7] LI C，XIAO F，WEN Y，et al. Krüppel-like factor 5-mediated Sirtuin6 promotes osteogenic differentiation and inhibits inflammatory injury of lipopolysaccharide-induced periodontal membrane stem cells by inhibiting nuclear factor kappa-B pathway [J]. Bioengineered，2022，13（3）：6966-6977. DOI：10.1080/21655979.2022.2036915.

[8] YANG P，SHI F，ZHANG Y. Baricitinib alleviates lipopolysaccharide-induced human periodontal ligament stem cell injury and promotes osteogenic differentiation by inhibiting JAK/STAT signaling [J]. Exp Ther Med，2022，25（2）：74. DOI：10.3892/etm.2022.11773.

[9] XIA F，WANG Y，XUE M，et al. LncRNA KCNQ1OT1：molecular mechanisms and pathogenic roles in human diseases [J]. Genes Dis，2021，9（6）：1556-1565. DOI：10.1016/j.gendis.2021.07.003.

[10] YANG JJ，PENG WX，ZHANG MB. LncRNA KCNQ1OT1 promotes osteogenic differentiation via miR-205-5p/RICTOR axis [J]. Exp Cell Res，2022，415（1）：113119. DOI：10.1016/j.yexcr.2022.113119.

[11] WANG F，ZHANG F，ZHENG F. lncRNA Kcnq1ot1 promotes bone formation by inhibiting miR-98-5p/Tbx5 axis in MC3T3-E1 cells [J]. Exp Ther Med，2022，23（3）：194. DOI：10.3892/etm.2022.11117.

[12] 韩操，张丽娜，颜南，等. *BMP-2/bFGF*双基因转染的骨髓间充质干细胞复合生物陶瓷骨促进兔桡骨缺损修复 [J]. 中国医科大学学报，2022，51（2）：125-130. DOI：10.12007/j.issn.0258-4646.2022.02.007.

[13] IRANMANESH P，VEDAEI A，SALEHI-MAZANDARANI S，et al. MicroRNAs-mediated regulation of the differentiation of dental pulp-derived mesenchymal stem cells：a systematic review and bioinformatic analysis [J]. Stem Cell Res Ther，2023，14（1）：76. DOI：10.1186/s13287-023-03289-5.

[14] 马文贤，黄琼，董振耀. 微小RNA-218-5p靶向Jagged 1调控人牙周膜干细胞的活性和骨向分化 [J]. 安徽医药，2021，25（12）：2503-2508，2547. DOI：10.3969/j.issn.1009-6469.2021.12.040.

[15] 周洋. 微小RNA-218-5p靶向TLR2基因对LPS所致人牙周膜干细胞炎症反应的影响 [J]. 口腔医学研究，2020，36（12）：1108-1112. DOI：10.13701/j.cnki.kqyxyj.2020.12.007.

（编辑　陈　姜）