

文章编号: 1004-7220(2023)05-0910-07

牵张刺激下牙周膜细胞外泌体 miR-181d-5p 在调控成骨细胞分化中的作用

张轶凡[#], 瞿方[#], 王莹莹, 吴雅琴, 宋迎爽, 曹希萌, 沈莹怡, 胥春

(上海交通大学医学院附属第九人民医院 口腔修复科;上海交通大学口腔医学院;国家口腔医学中心;国家口腔疾病临床医学研究中心;上海市口腔医学重点实验室;上海市口腔医学研究所,上海 200011)

摘要:目的 探索牵张加载下牙周膜细胞(periodontal ligament cells, PDLCs)外泌体对成骨细胞分化的影响,以及牵张加载下 PDLCs 外泌体在力相关牙周组织改建中的调控作用。方法 对体外培养人 PDLCs 施加 20% 牵张应变后,提取上清中的外泌体与成骨细胞共培养,检测成骨细胞分化情况,并探索外泌体中发挥调控作用的 miRNA。结果 牵张加载下 PDLCs 分泌的外泌体可上调成骨细胞中碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、转录因子 Osterix(Osx)、I 型胶原蛋白(type I collagen, COL-1)、Runt 相关转录因子 2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)、骨钙素(osteocalcin, OCN)和骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein 2, BMP 2)等成骨相关因子表达,促进细胞成骨向分化。牵张加载下 PDLCs 外泌体差异表达 miRNA 中,miRNA-181d-5p 表达量上调达 107 倍,将其转染成骨细胞后,成骨细胞中 ALP、Osx、Col-1、Runx2、Ocn 和 BMP2 等成骨相关因子表达亦增加。结论 本研究初步揭示了牵张加载下 PDLCs 外泌体 miR-181d-5p 在调控成骨细胞分化中的作用,对于明确力相关牙周组织改建中的信号通路具有重要科学意义。

关键词: 牙周膜细胞; 牵张; 外泌体; miR-181d-5p; 成骨分化

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2023.05.010

The Role of Exosome MiR-181d-5p Secreted by Periodontal Ligament Cells under Stretch Loading in the Regulation of Osteoblast Differentiation

ZHANG Yifan[#], QU Fang[#], WANG Yingying, WU Yaqin, SONG Yingshuang, CAO Ximeng, SHEN Yingyi, XU Chun

(Department of Prosthodontics, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University; National Center for Stomatology; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology; Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200011, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of exosomes, derived from periodontal ligament cells (PDLCs) under stretch loading on osteoblast differentiation, and the role of these exosomes in force-related periodontal

收稿日期: 2022-11-23; 修回日期: 2022-12-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(82071157, 31470903, 31270991, 30900282), 上海市卫生健康委员会卫生行业临床研究专项资助项目(201940009), 上海交通大学医学院附属第九人民医院原创探索项目(JYYC002)

通信作者: 胥春, 教授, 主任医师, E-mail: imxuchun@163.com

[#]为共同第一作者

tissue remodeling. **Methods** After 20% strain was applied to human PDLCs cultured *in vitro*, exosomes from the supernatant were extracted and co-cultured with osteoblasts, then the differentiation of osteoblasts was detected, and miRNA which played a regulatory role in exosomes was explored. **Results** Exosomes secreted by PDLCs under stretch loading could up-regulate the expression of osteogenic-related factors including alkaline phosphatase (ALP), transcription factor osterix (osterix, Osx), type I collagen (Col-1), Runt-related transcription factor 2 (Runx2), osteocalcin (Ocn), and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) in osteoblasts, as well as promote osteogenic differentiation of cells. Among the miRNAs differentially expressed in PDLCs exosomes under stretch loading, the expression of miRNA-181d-5p was up-regulated by 107 times, and the expression of osteogenic-related factors including ALP, Osx, Col-1, Runx2, Ocn and BMP2 was also increased in osteoblasts transfected with miRNA-181d-5p. **Conclusions** This study preliminarily reveals the role of exosome miR-181d-5p secreted by PDLCs under stretch loading in regulating the differentiation of osteoblast, which is of scientific significance for clarifying the signaling pathway in force-related periodontal tissue remodeling.

Key words: periodontal ligament cells (PDLCS); stretch; exosomes; miR-181d-5p; osteogenic differentiation

健康的牙周组织对于正常行使咀嚼功能至关重要。人体在咀嚼运动以及一些疾病诊疗过程中,牙齿不可避免地受到多种力学刺激,这些力学刺激在牙齿中产生应力并传递到牙周组织,可以导致牙周组织发生改建^[1-6]。牙周膜是口颌系统中特殊的应力感受组织,与人体感知牙齿所受力学刺激关系密切^[7-8]。牙周膜对力学刺激极为敏感,可以感知和判断牙齿所受应力的方向、位置和大小,将其分散传递到周围组织,参与牙周组织的改建^[9-13]。

牙周膜细胞(periodontal ligament cells, PDLCs)和成骨细胞在牙周组织改建的过程中具有重要作用。首先,PDLCs能感知力学信号并将其转导为生物信号^[14]。研究显示,力刺激下PDLCs能够感受力学信号进而调控牙周组织改建^[7-8];力学刺激可以促进PDLCs中Yes相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)的表达上调和核移位,从而促进PDLCs的成骨分化和牙槽骨的形成^[15]。成骨细胞是主要的骨质形成细胞,能够产生多种骨质形成所需要的蛋白,如碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素(osteocalcin, OCN)和I型胶原蛋白(type I collagen, COL-1)等,还能表达丰富的促成骨转录因子如Runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)和转录因子(osterix, Osx)等。成骨细胞还会分泌破骨细胞形成所需的巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)。此外,成骨细胞还通过分泌细胞核因子- κ B受体活化因子(receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)和骨保护素(osteoprotegerin,

OPG)来调控破骨细胞的分化,RANKL/OPG的比值决定了破骨细胞对骨质破坏和吸收的能力^[16-17]。然而,力学信号在PDLCs和成骨细胞之间的转导途径尚不清楚。

外泌体介导的细胞间信号通讯逐渐引起学界的注意^[18]。理论上,所有细胞都可以分泌外泌体,这些外泌体广泛存在于体液中^[19]。外泌体携带了细胞主动分泌的蛋白质、脂质和核酸等分子,通过自分泌和旁分泌在多种生理病理过程中发挥作用^[18]。其中,外泌体携带的miRNA具有极其重要的信号调控作用,在许多生物学过程中发挥作用。例如:结直肠癌细胞分泌的外泌体能够被人肝癌细胞和肺癌细胞等吸收,促进癌细胞生长、增殖和侵袭^[20];脂肪间充质干细胞来源的外泌体通过抑制miR-342-5p来保护内皮细胞,从而抑制动脉粥样硬化^[21]。但是,在力相关的牙周组织改建中,外泌体是否作为信号分子介导PDLCs和成骨细胞之间的信号通讯尚需进一步探索。本文探究了在牵张力刺激下PDLCs分泌的外泌体及其携带的生物信号分子对成骨细胞分化的影响,研究结果对于进一步揭示力学刺激引起牙周组织改建中的信号调控机制具有科学意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 MC3T3-E1细胞(中国科学院细胞库 GNM15)。

1.1.2 材料和试剂 无外泌体血清培养基(EXO-

FBS-50A-1, SBI 公司, 美国); 双抗 (SV30010, Hyclone 公司, 美国); 胎牛血清 (FBSAD-01011, Cyagen 公司, 美国); DMEM 高糖培养基 (SH30243.01, Hyclone 公司, 美国); α -MEM 培养基 (H30265.01B, Hyclone 公司, 美国); 地塞米松 (D4902, Sigma 公司, 美国); β -甘油磷酸钠 (G9422, Sigma 公司, 美国); 抗坏血酸 (A4403, Sigma 公司, 美国); PKH67 荧光染液 (PKH67GL, Sigma 公司, 美国); BCA 蛋白定量试剂盒 (P0010S, 上海碧云天生物技术有限公司); ALP 染色试剂盒 (P0321S, 上海碧云天生物技术有限公司); DAPI 染液 (MBD0015, Sigma 公司, 美国); 鬼笔环肽染液 (FAK100, Sigma 公司, 美国); Trizol 试剂 (15596026, Invitrogen 公司, 美国); Real-time PCR 试剂盒 (RR037Q, Takara 公司, 日本); miRNA 转染试剂盒 (C10511-05, 广州锐博生物技术有限公司); 抗 GAPDH 抗体 (Yeasen 30202ES40, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司); 抗 Runx2 抗体 (ab23981, Abcam 公司, 美国); 抗 BMP2 抗体 (ab284387, Abcam 公司, 美国); 抗 Ocn 抗体 (ab93876, Abcam 公司, 美国)。

1.2 细胞培养和处理

征求患者或其家长同意后, 无菌收集因正畸原因拔除的双尖牙, 在超净工作台内将根中 2/3 部分的牙周膜刮下, 通过组织块法用含 1% 双抗和 10% 胎牛血清的高糖培养基培养人牙周膜原代细胞, 培养成功后进行传代培养。本研究已通过上海交通大学医学院附属第九人民医院伦理委员会审核批准。

将第 3~6 代 PDLCs 接种于 6 孔弹性基底细胞培养板中, 更换无外泌体血清培养基后, 采用 FX-5000 力学加载仪 (Flexcell 公司, 美国) 加载 20% 动态牵张应变, 加载周期为 10 s (5 s 牵张, 5 s 松弛), 加载频率为 0.1 Hz, 加载时长为 6 h。

采用 MC3T3-E1 细胞经过成骨分化诱导得到成骨细胞。即在含 1% 双抗和 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基中添加地塞米松 (0.1 μ mol/L)、 β -甘油磷酸钠 (10 mmol/L) 和抗坏血酸 (50 μ g/mL), 形成分化培养基, 随后用分化培养基培养诱导 MC3T3-E1 细胞成骨向分化, 诱导后的成骨细胞用于后续实验。

1.3 外泌体提取、鉴定和检测

牵张加载 PDLCs 后, 收集细胞培养上清, 使用超速离心法抽提外泌体, 再通过形态、粒径分布和表面标志 3 个关键指标对抽提物进行外泌体鉴定。若抽提物鉴定为外泌体, 采用 BCA 法检测外泌体浓度。

1.4 外泌体染色以及与成骨细胞共孵育

用 PKH67 荧光染液标记牵张加载后 PDLCs 分泌的外泌体, 将荧光标记的外泌体与成骨细胞共孵育 24 h, 随后用 4% 多聚甲醛固定成骨细胞, 最后用 DAPI 染液和鬼笔环肽染液分别对固定后的成骨细胞细胞核和细胞骨架进行染色, 激光共聚焦显微镜下观察成骨细胞对 PDLCs 外泌体的摄取情况。

为了观察牵张加载下 PDLCs 外泌体对成骨细胞分化的影响, 将牵张加载后 PDLCs 分泌的外泌体按 20 μ g/mL 与成骨细胞共孵育, 对照组添加 20 μ g/mL 未施加牵张力的 PDLCs 外泌体提取物, 每 3 d 更换培养液并添加外泌体, 2 周后检测成骨细胞分化情况。

1.5 miRNA 测序和筛选

Trizol 法提取外泌体总 RNA, 3' 和 5' 加接头, 逆转录后扩增并构建 miRNA 文库, 随后对文库数据进行 2 代 illumina HiSeq 高通量测序。对原始 reads 数据去接头、去低质量, 利用 miRDeep2 2.0.0.5 进行新 miRNA 预测。通过 Novoalign 3.02.12 将每个样品的 reads 数据比对到合并的人类 pre-miRNAs 数据库上 (miRBase pre-miRNAs (v22) + 新预测的 pre-miRNAs), 最多允许 1 处错配。统计比对到每条成熟 miRNA 上的 tag 数作为该 miRNA 的原始表达量, 使用 TPM (tag counts per million aligned miRNAs) 方法进行标准化。计算两样品间的倍数变化, 按照牵张组和对照组之间表达量差异具有显著性 ($P < 0.05$)、错误发现率 (false discovery rate, FDR) ≤ 0.001 且差异倍数 ≥ 2.0 的标准来筛选差异表达 miRNA。

1.6 real-time q-PCR

用 Trizol 试剂从细胞中提取总 RNA, 再使用反转录试剂盒合成 cDNA, 最后通过 SYBR 试剂完成定量聚合酶链反应, 检测相关靶基因 mRNA 的表达情况。

1.7 蛋白质印记 (Western Blotting)

将细胞用裂解液裂解后,离心提取上清,BCA 法测量蛋白浓度,电泳后将样本蛋白转移到 PVDF 膜上,使用封闭液封闭后孵育 1 抗过夜,最后孵育 2 抗后显影观察结果。

1.8 ALP 染色

将成骨细胞轻轻冲洗 3 次后,使用 4% 多聚甲醛固定细胞,随后用 ALP 染色试剂盒对细胞进行染色,最后使用扫描仪扫描染色后的细胞得到细胞 ALP 染色图像。

1.9 统计学方法

所有数据使用 SPSS 23.0 软件进行录入和分

析,并以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果

2.1 牵张加载下 PDLCs 分泌外泌体的提取、鉴定和检测

提取牵张加载后的人 PDLCs 培养上清中的外泌体,对提取物进行透射电镜扫描、粒径分析和蛋白质免疫印记检测。结果发现,提取物呈典型的双层囊泡状结构,符合外泌体形态特点,直径集中在 111.7、145.7 nm 附近,外泌体提取物高表达 CD81 和 TSG101(见图 1)。上述结果证实,牵张加载后的人 PDLCs 培养上清提取物为外泌体。

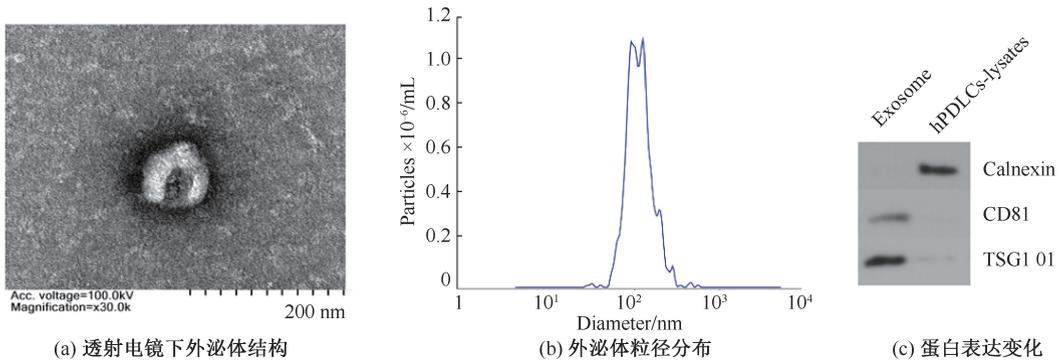


图 1 外泌体鉴定结果

Fig. 1 Identification results of exosomes (a) Structure of exosomes under transmission electron microscope, (b) Particle size distributions of exosomes, (c) Changes in protein expression

2.2 牵张加载下 PDLCs 外泌体促进成骨细胞成骨向分化

PKH67 标记的牵张加载后 PDLCs 外泌体与成骨细胞共同孵育,成骨细胞中用 DAPI 染液(蓝色)标记细胞核,鬼笔环肽染液(红色)标记细胞骨架。结果发现 PKH67 染液(绿色)标记的外泌体进入到成骨细胞中,成骨细胞摄取了与其共孵育的外泌体[见图 2(a)]。

qRT-PCR 结果发现,成骨细胞与牵张加载后 PDLCs 外泌体共孵育后,ALP、O_{sx} 和 Col-1 的 mRNA 表达水平较对照组明显提高[见图 2(b)]。Western Blotting 结果显示,牵张加载后 PDLCs 外泌体可以促进成骨细胞表达 Runx2、Ocn 和 BMP2 蛋白[见图 2(c)]。ALP 染色结果发现,成骨细胞与牵张加载后 PDLCs 外泌体共孵育后,ALP 表达增多[见图 2(d)]。

2.3 PDLCs 外泌体 miRNA 促进成骨细胞成骨向分化

对牵张加载 6 h 人牙周膜外泌体中差异表达 miRNA 进行分析。结果发现,在共计 72 个差异表达的 miRNA 中,有 26 个下调,46 个上调,其中 miR-181d-5p 上调明显,达到了 107 倍,而且其功能与成骨分化关系密切,故选取该 miRNA 进一步探索其在牵张加载下 PDLCs 外泌体促进成骨细胞成骨向分化中的作用。

使用 FAM(绿色)标记的 miRNA-181d-5p mimics 转染 DAPI(蓝色)染液标记细胞核的成骨细胞。结果发现,miRNA-181d-5p mimics 转染到了成骨细胞中[见图 3(a)]。对成骨细胞分别转染 50 nmol/L 的 miRNA-181d-5p mimics 和 50 nmol/L 的 miRNA mimics nc,24 h 后检测其分化情况。qRT-PCR 结果表明,和对照组相比,miRNA-181d-5p mimics 转染成

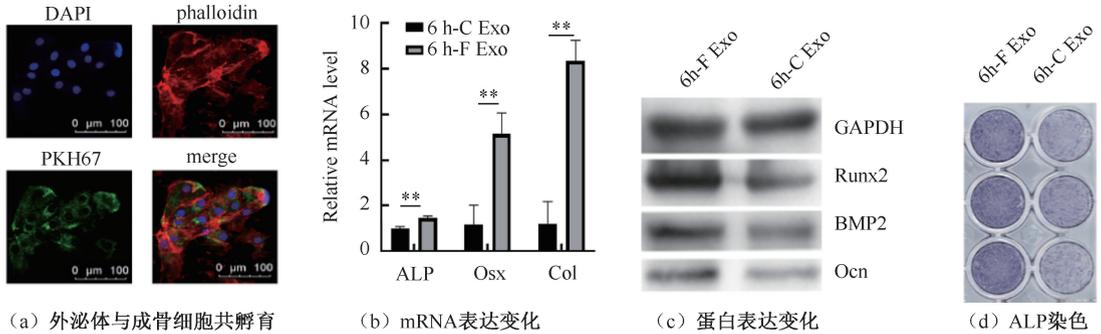


图2 牵张加载下牙周膜细胞外泌体对成骨细胞成骨分化的促进作用 (** $P < 0.01$)

Fig. 2 Exosomes secreted by PDLCs under stretch loading promote osteogenic differentiation of osteoblasts

(a) Co-incubation of exosomes with osteoblasts, (b) Changes in mRNA expression, (c) Changes in protein expression, (d) Alkaline phosphatase staining

骨细胞后,成骨细胞 ALP、Osx 和 Col-1 的 mRNA 表达水平明显提高[见图 3(b)]。Western Blotting 结果显示,miRNA-181d-5p 可以促进成骨细胞表达 Runx2、

Ocn 和 BMP2 蛋白[见图 3(c)]。ALP 染色结果显示,miRNA-181d-5p mimics 转染成骨细胞后,成骨细胞 ALP 表达增多[见图 3(d)]。

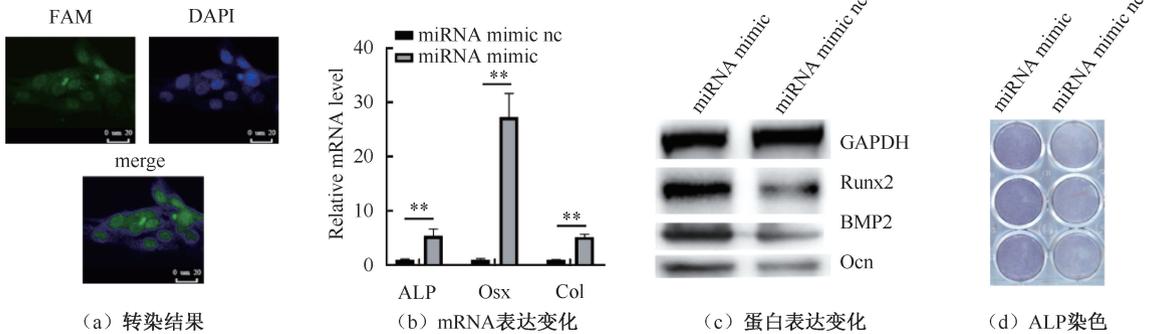


图3 miRNA-181d-5p 促进成骨细胞分化 (** $P < 0.01$)

Fig. 3 miRNA-181d-5p promotes the osteogenic differentiation of osteoblasts (a) Results of transfection,

(b) Changes in mRNA expression, (c) Changes in protein expression, (d) Alkaline phosphatase staining

3 讨论

人体维持牙齿稳固、正常行使咀嚼功能离不开健康的牙周组织,在日常生活和临床诊疗中,牙周组织不可避免地受到多种力学刺激。作为应力感受组织,牙周膜可以感知力学刺激,并将信号传递给成骨细胞等周围组织细胞,调控其完成牙周组织的改建。力信号在牙周组织中的传递途径众说纷纭,目前对其尚缺少统一的认知。随着外泌体的发现,这种潜在的力信号传导的新途径引起了学界的兴趣。外泌体是平均直径 100 nm 的具有脂质双分子层结构的细胞外囊泡,来源于胞内的多泡体,由

体内多种细胞分泌。作为一种近年来发现的新兴细胞间通讯方式,外泌体携带了细胞主动分泌的蛋白质、脂质和核酸等需要避免被降解的物质,通过自分泌和旁分泌的作用来介导细胞间信号交流,其在牙周组织改建中的作用具有进一步探索的价值。基于外泌体在细胞间通讯中的重要作用,本文探究了力学刺激导致牙周组织改建过程中,外泌体及其携带的 miRNA 作为信号传递分子发挥的细胞间通讯作用以及潜在机制。

在本研究中,对体外培养的 PDLCs 进行牵张力刺激后提取上清中的外泌体,将其与诱导得到的成骨细胞共孵育,发现与外泌体共孵育后的成骨细胞

可以加速成骨向分化,表现为 ALP、Osx 和 Col-1 等 mRNA 表达水平,以及 Runx2、Ocn 和 BMP2 等蛋白表达水平较对照组明显提高。同样,ALP 染色结果也呈现相同的趋势。以上结果证实了外泌体在力刺激相关牙周组织改建中的信号传递作用。除了传导力信号,牵张加载下 PDLCs 分泌的外泌体还能介导牙周组织的其他生理、病理过程。Wang 等^[22]研究发现,牵张刺激下 PDLCs 外泌体可以抑制巨噬细胞中的 NF- κ B 信号通路,进而抑制巨噬细胞中生成 IL-1 β ,减轻牙周炎症反应。不仅如此,除了本研究中提到的 PDLCs,骨细胞也可以感受应力刺激。研究表明,牵张加载会促进骨细胞分泌外泌体,且该外泌体可以通过 miR-181b-5p/PTEN/AKT 信号通路来促进牙周膜干细胞增殖和成骨向分化^[23]。压应力作用下,破骨细胞外泌体抑制了人牙周膜干细胞的成骨分化潜能^[24]。这些研究结果都显示,外泌体通过旁/自分泌参与多种细胞间通讯,进而介导了力相关牙周组织改建。

在外泌体携带的诸多“货物”中,miRNA 的功能和作用机制尤为值得关注。本文从外泌体中共计 72 个差异表达的 miRNA(其中 26 个下调,46 个上调)中筛选了可能与成骨细胞分化相关的 miRNA,发现 miR-181d-5p 上调达 107 倍,并推测其很可能在上述外泌体诱导成骨细胞分化过程中发挥重要作用。将其转染成骨细胞后发现,与牵张刺激下 PDLCs 外泌体的作用一致,miR-181d-5p mimics 转染后 ALP、Osx 和 Col-1 等 mRNA 表达水平,以及 Runx2、Ocn 和 BMP2 等蛋白表达水平相比对照组(mimics nc)显著升高。ALP 染色结果也显示,miR-181d-5p mimics 具有促进成骨分化的作用。miR-181d-5p 与成骨分化关系密切。Sun 等^[25]研究发现,miR-181d-5p 可以靶向抑制 OPG,故阻断 miR-181d-5p 可以解除其对 OPG 的抑制作用,从而避免骨吸收。不仅如此,miR-181d-5p 还被发现在多种信号通路中都具有重要作用。Zhang 等^[26]研究发现,miR-181d-5p 可以靶向抑制 Krueppel 样因子 6(KLF6),避免 KLF6 对肾小管上皮细胞的损伤以及肾脏急性肾缺血/再灌注损伤炎症反应,实现对肾脏的保护作用。此外,miR-181d-5p 在一些肿瘤的诊治中也有巨大前景。例如:miR-181d-5p 可以通过靶向 T 细胞转录因子-1 在骨肉瘤中充当肿

瘤抑制因子^[27],还可以通过靶向神经钙素 δ 抑制结肠癌细胞的 5-FU 敏感性^[28]。除了本研究中发现的 miR-181d-5p,Atsawasuwan 等^[29]研究发现,正畸患者龈沟液外泌体中 miRNA-29 家族的表达量明显升高,提示 miRNA-29 家族也可能参与了力学刺激作用下外泌体介导的牙周组织炎症反应。本文认为,在牙周微环境中,常驻细胞的外泌体 miRNA 与力相关的牙周组织改建关系密切。综上所述,牵张加载下 PDLCs 外泌体通过 miRNA-181d-5p 促进成骨细胞分化,进而参与力作用下的牙周组织改建。本文结果对于今后探索促进牙周组织缺损再生和修复具有重要的科学意义和潜在的临床价值。

4 结论

牵张刺激下 PDLCs 可以通过外泌体促进成骨细胞成骨向分化,而这种作用很可能与外泌体携带的 miR-181d-5p 有关,其中涉及的相关信号通路和机制尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] FAN J, CATON JG. Occlusal trauma and excessive occlusal forces: Narrative review, case definitions, and diagnostic considerations [J]. *Periodontol*, 2018, 89 (Suppl 1): S214-S222.
- [2] NAKATSU S, YOSHINAGA Y, KURAMOTO A, et al. Occlusal trauma accelerates attachment loss at the onset of experimental periodontitis in rats [J]. *J Periodontal Res*, 2014, 49(3): 314-322.
- [3] LIU J, LI Q, LIU S, et al. Periodontal ligament stem cells in the periodontitis microenvironment are sensitive to static mechanical strain [J]. *Stem Cells Int*, 2017, doi: 10.1155/2017/1380851.
- [4] 罗睿, 焦飞, 孙青, 等. 正畸与咬合力作用下大鼠牙槽骨内液体流动的数值模拟[J]. *医用生物力学*, 2020, 35(1): 57-63.
LUO R, JIAO F, SUN Q, et al. Numerical simulation on fluid flow within rat alveolar bone under orthodontic and occlusal loading [J]. *J Med Biomech*, 2020, 35(1): 57-63.
- [5] EL-AWADY AR, LAPP CA, GAMAL AY, et al. Human periodontal ligament fibroblast responses to compression in chronic periodontitis [J]. *Clin Periodontol*, 2013, 40(7): 661-671.
- [6] DEJAK B, MLOTKOWSKI A, ROMANOWICZ M. Finite element analysis of mechanism of cervical lesion formation in simulated molars during mastication and parafunction

- [J]. *Prosthet Dent*, 2005, 94(6): 520-529.
- [7] THOMPSON WR, RUBIN CT, RUBIN J. Mechanical regulation of signaling pathways in bone [J]. *Gene*, 2012, 503(2): 179-193.
- [8] VAN OERS RF, WANG H, BACABCA RG. Osteocyte shape and mechanical loading [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2015, 13(2): 61-66.
- [9] PAVASANT P, YONGCHAITRAKUL T. Role of mechanical stress on the function of periodontal ligament cells [J]. *Periodontol 2000*, 2011, 56(1): 154-165.
- [10] 宋迎爽, 胥春. 微小RNA在力相关牙周炎症反应和组织改建中的作用[J]. *医用生物力学*, 2021, 36(1): 164-168.
SONG YS, XU C. The role of microRNA in force-related periodontal inflammatory response and tissue remodeling [J]. *J Med Biomech*, 2021, 36(1): 164-168.
- [11] ZHONG W, XU C, ZHANG F, *et al.* Cyclic stretching force-induced early apoptosis in human periodontal ligament cells [J]. *Oral Dis*, 2008, 14(3): 270-276.
- [12] HAO Y, XU C, SUN SY, *et al.* Cyclic stretching force induces apoptosis in human periodontal ligament cells via caspase-9 [J]. *Arch Oral Biol*, 2009, 54(9): 864-870.
- [13] XU C, HAO Y, WEI B, *et al.* Apoptotic gene expression by human periodontal ligament cells following cyclic stretch [J]. *Periodontal Res*, 2011, 46(6): 742-748.
- [14] XU C, FAN Z, SHAN W, *et al.* Cyclic stretch influenced expression of membrane connexin 43 in human periodontal ligament cell [J]. *Arch Oral Biol*, 2012, 57(12): 1602-1608.
- [15] YANG Y, WANG BK, CHANG ML, *et al.* Cyclic stretch enhances osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells via YAP activation [J]. *Biomed Res Int*, 2018, doi: 10.1155/2018/2174824. eCollection 2018.
- [16] SAINT-PASTOU TERRIER C, GASQUE P. Bone responses in health and infectious diseases: A focus on osteoblasts [J]. *Infect*, 2017, 75(4): 281-292.
- [17] LONG F. Building strong bones: Molecular regulation of the osteoblast lineage [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 13(1): 27-38.
- [18] CAMUSSI G, DEREGIBUS MC, BRUNO S, *et al.* Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication [J]. *Kidney Int*, 2010, 78(9): 838-848.
- [19] CHEVILLET JR, KANG Q, RUF IK, *et al.* Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(41): 14888-14893.
- [20] SATO K, MENG F, GLASER S, *et al.* Exosomes in liver pathology [J]. *J Hepatol*, 2016, 65(1): 213-221.
- [21] WANG H, XIE Y, SALVADOR AM, *et al.* Exosomes: Multifaceted messengers in atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2020, 22(10): 57.
- [22] WANG Z, MARUYAMA K, SAKISAKA Y, *et al.* Cyclic stretch force induces periodontal ligament cells to secrete exosomes that suppress IL-1beta production through the inhibition of the NF-kappaB signaling pathway in macrophages [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1310.
- [23] LV PY, GAO PF, TIAN GJ, *et al.* Osteocyte-derived exosomes induced by mechanical strain promote human periodontal ligament stem cell proliferation and osteogenic differentiation via the miR-181b-5p/PTEN/AKT signaling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 295.
- [24] WANG Y, ZHENG Y, LI W. Exosomes derived from osteoclasts under compression stress inhibit osteoblast differentiation [J]. *Biocell*, 2021, 45(2): 427-444.
- [25] SUN T, LI Z, ZHONG X, *et al.* Strontium inhibits osteoclastogenesis by enhancing LRP6 and β -catenin-mediated OPG targeted by miR-181d-5p [J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 13(1): 85-97.
- [26] ZHANG Y, LI C, GUAN C, *et al.* MiR-181d-5p Targets KLF6 to improve ischemia/reperfusion-induced AKI through effects on renal function, apoptosis, and inflammation [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 510.
- [27] CHEN H, XIAO Z, YU R, *et al.* miR-181d-5p-FOXP1 feedback loop modulates the progression of osteosarcoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(3): 1434-1441.
- [28] PAN S, DENG Y, FU J, *et al.* N6-methyladenosine upregulates miR-181d-5p in exosomes derived from cancer-associated fibroblasts to inhibit 5-FU sensitivity by targeting NCALD in colorectal cancer [J]. *Int J Oncol*, 2022, 60(2): 14.
- [29] ATSAWASUWAN P, LAZARI P, CHEN Y, *et al.* Secretory microRNA-29 expression in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0194238.