

人骨形成蛋白 7 对人牙髓细胞增殖和分化的作用研究

喻刚, 蒋玉清, 刘文钊, 苏玲瑜

摘要 目的 研究骨形成蛋白 7 (BMP-7) 对人牙髓细胞 (hDPCs) 增殖和分化的影响。方法 原代培养 hDPCs 并鉴定, 采用不同浓度的 BMP-7 处理 hDPCs, 检测各处理组细胞增殖活性、钙化结节量、碱性磷酸酶 (ALP) 活性, 以及牙本质基质蛋白 (DMP-1) 和牙本质涎磷蛋白 (DSPP) 等成牙本质相关基因的表达。结果 BMP-7 对 hDPCs 增殖无明显影响, 但可剂量依赖性促进钙化结节的形成, 提高细胞中 ALP 活性, 并上调 DMP-1 和 DSPP 的基因表达水平。结论 BMP-7 对 hDPCs 增殖无促进作用, 但可明显促进 hDPCs 向成牙本质细胞分化。

关键词 骨形成蛋白-7; 人牙髓细胞; 增殖; 分化

中图分类号 R 780.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)11-1672-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.11.004

人牙髓细胞 (human dental pulp cells, hDPCs) 的主要成分是牙髓成纤维细胞和少量未分化的间充质细胞, 其中, 未分化的间充质细胞具有多向分化的潜能, 在一定条件下可以向成牙本质细胞分化, 这对于牙髓组织的损伤修复意义重大^[1-2]。人骨形成蛋白 (human bone morphogenetic proteins, BMPs) 在牙齿发育和牙髓损伤修复中发挥着重要作用。有研究^[3]显示, 在动物体内, 采用 BMP-7 (又名成骨蛋白 1) 与胶原载体复合用于牙齿的直接盖髓治疗, 在盖髓部位可见修复性牙本质形成, 表明 BMP-7 是牙髓修复的潜在治疗因子。该研究通过观察 BMP-7 对人牙髓细胞增殖和分化的影响, 探讨 BMP-7 在人牙髓牙本质复合体损伤修复中的具体作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2018-06-10 接收

基金项目: 重庆市基础科学与前沿技术研究专项 (编号: cstc2014jcyjA10057)

作者单位: 重庆医科大学附属口腔医院、口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆 401147

作者简介: 喻刚, 男, 主治医师;

苏玲瑜, 女, 主治医师, 责任作者, E-mail: sulingyu2010@163.com

1.1.1 实验试剂 BMP-7 购自美国 Peprotech 公司; DMEM 低糖培养基和胎牛血清均购自美国 Gibco 公司; 胰酶、MTT 购自 Sigma 公司; EdU 细胞增殖检测试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司; RNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; 矿化诱导液购自 Biosharp 公司; 茜素红染液和碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 检测试剂盒购自西安赫特生物科技有限公司; 波形丝蛋白 (Vimentin) 和角蛋白 (Keratin) 抗体购自英国 Abcam 公司; FITC 标记的荧光二抗购自武汉博士德生物工程有限公司; cDNA 合成试剂盒和 qRT-PCR 试剂盒均购自美国 BIO-RAD 公司。

1.1.2 实验仪器 Heraeus BB15 型细胞培养箱 (美国 ThermoFisher 公司); BHC-4000IIA/B3 型生物安全柜 (中国苏净安泰生物技术有限公司); Sorvall ST16 型低速离心机 (美国 ThermoFisher 公司); IX73 型倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); Multiscan MK3 酶标仪 (美国 ThermoFisher 公司); ABI7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 人牙髓细胞的收集与原代培养 收集临床因正畸或阻生拔除的健康前磨牙 (30 岁以下, 无牙体及牙周疾病), 于无菌条件下用含有双抗的低糖无血清 DMEM 培养液浸泡并冲洗数遍, 劈开牙冠取出牙髓组织, 立即用培养基冲洗 3 遍并充分剪碎, 加入 2.5 g/L 胰酶于 37 °C 消化 1 h, 加入等量含血清培养基终止消化, 1 000 r/min 离心 3 min 收集细胞, 采用含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基重悬并接种细胞, 置于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱培养。每 2~3 d 换液一次, 待细胞融合率达 80% 后消化并按 1:2 传代培养。取 2~5 代的 hDPCs 进行 Vimentin 和 Keratin 免疫荧光检测鉴定, 并开展后续实验。

1.2.2 EdU 细胞增殖检测 收集对数生长期的 hDPCs 并接种于 96 孔板中, 次日, 向孔中加入终浓度为 50、100 和 200 ng/ml 的 BMP-7 处理细胞, 每个浓度 3 个复孔, 并设置溶剂对照组。将 EdU 加入各处理组共同孵育 36 h 以标记增殖细胞, 按试剂盒操作说明对细胞进行固定染色, 在倒置荧光显微镜下

观察并拍照。

1.2.3 MTT 法检测细胞活力 收集对数生长期的 hDPCs 并接种于 96 孔板中,次日,采用 1.2.2 项下的方法处理细胞。于处理 1、3、7、10 d 行 MTT 检测:向每孔加入 20 μ l MTT 溶液(5 g/L),在 37 $^{\circ}$ C 孵育 2~4 h,再加入 50 μ l 质量浓度为 200 g/L 的酸性 SDS 溶液,于 37 $^{\circ}$ C 溶解甲臞过夜,最后采用酶标仪检测 570 nm 波长下的吸光度值。

1.2.4 矿化结节检测 收集 2~5 代的 hDPCs 并接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后向孔中加入含 50、100、200 ng/ml BMP-7 的矿化诱导液(含 10 nmol/L 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠和 50 g/L 维生素 C 的 DMEM 培养基)处理细胞,每 3 d 更换一次诱导液。于处理后的第 10 天吸出诱导液,采用 PBS 洗 3 次,甲醇固定 15 min, PBS 洗 2 次,加入茜素红染液于 37 $^{\circ}$ C 染色 30 min, PBS 洗 3 次,在倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.5 碱性磷酸酶活性检测 收集对数生长期的 hDPCs 并接种于 24 孔板中,采用 1.2.4 项下的处理方法诱导细胞。分别于诱导培养后第 1、3、7、10 天弃去诱导液并裂解细胞,按碱性磷酸酶检测试剂盒操作说明进行相应处理,并检测 405 nm 波长下的吸光度值。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 收集对数生长期的 hDPCs 并接种于 6 孔板中,采用 1.2.4 项下的处理方法诱导细胞,并于诱导培养后第 10 天进行牙本质

基质蛋白(dentin matrix protein 1, DMP-1)和牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP) mRNA 表达水平的测定:按试剂盒操作说明提取 hDPCs 总 RNA 逆转录成 cDNA,再进行荧光定量 PCR 检测。使用的引物序列如下: DMP-1 (forward): 5'-GT-GAGTGAGTCCAGGGGAGATAA-3', DMP-1 (reverse): 5'-TTTTGAGTGGGAGAGTGTGTGC-3'; DSPP (forward): 5'-CTGTTGGGAAGAGCCAAGATAAG-3', DSPP (reverse): 5'-CCAAGATCATTCCATGTTGTCCT-3'; GAPDH (forward): 5'-CAGGTGGTCTCCTCTGACTT-3', GAPDH (reverse): 5'-CCAAATTCGTTGCATACCA-3'。以 GAPDH mRNA 表达水平作为内参,通过检测目的基因相对于内参基因的表达变化进行定量分析。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad 5.0 软件进行统计分析,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组样本均数比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hDPCs 细胞来源鉴定 细胞免疫荧光的检测结果显示,原代培养的 hDPCs 细胞 Vimentin 检测结果为阳性,胞质内可见明显的绿色荧光,而 Keratin 检测呈阴性(图 1)。该结果表明原代培养的 hDPCs 来源于中胚层的间充质细胞。

2.2 BMP-7 对 hDPCs 增殖的影响 如图 2A 和 2B 所示,采用不同浓度的 BMP-7 (50、100 和 200 ng/ml) 处理 hDPCs 后,对照组和 BMP-7 处理组

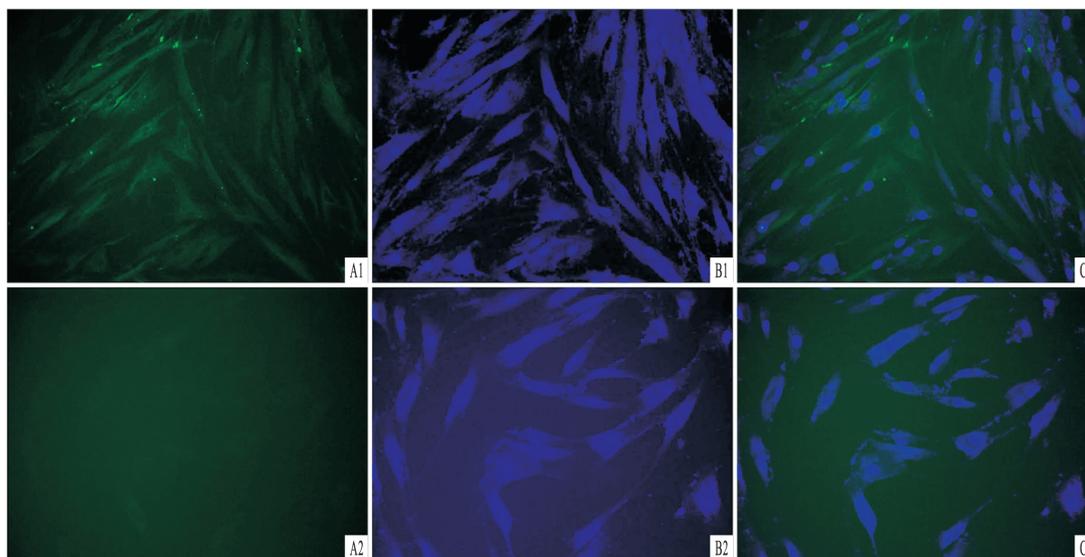


图 1 细胞免疫荧光鉴定 hDPCs 细胞免疫荧光 $\times 200$

A: 免疫荧光鉴定指标; B: Hoechst 染色; C: 重叠图; 1: Vimentin 免疫荧光染色; 2: Keratin 免疫荧光染色

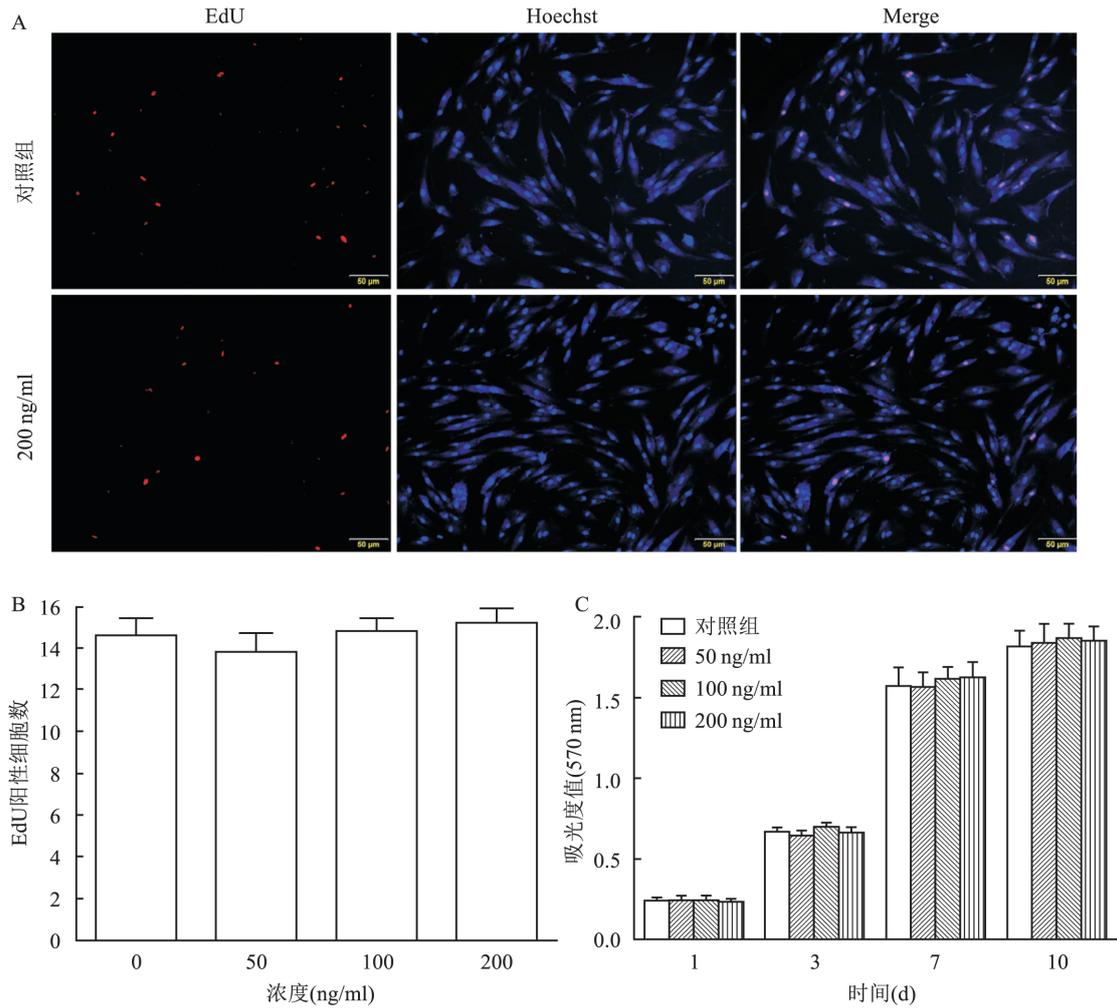


图2 不同浓度 BMP-7 对 hDPCs 增殖的影响 EdU 染色 × 100

A: EdU 细胞增殖检测; B: EdU 染色统计结果; C: MTT 检测细胞生长活力

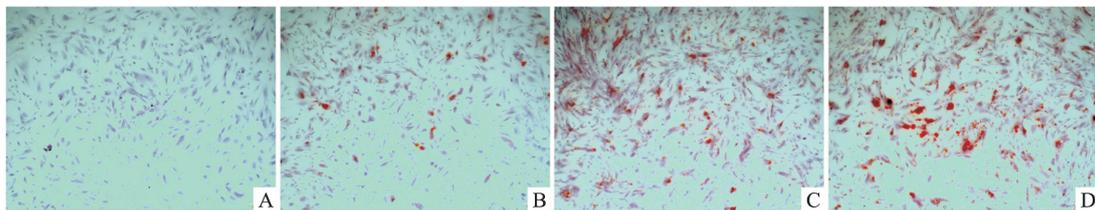


图3 不同浓度 BMP-7 诱导 hDPCs 矿化结节形成情况 茜素红染色 × 100

A: 对照组; B: 50 ng/ml BMP-7; C: 100 ng/ml BMP-7; D: 200 ng/ml BMP-7

hDPCs 中红色标记的增殖细胞数量差异无统计学意义;此外,MTT 细胞活力检测结果也显示,采用 BMP-7 处理细胞 1、3、7、10 d 后,各时间点的 BMP-7 处理组与对照组相比,hDPCs 细胞生长活力差异无统计学意义($P > 0.05$),不同浓度 BMP-7 处理组之间细胞活力也无明显差异(图 2C)。结果表明,BMP-7 对 hDPCs 增殖无明显影响。

2.3 BMP-7 对 hDPCs 钙化结节形成的影响 采

用含不同浓度 BMP-7 的矿化诱导液(BMP-7 浓度分别为 50、100 和 200 ng/ml)处理 hDPCs 10 d 后,BMP-7 处理组茜素红染色均呈阳性,可见明显的矿化结节,且矿化结节的量随 BMP-7 浓度的升高而增多(图 3)。

2.4 BMP-7 对 hDPCs ALP 活性的影响

采用含不同浓度 BMP-7 的矿化诱导液处理 hDPCs 3、7、10 d 后,BMP-7 处理组 ALP 活性值显著高于对照组

表1 各时间点不同浓度的 BMP-7 处理组在 405 nm 处的吸光度值($n=3$)

时间(d)	ALP	BMP-7 浓度(ng/ml)			
		0	50	100	200
1	吸光度值	0.151 ± 0.026	0.160 ± 0.031	0.146 ± 0.022	0.156 ± 0.021
	P 值	-	0.418 2	0.644 2	0.468 8
3	吸光度值	0.185 ± 0.032	0.282 ± 0.038	0.405 ± 0.038	0.492 ± 0.035
	P 值	-	0.001 6	<0.000 1	<0.000 1
7	吸光度值	0.266 ± 0.041	0.488 ± 0.058	0.802 ± 0.065	0.921 ± 0.082
	P 值	-	0.000 2	<0.000 1	<0.000 1
10	吸光度值	0.305 ± 0.028	0.630 ± 0.042	1.060 ± 0.069	1.281 ± 0.075
	P 值	-	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

($P < 0.01$), 且在同一时间点内, ALP 的活性随着 BMP-7 浓度的升高而显著增强; 随着作用时间的延长, 各处理组 ALP 的活性也有明显提升(表 1)。

2.5 BMP-7 对成牙本质相关基因表达的影响 采用不同浓度的 BMP-7 矿化诱导液处理 hDPCs 10 d 后, 各 BMP-7 处理组 DMP-1 和 DSPP mRNA 表达水平均显著高于对照组($P < 0.05$), 且随着 BMP-7 浓度的升高, 两种基因的表达水平也有显著提升(图 4)。

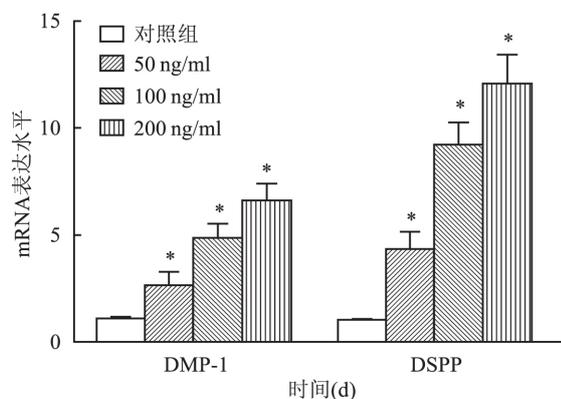


图4 BMP-7 对成牙本质相关基因表达的影响
与对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

BMP-7 属于 TGF- β 细胞因子超家族中骨形成蛋白亚家族, 又称为成骨蛋白 1, 具有多种生物学功能。有研究^[4]显示, BMP-7 是一种重要的肾脏调节因子, 与肾脏疾病的发生、发展、转归密切相关, 对维持肾脏的正常结构和功能也有重要意义。此外, BMP-7 还具有抑制器官纤维化的作用^[5-6], 还可用于诱导骨髓间充质干细胞向神经元细胞分化^[7]。而作为一种重要的成骨诱导因子, 其主要功能则在促进骨骼的发育和损伤修复方面, 诸多实验和临床研究^[8]表明, BMP-7 能促进骨折愈合, 并已在临床

上用于多种骨科疾病的治疗。同时, 在牙髓生物学领域, BMP-7 在成牙本质细胞分化和第三期牙本质的形成中具有重要的作用, 并能诱导牙乳头细胞发生功能性分化^[3]。林正梅等^[9]采用重组腺病毒介导 hBMP-7 基因转染人牙髓细胞, 发现与空载体组和未转染细胞组相比, hBMP-7 基因转染组检测到了牙髓细胞向成牙本质细胞分化, 表明 BMP-7 在牙髓的损伤修复中也具有重要的调控作用。由此可见, BMP-7 在保髓治疗中也具有很大的应用前景。

本研究直接采用 BMP-7 因子处理人牙髓细胞, 并运用多种评价指标检测 BMP-7 在诱导牙髓细胞增殖及分化中的作用。其中, ALP 是评价牙髓细胞早期分化的重要标志物。当牙髓中的未分化间充质干细胞向成牙本质细胞分化时, ALP 活性显著提升。DMP-1 在牙本质形成和矿化过程中具有重要作用, 它的表达水平可以提示牙髓细胞向成牙本质细胞分化的程度。DSPP 是牙本质非胶原蛋白的主要成分, 可以作为成牙本质细胞的特异性标记蛋白。结果显示, 经 BMP-7 处理的 hDPCs 细胞增殖无显著变化, 但可形成明显的矿化结节, 且 ALP 活性呈剂量和时间依赖性增加, DMP-1 和 DSPP 的表达水平也较对照组显著提升, 进一步证实了 BMP-7 可以诱导牙髓细胞向成牙本质细胞分化。

BMPs 家族蛋白发挥生物学效应的分子机制涉及两条重要的信号通路: Smads 介导的信号通路和 MAPK 途径。前者是由靶细胞膜上 BMPs 受体及细胞质内各型 Smads 蛋白协同参与完成, 是 TGF- β 超家族包括 BMPs 信号转导的经典通路; 后者属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 主要在 Smads 途径被阻断后, 作为补救途径来介导 BMPs 信号的传递^[10]。大量研究显示, BMPs 诱导的牙髓细胞分化与两种信号通路均有关联。Qin et al^[11]的研究显示, 在诱导向成牙本质细胞分化的过程中, BMP-2 的加入促进了 Smad1/5 磷酸化, 而采用 BMP 信号抑制剂 Noggin

选择性抑制 Smad 蛋白活性,则可显著抑制牙髓细胞的分化,表明 Smad1/5 在其中发挥了重要的调控作用。Yang et al^[12]的研究则发现,BMP-2 通过刺激 p38 MAPK 信号通路,激活了调控干细胞生长的 WNT/ β -catenin 信号,这一信号级联也是调控牙髓细胞分化的主要分子机制。此外,Li et al^[13]的研究也表明 MAPK 通路参与了 BMP-9 诱导牙髓干细胞分化的调控。由此我们推断,BMP-7 诱导牙髓细胞向成牙本质细胞分化也可能受到了 Smads 信号通路和 MAPK 途径的调控。

综上所述,BMP-7 可诱导 hDPCs 向成牙本质细胞分化,而对 hDPCs 增殖无显著影响,其诱导牙髓细胞分化的作用机制可能与 BMPs/Smads 和 MAPK 信号通路的调控相关,具体机制有待进一步探讨。

参考文献

- [1] Li J, Feng J, Liu Y, et al. BMP-SHH signaling network controls epithelial stem cell fate *via* regulation of its niche in the developing tooth[J]. *Dev Cell*, 2015, 33 (2): 125–35.
- [2] Tash P N, Aydin S, Yalvac M E, et al. Bmp2 and bmp7 induce odonto- and osteogenesis of human tooth germ stem cells[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 172 (6): 3016–25.
- [3] Rutherford R B, Spångberg L, Tucker M, et al. The time-course of the induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1[J]. *Arch Oral Biol*, 1994, 39 (10): 833–8.
- [4] Tsujimura T, Idei M, Yoshikawa M, et al. Roles and regulation of bone morphogenetic protein-7 in kidney development and diseases [J]. *World J Stem Cells* 2016, 8 (9): 288–96.
- [5] Li R X, Yiu W H, Tang S C. Role of bone morphogenetic protein-7 in renal fibrosis[J]. *Front Physiol* 2015 6: 114.
- [6] Jin Y, Cheng X, Lu J, et al. Exogenous BMP-7 facilitates the recovery of cardiac function after acute myocardial infarction through counteracting TGF- β 1 signaling pathway[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2018, 244 (1): 1–6.
- [7] 白广超,金宏亮,雷堃,等. BMP-7 诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经元细胞分化的初步研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53 (2): 190–5.
- [8] White A P, Vaccaro A R, Hall J A, et al. Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion[J]. *Int Orthop* 2007, 31 (6): 735–41.
- [9] 林正梅,秦伟,凌均棨,等. 腺病毒介导的人骨形成蛋白 7 基因转染对人牙髓细胞增殖与分化作用的研究[J]. *中华口腔医学杂志*, 2006, 41(10): 612–5.
- [10] Gu K, Smoke R H, Rutherford R B. Expression of genes for bone morphogenetic proteins and receptors in human dental pulp [J]. *Arch Oral Biol*, 1999, 41 (10): 919–23.
- [11] Qin W, Yang F, Deng R, et al. Smad1/5 is involved in bone morphogenetic protein-2-induced odontoblastic differentiation in human dental pulp cells[J]. *J Endod*, 2012, 38(1): 66–71.
- [12] Yang J, Ye L, Hui T Q, et al. Bone morphogenetic protein 2-induced human dental pulp cell differentiation involves p38 mitogen-activated protein kinase-activated canonical WNT pathway[J]. *Int J Oral Sci*, 2015 7(2): 95–102.
- [13] Li C, Yang X, He Y, et al. Bone morphogenetic protein-9 induced osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells in P38 and ERK1/2 MAPK dependent manner[J]. *Int J Med Sci*, 2012, 9 (10): 862–71.

Effects of BMP-7 on the proliferation and odontoblast differentiation of human dental pulp cells

Yu Gang, Jiang Yuqing, Liu Wenzhao, et al

(Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences, Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401147)

Abstract Objective To study the effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on the proliferation and odontoblast differentiation of human dental pulp cells (hDPCs). **Methods** Human DPCs were primary cultured and identified. Cellular proliferation, the quantity of calcified nodules, ALP activity, and the mRNA expression of dentin matrix protein 1 (DMP-1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) in hDPCs were detected after treatment with different concentrations of BMP-7. **Results** BMP-7 had no significant effect on hDPCs proliferation, but could increase the mineralized nodules, ALP activity, and the expression of DMP-1 and DSPP mRNA in a dose-dependent manner. **Conclusion** BMP-7 has no effect on the proliferation of hDPCs, but it can significantly promote the differentiation of hDPCs into odontoblasts.

Key words bone morphogenetic protein-7; human dental pulp cells; proliferation; differentiation