

大鼠牙囊细胞成骨分化过程中 Notch 信号表达情况*

罗文¹, 邝惠芳^{2△}, 王婧²

(1. 海南医学院第一附属医院口腔科, 海口 570102; 2. 海南医学院口腔医学院, 海口 571199)

[摘要] **目的** 探讨在大鼠牙囊细胞(DFC)成骨分化时 Notch 信号的表达情况。**方法** 分离、培养及纯化 DFC, 在光镜下观察原代及第 3 代 DFC 的形态。对第 3 代 DFC 进行波形蛋白(Vimentin)、角蛋白-14 (CK-14)免疫荧光染色鉴定其组织来源。将第 3 代 DFC 分为对照组(基础培养液进行培养)和成骨诱导组(成骨诱导液进行培养), 28 d 后进行茜素红染色, 鉴定 DFC 的成骨分化能力。应用定量逆转录聚合酶链反应检测两组 DFC 的 Notch 信号表达情况。**结果** 成功分离、培养及纯化 DFC。DFC 的胞体呈长梭形, 呈典型成纤维细胞表型, Vimentin 阳性表达, CK-14 阴性表达, 表明 DFC 来源于间充质且无上皮污染。培养 28 d 后成骨诱导组 DFC 较对照组茜素红染色更加明显, 表明 DFC 在成骨诱导液诱导下可向成骨方向分化。成骨诱导组 DFC 经 28 d 培养后 Notch 信号表达量呈下降趋势, 且明显低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** DFC 具有间充质干细胞特性, 在成骨分化过程中 Notch 信号通过负反馈回路调节 DFC 的成骨分化。

[关键词] 牙囊细胞; 成骨分化; Notch; 基因表达**[中图分类号]** R782**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)01-0012-04

Expression of Notch signal during osteogenic differentiation process of rat dental follicle cells*

LUO Wen¹, KUANG Hui Fang^{2△}, WANG Jing²

(1. Department of Stomatology, First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan 570102, China; 2. School of Stomatology, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571199, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of Notch signal during osteogenic differentiation of rat dental follicle cells (DFC). **Methods** DFC were isolated, cultured and purified. The morphologies of primary and the third generation of DFC were observed under light microscope. The immunofluorescent staining of Vimentin and CK-14 was used to identify the origin of the third generation of DFC. The third generation of DFC was divided into the control group (cultured in the basal medium) and osteogenic induction group (cultured in the osteogenic induction medium). After 28 d, the osteogenic differentiation ability of DFC was identified by alizarin red staining. Notch signal expression in the control group and osteogenic induction group were detected by qRT-PCR, respectively. **Results** DFC were isolated, cultured and purified successfully. The cell body of DFC showed the long spindle type, presenting the typical fibroblast phenotype, Vimentin was positively expressed, CK-14 was negatively expressed, which showed the DFC was derived from mesenchyma without epithelial contamination. After 28 d culture, the alizarin red staining in the osteogenic induction group was more obvious than that in the control group, which showed that DFC could differentiate into the osteogenesis direction under the induction of osteogenic induction solution. The Notch signal expression levels of DFC after 28 d culture in the osteogenic induction group showed the decreasing trend, moreover which was significantly lower than that in the control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** DFC have the characteristics of mesenchymal stem cells. The Notch signal regulates the osteogenic differentiation of DFC during the osteogenic differentiation process by negative feedback loop.

[Key words] dental follicle cells; osteogenic differentiation; Notch; gene expression来源于牙体组织的牙源性干细胞/祖细胞用于牙周疾病模型中具有良好的可行性和可预期性^[1]。牙

* 基金项目: 海南省自然科学基金项目(818MS14)。 作者简介: 罗文(1985—), 副主任医师/副教授, 博士, 主要从事口腔疾病相关的研究。

△ 通信作者, E-mail: 364662698@qq.com。

囊细胞(dental follicle cells,DFC)是牙周组织的前体细胞,其中包括牙槽骨成骨细胞、成牙骨质细胞和牙周成纤维细胞^[2]。DFC 成骨分化的不同阶段和相关基因表达与众多信号通路相关,如 Notch、转化生长因子-β(TGF-β)/骨形态发生蛋白(BMP)和 WNT 通路^[3]。Notch 通路通过 Notch 受体与膜结合型配体,如 Jagged-1 结合介导相邻细胞间的信息交流。位于细胞表面的受体 Notch 和配体(如 Jagged-1)结合后被 γ 分泌酶分解。胞内活化域(NICD)释放并易位到细胞核中与 RBP-JK 结合,从而调控细胞增殖与分化^[4]。本研究探讨在大鼠 DFC 成骨分化时 Notch 信号的表达情况变化,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠购自海南医学院药物安评中心;α-MEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶均购自美国 Hyclone 公司;青霉素、链霉素、抗坏血酸、I 型胶原酶、Triton、牛血清清蛋白(BSA)、茜素红、二脒基苯基吡啶(DAPI)均购自美国 Sigma 公司;小鼠抗大鼠波形蛋白(Vimentin)单克隆抗体购自美国 Thermo 公司,小鼠抗大鼠细胞角蛋白-14(CK-14)单克隆抗体购自英国 Abcam 公司;山羊抗小鼠异硫氰酸荧光素(FITC)-免疫球蛋白 G(IgG)购自武汉博士德公司;Trizol 试剂、引物 Notch 1 和 β-actin 均购自上海生工公司;M-MuLV 逆转录酶试剂盒购自美国 Fermentas 公司;定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)试剂盒 SYBR Green I kit 购自瑞士罗氏公司;OLYMPUS IX710 倒置相差荧光显微镜与 OLYMPUS CKX41 倒置显微镜均购自日本 HITACHI 公司;LightCycler PCR 2.0 系统购自瑞士罗氏公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 DFC 原代培养

取出出生后 6~7 d 的 SD 大鼠的乳鼠,无菌条件下将下颌骨切除放置于磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution,PBS)中。体视显微镜下用显微镊分离下颌第一磨牙的牙胚,机械分离牙囊组织,放置于含 1% 双抗的 α-MEM 培养液中,用眼科剪彻底剪碎。37℃、放置在 60 U/mL I 型胶原酶中消化 60 min。加入 4 mL 细胞培养液(α-MEM+10%胎牛血清+100 U/mL 青霉素+100 μg/mL 链霉素+100 mg/mL 抗坏血酸),并将大鼠 DFC 转移至 T-25 细胞培养瓶中,放置在 37℃、5%二氧化碳培养箱中 12 h 让细胞贴壁。细胞融合后用 0.25%胰酶消化传代。取第 3 代大鼠 DFC 作为实验细胞。实验过程中所有动物实验操作符合海南医学院伦理及操作要求。

1.2.2 大鼠 DFC 来源的鉴定(Vimentin、CK-14 细胞免疫荧光染色)

1.2.2.1 细胞爬片的制作

取第 3 代对数生长期大鼠 DFC 消化制备成细胞悬液 1×10^5 /mL,加入 6 孔细胞培养板中 1×10^5

个/孔,制作成爬片。

1.2.2.2 细胞固定

待爬片上的细胞长至 50%~60%,用 4%多聚甲醛固定 10 min。用 1%Triton 溶液配制的 3%BSA 封闭液中封闭作用 30 min(37℃湿盒中)。

1.2.2.3 孵育一抗

用 1% BSA 溶液按抗体说明书所示比例稀释抗体,Vimentin(1:250)、CK-14(1:100),37℃湿盒中孵育 2 h。

1.2.2.4 孵育二抗

用 1%BSA 溶液按 1:200 比例稀释 FITC 结合的羊抗鼠 IgG 二抗,37℃湿盒中孵育 1 h。

1.2.2.5 细胞核染色

每张爬片滴加 200 μL 的 DAPI(1 μg/mL)溶液浸染 2 min,双蒸水洗 2 次,每次 3 min。中性树胶封片。

1.2.3 成骨分化诱导

对照组继续用基础培养液培养,成骨诱导组加入地塞米松为基础的成骨诱导液继续培养 21 d,3 d 换 1 次诱导液,镜下观察出现不规则结节即可。弃成骨诱导液,PBS 洗 3 遍,4%多聚甲醛固定 30 min,茜素红染色 15 min 对分化细胞进行染色,显微镜下采图。

1.2.4 qRT-PCR

使用 Trizol 试剂分别分离对照组和成骨诱导组总 RNA,采用紫外分光光度计测定 RNA 的量和纯度。使用 M-MuLV 逆转录酶试剂盒进行 cDNA 合成。qRT-PCR 用 SYBR Green I kit 和 LightCycler PCR 2.0 系统及 LightCycler4.05 软件计算域值循环数。引物的设计和合成由上海生工公司完成,序列见表 1。以 β-actin 为内参照,qRT-PCR 检测 Notch1 基因表达。反应结束后由软件分析扩增曲线和产物溶解曲线,按相对定量法自动计算目的基因 mRNA 拷贝数。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,计数资料以例数或率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 Notch 1 与 β-actin 引物序列

项目	方向	引物序列
Notch 1	正向	5'-TCAGCGGGATCCACTGTGAG-3'
	反向	5'-ACACAGGCAGGTGAAGTTG-3'
β-actin	正向	5'-TGGCACCAGCACAATGAA-3'
	反向	5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'

2 结 果

2.1 大鼠 DFC 的分离、鉴定及成骨分化潜能

大鼠 DFC 的原代培养 3 d 左右细胞从组织块周围爬出,见图 1A。DFC 大部分呈纺锤状、长梭形,少部分为多角形,其来源于外胚层间充质,具有典型的

间充质成纤维细胞形态,见图 1B。CK-14 染色为阴性,见图 1C。Vimentin 几乎表达于所有大鼠 DFC,染色阳性,见图 1D。表明获取的 DFC 是间充质干细胞,而无上皮细胞。混杂在大鼠 DFC 原代中的上皮细胞

传至第 3 代时大鼠 DFC 已基本被纯化。用含有地塞米松的成骨诱导液诱导大鼠 DFC 28 d 后用茜素红染色液染色可见许多红色矿化小结节生成,见图 1E。

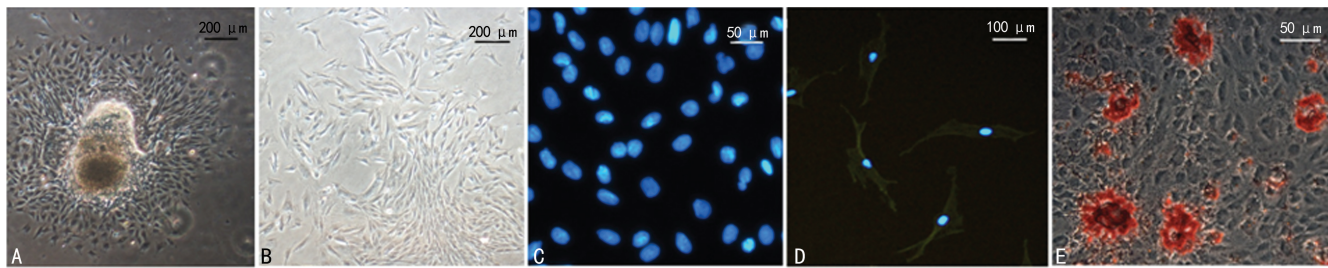
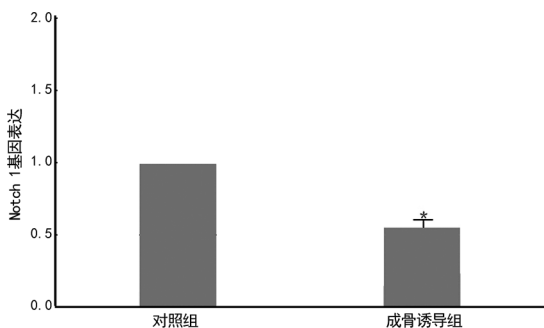


图 1 大鼠 DFC 的分离、鉴定及成骨分化潜能
A:组织块原代培养 DFC;B:第 3 代 DFC;C:CK-14 抗体免疫荧光检测;D:Vimentin 抗体免疫荧光检测;E:第 3 代 DFC 成骨诱导后茜素红染色。

图 1 大鼠 DFC 的分离、鉴定及成骨分化潜能

2.2 经成骨诱导后 DFC 的 Notch 1 信号表达情况

与对照组比较,成骨诱导 28 d 后 DFC 的 Notch 1 基因表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。



*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 2 经成骨诱导后 DFC 的 Notch 1 信号表达情况

3 讨论

DFC 作为骨组织工程的种子细胞之一,具有取材方便、多向分化能力强等优点,在骨修复研究中具有良好的应用前景^[5]。牙囊是包绕于牙齿发育期成釉器和牙乳头周围的疏松结缔组织,来源于外胚层间充质,在牙齿萌出和牙周组织形成中具有重要作用。DFC 是成骨细胞和成牙骨质细胞的前体细胞,DFC 中有碱性磷酸酶、I 型胶原、骨钙蛋白、骨涎蛋白等成骨细胞标志物表达,有牙骨质附着蛋白等成牙骨质细胞标志物表达,经诱导分化可形成牙槽骨和牙骨质^[6]。DFC 与上皮根鞘细胞和牙髓细胞混合,可以诱导 DFC 成骨及成牙骨质方向分化,形成骨样组织和成牙骨质组织^[7]。本研究成功分离、培养、鉴定了 DFC。DFC 的鉴定包括细胞形态鉴定和细胞表面特异性标志物检测。DFC 大多为呈梭形的成纤维细胞样,呈纺锤状结构,漩涡状排列,贴壁生长。DFC 来源于外胚间充质,可检测到间充质干细胞表面标志物——Vimentin 染色阳性,同时上皮细胞表面标志物——CK-14 染色阴性。利用茜素红染色液对经成骨诱导的 DFC 进行染色可见若干红色矿化小结节生

成,表明 DFC 在合适的成骨诱导条件下可以向成骨分化,与相关研究结果一致^[8]。

Notch 信号通路广泛存在于脊椎动物和非脊椎动物,在进化上高度保守,通过相邻细胞之间的相互作用调节细胞、组织、器官的分化和发育^[9]。相邻细胞可以通过 Notch 受体与配体的结合传递 Notch 信号。Notch 信号是相邻细胞之间通讯进而调控细胞发育分化的重要通路^[10-11]。Notch 1 作为 Notch 信号通路的主要受体,与其配体——Jagged 1 及下游靶基因——Hes 1 均为调控细胞分化的关键信号通路因子。在胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠模型中,CIA 组大鼠关节 Notch 1 呈强阳性表达,同时 Jagged 1、Hes 1 表达也显著上升,高于对照组和中药(傅山风湿外治方)控制组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),说明 Notch 1/Jagged 1 信号通路在诱发 CIA 的过程中得到激活,参与了 CIA 的发生、发展。通过药物控制能显著降低 Notch 1、Jagged 1、Hes 1 的表达,抑制 CIA 大鼠中 Notch 1/Jagged 1 信号通路的活化^[12]。表明 Notch 1 与配体 Jagged 1 结合后能影响其下游靶基因 Hes 1 的转录,Notch 1 的表达水平能影响 Notch 1/Jagged 1 信号通路的激活或抑制,从而调控多种炎症因子的表达,如白细胞介素-6、 γ 干扰素等,发挥炎症调控作用^[13]。

Notch 1 是 DFC 维持未分化状态的标记物之一,成骨分化过程中 Notch 信号在 DFC 中被激活^[14]。Notch 信号通路被激活不仅影响 DFC 成骨分化,而且影响 BMP/DLX3 信号通路(成骨分化相关通路)的激活,Notch 信号通路可能通过负反馈回路调节 DFC 的成骨分化^[15]。有研究发现,抑制 Notch 信号通路后可抑制骨肉瘤细胞 MG63 成骨分化,联合调控 Notch 信号通路与分化抑制因子 1 靶基因的表达可遏制骨肉瘤异常成骨分化,诱导其向正常成骨分化,促使异常中断的成骨分化重新发生^[16],说明 Notch 信号在骨肉瘤细胞 MG63 成骨分化中具有重要作用。有研究将人牙周膜干细胞经成骨诱导分化后发现,整合素金属蛋白酶 10(ADAM10)过表达组矿化结节形成量、成

骨相关基因 ALP、Runx2、OCN mRNA 表达水平及 Notch 信号通路相关基因——Notch1、NICD、Hes mRNA 和蛋白表达水平均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明过表达 ADAM10 可促进人牙周膜干细胞增殖并抑制其成骨分化,其机制可能与 Notch 信号通路的激活有关^[17]。在骨质疏松症大鼠动物模型中,经成骨诱导后骨质疏松症脂肪干细胞形成的矿化结节数量、Runx2、Notch1 表达水平均比正常脂肪干细胞低,说明骨质疏松症脂肪干细胞成骨能力比正常脂肪干细胞弱,且 Notch 信号通路受到抑制^[18]。本研究结果显示,与对照组比较,DFC 经 28 d 成骨诱导后 Notch 1 基因表达下降,表明在成骨诱导环境下 Notch 信号通过下调影响 DFC 向成骨方向分化,与相关研究结果一致。然而 Notch 信号通路的各级信号因子如何相互作用精确调控 DFC 的成骨分化仍需进一步研究。

综上所述,DFC 表达间充质干细胞表面标志物和 Notch 信号,具有间充质干细胞的特性。在成骨分化过程中 Notch 信号表达量下调,通过负反馈回路调节 DFC 的成骨分化。

参考文献

[1] CHEN C C, ZHANG J Y, LING J Q, et al. Nkd2 promotes the differentiation of dental follicle stem/progenitor cells into osteoblasts [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(5): 2403-2414.

[2] BUCHAILLE R, COUBLE M L, MAGLOIRE H, et al. A subtractive PCR-based cDNA library from human odontoblast cells; identification of novel genes expressed in tooth forming cells[J]. *Matrix Biol*, 2000, 19(5): 421-430.

[3] HANDA K, SAITO M, YAMAUCHI M, et al. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells[J]. *Bone*, 2002, 31(5): 606-611.

[4] KATO C, KOJIMA T, KOMAKI M, et al. S100A4 inhibition by RNAi up-regulates osteoblast related genes in periodontal ligament cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 326(1): 147-153.

[5] 杨爽, 胡伟平. 牙囊细胞成骨分化的研究进展[J]. *口腔医学*, 2018, 28(10): 930-933.

[6] BAI Y, BAI Y, MATSUZAKA K, et al. Formation of bone-like tissue by dental follicle cells co-cultured with dental papilla cells[J]. *Cell Tissue Res*, 2010, 342(2): 221-231.

[7] JUNG H S, LEE D S, LEE J H, et al. Directing the differentiation of human dental follicle cells

into cementoblasts and/or osteoblasts by a combination of HERS and pulp cells[J]. *J Mol Histol*, 2011, 42(3): 227-235.

- [8] RAD M R, LIU D W, HE H Z, et al. The role of dentin matrix protein 1 (DMP1) in regulation of osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells (DFSCs)[J]. *Arch Oral Biol*, 2015, 60(4): 546-556.
- [9] MIKHAIL P, PRANAV H, MICHAEL B M, et al. Notch signaling: Its essential roles in bone and craniofacial development [J]. *Genes Dis*, 2021, 8(1): 8-24.
- [10] CHEN X P, ZHANG T H, SHI J J, et al. Notch1 signaling regulates the proliferation and self-renewal of human dental follicle cells by modulating the G1/s phase transition and telomerase activity [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69967.
- [11] 赵锐, 王译晗, 朱悦, 等. 调控成骨细胞分化的信号通路及细胞因子研究进展[J]. *中国医学创新*, 2021, 18(5): 171-176.
- [12] 赵彩虹, 高玉亭, 郝慧琴, 等. 傅山风湿外治方对 CIA 大鼠 Notch1/Jagged1 通路表达的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(4): 431-436.
- [13] 焦沃尔, 魏金凤, 续珊, 等. Notch1-Jagged1 信号在变应性鼻炎中的表达及意义[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2018, 53(10): 733-739.
- [14] URIBE P, LARSSON L, WESTERLUND A, et al. Gene expression profiles in dental follicles from patients with impacted canines[J]. *Odontology*, 2018, 106(4): 351-359.
- [15] SANDRA V B, MARTIN G, CHRISTIAN M. NOTCH1 signaling regulates the BMP2/DLX-3 directed osteogenic differentiation of dental follicle cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(2): 500-504.
- [16] 陈洁, 张瑶, 谢圣男, 等. 抑制 Notch 信号通路联合沉默 Id1 对骨肉瘤恶性生物学行为及成骨分化的影响[J]. *中国细胞生物学学报*, 2021, 43(4): 715-724.
- [17] 朱永翠, 翟蕾, 闫亚姿, 等. 过表达 ADAM10 通过调控 Notch 信号通路对牙周膜干细胞成骨分化的影响[J]. *口腔医学研究*, 2021, 37(5): 468-473.
- [18] 冯茂耕, 杨双林, 罗道文, 等. 骨质疏松症大鼠脂肪干细胞成骨能力及 Mettl14 和 Notch1 表达的探究[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2021, 52(3): 423-429.