

地塞米松对牙囊细胞表达 Runx2、Osterix 的体外研究

张璇 吴亚菲 邢明明 董伟

【摘要】 目的 研究地塞米松对体外培养的小鼠牙囊细胞 Runx2 和 Osterix mRNA 表达的影响,探讨 Runx2 和 Osterix 在牙囊细胞成骨分化中的作用。**方法** 原代培养大鼠牙囊细胞,取生长状态良好的第4代大鼠牙囊细胞分别与实验组中浓度为 10^{-8} mol/L 地塞米松以及未加入地塞米松的对照组共培养,第7天、14天、21天提取细胞 mRNA,RT-PCR 检测 Runx2、Osterix 的 mRNA 表达,以 GAPDH 作为内参物,比较两组 PCR 产物的光密度值。**结果** 与对照组比较,加入地塞米松的实验组,Runx2 mRNA 在三个不同时间点的表达增强($P < 0.01$),Osterix mRNA 表达提前,在第14天、21天时表达强于对照组($P < 0.01$)。**结论** 地塞米松可增强小鼠牙囊细胞 Runx2 和 Osterix mRNA 的表达水平,提示地塞米松促进牙囊细胞向成骨方向的分化。

【关键词】 牙囊; 地塞米松; 核心结合因子 $\alpha 1$ 亚基; Osterix

The contribution of dexamethasone to dental follicle cells from rat molars express Runx2 and Osterix in vitro ZHANG Xuan, WU Ya-fei, XING Ming-ming, DONG Wei. Sichuan University of Oral Disease Research National Key Laboratories, Hospital of Stomatology Sichuan University, Chengdu 610041, China
Corresponding author: DONG Wei, Email: dongwei_89@126.com

【Abstract】 Objective To study the certain contribution of dexamethasone on expression of the Runx2 and Osterix mRNA on rat dental follicle cells *in vitro*, and the role of Runx2 and Osterix in dental follicle bone formation process during development of dental follicle cells. **Methods** The 4th passage of primary cultured human dental follicle cells were treated with 10^{-8} mol/L dexamethasone and without dexamethasone respectively for 7 d, 14 d, 21 d. Total RNA was isolated from rat molar dental follicle cells and subjected to RUNX2 and OSTERIX mRNA assay by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. The relative expression levels of Runx2 and Osterix mRNA were normalized to GAPDH. **Results** The mRNA expression of Runx2 in rat dental follicle cells with 10^{-8} mol/L dexamethasone treatment was up-regulated significantly than the control group ($P < 0.01$). The mRNA expression of Osterix was obvious up-regulated in rat dental follicle cells with treatment of dexamethasone in 7 d and 14 d ($P < 0.01$). **Conclusions** Dexamethasone may increase the expression of Runx2 and Osterix, therefore dexamethasone may promote the rat dental follicle bone formation process during development of dental follicle.

【Key words】 Dental sac; Dexamethasone; Core binding factor alpha 1 subunit; Osterix

牙囊是包绕于成釉器及牙乳头外周的一层疏松结缔组织,起源于外胚间充质,具有多向分化潜能。通过上皮-间充质反应分化形成牙周膜、牙骨质和固有牙槽骨。牙囊细胞以其较强的增殖分化能力成为牙周组织工程研究的一种种子细胞^[1]。目前对于牙囊细胞的研究集中于牙囊细胞的培养和牙囊细胞的成骨分化调控方面。近年来关于牙囊细胞的研究集中于牙囊细胞的培养方法、生物学性状、免疫组织化学和分化过程的研究^[2-6],其中以牙囊细胞成骨矿化分化过程中细胞信号因子的表达及调控方面的研究为最近的热点。牙囊细胞的成骨分化受一些调节分子所组成的网络控制,但其调控机制还未被完全阐释明白^[7]。最近的研

究表明,在骨髓间充质干细胞(marrow stroma cell, MSC)的成骨分化调控中 Runx2 和 Osterix 起到了重要作用^[8-10],可以调节作为成骨分化成熟标志的骨钙素(osteocalcin, OCN)的活性^[11-12]。Runx2 因其能激活与启动 MSC 向成骨细胞系分化并调节成骨细胞的成熟,而被作为成骨细胞特异性转录因子和分化因子的关键因子^[13]。已有研究表明地塞米松可以增强体外培养的牙囊细胞的碱性磷酸酶的活性,碱性磷酸酶为成骨细胞分化的早期标记物,作为一种促矿化因子促进牙囊细胞的钙化^[14-17]。本研究拟在国内外学者研究的基础上,研究大鼠牙囊细胞的培养与生物学特征及地塞米松在诱导鼠牙囊细胞矿化的过程中是否存在 Runx2 和 Osterix 的表达,了解大鼠牙囊细胞的成骨分化的机制,为其作为种子细胞在牙周组织工程中的应用打下基础。

材料与方法

一、主要试剂和仪器

改良的 Eagle 培养基(Gibco, 美国),胎牛血清(Gibco, 美国),地塞米松(Gibco, 美国),胰蛋白酶(Gibco, 美国),胶原酶(Gibco, 美国),兔抗大鼠波形蛋白单克隆抗体(SC, 美国),兔抗大鼠角蛋白单克隆抗体(SC, 美国),Trizol(MRC 公司, 美国),RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI 公司, 立陶宛),TaqDNA 聚合酶(TAKARA 公司),dNTP(TAKARA 公司)倒置相差显微镜(Olympus, Japan),Get Doc 1000 凝胶成像系统(BIO-RAD 公司, 美国)。

二、牙囊细胞分离、培养及传代

取 10 只不分雌雄 7 d 龄新生 SD 大鼠,分离 10 只大鼠的下颌第一二磨牙牙胚,将牙胚上的牙囊组织剪成 1 mm² 大小的组织块,分别离心收集 10 只大鼠的组织块,0.2% 的胶原酶 5 ml 消化 1 h,胰蛋白酶消化 5 min,离心收集组织块加入含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化,离心,加入含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基 4 ml 重悬细胞,于 5% CO₂、37 °C 饱和湿度的孵箱中培养。原代牙囊细胞培养 6~7 d 可长满约 80%,此时利用牙囊细胞与上皮细胞对胰酶耐受性的差异进行传代、纯化,每 4~5 d 即可传代 1 次,传代 4 次即可纯化细胞,取第四代细胞备用。

三、RT-PCR 检测

1. 牙囊细胞的处理:取生长良好的牙囊细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化后,用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液配成单细胞悬液,以每孔 1×10^3 个细胞接种到 96 孔板上,换含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液,牙囊细胞经传代培养后分为两组,第一组加入 10^{-8} mol/L 的地塞米松,第二组为空白对照组。2 d 换液 1 次。分别于第 7、14、21 天取材进行检测。

2. 牙囊细胞总 RNA 的提取:两组细胞经培养,第 7、14、21 天时加 Trizol 提取总的 RNA,按每毫升 Trizol 加入 200 μ l 氯仿后分层,按每毫升 Trizol 加入 0.5 ml 异丙醇混匀,按每毫升 Trizol 加入 1 ml 75% 乙醇,温和振荡离心管,悬浮沉淀,0.5% SDS 溶解 RNA 样品,55~60 °C 5~10 min,测 OD 值定量 RNA 浓度。-7 °C 保存备用。DNA 或 RNA 溶液稀释后,测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值,明确核酸含量和质量。取 5 μ l 样品在琼脂糖凝胶上电泳,检测 DNA 或 RNA 的分子大小。

3. 逆转录成 cDNA:采用 Oligo(dT) 或随机引物利用逆转录酶反转录成 cDNA 第一链,20 μ l 反应体系包括:总 RNA 5 μ l, Oligod T 引物 1 μ l, DEPC 处理过的水 6 μ l,按照说明书进行第一链的合成。

4. PCR:PCR 扩增 Runx2、Osterix 和内参照 GAPDH 引物由上海工程公司合成。采用 Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 的 20 μ l 反应体系。反应条件均为:95 °C 变性 10 min;95 °C 变性 30 s;62 °C 变性 1 min,45 个循环。反应所得产物于 1.6% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶放入紫外线下于可见分析装置显影,确定提取 cDNA 的质量。

5. 实时定量 RT-PCR:应用荧光染料 SYBR Green 进行实时定量 PCR 来分析经反转录而得的 cDNA。反应体系包括由总 RNA 反转录所得的 cDNA、10 \times PCR Buffer、25 mol/L MgCl₂、10 mmol/L dNTP Mixture、40 U/ μ l RNase Inhibitor、5 U/ml AMVRTase XL、5 U/ μ l AMV-Optimized Taq、20 μ mol/L 上游特异性引物、20 μ mol/L 下游特异性引物、1.5 μ l SYBR Green,然后进行 45 个循环。

每个样本重复3次。在每一个循环的退火温度结束时测定荧光值,并设定一个荧光阈值,当PCR反应超过这一荧光阈值时的反应次数就被认为是PCR扩增反应指数阶段开始时对应的循环次数,即Ct值,相对定量在连续荧光的水平上比较Ct值,转录本数量与Ct值成反比;转录本稀释两倍,Ct值就增加1。相对表达率可用以下公式计算: $R = 2 - (\Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{control}})$ 或 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,即要决定每个基因相应的表达率,每一测量数据需要以内参基因相对的值作为内标,并与相应的对照组比较。

6. 结果的计算:各样品的目的基因和管家基因分别进行实时PCR反应。根据DNA标准曲线,各样品目的基因和管家基因的浓度结果直接由机器生成。每个样品的目的基因浓度除以管家基因的浓度,即为此样品此基因校正后的相对浓度。

7. 待测基因以内参校正:实时定量PCR时各样品的加样量均相同,然而由于受RNA浓度定量误差和RNA逆转录效率等的影响,每个样品相同体积的cDNA并不完全相同。为校正此差异,我们使用管家基因作为内参,以样品待测基因的值除以样品内参的值,最终得到的比值为样品的待测基因相对含量。

四、统计学分析

采用SPSS 10.0软件包进行统计学处理。实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据采用成组设计的t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、实验组与对照组 Runx2 不同时间点的表达

经统计学检验,实验组与对照组三个时间点Runx2 mRNA的表达差异都有统计学意义($P < 0.01$),说明地塞米松的加入可提高牙囊细胞各时间点Runx2 mRNA的表达水平(表1)。

二、实验组与对照组 Osterix 不同时间点的表达

经统计学检验,实验组与对照组第14天和第21天时Osterix mRNA的表达差异有统计学意义($P < 0.01$),实验组Osterix mRNA的表达提前并提高了其表达水平(表2)。

表1 Runx2 mRNA在各时间点的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	第7天	第14天	第21天
对照组	5	1.14 ± 0.12	1.23 ± 0.16	1.20 ± 0.18
实验组	5	1.76 ± 0.18	1.96 ± 0.14	1.87 ± 0.17
t值		6.408	6.021	6.051
P值		<0.01	<0.01	<0.01

表2 Osterix mRNA在各时间点的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	第7天	第14天	第21天
对照组	5	-	0.94 ± 0.08	1.14 ± 0.07
实验组	5	0.82 ± 0.09	1.21 ± 0.01	1.36 ± 0.12
t值		-	4.714	3.541
P值			<0.01	<0.01

讨 论

Wise等于1992年首次成功培养出出生6d的大鼠的牙囊细胞,并通过组织学、免疫组织化学、蛋白分析技术、扫描电镜和透射电镜等方法,证明大鼠牙囊细胞主要为成纤维细胞,这种成纤维细胞具有合成与分泌蛋白质的功能^[18]。本研究在牙囊细胞的原代培养是将前人所用的直接胰酶消化法换成胶原酶、胰酶交替消化。在细胞消化所用酶中,胶原酶作用效力最为柔和,对细胞损伤最小,且主要针对细胞间质发生作用,从而作用时间易于掌握。本方法培养的大鼠牙囊细胞具有成纤维细胞的形态特征,这与Wise等^[19]的实验结果相符合。随着培养天数的增加,牙囊细胞形态上呈非均质性,存在多种细胞形态,其中以长梭形和多角形

为多见,有两个或多个树突多角形细胞生长速度较长梭形细胞快,且细胞间出现接触抑制,胞体更为紧凑,胞质颜色更为深染,在胞质中围绕细胞核有散在的高密度白色颗粒存在,大小不一。体外培养的大鼠牙囊细胞形态特点及其胞内的高密度颗粒与活体内牙囊细胞所观察到的结果相符合^[20]。到目前为止,多数学者认为该高密度颗粒属牙囊细胞特有,在大鼠的其他组织中未曾发现,可以作为大鼠牙囊细胞的特异性标志之一,并且认为该颗粒的存在与牙齿的萌出有关,具体机制尚未完全明了^[21-23]。采用实时 PCR 方法对地塞米松刺激大鼠牙囊后 Runx2 和 Osterix 的表达进行相对定量分析。实时 PCR 技术于 1996 年由美国 Applied Biosystem 公司推出,其基本原理是在 PCR 反应体系中加入荧光基因,利用荧光信号的累积检测整个 PCR 反应过程中 PCR 产物的累积量,最后通过标准曲线对未知模板进行分析。实时 PCR 所使用的荧光类型分为两种:荧光探针和荧光染料。本实验采用的是荧光染料,即采用一种能够结合于所有 dsDNA 双螺旋小沟的具有绿色激发波长的染料,它与 PCR 合成的双链 DNA 结合,在激发光照射下产生荧光,通过荧光的检测,可以实时监测 PCR 扩增的产物量。染料法相对于探针法简单易行,成本较低,无需合成特异性探针。本实验以 GAPDH 为内参来对 mRNA 的表达进行定量解析,首先分别测定目的基因和参比基因的量,再求出对于参比基因的目的基因的相对量,最后再进行样本间相对量的比较。通过选择参比基因对所有的样本进行归一化处理(RNA 量校正),然后再对不同样本之间的目的基因表达量进行比较,以消除样本材料、RNA 提取效率、PCR 扩增率等差异对结果的干扰,从而可以比较不同条件下靶基因的转录水平^[24-26]。牙囊细胞具有多向分化潜能,在一定条件下可以向成骨方向分化为牙骨质固有牙槽骨。牙囊细胞的成骨分化已被许多实验所证实,但其成骨分化中各种转录因子的表达调控机制尚不完全清晰。由于在骨发育中的重要作用,Runx2 和 Osterix 是最近研究最多的两个基因。前者在成骨分化中发现最早,是骨细胞发育中的主基因,其功能包括调节骨细胞分化、促进软骨细胞肥大化,还与血管的侵入及破骨细胞的分化有关,重要的功能地位在骨发育中现在仍无可取代。Runx2 属于 RUNT 结构域家族,通过 RUNT 结构域选择性结合靶基因,调节成骨转录的开始。Ducy 等的研究表明,Runx2 是调节成骨细胞分化最早、最特异的标志,Runx2 不仅能调节成骨细胞的分化,还可以调节成骨细胞的成熟,并通过结合成骨表达特异性的标记物启动子来调节成骨标记物(骨钙素、骨桥素、骨涎蛋白、I 型胶原)表达^[27]。体内外实验均表明 Runx2 是成骨分化和发育所必需的,是骨形成的关键基因^[28]。Osterix 是最近才发现的一个调控成骨分化和骨形成的特异性转录因子,同样在骨形成及骨细胞发育中起重要作用。它与 Runx2 属于同一个转录途径,位于 Runx2 下游,其表达需要 Runx2 的存在。该基因含有一个小的锌指结构,只在发育中的骨骼, Osterix 阳性表达的细胞才具有直接成骨的能力^[29-30]。地塞米松属于糖皮质激素,广泛用于诱导体外培养的骨髓基质干细胞、牙髓细胞、牙囊细胞向成骨细胞分化,地塞米松的这种作用是由于骨细胞是糖皮质激素的靶细胞,地塞米松对其分化使得基因表达有一定的调节引导作用。地塞米松不仅能促进成骨细胞分化成熟,诱导成骨,而且具有调节成骨样细胞合成胰岛素样生长因子和促进 I 型胶原合成的作用,调高碱性磷酸酶的活性,促进干细胞向成骨细胞的分化^[31-32]。地塞米松可以促进牙囊细胞的分化,并通过刺激碱性磷酸酶、骨钙素、I 型胶原等的表达来促进牙囊细胞的成骨分化。本实验结果显示地塞米松的加入加速了牙囊细胞成骨分化过程。通过实时 RT-PCR 技术从 mRNA 的水平发现 Runx2 和 Osterix 在两组细胞中均有表达,但表达情况却有不同:实验组牙囊细胞的 Runx2 mRNA 的水平在检测的各时间点都高于对照组,两组间差异有统计学意义;实验组牙囊细胞 Osterix mRNA 的表达及其到达峰值的时间均提前于对照组。说明实验组所诱导的牙囊细胞分化要早于对照组,分化的程度也较对照组高。说明地塞米松的加入可提高各时间点 Runx2 的表达水平,使 Osterix 的表达及峰值时间提前。检测结果说明地塞米松的加入可促进牙囊细胞向成骨方向的分化。

参 考 文 献

- [1] 全国牙病防治指导组. 第二次全国口腔健康流行病学抽样调查. 北京:人民卫生出版社,1999:662-667.
- [2] 曹采方. 牙周病学. 北京:人民卫生出版社,2000:120.
- [3] 金岩. 组织工程学原理与技术. 西安:第四军医大学出版社,2004:24.
- [4] De-Kok JJ, Drapeau SJ, Young R, et al. Evaluation of mesenchymal stem cell following implantation in alveolar sockets: a canine safety study. Int J

- Oral Maxillofac Implants, 2005, 20:511-518.
- [5] Akizuki T, Oda S, Komaki M, et al. Application of periodontal ligament cell sheet for periodontal regeneration : a pilot study in beagle. *J periodontal Res*, 2005, 40:245-251.
- [6] Zhao M, Jin Q, Berry JE, et al. Cementoblast delivery for periodontal tissue engineering. *J Periodontol*, 2004, 75:154-161.
- [7] Dassule HR, McMahon AP. Analysis of epithelial mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev Biol*, 1998, 202:215-227.
- [8] Thesleff I, Aberg T. Molecular regulation of tooth development. *Bone*, 1999, 25:123-125.
- [9] Thesleff I. Epithelial mesenchymal signaling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci*, 2003, 116:1647-1648.
- [10] Hu JC, Simmer JP. Development biology and genetics of dental malformations. *Orthod Craniofac Res*, 2007, 10:45-52.
- [11] Ken O, Ljnda JS. Extracellular matrix gene regulation. *Clin Orthop*, 2004, 427:123-128.
- [12] Nahashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 2002, 108:17-29.
- [13] Komori T. Runx 2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. *J Cell Biochem*, 2002, 87:1-8.
- [14] Xiang Z, Jane EA, Robert DI. Molecular and cellular biology of new bone formation : insights into the ankylosis of an kylosing spondylitis. *Rheumatology*, 2003, 15:387-393.
- [15] 张永宽, 林珠, 金作林, 等. 地塞米松对体外培养的人牙囊细胞增殖和碱性磷酸酶活性的影响. *临床口腔医学杂志*, 2006, 22:77-79.
- [16] Wise GE, Lin F, Fan W. Culture and characterization of dental follicle cells from rat molars. *Cell Tissue Res*, 1992, 267:483-492.
- [17] Hou LT, Liu CM, Chen YJ, et al. Characterization of dental follicle cells in developing mouse molar. *Arch Oral Biol*, 1999, 44:759-770.
- [18] Courmil I, Leblond CP, Pomponio J, et al. Immunohistochemical localization of procollagens III. Type I procollagen antigenicity in osteoblasts and prebone. *J Histochem Cytochem*, 1979, 27:1059-1069.
- [19] Wise GE, Frazier-Bowers S, D'Seuza RH. Cellular, molecular and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2002, 13:323-334.
- [20] Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Meth Dev*, 1997, 67:111-123.
- [21] Steinert PM, Roop DR. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. In: Richardson CC (ed) annual review of biochemistry. *Annu Rew Biochem*, 1998, 57:593-625.
- [22] Actor JK, Limor JR, Hunter RL, et al. A flexible bioluminescent-quantitative polymerase reaction assay for analysis of competitive. *Lab J Clin*, 1999, 13:40-47.
- [23] Sehnell S, Mendoza C. Enzymological considerations for a theoretical description of the quantitative competitive polymerase chain reaction. *J Theor Biol*, 1997, 84:433-440.
- [24] Ke LD, Chen Z, Yung WK. A reliability test of standard-based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standards. *Mol Cell Probes*, 2000, 14:127-135.
- [25] Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 2000, 289:1501-1504.
- [26] Emani S, Mayer JE, Emani SM. Gene regulation of extracellular matrix remodeling in human bone marrow stem cell-seeded tissue-engineered grafts. *Tissue Eng Part A*, 2011 Jun 17. [Epub ahead of print].
- [27] Linda JS, Dwight AT. Transcription of bone and cartilage genes. *Orthopaedics*, 2002, 13:375-381.
- [28] Seki K, Fujimori T, Savagner P, et al. Mouse Snail family transcription repressors regulate chondrocyte, extracellular matrix, type II collagen, and aggrecan. *J Biol Chem*, 2003, 278:41862-41870.
- [29] Pan K, Sun Q, Zhang J, et al. Multilineage differentiation of dental follicle cells and the roles of Runx2 over-expression in enhancing osteoblast/cementoblast-related gene expression in dental follicle cells. *Cell Prolif*, 2010, 43:219-228.
- [30] Sparber-Sauer M, Hönig M, Schulz AS, et al. Patients with early relapse of primary hemophagocytic syndromes or with persistent CNS involvement may benefit from immediate hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 2009, 44:333-338.
- [31] Xu LL, Liu HC, Wang DS, et al. Effects of BMP-2 and dexamethasone on osteogenic differentiation of rat dental follicle progenitor cells seeded on three-dimensional beta-TCP. *Biomed Mater*, 2009, 4:065010.
- [32] Jin ZL, Zhang YK, Suo HY, et al. Osteogenic-related gene expression profiles of human dental follicle cells induced by dexamethasone. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2008, 29:1013-1020.

(收稿日期:2011-03-04)

(本文编辑:巨娟梅)