

# 过表达 DDIT3 对人牙髓干细胞增殖和分化能力影响的研究

王立军\* 刘琼

(南华大学附属南华医院口腔科 湖南 衡阳 421000)

**[摘要]** 目的:通过构建 DDIT3 过表达质粒,进一步验证过表达 DDIT3 对人牙髓干细胞(human dental pulp cells, HDPCs)增殖和分化能力的影响。方法:构建带有绿色荧光标记的 DDIT3 慢病毒载体,分为 3 组:空白(A 组)对照组,绿色荧光对照组(B 组),DDIT3 过表达组(C 组);荧光显微镜观察病毒感染效率;qRT-PCR 和 Western blot 检测过表达效果;MTT 检测三组细胞的增殖能力;ALP、茜素红、vonKossa 染色和 qRT-PCR 检测 DDIT3 对 HDPCs 成骨/成牙本质分化能力的影响。结果:荧光显微镜下观察 C 组绿色荧光表达面积 >90%,qRT-PCR 和 Western blot 结果表明,C 组 DDIT3 mRNA 和蛋白表达明显升高;MTT 结果显示,与对照组相比,过表达 DDIT3 在 72 h 和 96 h 可明显抑制 HDPCs 的增殖;qRT-PCR 结果表明,DDIT3 过表达可明显增加矿化相关基因 OSX,DSPP, DMP1 和 OCN mRNA 表达水平,同时增加 DSPP 蛋白表达;ALP 染色结果表明,3 组细胞在成骨/成牙本质分化第 7 天,均可见明显的 ALP 染色阳性细胞,但染色面积无明显差异。然而,在成骨/成牙本质分化第 14 天,茜素红染色和 vonKossa 染色结果表明,过表达 DDIT3 可明显增加钙沉积。结论:DDIT3 可促进 HDPCs 晚期的成骨/成牙本质分化。

**[关键词]** DDIT3 HDPCs 成骨和成脂

**[中图分类号]** R78 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2018)01—0018—04

**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.01.005

**Effect of DDIT3 Overexpression on Proliferation and Differentiation of HDPCs.** WANG Li-jun\*, LIU Qiong. Department of Stomatology, Nanhua Hospital of University of South China. Hengyang 421001, China.

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of DDIT3 overexpression on proliferation and osteogenic/odontoblastic differentiation of HDPCs. **Methods:** DDIT3 overexpression lentiviral construct was confirmed by sequencing. Generation of lentiviral vectors was accomplished using a three-plasmid transfection procedure. Cells were allocated into three groups: HDPCs-WT group, HDPCs-GFP group, and HDPCs-DDIT3-overexpression group. Expression of DDIT3 was quantified by qRT-PCR and Western blot. Cell proliferation and osteogenic/odontoblastic differentiation were detected by MTT, qRT-PCR, ALP staining, Alizarin red staining, and von Kossa staining. **Results:** A lentiviral vector system was used to efficiently overexpress DDIT3 in primary HDPCs to levels >90%. It was found that DDIT3 mRNA was overexpressed over 38-fold, MTT assay revealed DDIT3 overexpression reduced HDPC proliferation by 72 and 96 hours compared to control groups. DDIT3 overexpression led to no significant difference in ALP staining area after 7 days culture in odontoblastic medium. However, DDIT3 overexpression enhanced calcium deposition by day 14, as examined by alizarin red and von Kossa staining. qRT-PCR results revealed that DDIT3 overexpression did not affect ALP and RUNX2 mRNA levels, however, it significantly increased OSX, DSPP, DMP1, and OCN mRNA levels by day 14. Western blot analysis revealed that DSPP protein levels were higher in the HDPCs-DDIT3-overexpression group. **Conclusion:** Lipid metabolism related gene DDIT3 may correlate with HDPCs late osteogenic/odontoblastic differentiation.

**[Key words]** DDIT3 HDPCs Osteogenesis and adipogenesis

DDIT3,作为 C/EBP 家族的成员,是一种在炎

症和成脂分化中都扮演着重要角色的转录因子。因其可与 C/EBP $\beta$  形成异构体而抑制其 DNA 结合活性,从而抑制 C/EBP $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  的表达而不利于脂肪的形成。作为一种凋亡转录因子,内质网刺激可诱导 DDIT3 的表达,并可通过诱导细胞凋亡蛋白

**基金项目** 湖南省教育厅科研项目(编号:14B0104)

**作者简介** 王立军(1969~),男,汉,学士,湖南衡阳人,主治医师,主要从事口腔颌面外科临床治疗工作。

**\* 通讯作者** 王立军,电话:18007479922

酶 11 而介导炎症的发生<sup>[1]</sup>。相反的,也有研究认为 DDIT3 与 C/EBP $\beta$  形成异构体会抑制 C/EBP $\beta$  与 RUNX2 的相互作用,从而抑制成骨向的分化<sup>[2]</sup>;也有研究发现,过表达 DDIT3 的小鼠可降低成骨细胞的功能并导致骨质疏松<sup>[3]</sup>。以上研究表明,DDIT3 在炎症和成脂中的作用虽然较为明确,但在成骨分化中的作用还存在很大的争议,目前,尚未有研究表明 DDIT3 是否以及如何调控 HDPCs 的成骨/成牙本质分化,相关的研究可能为调控 HDPCs 成骨/成牙本质分化提供新的思路。

## 1 材料与方法

1.1 材料 主要试剂:PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA 聚合酶(宝生物工程有限公司,中国大连);EcoRI 限制性内切酶(NEB,中国北京);BamHI 限制性内切酶(NEB,中国北京);T4 DNA 连接酶(Fermentas,美国);pLVX-CMV-ZsGreen1 质粒(Clontech,美国);DSPP 一抗(Santa Cruz Biotechnology,美国);LB 培养基(生物工程有限公司,中国上海);质粒大提试剂盒(天根生化科技有限公司,中国北京);切胶回收试剂盒(康为世纪生物科技有限公司,中国北京);其余实验试剂均为国产分析纯。病例来源:在患者知情同意下,选取我院 2016 年 11 月~2017 年 3 月收治的 60 名 18~28 岁病人中因正畸原因拔除的健康前磨牙和阻生的第三磨牙 100 颗,平均年龄(22.55 $\pm$ 3.38)岁。

## 1.2 方法

1.2.1 过表达 DDIT3 质粒的构建及鉴定 按照试剂盒说明方法提取 HDPCs 总 RNA(宝生物工程有限公司,中国大连),并逆转录为 cDNA。使用 PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA 聚合酶,按照说明书配制反应试剂,扩增 cDNA。正向引物:CCGGAATTCATGGAGCTTGTTCCAGCC 反向引物:CGCGGATCCTCATGCTTGGTGCAGATTC 琼脂糖凝胶电泳观察目的条带。在紫外灯照射下,切下带有目的条带的凝胶,按照切胶回收试剂盒提供的实验步骤,提取目的 DNA。用 EcoRI 和 BamHI 双酶切鉴定 DNA 切胶回收产物。用 EcoRI 和 BamHI 双酶切 pLVX-CMV-ZsGreen1 质粒,切胶回收得到线性化的 pLVX-CMV-ZsGreen1。T4 DNA 连接酶连接线性化的 pLVX-CMV-ZsGreen1 和 DNA 切胶回收产物。将上述连接产物经感受态细胞转化,涂板,挑取单克隆并摇菌。按照质粒大提试剂盒实验步骤提取质粒,测定浓度。酶切鉴定正确后储存于-20 $^{\circ}$ C,用于后续病毒的包装。

1.2.2 细胞的感染 用 pspax2、pMD2G 包装质粒分别和过表达载 pLVX-human-DDIT3 以及对照载体 pLVX-IRES-GFP 转染 293T 细胞。将 HDPCs 按照  $1.5 \times 10^5$  个/孔的密度铺至 6 孔板中,用上述病毒上清感染细胞。6 h 后,去除病毒感染液,换成 HDPCs 基础培养基,继续传代培养用于后续实验,以未感染的 HDPCs 作为空白对照,分别命名为 HDPCs-WT 组(A 组)、HDPCs-GFP 组(B 组)、HDPCs-DDIT3-overexpression 组(C 组)。qRT-PCR 检测 3 组细胞 DDIT3 mRNA 的表达。

1.2.3 细胞增殖能力测试 将 HDPCs 按照  $2 \times 10^3$  个/孔的密度铺至 96 孔板中,放于含 5%CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱内。分别选择 24、48、72 和 96 h 时间点,于每个时间点加入 20  $\mu$ L MTT 试剂(5.0 g/L),放于含 5%CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱内孵育 4 h。弃上清,每孔加入 200  $\mu$ L DMSO,避光摇床震荡 10 min,读取 A<sub>570</sub> 值。

1.2.4 矿化相关基因和蛋白的表达 将 3 组细胞铺至 12 孔板中,用 HDPCs 基础培养基培养至细胞铺满培养板,加入成牙本质分化培养基诱导至第 14 天,每两天换液。收集 0、7、14 d 的 3 组细胞 RNA,qRT-PCR 检测矿化相关基因 mRNA 的表达收集 0、7、14 d 的 3 组细胞蛋白。

1.2.5 ALP、茜素红和 vonKossa 染色 3 组细胞接种于 12 孔板中,成牙本质分化诱导至第 7 天。4%多聚甲醛室温固定 15 min,PBS 清洗 2 次,加入 ALP 工作液,室温孵育 30 min。去除染色液,双蒸水清洗,显微镜下观察拍照。用 IMAGEJ 软件计算 ALP 染色面积。当 3 组细胞成牙本质分化诱导至第 14 天时,弃去诱导分化培养基,PBS 清洗 1 次,4%多聚甲醛室温固定 15 min。蒸馏水清洗 3 次,将配置好的 1%茜素红溶液加入孔板中,室温孵育 10~20 min,弃去染色液,蒸馏水清洗数次,显微镜下观察并照相。将上述染色完成的细胞用蒸馏水清洗数次,每孔加入 600  $\mu$ L 10%氯化十六烷基吡啶室温反应 1 h。分别收集每孔的溶液,反复吹打混匀,以 200  $\mu$ L/孔加入 96 孔板中,紫外分光光度计记录 590 nm 的 A 值。3 组细胞诱导分化至第 14 天,用 4%多聚甲醛室温固定 15 min。PBS 清洗 1 次,加入 1%硝酸银溶液,于紫外灯下照射 45 min。用蒸馏水清洗 3 次,加入 3%硫代硫酸钠溶液 5 min,蒸馏水清洗 3 次,显微镜下观察照相。用 IMAGEJ 软件计算 vonKossa 染色面积。

1.3 统计学分析 数据采用 SPSS16.0(SPSS,

Chicago, IL, USA) 软件计算完成, 最后结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。两组比较用组间  $t$  检验(student's  $t$ -test) 分析, 多组比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 当统计学分析统计值  $P < 0.05$  被认为有统计学差异。

## 2 结果

2.1 DDIT3 过表达及对 HDPCs 增殖的影响 如表 1 所示, 与 B 组相比, C 组 DDIT3 mRNA 表达有明显统计学差异( $P < 0.05$ )。如表 2 MTT 试验显示, 与对照组相比, 过表达 DDIT3 在 72 h 和 96 h 可明显抑制 HDPCs 的增殖( $P < 0.05$ ); 而 A 组和 B 组在增殖能力上没有明显的统计学差异。

表 1 qRT-PCR 检测 3 组细胞 DDIT3 mRNA 表达

Table 1 Expression of DDIT3 mRNA detected by qRT-PCR  $\bar{x} \pm s$

组别	DDIT3
A 组	1.00 ± 0.01
B 组	1.08 ± 0.02
C 组	38.14 ± 1.27*

注: 与 A 组、B 组相比, \*  $P < 0.05$

表 2 细胞增殖结果

Table 2 Results of cell proliferation  $\bar{x} \pm s$

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
A 组	0.22 ± 0.01	0.35 ± 0.04	0.61 ± 0.11	0.85 ± 0.13
B 组	0.21 ± 0.02	0.34 ± 0.05	0.60 ± 0.12	0.83 ± 0.15
C 组	0.20 ± 0.03	0.30 ± 0.07	0.49 ± 0.08*	0.68 ± 0.09*

注: 与 A 组、B 组相比, \*  $P < 0.05$

表 3 过表达 DDIT3 对 HDPCs 相关基因的影响

Table 3 Effect of DDIT3 overexpression on HDPCs related genes  $\bar{x} \pm s$

组别	ALP	RUNX2	OSX	DSPP	DMP1	OCN	
A 组	7 d	7.62 ± 0.19	4.05 ± 0.21	3.31 ± 0.19	3.21 ± 0.29	3.05 ± 0.22	1.05 ± 0.13
	14 d	8.21 ± 0.43	5.08 ± 0.29	5.25 ± 0.24	5.15 ± 0.21	4.09 ± 0.43	2.23 ± 0.14
B 组	7 d	7.92 ± 0.23	4.01 ± 0.26	3.34 ± 0.21	3.24 ± 0.23	3.00 ± 0.16	1.12 ± 0.15
	14 d	8.20 ± 0.33	5.12 ± 0.35	5.31 ± 0.29	5.31 ± 0.32	4.08 ± 0.35	2.03 ± 0.13
C 组	7 d	8.05 ± 0.31	4.21 ± 0.31	3.42 ± 0.29	3.32 ± 0.19	3.29 ± 0.23	1.17 ± 0.22
	14 d	8.25 ± 0.35	5.19 ± 0.33	11.49 ± 0.62*	11.89 ± 0.32*	9.96 ± 0.35*	3.98 ± 0.56*

注: 与 A 组、B 组相比, \*  $P < 0.05$

## 3 讨论

DDIT3 广泛存在于许多组织的细胞中, 如骨、软骨、心脏和肌肉等<sup>[4]</sup>。有研究表明, 在非刺激状态下, DDIT3 主要存在于细胞质, 然而, 随着内质网应激, 可导致其表达的升高和核聚集<sup>[5]</sup>。本文同样发现, 在  $TNF\alpha$  刺激下, 可观察到 DDIT3 mRNA 和相关炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达水平的升高, 同时免疫荧光检测可看到轻微的核转移。 $TNF\alpha$  可激活未折叠蛋白反应并通过激活肿瘤坏死因子受体 1 引起

2.2 DDIT3 过表达对 HDPCs 成骨/成牙本质分化的影响 如表 3 qRT-PCR 结果表明, DDIT3 过表达对 ALP 和 RUNX2 mRNA 表达水平无明显影响; 在 HDPCs 成骨/成牙本质分化第 14 天, 过表达 DDIT3 可明显增加矿化相关基因 OSX、DSPP、DMP1 和 OCN mRNA 表达水平( $P < 0.05$ )。如图 1 ALP 染色结果表明, 3 组细胞在成骨/成牙本质分化第 7 天, 均可见明显的 ALP 染色阳性细胞; 与对照组相比, C 组 ALP 染色面积无明显改变。然而, 在成骨/成牙本质分化第 14 天, 茜素红染色和 von-Kossa 染色结果表明, 过表达 DDIT3 可明显增加钙沉积。

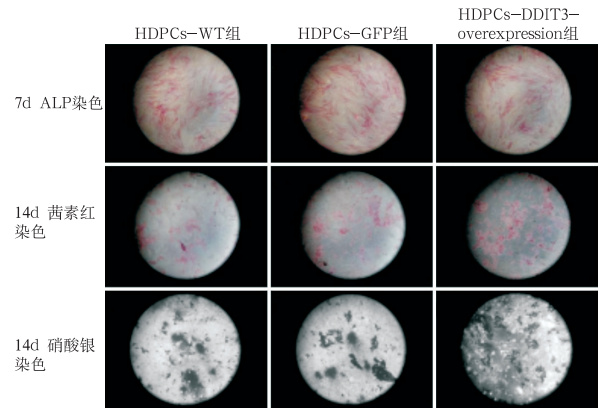


图 1 DDIT3 过表达促进了 HDPCs 成牙本质分化

Fig. 1 Overexpression of DDIT3 contributes to the odontoblastic differentiation of HDPCs.

内质网应激<sup>[6]</sup>。因此,  $TNF\alpha$  可能通过引起 HDPCs 内质网应激而促进了 DDIT3 的表达和核转移。

由于 DDIT3 在炎症反应中作用明确, 且在成骨分化的调控中起作用, 因此推测 DDIT3 可能也作为联系促炎刺激和 HDPCs 成牙本质分化的因子。为验证这一假设, 本文首先用慢病毒载体过表达 HDPCs 中的 DDIT3, 并检测了成牙本质分化的相关基因。发现早期矿化相关基因<sup>[7,8]</sup>, 包括 ALP 和 RUNX2, 与对照组相比并没有明显改变。然而, 晚

期成牙本质分化相关基因<sup>[9]</sup>, DSPP、DMP1 和 OCN, 在过表达组分化第 14 天, mRNA 表达却明显升高。以上结果提示, DDIT3 可能主要在晚期成牙本质分化阶段起作用。已有研究表明, TNF $\alpha$  可促进 HDPCs 矿化和相关基因 DSPP, DMP1 和 OCN 的表达升高<sup>[10]</sup>。因此, 可以推测, TNF $\alpha$  可能部分通过 DDIT3 促进了 HDPCs 的成牙本质分化。

DDIT3 在成骨分化中的作用复杂甚至是相反的。在多潜能间充质分化细胞系 ST-2 中, DDIT3 可通过与其它 C/EBP 家族成员形成异构体, 同时活化 Smad 和 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路而促进其成骨分化<sup>[11]</sup>。如前所说, HDPCs 也是一种具有自我更新和多向分化潜能的细胞系, 且定向的细胞分化需要多种细胞内外信号的调控, 如 Wnt、Notch、BMP 等<sup>[12,13]</sup>。在牙齿间充质细胞中条件性敲除  $\beta$ -catenin 的小鼠表现出缺失的磨牙牙根和纤细的切牙, 这表示 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在成牙本质分化中发挥着重要的作用<sup>[14]</sup>。因此推测, DDIT3 在 HDPCs 中扮演的角色与 ST-2 细胞系相似, 一方面可能通过直接激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路促进了成牙本质分化, 另一方面, 过表达的 DDIT3 也通过与其它 C/EBP 家族成员的结合抑制了 HDPCs 的成脂分化能力, 间接促进了其成牙本质分化。

综上所述, 本文研究首次证实了脂质代谢相关基因 DDIT3 存在于 HDPCs 中且可能调控 HDPCs 晚期的成骨/成牙本质分化, DDIT3 有望为后期调控 HDPCs 的成骨/成牙本质分化提供新的方向。

## 参考文献

- [1] 余淼, 吴燕茹, 韩雨亭, 等. Ddit3 在小鼠下颌第一磨牙牙胚不同时期的表达研究[J]. 口腔医学研究, 2016, 32(4): 331-334
- [2] Pereira RC, Stadmeier L, Marciniak SJ, et al. C/EBP homologous protein is necessary for normal osteoblastic function [J]. J Cell Biochem, 2006, 97(3): 633-640
- [3] Shirakawa K, Maeda S, Gotoh T, et al. CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) regulates osteoblast differentiation [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(16): 6105-6116
- [4] Shirakawa K, Maeda S, Gotoh T, et al. CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) regulates osteoblast differentiation [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(16): 6105-6116
- [5] Ghosh AP, Klocke BJ, Ballestas ME, et al. CHOP potentially co-operates with FOXO3a in neuronal cells to regulate PUMA and BIM expression in response to ER stress [J]. PLoS One, 2012, 7(6): e39586
- [6] Paula-Silva FW, Ghosh A, Silva LA, et al. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells [J]. J Dent Res, 2009, 88(4): 339-344
- [7] 郭晓睿, 关卿, 杨倩娟, 等. MTA 诱导牙髓细胞矿化中 Notch 信号相关基因的表达 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2017, 27(4): 189-192, 241
- [8] 彭伟, 秦媛, 李坤河, 等. 雌激素对体外骨髓间充质干细胞成骨及成纤维相关基因的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(33): 4869-4875
- [9] Wang Y, Zheng Y, Wang Z, et al. 10 m 17beta-oestradiol enhances odonto/osteogenic potency of human dental pulp stem cells by activation of the NF-kappaB pathway [J]. Cell Prolif, 2013, 46(6): 677-684
- [10] Paula-Silva FW, Ghosh A, Silva LA, et al. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells [J]. J Dent Res, 2009, 88(4): 339-344
- [11] Miao Yu, Si-Qi Yi, Yan-Ru Wu, et al. Ddit3 suppresses the differentiation of mouse chondroprogenitor cells [J]. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2016, 81(Pt A): 156-163
- [12] Bluteau G, Luder HU, De Bari C, et al. Stem cells for tooth engineering. Eur Cell Mater, 2008, 16: 1-9
- [13] Cai X, Gong P, Huang Y, et al. Notch signalling pathway in tooth development and adult dental cells [J]. Cell Prolif, 2011, 44(6): 495-507
- [14] Kim TH, Bae CH, Lee JC, et al. beta-catenin is required in odontoblasts for tooth root formation [J]. J Dent Res, 2013, 92(3): 215-221

[收稿日期: 2017-08-15]

(本文编辑 汪喻忠)