

人牙髓干细胞成骨分化前后相关基因的表达分析

林文珍 高丽 牛晨光 胡戌琛 苑克勇 马瑞 黄正蔚*

(上海交通大学医学院附属第九人民医院牙体牙髓病科;

上海市口腔医学重点实验室/上海市口腔医学研究所, 国家口腔疾病临床研究中心 上海 200011)

[摘要] 目的:分析人牙髓干细胞(hDPSCs)成骨诱导后相关基因的表达变化。方法:使用改良组织块法体外培养 hDPSCs 并检测其多向分化能力。hDPSCs 成骨诱导后对其进行基因表达谱芯片技术和实时荧光定量 PCR 分析相关基因的表达情况。结果:hDPSCs 能够进行成骨细胞和脂肪细胞分化。基因表达谱芯片技术分析得出 hDPSCs 在成骨诱导前后有 1284 个基因上调或下调 2 倍以上。其中,骨调节蛋白(osteomodulin, OMD)基因转录上调约 50 倍。实时荧光定量 PCR 显示 OMD 基因在成骨诱导过程中转录呈逐渐增加趋势。结论:hDPSCs 成骨分化涉及多个基因调控。OMD 基因也参与其中,其表达变化具有时间规律性,与成骨过程呈正相关。

[关键词] 人牙髓干细胞 成骨分化 骨调节蛋白

[文献标志码] A **[文章编号]** 1671—7651(2018)04—0375—05

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.04.010

Gene Expression of Human Dental Pulp Stem Cells during Osteogenic Differentiation. LIN Wen-zhen, GAOLi, NIU Chen-guang, HU Xu-chen, YUAN Ke-yong, MA Rui, HUANG Zheng-wei*. Department of Endodontics, Ninth People's Hospital, Shanghai JiaoTong University School of Medicine; Shanghai Key Laboratory of Stomatology & Shanghai Research Institute of Stomatology, National Clinical Research Center of Stomatology, Shanghai 200011, China.

[Abstract] **Objective:** To evaluate the differences in gene expression of human dental pulp stem cells (hDPSCs) after osteogenetic induction. **Methods:** hDPSCs were cultured by explant method and the capability of multi-differentiation in hDPSCs was identified. The gene expressions were evaluated by microarray assay and quantitative real-time PCR after osteogenetic induction. **Results:** hDPSCs could differentiate into osteoblasts and adipocytes. The microarray assay revealed that the expression of 1284 genes were upregulated or downregulated more than twice after osteogenetic induction. Of these, the transcription of osteomodulin (OMD) gene was upregulated by fifty times. The results of qPCR indicated that the expression of OMD was gradually increased during osteogenetic induction. **Conclusion:** The osteogenetic differentiation of hDPSCs is regulated by multiple genes. OMD is one of these genes, and its expression is time-dependent and coincides with osteogenesis.

[Key words] Human dental pulp stem cells Osteogenetic differentiation Osteomodulin

由神经嵴发育而来的牙齿和牙周组织含有多种口腔干细胞(oral stem cells)^[1],例如牙乳头干细胞、牙周韧带干细胞等。人体牙髓组织中含有间充质来源的牙髓干细胞(human dental pulp stem cells, hDPSCs),由 Gronthos 等人于 2000 年首次发现并命名,跟骨髓间充质干细胞相比,它具有更高的细胞增殖能力和克隆形成能力^[2],有望成为组织工

程修复骨组织缺损的种子细胞之一。

基因芯片技术作为一种快速、敏感、高通量的检测手段,广泛地被应用于功能基因组、疾病基因组和系统生物学等领域。将预先设计好的寡核苷酸或 cDNA 在支持物上密集排列形成点阵,再进行核酸杂交检测和计算机数据分析,即可在一次实验中获得大量的生物信息^[3]。

本研究采用 Affymetrix 表达谱芯片技术,检测 hDPSCs 成骨诱导过程中相关基因的变化,筛选出表达明显增高和降低的基因,希望对后续研究成骨调控和骨再生机制提供支持,为 hDPSCs 更好地应用于骨缺损修复提供依据。

基金项目 国家自然科学基金(编号:81570964)

上海市教育委员会高峰高原学科建设计划

作者简介 林文珍(1991~),女,浙江温州人,硕士在读,主要从事牙髓干细胞相关的研究。

* 通讯作者 黄正蔚, E-mail: huangzhengwei@shsmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 主要试剂 DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清、青霉素、链霉素 (Gibco, 美国); GeneChip Scanner 3000 7G 扫描仪 (Thermo, 美国); Trizol 总 RNA 提取试剂 (Invitrogen, 美国); NucleoSpin miRNA 试剂盒 (Macherey - Nagel, 德国); Affymetrix Primeview Array 芯片 (Affymetrix, 美国); PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 逆转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq PCR 试剂盒 (Takara, 日本); ABI 7500 Real Time PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国)。

1.2 hDPSCs 的分离和培养 经患者知情同意后, 选取 18~20 岁患者因正畸需要而拔除的完整、健康的第三恒磨牙。在超净台中, 取出牙髓, 去除根尖 1/3 牙髓, 用 PBS 浸洗 3 次以上, 剪碎至 0.5~1 mm³/块, 将其均匀接种于 10 cm 培养皿中, 向培养皿中加入 10 mL 完全培养基 (含 15% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素), 置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养, 平均每 3 d 换液。待原代细胞长至 80% 汇合状态时, 按 1:2 传代备用, 实验所用 hDPSCs 为第 2~3 代。

1.3 人牙髓干细胞鉴定

1.3.1 成骨诱导 将 hDPSCs 制成细胞悬液, 以 2×10⁵ 个细胞/孔的密度接种到 6 孔板中。实验组细胞次日换成骨诱导液 (完全培养基中含 0.1 μmol/L 地塞米松、50 μmol/L 维生素 C、10 mmol/L β-甘油磷酸钠) 培养。对照组细胞仅用完全培养基培养。培养 3 周后, 吸弃培养液, PBS 清洗, 4% 多聚甲醛固定 15 min 后, PBS 清洗 2 次, 每孔加入 40 mmol/L 的茜素红染色液, 室温孵育 20 min 后, PBS 清洗 4 次, 倒置显微镜下观察钙化结节是否形成。

1.3.2 成脂诱导 待 hDPSCs 生长汇合至 100% 时, 实验组细胞换成脂诱导液 A 液 (完全培养基中含 10 mg/L 胰岛素、0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、0.2 mmol/L 吡啶美锌、1×10⁻⁶ mol/L 地塞米松) 培养; 2 d 后换成脂诱导液 B 液 (完全培养基中含 10 mg/L 胰岛素), 1 d 后换成脂诱导液 A 液, 如此循环重复 3~5 个周期。对照组细胞仅用完全培养基培养。诱导完成后, 吸弃培养基, PBS 清洗, 4% 多聚甲醛固定 15 min 后, PBS 清洗 2 次, 每孔加 1 mL 油红 O 染色 1 h, 用 70% 乙醇漂洗 3 次后显微镜下观察细胞。

1.4 基因表达谱芯片分析 取第 2 代成骨诱导前

和成骨诱导 21 d 后的 hDPSCs, 使用 Trizol 提取两组细胞总 RNA, 用 NucleoSpin 试剂盒纯化 RNA。取 500 ng RNA 进行 cDNA 合成和分段后, 将样品和 Affymetrix 芯片 45 °C 温箱中杂交处理 16~18 h。漂洗基因芯片并染色后, 将芯片置于 GeneChip 扫描仪上扫描。使用 Robust Multichip Analysis (RMA) 算法进行背景校正和标准化处理, 将信号值转化为 log₂ RMA 信号强度后进行统计学分析。

1.5 实时荧光定量 PCR 收集第 2 代分别经完全培养基和成骨诱导培养基处理 0、7、14、21 d 的细胞, 用 Trizol 裂解细胞并提纯获得总 mRNA。使用 PrimeScript 逆转录试剂盒获得 cDNA。采用 SYBR 反应体系, 在 ABI 7500 Real Time PCR 仪上进行反应。反应条件为: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 扩增 30 s, 共 40 个循环。实验所用引物如表 1 所示。采用 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因的相对表达量。

表 1 qPCR 引物序列

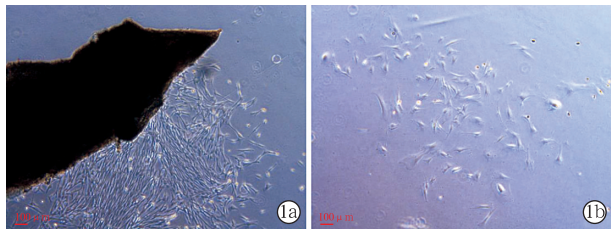
Table 1 Primer sequences of qPCR

基因	引物序列 (5'→3')
ALP	正义链 5'-CCTTGTAGCCAGGCCCATTTG-3' 反义链 5'-GGACCATTCCCACGTCTTCAC-3'
OMD	正义链 5'-AGGCTGTGTTCAGTGAATGCT-3' 反义链 5'-GTTGCTGAATGTGCATCGGA-3'
β-actin	正义链 5'-TGGCACCAGCACAAATGAA-3' 反义链 5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism 6.0 软件处理数据, 相关结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对照组与实验组数据间均数比较采用配对设计样本的 *t* 检验, 设 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。基因芯片标准化处理后的数据采用 Moderated *t*-test 进行统计学分析, 差异表达基因的筛选标准为: 与对照组相比, 实验组基因表达的变化倍数 (Fold Change) > 2 或 < 0.5, 且 *P* < 0.05。

2 结果

2.1 hDPSCs 生长情况及形态学观察 采用改良组织块法培养 hDPSCs, 培养 3~5 d 时组织块周围陆续有细胞游出, 10~14 d 时组织块周围可形成细胞簇, 见图 1a; 14~21 d 时大量细胞聚集在组织块周围呈漩涡状排列离组织块较远的区域可见单克隆形成, 见图 1b。传代后在倒置相差显微镜下可见细胞多呈长梭形, 也可呈星形、纺锤形, 胞质均匀, 胞核圆。细胞状态良好, 增殖速度较快, 呈漩涡状排列。



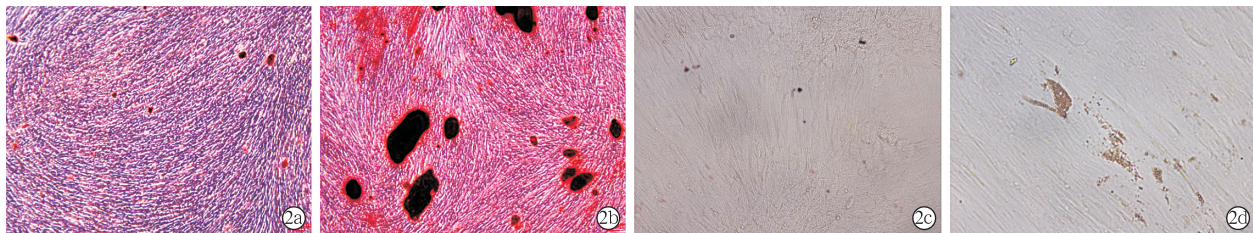
1a:改良组织块法培养 10 d 后细胞密集生长;1b:原代牙髓细胞具有单克隆形成能力

图 1 hDPSCs 原代培养

Fig. 1 Characterization of primary hDPSCs.

2.2 成骨和成脂诱导结果 经完全培养基培养 21 d 的细胞未见矿化结节的产生,见图 2a。经成骨诱导 21 d 后,hDPSCs 呈复层生长,茜素红染色呈阳性,可见大量红色矿化结节形成,见图 2b。对照组细胞没有形成明显脂滴,见图 2c;而成脂诱导液处理组细胞在 7 d 后,可见细胞形态较培养初期细胞变得更为饱满,诱导 14 d 后油红 O 染色阳性,可见细胞胞质内有大量脂滴,见图 2d。

2.3 基因表达谱芯片检测结果 参考 Nakamura 等^[4]的基因表达谱研究,将基因表达水平改变 2 倍或 2 倍以上作为筛选指标。芯片结果显示,和非诱导细胞相比,hDPSCs 在诱导后上调或下调倍数大于 2 的基因有 1284 个。根据不同基因表达趋势的不同,层次聚类分析将表达趋势一致的基因聚类在



2a,2c:成骨和成脂对照组;2b:hDPSCs 具有成骨分化能力,茜素红染色可见形成的钙结节;2d:hDPSCs 在成脂诱导 15 d 后油红 O 染色可见脂滴(×400)

图 2 hDPSCs 成骨成脂分化能力

Fig. 2 The osteogenic and adipogenic differentiation capability of hDPSCs.

表 2 hDPSCs 成骨诱导基因表达谱芯片部分结果

Table 2 Partial results of microarray assay with regard to the genes expressed in hDPSCs during osteogenic induction

基因 ID	基因简称	基因名称	比率/%
1734	DIO2	deiodinase, iodothyronine, type II	93.71
4958	OMD	osteomodulin	58.17
347	APOD	apolipoprotein D	41.38
1831	TSC22D3	TSC22 domain family, member 3	36.67
1281	COL3A1	collagen, type III, alpha 1	18.18
3485	IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2	18.11
50964	SOST	sclerostin	6.96
153830	RNF145	ring finger protein 145	0.44
3084	NRG1	neuregulin 1	0.11

一起,层次聚类纵线的长短表示基因变化趋势的一致性,纵线越短,表示基因表达的一致性越高,见图 3。hDPSCs 成骨诱导后,表达上调 2 倍的基因有 691 个,表达下调 2 倍的基因有 593 个。部分基因如表 2 所示,其中 OMD 基因上调 58 倍,见表 2。

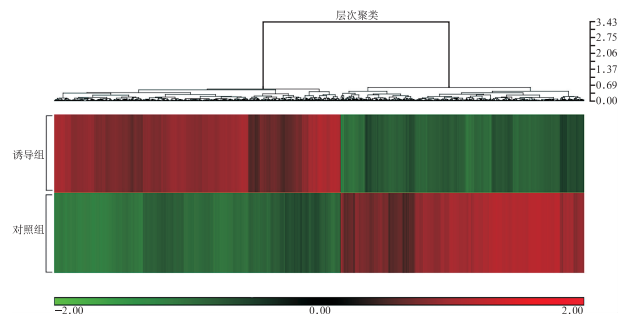


图 3 差异表达基因的聚类图。横坐标代表不同的基因,纵坐标代表不同的样品;方块的颜色和深浅表示某个样品中某个基因的相对表达量

Fig. 3 The cluster graph of differentially expressed genes.

2.4 qPCR 验证差异基因表达 回顾文献并结合芯片检测结果,将 OMD 基因和 ALP 基因作为 qPCR 的目的基因。结果显示,在体外成骨诱导过程中,ALP 基因的表达随着诱导时间的增加而增加,和第 0 天相比,第 7 天增加倍数约达 20 倍;OMD 基因的表达也随着时间的推移而增加,在同一时间段,经诱导的细胞基因表达增加的幅度更大;

并且,和诱导前细胞相比,诱导 21 d 的 hDPSCs OMD 基因的表达倍数约在 35 倍,和基因芯片趋势基本一致,见图 4。

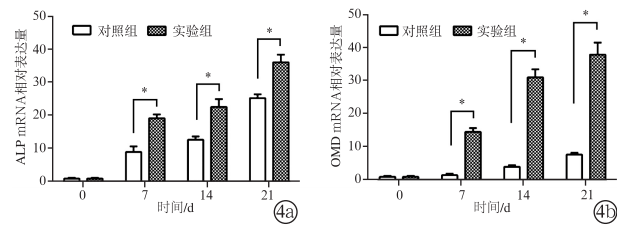


图 4 qPCR 分析 ALP(4a) 和 OMD(4b) 基因在成骨诱导时的表达趋势(与对照组比较, * $P < 0.05$)

Fig. 4 qPCR analysis of the expression of relative genes during osteogenic induction. (* $P < 0.05$, compared with the control group)

3 讨论

hDPSCs 是牙髓组织中的间充质干细胞,因其取材方便,医学伦理压力小,是口腔医学研究领域中重要的组织干细胞之一。前期实验表明在免疫磁珠筛选后,间充质干细胞的标志物 STRO-1 阳性的细胞随着细胞的代数增加而降低^[5]。因此为了避免细胞反复传代老化,本实验使用前三代的 hDPSCs,由于 hDPSCs 无特异性标志物,所以确定 hDPSCs 还需要从其分化功能上鉴定。通过对 hDPSCs 进行诱导培养,hDPSCs 能形成钙结节和脂滴,说明其具有成骨分化和成脂分化能力。有实验表明,hDPSCs 还能进行成软骨细胞和神经细胞分化,具有干细胞的多向分化的能力^[6]。

在体外,hDPSCs 能向成骨样组织分化的能力是其用于修复骨缺损的实验基础。而成骨成牙本质过程受到基因表达的精确调控^[7]。近期的研究发现,干细胞向成骨细胞分化的过程涉及了多种信号通路的调控,如 Wnt 信号通路,转化生长因子(TGF)- β 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路、BMP-2/Smads/Runx2 信号通路、Notch 信号通路等^[8]。本研究通过对基因芯片的 KEGG 信号通路的注释,发现所涉及的通路包括 MAPK 信号通路,ECM 受体相互作用通路等。

基因芯片能实现生物信息的规模化、微量化和并行化的检测分析,是基因序列和表达分析的有力工具。为了进一步明确 hDPSCs 在成骨诱导过程中起着调节作用的基因,本研究使用基因表达谱芯片技术以检测基因表达水平的变化。发现牙髓干细胞在诱导前后上调或下调变化 2 倍以上的基因有 1284 个。Liu 等^[9]使用基因芯片技术分析了用牙本质提取物和矿化液作用于 hDPSC 21 d 后相关基因

的表达情况,其中有 21 个细胞外基质相关基因以及 8 个 TGF- β 相关基因。

为了验证其中一个高表达的 OMD 基因,本研究采用 qPCR 实验将 OMD 与碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)基因的表达趋势做作对比。ALP 是成骨细胞分化的标志之一,如果 ALP 活性越高,则细胞成骨分化越明显^[10]。在本实验中,hDPSC 成骨诱导 7 d 后,ALP mRNA 水平显著增高,说明 hDPSC 有较强的成骨分化能力。OMD 是一种介导细胞黏附的硫酸角质素蛋白聚糖,属于细胞外基质的富亮氨酸蛋白家族^[11]。Ninomiya 等^[12]对小鼠胫骨进行免疫荧光染色,发现在成骨细胞中能检测到 OMD 蛋白,同时也伴随着 ALP,OPN,OCN 表达。在 hDPSC 成骨诱导 21 d 后,和诱导前相比,OMD 基因表达倍数达 35 倍左右,虽略低于基因芯片结果,但基本能提示 OMD 在 hDPSC 成骨诱导过程中起某种作用。此外,有研究发现 OMD 能减少胶原纤维直径和改变胶原纤维的形状^[13]。目前研究发现 OMD 表达的调节涉及 TGF- β 1 信号通路,其中 BMP-2 能上调 OMD 而抑制成骨细胞晚期分化和矿化的 TGF- β 1 能减少 OMD 的表达^[14]。

上述实验结果证实,hDPSCs 能向成骨细胞分化并且能够形成矿化基质。基因表达谱芯片结果显示的差异表达基因可能在上述过程中发挥重要作用。在以后的研究中,可以从这些筛选出的基因入手,在信号通路中选择感兴趣的分子作为研究靶点,从而有助于了解 hDPSCs 成骨分化涉及的调控网络。

参考文献

- [1] Diomedea F, Rajan TS, Gatta V, et al. Stemness maintenance properties in human oral stem cells after long-term passage [J]. Stem Cells Int, 2017, 2017: 5651287
- [2] Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(25): 13625-13630
- [3] Xia XL, Brophy S, Zhou SM. Learning differentially expressed gene pairs in microarray data [J]. Stud Health Technol Inform, 2017, 235: 191-195
- [4] Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, et al. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp [J]. J Endod, 2009, 35(11): 1536-1542
- [5] 高丽,江文欣,牛晨光,等. 干细胞表面标志物在牙髓干细胞中的表达[J]. 上海口腔医学,2015,24(3): 257-262

- [6] Struys T, Moreels M, Martens W, et al. Ultrastructural and immunocytochemical analysis of multilineage differentiated human dental pulp- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells [J]. *Cells Tissues Organs*, 2011, 193(6) : 366-378
- [7] 刘金凤,牛雪微,超博,等. 牙髓再生的研究现状[J]. *口腔医学研究*, 2017, 33(1) : 108-111
- [8] Augello A, De Bari C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(10) : 1226-2238
- [9] Liu J, Jin T, Chang S, et al. Matrix and TGF- β -related gene expression during human dental pulp stem cell (DPSC) mineralization [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2007, 43(3/4) : 120-128
- [10] Datta P, Ghosh P, Ghosh K, et al. *in vitro* ALP and osteocalcin gene expression analysis and *in vivo* biocompatibility of N-methylene phosphonic chitosan nanofibers for bone regeneration [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2013, 9(5) : 870-879
- [11] Sommarin Y, Wendel M, Shen Z, et al. Osteoadherin, a cell-binding keratan sulfate proteoglycan in bone, belongs to the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(27) : 16723-16729
- [12] Ninomiya K, Miyamoto T, Imai J, et al. Osteoclastic activity induces osteomodulin expression in osteoblasts [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362(2) : 460-466
- [13] Tashima T, Nagatoishi S, Sagara H, et al. Osteomodulin regulates diameter and alters shape of collagen fibrils [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(3) : 292-296
- [14] Rehn AP, Chalk AM, Wendel M. Differential regulation of osteoadherin (OSAD) by TGF- β 1 and BMP-2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 349(3) : 1057-1064
- [收稿日期:2017-09-23] (本文编辑 汪喻忠)

武汉大学口腔医院选派出国博士后在唇腭裂致病基因功能性研究取得新进展 揭示唇腭裂基因突变致病分子机制

武汉大学口腔医院选派到美国爱荷华大学(University of Iowa)的博士后刘欢医师对唇腭裂 GWAS 研究功能性解析取得进展,成果以“Identification of common non-coding variants at 1p22 that are functional for non-syndromic orofacial clefting”(《非综合征型唇腭裂位于人类染色体 1p22 区段功能性致病常见突变鉴定》)为题,于 2017 年 3 月 13 日在 *Nature Communications*(自然通讯)杂志在线发表。这是我院研究人员继边专教授团队于上月在 *Nature Communications*(自然通讯)发表“Genome-wide analyses of non-syndromic cleft lip with palate identify fourteen novel loci and genetic heterogeneity”(《非综合征型唇腭裂全基因组关联分析发现了 14 个新的易感位点和遗传异质性》)之后,在唇腭裂研究领域取得的又一重要进展。

唇腭裂是人类最常见的胚胎发育缺损之一,在全世界范围内有非常高的发病率。该疾病对患儿及其家庭带来不同程度上的生理和心理上的影响。遗传病学和流行病学研究显示,一部分唇腭裂的发病与患儿的遗传背景有关,而不同遗传背景的唇腭裂患儿手术预后也有差别。因此,唇腭裂的精准遗传诊断对个性化的产前干预防控和患儿的综合序列治疗起到指导作用。全基因组关联分析(Genome-Wide Association Study, GWAS)能够有效的确认与唇腭裂相关的致病基因位点,而从生物学功能上验证这些“相关”致病位点,是推动遗传研究向临床精准诊断转化不可或缺的环节。刘欢医师利用功能基因组学注释、转基因动物模型以及基因编辑手段,以唇腭裂 GWAS 所报道的亚洲人群最常见的易感基因位点 1p22 为例,从十多个“相关”致病位点中确定了 3 个生物学功能致病的基因突变。该研究不仅精准的确认了唇腭裂 1p22 区段的功能致病突变,更提出了广泛适用于遗传病 GWAS 结果功能研究体系,推动了遗传病学研究向临床诊断的转化。刘欢医师于 2014 年受我院资助前往美国爱荷华大学 Jeffrey Murray 教授(现任职于比尔及梅琳达·盖茨基金会)项目组进行博士后研究。在导师指导下,对非综合征型唇腭裂和非综合征型唇腭裂遗传病学结果进行系统化的功能精细解读。三年博士后期间在《*Human Molecular Genetics*》《*American Journal of Human Genetics*》等期刊发表论文 6 篇。