

碱性成纤维细胞生长因子通过激活 Wnt/ β -Catenin 信号通路促进根尖牙乳头干细胞的增殖

https://doi.org/10.12307/2022.332

付乙¹, 张羽¹, 何梅², 车彦霖³, 梁静², 吴家媛²

投稿日期: 2020-12-04

送审日期: 2020-12-11

采用日期: 2021-05-21

修回日期: 2021-08-07

在线日期: 2021-09-13

中图分类号:

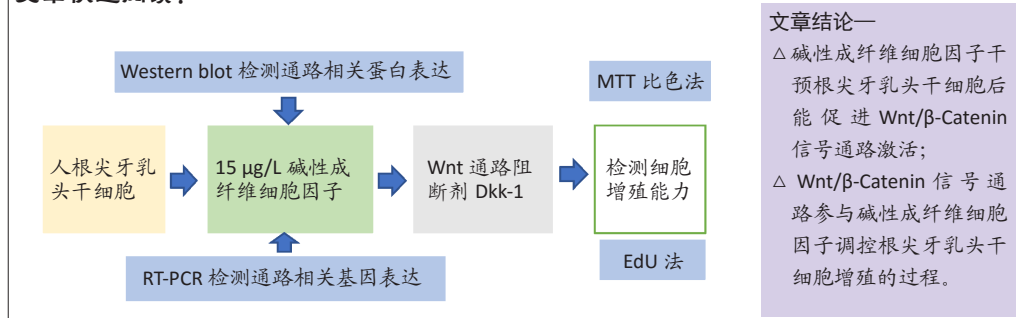
R459.9; R318; R781

文章编号:

2095-4344(2022)13-02050-06

文献标识码: A

文章快速阅读:



文题释义:

根尖牙乳头干细胞: 一种牙源性干细胞, 相比其他的牙源性干细胞, 具有更强的再生、增殖能力。根尖牙乳头干细胞的生物学性能受诸多外源性因素影响, 如碱性成纤维细胞生长因子等。

Wnt通路: 是由配体蛋白质Wnt和膜蛋白受体结合激发的一组下游通道信号转导途径。通过使细胞表面受体活化, 将细胞外信号传递到细胞内。Wnt/ β -Catenin信号通路在细胞增殖、细胞命运决定和分化中发挥着作用。

摘要

背景: 碱性成纤维细胞因子作用于成纤维细胞时, 可以通过激活Wnt信号诱导其增殖, 但在其作用于根尖牙乳头干细胞的研究中, 是否也可以激活Wnt/ β -Catenin信号通路, 以及激活该通路后对根尖牙乳头干细胞的生物学活动有何影响尚不清楚。

目的: 探讨碱性成纤维细胞因子对根尖牙乳头干细胞增殖的调控作用。

方法: 通过酶消化法和有限稀释法克隆化培养人根尖牙乳头干细胞; 以15 μ g/L碱性成纤维细胞因子作用根尖牙乳头干细胞2 d, 采用RT-PCR、Western blot检测 β -Catenin、TCF1、TCF3、LEF1 mRNA与蛋白的表达。然后进一步研究在Wnt/ β -Catenin信号通路抑制的情况下碱性成纤维细胞因子对根尖牙乳头干细胞增殖的影响, 设置碱性成纤维细胞因子(15 μ g/L)+Dkk-1组、碱性成纤维细胞因子(15 μ g/L)组和阴性对照组, 采用MTT比色法和EdU法对比各组根尖牙乳头干细胞增殖情况。

结果与结论: ①15 μ g/L碱性成纤维细胞因子作用后上调了根尖牙乳头干细胞中 β -Catenin、TCF1、TCF3、LEF1 mRNA和蛋白的表达($P < 0.05$); ②碱性成纤维细胞因子(15 μ g/L)组根尖牙乳头干细胞增殖能力强于碱性成纤维细胞因子(15 μ g/L)+Dkk-1组和阴性对照组($P < 0.05$); ③结果表明, 碱性成纤维细胞因子作用根尖牙乳头干细胞后能促进Wnt/ β -Catenin信号通路关键分子 β -Catenin及下游分子TCF1、TCF3、LEF1的表达, Wnt/ β -Catenin信号通路参与碱性成纤维细胞因子调控根尖牙乳头干细胞增殖的过程。

关键词: 干细胞; 根尖牙乳头干细胞; 碱性成纤维细胞因子; Wnt/ β -Catenin; 信号通路; 增殖

缩略语: 碱性成纤维细胞因子: basic fibroblast growth factor, bFGF

Basic fibroblast growth factor promotes the proliferation of stem cells from the apical papilla through activation of Wnt/ β -Catenin signaling pathway

Fu Yi¹, Zhang Yu¹, He Mei², Che Yanlin³, Liang Jing², Wu Jiayuan²

¹Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; ²Stomatological Hospital Affiliated to Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; ³Weihai Stomatological Hospital, Weihai 264200, Shandong Province, China

Fu Yi, Master candidate, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Corresponding author: Wu Jiayuan, MD, Chief physician, Master's supervisor, Stomatological Hospital Affiliated to Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Abstract

BACKGROUND: When basic fibroblast factors act on fibroblasts, they can induce their proliferation by activating Wnt signaling. However, in the study of its effect on apical dental papilla stem cells, whether it can activate the Wnt/ β -Catenin signaling pathway and the effect of activating this pathway on the biological activities of apical dental papilla stem cells remains unclear.

¹遵义医科大学, 贵州省遵义市 563000; ²遵义医科大学附属口腔医院, 贵州省遵义市 563000; ³威海口腔医院, 山东省威海市 264200

第一作者: 付乙, 女, 1995年生, 贵州省铜仁市人, 苗族, 遵义医科大学在读硕士, 主要从事口腔内科方向研究。

通讯作者: 吴家媛, 博士, 主任医师, 研究生导师, 遵义医科大学附属口腔医院, 贵州省遵义市 563000

https://orcid.org/0000-0001-5300-1267(吴家媛)

基金资助: 国家自然科学基金项目(81460102), 项目负责人: 吴家媛; 遵义市优秀青年科技创新人才培养项目(遵优青科[2018]8号), 项目负责人: 吴家媛; 贵州省省长基金(黔省合专字[2012]16), 项目负责人: 吴家媛; 贵州省科技厅项目(黔科合J字LKZ[2013]11号), 项目负责人: 吴家媛

引用本文: 付乙, 张羽, 何梅, 车彦霖, 梁静, 吴家媛. 碱性成纤维细胞生长因子通过激活 Wnt/ β -Catenin 信号通路促进根尖牙乳头干细胞的增殖 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(13):2050-2055.



OBJECTIVE: To investigate the regulatory role of basic fibroblast growth factor on the proliferation of stem cells from apical papilla.

METHODS: Human stem cells from apical papilla were cloned and cultured through enzymatic digestion and limiting dilution assay, and then treated with 15 $\mu\text{g/L}$ basic fibroblast growth factor for 2 days. RT-PCR and western blot assay were used to detect the expression of β -Catenin, TCF1, TCF3, and LEF1 mRNAs and proteins. The effect of basic fibroblast growth factor on the proliferation of stem cells from apical papilla was further studied in the case of Wnt/ β -Catenin signaling pathway inhibition. The basic fibroblast growth factor (15 $\mu\text{g/L}$) + Dkk-1 group, basic fibroblast growth factor (15 $\mu\text{g/L}$) group, and negative control group were set. The proliferation of stem cells from apical papilla in each group was compared by MTT assay and EdU assay.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The expression levels of β -Catenin, TCF1, TCF3, and LEF1 mRNAs and proteins were upregulated by 15 $\mu\text{g/L}$ basic fibroblast growth factor on stem cells from apical papilla ($P < 0.05$). (2) The stem cells from apical papilla of the basic fibroblast growth factor (15 $\mu\text{g/L}$) group showed stronger proliferation activity than that in the negative control group and basic fibroblast growth factor (15 $\mu\text{g/L}$) + Dkk-1 group ($P < 0.05$). (3) Results suggest that basic fibroblast growth factor can promote the expression of key molecules β -Catenin in Wnt/ β -Catenin signaling pathway and downstream molecules TCF1, TCF3, and LEF1. Wnt/ β -Catenin signaling pathway participates in the regulation of basic fibroblast growth factor on the proliferation of stem cells from apical papilla.

Key words: stem cells; stem cells from apical papilla; basic fibroblast growth factor; Wnt/ β -Catenin; signaling pathway; proliferation

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 81460102 (to WJY); the Foundation for Distinguished Young Talents in Technology Innovation of Zunyi, No. [2018]8 (to WJY); Guizhou Provincial Governor Foundation, No. [2012]16 (to WJY); Guizhou Science and Technology Fund, No. J LKZ[2013]11 (to WJY)

How to cite this article: FU Y, ZHANG Y, HE M, CHE YL, LIANG J, WU JY. Basic fibroblast growth factor promotes the proliferation of stem cells from the apical papilla through activation of Wnt/ β -Catenin signaling pathway. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(13):2050-2055.

0 引言 Introduction

牙源性干细胞拥有优越的干细胞生物学特性, 主要表现为较强的增殖和多向分化能力^[1-3]。不同来源的牙源性干细胞增殖能力不同, 根据细胞来源可将其分为: 牙髓干细胞、根尖牙乳头干细胞、牙周膜干细胞等^[4]。与牙髓干细胞及牙周膜干细胞比较, 根尖牙乳头干细胞拥有更强的再生、增殖分化能力^[5-9]。根尖牙乳头干细胞的生物学性能受诸多外源性因素影响: 无机三氧化聚合物、肿瘤坏死因子 α 都可在体外有效促进根尖牙乳头干细胞的增殖, 诱导根尖牙乳头干细胞多向分化^[10-11]。

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)能与转化生长因子协同作用, 结合相关受体, 启动下游信号通路, 促进细胞增殖、分化^[12]。前期研究结果也显示, 15 $\mu\text{g/L}$ bFGF有显著促进根尖牙乳头干细胞增殖的能力, 同时可使长时间培养的根尖牙乳头干细胞维持间充质干细胞的干性^[13-15], 但具体的机制不明确。

近年来大量研究发现, Wnt/ β -Catenin信号通路在牙齿发育过程中发挥着重要作用, 该通路通过影响成牙本质细胞、牙源性间充质细胞增殖、分化和极化, 调控牙齿形态, 包括数量、大小、位置、形状和组织形成^[16-20]。CTNNB1基因编码的 β -连环蛋白(Catenin beta-1, CATENIN-BETA)是Wnt信号通路中的一个重要分子, CATENIN-BETA被激活后进入细胞核内并与LEF/TCF作用, 以激活经典Wnt/ β -Catenin信号通路的方式调控细胞增殖等多项生物学活动, 参与细胞信号转导^[21-22]。研究显示, bFGF作用于成纤维细胞时, 可以通过激活Wnt信号诱导其增殖^[23], 但在bFGF作用于根尖牙乳头干细胞的研究中, 其是否可以激活Wnt/ β -Catenin信号通路, 激活该通路后对根尖牙乳头干细胞的生物学活动有何种影响, 尚不知晓。

此次研究通过检测bFGF作用于根尖牙乳头干细胞后Wnt/ β -Catenin信号通路相关因子表达水平的变化, 以及阻断Wnt/ β -Catenin信号通路后bFGF对根尖牙乳头干细胞的增殖作用是否发生变化, 以此为探讨bFGF对根尖牙乳头干细胞的作用机制提供理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 通过对比bFGF作用下, 阻断Wnt/ β -Catenin信号通路前后的根尖牙乳头干细胞增殖能力, 探究bFGF的作用机制。

1.2 时间及地点 实验于2014年5月至2015年3月在贵州省高等学校口腔疾病研究特色重点实验室及陕西省空军军医大学牙体牙髓病学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验材料 该实验取得遵义医科大学附属口腔医院伦理委员会许可。材料取自该院颌面外科门诊16-22岁因正畸治疗拔除的根尖未成熟的健康第三磨牙(患者及监护人知情同意)。

1.3.2 实验试剂与仪器 胎牛血清、 α -MEM (HyClone, U.S); 小鼠抗人STRO-1单克隆抗体、小鼠抗人CD24多克隆抗体(R & D, U.S); 茜素红S、油红O、Wnt信号通路抑制剂Dkk-1 (Sigma, U.S); 荧光定量PCR试剂盒(TaKaRa, JPN); bFGF(Peprotech, U.S); MTT(Alexis, U.S); 倒置荧光显微镜(OLYMPUS, JPN); 倒置相差显微镜(Leica, GER); EdU细胞增殖成像检测试剂盒(Ribobio, CHA); ECL化学发光底物、PVDF膜(Millipore, U.S); 小鼠抗人CATENIN-BETA单克隆抗体、兔抗人TCF3单克隆抗体、兔抗人LEF1多克隆抗体(Beyotime, CHA); 兔抗人TCF1/TCF7 (C63D9)单克隆抗体(CST, U.S)。

1.4 实验方法

1.4.1 人根尖牙乳头干细胞的分离及克隆纯化培养 以PBS(含100 U/mL青霉素, 100 mg/L链霉素)清洗根尖发育未成熟的健康第三磨牙, 分离根尖牙乳头, 见图1A, 并剪碎置于 α -MEM培养基中, 加入I型胶原酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡消化1 h后终止, 接种于培养皿(35 mm)内, 并加入 α -MEM培养基(含体积分数为15%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素)置于37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数为5%CO₂培养箱, 每两三天换液1次, 细胞融合达80%时, 加入0.25%胰蛋白酶消化处理后收集细胞并统计数量, 以有限稀释法完成相关克隆纯化处理。

1.4.2 细胞免疫荧光技术鉴定根尖牙乳头干细胞表面分子 选取第2代根尖牙乳头干细胞, 制备细胞爬片; 细胞融合达

80% 后以 PBS 洗涤, 40 g/L 多聚甲醛固定, 0.5% TrionX-100 破膜, 山羊血清封闭, 加入一抗 (小鼠抗人 STRO-1; 小鼠抗人 CD24; 兔抗人角蛋白), 二抗 (PE 标记的山羊抗鼠 IgM; FITC 标记的山羊抗鼠 IgG; FITC 标记的山羊抗兔 IgG), DAPI 避光染色 5 min, 添加抗荧光淬灭剂并封固, 激光共聚焦显微镜下观察。

1.4.3 成骨成脂分化能力鉴定 取第 2 代根尖牙乳头干细胞, 以每孔 2.5×10^5 细胞数接种于 6 孔板, 分别以成骨、成脂诱导液连续处理 3 周后进行茜素红染色、油红 O 染色, 采集细胞染色图像。

1.4.4 RT-PCR 检测 CTNNB1、TCF1、TCF3 和 LEF1 基因的表达 取第 2 代根尖牙乳头干细胞, 以每孔 2.5×10^5 细胞数接种于 6 孔板, 设实验组 (15 $\mu\text{g/L}$ bFGF) 与对照组 (0 $\mu\text{g/L}$ bFGF), 干预 2 d 后, 依据细胞总 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA, -80°C 低温保存。借助 PCR 扩增仪, 以反转录反应液进行反转录反应, 检测基因的表达。目的基因引物序列见表 1。RT-PCR 的反应体系为 0.02 mL, 见表 2。

表 1 | 引物基因序列

Table 1 | Primer gene sequences

基因名称	引物序列
CTNNB1	上游引物 5'-CTT ATG GCA ACC AAG AAA GCA-3'
	下游引物 5'-GAG CAG ACA GAT AGC ACC TTC A-3'
TCF1	上游引物 5'-GAA CTG GCC AAG CTG AGG TG-3'
	下游引物 5'-GAG GCT TCT GAG TGT TAG TCC TGT C-3'
TCF3	上游引物 5'-AAC ACA GCT GGC TGG ATG ATT G-3'
	下游引物 5'-ACA GGT CTC TGA ATC CAC CTG AAA G-3'
LEF1	上游引物 5'-TTA TCC AGG CTG GTC TGC AAG AG-3'
	下游引物 5'-GCA GCT GTC ATT CTT GGA CCT GTA-3'
GAPDH	上游引物 5'-GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT-3'
	下游引物 5'-GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG-3'

表 2 | PCR 反应液成分及用量

Table 2 | Component and content of PCR reaction liquid

成分	用量	终浓度
SYBR® Premix Ex Taq II (Til RNase Plus)(2 \times)	10 μL	1 \times
PCR Forward Primer(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8 μL	0.4 $\mu\text{mol/L} \times 1$
PCR Reverse Primer(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8 μL	0.4 $\mu\text{mol/L} \times 1$
ROX Reference Dye II (50 \times)	0.4 μL	1 \times
RT 反应液 (cDNA 溶液)	2 μL	
dH ₂ O (无菌蒸馏水)	6 μL	
总计	20 μL	

1.4.5 Western blot 检测 CATENIN-BETA、TCF1、TCF3、LEF1 蛋白的表达 取第 2 代根尖牙乳头干细胞, 以每孔 2.5×10^5 细胞数接种于 6 孔板, 设实验组 (15 $\mu\text{g/L}$ bFGF) 与对照组 (0 $\mu\text{g/L}$ bFGF), 干预 2 d 后, 以预冷 PBS 清洗 3 遍, 加入 100 μL 含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 12 000 r/min 4°C 离心 10 min, 吸取上清液, 按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书的方法检测各样品蛋白质浓度, 加入超纯水、5 \times Loading buffer 将样品浓度调整至 1 g/L, 95°C 处理 5 min, 行 SDS-PAGE 电泳后将蛋白转印至 PVDF 膜上, TBST 清洗 5 min, 快

速封闭液封闭 20 min, TBST 清洗 3 遍, 每次 10 min, 以 1 : 1 000 配制 CATENIN-BETA、TCF1、TCF3、LEF1 一抗, 4°C 孵育过夜, TBST 清洗 3 遍, 每次 10 min, 以 1 : 2 000 配制对应种属的荧光二抗, 常温孵育 1 h, TBST 清洗 3 遍, 每次 10 min, 以 ECL 化学底物反应液浸泡约 10 s, V3 蛋白电泳成像系统对比 CATENIN-BETA、TCF1、TCF3、LEF1 蛋白的表达水平。

1.4.6 阻断 Wnt 信号通路对 bFGF 调控根尖牙乳头干细胞增殖的影响 取第 2 代根尖牙乳头干细胞, 以每孔 2.5×10^5 细胞数接种于 6 孔板, 将其分为 3 组: ① bFGF(15 $\mu\text{g/L}$)+Dkk-1 组 (10 $\mu\text{g/L}$); ② bFGF(-) 组; ③ bFGF(15 $\mu\text{g/L}$) 组。以 α -MEM 完全培养基培养 24 h 后更换无血清培养基继续培养 24 h, 按分组更换培养基, 继续培养。在接种后第 1, 3, 5, 7 天终止培养, 加入 0.02 mL 的 MTT 溶液 (5 g/L), 培养 4 h, 将原液倒掉, 再加入 0.15 mL 二甲基亚砜, 避光振荡 10 min, 使用酶标仪测定 490 nm 波长处吸光度值。

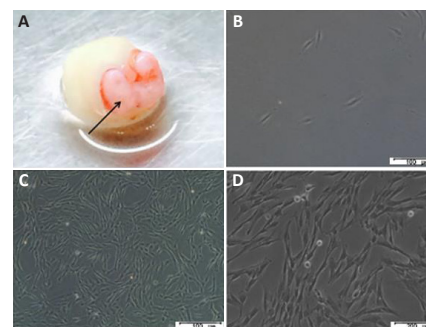
在细胞培养第 4 天, 根据文献 [14] 的方法对根尖牙乳头干细胞进行 EdU 染色, 待反应结束, 荧光显微镜观察。

1.5 主要观察指标 ①根尖牙乳头干细胞的形态; ②根尖牙乳头干细胞的成脂、成骨分化能力; ③根尖牙乳头干细胞在 bFGF 作用下 Wnt/ β -Catenin 信号通路相关因子的表达水平; ④阻断 Wnt 信号通路后 bFGF 对根尖牙乳头干细胞增殖的影响。

1.6 统计学分析 以 GraphPad Prism 8.0.2 软件对数据进行单因素方差分析, 两两比较用 LSD-t 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果 Results

2.1 人根尖牙乳头干细胞的形态 酶消化法得到原代人根尖牙乳头干细胞, 培养 3 d 后发现细胞为旋涡状贴壁生长, 见图 1B, C。以有限稀释法对根尖牙乳头干细胞进行克隆化筛选纯化培养, 3 d 达到 80% 汇合, 见图 1D。



图注: 图 A 为根尖牙乳头 (黑色箭头); B 为原代单个贴壁细胞 ($\times 100$); C 为原代细胞呈集落生长 ($\times 100$); D 为有限稀释法筛选的克隆化根尖牙乳头干细胞 ($\times 200$)

图 1 | 根尖牙乳头干细胞的原代培养

Figure 1 | Primary culture of stem cells from apical papilla

2.2 免疫荧光染色鉴定结果 小鼠抗人波形丝单克隆抗体、小鼠抗人 STRO-1 多克隆抗体、小鼠抗人 CD24 多克隆抗体染色均呈阳性; 兔抗人角蛋白多克隆抗体阴性, 见图 2。

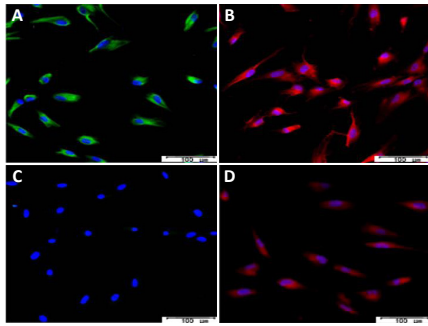


图 2 | 根尖牙乳头干细胞免疫荧光染色 (×100)

Figure 2 | Immunofluorescence staining of stem cells from the apical papilla (×100)

图注: 图 A 为波形丝蛋白细胞荧光染色, DAPI 细胞核染色; B 为 STRO-1 荧光染色, DAPI 细胞核染色; C 为角蛋白细胞荧光染色, DAPI 细胞核染色; D 为 CD24 荧光染色, DAPI 细胞核染色

2.3 成脂、成骨能力鉴定结果 倒置显微镜下观察到细胞胞浆中空泡状的圆形脂滴显示为深红色, 即油红 O 染色显示阳性, 见图 3A; 细胞呈复层紧密分布, 其周围及表面见大量矿化颗粒, 茜素红染色显示为红褐色, 见图 3B。

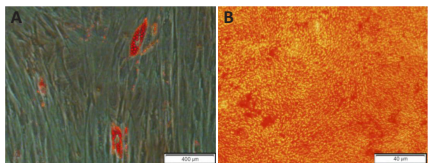
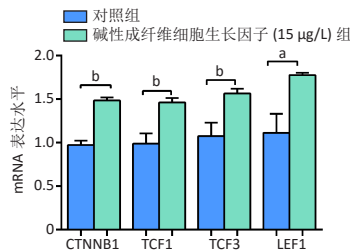


图 3 | 根尖牙乳头干细胞的分化能力

Figure 3 | Differentiation ability of stem cells from the apical papilla

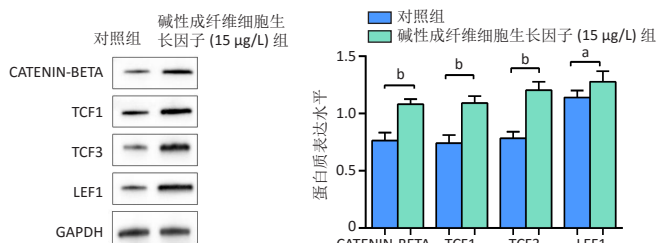
图注: 图 A 为成脂诱导 3 周后油红 O 染色 (×400); B 为成骨诱导 3 周后茜素红染色 (×40)

2.4 CTNNB1、TCF1、TCF3 和 LEF1 基因的表达 bFGF(15 μg/L) 可上调根尖牙乳头干细胞中 CTNNB1、TCF1、TCF3 和 LEF1 基因的表达, 与对照组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 4。



图注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$
图 4 | 各组根尖牙乳头干细胞中 CTNNB1、TCF1、TCF3 及 LEF1 mRNA 表达水平
Figure 4 | mRNA expression levels of CTNNB1, TCF1, TCF3, and LEF1 in stem cells from the apical papilla of each group

2.5 CATENIN-BETA、TCF1、TCF3、LEF1 蛋白表达水平 bFGF (15 μg/L) 可上调根尖牙乳头干细胞中 CATENIN-BETA、TCF1、TCF3 和 LEF1 蛋白的表达, 与对照组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 5。



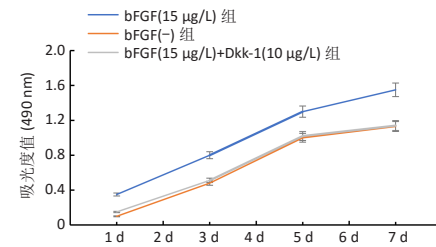
图注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

图 5 | 各组根尖牙乳头干细胞中 CATENIN-BETA、TCF1、TCF3、LEF1 蛋白表达水平

Figure 5 | Protein expression levels of CATENIN-BETA, TCF1, TCF3, and LEF1 in stem cells from the apical papilla of each group

2.6 阻断 Wnt 信号通路后 bFGF 对根尖牙乳头干细胞增殖的影响

2.6.1 MTT 法检测细胞增殖 3 组细胞的生长随时间变化的情况大致相同, 均呈上升趋势。加入阻断剂后, bFGF(15 μg/L)+Dkk-1(10 μg/L) 组的增殖曲线斜率小于 bFGF(15 μg/L) 组。第 1, 3, 5, 7 天, bFGF(15 μg/L)+Dkk-1(10 μg/L) 组的细胞增殖能力均低于 bFGF(15 μg/L) 组 ($P < 0.05$)。bFGF(15 μg/L)+Dkk-1 (10 μg/L) 组与 bFGF(-) 组的细胞生长趋势在第 5 天后趋近一致。经统计得出, 第 1, 3 天, bFGF(15 μg/L)+Dkk-1(10 μg/L) 组的细胞增殖能力高于 bFGF(-) 组 ($P < 0.05$); 第 5, 7 天, 阻断通路后 bFGF 促进细胞增殖的作用减弱 ($P < 0.05$), 见图 6。

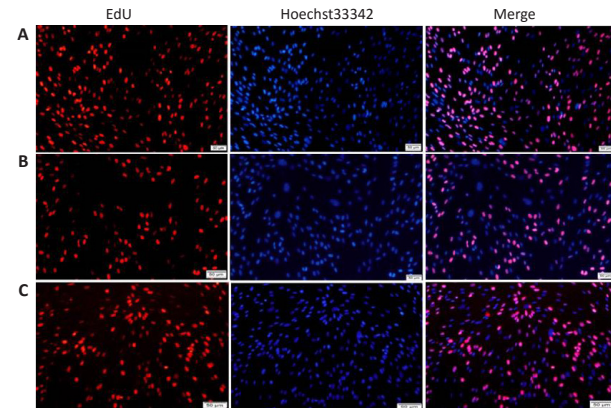


图注: bFGF(15 μg/L) 组细胞增殖能力明显高于另外两组。bFGF: 碱性成纤维细胞生长因子

图 6 | 各组根尖牙乳头干细胞增殖能力的比较

Figure 6 | Comparison of proliferative ability of stem cells from the apical papilla of each group

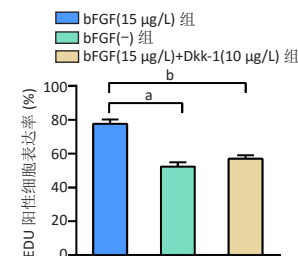
2.6.2 EdU 法检测细胞增殖能力 3 组荧光染色图像见图 7。荧光显微镜下可见 3 组细胞的细胞核呈红色, 取相同放大倍数下的红色细胞核计数, 选用 3 个视野下的细胞核数量计算平均值。如图 8 所示, bFGF(15 μg/L) 组的阳性细胞数量高于 bFGF(-) 组 ($P < 0.05$); bFGF(15 μg/L)+Dkk-1(10 μg/L) 组的阳性细胞数量低于 bFGF(15 μg/L) 组 ($P < 0.05$)。



图注: 图 A 为 bFGF(15 μg/L) 组; B 为 bFGF(-) 组; C 为 bFGF(15 μg/L)+Dkk-1 (10 μg/L) 组。bFGF(15 μg/L) 组的阳性细胞表达率高于另外两组。bFGF: 碱性成纤维细胞生长因子

图 7 | 各组根尖牙乳头干细胞 EdU 荧光染色 (×50)

Figure 7 | EdU fluorescence staining of stem cells from the apical papilla of each group (×50)



图注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.05$ 。bFGF: 碱性成纤维细胞生长因子

图 8 | 各组 EdU 阳性根尖牙乳头干细胞数量比较

Figure 8 | Comparison of the number of EdU-positive cells of stem cells from the apical papilla of each group

3 讨论 Discussion

根尖牙乳头干细胞作为间充质来源的牙源性干细胞，具有间充质干细胞的生物学特征，例如增殖能力强、成骨成脂分化能力等。间充质干细胞最常用的鉴定方法是细胞表面的免疫学表型。STRO-1 为大家熟知的间充质干细胞表面特异标记物，其免疫荧光染色鉴定在根尖牙乳头干细胞中的阳性率高于牙髓干细胞^[24]。虽然牙源性干细胞普遍缺乏特异性标记物，但根尖牙乳头干细胞的特征性表面分子 CD24 不在其他类别的牙源性干细胞中表达^[25]。

β -Catenin 是 Wnt/ β -Catenin 信号通路的诸多信号转导因子中最为关键的一类^[26-27]。研究发现，细胞的增殖活性在 Wnt/ β -Catenin 信号通路被激活后得以增强^[28]。脊椎动物基因组内通常分布着 4 个 TCF/LEF 家族转录基因，分别为 TCF1、LEF1、TCF3 与 TCF4，其中 TCF1 和 LEF1 是 Wnt 信号通路的靶器官，参与 Wnt 信号通路的正反馈调控^[29-33]，而 TCF3 主要作为一种转录抑制因子独立作用于 CATENIN-BETA 结构域。作为核心转导因子的 CATENIN-BETA 是检测 Wnt/ β -Catenin 信号通路是否被激活的指标之一。实验以 bFGF(15 μ g/L) 培养根尖牙乳头干细胞 2 d 后，采用 RT-PCR 及 Western blot 检测根尖牙乳头干细胞中 CATENIN-BETA、TCF1、TCF3、LEF1 基因及蛋白的表达，与对照组相比，bFGF 能够提高上述基因及蛋白的表达，说明 bFGF 作用于根尖牙乳头干细胞后通过表面受体及某种细胞内信号转导途径上调了经典分子 β -Catenin 及通路下游分子的表达，从而激活了 Wnt/ β -Catenin 信号通路，促进根尖牙乳头干细胞增殖。

为了验证这一结果，通过 Dkk-1 阻断 Wnt 信号激活明确 bFGF 对根尖牙乳头干细胞的增殖效能。Dkk-1 是 Wnt/ β -Catenin 信号通路的一类经典阻滞剂。通过介导蛋白酶体 CATENIN-BETA 降解与细胞凋亡，抑制细胞增殖从而阻断通路^[34-37]。徐仑等^[38]研究发现，在常规培养基条件下，Dkk-1 对牙周膜干细胞的增殖没有明显的促进或抑制作用，但加入 bFGF 后牙周膜干细胞的增殖活性大幅减弱，这种现象可能是因添加 bFGF 前 Wnt 信号通路未激活所引起。该实验也观察到类似现象，抑制信号通路后，bFGF 对根尖牙乳头干细胞促细胞增殖活性下降。由此可见，bFGF 通过 Wnt/ β -Catenin 信号通路调控根尖牙乳头干细胞增殖。

现今可通过多种方法来检测细胞生长增殖情况，如 MTT 法、BrdU 法、EdU 法等。相较于 BrdU 法，MTT 法更能客观体现细胞的增殖情况^[39]，而 EdU 检测形成的三唑环，可降低环境干扰，提高检测灵敏度^[40]。

该实验以 MTT 及 EdU 法检测 bFGF 在 Dkk-1 作用下对根尖牙乳头干细胞增殖调控的影响，发现 bFGF(15 μ g/L)+Dkk-1(10 μ g/L) 组的细胞增殖能力低于 bFGF(15 μ g/L) 组 ($P < 0.05$)，说明 bFGF 诱导的 Wnt 信号被 Dkk-1 阻断。EdU 检测显示 bFGF(15 μ g/L) 组的阳性细胞数量高于 bFGF(-) 组 ($P < 0.05$)；bFGF(15 μ g/L)+Dkk-1(10 μ g/L) 组的阳性细胞数低于 bFGF(15 μ g/L) 组 ($P < 0.05$)。该结果与 MTT 检测一致。如此可充

分证实：阻断通路后，bFGF 促进根尖牙乳头干细胞增殖的作用下降，表明 bFGF 是以激活 Wnt/ β -Catenin 信号通路的方式对根尖牙乳头干细胞增殖进行调控。

该实验明确了 bFGF 通过提高 CATENIN-BETA、TCF1、TCF3 和 LEF1 表达的方式激活 Wnt/ β -Catenin 信号通路，调控根尖牙乳头干细胞的增殖。

作者贡献：实验评估、设计及指导为吴家媛，实验实施及资料收集为车彦霖、张羽、何梅、付乙；论文撰写为付乙、梁静、吴家媛。

经费支持：该文章接受了“国家自然科学基金项目(81460102)，遵义市优秀青年科技创新人才培养项目(遵优青科[2018]8号)，贵州省省长基金(黔省专合字[2012]16)及贵州省科技厅项目(黔科合J字LKZ[2013]11号)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：该研究的实施符合遵义医科大学附属口腔医院的相关伦理要求。

知情同意问题：材料取自遵义医科大学口腔附属医院口腔颌面外科门诊 16-22 岁因正畸治疗拔除的根尖未成熟的健康第三磨牙，患者知情同意。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明：文章统计学方法已经通过遵义医科大学统计学专家审核。

文章版权：文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 王恒心, 王思拓, 伍美玲, 等. 牙源性干细胞及牙髓再生的研究进展 [J]. 中国实用口腔科杂志, 2019,12(5):312-316.
- [2] AURREKOETXEA M, IRASTORZA I, GARCÍA-GALLASTEGUI P, et al. Wnt/ β -Catenin Regulates the Activity of Epiprofin/Sp6, SHH, FGF, and BMP to Coordinate the Stages of Odontogenesis. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:25.
- [3] YUN CY, CHOI H, YOU YJ, et al. Requirement of Smad4-mediated signaling in odontoblast differentiation and dentin matrix formation. *Anat Cell Biol.* 2016;49(3):199-205.
- [4] ZHAI Q, DONG Z, WANG W, et al. Dental stem cell and dental tissue regeneration. *Front Med.* 2019;13(2):152-159.
- [5] SONOYAMA W, LIU Y, YAMAZA T, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008;34(2):166-171.
- [6] 马玉, 段子文, 李淑慧, 等. 牙周膜干细胞与根尖乳头干细胞成骨及成牙本质能力比较的实验研究 [J]. 口腔医学, 2018,38(1):5-9.
- [7] 赵璐, 于莉, 袁萍, 等. 根尖乳头干细胞与牙周膜干细胞的生物学行为比较 [J]. 中国组织工程研究, 2016,20(1):113-117.
- [8] 谭小兵, 郭宇, 刘佳, 等. 人牙髓干细胞和根尖乳头干细胞体外分化能力的对比研究 [J]. 重庆医学, 2017,46(5):586-589.

- [9] 李林峰, 李健. 牙源性干细胞在组织工程中的研究与应用 [J]. 临床口腔医学杂志, 2019,35(3):179-183.
- [10] DU J, LU Y, SONG M, et al. Effects of ERK/p38 MAPKs signaling pathways on MTA-mediated osteo/odontogenic differentiation of stem cells from apical papilla: a vitro study. BMC Oral Health. 2020;20(1):S30-S43.
- [11] SCHNEIDER R, HOLLAND GR, CHIEGO D JR, et al. White mineral trioxide aggregate induces migration and proliferation of stem cells from the apical papilla. J Endod. 2014;40(7):931-936.
- [12] 王远铜. bFGF: 碱性成纤维细胞生长因子的研究现状与应用 [J]. 科技创新与应用, 2019(26):165-166.
- [13] WU J, HUANG GT, HE W, et al. Basic fibroblast growth factor enhances stemness of human stem cells from the apical papilla. J Endod. 2012; 38(5):614-622.
- [14] 何梅. Wnt/ β -Catenin 信号通路和 p38 信号通路对 bFGF 维持人根尖牙乳头干细胞干性的影响 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2019.
- [15] 何梅, 吴家媛. Wnt/ β -Catenin 信号通路对牙根发育的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2017,21(28):4556-4562.
- [16] YANG ZH, LIU F. Wnt/ β -catenin signaling for dental regeneration. Regen Dent Implant Ther. 2014;1:3-8.
- [17] WANG B, LI H, LIU Y, et al. Expression patterns of WNT/ β -CATENIN signaling molecules during human tooth development. J Mol Histol. 2014;45(5):487-496.
- [18] YOSHIOKA S, TAKAHASHI Y, ABE M, et al. Activation of the Wnt/ β -catenin pathway and tissue inhibitor of metalloprotease 1 during tertiary dentinogenesis. J Biochem. 2013;153(1):43-50.
- [19] JIN Y, WANG C, CHENG S, et al. MicroRNA control of tooth formation and eruption. Arch Oral Biol. 2017;73:302-310.
- [20] MOON RT, SHAH K. Developmental biology: signalling polarity. Nature. 2002;417(6886):239-240.
- [21] 冯晓宇, 易昆, 贾瑞芝, 等. Wnt/ β -Catenin 信号通路对钟状晚期牙胚成釉器上皮调控的初步研究 [J]. 北京口腔医学, 2020,28(3): 126-130.
- [22] LI Z, XU Z, DUAN C, et al. Role of TCF/LEF Transcription Factors in Bone Development and Osteogenesis. Int J Med Sci. 2018;15(12):1415-1422.
- [23] WANG X, ZHU Y, SUN C, et al. Feedback Activation of Basic Fibroblast Growth Factor Signaling via the Wnt/ β -Catenin Pathway in Skin Fibroblasts. Front Pharmacol. 2017;8:32.
- [24] 黄义彬. 人根尖乳头干细胞与牙髓干细胞体外生物学特性的比较研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
- [25] SONOYAMA W, LIU Y, FANG D, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. PLoS One. 2006;1(1):e79.
- [26] 苏尚, 吴畏. Wnt/ β -Catenin 信号通路对靶基因转录的调控 [J]. 中国科学: 生命科学, 2014,44(10):1029-1042.
- [27] SCHWARZ-ROMOND T. Three decades of Wnt signalling. EMBO J. 2012; 31(12):2664.
- [28] ROOSE J, HULS G, VAN BEEST M, et al. Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. Science. 1999; 285(5435):1923-1926.
- [29] CHEESMAN SE, NEAL JT, MITTGE E, et al. Epithelial cell proliferation in the developing zebrafish intestine is regulated by the Wnt pathway and microbial signaling via Myd88. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108 Suppl 1(Suppl 1):4570-4577.
- [30] HOVANES K, LI TW, MUNGUIA JE, et al. Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. Nat Genet. 2001;28(1):53-57.
- [31] DAS J, KUMAR R. Plant Wnt: deciphering a novel signaling pathway in plants. Curr Sci. 2016;111(8):1319-1324.
- [32] TAMURA M, NEMOTO E. Role of the Wnt signaling molecules in the tooth. Jpn Dent Sci Rev. 2016;52(4):75-83.
- [33] NAYAK L, BHATTACHARYA NP, DE RK. Wnt signal transduction pathways: modules, development and evolution. BMC Syst Biol. 2016; 10 Suppl 2(Suppl 2):44.
- [34] TSENTIDIS C, GOURGIOTIS D, KOSSIVA L, et al. Increased levels of Dickkopf-1 are indicative of Wnt/ β -catenin downregulation and lower osteoblast signaling in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus, contributing to lower bone mineral density. Osteoporos Int. 2017;28(3):945-953.
- [35] 颜露, 袁晓娟, 左婕, 等. DKK-1 在大鼠牙囊细胞体外的表达作用研究 [J]. 口腔医学, 2019,39(10):902-906.
- [36] 陈曦, 孙延芳, NXUMALO W. Dickkops 分泌蛋白调控肿瘤细胞机制 [J]. 浙江理工大学学报 (自然科学版), 2020,43(2):253-261.
- [37] HAN XL, LIU M, VOISEY A, et al. Post-natal effect of overexpressed DKK1 on mandibular molar formation. J Dent Res. 2011;90(11):1312-1317.
- [38] 徐仑, 聂嘉, 陈冬冬, 等. 两种 Wnt 通路抑制剂对牙周膜干细胞作用的比较研究 [J]. 现代生物医学进展, 2016,16(2):253-256.
- [39] 刘苹, 李平, 熊仁平, 等. MTT 法与 BrdU ELISA 法检测成纤维细胞增殖的可靠性比较 [J]. 第三军医大学学报, 2006,28(11):1262-1263.
- [40] 罗涛, 王彤敏, 李力燕. EdU 与 BrdU 在检测细胞增殖中的特点及应用进展 [J]. 重庆医学, 2015,44(32):4581-4583.

(责任编辑: MZH, ZN, JY)