文章编号:1000-5404(2012)09-0839-04

论著

purmorphamine 促进人牙周膜干细胞应力成骨

常慧君[1,2],申 涛[3],董世武[4],杨彦春[1],张 洁[1],周继祥[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院口腔科[1],基础医学部人体解剖学教研室[4];610041 成都,四川省军区门诊部口腔科[2];066102 河北 秦皇岛,中国人民解放军 61251 部队[3])

[摘要] **目的** 研究 purmorphamine 在动态张应力促人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells,PDLSCs)向成骨细胞分化过程中的作用。**方法** 分离培养鉴定 PDLSCs,在矿化诱导环境中加入 purmorphamine,采用 Flexcell FX-4000T 应力加载系统对细胞加力 24 h,以 Real-time PCR 检测成骨相关指标 Runx2、alkaline phosphatase(ALP)以及 Hedgehog(Hh)通路的标志物 GLI1、Pathed1(PTCH1)、Smoothend(SMO)。**结果** 动态张应力作用24 h 后,成骨相关指标 Runx2、ALP,Hh 通路的标志物 GLI1、PTCH1、SMO 的表达水平明显升高($P<0.05$);加入 purmorphamine 后,成骨相关指标 Runx2、ALP,Hh 通路的标志物 GLI1、PTCH1、SMO 的表达水平较加力组均有增强,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** purmorphamine 可能通过激活 Hh 通路,进而增强人 PDLSCs 应力条件下向成骨细胞分化。

[关键词] purmorphamine;人牙周膜干细胞;Hedgehog;动态张应力;成骨分化
[中图法分类号] R322.41; R329.2; R345.61 [文献标志码] A

Purmorphamine promotes osteogenic differentiation in human periodontal ligament stem cells under dynamic tensile

Chang Huijun[1,2], Shen Tao[3], Dong Shiwu[4], Yang Yanchun[1], Zhang Jie[1], Zhou Jixiang[1] ([1]Department of Stomatology, Southwest Hospital, [4]Department of Anatomy, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Stomatology, Out-patient Department of Sichuan Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610041; [3]No. 61251 Troop, Qinhuangdao, Hebei Province, 066102, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of purmorphamine on the osteogenic differentiation in human periodontal ligament stem cells (PDLSCs) under dynamic strain. **Methods** PDLSCs were isolated from freshly extracted teeth and identified with flow cytometry for expression of STRO-1 and CD146, and then subcultured into six-well flexible-bottomed Uniflex culture plates. When 80% confluence was achieved, purmorphamine, an activator of the hedgehog (Hh) signaling pathway, was added into the wells in mineralization induction medium at the concentration of 1 μmol/L, and dynamic strains were applied to PDLSCs with the Flexcell FX-4000T Tension Plus System for 24 h. Then the mRNA expression of osteoblastic related indexes of Runx2, ALP and Hh pathway markers GLI1, PTCH1, SMO was detected by real-time PCR. **Results** After 24 h loading, the gene expression of osteogenic markers Runx2 and ALP and Hh pathway markers (GLI1, PTCH1 and SMO) was all increased ($P<0.05$). And the group with purmorphamine treatment showed much higher expression of these genes than the control group and the only mechanical loading group ($P<0.05$). **Conclusion** Purmorphamine promotes osteogenic differentiation in PDLSCs under dynamic tensile, probably through activation of Hh signal pathway.

[**Key words**] purmorphamine; human periodontal ligament stem cells; Hedgehog signal pathway; dynamic tensile; osteoblast differentiation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30870599). Corresponding author: Zhou Jixiang, Tel:86-23-68754387, E-mail:Zhoujx6518@sina.com

人牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells,PDLSCs)是源自人牙周膜组织,具有干细胞特性即自我更新和多向分化能力的成体干细胞。研究显示其在体内体外均具有成骨分化潜能,对牙周组织的功能稳定和再生修复起着重要的作用[1-2]。本课题组的前期研究显示,在动态张应力作用下 PDLSCs 可向成骨细胞分化[3],但此成骨分化过程中的分子调控机制尚不明了。嘌呤衍生物 purmorphamine 是一种化学合成小分子,为解决临床骨代谢相关疾病的需要,即加速成骨分化的需求应运而生的。其化学结构为 2-(1-naph-

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30870599)
[通信作者] 周继祥,电话:(023)68754387,E-mail:Zhoujx6518@sina.com

thoxy)-6-(morpholinoanilino)-9-cyclohexylpurine,该杂环类分子对小鼠间充质细胞系C3H10T1/2和成骨细胞系MC3T3-E1具有促成骨作用[4]。Sinha等[5]采用小鼠细胞系研究证明purmorphamine是通过直接作用于Hedgehog(Hh)信号通路中的膜受体Smoothened(SMO)从而激活Hh信号通路的下游转录因子GLI1而发挥其促成骨分化的作用。本实验将观察在动态张应力作用下purmorphamine对人PDLSCs成骨分化过程的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料和设备

α-MEM培养液,胎牛血清;0.25%胰蛋白酶(HyClone公司,美国),Ⅰ型胶原酶(Gibco公司,美国),PBS(中杉金桥生物技术有限公司,北京),AF647标记小鼠抗人STRO-1流式抗体、PE标记小鼠抗人CD146流式抗体(Biolegend公司,美国),成骨诱导培养液、成脂诱导培养液、茜素红、油红O(Cyagen公司,美国),purmorphamine(Cayman公司,美国),Trizol(Invitrogen,美国),RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit、Deoxyribonuclease Ⅰ、RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor(Fermentas,加拿大),SYBR Green PCR Master Mix(ABI,美国)。FX-4000T张应力加载系统(Flexcell International Corporation,美国),倒置相差显微镜(Olympus,日本),CO_2孵箱(Themo Scientific,美国),水平电泳槽(北京君意东方仪器公司),DG-Ⅲ双稳数显电泳仪(北京鼎国生物技术发展中心),高速离心机(Sigma,美国)。

1.2 PDLSCs的分离培养和鉴定

取13~21岁因正畸或者阻生而拔除的牙体牙周均健康的新鲜牙齿,按照申涛[6]的方法分离培养获得PDLSCs。PDLSCs表面标志物流式细胞术鉴定:收集第4代PDLSCs制悬,6×10^6/ml,分别取100 μl细胞悬液加入4只EP管,各管分别加入小鼠抗人STRO-1和小鼠抗人CD146抗体及同型对照单抗,经流式细胞仪检测其干细胞表面标志物STRO-1、CD146的表达情况。PDLSCs成骨成脂诱导分化:收集第4代PDLSCs制悬,接种于孔底预置无菌玻片的24孔板内,每孔细胞约2×10^4。细胞融合率达95%以上时分别更换为成骨、成脂诱导培养液,按说明定期更换诱导培养液。3周后结束诱导,分别用茜素红和油红O染色,光镜下观察。

1.3 PDLSCs张应力加载

取第4~6代PDLSCs悬液,按约2×10^6/孔接种于孔底为硅胶膜的BioFlex6孔培养板内。采用FX-4000T加载装置进行加载,加载参数为:最大形变12%最小形变为0的正弦波,频率为0.1 Hz。此参数最为接近临床,且成骨效果最为明显[7]。purmorphamine浓度为采纳Wu等[4]报道的EC_{50}为1 μmol/L,加载时间为24 h。实验分为3个组:对照组、加力组和实验组(加力并加药物组),每组设4个孔。细胞融合达80%以上时,将孔内培养液更换为无血清的α-MEM培养液,进行同步化处理。12 h后将各孔内无血清的α-MEM培养液更换为成骨诱导液,实验组各孔内加入purmorphamine,对照组和加力组各孔内加入溶剂DMSO,使其终浓度为10^{-2}mol/L。

1.4 Real-time PCR检测分析

取出培养板后,将孔内培养液吸出,PBS漂洗2遍。各孔加入1 ml Trizol,反复混匀后,收集PDLSCs裂解液至经DEPC处理的Ep管内,常规提取总RNA并用总RNA纯化系统(Invitrogen)处理后进行Real-time PCR检测。引物用http://frodo.wi.mit.edu/primer3/网站设计,同时用primer5引物设计软件进行比对序列以及TM值,然后由上海捷瑞生物工程公司合成。所用引物见表1。反应条件:50 ℃ 2 min,95 ℃ 10 min,然后94 ℃ 20 s,55 ℃ 60 s,共60个循环。选择β-actin作为看家基因,通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$法算出目的基因mRNA的相对含量(RQ值)。

表1 Real-time PCR引物序列和片段长度

基因名称	引物序列	片段长度	TM值
Runx2	上游:5′-GCAGTTCCCAAGCATTTCAT-3′	182 bp	59.8 ℃
	下游:5′-CACTCTGGCTTTGGGAAGAG-3′		
ALP	上游:5′-CCACGTCTTCACATTTGGTG-3′	196 bp	59.5 ℃
	下游:5′-AGACTGCGCCTGGTAGTTGT-3′		
GLI1	上游:5′-GAGTCCAGAGGTTCAAGAG-3′	103 bp	54.2 ℃
	下游:5′-GGTGAGTAGACAGAGGTTG-3′		
SMO	上游:5′-TATCCTCCTTCTCCTGTTC-3′	200 bp	55.1 ℃
	下游:5′-TCACTCACTGCTCCTATC-3′		
PTCH1	上游:5′-GCCTATGCCTGTCTAACC-3′	189 bp	56.2 ℃
	下游:5′-ATCCACACCAACACCAAG-3′		
β-actin	上游:5′-CATTAAGGAGAAGCTGTGCT-3′	208 bp	61.0 ℃
	下游:5′-GTTGAAGGTAGTTTCGTGGA-3′		

1.5 统计学处理

RQ值为计量资料,以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件,所得数据符合正态分布且方差齐性,采用单因素方差分析,两两比较采用LSD法进行处理。

2 结果

2.1 流式细胞术检测

STRO-1阳性率为89.9%,CD146阳性率为91.3%。说明所用细胞具有干细胞特性。

2.2 成骨成脂诱导

成骨诱导细胞经茜素红染色可见红色矿化结节,边缘不规则,大小不均一(图1);成脂诱导细胞经油红O染色可见圆形脂滴形成(图2)。

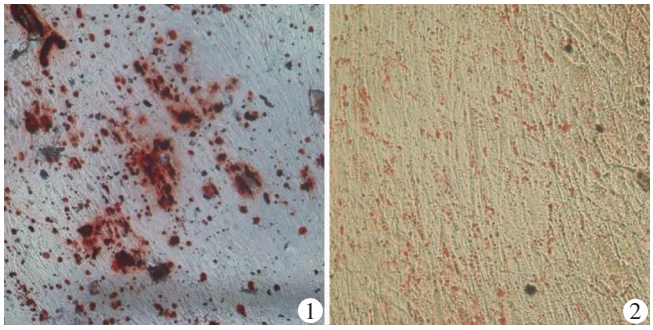


图1 成骨诱导后茜素红染色阳性 (×200)

图2 成脂诱导后油红O染色阳性 (×200)

2.3 purmorphamine对成骨分化的影响

在动态张应力下作用24 h,加力组Runx2、ALP的表达增

强,与对照组比差异有统计学意义($P<0.05$);实验组与加力组比较 Runx2、ALP 表达水平有升高,差异有统计学意义($P<0.05$,表 2,图 3、4)。

表 2 动态张应力下作用 24 h 各组间 Runx2 和 ALP mRNA RQ 值的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	Runx2	ALP
对照组	1.766 ± 0.471	2.004 ± 0.360
加力组	4.199 ± 0.780[a]	4.716 ± 0.506[a]
实验组	5.911 ± 0.741[ab]	7.498 ± 0.701[ab]

a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与加力组比较

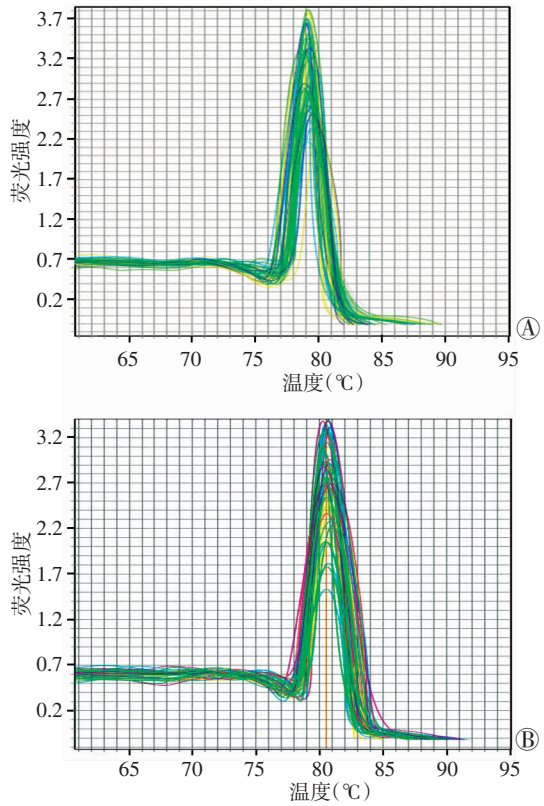


图 3 ALP(A)与 GLI1(B)定量 PCR 融解曲线

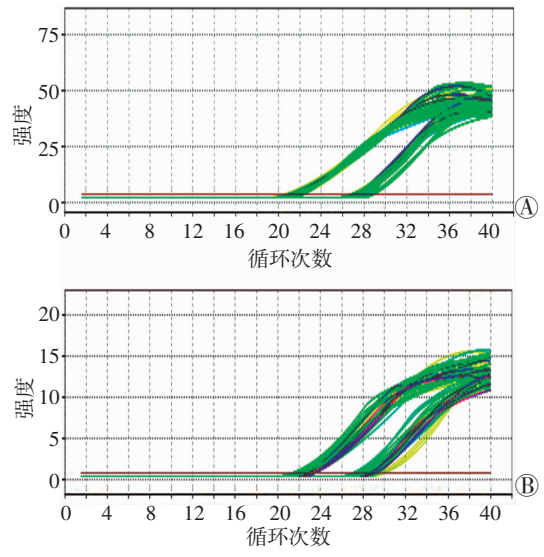


图 4 ALP(A)与 GLI1(B)定量 PCR 扩增曲线

2.4 purmorphamine 对 Hedgehog 信号通路的影响

在动态张应力下作用 24 h,加力组的 GLI1、PTCH1、SMO 的表达水平上调,差异有统计学意义($P<0.05$);实验组与加力组比较 GLI1、PTCH1、SMO 的表达明显增强,差异有统计学意义($P<0.05$,表 3,图 3、4)。

表 3 24 h 各组间 GLI1、SMO 和 PTCH1 mRNA RQ 值的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	GLI1	SMO	PTCH1
对照组	1.713 ± 0.146	2.593 ± 0.202	1.742 ± 0.153
加力组	5.130 ± 0.232[a]	6.596 ± 0.828[a]	2.747 ± 0.228[a]
实验组	7.342 ± 0.600[ab]	13.323 ± 1.092[ab]	5.597 ± 0.369[ab]

a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与加力组比较

3 讨论

正畸临床中张力侧成骨是错位牙移动的生理基础。作为牙齿的支持组织牙周膜,被广泛采用作为新骨形成来源的研究对象。Meikle 等[8-10]均研究发现牙周膜组织在张应力作用下可通过骨形态蛋白通路或基质金属酶向成骨细胞分化。因为牙周膜组织中含有细胞、纤维、血管和蛋白聚糖和组织液等异质成分,所以新骨形成的机制到目前仍未有定论[11-14]。自 Seo 等[1]首次成功从牙周膜组织分离并鉴定 PDLSCs 以来,发现在体外适当环境中 PDLSCs 可以向成骨细胞分化。本课题组前期研究已经证实,在动态张应力作用下 PDLSCs 的 Runx2、ALP、osteocalcin(OCN)等成骨分化标志物的 RNA 和蛋白的表达水平均上调,证明在动态张应力作用下 PDLSCs 可以向成骨细胞分化[3]。

Hh 自 1992 年首次克隆以来,已查明在脊椎动物中其家族含有 3 种与果蝇类高度保守的同源蛋白,即 Sonic hedgehog(Shh)、Indin hedgehog (Ihh)、Desert hedgehog (Dhh),其中 Shh 是研究最为广泛,与脊椎动物的成骨细胞的分化作用密切相关[10,15]。当 Hh 配体蛋白被激活时,Hh 配体与靶细胞膜上的 12 通道的受体 Ptched1(PTCH1)竞争性结合,从而解除了 PTCH1 对细胞膜上的 7 通道的跨膜蛋白 Smothened(SMO)的抑制。释放的跨膜蛋白 SMO 进而激发了 Hh 通路的下游信号,最终引起细胞核内的目标基因 GLI1 的表达和转录[10,15-16]。研究证明 purmorphamine 可激活 Hh 通路,从而发挥其促小鼠间充质细胞的成骨作用[4-5]。

Runx2 是一种与骨相关的重要转录因子,在成骨分化和骨形成过程中发挥关键作用;ALP 是一种骨基质蛋白,与成骨细胞的分化和成熟呈正相关,因而本实验选取这两个成骨相关指标来观察 PDLSCs 向成骨细胞转化的趋势。实验中,加力 24 h 后,Runx2、ALP 的

表达水平均有升高($P<0.05$)。说明动态张应力组的成骨活动比对照组有明显增强,即张应力能够促使PDLSCs向成骨细胞分化。加入purmorphamine的实验组在动态张应力作用24 h后,与加力组相比较,Runx2、ALP的表达水平均有升高($P<0.05$)。说明purmorphamine可以增强张应力下PDLSC向成骨细胞的分化。此结果与Wu等[4-5]在小鼠间充质细胞系中取得的结果相类似,也与Dohle等[16]采用的人的上皮细胞系和成骨细胞系的24 h时检测的osteonectin和ALP的mRNA的表达水平上调结果相同。与Plaisant等[17]报道purmorphamine可抑制人脂肪干细胞系和人间充质干细胞系RUNX2、osteopontin及osteonectin的mRNA的表达相反,这可能与实验中所用细胞数和生长状况及成熟状态的不同有关。

在动态张应力作用24 h后,Hh通路的标志物核心转录因子GLI1以及膜受体PTCH1、SMO的表达水平均呈增强($P<0.05$)。说明在动态张应力作用下PDLSCs向成骨细胞分化过程中Hh通路可能参与发挥了作用。而加入了purmorphamine后,检测结果显示GLI1、PTCH1、SMO与加力组比较表达水平均增强($P<0.05$)。与Dohle等[16]报道purmorphamine可促使人脂肪干细胞系和人间充质干细胞系GLI1的上调从而激活Hh信号通路相同。本实验也通过GLI1、PTCH1、SMO的上调证明了purmorphamine可激活人牙周膜干细胞的Hh通路。

综合研究表明,purmorphamine对动态张应力下PDLSCs向成骨细胞分化过程有促进作用,此作用是通过激活Hh通路发挥出来的。Walter等[18]证明Hh通路是一个剂量依赖的信号通路。至于不同浓度的purmorphamine对动态张应力下PDLSC向成骨细胞分化过程的具体调控,还需要进一步观察。

参考文献:

[1] Seo B M, Miura M, Gronthos S, *et al*. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament[J]. Lancet, 2004, 364(9429): 149-155.

[2] San-Miguel S M, Fatahi M R, Li H, *et al*. Defining a visual marker of osteoprogenitor cells within the periodontium[J]. J Periodontal Res, 2010, 45(1): 60-70.

[3] 申涛. 动态张应力促人牙周膜干细胞向成骨细胞分化的研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2011.

[4] Wu X, Walker J, Zhang J, *et al*. Purmorphamine induces osteogenesis by activation of the hedgehog signaling pathway[J]. Chem Biol, 2004, 11(9): 1229-1238.

[5] Sinha S, Chen J K. Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothened[J]. Nat Chem Biol, 2006, 2(1): 29-30.

[6] 申涛, 常慧君, 简从相, 等. 改良法分离培养人牙周膜干细胞[J]. 华西口腔医学杂志, 2011, 29(01): 71-74, 78.

[7] Wescott D C, Pinkerton M N, Gaffey B J, *et al*. Osteogenic gene expression by human periodontal ligament cells under cyclic tension[J]. J Dent Res, 2007, 86(12): 1212-1216.

[8] Meikle M C. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt[J]. Eur J Orthod, 2006, 28(3): 221-240.

[9] 彭庭莉, 周继祥, 杨军, 等. 动态张应力对人牙周膜成纤维细胞MMP-9 mRNA合成的影响[J]. 中华口腔医学杂志, 2005, 40(6): 462.

[10] Kim W K, Meliton V, Bourquard N, *et al*. Hedgehog signaling and osteogenic differentiation in multipotent bone marrow stromal cells are inhibited by oxidative stress[J]. J Cell Biochem, 2010, 111(5): 1199-1209.

[11] Enokiya Y, Hashimoto S, Muramatsu T, *et al*. Effect of stretching stress on gene transcription related to early-phase differentiation in rat periodontal ligament cells[J]. Bull Tokyo Dent Coll, 2010, 51(3): 129-137.

[12] Arnold W H, Becher S, Dannan A, *et al*. Morphological characterization of periodontium-derived human stem cells[J]. Ann Anat, 2010, 192(4): 215-219.

[13] 刘宁, 刘鲁川, 董正谋, 等. 复方奥硝唑-甲磺酸培氟沙星缓释制剂对人牙周膜细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(1): 78-81.

[14] Intini G. Future approaches in periodontal regeneration: gene therapy, stem cells, and RNA interference[J]. Dent Clin North Am, 2010, 54(1): 141-155.

[15] 蹇骞, 徐海伟, 谢汉平, 等. RCS大鼠自然病程中视网膜边缘生发区细胞增殖及Shh/Ptc信号途径改变的观察[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(11): 997-1001.

[16] Dohle E, Fuchs S, Kolbe M, *et al*. Sonic hedgehog promotes angiogenesis and osteogenesis in a coculture system consisting of primary osteoblasts and outgrowth endothelial cells[J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(4): 1235-1237.

[17] Plaisant M, Fontaine C, Cousin W, *et al*. Activation of hedgehog signaling inhibits osteoblast differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2009, 27(3): 703-713.

[18] Walter K, Omura N, Hong S M, *et al*. Overexpression of smoothened activates the sonic hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer-associated fibroblasts[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(6): 1781-1789.

(**收稿**:2012-01-13;**修回**:2012-02-05)

(编辑 张 维)