DOI:10.16016/j.2097-0927.202303095

Necdin 对大鼠牙胚外胚间充质干细胞成牙分化和矿化的影响

张艺馨,袁洪燕,陆明洁,谢 波,邹续强,温秀杰 646000 四川 泸州,西南医科大学附属口腔医院正畸科,口颌面修复重建和再生泸州市重点实验室,西南医科大学口腔医学研究所

[摘要] **目的** 探讨胚胎癌细胞来源分化神经元特异蛋白(neurally differentiated EC-cell-derived protein,Necdin)对大鼠牙胚外胚间充质干细胞(ectomesenchymal stem cells,EMSCs)成牙分化和矿化的调控作用。**方法** 利用免疫荧光染色检测 Necdin 在 E13.5d、E19.5d 大鼠牙胚中的表达分布情况。分离培养 E19.5d 大鼠牙胚 EMSCs,流式细胞术鉴定细胞表型,构建 Necdin 沉默慢病毒感染 EMSCs,分为阴性对照组(sh-NC)和沉默组(sh-Necdin)。流式细胞术检测 EMSCs 凋亡情况,CCK-8 法检测 EMSCs 增殖能力,划痕实验检测 EMSCs 迁移能力,矿化诱导后通过碱性磷酸酶染色、茜素红染色、RT-PCR 和 Western blot 观察 Necdin 对 EMSCs 成牙分化和矿化的调控作用。**结果** 免疫荧光显示 Necdin 在内、外釉上皮和上皮与间充质接触区域呈强阳性表达;牙胚组织来源的 EMSCs 沉默 Necdin 后,sh-Necdin 组 EMSCs 凋亡率较 sh-NC 组增多($P<0.01$),与 sh-NC 组相比,sh-Necdin 组 EMSCs 的增殖能力更强($P<0.01$),但迁移能力变弱($P<0.01$);与 sh-NC 组相比,sh-Necdin 组碱性磷酸酶染色更浅且矿化结节形成更少;sh-Necdin 组 EMSCs 成牙分化和矿化相关的基因与蛋白表达量明显低于 sh-NC 组($P<0.05$)。**结论** Necdin 在大鼠牙胚未来成牙分化和矿化区域呈特异性表达,沉默 Necdin 促进 EMSCs 凋亡和增殖,但抑制 EMSCs 迁移以及成牙分化和矿化,Necdin 可能在牙发育矿化过程中发挥重要作用。

[关键词] 胚胎癌细胞来源分化神经元特异蛋白;外胚间充质干细胞;成牙本质分化;矿化
[中图法分类号] R322.41;R329.21;R341 [文献标志码] A

Effects of Necdin on odontogenic differentiation and mineralization of rat dental germ ectodermal mesenchymal stem cells

ZHANG Yixin, YUAN Hongyan, LU Mingjie, XIE Bo, ZOU Xuqiang, WEN Xiujie Department of Orthodontics, Luzhou Key Laboratory of Oral & Maxillofacial Reconstruction and Regeneration, Institute of Stomatology, Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan Province, 646000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the regulative effect of neurally differentiated EC-cell-derived protein, Necdin, on the odontogenic differentiation and mineralization of rat dental germ ectomesenchymal stem cells (EMSCs). **Methods** Immunofluorescence staining was used to detect the expression and distribution of Necdin in E13.5d and E19.5d rat dental germ. EMSCs derived from E19.5d rat dental germ were isolated and cultured, and identified with flow cytometry for cell surface antigens. The EMSCs were stably transfected with lentiviral vector of Necdin silencing. Then, the apoptosis of EMSCs was detected by flow cytometry in the negative control group (sh-NC) and silenced group (sh-Necdin). The proliferation capacity of EMSCs was detected by CCK-8 assay, and the migration ability of EMSCs was detected by cell scratching assay. After mineralization induction, the regulative effect of Necdin on the odontogenic differentiation and mineralization of EMSCs was observed by alkaline phosphatase staining, alizarin red staining, RT-PCR and Western blotting. **Results** The immunofluorescence results showed that Necdin was

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81970906);四川省科技计划项目(2019YJ0689)
[通信作者] 温秀杰,E-mail:wenxiujie@tom.com

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

strongly expressed and concentrated in the inner enamel epithelium, outer enamel epithelium and in the contact area between epithelium and mesenchyme. After Necdin silencing, the EMSCs showed higher apoptotic rate, enhanced proliferation ability but weaker migration ability when compared with the cells from the sh-NC group (all $P<0.01$). What's more, Necdin silencing also resulted in lighter alkaline phosphatase stain and less mineralized nodule formation, and up-regulations of the molecules related to tooth differentiation and mineralization at mRNA and protein levels ($P<0.05$) in the cells from the sh-Necdin group than those from the sh-NC group. **Conclusion** Necdin is specifically expressed in the future odontogenic differentiation and mineralization regions in rat dental germ. Its silencing promotes the apoptosis and proliferation, but inhibits the migration and the abilities of odontogenesis differentiation and mineralization in EMSCs. Necdin might play an important role in tooth development and mineralization.

[**Key words**] neurally differentiated EC-cell-derived protein; ectomesenchymal stem cells; odontogenic differentiation; mineralization

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81970906) and the Project of Science and Technology Plan of Sichuan Province (2019YJ0689). Corresponding author: WEN Xiujie, E-mail: wenxiujie@tom.com

牙齿发育的启动和组织的生成是一个长期、复杂的生物学过程,离不开外胚层间充质和牙源性上皮这两种组织之间的相互作用,涉及多种基因的级联表达实现对牙齿发育的精确调控[1]。颅神经嵴迁移来源的外胚间充质干细胞(ectomesenchymal stem cells, EMSCs)被认为是形成颅面硬组织的祖细胞,可以形成如上颌骨、下颌骨以及除牙釉质外的所有牙齿组织,对牙齿发育具有重要意义,是研究牙组织工程良好的细胞模型[2]。虽然至今已经发现多个基因影响牙发育,但这些信号分子的调控机制及调控网络仍然不清楚,大大制约了牙组织工程的突破与发展。胚胎癌细胞来源分化神经元特异蛋白(neurally differentiated EC-cell-derived protein,Necdin)是黑色素瘤相关抗原(melanoma associated antigen,Mage)家族Ⅱ类成员,可以通过结合多种蛋白和受体分子参与调控多项细胞生理过程[3]。目前研究已经充分证明 Necdin 在调控神经系统发育方面的重要作用,但调控其他组织的形态发生及发育过程的研究仍处于初始阶段,在牙齿发生发育中所起的可能调控作用还不清楚。本研究旨在通过免疫荧光染色观察 Necdin 在大鼠牙胚中的表达分布情况,然后利用慢病毒感染构建沉默 Necdin 的 EMSCs,探究 Necdin 对 EMSCs 的凋亡、增殖、迁移以及成牙分化和矿化的调控作用,以便进一步揭示牙齿发生发育的潜在分子生物学机制,从而为发展牙齿组织工程提供理论依据和实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

α-MEM 培养基(HyClone,美国);胰酶、胎牛血清(Gibco,美国);CCK-8 试剂盒、细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 化学发光试剂盒磷酸酶显色试剂盒、0.2%茜素红溶液碱性(碧云天,中国);HE 染色试剂盒(Solarbio,中国);CD45、CD29、CD90、CD105(Santa Cruz,美国);Necdin(Genetex,美国);荧光二抗 488 山羊抗兔、荧光二抗 CY3 山羊抗兔、DAPI 染液(谷歌生物,中国);山羊抗兔 IgG-FITC、山羊抗鼠 IgG-FIT、Dspp 抗体、Dmp1 抗体(ABclonal,中国);GAPDH 抗体、Runx2 抗体、Alp 抗体(Proteintech,美国);PAGE 凝胶快速制备试剂盒(雅酶,中国);TRIzol Reagent RNA 提取试剂盒(Invitrogen,美国);PrimeScript™ 1st Strand cDNA Syn-thesis Kit、TB Green Premix *EX Taq* Ⅱ(TaKaRa,日本)。

1.2 方法

1.2.1 HE 染色和免疫荧光染色 取胚胎期 E13.5d、E19.5d 大鼠头部,固定过夜后脱钙 1~3 d,之后梯度乙醇脱水,包埋后进行连续切片。染色前先于 60 ℃烤片 2 h,之后将切片浸入二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,按照 HE 染色试剂盒(Solarbio)的方案进行 HE 染色,然后扫片记录。免疫荧光染色脱蜡水化步骤同 HE 染色,之后进行抗原修复和血清封闭,先加入稀释好的 Necdin 一抗(1∶200)孵育过夜后,再加入对应的 488 山羊抗兔二抗进行孵育,DAPI 复染细胞核后封片进行镜检拍照。动物实验过程和处死方法均按照西南医科大学医学伦理委员会批准的方案进行(No.201903-187)。

1.2.2 E19.5d 牙胚来源 EMSCs 培养及表面抗原鉴定 SD 大鼠购自重庆医科大学动物实验室。取胚胎期 E19.5d 大鼠头部,于体视显微镜下取出牙胚组织,置于培养皿中,加入含 10% FBS 的 α-MEM,置于 37 ℃含 5% CO_2 的恒温箱中静置贴壁培养,24~48 h 后可观察到组织块周围细胞呈放射状生长。根据细胞

生长情况进行传代,后续实验均取生长状态良好的第3代EMSCs进行。流式细胞实验中每组收集约5×10^5个细胞,用4%聚甲醛固定细胞15 min,然后分别加入PBS、CD45、CD29、CD90、CD105,在4 ℃下孵育过夜,第2天根据一抗种属加入对应羊抗兔IgG-FITC或羊抗鼠IgG-FITC二抗孵育,上机用流式仪器检测细胞表面抗原。

1.2.3 转染细胞 Necdin沉默慢病毒委托上海吉凯基因医学科技股份有限公司根据NCBI基因序列(Gene ID: 308690)设计构建提供,沉默组sh-Necdin靶序列为:5′-GACCTGAGCGACCCTAACTTTT-3′,阴性对照组sh-NC靶序列为:5′-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3′。根据慢病毒感染说明书进行实验,已经通过预实验确定测定病毒合适感染复数为50,并加入HiTransG P感染增强液提高感染效率。48 h后使用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达确认病毒成功感染EMSCs,收集每组基因和蛋白用RT-PCR和Western blot验证感染效率。

1.2.4 细胞免疫荧光染色 将慢病毒转染后的sh-NC组EMSCs和sh-Necdin组EMSCs接种于爬片上过夜,之后将细胞固定在4%多聚甲醛中,使用Necdin一抗(1∶200)孵育过夜后,再用CY3山羊抗兔荧光二抗(红色荧光)孵育,最后用DAPI染细胞核,滴加抗荧光淬灭封片剂封片后在荧光显微镜下观察并采集图像。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 选取生长状态良好的转染后各组细胞进行常规消化离心,之后将细胞沉淀重悬计数,各组细胞数调整至1×10^6/mL。将10 μL AnnexinV-APC分别加入1 mL各组细胞悬液中混合均匀,然后加入10 μL PI染液混匀,于室温条件下避光反应15 min,然后上机检测各组细胞的凋亡指数。

1.2.6 CCK-8 在96孔板中以2×10^3细胞/孔的比例分别接种各组细胞,每组设置3个复孔。24 h后,每孔加入100 μL CCK-8工作溶液,然后将细胞放入孵箱避光培养2 h,酶标仪检测每孔细胞在450 nm处光密度并绘制连续7 d的细胞生长曲线。

1.2.7 划痕实验检测细胞迁移 先在6孔板背侧划线做横向标记,取生长状态良好的各组细胞,常规消化后以合适的密度接种于6孔板中,待两组细胞在6孔板中长满后,用200 μL的枪头沿垂直于孔板底部的方向画线。之后更换为无血清培养基进行细胞培养,分别在划痕后0、12和24 h对细胞进行观察和拍照。最后利用Image J软件计算划痕宽度。

1.2.8 碱性磷酸酶染色及茜素红染色 取生长状态良好的各组细胞,常规消化后以合适的密度接种于6孔板中。待细胞生长良好并融合至70%~80%时,更换为矿化培养基(含10 mmol/Lβ-甘油磷酸钠,50 mg/mL维生素C,1×10^{-8} mol/L地塞米松、10% FBS的α-MEM培养基)进行培养。第7、21天,分别使用碱性磷酸酶染色试剂盒和茜素红染色试剂盒进行染色。

1.2.9 RT-PCR 用TRIzol试剂(Invitrogen)收集各组细胞的RNA,然后使用PrimeScript™ 1st Strand cDNA Syn-thesis Kit(TaKaRa)逆转录RNA获得cDNA,采用TB Green Premix *EX Taq* Ⅱ(TaKaRa)进行RT-PCR。分析结果用GAPDH的表达归一化,所用引物均由TaKaRa公司合成,相关基因引物信息见表1。

1.2.10 Western blot 使用含PMSF的Western及IP细胞裂解液提取收集各组蛋白,进行BCA蛋白定量检测,经过SDS-PAGE电泳、转膜、封闭、一抗及二抗孵育后,采用ECL化学发光显影液进行显影,检测相关蛋白的表达。

表1 RT-PCR引物序列

基因	引物序列(5′→3′)
Necdin	正向:TCGGAACAAAGTAAGGACCTGAG 反向:GTCAACCTCTTCAAACCGTTCTG
Dmp1	正向:AGGCTTGTATGTGGGATGACG 反向:CCAGTGCTGTGACGGGTATG
Dspp	正向:CGCTGGAGAGAGACATTGTTGAA 反向:TGTCGTTAGGCCTTGTTGATA
Alp	正向:AGGATTGTGGCGGTCTTTGC 反向:TCAGAACAGGGTGCGTAGG
Runx2	正向:GGCGTATTTCAGATGATGACACT 反向:AAGTGAAGGTGGCTGGATAGTG
GAPDH	正向:CTTCTCTTGTGACAAAGTGGACA 反向:CACCCCATTTGATGTTAGCG

1.3 统计学方法

使用SPSS 20.0软件和GraphPad Prism 8软件进行统计分析。每组进行3次重复实验取平均值,数据以$\bar{x}\pm s$表示,组间采用非配对t检验进行分析,$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠牙胚HE染色和Necdin免疫荧光化学染色

E13.5d牙胚HE染色显示上皮芽不断向外胚间充质中生长,基底部向内凹陷,形状像帽子,提示成釉器处于帽状期,可见到外釉上皮层、内釉上皮层和星网状层。围绕在成釉器周围的外胚间充质细胞密度逐渐增加,其中在内釉上皮下方形成的球形外胚间充质细胞凝聚区被称为牙乳头,包围成釉器和牙乳头底部的

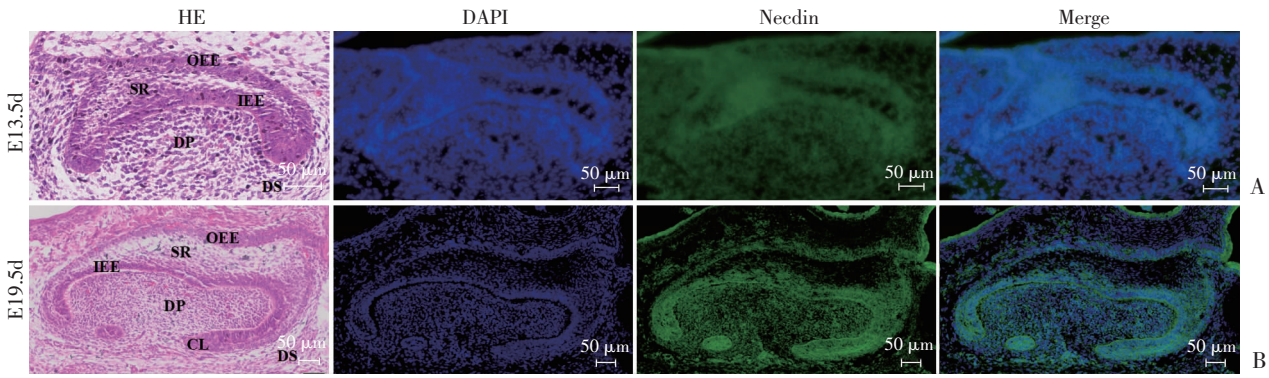
外胚间充质细胞呈环状排列称为牙囊,组织免疫荧光染色显示 Necdin 在内外釉上皮和牙乳头处阳性表达(图 1A)。E19.5d 牙胚 HE 染色显示成釉器进一步长大,上皮凹陷更深,周缘继续生长延伸,形似吊钟,此时期称为钟状期成釉器,在此阶段内釉上皮开始分化为成釉细胞并诱导牙乳头处 EMSCs 分化为成牙本质细胞,之后将分泌形成牙釉质和牙本质,但目前在此阶段还未检测到硬组织的形成,免疫荧光化学染色显示 Necdin 在内、外釉上皮和上皮与间充质接触区域表达较强,星网状层、牙乳头、牙囊处也有分散表达(图 1B)。

2.2　E19.5d 大鼠牙胚外胚间充质干细胞分离培养和鉴定

从 E19.5d 胎鼠头部取出牙胚组织,采用组织块贴壁法成功获得牙胚 EMSCs,可见细胞呈放射状从组织块爬出(图 2A)。流式细胞术检测结果显示这些细胞高表达间充质干细胞表面标记物 CD29、CD90、CD105,低表达造血干细胞表面标记物 CD45(图 2B)。

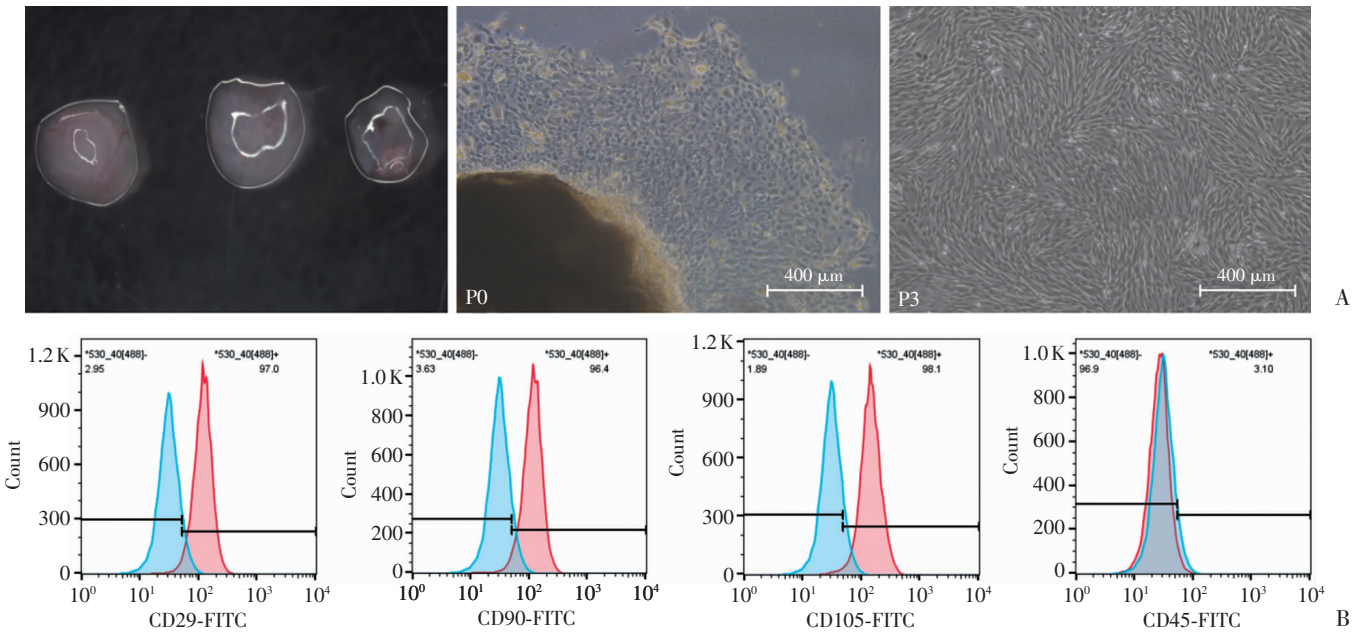
2.3　构建沉默 Necdin 的 EMSCs

慢病毒感染 EMSCs 48 h 后,在荧光显微镜下可观察到 sh-NC 组和 sh-Necdin 组细胞均表达绿色荧光,表明慢病毒成功感染 EMSCs(图 3A)。随后进一步通过 RT-PCR 和 Western blot 证实感染沉默慢病毒后,Necdin 基因和蛋白水平明显降低($P<0.01$,图 3B~D)。细胞免疫荧光染色检测显示 Necdin 主要在细胞质中表达,并且 sh-Necdin 组中 Necdin 表达明显比 sh-NC 组少(图 3E)。



A:E13.5d 大鼠牙胚 HE 和荧光染色;B:E19.5d 大鼠牙胚 HE 和荧光染色;IEE:内釉质上皮,OEE:外釉质上皮,SR:星状网,DP:牙乳头,DS:牙囊,CL:颈环

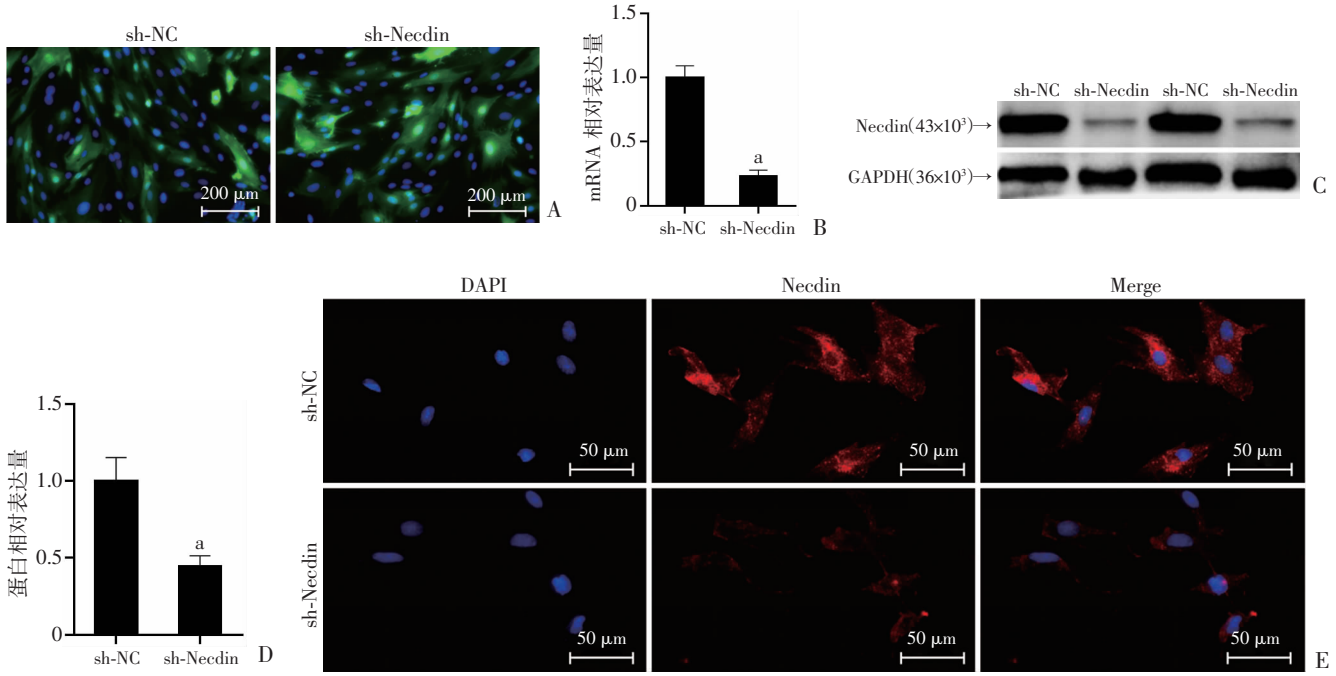
图 1　大鼠牙胚 HE 染色和 Necdin 免疫荧光染色观察



A:E19.5d 大鼠牙胚组织及 EMSCs 原代和第 3 代;B:流式细胞术检测细胞表面标记物

图 2　EMSCs 的分离培养与细胞表面抗原鉴定

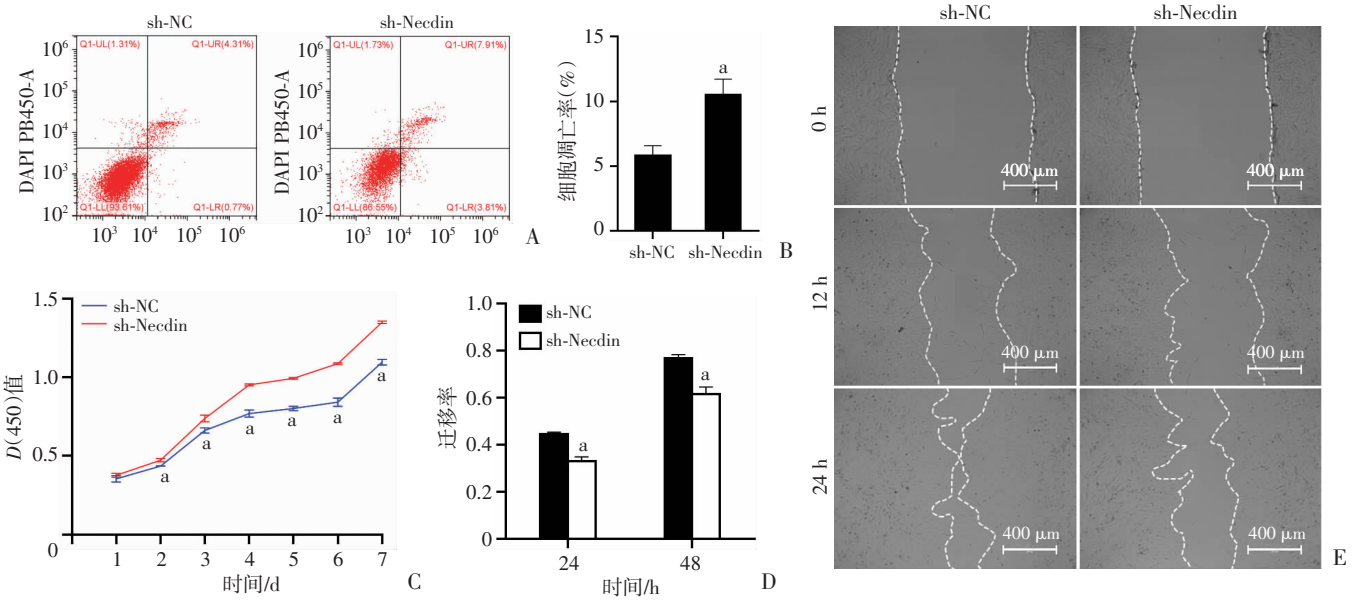
2.4　沉默 Necdin 对 EMSCs 凋亡、增殖和迁移的影响　流式检测细胞凋亡显示 sh-Necdin 组凋亡增多($P<0.01$,图 4A、B);CCK-8 检测结果显示 sh-Necdin 组增殖能力变强($P<0.01$,图 4C);划痕实验显示两组细胞都能发生迁移,但是 24 h 和 48 h 检测结果提示 sh-Necdin 组迁移能力较 sh-NC 组弱($P<0.01$,图 4D、E)。



a:$P<0.01$,与 sh-NC 比较

A:sh-NC 组和 sh-Necdin 组绿色荧光蛋白表达;B:RT-PCR 检测 Necdin 的表达;C:Western blot 检测 Necdin 的蛋白表达;D:蛋白表达半定量分析;E:免疫荧光染色检测 Necdin 在 EMSCs 内的表达

图 3　EMSCs 沉默 Necdin 后的慢病毒转染验证($n=3,\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.01$,与 sh-NC 比较

A:流式细胞术检测 EMSCs 凋亡;B:各组细胞凋亡率;C:CCK-8 检测 EMSCs 增殖能力;D、E:划痕实验检测 EMSCs 迁移能力和迁移率统计分析

图 4　沉默 Necdin 对 EMSC 凋亡、增殖和迁移的影响($n=3,\bar{x}\pm s$)

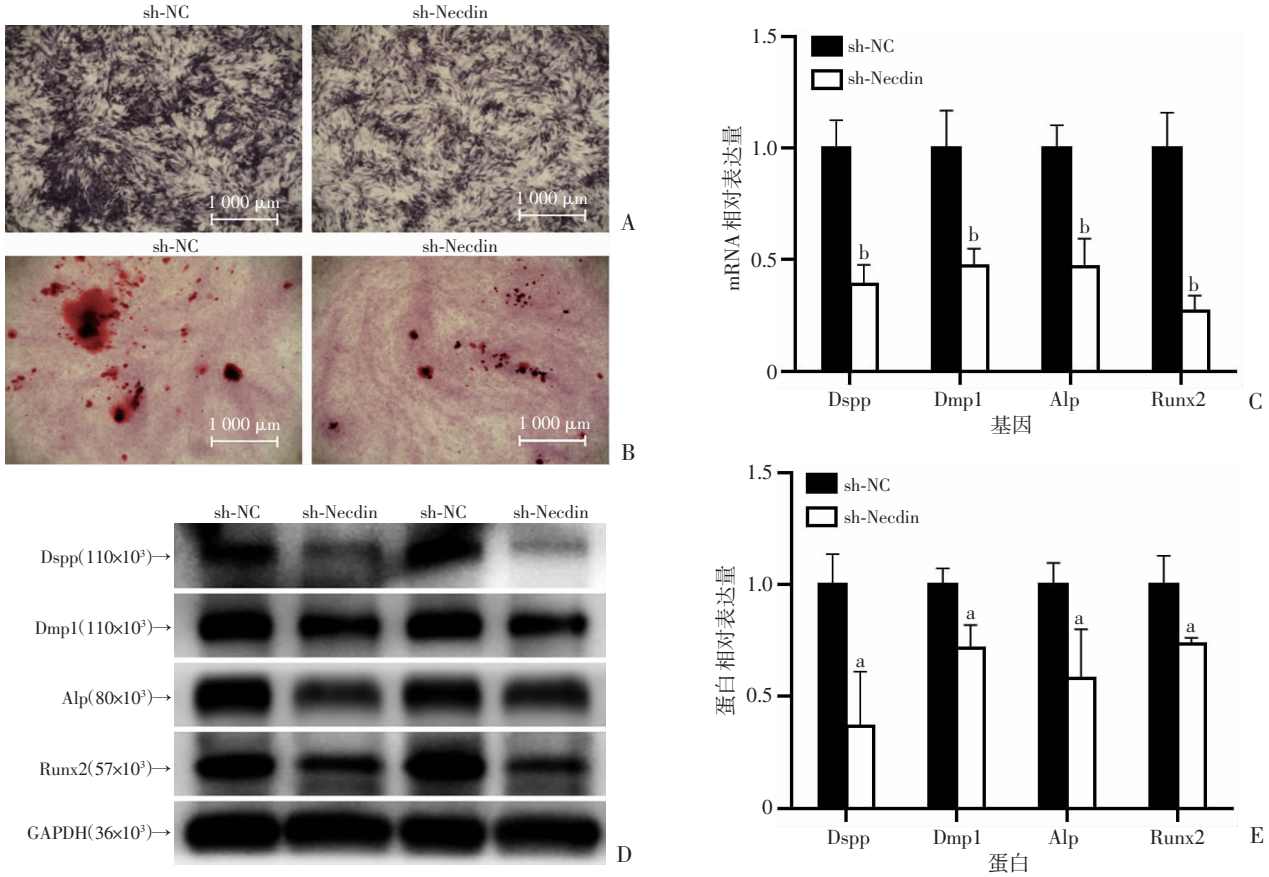
2.5 沉默 Necdin 后 EMSCs 成牙分化和矿化能力减弱

对矿化诱导 7 d 后的细胞进行碱性磷酸酶染色发现 sh-Necdin 组染色较浅,而对矿化诱导 21 d 后的细胞进行茜素红染色也发现 sh-Necdin 组形成矿化结节较少(图 5A、B)。收集矿化诱导 7 d 后的细胞 RNA 和蛋白进行 RT-PCR 与 Western blot 检测,发现 Dspp、Dmp1、Alp、Runx2 基因与蛋白表达均降低,其差异均具有统计学意义($P<0.05$,图 5C~E)。

3 讨论

牙齿的发育是上皮细胞与间充质持续的相互诱导和相互作用的产物。牙齿具有复杂的调节机制、特殊的组织起源、多样的结构和重要的功能等特点,在一定程度上使牙组织工程的研究更加困难。调节牙齿发生发育的复杂机制仍不清楚,需要研究人员进一步探索。Necdin 最初于 1991 年从 P19 胚胎癌细胞分离出来,属于黑色素瘤相关抗原家族Ⅱ类成员,是一种生长调控蛋白,可以通过与多种蛋白受体等结合发挥不同的功能[4-6]。在本实验中首先利用免疫荧光染色发现 Necdin 在 E13.5d 牙胚中高表达于内外釉上皮和牙乳头处,在 E19.5d 牙胚中内、外釉上皮和上皮与间充质相互作用区域表达较强,同时牙乳头、牙囊处也有分散表达。这些部位与未来发生成牙分化和矿化息息相关,提示 Necdin 可能与牙发育相关。

之后利用 E19.5d 大鼠牙胚来源的 EMSCs 细胞模型进一步探究 Necdin 的可能调控作用。由颅神经嵴迁移来源的 EMSCs 被认为是多种牙源性间充质干细胞的始祖细胞,在牙齿发生、发育过程中起着关键作用[7]。p75 神经营养因子受体(p75 neurotrophin receptor,p75NTR)是孤立的颅神经嵴衍生的 EMSCs 的标志物,课题组前期研究发现 E19.5d 牙胚 EMSCs 高表达 p75NTR,并表现出较强的矿化及成牙潜能[8]。由于 E19.5d 的大鼠牙胚成釉器处于钟状期已经进入成熟阶段,牙胚开始进行组织分化和形态分化,分化成



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 sh-NC 比较

A:碱性磷酸酶染色;B:茜素红染色;C:RT-PCR 检测成牙分化和矿化相关基因表达;D:Western blot 检测成牙分化和矿化相关蛋白表达;E:蛋白表达半定量分析

图 5 沉默 Necdin 对 EMSCs 成牙分化和矿化的影响($n=3,\bar{x}\pm s$)

特定表型的细胞开始具备拥有形成相应牙组织的能力,在此阶段由牙胚组织所培养获得的 EMSCs 用来研究牙的发生发育更合适[9];并且 E19.5 d 牙胚组织学染色结果也显示,Necdin 在未来发生成牙分化和矿化区域呈阳性表达。因此,本实验选择从 E19.5d 大鼠牙胚组织中获取培养 EMSCs。通过流式细胞术验证其为间充质干细胞,之后构建 Necdin 沉默慢病毒成功感染 EMSCs 进一步研究 Necdin 对 EMSCs 的调控作用。

牙的发育是一个长期、复杂的生物学过程,包括细胞与细胞、上皮与间充质的相互作用,以及细胞的凋亡、增殖、迁移、分化和组织矿化等[7]。本研究发现,沉默 Necdin 可同时促进 EMSCs 的凋亡和增殖,可能与 Necdin 复杂的生物学功能以及 E19.5d EMSCs 特殊的生理状态有关。在以往的研究中,Necdin 过表达会抑制胚胎小鼠新皮层中神经前体细胞的增殖,而敲除 Necdin 后,胚胎期的小鼠神经节隆起区的 GABAergic 神经元增殖和凋亡细胞的数量同时增加[10-11]。尽管这可能与机体为维持神经细胞功能稳态有关,但 Necdin 在这一过程中发挥的生物学功能引发了学者们的关注,越来越多证据证明 Necdin 是一种抗有丝分裂和抗凋亡的蛋白。有研究发现,敲除 Necdin 后的神经元干细胞 NSCPCs 表现出活跃的细胞增殖和凋亡,可能是由于 Necdin 与转录抑制因子 Bmi1 相互作用,促进周期蛋白依赖性激酶抑制剂 p16 的表达从而抑制细胞增殖和凋亡[12]。事实上,Necdin 可通过促进凋亡蛋白 CCAR1/CARP1 的降解来发挥其促生存活性从而抑制小鼠成肌细胞凋亡[13]。MC3T3-E1 小鼠成骨细胞中过表达 Necdin 也显示出抗增殖和抑制凋亡作用[14]。在脂肪干细胞和造血干细胞中,Necdin 的缺失可以使细胞拥有更强的增殖能力[15-16]。研究也发现 Necdin 可以在细胞质中直接与主要细胞周期调节子 E2F1 相互作用来抑制细胞的增殖和诱导分化,并且还抑制 E2F1 介导的细胞凋亡[17-18]。本研究显示,沉默 Necdin 促进 E19.5d 牙胚 EMSCs 凋亡的同时,可能也激活了细胞增殖的信号通路,但是具体的分子机制如何还需进一步探究。此外,划痕实验发现 Necdin 正向调控 EMSCs 的迁移。Necdin 在前脑发育过程中促进 GABAergic 神经元的分化和迁移[11]。Necdin 缺陷小鼠表现出交感神经元和 GnRH 神经元的异常迁移,并伴有轴突生长受损[19-20]。在人类和小鼠成纤维细胞中 Necdin 的缺失会通过损害细胞极性启动,从而减少细胞迁移[21]。另外研究表明 Necdin 似乎是一种影响癌细胞运动、侵袭和生长的抑癌基因。在卵巢癌中,Necdin 重新表达可以通过抑制 Src、FAK 和 RhoA 的活性来减少肌动蛋白应力纤维和局灶性粘连复合物的形成,从而抑制癌细胞迁移和入侵[22]。在骨肉瘤中,Necdin 显著抑制 SAOS-2 骨肉瘤细胞的集落形成并抑制癌细胞的增殖、侵袭、转移从而抑制肿瘤生长[23]。在牙发育过程中上皮与间充质的异常凋亡、增殖,以及上皮与间充质之间的异常迁移都可能导致牙形成的缺陷并伴随功能异常,因此 Necdin 对 EMSCs 凋亡、增殖和迁移的影响与牙齿发育密切相关。

近年来 Necdin 被报道调控多种细胞分化,参与多种神经元以及肌肉细胞、脂肪细胞等分化[24-26]。最近也发现 Necdin 在骨组织细胞分化、增殖和死亡中起重要作用[14]。骨组织和牙齿都属于矿化组织,所以在生物学特性和基质形成方面有很多共同点。本实验进一步研究了 Necdin 在 EMSCs 成牙分化和矿化中的调控作用。牙本质涎磷蛋白(Dspp)和牙本质基质蛋白 1(Dmp1)是公认的牙源性标志物,在早期成牙细胞分化和晚期牙本质矿化过程中发挥着重要作用[27-28]。Dspp 的表达是正常成牙细胞谱系分化所必需的,缺失将导致牙源性间充质干细胞分化为软骨细胞样细胞[29]。Dmp1 基因的缺失会导致牙形成和矿化的缺陷[30]。碱性磷酸酶(Alp)和 Run 相关转录因子 2(Runx2)是成骨分化和矿化的关键调节因子[31]。Alp 在矿化组织细胞中高度表达,特别在硬组织的形成中起着至关重要的作用[32]。临床研究、动物模型和分子生物学研究表明,Runx2 对于成骨细胞分化、牙板消退以及牙滤泡和牙周韧带中的破骨细胞生成至关重要,Runx2 突变会导致牙萌出困难[33-34]。沉默 Necdin 后抑制了 EMSCs 碱性磷酸酶活性和矿化结节形成能力,提示 EMSCs 的矿化能力减弱。之后通过 RT-PCR 与 Western blot 检测,发现 Dmp1、Dspp、Alp、Runx2 基因与蛋白表达均降低。由于 Necdin 沉默后影响这些成牙分化和矿化相关因子的表达,从而抑制了 EMSCs 成牙分化及矿化能力,我们推测 Necdin 调控了牙发育过程,但具体机制还不清楚。

综上,本研究发现 Necdin 在牙胚未来发生成牙分化和矿化的区域呈阳性表达,沉默 Necdin 后,促进 EMSCs 的凋亡和增殖,但抑制 EMSCs 迁移、成牙分化和矿化,表明 Necdin 可能与牙发育密切相关,但其中的调控机制及体内实验仍有待进一步研究。这一新发现有助于探索 Necdin 的功能,为进一步推进牙齿组织学工程提供了理论依据和实验基础。

参考文献:

[1] OTSU K, KUMAKAMI-SAKANO M, FUJIWARA N, *et al*. Stem cell sources for tooth regeneration: current status and future prospects[J]. Front Physiol, 2014, 5: 36. DOI: 10.3389/fphys.2014.00036.

[2] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. Cell, 2006, 126(4): 663-676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.

[3] YOSHIKAWA K. Necdin: a purposive integrator of molecular interaction networks for mammalian neuron vitality[J]. Genes Cells, 2021, 26(9): 641-683. DOI: 10.1111/gtc.12884.

[4] MARUYAMA K, USAMI M, AIZAWA T, *et al*. A novel brain-specific mRNA encoding nuclear protein (necdin) expressed in neurally differentiated embryonal carcinoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1991, 178(1): 291-296. DOI: 10.1016/0006-291x(91)91812-q.

[5] PÕLD M, ZHOU J, CHEN G L, *et al*. Identification of a new, unorthodox member of the *MAGE* gene family[J]. Genomics, 1999, 59(2): 161-167. DOI: 10.1006/geno.1999.5870.

[6] YOSHIKAWA K. Cell cycle regulators in neural stem cells and postmitotic neurons[J]. Neurosci Res, 2000, 37(1): 1-14. DOI: 10.1016/s0168-0102(00)00101-2.

[7] THESLEFF I, NIEMINEN P. Tooth morphogenesis and cell differentiation[J]. Curr Opin Cell Biol, 1996, 8(6): 844-850. DOI: 10.1016/s0955-0674(96)80086-x.

[8] LI G, LIU J Y, ZHAO M Z, *et al*. SOST, an LNGFR target, inhibits the osteogenic differentiation of rat ectomesenchymal stem cells[J]. Cell Prolif, 2018, 51(2): e12412. DOI: 10.1111/cpr.12412.

[9] YANG K, WANG Y Y, JU Y X, *et al*. p75 neurotrophin receptor regulates differential mineralization of rat ectomesenchymal stem cells[J]. Cell Prolif, 2017, 50(1): e12290. DOI: 10.1111/cpr.12290.

[10] HUANG Z Y, FUJIWARA K, MINAMIDE R, *et al*. Necdin controls proliferation and apoptosis of embryonic neural stem cells in an oxygen tension-dependent manner[J]. J Neurosci, 2013, 33(25): 10362-10373. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5682-12.2013.

[11] KUWAJIMA T, HASEGAWA K, YOSHIKAWA K. Necdin promotes tangential migration of neocortical interneurons from basal forebrain[J]. J Neurosci, 2010, 30(10): 3709-3714. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5797-09.2010.

[12] MINAMIDE R, FUJIWARA K, HASEGAWA K, *et al*. Antagonistic interplay between necdin and Bmi1 controls proliferation of neural precursor cells in the embryonic mouse neocortex[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84460. DOI: 10.1371/journal.pone.0084460.

[13] FRANÇOIS S, D'ORLANDO C, FATONE T, *et al*. Necdin enhances myoblasts survival by facilitating the degradation of the mediator of apoptosis CCAR1/CARP1[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43335. DOI: 10.1371/journal.pone.0043335.

[14] JU H, LEE S, LEE J Y, *et al*. Necdin modulates osteogenic cell differentiation by regulating Dlx5 and MAGE-D1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 489(2): 109-115. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.101.

[15] FUJIWARA K, HASEGAWA K, OHKUMO T, *et al*. Necdin controls proliferation of white adipocyte progenitor cells[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30948. DOI: 10.1371/journal.pone.0030948.

[16] KUBOTA Y, OSAWA M, JAKT L M, *et al*. Necdin restricts proliferation of hematopoietic stem cells during hematopoietic regeneration[J]. Blood, 2009, 114(20): 4383-4392. DOI: 10.1182/blood-2009-07-230292.

[17] KUWAKO K I, TANIURA H, YOSHIKAWA K. Necdin-related MAGE proteins differentially interact with the E2F1 transcription factor and the p75 neurotrophin receptor[J]. J Biol Chem, 2004, 279(3): 1703-1712. DOI: 10.1074/jbc.M308454200.

[18] KURITA M, KUWAJIMA T, NISHIMURA I, *et al*. Necdin downregulates CDC2 expression to attenuate neuronal apoptosis[J]. J Neurosci, 2006, 26(46): 12003-12013. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3002-06.2006.

[19] TENNESE A A, GEE C B, WEVRICK R. Loss of the Prader-Willi syndrome protein necdin causes defective migration, axonal outgrowth, and survival of embryonic sympathetic neurons[J]. Dev Dyn, 2008, 237(7): 1935-1943. DOI: 10.1002/dvdy.21615.

[20] MILLER N L G, WEVRICK R, MELLON P L. Necdin, a Prader-Willi syndrome candidate gene, regulates gonadotropin-releasing hormone neurons during development[J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(2): 248-260. DOI: 10.1093/hmg/ddn344.

[21] BUSH J R, WEVRICK R. Loss of Necdin impairs myosin activation and delays cell polarization[J]. genesis, 2010, 48(9): 540-553. DOI: 10.1002/dvg.20658.

[22] YANG H L, DAS P, YU Y H, *et al*. NDN is an imprinted tumor suppressor gene that is downregulated in ovarian cancers through genetic and epigenetic mechanisms[J]. Oncotarget, 2016, 7(3): 3018-3032. DOI: 10.18632/oncotarget.6576.

[23] LI J, WU Z Z, WANG J N, *et al*. Necdin, one of the

important pathway proteins in the regulation of osteosarcoma progression by microRNA-200c[J]. Bioengineered, 2022, 13(4): 8915-8925. DOI: 10.1080/21655979.2022.2056693.

[24] KUWAJIMA T, TANIURA H, NISHIMURA I, *et al*. Necdin interacts with the Msx2 homeodomain protein *via* MAGE-D1 to promote myogenic differentiation of C2C12 cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(39): 40484-40493. DOI: 10.1074/jbc.M404143200.

[25] CYPESS A M, ZHANG H B, SCHULZ T J, *et al*. Insulin/IGF-I regulation of necdin and brown adipocyte differentiation *via* CREB- and FoxO1-associated pathways[J]. Endocrinology, 2011, 152(10): 3680-3689. DOI: 10.1210/en.2011-1229.

[26] LIANG Q L, ZHENG Q, ZUO Y, *et al*. SENP2 suppresses necdin expression to promote brown adipocyte differentiation[J]. Cell Rep, 2019, 28(8): 2004-2011.e4. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.07.083.

[27] CHING H S, LUDDIN N, RAHMAN I A, *et al*. Expression of odontogenic and osteogenic markers in DPSCs and SHED: a review[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2017, 12(1): 71-79. DOI: 10.2174/1574888x11666160815095733.

[28] LIM D, WU K C, LEE A, *et al*. DSPP dosage affects tooth development and dentin mineralization[J]. PLoS One, 2021, 16(5): e0250429. DOI: 10.1371/journal.pone.0250429.

[29] GUO S L, LIM D, DONG Z H, *et al*. Dentin sialophosphoprotein: a regulatory protein for dental pulp stem cell identity and fate[J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(23): 2883-2894. DOI: 10.1089/scd.2014.0066.

[30] LU Y B, YE L, YU S B, *et al*. Rescue of odontogenesis in Dmp1-deficient mice by targeted re-expression of DMP1 reveals roles for DMP1 in early odontogenesis and dentin apposition *in vivo*[J]. Dev Biol, 2007, 303(1): 191-201. DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.11.001.

[31] KOMORI T. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by Runx2[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(7): 1694. DOI: 10.3390/ijms20071694.

[32] VIMALRAJ S. Alkaline phosphatase: structure, expression and its function in bone mineralization[J]. Gene, 2020, 754: 144855. DOI: 10.1016/j.gene.2020.144855.

[33] KREIBORG S, JENSEN B L. Tooth formation and eruption-lessons learnt from cleidocranial dysplasia[J]. Eur J Oral Sci, 2018, 126: 72-80. DOI: 10.1111/eos.12418.

[34] ZENG L, HE H, SUN M J, *et al*. Runx2 and Nell-1 in dental follicle progenitor cells regulate bone remodeling and tooth eruption[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 486. DOI: 10.1186/s13287-022-03140-3.

(**收稿**:2023-03-15;**修回**:2023-04-10)

(编辑 张 维)