论 著

经典Wnt信号通路对人牙周膜干细胞成骨分化的影响

刘冬巧[1,2]，王天齐[2,3]，段小妮[3,4]，颜 艳[5]，张淋坤[2,3]，张春香[2,3]

1. 郑州市口腔医院 正畸科(郑州450000)；2. 南开大学医学院口腔医学系 口腔正畸学(天津300071)3. 天津市口腔医院 正畸科，天津市口腔功能重建重点实验室(天津300041)；4. 天津医科大学口腔医学系 口腔正畸学(天津300070)；5. 天津市口腔医院中心实验室(天津 300041)

【摘 要】目的 探讨经典Wnt /β -catenin通路对人PDLSCs成骨分化的信号调节。**方法** 本研究从细胞、基因和蛋白水平研究了经典Wnt信号通路对人PDLSCs成骨分化的调控作用。**结果** 经典Wnt通路激活剂氯化锂(LiCl)刺激人PDLSCs后，β-catenin、Osterix和OPG的蛋白表达量相较于对照组增加($P < 0.05$)，呈剂量依赖性上调，分别增大为原对照组的1.7倍、1.2倍和1.2倍。但RANKL的表达没有改变($P > 0.05$)，导致OPG/RANKL比值变大。同时ALP、Col-I和Runx2的mRNA水平也升高($P < 0.05$)，分别增大为原对照组的1.7倍、1.5倍和2倍。用β-catenin抑制剂豆蔻素阻断经典Wnt通路，可促进细胞内β-catenin的降解，降低Osterix和OPG的蛋白表达，以及ALP、Col-I和Runx2的mRNA的表达。**结论** 经典Wnt信号通路对人PDLSCs的成骨分化有正向调节作用，为牙周组织工程中经典Wnt/β-catenin信号通路对人牙周膜干细胞成骨分化的药理学调控提供了一种可行性策略，同时也为促进正畸治疗过程中的牙齿移动以及随后的牙周组织改建提供了思路。

【关键词】 骨生物学 细胞/分子生物学 保持和稳定性 Wnt/β-catenin信号通路 人牙周膜干细胞

【中图分类号】 R783.5 **文献标志码** A DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2021.06.008

Effect of the canonical Wnt signaling pathway on osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells

LIU Dong-qiao[1,2], WANG Tian-qi[2,3], DUAN Xiao-ni[3,4], YAN Yan[5], ZHANG Lin-kun2,3, ZHANG Chun-xiang[2,3]

1. *Department of Orthodontics, Zhengzhou Stomatological Hospital, Zhengzhou 450000, China;* 2.*Department of Stomatology, School of Medicine, Nankai University, Major/Department of Orthodontics, Tianjin 300071, China*; 3.*Department of Orthodontics, Tianjin Stomatological Hospital, Tianjin Key Laboratory of Oral Function Reconstruction, Tianjin 300041, China*; 4.*Department of Stomatology, Tianjin Medical University, Major/Department of Orthodontics, Tianjin 300070 China*; 5.*Central Laboratory of Tianjin Stomatological Hospital, Tianjin300041, China*

【Abstract】Objective To investigate the canonical Wnt/β-catenin signaling regulation of osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells (PDLSCs). **Methods** In this study, the regulatory effect of the canonical Wnt signaling pathway on osteogenic differentiation of human PDLSCs were investigated at the cellular, genetic, and protein levels. **Results** After human PDLSCs were stimulated with lithium chloride (LiCl), a canonical Wnt activator, the expression of β-catenin, Osterix, and osteoprotegerin (OPG) proteins was significantly up-regulated in a dose-dependent manner ($P < 0.05$), increasing to 1.7 times, 1.2 times and 1.2 times, respectively, that in the original control group, but the expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) did not change ($P > 0.05$), resulting in an increased OPG/RANKL ratio. In addition, the mRNA levels of ALP, Col-I, and Runx2 were significantly increased ($P < 0.05$), increasing to 1.7 times, 1.5 times and 2 times, respectively, those in the original control group. Blockage of the canonical Wnt signaling pathway with cardamonin, an inhibitor of β-catenin, promoted the degradation of intracellular β-catenin, thereby down-regulating the protein expression of

基金项目：天津市卫生行业重点攻关项目(15KG119)；天津市首批卫生计生行业高层次人才选拔培养工程(津人才[2018]19号)

第一作者简介：刘冬巧，硕士。

通信作者：张春香，副主任医师，博士。E-mail：zhang_chunxiang@sina.com

Osterix and OPG and the mRNA expression of ALP, Col-I, and Runx2. **Conclusion** The canonical Wnt signaling pathway can positively regulate osteogenic differentiation of human PDLSCs, providing a viable strategy for pharmacological modulation of human PDLSC osteogenic differentiation via the canonical Wnt/β-catenin signaling pathway in periodontal tissue engineering, as well as providing ideas for accelerating tooth movement and subsequent periodontal tissue remodeling during orthodontic treatment.

【Key words】 Bone biology Cell/molecular biology Retention and stability Wnt/β-catenin signaling pathway Human periodontal ligament stem cells

牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSCs)是从牙周韧带中分离出来的一种新的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),在维持牙周组织内稳态、牙周组织再生和正畸治疗等方面发挥着重要作用。由于人PDLSCs有可能在体内形成牙骨质/牙周韧带(periodontal ligament, PDL)样结构,为牙周炎、矫创伤或正畸矫治力损伤的牙周组织的重建和再生提供了新方法[1]。最近,有研究证明Wnt信号通路在骨再生过程中起着重要的作用[2-4]。目前已鉴定的Wnt家族蛋白有19种,根据其稳定细胞内β-catenin的作用,分为两类:经典和非经典。经典Wnt信号传导通路是通过β-catenin介导的,它在经典Wnt信号传导通路中起着关键作用。而非经典Wnt /Ca^{2+}信号传导途径可激活Ca^{2+}/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II(CaMKII)[5],其信号传导不依赖于β-catenin。Wnt分子是一个分泌蛋白家族,一些Wnt蛋白,例如Wnt1、3a、4、5、10b和13,在成骨细胞形成中起着重要作用[6]。在缺少Wnt蛋白的情况下,β-catenin与含有腺瘤性息肉病大肠杆菌(adenomatous polyposis coli, APC)、糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3 beta, GSK-3β)、Axin蛋白和酪蛋白激酶1(casein kinase 1)形成复合物。在这个复合体中,GSK-3β组成性磷酸化β-catenin,导致其泛素化,并被26S蛋白酶体降解。在Wnt刺激下,Wnt蛋白与卷曲(Fz)受体和低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6(lowdensitylipoprotein receptor-related protein 5/6, LRP5/6)共受体的相互作用导致Axin/APC/GSK-3β活性的抑制[7]。这种复合体的破坏导致活性去磷酸化β-catenin的稳定和核移位,进而激活淋巴增强因子-1(lymphoid enhancer-binding factor-1, LEF-1)/T细胞因子(T lymphocyte factor, TCF)转录系统,参与细胞周期进程和分化的调节[8]。

有研究表明Wnt/β-catenin信号通路控制着干细胞向成骨细胞的分化[9-10]。已有研究发现,Wnt信号通路通过直接刺激*Runx2*基因表达促进成骨作用,这一功能在成骨细胞形成中起重要作用。同样,小鼠体内Wnt10b的过度表达可以抑制骨丧失,并通过诱导Runx2使骨髓MSCs向成骨细胞系转移。LiCl刺激MSCs作为Wnt信号通路的激活剂,可以诱导骨髓MSCs分化为成骨细胞[11]。与之相反,Wnt通路抑制因子(dickkopfs1, DKK1)则可以与LRP5结合并阻断Wnt/β-catenin信号通路,从而减少骨形成[12]。遗传学研究发现Wnt/β-catenin信号通路在间充质组织发育过程中起重要作用,其中包括骨骼成熟和牙齿形成[13-14]。然而,经典Wnt/β-catenin信号通路对骨髓MSCs成骨分化的影响仍存在争议[10, 15]。经典Wnt/β-catenin信号通路与人PDLSCs成骨分化的潜在关系尚不清楚。在本项研究中,我们试图研究经典Wnt/β-catenin信号对人PDLSCs成骨分化的调控。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

根据以往方法分离和培养人PDLSCs[16]。人PDLSCs取自12~16岁因正畸减数拔牙受试者的前磨牙,要求前磨牙没有龋坏以及其他症状,并且患者知情同意。第2~4代的PDLSCs通过CD146免疫磁珠试剂盒(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)进行PDSLCs的免疫磁珠分离。使用STRO-1, CD146, CD271和Scleraxis抗体,通过免疫细胞化学染色将分选的$CD146^{+}$细胞鉴定为人PDLSCs[16]。为了研究PDLSCs的多向分化能力,对分离的细胞进行成骨和成脂分化能力的检测[16]。将人PDLSCs传代3~4代后用于后续实验研究。细胞在含有5%胎牛血清、10 nM地塞米松、10 mM β-甘油磷酸酯和50 μg/mL L-抗坏血酸的成骨培养基中培养3 d,培养基分为添加和不添加氯化锂(GSK3β抑制剂)或豆蔻素(Wnt/β-catenin抑制剂)。人PDLSCs的收集和培养得到了南开大学天津市口腔医院伦理委员会的批准(2009026)。

1.2 细胞活力测定

将人PDLSCs接种于6孔板中,分别用豆蔻素或氯化锂处理3 d。使用Beckman Coulter Vi-Cell测量三次细胞活力。

表1 RNA提取及实时定量RT-PCR

Target gene	Primers	Sequence	Fragment Size
Runx2	Forward	5′-CAGATGGGACTGTGGTTACTGT-3′	169 bp
	Reverse	5′-GTGAAGACGGTTATGGTCAAGG-3′	
ALP	Forward	5′- CAGATGAAGTGGGAGTGCTTGT -3′	115 bp
	Reverse	5′-CTGATGTGGAGTATGAGAGTGACG-3′	
Col-I	Forward	5′-CCACCTGCCTCTGGCTTCT -3′	68 bp
	Reverse	5′- AGCTGTGGAGGAGGGTTTCA -3′	
GAPDH	Forward	5′- GGAAGGTGAAGGTCGGAGT -3′	229 bp
	Reverse	5′-TGGAAGATGGTGATGGGATT-3′	

在细胞培养第5 d,使用豆蔻素或LiCl最后一次处理样本后2 h,用Trizol试剂(Invitrogen)分别提取不同培养条件下人PDLSCs的总核糖核酸(ribonucleic acid,RNA)。然后用分光光度计测定所提取RNA的浓度和纯度,结果显示总RNA的纯度高达95%或者更高。RNA分离后,使用SYBR-PrimeScript™逆转录聚合酶链反应试剂盒(中国,Takara),在每10 μL反应体积中使用500 ng RNA进行反向转录脱氧核糖核酸(complementary deoxyribonucleic acid, cDNA)合成,每个反应体积包含0.5 μL PrimeScript™ RT酶混合物I,0.5 μL oligo dT引物,2.0 μL PrimeScript™缓冲液和0.5 μL随机6聚体。使用ABI PRISM 7300实时PCR系统(Applied Biosystems,US)重复测量三次RT-PCR。根据GenBank数据库合成了*Runx2*、*ALP*、*Col-I*和*GAPDH*的引物序列,如表1所示。本实验采用$2^{-\Delta\Delta CT}$方法计算基因表达水平。实验数据显示为相对于对照组的折叠变化。为保证扩增产物的纯度,绘制了每次PCR反应的熔融曲线。

1.3 Western blot分析

从培养液取出细胞后,用冷PBS洗涤2次,在缓冲液(Keygen total protein extraction kit, Keygen Biotech,China)中裂解20 min。然后将裂解后的混合物在4 °C下14 000 r离心15 min后,收集上清液,用BCA蛋白检测试剂盒进行定量测定。每个样本为30 ~ 50μg等量的细胞裂解物,将其放在10 % SDS-PAGE凝胶上运行,然后转移到PVDF膜(Bio-Rad)上。如前所述进行Western blot分析[16]。封闭后,用抗β-catenin、Osterix、OPG、RANKL和GAPDH(Abcam,Cambridge,MA,USA)的一抗进行检测,然后加入辣根过氧化物酶偶联的二抗(中国北京中山生物有限公司)。之后使用化学发光试剂盒(Millipore,Billerica,MA,USA)观察免疫反应蛋白,使用ChemiDoc XRS凝胶文档系统和Quantity One软件(Bio-Rad,Hercules,CA,USA)测定条带强度。

1.4 统计学分析

本实验数据均使用SPSS 17.0(SPSS Inc,Chicago,IL,USA)进行处理,计量资料用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析(one-ANOVA)进行组间比较。$P < 0.05$为有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞活力测定

豆蔻素的结构如图1A所示。我们用Beckman Coulter Vi-Cell检测了豆蔻素和LiCl对细胞活力的影响。另外在进行六组数据的单因素方差分析前先进行整体分析,结果显示各组之间细胞活力的差异无统计学意义($F = 2.170$,$P > 0.05$)。如图1B所示,各组数据无统计学差异($P > 0.05$),即豆蔻素、二甲基亚砜(DMSO)和LiCl没有表现出任何明显的细胞毒性作用。

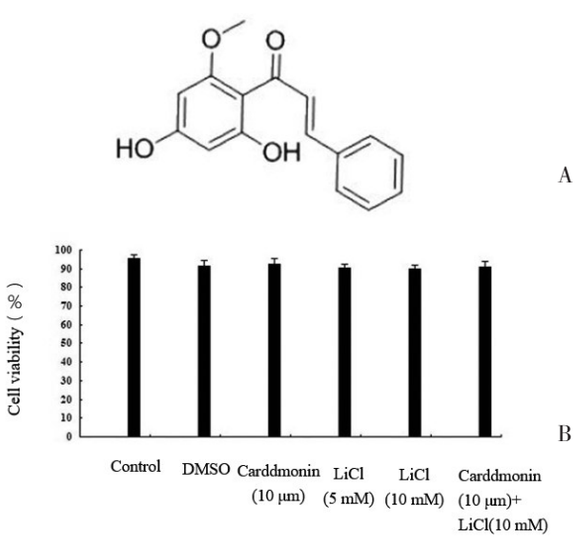


图1 豆蔻素结构以及细胞活力检测结果

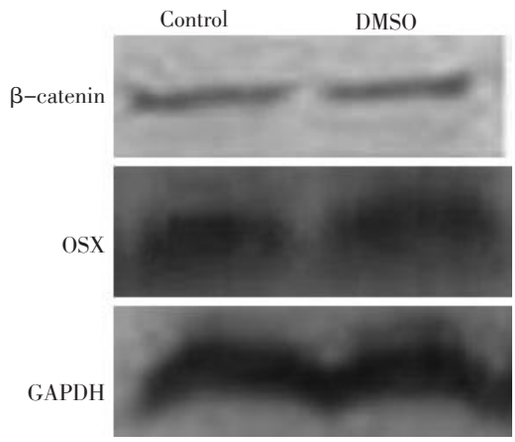


图2 DMSO组和正常对照组的蛋白表达情况

2.2 豆蔻素通过促进β-catenin降解来抑制Wnt/β-catenin的信号转导

为了检验二甲基亚砜(DMSO)对实验是否有干扰,我们比较了DMSO组和正常对照组的蛋白质表达情况。如图2所示,β-catenin和Osterix在两组间的表达无明显差异($P > 0.05$),说明DMSO对实验的影响可以忽略不计。用抗β-catenin抗体进行免疫印迹试验分析,观察豆蔻素对细胞内β-catenin水平的影响。如图3所示,β-catenin水平降低。GSK-3β导致β-catenin的降解,而LiCl是一种GSK-3β的抑制剂,我们用豆蔻素和LiCl来培养牙周膜干细胞来排除GSK-3β的影响。Western blot分析结果显示,DMSO组和正常对照组有统计学差异($P < 0.05$),豆蔻素可降低细胞内β-catenin的表达。

2.3 经典Wnt通路对PDLSCs成骨分化的促进作用

LiCl是Wnt/β-catenin信号通路的激活剂,提高了β-catenin的表达(图3)。通过评估成骨细胞特异性转录因子Osterix蛋白表达的变化,以剂量依赖的方式支持Wnt信号在hPDLSCs中的成骨潜力(图3)。在进行五组数据的单因素方差分析前先进行整体分析,结果显示各组之间细胞活力的差异有统计学意义($F = 6.270$, $P < 0.05$)。Western blot分析结果表明,LiCl培养3 d后,OPG的表达增加($P < 0.05$),RANKL表达无明显变化($P > 0.05$),因此OPG/RANKL比值增加(图4)。为了证实LiCl促进成骨的作用,我们采用了实时RT-PCR的方法,以*ALP*、*Col-I*和*Runx2*作为其他成骨靶基因的例子。经过LiCl处理后,各组信使核糖核酸(messenger ribonucleic acid,mRNA)水平均呈剂量依赖性升高(图5)。上述结果表明,经典Wnt通路促进PDLSCs向成骨细胞分化。

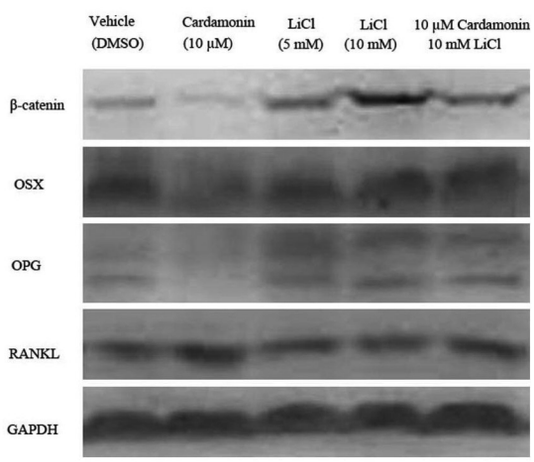
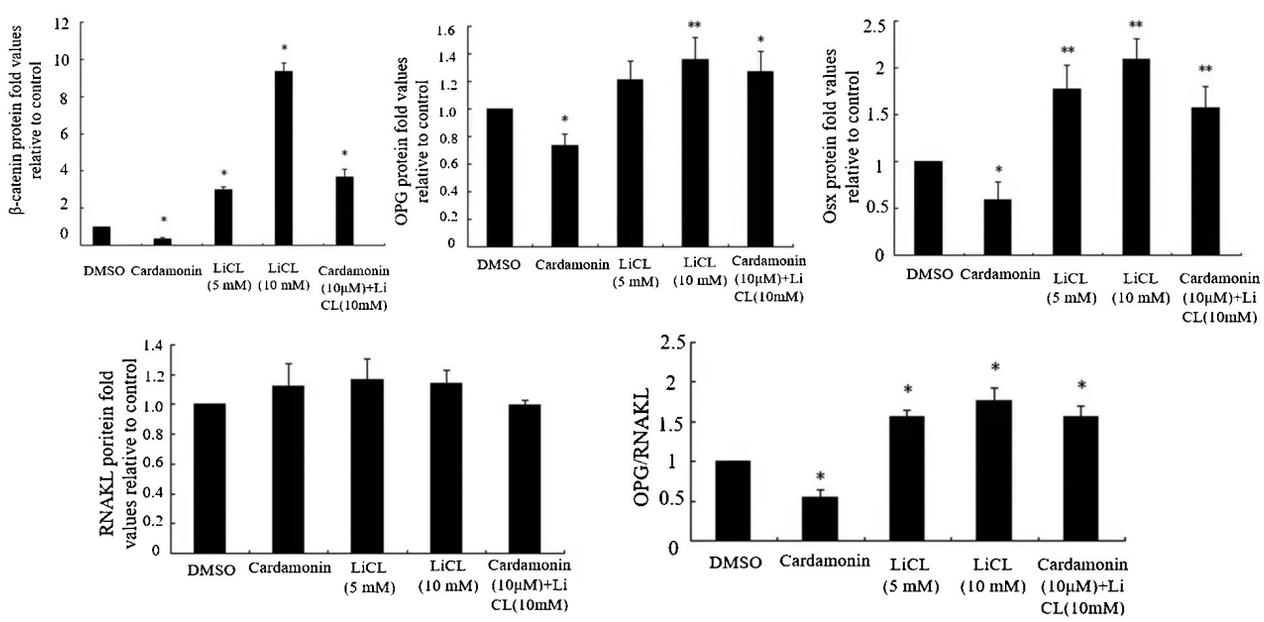


图3　各组Western blot分析结果

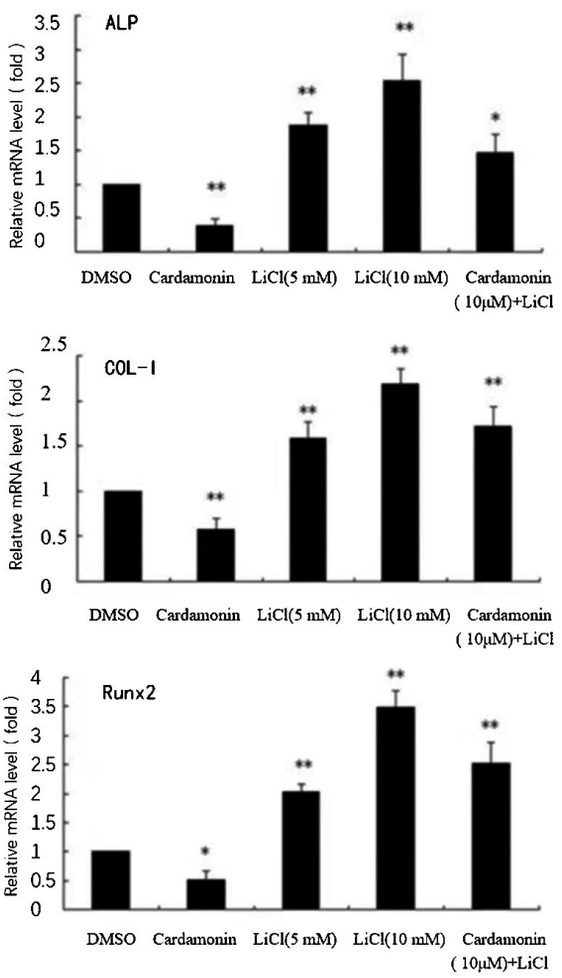


注:*表示$P < 0.05$,**表示$P < 0.01$

图4　各组蛋白表达情况

2.4 豆蔻素对PDLSCs成骨分化的抑制作用

为了确定经典Wnt/β-catenin信号通路是否对PDLSCs的成骨有正向调节作用,将这些细胞与豆蔻素培养,豆蔻素可促进细胞内β-catenin的降解,并抑制经典的Wnt/β-catenin信号传导。对五组数据进行单因素方差分析前先进行整体分析,显示各组之间的表达量差异有统计学意义($F=8.18$,$P<0.05$)。最终的结果表明豆蔻素能降低Osterix和OPG的表达,导致OPG/RANKL比值降低(图4)。同时豆蔻素也降低了成骨因子ALP、Col-I和Runx2的mRNA水平。此外,豆蔻素减弱了LiCl诱导的成骨分化刺激作用,提示豆蔻素通过典型的Wnt/β-catenin信号通路抑制成骨分化(图5)。



注:*表示$P<0.05$,**表示$P<0.01$

图5 各组mRNA表达情况

3 讨论

人牙周膜组织源性间充质干细胞(PDLSCs)具有克隆形成能力强、增殖能力强等特点,可用于干细胞介导的治疗和组织工程。正畸牙齿的移动是由于外加的机械力而引起的组织重建的结果。PDLSCs则在正畸牙齿的移动过程中和过程后发挥着动态作用。组织再生和重建的过程受不同的信号通路控制。来自几个团队的最新研究阐明了经典Wnt/β-catenin信号通路在骨骼发育和出生后骨量维持中的重要性[2]。作为经典Wnt信号通路协助受体,人类的*LRP5*如果发生功能缺失的突变,就会导致骨质疏松症-假性胶质瘤综合征,在这种综合征中,人们表现为低骨密度和骨骼脆性。相反,激活人类*LRP5*的突变发生会导致患者骨密度增加[17]。几项对于基因敲除小鼠的优等研究也证实,经典的wnt/β-catenin信号通路对于骨骼发育和出生后骨量的维持是必不可少的[2-3]。

Wnt信号通路通过控制间充质干细胞或成骨细胞的功能进而参与成骨的过程。细胞和分子水平的研究表明,β-catenin和Tcf蛋白共同调节成骨细胞对于OPG的表达,OPG是破骨细胞分化的主要抑制剂。在βcat(ex3)ob成骨细胞中,OPG的表达明显增加,而作为主要破骨细胞分化因子的RANKL的表达则略有增加[18]。在矿化培养基中分化5 d和10 d后,β-catenin成骨细胞中OPG mRNA的表达与对照组相比降低,而RANKL的表达增加[3]。Wnt/β-catenin信号通路会促进MSCs(骨髓间充质干细胞)向成骨细胞分化[10]。用LiCl刺激MSCs,作为Wnt信号通路的激活剂,可以诱导MSCs向成骨细胞分化[11]。相反,Dickkopfs1(DKK1)抑制Wnt/β-catenin信号转导,可与LRP5结合,阻断Wnt/β-catenin信号转导,抑制BMSCs的成骨分化,减少骨的形成[12]。这些重要的发现表明,Wnt/β-catenin信号通路的激活可能有助于改善骨或牙齿的组织工程。在牙齿发育过程中,人们发现经典Wnt信号通路作用于牙齿形态形成的多个阶段[19]。虽然Wnt信号通路在牙周发育和动态平衡中的作用尚不清楚,但越来越多的数据表明,Wnt信号通路的激活是牙周组织(如牙骨质、牙周膜和牙槽骨)再生所必需的。然而,经典Wnt信号通路与PDLSCs成骨分化之间的潜在关系尚不清楚。

在本项研究中,通过在人体PDLSCs中加入GSK-3β抑制剂LiCl来模拟Wnt的作用,并检测经典Wnt信号通路是否对这些细胞的成骨分化有积极的影响。经过LiCl的处理可升高PDLSCs在成骨诱导培养基中的成骨特异性基因和蛋白的表达。LiCl可促进OPG的表达,但不改变RANKL的表达,从而增加OPG/RANKL的比值。这一结果表明,使用可以上调经典Wnt信号通路的药物可以促进PDLSCs的成骨分化。成骨转录因子包括Runx2和Osterix是调节

成骨细胞定位和间充质细胞成骨分化所必需的[20]。与以前的研究一致，本研究表明LiCl以剂量依赖的方式提高Osterix、Runx2、ALP和Col-I的水平。以前的研究表明，Wnt信号通路上调β-catenin蛋白水平足以促进Runx2的表达，从而导致成骨细胞分化。反之，作为一种新型的Wnt/β-catenin信号的小分子抑制剂，不论有没有LiCl，豆蔻素能以剂量依赖性下调细胞内β-catenin的表达[21]，从而抑制成骨因子的表达，但不会改变RANKL的表达。豆蔻素会减弱LiCl的一些积极作用，这表明豆蔻素可通过经典Wnt信号通路抑制hPDLSCs的成骨分化。Cho等[22]的研究表明，剂量 ≤ 10 μM的豆蔻素可抑制65% ~ 70%的β-catenin活性，而不影响细胞活力。也有学者指出豆蔻素引起*ALP*、*OCN*、*OPN*、*BSP*、*CAP*、*CEMP1*等成骨基因表达下降，从而导致相应的蛋白合成减少[23]。瞬时受体电位通道（TRP）参与了疼痛信号转导通路的激活或调节。有研究表明豆蔻素可以通过抑制TRPV1离子通道发挥显著的镇痛作用[24]。为了避免此项干扰作用，提示我们后续实验可以采用特定siRNA或者其他Wnt通路抑制剂，用以佐证豆蔻素在Wnt信号通路中的作用。细胞内β-catenin水平受多种途径控制：GSK-3β依赖途径、PKCα依赖途径和Siah依赖途径。在GSK-3β依赖途径中，GSK-3β与腺瘤性息肉大肠杆菌和轴蛋白形成破坏复合物，磷酸化β-catenin的末端丝氨酸/苏氨酸残基，通过泛素依赖机制促进其降解[25]。β-catenin的N-末端丝氨酸/苏氨酸残基也会被PKCα磷酸化，也会导致泛素依赖的β-catenin降解[26]。在Siah依赖的途径中，Siah-1与腺瘤性息肉病结肠腺瘤性结肠炎的羧基末端相互作用，从而吸附泛素化复合体，促进β-catenin的降解[27]。在本研究中，豆蔻素能诱导细胞内β-catenin在LiCl（已知的GSK-3β抑制剂）存在的情况下发生降解。这些结果表明，豆蔻素胞内降解β-catenin的途径可能是通过Siah途径和/或依赖PKCα途径，而不是通过GSK-3β途径。经典Wnt/β-catenin信号通路通过一系列机制增加骨量，包括干细胞更新，刺激成骨细胞复制，诱导成骨，抑制成骨细胞和骨细胞的凋亡[25]。Heo等[28]的研究表明，在成骨转录因子的刺激下，经典Wnt信号通路会导致PDLC分化为成骨细胞系。Wnt/β-catenin信号通路会促进祖细胞向成骨细胞分化[9]。与之前的一些研究结果一致，本研究发现Wnt/β-catenin信号通路促进了PDLSCs的成骨分化。与之相矛盾的是，有多篇文章表明Wnt/β-catenin信号通路在体外会抑制MSCs的成骨分化和矿化[15,29]。例如，一项研究表明，wnt/β-catenin信号通路会负向调节牙髓干细胞向成牙本质细胞的分化[14]。Liu的研究指出，β-catenin的激活抑制了非经典的Wnt/Ca^{2+}途径，导致炎症微环境中PDLSCs的增殖增加，但成骨分化减少[30]。Nemotot等[31]观察到Wnt信号通路会抑制成牙骨质细胞分化并促进细胞的增殖。鉴于祖细胞成骨分化调控的复杂性，我们要阐明Wnt/β-catenin信号通路在调控MSCs成骨分化中的确切机制是非常困难的。在这方面，我们的研究结果与前面的一些研究结果是一致的[11,13-14]，但与其他研究人员也有不同之处[14-15,29]。我们认为这种差异在于Wnt靶基因转录的基因特异性激活因子和/或抑制因子存在于细胞环境中，这或许取决于细胞类型和/或分化阶段[32]。在未来，开发一个模型系统来测试规范的Wnt信号对人体PDLSCs增殖和成骨分化的影响将会是很有意义的。综上所述，本文报道的结果首次证明Wnt/β-catenin信号可以促进PDLSCs的成骨分化。我们的研究结果表明，对经典Wnt信号通路进行药理学调节可以提高hPDLSCs的成骨能力，为牙周组织工程提供了一种可行的策略。据了解，正畸治疗后复发的风险一直会持续到牙槽骨改建完成，因此我们的研究结果启发我们提出，通过调节Wnt/β-catenin信号对PDLSCs成骨分化的影响，正确调控正畸牙移动后的牙槽骨改建，可以预防移动牙齿的复发。LiCi是Wnt通路激活剂，本研究的局限性在于只检验mRNA的表达不足以证明经典Wnt信号通路对人牙周膜干细胞的成骨分化具有正向调节作用，后续应增加实验增强结论的正确性。

4 结论

经典Wnt信号通路对人PDLSCs的成骨分化有正向调节作用，为牙周组织工程中经典Wnt/β-catenin信号通路对人牙周膜干细胞成骨分化的药理学调控提供了一种可行性策略，同时也为促进正畸治疗过程中的牙齿移动以及随后的牙周组织改建提供了思路。

参 考 文 献

[1] Liu J, Ruan JP, Weir MD, *et al*. Periodontal bone-ligament-cementum regeneration via scaffolds and stem cells[J]. Cells, 2019, 8(6): 537.

[2] Karner CM, Long F. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts[J]. Cell Mol Life Sci, 2017, 74(9): 1649-1657.

[3] Yu CX, Xuan M, Zhang MZ, *et al*. Postnatal deletion of β -catenin in osterix-expressing cells is necessary for bone growth and intermittent PTH-induced bone gain[J]. J Bone Miner Metab, 2018, 36(5): 560-572.

[4] Oichi T, Otsuru S, Usami Y, *et al*. Wnt signaling in

chondroprogenitors during long bone development and growth[J]. Bone, 2020, 137: 115368.

[5] Yang K, Wang X, Zhang HM, *et al*. The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies[J]. Lab Invest, 2016, 96(2): 116-136.

[6] Williams BO. Genetically engineered mouse models to evaluate the role of Wnt secretion in bone development and homeostasis[J]. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2016, 172C(1): 24-26.

[7] Hua Y, Yang YL, Li Q, *et al*. Oligomerization of frizzled and LRP5/6 protein initiates intracellular signaling for the canonical WNT/β-catenin pathway[J]. J Biol Chem, 2018, 293(51): 19710-19724.

[8] Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors[J]. J Biol Chem, 2006, 281(32): 22429-22433.

[9] Teufel S, Hartmann C. Wnt-signaling in skeletal development[J]. Curr Top Dev Biol, 2019, 133: 235-279.

[10] Hu LF, Su PH, Yin C, *et al*. Microtubule actin crosslinking factor 1 promotes osteoblast differentiation by promoting β-catenin/TCF1/Runx2 signaling axis[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(2): 1574-1584.

[11] Frey JL, Li Z, Ellis JM, *et al*. Wnt-Lrp5 signaling regulates fatty acid metabolism in the osteoblast[J]. Mol Cell Biol, 2015, 35(11): 1979-1991.

[12] Morvan F, Boulukos K, Clément-Lacroix P, *et al*. Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass[J]. J Bone Miner Res, 2006, 21(6): 934-945.

[13] Sasaki T, Ito Y, Xu X, *et al*. LEF1 is a critical epithelial survival factor during tooth morphogenesis[J]. Dev Biol, 2005, 278(1): 130-143.

[14] Järvinen E, Shimomura-Kuroki J, Balic A, *et al*. Mesenchymal Wnt/β-catenin signaling limits tooth number[J]. Development, 2018, 145(4): dev158048.

[15] de Boer J, Siddappa R, Gaspar C, *et al*. Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Bone, 2004, 34(5): 818-826.

[16] Zhang CX, Li J, Zhang LK, *et al*. Effects of mechanical vibration on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells[J]. Arch Oral Biol, 2012, 57(10): 1395-1407.

[17] Boyden LM, Mao J, Belsky J, *et al*. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5[J]. N Engl J Med, 2002, 346(20): 1513-1521.

[18] Albers J, Keller J, Baranowsky A, *et al*. Canonical Wnt signaling inhibits osteoclastogenesis independent of osteoprotegerin[J]. J Cell Biol, 2013, 200(4): 537-549.

[19] Wu XS, Li Y, Wang F, *et al*. Spatiotemporal expression of Wnt/β-catenin signaling during morphogenesis and odontogenesis of deciduous molar in miniature pig[J]. Int J Biol Sci, 2017, 13(8): 1082-1091.

[20] Lee YJ, Park SY, Lee SJ, *et al*. Ucma, a direct transcriptional target of Runx2 and Osterix, promotes osteoblast differentiation and nodule formation[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, 23(8): 1421-1431.

[21] Hou GC, Yuan X, Li Y, *et al*. Cardamonin, a natural chalcone, reduces 5-fluorouracil resistance of gastric cancer cells through targeting Wnt/β-catenin signal pathway[J]. Invest New Drugs, 2020, 38(2): 329-339.

[22] Kim KI, Jeong DS, Jung EC, *et al*. Wnt/β-catenin signaling inhibitor ICG-001 enhances pigmentation of cultured melanoma cells[J]. J Dermatol Sci, 2016, 84(2): 160-168.

[23] Zhou YH, Wu CT, Zhang XF, *et al*. The Ionic products from bredigite bioceramics induced cementogenic differentiation of periodontal ligament cells via activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway[J]. J Mater Chem B, 2013, 1(27): 3380-3389.

[24] Ping CP, Tengku Mohamad TAS, Akhtar MN, *et al*. Antinociceptive effects of cardamonin in mice: possible involvement of $TRPV_1$, glutamate, and opioid receptors[J]. Molecules, 2018, 23(9): 2237.

[25] Wang Z, Jia Y, Du F, *et al*. IL-17A inhibits osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells via Wnt signaling pathway[J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 4095-4101.

[26] Jiang WK, Wang DY, Alraies A, *et al*. Wnt-GSK3 β/β-catenin regulates the differentiation of dental pulp stem cells into bladder smooth muscle cells[J]. Stem Cells Int, 2019, 2019: 8907570.

[27] Gonulcu SC, Unal B, Bassorgun IC, *et al*. Expression of notch pathway components (numb, itch, and siah-1) in colorectal tumors: a clinicopathological study[J]. World J Gastroenterol, 2020, 26(26): 3814-3833.

[28] Heo JS, Lee SY, Lee JC. Wnt/β-catenin signaling enhances osteoblastogenic differentiation from human periodontal ligament fibroblasts[J]. Mol Cells, 2010, 30(5): 449-454.

[29] Huang XB, Zhong LL, Hendriks J, *et al*. The effects of the WNT-Signaling modulators BIO and PKF118-310 on the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2): 561.

[30] Liu N, Shi ST, Deng MJ, *et al*. High levels of β-catenin signaling reduce osteogenic differentiation of stem cells in inflammatory microenvironments through inhibition of the noncanonical Wnt pathway[J]. J Bone Miner Res, 2011, 26(9): 2082-2095.

[31] Nemoto E, Koshikawa Y, Kanaya S, *et al*. Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation[J]. Bone, 2009, 44(5): 805-812.

[32] Eijken M, Meijer IMJ, Westbroek I, *et al*. Wnt signaling acts and is regulated in a human osteoblast differentiation dependent manner[J]. J Cell Biochem, 2008, 104(2): 568-579.

(2020-09-11 收稿)