

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2019.01.005

· 基础研究 ·

## 瘦素对人根尖乳头干细胞成骨/成牙本质相关基因表达的影响

尹小萍<sup>1</sup>, 熊华翠<sup>2</sup>, 陈柯<sup>2</sup>, 黄颖<sup>3</sup>, 徐帅妹<sup>2</sup>

1. 桂林医学院口腔科, 广西壮族自治区 桂林(541000); 2. 南方医科大学口腔医院, 广东 广州(510280);  
3. 南方医科大学顺德医院口腔医学中心, 广东 佛山(528000)

**【摘要】** 目的 探讨瘦素(leptin)对人根尖乳头干细胞(human stem cells from the apical papilla, hSCAPs)增殖及成骨/成牙本质相关基因表达的影响,为临床年轻恒牙根尖持续发育的研究提供实验基础。方法 采用人根尖乳头组织块培养法获得hSCAPs,以免疫荧光染色法、Western blot和qRT-PCR分别检测hSCAPs中leptin及其受体OBRb蛋白及基因的表达。实验组用质量分数为0.1 μg/mL的leptin(0.1 μg/mL组)和1.5 μg/mL的leptin(1.5 μg/mL组)分别刺激hSCAPs,对照组仅加入α-MEM培养基,CCK-8、流式细胞仪法、qRT-PCR分别检测各组hSCAPs增殖情况及成骨/成牙本质相关基因:碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、牙本质基质蛋白-1(dentin matrix protein-1, DMP-1)和牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP)、骨钙素(osteocalcin, OCN)mRNA的表达。结果 hSCAPs表达leptin及其受体OBRb的蛋白及基因。与对照组相比,实验组细胞增殖能力及S期细胞比例均高于对照组( $P < 0.05$ ),且其中1.5 μg/mL组高于0.1 μg/mL组( $P < 0.05$ )。3 d和7 d时,0.1 μg/mL组、1.5 μg/mL组hSCAPs的ALP、DMP-1、DSPP mRNA的表达量高于对照组,且1.5 μg/mL组高于0.1 μg/mL组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),14 d时0.1 μg/mL组、1.5 μg/mL组hSCAPs的ALP、DMP-1、DSPP mRNA的表达量明显低于对照组( $P < 0.05$ );0.1 μg/mL组、1.5 μg/mL组OCN mRNA的表达量于7 d、14 d时高于对照组,且1.5 μg/mL组均高于0.1 μg/mL组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),于14 d达到峰值。结论 Leptin可促进hSCAPs增殖,并上调hSCAPs成骨/成牙本质相关基因的表达。

**【关键词】** 牙源性; 根尖乳头干细胞; 瘦素; 成骨/成牙本质相关基因; 分化; 牙本质基质蛋白-1; 牙本质涎磷蛋白; 骨钙素

**【中图分类号】** R781 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)01-0023-07

**【引用著录格式】** 尹小萍,熊华翠,陈柯,等.瘦素对人根尖乳头干细胞成骨/成牙本质相关基因表达的影响[J].口腔疾病防治,2019,27(1):23-29.

**The effects of leptin on osteogenesis/odontogenic related gene expression of human apical papillary stem cells**  
YIN Xiaoping<sup>1</sup>, XIONG Huacui<sup>2</sup>, CHEN Ke<sup>2</sup>, HUANG Ying<sup>3</sup>, XU Shuaimei<sup>2</sup>. 1. Dental Treatment Department of Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541000, China; 2. Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 518280, China; 3. Stomatological center of Shunde Hospital of Southern Medical University, Foshan 528000, China

Corresponding author: CHEN Ke, Email:dentchenke@sohu.com, Tel: 0086-18902404293.

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of leptin on the proliferation of stem cells from human stem cells from the apical papilla (hSCAPs) and the expression of osteogenic/dentinogenic genes in vitro to provide an experimental basis for the sustainable development of young permanent teeth. **Methods** The tissue block method was used to isolate and culture hSCAPs from the apical papilla of the immature third permanent molar. The expression of leptin and

**【收稿日期】** 2018-09-11; **【修回日期】** 2018-11-10

**【基金项目】** 广州市科技计划项目(201510010160);广州市妇女儿童医疗中心儿研所内部基金(0160047);国家自然科学基金项目(81800957)

**【作者简介】** 尹小萍,住院医师,硕士,Email: 952574066@qq.com

**【通信作者】** 陈柯,主任医师,硕士,Email: dentchenke@sohu.com, Tel: 0086-18902404293

OBRb in hSCAPs was detected using immunocytofluorescence staining, western blotting and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. The hSCAPs was treated with 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of leptin (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  group) or 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of leptin (1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  group) at different time points. The control group was treated with alpha-MEM medium. Cell proliferation was measured using the CCK8 assay and cell cycle analysis. QRT-PCR was used to detect the expression of related osteoblast/odontogenic genes for alkaline phosphatase (ALP), dentin matrix protein -1 (DMP-1), dentin sialophosphoprotein (DSPP), and osteocalcin (OCN) mRNA. The differences between the treatment groups and the control group were analyzed statistically using one-way ANOVA followed by Bonferroni analysis. **Results** The expression of both leptin and OBRb were found in hSCAPs. Compared with the control group, the cell proliferation capacity and S phase cells in the treatment groups were higher than those in the control group, with the 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  group displaying higher levels than 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  group, and the treated hSCAPs demonstrated a higher proliferation rate and a higher expression of ALP, DSPP, and DMP-1 from day 3 to day 7, with the 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  group displaying higher levels than 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ), at day 7. The treated hSCAPs demonstrated a lower expression of ALP, DSPP, and DMP-1. Compared with the control group, the treated hSCAPs demonstrated a higher expression of OCN from day 7 to day 14, with significantly higher expression in the 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  group compared to the 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  group. **Conclusion** Leptin may promote cell proliferation and upregulate the expression of relative osteogenic/dentinogenic genes.

**【Key words】** Odontogenic; Apical papilla stem cells; Leptin; Osteogenic/dentinogenic genes; Differentiation; Dentin matrix protein-1; Dentin sialophosphoprotein; Osteocalcin

Sonoyama 等<sup>[1]</sup>于2006年首次从人阻生智齿根尖部分离培养获得一种新的间充质干细胞—根尖乳头干细胞 (stem cells from the apical papilla, SCAPs)。研究结果显示,人根尖乳头干细胞 (human stem cells from the apical papilla, hSCAPs) 不仅具有高度的增殖和自我更新能力,还可在体外经诱导向成骨/成牙本质、成脂、成软骨及神经元方向分化<sup>[1-2]</sup>。部分患有牙髓炎或根尖周炎的年轻恒牙,其牙根经适当治疗后仍能持续发育成形,推测可能与根尖周围组织的干细胞 hSCAPs 在牙根发育过程中介导的牙本质再生有关<sup>[3]</sup>。瘦素 (leptin) 主要是由白色脂肪组织分泌的一种非糖基化蛋白类激素<sup>[4]</sup>, 不仅参与调控能量代谢<sup>[5]</sup>, 还参与脂类代谢、骨代谢、炎症反应、免疫功能等许多重要的生理过程<sup>[6]</sup>。leptin 受体 (leptin receptor, OBR), 属于 I 型细胞因子受体家族, 其中 OBRb 是主要的功能受体, 与 leptin 结合后激活多条信号转导通路, 从而产生各种生物学效应<sup>[4]</sup>。研究证实, 钟状期牙胚中成釉细胞、中间层细胞、成牙本质细胞、牙乳头中均表达 leptin, 且在牙乳头的上 1/3 部分, 即靠近成牙本质部位细胞层的区域, 表达更多的 leptin<sup>[7]</sup>。Martin 等<sup>[8]</sup>采用免疫组化方法发现 leptin 受体 OBRb 仅在成牙本质细胞层表达, 而在牙髓组织中心区域几乎无表达, 提示 leptin 可能与牙根发育过程中的成牙本质分化有关。作为牙髓细胞和

成牙本质细胞的前体细胞, hSCAPs 是否表达 leptin 及其高亲和力功能受体 OBRb, 调控其成骨/成牙本质分化, 从而影响牙根持续发育, 目前尚未见 leptin 在此过程中的作用研究。本研究的目的是探讨 leptin 对 SCAPs 增殖及成骨/成牙本质分化相关基因表达的影响, 为临床年轻恒牙根尖持续发育提供实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

$\alpha$ -MEM 培养基、10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, 美国); 0.25%胰酶 (杭州吉诺公司); PBS 粉剂 (武汉博士德公司); leptin 抗体、leptin 受体抗体 (Abcam, 美国); 鼠抗人 Stro-1 单克隆抗体、鼠抗人 CD24 多克隆抗体、鼠抗人波形丝蛋白多克隆抗体、鼠抗人角蛋白多克隆抗体; 兔抗鼠荧光二抗、鼠抗兔荧光二抗 (中杉金桥生物技术有限公司); FITC 绿色荧光抗体 (Santa Cruz, 美国);  $\beta$ -actin (Cell Signaling Technology, 美国); NucleoSpin<sup>®</sup>RNA 提取试剂盒 (Machery-Nagel, 德国); 逆转录试剂盒、SYBR Green qRT-PCR 试剂盒 (Takara, 日本);  $\beta$ -甘油磷酸钠、地塞米松、维生素 C (Sigma, 美国); CCK-8 试剂盒 (上海贝博公司); 细胞周期试剂盒 (BD, 美国); 倒置相差显微镜及照相系统 (Olympus CKX41, 日本); 荧光倒置相差显微镜

(Nikon, 日本); 酶联免疫检测仪(Biotek, 美国); 7500 实时 qRT-PCR 仪(ABI 公司, 美国); 25 cm<sup>2</sup> 塑料细胞培养瓶、35 mm 培养皿(Corning, 美国); 6 孔细胞培养板、12 孔细胞培养板、96 孔细胞培养板(Costar, 美国)。

## 1.2 hSCAPs 的分离培养、纯化及鉴定

**1.2.1 hSCAPs 的分离培养** 选取人根尖孔尚未闭合的埋伏阻生智齿(无牙体牙髓疾病)。牙齿完整拔出后,用含 2% 双抗的无菌 PBS 大量冲洗,在无菌条件下剪取牙乳头组织,完全培养基反复冲洗,剪成约 1 mm<sup>3</sup> 大小均匀铺于 25 cm<sup>2</sup> 的培养瓶底部,加入 4 mL 完全培养基于 37 ℃,体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中静置培养,72 h 半量换液,于倒置显微镜下观察细胞形态,待组织块周围细胞较密集时用胰蛋白酶消化传代培养。

**1.2.2 hSCAPs 的有限稀释法克隆化培养、纯化及鉴定** 取对数生长期的第 1 代 hSCAPs 制成细胞悬液,调整细胞密度至 10-15 个/mL,以 100 μL/孔接种于 96 孔培养板中,次日标记单个细胞孔,并补液至 200 μL/孔,72 h 换液,待单克隆细胞长满孔底约 80% 时,胰酶消化并传代以扩大培养。取扩大培养后的细胞制备细胞爬片,免疫荧光染色法鉴定波形丝蛋白、角蛋白、Stro-1 及 CD24 的表达,以确定细胞来源及其干细胞特性。

## 1.3 hSCAPs 中 leptin 及其受体 OBRb 的鉴定

**1.3.1 免疫荧光染色法** 取生长状态良好的第 3 代 hSCAPs,胰蛋白酶消化以制备细胞悬液,调整细胞密度为 3 × 10<sup>4</sup> 个/mL。将 1 mm<sup>2</sup> 无菌盖玻片预先置于 12 孔细胞培养板内,吸取细胞以 1 mL/孔均匀接种于培养板,每组设置 3 个复孔。倒置显微镜下观察细胞生长情况,待玻片上细胞密度约达 50% 时,PBS 冲洗后,4% 多聚甲醛固定细胞 20 min,PBS 冲洗,0.25% Triton X-100 室温通透 5 min,PBS 冲洗,5% BSA 室温下摇床封闭 30 min 后,4 ℃ 过夜孵育 leptin 抗体(1:10)、OBRb 抗体(1:10)及 PBS(阴性对照组),每组 3 个复孔。次日,PBS 冲洗后,于避光条件下,leptin 抗体组加入鼠抗兔荧光二抗、OBRb 抗体组加入 FITC 二抗,37 ℃ 避光孵育 1 h,0.8 μg/mL DAPI 染核 10 min,中性树脂封片。避光条件下激光共聚焦显微镜观察 leptin 及 OBRb 蛋白表达情况。

**1.3.2 Western blot 法** 取生长状态良好的第 3 代 hSCAPs,胰蛋白酶消化以制备细胞悬液,调整细胞密度为 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL 并接种于 6 孔培养板内,每组

设置 3 个复孔,每孔加入 2 mL 完全培养基,常规换液,并于倒置显微镜下观察细胞生长情况,待细胞生长至约 80% 融合时终止培养。提取每孔中 hSCAPs 总蛋白,BCA 法测定蛋白质浓度。取 10 μL 待测蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,常规转膜,封闭,加入 leptin 和 OBRb 一抗(稀释比分别为 1:100 及 1:600)后 4 ℃ 孵育过夜。TBST 漂洗,避光条件下,加入二抗(1:6 000 稀释),室温下摇床孵育,TBST 漂洗,ECL 发光液发光,于暗室 X 线压片曝光,显影,定影。

**1.3.3 RT-PCR** 取生长状态良好的第 3 代 hSCAPs,胰蛋白酶消化后制备细胞悬液,调整细胞密度以 1 × 10<sup>5</sup> 个/孔接种到 6 孔培养板中,每组设置 3 个复孔,常规换液,并于镜下观察细胞生长情况,待细胞生长至约 80% 融合时终止培养。按 NucleoSpin<sup>®</sup> RNA 试剂盒提取每孔 hSCAPs 细胞总 RNA,检测 RNA 浓度及纯度。按 Takara 公司逆转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。按照标准 SYBR Green 荧光实时定量 PCR 试剂盒进行加样操作,以 GAPDH 为内参,采用 ABI PRISM 7900 Real-Time PCR system 进行 SYBR Green qRT-PCR,将 PCR 扩增产物依次加入 1% 凝胶孔槽中,100 V 恒压下电泳 40 min,GelRed 染色,凝胶成像系统扫描并拍照记录。GAPDH 上游引物序列:5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3';GAPDH 下游引物序列:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGA-3'。leptin 上游引物序列:5'-AGCCAAATGCATGGTGCAG-3';leptin 下游引物序列:5'-ACAAAGTGCAAGCAGGGTTC-3'。OBRb 上游引物序列:5'-CACCATTGGTACCATTTC-CACTTC-3';OBRb 下游引物序列:5'-GATTCCTGGGCCATCCAGTC-3'。

## 1.4 leptin 对 hSCAPs 增殖及成骨/成牙本质分化的影响

**1.4.1 分组** 第 3 代 hSCAPs 分为 2 个实验组、1 个对照组,加入相应的培养基:实验组分别加入含 0.1 μg/mL leptin 的含 10% FBS 的 α-MEM 培养基(0.1 μg/mL 组)和 1.5 μg/mL leptin 的含 10% FBS 的 α-MEM 培养基(1.5 μg/mL 组);对照组加入不含 leptin 的含 10% FBS 的 α-MEM 培养基。

**1.4.2 CCK-8 检测** 取生长状态良好且处于对数生长期的第 3 代 hSCAPs,胰蛋白酶消化以制备细胞悬液,调整细胞密度,以 100 μL、2 000 个/孔接种于 96 孔培养板,于 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养 24 h 后更换为无血清培养基。继续培养 24 h

后,细胞分为2个实验组、1个对照组,按照分组加入相应的培养基,每组设置5个复孔,每孔培养液体积为100  $\mu\text{L}$ ,隔天换液。分别于1、3、5、7 d时,避光下每孔加入已稀释好的CCK-8溶液(无血清 $\alpha$ -MEM培养基:CCK-8 = 10:1)100  $\mu\text{L}$ ,于37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中继续培养3 h,在酶标仪450 nm波长处检测各孔OD值,计算细胞活力。

**1.4.3 流式细胞仪检测hSCAPs细胞周期** 取生长状态良好的第3代hSCAPs,胰蛋白酶消化以制备细胞悬液,调整细胞密度,以2 mL、 $1 \times 10^5$ 个/孔接种到6孔培养板中,于37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中常规培养24 h后更换为无血清培养基。继续培养24 h后,细胞分为2个实验组、1个对照组,按照分组加入相应的培养基,每组设置3个复孔,每孔培养液体积为2 mL。连续培养3 d后至细胞约达70%融合时终止培养。根据细胞周期试剂盒处理各组细胞,依次上流式细胞仪检测。

**1.4.4 qRT-PCR检测hSCAPs成骨/成牙本质相关基因** 取生长状态良好的第3代hSCAPs,胰蛋白酶消化以制备细胞悬液,调整细胞密度以 $1 \times 10^5$ 个/孔接种到6孔培养板中,于37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中常规培养24 h后更换为无血清培养基。继续培养24 h后,按设置的实验组和对照组,更换为相应的培养液后,均加入矿化诱导液(10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠+50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 维生素C),每组设置3个复孔,每孔加液体积为2 mL,每72 h换液,分别于矿化诱导的3 d、7 d、14 d时终止培养。按NucleoSpin<sup>®</sup> RNA isolation试剂盒提取纯化各组细胞总RNA,检测RNA浓度及纯度并逆转录为cDNA。按照标准SYBR Green荧光实时定量PCR试剂盒进行加样操作,以GAPDH为内参,采用ABI PRISM 7900 Real-Time PCR system进行SYBR GreenqRT-PCR分析碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、牙本质基质蛋白(dentin matrix protein-1, DMP-1)、牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP)和骨钙素(osteocalcin, OCN)的mRNA表达情况。GAPDH上游引物序列:5'-GCACCGTCAAGGCT-GAGAAC-3'; GAPDH下游引物序列:5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'。ALP上游引物序列:5'-AACGGTCCAGGCTATGTGCT-3'; ALP下游引物序列:5'-CTGCTGACTGCTGCCGATAC-3'。DMP-1上游引物序列:5'-AGTGCCCAAGATACCACCAG-3'; DMP-1下游引物序列:5'-CATTCCTCATCGTCCAACT-3'。DSPP上游引物序列:5'-GCATTT-

GGGCAGTAGCATGG-3', DSPP下游引物序列:5'-CTGACACATTTGATCTTGCTAGGAG-3'。OCN上游引物序列:5'-CCCAGGGCTACCTGTATCAA-3'; OCN下游引物序列:5'-CTCCTGAAAGCCGATGTG-GTC-3'。

### 1.5 统计学分析

采用SPSS 13.0软件包对实验数据进行统计学分析,多组间的比较采用完全随机设计的单因素方差分析(One-Way ANOVA),采用Bonferroni方法进行不同组间样本均数的两两比较;实验数据均以表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 hSCAPs的分离培养及鉴定

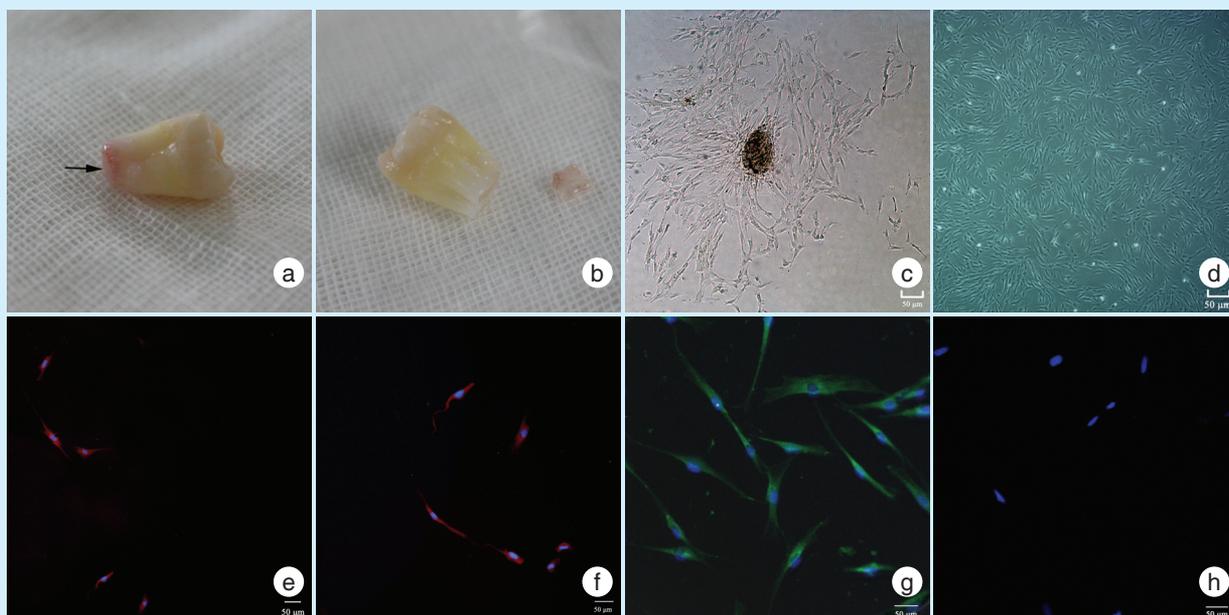
根尖乳头组织硬度中等,质地较为致密;连续培养3~5 d后,于倒置显微镜下可见细胞从组织块边缘爬出并呈放射状生长。细胞形态多为短梭形,少数为多角形。传代后细胞呈成纤维细胞样,生长能力较强,长满瓶底后整体呈漩涡状排列。经免疫荧光染色法鉴定,有限稀释法克隆化培养、纯化后的第二代hSCAPs,其抗波形丝蛋白、抗Stro-1及CD24染色呈阳性表达,抗角蛋白染色呈阴性表达,符合间充质来源干细胞的特性(图1)。

### 2.2 hSCAPs中leptin及其受体OBRb的表达情况

免疫荧光染色结果显示,hSCAPs中leptin及OBRb染色均呈阳性表达,其中hSCAPs中leptin染色呈红色荧光,OBRb染色呈绿色荧光。Western-blot检测结果显示:hSCAPs均表达leptin和OBRb,两者条带分别约为16 kDa及120 kDa,均与文献中实际蛋白分子量相符。RT-PCR结果显示,hSCAPs均表达leptin及其受体OBRb基因(图2)。

### 2.3 leptin对hSCAPs细胞增殖能力的影响

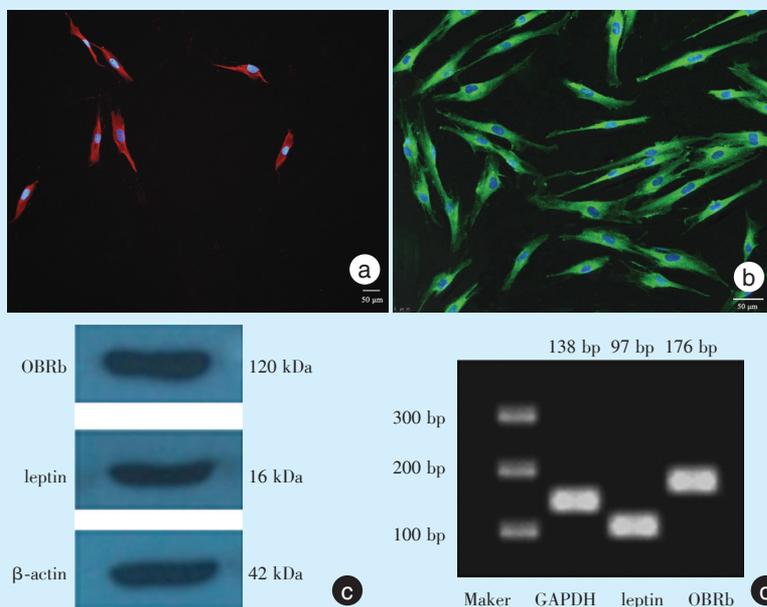
CCK-8检测结果显示,与对照组相比,0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组和1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组在3 d( $F = 159.04$ )、5 d( $F = 205.84$ )、7 d( $F = 131.18$ )时促进hSCAPs增殖,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组对hSCAPs增殖的促进作用高于0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )(图3a)。流式细胞仪检测细胞周期结果显示:0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组和1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组S期细胞比例分别为13.37%和15.46%,均高于对照组,差异具有统计学意义( $F = 229.78$ );且1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组S期细胞高于0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )(图3b~3c)。



a和b:牙根未发育完全的阻生智齿根尖乳头(箭头所示);c:hSCAPs的原代细胞;d:hSCAPs的传代细胞;e:波形丝蛋白呈红色荧光阳性表达  $\times 100$ ;f:STRO-1呈红色荧光阳性表达  $\times 200$ ;g:CD24呈绿色荧光阳性表达  $\times 400$ ;h:角蛋白表达呈阴性  $\times 400$   
hSCAPs:人根尖乳头干细胞

图1 hSCAPs的培养及鉴定

Figure 1 Culture and identification of hSCAPs



a: leptin 免疫荧光染色呈阳性  $\times 400$ ; b: OBRb 免疫荧光染色呈阳性  $\times 400$ ; c: Western blot 结果显示 hSCAPs 表达 leptin 及 OBRb 蛋白; d: RT-PCR 结果显示 hSCAPs 表达 leptin 及 OBRb

图2 hSCAPs 中 leptin 及其受体 OBRb 的表达

Figure 2 The expression of leptin and its receptor OBRb in hSCAPs

#### 2.4 leptin 对 hSCAPs 成骨/成牙本质分化相关基因表达的影响

矿化诱导 3 d, 和对照组相比, 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组和

1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组 ALP ( $F = 265.36$ )、DMP-1 ( $F = 140.5$ ) 和 DSPP ( $F = 359.53$ ) mRNA 表达水平均升高, 且 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组均高于 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组, 差异均具有统

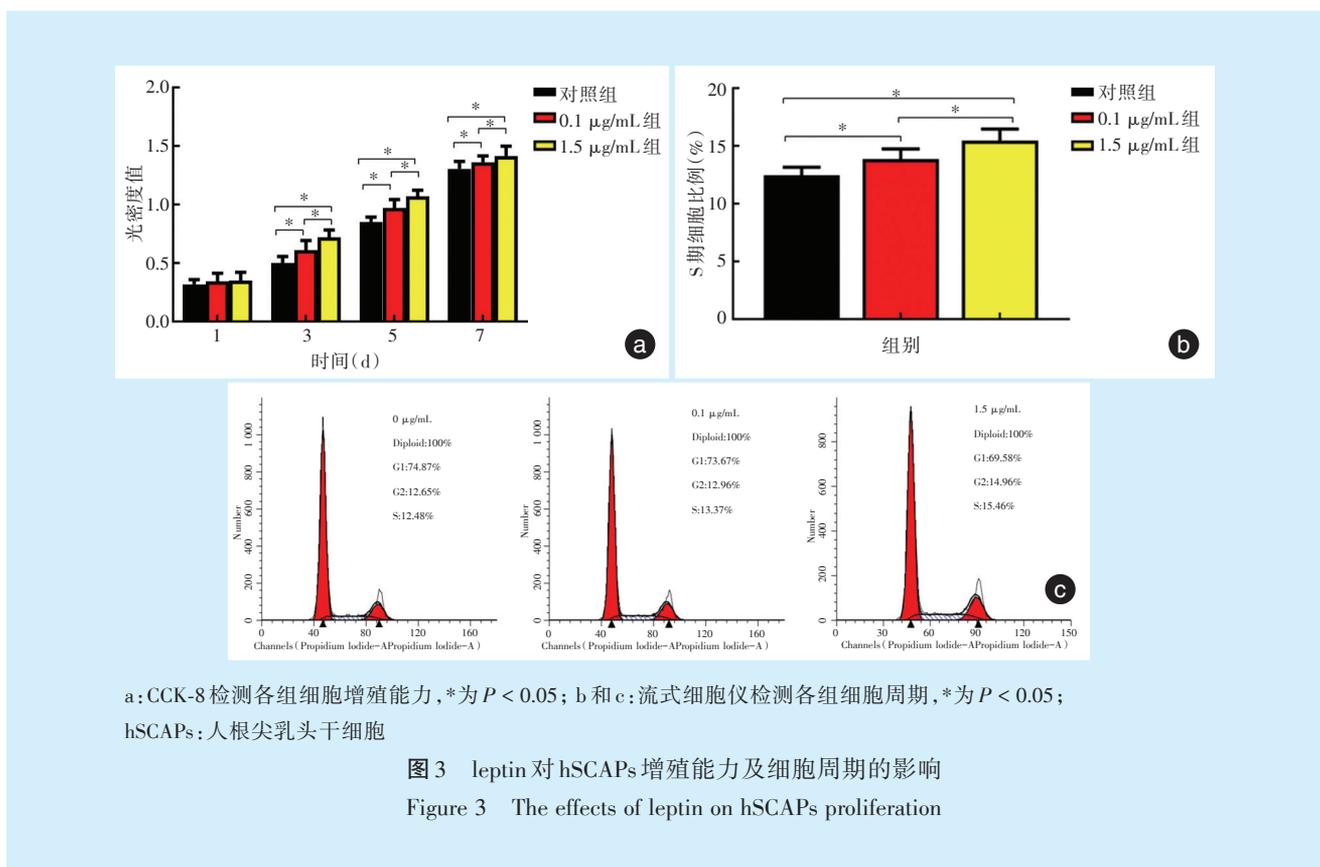


图3 leptin对hSCAPs增殖能力及细胞周期的影响

Figure 3 The effects of leptin on hSCAPs proliferation

计学意义 ( $P < 0.05$ ); 0.1 μg/mL组和1.5 μg/mL组 OCN mRNA与对照组相比无明显变化 ( $F = 11.34$ ,  $P = 0.163$ )。

矿化诱导7 d, 和对照组相比, 0.1 μg/mL组和1.5 μg/mL组 ALP ( $F = 282.17$ )、DMP-1 ( $F = 412.20$ )、DSPP ( $F = 314.36$ )和OCN ( $F = 467.91$ ) mRNA表达水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ), 且1.5 μg/mL组均高于0.1 μg/mL组, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

矿化诱导14 d, 0.1 μg/mL组和1.5 μg/mL组 ALP ( $F = 157.10$ )、DMP-1 ( $F = 269.00$ )和DSPP ( $F = 144.46$ ) mRNA表达明显低于对照组, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。0.1 μg/mL组和1.5 μg/mL组 OCN mRNA表达水平明显高于对照组 ( $F = 245.01$ ,  $P < 0.05$ ), 1.5 μg/mL组 OCN mRNA表达高于0.1 μg/mL组, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

牙源性干细胞在再生医学领域的研究中备受重视<sup>[9]</sup>, hSCAPs具有高度的增殖、自我更新和多向分化的能力, 是牙根发育的成牙本质细胞的重要来源, 在牙根的形成和发育过程中起着重要作用<sup>[3]</sup>。因此, 任何可能对SCAPs增殖及分化造成影

响的刺激因素, 将可能最终影响牙根的发育与形成<sup>[10]</sup>。

leptin目前已被发现存在于牙髓<sup>[8]</sup>、牙周膜<sup>[11]</sup>、牙龈<sup>[11-12]</sup>和牙乳头<sup>[7]</sup>中。此实验证实了hSCAPs表达leptin, 提示leptin可能作为提供营养或系统信号的功能性因子, 参与到牙根的发育与形成过程中。此外, 在牙乳头的上1/3部分, 即靠近成牙本质部细胞层的区域, 表达更多的leptin<sup>[7]</sup>, 提示leptin在牙根发育过程中可能与牙本质分化有关。本研究发现leptin和OBRb在体外hSCAPs中均有表达, 这提示leptin在牙本质分化中可能发挥作用。

本实验采用CCK-8法及流式细胞法来分析leptin对hSCAPs增殖能力的影响。实验结果显示: 外源性两种浓度leptin均可促进hSCAPs增殖, 且hSCAPs对较高浓度leptin刺激更为敏感。leptin对hSCAPs的增殖能力的促进作用, 预示着其在组织工程牙髓及牙根方面的潜力。目前研究发现, leptin通过与其受体OBR相互作用, 从而激发其介导的多条信号通路, 调控细胞的增殖和凋亡<sup>[13]</sup>。Saxena等<sup>[14]</sup>的研究结果表明, leptin可通过激活JAK/STAT-PI3K/AKT-ERK信号通路促进HepG2和

Huh7细胞增殖。Ducy等<sup>[15]</sup>的研究也显示 leptin 可直接或间接作用于成骨细胞和破骨细胞促进其增殖。然而,Um等<sup>[4]</sup>研究结果则显示,leptin显著降低骨髓干细胞和牙周膜干细胞的增殖能力,且对牙周膜干细胞的增殖抑制效果更大。本研究表明,leptin可以促进hSCAPs的增殖。

Martin等<sup>[8]</sup>采用免疫组化方法,结果显示 leptin 受体 OBRb 仅在成牙本质细胞层表达,而在牙髓组织中心区域几乎无表达;且外源性 leptin 可明显提高牙髓组织中 DSPP 的表达量,并呈剂量相关性<sup>[8]</sup>。Ngo等<sup>[16]</sup>证实 leptin 可通过激活 MAPK 信号通路诱导骨髓干细胞向牙源性分化,提示 leptin 可能与牙根发育的成牙本质分化有关。为了进一步探讨 leptin 对 SCAPs 的成骨/成牙本质分化相关基因的影响,本实验应用 qRT-PCR 检测不同浓度 leptin 刺激 hSCAPs 3 d、7 d 和 14 d 时成骨/成牙本质相关基因: ALP、DMP-1、DSPP 和 OCN 的表达水平。在本实验中,ALP、DMP-1 及 DSPP mRNA 的表达较一致:与对照组相比,各实验组 hSCAPs 的 ALP、DMP-1 及 DSPP 表达较高,且均于 7 d 时达到峰值,随后呈下降趋势,14 d 时明显低于对照组;结合 CCK8 结果发现,实验组同样于 7 d 时达到峰值,推测 leptin 与 OBRb 相互结合引起其自身磷酸化,直接激活了 hSCAPs 内的信号转导通路级联反应,从而介导了 hSCAPs 的增殖和成牙本质分化。在本实验中,随着 leptin 的持续刺激,OCN mRNA 表达呈现不断增长趋势,并在 14 d 达到峰值。hSCAPs 中 OCN mRNA 表达水平与 ALP、DMP-1 和 DSPP 的 mRNA 不一致,可能是因为 hSCAPs 在 leptin 刺激下,其成骨分化和成牙本质分化的过程并不是同步化的。随着 leptin 持续刺激,在矿化诱导的早期,某些信号通路可能介导 hSCAPs 主要向成牙本质分化,或者期间介导 hSCAPs 向成牙本质分化的某些信号通路起了主导作用。然而到了诱导的晚期,介导 hSCAPs 分化的信号通路可能以成骨分化为主,或另一些介导成骨分化的信号通路起主导作用<sup>[17]</sup>,从而使成骨/成牙本质相关基因的表达水平存在差异。

#### 参考文献

- [1] Sonoyama W, Liu Y, Fang D, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine[J]. *PLoS One*, 2006, 20
- [2] Nada OA, El Backly RM. Stem cells from the apical papilla (scap) as a tool for endogenous tissue regeneration[J]. *Front Bio Eng Biotechol*, 2018, 24(2): 103-105.
- [3] Cantore S, Ballini A, De Vito D, et al. Characterization of human apical papilla-derived stem cells[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2017, 31(4): 901-910.
- [4] Um S, Choi JR, Lee JH, et al. Effect of leptin on differentiation of human dental stem cells[J]. *Oral Dis*, 2011, 17(7): 662-669.
- [5] Jansson JO, Palsdottir V, Hägg DA, et al. Body weight homeostat that regulates fat mass independently of leptin in rats and mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(2): 427-432.
- [6] Abella V, Scotece M, Conde J, et al. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(2): 100-109.
- [7] Ide S, Tokuyama R, Davaadorj P, et al. Leptin and vascular endothelial growth factor regulate angiogenesis in tooth germs[J]. *Histochem Cell Biol*, 2011, 135(3): 281-292.
- [8] Martin - Gonzalez J, Perez - Perez A, Sanchez - Jimenez F, et al. Leptin promotes dentin sialophosphoprotein expression in human dental pulp[J]. *J Endod*, 2015, 41(4): 487-492.
- [9] 叶青松, 王晓燕. 牙源性干细胞储存和临床应用的研究进展[J]. *口腔疾病防治*, 2018, 26(1): 15-25.
- [10] 牛巧丽, 李一鸣, 宋艳艳, 等. 不同浓度 MTA 对根尖乳头干细胞增殖及分化的影响[J]. *口腔疾病防治*, 2018, 26(8): 491-495.
- [11] Li W, Zhu W, Hou J, et al. Leptin and its receptor expression in dental and periodontal tissues of primates[J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 355(1): 181-188.
- [12] Williams RC, Skelton AJ, Todryk SM, et al. Leptin and pro-inflammatory stimuli synergistically upregulate MMP-1 and MMP-3 secretion in human gingival fibroblasts[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148024.
- [13] Münzberg H, Morrison CD. Structure, production and signaling of leptin[J]. *Metabolism*, 2015, 64(1): 13-23.
- [14] Saxena NK, Sharma D, Ding X, et al. Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(6): 2497-2507.
- [15] Ducy P, Amling M, Takeda S, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass[J]. *Cell*, 2000, 100(2): 197-207.
- [16] Ngo VA, Jung JY, Koh JT, et al. Leptin Induces odontogenic differentiation and angiogenesis in human dental pulp cells *via* activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. *J Endod*, 2018, 44(4): 585-591.
- [17] 顾雪凝, 权家苗, 郭雨晴, 等. 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白调控转化生长因子 $\beta$ 1 对人根尖牙乳头干细胞分化的作用[J]. *口腔疾病防治*, 2018, 26(7): 428-433.

(编辑 张琳, 曾曙光)