

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2019.06.003

· 基础研究 ·

载脂蛋白D在人牙髓细胞增殖及迁移中的作用

徐帅妹, 曾雄群, 元佩燕, 刘忠俊, 曾曙光
南方医科大学口腔医院牙体牙髓科, 广东 广州(510280)

【摘要】 目的 探讨载脂蛋白D(apolipoprotein D, APOD)在人牙髓细胞增殖及迁移过程中的作用,为运用APOD促进牙髓组织再生提供基础。**方法** 设置阴性对照(NC)组及抑制APOD表达(si-APOD)组,以siRNA抑制APOD在人牙髓细胞的表达,qPCR与Western blot检测APOD表达水平;通过细胞克隆形成实验、CCK8实验检测抑制APOD表达后牙髓细胞的增殖能力;Transwell实验检测抑制APOD表达后牙髓细胞迁移能力的变化。**结果** 抑制APOD表达后,si-APOD组较NC组克隆形成数量降低,差异有统计学意义($t = 7.624, P = 0.002$);CCK8实验显示si-APOD组OD值在3、5、7 d时间点与NC组相比均降低($P < 0.05$);Transwell结果表明,si-APOD组细胞穿孔数量 57.25 ± 4.03 ,NC组细胞穿孔数量 154.50 ± 8.39 ,差异有统计学意义($t = 10.45, P < 0.001$)。**结论** 抑制牙髓细胞APOD的表达可抑制其增殖与迁移能力。

【关键词】 载脂蛋白D; 牙髓组织再生; 牙髓细胞; 增殖; 迁移; CCK8

【中图分类号】 R781.3 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)06-0355-05

【引用著录格式】 徐帅妹,曾雄群,元佩燕,等.载脂蛋白D在人牙髓细胞增殖及迁移中的作用[J].口腔疾病防治,2019,27(6):355-359.

The role of APOD in the proliferation and migration of human dental pulp cells XU Shuamei, ZENG Xiongqun, YUAN Peiyan, LIU Zhongjun, ZENG Shuguang. Departments of Endodontics, Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China.

Corresponding author: LIU Zhongjun, Email: 153093518@qq.com, Tel: 0086-20-84403983; ZENG Shuguang, Email: sunrise doctor@163.com, Tel: 0086-20-84426974

【Abstract】 Objective To explore the role of apolipoprotein D (APOD) in the proliferation and migration of human dental pulp cells (DPCs) and to provide a basis for the use of APOD to promote pulp regeneration. **Methods** APOD expression in human dental pulp cells was inhibited by siRNA. The inhibition effect of APOD was confirmed by qPCR and Western blot. After APOD inhibition, colony formation experiments and CCK8 assays were employed to confirm the proliferation ability of dental pulp cells. Transwell assays were used to verify the cell migration ability after the inhibition of APOD expression. **Results** After inhibiting APOD expression, the colony formation rate in the si-apod group was reduced compared with the NC group, and the difference was statistically significant ($t = 7.624, P = 0.002$). The CCK8 experiment showed that the OD value in the si-apod group decreased at 3, 5 and 7 d compared with that in the NC group ($P < 0.05$). Transwell results showed that the number of cell divisions was 57.25 ± 4.03 in the si-apod group and 154.50 ± 8.39 in the NC group, and the difference was statistically significant ($t = 10.45, P < 0.001$). **Conclusion** Inhibition of APOD expression in dental pulp cells inhibits their proliferation and migration ability.

【Key words】 Apolipoprotein D; Pulp tissue regeneration; Dental pulp cells; Proliferation; Migration; CCK8

【收稿日期】 2018-11-05; **【修回日期】** 2019-01-06

【基金项目】 国家自然科学基金青年项目(81800957);南方医科大学科研启动计划项目-青年科技人员培育项目(PY2017N038);南方医科大学口腔医院科研启动项目(PY2017009);广东省自然科学基金项目(2015A030313810);广州市科技计划项目(201707010193)

【作者简介】 徐帅妹,主治医师,硕士,Email:447990907@qq.com

【通信作者】 刘忠俊,主治医师,博士,Email:153093518@qq.com, Tel:0086-20-84403983

曾曙光,主任医师,博士,Email:sunrise doctor@163.com, Tel:0086-20-84426974

在牙髓组织的损伤修复过程中,牙髓细胞(dental pulp cells, DPCs)的正常生长与增殖是其发挥功能的重要基础,同时,细胞接受信号并准确迁移至指定受损伤区域,是其参与组织损伤修复过程的重要保障。载脂蛋白D(apolipoprotein D, APOD)是一种分子量为29 kD的糖蛋白^[1]。其他类型的载脂蛋白主要局限于肝脏或肠道中表达,而APOD表达的组织器官更为广泛。研究发现APOD在大脑、小脑和脊髓等中枢神经系统中高度表达,在肾脏、脾脏等内脏器官以及卵巢、睾丸等生殖器官中也有不同程度的表达^[2]。有研究表明,过表达APOD或加入外源性的APOD可以协同血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)调节血管平滑肌细胞的迁移^[3];APOD可以抑制PDGF-BB对血管平滑肌细胞的促增殖作用^[4]。APOD是否在牙髓细胞中表达及促进其再生,尚未见报道。本课题组前期已经通过qPCR验证了APOD在人牙髓细胞中的表达,本研究探讨APOD在人牙髓细胞增殖及迁移过程中的作用,为运用APOD促进牙髓组织再生提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

胎牛血清、低糖DMEM(Hyclone,美国);结晶紫(Sigma,美国);CCK8试剂盒(恩晶,中国);transwell小室(Corning,美国);TRIzol、PrimeScript[®]RTreagent Kit、SYBR[®]PremixDimerEraser[™] kit (Takara,日本);APOD siRNA (h) (santacruz, sc-45518,美国);lipofectamine 2000(Thermo fisher,美国);APOD一抗(Cloud-Clone Crop, PAB968Hu01,美国)。

1.2 原代骨髓细胞培养

收集18~25岁自愿者因正畸或阻生需要拔除的完整、健康第三磨牙(获得南方医科大学口腔医院伦理委员会的同意及患者知情同意),无菌条件下取出牙髓,剪成1 mm×1 mm×1 mm的组织块,用3 g/L I型胶原酶37℃消化15 min后,接种于6孔板,盖玻片固定;加入含10%胎牛血清、100 U/mL青、链霉素的DMEM培养基,37℃、5% CO₂条件下培养。待细胞贴壁后每3 d换液1次;细胞生长融合约80%时传代扩大培养。

1.3 APOD siRNA转染牙髓细胞,qPCR、western blot检测APOD表达

取第3代对数生长期DPCs,将细胞接种在六孔板中,待细胞密度至60%,准备转染。设置NC

组与si-APOD组。遵照说明书制备转染复合物(si-APOD组50 pmol APOD siRNA为三条序列的混合物:①5'-GAAGAUGGUACGAAAUUGAtt-3',5'-UCAUUUCGUACCAUCUUCt-3';②5'-CUGAUGGAACUGUGAAUCAAtt-3',5'-UGAUUCACAGUUC-CAUCAGtt-3';③5'-GUACCUGCAUCAUCCAACUtt-3',5'-AGUUGGAUGAUGCAGGUACtt-3'),NC组使用阴性对照siRNA,10 μL/孔 lipofectamine 2000,将转染复合物滴加至孔板中,补充培养基至2 mL,继续培养48 h。

1.3.1 qPCR检测APOD mRNA表达 两组分别加入Trizol,提取两组细胞总RNA,按Prime-Script[®]RTreagent Kit说明书进行逆转录,按SYBR[®]Premix DimerEraser[™] kit说明书进行PCR扩增反应,GAPDH引物序列:5'-CCAGGTGGTCTCCTCTGACTTC-3',5'-GTGGTCGTTGAGGGCAAT-3';APOD引物序列:5'-ATCCAGGCCAACTACTCACT-3',5'-GATTCACAGTTCCATCAGCT-3'。检测APOD mRNA表达水平。

1.3.2 Western blot检测APOD蛋白表达 两组分别提取总蛋白,经煮沸变性后进行电泳,5%浓缩胶,10%分离胶,80 V 30 min后120 V 45 min。转PVDF膜:300 mA,90 min,50 g/L脱脂奶粉室温封闭90 min,APOD一抗(1:500)孵育过夜;TBST洗膜3次,HRP标记羊抗兔二抗(1:5 000)室温孵育1 h;TBST洗膜3次,加入ECL发光试剂显影。

1.4 克隆形成、CCK8检测抑制APOD表达对牙髓细胞增殖的影响

1.4.1 观察克隆形成 取第3代对数生长期DPCs,抑制APOD表达,设置NC组与si-APOD组,以100个/孔的密度接种于6孔板内,37℃、5%CO₂培养,21 d计算形成克隆数(以≥50个细胞为一个克隆),多聚甲醛固定,结晶紫染色,倒置显微镜下观察克隆形成情况。

1.4.2 CCK8检测 取第3代对数生长期DPCs,抑制APOD表达,设置NC组与si-APOD组,在96孔板中配置100 μL/孔(约103个)细胞悬液,37℃、5%CO₂条件下培养。1、3、5、7 d分别加入10 μL/孔CCK8溶液,继续培养2 h后酶标仪测定450 nm吸光度。

1.5 Transwell检测抑制APOD表达对牙髓细胞迁移的影响

取第3代对数生长期DPCs,抑制APOD表达,设置NC组与si-APOD、空白对照组,细胞更换无血

清培养基,24 h后胰酶消化,上室使用无血清培养基,细胞计数板计数,加入 5×10^4 个细胞;下室加入含10%胎牛血清培养基,37℃、5%CO₂培养24 h,甲醇固定,0.1%结晶紫染色,倒置显微镜下观察、拍照。随机选择4个视野进行统计分析。

1.6 统计分析

采用SPSS 22.0统计软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两样本 t 检验进行比较。 $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

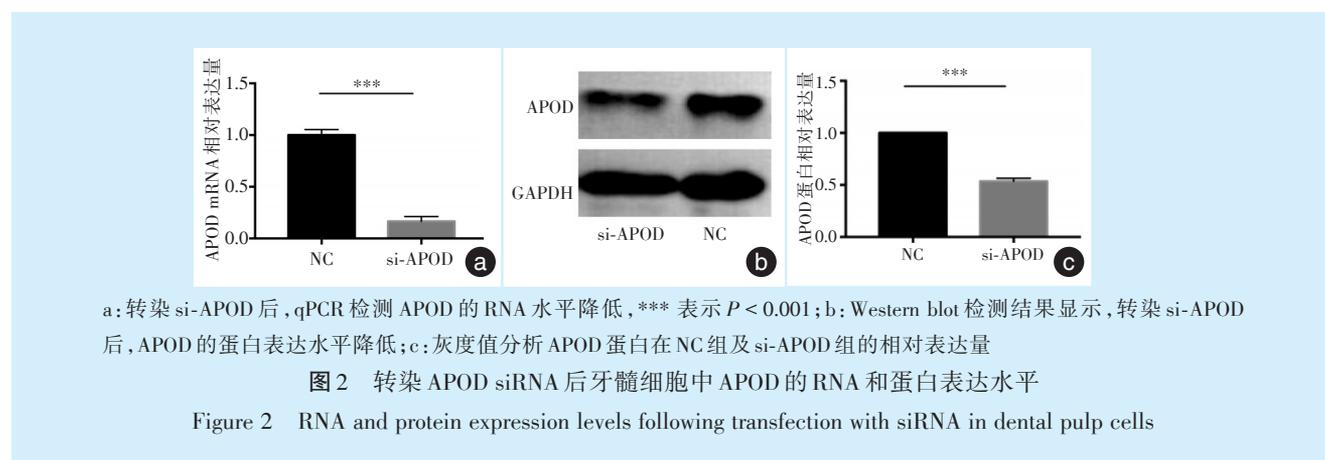
2.1 成功分离培养牙髓细胞并抑制APOD在牙髓细胞的表达

接种组织块5~10 d后可见部分组织块有细胞游出,细胞呈短梭形或纤维细胞状,放射状或漩涡状围绕在组织块周围,见图1。本课题组前期已



图1 牙髓细胞从牙髓组织块中游出 ×100
Figure 1 Dental pulp cells were derived from dental pulp tissue explants ×100

经对分离的牙髓细胞行流式细胞术检测发现,牙髓细胞的间充质干细胞表面标记物CD29、CD44、CD90和CD105的阳性表达率分别为90.82%、99.45%、98.79%、97.92%^[5]。qPCR结果提示转染APOD siRNA后,与NC组相比,si-APOD组的APOD



a: 转染 si-APOD 后, qPCR 检测 APOD 的 RNA 水平降低, *** 表示 $P < 0.001$; b: Western blot 检测结果显示, 转染 si-APOD 后, APOD 的蛋白表达水平降低; c: 灰度值分析 APOD 蛋白在 NC 组及 si-APOD 组的相对表达量

图2 转染 APOD siRNA 后牙髓细胞中 APOD 的 RNA 和蛋白表达水平

Figure 2 RNA and protein expression levels following transfection with siRNA in dental pulp cells

表达量在 mRNA 水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 实验重复3次, 结果见图2a; 与NC组相比, si-APOD组的APOD蛋白表达水平降低(图2b~c)。

2.2 抑制APOD在牙髓细胞的表达, 牙髓细胞增殖能力降低

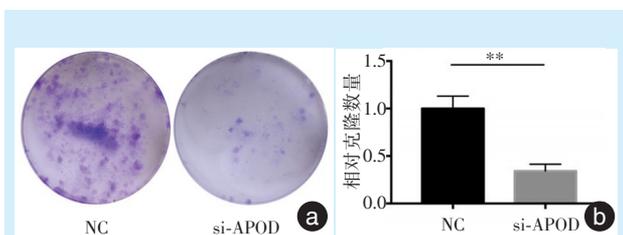
克隆形成实验结果提示, si-APOD组较NC组克隆形成数量降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), si-APOD组克隆形成数量/NC组克隆形成数量比值为 0.35 ± 0.07 (图3)。CCK8检测结果可见 si-APOD组OD值在3、5、7 d时间点与NC组相比均降低 ($P < 0.05$, 图4)。

2.3 抑制APOD在牙髓细胞的表达, 牙髓细胞迁移能力降低

Transwell结果提示 si-APOD组细胞穿孔数量 57.25 ± 4.03 , NC组细胞穿孔数量 154.50 ± 8.39 , 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图5)。

3 讨论

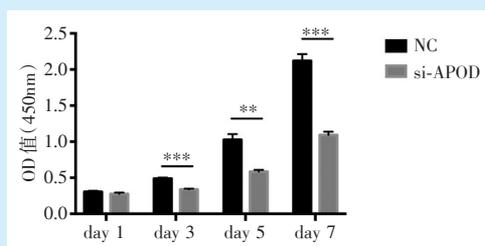
随着对APOD研究的深入, 人们逐渐开始对其较为关注, 这主要是源于APOD的表达与许多临床病理症状的关联性。研究者注意到APOD在正常的中枢神经系统中由星形角质细胞分泌并高度表达, 并与花生四烯酸的转运、代谢和信号转导存在这一定的联系^[6]。Sasaki等^[7]的研究发现, 异位表达Tap73, 同时在培养基中加入人的APOD重组体, 可介导人骨肉瘤Saos-2细胞的成骨向分化过程; 重要的是, 敲除APOD可以终止P53家族介导的碱性磷酸酶反应(ALP), 进而影响成骨过程。过表达APOD或加入外源性的APOD可以协同PDGF-BB(血小板衍生长因子)调节血管平滑肌细胞的迁移^[8], APOD可以抑制PDGF-BB对血管平滑肌细胞的促增殖作用^[4]。Martineau等^[9]发现, APOD与小鼠的骨代谢有关, APOD基因敲除的小鼠, 其破骨



a: si-APOD组较NC组,克隆形成数量降低;b:计数克隆数量,si-APOD组克隆形成数量较NC组克隆形成数量降低,**表示 $P < 0.01$

图3 克隆形成实验

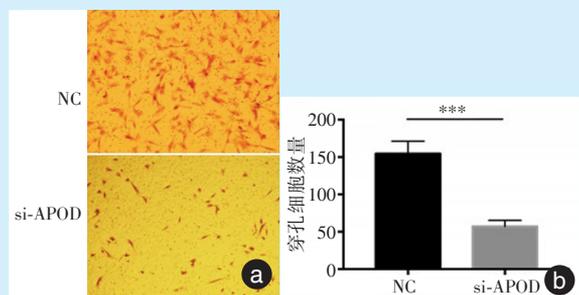
Figure 3 Colony formation experiment



当APOD被抑制后,通过CCK8检测实验发现,第3、5、7天时,牙髓细胞的组织明显受抑制,si-APOD组的OD值低于NC组,**表示 $P < 0.01$,***表示 $P < 0.001$

图4 CCK8实验检测牙髓细胞的增殖能力

Figure 4 CCK8 assay for detecting the proliferative capacity of dental pulp cells



a: Transwell实验显示,si-APOD组较NC组细胞迁移数量减少;b:穿孔细胞计数,***表示 $P < 0.001$

图5 Transwell实验检测牙髓细胞的迁移能力

Figure 5 Transwell assay for detecting migration of dental pulp cells

作用增强,而成骨作用明显减弱,通过加入外源性的APOD,可部分补偿成骨作用。

牙髓内的未分化间充质细胞在受到深龋、磨损、外伤等刺激时被激活并诱导分化为成牙本质

细胞,形成修复性牙本质从而阻止病变进展保存牙髓活力。牙髓组织的这种修复潜能为研究牙髓牙本质复合体再生提供了可靠的生物学基础^[10]。在牙髓组织收到外界刺激时,牙髓细胞正常的生长及增殖,并准确的迁移至受损区域,是完成该生物过程的重要基础。本课题组之前研究发现整合素 $\alpha 5$ (Integrin- $\alpha 5$, ITGA5)可促进DPCs的增殖与迁移^[5],抑制ITGA5的表达可促进DPCs成牙本质向分化^[11],研究表明还证实瞬时受体电位通道M7 (transient receptor potential melastain 7, TRPM7)在DPCs增殖、迁移过程中发挥了重要作用^[12]。研究发现通过脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)与变形链球菌激活Toll样受体4 (Toll-like receptor 4, TLR4)可以引导人DPCs的增殖及迁移能力^[13]。然而,目前对参与牙髓细胞增殖与迁移过程的研究阐述仍不充分,对于参与其中的信号分子及调控过程仍需进一步研究。

牙髓细胞高度的增殖能力在牙髓组织的损伤修复过程中扮演着重要角色^[14]。本研究证实了APOD在人牙髓细胞中表达,并对其在增殖、迁移分化过程中的作用进行了探讨。研究结果表明,抑制APOD的表达,细胞贴壁生长的第3、5、7天,其增殖能力明显降低,且细胞克隆形成能力显著下降,说明APOD对于牙髓细胞正常的生长增殖过程中具有发挥了重要作用。有研究报道,通过构建APOD基因敲除小鼠获取的骨髓间充质干细胞,其增殖能力较野生型小鼠明显偏低。同时该研究还发现APOD基因敲除加速了小鼠的骨转化过程,造成了成骨过程缩短,骨量减少^[9]。在本研究中,通过siRNA干扰牙髓细胞的APOD的表达,降低了牙髓细胞增殖能力,这与上述研究的结果相近。另外有研究报道A10细胞中过表达APOD,细胞增殖数量有所上升,但并无统计学差异。而在经过血清饥饿的A10细胞中,APOD可以抑制PDGF对该细胞的促增殖作用,该研究认为APOD在细胞内的累积可以通过影响ERK1/2磷酸化选择性抑制PDGF-BB引起的血管平滑肌细胞增殖^[15]。因此,对于APOD在不同细胞以及不同状态的细胞,其对增殖的作用未必相同,本研究仅讨论了通过siRNA抑制牙髓细胞APOD表达的情况,因此需要进一步研究APOD对牙髓细胞增殖的作用及可能存在的机制进一步探讨。

细胞的迁移对于组织、器官的再生是极其重要的,细胞只有迁移到受损区域才能发挥其应有

的功能。目前,已证实多种生长因子参与了牙髓细胞的迁移过程,包括胰岛素样生长因子-1,血管内皮生长因子、转化生长因子- β 1等^[16-17]。在本研究中,抑制APOD表达,transwell结果提示,穿孔细胞数量显著降低,细胞迁移能力降低。说明APOD参与了牙髓细胞的迁移过程。有研究表明APOD分布于细胞核周围区域,在细胞迁移过程中向细胞尾部延伸分布,在迁移过程中APOD可能直接影响Rac家族小GTP酶1(Rac family small GTPase 1, Rac1)活性,而Rac1活性与细胞板状伪足的延伸有关^[18]。APOD还可以影响与细胞骨架重排相关的细胞后部的回缩,这可能与调节分子如Ras同源家庭成员A(Ras homolog family member A, rhoA),钙调神经磷酸酶和酪氨酸激酶有关。对于APOD在牙髓细胞影响其迁移的具体机制需进一步研究^[19]。

综上所述,本研究结果表明APOD在牙髓细胞增殖、迁移过程中发挥了重要作用;为进一步探讨APOD在牙髓组织再生中发挥的作用奠定了基础。

参考文献

- [1] Allina DO, Andreeva YY, Zavalishina LE, et al. Estimation of the diagnostic potential of APOD, PTOV1, and EPHA4 for prostatic neoplasms[J]. *Arkh Patol*, 2016, 78(5): 9-14.
- [2] Gao GQ, Song LS, Tong B, et al. Expression levels of GSTA2 and APOD genes might be associated with carotenoid coloration in golden pheasant(*Chrysolophus pictus*) plumage[J]. *Dongwuxue Yanjiu*, 2016, 37(3): 144-150.
- [3] Nazarenko MS, Markov AV, Slepsov AA, et al. Comparative analysis of gene expression in vascular cells of patients with advanced atherosclerosis[J]. *Biomed Khim*, 2018, 64(5): 416-422.
- [4] Sarjeant JM, Lawrie A, Kinnear C, et al. Apolipoprotein D inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation by preventing translocation of phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2 to the nucleus[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(12): 2172-2177.
- [5] Xu S, Cui L, Ma D, et al. Effect of ITGA5 down-regulation on the migration capacity of human dental pulp stem cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(11): 14425-14432.
- [6] Waldner A, Dassati S, Redl B, et al. Apolipoprotein D concentration in human plasma during aging and in parkinson's disease: a cross-sectional Study[J]. *Parkinsons Dis*, 2018, 2018: 3751516.
- [7] Sasaki Y, Negishi H, Koyama R, et al. p53 family members regulate the expression of the apolipoprotein D gene[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(2): 872-883.
- [8] Lai CJ, Cheng HC, Lin CY, et al. Activation of liver X receptor suppresses angiogenesis via induction of ApoD[J]. *FASEB J*, 2017, 31(12): 5568-5576.
- [9] Martineau C, Najyb O, Signor C, et al. Apolipoprotein D deficiency is associated to high bone turnover, low bone mass and impaired osteoblastic function in aged female mice[J]. *Metabolism*, 2016, 65(9): 1247-1258.
- [10] Jin GZ, Kim HW. Co-culture of human dental pulp stem cells and endothelial cells using porous biopolymer microcarriers: a feasibility study for bone tissue engineering[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2017, 14(4): 393-401.
- [11] Cui L, Xu SM, Ma DD, et al. The role of integrin-alpha 5 in the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells[J]. *J Endod*, 2014, 40(2): 235-240.
- [12] Cui L, Xu SM, Ma DD, et al. The effect of TRPM7 suppression on the proliferation, migration and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells[J]. *Int Endod J*, 2014, 47(6): 583-593.
- [13] Liu Y, Gao Y, Zhan X, et al. TLR4 activation by lipopolysaccharide and *Streptococcus mutans* induces differential regulation of proliferation and migration in human dental pulp stem cells[J]. *J Endod*, 2014, 40(9): 1375-1381.
- [14] Soares DG, Rosseto HL, Scheffel DS, et al. Odontogenic differentiation potential of human dental pulp cells cultured on a calcium-aluminate enriched chitosan-collagen scaffold[J]. *Clin Oral Investig*, 2017, 21(9): 2827-2839.
- [15] Sarjeant JM, Lawrie A, Kinnear C, et al. Apolipoprotein D inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation by preventing translocation of phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2 to the nucleus[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(12): 2172-2177.
- [16] Lv T, Wu Y, Mu C, et al. Insulin-like growth factor 1 promotes the proliferation and committed differentiation of human dental pulp stem cells through MAPK pathways[J]. *Arch Oral Biol*, 2016, 72: 116-123.
- [17] Aksel H, Huang GT. Combined effects of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein 2 on odonto/osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro[J]. *J Endod*, 2017, 43(6): 930-935.
- [18] Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia[J]. *Cell*, 1995, 81(1): 53-62.
- [19] Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells [J]. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68: 459-486.

(编辑 罗燕鸿)