

网络出版时间: 2023-03-07 14:42:53 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20230307.1348.013.html>

过表达 ephrinB2 调控犬牙周膜干细胞的成骨能力

刘雨苗¹ 杨金鑫² 朱绍跃³ 马毓临¹ 夏寒萍¹ 周 猛² 杨姝蕾¹ 黄泰宁¹ 丁珂欣² 刘宗响^{1,2}

摘要 目的 观察促红细胞生成素肝细胞激酶受体 B4/促红细胞生成素肝细胞激酶受体配体 B2 (EphB4/ephrinB2) 信号通路中过表达 ephrinB2 在比格犬来源的牙周膜干细胞 (cPDLSCs) 中成骨分化的能力。方法 采用 Beagle 犬前磨牙及磨牙中分离 PDLSCs, 用 EfnB2-GFP-Bsd 载体和空载体 (GFP-Bsd) 转染细胞后进行成骨诱导分化, Western blot 检测转染后 ephrinB2 蛋白表达水平, 行 CCK-8 实验、茜素红 S 染色实验、碱性磷酸酶染色实验 (ALP)、反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 分别检测 EfnB2-cPDLSCs 组、空载体对照组 (Vector-cPDLSCs) 的成骨分化效果。结果 CCK-8 显示: EfnB2-cPDLSCs 组和 Vector-cPDLSCs 组在细胞增殖上没有差异。茜素红染色实验和 ALP 染色实验证实: EfnB2-cPDLSCs 组较 Vector-cPDLSCs 显示更高的 ALP 活性和矿化能力。RT-PCR 显示: EfnB2-cPDLSCs 组成牙本质/成骨标志物的表达高于 Vector-cPDLSCs 组。结论 通过过表达犬牙周膜细胞中的 ephrinB2 可提高其成骨分化的能力。

关键词 犬牙周膜细胞; 促红细胞生成素肝细胞激酶受体配体 B2; 基因转染; 成骨分化

中图分类号 R 781.4+2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)03-0423-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.013

慢性牙周炎引起牙齿支持组织的渐进性破坏, 是目前导致成人牙齿丧失的首位危险因素^[1]。传统的洁治、刮治、根面平整等非手术治疗着力于清除菌斑和减轻炎症, 而引导性组织再生、引导性骨再生等手术治疗的再生效果也很有限^[2], 能够真正实现牙周组织结构再生及功能恢复的技术还在探索之中。传统的牙周治疗方法并不能满足临床需求, 近年来牙周组织工程进展迅速, 为研究提供了新的方向。牙周组织工程是采用组织工程的方法, 构建由

一种或多种要素(细胞、支架、信号分子)组成的复合物, 并将其植入缺损区, 最终实现功能性组织再生的技术。牙周组织工程是一种由多种元素构成的复合体以恢复缺损区功能的技术。临床上, 此类组织工程复合物的最佳细胞来源及最适合刺激植入细胞的再生潜力和治疗效果的生物信号分子都还未明确。牙周膜干细胞 (periodontal ligament stem cells, PDLSCs) 是一种具有潜力的免疫调节剂, 研究^[3]证实, 牙周膜干细胞显示出较牙髓干细胞及牙髓间充质干细胞更高的生长潜力, 因此其在牙周组织再生方向有着重要作用。Eph 作为受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) 的大家族, 可通过配体激活的激酶结构域将细胞外的信号传递至细胞, EphB4 受体与 ephrinB2 配体可互被对方激活, 发生酪氨酸磷酸化反应。该研究旨在通过基因转染犬牙周膜干细胞使其过表达 ephrinB2 来观察其调控细胞成骨分化的能力。

1 材料与方法

1.1 细胞分离与鉴定 实验涉及的所有试剂、细胞及牙齿均获得伦理委员会(批准号: 20161108)的同意。全麻下拔除 Beagle 犬前磨牙和磨牙, 用含有 10% 双抗 (青霉素 100 μ /ml, 链霉素 100 μ g/ml) 的 PBS 大量冲洗, 刮取根中 1/3 牙周膜, I 型胶原酶消化后获得细胞悬液, 1 000 r/min 离心 3 min, 小心吸弃上清液, 将组织块放入含有 20% FBS 和 1% 双抗的 DEME 培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养, 每 3 d 换液, 记录细胞生长情况, 待融合至 80%, 胰酶消化传代至第三代。流式细胞仪检测其干细胞特性, 检测 STRO-1、CD45、CD73、CD90 和 CD105 表面标志物的表达。分别用 0.21% 油红 O 染色实验以及荧光免疫检测多向分化能力。

1.2 慢病毒载体转染细胞 转染病毒购自苏州吉玛公司, 将 EfnB2-绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 和空载体 GFP-Bsd (对照组) 转染入犬牙周膜干细胞 (canine periodontal ligament stem cells, cPDLSCs)。具体操作如下: 按 1×10^5 每孔密度, 待细胞融合至 60% 时, 吸弃 DEME 培养基, 将含

2022-02-27 接收

基金项目: 江苏省自然科学基金青年项目 (BK20210080); 江苏省大学生创新创业训练计划 (202010313003Z)

作者单位: ¹徐州医科大学 徐州 221004

²徐州医科大学附属医院口腔科医学科 徐州 221002

³徐州医科大学附属医院口腔科教科 徐州 221002

作者简介: 刘雨苗, 女, 本科生;

刘宗响, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xzkqlzx@163.com

有 EfnB2-GFP-Bsd 和 GFP-Bsd 的 DEME 培养基分别加入 6 孔板中, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 随后更换含 10% FBS 和 1% 嘌呤霉素的 DEME 培养基在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中筛选 48 h, 荧光倒置显微镜下观察其转染效率。分别采用 RT-PCR 及 Western blot 检测 ephrinB2 的 mRNA 及蛋白表达水平。

1.3 细胞增殖实验 CCK-8 试剂盒用以进行细胞增殖实验。具体操作如下: 按每孔细胞密度为 8 × 10³ 个/ml 的 wild-type cPDLSCs(未转染犬牙周膜干细胞), EfnB2-cPDLSCs 和 Vector-cPDLSCs 细胞悬液种在 96 孔板中, 分别在第 0、2、4、6、8 天加入 CCK-8 溶液, 37 °C、5% CO₂ 孵育 2 h, 酶标仪上进行检测, 吸收波长为 450 nm。根据所测得吸光度(optical density, OD) 值分组计算细胞的增殖活力。

1.4 成骨诱导 按每孔细胞密度 1 × 10⁵ 个/ml 的 wild-type cPDLSCs, EfnB2-cPDLSCs 和 Vector-cPDLSCs 细胞悬液种在 6 孔板中, 培养至融合度为 70% 时更换含有成骨诱导液的培养基(0.1 μmol/L 地塞米松 + 50 μmol/L 维生素 C + 10 mmol/L β-甘油磷酸钠)。常规每 3 d 更换一次成骨诱导液。21 d 后行碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP) 实验及茜素红 S 染色实验, 观察并拍照。

1.5 RT-PCR 用 Trizol 法提取单独培养的 wild-type cPDLSCs, EfnB2-cPDLSCs 和 Vector-cPDLSCs 的总 RNA, SuperScript III 反转录酶将 1.0 μg 的总 RNA 合成 cDNA, 并用 Nanodrop 2000 分光光度计来进行定量。PCR 扩增仪中进行逆转录, 使用荧光定量 PCR 仪器进行检测, 设置三个复孔, 反应条件: 95 °C、10 min; 95 °C、15 s。58 °C、1 min 40 个循环。根据各基因的 Ct 值, 计算出各组相对 mRNA 水平。RT-PCR 的引物序列见表 1。

1.6 Western blot 按 1 × 10⁵ 个/ml 每孔密度将 wild-type cPDLSCs、EfnB2-cPDLSCs、Vector-cPDLSCs 种入 6 孔板培养至融合度约为 70%, 更换成骨诱导液 12 h 后裂解, 4 °C 下 12 000 r/min 离心 20 min 后收集上清液, 用 BCA 试剂盒定量分析蛋白浓度, 每个上样孔为 10 ~ 20 μl 等量的细胞裂解物。在 10% SDS-PAGE 彩色凝胶上裁取合适的区域随后转移到 PVDF 膜上, 进行封闭, 随后一抗 4 °C 孵育过夜, 加入二抗后使用化学发光试剂盒观察, 使用 Quantity One 软件测定条带。所用抗体: EphrinB2 兔抗人多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司), 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自美国 Cell Signaling Tech-

表 1 犬 ALP、COL1、DSPP、Runx2、BSP、ephrinB2 基因 RT-PCR 引物序列

犬基因	引物(5'-3')
GAPDH	F: TGTCCCCACCCCAATGTATC R: CTCCGATGCCTGCTTCACTACCTT
ALP	F: TTCAAACCGAGACACAAGCAACT R: GGGTCAGTCACGTTGTTCCTGT
COL1	F: GGTTCAGCTAAGTTGGAGGTACT R: CCAATGTTGCCAGGGTAAC
DSPP	F: GTCCTAGTGGGGAATGGAGCA R: TCTTCAGGGCCATCATCTTC
Runx2	F: TACCACACCTACCTGCCACCAC R: GCGGAAGCATTCTGGAAGGAGAC
BSP	F: TTGCTCAGCATTTTGGGAATGG R: AACGTGGCCGATACTTAAAGACC
ephrinB2	F: CCTCTCTCAACTGTGCCAAA R: CCCAGAGGTTAGGGCTGAATT

nology 公司 抗 β-actin 鼠多克隆抗体购自美国 Bioworld Tech 公司。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 24.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用单因素方差分析(ANOVA) 及 Tukey's post-hoc test 进行 3 组间实验数据的比较, 用 *t* 检验进行两组间的数据比较, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 犬 cPDLSCs 培养及鉴定 流式细胞仪分析可示提取的 cPDLSCs 中 CD73、CD90、CD105 等为高表达的干细胞标志物, 而 CD45 表达较低, 见图 1A。另外, 分离的 cPDLSCs 具有多向分化能力, 见图 1B、C。

2.2 ephrinB2 转染 PDLSCs 嘌呤霉素筛选后, 可见在倒置荧光显微镜下, EfnB2-cPDLSCs 及 Vector-cPDLSCs 中 GFP 呈现高表达, 而在对照组 wild-PDLSCs 中并未检测到荧光的表达, 见图 2。Western blot 分析结果提示: ephrinB2 在 EfnB2-cPDLSCs 中的表达量高于其在 Vector-cPDLSCs 和 wild-type cPDLSCs 中的表达(*P* < 0.05)。见图 2C。RT-PCR 结果显示: EfnB2-cPDLSCs 组的 ephrinB2 mRNA 表达量高于 Vector-cPDLSCs 组及 wild-type cPDLSCs 组(*P* < 0.05)。见图 2B。

2.3 实验组与对照组的细胞增殖能力 根据吸光度测定细胞增殖能力, EfnB2-cPDLSCs 与 wild-type cPDLSCs、Vector-cPDLSCs 在细胞增殖能力方面差异并无统计学意义。见图 3。

2.4 实验组与对照组的成骨能力 经 12 d 行 ALP 实验, 与 wild-type cPDLSCs 和 Vector-cPDLSCs 相比,

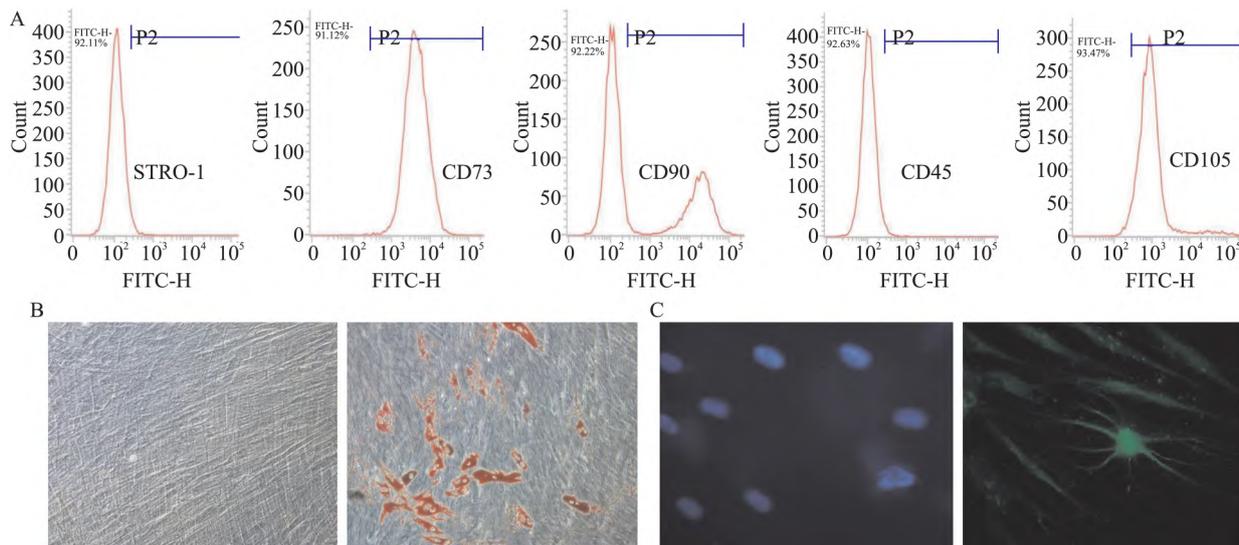


图1 cPDLSCs 的分化能力检测

A: 流式细胞仪分析 cPDLSCs 的表面抗原特征表型 CD45、CD73、CD90、CD105、STRO-1; B: 成脂诱导 3 周后油红 O 染色 ×10; C: 成神经诱导 2 周后免疫荧光结果 ×100

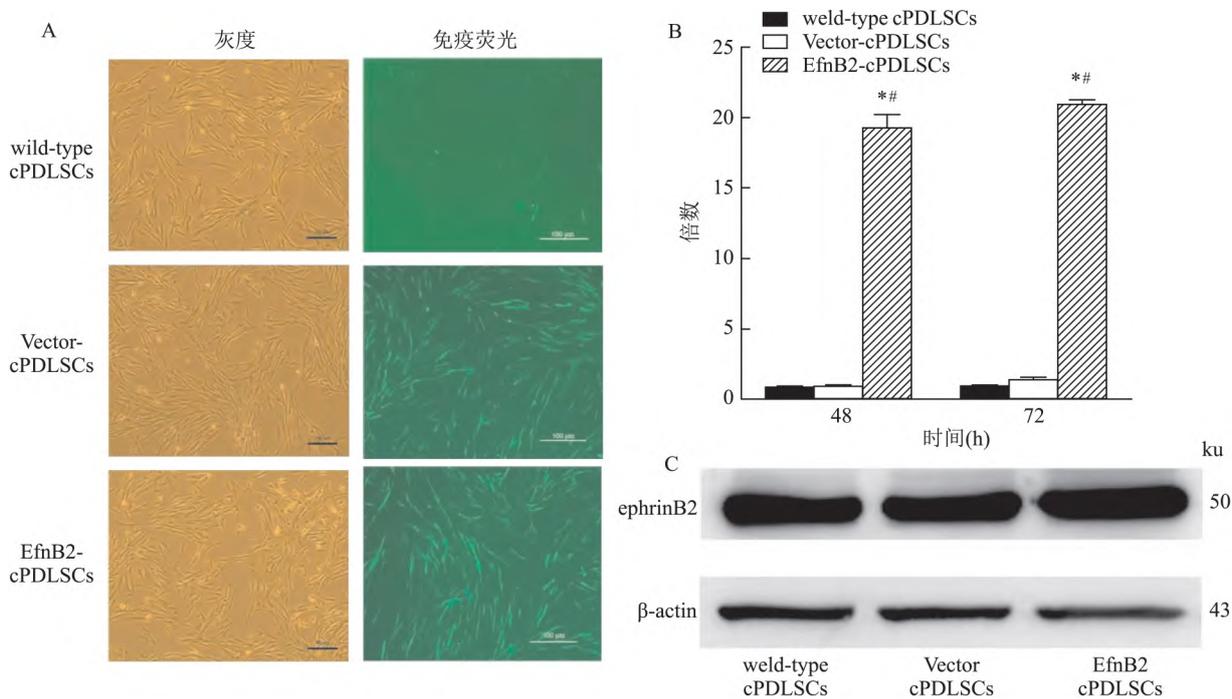


图2 wild-type cPDLSCs 组、Vector-cPDLSCs 组和 EfnB2-cPDLSCs 转染效果对比

A: wild-type cPDLSCs 组、Vector-cPDLSCs 组和 EfnB2-cPDLSCs 组的 GFP 表达; B: wild-type cPDLSCs 组、Vector-cPDLSCs 组和 EfnB2-cPDLSCs 组的 ephrinB2 相对 mRNA 表达量; 与 wild-type cPDLSCs 组比较: * $P < 0.05$; 与 Vector-cPDLSCs 组比较: # $P < 0.05$; C: wild-type cPDLSCs 组、Vector-cPDLSCs 组和 EfnB2-cPDLSCs 组 Western blot 分析 ephrinB2 表达水平

EfnB2-cPDLSCs 展现出更高的 ALP 活性和矿化能力。见图 4。

2.5 实验组和对照组的成骨分化标志物的 mRNA 的表达水平 RT-PCR 结果显示: 分别比较成骨诱导培养 7、14、21 d 的成骨分化标志物的 mRNA 表达

结果, EfnB2-cPDLSCs 组的 ALP、Runx2、Col-1、BSP 的 mRNA 表达水平高于 Vector-cPDLSCs 组 ($P < 0.05$)。EfnB2-cPDLSCs 组 7d 及 14d 时 DSPP 的 mRNA 表达高于 Vector-cPDLSCs ($P < 0.05$), 但在 21 d 时差异无统计学意义。见图 5。

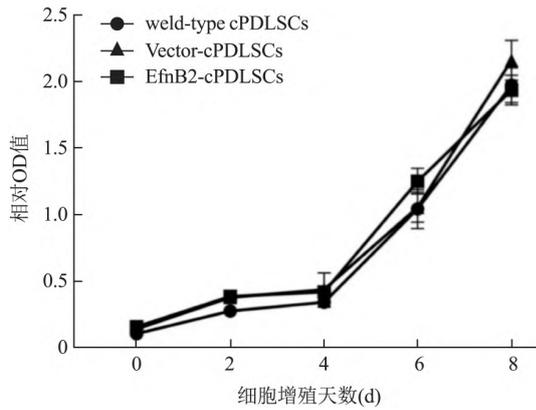


图3 wild-type cPDLSCs 组、Vector-cPDLSCs 组和 EfnB2-cPDLSCs 组的细胞增殖能力比较

3 讨论

牙周炎是一种支持组织进行性破坏的炎症疾病,牙周基础治疗及药物治疗能良好的控制菌斑、消除炎症,但是无法恢复炎症造成牙槽骨吸收及附着丧失,患者仍面临牙齿松动后拔除的风险^[4]。随着患者保留牙齿意愿的增强,引导组织再生工程受到

广泛研究。有报道称 ephrinB2 信号分子可增强细胞迁移能力、促进牙源性干细胞成骨,并能促进周围血管新生,是理想的生物信号分子^[5]。体外实验证明 ephrinB2 过表达可调节成骨细胞和骨髓间充质干细胞的成骨分化潜能,先前实验证实 cPDLSC 能够高表达作为间充质干细胞表面标志物,成骨、成脂和成神经实验均提示可作为牙周组织工程的干细胞来源^[6]。在本实验中,成功获得 cPDLSC,并在 cPDLSC 上过表达 ephrinB2,CCK-8 结果表明转染后的细胞增殖能力较强。在成骨诱导条件下,观察到 ephrinB2-cPDLSC 组的 ALP 和矿化结节密度水平远高于 Vector-cPDLSCs 组,证实了 ephrinB2 过表达具有诱导犬牙周膜干细胞的成骨分化潜能。RT-PCR 结果显示 ephrinB2-cPDLSC 组成骨基因 ALP、Runx2、COL-1、BSP、DSPP 基因在 7、14、21 d 的表达水平均高于对照组。其中,Runx2、COL1、BSP、DSPP 的表达在 14 d 时达到峰值。实验组成骨基因高表达表明 ephrinB2 修饰的 cPDLSC 具有更大的成骨潜能。

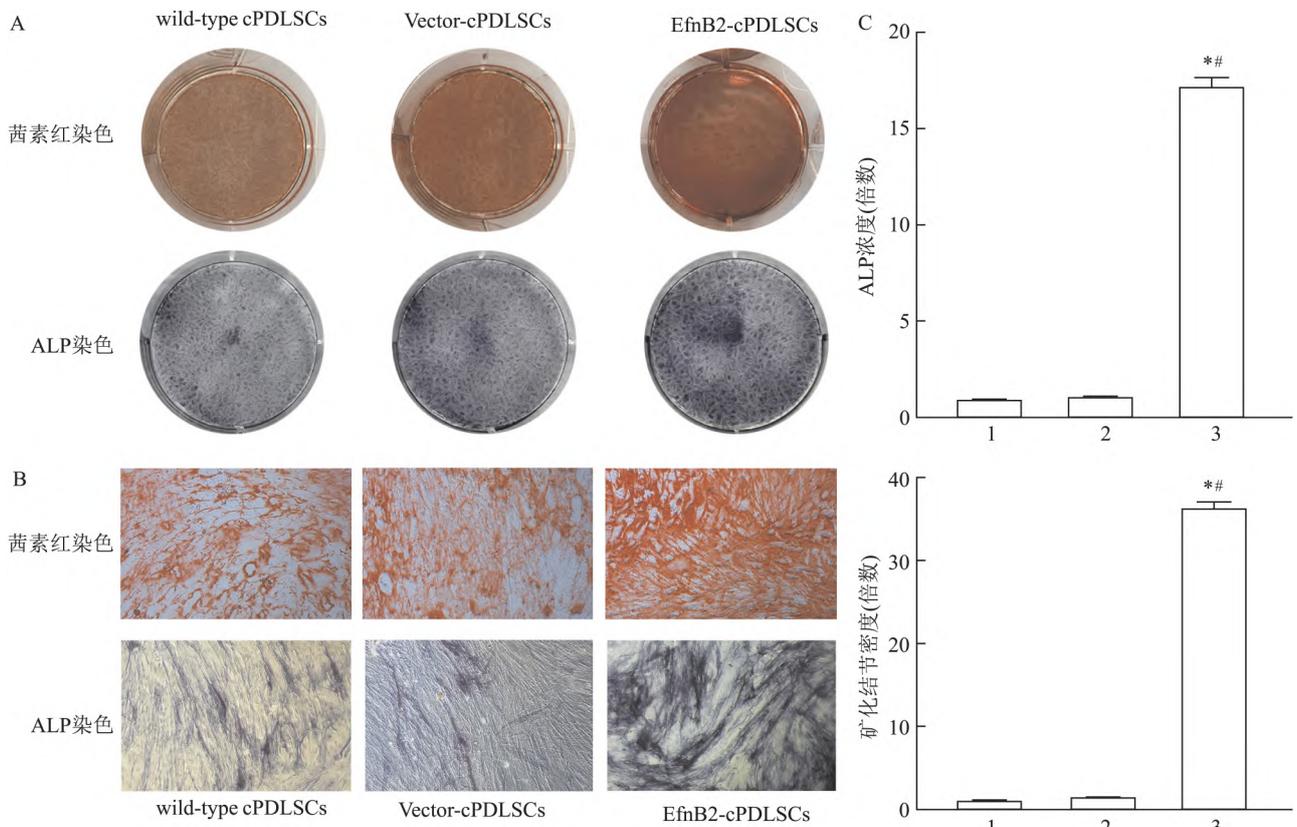


图4 wild-type cPDLSCs 组、Vector-cPDLSCs 组和 EfnB2-cPDLSCs 组 ALP 染色和茜素红染色

A: wild-type cPDLSCs 组、Vector-cPDLSCs 组、EfnB2-cPDLSCs 组在培养 21 d 时 ALP 染色和茜素红染色 B: wild-type cPDLSCs 组、Vector-cPDLSCs 组、EfnB2-cPDLSCs 组在培养 21 d 时 ALP 染色和茜素红染色镜下; C: 各组 ALP 密度和相对矿化结节密度; 1: wild-type cPDLSCs 组; 2: Vector-cPDLSCs 组; 3: EfnB2-cPDLSCs 组; 与 wild-type cPDLSCs 组比较: * P < 0. 05; 与 Vector-cPDLSCs 组比较: # P < 0. 05

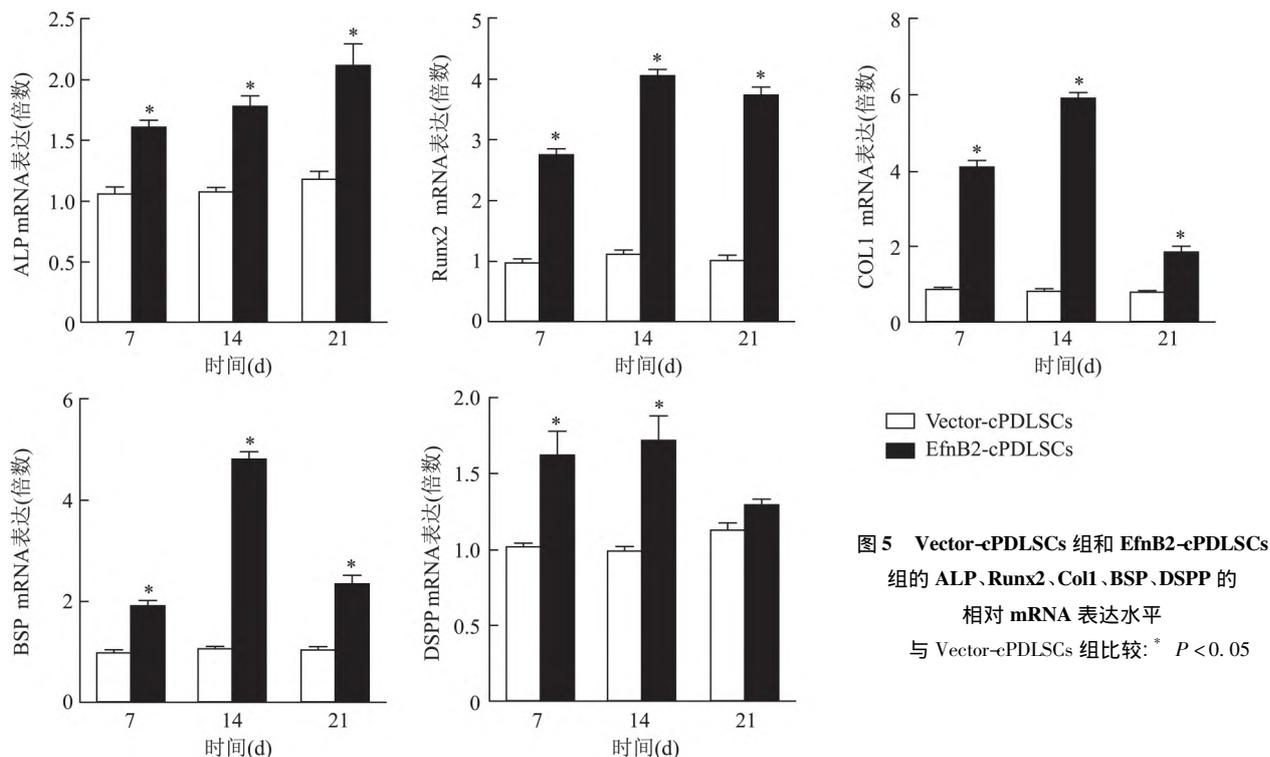


图5 Vector-cPDLSCs 组和 EfnB2-cPDLSCs 组的 ALP、Runx2、Col1、BSP、DSPP 的相对 mRNA 表达水平与 Vector-cPDLSCs 组比较: * $P < 0.05$

牙周组织工程是一项利用由支架、细胞、信号分子组成的复合体,植入缺损区域以实现功能性组织再生的技术。但是如何选择适合的信号分子以及何种载体使得信号分子更好作用于靶细胞还未明确。

ephrinB2 信号分子可增强细胞迁移能力、促进牙源性干细胞成骨,并能促进周围血管新生,是理想的生物信号分子。受体 EphB4 和配体 ephrinB2 之间的信号传导是双向,即信号传入 EphB4 表达的细胞(正向信号)和 ephrinB2 表达的细胞(反向信号)使各自发生酪氨酸磷酸化,进而激活下游通路如 RhoA、Rac 等蛋白,影响细胞的黏附运动,促进血管新生^[7]。在骨重建中,Eph/ephrin 双向信号通过反向信号传导 ephrinB2 以抑制 c-Fos-NFATc1 转录级联反应(负反馈),从而抑制破骨细胞的分化;另一方面,正向信号通过降低 RhoA 活性和增强成骨细胞分化刺激骨形成^[8]。本研究中通过基因转染技术用 ephrinB2 转染 cPDLSCs,根据荧光蛋白显示及 ephrinB2 的蛋白和 mRNA 表达,EfnB2-cPDLSCs 中 ephrinB2 蛋白和 mRNA 稳定持续表达,证实 ephrinB2 转染成功。通过 CCK-8 检测转染后细胞增殖能力,实验组和对照组差异并无统计学意义。为进一步研究 ephrinB2 转染后 cPDLSCs 成骨分化能力,ALP 实验和 RT-PCR 可见,在成骨诱导条件下培养时,与 wild-type cPDLSCs 和 Vector-cPDLSCs 相比,

EfnB2-cPDLSCs 显示出更多的矿化结节和增强的 ALP 活性,此外,在中后期多种成骨基因如 COL-1、ALP、RunX2 等的表达都增加,有研究^[9]发现,用 EphB4-FC 刺激人牙周膜干细胞可见早期成骨基因的表达并没有差异,不同于本研究中 EfnB2-cPDLSCs。推测 ephrinB2 反向信号不仅在骨代谢中发挥作用,也和早期骨形成相关且 ephrinB2 的基因转染更加持续强烈^[10]。总之,本研究结果表明,ephrinB2 基因修饰过的 cPDLSCs 表现出增高的成骨分化能力,ephrinB2 反向信号通路和 EphB4 或在其中发挥重要作用。

参考文献

- [1] Dannewitz B, Holtfreter B, Eickholz P. Periodontitis-therapy of a widespread disease [J]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2021, 64(8): 931-40.
- [2] Pellegrini G, Pagni G, Rasperi G. Surgical approaches based on biological objectives: GTR versus GBR techniques [J]. Int J Dent, 2013, 2013: 521547.
- [3] 吴梦鑫,梁文红,杨琨,等.牙周膜干细胞促进牙周组织再生的影响因素[J].中国组织工程研究,2022,26(30):4912-4920.
- [4] 冯远华,罗翠芬,彭国光,等.骨质疏松与牙种植的探析[J].中国医学创新,2017,14(1):121-4.
- [5] Qu F, Song Y, Wu Y, et al. The protective role of Ephrin-B2/EphB4 signaling in osteogenic differentiation under inflammatory environment [J]. Exp Cell Res, 2021, 400(2): 112505.
- [6] Ning H, Lin G, Lue T F, et al. Mesenchymal stem cell marker

- Stro-1 is a 75 kd endothelial antigen [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 413(2): 353–7.
- [7] Hou J, Chen Y, Meng X, et al. Compressive force regulates ephrinB2 and EphB4 in osteoblasts and osteoclasts contributing to alveolar bone resorption during experimental tooth movement [J]. *Korean J Orthod*, 2014, 44(6): 320–9.
- [8] 徐晓南, 张丁. 促红细胞生成素肝细胞激酶受体及配体对骨改建的调控作用 [J]. *中国医学科学院学报*, 2018, 40(2): 294–8.
- [9] Heng B C, Wang S, Gong T, et al. EphrinB2 signaling enhances osteogenic/odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells [J]. *Arch Oral Biol*, 2018, 87: 62–71.
- [10] Tonna S, Takyar F M, Vrahnas C, et al. EphrinB2 signaling in osteoblasts promotes bone mineralization by preventing apoptosis [J]. *FASEB J*, 2014, 28(10): 4482–96.

Overexpression of ephrinB2 in canine periodontal ligament stem cells regulates osteogenic differentiation

Liu Yumiao¹, Yang Jinxin², Zhu Shaoyue³, Ma Yulin¹, Xia Hanping¹,

Zhou Meng², Yang Shulei¹, Huang Taining¹, Ding Kexin², Liu Zongxiang^{1,2}

(¹Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004; ²Dept of Medical, ³Dept of Science and Education, The Affiliated Stomatological Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002)

Abstract Objective Investigate osteogenic differentiation of canine periodontal ligament stem cells (cPDLSCs) via over-expression ephrinB2 in cPDLSCs. **Methods** cPDLSCs were isolated from the premolars and molars of Beagle. After transfected with EfnB2-GFP-Bsd and GFP-Bsd empty Vector, cPDLSCs were induced to osteogenic differentiation. Western blot was used to invest the expression of ephrinB2 protein. The effect of osteogenic differentiation of EfnB2-cPDLSCs and Vector-cPDLSCs were analyzed by RT-PCR, CCK-8, Alizarin-red S staining and ALP. **Results** There was no significant difference in cell proliferation between EfnB2-cPDLSCs and Vector-cPDLSCs. While EfnB2-cPDLSCs displayed an enhanced ALP activity and more prominent mineralized nodules compared with Vector-cPDLSCs. The odonto-/osteogenic genes in EfnB2-cPDLSCs were also highly enhanced. **Conclusion** The results of our study indicated that ephrinB2 gene-transfected cPDLSCs showed enhanced osteogenic differentiation.

Key words cPDLSCs; ephrinB2; gene transfection; osteogenic differentiation

(上接第 422 页)

mice. MnPO^{Vglut2} neurons expressing red fluorescent protein were located by using fluorescence microscope. Whole-cell patch clamp technique was used to observe the effect of AVP on the firing frequency of MnPO^{Vglut2} neurons, the effect of synaptic transmission blockers (STBs) on the AVP-induced change in the firing frequency of MnPO^{Vglut2} neurons, and the effect of AVP V1a receptor antagonist on the AVP-induced change in the firing frequency of MnPO^{Vglut2} neurons. **Results** The mean firing frequency of MnPO^{Vglut2} neurons increased during perfusion with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) and AVP compared with that during perfusion with ACSF ($P < 0.01$), indicating that AVP excited the MnPO^{Vglut2} neurons. The mean firing frequency of MnPO^{Vglut2} neurons still increased during perfusion with ACSF, STBs, and AVP compared with that during perfusion with ACSF and STBs ($P < 0.001$); moreover, the magnitude of AVP-induced increase in firing frequency didn't change significantly during perfusion with ACSF, STBs, and AVP compared with that during perfusion with ACSF and AVP ($P > 0.05$), suggesting that AVP excited the MnPO^{Vglut2} neurons directly in a postsynaptic manner. The magnitude of AVP-induced increase in the firing frequency of MnPO^{Vglut2} neurons declined during perfusion with ACSF, STBs, AVP, and V1a receptor antagonist compared with that during perfusion with ACSF, STBs, and AVP ($P < 0.01$), suggesting that AVP excited MnPO^{Vglut2} neurons directly via V1a receptor. **Conclusion** AVP can excite MnPO^{Vglut2} neurons via V1a receptor directly in a postsynaptic manner. This study reveals the molecular marker of MnPO neurons which AVP act on.

Key words arginine vasopressin; median preoptic nucleus; glutamatergic neurons; thermoregulation