

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2017.07.002

· 专栏论著 ·

Notch 信号及自噬在三氧化矿化聚合物促人牙髓细胞体外分化中的作用

何飞¹, 郑雨燕¹, 仇伟², 张国权¹, 麦穗³

1. 深圳市人民医院口腔科·暨南大学第二附属医学院, 广东 深圳(518020); 2. 清华大学深圳研究生院, 生命与健康学部, 健康科学与技术重点实验室, 广东 深圳(518055); 3. 中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院牙体牙髓科, 广东 广州(510055)



【通讯作者简介】 郑雨燕, 女。毕业于中山大学光华口腔医学院, 硕士研究生, 主任医师。1998 年至今在深圳市人民医院口腔医学中心工作, 2012 年起任深圳市人民医院口腔医学中心一门诊主任。2010 年作为访问学者赴德国卡尔古斯塔夫大学医院研修。现任广东省口腔医学会理事, 广东省口腔医师协会监事, 深圳市医师协会口腔医师分会常务理事。中华口腔医学会牙体牙髓病专业委员会委员, 中华口腔医学会全科口腔医学专业委员会委员, 广东省口腔医学会牙体牙髓专业委员会常务委员, 广东省口腔医学会全科专业委员会委员, 深圳市预防医学会口腔保健专业委员会副主任委员, 深圳市医学会口腔专业委员会常务委员。主要从事龋病、牙髓病的临床和基础研究。主持并完成多项科研课题, 在专业核心期刊上发表论文 20 余篇。

【摘要】 目的 探讨 Notch 信号及自噬在三氧化矿化聚合物(mineral trioxide aggregate, MTA)促人牙髓细胞(human dental pulp cells, hDPCs)体外分化的作用。方法 体外培养 hDPCs, 采用荧光定量 PCR 法检测 MTA 作用不同时间(24 h、3 d、7 d)对 hDPCs 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、核心结合蛋白因子 2(runt-related transcription factor 2, Runx2)及牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP)表达的影响; Von Kossa 染色观察细胞钙化结节形成的变化; Western Blot 法检测 MTA 作用下 hDPCs Notch 信号及自噬相关蛋白表达的变化。结果 0.1 mg/mL MTA 即可促进体外培养 hDPCs 的分化。与未处理 hDPCs 的空白对照组相比, MTA 组 hDPCs 的 Notch 信号成分 Notch1、Hes1、Jagged1 及自噬相关蛋白 p62 表达均明显增高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。以自噬体与溶酶体融合抑制剂 Bafilomycin A1 (BAF)刺激细胞, 自噬潮受抑制, Notch1 表达升高, MTA 具有类似作用。结论 MTA 可显著促进 hDPCs 的体外分化, 其作用机制可能与 Notch1-Jagged1-Hes1 信号转导途径激活及自噬抑制有关。

【关键词】 三氧化矿化聚合物; 牙髓细胞; 分化; Notch; 自噬

【中图分类号】 R780.2 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2017)07-0414-06

【引用著录格式】 何飞, 郑雨燕, 仇伟, 等. Notch 信号及自噬在三氧化矿化聚合物促人牙髓细胞体外分化中的作用[J]. 口腔疾病防治, 2017, 25(7): 414-419.

Effect of Notch signaling and autophagy on MTA induced differentiation of human dental pulp cells *in vitro*

HE Fei¹, ZHENG Yuyan¹, QIU Wei², ZHANG Guoquan¹, MAI Sui³. 1. Department of Stomatology, the Second Clinical

【收稿日期】 2017-03-11; **【修回日期】** 2017-05-23

【基金项目】 广东省自然科学基金项目(2014A030313068); 深圳市科创委科技计划项目(JCYJ201416122811975)

【作者简介】 何飞, 副主任医师, 博士, Email: hefeixqkq@aliyun.com

【通信作者】 郑雨燕, 主任医师, 硕士, Email: swift-zheng@163.com

Medical College & Shenzhen People's Hospital, Ji'nan University, Shenzhen 518020, China; 2. Key Lab in Healthy Science and Technology, Division of Life Science, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China; 3. Department of Conservative Dentistry and Endodontics Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510055, China

Corresponding author: ZHENG Yuyan, Email: swift-zheng@163.com, Tel: 0086-755-22943578

【Abstract】 Objective The aim of this study is to investigate the roles of Notch signaling and autophagy on mineral trioxide aggregate (MTA) induced differentiation of human dental pulp cells (hDPCs). **Methods** Third molars from healthy human were collected and hDPCs were isolated by a combined digestion of collagenase I and dispase II. Real time PCR were used to test the mRNA expression levels of alkaline phosphatase (ALP), runt-related transcription factor 2 (Runx2) and dentin sialophoprotein (DSPP) in MTA treated hDPCs in different time (24 h, 3 d and 7 d). The mineralization nodules formed by hDPCs with or without MTA treatment were detected by Von Kossa staining. Expressions of Notch1, Jagged1, Hes1, LC3 II/LC3 I and p62 in wild type and MTA treated hDPCs were detected by western blotting. **Results** MTA extracted in a concentration of 0.1 mg/mL could promote the differentiation of hDPCs. Compared with that of wild type hDPCs, the expressions of Notch1, Hes1, or Jagged1 and p62 ($P < 0.01$) in MTA treated hDPCs were significantly increased. MTA treatment showed inhibition effects on autophagy flux similar to Bafilomycin A1, a specific inhibitor of fusion between autophagosomes and lysosomes. **Conclusion** MTA could promote hDPCs differentiation with highly relevant in stimulating Notch1-Jagged1-Hes1 signaling and inhibition of autophagy flux.

【Key words】 Mineral trioxide aggregate; Dental pulp cells (DPCs); Differentiation; Notch; Autophagy

三氧化矿化聚合物(mineral trioxide aggregate, MTA)是近些年常用的盖髓剂,具有优良的封闭性及诱导牙本质桥形成能力^[1-3]。但目前对MTA促牙髓损伤修复的作用机制尚不明确,可能与钙离子释放及MAPK、Wnt/ β -catenin和NF- κ B等信号分子作用有关^[4-7]。Notch信号是调节细胞分化的关键信号之一^[8-9],它通过对牙髓干细胞的增殖和分化的调控,参与牙髓损伤修复过程^[10-11]。最新研究显示,Notch1还可作为自噬的底物,参与机体自噬过程^[12]。本研究通过研究MTA对牙髓细胞的成牙本质分化相关因子,碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、核心结合蛋白因子2(runt-related transcription factor 2, Runx2)、牙本质涎磷蛋白(dentin sialophoprotein, DSPP)及Notch信号成份(受体Notch1、配体Jagged1、靶蛋白Hes1),以及自噬相关蛋白微管相关蛋白1轻链3(Microtubule-associated protein1 light chain 3, LC3)、p62的表达影响,探讨MTA的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

MTA(Dentsply公司,美国); α -MEM培养基、胰蛋白酶(Gibco公司,美国);胎牛血清(Hyclon公司,美国);I型胶原蛋白酶、Dispase II、Bafilomycin A1(BAF)(Sigma公司,美国)。荧光定量PCR仪qTOWER2.2(Aanalytik, Jena, 德国);SYBR GREEN

PCR MASTER MIX(ABI公司,美国)。Notch1抗体(Abcam, 英国), Jagged1抗体(Abcam, 英国), Hes1抗体(CST, 美国), p62抗体(MBL, 日本), LC3抗体(Sigma, 美国), GAPDH抗体(Proteintech, 美国)

1.2 人牙髓细胞(human dental pulp cells, hDPCs)培养

牙髓取自临床上因阻生而完整拔除的健康第三磨牙,患者知情同意,项目取得深圳市人民医院伦理委员会批准。hDPCs的分离和培养参见文献^[13]。

1.3 MTA浸提液的制备

称取一定量的MTA,加入适量的无血清培养基,调节其终浓度至20 mg/mL。37℃摇床上震荡48 h,37℃孵育3 d。过滤,4℃保存备用^[14]。

1.4 钙质结节染色

细胞浓度为 1×10^4 个/孔接种6孔培养板,培养24 h后加含浓度0.1 mg/mL MTA的培养基,以无MTA为空白对照组,细胞在37℃、5% CO₂培养箱培养21 d, Von Kossa法进行钙质结节染色。

1.5 荧光定量PCR

牙髓细胞以 1×10^5 个/孔接种于6孔培养板,培养3~5 d后分为2组,MTA组加入含0.1 mg/mL MTA的培养基,以无MTA为空白对照组,细胞在37℃、5% CO₂培养箱分别培养24 h、3 d及7 d,实验结束后Trizol法提取总RNA,合成cDNA,以GAPDH为内参,SYBR Green试剂盒检测ALP、Runx2及

DSPP mRNA 相对表达水平。

ALP引物序列:上游5'-AACATCAGGGACATT-GACGTG-3';下游:5'-GTATCTCGGTTTGAAGCTCTTCC-3'。Runx2引物序列:上游5'-CCGCCT-CAGTGATTTAGGGC-3';下游5'-GGGTCTGTA-ATCTGACTCTGTCC-3'。DSPP引物序列:上游5'-CCTAAAGAAAATGAAGATAATT-3';下游5'-TAGAAAACTCTTCCTCCTAC-3'。GAPDH引物序列:上游5'-GGATTTGGTCGTATTGGG-3';下游5'-GGAAGATGGTGATGGGATT-3'。

1.6 Western blot 检测

牙髓细胞以 1×10^4 个/mL 细胞接种,培养 5~7 d 后按设计分组,分别加入含不同浓度 MTA (0.1、0.5、1.0 mg/mL) 或 Bafilomycin A1 (BAF) (100 nM) 的培养基,以单纯培养基为空白对照组,细胞在 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 或 48 h,实验结束后弃上清,以冷 PBS 清洗 2 次后裂解法提取细胞总蛋白,测定提取物的蛋白浓度,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后取出凝胶,转印至硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)膜,转印结束后将 NC 膜置于封闭液中,以阻止非特异性结合;一抗室温孵育 2 h;清洗后二抗室温孵育 1 h;HRP 显色,观察结果;用凝胶扫描仪对蛋白条带进行扫描,Image J 软件进行灰度分析,其中 LC3

II/LC3 I 比值为条带灰度值除以内参灰度值后的比值。所用抗体:Notch1 抗体(1:200),Jagged1 抗体(1:200),Hes1 抗体(1:1 000),p62 抗体(1:2000),LC3 抗体(1:2000),GAPDH 抗体(1:10 000)。

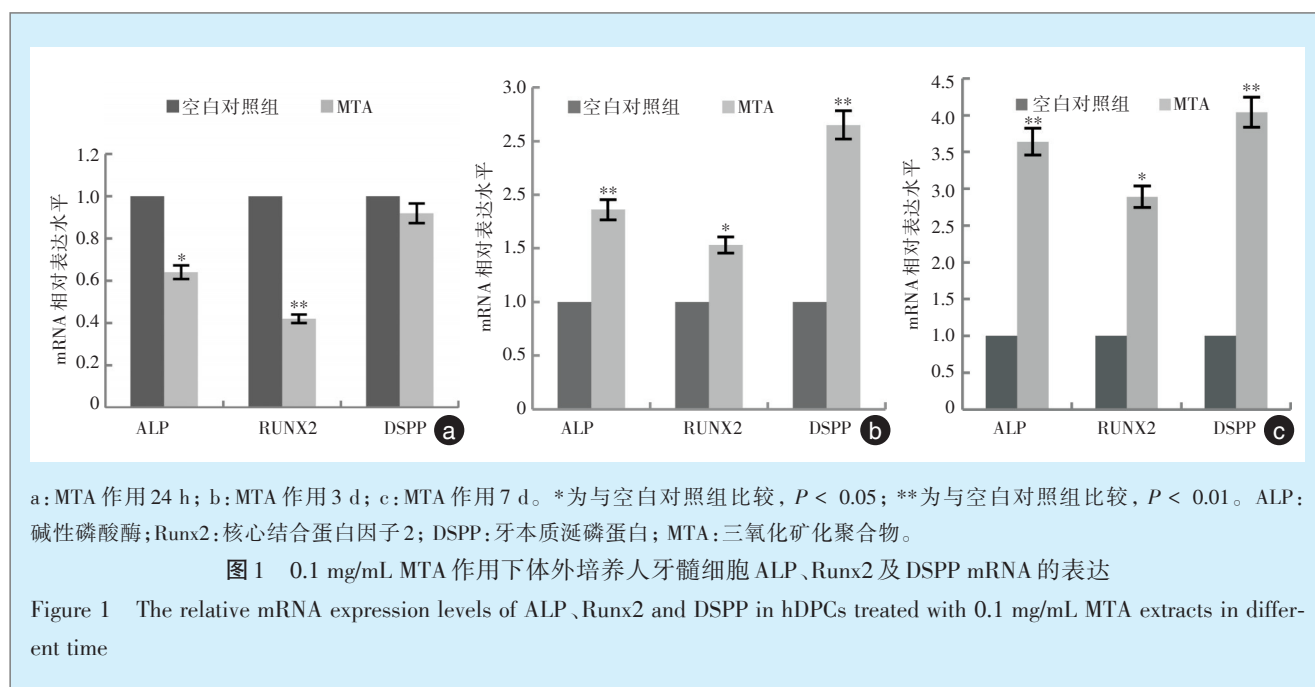
1.7 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析,实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,检验水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 MTA 作用下 hDPCs 的 ALP、Runx2 及 DSPP mRNA 表达变化

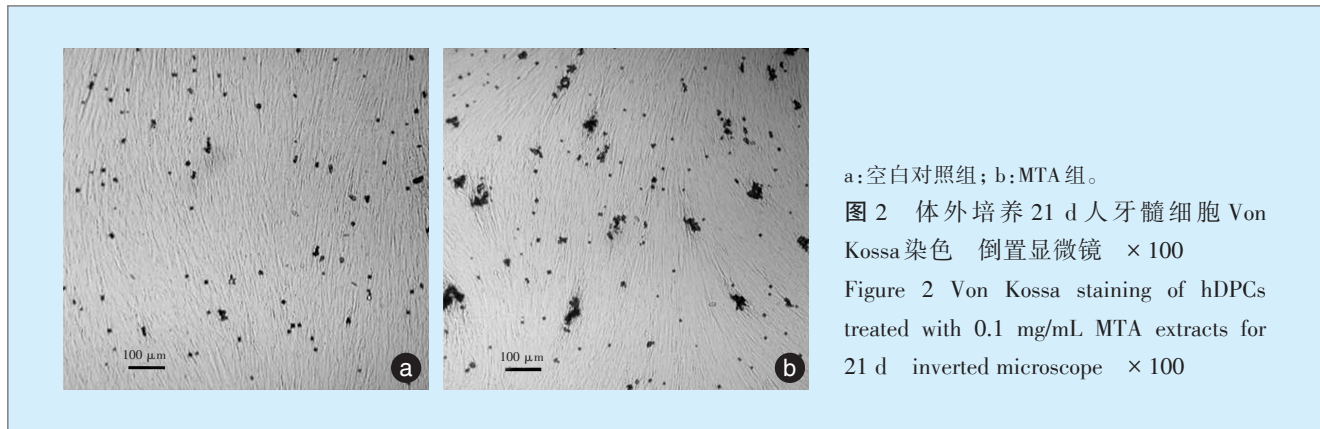
浓度为 0.1 mg/mL MTA 作用不同时间,hDPCs ALP、Runx2 及 DSPP mRNA 相对表达水平不同。MTA 作用 24 h,与空白对照组相比,细胞 DSPP 的表达量无显著变化,而 ALP($t = 3.55, P = 0.015$)、Runx2($t = 6.12, P = 0.001 2$) 表达降低(图 1a); MTA 作用 3 d,ALP($t = 3.06, P = 0.028$)、Runx2($t = 3.01, P = 0.033$) 及 DSPP($t = 3.50, P = 0.004$) 表达均升高(图 1b);至 7 d 时 ALP($t = 5.85, P = 0.001 3$)、Runx2($t = 4.15, P = 0.026$) 及 DSPP($t = 13.21, P < 0.001$) 表达水平均较对照组均增强,且差异具有统计学意义(图 1c)。



hDPCs 体外连续培养 21 d, Von Kossa 钙质染色显示 MTA 组较空白对照组钙化结节数量增多,体积增大(图 2)。

2.2 MTA 作用下 hDPCs Notch 信号成分的蛋白表达

Western Blot 法检测 0.1 mg/mL MTA 作用 24 h hDPCs 的 Notch 信号成分的蛋白表达,如图 3 所示,



与对照组相比, MTA组 Notch1受体($t = 4.03, P = 0.036$)、Jagged1配体($t = 6.02, P = 0.0078$)及其主要靶蛋白Hes1($t = 2.98, P = 0.044$)的蛋白表达均明显增强, 差异均有统计学意义。

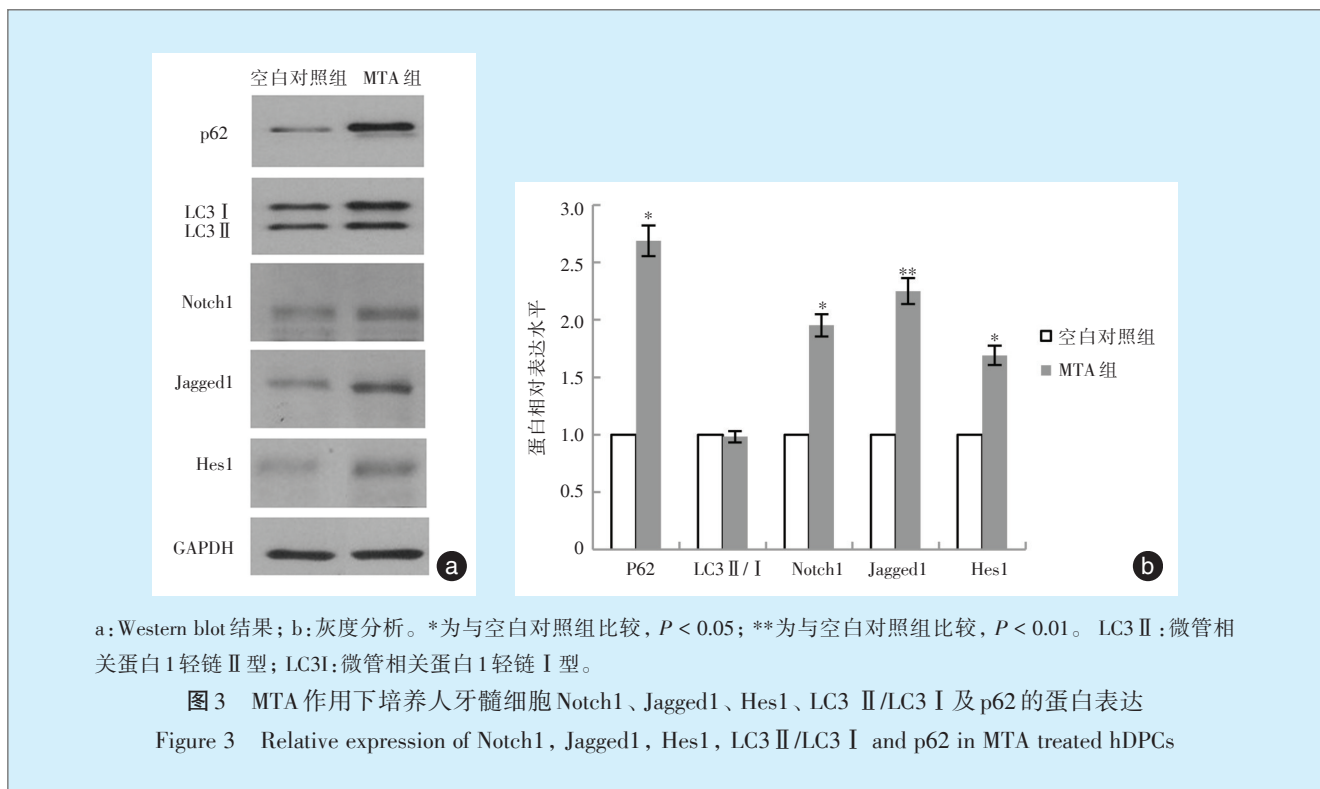
2.3 MTA对自噬的影响

0.1 mg/mL MTA处理24 h, hDPCs p62蛋白表达较对照组显著增加($P < 0.01$); LC3I及LC3 II表达量亦增加, 但LC3 II/LC3 I比值未见显著变化(图4)。

当MTA浓度变化(0.1 ~ 1.0 mg/mL), p62蛋白表达随MTA浓度变化而变化; 0.1 mg/mL组($t =$

4.87, $P = 0.009$)、0.5 mg/mL组($t = 5.68, P = 0.0005$)、1.0 mg/mL组($t = 4.24, P = 0.023$)与对照组比较, 差异均有统计学意义; LC3I及LC3 II表达量升高, 但LC3 II/LC3 I比值无明显变化(图4a、图4b)。

0.1 mg/mL MTA作用下p62表达12 ~ 24 h达到峰值, 至48 h下降至对照组水平, LC3 II/LC3 I比值仍未见显著变化(图4c、图4d)。以自噬体与溶酶体融合抑制剂Bafilomycin A1 (BAF)刺激细胞24 h, 自噬潮受阻, p62及Notch1表达升高, MTA具有类似作用(图4e、图4f)。

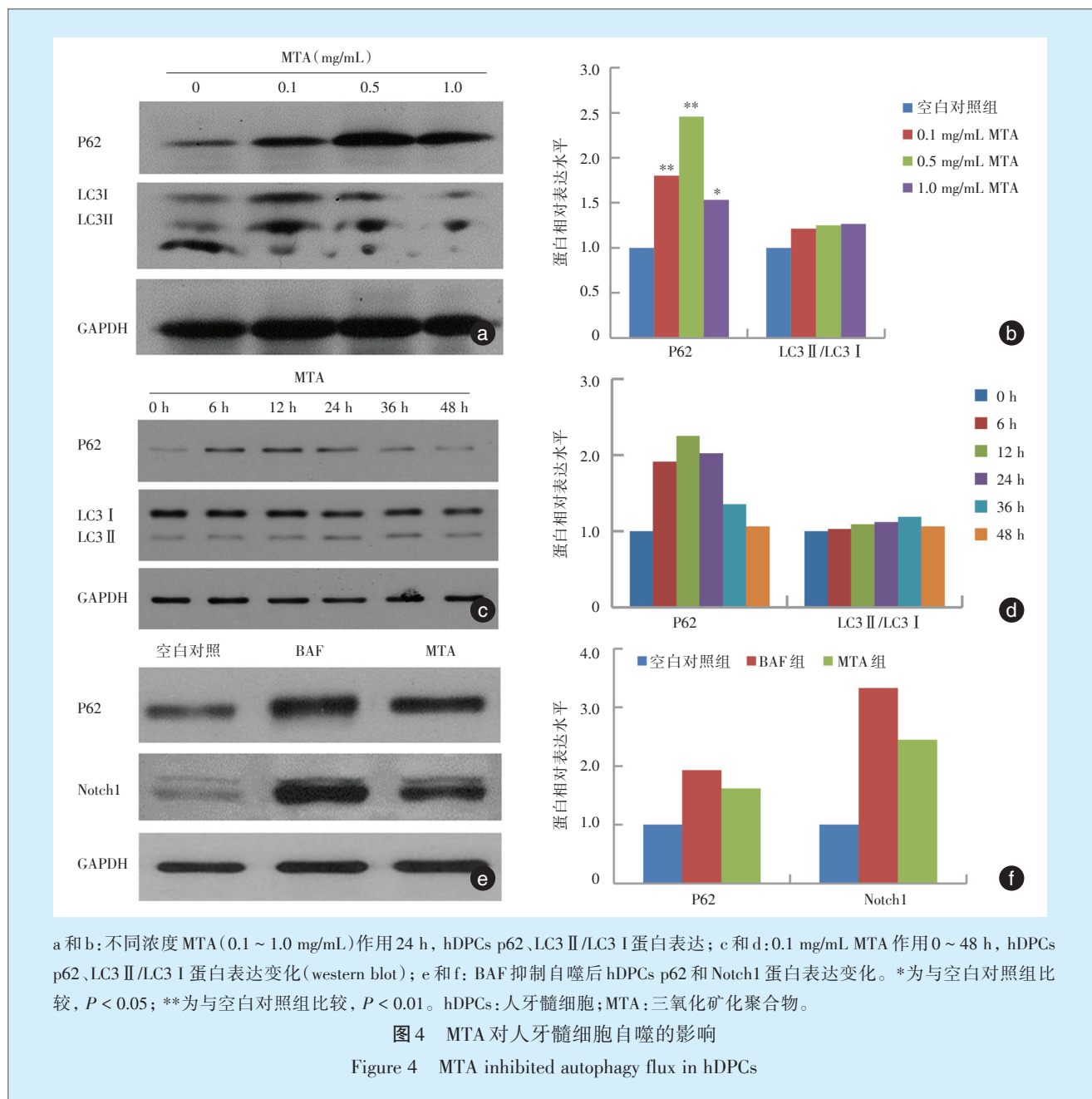


3 讨论

3.1 MTA对成牙本质分化指标的影响

3.1.1 MTA可促进hDPCs钙化结节形成及DSPP的

表达 牙髓损伤后存在一定的自我修复能力^[13], 利用盖髓剂施行盖髓术正是要尽可能地保存或促进牙髓的自我修复功能, 达到保存活髓的目标。



盖髓剂具有的诱导修复性牙本质形成的作用越强,则临床效果越好。MTA 作为近年公认有效的盖髓剂,其促 hDPCs 分化作用已被以往许多研究证实^[3,5,7]。本研究结果也支持这一观点,MTA 可促进牙髓细胞钙化结节的形成及 DSPP 的表达。

3.1.2 MTA 对 hDPCs ALP、Runx2 表达的影响

MTA 对 ALP 及 Runx2 的影响尚存在不同观点。多数研究认为 MTA 可提高牙髓细胞 ALP、Runx2 的表达^[3,5,7]。与此相类似,本研究观察到 MTA 作用初期(24 h)hDPCs ALP 及 Runx2 的表达短暂降低,但随着作用时间延长,细胞 ALP、Runx2 表达升高。有研究发现,MTA 所释放的钙离子浓度是影响上

述两指标变化的关键因素。多数实验所使用的 MTA 的钙离子浓度较低(近似本实验中 Ca 离子浓度 393.5 mg/L),而高浓度钙离子(约 3~9 倍于本实验钙离子浓度)在促进 DPCs 分化同时却显著抑制其 ALP 及 Runx2 mRNA 的表达^[15]。本研究所使用的是特定浓度的 MTA 浸提液,并不能完全反映材料在体内的情况,因此,需要设计更符合材料在体内情况的实验进一步验证。

3.2 MTA 对 hDPCs Notch 信号及自噬相关蛋白表达的影响

Notch 信号参与了牙髓损伤修复全过程,是调节牙髓干细胞增殖和分化的关键信号^[10-11]。本研究

结果显示,低浓度MTA处理后hDPCs Notch1、Jagged1及Hes1表达即显著增强。有研究表明,与另一Notch-Dll1途径相比,Notch-Jagged1途径具有更强的促牙髓细胞成骨分化能力^[16]。因此,我们推测,MTA的促hDPCs分化作用与Notch1-Jagged1信号转导增强有关。另外,Notch1可通过机体自噬过程降解,直接受到自噬机制的调控^[13]。细胞自噬是细胞将自身一些蛋白质和细胞器包裹在特定的膜结构中,由溶酶体降解,产生能量和小分子供细胞再次利用的过程。对细胞维持内部稳态起重要作用,并参与细胞的多种生理、病理变化过程^[17-18]。那么,MTA作用下Notch表达增强是否与自噬有关?本研究选取LC3和p62两指标对牙髓细胞自噬进行初步探讨。在自噬启动时,胞浆型LC3-I转变为自噬体膜型即LC3-II,后者含量与自噬体数量成正比,是常用的自噬起始阶段的分子标记物。p62是一种多功能泛素结合蛋白,参与泛素蛋白酶系统和自噬-溶酶体系统两种蛋白降解过程,通常作为自噬潮的监测指标,表达量越高,自噬功能越弱^[19]。通过实验发现,在一定范围内,随MTA浓度的升高,p62表达显著升高,提示MTA对自噬潮有抑制作用;使用自噬体与溶酶体融合抑制剂BAF刺激细胞,可产生与MTA相似的作用,二者均可使细胞p62及Notch1受体表达升高。因此,我们推测,MTA可能通过阻碍自噬潮,抑制自噬作用,减少Notch1降解,间接促进Notch信号转导,发挥其促hDPCs分化作用。自噬过程短暂,本研究中MTA作用后48h自噬抑制即解除,因此,时间和浓度可能是MTA作用的关键因素,值得进一步深入研究。

综上所述,MTA具有促进hDPCs体外分化的作用,其作用机制与Notch信号激活及自噬抑制相关。

参考文献

- [1] Mente J, Hufnagel S, Leo M, et al. Treatment outcome of mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: long-term results[J]. *J Endod*, 2014, 40(11): 1746-1751.
- [2] Baltuck C, Barnes C, Beaudry D, et al. Comparison of CaOH with MTA for direct pulp capping: a PBRN randomized clinical trial[J]. *J Dent Res*, 2013, 92(Suppl7): 16S-22S.
- [3] Seo MS, Hwang KG, Lee J, et al. The effect of mineral trioxide aggregate on odontogenic differentiation in dental pulp stem cells[J]. *J Endod*, 2013, 39(2): 242-248.
- [4] Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate[J]. *Int Endod J*, 2008, 41(5): 408-417.
- [5] Wang Y, Yan M, Fan Z, et al. Mineral trioxide aggregate enhances the odonto/osteogenic capacity of stem cells from inflammatory dental pulps via NF- κ B pathway[J]. *Oral Dis*, 2014, 20(7): 650-658.
- [6] Zhao X, He W, Song Z, et al. Mineral trioxide aggregate promotes odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp stem cells[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(1): 215-220.
- [7] Chen YW, Ho CC, Huang TH, et al. The Ionic products from mineral trioxide aggregate-induced odontogenic differentiation of dental pulp cells via activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. *J Endod*, 2016, 42(7): 1062-1069.
- [8] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal interaction in development[J]. *Science*, 1999, 284(5415): 770-776.
- [9] Olena AF, Rao MB, Thatcher EJ, et al. miR-216a regulates snx5, a novel notch signaling pathway component, during zebrafish retinal development[J]. *Dev Biol*, 2015, 400(1): 72-81.
- [10] Mitsiadis TA, Feki A, Papaccio G, et al. Dental pulp stem cells, niches, and notch signaling in tooth injury[J]. *Adv Dent Res*, 2011, 23(3): 275-279.
- [11] Harada H, Kettunen P, Jung HS, et al. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling[J]. *J Cell Biol*, 1999, 147(1): 105-120.
- [12] Wu X, Fleming A, Ricketts T, et al. Autophagy regulates Notch degradation and modulates stem cell development and neurogenesis [J]. *Nat Commun*, 2016, 7(1): 10533-10550.
- [13] Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(25): 13625-13630.
- [14] Hakki SS, Bozkurt SB, Hakki EE, et al. Effects of mineral trioxide aggregate on cell survival, gene expression associated with mineralized tissues, and biomineralization of cementoblasts[J]. *J Endod*, 2009, 35(4): 513-519.
- [15] An S, Gao Y, Ling J, et al. Calcium ions promote osteogenic differentiation and mineralization of human dental pulp cells: implications for pulp capping materials[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2012, 23(3): 789-795.
- [16] Sukarawan W, Peetiakarawach K, Pavasant P, et al. Effect of Jagged-1 and Dll-1 on osteogenic differentiation by stem cells from human exfoliated deciduous teeth[J]. *Arch Oral Biol*, 2016, 65(1): 1-8.
- [17] Kimmey JM, Huynh JP, Weiss LA, et al. Unique role for ATG5 in neutrophil-mediated immunopathology during M. tuberculosis infection[J]. *Nature*, 2015, 528(7583): 565-569.
- [18] Netea-Maier RT, Plantinga TS, van de Veerdonk FL, et al. Modulation of inflammation by autophagy: consequences for human disease [J]. *Autophagy*, 2016, 12(2): 245-260.
- [19] Wang AL, Boulton ME, Dunn WA, et al. Using LC3 to monitor autophagy flux in the retinal pigment epithelium[J]. *Autophagy*, 2009, 5(8): 1190-1193.

(编辑 张琳,韩倩倩)