

网络出版时间:2025-02-06 15:07:49 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250206.1138.012

FGF18 通过上调 BMP2 诱导人牙龈成纤维细胞向成骨样细胞分化

侯亚丽¹,刘慧娟²,张昊³,孙婧媛¹,宋鹏¹,刘月瑶¹,李荷香¹
(河北医科大学口腔医院¹ 病理科、³ 口腔颌面外科,石家庄 050017;²河北省口腔医学重点实验室,河北省口腔健康技术创新中心,石家庄 050017)

摘要 目的 研究成纤维细胞生长因子 18(FGF18)是否能诱导体外分离培养的人牙龈成纤维细胞(HGFs)向成骨样细胞分化,并探究其成骨机制。**方法** 组织块法分离培养 HGFs 并鉴定。取第 3 代 HGFs,分为实验组和对照组。实验组加入 FGF18 和 L-DMEM、对照组加入 L-DMEM。噻唑蓝(MTT)法检测不同浓度 FGF18(0、0.01、0.02、0.04、0.06 mg/L)对 HGFs 增殖影响;碱性磷酸酶(ALP)和茜素红染色检测成骨能力和矿化能力;RT-PCR、免疫细胞化学染色及 Western blot 检测成骨相关基因、蛋白和 BMP 信号通路中 BMP2 基因和蛋白表达情况。**结果** 与对照组比较,实验组培养 3、5、7、9、11 d 均可促进 HGFs 增殖($P<0.05$);培养 14、21 d ALP 活性、矿物盐沉积均增高($P<0.05$),ALP、OPN、OCN 及 BMP 信号通路中 BMP2 mRNA 表达均明显增高($P<0.01$)。培养 21 d OPN、OCN 及 BMP2 蛋白表达较培养 14 d 明显增高($P<0.01$)。**结论** FGF18 能促进 HGFs 增殖,诱导 HGFs 向功能性成骨样细胞分化,其成骨机制与上调 BMP2 有关。

关键词 人牙龈成纤维细胞;FGF18;成骨;诱导;细胞分化;增殖

中图分类号 R 780.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)02-0279-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.013

成纤维细胞是结缔组织中的主要细胞,是终末分化的细胞。但越来越多的证据表明成纤维细胞具有和间充质干细胞类似的分化能力^[1-2],具有一定的可塑性和异质性^[3]。人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblasts, HGFs)是从牙龈固有层分离的成纤维细胞,它虽然不是干细胞,但也具有一定的分化能力。研究发现 HGFs 在不同诱导条件下可分化为血管内皮样细胞^[4]、骨骼肌样细胞及神经样细胞^[5]。而且在适当的实验条件下 HGFs 还能表现很好的成骨分化潜力,是目前骨组织工程中具有优势的种子细胞之一^[6]。成纤维细胞生长因子 18(fibroblast growth factor18, FGF18)是生长因子家族中的一员,有促进细胞成骨的作用^[7]。而且其骨诱导作用缓和,能避免骨形成异常、破骨细胞激活和组织炎症。同时它还能够促进细胞生长、迁移、软组织的修复和血管再生。Murugaiyan et al^[8] 研究显示重组

FGF18 能促进小鼠胚胎来源的间充质干细胞向成骨细胞分化。然而单一重组 FGF18 是否能够诱导体外分离培养的 HGFs 向功能性成骨样细胞分化鲜有报道。因此,该研究探讨 FGF18 对 HGFs 成骨方向分化的影响,并初步探索可能的作用机制,为下一步牙龈注射 FGF18 组织工程化牙槽骨提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 人牙龈标本获取 收集河北医科大学口腔医院口腔颌面外科门诊智齿拔除术患者废弃牙龈组织 2~3 例进行 HGFs 原代培养,患者年龄 20~30 岁。本实验经河北医科大学口腔医院伦理委员会审查批准,批准号为 2019041。

1.2 主要仪器与试剂 Real-Time 7500 PCR Systems(美国 Thermo 公司);SUAAISETIV 酶标仪(美国 Biotek 公司);细胞计数仪(美国 Nexcelom 公司);L-DMEM 培养基(赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司);CK 抗体、Vimentin 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);OPN 抗体、OCN 抗体、BMP2 抗体(英国 Abcam 公司);FGF18(美国 PEPRO-TECH 公司);BCIP/NBT 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);茜素红 S、氯化十六烷基吡啶(美国 Sigma 公

2024-10-10 接收

基金项目:河北省 2019 年度医学科学研究课题(编号:20191076);河北医科大学 2023 年大学生创新性实验计划项目(编号:USIP2023235)

作者简介:侯亚丽,女,副主任医师,硕士生导师;

李荷香,女,副主任医师,通信作者, E-mail: 16600999@hebmu.edu.cn

司);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(上海泊湾生物科技有限公司);BCA 蛋白定量检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 HGFs 分离、培养与鉴定 将智齿拔除患者废弃牙龈组织浸泡、冲洗,剔除牙龈上皮,剩余纤维结缔组织剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 组织块贴壁培养、传代。取生长状态良好 P3 代 HGFs,制备细胞爬片,进行免疫细胞化学染色。一抗浓缩液分别为 CK(1:100)、Vimentin(1:100),按 PV9000 试剂盒说明书操作,苏木精复染,脱水透明,封片。

1.3.2 不同浓度 FGF18 溶液配制 取 0.025 mg FGF18 粉末,用灭菌双蒸水配制成 50 mg/L 的 FGF18 溶液,再按比例稀释,配成含 0、0.01、0.02、0.04、0.06 mg/L 的 FGF18、10% FBS 的 L-DMEM 培养基,长期低温密封保存。

1.3.3 噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)实验 取生长状态良好 P3 代 HGFs 消化、计数,接种于 96 孔板。细胞贴壁后加入含有不同浓度 FGF18(0、0.01、0.02、0.04、0.06 mg/L)的 L-DMEM 培养基。将 96 孔板放入 37℃,5% CO₂ 孵育箱培养 1、3、5、7、9、11 d,每孔加入 20 μl MTT 溶液,孵育 4~6 h 后弃掉 MTT 溶液,每孔加入 150 μl 二甲基亚砷,吹打混匀,酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔吸光度(optical density, OD)值,绘制生长曲线。

1.3.4 实验分组 取 P3 代 HGFs,分为实验组和对照组。实验组加入 FGF18 和 L-DMEM、对照组加入 L-DMEM。根据 MTT 实验结果选择最佳浓度作为实验组 FGF18 诱导浓度。

1.3.5 诱导过程细胞形态观察及免疫表型检测 倒置显微镜观察诱导过程中细胞形态变化。分别于 7、14、21 d 后消化细胞,制备细胞爬片,免疫细胞化学染色检测细胞免疫表型。一抗浓缩液分别为 OCN(1:100)和 OPN(1:100)。

1.3.6 ALP 染色及其活性半定量检测 细胞消化、计数后接种于 24 孔培养板,分为实验组和对照组。实验组加入 FGF18 和 L-DMEM、对照组加入 L-DMEM。分别于 7、14、21 d 取出培养板进行 ALP 染色和活性半定量检测。ALP 染色:将 PBS 冲洗后细胞多聚甲醛固定,再冲洗,加入适量 BCIP/NBT 染色工作液,室温避光孵育 5~30 min,去除 BCIP/NBT 染色工作液,蒸馏水洗涤终止后观察。活性半定量

检测:按照 BCA 蛋白定量检测试剂盒说明书检测蛋白浓度,然后用 ALP 检测试剂盒检测溶液在波长 520 nm 处 OD 值。

1.3.7 茜素红染色及半定量检测 细胞消化、计数接种于 6 孔培养板培养 7、14、21 d,加入茜素红染色液染色,显微镜下观察矿化结节形成情况。弃上清液,每孔加入 10% 氯化十六烷基吡啶 1 ml,室温静置 30 min 后,每孔取出 100 μl 加入 96 孔板,在酶联免疫监测仪上测定 562 nm 时各孔 OD 值。

1.3.8 Real-time PCR 实验 细胞消化计数后,接种 6 孔培养板培养 7、14 和 21 d。然后提取总 RNA,测定浓度。并将 RNA 反转录合成互补 DNA(complementary DNA, cDNA),然后将 3 μg cDNA 样本与 SYBR Green qPCR 预混液混合后,进行 Real-time PCR,检测 ALP、OPN、OCN、BMP2 基因相对表达量,并采用 2^{-ΔΔC_T} 进行统计学分析。RT-PCR 引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列
Tab.1 Primary sequences of genes used for RT-PCR

Target gene	Primer sequence
GAPDH	F: 5'-TGGGTGTGAACACGAGAA-3' R: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'
ALP	F: 5'-AGCGTGACTTGAAGTGTTCATG-3' R: 5'-GAAAGGACCTGGACCACACAGA-3'
OCN	F: 5'-CGCTACCTGTATCAATGGCTGG-3' R: 5'-CTCCTGAAAGCCGATGTGGTCA-3'
OPN	F: 5'-CGAGGTGATAGTGTGGTTTATGG-3' R: 5'-GCACCATTCAACTCCTCGCTTTC-3'
BMP2	F: 5'-CGTCAAGCCAAACACAAACAGC-3' R: 5'-GAGCCACAATCCAGTCATTCCAC-3'

1.3.9 Western blot 实验 RIPA 裂解液裂解细胞,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,然后 SDS-PAGE 凝胶分离蛋白质,转移至 PVDF 膜。5% BSA 封闭 2 h 后,与一抗 OPN 抗体(1:1 000)、OCN 抗体(1:1 000)、BMP2 抗体(1:1 000)4℃孵育过夜,辣根过氧化物酶标记的 IgG 荧光二抗抗体孵育 2 h。TBST 清洗液清洗条带后使用显影剂在凝胶成像系统显影,Image J 软件进行定量分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。若数据符合正态分布且方差齐,两独立样本均数比较采用 *t* 检验;若数据不符合参数检验条件,则采用非参数秩和检验。检验水准为双侧 α = 0.05。

2 结果

2.1 组织块原代培养 HGFs 形态学观察和鉴定

人牙龈组织块原代培养 5~7 d 后, HGFs 从组织块周围游出, 呈细长梭形, 排列成束状或旋涡状(图 1A)。免疫细胞化学染色显示: HGFs 抗 Vimentin 抗体阳性(图 1B), 抗 CK 抗体阴性(图 1C)。证实了该细胞符合中胚层来源成纤维细胞生物学特性, 且无牙龈上皮细胞混杂。

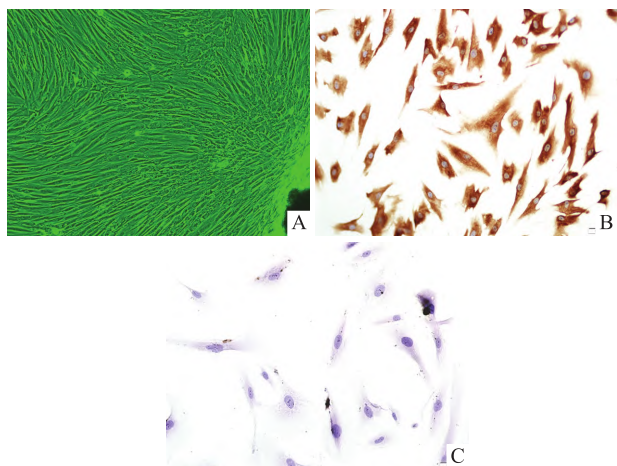


图 1 HGFs 原代培养及免疫细胞化学染色 $\times 100$

Fig. 1 HGFs primary culture and immunocytochemical staining $\times 100$

A: Primary culture of HGFs; B: Positive result showed with treatment of anti-Vimentin antibody; C: Negative result showed with treatment of anti-CK antibody.

2.2 FGF18 对 HGFs 增殖影响 7 d 内, FGF18 在 0~0.02 mg/L 范围内均能促进 HGFs 增殖(图 2A), 当 FGF18 在 0.02 mg/L 时促增殖作用最佳。FGF18 在 0.04 mg/L 时, 随着时间的延长细胞数目减少, 促增殖作用消失。FGF18 在 0.06 mg/L 时, 大部分细胞死亡。故选择 0.02 mg/L 作为实验最佳诱导浓

度。MTT 结果显示实验组培养 3、5、7、9、11 d 可明显促进 HGFs 增殖(图 2B), 与对照组比较差异有统计学意义($t = 5.322, 3.116, 3.538, 6.419, 3.002$, 均 $P < 0.05$)。

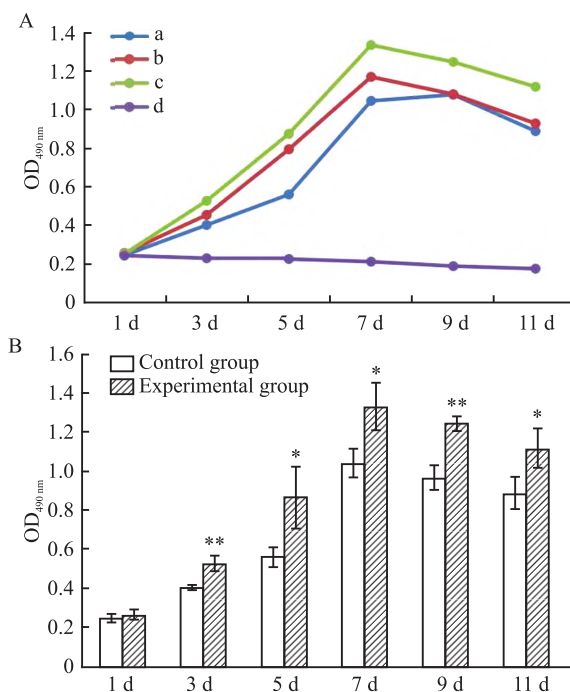


图 2 FGF18 对 HGFs 增殖的影响

Fig. 2 Effect of FGF18 on proliferation of HGFs

A: Effects of different concentrations of FGF18 on proliferation of HGFs; B: MTT results of experimental group and control group; a: 0 mg/L FGF18 + L-DMEM group; b: 0.01 mg/L FGF18 + L-DMEM group; c: 0.02 mg/L FGF18 + L-DMEM group; d: 0.04 mg/L FGF18 + L-DMEM group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group.

2.3 不同诱导时间的形态学特征及成骨相关蛋白表达 形态学特征(图 3): 7 d 两组细胞形态均无明显

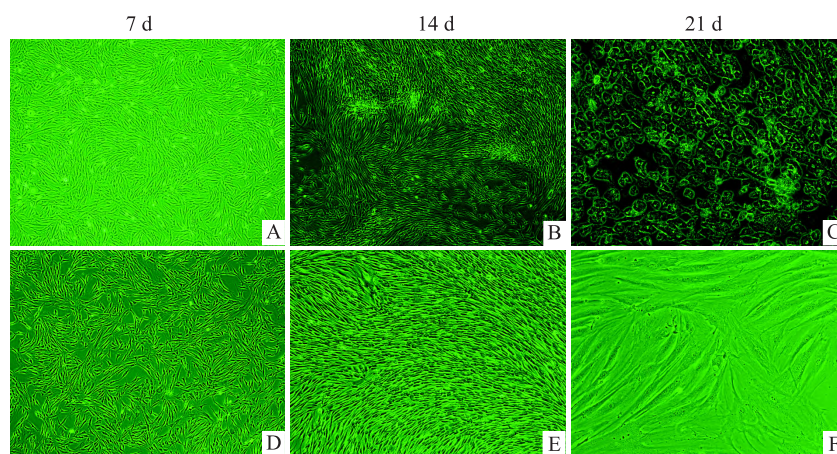


图 3 诱导过程细胞形态特征

Fig. 3 Morphological characteristics of cells during induction

A-C: Experimental group (A, B: $\times 40$; C: $\times 200$); D-F: Control group (D, E: $\times 40$; F: $\times 200$).

显改变,呈细长梭形;14 d 实验组细胞生长出现聚集现象、形态开始变短呈短梭形,21 d 呈多边形似成骨细胞样形态,而对照组细胞随时间无明显变化。免疫细胞化学染色(图 4)显示:14 d 时实验组细胞 OPN 和 OCN 均为弱阳性表达,21 d 表达均增强,均呈现为强阳性。对照组 HGFs 始终为阴性。

2.4 ALP 表达 ALP 染色结果(图 5)显示:实验组在 0.02 mg/L FGF18 诱导下,ALP 染色随时间延长逐渐加深呈深紫色;而对照组随时间变化不大,呈浅紫色。ALP 活性分析(图 6)显示:培养 14、21 d 时实验组 ALP 活性较对照组明显增强,差异有统计

学意义($t = 10.517, 8.654$, 均 $P < 0.01$)。

2.5 矿化结节形成情况 14、21 d 茜素红染色(图 7),实验组可观察到有矿化结节形成,对照组无矿化结节形成。半定量结果(图 8)显示:实验组 14、21 d 矿物盐沉积量均高于对照组,差异有统计学意义($t = 3.174, 10.388$, 均 $P < 0.05$)。

2.6 ALP、OPN、OCN、BMP2 mRNA 表达情况 RT-PCR 结果(图 9)显示,14、21 d 实验组 ALP、OPN、OCN、BMP2 mRNA 表达均明显高于对照组,差异有统计学意义($t_{14d} = 17.026, 7.224, 14.993, 17.111$; $t_{21d} = 36.465, 14.352, 36.638, 140.724$, 均

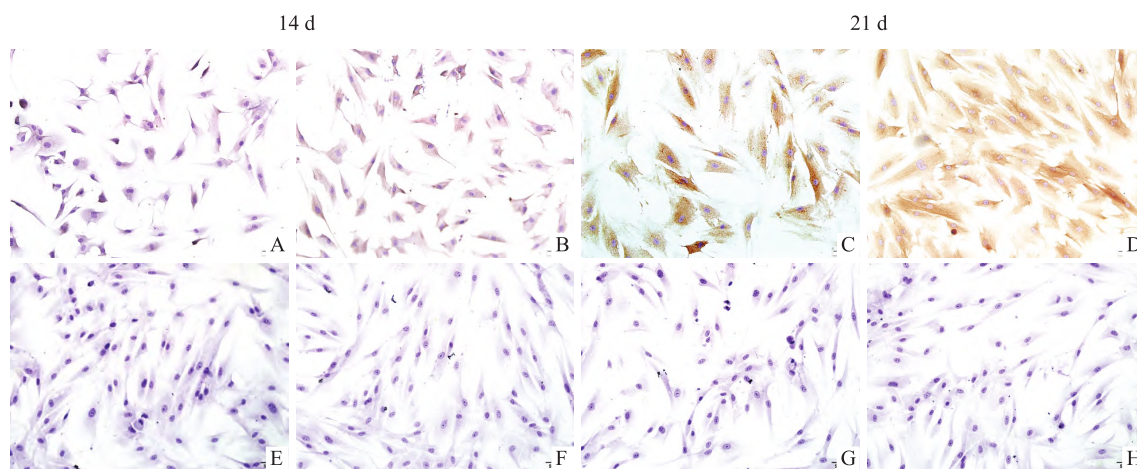


图 4 诱导 14、21 d 后细胞免疫表型鉴定 $\times 200$

Fig. 4 Cell immunophenotypic identification after induction at 14 and 21 days $\times 200$

A, C: Positive result showed with treatment of anti-OPN antibody in Experimental group; B, D: Positive result showed with treatment of anti-OCN antibody in Experimental group; E, G: Negative result showed with treatment of anti-OPN antibody in Control group; F, H: Negative result showed with treatment of anti-OCN antibody in Control group.

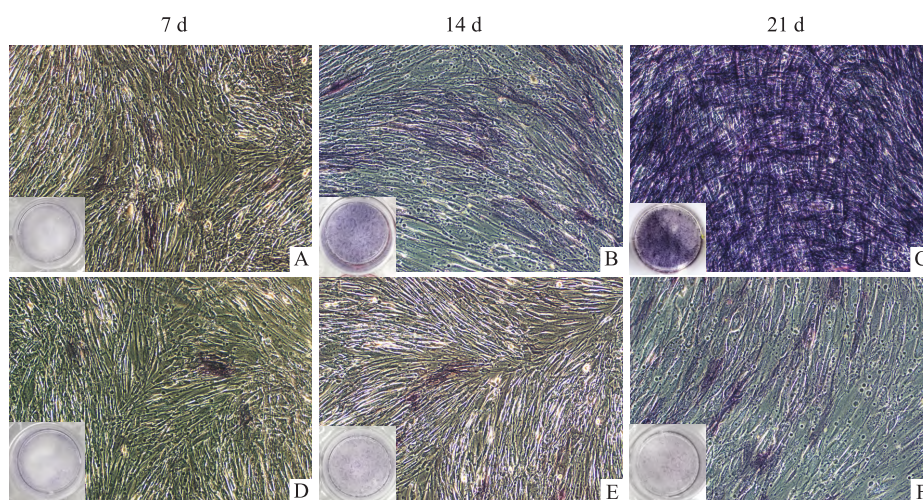


图 5 诱导后细胞 7、14、21 d ALP 表达 $\times 100$

Fig. 5 Expression of ALP in cells at 7, 14 and 21 days after induction $\times 100$

A - C: Experimental group; D - F: Control group.

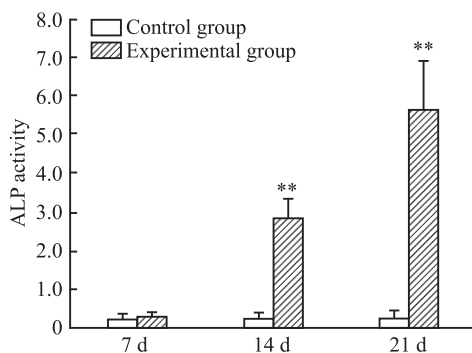
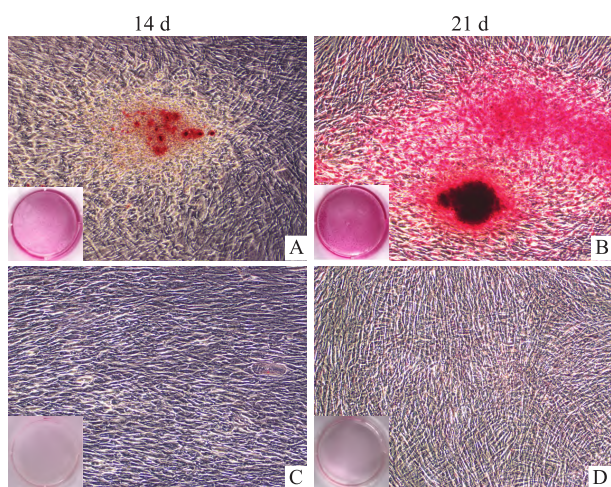


图6 诱导后细胞 7、14、21 d ALP 活性

Fig.6 ALP activity at 7, 14 and 21 days after induction

** $P < 0.01$ vs Control group.图7 诱导后矿化结节观察 $\times 100$ Fig.7 Observation of mineralization nodules after induction $\times 100$

A, B: Experimental group; C, D: Control group.

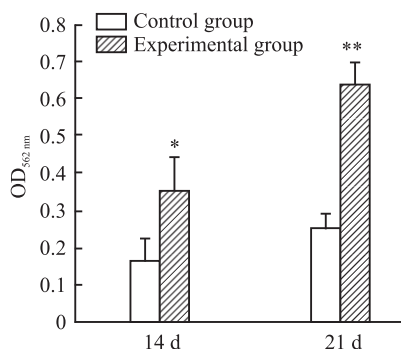


图8 诱导后矿物盐半定量分析

Fig.8 Semi-quantitative analysis of mineral

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group. $P < 0.01$).

2.7 OPN、OCN、BMP2 蛋白表达 Western blot 结果(图 10)显示,实验组 21 d OPN、OCN 蛋白表达较 14 d 升高约 5 倍,差异有统计学意义($t = 70.911$,

54.990, 均 $P < 0.01$);实验组 21 d BMP2 蛋白表达较 14 d 升高约 8 倍,差异有统计学意义($t = 6.218$, $P < 0.01$)。

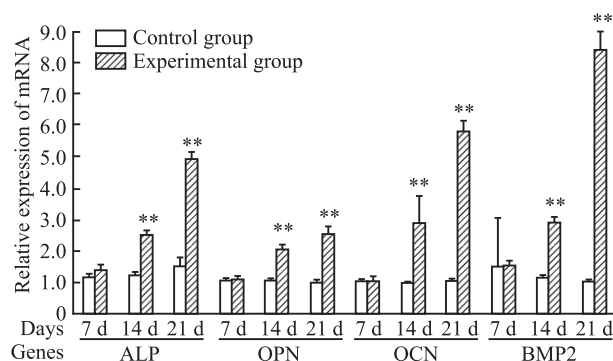


图9 诱导后细胞 ALP、OPN、OCN 和 BMP2 mRNA 相对表达量

Fig.9 Relative expression of ALP, OPN, OCN and BMP2 mRNA

in cells after induction

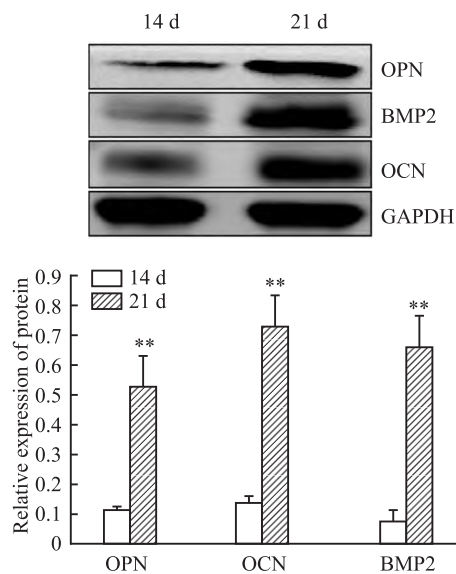
** $P < 0.01$ vs Control group.

图10 诱导后细胞 OPN、OCN 和 BMP2 蛋白相对表达量

Fig.10 Relative expression of OPN, OCN and BMP2 proteins in cells after induction

** $P < 0.01$ vs 14 days.

3 讨论

HGFs 在临床获取方便,体外培养成活率高,分裂增殖能力强,并且具有很好的成骨分化潜能^[6],是目前骨组织工程中比较有优势的种子细胞之一。FGF18 是一种多效生长因子^[8],不仅能够刺激多种细胞和组织增殖^[9],而且在骨骼生长发育中发挥重要作用^[10]。牙龈下方为牙槽骨,其纤维结缔组织直

接和牙槽骨接触。如果 HGFs 能够在 FGF18 诱导下向成骨样细胞分化形成牙槽骨,将会为下一步牙龈注射 FGF18 组织工程化牙槽骨提供研究基础。

本研究利用组织块培养方法成功培养出 HGFs,并用免疫细胞化学方法鉴定了其表型。FGF 是多种间充质细胞和神经外胚层细胞的有丝分裂原,能促进细胞分裂增生。本研究用 MTT 法评估了 FGF18 对 HGFs 的促增殖作用。实验结果显示 0.02 mg/L FGF18 明显促进了 HGFs 增殖,能够短时间获得足够数量种子细胞,为后续诱导实验提供基础。

ALP、OCN、OPN 等是成骨细胞表型特异性标记^[11]。其中 ALP 是成骨细胞分化早到中期标志物^[7],OPN 和 OCN 是中到晚期标志物。细胞成骨能力和 ALP 活性有关。本研究结果显示 7 d 时实验组和对照组细胞 ALP 染色均有表达,但活性较低。这是 HGFs 中有表达成骨细胞表型的成纤维细胞亚群^[12]的结果。但是其增殖的同时也分泌一些 BMP2 拮抗剂如: Gremlin1、Gremlin2 等^[13],抑制内源性 BMP2 表达,从而降低 ALP 活性。实验组虽然添加了 FGF18,但是它在 7 d 前仅发挥一个促增殖作用,促进 HGFs 数量增多,故两组 ALP 活性在开始时无差别。研究^[14]发现骨髓间充质干细胞长时间增殖潜能的下降可能标志向分化的转换。据此,课题组推测 7 d 时 HGFs 未呈现向成骨样细胞分化的趋势,仅表现为细胞增殖。7 d 后两组 ALP 活性均开始增强,但对照组随时间变化不大,而实验组随时间推移不断增强。这是由于 7 d 后两组细胞增殖均进入平台期,细胞数量开始下降。而 HGFs 数量下降又导致其分泌的 BMP2 抑制剂—Gremlin1、Gremlin2 等因子减少,因而 BMP2 表达相对增强,ALP 活性增强。而 FGF18 还可通过抑制 noggin 来上调 BMP2 表达,从而促进实验组成骨细胞的表型分化^[15],ALP 活性不断增强。故课题组推测 7~14 d 是 0.02 mg/L FGF18 诱导 HGFs 向成骨样细胞分化的时间段,但具体时间节点有待进一步研究。

本研究分别从基因和蛋白水平对诱导后细胞进行了研究。RT-PCR 及 Western blot 结果显示,诱导后细胞 ALP、OPN、OCN 的 mRNA 及 OPN、OCN 蛋白的表达均增高,表明 0.02 mg/L FGF18 能诱导 HGFs 向成骨方向分化。在体内和/或体外,矿化是一种非常可靠用来表征细胞类型为成骨细胞或类成骨细胞的方法。矿化结节形成不仅是成骨细胞成熟标志,同时也是成骨细胞行使功能的一个主要形态学特征^[16]。茜素红染色及半定量结果显示诱导后的成

骨样细胞能够分泌矿物盐并形成矿化结节。从而进一步证明了诱导分化后的成骨样细胞有分泌功能,是功能性的成骨样细胞。本研究结果还显示 HGFs 经过 FGF18 作用 14 d 和 21 d 后,BMP2 基因和蛋白表达均升高,表明 FGF18 通过上调 BMP2 诱导了 HGFs 向成骨样细胞分化,但具体机制仍需要进一步研究。

综上所述,FGF18 能够促进 HGFs 增殖和成骨样分化,诱导 HGFs 向功能性成骨样细胞分化,其成骨机制和 BMP2 升高有关,但具体机制有待进一步实验论证。本研究将为下一步牙龈注射 FGF18 组织工程化牙槽骨提供研究基础。

参考文献

- [1] 赵强,白海,苏毅,等. 间充质干细胞与成纤维细胞生物学特性的比较及研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2021, 43(5): 1068-74. doi:10.11844/cjcb.2021.05.0018.
- [1] Zhao Q, Bai H, Su Y, et al. The comparative study on the characterization of mesenchymal stem cells and fibroblasts[J]. Chin J Cell Biol, 2021, 43(5): 1068-74. doi:10.11844/cjcb.2021.05.0018.
- [2] Ahangar P, Mills S J, Smith L E, et al. Human gingival fibroblast secretome accelerates wound healing through anti-inflammatory and pro-angiogenic mechanisms[J]. NPJ Regen Med, 2020, 5(1): 24. doi: 10.1038/s41536-020-00109-9.
- [3] Alfonso García S L, Parada-Sánchez M T, Arboleda Toro D. The phenotype of gingival fibroblasts and their potential use in advanced therapies[J]. Eur J Cell Biol, 2020, 99(7): 151123. doi:10.1016/j.ejcb.2020.151123.
- [4] Liu X, Wang J, Dong F, et al. Human gingival fibroblasts induced and differentiated into vascular endothelial-like cells[J]. Dev Growth Differ, 2016, 58(9): 702-13. doi:10.1111/dgd.12327.
- [5] 苏建芳,宋鹏,董福生,等. 人牙龈成纤维细胞诱导分化为神经样细胞的实验研究[J]. 现代口腔医学杂志, 2021, 35(6): 361-6.
- [5] Su J F, Song P, Dong F S, et al. Experiment of human gingival fibroblasts induction into nerve-like cells[J]. J Mod Stomatol, 2021, 35(6): 361-6.
- [6] Li J, Fu L, Lu Q, et al. Comparison of the osteogenic potential of fibroblasts from different sources[J]. Tissue Cell, 2024, 88: 102358. doi:10.1016/j.tice.2024.102358.
- [7] Amirthalingam S, Lee S S, Pandian M, et al. Combinatorial effect of nano whitlockite/nano bioglass with FGF-18 in an injectable hydrogel for craniofacial bone regeneration[J]. Biomater Sci, 2021, 9(7): 2439-53. doi:10.1039/d0bm01496f.
- [8] Murugaiyan K, Amirthalingam S, Hwang N S, et al. Role of FGF-18 in bone regeneration[J]. J Funct Biomater, 2023, 14(1): 36. doi:10.3390/jfb14010036.
- [9] Jiang P, Dou X, Li S, et al. MiR-590-5p affects chondrocyte pro-

- liferation, apoptosis, and inflammation by targeting FGF18 in osteoarthritis[J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(8): 8728–41.
- [10] Hendesi H, Stewart S, Gibison M L, et al. Recombinant fibroblast growth factor-18 (sprifermin) enhances microfracture-induced cartilage healing[J]. *J Orthop Res*, 2022, 40(3): 553–64. doi:10.1002/jor.25063.
- [11] 邹雨希, 孙 晶, 孙 玉, 等. Lin28 过表达部分通过 mTOR 信号通路促进人牙髓干细胞的增殖并抑制成骨分化[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(9): 1507–13. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.09.012.
- [11] Zou Y X, Sun J, Sun Y, et al. Lin28 overexpression promotes proliferation and inhibits osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in part through the mTOR signaling pathway[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(9): 1507–13. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.09.012.
- [12] Cho Y, Kim B, Bae H, et al. Direct gingival fibroblast/osteoblast transdifferentiation *via* epigenetics[J]. *J Dent Res*, 2017, 96(5): 555–61. doi:10.1177/0022034516686745.
- [13] Ghuman M S, Al-Masri M, Xavier G, et al. Gingival fibroblasts prevent BMP-mediated osteoblastic differentiation[J]. *J Periodontal Res*, 2019, 54(3): 300–9. doi:10.1111/jre.12631.
- [14] Pizzicannella J, Marconi G D, Pierdomenico S D, et al. Bovine pericardium membrane, gingival stem cells, and ascorbic acid: a novel team in regenerative medicine[J]. *Eur J Histochem*, 2019, 63(3): 169–77. doi:10.4081/ejh.2019.3064.
- [15] Häckel S, Zolfaghar M, Du J, et al. Fibrin-hyaluronic acid hydrogel (Regeno Gel) with fibroblast growth factor-18 for *in vitro* 3D culture of human and bovine nucleus pulposus cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 5036. doi:10.3390/ijms20205036.
- [16] Yao X, Zhang J, Jing X, et al. Fibroblast growth factor 18 exerts anti-osteoarthritic effects through PI3K-AKT signaling and mitochondrial fusion and fission[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 139: 314–24. doi:10.1016/j.phrs.2018.09.026.

FGF18 induces differentiation of human gingival fibroblasts into osteoblasts by upregulating BMP2

Hou Yali¹, Liu Huijuan², Zhang Hao³, Sun Jingyuan¹, Song Peng¹, Liu Yueyao¹, Li Hexiang¹

(¹*Dept of Pathology, ³Dept of Oral and Maxillofacial Surgery, School and Hospital of Stomatology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017; ²Hebei Key Laboratory of Stomatology, Hebei Technology Innovation Center of Oral Health, Shijiazhuang 050017*)

Abstract Objective To investigate whether fibroblast growth factor 18 (FGF18) can induce human gingival fibroblasts (HGFs) isolated *in vitro* to differentiate into osteoblast-like cells, and to explore the mechanism of osteogenesis. **Methods** HGFs were isolated, cultured and identified by tissue block method. The third generation of HGFs were divided into experimental group and control group. FGF18 and L-DMEM was added to the experimental group while L-DMEM was added to the control group. The effects of different concentrations of FGF18 (0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06 mg/L) on proliferation of HGFs were detected by Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. Alkaline phosphatase (ALP) and alizarin red staining were used to detect the osteogenesis and mineralization ability of the cells after induction. RT-PCR, immunocytochemistry staining, and Western blot were used to detect the expression of genes and proteins related to osteogenesis and BMP2 in the BMP signaling pathway. **Results** Compared with the control group, the experimental group could promote the proliferation of HGFs at 3, 5, 7, 9, and 11 days ($P < 0.05$), ALP activity and mineral salt deposition increased after induction at 14 and 21 days ($P < 0.05$), and the expressions of ALP, OPN, OCN mRNA and BMP2 mRNA in BMP signaling pathway significantly increased ($P < 0.01$). The expressions of OPN, OCN and BMP2 protein at 21 days were significantly higher than those at 14 days ($P < 0.01$). **Conclusion** FGF18 can promote the proliferation of HGFs, and induce the differentiation of HGFs into functional osteoblasts. The osteogenic mechanism is related to the upregulation of BMP2. **Key words** human gingival fibroblasts; fibroblast growth factor 18; osteogenesis; induce; cell differentiation; proliferation

Fund programs Medical Science Research Project of Hebei Province (No. 20191076); Undergraduate Innovative Experimental Program of Hebei Medical University (No. USIP2023235)

Corresponding author Li Hexiang, E-mail: 16600999@hebmu.edu.cn