

网络出版时间: 2021-2-5 13:03 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210205.1052.031.html>

◇ 综 述 ◇

微环境下 Wnt/ β -catenin 通路参与牙周膜干细胞骨向分化机制的研究进展

沈振国, 赵荣权, 欧琳琳, 周 柠 综述 邢 田 审校

摘要 牙周膜干细胞作为牙周组织中的干细胞, 具有分化成骨的能力, 在牙槽骨修复过程中具有巨大的潜力。Wnt/ β -catenin 通路在身体发育中起重要作用。目前, 已发现多种微环境可通过 Wnt/ β -catenin 通路调节牙周膜干细胞的成骨分化。该文综述 Wnt/ β -catenin 通路在不同微环境中调控牙周膜干细胞成骨分化的过程, 为牙周疾病的基础研究和临床防治提供参考。

关键词 牙周膜干细胞; Wnt/ β -catenin 通路; 成骨分化

中图分类号 R78

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)03-0497-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.033

牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSCs)以其多向分化的能力以及易于获取的组织来源优势, 成为非常理想的组织工程种子细胞, 在牙周再生领域中得到广泛的应用。然而, PDLSCs 成骨分化能力受到多种因素的调控, 其分化机制也是近年来的研究热点, Wnt/ β -catenin 作为调节细胞生长和分化的重要信号途径, 在 PDLSCs 的分化中发挥重要的作用。

1 牙周膜干细胞的生物学特性

Seo et al^[1]于2004年成功从离体牙牙周组织中分离培养出 PDLSCs, 发现其具有较强的克隆形成能力, 及成牙骨质、成神经、成脂等多项分化能力, 且高表达间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)表面标志物 STRO-1 和 CD 146/MUC 18, 可成为最具牙

周组织修复潜力的干细胞之一。自 Lindroos et al^[2]揭示 PDLSCs 成骨分化具有临床应用价值后, 围绕这方面的研究取得较大进展。体外实验采用含地塞米松、 β -磷酸甘油和抗坏血酸的成骨诱导液培养 PDLSCs, 发现成骨相关基因表达升高, 如碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、特异性 Runt 相关性转录因子(Runt-related transcription factor, Runx) 2、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP) 2、胶原蛋白(collagen, Col) I、骨钙素(osteocalcin, OCN), 细胞体外长期培养能够形成钙化结节。

PDLSCs 迁移和增殖对修复缺损具有重要作用, 而其迁移和增殖受细胞周围环境、代谢产物、神经递质、细胞因子等的影响。基质细胞衍生因子(stromal cell derived factor, SDF) 1、甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH) 和成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF) 2 等细胞因子能够促进 PDLSCs 的增殖和迁移^[3-4]。

2 Wnt/ β -catenin 通路

1982 年 Nusser et al^[5]在小鼠乳腺癌中发现了 Integration-1 (INT-1) 基因。之后的研究表明, 果蝇中的无翅基因与 INT-1 基因功能类似, 属于同源基因, 因此将二者并称为 Wnt 基因, 此基因调控的信号传导系统为 Wnt 通路^[6]。此通路对细胞的生长、分化以及募集等多种生物学过程发挥重要作用^[7], 且与肿瘤、炎症疾病和心血管疾病等密切相关。

Wnt 通路由 4 部分组成: ①细胞外的配体蛋白 Wnt 蛋白, 由 Wnt 家族基因转录表达而来; ②细胞膜上的卷曲蛋白受体(frizzled, Fzd) 及低密度脂蛋白受体相关蛋白(low-density lipoprotein receptor-related protein, LRP) 5/6; ③细胞浆中的信号转导部分; ④细胞核内的转录调控部分。

Wnt/ β -catenin 通路, 即经典 Wnt 通路: 胞膜外配体 Wnts 蛋白与受体结合后, 开启通路的传导并活化胞内的蓬乱蛋白(dishevelled, Dsh/Dvl) 从而降低

2020-07-20 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1908085MH256); 病原生物学安徽省重点实验室开放课题(编号: BY-Z01); 安徽医科大学博士科研资助基金(编号: XJ201708); 国家级大学生创新创业训练计划(编号: 201810366041)

作者单位: 安徽医科大学口腔医学院、安徽医科大学附属口腔医院、安徽省口腔疾病研究重点实验室, 合肥 230032

作者简介: 沈振国, 男, 本科生;

邢 田, 女, 讲师, 责任作者, E-mail: xingtian8110@163.com

由腺瘤性结肠息肉病蛋白(adenomatous polyposis coli, APC)、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、Axin、 β -连环蛋白(β -catenin)等形成的降解复合体中关键成分 GSK-3 β 的活性,进而阻止 β -catenin 降解,使 β -catenin 积聚并转移入核与胞核内的转录因子 T 细胞因子/淋巴增强因子(TCF/LEFs)结合,激活下游靶基因,引发生物学效应。

3 局部微环境调控 Wnt 通路影响 PDLSCs 成骨分化

3.1 炎症微环境 Wnt/ β -catenin 通路在炎症微环境中对 PDLSCs 的成骨起着重要的作用。慢性牙周炎患者炎症牙龈和龈沟液中高表达白细胞介素(interleukin, IL)-33, 体外实验中牙龈卟啉单胞菌可活化牙龈上皮细胞高表达 IL-33^[8]。IL-33 可促进增殖和克隆形成率,但是抑制 ALP 的活性和矿化结节的产生,给予 PNU(β -catenin 抑制剂)的处理,可以恢复这种抑制效应,表明 IL-33 通过 Wnt/ β -catenin 通路调控 PDLSCs 的成骨分化潜力^[9]。

低浓度($\leq 1 \mu\text{g/ml}$)脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是否抑制 PDLSCs 成骨分化尚存争议。Xing et al^[10]使用低浓度($0.5 \mu\text{g/ml}$)大肠杆菌 LPS 活化 PDLSCs,发现 Wnt/ β -catenin 通路蛋白 Cyclin 和激活转录共刺激因子(transcriptional activator with a PDZ motif, TAZ)表达增高,成骨关键基因 Runx 2、ALP、Col-I 表达增高,茜素红染色显示钙化结节增多。降低 TAZ 同时可以降低 LPS 诱导的成骨增强作用。此外,阻断 Wnt/ β -catenin 通路可以抑制 LPS 引起的成骨分化。然而,文献^[11]报道,高浓度 LPS($\geq 10 \mu\text{g/ml}$)可显著抑制 PDLSCs 增殖和成骨分化,同时促进炎症因子表达,加重牙周组织的损伤。可见, LPS 通过 Wnt/ β -catenin 通路调控干细胞成骨分化作用依赖 LPS 浓度。

Peng et al^[12]体外分离培养患者的 PDLSCs,发现源自牙周炎患者炎症组织的细胞较正常受试者,其成骨分化能力明显降低。长链非编码 RNA(Long noncoding RNA, lncRNA)可能参与 Wnt 信号通路的调控来调节干细胞成骨分化能力。在 PDLSCs 成骨分化过程中,ALP、Runx 2 和成骨相关转录因子抗体(osterix, OSX)的表达增加,而 lncRNA-ANCR 的表达减少。lncRNA-ANCR 可能通过抑制 microRNA(miR)-758,进一步激活 Notch2/Wnt/ β -catenin 通路,从而抑制 PDLSCs 成骨分化。

Wang et al^[13]分离培养牙周炎患者炎症局部

PDLSCs,高通量测序发现,与正常组相比,lncRNA-POIR 显著降低。lncRNA-POIR 作为显著的促进成骨的基因,可能作为 miR-482 的竞争性内源性 RNA,调控其靶基因 FoxO1 表达,继而, FoxO1 通过与 TCF-4 竞争 β -catenin,抑制经典 Wnt 通路,增加其成骨分化。然而, Wnt 通路参与调控成骨可能与其他信号通路存在串联关系,如 NF- κ B。炎症通过 NF- κ B 通路增加 miR-482 的表达,同时 miR-482 在炎症微环境中的过表达导致了 lncRNA-POIR/miR-482 调节网络的失衡。

3.2 高糖微环境 体外试验中,当暴露于高糖环境时, PDLSCs 产生细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS),成骨能力降低。清除 ROS 可激活 PI3K/Akt 进而促使 β -catenin 入核结合 TCF/LEF,阻断高糖介导的 PDLSCs 成骨抑制^[14]。这表明高糖环境使 PDLSCs 内产生氧化损伤,通过抑制 PI3K/Akt/Wnt/ β -catenin 通路抑制其成骨分化。

糖尿病大鼠牙周膜组织 DNA 甲基化水平升高,牙槽骨骨量和密度降低。体外实验,高糖处理 PDLSCs 可降低 β -catenin、p-GSK-3 β 和 LEF 1 表达。DNA 甲基转移酶抑制剂 5-Aza-2-脱氧胞苷(5-Aza-DC),可降低 PDLSCs DNA 甲基化水平,并挽救了 PDLSCs 在高糖环境下降低的成骨分化。然而,采用 Wnt 通路的拮抗剂 Dickkopf 相关蛋白(Dickkopf-related protein, DKK)-1,可以阻断 5-Aza-DC 在高糖中对细胞成骨分化的保护作用。这一研究^[15]首次提出,在高糖环境下,抑制 DNA 甲基化可通过 Wnt 信号通路促进 PDLSCs 的成骨分化。以上研究表明,糖尿病导致的 PDLSCs 成骨分化能力降低可能是通过 DNA 甲基化抑制 Wnt/ β -catenin 通路造成的。

然而,体外将 PDLSCs 进行成骨诱导,用晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)处理细胞,细胞成骨能力降低,表现出 ALP 活性降低,矿化结节形成减少,成骨特异性基因 Runx 2、OSX、ALP、OPN、Col-I 和 OCN 表达下调。经典 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂 XAV-939 部分挽救了 AGE 诱导的 PDLSCs 成骨潜能的抑制。可见 AGEs 激活了经典 Wnt/ β -catenin 通路,促进了 β -catenin 的核转位,从而减弱了 PDLSCs 的成骨分化能力^[16]。

3.3 生物应力 用循环液压模拟生理性的咀嚼,压力刺激下乳牙 PDLSCs 成骨能力受抑制。在循环液压下,乳牙 PDLSCs 中 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体(al-

pha 7 nicotinic acetylcholine receptors, $\alpha 7$ nachr) 被激活, GSK- 3β 去磷酸化, 激活 Wnt/ β -catenin 通路, 核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activator of NK- κ B ligand, RANKL) 上调、Runx 2、ALP 和骨保护素(osteoprotegerin, OPG) 的降低, PDLSCs 表现出诱导破骨细胞分化的能力。抑制 $\alpha 7$ nachr 或 Wnt/ β -catenin 通路可逆转成骨抑制^[17]。

然而, PDLSCs 在液压压力模拟的正畸力的作用下成骨分化, 且短期作用(1 h) 较长期作用(12 h) 的成骨效应较强。在力的作用下, PDLSCs 中的 GSK- 3β 磷酸化, 活化 β -catenin 入核, 激活 Wnt/ β -catenin 通路, 促进 PDLSCs 成骨分化^[18]。这可能与 PDLSCs 不同年龄来源(乳牙和恒牙) 相关。可见在 PDLSCs 分化的不同阶段, 生物应力作用下的 Wnt/ β -catenin 通路起到正向或负向的调控作用, 以满足机体发育的不同阶段的需求。

3.4 药物 阿奇霉素(azithromycin, AZM) 结合非手术牙周疗法可缓解临床症状^[19], 同时抑制破骨细胞分化和骨吸收^[20]。体外试验中, 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 活化 PDLSCs 致使 ALP 活性降低, 钙化结节减少。AZM 的加入使得降低 PDLSCs 成骨分化能力得到回升。同时 β -catenin、磷酸化 p65 和磷酸化 I κ B- α 蛋白表达下降。这表明, AZM 通过同时抑制 Wnt/ β -catenin 和 NF- κ B 通路, 促进 PDLSCs 在炎症微环境中的成骨分化^[21]。

积雪草苷(asiatikoside, AC) 可促进伤口愈合, 具有抗炎、抗氧化和抗溃疡的活性^[22]。体外实验中, AC 可促进 PDLSCs 成骨分化, 能够显著上调 PDLSCs 中 Wnt 3a 基因的表达, 并呈剂量依赖性(最适浓度 100 μ mol/L), 同时抑制 Wnt 的负调节因子 Axin 2, 激活 Wnt/ β -catenin 通路, 进而诱导 OSX 和牙本质基质蛋白(dentin matrix protein, DMP) 1 表达, 促进 PDLSCs 成骨分化^[23]。

作为胰高血糖素样肽-4 类似物, 肠促胰岛素类似物(exendin-4, Ex-4) 在细胞和分子水平上都具有快速的抗炎作用, 对 MSCs 成骨分化有积极的影响^[24-25]。Ex-4 同样增强 PDLSCs 的成骨分化能力, Ex-4 处理使细胞核与细胞浆的 β -catenin 蛋白表达均上调, GSK- 3β 磷酸化增加, Wnt/ β -catenin 通路激活, 同时促进 I κ B α 磷酸化来抑制 NF- κ B 通路的活化。Ex-4 亦可以通过相同机制减轻高浓度 LPS (10 μ g/ml) 对 PDLSCs 的成骨分化抑制作用^[26]。

吸烟已被公认为牙周炎的独立危险因素之一, 烟草的有效成分尼古丁可以抑制胶原合成、破坏上

皮结构, 引起牙周局部组织损伤^[27]。尼古丁对 PDLSCs 的成骨分化的抑制作用具有剂量依赖性。尼古丁处理可激活 $\alpha 7$ nachr 从而激活 Wnt/ β -catenin 通路, 抑制 PDLSCs 成骨。分别抑制 $\alpha 7$ nachr 和 Wnt/ β -catenin 通路可挽回受抑制的 PDLSCs 成骨分化^[28]。

3.5 生物支架 近年来随着种植技术临床应用增多, 研究者多聚焦于传统材料的改良和新型材料的研发。体外实验中, 将 PDLSCs 培养于聚苯乙烯(TCPS) 上, 和四种没有骨诱导因子的钛盘[光滑的抛光处理(PT)、亲水性抛光处理(pmodPT)、粗糙喷砂-大颗粒-酸蚀(sandblasted, large-grit, acid-etched, SLA) 和亲水性(mod) SLA], 然后检测成骨活性。与 TCPS 和其他钛表面相比较, 培养在 SLA 上的细胞出现较高的成骨活性。SLA 和 modSLA 上培养的细胞高表达 Wnt3a 和 β -catenin, 但在 PT 和 pmodPT 上细胞却高表达钙依赖性 Wnt 信号分子 Wnt5a、钙调素; 此外, 不同的表面修饰也会改变细胞整合素 $\alpha 2/\beta 1$ 、sonic hedgehog 和 Notch 信号分子的表达。总之, 表面粗糙度和亲水性可以影响不同的 Wnt 通路和信号分子参与调控 PDLSCs 的成骨分化^[29]。

Mao et al^[30] 以 α -磷酸三钙颗粒为前驱体, 在水溶液中通过水热反应制备了具有微纳米杂化表面的羟基磷灰石(HA) 生物陶瓷(mnHA), 与具有平坦致密表面的 HA 生物陶瓷相比, mnHA 生物陶瓷能够促进细胞黏附、增殖、ALP 活性以及成骨/成牙骨质基因的表达。此外, mnHA 生物陶瓷还能引起经典 Wnt 信号通路中 LRP5 和 β -catenin 的表达上调。DKK-1 可抑制 ALP 活性和 ALP、OCN、CAP、CEMP 和 Runx 2 基因的表达。可见, 能够成为牙周组织再生的材料 mnHA 通过 Wnt 通路促进成骨/成牙骨质。

参考文献

- [1] Seo B M, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament [J]. Lancet, 2004, 364(9429): 149-55.
- [2] Lindroos B, Maenpaa K, Ylikomi T, et al. Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 368(2): 329-35.
- [3] Du L, Feng R, Ge S. PTH/SDF-1 α cotherapy promotes proliferation, migration and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells [J]. Cell Prolif, 2016, 49(5): 599-608.
- [4] Zhang C, Guo H, Yang C, et al. The biological behavior optimi-

- zation of human periodontal ligament stem cells via preconditioning by the combined application of fibroblast growth factor-2 and A83-01 in in vitro culture expansion [J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 66.
- [6] Nusse R, Varmus H E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome [J]. *Cell*, 1982, 31(1): 99 – 109.
- [7] Cadigan K M, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development [J]. *Genes Dev*, 1997, 11(24): 3286 – 305.
- [8] 杨留洋, 高倩, 程民, 等. TCF7L2 与 WNT7b 相互作用促进胃癌细胞增殖与转移 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(11): 1729 – 34.
- [9] Tada H, Matsuyama T, Nishioka T, et al. Porphyromonas gingivalis gingipain-dependently enhances IL-33 production in human gingival epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0152794.
- [10] Kukulj T, Trivanovic D, Mojsilovic S, et al. IL-33 guides osteogenesis and increases proliferation and pluripotency marker expression in dental stem cells [J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(1): e12533.
- [11] Xing Y, Zhang Y, Jia L, et al. Lipopolysaccharide from Escherichia coli stimulates osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells through Wnt/beta-catenin-induced TAZ elevation [J]. *Mol Oral Microbiol*, 2019, 34(1).
- [12] Li C, Li B, Dong Z, et al. Lipopolysaccharide differentially affects the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells through Toll-like receptor 4 mediated nuclear factor kappaB pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(3): 67.
- [13] Peng W, Deng W, Zhang J, et al. Long noncoding RNA ANCR suppresses bone formation of periodontal ligament stem cells via sponging miRNA-758 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(2): 815 – 21.
- [14] Wang L, Wu F, Song Y, et al. Long noncoding RNA related to periodontitis interacts with miR-182 to upregulate osteogenic differentiation in periodontal mesenchymal stem cells of periodontitis patients [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(8): e2327.
- [15] Kim S Y, Lee J Y, Park Y D, et al. Hesperetin alleviates the inhibitory effects of high glucose on the osteoblastic differentiation of periodontal ligament stem cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67504.
- [16] Liu Z, Chen T, Sun W, et al. DNA demethylation rescues the impaired osteogenic differentiation ability of human periodontal ligament stem cells in high glucose [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 27447.
- [17] Zhang L N, Wang X X, Wang Z, et al. Berberine improves advanced glycation end products-induced osteogenic differentiation responses in human periodontal ligament stem cells through the canonical Wnt/betacatenin pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(6): 5440 – 52.
- [18] Chen Y, Yang K, Zhou Z, et al. Mechanical stress modulates the RANKL/OPG system of periodontal ligament stem cells via alpha7 nAChR in human deciduous teeth: an in vitro study [J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 5326341.
- [19] Zhang L, Liu W, Zhao J, et al. Mechanical stress regulates osteogenic differentiation and RANKL/OPG ratio in periodontal ligament stem cells by the Wnt/beta-catenin pathway [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1860(10): 2211 – 9.
- [20] Oliveira A, Costa F O, Nogueira L M R, et al. Azithromycin and full-mouth scaling for the treatment of generalized stage III and IV periodontitis: a 6-month randomized comparative clinical trial [J]. *Braz Dent J*, 2019, 30(5): 429 – 36.
- [21] Gannon S C, Cantley M D, Haynes D R, et al. Azithromycin suppresses human osteoclast formation and activity in vitro [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(5): 1098 – 107.
- [22] Meng T, Zhou Y, Li J, et al. Azithromycin promotes the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells after stimulation with TNF-alpha [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 7961962.
- [23] Nie X, Zhang H, Shi X, et al. Asiaticoside nitric oxide gel accelerates diabetic cutaneous ulcers healing by activating Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 79: 106109.
- [24] Fitri A R, Pavasant P, Chamni S, et al. Asiaticoside induces osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells through the Wnt pathway [J]. *J Periodontol*, 2018, 89(5): 596 – 605.
- [25] Ruan B, Zhu Z, Yan Z, et al. Azoramide, a novel regulator, favors adipogenesis against osteogenesis through inhibiting the GLP-1 receptor-PKA-beta-catenin pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 57.
- [26] Wolak M, Staszewska T, Juszczak M, et al. Anti-inflammatory and pro-healing impacts of exendin-4 treatment in Zucker diabetic rats: Effects on skin wound fibroblasts [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 842: 262 – 9.
- [27] Liu H, Zheng J, Zheng T, et al. Exendin-4 regulates Wnt and NF-kappaB signaling in lipopolysaccharide-induced human periodontal ligament stem cells to promote osteogenic differentiation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75: 105801.
- [28] Deveci B, Ayna B, Tacir I H, et al. Effects of nicotine administration in rats on MMP2 and VEGF levels in periodontal membrane [J]. *Folia Morphol (Warsz)*, 2018, 77(3): 471 – 7.
- [29] Zhou Z, Li B, Dong Z, et al. Nicotine deteriorates the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through alpha7 nicotinic acetylcholine receptor regulating Wnt pathway [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83102.
- [30] Kim S Y, Yoo J Y, Ohe J Y, et al. Differential expression of osteomodulatory molecules in periodontal ligament stem cells in response to modified titanium surfaces [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 452175.
- [31] Mao L, Liu J, Zhao J, et al. Effect of micro-nano-hybrid structured hydroxyapatite bioceramics on osteogenic and cementogenic differentiation of human periodontal ligament stem cell via Wnt signaling pathway [J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 7031 – 44.