

# 转录因子 NFIC 在 cAMP 信号通路调控根尖牙乳头干细胞分化中的作用

梁妍 张菁\* 李颂

**摘要** 目的 通过慢病毒转染过表达 NFIC 基因,研究 NFIC 在 cAMP 信号通路促进根尖牙乳头干细胞(SCAPs)分化中的作用。方法 采用酶消化法培养 SCAPs,将 SCAPs 分别于普通矿化诱导液(对照组)、cAMP 信号通路激动剂(Forskolin 组)、转染空病毒载体协同 Forskolin (Forskolin + LV-empty 组)、转染过表达 NFIC 慢病毒协同 Forskolin (Forskolin + ov-NFIC 组)的矿化诱导液中培养。矿化诱导 10 d 后茜素红染色检测各组矿化结节形成情况,QPCR 法检测 7 d Runt 相关基因 2(RUNX2)、碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(OCN) mRNA 的表达。结果 Forskolin 作用 SCAPs 后矿化结节形成增多,相关矿化基因表达增高,而 Forskolin + ov-NFIC 组矿化结节进一步增多,矿化基因表达进一步上调。结论 转录因子 NFIC 能够促进 cAMP 信号通路介导的 SCAPs 分化。

**关键词** 根尖牙乳头干细胞;cAMP;NFIC;分化

**中图分类号** R 780.2

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2017)02-0190-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.008

根尖牙乳头干细胞(stem cells from the apical papilla, SCAPs)是一种成体间充质干细胞,位于牙根尚未完全发育成形的恒牙根尖周组织中,能分化为成牙本质细胞,形成牙根部牙本质<sup>[1]</sup>。环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)是一种重要的细胞内信号分子,通过一系列作用调控相关目的基因表达,在细胞的增殖、分化、凋亡等生命过程中发挥了重要作用<sup>[2]</sup>。课题组前期研究<sup>[3-4]</sup>显示,cAMP 信号通路能够促进 SCAPs 增殖和成牙/成骨分化。核因子 I-C(nuclear factor I-C, NFIC)是 NF1 家族成员之一,是一种编码位置特异性的转录因

子<sup>[5]</sup>。研究<sup>[6]</sup>表明,增强 SCAPs 细胞 NFIC 活性,能够促进其增殖和成牙/成骨分化。该实验通过慢病毒转染过表达 NFIC 基因,研究 NFIC 在 cAMP 信号通路调控 SCAPs 分化中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司);超净工作台(苏州净化设备有限公司);倒置相差显微镜及照相系统(德国 Leica 公司);实时定量基因扩增荧光检测(QPCR)仪(美国 Agilent 公司);α-MEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);I 型胶原酶、分散酶、Forskolin、茜素红(美国 Sigma 公司);过表达 NFIC 慢病毒(ov-NFIC)、空载体病毒(LV-empty)(上海吉玛公司);TRIzol(美国 Invitrogen 公司);RNA 提取及逆转录试剂盒、QPCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);Runt 相关基因 2(Runt-related transcription factor 2, RUNX2)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、β-actin 引物(上海生工公司)。

**1.2 SCAPs 的分离培养** 收集 14~20(16.57 ± 0.84)岁患者因阻生或正畸需要拔除的牙根尚未发育完成、健康的第 3 磨牙(由安徽医科大学附属口腔医院外科门诊提供,已获患者知情同意)。收集的牙齿于无菌条件下剥离位于根尖部的牙乳头组织,PBS 冲洗后将根尖乳头剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 左右大小的组织块,加入含 I 型胶原酶(3 mg/ml)和分散酶(4 mg/ml)的消化液中消化,收集细胞及消化松散的组织块,接种于 6 孔板,加入含 20% 胎牛血清的 α-MEM 培养基,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养,每 3~4 d 换液 1 次。待细胞长至 80% 汇合时,胰蛋白酶消化传代培养,取第 3~5 代细胞用于实验。

**1.3 病毒转染和实验分组** 培养所得的细胞以 2 × 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板,待细胞汇合至 30%~40% 时,更换含 ov-NFIC 慢病毒(MOI = 40)或 LV-empty(MOI = 1)的 α-MEM 培养基,病毒转染 12~16 h 后,更换培养液为相应的矿化诱导液。实验分

2016-09-09 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81400497);安徽省自然科学基金(编号:1408085QH178);安徽医科大学博士科研基金(编号:XJ201307)

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中心实验室,合肥 230032

作者简介:梁妍,女,硕士研究生;

李颂,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:xlisong@sohu.com

\* 对本文具有同等贡献

为4组:对照组,即正常矿化诱导液( $\alpha$ -MEM、10% FBS、10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠、50  $\mu$ g/ml 维生素C、10 nmol/L 地塞米松)作用; Forskolin 组,含 10  $\mu$ mol/L Forskolin(cAMP 信号通路激动剂)的矿化诱导液刺激; Forskolin + LV-empty 组,转染空病毒载体的 Forskolin 刺激; Forskolin + ov-NFIC 组,转染 ov-NFIC 病毒的 Forskolin 刺激。

**1.4 茜素红染色检测矿化结节形成情况** 各组矿化诱导培养 10 d 后 4% 多聚甲醛溶液固定 10 ~ 15 min, PBS 漂洗 3 ~ 5 次 2% 茜素红(pH 4.34)室温避光染色 30 ~ 45 min, 蒸馏水清洗干净。倒置显微镜下观察矿化结节形成情况。10% 氯化烷基十六吡啶(CPC)溶解钙结节 酶标仪 562 nm 波长测定相应的吸光度值, 定量分析各组矿化结节含量。实验重复 3 次。

**1.5 QPCR 法检测矿化相关基因表达情况** 实验各组矿化诱导刺激 7 d 后, 加入 TRIzol 裂解细胞, 提取总 RNA, 测定 RNA 浓度和纯度。使用反转录试剂盒, 将 500 ng RNA 逆转录为 cDNA, 反转录产物用 QPCR 试剂盒进行分析, 反应体系(Taq II 10.0  $\mu$ l, Dye II 0.4  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O 6.0  $\mu$ l, PCR 上游引物各 0.8  $\mu$ l, cDNA 2.0  $\mu$ l) 和反应条件(95  $^{\circ}$ C、120 s; PCR 反应: 95  $^{\circ}$ C、5 s, 60  $^{\circ}$ C、15 s, 72  $^{\circ}$ C、20 s, 循环 40 次; 溶解曲线分析: 95  $^{\circ}$ C、30 s, 55  $^{\circ}$ C、30 s, 95  $^{\circ}$ C、30 s)。实验重复 3 次。引物序列见表 1。

表 1 QPCR 检测所用引物名称及序列

基因名称	引物序列(5'-3')
$\beta$ -actin	F:GCCAAGTGGGTGGTATAGAGG R:GTGGATGTTGGGTCTAAGAG
RUNX2	F:CGCCTCACAAAACAACCACAG R:ACTGCTTGCAGCCTTAAATGAC
ALP	F:CCACGTCTTCACATTTGGTG R:AGACTGGCCCTGCTAGTTCT
OCN	F:ATGAGAGCCCTCACACTCCT R:CTTGACACAAAGGCTGCAC

**1.6 统计学处理** 应用 SPSS 17.0 软件进行分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。数据比较采用 *t* 检验或单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 牙乳头干细胞的体外培养** 取新鲜拔除的根尖孔尚未闭合的第 3 磨牙, 分离位于根尖部的根尖牙乳头组织(图 1A); 采用酶消化法进行原代培养至 7 d 左右, 组织块边缘游出细胞, 倒置显微镜下观

察细胞呈梭形、成纤维细胞样结构(图 1B)。

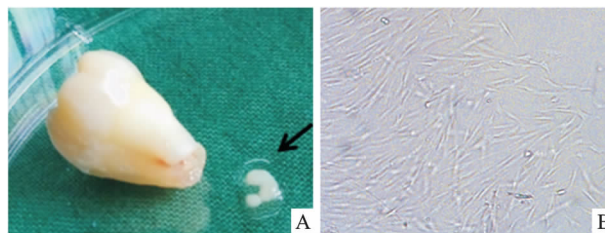


图 1 原代培养人 SCAPs

A: 分离的根尖牙乳头组织(箭头); B: 培养 7 d 左右组织块周围长出细胞  $\times 40$

**2.2 NFIC 在 Forskolin 促进 SCAPs 矿化结节形成中的作用** 茜素红染色结果显示, 矿化诱导 10 d 后, 实验各组均能形成矿化结节。与对照组比较, Forskolin 作用 SCAPs 后矿化结节形成增多, 同时过表达 NFIC 基因后增强了 Forskolin 对 SCAPs 矿化结节形成能力的促进作用(图 2)。矿化结节定量分析结果与茜素红染色结果一致(对照组:  $1.048 \pm 0.063$ , Forskolin 组:  $1.314 \pm 0.001$ , Forskolin + LV-empty 组:  $1.264 \pm 0.028$ , Forskolin + ov-NFIC 组:  $1.671 \pm 0.048$ ,  $F = 38.23$ ,  $P = 0.03$ )。

**2.3 NFIC 在 Forskolin 促进 SCAPs 矿化基因表达中的作用** QPCR 检测结果显示, Forskolin 作用 SCAPs 后, 7 d RUNX2、ALP、OCN mRNA 表达较对照组升高; 过表达 NFIC 协同 Forskolin 作用后, 这些矿化基因的表达进一步上调: RUNX2 组( $F = 65.15$ ,  $P = 0.042$ )、ALP 组( $F = 22.44$ ,  $P = 0.036$ )、OCN 组( $F = 20.44$ ,  $P = 0.046$ )。见图 3。上述结果表明, 转录因子 NFIC 能够增强 Forskolin 对 SCAPs 分化的促进作用。

## 3 讨论

年轻恒牙发生根尖周病变, 进行牙髓血运重建治疗后, 牙根可以继续发育, 根尖孔闭合, 说明 SCAPs 在继续牙根发育中发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。同时动物实验<sup>[8]</sup>也表明, 将 SCAPs 结合支架材料植入到免疫缺陷小鼠皮下, SCAPs 可以分化为成牙本质样细胞, 并形成牙本质样结构。因此 SCAPs 可以作为牙组织工程重要的种子细胞, 对于促进牙髓牙本质再生具有潜在的临床价值。

本实验研究显示, 通过 Forskolin 活化 cAMP 信号通路后, 促进 SCAPs 细胞矿化结节形成, 同时过表达 NFIC 基因进一步增强 Forskolin 的促进作用。

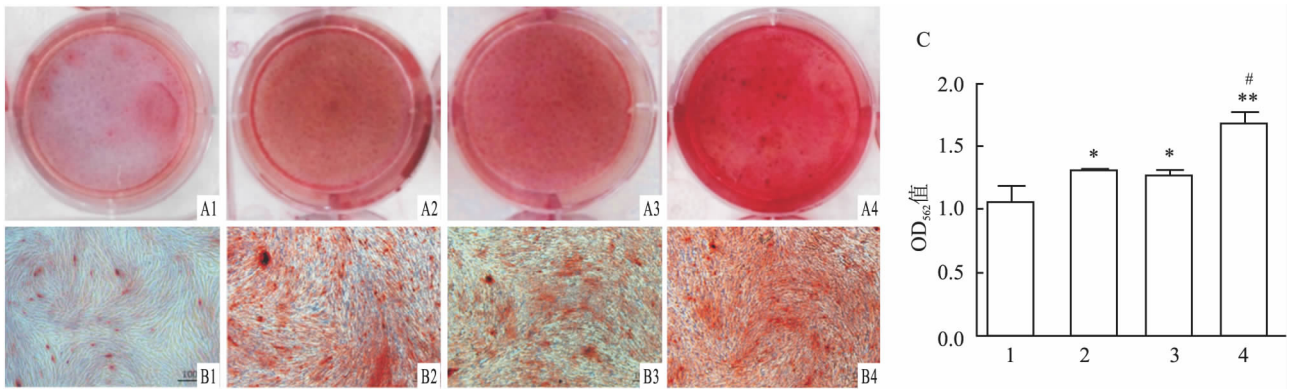


图2 NFIC在Forskolin促进SCAPs矿化结节形成中的作用

A:实验各组矿化诱导10 d,茜素红染色后肉眼观察;B:显微镜下观察矿化结节形成情况 ×40;C:矿化结节定量分析;1:对照组;2: Forskolin 组;3: Forskolin + LV-empty 组;4: Forskolin + ov-NFIC 组;与对照组比较: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01; 与Forskolin 组比较:# P < 0.05

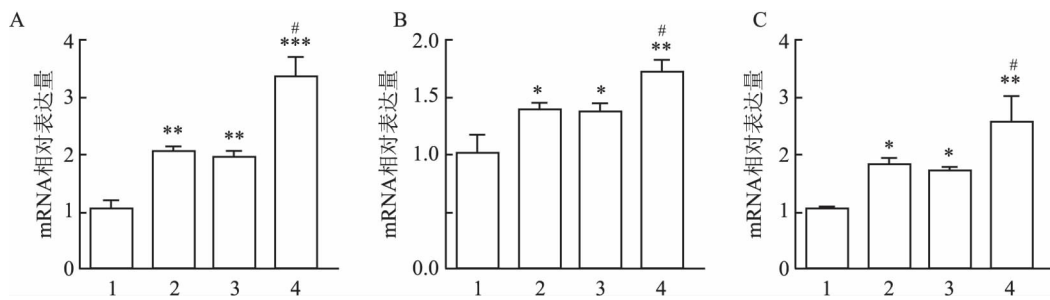


图3 NFIC在Forskolin促进SCAPs矿化基因表达中的作用

A: RUNX2 mRNA; B: ALP mRNA; C: OCN mRNA; 1:对照组; 2: Forskolin 组; 3: Forskolin + LV-empty 组; 4: Forskolin + ov-NFIC 组; 与对照组比较: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01; 与Forskolin 组比较:# P < 0.05

RUNX2 是重要的成骨分化转录因子,在早期成骨分化起到决定性作用<sup>[9-10]</sup>,同时 ALP 是成骨分化早期标志物<sup>[11]</sup>,OCN 是成骨分化晚期阶段成骨细胞分泌的重要蛋白<sup>[12]</sup>。通过 QPCR 法检测这些矿化基因表达结果表明,Forskolin 上调 RUNX2、ALP、OCN mRNA 的表达,这种促进作用被过表达 NFIC 进一步增强,说明转录因子 NFIC 与 Forskolin 在调控 SCAPs 分化中可能起到了协同促进作用。

转录因子环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)作为 cAMP 信号通路重要的下游信号分子,对于调控基因转录起到了重要作用<sup>[13]</sup>。Crawford et al<sup>[14]</sup>研究发现,磷酸烯醇丙酮酸羧激酶基因启动子上 NFI 结合位点(P1 位点)与 CRE 位点邻近,因此 NFI 可能与结合到 CRE 的蛋白存在相互作用关系;进一步研究显示 NFI 与 CREB 相互作用可能通过改变 DNA 结合形式。信号通路之间存在着错综复杂的串扰关系,有研究<sup>[15]</sup>报道在转化生长因子 β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1) 调控的 SCAPs 成牙/成骨分化中,NFIC 起到了负性调控作用。此外,Liu et al<sup>[16]</sup>研究发现在心脏成纤维细胞,

cAMP 信号通路抑制 TGF-β 刺激的胶原合成。Oerlecke et al<sup>[17]</sup>研究发现在乳腺癌细胞,cAMP 可以促进 TGF-β 介导的基因表达,作用机制是通过上调 TβR I 表达,促进 Smad3 磷酸化。说明 TGF-β 信号通路与 cAMP 信号通路、转录因子 NFIC 都存在相互作用关系,因此推测 cAMP 信号通路与 NFIC 也可能相互作用。本研究显示转录因子 NFIC 与 cAMP 信号通路在调控 SCAPs 分化中存在相互作用关系,NFIC 可能通过影响 CREB 表达直接参与 cAMP 信号通路调控的 SCAPs 分化,也可能通过影响 TGF-β 信号通路而间接作用 cAMP 信号通路,但其具体机制还需要进一步研究。

综上所述,转录因子 NFIC 参与调控 cAMP 信号通路介导的 SCAPs 分化,起到了协同促进的作用。

### 参考文献

[1] Sonoyama W, Liu Y, Fang D, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine [J]. PLoS One, 2006, 1: e79.

[2] Ohta Y, Nakagawa K, Imai Y, et al. Cyclic AMP enhances Smad-

- mediated BMP signaling through PKA-CREB pathway [J]. *J Bone Miner Metab*, 2008, 26(5):478–84.
- [3] 朱永娜, 张菁, 苏圣哲, 等. cAMP 信号通路对根尖乳头干细胞增殖的影响 [J]. *安徽医药*, 2016, 20(5):874–8.
- [4] 苏圣哲, 朱永娜, 张菁, 等. cAMP 信号通路在根尖乳头干细胞定向分化中的作用 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2016, 32(5):650–4.
- [5] Nagata K, Guggenheimer R A, Enomoto T, et al. Adenovirus DNA replication *in vitro*: identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982, 79(21):6438–42.
- [6] Zhang J, Wang Z, Jiang Y, et al. Nuclear Factor I-C promotes proliferation and differentiation of apical papilla-derived human stem cells *in vitro* [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 332(2):259–66.
- [7] Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial [J]. *J Endod*, 2011, 37(4):562–7.
- [8] Na S, Zhang H, Huang F, et al. Regeneration of dental pulp/dentine complex with a three-dimensional and scaffold-free stem-cell sheet-derived pellet [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2016, 10(3):261–70.
- [9] Xu J, Li Z, Hou Y, et al. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(12):2527–35.
- [10] Byers B A, García A J. Exogenous Runx2 expression enhances *in vitro* osteoblastic differentiation and mineralization in primary bone marrow stromal cells [J]. *Tissue Eng*, 2004, 10(11–12):1623–32.
- [11] Shui C, Scutt A. Mild heat shock induces proliferation, alkaline phosphatase activity, and mineralization in human bone marrow stromal cells and Mg-63 cells *in vitro* [J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(4):731–41.
- [12] Reichert T, Storkel S, Becker K, et al. The role of osteonectin in human tooth development: an immunohistological study [J]. *Calcif Tissue Int*, 1992, 50(5):468–72.
- [13] Gonzalez G A, Montminy M R. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133 [J]. *Cell*, 1989, 59(4):675–80.
- [14] Crawford D R, Leahy P, Hu C Y, et al. Nuclear factor I regulates expression of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(22):13387–90.
- [15] He W, Zhang J, Niu Z, et al. Regulatory interplay between NFIC and TGF- $\beta$ 1 in apical papilla-derived stem cells [J]. *J Dent Res*, 2014, 93(5):496–501.
- [16] Liu X, Sun S Q, Hassid A, et al. cAMP inhibits transforming growth factor-beta-stimulated collagen synthesis *via* inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Smad signaling in cardiac fibroblasts [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70(6):1992–2003.
- [17] Oerlecke I, Bauer E, Dittmer A, et al. Cyclic AMP enhances TGF $\beta$  responses of breast cancer cells by upregulating TGF $\beta$  receptor I expression [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e54261.

## Role of NFIC on cAMP-mediated differentiation of stem cells from the apical papilla

Liang Yan, Zhang Jing, Li Song

(*Stomatologic College of Anhui Medical University, The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University Key Laboratory of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032*)

**Abstract Objective** To investigate the role of NFIC on the stimulation effects of cAMP-induced differentiation of stem cells from the apical papilla (SCAPs) *in vitro*. **Methods** SCAPs isolated from dental papilla of human immature third molars were cultured by enzyme digestion. SCAPs were transfected with lentivirus that overexpressed NFIC gene (ov-NFIC) or an empty vector (LV-empty) and co-treatment with Forskolin. Mineralized nodule formation of each group was measured by alizarin red staining. Quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction was performed to test the expressions of RUNX2, ALP, OCN mRNA. **Results** Forskolin increased the expression of Runx2, ALP, OCN mRNA as well as matrix mineralization in SCAPs, and the stimulation effects of Forskolin were enhanced by overexpressing NFIC gene. **Conclusion** The results indicate that NFIC can promote cAMP-induced differentiation of SCAPs.

**Key words** stem cells from the apical papilla; cAMP; NFIC; differentiation