

李坤阳,陈栋,左春然,等. VPS4B 调控 Notch 通路对促进牙髓干细胞成牙本质分化的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 36-41.

Li KY, Chen D, Zuo CR, et al. Effects of VPS4B on the Notch pathway and odontogenic differentiation in dental pulp stem cells [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 36-41.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.006

VPS4B 调控 Notch 通路对促进牙髓干细胞成牙本质分化的机制研究

李坤阳¹, 陈 栋^{2*}, 左春然¹, 刘爱群¹, 朱兰省¹, 牛 兵¹

(1.河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院)口腔科,郑州 450001; 2.郑州大学第一附属医院·河南省口腔医院口腔科,郑州 450052)

【摘要】 目的 探讨细胞液泡分选蛋白 4B(VPS4B)对人牙髓干细胞(hDPSCs)成牙本质分化及 Notch 通路的影响。**方法** hDPSCs 分正常组、矿化组、阴性对照组、VPS4B-siRNA 组,除正常组(正常培养,不做任何处理)外,其余各组添加矿化液(0.785 g/L 地塞米松、0.05 g/L 维生素 D₃、1.6 g/L β-甘油磷酸钠),同时阴性对照组和 VPS4B-siRNA 组均用脂质体 Lipofectamine 2000 分别和阴性对照 siRNA、VPS4B-siRNA 共转染。CCK8 检测细胞增殖情况;蛋白免疫印迹检测细胞中 VPS4B、Notch 受体释放其胞内结构域(NICD)、Hairy 相关转录因子 1(Hey1)蛋白水平;茜素红染色观察细胞矿化情况;钙浓度检测试剂盒检测细胞钙浓度;实时荧光定量 PCR 检测细胞 Runx2、骨桥蛋白(OPN)、牙本质涎磷蛋白(DSPP)mRNA 水平。**结果** 正常组茜素红染色较浅,面积较小;矿化组、阴性对照组染色较深,且面积较大;VPS4B-siRNA 组染色颜色有所减轻,面积减少。与正常组相比,矿化组、阴性对照组 OD₄₅₀ 水平, NICD、Hey1 蛋白水平降低($P<0.05$),矿化结节相对数量, VPS4B 蛋白水平,钙浓度, Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平升高($P<0.05$); VPS4B-siRNA 组矿化结节相对数量, OPN、DSPP mRNA 水平升高($P<0.05$); OD₄₅₀ 水平, NICD、Hey1 蛋白水平降低($P<0.05$)。分别与矿化组、阴性对照组相比, VPS4B-siRNA 组 NICD、Hey1 蛋白水平升高($P<0.05$); OD₄₅₀ 水平, VPS4B 蛋白水平,矿化结节相对数量,钙浓度, Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平降低($P<0.05$)。**结论** 干扰 VPS4B 后可抑制 hDPSCs 牙本质分化,并初步探究可能是通过激活 Notch 通路实现的。

【关键词】 牙髓干细胞;成牙本质分化;细胞液泡分选蛋白 4B;Notch 通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)12-0036-06

Effects of VPS4B on the Notch pathway and odontogenic differentiation in dental pulp stem cells

LI Kunyang¹, CHEN Dong^{2*}, ZUO Chunran¹, LIU Aiqun¹, ZHU Lansheng¹, NIU Bing¹

(1. Department of Stomatology, Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine (the Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine), Zhengzhou 450001, China.

2. Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University·Stomatologic Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450052)

【基金项目】2018 年度河南省医学科技攻关计划项目(SBGJ2018038);河南省高等学校重点科研项目计划(18A310036)。

【作者简介】李坤阳(1984—),男,硕士研究生,研究方向:牙周病学。E-mail:li1984ky@sina.com

【通信作者】陈栋(1970—),男,医学博士,教授,硕士生导师。E-mail:chendongfmmu@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effects of vacuolar protein sorting 4B (VPS4B) on odontogenic differentiation and Notch pathway signaling in human dental pulp stem cells (hDPSCs). **Methods** hDPSCs was divided into normal, mineralized, negative control, and VPS4B-siRNA groups. The normal group was grown in normal culture, without any additional treatment. The remaining groups underwent treatment with mineralized liquid (0.785 g/L dexamethasone, 0.05 g/L vitamins, 2.16 g/L sodium β -glycerophosphate); the negative control and VPS4B-siRNA groups underwent transfection of negative control siRNA and VPS4B-siRNA, respectively, using Lipofectamine 2000. The CCK8 assay was used to detect cell proliferation. The protein levels of VPS4B, Notch intracellular domain (NICD), and hairy and enhancer of split-related with YRPW motif1 (Hey1) were detected by Western blotting. Cell mineralization was observed by alizarin red staining. Cell calcium concentrations were determined using a calcium detection kit. The mRNA levels of Runx2, osteopontin (OPN), and dentin sialophosphoprotein (DSPP) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** In the normal group, the alizarin red staining area was light and small. The mineralized and negative control groups exhibited a darker and larger staining area, while the VPS4B-siRNA group exhibited a lighter and smaller staining area. Compared with the normal group, the levels of OD₄₅₀, NICD, and Hey1 proteins were reduced in the mineralized and negative control groups (all $P < 0.05$), while the relative number of mineralized nodules, level of VPS4B protein, concentration of calcium, and levels of Runx2, OPN, and DSPP mRNA were enhanced (all $P < 0.05$). The relative number of mineralized nodules and levels of OPN and DSPP mRNA were enhanced in the VPS4B-siRNA group (all $P < 0.05$), while the levels of OD₄₅₀, NICD, and Hey1 proteins were reduced (all $P < 0.05$). Compared with the mineralized and negative control groups, NICD and Hey1 protein levels were enhanced in the VPS4B-siRNA group (both $P < 0.05$), while the levels of OD₄₅₀ and VPS4B protein, the relative number of mineralized nodules, concentration of calcium, and levels of Runx2, OPN, and DSPP mRNA were reduced (all $P < 0.05$). **Conclusions** Interference with VPS4B activity can inhibit odontogenic differentiation in hDPSCs, presumably through modulation of the Notch pathway.

[Keywords] dental pulp stem cells; odontogenic differentiation; vacuolar protein sorting 4B; Notch pathway

人牙髓干细胞(human dental pulp stem cells, hDPSCs)是从牙齿上分离出的成体间充质干细胞,具有高度增殖能力,且具有多向分化潜能,是牙齿再生的重要细胞^[1]。因此 hDPSCs 的定向分化对于牙齿再生至关重要。细胞液泡分选蛋白 4B (vacuolar protein sorting 4B, VPS4B)在 hDPSCs 中高表达,可促进向成牙本质分化,但机制尚不明确^[2]。Notch 通路与细胞增殖、分化等关系密切,并且几乎涉及机体所有器官、组织和细胞,在牙齿发育和再生过程中发挥重要作用^[3-4]。Notch 受体释放其胞内结构域(Notch intracellular domain, NICD)作为 Notch 通路激活金标准,过表达 NICD 可以抑制 hDPSCs 分化^[5]。推测 VPS4B 可能调控 Notch 通路影响 hDPSCs 成牙本质分化。因此,本研究采用矿化液和干扰 VPS4B 同时处理 hDPSCs,探讨其对成牙本质分化的影响,并初步探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

收集本院 18~30 岁因正畸或阻生齿拔除的健康完整恒牙,无菌工作台上取出牙髓,分离纯化和鉴定得 hDPSCs^[6]。经核实,所有操作经患者知情同

意并签订知情同意书,本研究经本院伦理协会审核并通过(20190014)。

1.2 主要试剂与仪器

地塞米松、维生素、 β -甘油磷酸钠、茜素红(德国 Sigma 公司,批号分别为:170412、181113、171207、180415);脂质体 Lipofectamine 2000 转染试剂盒(赛默飞世尔公司,批号:20170418);一抗 VPS4B、NICD、hairy 相关转录因子 1(hairy and enhancer of split-related with YRPW motif1, Hey1)、GAPDH、钙浓度检测试剂盒(美国 abcam 公司,批号分别为:ab224736、ab83232、ab22614、ab181602、ab102505);VPS4B-siRNA、阴性对照 siRNA、Runx 相关转录因子 2(runt-related transcription factor2, Runx2)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP)引物序列均由生工生物工程股份有限公司合成。CO₂ 培养箱(深圳瑞沃德公司,型号:D180-P);酶标仪、实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)仪(赛默飞世尔公司,型号分别为:Multiskan Sky、7500);凝胶成像系统(上海天能公司,型号:4800)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及处理

参考文献^[7]设计 VPS4B-siRNA, VPS4B-siRNA-

1:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'、VPS4B-siRNA-2:5'-AACATTTGAGAAACGAATT-3'、VPS4B-siRNA-3:5'-TGATCCTAACCATCTTGT-3',最终三者 1:1:1 混合为 VPS4B-siRNA。阴性对照 siRNA:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'。VPS4B-siRNA 及阴性对照 siRNA 均用 50 μL 无血清 MEM 稀释成 20 μmol/L;2 μL 脂质体 Lipofectamine 2000 用 50 μL DMEM 培养液稀释,轻轻混匀后室温孵育 5 min,上述稀释的 siRNA 与稀释的脂质体 Lipofectamine 2000 轻轻混合后室温孵育 20 min,现配现用。

10% FBS+90% DMEM 培养液制成完全培养液培养 hDPSCs,采用生长良好的第 3 代 hDPSCs 进行后续实验,实验分为正常组、矿化组、阴性对照组、VPS4B-siRNA 组。正常组正常培养相同时间,其余组添加矿化液(0.785 g/L 地塞米松、0.05 g/L 维生素、2.16 g/L β-甘油磷酸钠),在添加矿化液基础上阴性对照组(添加脂质体 Lipofectamine 2000+阴性对照 siRNA)、VPS4B-siRNA 组(添加脂质体 Lipofectamine 2000+VPS4B-siRNA),6 h 后弃去培养液再添加含矿化液完全培养液培养,其余 2 d 换一次液,置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养 14 d。

1.3.2 蛋白免疫印迹检测细胞中 VPS4B、NICD、Hey1 蛋白水平

按 1.3.1 对细胞处理后,蛋白裂解液冰上裂解细胞 20 min,4℃ 12000 r/min 离心 20 min,上清为总蛋白,凝胶电泳分离蛋白,PVDF 转膜,分别加入一抗 VPS4B、NICD、Hey1、GAPDH 置于 4℃ 孵育过夜,添加对应二抗,室温孵育 1 h。凝胶成像系统拍照并分析条带灰度。目的蛋白相对表达=目的蛋白条带灰度/GAPDH 条带灰度。

1.3.3 CCK8 检测细胞增殖情况

每孔 3×10⁴ 个细胞接种至 96 孔板中,添加 200 μL 培养液培养细胞,待细胞贴壁后添加 CCK8 试剂,继续培养 2 h,酶标仪检测各组细胞光密度 OD₄₅₀ (optic density, OD)。

1.3.4 茜素红染色观察细胞分化情况

按 1.3.1 处理各组细胞,弃去培养液,40 g/L 多聚甲醛固定,茜素红染液染色,肉眼及倒置显微镜下观察矿化结节情况。Image-J 软件定量分析,每个样品显微镜视野下计数 5 个孔,求平均值,每个视野下矿化结节数量为矿化结节相对数量。

1.3.5 钙浓度检测试剂盒检测细胞钙水平

按 1.3.1 处理细胞后按照钙浓度检测试剂盒说明书配置 MTB 试剂和碱性溶液,钙标准液 2.5 mmol/L,4℃ 避光保存。100 μL MTB+200 μL 碱性溶液+各 10 μL(待测样品、钙标准液、ddH₂O),混匀后置于 1 cm 比色皿,ddH₂O 用于调零,测定 OD₆₁₀。待测样品钙浓度=OD_{测定管}/OD_{标准管}×2.5。

1.3.6 qRT-PCR 检测细胞中 Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平

按 1.3.1 方法处理细胞后,RNA 提取试剂盒提取总 RNA,逆转录 cDNA 试剂盒合成 cDNA,qRT-PCR 仪检测细胞中 Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平。引物序列 Runx2-F:5'-CCATAACCGTCTTCACAAATCC-3',R:5'-GCGGGACACCTACTCTCATACT-3',OPN-F:5'-ACACATATGATGGCCGAGGTG-3',R:5'-GTGTGAGGTGATGTCCTCGTCTGTA-3,DSPP-F:5'-CCATTCCCACGGACTCCCA-3',R:5'-TGGCGATGCAGGTCACAAT-3',20 μL 反应体系:2×mix 10 μL,ddH₂O 7.8 μL,50 ng/μL cDNA 1 μL,(F/R)(0.6/0.6)μL。反应条件:94℃、90 s;94℃、60 s,61℃、60 s,40 个循环。2^{-ΔΔCt} 法计算 Runx2、OPN、DSPP mRNA 相对表达水平。8 个平行。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 24.0 软件对数据进行统计学分析,计量数据均采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较行 SNK-*q* 检验。*P*<0.05,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 干扰 VPS4B 对 hDPSCs VPS4B 蛋白的影响

与正常组相比,矿化组、阴性对照组 VPS4B 蛋白水平升高(*P*<0.05);分别与矿化组、阴性对照组相比,VPS4B-siRNA 组 VPS4B 蛋白水平降低(*P*<0.05)。见图 1、表 1。

2.2 干扰 VPS4B 对 hDPSCs 增殖的影响

与正常组相比,矿化组、阴性对照组、VPS4B-siRNA 组 OD₄₅₀ 水平降低(*P*<0.05);分别与矿化组、

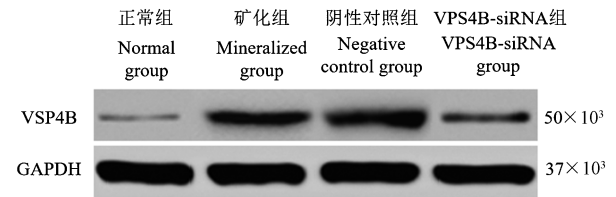


图 1 4 组细胞中 VPS4B 蛋白表达情况
Figure 1 Expression of VPS4B protein in 4 groups of cells

阴性对照组相比, VPS4B-siRNA 组 OD₄₅₀ 水平降低 ($P<0.05$)。见表 2。

2.3 干扰 VPS4B 对 hDPSCs 成牙本质分化的影响

正常组茜素红染色较浅, 面积较小。与正常组相比, 矿化组、阴性对照组、VPS4B-siRNA 组染色较深, 且面积较大, 矿化结节相对数量升高 ($P<0.05$); 分别与矿化组、阴性对照组相比, VPS4B-siRNA 组染色颜色有所减轻, 面积减少, 矿化结节相对数量降低 ($P<0.05$)。见图 2、表 3。

2.4 干扰 VPS4B 对 hDPSCs 钙化的影响

与正常组相比, 矿化组、阴性对照组钙浓度升高 ($P<0.05$); 分别与矿化组、阴性对照组相比, VPS4B-siRNA 组钙浓度降低 ($P<0.05$)。见表 4。

表 1 4 组细胞 VPS4B 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Comparison of VPS4B protein levels in 4 groups of cells

组别 Groups	VPS4B
正常组 Normal group	0.11±0.02
矿化组 Mineralized group	0.47±0.05 [#]
阴性对照组 Negative control group	0.49±0.04 [#]
VPS4B-siRNA 组 VPS4B-siRNA group	0.16±0.03 ^{*&}
<i>F</i>	237.975
<i>P</i>	0.000

注: 与正常组相比, [#] $P<0.05$; 与矿化组相比, ^{*} $P<0.05$; 与阴性对照组相比, [&] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, [#] $P<0.05$. Compared with the mineralized group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the negative control group, [&] $P<0.05$.

表 2 4 组细胞 OD₄₅₀ 比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 2 Comparison of OD₄₅₀ in 4 groups of cells

组别 Groups	OD ₄₅₀
正常组 Normal group	2.14±0.05
矿化组 Mineralized group	1.24±0.15 [#]
阴性对照组 Negative control group	1.28±0.12 [#]
VPS4B-siRNA 组 VPS4B-siRNA group	0.87±0.05 ^{*#&}
<i>F</i>	220.786
<i>P</i>	0.000

注: 与正常组相比, [#] $P<0.05$; 与矿化组相比, ^{*} $P<0.05$; 与阴性对照组相比, [&] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, [#] $P<0.05$. Compared with the mineralized group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the negative control group, [&] $P<0.05$.

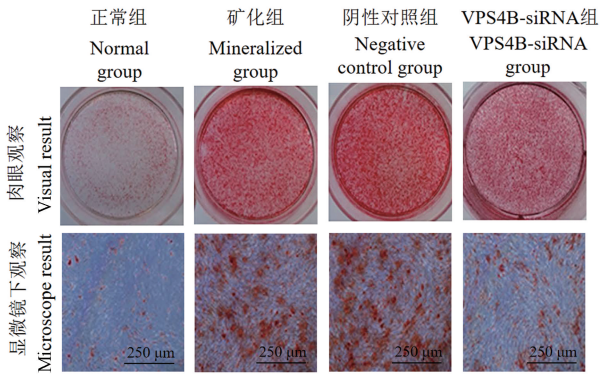


图 2 4 组细胞茜素红染色结果

Figure 2 Results of alizarin red staining in 4 groups of cells

表 3 4 组细胞矿化结节相对数量比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Comparison of relative number of mineralized nodules in 4 groups of cells

组别 Groups	矿化结节相对数量(<i>n</i>) Relative number of mineralized nodules
正常组 Normal group	13.45±3.56
矿化组 Mineralized group	73.58±6.89 [#]
阴性对照组 Negative control group	71.74±5.47 [#]
VPS4B-siRNA 组 VPS4B-siRNA group	48.98±5.18 ^{*#&}
<i>F</i>	214.482
<i>P</i>	0.000

注: 与正常组相比, [#] $P<0.05$; 与矿化组相比, ^{*} $P<0.05$; 与阴性对照组相比, [&] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, [#] $P<0.05$. Compared with the mineralized group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the negative control group, [&] $P<0.05$.

表 4 4 组细胞钙浓度比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 4 Comparison of calcium concentration in 4 groups of cells

组别 Groups	钙浓度 (mmol/L) Calcium concentration
正常组 Normal group	1.53±0.18
矿化组 Mineralized group	2.48±0.45 [#]
阴性对照组 Negative control group	2.50±0.43 [#]
VPS4B-siRNA 组 VPS4B-siRNA group	1.95±0.25 ^{*&}
<i>F</i>	14.395
<i>P</i>	0.000

注: 与正常组相比, [#] $P<0.05$; 与矿化组相比, ^{*} $P<0.05$; 与阴性对照组相比, [&] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, [#] $P<0.05$. Compared with the mineralized group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the negative control group, [&] $P<0.05$.

2.5 干扰 VPS4B 对 hDPSCs 中 Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平的影响

与正常组相比,矿化组、阴性对照组 Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平升高,VPS4B-siRNA 组 OPN、DSPP mRNA 水平升高($P<0.05$);分别与矿化组、阴性对照组相比,VPS4B-siRNA 组 Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平降低($P<0.05$)。见图 3。

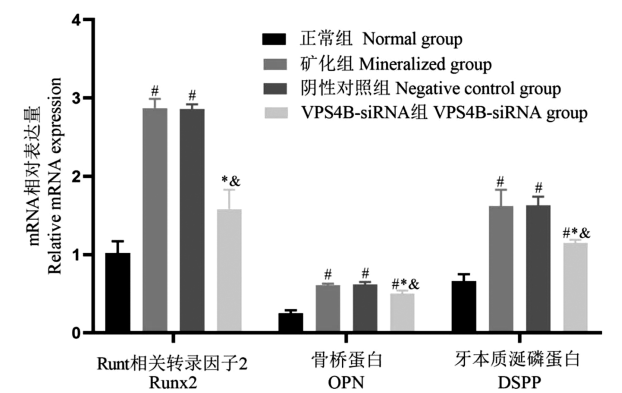
2.6 干扰 VPS4B 对 hDPSCs 中 Notch 通路蛋白的影响

与正常组相比,矿化组、阴性对照组、VPS4B-siRNA 组细胞中 NICD、Hey1 蛋白水平降低($P<0.05$);分别与矿化组、阴性对照组相比,VPS4B-siRNA 组 NICD、Hey1 蛋白水平升高($P<0.05$)。见图 4、表 5。

3 讨论

hDPSCs 具有多向分化和自我更新能力,牙髓损伤可促使 hDPSCs 迁移至受损部位定向分化,从而修复损伤,检测未分化和分化后基因表达差异对于维持 hDPSCs 定向分化具有重要意义^[8]。VPS4B 作为 AAA-ATPase 家族成员,VPS4B 的破坏可能导致某些功能改变,主要表现为改变 VPS4B 二级结构,导致其功能降低或丧失;VPS4B 基因突变已成为牙本质异常的致病基因^[9-10]。但具体机制尚不清楚,因此研究 VPS4B 在 hDPSCs 成牙本质分化的机制对于治疗疾病意义重大。本研究发现,与正常组相比,矿化组 VPS4B 蛋白水平升高;提示矿化 hDPSCs 可促进 VPS4B 蛋白的表达。与矿化组相比,VPS4B-siRNA 组 VPS4B 蛋白水平降低;说明干扰 VPS4B 后矿化 hDPSCs 细胞中蛋白水平下降,干扰成功。与正常组相比,矿化组 OD₄₅₀ 下降,矿化结节相对数量、钙浓度升高,提示矿化 hDPSCs 促进 VPS4B 表达,可抑制细胞增殖、促进成牙本质分化。与矿化组相比,VPS4B-siRNA 组茜素红染色颜色有所减轻,面积减少,OD₄₅₀、矿化结节相对数量、钙浓度降低;提示干扰 VPS4B 后进一步抑制细胞增殖、hDPSCs 成牙本质分化。

Runx2 具有多个结合位点,可以结合在靶基因的启动子上从而调控众多成骨相关的靶基因,如骨钙素、OPN 等,影响细胞分化;增强 Runx2 表达可促进 hDPSCs 分化为成牙本质细胞^[11-12]。OPN 可结合羟基磷灰石晶体从而参与钙离子信号传导过程,在初期矿化中起重要作用;DSPP 作为牙本质特异性蛋白,其水平反映 hDPSCs 成牙本质分化水



注:与正常组相比, # $P<0.05$;与矿化组相比, * $P<0.05$;与阴性对照组相比, & $P<0.05$ 。

图 3 4 组细胞 Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平比较
Note. Compared with the normal group, # $P<0.05$. Compared with the mineralized group, * $P<0.05$. Compared with the negative control group, & $P<0.05$.

Figure 3 Comparison of Runx2, OPN and DSPP mRNA levels in four groups of cells

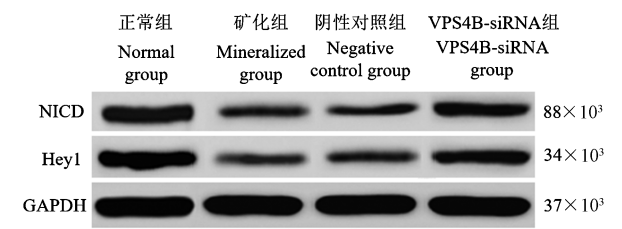


图 4 4 组细胞中 NICD、Hey1 蛋白表达情况
Figure 4 Expression of NICD and Hey1 protein in 4 groups of cells

表 5 4 组细胞 NICD、Hey1 蛋白水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 5 Comparison of NICD and Hey1 protein levels in 4 groups of cells

组别 Groups	Notch 受体释放其胞内 结构域 NICD	Hairy 相关转录 因子 1 Hey1
正常组 Normal group	0.57±0.06	0.72±0.05
矿化组 Mineralized group	0.13±0.04 [#]	0.11±0.01 [#]
阴性对照组 Negative control group	0.14±0.05 [#]	0.13±0.04 [#]
VPS4B-siRNA 组 VPS4B-siRNA group	0.46±0.05 ^{#*&}	0.43±0.05 ^{#*&}
<i>F</i>	157.386	396.856
<i>P</i>	0.000	0.000

注:与正常组相比, # $P<0.05$;与矿化组相比, * $P<0.05$;与阴性对照组相比, & $P<0.05$ 。

Note. Compared with the normal group, # $P<0.05$. Compared with the mineralized group, * $P<0.05$. Compared with the negative control group, & $P<0.05$.

平^[13-14]。本研究发现,与正常组相比,矿化组 Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平升高,提示 Runx2 促进参与矿化过程中的 OPN 和形成牙本质的相关基因水平升高,促进 hDPSCs 牙本质分化。与矿化组相比,VPS4B-siRNA 组 Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平降低,提示干扰 VPS4B 后 Runx2 水平降低,对 OPN 的促进作用减弱,导致牙本质分化相关基因如 DSPP 等水平降低,hDPSCs 牙本质分化能力减弱。

活化 Notch 信号通路可暴露出 NICD,活化的 NICD 可与 DNA 结合蛋白结合,从而活化 Notch 靶基因,Hey1 作为 Notch 靶基因可受 NICD 调控^[15-17]。Hey1 可与 DNA 蛋白结合从而发挥作用,被认为转录抑制物,可与 Runt 结构家族羧基端结合从而发挥作用^[18-19]。同时发现高表达 NICD 可直接抑制 Runx2 的表达从而抑制成骨分化^[20]。本研究发现,与正常组相比,矿化组细胞中 NICD、Hey1 蛋白水平降低,提示 hDPSCs 成牙本质分化过程中 NICD 受到抑制,调控 Hey1 的作用减弱,从而导致 Hey1 对 Runx2 的转录抑制作用减弱,促进 hDPSCs 成牙本质分化。与矿化组相比,VPS4B-siRNA 组 NICD、Hey1 蛋白水平升高,提示干扰 VPS4B 后 VPS4B 二级结构改变,而改变 ATP 的结合结构,导致 ATP 功能改变,经过一系列影响,激活 NICD, NICD 调控 Hey1 水平升高,Hey1 对 Runx2 的抑制作用加强,Runx2 水平降低调控 OPN、DSPP 能力降低,hDPSCs 分化能力降低,导致疾病发生。

综上所述,干扰 VPS4B 后可抑制 hDPSCs 牙本质分化,可能是通过激活 Notch 通路实现的。但 VPS4B 与 Notch 之间的作用结合部位尚未发现,仍需深入探究分析。

参考文献:

- [1] 罗孟亚男,赵娜,戴楠楠,等.骨髓间充质干细胞调节 Notch 表达可有效治疗放射性唾液腺损伤[J].中国组织工程研究,2019,23(25):3967-3972.
- [2] Pan Y, Lu T, Peng L, et al. Vacuolar protein sorting 4B regulates the proliferation and odontoblastic differentiation of human dental pulp stem cells through the Wnt- β -catenin signalling pathway[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 2575-2584.
- [3] Mills EA, Goldman D. The regulation of notch signaling in retinal development and regeneration[J]. Curr Pathobiol Rep, 2017, 5(4): 323-331.
- [4] Bhola NE, Jansen VM, Koch JP, et al. Correction; treatment of triple-negative breast cancer with torc1/2 inhibitors sustains a drug-resistant and notch-dependent cancer stem cell population[J]. Cancer Res, 2019, 79(4): 875-879.
- [5] 邱申彩,龙晏,陈晓燕,等.超表达 Notch 胞内结构域对人牙周膜干细胞增殖及成骨分化的影响[J].中华口腔医学杂志,2019,54(5):315-321.
- [6] 王军强,曹伟靖. CCN2 对人牙髓干细胞增殖及分化的影响[J]. 中国医药导报,2014,11(16):24-27,169.
- [7] 陈昱延,周一凡,蒋大伟,等.干扰 VPS4B 表达对肝癌细胞增殖和细胞周期的影响[J]. 南通大学学报(医学版),2016,36(1):10-13.
- [8] Zhou M, Liu NX, Shi SR, et al. Effect of tetrahedral DNA nanostructures on proliferation and osteo/odontogenic differentiation of dental pulp stem cells via activation of the notch signaling pathway[J]. Nanomedicine, 2018, 14(4):1227-1236.
- [9] Yang Q, Chen D, Xiong F, et al. A splicing mutation in VPS4B causes dentin dysplasia I[J]. J Med Genet, 2016, 53(9):624-633.
- [10] Lin HH, Li X, Chen JL, et al. Identification of an AAA ATPase VPS4B-Dependent pathway that modulates epidermal growth factor receptor abundance and signaling during hypoxia[J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(6):1124-1138.
- [11] Xin BC, Wu QS, Jin S, et al. Berberine promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells through activating EGFR-MAPK-Runx2 pathways[J]. Pathol Oncol Res, 2020, 26(3):1677-1685.
- [12] Zhan FL, Liu XY, Wang XB. The role of microRNA-143-5p in the differentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts by targeting Runx2 via the OPG/RANKL signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1):536-546.
- [13] An Y, Song Y, Wang Z, et al. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on the biological behaviors of bone marrow mesenchymal stem cells on titanium with different surface topographies[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(1):67-76.
- [14] Rahman SU, Oh JH, Cho YD, et al. Fibrous topography-potentiated canonical wnt signaling directs the odontoblastic differentiation of dental pulp-derived stem cells[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(21):17526-17541.
- [15] 李长龙,杜小燕,王冬平,等.长爪沙鼠脑缺血模型近交系的培育及其发病机制研究进展[J].中国实验动物学报,2018,26(4):512-517.
- [16] Zhang X, Qiao B, Hu Z, et al. BMP9 promotes the extracellular matrix of nucleus pulposus cells via inhibition of the Notch signaling pathway[J]. DNA Cell Biol, 2019, 38(4):358-366.
- [17] 郭彩霞,于洪涛,石红梅,等. COX-2 基因对 TGF- β 1 诱导的人胚肺成纤维细胞生长及 Notch 信号通路的影响及其作用机制[J]. 中国比较医学杂志,2019,29(3):54-59.
- [18] 薄剑波,邵志翔,蔺广荣. Yes 相关蛋白 1 和胶原三股螺旋重复蛋白 1 在三阴性乳腺癌中的表达及其与 E-钙黏蛋白表达的相关性[J]. 肿瘤研究与临床,2019,31(1):11-15.
- [19] Zeng Z, Yin X, Zhang X, et al. Cyclic stretch enhances bone morphogenetic protein-2-induced osteoblastic differentiation through the inhibition of Hey1[J]. Int J Mol Med, 2015, 36(5):1273-1281.
- [20] 王南,谭涛,林端阳,等.过表达 NICD 通过下调基因 JunB 的表达抑制 BMP9 诱导间充质干细胞 C3H10T1/2 成骨分化[J]. 重庆医科大学学报,2018,43(10):14-19.

[收稿日期]2020-04-07