

刘洋,李剑奎,沙伟君,等. 牙本质基质蛋白 1 糖基化形式在颌骨损伤中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 16-23.

Liu Y, Li JK, Sha WJ, et al. Role of proteoglycan form of dentin matrix protein 1 in jaw defects [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 16-23.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.003

牙本质基质蛋白 1 糖基化形式在颌骨损伤中的作用

刘 洋¹, 李剑奎¹, 沙伟君¹, 崔立然¹, 王 辉¹, 徐 浩², 张怀胜², 宋 波², 薛 徽^{1*}

(1. 齐齐哈尔医学院附属第一医院, 黑龙江 齐齐哈尔 161041; 2. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

【摘要】 目的 探讨牙本质基质蛋白 1 糖基化形式(proteoglycan form of dentin matrix protein 1, DMP1-PG)在下颌骨损伤中的重要作用。**方法** 分别构建对照组野生型(wild type, WT)小鼠及实验组牙本质基质蛋白 1 糖基化点突变(S89G-DMP1)小鼠下颌骨缺损模型。模型构建完成后 7 d、14 d 及 28 d 收取样本, 显微计算机断层 micro-CT 扫描, 组织切片及染色, 观察二者之间组织愈合差异; 通过免疫荧光染色, 观察成骨相关蛋白在组织损伤区的表达变化差异; 应用实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)技术, 对比实验组与对照组在术后成骨相关基因表达变化情况; 分别提取实验组与对照组颌骨髓间充质干细胞, 进行成骨诱导分化, 观察二者之间成骨分化能力差异。**结果** 同对照组相比, 实验组小鼠下颌骨损伤愈合能力明显减弱, 骨损伤区成骨相关蛋白表达减低, 术后 7 d 及 14 d 成骨相关基因表达水平较对照组明显下调。通过提取两组小鼠下颌骨髓间充质干细胞进行成骨诱导分化, 结果显示同对照组相比, 实验组小鼠骨髓间充质干细胞成骨向分化能力明显减弱。**结论** DMP1-PG 参与颌骨损伤修复, 缺乏 DMP1-PG 可导致小鼠颌骨缺损愈合延迟。

【关键词】 颌骨缺损; 蛋白聚糖; 牙本质基质蛋白 1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0016-08

Role of proteoglycan form of dentin matrix protein 1 in jaw defects

LIU Yang¹, LI Jiankui¹, SHA Weijun¹, CUI Liran¹, WANG Hui¹, XU Hao², ZHANG Huaisheng², SONG Bo², XUE Hui^{1*}

(1. the First Affiliated Hospital of Qiqihaer Medical University, Qiqihaer 161041, China.

2. Qiqihaer Medical University, Qiqihaer 161006)

【Abstract】 Objective To investigate the role of proteoglycan form of dentin matrix protein 1 (DMP1-PG) in mandibular bone injury. **Methods** We created mandibular bone defects in wild-type mice (control group) and DMP1 glycosylation point mutant (S89G-DMP1) mice (experimental group). Samples of mandibles were collected at 7, 14 and 28 days after model construction and subjected to micro-computed tomography scans, tissue sectioning, and hematoxylin eosin and toluidine blue staining to compare defect healing between the two groups. We also examined differences in the expression of osteogenesis-related proteins in the injured areas by immunofluorescence staining, and compared osteogenesis-related gene expression levels between the experimental and control groups post-surgery using real-time quantitative polymerase chain reaction. Mandibular bone marrow mesenchymal stem cells were extracted from both groups and their osteogenic differentiation abilities were compared. **Results** Mandibular injury healing was significantly reduced in the experimental compared with the control mice, and expression levels of osteogenesis-related proteins in the bone-injury area

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金资助项目(LH2020H128); 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(2019-KYYWF-1218)。

[作者简介] 刘洋(1981—), 女, 硕士, 研究方向: 颌骨创伤及牙周损伤。E-mail: liuyang811001@126.com

[通信作者] 薛徽(1982—), 男, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 牙发育, 骨损伤及骨修复。E-mail: xuehui820512@126.com

were decreased. In addition, the osteogenic differentiation ability of bone marrow mesenchymal stem cells from the experimental group was significantly weaker than that of cells from the control group. **Conclusions** DMP1-PG is involved in the repair of jaw injury, and lack of DMP1-PG can lead to delayed healing of jaw defects in mice.

【Keywords】 jaw defect; proteoglycan; dentin matrix protein 1

颌骨损伤是口腔颌面外科与创伤外科的常见病与多发病,常因直接暴力,间接暴力,肿瘤,炎症及医源性损伤等引起^[1]。颌骨损伤后主要表现为开口受限,咬合关系错乱,面部肿胀等临床特征,因其特殊解剖位置及功能特点,颌骨缺损修复过程近年来备受关注^[2-3],如何快速、安全、有效治疗口腔颌面部损伤,促进缺损区新骨形成已成为目前亟待解决的科学问题。骨损伤发生后,骨组织内血管断裂,血小板、纤维蛋白及大量红细胞自血管内释放,在损伤区激活凝血系统进而形成血肿^[4],与此同时,中性粒细胞,巨噬细胞及淋巴细胞等炎症细胞迅速募集至骨损伤区,吞噬组织碎片及病原体,释放大量的趋化因子及炎症因子^[5-6]。来自骨膜及骨髓腔内的间充质干细胞在多种炎症因子的刺激下,迅速聚集至骨损伤区并向成骨细胞、成软骨细胞及成纤维细胞分化,进而形成骨痂,最终骨痂在成骨细胞及破骨细胞的共同作用下被板层状骨取代,骨损伤修复完成^[7]。

骨痂在骨组织损伤修复过程中具有维持组织形态、调控损伤区初期稳定性及提供基质矿化空间等重要作用。蛋白聚糖是构成骨痂的重要组成部分之一,能够有效维持骨痂机械强度,并为损伤组织提供保护性屏障。DMP1-PG 是一类新发现的蛋白聚糖,通过对骨损伤样本进行高通量测序,我们发现其与骨损伤修复关系密切。DMP1 是在牙本质 cDNA 克隆过程中发现的一类酸性细胞外基质蛋白, DMP1-PG 是其糖基化形式^[8]。DMP1-PG 在软骨基质及骨基质中呈高表达, DMP1-PG 缺失后,四肢长骨发育呈现老龄化骨病特征,此外颌骨及颅骨发育异常,表现为颞下颌关节过度磨损及颅骨颅缝早闭特征。然而 DMP1-PG 在颌面部骨组织中的损伤修复作用暂无相关研究及报道。

前期研究过程中,通过构建颌骨骨缺损模型,我们发现 DMP1-PG 在野生型小鼠颌骨缺损修复组织中大量表达,为进一步探讨 DMP1-PG 在颌骨缺损修复中的作用,我们构建 DMP1-PG 点突变(S89G-DMP1)小鼠,通过对比二者在颌骨创伤修复中的差异,探究 DMP1-PG 对小鼠颌骨损伤修复的影响及相关作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验组 S89G-DMP1 小鼠, SPF 级, 雄性, 8 周龄 30 只, 体重 24~26 g, 由上海同济大学口腔医学院孙瑶教授课题组设计, 辽宁长生生物技术股份有限公司[SCXK(辽)2020-001]培育, 对照组 WT 小鼠为 C57BL/6J 品系, SPF 级, 雄性, 8 周龄 30 只, 体重 24~26 g, 购于辽宁长生生物技术股份有限公司[SCXK(辽)2020-001], 在齐齐哈尔医学院实验动物中心屏障环境[SYXK(黑)2021-013]饲养, 上述实验动物饲养给与 12 h 无光/12 h 人工光照饲养环境, 饲养温度 22℃~25℃, 自由进食与饮水。所有动物相关实验方案均经齐齐哈尔医学院伦理委员会批准(QMU-AECC-2021-56)。所有实验设计及操作均符合动物实验学“3R”原则。

1.2 主要试剂与仪器

HE 染液(上海生工生物工程有限公司, 批号 E607318); 甲苯胺蓝染液(上海生工生物工程有限公司, 批号 A600962); TRIzol 试剂盒(Invitrogen 公司, 批号 15596018); anti-DMP1-C 及 anti-DMP1-N(爱玛特医药科技上海有限公司); anti-ALP(Abcam 公司, 批号 ab224355); anti-RUNX2(Abcam 公司, 批号 ab76956); 反转录试剂盒(TaKaRa 公司, 批号 PR036A)。

实时荧光定量 PCR 仪(Lightcycler 96); Bio-Rad PCR 仪(C1000 Touch); 石蜡切片机(Thermo, HM325); 倒置荧光显微镜(尼康, TS2R); 显微计算机断层 micro-CT 机(SCANCO, Switzerland)。

1.3 实验方法

1.3.1 S89G-DMP1 小鼠的构建

根据野生型小鼠(C57BL/6J)全基因组序列, 构建所有 DMP1 蛋白糖基化位点外显子上、下游 6.6 kb 及 8.2 kb 基因序列同源重组臂, 在 DMP1 第 6 外显子下游 179 bp 敲入 Neo 阳性序列, 质粒构建完成后, 通过电转技术, 将质粒转入小鼠胚胎干细胞, 后将 3 个阳性克隆移植入 Balb/c 假孕小鼠子宫内。已获得 5 个嵌合体的雄性小鼠与野生型小鼠(C57BL/6J)杂交, 获取 F1 代小鼠。通过杂交获得

的雄性小鼠与 B6.129S4-Gt (ROSA) 26-*Sortm1* (FLP1) *Dym*/Rain J 雌性小鼠杂交,确定移除 Neo 序列,通过基因型鉴定确定 Neo 移除序列的子代小鼠。经鉴定获得的 S89G-DMP1 小鼠在实验使用时均须经过基因型鉴定。

1.3.2 下颌骨缺损模型构建

根据相关文献^[9]建立下颌骨缺损模型。选用 8 周龄雄性 WT 小鼠及 S89G-DMP1 小鼠,作为实验对象。腹腔注射戊巴比妥钠(剂量:50 mg/kg,浓度:0.3%),麻醉显效后,将右侧下颌骨表面皮肤备皮并充分消毒,切开下颌表面皮肤,钝性分离咬肌,暴露下颌骨,使用牙科涡轮机在下颌骨体部构建直径 1.2 mm 的缺损洞形,该缺损洞形需穿通下颌骨。洞形制备完成后生理盐水局部冲洗,分层缝合咬肌与表面皮肤。术中需注意保护下颌骨骨膜,避免因人为手术因素造成二组之间的差异。术后 3 d 内腹腔注射镇痛药及抗生素。

1.3.3 Micro-CT 扫描

颌骨损伤模型构建完成后 14 d 及 28 d 收取样本,选择合适管径的扫描管,扫描精度选取 10 μ m,扫描功率 14 W,扫描电流 200 μ A,扫描电压 70 kV。

1.3.4 样本脱钙,包埋,HE,甲苯胺蓝染色及免疫荧光染色

颌骨损伤模型构建后 7 d、14 d 及 28 d 收取组织样本,将下颌骨置于 4℃ 浓度为 4% 的多聚甲醛溶液中 24 h 后,放入 10% 乙二胺四乙酸溶液中脱钙 14 d。样本脱钙完成后置入自动样本脱水仪脱水、浸蜡,组织包埋机包埋后切片,切片厚度为 4 μ m。根据 HE 及甲苯胺蓝试剂盒要求进行相应染色,中性树胶封片,显微镜拍照。

石蜡切片水化后,透明质酸抗原修复,山羊血清封闭处理。将组织切片与以下一抗: anti-ALP (1:500), anti-RUNX2 (1:500), anti-DMP1-N (1:500), anti-DMP1-C (1:500) 进行共同孵育并 4℃ 过夜, PBS 溶液洗涤三次后与荧光二抗 Alexa Fluor 546 IgG (1:1000) 室温孵育 1 h,使用 DAPI 进行细胞核复染,荧光显微镜下观察、拍照。

1.3.5 RT-qPCR 检测

下颌骨缺损模型构建完成后 7 d 及 14 d 收取样本,将样本放入含 1 mL TRIzol (Invitrogen) 溶液的 EP 管中,根据试剂盒要求提取损伤样本 RNA,紫外分光光度仪测量 RNA 浓度,使用 TaKaRa 逆转录

试剂盒 20 μ L 体系将 RNA 逆转录为 cDNA。根据 RT-qPCR 试剂盒使用说明书配置 10 μ L 扩增体系,分析靶基因 mRNA 表达水平,引物序列见表 1。

1.3.6 细胞培养与 ALP 染色

选取 8 周龄 WT 小鼠及 S89G-DMP1 小鼠,提取下颌骨骨髓间充质干细胞 (mandible bone marrow stromal cells, mBMSCs)。充分麻醉诱导后,将小鼠下颌骨分离,剪碎,反复冲洗,1200 r/min 离心 5 min 后,将上清液及碎骨片吸出,用含有 α -MEM, 10% 胎牛血清及 1% 青霉素/链霉素的普通培养基再次离心重悬,置于培养皿中培养,当细胞密度达到 80% 以上时进行传代。P3 代后,将细胞置于含有 β -甘油磷酸钠的成骨诱导培养基中成骨诱导 21 d,根据 ALP 试剂盒使用说明对其进行 ALP 染色,显微镜拍照。

1.4 统计学方法

所有实验样本应用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计学分析并绘制条形图,计量资料通过平均数 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 表示,使用 *t* 检验进行两组间数据比较分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

基因 Genes	引物序列 (5'-3') Primer sequences
<i>Dmp1</i> -F	AGTGAGTCATCAGAAGAAAGTCAAGC
<i>Dmp1</i> -R	CTATACTGGCCTCTGTCTGCTAGCC
<i>Opn</i> -F	GATCAGGACAACAACGGAAGG
<i>Opn</i> -R	GCTGGCTTTTGGAACTTGCTT
<i>Ocn</i> -F	GAGGACCATCTTTCTGCTCACTCT
<i>Ocn</i> -R	TTATTGCCCTCTGCTTGGA
<i>Alp</i> -F	GATCATTTCCACGTTTTTCACATT
<i>Alp</i> -R	TTCACCGTCCACCACCTTGT
<i>Opg</i> -F	CCAAGAGCCCAGTGTTTCTT
<i>Opg</i> -R	CCAAGCCAGCCATTGTTAAT
<i>Acan</i> -F	CGCCACTTTCATGACCGAGA
<i>Acan</i> -R	TCATTTCAGACCGATCCACTGGTAG
<i>Bgn</i> -F	CCTGAGACCCTGAACGAAC
<i>Bgn</i> -R	GTGACCTAAGCCCAACCTGT
<i>Dcn</i> -F	TGAGCTTCAACAGCATCACC
<i>Dcn</i> -R	AAGTCATTTTGCCCAACTGC
<i>Vcan</i> -F	TGAGCTTCAACAGCATCACC
<i>Vcan</i> -R	ATAGAATTGCTCTTTGCGGATGAGG

2 结果

2.1 DMP1-PG 在下颌骨损伤区的表达

DMP1-PG 为 DMP1 糖基化形式,即 DMP1-N 端通过共价键与糖胺聚糖链连接,通过对组织样本进行 DMP1-N 抗体免疫荧光染色,可观察 DMP1-PG 在组织中的表达。首先构建 WT 小鼠下颌骨骨缺损模型,在术后 14 d 收取样本,通过对骨缺损样本进行免疫荧光染色,研究发现 DMP1-PG 在缺损组织内及缺损周围骨组织间大量表达。骨缺损后 14 d,提取缺损组织范围内 RNA,结果显示同未损伤区下颌骨相比,*Dmp1* 基因表达显著上调,上述结果表明 DMP1-PG 可能在颌骨缺损修复过程中发挥重要的作用,见图 1。

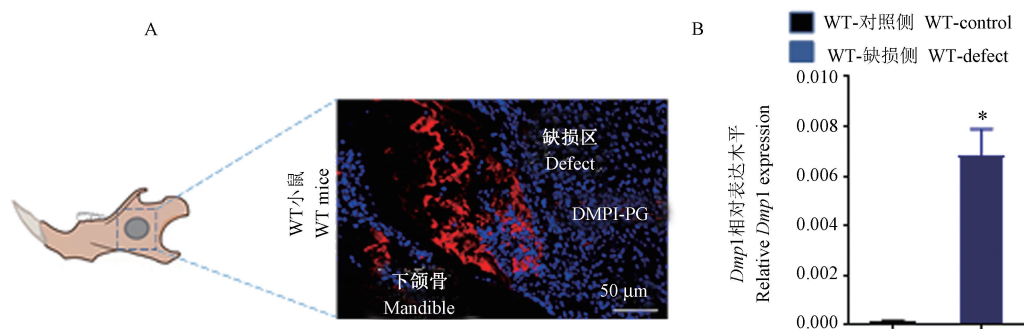
2.2 S89G-DMP1 小鼠基因型鉴定

S89G-DMP1 小鼠构建完成后进行基因型鉴定,组织样本凝胶电泳结果显示 DMP1-Neo 为 260 bp 条带,DMP1-WT 为 250 bp 条带,WT 小鼠显示为

DMP1-WT 250 bp 单条带,S89G-DMP1 小鼠纯合子显示为 DMP1-Neo 260 bp 单条带,S89G-DMP1 小鼠杂合子显示为 260 bp 与 250 bp 双条带。根据实验结果,6 号小鼠为 S89G-DMP1 阳性对照,1~5 号小鼠为 S89G-DMP1 纯合子,见图 2。

2.3 DMP1-PG 缺失抑制下颌骨损伤修复

为进一步探究 DMP1-PG 在颌骨损伤中的作用,课题组同时构建 WT 小鼠及 S89G-DMP1 小鼠颌骨缺损模型,在术后 7 d、14 d 及 28 d 收取样本,进行组织学染色。结果显示,颌骨缺损后 7 d,WT 小鼠及 S89G-DMP1 小鼠骨缺损区域内均未见明显骨组织生成,损伤区内可见大量纤维样结构。术后 14 d,WT 小鼠颌骨缺损区内可见部分点、片状骨小梁生成,相较于 WT 小鼠,S89G-DMP1 小鼠损伤区骨组织生成能力明显减弱,损伤区仅可见极少数量的新生骨小梁,新生骨组织细小、散在的分布于颌骨缺损区;颌骨缺损后 28 d,WT 小鼠颌骨缺损区内可见大量新生骨组织,主要为骨小梁样结构,新生骨



注:A:DMP1-PG 在 WT 小鼠下颌骨缺损区表达情况。B:*Dmp1* 基因在 WT 小鼠下颌骨缺损后 14 d 表达变化差异。与对照侧比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 DMP1-PG 在下颌骨损伤区大量表达

Note. A, Expression of DMP1-PG in the mandibular defect area of WT mice. B, *Dmp1* gene expression difference in WT mice after mandibular defect 14 days. Compared with WT-control mice, * $P < 0.05$.

Figure 1 DMP1-PG is abundantly expressed in the mandibular injury area

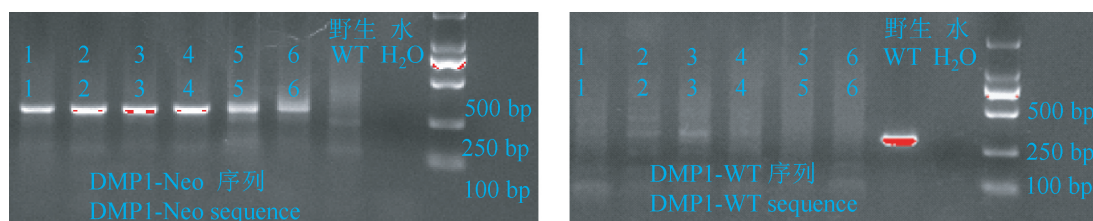


图 2 S89G-DMP1 小鼠基因型鉴定

Figure 2 Genotypic identification of S89G-DMP1 mice

组织已完整覆盖缺损区,与周围组织无明显界限,骨小梁结构成熟,HE 染色显示新生骨小梁无明显淡染,与正常下颌骨组织染色无明显差异。同 WT 小鼠相比,S89G-DMP1 小鼠在颌骨损伤后 28 d 尚不能完成有效损伤修复,缺损区内新生骨小梁数量较术后 14 d 略增加,但仍明显少于 WT 小鼠,骨小梁不能完整覆盖缺损组织,新生骨组织主要表现为类骨质样结构,HE 染色表现为明显的淡染状态。术后 14 d 及 28 d 收取样本,进行 Micro-CT 扫描,结果显示,WT 小鼠颌骨缺损区内新生骨组织量显著高于 S89G-DMP1 小鼠,见图 3。

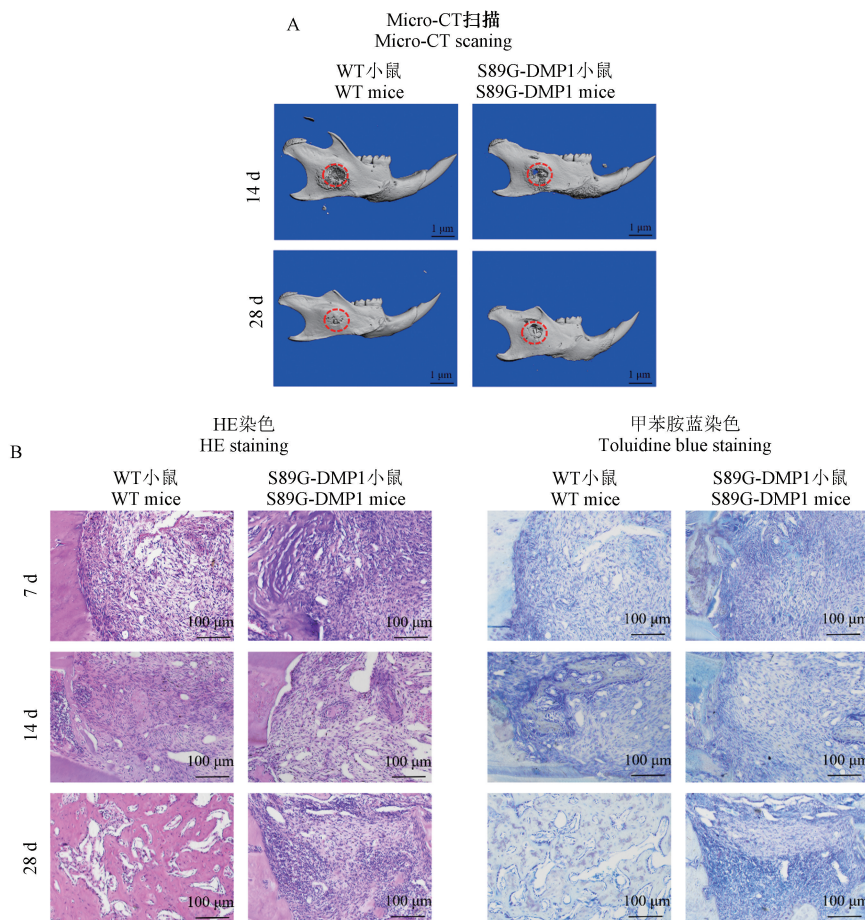
2.4 DMP1-PG 缺失抑制成骨蛋白表达

通过使用免疫荧光染色技术,观察 DMP1-PG 缺失后对小鼠颌骨缺损区成骨相关蛋白表达的影响。

结果显示,下颌骨损伤后 14 d,成骨相关蛋白 DMP1-C,ALP 及 RUNX2 在 WT 小鼠颌骨缺损区表达量较高,表现为染色较深的红染区,主要分布于新生骨小梁周围区域。在 S89G-DMP1 小鼠颌骨损伤区,上述蛋白表达量明显减低,尤其在 ALP 蛋白表达方面,S89G-DMP1 小鼠仅呈现极个别散在点样红染。上述结果进一步证实 DMP1-PG 缺失后,成骨相关蛋白在骨损伤区生成明显减弱,见图 4。

2.5 DMP1-PG 缺失抑制小鼠成骨相关因子表达

为进一步探究 DMP1-PG 影响颌骨损伤修复的相关机制,应用 RT-qPCR 技术对比观察颌骨损伤后 7 d 及 14 d 成骨相关基因及蛋白聚糖生成相关基因表达变化情况。结果显示术后 7 d,WT 小鼠与蛋白



注:A:术后 14 d 及 28 d Micro-CT 扫描;B:WT 小鼠及 S89G-DMP1 小鼠在下颌骨缺损后 7 d、14 d 及 28 d 组织学切片 HE 染色及甲苯胺蓝染色。

图 3 WT 小鼠及 S89G-DMP1 小鼠下颌骨缺损组织学及影像学差异

Note. A, Micro-CT scans at 14 d and 28 d post-operation. B, HE staining and toluidine blue staining of histological sections of WT mice and S89G-DMP1 mice at 7 d, 14 d and 28 d after mandibular defect.

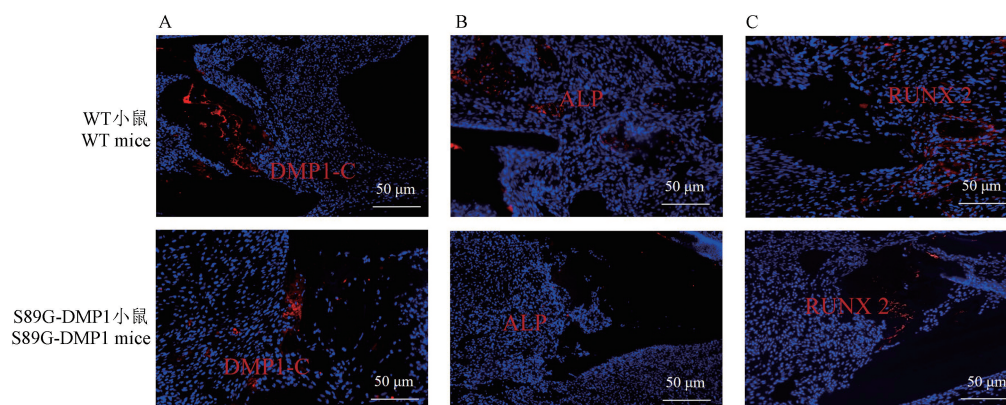
Figure 3 Histological and iconography differences of mandibular defects in WT mice and S89G-DMP1 mice

聚糖生成相关基因 (*Acan*、*Bgn*、*Dcn* 及 *Vcan*) 及骨生成相关基因 (*Alp*、*Ocn*、*Opn* 及 *Runx2*) 显著高于 S89G-DMP1 小鼠, $P < 0.05$, 差异具有统计学意义。术后 14 d, *Dcn*、*Alp*、*Ocn* 及 *Opn* 在 WT 小鼠缺损骨组织内表达量高于 S89G-DMP1 小鼠, $P < 0.05$, 差异具有统计学意义, 见图 5。

2.6 DMP1-PG 缺失抑制骨髓间充质干细胞分化

骨髓间充质干细胞在骨损伤修复过程中发挥

重要的作用, 通过提取下颌骨来源的 BMSCs, 观察 DMP1-PG 缺失后对其成骨分化能力的影响。ALP 染色显示 DMP1-PG 缺失后 BMSCs 成骨活性降低。此外, 来源于 S89G-DMP1 小鼠 mBMSCs 培养聚集物的成骨及蛋白聚糖相关的 mRNA 表达水平较 WT 小鼠表达明显降低。S89G-DMP1 小鼠 BMSCs 异常的成骨能力进一步证实了 DMP1-PG 在调节颌骨缺损愈合中的重要作用, 见图 6。

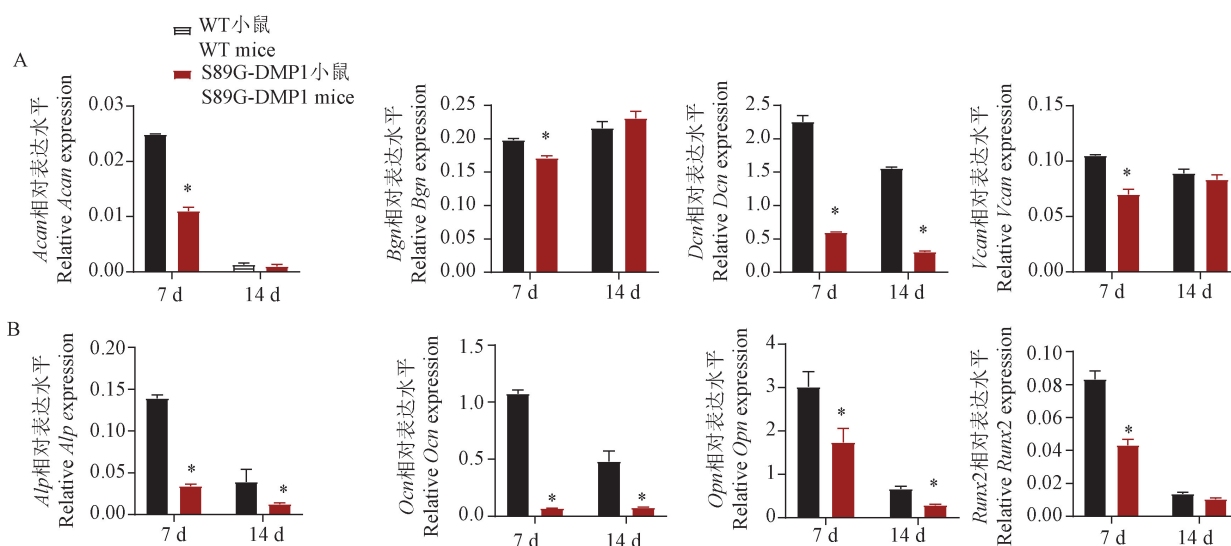


注: A: DMP1-C 端免疫荧光染色; B: ALP 免疫荧光染色; C: RUNX 2 免疫荧光染色。

图 4 成骨相关蛋白在下颌骨缺损区免疫荧光染色

Note. A, DMP1-C-terminal immunofluorescence staining. B, ALP immunofluorescence staining. C, RUNX 2 immunofluorescence staining.

Figure 4 Immunofluorescence staining of osteogenesis-related proteins in the mandibular defect area

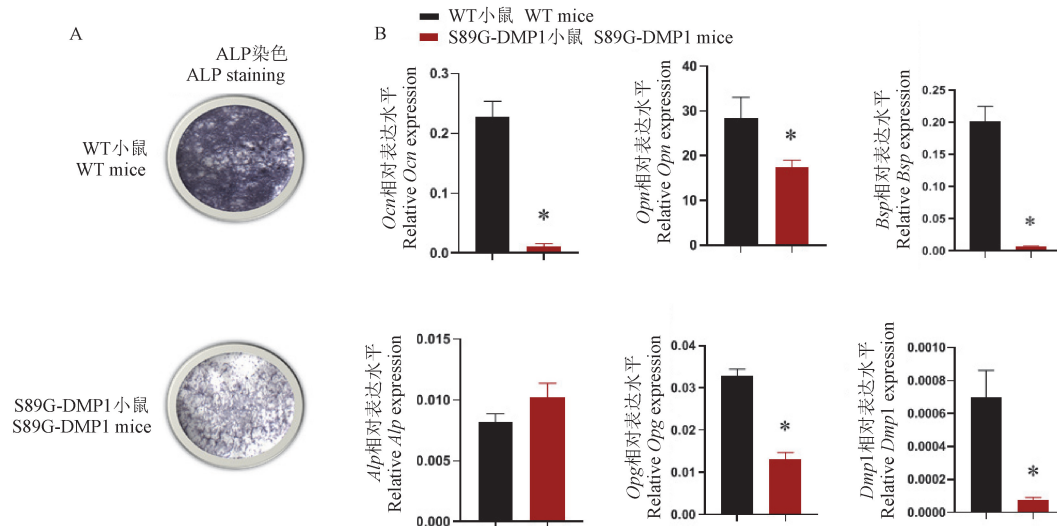


注: A: 蛋白聚糖生成相关基因在 WT 小鼠及 S89G-DMP1 小鼠下颌缺损后 7 d 及 14 d 表达变化差异; B: 成骨相关基因在 WT 小鼠及 S89G-DMP1 小鼠下颌缺损后 7 d 及 14 d 表达变化差异。与 WT 小鼠比较, $*P < 0.05$ 。

图 5 WT 小鼠及 S89G-DMP1 小鼠下颌骨缺损后相关基因表达变化

Note. A, Expression changes of proteoglycan-related genes in WT mice and S89G-DMP1 mice after mandibular defect at 7 d and 14 d. B, Osteogenesis-related genes in WT mice and S89G-DMP1 mice at 7 d and 14 d after mandibular defect. Compared with WT mice, $*P < 0.05$.

Figure 5 Changes in the expression levels of related genes after mandibular defect in WT mice and S89G-DMP1 mice



注:A:WT小鼠及S89G-DMP1小鼠下颌骨髓间充质干细胞成骨诱导后ALP染色;B:二组骨髓间充质干细胞成骨诱导后相关基因表达差异。与WT小鼠比较,* $P<0.05$ 。

图6 DMP1-PG缺失后骨髓间充质干细胞成骨能力下降

Note. A, ALP staining of mBMSCs osteogenic induction of WT mice and S89G-DMP1 mice. B, Differences in the expression levels of related genes after osteogenic induction of mBMSCs between the two groups. Compared with WT mice, * $P<0.05$.

Figure 6 Decreased osteogenic ability of bone marrow mesenchymal stem cells after DMP1-PG deletion

3 讨论

因多种原因导致的颌骨缺损,不仅对患者的语言、咀嚼及吞咽等功能造成影响,同时也给患者造成极大的心理及社会适应障碍。颌骨缺损发生后,血肿即刻形成同时伴有炎症细胞浸润,体内间充质干细胞向成纤维细胞、成软骨细胞及成骨细胞分化,形成软骨及硬骨骨痂,最终完成骨组织再生过程^[10]。在这一过程中,骨组织细胞外基质成分发挥重要的作用,包括在愈合过程中提供支撑结构,调控成骨细胞行为及功能等^[11]。蛋白聚糖是细胞外基质的重要组成部分之一,尽管其在细胞外基质中含量较低,但其参与多种细胞组织活动,包括维持骨矿化基质强度,充填组织细胞间隙,粘附生长因子,调控基质矿化及骨损伤修复^[12-14]。

DMP1是最初在牙本质中被发现的酸性蛋白,在随后的相关研究中,人们发现其不仅在牙本质中表达,在其他组织包括皮肤、肌肉、乳腺、脑组织及骨组织^[15]中均有表达,尤其在骨组织中呈高表达,表达量明显高于牙本质。DMP1在体内以四种形式存在:DMP1全长片段及水解后产物DMP1-C端,DMP1-N端,DMP1-N端尚可以通过共价键与糖胺聚糖链连接,形成DMP1糖基化形式,即DMP1-PG。作为一类新发现的蛋白聚糖,DMP1-PG在肌肉组

织^[16]、骨组织矿化前沿及软骨基质中大量表达^[17]。相关研究表明,DMP1-PG缺失可导致小鼠骨脆性增加,骨组织过度衰老。

在前期研究中,我们发现DMP1-PG在颌骨骨缺损修复组织内及周围大量表达,Dmp1基因表达水平在损伤修复过程中显著上调,上述结果表明DMP1-PG参与颌骨损伤修复过程。为进一步探究DMP1-PG调控颌骨损伤修复的重要意义及机制,课题组构建WT小鼠及DMP1-PG点突变(S89G-DMP1)小鼠下颌骨骨缺损模型,该缺损模型为稳定的颌骨膜内成骨模型。通过对二组小鼠颌骨损伤后7 d、14 d及28 d样本进行组织切片、染色,研究发现,DMP1-PG缺失后,小鼠成骨能力明显减弱,WT小鼠在建模后28 d,新生骨组织几乎完全覆盖缺损区,而S89G-DMP1小鼠仅表现为部分骨组织修复,修复周期明显延长。上述结果表明DMP1-PG在颌骨损伤修复过程中发挥重要的调控作用。利用RT-qPCR技术,我们检测颌骨损伤修复过程中成骨相关基因表达变化,结果显示损伤后7 d及14 d,S89G-DMP1小鼠成骨相关基因表达均明显低于对照组WT小鼠,颌骨修复过程中,除成骨相关基因在DMP1-PG缺失后发生变化,与蛋白聚糖生成相关基因同样出现表达减低趋势,这种趋势在损伤修复早期表现更加明显。上述结果表明,DMP1-PG缺失后

不仅影响骨组织生成,同样参与调控其他类型与损伤修复密切相关的蛋白聚糖的合成。

相关研究表明,骨髓来源的间充质干细胞具有较强的修复骨组织缺损的能力^[18-20]。间充质干细胞在骨损伤修复过程中可直接向成骨细胞分化,同时可调控组织修复过程中的免疫活动,促进血管生成及其他类型细胞向损伤区募集^[21]。本次研究中,我们提取两组小鼠下颌骨骨髓间充质干细胞并进行成骨诱导,ALP 染色可见 S89G-DMP1 小鼠来源的间充质干细胞成骨能力显著低于 WT 小鼠,此外,成骨相关基因及蛋白聚糖合成相关基因表达同样显著低于对照组。上述结果表明,在细胞水平,DMP1-PG 可能参与调控干细胞分化能力,进而调控骨组织损伤修复过程。

综上所述,DMP1-PG 作为一类新发现的蛋白聚糖,在颌骨组织损伤修复过程中发挥重要的正向调控作用,其机制可能与干细胞分化及蛋白聚糖合成有关,本研究为治疗颌骨损伤修复提供新的研究方向及治疗靶点。

参考文献:

- [1] 王亚楠,吴旋,贾婷婷,等. 2 型糖尿病对小鼠下颌骨骨再生及辅助性 T 细胞 17、调节性 T 细胞相关因子表达的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2021, 39(6): 642-650.
- [2] 黄佳倩,马国武. 他汀类药物在颌骨缺损再生中的骨代谢及免疫调控研究进展[J]. 口腔医学研究, 2021, 37(7): 592-594.
- [3] 熊学鹏,赵怡芳. 上颌骨缺损修复后的功能与形态评估[J]. 中国实用口腔科杂志, 2021, 14(5): 536-540.
- [4] Sivaraj KK, Majev PG, Jeong HW, et al. Mesenchymal stromal cell-derived septoclasts resorb cartilage during developmental ossification and fracture healing [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 571.
- [5] Knox AM, McGuire AC, Natoli RM, et al. Methodology, selection, and integration of fracture healing assessments in mice [J]. J Orthop Res, 2021, 39(11): 2295-2309.
- [6] Lukač N, Katavić V, Novak S, et al. What do we know about bone morphogenetic proteins and osteochondroprogenitors in inflammatory conditions? [J]. Bone, 2020, 137: 115403.
- [7] 薛徽,孙瑶. 影响骨折愈合的生物因素研究新进展[J]. 口腔医学, 2018, 38(11): 1043-1047.
- [8] 孙瑶. 骨基质酸性蛋白 DMP1 在骨发育中的作用[J]. 口腔颌面外科杂志, 2014, 24(2): 85-89.
- [9] Wong SA, Hu DP, Slocum J, et al. Chondrocyte-to-osteoblast transformation in mandibular fracture repair [J]. J Orthop Res, 2021, 39(8): 1622-1632.
- [10] Hixon KR, Miller AN. Animal models of impaired long bone healing and tissue engineering- and cell-based *in vivo* interventions [J]. J Orthop Res, 2022, 40(4): 767-778.
- [11] Lu X, Li W, Fukumoto S, et al. The ameloblastin extracellular matrix molecule enhances bone fracture resistance and promotes rapid bone fracture healing [J]. Matrix Biol, 2016, 52-54: 113-126.
- [12] Xue H, Tao D, Weng Y, et al. Glycosylation of dentin matrix protein 1 is critical for fracture healing via promoting chondrogenesis [J]. Front Med, 2019, 13(5): 575-589.
- [13] Weng Y, Liu Y, Du H, et al. Glycosylation of DMP1 is essential for chondrogenesis of condylar cartilage [J]. J Dent Res, 2017, 96(13): 1535-1545.
- [14] Gao Y, Liu S, Huang J, et al. The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 648459.
- [15] Jing B, Zhang C, Liu X, et al. Glycosylation of dentin matrix protein 1 is a novel key element for astrocyte maturation and BBB integrity [J]. Protein Cell, 2018, 9(3): 298-309.
- [16] 周梦琪,范琪琪,孙瑶. 牙本质基质蛋白 1 糖基化修饰对小鼠骨骼肌损伤修复的影响[J]. 同济大学学报(医学版), 2020, 41(2): 198-204.
- [17] Sun Y, Weng Y, Zhang C, et al. Glycosylation of dentin matrix protein 1 is critical for osteogenesis [J]. Sci Rep, 2015, 5: 17518.
- [18] Aghali A. Craniofacial bone tissue engineering: current approaches and potential therapy [J]. Cells, 2021, 10(11): 2993.
- [19] Liang W, Han B, Hai Y, et al. Mechanism of action of mesenchymal stem cell-derived exosomes in the intervertebral disc degeneration treatment and bone repair and regeneration [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 833840.
- [20] Shin RL, Lee CW, Shen OY, et al. The crosstalk between mesenchymal stem cells and macrophages in bone regeneration: a systematic review [J]. Stem Cells Int, 2021, 2021: 8835156.
- [21] Oryan A, Kamali A, Moshiri A, et al. Role of mesenchymal stem cells in bone regenerative medicine: what is the evidence? [J]. Cells Tissues Organs, 2017, 204(2): 59-83.

[收稿日期]2022-03-24