

生物活性玻璃45S5通过细胞自噬促进根尖牙乳头细胞成牙本质方向分化

刘炜林 苏灿 崔彩云

滨州医学院附属医院牙体牙髓科, 滨州 256600

[摘要] **目的** 45S5促进根尖牙乳头细胞(APCs)成牙本质方向分化作用机制仍不明确,本研究旨在探讨细胞自噬参与生物活性玻璃45S5促进APCs成牙本质方向分化的作用。**方法** 体外分离培养APCs,流式细胞术鉴定细胞组织来源。配置1 mg/mL 45S5浸提培养液,检测pH和离子浓度。实验分为对照组、45S5组和3-甲基腺嘌呤(3-MA) 45S5组,45S5组为1 mg/mL 45S5诱导培养APCs,3-MA 45S5组为1 mg/mL 45S5中加入自噬抑制剂(3-MA)。免疫印迹法(Western blot)检测各组诱导培养24 h后自噬相关蛋白微管相关蛋白1轻链3 β (LC3B)和P62的表达,实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测诱导培养7 d后骨涎蛋白(BSP)、Runt相关转录因子2(Runx2)、牙本质涎磷蛋白(DSPP)和牙本质基质蛋白-1(DMP-1)的表达,细胞碱性磷酸酶(ALP)染色分析诱导培养7 d细胞ALP活性,茜素红染色分析诱导培养21 d矿化结节形成。**结果** 45S5浸提培养液的pH为 8.65 ± 0.01 ,与对照组差异无统计学意义($P>0.05$);45S5诱导培养液的硅离子浓度为 (1.56 ± 0.07) mmol/L,高于对照组 (0.08 ± 0.01) mmol/L($P<0.05$);45S5浸提培养液的钙离子浓度为 (1.57 ± 0.15) mmol/L,与对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。Western blot结果显示,与对照组相比,45S5组LC3B-II/I比值升高、P62表达降低($P<0.05$);与45S5组相比,3-MA 45S5组LC3B-II/I比值降低、P62表达升高($P<0.05$)。RT-qPCR结果显示,与对照组相比,45S5组BSP、Runx2、DMP-1和DSPP表达增加;与45S5组相比,3-MA 45S5组BSP、Runx2、DMP-1和DSPP表达降低($P<0.05$)。ALP染色和茜素红染色分析结果显示,与对照组相比,45S5组ALP活性增强,矿化结节形成增多;与45S5组相比,3-MA 45S5组ALP活性降低,矿化结节形成减少。**结论** 1 mg/mL 45S5体外通过细胞自噬促进APCs成牙本质方向分化。

[关键词] 成牙本质分化; 根尖牙乳头细胞; 自噬; 生物活性玻璃45S5

[中图分类号] Q254 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2025.2024177



本文链接

开放科学标识码

Bioactive glass 45S5 promotes odontogenic differentiation of apical papilla cells through autophagy

Liu Weilin, Su Can, Cui Caiyun

Dept. of Cariology and Endodontics, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600, China

Supported by: Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2019PH083)

Correspondence: Cui Caiyun, E-mail: cuicaiyun1987@163.com

[Abstract] **Objective** The mechanism of the odontogenic differentiation of apical papillary cells (APCs) stimulated by bioactive glass 45S5 is still unclear. This study aims to investigate the effect of autophagy on the odontogenic differentiation of APCs stimulated by bioactive glass 45S5. **Methods** APCs were isolated and cultured *in vitro*, and the cell origin was identified by flow cytometry. The culture medium was prepared with 1 mg/mL 45S5, and its pH and ion concentration were determined. The experiments were divided into control, 45S5, and 3-methyladenine (3-MA) 45S5 groups. In the 45S5 group, APCs were induced to culture with 1 mg/mL 45S5. In the 3-MA 45S5 group, the autophagy inhibitor 3-MA was added to 1 mg/mL 45S5. Protein

concentration were determined. The experiments were divided into control, 45S5, and 3-methyladenine (3-MA) 45S5 groups. In the 45S5 group, APCs were induced to culture with 1 mg/mL 45S5. In the 3-MA 45S5 group, the autophagy inhibitor 3-MA was added to 1 mg/mL 45S5. Protein

[收稿日期] 2024-05-06; **[修回日期]** 2024-08-25

[基金项目] 山东省自然科学基金(ZR2019PH083)

[第一作者] 刘炜林, 硕士, E-mail: 1275251026@qq.com

[通信作者] 崔彩云, 主治医师, 博士, E-mail: cuicaiyun1987@163.com

immunoblotting assay (Western blot) was used to detect the expression of autophagy-associated proteins of microtubule-associated protein 1 light-chain 3 β (LC3B) and P62 after 24 h of induction culture in each group. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expression of bone sialoprotein (BSP), Runt-related transcription factor 2 (Runx2), dentin sialophosphoprotein (DSPP), and dentin matrix protein-1 (DMP-1) after 7 d of induction culture. Cellular alkaline phosphatase (ALP) staining analyzed cellular ALP activity at 7 d of induction, and alizarin red staining evaluated the formation of mineralized nodules at 21 d of induction. **Results** The pH of the 45S5 extract culture medium was 8.65 ± 0.01 , which was not significantly different from that of the control group ($P>0.05$). The silicon ion concentration of the 45S5 induction culture medium was (1.56 ± 0.07) mmol/L, which was higher than that of the control group (0.08 ± 0.01) mmol/L ($P<0.05$). The calcium ion concentration of the 45S5 induction culture was (1.57 ± 0.15) mmol/L, which was not significantly different from that of the control group ($P>0.05$). Western blot results showed that LC3B- II / I ratio increased and P62 expression decreased in the 45S5 group compared with those in the control group ($P<0.05$). By contrast, the ratio decreased and the expression increased in the 3-MA 45S5 group compared with those in the 45S5 group ($P<0.05$). RT-qPCR results showed that the expression of BSP, Runx2, DMP-1, and DSPP enhanced in the 45S5 group compared with that in the control group ($P<0.05$), but the expression decreased in the 3-MA 45S5 group compared with that in the 45S5 group ($P<0.05$). Semi-quantitative analysis of ALP staining and alizarin red staining showed that the ALP activity was enhanced, and the formation mineralized nodule increased in the 45S5 group compared with those in the control group. The ALP activity weakened, and the formation mineralized nodules were reduced in the 3-MA 45S5 group compared with those in the 45S5 group. **Conclusion** Cell autophagy participates in the odontogenic differentiation of APCs induced by 1 mg/mL 45S5 *in vitro*.

[Key words] odontogenic differentiation; apical papilla cells; autophagy; bioactive glass 45S5

生物活性玻璃45S5因具有良好的生物相容性、骨诱导和骨传导性能,被广泛用于骨组织再生^[1-2]。近年来,生物活性玻璃类材料逐渐应用于牙髓-牙本质复合体再生。研究^[3-6]表明,生物活性玻璃45S5可促进牙髓细胞的成牙本质方向分化、血管生成和小管样牙本质形成。年轻恒牙未闭合的根尖孔外获取的根尖牙乳头组织中能够分离培养出具有多向分化潜能的干细胞,即根尖牙乳头干细胞(stem cell from the apical papilla, SCAP),其与同一组织来源的牙髓干细胞相比具有更强的端粒酶活性和形成牙本质能力^[7],是牙髓-牙本质复合体再生重要的细胞来源。45S5体外可促进根尖牙乳头细胞(apical papilla cells, APCs)的增殖、成牙本质方向分化基因的表达和体外矿化结节的形成,但其作用机制仍未明确^[8]。

细胞自噬是细胞利用溶酶体对自身细胞器和大分子物质进行降解的过程,在细胞代谢、更新细胞器和维持细胞内稳态等方面发挥着重要作用^[9]。与生物活性玻璃45S5化学组成相似的硅酸盐材料,如iRoot BP、MTA,均由SiO₂和CaO等基本成分组成,iRoot BP通过细胞自噬参与促进骨髓间充质干细胞成牙本质方向分化^[10],MTA通过细胞自噬参与牙髓细胞成牙本质方向分化^[11]。本研究提出假设细胞自噬参与生物活性玻璃45S5促

进APCs成牙本质方向分化,旨在明确45S5促进APCs成牙本质方向分化的作用机制,为牙髓牙本质复合体再生提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

45S5生物活性玻璃(B139900,上海阿拉丁生化科技股份有限公司),胎牛血清(安徽康源生物技术有限责任公司),茜素红、BCA试剂盒、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司),引物(上海生工生物工程技术有限公司),氯化十六烷基吡啶、焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水、BCIP/NBT显色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),10 \times 洗膜缓冲液(Tris Buffered Saline Tween, TBST)、10 \times 蛋白电转移缓冲液、10 \times SDS-PAGE电泳缓冲液(北京普利莱基因技术有限公司),一步法PAGE凝胶快速制备试剂盒(上海雅酶生物科技有限公司),超敏电化学发光试剂盒(苏州新赛美生物科技有限公司),高血糖DMEM培养基、青霉素-链霉素-胰酶(Gibco公司,美国), β -甘油磷酸钠、维生

素C、噻唑蓝、地塞米松、二甲基亚砷(Sigma公司,美国),微管相关蛋白1轻链3 β (microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta, LC3B)抗体(Cell Signaling Technology公司,美国),SYBR green聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)预混液、TRIzol试剂(Invitrogen公司,美国),Premix型反转录试剂(TaKaRa公司,日本),3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)(Apexbio公司,美国),P62抗体(Proteintech公司,美国),I型胶原蛋白酶(Worthington公司,美国),CD29、CD34、CD45、CD90、CD105、CD146(BD公司,美国)。

pH仪(上海精密科学仪器有限公司),化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司),高温高压蒸汽消毒锅(山东新华医疗器械股份有限公司),超纯水(ultrapure water, UP水)机(青岛富勒姆科技有限公司),恒温水浴箱(嘉兴市欣欣仪器设备有限公司),玻璃板、制胶器、半干转印系统、垂直电泳系统、梳子(BIORAD公司,美国),CO₂培养箱、酶标仪(Thermo公司,美国),恒温混匀仪、低温高速离心机(Eppendorf公司,德国),倒置显微镜(奥林巴斯株式会社,日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 APCs的获得、培养和鉴定

本实验根尖牙乳头组织取自滨州医学院附属医院口腔颌面外科门诊12~18岁因正畸需要拔除的患者的前磨牙,患者及家属知情同意,实验方案通过滨州医学院附属医院伦理委员会审查(伦理批号:2019-G036-01)。离体牙立即放入无菌培养液中,超净台内PBS冲洗牙齿表面的血液及杂质,4 h内完成原代培养。无菌刀片切下牙齿根尖部牙乳头组织,眼科剪修剪组织至1 mm³大小,漂洗离心,组织块中加入1 mL I型胶原蛋白酶,37 °C水浴消化至组织块完全消失,离心后弃上清液,加入2 mL含20%DMEM培养液,接种于6孔板37 °C、5%CO₂细胞培养箱中培养。每3 d更换一次培养液,待细胞融合达到70%~80%后进行细胞传代,取第2和第4代细胞用于后续实验。

取对数生长期的第2代APCs,消化离心后制备5.0×10⁶个/mL的细胞悬液,依次取200 μ L加入EP管中,避光加一抗(CD29 20 μ L, CD34 20 μ L, CD45 20 μ L, CD90 10 μ L, CD105 10 μ L, CD146 20 μ L;阴性对照为用PBS代替一抗孵育),避光冰上孵育30 min, PBS漂洗离心2次,细胞悬液通过200目细胞筛过滤收集于流式管内上机检测,

Flowing Software 2.5.1分析数据。

1.2.2 生物活性玻璃45S5诱导培养液的配置和pH、离子浓度检测

电子天平称量生物活性玻璃45S5粉末,锡箔纸包裹后于180 °C干热灭菌4 h,冷却至室温备用。将45S5按照1 mg/mL加入DMEM培养液,封口膜封口后置于37 °C培养箱中24 h,离心取上清经0.22 μ m无菌针头式过滤器过滤,即1 mg/mL的45S5浸提培养液;不加入45S5的DMEM培养液37 °C浸提24 h,离心后上清经0.22 μ m过滤器过滤,即DMEM浸提培养液。向上述各浸提培养液内分别加入10%胎牛血清和1%青霉素—链霉素混合液,即45S5诱导培养液和DMEM诱导培养液。

取45S5浸提培养液和DMEM浸提培养液各5 mL,使用pH仪测定溶液pH,离子体发射光谱测定浸提培养液硅离子及钙离子的浓度(由上海荟铭检测设备有限公司测定)。

1.2.3 免疫印迹法(Western blot)检测自噬相关蛋白的表达

实验分为对照组、45S5组和3-MA 45S5组,对照组为DMEM诱导培养液,45S5组为1 mg/mL的45S5诱导培养液,3-MA 45S5组为1 mg/mL的45S5诱导培养液中加入5 mmol/L 3-MA。取第4代APCs以2.0×10⁴个/mL将细胞接种于75 cm²培养瓶,待细胞生长融合达80%时记为第0天。加入各组诱导培养液培养24 h,按照试剂盒说明书提取总蛋白,BCA蛋白浓度测定盒测定蛋白样品浓度,加入UP水将蛋白样品浓度稀释为1.25 μ g/ μ L的中间液,加入中间液体积1/5的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液,配置为1 μ g/ μ L的蛋白样品,金属浴95 °C,5 min,使蛋白充分变形,-20 °C冷冻保存。蛋白电泳,一抗稀释比例GAPDH为1:2 000, P62为1:50 000, LC3为1:1 000,二抗稀释比例为1:10 000,曝光条带。使用ImageJ软件计算条带灰度值,以自噬相关蛋白的相对表达量为纵坐标、组别为横坐标,绘制直方图。

1.2.4 实时荧光定量PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测细胞自噬对45S5诱导APCs成牙本质方向分化相关基因表达的影响

实验分为对照组、45S5组和3-MA 45S5组,同1.2.3。取第4代APCs以1.5×10⁵个/孔的密度将细胞接种于6孔板,待细胞生长融合达80%时记为第0天。加入各组诱导培养液培养7 d,提取细胞总RNA,测定RNA纯度,按照说明书进行反转录

反应，结束后-20℃保存。RT-qPCR检测骨唾液酸蛋白 (bone sialoprotein, BSP)、Runx相关转录因子2 (Runx-related transcription factor 2, Runx-2)、牙本质基质酸性磷蛋白1 (dentin matrix protein 1, DMP-1)、牙本质涎磷蛋白 (dentin sialophosphoprotein, DSPP) 的表达。反应条件为 50℃ 2 min, 95℃ 10 min (1个循环, 预变性); 95℃ 15 s, 60℃ 60 s (40个循环, PCR反应); 95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 95℃ 15 s (溶解阶段)。BSP、Runx2、DMP-1、DSPP及内参的引物序列见表1。反应结束后分析扩增曲线和溶解曲线, 验证引物特异性及产物是否单一。以GAPDH为内参, 用定量的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对mRNA表达水平, 以细胞因子为横坐标、RNA含量为纵坐标, 绘制直方图。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Tab 1 RT-qPCR primer sequence

基因	引物序列 (5'-3')
BSP	F: GATTTCAGTTCAGGGCAGTAG
	R: CCCAGTGTGTACAGAAAGTG
Runx2	F: TCTTAGAACAAATTCTGCCCTTT
	R: TGCTTTGGTCTTGAAATCACAC
DMP-1	F: AGGAAGTCTCGCATCTCAGAG
	R: TGGAGTTGCTGTTTTCTGTAGAG
DSPP	F: CTGTTGGGAAGAGCCAAGATAAG
	R: CCAAGATCATTCCATGTTGTCTCT
GAPDH	F: GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	R: GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

1.2.5 细胞碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)

染色及BCA半定量检测细胞自噬对45S5诱导APCs ALP活性的影响

实验分为对照组、矿化诱导 (OM) 组、45S5组和3-MA 45S5组, 对照组为DMEM诱导培养液 (即阴性对照组), OM组为DMEM诱导培养液中加入10 mmol/L β-磷酸甘油钠、10 nmol/L地塞米松和50 mg/mL抗坏血酸 (即阳性对照组), 45S5组为1 mg/mL的45S5诱导培养液, 3-MA 45S5组为1 mg/mL的45S5诱导培养液中加入5 mmol/L 3-MA。取第4代APCs以 1.5×10^5 个/孔的密度将细胞接种于12孔板, 待细胞生长融合达80%时, 记为第0天。分别加入各组诱导培养液培养7 d, 每48 h更换培养液。按照BCIP/NBT显色试剂盒说明书染色, 显微镜下观察拍照。提取单层贴壁细胞总蛋白, BCA半定量检测蛋白浓度, 酶标仪波长调至562 nm, 测定光密度 (optical density, OD) 值。

1.2.6 茜素红染色及氯化十六烷基吡啶半定量分析

细胞自噬对45S5诱导APCs矿化能力的影响

实验分为对照组、OM组、45S5组和3-MA

45S5组, 对照组为DMEM诱导培养液 (即阴性对照组), OM组为DMEM诱导培养液中加入10 mmol/L β-磷酸甘油钠、10 nmol/L地塞米松和50 mg/mL抗坏血酸 (即阳性对照组), 45S5组为1 mg/mL的45S5诱导培养液中加入10 mmol/L β-磷酸甘油钠、10 nmol/L地塞米松和50 mg/mL抗坏血酸, 3-MA 45S5组为1 mg/mL的45S5诱导培养液中加入5 mmol/L 3-MA、10 mmol/L β-磷酸甘油钠、10 nmol/L地塞米松和50 mg/mL抗坏血酸。取第4代APCs以 1.5×10^5 个/孔的密度将细胞接种于12孔板, 待细胞生长融合达80%时, 记为第0天, 分别加入各组诱导培养液培养至21 d, 每孔加入1 mL 4%多聚甲醛固定液固定30 min, 0.1%茜素红染色液室温下染色30 min, UP水轻柔漂洗3次, 显微镜下观察并拍照记录。每孔加入100 mmol/L氯化十六烷基吡啶溶液1 mL, 室温下放置30 min使待测孔底色完全溶解, 反复吹打充分混匀后, 每孔吸取120 μL转移至96孔板, 每孔3个复孔, 酶标仪波长调至496 nm处, 测定各组OD值。

1.2.7 统计分析

采用SPSS 19.0软件进行统计分析。浸提液pH、离子浓度的差别经正性检验和方差齐性检验后, 进行独立样本t检验。各组基因、蛋白、ALP活性和矿化结节半定量分析的差别, 经方差齐性检验方差齐后, 采用单因素方差进行分析。组间差异有统计学意义时, 采用LSD检验进行两两比较。双侧检验 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

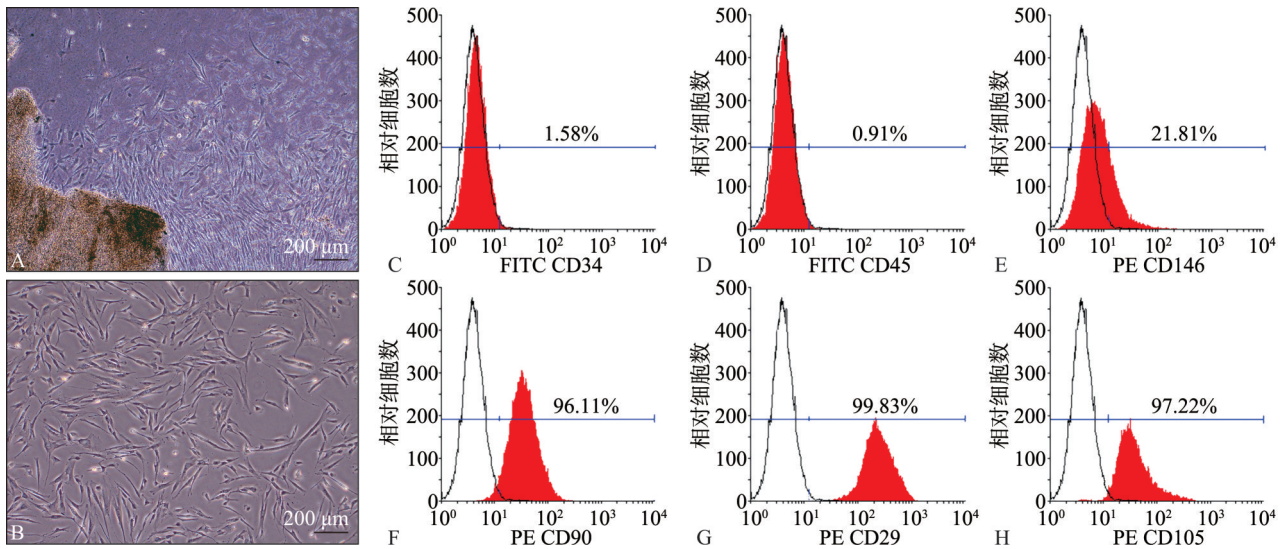
2 结果

2.1 APCs的培养及鉴定

在连续培养过程中, 第1代至第3代APCs均保持间充质细胞的典型的长梭形形态特点 (图1A、B)。流式细胞术结果显示, APCs阳性表达间充质干细胞的细胞表面标记物CD90、CD146、CD29和CD105, 阴性表达造血系统细胞的细胞表面标记物CD34、CD45 (图1C~H)。

2.2 45S5浸提培养液的pH及离子浓度

45S5浸提培养液与DMEM浸提培养液的pH及离子浓度见表2。统计分析表明, 45S5浸提培养液的pH、钙离子浓度与DMEM浸提培养液相比, 二者间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。45S5浸提培养液的硅离子浓度高于DMEM浸提培养液, 二者间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



A、B: 分别为第1代、第3代APCs, APCs均呈长梭形; C~H: 第3代APCs阳性表达CD90、CD146、CD29和CD105, 阴性表达CD34和CD45。

图1 APCs的培养及鉴定

Fig 1 Culture and identification of APCs

表2 45S5浸提培养液与DMEM浸提培养液的pH及离子浓度

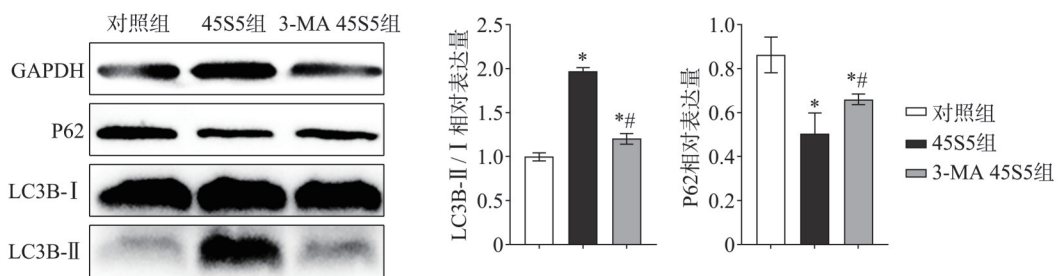
Tab 2 pH and ion concentration of 45S5 extraction culture medium and DMEM extraction culture medium

浸提培养液	pH	Si/ (mmol/L)	Ca/ (mmol/L)
DMEM	8.60±0.03	0.08±0.01	1.65±0.18
45S5	8.65±0.01	1.56±0.07*	1.57±0.15

注: 与对照组相比, *P<0.05。

2.3 45S5体外促进APCs自噬相关蛋白表达

免疫印迹法检测45S5体外对APCs自噬相关蛋



左: P62、LC3B-I、LC3B-II的表达, 内参为GAPDH; 右: 灰度值分析, 与对照组相比, *P<0.05; 与45S5组相比, #P<0.05。

图2 免疫印迹法检测45S5体外对APCs自噬相关蛋白表达的影响

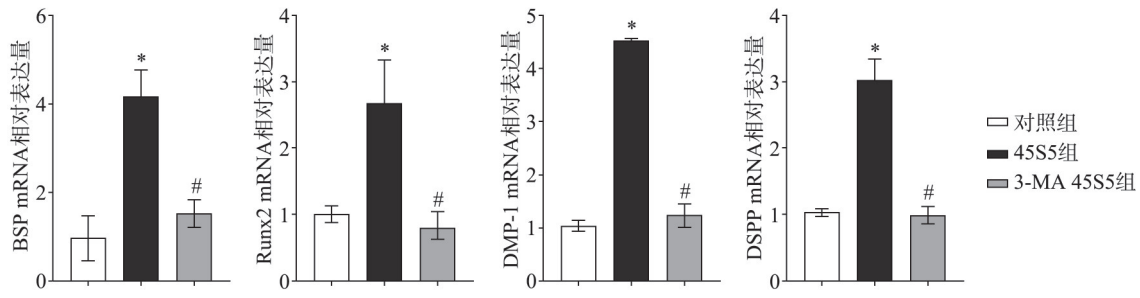
Fig 2 Western blot detects the effect of 45S5 on the expression of autophagy-related proteins in APCs in vitro

2.4 45S5体外通过细胞自噬促进APCs成牙本质方向分化相关基因的表达

RT-qPCR检测细胞自噬对45S5诱导APCs成牙本质方向分化相关基因表达的影响, 结果见图3。与对照组相比, 45S5组BSP、Runx2、DMP-1和DSPP表达增加, 差异有统计学意义 (P<0.05); 与

白表达的影响, 结果见图2。与对照组相比, 45S5组P62相对表达降低, 差异具有统计学意义 (P<0.05); 与45S5组相比, 3-MA 45S5组P62相对表达增加, 但仍低于对照组, 差异具有统计学意义 (P<0.05)。与对照组相比, 45S5组LC3B-II/I比值升高, 差异具有统计学意义 (P<0.05); 与45S5组相比, 3-MA 45S5组LC3B-II/I比值降低, 但仍高于对照组, 差异具有统计学意义 (P<0.05)。结果表明: 45S5增强APCs的自噬水平, 3-MA抑制45S5促进自噬的作用。

45S5组相比, 3-MA 45S5组BSP、Runx2、DMP-1和DSPP基因表达降低, 差异有统计学意义 (P<0.05)。结果表明: 45S5促进APCs成牙本质方向分化相关基因BSP、Runx2、DMP-1和DSPP的表达, 3-MA抑制45S5的促进作用。



与对照组相比, * $P < 0.05$; 与45S5组相比, # $P < 0.05$ 。

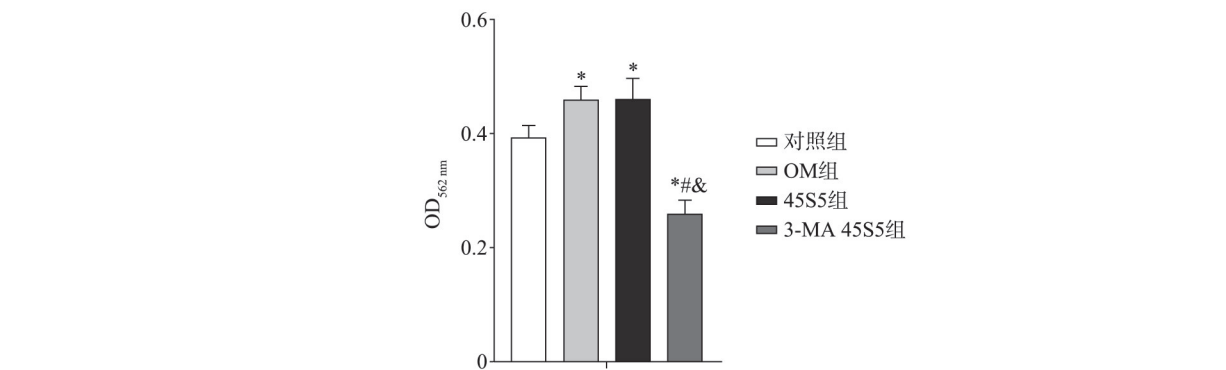
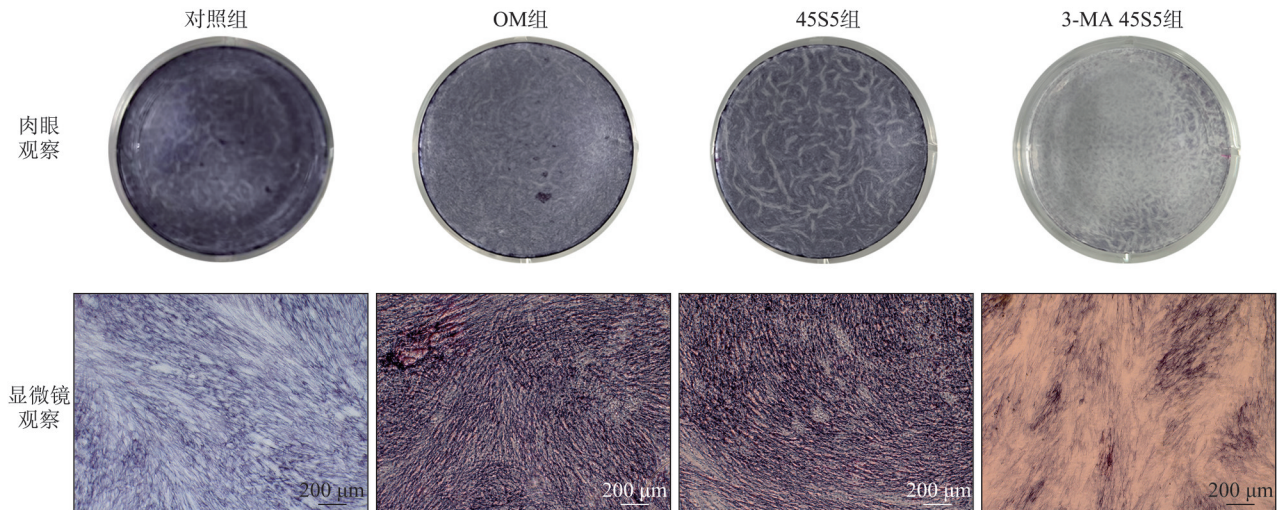
图3 RT-qPCR检测细胞自噬对45S5诱导APCs成牙本质方向分化相关基因表达的影响

Fig 3 RT-qPCR detects the effect of autophagy on the expression of genes related to odontoblast differentiation of APCs induced by 45S5

2.5 45S5体外通过细胞自噬促进APCs ALP活性

细胞自噬对45S5诱导APCs ALP活性的影响见图4。培养7 d后, 对照组、OM组与45S5组蓝染, 3-MA 45S5组蓝染较弱。BCA半定量检测结果显示, 与对照组相比, OM组和45S5组OD值升高, 3-MA 45S5组OD值降低, 差异有统计学意义

($P < 0.05$); 与OM组相比, 45S5组OD值变化差异无统计学意义, 3-MA 45S5组OD值降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与45S5组相比, 3-MA 45S5组OD值降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果表明: 45S5促进APCs ALP活性, 3-MA抑制45S5的促进作用。



上: 肉眼观察。中: 显微镜观察。下: 半定量分析, 与对照组相比, * $P < 0.05$; 与OM组相比, # $P < 0.05$; 与45S5组相比, & $P < 0.05$ 。

图4 细胞自噬对45S5诱导APCs ALP活性的影响

Fig 4 Effect of autophagy on ALP activity of APCs induced by 45S5

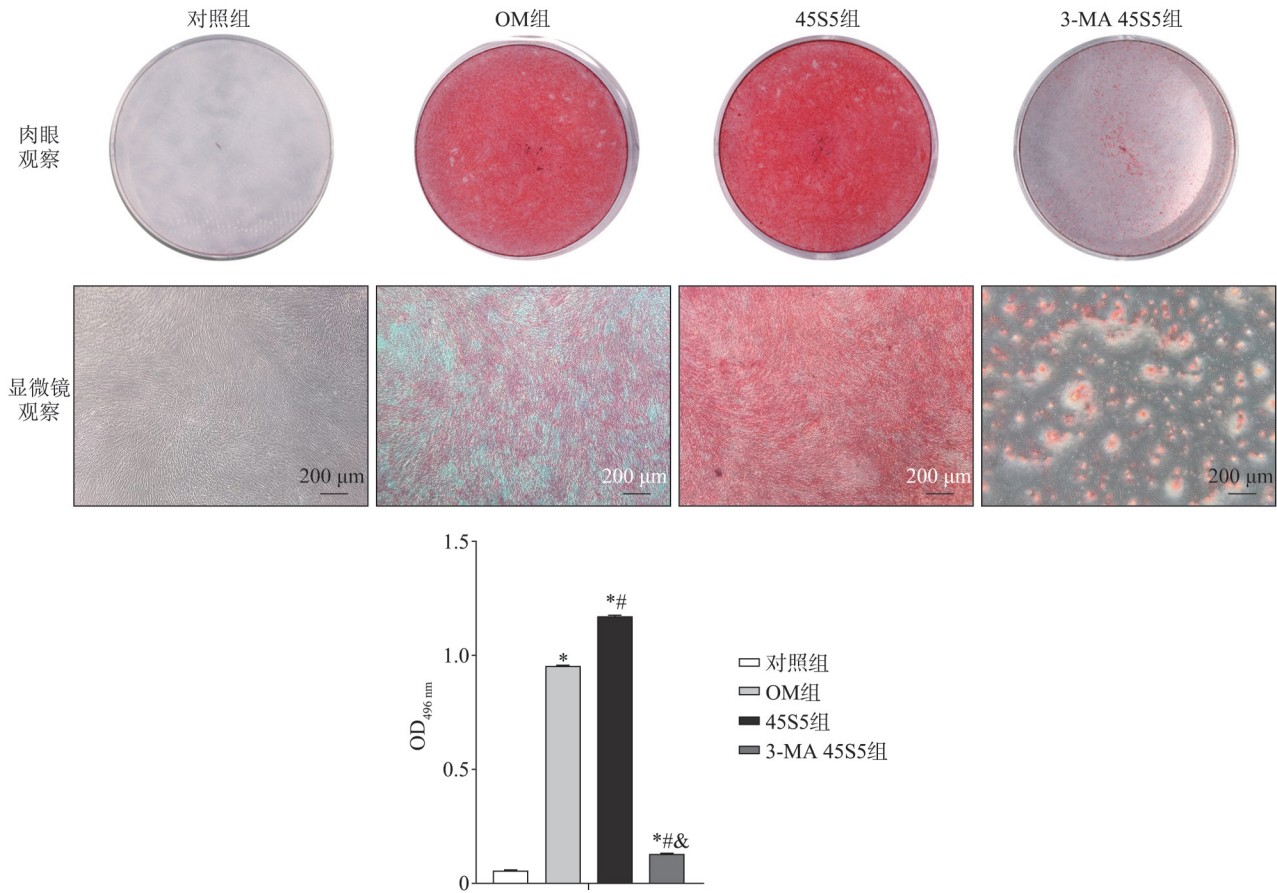
2.6 45S5体外通过细胞自噬促进APCs矿化结节的形成

茜素红染色及氯化十六烷基吡啶半定量分析

结果见图5。茜素红染色显示, 对照组红染不明显, OM组与45S5组均有红染, 3-MA组可见少量红染。氯化十六烷基吡啶半定量分析显示, 培养

21 d后,与对照组相比,OM组、45S5组和3-MA 45S5组 OD值均升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$);与OM组相比,45S5组 OD值升高,3-MA 45S5组 OD值降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$);

与45S5组相比,3-MA 45S5组 OD值降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。结果表明:45S5促进APCs矿化结节形成,3-MA抑制45S5的促进作用。



上:肉眼观察。中:显微镜观察。下:半定量分析,与对照组相比,* $P<0.05$;与OM组相比,# $P<0.05$;与45S5组相比,& $P<0.05$ 。

图5 细胞自噬对45S5诱导APCs矿化能力的影响

Fig 5 Effect of autophagy on the ability of 45S5 to induce mineralization of APCs

3 讨论

45S5的主要成分构成为 Na_2O (24.5%)、 CaO (24.5%)、 P_2O_5 (6.0%)和 SiO_2 (45%)。45S是指45%的 SiO_2 ,5表示Ca和P的摩尔比为5:1。本研究使用的45S5是粒径为20~50 μm 的不规则颗粒。生物活性玻璃中, Na^+ 和 K^+ 等与溶液中 H^+ 迅速交换形成 OH^- ,导致pH升高。本研究中,DMEM浸提培养液和45S5浸提培养液的pH分别为 8.60 ± 0.03 和 8.65 ± 0.01 ,与细胞活跃增殖的7.58~8.55 pH范围接近。0.5~4 mmol/L的硅离子可以促进细胞的增殖和成骨方向分化^[8],本研究中45S5组硅离子浓度为 (1.56 ± 0.07) mmol/L,促进APCs的分化。本研究发现45S5促进APCs成牙本质方向分化有细胞自噬的参与。细胞成牙本质方向分化的相关基因

主要是DSPP和DMP-1,其中DSPP是成牙本质分化的特异性标志物^[12],主要在成牙本质细胞中表达。DMP-1是一种细胞外非胶原基质蛋白,广泛存在于牙本质与骨骼中^[13]。DMP-1与DSPP具有协同关系,是DSPP的下游因子,对牙本质矿化及成牙本质细胞的分化有着重要作用^[14]。本研究中1 mg/mL 45S5体外培养7 d后,DSPP和DMP-1等成牙本质方向分化相关基因表达水平上升,45S5体外促进APCs成牙本质方向分化;加入3-MA后DSPP和DMP-1表达水平下降,表明45S5促进APCs成牙本质方向分化有细胞自噬的参与。

本研究发现,45S5体外促进APCs矿化结节形成和ALP活性升高。细胞基质中钙盐沉积的情况能直观反映细胞成骨分化水平,矿化是成牙本质分化的晚期标志。茜素红可与钙盐反应形成红色沉积物,定性分析细胞的成骨分化情况可通过观

察不同组之间红色深浅的差异以及显微镜下红色沉积物的情况来完成。通过表面活性剂氯化十六烷基吡啶来溶解红色沉积物,可半定量分析细胞的成骨分化情况^[15]。本研究中1 mg/mL 45S5 诱导培养21 d后,相比OM组产生更多的矿化结节,加入3-MA后矿化结节减少,表明45S5促进APCs体外矿化能力有细胞自噬的参与。ALP在牙齿形成的多种细胞中表达,组织非特异性ALP突变引起的低磷酸酯酶症表现为骨骼与牙齿的牙本质矿化异常^[16]。在矿化过程中无机磷酸盐(Pi)与钙离子结合生成羟磷灰石,核苷酸焦磷酸/磷酸二酯酶1和进行性强直蛋白同源物的产物无机焦磷酸(PPi)会抑制羟磷灰石的形成,ALP可以水解PPi并将其分解为Pi促进羟磷灰石形成^[17]。本研究中1 mg/mL 45S5 诱导培养7 d后,APCs ALP活性升高,加入3-MA后ALP活性降低,表明45S5促进APCs ALP活性有细胞自噬的参与。

本研究发现45S5促进APCs自噬水平上升,加入3-MA后,45S5对APCs自噬水平的促进作用被抑制。细胞自噬是一个动态过程,第一步高尔基体与内质网联合形成双层膜结构的囊泡,即为吞噬泡;第二步吞噬泡的膜延伸,将细胞质包入其中形成具有完整囊泡结构的自噬体;第三步溶酶体与自噬体融合,被包围的细胞质成分降解,回到细胞质继续发挥作用^[18]。评价自噬水平的黄金标准是LC3和P62。蛋白酶ATG4裂解LC3,在自噬小泡形成过程中生成LC3-I,LC3-I与磷脂酰乙醇胺结合转化为LC3-II,并定位于自噬小体的内外膜上,在自噬体膜形成中起着重要作用。LC3-II作为连接蛋白可以与P62蛋白结合,使自噬体与溶酶体融合并吞噬底物。因此在自噬体与溶酶体融合过程中,LC3是关键因子。LC3-II的数量可以反映自噬体和自噬相关结构的数量,因此采用LC3-II/LC3-I的比值检测自噬水平的变化,自噬水平越高,比值越高^[19-20]。P62蛋白是细胞自噬过程中的重要受体,在自噬过程中结合自噬体膜上的ATG8与LC3-II蛋白,并被整合到自噬体中,参与自噬体与溶酶体结合转化为自噬溶酶体的过程,是被溶酶体降解的底物。因此P62表达与自噬呈反比,自噬被抑制则P62作为底物积累而表达增加,自噬激活则P62表达降低。3-MA抑制自噬泡形成,抑制自噬的位点位于LC3和P62的上游,因此,加入3-MA,会在降低LC3-II的数量同时增加LC3-I的数量,并抑制P62的消耗,导致P62堆积,数量上升。

Vitapex在激活SCAPs自噬的同时,促进成牙与成骨方向分化。0.5 mmol/L氟化钠体外促进SCAPs矿化能力提升,成牙本质分化标志物基因和蛋白表达增强,同时自噬相关蛋白LC3、ATG5和Beclin1表达上升,沉默ATG5阻断自噬后,成牙本质方向分化相关基因和蛋白表达降低,表明自噬参与NaF促进SCAPs成牙本质方向分化的过程^[21]。20 μmol/L的原硅酸通过促进细胞自噬促进前成骨细胞分化和矿化^[22],提示硅离子通过自噬促进细胞成骨方向分化的可能。本研究通过检测45S5诱导培养后APCs中LC3-II/I的比值以及P62蛋白的相对表达量,发现45S5组的LC3-II/I比值升高,P62蛋白表达下降,表明45S5能够促进APCs的自噬水平。进一步检测成牙本质方向分化相关基因DSPP和DMP-1等的表达情况、45S5对APCs ALP活性的影响以及矿化结节的形成情况,发现45S5组中DSPP和DMP-1等的表达水平上升,ALP活性增加,矿化结节数量增多,表明45S5体外促进APCs成牙本质方向分化;为了验证细胞自噬在这一过程中的作用使用了自噬抑制剂3-MA,加入3-MA后DSPP和DMP-1等的表达水平下降,ALP活性降低,矿化结节数量减少,表明45S5促进APCs成牙本质方向分化中有细胞自噬参与。

结合上述实验结果,笔者推测45S5可能通过溶解释放适宜浓度的硅离子,促进APCs成牙本质方向分化,且细胞自噬参与该过程。尽管本研究在探索45S5对APCs成牙本质方向分化的影响以及细胞自噬在这一过程中的作用方面取得了初步成果,但仍存在一些不足。虽然研究中观察到了45S5促进APCs细胞自噬水平上升的现象,并通过抑制剂3-MA验证了细胞自噬在成牙本质分化中的参与,但对于自噬如何具体促进细胞分化,以及45S5如何调控自噬的分子机制,仍需进一步的实验验证和深入解析。目前的研究主要集中在体外细胞培养实验,虽然这些结果为45S5的生物学效应提供了初步证据,但体内环境的复杂性意味着需要通过动物实验来进一步验证45S5促进APCs成牙本质方向分化的效果,以及细胞自噬在其中的作用。未来尚需要设计动物实验,评估45S5在体内对APCs成牙本质方向分化的影响以及细胞自噬在这一过程中的作用,为牙髓牙本质复合体再生和修复提供新的策略。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Nitu, Fopase R, Pandey LM, et al. Assessment of sol-gel derived iron oxide substituted 45S5 bioglass-ceramics for biomedical applications[J]. *J Mater Chem B*, 2023, 11(31): 7502-7513.
- [2] Cui CY, Wang SN, Ren HH, et al. Regeneration of dental-pulp complex-like tissue using phytic acid derived bioactive glasses[J]. *Rsc Advances*, 2017, 7(36): 22063-22070.
- [3] Yun J, Burrow MF, Matinlinna JP, et al. A narrative review of bioactive glass-loaded dental resin composites [J]. *J Funct Biomater*, 2022, 13(4): 208.
- [4] Li J, Wang S, Dong Y. Regeneration of pulp-dentine complex-like tissue in a rat experimental model under an inflammatory microenvironment using high phosphorous-containing bioactive glasses[J]. *Int Endod J*, 2021, 54(7): 1129-1141.
- [5] Abdelaziz H, Mahran AH, Elsewify T. Osteogenic differentiation and proliferation of apical papilla stem cells using nanoparticles of Neo MTA and bioactive glass[J]. *Saudi Dent J*, 2024, 36(1): 134-139.
- [6] Irshad N, Jahanzeb N, Alqasim A, et al. Synthesis and analyses of injectable fluoridated-bioactive glass hydrogel for dental root canal sealing[J]. *PLoS One*, 2023, 18(11): e0294446.
- [7] Sonoyama W, Liu Y, Fang D, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine[J]. *PLoS One*, 2006, 1(1): e79.
- [8] 崔彩云, 董艳梅, 邱莞迪, 等. 生物活性玻璃45S5体外对根尖牙乳头细胞成牙本质方向分化的影响[J]. *滨州医学院学报*, 2021, 44(4): 281-286.
- Cui CY, Dong YM, Qiu WD, et al. Effect of bioactive glass 45S5 on odontogenic differentiation of apical papilla cells *in vitro*[J]. *J Binzhou Med Univ*, 2021, 44(4): 281-286.
- [9] Yang S, Fan W, Li Y, et al. Autophagy in tooth: physiology, disease and therapeutic implication[J]. *Cell Biochem Funct*, 2021, 39(6): 702-712.
- [10] 陆嘉敏, 闫明, 李泽汉, 等. iRoot BP Plus对骨髓间充质干细胞成牙/成骨分化及自噬的影响[J]. *口腔医学*, 2019, 39(10): 873-879.
- Lu JM, Yan M, Li ZH, et al. Effect of iRoot BP Plus on the odonto/osteogenic differentiation and autophagy of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Stomatology*, 2019, 39(10): 873-879.
- [11] Kim YJ, Kim WJ, Bae SW, et al. Mineral trioxide aggregate-induced AMPK activation stimulates odontoblastic differentiation of human dental pulp cells[J]. *Int Endod J*, 2021, 54(5): 753-767.
- [12] Ma S, Liu G, Jin L, et al. IGF-1/IGF-1R/hsa-let-7c axis regulates the committed differentiation of stem cells from apical papilla[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36922.
- [13] Kashima TG, Dongre A, Oppermann U, et al. Dentine matrix protein 1 (DMP-1) is a marker of bone-forming tumours[J]. *Virchows Arch*, 2013, 462(5): 583-591.
- [14] Martin-Gonzalez J, Segura-Egea JJ, Pérez-Pérez A, et al. Leptin in dental pulp and periapical tissues: a narrative review[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(4): 1984.
- [15] Krafts KP, Pambuccian SE. Romanowsky staining in cytopathology: history, advantages and limitations[J]. *Biotech Histochem*, 2011, 86(2): 82-93.
- [16] Lu C, Mamaeva OA, Cui C, et al. Establishment of Singleton-Merten syndrome pulp cells: evidence of mineralization dysregulation[J]. *Connect Tissue Res*, 2014, 55(Suppl 1): 57-61.
- [17] Makris K, Mousa C, Cavalier E. Alkaline phosphatases: biochemistry, functions, and measurement[J]. *Calcif Tissue Int*, 2023, 112(2): 233-242.
- [18] Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms[J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 207-215.
- [19] Podestà MA, Faravelli I, Ponticelli C. Autophagy in lupus nephritis: a delicate balance between regulation and disease[J]. *Autoimmun Rev*, 2022, 21(8): 103132.
- [20] Yun J, Burrow MF, Matinlinna JP, et al. A narrative review of bioactive glass-loaded dental resin composites [J]. *J Funct Biomater*, 2022, 13(4): 208.
- [21] Pan Y, Li Z, Wang Y, et al. Sodium fluoride regulates the osteo/odontogenic differentiation of stem cells from apical papilla by modulating autophagy[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(9): 16114-16124.
- [22] Chi H, Kong M, Jiao G, et al. The role of orthosilicic acid-induced autophagy on promoting differentiation and mineralization of osteoblastic cells[J]. *J Biomater Appl*, 2019, 34(1): 94-103.

(本文编辑 李彩)