

肾上腺髓质素对人牙髓干细胞增殖和分化的影响

朱 强,许震宇,田 刚,唐 震,高建勇,邱小倩,蔚一博,汪大林*

第二军医大学长海医院口腔科,上海 200433

[摘要] 目的 探讨肾上腺髓质素(adrenomedullin,ADM)对人牙髓干细胞(dental pulp stem cells,DPSCs)增殖、成牙本质分化能力的影响。方法 体外培养的人 DPSCs 传至第 3 代,培养液中加入不同浓度 ADM(10^{-6} 、 10^{-7} 及 10^{-8} mol/L)处理细胞 24 h,并设置空白对照组。流式细胞术检测细胞周期及细胞凋亡,定量 PCR 和蛋白质印迹法检测成牙本质分化标记物碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)的 mRNA 及蛋白表达。结果 细胞周期检测结果显示,3 种浓度 ADM 干预 DPSCs 后 $G_2/S/M$ 期细胞比例均较空白对照组上升($P<0.05$),但各干预组间差异无统计学意义;细胞凋亡检测结果显示,3 种浓度 ADM 干预组的 Annexin V^{+}/PI^{-} 标示细胞比例均较空白对照组下降($P<0.05$),但各干预组间差异无统计学意义;定量 PCR 及蛋白质印迹检测结果显示,DPSCs 中 ALP mRNA 及蛋白表达较空白对照组上升($P<0.01$),但各干预组间差异无统计学意义。结论 ADM 具有促进 DPSCs 的增殖、抑制凋亡及促其向成牙本质分化的作用。

[关键词] 牙髓干细胞;肾上腺髓质素;细胞增殖;细胞分化

[中图分类号] R 329.441 [文献标志码] A [文章编号] 0258-879X(2014)05-515-05

Effects of adrenomedullin on proliferation and differentiation of dental pulp stem cells

ZHU Qiang, XU Zhen-yu, TIAN Gang, TANG Zhen, GAO Jian-yong, QIU Xiao-qian, WEI Yi-bo, WANG Da-lin*

Department of Stomatology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Objective To explore the effects of adrenomedullin (ADM) on the proliferation and odontogenic differentiation potential of dental pulp stem cells (DPSCs). Methods The 3rd generation of cultured human DPSCs were treated with ADM of different concentrations (10^{-6} mol/L, 10^{-7} mol/L and 10^{-8} mol/L) for 24 h, and a blank control group was also set up. Cell apoptosis and cell cycle were measured by flow cytometry; the mRNA and protein expressions of alkaline phosphatase (ALP), an odontogenic differentiation marker, were analyzed by qPCR and Western blotting analysis, respectively. Results Cell cycle analysis showed that the proportion of $G_2/S/M$ phase cells in the three ADM treatment groups were significantly higher than that in the blank control group ($P<0.05$), but there were no significant differences between the three ADM groups. Cell apoptosis analysis showed that the proportion of cells labelled by Annexin V^{+}/PI^{-} was significantly lower in the three ADM groups than that in the blank control group ($P<0.05$), but there were no significant differences between the three ADM groups. The results of qPCR and Western blotting analysis showed that the ALP expression in DPSCs was increased significantly compared with that in the blank control group ($P<0.01$), but there were no significant differences between the three ADM groups. Conclusion ADM can promote the proliferation and inhibit the apoptosis of DPSCs, and it can also promote odontogenic differentiation of DPSCs.

[Key words] dental pulp stem cells; adrenomedullin; cell proliferation; cell differentiation

[Acad J Sec Mil Med Univ,2014,35(5): 515-519]

自 2000 年 Gronthos 等^[1]证实成人的牙髓组织中存在干细胞之后,牙髓干细胞(dental pulp stem cells,DPSCs)就成为了口腔医学研究领域的新热点。Gronthos 等^[2]还发现 DPSCs 在体外能形成高密度散在的矿化结节,植入免疫缺陷小鼠皮下能形成与天然牙结构近似的牙髓-牙本质复合体,其中包括牙本质样结构、沿牙本质小管样结构排列的成牙本质样细胞以及血管、神经和结缔组织,从而证实 DPSCs 具有自我更新的能力。研究者还借鉴骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells,BMSCs)的研究

方法,对 DPSCs 和 BMSCs 体外增殖情况进行对比,发现 DPSCs 平均约有 72% 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)阳性细胞,而 BMSCs 约有 46% BrdU 阳性细胞,表明在体外培养中 DPSCs 的增殖率比 BMSCs 高,研究还发现 DPSCs 在以后的传代中依然保持着较高的增殖能力^[3]。DPSCs 具有横向分化的潜能,在不同的微环境作用下可分化为多种细胞,如成牙本质细胞、肌细胞、脂肪细胞和骨细胞等。

肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)是一种多能性肽,最初从人脑细胞中分离获得^[4],具有扩张血管、促细胞生长、调节激素分泌、排钠利尿、抗菌等功能^[5]。ADM 被认为在哺乳动物的发育中发挥了重要的作用^[6]。有研究发现,在牙齿组织发育过程的关键发育时间点呈现 ADM 的高表达^[7]。ADM 的作用被认为是调节胚胎发育,控制细胞增殖、分化和迁移,并推测可能在成体中起到调节内环境平衡的作用^[8]。尤其引起我们重视的是,ADM 对成骨现象存在明显的调控作用^[9],虽然骨发生和牙本质发生各自由成骨细胞与成牙本质细胞通过不同的分子机制调控,但两者的基因表达模式却具有一定的相似性,具有共同的标记物,如:骨唾液酸蛋白(bone sialoprotein, BSP)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)。

ADM 的这些特性似乎适用于牙髓损伤的治疗,然而 ADM 对 DPSCs 的生物学效应尚未明确。本研究通过滴注不同浓度 ADM,观察 ADM 对 DPSCs 的增殖、凋亡、分化的影响,评估 ADM 在牙髓再生中可能发挥的生物学效应,以期为 ADM 在体内牙髓再生研究及其临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料 人原代牙周膜细胞由第三军医大学新桥医院口腔科谭颖徽教授惠赠; ADM、牛血清白蛋白(BSA)购自 Sigma 公司; DMEM 细胞培养基及胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司; TRIzol 购自 Invitrogen 公司; RNA 反转录及定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司; 细胞周期检测试剂盒(PI/RNaseA)购自 Roche 公司; ALP 引物序列由上海生工生物工程技术有限公司设计合成,ALP 正义链: 5'-CAG TTC TGG AGG ATG GC-3',反义链: 5'-TCT CAC AGC CTT GCG TGT TC-3'; 细胞凋亡检测试剂盒(Annexin V-FITC/PI)、细胞总蛋白

抽提裂解液及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究。小鼠抗人 ALP 及抗人 β -actin 单克隆抗体、HRP 标记山羊抗小鼠二抗购自 Santa Cruz 公司。

1.2 DPSCs 培养及分组 人原代 DPSCs,在 DMEM(含 20% FBS)、5% CO₂、37℃ 条件下培养。传代培养至第 3 代,分别在培养液中添加 ADM 至终浓度分别为 10⁻⁶、10⁻⁷ 及 10⁻⁸ mol/L(ADM 干预组),培养 24 h 后收集细胞。另设未经处理的 DPSCs 作为空白对照组。

1.3 流式细胞术检测 DPSCs 细胞周期 将各组 DPSCs 细胞重悬于 500 μ L Buffer A (100 mmol/L 磷酸缓冲液,0.5% BSA)。Buffer A 洗涤 2 次,加入 PI (25 μ g/mL)+RNaseA (50 μ g/mL) 300 μ L,吹匀重悬,4℃ 避光处理 30 min,上流式细胞仪检测细胞周期。

1.4 流式细胞术检测 DPSCs 细胞凋亡 将各组 DPSCs 细胞用 100 μ L 的标记溶液(含 1 μ g/L Annexin V-FITC 和 1 μ g/L PI)重悬细胞,室温下避光孵育 10~15 min。500 $\times$ g 离心 5 min,沉淀细胞,孵育缓冲液洗 1 次,上流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。Annexin V⁺/PI⁻判定为凋亡细胞。

1.5 实时定量 PCR 法检测 ALP mRNA 表达 TRIzol 裂解细胞抽提总 RNA。取 500 ng 总 RNA 以反转录试剂盒行反转录。SYBR 法定量检测 DPSCs 细胞内 ALP mRNA 的表达水平。定量 PCR 反应体系: SYBR Premix 10 μ L,10 μ mol/L 正反向引物各 0.4 μ L,反转录产物 1 μ L,补充去离子水至反应体系 20 μ L。反应条件: 95℃ 变性 60 s; 95℃ 5 s,60℃ 20 s,共 40 循环。以 18S rRNA 表达水平作为内参,通过 $\Delta\Delta$ Ct 法比较经不同浓度 ADM 处理的细胞间 ALP mRNA 的相对表达水平。

1.6 蛋白印迹分析检测 ALP 蛋白表达 收集各组 DPSCs,加入细胞总蛋白抽提裂解液提取细胞总蛋白,采用 BCA 法检测总蛋白浓度。各取 20 μ g 总蛋白进行 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳。运用半干法将凝胶中蛋白转印至 PVDF 膜上。再以 5% 的脱脂牛奶常温封闭 2 h,加入 TBST 稀释小鼠抗人 ALP(或 β -actin)单克隆抗体,4℃ 过夜。取出后 TBST 洗膜 3 次。再加入 HRP 标记山羊抗小鼠二抗,室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,增强型化学发光

显影。采用 LabWork 4.0 图像分析软件进行条带光密度扫描分析 ALP 的表达丰度。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 15.0 软件分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同处理样本均数比较采用方差分析 (ANOVA)。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 ADM 对 DPSCs 增殖的影响 经不同浓度

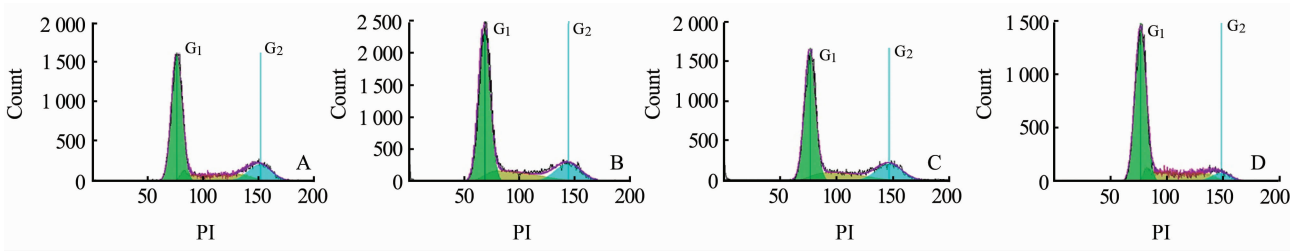


图 1 ADM 干预后 DPSCs 细胞周期检测结果

Fig 1 Cell cycle distribution of dental pulp stem cells (DPSCs) after adrenomedullin (ADM) intervention

A: 10^{-6} mol/L ADM intervention group; B: 10^{-7} mol/L ADM intervention group; C: 10^{-8} mol/L ADM intervention group; D: Control group

2.2 ADM 对 DPSCs 凋亡的影响 DPSCs 经不同浓度 ADM 处理 24 h 后,细胞凋亡检测结果显示 10^{-6} 、 10^{-7} 及 10^{-8} mol/L ADM 干预组 Annexin V⁺/PI⁻ 细胞比例分别为 (9.29 ± 0.72)%、(10.27 ± 0.74)% 及

(10.48 ± 0.61)% ,均低于空白对照组 [(14.58 ± 0.77)%],差异有统计学意义 ($P < 0.05$),但不同浓度 ADM 干预组间 Annexin V⁺/PI⁻ 细胞比例差异无统计学意义 (图 2)。

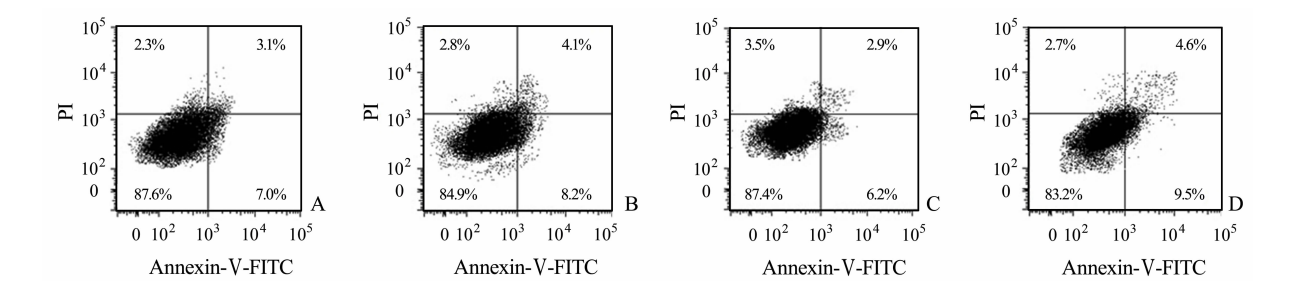


图 2 ADM 干预后 DPSCs 细胞凋亡检测结果

Fig 2 Apoptosis of dental pulp stem cells (DPSCs) after adrenomedullin (ADM) intervention

A: 10^{-6} mol/L ADM intervention group; B: 10^{-7} mol/L ADM intervention group; C: 10^{-8} mol/L ADM intervention group; D: Control group

2.3 ADM 对 DPSCs 成牙本质/成骨分化的影响 DPSCs 经不同浓度 ADM 处理 24 h 后,通过实时定量 PCR 检测各组 ALP mRNA 相对 18S rRNA 的表达水平。结果显示,经 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} mol/L ADM 干预后 ALP mRNA 相对表达水平分别为 3.27 ± 0.31 、 3.04 ± 0.27 、 2.93 ± 0.20 ,均高于空白对照组 (0.96 ± 0.07),差异有统计学意义 ($P <$

0.01 ,图 3)。蛋白质印迹分析检测各组 ADM 蛋白相对 β -actin 的表达水平,结果显示 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} mol/L ADM 干预后 ALP 蛋白相对表达水平分别为 2.46 ± 3.78 、 2.25 ± 2.75 、 2.38 ± 2.98 ,均高于空白对照组 (1.05 ± 0.13),差异有统计学意义 ($P < 0.01$,图 4)。但不同浓度 ADM 干预组间 ALP mRNA 及蛋白表达水平差异均无统计学意义。

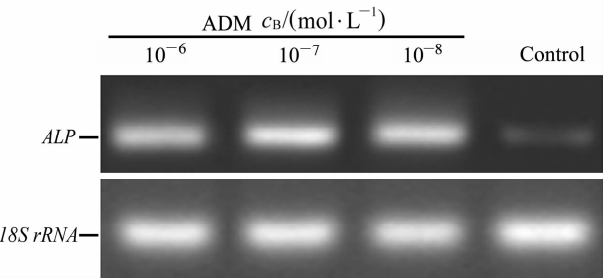


图 3 ADM 干预后 DPSCs 中 ALP mRNA 表达
Fig 3 Expression of alkaline phosphatase (ALP) mRNA in dental pulp stem cells (DPSCs) after adrenomedullin (ADM) intervention

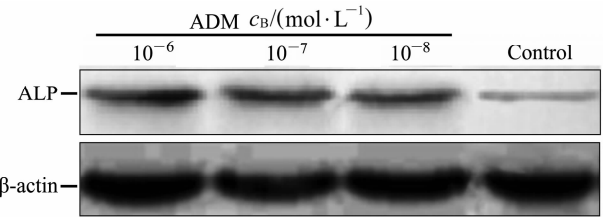


图 4 ADM 干预后 DPSCs 中 ALP 蛋白的表达
Fig 4 Expression of alkaline phosphatase (ALP) protein in dental pulp stem cells (DPSCs) after adrenomedullin (ADM) intervention

3 讨 论

最初,ADM 被认为是一个重要的肿瘤生长因子^[10]。而现有研究表明,ADM 可以促进多个细胞的增殖,如成纤维细胞、角质形成细胞、内皮细胞、成骨细胞及肿瘤来源的细胞等,其机制研究发现,ADM 量的增加与 cAMP 信号成正相关^[11],ADM 也可以刺激人角质形成细胞的 DNA 和 cAMP 的合成^[12]。推测 ADM 对于细胞的促进增殖作用可能是通过 cAMP 介导的。然而,在对某些特定细胞(如血管平滑肌细胞、肾小球系膜细胞、神经胶质细胞和神经胶质肿瘤细胞)的观察中发现,ADM 对这些细胞的增殖和生长有抑制作用^[13]。因此,我们推测 ADM 作为一种生长因子,其对生长的调节作用可能和细胞的种类相关。本研究通过在 DPSCs 培养液中滴注不同浓度的 ADM 作为干预与空白对照组相比较,细胞流式术检测 DPSCs 细胞周期,结果证实 ADM 对 DPSCs 具有明显的促增殖作用,而 ADM 的浓度对促增殖效应的影响不明显。

ADM 还被认为是一个对胚胎发育和分化的重要因子,也是一个细胞凋亡存活因子^[7,14]。研究表

明,ADM 可以增加早期内皮祖细胞增殖,并抑制其凋亡^[15]。骨髓间充质干细胞(MSCs)能够分泌大量的血管生成因子和抗凋亡因子,其中就包括有 ADM^[16]。有研究发现 ADM 可促进 MSCs 存活,有利于心脏修复^[17]。本实验通过流式 Annexin V/PI 法检测凋亡细胞率,发现 ADM 干预后细胞的凋亡率低于空白对照细胞,而不同浓度 ADM 干预组间的细胞凋亡率差异无统计学意义,证实 ADM 对 DPSCs 的凋亡具有抑制作用。

ADM 对不同的干细胞具有不同的影响作用。ADM 被认为与多种类型干细胞/祖细胞存在联系。ADM 及其受体的协调增加表达量可以通过提高透明小球干细胞的增殖来改善自分泌/旁分泌的方式,促进肾上腺皮质再生^[18]。神经干细胞(neural stem cell, NSCs)位于嗅球,被称为嗅球干细胞(OBSCs),保留干细胞的性质,缺乏 ADM 可以严重改变 OBSCs 后代细胞的增殖和分化^[19]。研究表明,ADM 对成人 NSCs 或成体神经祖细胞的分化和增殖具有促进作用^[20]。本实验通过观察经 ADM 处理 DPSCs 干预组相比空白对照组的 ALP mRNA 和蛋白表达水平,证实了 ADM 对 DPSCs 的成牙本质分化同样具有促进作用。

研究推测 ADM 可以通过调控干细胞分化来重建神经,并预测 ADM 运用于再生医学领域内可能具有良好的前景^[20]。更有学者认为,ADM 作为一种不同来源的干细胞生长因子,具有被添加到任何干细胞治疗中应用的潜力;不仅如此,ADM 还可以决定一些祖细胞的未来分化结果^[21]。ADM 可以作用于特定干细胞使其分化成为特定的后代细胞,但是在这过程中同样存在很多的小分子物质,它们可以抵消或增加 ADM 的活性^[22-23]。本实验初步证实了 ADM 对 DPSC 的促增殖、抗凋亡、促成牙本质/成骨分化的能力,但是其具体作用机制尚未明确,还需进一步研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey P G, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in

- vitro and in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97:13625-13630.
- [2] Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher L W, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells[J]. J Dent Res, 2002, 81:531-535.
 - [3] Karamzadeh R, Eslaminejad M B, Aflatoonian R. Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods[J]. J Vis Exp, 2012(69). pii: 4372. doi: 10.3791/4372.
 - [4] Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 192:553-560.
 - [5] López J, Martínez A. Cell and molecular biology of the multifunctional peptide, adrenomedullin [J]. Int Rev Cytol, 2002, 221:1-92.
 - [6] Garayoa M, Martínez A, Lee S, Pio R, An W G, Neckers L, et al. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) up-regulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation: a possible promotion mechanism of carcinogenesis[J]. Mol Endocrinol, 2000, 14:848-862.
 - [7] Montuenga L M, Martínez A, Miller M J, Unsworth E J, Cuttitta F. Expression of adrenomedullin and its receptor during embryogenesis suggests autocrine or paracrine modes of action[J]. Endocrinology, 1997, 138:440-451.
 - [8] 夏 蕾, 沈 朋. 四物合剂对人红白血病细胞株 K562/ADM 多药耐药性的逆转作用研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29:792-795.
 - [9] Kim S H, Kim Y S, Lee S Y, Kim K H, Lee Y M, Kim W K, et al. Gene expression profile in mesenchymal stem cells derived from dental tissues and bone marrow [J]. J Periodontal Implant Sci, 2011, 41:192-200.
 - [10] Miller M J, Martínez A, Unsworth E J, Thiele C J, Moody T W, Elsasser T, et al. Adrenomedullin expression in human tumor cell lines. Its potential role as an autocrine growth factor[J]. J Biol Chem, 1996, 271:23345-23351.
 - [11] Withers D J, Coppock H A, Seufferlein T, Smith D M, Bloom S R, Rozengurt E. Adrenomedullin stimulates DNA synthesis and cell proliferation via elevation of cAMP in Swiss 3T3 cells[J]. FEBS Lett, 1996, 378:83-87.
 - [12] Kapas S, Brown D W, Farthing P M, Hagi-Pavli E. Adrenomedullin has mitogenic effects on human oral keratinocytes: involvement of cyclic AMP[J]. FEBS Lett, 1997, 418:287-290.
 - [13] Hinson J P, Kapas S, Smith D M. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide [J]. Endocr Rev, 2000, 21:138-167.
 - [14] Demir H, Onur O E, Denizbasi A, Akoglu H, Eroglu S E, Ozpolat C, et al. The effects of adrenomedullin in traumatic brain injury[J]. Peptides, 2013, 43:27-31.
 - [15] Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Ishibashi-Ueda H, Yamagishi M, et al. Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia[J]. Circulation, 2005, 111:356-362.
 - [16] Nagaya N, Mori H, Murakami S, Kangawa K, Kitamura S. Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005, 288: R1432-R1437.
 - [17] Fujii T, Nagaya N, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Nishigami K, et al. Adrenomedullin enhances therapeutic potency of bone marrow transplantation for myocardial infarction in rats [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288: H1444-H1450.
 - [18] Rebuffat P, Macchi C, Malendowicz L K, Nussdorfer G G. Up-regulation of adrenomedullin receptor gene expression in activated local stem cells during rat adrenal regeneration[J]. Int J Mol Med, 2007, 20:855-858.
 - [19] Vergaño-Vera E, Fernández A P, Hurtado-Chong A, Vicario-Abejón C, Martínez A. Lack of adrenomedullin affects growth and differentiation of adult neural stem/progenitor cells[J]. Cell Tissue Res, 2010, 340:1-11.
 - [20] Wang L, Zheng L, Li C, Dong S, Lan A, Zhou Y. Adrenomedullin delivery in microsphere-scaffold composite for remodeling of the alveolar bone following tooth extraction: an experimental study in the rat[J]. Biomed Eng Online, 2013, 12:99.
 - [21] Martínez A, Julián M, Bregonzio C, Notari L, Moody T W, Cuttitta F. Identification of vasoactive nonpeptidic positive and negative modulators of adrenomedullin using a neutralizing antibody-based screening strategy [J]. Endocrinology, 2004, 145:3858-3865.
 - [22] Martínez A, Oh H R, Unsworth E J, Bregonzio C, Saavedra J M, Stetler-Stevenson W G, et al. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator [J]. Biochem J, 2004, 383(Pt 3):413-418.
 - [23] Martínez A, Zudaire E, Portal-Núñez S, Guédez L, Libutti S K, Stetler-Stevenson W G, et al. Proadrenomedullin NH₂-terminal 20 peptide is a potent angiogenic factor, and its inhibition results in reduction of tumor growth[J]. Cancer Res, 2004, 64:6489-6494.