

• 论著 •

釉基质衍生物对人牙周膜干细胞成骨分化的影响

余晓宏¹ 刘屿² 曾莲¹ 杨艳玲¹ 王洲¹ 李卫¹

1. 云南省第二人民医院口腔内科 昆明 650012;

2. 昆明医科大学附属口腔医院口腔颌面外科 昆明 650031

[摘要] 目的 研究釉基质衍生物对人牙周膜干细胞增殖和成骨分化的影响并探究其可能的机制。方法 原代培养人牙周膜干细胞, 经过流式鉴定后选取第3代细胞进行实验。采用CCK-8试剂盒检测不同浓度(0、20、50、100 mg·L⁻¹)的釉基质衍生物对人牙周膜干细胞增殖的影响; 实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测不同浓度(0、20、50、100 mg·L⁻¹)釉基质衍生物对人牙周膜干细胞成骨分化的影响; 通过Trichrome染色和Von Kosa's染色检测不同浓度(0、20、50、100 mg·L⁻¹)釉基质衍生物对人牙周膜干细胞胶原合成和矿化结节形成的影响; 不同浓度釉基质衍生物和DDK1作用人牙周膜干细胞之后, 通过Western blot和qRT-PCR检测β-连环蛋白、RunX2、CaMK II及NLK表达情况。结果 釉基质衍生物对人牙周膜干细胞的增殖具有明显的促进作用, 并呈现剂量和时间依赖性; 釉基质衍生物处理人牙周膜干细胞之后, 矿化结节形成和胶原合成显著增多, 骨钙素、I型胶原、RunX2的表达明显增多; 另外, 釉基质衍生物处理能显著增加β-连环蛋白、RunX2、CaMK II和NLK的表达, 且该作用可被DDK1抑制。结论 釉基质衍生物对体外培养的人牙周膜干细胞有促进增殖和成骨分化的作用, 其作用可能是通过Wnt/β-连环蛋白实现的。

[关键词] 釉基质衍生物; 人牙周膜干细胞; 成骨分化

[中图分类号] Q 254 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2020006



开放科学(资源服务)
标识码(OSID)

Effects of enamel matrix derivative on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells Yu Xiaohong¹, Liu Yu², Zeng Lian¹, Yang Yanling¹, Wang Zhou¹, Li Wei¹. (1. Dept. of Oral Medicine, The Second People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650012, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Stomatology Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650031, China)

This study was supported by Health Science and Technology Project in Yunnan Province (2018NS0006).

[Abstract] Objective To investigate the effects of enamel matrix derivative (EMD) on the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs) and the potential mechanism. **Methods** The primary cultured hPDLSCs were identified by flow cytometry, and the third generation cells were selected for experiments. The cell counting kit-8 assay was performed to detect the effect of different EMD concentrations (0, 20, 50 and 100 mg·L⁻¹) on the proliferation of hPDLSCs. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to verify the effect of EMD on the osteogenic differentiation of hPDLSCs in different concentrations (0, 20, 50 and 100 mg·L⁻¹). The effect of different EMD concentrations (0, 20, 50 and 100 mg·L⁻¹) on collagen synthesis and mineralised nodule formation of hPDLSCs were detected through trichrome and Von Kosa's staining. Western blotting and qRT-PCR were performed to detect β-catenin, RunX2, CaMK II and NLK expressions after different concentrations of EMD and DDK1 were applied to hPDLSCs. **Results** EMD significantly promoted the proliferation of hPDLSCs, which increased with the increase in concentration and stimulation time of EMD. After EMD treatment with hPDLSCs, the formation of mineralised nodules

and collagen synthesis increased significantly. Furthermore, the expressions of osteocalcin, collagen I and RunX2 were elevated. Moreover, the expressions of β-catenin, RunX2, CaMK II and NLK were significantly increased with EMD treatment and inhibited by DDK1. **Conclusion** EMD can

[收稿日期] 2019-05-19; **[修回日期]** 2019-10-10

[基金项目] 云南省卫生科技计划项目(2018NS0006)

[作者简介] 余晓宏, 住院医师, 硕士, Email: 297244077@qq.com

[通信作者] 刘屿, 主治医师, 硕士, Email: 383321966@qq.com

promote the proliferation and osteogenic differentiation of hPDLSCs *in vitro* through the Wnt/ β -catenin signalling pathway.

[Key words] enamel matrix derivative; human periodontal ligament stem cell; osteogenic differentiation

牙周炎等牙周组织疾病造成牙周支持组织的破坏,牙周附着的丧失,最终导致牙齿的松动、脱落。牙周炎治疗的最终目的不但要控制炎症和阻止病变的进一步发展,而且还要形成新的牙槽骨和牙骨质^[1]。牙周膜干细胞分化是骨组织再生和修复的关键,因此研究牙周膜干细胞成骨分化的分子机制对于临床上治疗牙周组织疾病具有重要作用。

人牙周膜包围干细胞亚群,其负责维持和再生牙周组织结构和功能。这些细胞表现出多能性,可以分化为成骨细胞、成纤维细胞和牙齿成牙骨质细胞,以及形成牙骨质和牙周膜样组织,因此通常被称为牙周膜干细胞,大量的动物研究^[2]提供了可靠的证据支持牙周膜干细胞可用于牙周组织再生的设想。因此牙周组织再生治疗的一个关键因素为促干细胞定向诱导分化,目前虽已证实骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、转化生长因子、血小板衍生因子、雌激素等具有明确的骨向诱导作用。但对于牙周组织的修复治疗仍需积极寻求更多的高效药物。

由猪胎儿的牙齿材料^[3]制备的釉基质衍生物(enamel matrix derivative)由疏水性蛋白质的混合物组成,其中牙釉蛋白含量超过90%。在牙周骨内缺损的治疗中,釉基质衍生物被证明可以支持骨缺损的再生^[4]。有研究^[5-6]已经特别报道了釉基质衍生物可以在体外刺激成骨细胞和成牙骨质细胞的增殖和分化,并促进体内牙骨质和牙周组织的再生。在体外,釉基质衍生物能促进CD4⁺ T细胞凋亡,抑制肿瘤坏死因子诱导的MC3T3-E1成骨细胞的凋亡^[7]。另有研究^[8]表明,将釉基质衍生物放入猴牙周缺损模型中,观察到几乎完全的无细胞牙骨质修复,胶原组织紧密地结合于新生的牙槽骨。虽然研究已经发现了釉基质衍生物有促进牙周膜成纤维细胞增殖及牙槽骨修复的作用,但其中的调控作用机制还很不明确,其对牙周膜干细胞的作用还有待进一步研究。人牙周膜干细胞成骨分化受到多种信号转导通路的调节,如Wnt通路、Smad蛋白通路、p38有丝分裂原活性蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路、Notch等^[9]。Wnt信号通路已被证明在间充

质干细胞增殖、分化、凋亡等过程均产生调控作用^[10-11],而Wnt信号通路是否参与调控釉基质衍生物促进人牙周膜干细胞成骨向分化尚无报道。因此本实验旨在探讨Wnt信号通路在釉基质衍生物促进人牙周膜干细胞成骨分化过程中是否起作用,从而进一步阐明釉基质衍生物促进人牙周膜干细胞成骨分化的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

釉基质衍生物(Straumann公司,瑞士),DDK1(Sigma公司,美国),Dulbecco's改良Eagle's培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)(Gibco公司,美国)、0.25%胰蛋白酶(Gibco公司,美国)、青链霉素(Gibco公司,美国);胎牛血清(Gibco公司,美国);I型胶原,骨钙素, β -连环蛋白,RunX2, CaMK II及NLK引物合成(上海生工生物工程有限公司),Trizol提取试剂(Invitrogen公司,美国);Super TaqMan OneStep RT-qPCR Kit(北京康为世纪生物科技有限公司);CCK-8检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); β -连环蛋白抗体(Abcam公司,英国)、RunX2抗体(Santa Cruz Biochemistry公司,美国),CaMK II(Abcam公司,英国)、NLK抗体(Abcam公司,英国),对应二抗(北京康为世纪生物科技有限公司);STRO-1(Abcam公司,英国)、CD146流式抗体(Abcam公司,英国);Masson Trichrome染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)、Von Kosa's染液(北京索莱宝科技有限公司);CO₂细胞培养箱(FORMA 3131; Thermo公司,美国),倒置相差显微镜(TS100; Nikon公司,日本),多功能酶标仪(FC; Thermo公司,美国),超低温冰箱-80℃(L93-12L; Thermo公司,美国),低温高速离心机(GS-15R; Beckman公司,美国),其余细胞培养耗材(Corning公司,美国),实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)仪(ABI-7500; ABI公司,美国),低温离心机(CF-

16RX; 日立公司, 日本), 流式细胞仪 (CyFlow Space, Partec GmbH公司, 德国)。

1.2 实验方法

1.2.1 人牙周膜干细胞体外培养和鉴定 取因正畸而拔除的健康前磨牙, 患者年龄11~14岁。用尖刀刮取牙根部的牙周膜组织, 将组织剪成1 mm³碎块。在超净工作台内用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 和不含胎牛血清的 α -基础Eagle's培养基 (α -minimum Eagle's medium, α -MEM) 各清洗标本2次, 将标本接种于T25培养瓶中, 加入适量含有10%胎牛血清、1%双抗的DMEM, 置于CO₂培养箱中, 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。待细胞从组织块边缘爬出并生长汇合达80%时, 用0.25%胰蛋白酶消化后扩大培养。

选取生长状况良好的第3代细胞, 收集细胞后制备成单细胞悬浮液。向流式管中加入50 μ L细胞悬浮液, 使每管细胞数目约为10⁶, 向管中分别加入50 μ L稀释后的STRO-1、CD146单克隆抗体, 并轻轻混匀, 4℃避光孵育30 min; 然后用洗涤缓冲液洗涤细胞2次。每管加入250 μ L缓冲液重悬细胞后用流式细胞仪检测。

1.2.2 CCK-8检测釉基质衍生物对人牙周膜干细胞增殖的影响 收集对数生长期的细胞, 用完全培养基重悬, 将细胞接种于96孔板中, 使每孔细胞数目为1 $\times$ 10³, 培养基体积为200 μ L, 调零孔只加入200 μ L培养基。将细胞置于37℃、5% CO₂培养箱培养24 h, 按实验分组更换相应培养液, 使釉基质衍生物的终浓度为10、20、50、100 mg $\cdot$ L⁻¹, 空白对照组不处理, 分别于6 h、12 h、1 d、2 d、3 d、5 d和7 d后取出1块板。向每个孔加入10 μ L CCK-8溶液。将培养板在培养箱内孵育2 h, 用酶标仪测定450 nm波长处的吸光度 (A) 值, 并计算

细胞活力:

$$\text{细胞活力} = [A_{\text{加药}} - A_{\text{调零孔}}] / [A_{\text{空白对照}} - A_{\text{调零孔}}] \times 100\%$$

1.2.3 人牙周膜干细胞胶原合成及矿化结节形成检测 取第3代人牙周膜干细胞, 以5 $\times$ 10⁴ mL⁻¹接种1 mL至24孔板, 培养24 h后, 每组3孔重复, 对照组换成含10%胎牛血清、1%双抗的DMEM, 实验组在相同的培养液中加入不同质量浓度的釉基质衍生物 (20、50或100 mg $\cdot$ L⁻¹), 空白对照组不做处理, 放入37℃、5% CO₂培养箱中培养2、4周后进行以下检测。

Trichrome染色检测胶原合成情况: 按试剂说明书进行, 细胞用体积分数10%甲醛固定后, 加入Bouin's溶液56℃ 1 h, 放入魏格特铁苏木精染液10 min, 清洗后, 放入比布列西酸性品红液10~15 min, 再放入苯胺蓝溶液10 min, 清洗后放入1%乙酸5 min, 脱水后显微镜观察。

茜素红染色法检测矿化结节形成情况: 接种等量人牙周膜干细胞至24孔爬片, 待细胞融合度达80%时, 分别换液为含20、50、100 mg $\cdot$ L⁻¹釉基质衍生物的DMEM, 空白对照组换等体积不含釉基质衍生物的培养基, 继续培养2、4周后, 用茜素红染色法将矿化结节染成红色。将固定后的细胞爬片用PBS洗涤后, 浸入5%硝酸银水溶液中10 min, 日光下放置暴晒30 min, 蒸馏水洗涤, 乙醇系列脱水, 二甲苯透明, 显微镜观察。

1.2.4 qRT-PCR检测成骨分化标志物mRNA水平 收集生长状况良好的第3代细胞, 用Trizol法提取细胞总RNA, qRT-PCR检测成骨分化相关因子I型胶原 (collagen I)、骨钙素 (osteocalcin)、RunX2 mRNA水平的表达情况。引物序列见表1。PCR程序如下: 95℃ 5 min; 95℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 30个循环; 72℃ 10 min。

表 1 qRT-PCR的引物序列
Tab 1 Primer sequence for qRT-PCR

名称	正向引物	反向引物	产物长度/bp
I型胶原	TGACGAGACCAAGAAGTCC	GCACCATCATTTCCACGAGC	785
RunX2	GCGGTGCAAACTTTCTCCAG	GACTCTGTTGGTCTCGGTGG	97
骨钙素	CATGAGAGCCCTCAGACTCC	CTCCTGAAAGCCGATGTGGT	256
β -连环蛋白	TAGGTAAGGTGGGTGAGGGT	AGGCCCAGTTCGGAAGTCT	87
CaMK II	ACCTGTGGATATCTGGGCCT	TCTGCCTGCCAACTGAGAAG	380
NLK	ATCTCCTTTGCAGGATGTTGGT	TCATCTAGGTAGGGGTGGGC	82
β -肌动蛋白	TATGGAATCCTGTGGCAT	GTGTTGGCATAGAGGTCTT	87

1.2.5 Western blot、qRT-PCR检测DDK1对人牙周膜干细胞成骨分化的影响 选取第3代人牙周膜干细胞,以 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 接种1 mL至6孔板,每孔加入含10%胎牛血清的DMEM 2 mL,待细胞融合度达80%时,分别换液为含20、50、100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 釉基质衍生物的DMEM和含0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ DKK1的DMEM,空白对照组换等体积DMEM,共5组,每组6孔重复。培养7 d后,其中3孔提取总RNA,经qRT-PCR检测 β -连环蛋白、RunX2、CaMK II 及NLK在mRNA水平的表达情况;另外3孔提取总蛋白质,经Western blot检测 β -连环蛋白、RunX2、CaMK II 及NLK在蛋白质水平的表达情况。

1.3 统计分析

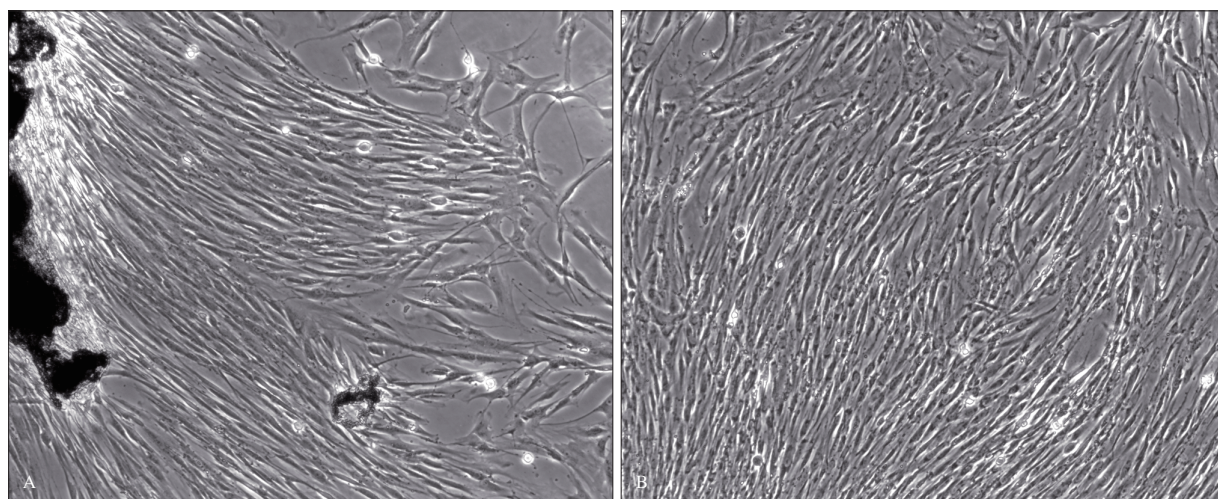
用SPSS 13.0统计学软件进行统计分析,每个体外实验至少进行3次。实验数据均以均数 $\pm$ 标准差表示;采用单因素方差分析检验差异显著性,

用LSD-*t*检验比较两组间差异。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人牙周膜干细胞流式鉴定

采用组织块消化培养的原代细胞,5~10 d可见组织块周围明显有原代细胞爬出(图1A),进一步通过有限稀释克隆法得到纯化的人牙周膜干细胞。纯化后的人牙周膜干细胞形态丰满,呈长梭形,细胞核聚集在中心,细胞呈放射状、旋涡状生长,2周左右即可达80%汇合(图1B);流式细胞检测结果显示第3代人牙周膜干细胞阳性表达间充质细胞表面标记物CD146(阳性)、STRO-1(阳性),证实所取得细胞为间充质来源(图2)。



A: 原代细胞; B: 培养2周细胞。

图1 人牙周膜干细胞形态特征

Fig 1 Morphological characteristics of human periodontal ligament stem cells

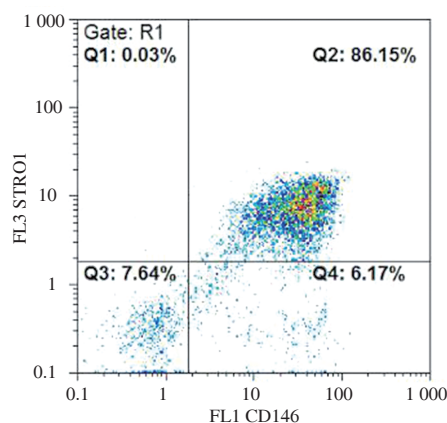


图2 流式细胞仪检测人牙周膜干细胞表面抗原的表达

Fig 2 Flow cytometry detection of surface antigens of human periodontal ligament stem cells

2.2 釉基质衍生物对人牙周膜干细胞活力的影响

CCK8检测不同浓度(10、20、50、100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 釉基质衍生物对人牙周膜干细胞活力的影响,结果显示(图3),与空白对照组相比,在20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上釉基质衍生物均明显促进人牙周膜干细胞的活力,并呈现剂量和时间依赖性,在作用3 d后效果最明显($P < 0.05$)。

2.3 釉基质衍生物对人牙周膜干细胞成骨相关基因表达的影响

以釉基质衍生物(0、20、50、100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别培养牙周膜干细胞2、4周后,以qRT-PCR检测成骨相关因子I型胶原、骨钙素、RunX2的mRNA表达水平。结果显示,随着时间的延长,釉

基质衍生物促进牙周膜干细胞成骨相关因子 I 型

胶原、骨钙素、RunX2表达 ($P<0.05$) (图4)。

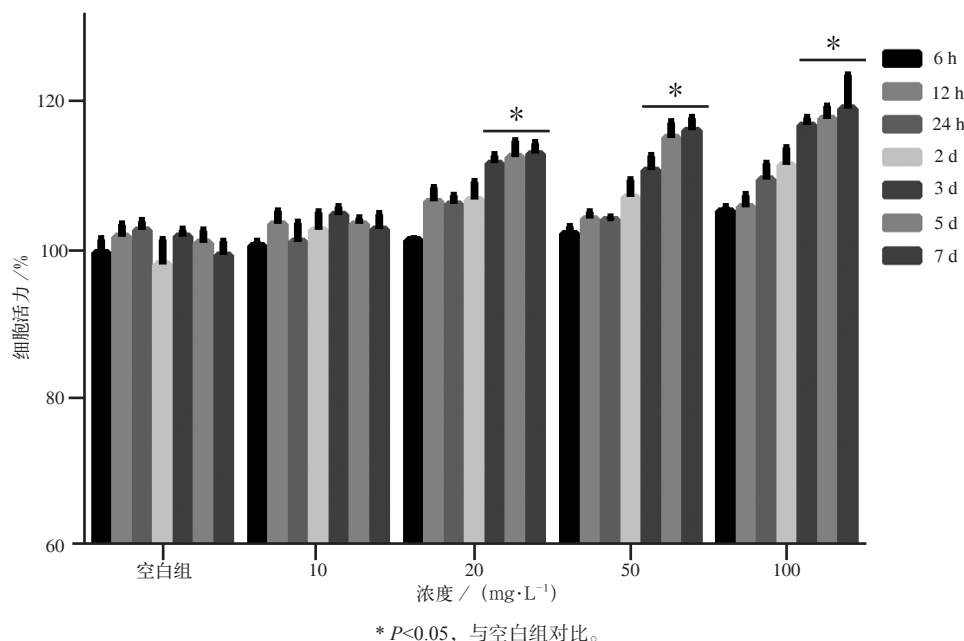


图3 釉基质衍生物对牙周膜干细胞活力的影响

Fig 3 Effects of enamel matrix derivatives on proliferation of periodontal ligament stem cells

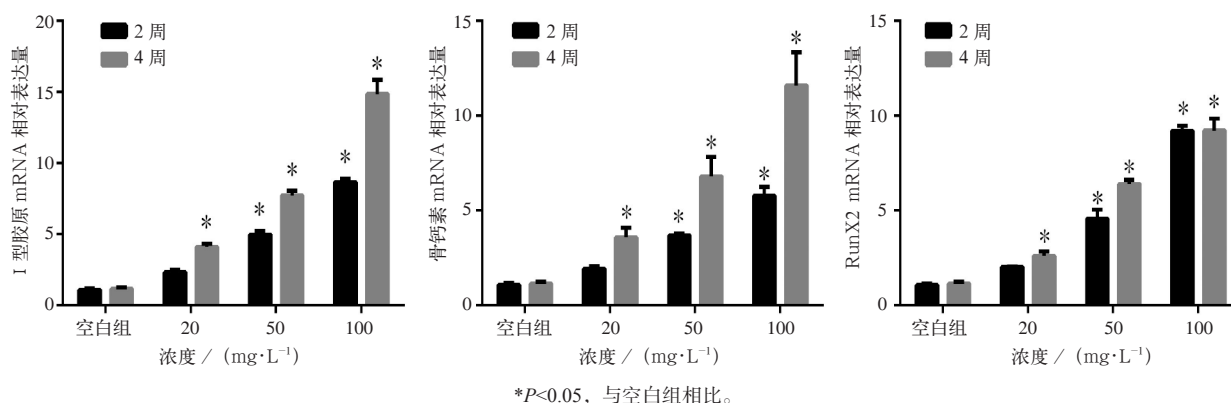


图4 qRT-PCR检测牙周膜干细胞成骨相关基因表达

Fig 4 Expression of osteogenesis-related genes of periodontal ligament stem cells detected by qRT-PCR

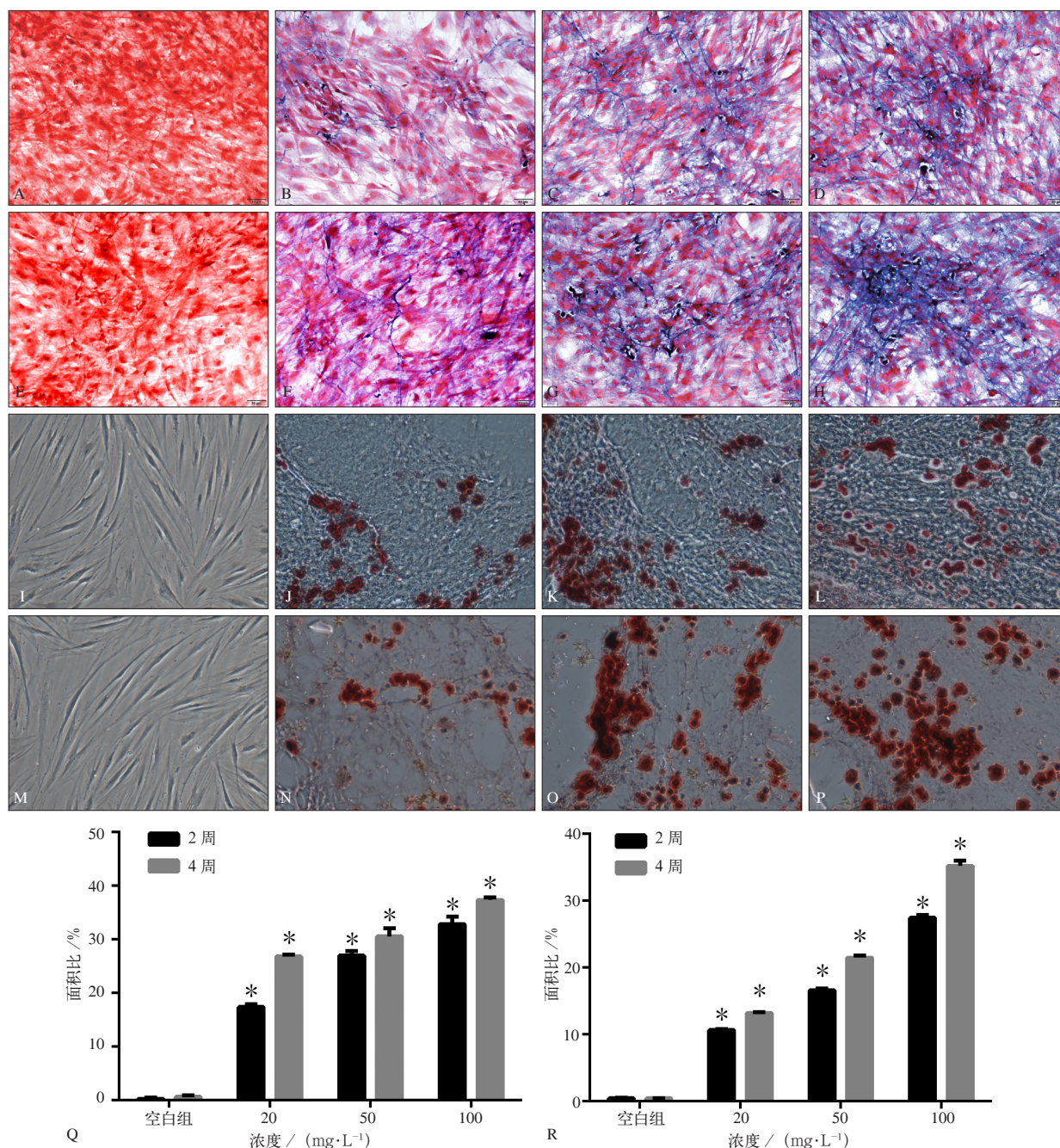
2.4 釉基质衍生物对人牙周膜干细胞胶原合成及矿化能力的影响

以不同浓度的釉基质衍生物 (0、20、50、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用牙周膜干细胞2、4周后, 检测牙周膜干细胞生成胶原情况以及矿化结节形成情况; Trichrome染色结果显示 (图5A~H), 随着釉基质衍生物的浓度越高, 牙周膜干细胞合成胶原量显著增多 ($P<0.05$), 且呈剂量、时间效应关系, 说明釉基质衍生物能够促进牙周膜干细胞胶原的合成能力; 茜素红染色结果显示 (图5I~P), 随着釉基质衍生物的浓度越高, 牙周膜干细胞矿化结节形成量越多 ($P<0.05$), 并且呈剂量、时间效应关系, 说明釉基质衍生物能够促进

牙周膜干细胞矿化结节形成的能力。

2.5 Wnt信号通路在不同浓度釉基质衍生物作用下对人牙周膜干细胞成骨分化的影响

使用釉基质衍生物 (20、50、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 或 0.05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DDK1分别培养牙周膜干细胞7 d后, 以qRT-PCR和Western blot检测 β -连环蛋白、RunX2、CaMK II及NLK的表达。结果显示, 在mRNA水平 (图6A~D), 釉基质衍生物促进牙周膜干细胞RunX2、CaMK II及NLK的表达, 而降低 β -连环蛋白表达, 并且呈现出一定剂量依赖效应 ($P<0.05$); 在蛋白质水平 (图6E) 与mRNA表达一致, 而当人牙周膜干细胞经DDK1处理后, 釉基质衍生物的效果被明显抑制。



A~H、Q: Trichrome染色; I~P、R: 茜素红染色。A~D、I~L: 作用2周; E~H、M~P: 作用4周。A、E、I、M: 空白组; B、F、J、N: 釉基质衍生物20 mg·L⁻¹; C、G、K、O: 釉基质衍生物50 mg·L⁻¹; D、H、L、P: 釉基质衍生物100 mg·L⁻¹。**P*<0.05, 与空白组相比。

图 5 Trichrome和茜素红染色检测牙周膜干细胞胶原合成和矿化能力

Fig 5 Collagen synthesis and mineralization nodule formation of periodontal ligament stem cells detected by Trichrome staining and alizarin red staining

3 讨论

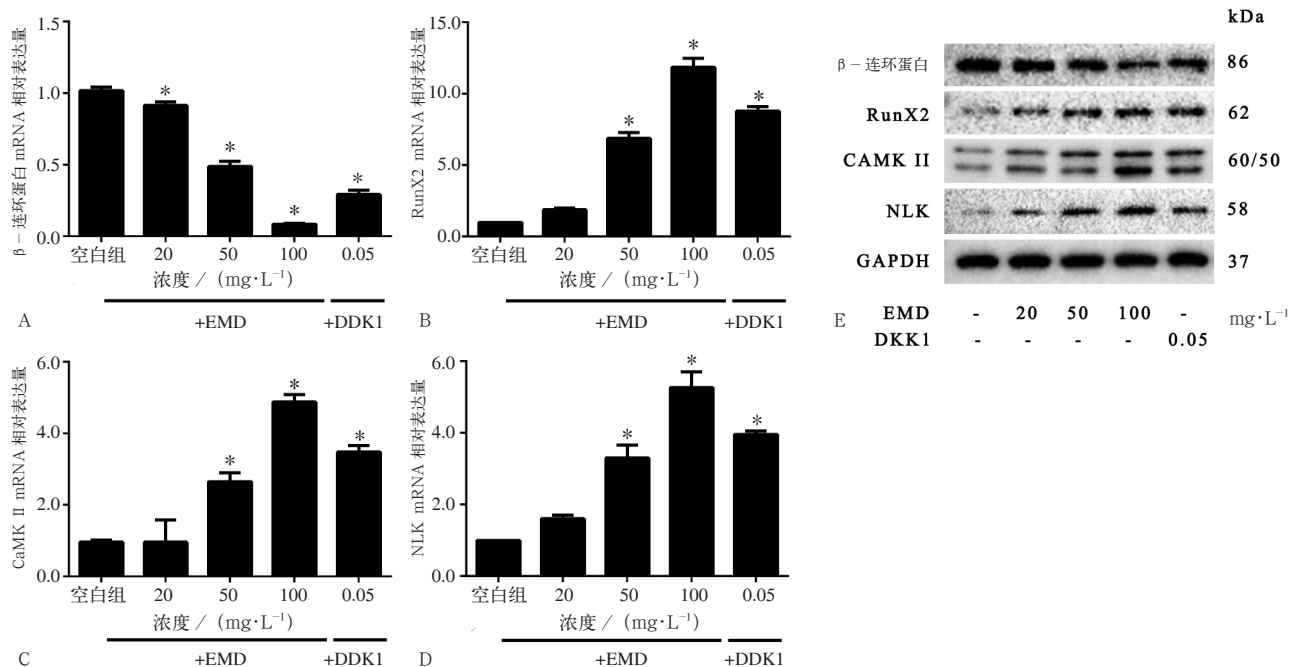
目前针对牙周组织疾病治疗的难点和重点都在于如何有效提升牙槽骨再生的水平。Seo等^[10]于2004年首次从人第三磨牙中分离出牙周膜干细胞, 在一定的培养条件下, 牙周膜干细胞能够分

化为成牙骨质细胞、脂肪细胞和胶原形成细胞。牙槽骨再生需要细胞同时具备较强的矿化能力和胶原合成能力, 牙周膜干细胞移植可以是牙槽骨再生的有效方法^[11]。

Wnt信号通路分为经典的Wnt/β-连环蛋白信号通路和非经典的Wnt/CaMK II/NLK信号通路。目前在干细胞参与成骨分化的过程中研究较多的为

Wnt/ β -连环蛋白信号通路,但是对Wnt/ β -连环蛋白信号通路在人牙周膜干细胞的成骨分化过程中的作用尚有争议^[12-13],有分析称Wnt/ β -连环蛋白信号

通路对人牙周膜干细胞成骨分化的抑制或促进作用可能与细胞生长微环境、生长状态和所受刺激等因素有关。



A: β -连环蛋白 mRNA 相对表达水平; B: RunX2 mRNA 相对表达水平; C: CaMK II mRNA 相对表达水平; D: NLK mRNA 相对表达水平; E: β -连环蛋白、RunX2、CaMK II、NLK 蛋白质表达水平。* $P < 0.05$, 与空白组相比。

图 6 qRT-PCR 和 Western blot 检测牙周膜干细胞 β -连环蛋白、RunX2、CaMK II 及 NLK 的表达

Fig 6 Expression of β -catenin, RunX2, CaMK II and NLK in periodontal ligament stem cells detected by qRT-PCR and Western blot

牙釉质基质蛋白是牙齿发育期间产生的以牙釉蛋白衍生蛋白为主的异质混合物。热处理形式的牙釉质基质蛋白具有调节人牙周膜细胞的间充质和非间充质分化途径的能力^[14],但由于从人牙胚不易获得牙釉质基质蛋白,临床上常用的釉基质衍生物是由猪牙胚中提取得到的釉基质蛋白纯化获得。牙釉质基质蛋白相对容易获得,因此对于釉基质衍生物调节牙周膜干细胞的成骨分化将有助于进一步理解其发挥临床疗效的作用机制,对于釉基质衍生物的广泛临床应用显得意义重大,同时能够为牙周组织缺损的诊疗提供一定参考。

本实验分离出牙周膜干细胞,并提供流式细胞仪鉴定,证明了牙周膜干细胞的干细胞特性。在给予浓度梯度的釉基质衍生物刺激后,细胞增殖能力得到显著提高,同时细胞胶原形成和矿化能力以及成骨细胞相关基因表达也被明显增强,提示釉基质衍生物能够促进牙周膜干细胞的增殖,还能够明显促进其成骨分化,其结论与王爽

等^[15]的发现一致;另外,在浓度梯度釉基质衍生物作用的同时施加 DKK-1,结果显示牙周膜干细胞成骨分化能力被明显抑制,表明抑制 Wnt 信号通路可抑制釉基质衍生物促进牙周膜干细胞成骨分化的能力,进一步表明釉基质衍生物促进牙周膜干细胞分化的作用可能是通过对经典的 Wnt/ β -连环蛋白信号通路的激活,从而使糖原合成酶激酶 (glycogen synthetase kinase, GSK)-3 β 大量被磷酸化,促进 β -连环蛋白在细胞内聚集,并转移至细胞核内与转录因子/淋巴增强因子结合,同时促进下游一系列靶基因的表达,调控了牙周膜干细胞的增殖与分化过程。另一方面,本研究还发现釉基质衍生物能促进 CaMK II、NLK 表达,且其表达也与牙周膜干细胞成骨分化程度呈正相关,DDK-1 作用后, CaMK II、NLK 表达被明显抑制。提示,釉基质衍生物对牙周膜干细胞成骨分化的促进作用也可能涉及非经典的 Wnt/CaMK II/NLK 信号通路。因此,本研究将有助于进一步明确釉基质衍生物促牙周膜干细胞分化的相关机

制,对釉基质衍生物应用于临床治疗牙槽骨再生将能够提供一定理论参考。但由于釉基质衍生物包含多种蛋白质,具体是哪些蛋白质或者哪种蛋白质的某一肽段发挥作用还需要进一步研究。

4 参考文献

- [1] Cochran DL, Wozney JM. Biologic mediators for periodontal regeneration[J]. *Periodontology* 2000, 1999, 19(1): 40-58.
- [2] Vandana KL, Desai R, Dalvi PJ. Autologous stem cell application in periodontal regeneration technique (SAI-PRT) using PDLSCs directly from an extracted tooth—an insight[J]. *Int J Stem Cells*, 2015, 8(2): 235-237.
- [3] Hoang AM, Klebe RJ, Steffensen B, et al. Amelogenin is a cell adhesion protein[J]. *J Dent Res*, 2002, 81(7): 497-500.
- [4] Bosshardt DD, Nanci A. Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth[J]. *J Clin Periodontol*, 2004, 31(3): 184-192.
- [5] Hakki SS, Berry JE, Somerman MJ. The effect of enamel matrix protein derivative on follicle cells *in vitro*[J]. *J Periodontol*, 2001, 72(5): 679-687.
- [6] Reseland JE, Reppe S, Larsen AM, et al. The effect of enamel matrix derivative on gene expression in osteoblasts[J]. *Eur J Oral Sci*, 2006, 114(Suppl 1): 205-211.
- [7] He J, King Y, Jiang J, et al. Enamel matrix derivative inhibits TNF- α -induced apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2005, 99(6): 761-767.
- [8] Hammarström L, Heijl L, Gestrelus S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins[J]. *J Clin Periodontol*, 1997, 24(9 Pt 2): 669-677.
- [9] 毛杰, 周翊飞, 吴晓玲, 等. 雌激素介导下Wnt/ β -catenin信号通路调控人牙周膜干细胞的成骨分化[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(13): 2087-2092.
- [10] Mao J, Zhou YF, Wu XL, et al. Estrogen regulates osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2018, 22(13): 2087-2092.
- [11] Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament[J]. *Lancet*, 2004, 364(9429): 149-155.
- [12] Kim SH, Kim KH, Seo BM, et al. Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model: a pilot study[J]. *J Periodontol*, 2009, 80(11): 1815-1823.
- [13] Song L, Liu M, Ono N, et al. Loss of Wnt/ β -catenin signaling causes cell fate shift of preosteoblasts from osteoblasts to adipocytes[J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(11): 2344-2358.
- [14] 崔晓霞, 杨琨, 伍燕, 等. 糖基化终末产物介导的牙周膜干细胞成骨分化过程中Wnt经典信号通路相关作用机制的研究[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2013, 23(9): 564-568.
- [15] Cui XX, Yang K, Wu Y, et al. Effects of advanced glycation end products on the osteogenic influence of Wnt classic pathway in human periodontal ligament stem cells[J]. *Chin J Conserv Dent*, 2013, 23(9): 564-568.
- [16] Amin HD, Olsen I, Knowles J, et al. Interaction of enamel matrix proteins with human periodontal ligament cells[J]. *Clin Oral Investig*, 2016, 20(2): 339-347.
- [17] 王爽, 丰培勋, 陈悦, 等. 釉基质蛋白衍生物对人牙周膜干细胞分化、增殖的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(23): 3716-3722.
- [18] Wang S, Feng PX, Chen Y, et al. Effect of enamel matrix derivatives on the differentiation and proliferation of human periodontal ligament stem cells[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2015, 19(23): 3716-3722.

(本文编辑 胡兴戎)