

研究论文

过表达*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*对牙髓干细胞 牙向分化的影响

黄义德^{1,2#*} 王放放^{1#} 胡雪峰^{1,2}

(¹福建师范大学生命科学学院, 福州 350108; ²福建师范大学生命科学学院,
福建省发育与神经生物学重点实验室, 福州 350108)

摘要 在组织工程研究领域, 利用干细胞进行牙齿再生是一种途径。目前, 研究认为牙齿的发育过程是上皮与间充质相互诱导的结果, 利用干细胞进行再生牙齿时也需要有上皮源性和间充质源性干细胞的参与。牙髓干细胞是牙齿自体的干细胞, 具有多向分化潜能, 在牙齿再生中是一种理想的间充质源性干细胞。该研究通过慢病毒介导在牙髓干细胞中分别过表达人*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*基因, 研究其对牙向分化的诱导潜能。过表达这三个基因均能显著提高牙髓干细胞碱性磷酸酶的水平, 并且促使牙髓干细胞表达成牙本质细胞标志蛋白——牙本质涎磷蛋白、骨钙素、骨桥素和形成钙化组织。但在诱导牙向分化的能力上, 三个基因有一定的区别。过表达*Msx1*基因对牙髓干细胞体外诱导牙向分化能力最为明显, 其次是*Bmp4*基因, 过表达*Pax9*在促进牙髓干细胞表达骨桥素和钙质形成上不是很显著。

关键词 牙髓干细胞; *Msx1*; *Pax9*; *Bmp4*; 牙向分化

利用干细胞进行再生牙齿的研究需要间充质源性和上皮源性干细胞的参与^[1]。目前, 用于牙齿再生研究的间充质源性成体干细胞主要有骨髓干细胞、脂肪干细胞和牙髓干细胞等^[2-5]。Gronthos等^[6]在2000年从成年人的牙髓中分离出的牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)具有很强的分裂和克隆形成能力, 而且实验结果证实牙髓干细胞具有多向分化潜能。将牙髓干细胞种植到羟磷灰石/三钙磷酸盐(HA/TCP)支架上能够在体内形成牙齿样结构^[7]。因此, 牙髓干细胞具有作为代替牙胚间充质进行牙齿再生的潜能。在利用干细胞进行牙齿再生的研究中, 目前采用的一种技术手段和趋势是: 根据牙齿器官发育过程有关基因调控的机制, 利用分子生物学和组织工程技术, 在体外诱导干细胞的牙齿发育能力, 进而诱导牙齿的再生, 形成能移植到体内的牙胚或再生牙齿^[8-9]。

Msx1、*Pax9*和*Bmp4*是牙齿发育过程中起重要作用的三个基因。小鼠模型的研究表明, 在牙齿发育的起始、蕾状期和帽状期期间*Pax9*在牙间充质中

有强烈表达, *Pax9*缺失会导致小鼠牙齿发育停滞在蕾状期^[10]。人类*Pax9*基因突变导致牙齿的缺失^[11]。在牙齿的发育过程中同源异型框基因*Msx1*是一种重要的转录因子, 与*Pax9*基因相似, 在牙齿发育的早期阶段, *Msx1*在牙间充质中有强烈表达。*Msx1*的缺失会导致磨牙牙胚的发育停滞于蕾状期^[12], 人类*Msx1*基因的突变也会导致先天缺牙^[13]。*Bmp4*是一种重要的生长因子, 参与了许多器官的发育过程。*Bmp4*基因敲除小鼠的胚胎在牙齿发生之前就已死亡^[14]。在牙齿发育的过程中, *Bmp4*最早在牙上皮中表达(E11), 随后*Bmp4*的表达转移到牙间充质(E12)。*Bmp4*表达的转化与牙齿诱导潜能的转变相一致, 表明*Bmp4*是牙齿发育过程中重要的内源性信号分子之一。在体外培养的实验中, *BMP4*可以部分的替代牙上皮的诱导成牙潜能, 诱导牙间充质表达*Msx1*、

收稿日期: 2011-05-07 接受日期: 2011-06-16

福建省自然科学基金(No.2008J04012)资助项目

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0591-22868193, E-mail: ydhuang@fjnu.edu.cn

Msx2、*Lef1*和*Egr1*等转录因子并发生形态变化^[15]。

在这篇文章中,我们利用慢病毒载体在牙髓干细胞中分别过表达*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*三个基因,考察其对牙髓干细胞牙向分化的诱导作用。

1 材料与方法

1.1 材料

三质粒慢病毒系统pNL-IRES2-EGFP、pVSVG和pHelper为美国Tulane大学陈一平博士惠赠。含人*Mxs1*和人*Pax9* cDNA序列的载体pBOT7-hMxs1和pBOT7-hPax9购自Open Biosystems。含人*Bmp4*全长cDNA序列的载体pBluescript II KS-hBmp4为本实验室保存。成人第三磨牙由福建协和医院提供。

α -MEM培养基、D-MEM高糖培养基、Collagenase type I、Dispase购自GIBCO公司;胎牛血清、L-谷氨酰胺购自Hyclone公司;NaCl、KCl、Na₂HPO₄和KH₂PO₄购自SIGMA公司;青霉素、链霉素购自AMRESCO公司;兔抗人骨钙素(osteocalcin) IgG单克隆抗体、鼠抗人牙本质涎蛋白(dentin sialoprotein DSP) IgG单克隆抗体购自Santa Cruz公司;羊抗人骨桥素(osteopontin) IgG单克隆抗体购自R&D公司;HRP偶合二抗和免疫组化检测试剂盒购自北京中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 带GFP报告基因的慢病毒过表达载体pNL-Bmp4-IRES2-EGFP、pNL-Msx1-IRES2-EGFP和pNL-Pax9-IRES2-EGFP的构建 含人*Bmp4* cDNA序列的质粒pBluescript II KS-hBmp4用*Sal* I和*Sac* II进行双酶切,割胶回收目的条带。同时,慢病毒载体pNL-IRES2-EGFP也用*Sal* I和*Sac* II进行双酶切并割胶纯化。将*Sal* I和*Sac* II双酶切后的慢病毒载体pNL-IRES2-EGFP与*Bmp4*片段相连构建过表达载体pNL-Bmp4-IRES2-EGFP。用*Eco*R I和*Xho* I对质粒pBOT7-hMxs1和pBOT7-hPax9进行双酶切,并纯化回收目的片段。慢病毒载体pNL-IRES2-EGFP用*Eco*R I和*Sal* I进行双酶切。因为*Sal* I与*Xho* I是同尾酶,酶切后的目的片段和载体仍可以进行定向克隆。用T4 DNA连接酶连接慢病毒载体和*Msx1*、*Pax9*目的片段,构建过表达载体pNL-Msx1-IRES2-EGFP和pNL-Pax9-IRES2-EGFP。过表达载体中EGFP作为报告蛋白检测目的基因的表达。

1.2.2 慢病毒的生产 用QIAGEN试剂盒(QIAGEN

Plasmid Midi Kit)提取pNL-Bmp4-IRES2-EGFP、pNL-Msx1-IRES2-EGFP、pNL-Pax9-IRES2-EGFP、pNL-IRES2-EGFP、pVSVG和pHelper质粒,定量后-20℃冻存备用。

293T细胞复苏后以 5×10^6 个细胞数接种于10 cm的塑料细胞培养皿,置于37℃,5% CO₂条件下培养。次日,当细胞长到70%~80%丰度时,向细胞培养皿中加入10 μ L的25 mmol/L氯喹,37℃静置45~60 min。分别吸取14.0 μ g pNL-IRES2-EGFP、pNL-Bmp4-IRES2-EGFP、pNL-Msx1-IRES2-EGFP和pNL-Pax9-IRES2-EGFP分别加入到1.5 mL离心管中,同时向每个离心管加入8.2 μ g pHelper和5.7 μ g pVSVG质粒。向每个离心管中加入40 μ L 2.5 mol/L CaCl₂,用pH7.0的TE补加到625 μ L,并混匀。将上述含CaCl₂的质粒混合液逐滴加入625 μ L的HEPES缓冲液(pH7.0)中,混匀,室温静置30 min。将静置后的质粒混合液逐滴加入细胞培养皿中。细胞在37℃,5% CO₂条件下培养10~12 h后弃去培养皿中的转染液,并加入含10%胎牛血清的 α -MEM培养液。每12 h后收集含病毒颗粒的培养液,并加入新鲜的培养液。含病毒颗粒的培养液4℃暂存,在收集三次后进行病毒浓缩。

采用超速离心方法浓缩病毒。三次收集后的含病毒颗粒的培养液于4℃,7 500 r/min离心10 min以去除细胞碎片。将含病毒颗粒的上清转移到超速离心管,4℃,100 000 r/min超速离心2.5 h以沉淀病毒。浓缩后的病毒颗粒分装成20 μ L/管。液氮速冻后置于-80℃保存。

1.2.3 牙髓干细胞最佳感染复数的确定 牙髓干细胞按Gronthos等^[6]建立的方法进行分离。将 $(2\sim 4) \times 10^5$ 个牙髓干细胞接种到3.5 cm细胞培养皿中,细胞培养基成分为含10%胎牛血清的 α -MEM(含2 mmol/L谷氨酰胺,100 U/mL青霉素,100 μ g/mL链霉素)。以不同的感染复数(multiplicity of infection, MOI)值向牙髓干细胞中加入不同量的浓缩病毒液,然后置于37℃,5% CO₂条件下培养过夜。受病毒感染过夜的牙髓干细胞进行换液,并置于37℃,5% CO₂条件下继续培养48 h。倒置荧光显微镜下观察表达EGFP蛋白的牙髓干细胞,确定最佳MOI值。

1.2.4 牙髓干细胞培养与慢病毒转染 本文按不同实验采用两种方法培养和转染牙髓干细胞:(1)贴壁单层培养。将 $(2\sim 4) \times 10^6$ 个牙髓干细胞接种于10 cm塑料细胞培养皿中,加入10 mL含10%胎牛血清 α MEM

细胞培养液, 置于37 °C, 5% CO₂条件下培养。待细胞丰度达到50%时弃去旧的培养液, 加入新鲜的培养液, 以最佳感染复数计算所要加入的病毒量转染牙髓干细胞。每隔三天给细胞换一次液, 细胞连续培养7 d后, Trypsin-EDTA消化液消化细胞。消化后的细胞用于碱性磷酸酶和牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP)基因转录情况检测; (2) 三维球状细胞培养。慢病毒转染后的牙髓干细胞按文献[16]采用三维球状细胞培养法进行体外培养。约1×10⁸个牙髓干细胞放置1.5 mL离心管中, 按照最佳感染复数加入所需病毒液, 补加αMEM细胞培养液至200 μL, 细胞在37 °C, 5% CO₂培养箱转染3 h。转染结束后, 1 000 r/min离心5 min, 弃掉上清。向细胞团块加入新鲜的培养液, 37 °C, 5% CO₂培养箱10 d, 每隔一天更换一次培养液。

1.2.5 碱性磷酸酶活性测定 将原代培养的牙髓干细胞用Trypsin-EDTA消化液消化后接种于96孔培养板, 每孔接种100 μL, 细胞数约为1.0×10⁴个。37 °C, 5% CO₂培养过夜后, 每孔按最佳感染复数计算所要加入的病毒量加入病毒, 转染牙髓干细胞。转染24 h后, 弃去培养液终止感染, 加入新鲜的含10%胎牛血清αMEM细胞培养液。每隔1 d换一次培养液, 持续培养7 d。7 d后, 将96孔板取出, 用PBS缓冲液冲洗细胞3次。每孔加入细胞裂解液(1% NP40, 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl) 100 μL, 充分吹打, 至细胞完全裂解。加入碱性磷酸酶底物pNPP反应混合液, 37 °C孵化60 min, 1 mol/L NaOH终止反应。酶标仪490 nm测吸光值。

1.2.6 RT-PCR检测DSPP基因表达 转染携带有人*Msx1*、*Pax9*、*Bmp4*基因和空载慢病毒载体的牙髓干细胞在培养皿中连续培养7 d后, 细胞用Trypsin-EDTA消化液消化。利用Trizol法提取总RNA, 并合成模板cDNA。利用DSPP特异性引物(上游: 5'-TGG GCA GAA GTA GGA GGG AAG AGT-3'; 下游: 5'-ACG CGT TTG CTT TCT CTA TGG TTG A-3')扩增DSPP片段。扩增条件为: 95 °C 10 min; 94 °C 2 min; 54 °C 20 s; 72 °C 20 s; 72 °C 10 min, 反应35个循环。同时以β-actin作为内参, 扩增β-actin的上游引物为: 5'-TGC TGT CCC TGT ATG CCT CT-3', 下游引物为: 5'-TTT GAT GTC ACG CAC GAT TT-3'。

1.2.7 免疫组化 慢病毒转染后的牙髓干细胞经三维球状培养法培养10 d后, 样品进行免疫组化检

测牙本质标记蛋白骨钙素、牙本质涎蛋白和骨桥素的表达情况。所用一抗的稀释度为: 骨钙素1:100; 牙本质涎蛋白1:100; 骨桥素1:20。

1.2.8 茜素红染色检测钙化情况 三维球状培养法培养后的牙髓干细胞石蜡切片经梯度脱蜡复水后, 浸入1%茜素红溶液30 min。0.2%醋酸溶液冲洗一次, 滤纸吸干。梯度酒精系列脱水, 二甲苯固定, 封片, 显微观察。

2 结果

2.1 *Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*慢病毒过表达载体的构建

将*Pax9*和*Msx1* cDNA序列从质粒pBOT7-h*Pax9*和pBOT7-h*Mxs1* (Open Biosystems)中亚克隆到慢病毒载体pNL-IRES2-EGFP多克隆位点*EcoR* I和*Sal* I之间, 构建成过表达载体pNL-*Pax9*-IRES2-EGFP和pNL-*Msx1*-IRES2-EGFP。将人*Bmp4* cDNA序列从质粒pBluescript II KS-*Bmp4*中亚克隆到慢病毒载体pNL-IRES2-EGFP多克隆位点*Sal* I和*Sac* II上, 构建成过表达载体pNL-*Bmp4*-IRES2-EGFP。构建好的过表达载体测序证实表达序列和表达框均正确。

2.2 慢病毒载体能有效转染牙髓干细胞

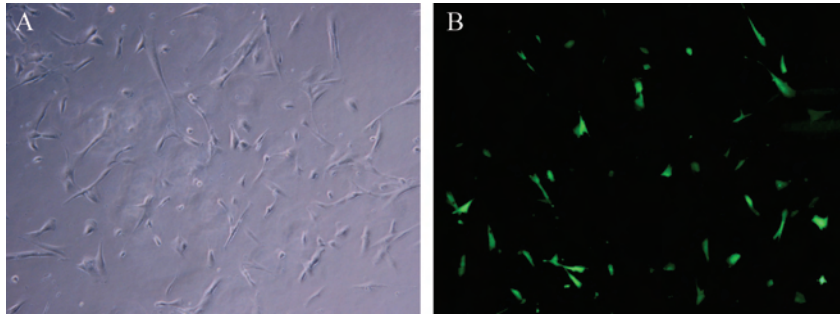
为了确定实验所用慢病毒能有效转染牙髓干细胞, 我们用空载慢病毒载体pNL-IRES2-EGFP来感染P1代的牙髓干细胞, 结果表明慢病毒载体pNL-IRES2-EGFP能有效的转染牙髓干细胞(图1)。

2.3 最佳感染复数的确定

慢病毒转染靶细胞时有一个最佳病毒数与靶细胞数的比值, 也就是感染复数(MOI)。我们用不同感染复数对牙髓干细胞进行转染, 观察报告基因EGFP的表达情况, 结果显示感染复数为50时, 慢病毒能最有效地转染牙髓干细胞(图2)。因此, 在过表达实验中均以感染复数为50的病毒量对牙髓干细胞进行转染。

2.4 过表达人*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*增强牙髓干细胞碱性磷酸酶的表达

过表达人*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*慢病毒和空载病毒载体分别转染96孔板中培养的牙髓干细胞。24 h后终止转染, 继续培养一周后裂解细胞, 检测碱性磷酸酶含量。结果显示, 与没有携带外源基因的空载病毒相比, 过表达*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*均能显著提高牙髓干细胞碱性磷酸酶的表达, 其中过表达*Msx1*基因的牙髓干细胞碱性磷酸酶活性增加最为显著(图3)。



A: 牙髓干细胞明场图片; B: 牙髓干细胞荧光图片, 显示EGFP报告蛋白在牙髓干细胞中的表达。

A: bright field micrograph showing morphology of dental pulp stem cells; B: fluorescence micrograph showing expression of reporter gene *EGFP* in dental pulp stem cells.

图1 慢病毒载体pNL-IRES2-EGFP转染牙髓干细胞

Fig.1 Transfection of lentivirus vector pNL-IRES2-EGFP to dental pulp stem cells

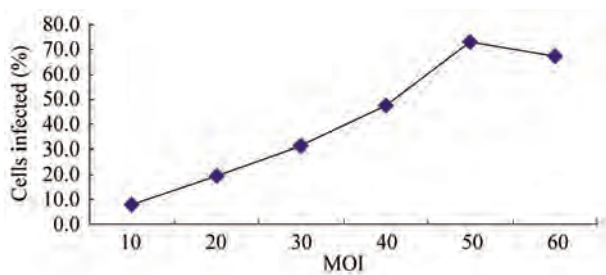


图2 不同感染复数对牙髓干细胞感染率的影响

Fig.2 Effect of different MOI on dental pulp stem cells

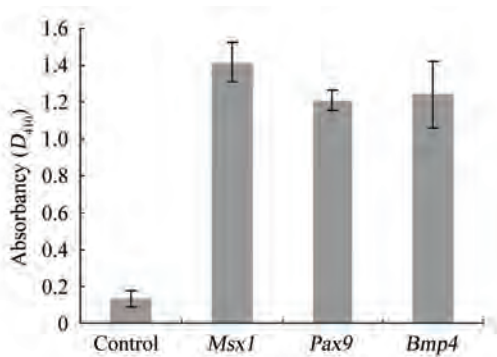
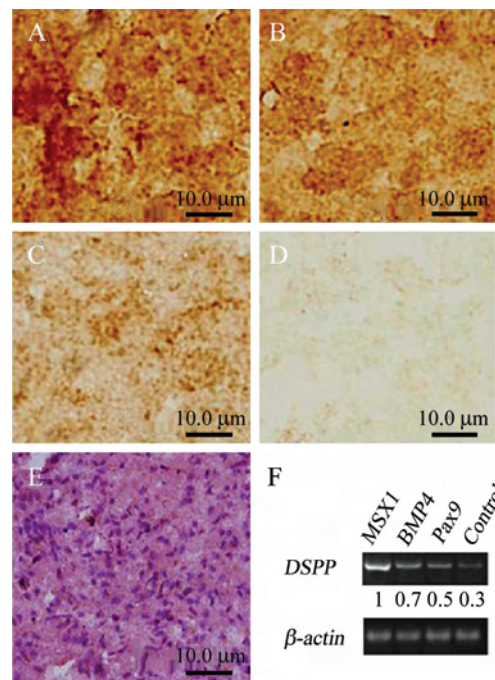


图3 过表达人*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*对牙髓干细胞碱性磷酸酶表达的影响

Fig.3 Effect of human *Msx1*, *Pax9* and *Bmp4* overexpression on alkaline phosphatase activity in dental pulp stem cells

2.5 过表达人*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*牙髓干细胞增强牙本质特异性蛋白牙本质涎蛋白、骨钙素和骨桥素的分泌表达

正在极化的成牙本质细胞、功能型成牙本质细胞和成熟型成牙本质细胞均有强烈的*DSPP*表达,



A: 过表达*Msx1*; B: 过表达*Bmp4*; C: 过表达*Pax9*; D: 转染空载慢病毒pNL-IRES2-EGFP; E: 该组切片的HE染色; F: RT-PCR检测结果。

A: *Msx1* overexpressing cells; B: *Bmp4* overexpressing cells; C: *Pax9* overexpressing cells; D: cells infected by lentivirus pNL-IRES2-EGFP as negative control; E: H&E staining; F: RT-PCR analysis of the expression of *DSPP* gene.

图4 过表达人*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*对牙髓干细胞*DSPP*表达的影响

Fig.4 Effect of human *Msx1*, *Pax9* and *Bmp4* overexpression on the expression of *DSPP* in dental pulp stem cells

*DSPP*表达可作为成牙本质细胞分化成熟的标志。在过表达*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*的牙髓干细胞中, 通过RT-PCR的方法我们首先检测*DSPP* mRNA的转录情

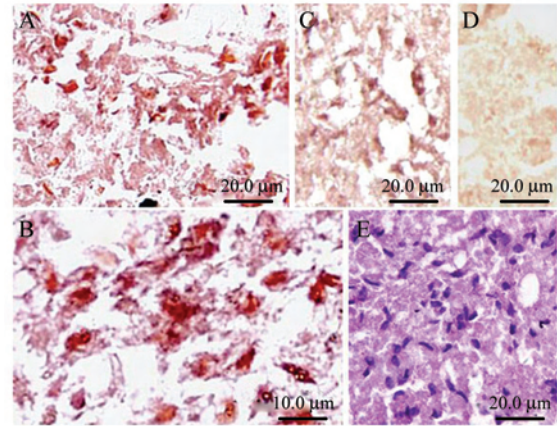
况, 与对照组相比, *DSPP* mRNA的转录水平均有所增加, 其中过表达*Msx1*基因*DSPP*转录水平增加最为明显, 其次是过表达*Bmp4*和*Pax9*(图4F)。

*DSPP*是成牙本质细胞分泌的一种前体蛋白, 随后被割裂生成两种蛋白产物: 牙本质涎蛋白(dentin sialoprotein, DSP)和牙本质磷蛋白(dentin phosphoprotein, DPP)。利用DSP抗体检测三维培养的牙髓干细胞, 结果发现DSP的表达量明显增加。在三个过表达基因中, 过表达*MSX1*的牙髓干细胞DSP的表达量增加最大, 其次是过表达*Bmp4*基因, 过表达*Pax9*的牙髓干细胞DSP的表达量增加较少。免疫组化的结果与RT-PCR结果相互吻合(图4)。

除DSP外, 骨钙素和骨桥素作为牙本质细胞外基质的成份存在于牙本质中, 也是成牙本质细胞分化的重要指标之一。通过免疫组化技术我们检测了骨钙素和骨桥素在过表达*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*的牙髓干细胞中的表达情况。结果显示, 过表达三个基因均能明显增强牙髓干细胞骨钙素的表达, 其中, *Msx1*和*Bmp4*增强程度比*Pax9*更为明显(图5)。在表达*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*三个基因中, *Msx1*和*Bmp4*能显著增强牙髓干细胞骨桥素的表达, *Pax9*对牙髓干细胞骨桥素的表达增强不是很明显(图5)。

2.6 过表达人*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*促进牙髓干细胞钙化

利用茜素红S染色来进一步检测三维培养牙髓干细胞有无钙化及钙化沉积的程度。结果显示过表达人*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*均能增加牙髓干细胞的钙



A: 过表达*Bmp4*; B: 过表达*Msx1*; C: 过表达*Pax9*; D: 转染空载慢病毒; E: HE染色。

A: *Msx1* overexpressing cells; B: *Bmp4* overexpressing cells; C: *Pax9* overexpressing cells; D: cells infected by lentivirus pNL-IRES2-EGFP as control; E: H&E staining.

图6 过表达人*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*对牙髓干细胞钙化的影响
Fig.6 Effect of human *Msx1*, *Pax9* and *Bmp4* overexpression on the formation of calcified tissues in dental pulp stem cells

化沉积, 其中过表达*Msx1*和*Bmp4*基因的牙髓干细胞钙化明显(图6)。

3 讨论

干细胞是一类能进行自我更新的多潜能细胞, 在一定条件下, 如在某些生长因子的诱导下或在特定的微环境中, 可以分化成特定的功能性细胞。一直以来, 人们希望利用干细胞的多能性使干细胞形成所需的特定类型的细胞、组织甚至器官, 用来治

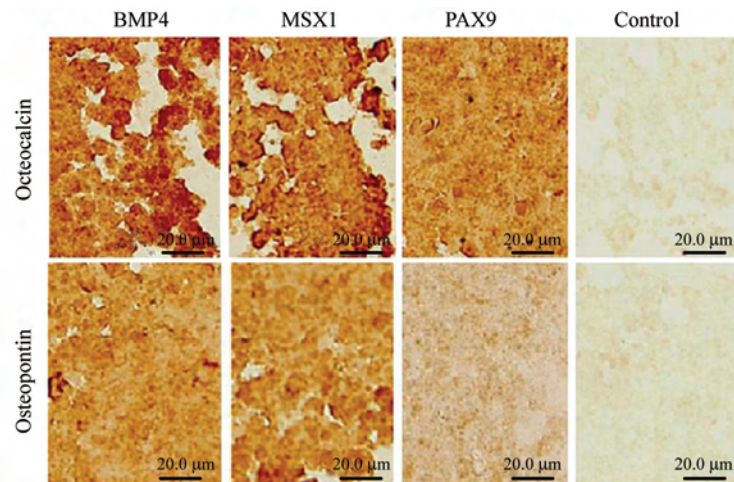


图5 过表达人*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*对牙髓干细胞骨钙素和骨桥素表达的影响

Fig.5 Effect of human *Msx1*, *Pax9* and *Bmp4* overexpression on the expression of osteocalcin and osteopontin in dental pulp stem cells

疗疾病或修复受损的组织和器官。要实现干细胞的这些功能,涉及到对干细胞的定向诱导分化。干细胞的定向诱导分化已经在脂肪干细胞、神经干细胞、骨髓干细胞、牙髓干细胞等许多成体干细胞中广泛开展^[2-5,17-18]。近年来也有不少体外诱导牙髓干细胞牙向分化的研究,主要通过两种手段进行。一种是向培养的牙髓干细胞添加牙向分化中起重要作用的生长因子,诱导牙髓干细胞牙向分化^[19]。另一种是在牙髓干细胞中过表达牙齿发育过程中重要的基因,使牙髓干细胞定向分化^[20]。两种方法均有报道牙髓干细胞体外诱导后能形成牙本质样细胞结构,但均不能替代有诱导能力的牙间充质形成牙齿的结构。

在这篇文章中,我们在牙髓干细胞中过表达牙齿发育过程中起重要作用的三个基因——*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*,研究其对牙髓干细胞牙向分化的诱导潜能。本文主要采取三维培养的方法培养转染目的基因的牙髓干细胞。研究表明三维培养法能够形成细胞与细胞、细胞与基质间相互作用,而且三维培养中细胞分泌的胞外基质能作为天然的支架支持细胞的生长与分化^[16]。与传统的体外单层培养皿培养相比,三维培养提供了一个与体内更相似的细胞间或细胞与间质间相互作用的环境。

过表达*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*基因的牙髓干细胞显示碱性磷酸酶的水平有显著的增加。碱性磷酸酶是成骨细胞与成牙本质细胞分化的早期标志物,对钙组织的形成起重要作用^[21]。碱性磷酸酶表达的增加表明过表达*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*基因促进牙髓干细胞的分化。对三维培养的牙髓干细胞钙化沉积检测表明,过表达*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*的基因钙化沉积明显。RT-PCR结果表明,三维培养的牙髓干细胞*DSPP*基因的转录水平显著增加,其中过表达*Msx1*增加最为明显,约是对照的3.3倍(图4F)。*DSPP*表达是成牙本质细胞分化成熟的特征性的一个重要标志物。DSP蛋白(DSPP前体蛋白加工的两个成熟蛋白之一)免疫组化检测与RT-PCR结果一致,过表达*Msx1*增加最为明显。DSPP检测结果显示,在促进牙髓干细胞牙向分化上,*Msx1*和*Bmp4*的能力比*Pax9*更强。这点在对另两个成牙本质细胞标志蛋白——骨桥素和骨钙素的检测中得到进一步证实(图5和图6)。细胞培养水平上表明,过表达*Msx1*、*Pax9*和

*Bmp4*可使牙髓干细胞不同程度的向成牙本质细胞分化,但是否过表达*Msx1*、*Pax9*和*Bmp4*的牙髓干细胞具有牙齿诱导能力,还有待进一步体内重组实验的研究。

参考文献 (References)

- 1 Duailibi SE, Duailibi MT, Vacanti J, Yelick PC. Prospects for tooth regeneration. *Periodontology* 2000; 41: 177-87.
- 2 Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res* 2004; 83(7): 518-22.
- 3 Jing W, Wu L, Lin Y, Liu L, Tang W, Tian W. Odontogenic differentiation of adipose-derived stem cells for tooth regeneration: Necessity, possibility, and strategy. *Med Hypotheses* 2008; 70(3): 540-2.
- 4 Wu L, Zhu F, Wu Y, Lin Y, Nie X, Jing W, et al. Dentin sialophosphoprotein-promoted mineralization and expression of odontogenic genes in adipose-derived stromal cells. *Cells Tissues Organs* 2008; 187(2): 103-12.
- 5 Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: A cell source for tissue repair. *J Cell Physiol* 2006; 208(2): 319-25.
- 6 Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(25): 13625-30.
- 7 Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81: 531-5.
- 8 Zhang Y, Chen Z, Song Y, Liu C, Chen Y. Making a tooth: Growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Res* 2005; 15: 301-16.
- 9 Chai Y, Slavkin HC. Prospects for tooth regeneration in the 21st century: A perspective. *Microsc Res Tech* 2003; 60: 469-79.
- 10 Peters H, Neubuser A, Kratochwil K, Balling R. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev* 1998; 12(17): 2735-47.
- 11 Schuffenhauer S, Leifheit HJ, Lichtner P, Peters H, Murken J, Emmerich P. *De novo* deletion (14)(q11.2q13) including PAX9: Clinical and molecular findings. *J Med Genet* 1999; 36(3): 233-6.
- 12 Satokata I, Mass R. MSX1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet* 1994; 6(4): 348-56.
- 13 Vastardis H, Karimbox N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman CE. A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet* 1996; 13(4): 417-21.
- 14 Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BLM. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 1995; 9: 2105-16.
- 15 Chen YP, Bei M, Woo I, Satokata I, Mass R. Msx1 controls in-

- ductive signaling in mammalian tooth morphogenesis. *Development* 1996; 122: 3035-44.
- 16 Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res* 2004; 83(8): 590-5.
- 17 Xu Y, Liu L, Li Y, Zhou C, Xiong F, Liu Z, *et al.* Myelin-forming ability of Schwann cell-like cells induced from rat adipose-derived stem cells *in vitro*. *Brain Res* 2008; 1239: 49-55.
- 18 Daadi MM. *In vitro* assays for neural stem cell differentiation: Induction of dopaminergic phenotype. *Methods Mol Biol* 2008; 438: 205-12.
- 19 He H, Yu J, Liu Y, Lu S, Liu H, Shi J, *et al.* Effects of FGF2 and TGF β 1 on the differentiation of human dental pulp stem cells *in vitro*. *Cell Biology International* 2008; 32: 827-34.
- 20 He F, Yang Z, Tan Y, Yu N, Wang X, Yao N, *et al.* Effects of Notch ligand Delta1 on the proliferation and differentiation of human dental pulp stem cells *in vitro*. *Arch Oral Biol* 2009; 54(3): 216-22.
- 21 Beck GR Jr, Zerler B, Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(15): 8352-7.

Induction of Dental Pulp Stem Cell Odontogenic Differentiation by Over-expression of *Msx1*, *Pax9* and *Bmp4*

Huang Yide^{1,2#*}, Wang Fangfang^{1#}, Hu Xuefeng^{1,2}

(¹College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China; ²College of Life Science, Fujian Normal University, Fujian Key Laboratory of Developmental and Neuro Biology, Fuzhou 350108, China)

Abstract Tooth regeneration based on stem cells is a promising biological strategy in tissue engineering. Studies showed that odontogenesis involves in epithelial-mesenchymal interaction in developing embryo, tooth regeneration using stem cells also requires both epithelium-derived stem cells and mesenchyme-derived stem cells. In recent studies, dental pulp stem cell (DPSC), which were isolated from dental pulp tissues, showed excellent pluripotency potential, and might be used as suitable mesenchyme-derived stem cells for tooth regeneration. In order to induce DPSCs into odontogenic lineage, we over-expressed *Msx1*, *Pax9* and *Bmp4* by lentivirus-mediated method in DPSCs, respectively. Our results showed that over-expression of *Msx1*, *Pax9* and *Bmp4* induced expression of dentin sialoprotein, osteocalcin and osteopontin, differentiation markers for odontoblasts, formed mineralized tissues, and all led to an elevated alkaline phosphatase in DPSCs *in vitro*. The ability to induce differentiation of DPSCs into odontoblasts has some difference for *Msx1*, *Pax9* and *Bmp4*. Over-expression of *Msx1* had the most effective induction on odontogenic differentiation in DPSCs *in vitro*, the second was over-expression of *Bmp4*, *Pax9*-expressing DPSCs didn't obviously express osteopontin and form calcified tissues.

Key words dental pulp stem cell; *Msx1*; *Pax9*; *Bmp4*; odontogenic differentiation

Received: May 7, 2011 Accepted: June 16, 2011

This work was supported by Fujian Provincial Natural Science Foundation of China (No.2008J04012)

#These two authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: 86-591-22868193, E-mail: ydhuang@fjnu.edu.cn