

过表达 β -catenin诱导人表皮干细胞向成釉质细胞分化

王冰梅* 刘 英 林 鑫 曾金镇 柳志坚

(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 人表皮干细胞可作为上皮源性的成体干细胞可应用于人类牙齿再生, 但是其诱导效率较低。该研究利用过表达手段上调Wnt/ β -catenin信号通路核心因子 β -catenin在人表皮干细胞的表达, 以期提高诱导其向成釉质细胞分化的效率。分别构建 β -catenin和 β -catenin(S33Y)基因的慢病毒载体, 转染293T细胞生产病毒液并感染人表皮干细胞, 采用Western blot检测人表皮干细胞感染后 β -catenin的蛋白表达水平; 然后与具有诱导成牙潜能的小鼠牙胚间充质进行重组, 移植裸鼠体内培养; 嵌合体组织切片染色和免疫组化检测形成牙齿的效率(成牙率)和成釉质细胞分化的效率(成釉率)。结果显示, 过表达 β -catenin的人表皮干细胞的重组嵌合体的成釉率提高至100%。提示, 过表达 β -catenin可诱导人表皮干细胞向成釉质细胞分化。

关键词 人表皮干细胞; 牙齿再生; Wnt/ β -catenin信号; β -catenin(S33Y)

Induction of Human Keratinocytes into Ameloblasts through Overexpression of β -catenin

Wang Bingmei*, Liu Ying, Lin Xin, Zeng Jinzhen, Liu Zhijian

(Fujian Key Laboratory of Developmental and Neural Biology, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China)

Abstract Human keratinocyte stem cells can be used as epithelial adult stem cells in human tooth regeneration. But the tooth formation rate is relatively low. In this study, we aimed to overexpress β -catenin in human keratinocyte stem cells to improve its tooth formation rate. β -catenin and β -catenin(S33Y) gene coding region was respectively inserted into lentivirus vector and transfected in 293T cells to produce the recombinant lentivirus, then the lentivirus infected human keratinocyte stem cells to up-regulate the expression of β -catenin. The human keratinocyte stem cells were recombined with mouse embryonic dental mesenchyme possessing odontogenic potential. Histology and immunohistochemistry staining were used to detect tooth formation (tooth formation rate) of the chimeric tooth and the efficiency of human keratinocyte stem cells differentiation into ameloblasts (ameloblasts differentiation rate). The data showed that the ameloblasts differentiation rate of the chimeric tooth was increased to 100%. These results indicated that the over-expression of β -catenin in human keratinocyte stem cells could induce them into ameloblasts.

Key words human keratinocytes; tooth regeneration; Wnt/ β -catenin signaling; β -catenin(S33Y)

收稿日期: 2014-05-11 接受日期: 2014-06-17

国家自然科学基金青年科学基金项目(批准号: 81200761)、教育部博士点基金项目(批准号: 20123503120005)、福建省自然科学基金项目(批准号: 2011J01146)、福建省教育厅科技项目(批准号: JA12081)和福建师范大学优秀青年骨干教师培养基金(批准号: fjsdj2012077)资助的课题

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

Received: May 11, 2014 Accepted: June 17, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81200761), Doctoral Program of Higher Education of China (Grant No.20123503120005), Natural Science Foundation of Fujian Province (Grant No.2011J01146), Scientific Research Fund of Fujian Provincial Education Department (Grant No.JA12081) and Excellent Young Key Teachers Program of Fujian Normal University (Grant No.fjsdj2012077)

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

网络出版时间: 2014-07-10 16:08 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.08.0165.html>

牙齿发育是外胚层来源的上皮细胞与颅神经嵴来源的间充质细胞相互作用相互诱导的过程^[1-2]。牙上皮细胞随着牙釉质的分泌而逐渐凋亡^[3], 在成体牙齿中不存在牙源性上皮细胞, 因此寻找上皮源性的成体干细胞应用于牙齿再生仍然是该领域的难题之一。我们的前期研究表明, 在具有成牙潜能的小鼠牙胚间充质的诱导下, 成纤维生长因子8(fibroblast growth factors 8, FGF8)可诱导人表皮干细胞向成釉质细胞分化^[4], 但是形成牙齿的效率(成牙率)以及人表皮干细胞分化形成成釉质细胞并分泌釉质的效率(成釉率)很低。原因可能是仅单一的FGF8成牙信号因子无法完全满足人表皮干细胞分化形成成釉质细胞。

Wnt信号通路是真核生物中高度保守的信号通路, 其经典信号即Wnt/ β -catenin信号通路在细胞增殖分化以及器官形成等胚胎发育过程中发挥重要的调控作用^[5-6]。 β -联蛋白(β -catenin)是Wnt/ β -catenin信号通路调控的核心分子。当胞外不存在Wnt信号时, 胞内 β -catenin与结肠腺瘤样息肉(Adenomatous polyposis coli, Apc)、轴蛋白(Axin)、糖原合酶激酶3(Gsk3 β)形成复合体, β -catenin被Gsk3 β 磷酸化, 并被蛋白酶体降解, 因此 β -catenin无法入核激活下游基因的转录。当胞外存在较高水平的Wnt信号时, 胞外信号传导入胞内, 引起 β -catenin/Apc/Axin/Gsk3 β 复合体的降解, β -catenin游离并在细胞质积累, 转位入核激活下游靶基因的表达^[7-9]。而且已有文献报道, β -catenin的氨基酸序列上第33位的丝氨酸(S)是其磷酸化的位点, 当第33位的丝氨酸(S)突变成酪氨酸(Y), 即 β -catenin(S33Y), 将导致 β -catenin不能被磷酸化降解, 细胞中大量存在 β -catenin, Wnt/ β -catenin信号通路持续激活^[10]。因此, 通过上调细胞中 β -catenin(S33Y)基因的表达, 可持续地激活Wnt/ β -catenin信号通路。

Wnt/ β -catenin信号通路在小鼠牙齿发育过程具有重要调控作用。无论是在口腔上皮过表达效应因子(β -catenin), 还是敲除抑制因子(Apc)均会使小鼠形成异位牙齿, 导致牙齿数目的增多^[11-15]。研究表明, Wnt/ β -catenin信号通路在牙上皮分化过程发挥重要作用。另有文献报道, FGF8是Wnt/ β -catenin信号通路的直接下游基因之一^[11,16]。因此本研究利用慢病毒表达系统具有能够长期稳定过表达目的基因的优点, 介导Wnt/ β -catenin信号通路的核心基因 β -catenin及其突变基因 β -catenin(S33Y)在人表皮干细胞中过

表达, 从而提高其Wnt/ β -catenin信号活性, 激活级联反应(cascade), 产生连锁效应, 以期提高诱导人表皮干细胞向成釉质细胞分化的效率。研究结果为利用人表皮干细胞作为上皮源性成体干细胞应用于人类牙齿再生提供更多数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 生物材料、质粒和菌种 包皮组织取自福建省福州儿童医院的包皮环切手术的弃废材料, 患者年龄在5~12岁, 所有标本均得到患者本人或家属知情同意, 按福建师范大学动物伦理委员会的相关规定执行。

10周龄雌性和12周龄雄性昆明小鼠以及10周龄Blab/c裸鼠均购买于上海斯莱克公司。

pcDNA3-S33Y Beta-catenin质粒购自ADDGENE公司; PNL-IRES2-EGFP慢病毒空载体质粒、慢病毒包装辅助质粒(pHelper和pVSVG)和pBluscript- β -catenin质粒为本实验保存; DH5 α 大肠杆菌为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 Keratinocyte Serum-free medium (KFSM)购自GIBCO公司; 胰蛋白酶/EDTA和Dispase购自R&D公司; 青霉素/链霉素购自Amresco公司; K14鼠抗人多克隆抗体、K19鼠抗人多克隆抗体、CD29鼠抗人多克隆抗体和Ameloblastin羊抗人多克隆抗体购自Santa Cruz公司; 人MHC抗体购自BioLegend公司; FITC标记的山羊抗小鼠购自NEOMARKERS公司; 山羊超敏二步法免疫组化检测试剂和DAB显色试剂盒购自中杉金桥公司; 蛋白质Marker购自TaKaRa公司。

1.2 方法

1.2.1 人表皮干细胞的分离培养及细胞免疫荧光 表皮干细胞的分离和培养具体步骤如下: 将手术切除的小儿包皮在Dispase II中4 °C消化过夜, 用尖镊分离表皮与真皮, 将分离下的表皮剪碎并用胰蛋白酶37 °C处理15 min, 将其消化成单细胞悬液, 离心后用KFSM无血清培养液悬浮细胞, 大约 2×10^6 细胞接种于6 cm培养皿, 6 h后吸弃上清培养液, 添加新鲜KFSM无血清培养液。之后隔天半量换液, 当细胞密度为50%以上时每天换液, 通过提高接种密度、保持较低Ca²⁺浓度等维持表皮干细胞的未分化状态。

细胞免疫荧光检测按以下步骤进行: 细胞传代

时, 在新培养皿中放入灭菌的盖玻片; 当细胞爬片至盖玻片面积的30%~40%时, 将盖玻片取出, PBS清洗2次; 加入预冷4% PFA固定30 min; PBS清洗3次; 37 °C, 血清封闭1 h; 加入K14、K19或CD29一抗(按说明书比例稀释)过夜; PBS清洗2次; 加入二抗(按说明书比例稀释) 37 °C 1 h(如果非荧光二抗另需加入DAB显色液, 详见说明书); PBS清洗2次; 封片, 采用激光共聚焦显微镜(Nikon, C1-Si)拍照。

1.2.2 β -catenin和 β -catenin(S33Y)慢病毒载体的构建 利用 β -catenin引物从本实验室前期已构建的pBluscript- β -catenin质粒以及从公司购买的pcDNA3-S33Y Beta-catenin质粒中分别扩增出带酶切位点的 β -catenin条带和 β -catenin(S33Y)条带。PCR片段和pNL-IRES2-EGFP慢病毒空载体质粒分别进行双酶切后连接, 然后转化大肠杆菌DH5 α , 挑选单克隆进行PCR、酶切鉴定和DNA测序, 鉴定阳性克隆即为构建成功的pNL- β -catenin-IRES2-EGFP和pNL- β -catenin(S33Y)-IRES2-EGFP慢病毒质粒。引物序列如下: β -catenin上游引物: 5'-CGT CGA CCC AGC GTG GAC AAT GGC TAC T-3', β -catenin下游引物: 5'-CGG GAT CCG GGC CCT CTA GAT GCA TGC TC-3'。

1.2.3 慢病毒包装 慢病毒质粒10 μ g pNL-IRES2-EGFP(或11 μ g pNL- β -catenin-IRES2-EGFP或11 μ g pNL- β -catenin(S33Y)-IRES2-EGFP)与另外两种病毒包装辅助质粒(7 μ g pHelper和6 μ g pVSVG)混匀, 再加入45 μ L 2.5 mol/L CaCl₂, 用TE补至总体积625 μ L; 然后逐滴加入等体积的Hepes缓冲液, 室温下孵育20 min。将上述混合液滴加入293T细胞的培养液中, 于37 °C、5% CO₂培养箱中培养12 h, 换新鲜的高糖DMEM培养液, 继续培养24 h, 然后收集上清液离心过滤, 收获较高纯度的病毒并检测滴度。

1.2.4 慢病毒感染人表皮干细胞 人表皮干细胞密度达40%~50%时, 加入慢病毒进行感染实验。实验分成3个组, 分别为EGFP组(空载体感染组)、 β -catenin感染组(pNL- β -catenin-IRES2-EGFP慢病毒载体)和 β -catenin(S33Y)感染组(pNL- β -catenin(S33Y)-IRES2-EGFP慢病毒载体)。参照预实验的最佳感染复数, 在人表皮干细胞中加入病毒液。感染14 h后换液, 36 h可以在荧光显微镜下观察GFP的表达, 确定感染率。

1.2.5 感染细胞的Western blot检测 收集感染的人表皮干细胞, 按照RIPA总蛋白提取试剂盒说明书

提取细胞总蛋白, BCA法检测蛋白浓度。12% SDS-PAGE凝胶电泳, 转移蛋白至PVDF膜。根据蛋白Marker的位置裁剪所需目的蛋白和内参条带对应的膜, 5% BSA封闭后分别用兔抗人 β -catenin(1:500)多克隆抗体孵育过夜, 次日用绿色荧光二抗避光孵育2 h, β -actin抗体(1:3 000)同上操作, 作为上样内参。在凝胶成像系统上观察目的条带, 拍照并分析。利用目的蛋白与 β -actin的灰度值之比计算 β -catenin表达量。

1.2.6 小鼠牙胚间充质的分离、嵌合体重组和移植 在解剖镜下用尖镊取下第13.5 d(E13.5)小鼠胚胎头部并分离下颌。将下颌放置于2 U/mL的Dispase II中37 °C消化10 min, 吸弃消化液后用PBS清洗, 加入含有10%胎牛血清的DMEM终止消化5~10 min。在解剖镜下利用显微外科尖镊, 在磨牙位置先将口腔上皮和牙上皮从下颌表面剥离, 再将磨牙牙胚间充质从下颌弓区域分离出来。

将小鼠牙胚间充质转移到0.45 μ m的滤膜上(保持牙胚的口腔面向上), 同时刮下人表皮细胞, 使其形成膜片平整的覆盖在牙胚间充质上。将载有重组组织块的滤膜转移到Trowell器官培养皿内, 加入含有10%胎牛血清的DMEM并调节液面高度, 使其淹没重组组织块的1/2, 在37 °C、5% CO₂培养箱内过夜。次日, 将嵌合体移植至麻醉的裸鼠肾囊膜下, 肾脏复位, 缝合创口。将裸鼠继续培养20 d左右。

1.2.7 组织切片和HE和AZAN染色 将在裸鼠肾囊膜下培养20 d的重组嵌合体取出并置于4%多聚甲醛固定过夜; 然后4 °C条件下用脱钙液进行脱钙, 脱钙液隔天换一次, 直至组织块变软; 梯度酒精进行组织块脱水, 无水乙醇脱水两次, 每次1 h; 50%无水乙醇和50%二甲苯混合液透明0.5 h, 二甲苯透明; 石蜡包埋; 待石蜡凝固后即可进行切片、贴片。HE染色过程: 二甲苯脱蜡两次, 每次10 min; 梯度酒精复水, 蒸馏水清洗, 苏木精3~5 min, 自来水蓝化, 蒸馏水清洗, 伊红1 min, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封片, 待其干燥后镜检拍照。Azan染色过程: 二甲苯脱蜡, 梯度酒精复水, 蒸馏水清洗, 苯胺酒精45 min, 酸酒精2 min, 偶氮卡红, 56 °C, 60 min, 双蒸水漂洗, 苯胺酒精分化, 即进即出, 酸酒精2 min, 磷钨酸3 h, 双蒸水漂洗, 苯胺蓝40 min, 双蒸水漂洗, 磷钨酸5 min, 双蒸水漂洗, 酸水2 min, 脱水、透明和封片。

1.2.8 组织切片的免疫组化检测 石蜡切片置于二甲苯脱蜡, 梯度酒精复水, 水洗; 预冷4%多聚甲醛

固定20 min。吸弃多聚甲醛, 室温PBS漂洗3次, 每次5 min; 3%过氧化氢孵育10 min, 以阻断内源性过氧化物酶; PBS漂洗3次, 每次5 min; 血清室温封闭1 h; 滴加稀释浓度适宜的Ameloblastin或MHC一抗, 4 °C过夜; PBS漂洗3次, 每次5 min; 滴加稀释浓度的二抗, 37 °C避光孵育1 h; PBS避光漂洗3次, 每次5 min; DAB显色; 双蒸水漂洗; 脱水、透明和封片。

2 结果

2.1 人表皮干细胞的分离培养及鉴定

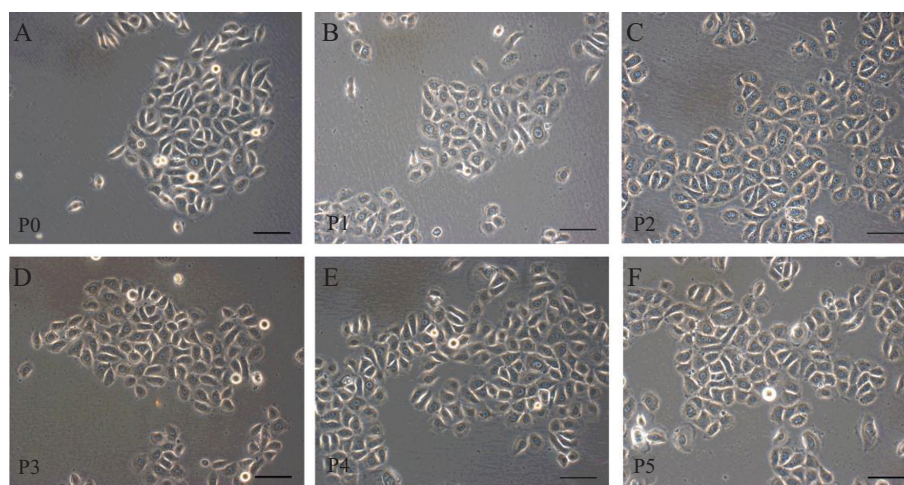
分离培养的表皮细胞呈铺路石状的贴壁生长, 培养10 d左右细胞可铺满整个培养皿。目前分离得到的原代表皮细胞可传代至少9次。其中第5代 (passage, P) 之前的细胞形态较立体, 光泽度好(图1), 因此本研究采用P3~P4的表皮细胞作为实验材料。

此外分离培养传代后的表皮细胞经液氮冻存后复苏, 仍然保持良好的生长状态。

利用免疫荧光技术检测表皮干细胞表面标识分子K14、K19和CD29^[17-18]在分离培养的表皮细胞的表达情况。结果显示, K14、K19和CD29在表皮细胞均呈阳性表达(图2)。结果表明, 分离培养的表皮细胞具有人表皮干细胞的特性。

2.2 重组慢病毒载体的构建及鉴定

用引物 β -catenin分别从pBluscript- β -catenin质粒和pcDNA3-S33Y Beta-catenin质粒扩增 β -catenin和 β -catenin(S33Y)全长片段, 扩增长度均约为2 400 bp。将片段分别双酶切后连接至利用相应酶进行双酶切的慢病毒空载体pNL-IRES2-EGFP, 得到pNL- β -catenin-IRES2-EGFP和pNL- β -catenin(S33Y)-IRES2-EGFP重组质粒。用PCR和双酶切鉴定上述两种重

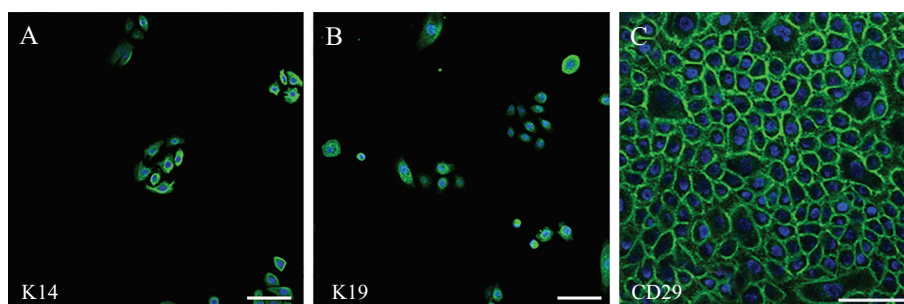


A~F: P0~P5的细胞形态。标尺=100 μ m。

A~F: morphological characterization of human keratinocytes of P0~P5. Scale bars=100 μ m.

图1 人表皮细胞的P0~P5形态图

Fig.1 Morphology of P0-P5 human keratinocytes



A: K14免疫荧光, 阳性; B: K19免疫荧光, 阳性; C: CD29免疫荧光, 阳性; DAPI复染, 蓝色; 标尺=100 μ m。

A: the cells were positive for K14 by immunofluorescence; B: the cells were positive for K19 by immunofluorescence; C: the cells were positive for CD29 by immunofluorescence; the cells were stained with DAPI. Scale bars=100 μ m.

图2 人表皮干细胞的鉴定

Fig.2 Identification of surface marker of human keratinocytes

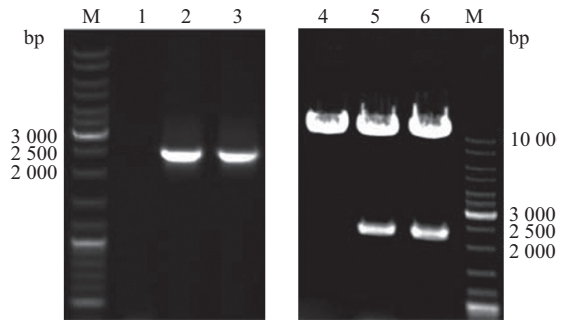
组质粒, 阳性克隆的PCR片段大小均约为2 400 bp, 而空载体克隆没有PCR条带产生; 阳性克隆的酶切产物具有约为10 500 bp和2 400 bp的两个条带(图3), 空载体克隆仅有10 500 bp的条带。证明所构建的质粒符合预期, 且测序结果也说明质粒构建的正确性。

2.3 慢病毒的包装及感染人表皮干细胞

将pNL- β -catenin-IRES2-EGFP和pNL- β -catenin(S33Y)-IRES2-EGFP分别与辅助包装质粒共转染293T细胞, 终止反应24, 48, 72 h后分别收集细胞上清液作为病毒原液进行浓缩; 浓缩病毒液感染表皮干细胞, 感染效率约85%。从感染的表皮干细胞中筛选出稳定株, 且冻存复苏后细胞状态保持良好, 保持荧光蛋白基因表达强度基本不变(图4A~图4D)。空载体组细胞荧光较强, 感染效率达95%以上(图4E~图4F)。

2.4 Western blot检测感染的人表皮干细胞 β -catenin蛋白的表达

利用Western blot技术检测 β -catenin感染组、

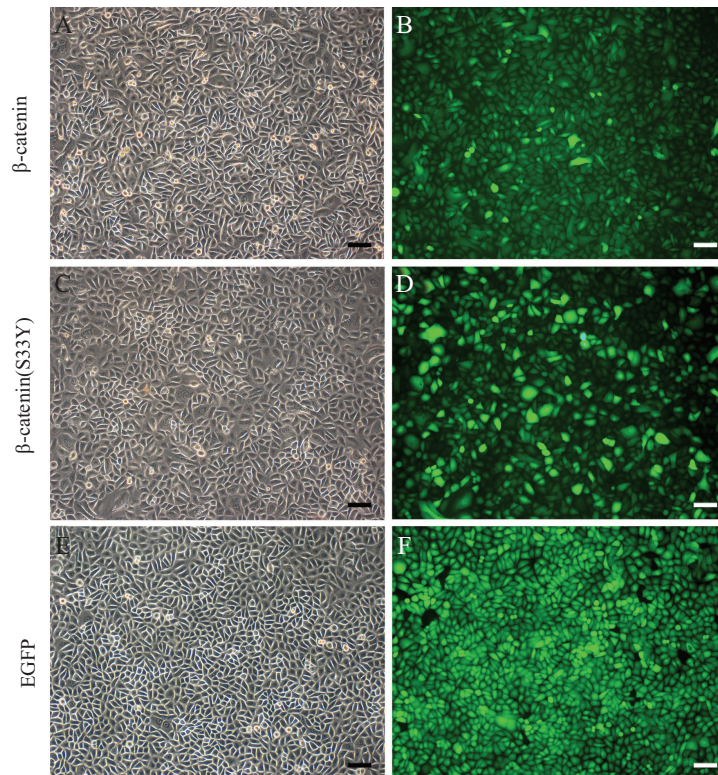


1: 空载pNL-IRES2-EGFP质粒的PCR扩增; 2: pNL- β -catenin-IRES2-EGFP质粒的PCR扩增; 3: pNL- β -catenin(S33Y)-IRES2-EGFP质粒的PCR扩增; 4: 空载pNL-IRES2-EGFP质粒的双酶切; 5: pNL- β -catenin-IRES2-EGFP重组质粒的BamH I和Sal I双酶切; 6: pNL- β -catenin(S33Y)-IRES2-EGFP重组质粒的BamH I和EcoR I双酶切; M: DNA marker。

1: PCR production of pNL-IRES2-EGFP; 2: PCR production of pNL- β -catenin-IRES2-EGFP; 3: PCR production of pNL- β -catenin(S33Y)-IRES2-EGFP; 4: restrictive enzyme digestion production of pNL-IRES2-EGFP; 5: restrictive enzyme digestion production of pNL- β -catenin-IRES2-EGFP; 6: restrictive enzyme digestion production of pNL- β -catenin(S33Y)-IRES2-EGFP; M: DNA marker.

图3 重组慢病毒质粒的PCR和酶切鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid with PCR and restrictive enzyme digestion

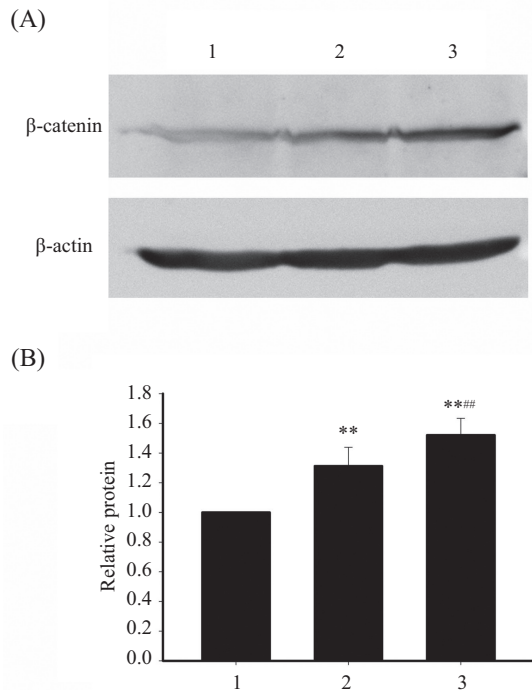


A: 光镜下的 β -catenin感染组; B: 荧光显微镜下的 β -catenin感染组; C: 光镜下的 β -catenin(S33Y)感染组; D: 荧光显微镜下的 β -catenin(S33Y)感染组; E: 光镜下的空载体组(EGFP); F: 荧光显微镜下的空载体组(EGFP)。

A: β -catenin transfected group under optical microscope; B: β -catenin transfected group under fluorescence microscope; C: β -catenin(S33Y) transfected group under optical microscope; D: β -catenin(S33Y) transfected group under fluorescence microscope; E: the empty vector transfected group (EGFP) under optical microscope; F: the empty vector transfected group (EGFP) under fluorescence microscope.

图4 人表皮干细胞的慢病毒感染结果

Fig.4 Lentiviral vector transfection into human keratinocytes



A: Western blot检测 β -catenin蛋白的表达; B: 统计分析 β -catenin蛋白水平($n=3$), ** $P<0.01$, 与空载体组比较; *** $P<0.01$, 与 β -catenin感染组比较。1: 空载体组; 2: β -catenin感染组; 3: β -catenin(S33Y)感染组。

A: β -catenin protein was detected by Western blot; B: statistical analysis of relative levels of β -catenin protein ($n=3$), ** $P<0.01$ vs empty vector transfected group; *** $P<0.01$ vs β -catenin transfected group. 1: empty vector transfected group; 2: β -catenin transfected group; 3: β -catenin(S33Y) transfected group.

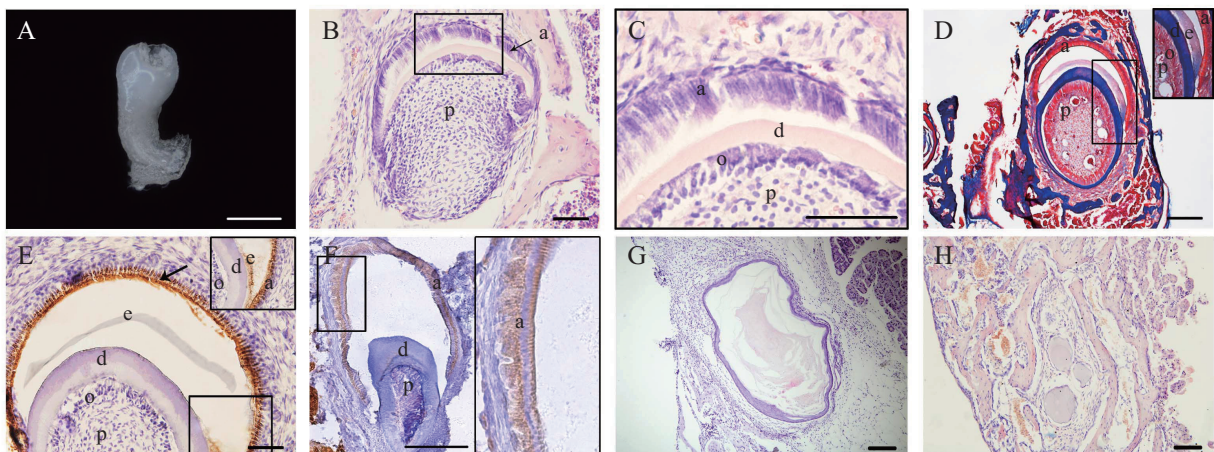
图5 β -catenin的蛋白在感染的人表皮干细胞中的表达

Fig.5 Expression of β -catenin protein in transfected human keratinocytes

β -catenin(S33Y)感染组与空载体组的人表皮干细胞的 β -catenin蛋白表达情况, 结果显示, 感染组的 β -catenin蛋白表达量明显高于空载体组($P<0.01$), 且 β -catenin(S33Y)感染组的 β -catenin蛋白表达量明显高于 β -catenin感染组($P<0.01$)(图5)。

2.5 过表达 β -catenin诱导人表皮干细胞向成釉质细胞分化

慢病毒感染的人表皮干细胞的细胞密度达80%~90%时, 刮下细胞膜片与E13.5小鼠牙胚间充质重组形成嵌合体, 移植到裸鼠的肾囊膜下培养20 d。嵌合体形成牙齿样结构(图6A), 且组织切片经HE和AZAN染色后发现嵌合体牙齿结构完整, 包括拉长的成釉质细胞、釉质、成牙本质细胞、牙本质及牙乳头(图6B~图6D)。为了进一步鉴定嵌合体的成釉质细胞, 本研究利用免疫组织化学检测嵌合体牙齿中釉原蛋白Ameloblastin的表达(图6E); 同时利用人MHC抗体检测成釉质细胞来自人源的表皮干细胞(图6F)。根据组织切片染色和免疫组织化学结果统计成牙率和成釉率。空载体组的成牙率为5.30%(1/19例), 其中成釉率为0; β -catenin感染组的成牙率为6.67%(1/15例), 其中成釉率高达100%(3/3例); β -catenin(S33Y)感染组的成牙率为17.65%(3/17例), 其中成釉率高达100%(3/3例)。阴性对照组中嵌合体大部分未成牙(图6G~图6H); 少部分嵌合体成牙,



A: 嵌合体牙齿整体观; B: 嵌合体牙齿组织切片HE染色; C: B图的放大图; D: 嵌合体牙齿组织切片AZAN染色; E: 嵌合体牙齿组织切片的Ameloblastin免疫组化; F: 嵌合体牙齿组织切片的人MHC免疫组化; G~H: 嵌合体未成牙。a: 成釉质细胞; d: 牙本质; e: 牙釉质; o: 成牙本质细胞; p: 牙髓。标尺=100 μ m(A、G和H); 标尺=50 μ m(B~F)。

A: whole morphology of chimeric tooth; B: HE stained section of chimeric tooth; C: higher magnification of B; D: AZAN stained section of chimeric tooth; E: immunostaining of human Ameloblastin in the ameloblasts of Chimeric tooth; F: immunostaining of human MHC in the ameloblasts of Chimeric tooth; G~H: chimeric not formed tooth. a: ameloblast; d: dentin; e: enamel; o: odontoblasts; p: pulp. Scale bars=100 μ m (A,G,H); Scale bars=50 μ m (B~F).

图6 嵌合体牙齿的组织形态和免疫组化染色

Fig.6 Histology and immunohistochemistry analysis of chimeric tooth

但是仅具有牙本质和成牙本质细胞,成釉细胞未拉长,牙釉质未形成。结果提示,过表达 β -catenin可诱导人表皮干细胞向成釉质细胞分化。

3 讨论

人类遗传性的牙齿缺陷是一种比较普遍的现象,同时,随着年龄的增长,几乎所有人都存在不同程度的牙齿缺陷或缺失。因此,人类牙齿再生是一项极具应用前景、市场价值和社会效益的研究工作。由于人类牙齿具有独特的发育过程和相对简单的结构等特点,目前预测第一个可能成功再生并进入商业化应用的器官将是牙齿^[19]。根据牙齿的发育特性,即牙齿发育是牙上皮和牙间充质细胞相互诱导的结果,利用成体干细胞进行牙齿再生同样需要上皮源性和间充质源性的干细胞的参与^[20-21]。已有研究表明,间充质源性的成体干细胞,例如骨髓干细胞和牙髓干细胞等均可以被诱导发育形成牙本质细胞,证明应用于牙齿再生的间充质源性成体干细胞的来源问题已经在理论上得到了解决。但是,寻找适合于人类牙齿再生的上皮源性的干细胞仍然是该领域的难题之一。已有报道显示,胚胎干细胞和iPSCs可被诱导为成釉细胞,为牙齿再生的上皮干细胞的来源提供了希望^[22-23]。然而对于人类的牙齿再生研究工作来说,利用胚胎组织或者细胞将会受到伦理学以及临床应用等限制,而iPSCs在应用于人体细胞移植等使用过程中面临很多问题有待解决。而利用成体干细胞可以避免或者减少这些问题,具有更加广阔的前景。我们的前期研究已经在本领域首次证明,人成体包皮来源的表皮干细胞可以成为牙齿再生的上皮组成来源,被诱导为成釉质细胞并分泌釉质,相关数据已发表在Developmental Biology期刊^[4]。但是其嵌合体成牙率为28.00%和成釉率为40.00%,诱导效率较低。因此本研究期望在原有工作基础上,重点解决提高诱导人表皮干细胞牙向分化的效率问题。

Wnt/ β -catenin信号通路是进化过程中高度保守的信号通路,它在小鼠牙齿发育过程发挥重要的作用^[11,15,24]。在小鼠牙上皮过表达Wnt/ β -catenin信号通路,无论是敲除抑制因子(例如Apc)还是过表达效应因子(例如 β -catenin),均可引起小鼠口腔的牙齿数目的增多^[11-15]。我们的研究还发现,在人牙齿早期发育过程中,Wnt/ β -catenin信号通路的相关因子,如 β -catenin、Sostdc1(Wise)等基因在牙上皮强烈表达^[25]。

由此推论,Wnt/ β -catenin信号通路可能是牙上皮发育的关键开关信号通路,对干细胞的牙向分化可能有促进作用。

本研究以包皮组织为材料分离人表皮干细胞,在此基础上利用慢病毒介导Wnt/ β -catenin信号的关键因子 β -catenin及其突变基因 β -catenin(S33Y)在人表皮干细胞中的过表达,从而提高人表皮干细胞的Wnt/ β -catenin信号活性。然后将慢病毒感染的人表皮干细胞膜片与E13.5的具有成牙潜能的小鼠牙胚间充质重组,重组后的嵌合体在裸鼠肾囊中培育。嵌合体进行组织形态学检测结果表明,人表皮干细胞过表达 β -catenin基因的嵌合体成牙率为6.67%(1/15例),其中成釉率高达100%(3/3例);人表皮干细胞过表达 β -catenin(S33Y)基因的嵌合体成牙率为17.65%(3/17例),其中成釉率高达100%(3/3例)。相比空载体对照组的成牙率和成釉率均有提高。同时与FGF8诱导人表皮干细胞牙向分化的研究相比^[4],成釉率提高了60%。因此,人表皮干细胞过表达 β -catenin基因确实能够提高诱导其向成釉质细胞分化的效率。研究结果也进一步证实,Wnt/ β -catenin信号通路在牙上皮细胞分化过程中具有重要的调控作用。

β -catenin(S33Y)是 β -catenin氨基酸序列的第33位的丝氨酸(S)突变为酪氨酸(Y)所致,该突变引起 β -catenin蛋白不会被磷酸化,即 β -catenin蛋白在细胞质持续积累并转位进入细胞核激活下游靶基因的转录;因此Wnt/ β -catenin信号通路处于持续激活的状态^[10,26-27]。本研究结果证明,过表达 β -catenin(S33Y)基因感染组的人表皮干细胞的 β -catenin的表达量明显高于过表达 β -catenin基因感染组。同时,研究结果发现,人表皮干细胞过表达 β -catenin与过表达 β -catenin(S33Y)的成釉率均高达100%;结果显示,人表皮干细胞 β -catenin基因的有效激活就能提高其向成釉质细胞分化,并不一定需要持续地激活;但是人表皮干细胞过表达 β -catenin(S33Y)基因比过表达 β -catenin基因的成牙率高约11%,说明人表皮干细胞 β -catenin基因的持续激活同样有利于其成牙。本研究结果将为利用人表皮干细胞作为上皮来源应用于人类牙齿再生的研究提供相关的实验数据,为理解牙上皮向成釉细胞分化的分子调控机制奠定基础,同时对干细胞在组织工程领域中的应用研究也有普遍的意义。

参考文献 (References)

- 1 Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev* 1997; 67(2): 111-23.
- 2 Thesleff I, Vaahtokari A, Partanen AM. Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int J Dev Biol* 1995; 39(1): 35-50.
- 3 Abiko Y, Nishimura M, Arai J, Kuraguchi J, Saitoh M, Kaku T. Apoptosis in the reduced enamel epithelium just after tooth emergence in rats. *Med Electron Microsc* 1996; 29: 84-9.
- 4 Wang B, Li L, Du S, Liu C, Lin X, Chen Y, *et al.* Induction of human keratinocytes into enamel-secreting ameloblasts. *Dev Biol* 2010; 344(2): 795-9.
- 5 Lin M, Li L, Liu C, Liu H, He F, Yan F, *et al.* Wnt5a regulates growth, patterning, and odontoblast differentiation of developing mouse tooth. *Dev Dyn* 2011; 240(2): 432-40.
- 6 Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: A common theme in animal development. *Genes Dev* 1997; 11(24): 3286-305.
- 7 Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vainzel-Ohayon D, *et al.* arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 2000; 407(6803): 527-30.
- 8 Baeg GH, Lin X, Khare N, Baumgartner S, Perrimon N. Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of Wingless. *Development* 2001; 128(1): 87-94.
- 9 Zhang H, Yu C, Dai J, Keller JM, Hua A, Sottnik JL, *et al.* Parathyroid hormone-related protein inhibits DKK1 expression through c-Jun-mediated inhibition of beta-catenin activation of the DKK1 promoter in prostate cancer. *Oncogene* 2014; 33(19): 2464-77.
- 10 Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, *et al.* Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997; 275(5307): 1787-90.
- 11 Liu F, Chu EY, Watt B, Zhang Y, Gallant NM, Andl T, *et al.* Wnt/beta-catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis. *Dev Biol* 2008; 313(1): 210-24.
- 12 Mustonen T, Pispä J, Mikkola ML, Pummila M, Kangas AT, Pakkasjarvi L, *et al.* Stimulation of ectodermal organ development by Ectodysplasin-A1. *Dev Biol* 2003; 259(1): 123-36.
- 13 Pispä J, Mustonen T, Mikkola ML, Kangas AT, Koppinen P, Lukinmaa PL, *et al.* Tooth patterning and enamel formation can be manipulated by misexpression of TNF receptor Edar. *Dev Dyn* 2004; 231(2): 432-40.
- 14 Kuraguchi M, Wang XP, Bronson RT, Rothenberg R, Ohene-Baah NY, Lund JJ, *et al.* Adenomatous polyposis coli (APC) is required for normal development of skin and thymus. *PLoS Genet* 2006; 2(9): e146.
- 15 Jarvinen E, Salazar-Ciudad I, Birchmeier W, Taketo MM, Jernvall J, Thesleff I. Continuous tooth generation in mouse is induced by activated epithelial Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(49): 18627-32.
- 16 Wang XP, O'Connell DJ, Lund JJ, Saadi I, Kuraguchi M, Turbe-Doan A, *et al.* Apc inhibition of Wnt signaling regulates supernumerary tooth formation during embryogenesis and throughout adulthood. *Development* 2009; 136(11): 1939-49.
- 17 Kaur P, Li A. Adhesive properties of human basal epidermal cells: An analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. *J Invest Dermatol* 2000; 114(3): 413-20.
- 18 Michel M, Torok N, Godbout M. J, Lussier M, Gaudreau P, Royal A, Germain L. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells *in vivo* and *in vitro*: Keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci* 1996; 109(5): 1017-28.
- 19 Garcia-Godoy F, Murray PE. Status and potential commercial impact of stem cell-based treatments on dental and craniofacial regeneration. *Stem Cells Dev* 2006; 15(6): 881-7.
- 20 Duailibi SE, Duailibi MT, Vacanti JP, Yelick PC. Prospects for tooth regeneration. *Periodontol* 2000 2006; 41: 177-87.
- 21 Yen AH, Sharpe PT. Regeneration of teeth using stem cell-based tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6(1): 9-16.
- 22 Cai J, Liu P, Chen S, Wu X, Sun Y, Li A, *et al.* Generation of tooth-like structures from integration-free human urine induced pluripotent stem cells. *Cell Regeneration* 2013; 2(6): 1-8.
- 23 Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Iwamoto T, Yamada A, *et al.* Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. *J Biol Chem* 2012; 287(13): 10590-601.
- 24 Liu F, Millar SE. Wnt/beta-catenin signaling in oral tissue development and disease. *J Dent Res* 2010; 89(4): 318-30.
- 25 Wang B, Li H, Liu Y, Lin X, Lin Y, Wang Y, Hu X, Zhang Y. Expression patterns of WNT/beta-CATENIN signaling molecules during human tooth development. *J Mol Histol* 2014; doi: 10.1007/s10735-014-9572-5.
- 26 Leung JY, Kolligs FT, Wu R, Zhai Y, Kuick R, Hanash S, Cho KR, Fearon ER. Activation of AXIN2 expression by beta-catenin-T cell factor. A feedback repressor pathway regulating Wnt signaling. *J Biol Chem* 2002; 277(24): 21657-65.
- 27 Baarsma HA, Menzen MH, Halayko AJ, Meurs H, Kerstjens HA, Gosens R. beta-Catenin signaling is required for TGF-beta1-induced extracellular matrix production by airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011; 301(6): L956-65.