

# 机械敏感离子通道Trpm7在LIPUS促进牙髓间充质干细胞成骨分化中的作用机制的研究

姚欢 潘华锋 郑妍 章杰 李娅莎 吴梦云 杨珂\*

(重庆医科大学附属儿童医院, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室;  
儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆市干细胞治疗工程技术研究中心,  
重庆市细胞生物工程有限公司, 重庆 400014)

**摘要** 该文主要研究低强度脉冲超声(low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS)促进牙髓间充质干细胞(dental pulp mesenchymal stem cells, DPSCs)成骨分化, 以及瞬时受体电位M7(transient receptor potential melastatin 7, Trpm7)在其中发挥的作用。培养人DPSCs, 流式细胞术检测其表面分子标志表达, 阿利新蓝、茜素红及油红O染色检测其成软骨、成骨和成脂分化能力。ALP活性、ALP染色和茜素红染色观察LIPUS促成骨分化的能力。实时定量PCR检测LIPUS处理组与对照组成骨分化相关基因OPN、OCN、RUNX2表达的差异以及不同时间点两组Trpm7 mRNA表达水平的变化。ALP活性检测LIPUS及不同浓度Trpm7抑制剂2-氨基乙酯二苯基硼酸(2-aminoethoxy-diphenyl borate, 2-APB)对成骨分化能力的影响。实验分为对照组、LIPUS组、LIPUS+二甲基亚砷(DMSO)组和LIPUS+2-APB组, ALP和茜素红染色观察各组成骨分化能力, Western blot检测各组OPN、OCN和RUNX2的蛋白表达。结果显示, 成功培养DPSCs, LIPUS处理后ALP和茜素红阳性染色明显增多, ALP活性增强( $P < 0.01$ ); OPN、OCN、RUNX2的mRNA表达水平显著增加( $P < 0.05$ ), LIPUS处理第2天和第5天Trpm7的mRNA表达水平有明显升高( $P < 0.05$ )。2-APB作用后明显下调ALP活性( $P < 0.01$ )。LIPUS组、LIPUS+DMSO组与对照组相比, ALP和茜素红阳性染色以及OPN、OCN与RUNX2的蛋白表达均显著增加, 而LIPUS+2-APB组较于LIPUS+DMSO组, ALP和茜素红染色以及OPN、OCN与RUNX2的蛋白表达明显降低。该研究结果提示, LIPUS能够促进DPSCs的成骨分化, 且Trpm7在这一过程中发挥着重要作用。

**关键词** 低强度脉冲超声; 人牙髓间充质干细胞; Trpm7; 成骨分化

## Mechanically Sensitive Ion Channels Trpm7 in LIPUS Promotes Interdental Dentinal Mesenchyme Study on the Mechanism of Action in Osteogenic Differentiation

Yao Huan, Pan Huafeng, Zheng Yan, Zhang Jie, Li Yasha, Wu Mengyun, Yang Ke\*

(Key Laboratory of Children's Developmental Diseases Research, Ministry of Education, Children's Hospital of Chongqing Medical University; National International Science and Technology Cooperation Base for Major Children's Development; Chongqing Key Laboratory of Pediatrics; Chongqing Stem Cell Therapy Engineering Research Center, Chongqing Cell Bioengineering Technology Co., Ltd., Chongqing 400014, China)

收稿日期: 218-05-01 接受日期: 2018-06-20

重庆市自然科学基金一般项目(批准号: cstc2017jcyjAX0171、cstc2014jcyjA10090)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13983774210, E-mail: 361885986@qq.com

Received: May 1, 2018 Accepted: June 20, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of Chongqing (Grant No.cstc2017jcyjAX0171, cstc2014jcyjA10090)

\*Corresponding author. Tel: +86-13983774210, E-mail: 361885986@qq.com

网络出版时间: 2018-08-24 10:51:04

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180824.1050.004.html>

**Abstract** The purpose of this study was to investigate the role of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in promoting osteogenic differentiation of dental pulp mesenchymal stem cells (DPSCs) and the role of transient receptor potential M7 (Transient receptor potential melastatin 7, Trpm7) involved. The human DPSCs were cultured. The surface molecular markers were detected by flow cytometry. The alcian blue, alizarin red and oil red O staining were used to detect the chondrogenic, osteogenic and adipogenic differentiation ability. ALP activity, ALP staining and alizarin red staining were observed the ability of LIPUS to promote osteogenic differentiation. The Real-time quantitative PCR was used to detect the difference of *OPN*, *OCN* and *RUNX2* expression in the LIPUS-treated group and the control group, and the mRNA expression levels of *Trpm7* in the two groups were detected at different time points. ALP activity was used to examine the effect of LIPUS and different concentrations of Trpm7 inhibitor 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) on osteogenic differentiation. The osteogenic differentiation ability was observed by ALP staining and alizarin red staining in control group, LIPUS group, LIPUS+DMSO group and LIPUS+2-APB group. The expressions of *OPN*, *OCN* and *RUNX2* were detected by Western blot. The results showed the cultured cells were identified as DPSCs. In the LIPUS treatment group, ALP staining and alizarin red staining increased significantly, and the ALP activity enhanced ( $P<0.01$ ). The mRNA expression of *OPN*, *OCN* and *RUNX2* were significantly increased ( $P<0.05$ ). The mRNA expression of *Trpm7* was significantly increased on the 5th day ( $P<0.05$ ). 2-APB significantly inhibited ALP activity ( $P<0.01$ ). Compared with the control group, ALP staining, alizarin red staining and the protein expression of *OPN*, *OCN*, *RUNX2* were significantly increased in LIPUS group and LIPUS+DMSO group. Compared to LIPUS+DMSO group, ALP and alizarin red staining, the protein expression of *OPN*, *OCN*, *RUNX2* were significantly reduced in LIPUS+2-APB group. We concluded that LIPUS can promote osteogenic differentiation of DPSCs, and the mechanically sensitive ion channel Trpm7 plays an important role in this process.

**Keywords** low-intensity focused ultrasound; human dental pulp mesenchymal stem cells; Trpm7; osteogenic differentiation

作为骨折最主要的并发症之一,骨折延迟愈合和不愈合发生率较高,目前最佳的治疗方法是自体骨移植<sup>[1]</sup>,但我们仍需要寻找一种安全、并发症少且无损伤的治疗方法。低强度脉冲超声(low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS)由于其特有的物理学和生物学机制,不仅可以缩短骨折愈合时间,而且可以有效地治疗骨延迟愈合和骨不连<sup>[2]</sup>,以其安全、简便且无侵害的优势应用于临床<sup>[3]</sup>。

牙髓间充质干细胞(dental pulp mesenchymal stem cells, DPSCs)作为一种有潜能的干细胞,具有较高的增殖能力和多向分化潜能<sup>[4]</sup>;其来源丰富,无伦理争议,副作用小,不会引起强烈的排斥反应,还具有免疫调控的作用。DPSCs作为一类优良的种子细胞,可能会为骨组织工程开辟一条新路<sup>[5]</sup>。研究发现,机械力能够特异性地诱导MSC向成骨分化<sup>[6]</sup>,而机械作用正是LIPUS最基本的原发效应。有研究表明,LIPUS能促进骨髓间充质干细胞的成骨分化,但具体机制并不清楚<sup>[7]</sup>。而LIPUS是否也能促进DPSCs

向成骨方向分化,目前尚无具体的报道。通道酶瞬时受体电位M7(transient receptor potential melastatin 7, Trpm7)是一种质膜钙通道,具有机械敏感性,参与调节细胞多个生理进程<sup>[8]</sup>,并且Trpm7的缺陷会导致骨形成的障碍<sup>[9]</sup>。故本实验将探讨LIPUS是否能促进DPSCs的成骨分化以及在这一过程中Trpm7发挥的可能作用,以进一步理解LIPUS刺激MSCs成骨分化的潜在机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

低强度脉冲超声(LIPUS)仪由重庆融海超声医学工程研究中心研制;人牙髓间充质干细胞源于本实验室保存;另需 $\alpha$ -MEM培养基(Hyclone)、胎牛血清(Gibco)、 $\beta$ -甘油磷酸钠、地塞米松、抗坏血酸(Solarbio)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、吡哆美辛、胰岛素、ALP染色试剂盒(BD)、1%茜素红染液(pH4.2, Solarbio)、油红O染液(北京雷

根生物技术有限公司)、ALP化学发光检测试剂盒(BD)、高纯度总RNA快速提取试剂盒(BioTeke)、RealMaster Mix(TIANGE)、2-APB(Sigma aldrich)和OPN、RUNX2、OCN、 $\beta$ -GAPDH抗体(Sigma aldrich)等。

## 1.2 方法

**1.2.1 配制普通培养基、成骨及成脂培养基** 含10%胎牛血清的 $\alpha$ -MEM培养基作为普通培养基;成骨培养基:10%胎牛血清的 $\alpha$ -MEM培养基+10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠+0.1  $\mu$ mol/L地塞米松+50  $\mu$ g/mL抗坏血酸C;成脂培养基:10%胎牛血清的 $\alpha$ -MEM培养基+1  $\mu$ mol/L地塞米松+10  $\mu$ g/mL胰岛素+200  $\mu$ mol/L吡哆美辛+0.5 mmol/L IBMX。

**1.2.2 设计分组及培养方法** 将人牙髓间充质干细胞以50%的密度接种于24孔板中,相应处理如下:普通培养基每孔1 mL培养2天后,每孔皆更换为1 mL成骨培养基(以后成骨培养基持续培养),每隔3天换液。本研究中,DPSCs的培养均照此进行。实验分为四组:对照组、LIPUS组、LIPUS+DMSO组和LIPUS+Trpm7抑制剂2-APB组。LIPUS组:照射2 min/次;LIPUS+DMSO组:照射2 min/次+0.02% DMSO;LIPUS+2-APB组:照射2 min/次+75  $\mu$ mol/L的2-APB。本研究中,LIPUS每天早晚照射DPSCs 2次,DMSO与2-APB在每次换液时重加。

**1.2.3 碱性磷酸酶(ALP)活性检测** 用PBS洗3次,24孔板每孔100  $\mu$ L ALP裂解液常温裂解DPSCs 5 min;而后移至1.5 mL EP管,13 000 r/min离心3 min;在新EP管中,取上清液5  $\mu$ L、1 $\times$ LVPO Buffer 15  $\mu$ L、ALP底物5  $\mu$ L,共25  $\mu$ L体系,室温孵育30 min;酶标仪测各孔吸光度值,检测细胞ALP活性。

**1.2.4 实时定量PCR** ddH<sub>2</sub>O 4.5  $\mu$ L、2.5 $\times$ RealMaster Mix 7.5  $\mu$ L、cDNA 2  $\mu$ L及引物1  $\mu$ L(15  $\mu$ L体系),用Bio-Rad CFX Manager仪器进行检测。

**1.2.5 碱性磷酸酶(ALP)染色** LIPUS处理细胞7天,如需染色8个孔(24孔板中),则需配制2 mL的ALP染色液(每孔250  $\mu$ L)。AS-MIX 80  $\mu$ L(总体积的1/25)、ddH<sub>2</sub>O 2 mL、倒入FAST-BLUE至溶液淡黄色即可。DPSCs用PBS洗涤2次后,4%多聚甲醛固定1 min,PBS再洗1次,加入染色液工作液,在37  $^{\circ}$ C孵箱中孵育0.5 h,镜下呈现蓝紫色染色时弃染色液,加少量PBS,显微镜下拍照。

**1.2.6 油红O染色** LIPUS处理细胞21天后,PBS清

洗细胞2次,4%多聚甲醛固定1 min,PBS再洗1次,加油红O染色液,在37  $^{\circ}$ C孵箱中放置30 min,吸出染色液,加少量PBS,显微镜下拍照。

**1.2.7 茜素红染色** LIPUS处理细胞21天后,PBS清洗细胞2次,4%多聚甲醛固定1 min,PBS再洗1次,加1%茜素红染色液,在37  $^{\circ}$ C孵箱中放置5 min,镜下观察到红色钙结节,即可吸出染色液,加少量PBS,显微镜下拍照。

**1.2.8 阿利新蓝染色** 细胞培养14天后,PBS洗3次,4%多聚甲醛固定15 min,0.1% HCl溶液冲洗5 min,使pH值下降到1.0,阿利新蓝染色30 min,用0.1% HCl溶液冲洗去除非特异性染色。自来水冲洗5 min,晾干后于倒置相差显微镜下观察。

**1.2.9 Western blot** PBS洗涤细胞2次后,每孔加入上样缓冲液与电泳液SDS-PAGE 1:4的溶液200  $\mu$ L,尽量刮干净细胞,沸水煮蛋白15 min,使蛋白完全变性。每组取20  $\mu$ L蛋白上样,电泳后根据蛋白分子量选择合适的切胶范围以及转膜时间,电转时根据胶的大小裁好同样大小的PVDF膜,精准对齐,半干转膜。转膜完毕后TBST洗3 min $\times$ 5次;5%脱脂奶粉常温封闭1 h,加入一抗(1:1 000稀释),4  $^{\circ}$ C放置12~14 h,TBST洗3 min $\times$ 5次,再加入相应的二抗,常温孵育1 h后TBST洗3 min $\times$ 5次,显色液显色。

**1.2.10 统计学处理** 以上各项实验均进行3次重复独立实验,采用SPSS 17.0软件进行统计分析,计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异具有显著性。

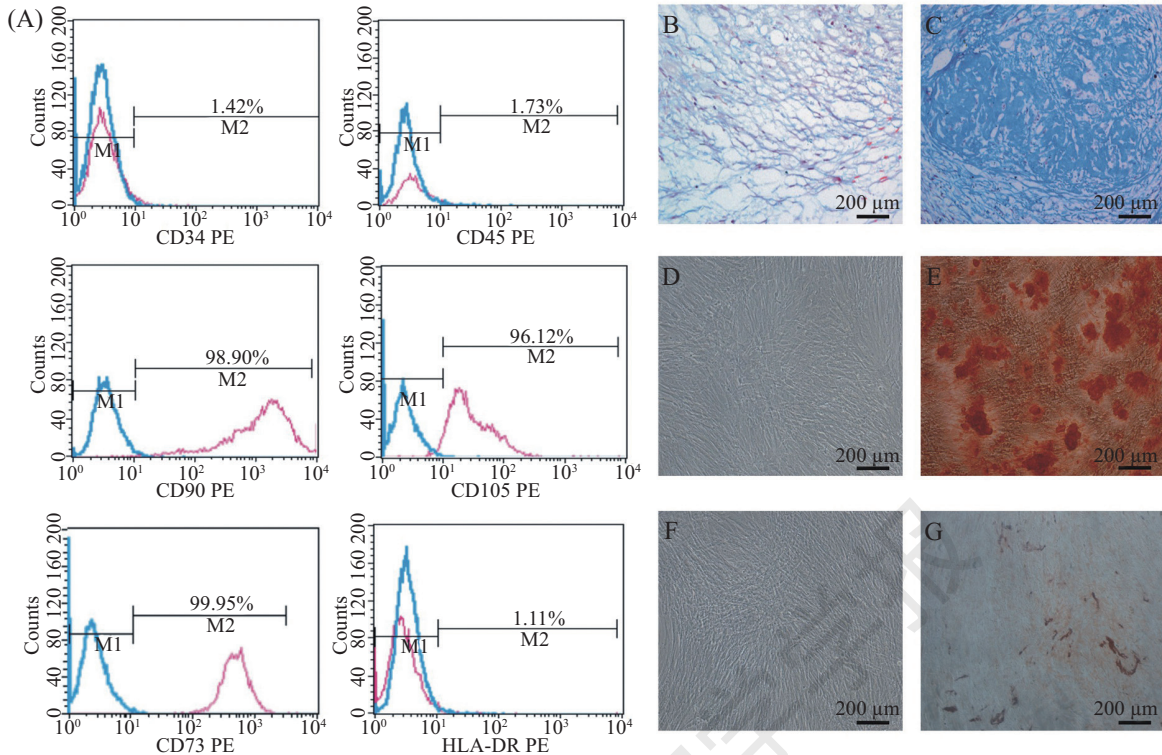
## 2 结果

### 2.1 人牙髓间充质干细胞的培养和鉴定

细胞贴壁生长,胞体呈梭形或多边形,胞体丰满,胞质均匀。流式检测细胞CD73、CD105和CD90表达为阳性,纯度分别为99.95%、96.12%、98.90%;CD34、CD45及HLA-DR等指标为阴性。成软骨诱导分化14天,阿利新蓝染色可见蓝色软骨组织;成骨诱导21天,茜素红染色可见明显红色钙结节;成脂诱导21天油红O染色可见脂滴形成(图1)。

### 2.2 LIPUS促进DPSCs向成骨方向分化

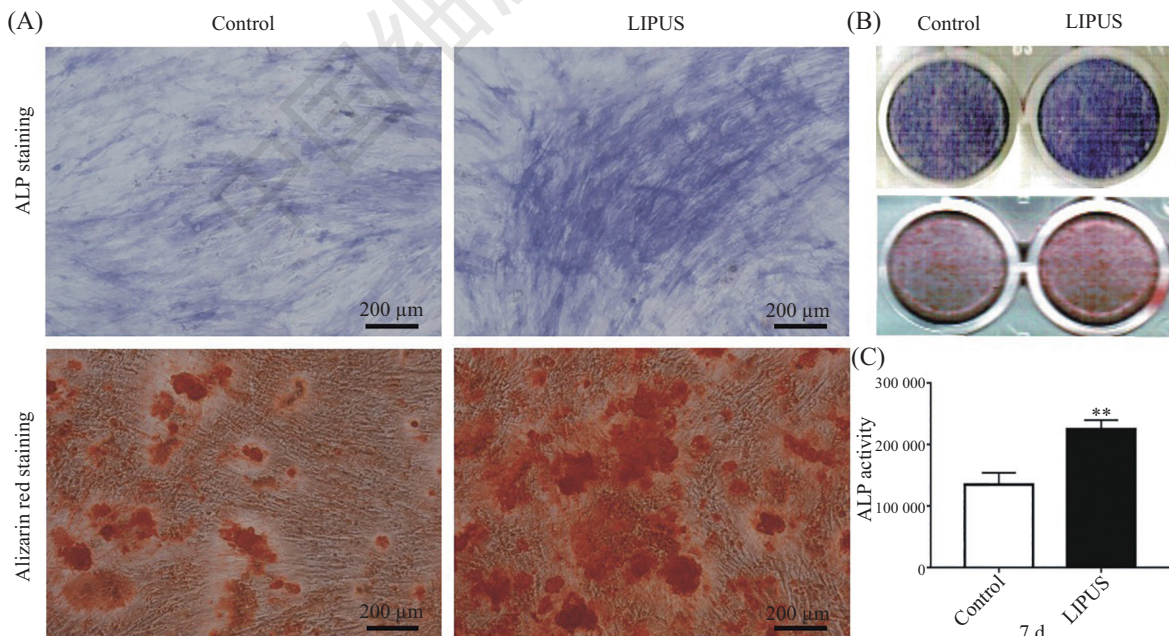
LIPUS处理7天后进行ALP活性检测,LIPUS组与对照组相比,ALP活性明显上升( $P<0.01$ )。LIPUS处理7天及21天后,分别进行ALP及茜素红染色。图2中ALP染色显示,LIPUS组阳性蓝紫色染色明显增



A: 流式细胞检测DPSCs的表面分子标志表达(CD34、CD45、CD90、CD105、CD73和HLA-DR); B、D、F分别为阿利新蓝染色、茜素红染色、油红O染色对照组图片; C: 阿利新蓝染色; E: 茜素红染色; G: 油红O染色。  
 A: flow cytometric detection of surface molecular marker expression (CD34, CD45, CD90, CD105, CD73 and HLA-DR) of DPSCs; B, D and F were control group images of aliline blue staining, alizarin red staining, and oil red O staining, respectively; C: aliline blue staining; E: alizarin red staining; G: oil red O staining.

图1 DPSCs表面标志抗原表达和分化能力检测

Fig.1 Detection of surface antigen expression and differentiation of DPSCs



A: LIPUS处理7天和21天后ALP和茜素红染色。B: ALP和茜素红染色的大体观察。C: LIPUS处理7天后ALP读数; \*\* $P < 0.01$ , 与对照组相比较。  
 A: ALP and Alizarin Red staining after 7 and 21 days of LIPUS treatment. B: general observation of ALP and Alizarin Red staining. C: ALP activity after 7 days of LIPUS treatment; \*\* $P < 0.01$  compared with control group.

图2 LIPUS对DPSCs成骨分化的影响

Fig.2 Effect of LIPUS on osteogenic differentiation of DPSCs

多; 茜素红染色显示, 与对照组相比, LIPUS组红色钙结节显著增加。以上提示, LIPUS在早期及晚期均促进DPSC向成骨方向分化。

### 2.3 LIPUS促进DPSCs成骨分化相关基因的表达

LIPUS处理7天后, 实时定量PCR检测成骨分化相关基因*OPN*、*OCN*和*RUNX2*的表达。结果显示, 与对照组相比, LIPUS组*OPN*、*OCN* mRNA表达水平明显增加( $P<0.05$ ), *RUNX2*表达显著提高( $P<0.01$ ), 证实LIPUS能够促进DPSC成骨分化相关基因的表达(图3)。

### 2.4 LIPUS促DPSCs成骨分化过程中机械敏感离子通道Trpm7表达增加

实时定量PCR检测显示, 0天(刺激前)的对照组与LIPUS组*Trpm7*表达并无明显差异。经LIPUS处理2天及5天后, LIPUS组与对照组相比, 机械敏感离子通道*Trpm7*表达明显增加( $P<0.05$ ), 提示在LIPUS促

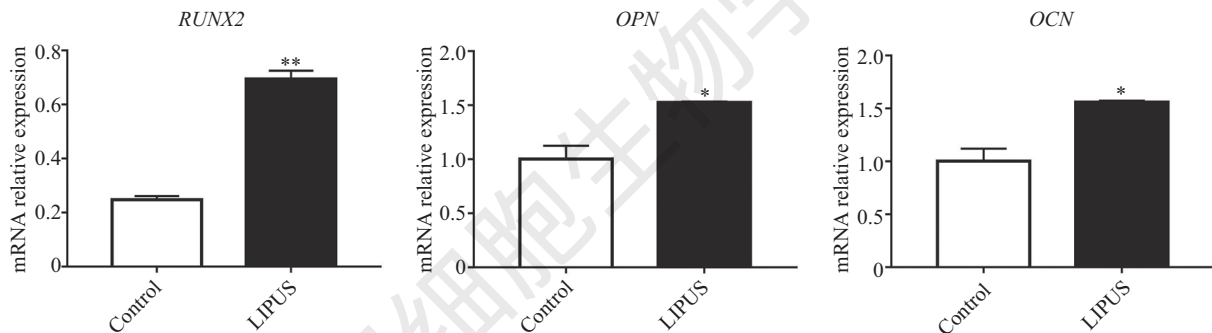
进成骨分化这一过程中*Trpm7*表达升高(图4)。

### 2.5 Trpm7通道抑制剂2-APB抑制LIPUS促成骨作用

LIPUS处理7天后, ALP活性检测显示与LIPUS+DMSO组相比, 75  $\mu\text{mol/L}$ 浓度ALP活性显著降低( $P<0.001$ ), 而400  $\mu\text{mol/L}$ 浓度下降最为明显(图5A)。考虑到200  $\mu\text{mol/L}$ 及400  $\mu\text{mol/L}$ 浓度对DPSC的细胞毒性作用( $P<0.05$ ,  $P<0.001$ )(图5B), 不能作为2-APB抑制LIPUS促成骨的有效浓度, 故后续实验选取75  $\mu\text{mol/L}$ 作为实验浓度。

### 2.6 Trpm7通道抑制剂2-APB抑制LIPUS促早期及晚期成骨分化

LIPUS处理7天及21天后, LIPUS组、LIPUS+DMSO组与对照组相比, ALP与茜素红染色可见阳性蓝紫色染色与红色钙结节明显增多(图6)。Trpm7通道抑制剂2-APB作用后, 染色明显减少(图6)。以

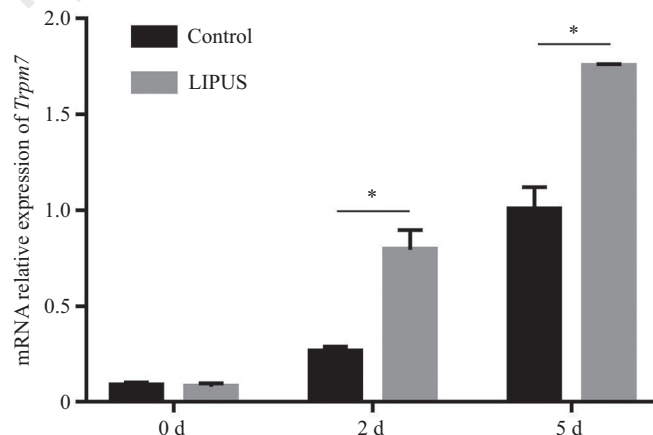


qRT-PCR检测LIPUS处理7天后细胞*RUNX2*、*OPN*和*OCN* mRNA的表达,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ , 与对照组相比较。

qRT-PCR detected the expression of *RUNX2*, *OPN* and *OCN* mRNA in cells 7 days after LIPUS treatment,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$  compared with control group.

图3 实时定量PCR检测LIPUS处理对成骨分化基因*RUNX2*、*OPN*和*OCN*表达的影响

Fig.3 Effect of LIPUS treatment on the expression of osteogenesis gene *RUNX2*, *OPN* and *OCN* by Real-time quantitative PCR

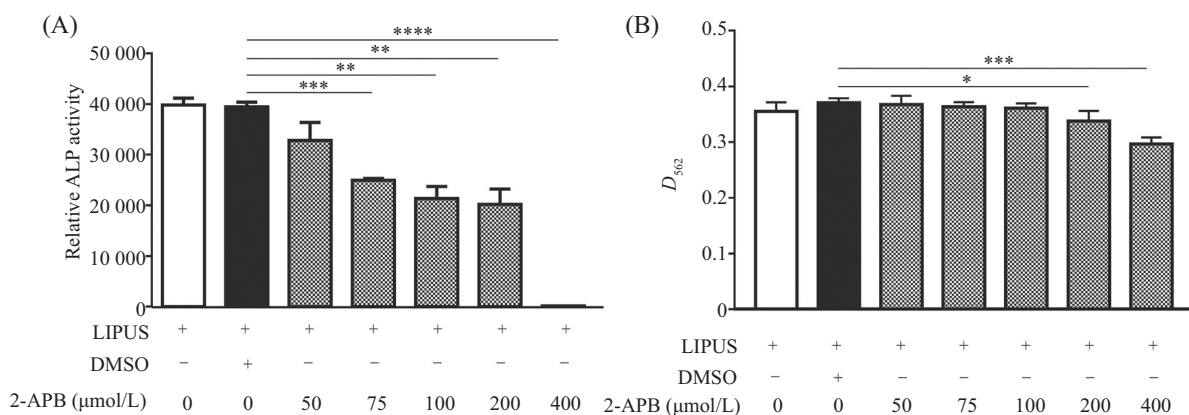


qRT-PCR检测LIPUS处理0、2、5天后细胞*Trpm7* mRNA的表达,  $*P<0.01$ , 与对照组相比较。

The expression of *Trpm7* mRNA was detected by qRT-PCR after 0, 2 and 5 days of LIPUS treatment,  $*P<0.01$  compared with the control group.

图4 LIPUS处理下不同时间点*Trpm7*通道的mRNA表达

Fig.4 mRNA expression of *Trpm7* channel at different time points under LIPUS irradiation



A: ALP活性检测LIPUS及2-APB处理后对细胞活性的影响; B: 吸光度检测处理因素作用后对细胞蛋白量的影响, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , 与LIPUS+DMSO组相比较。

A: ALP activity assays the effects of LIPUS and 2-APB treatment on cell viability. B: effect of absorbance assay on cell protein amount after the same treatment, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  compared with LIPUS+DMSO group.

图5 不同浓度Trpm7通道抑制剂2-APB对LIPUS促成骨ALP活性及DPSCs蛋白量的影响

Fig.5 Effects of 2-APB, a 7-channel inhibitor of different concentrations of Trpm, on LIPUS-induced bone ALP activity and hDPSCs protein content

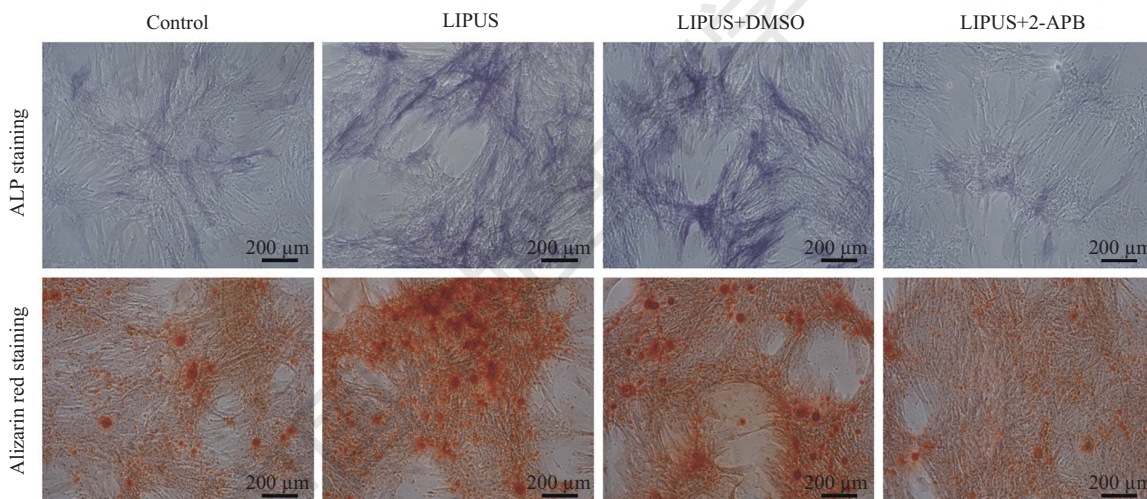


图6 Trpm7通道抑制剂2-APB对LIPUS促早期及晚期成骨分化的影响

Fig.6 Effect of Trpm7 channel inhibitor 2-APB on LIPUS promoting early and late osteogenic differentiation

上提示, 抑制Trpm7通道可以降低LIPUS促早期及晚期成骨分化的作用。

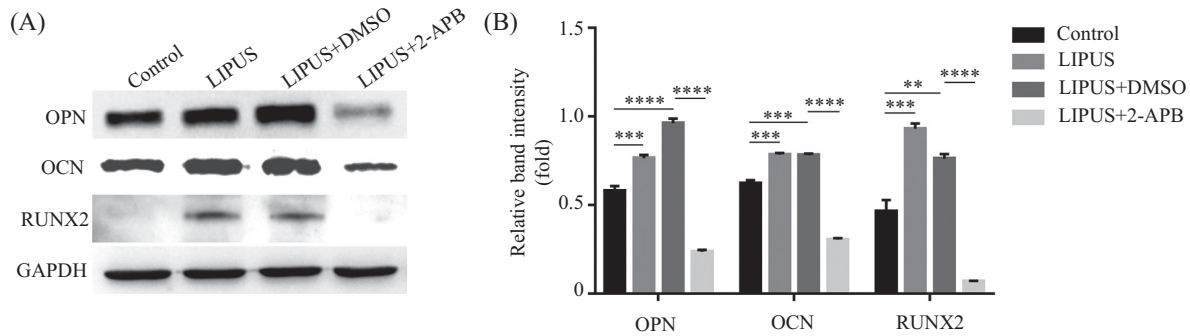
### 2.7 Trpm7通道抑制剂2-APB抑制LIPUS促成骨分化相关基因的蛋白表达

Western blot检测LIPUS处理及2-APB处理14天后对成骨分化相关蛋白OPN、OCN、RUNX2表达的影响。结果显示, 与对照组相比较, LIPUS组、LIPUS+DMSO组OPN、OCN、RUNX2蛋白表达量明显增加, 而LIPUS+2-APB组与LIPUS+DMSO组相比蛋白表达明显降低, 说明抑制Trpm7通道可以减少LIPUS促成骨分化的作用(图7)。

## 3 讨论

骨折愈合的过程十分复杂, 包括血肿形成、机化以及骨痂的形成和改建。骨质疏松、糖尿病、吸烟、酗酒等危险因素也会影响骨折愈合, 每年仍有10%左右的骨折病例最终会发生延迟愈合或骨不连<sup>[10]</sup>。为此, 我们需要寻找更为安全高效的方法来加速骨折愈合或治疗骨不连。

LIPUS作为一种生物物理疗法, 具有无辐射影响、便于携带、速度快且费用更为经济等特点, 对于新鲜骨折和骨折不愈合具有一定的治疗效果<sup>[2]</sup>。临床研究表明, LIPUS能促进骨折修复并且加速骨



A: Western blot检测LIPUS及2-APB处理下成骨分化相关指标蛋白表达的变化情况; B: 相应灰度值分析,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ ,  $****P<0.0001$ 。A: Western blot analysis of protein expression changes associated with osteogenic differentiation under LIPUS and 2-APB treatment; B: corresponding gray value analysis of,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ ,  $****P<0.0001$ 。

图7 Western blot检测LIPUS及2-APB对成骨分化相关指标蛋白表达的影响

Fig.7 Effect of LIPUS and 2-APB on protein expression of osteogenic differentiation markers detected by Western blot

折愈合,然而LIPUS发挥作用的机制却不清楚<sup>[11]</sup>。LIPUS能够作用于MSCs,影响其迁移、增殖、分化等。有研究发现,LIPUS能够促进间充质干细胞向成骨方向分化<sup>[7]</sup>,但具体机制并不清楚。

DPSCs是一种具有多向分化潜能的干细胞,能够分化为骨、软骨、脂肪、神经等细胞系类型<sup>[12]</sup>,且免疫原性低还具有免疫调控作用。作为理想的种子细胞,通过组织工程方法引入骨组织损伤局部,或者应用外源性DPSCs注射于骨折部位,体现了它在再生医学研究中广阔的应用前景<sup>[13]</sup>。已有研究证实,LIPUS能够促进DPSCs的增殖<sup>[14]</sup>,且通过一些离子通道发挥作用<sup>[15]</sup>。但LIPUS是否能提高DPSCs向成骨细胞谱系分化,目前仍未有报道。本实验首先对细胞进行培养和鉴定,说明其为人来源的DPSCs。然后分为对照组和LIPUS组,结果发现,LIPUS组ALP阳性蓝紫色染色、茜素红红色钙结节较对照组明显增多、ALP活性显著增加;qRT-PCR检测显示,LIPUS组OPN、OCN、RUNX2 mRNA表达水平明显增加。以上说明,LIPUS能够促进DPSCs早期及晚期成骨分化并且能提高成骨相关基因的表达,证明了LIPUS能够促进DPSCs的成骨分化。

胞内外的力学微环境和细胞机械力产生的机械信号对调控MSCs形态结构和功能有着重要的影响<sup>[16]</sup>。研究发现,单一的剪切应力能够刺激MSCs的成骨分化,故机械应力促进MSCs向成骨方向分化<sup>[6]</sup>。而机械效应是LIPUS最原发和最主要的效应,因此,LIPUS可能以声波压的机械力形式作用于MSCs,促进成骨分化。一些机械敏感离子通道蛋白在MSCs中高表达,这些特异性离子通道的表达能够

帮助MSCs对物理和化学环境变化产生应答,对于细胞命运的决定具有重要影响<sup>[17]</sup>。研究表明,细胞的一些机械感应通道能够响应LIPUS,从而产生生物学效应<sup>[18]</sup>。瞬时受体电位TRP通道mstastatin家族第7号成员Trpm7,是含有阳离子通道和蛋白激酶双重结构的膜蛋白<sup>[19]</sup>,广泛分布于各种组织和器官中,能感应来自周围环境的多种刺激(如渗透压、温度、机械等)且具有机械敏感性<sup>[8]</sup>。本实验经qRT-PCR检测发现,在LIPUS促进DPSCs成骨分化这一过程中,LIPUS组较对照组Trpm7表达显著提高,提示Trpm7参与了LIPUS促成骨分化的过程。

近来有研究表明,Trpm7的缺陷会加速软骨内成骨和延迟膜内骨化<sup>[9]</sup>。Trpm7对机械力较敏感,可以快速感受压力和流体剪切力的作用,上调成骨相关基因的表达<sup>[20]</sup>。本实验发现,应用Trpm7通道特异性抑制剂2-APB处理后,能明显抑制LIPUS促成骨分化的作用,ALP和茜素红染色以及OPN、OCN和RUNX2的蛋白表达明显降低。这提示,在LIPUS促成骨分化过程中,Trpm7通道发挥了关键的作用,抑制Trpm7通道可以降低LIPUS促成早期及晚期成骨分化的作用。胞内游离钙离子浓度变化是细胞接受环境压力后的首要应答,也是机械传导的重要生物信号<sup>[8]</sup>。机械作用开放Trpm7通道,其作为质膜钙通道而引起的胞内钙震荡是MSCs响应机械应力的主要方式,且这一过程可能是通过细胞骨架的被动牵拉所致<sup>[21]</sup>,具体机制有待进一步探讨。

本实验提示LIPUS能够促进DPSCs的成骨分化,并发现Trpm7在LIPUS促成骨分化的过程中发挥一定作用。这一发现为LIPUS能够促进MSCs

成骨分化这一理论提供了新的支持, 也为这一耐受性良好、无创且操作简便的治疗方法在临床上的应用奠定了理论及实验基础。

### 参考文献 (References)

- Hannouche D, Petite H, Sedel L. Current trends in the enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg Br* 2001; 83(2): 157-64.
- Kamath JB, Jayasheelan N, Reddy B, Muhammd S, Savur A. The effect of low-intensity pulsed ultrasound therapy on fracture healing. *Muller J Med Sci Res* 2015; 6(1): 49-53.
- Rubin C, Bolander M, Ryaby JP, Hadjiargyrou M. The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83-A(2): 259-70.
- 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(8): 531.
- Cristaldi M, Mauceri R, Tomasello L, Pizzo G, Pizzolanti G, Giordano C, *et al.* Dental pulp stem cells for bone tissue engineering: a review of the current literature and a look to the future. *Regen Med* 2018; doi: 10.2217/rme-2017-0112.
- Yourek G, McCormick SM, Mao JJ, Reilly GC. Shear stress induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Regen Med* 2010; 5(5): 713-24.
- Angle SR, Sena K, Sumner DR, Virdi AS. Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by various intensities of low-intensity pulsed ultrasound. *Ultrasonics* 2011; 51(3): 281-8.
- Xiao E, Yang H, Gan YH, Duan DH, He LH, Guo Y, *et al.* Trpm7 senses mechanical stimulation inducing osteogenesis in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2015; 33(2): 615-21.
- Elizondo MR, Arduini BL, Paulsen J, Macdonald EL, Sabel JL, *et al.* Defective skeletogenesis with kidney stone formation in dwarf zebrafish mutant for Trpm7. *Curr Biol* 2005; 15(7): 667-71.
- Uddin SM, Qin YX. Enhancement of osteogenic differentiation and proliferation in human mesenchymal stem cells by a modified low intensity ultrasound stimulation under simulated microgravity. *PLoS One* 2013; 8(9): e73914.
- Padilla F, Puts R, Vico L, Guignandon A, Raum K. Stimulation of bone repair with ultrasound. *Adv Exp Med Biol* 2016; 880: 385-427.
- Rodríguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, Meseguer L, Ramírez MC, Blanquer M, *et al.* Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J* 2011; 44(9): 800-6.
- Nakajima K, Kunimatsu R, Ando K, Ando T, Hayashi Y, Kihara T, *et al.* Comparison of the bone regeneration ability between stem cells from human exfoliated deciduous teeth, human dental pulp stem cells and human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 497(3): 876-82.
- Gao Q, Walmsley AD, Cooper PR, Scheven BA. Ultrasound stimulation of different dental stem cell populations: role of mitogen-activated protein kinase signaling. *J Endod* 2016; 42(3): 425-31.
- Gao Q, Cooper PR, Walmsley AD, Scheven BA. Role of Piezo channels in ultrasound-stimulated dental stem cells. *J Endod* 2017; 43(7): 1130-6.
- Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 2009; 324(5935): 1673-7.
- Solmesky LJ. Characterization of human mesenchymal stem cells from bone marrow. Germany: LAP LAMBERT Academic Press, 2012.
- Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005; 2005(272): re3.
- Runnels LW, Yue L, Clapham DE. The Trpm7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis. *Nat Cell Biol* 2002; 4(5): 329-36.
- Liu YS, Liu YA, Huang CJ, Yen MH, Tseng CT, *et al.* Mechano-sensitive Trpm7 mediates shear stress and modulates osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells through Osterix pathway. *Sci Rep* 2015; 5: 16522.
- Kim TJ, Joo C, Seong J, Reza V, Elliot LB, Michael WB, *et al.* Distinct mechanisms regulating mechanical force-induced Ca<sup>2+</sup> signals at the plasma membrane and the ER in human MSCs. *Elife* 2015; 4(4): e04876.