·基础研究·

低氧环境下Notch信号通路对人牙髓干细胞成牙本质向分化的影响

扫码阅读电子版

关丽娜[1] 杨帆[2] 尹东锋[1] 杨自更[1] 魏敦宏[1] 雒可夫[1] 王瑞[1]
[1]新疆军区总医院,乌鲁木齐 830000;[2]军事口腔医学国家重点实验室,口腔疾病国家临床医学研究中心,陕西省口腔医学重点实验室,空军军医大学口腔医院,西安 710032
通信作者:王瑞,Email:urumqi@126.com

【摘要】 目的 探讨低氧环境下通过低氧诱导因子-1α(*HIF-1α*)调控Notch信号通路对人牙髓干细胞(HDPSC)成牙本质向分化能力的影响。**方法** 组织块酶消化法培养HDPSC,给予氯化钴($CoCl_2$)诱导的化学性低氧环境,Western blot检测HIF-1α蛋白表达,茜素红染色检测细胞矿化结节形成能力,反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测Notch下游靶基因*Hes1*与成牙本质相关基因的表达;进一步加入Notch信号通路特异性阻断剂γ分泌酶抑制剂(GSI),观察以上指标的变化。报告基因方法检测*HIF-1α*对Notch信号通路的调控作用。采用R version 3.5.3软件进行统计分析,计量资料进行正态检验,多组间比较采用单因素方差分析(方差齐)或Kruskal-Wallis *H*检验(方差不齐),两两比较采用LSD-*t*检验(方差齐)或Mann-Whitney *U*检验(方差不齐)。**结果** (1)$CoCl_2$诱导的低氧条件下HDPSC中的HIF-1α蛋白水平上调,Notch下游靶基因*Hes1* mRNA相对表达量为1.46±0.12,相比常氧组(1.06±0.09)显著增高($t=-4.64$,$P=0.012$);GSI处理阻断Notch信号通路后,低氧条件下HDPSC中HIF-1α蛋白水平下调,*Hes1* mRNA相对表达量降低至0.82±0.14,与处理前相比差异有统计学意义($t=5.98$,$P=0.004$);常氧条件下GSI处理后的HDPSC中HIF-1α蛋白水平也明显下调,*Hes1* mRNA相对表达量(0.30±0.09)相比处理前也显著降低($t=10.08$,$P=0.001$);(2)矿化诱导后的茜素红染色结果显示:低氧处理后,HDPSC细胞成牙本质分化能力下降;GSI处理后,成牙本质向分化能力增强。成骨/牙本质相关基因mRNA表达水平检测结果显示:低氧处理后,*BSP*、*OCN*和*DSPP*的mRNA相对表达量分别为0.53±0.14、0.43±0.20、0.48±0.11,相比常氧组(1.21±0.12、1.08±0.19、1.03±0.13)显著降低($t_{BSP}=6.30$,$P_{BSP}=0.003$;$t_{OCN}=4.07$,$P_{OCN}=0.015$;$t_{DSPP}=5.67$,$P_{DSPP}=0.005$);GSI处理后,低氧条件下*BSP*、*OCN*和*DSPP* mRNA相对表达量分别为0.99±0.13、1.09±0.13、0.95±0.16,与处理前相比显著增高($t_{BSP}=-4.17$,$P_{BSP}=0.014$;$t_{OCN}=-4.83$,$P_{OCN}=0.012$;$t_{DSPP}=-4.30$,$P_{DSPP}=0.017$),常氧条件下*BSP*、*OCN*和*DSPP* mRNA相对表达量分别为1.73±0.20、1.55±0.08、1.52±0.14,与处理前相比显著增高($t_{BSP}=-3.84$,$P_{BSP}=0.027$;$t_{OCN}=-3.99$,$P_{OCN}=0.035$;$t_{DSPP}=-4.43$,$P_{DSPP}=0.011$)。(3)荧光素酶报告基因结果显示,*HIF-1α*可调控NICD启动子,使双荧光素酶相对表达活性为5.37±0.12,与对照组(2.09±0.15)相比显著增强($t=-28.92$,$P<0.001$),提示*HIF-1α*可能使Notch信号通路激活。**结论** 低氧引起HDPSC中HIF-1α升高并可能通过激活Notch信号通路抑制其成牙本质向分化能力。

【关键词】 牙髓; 干细胞; 低氧; 低氧诱导因子; Notch信号通路; 成牙本质向分化
基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2016D01C391)
引用著录格式:关丽娜,杨帆,尹东锋,等. 低氧环境下Notch信号通路对人牙髓干细胞成牙本质向分化的影响[J/CD]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2020,14(4):214-220.
DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2020.04.003

Effects of Notch signaling pathway on the dentin differentiation of human dental pulp stem cells in hypoxic environment

Guan Lina[1], Yang Fan[2], Yin Dongfeng[1], Yang Zigeng[1], Wei Dunhong[1], Luo Kefu[1], Wang Rui[1]
[1]General Hospital of Xinjiang Military Command, PLA, Urumqi 830000, China; [2]State Key Laboratory of Military Stomatology and National Clinical Research Center for Oral Diseases and Shaanxi Key Laboratory of Stomatology, Department of Rehabilitation Medicine, School of Stomatology, Air Force Medical

University, PLA, Xi'an 710032, China

Corresponding author: Wang Rui, Email: urumqi@126.com

【Abstract】 Objective To investigate whether and how hypoxia affects the differentiation capacity of human dental pulp stem cells (HDPSCs) via Notch signaling. **Methods** Primary cultured HDPSCs were stimulated by $CoCl_2$, which could induce a chemical hypoxic environment. HIF-1α protein level was detected by Western blot. The mRNA expression levels of Notch and dentin related genes were detected by RT-PCR. Alizarin red staining was used to detect the ability of HDPSCs to form mineralized nodules. Notch signaling pathway specific blocker GSI was further added to observe the changes of the indicators above. Reporter gene method was then used to detect the regulation of *HIF-1α* gene on Notch signaling pathway. R software (version 3.5.3) was used for statistical analysis. All measurement data were done by normality test. One-Way ANOVA (homogeneity of variance) or Kruskal-Wallis *H* test (heterogeneity of variance) was used for the multi-group comparison, and LSD-*t* test (homogeneity of variance) or Mann-Whitney *U* test (heterogeneity of variance) was used for the pair-wise comparison. **Results** (1) HIF-1α protein level was up-regulated by the chemical hypoxic environment induced by $CoCl_2$, and then reduced when GSI was added. The mRNA expression level of Notch target gene *Hes1* was also significantly increased from 1.06 ± 0.09 to 1.46 ± 0.12 ($t = -4.64$, $P = 0.012$) under the hypoxic condition, and then significantly decreased to 0.82 ± 0.14 when GSI was added ($t = 5.98$, $P = 0.004$). Moreover, the same resultsthat the mRNA expression level of *Hes1* was significantly decreased from 1.06 ± 0.09 to 0.30 ± 0.09 when GSI was added ($t = 10.08$, $P = 0.001$), were observed under a normoxic condition. (2) The results of alizarin red staining showed that the dentin differentiative potential of HDPSCs was decreased under the hypoxic environment, and then enhanced when GSI was added. The mRNA expression levels of osteogenic/dentin related genes *BSP*, *OCN* and *DSPP* were 1.21 ± 0.12, 1.08 ± 0.19 and 1.03 ± 0.13 under the normoxic environment, and 0.53 ± 0.14, 0.43 ± 0.20 and 0.48 ± 0.11 under the hypoxic environment, where there was a statistically significant difference between the two conditions ($t_{BSP} = 6.30$, $P_{BSP} = 0.003$; $t_{OCN} = 4.07$, $P_{OCN} = 0.015$; $t_{DSPP} = 5.67$, $P_{DSPP} = 0.005$). When GSI was added, the mRNA expression levels of *BSP*, *OCN* and *DSPP* under the hypoxic environment were then significantly increased to 0.99 ± 0.13, 1.09 ± 0.13 and 1.09 ± 0.13 ($t_{BSP} = -4.17$, $P_{BSP} = 0.014$; $t_{OCN} = -4.83$, $P_{OCN} = 0.012$; $t_{DSPP} = -4.30$, $PDSPP = 0.017$). Moreover, the same results that the mRNA expression level of *BSP*, *OCN* and *DSPP* were significantly increased to 1.73 ± 0.20, 1.55 ± 0.08 and 1.52 ± 0.14 respectively after GSI was added ($t_{BSP} = -3.84$, $P_{BSP} = 0.027$; $t_{OCN} = -3.99$, $P_{OCN} = 0.035$; $t_{DSPP} = -4.43$, $P_{DSPP} = 0.011$), were observed under the normoxic condition. (3) The results of luciferase reporter gene experiment showed that the activity of Notch signaling pathway was significantly increased from 2.09 ± 0.15 to 5.37 ± 0.12 after the addition of *HIF-1α* ($t = -28.92$, $P < 0.001$). **Conclusion** Hypoxia caused an increase of HIF-1α in HDPSCs and HIF-1α may inhibit the dentin differentiative potential of HDPSCs by activating the Notch signaling pathway.

【Key words】 Dental pulp; Stem cells; Anoxia; Hypoxia inducible factors; Notch signaling pathway; Odontogenic differentiation

Fund program: Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2016D01C391)

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2020.04.003

牙髓干细胞(dental pulp stem cell, DPSC)是最早从牙齿分离获得的来源于牙髓组织中的一种成体间充质干细胞,具有高度增殖、自我更新及多向分化潜能[1],在牙髓组织的损伤修复过程中发挥着重要作用。DPSC在一定条件下可以分化形成多种组织,包括牙本质-牙髓复合体、骨组织、脂肪组织、神经组织等[2-4],是牙再生及组织工程中重要的种子细胞。

牙髓被硬组织包绕、血管丰富且缺乏有效的侧枝循环,当受到外伤或炎症等刺激时易引起血管扩张和通透性增加、组织压上升,从而导致血流减少和局部低氧,进而影响参与牙髓损伤修复的DPSC干性特征和分化能力其修复过程[5]。已有研究发现,低氧可以影响DPSC的多潜能性、自我更新和分化能力[6-8],但具体机制还不是很明确。因此,研究DPSC自我更新与分化能力在低氧条件下的改变和

相关调控机制对于充分理解牙齿损伤修复机制并指导DPSC的临床应用有着重要意义。

Notch信号通路是一个跨物种的高度保守的信号通路,在细胞增殖与分化等方面有着重要作用,并已被证实在牙齿发育和牙齿损伤修复中对细胞命运决定及细胞分化方面起着至关重要的作用,过表达或者抑制 Notch 的配体Jagged1能对Notch信号通路产生显著影响,从而影响DPSC的增殖和分化[9]。在低氧导致的细胞应激状态中,低氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)起到重要的调节作用。有研究报道,HIF-1α能够竞争性结合Notch信号通路的胞内段Notch1 胞内域(Notch1 intracellular domain,NICD),从而调控Notch信号的活性[10-11],对于这种协同作用的深入研究将有助于体外培养条件的优化及揭示DPSC定向分化的机制。本研究以人牙髓干细胞(human dental pulp stem cell, HDPSC)为对象,通过氯化钴(cobalt chloride,$CoCl_2$)诱导化学性低氧环境,影响细胞内HIF-1α的表达,进而探讨HIF-1α是否可以通过Notch信号通路影响HDPSC的分化能力,为进一步阐明HDPSC在牙髓损伤修复及再生机制中的作用提供依据。

材料与方法

一、主要试剂和仪器

α-MEM、胰蛋白酶、胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)、青霉素、链霉素(Hyclone,美国);$CoCl_2$、γ分泌酶抑制剂(gamma-secretase inhibitor,GSI)、二甲基亚砜(DMSO,Sigma,美国);β-actin抗体、HIF-1α抗体(Abcam,英国);反转录聚合酶链反应(PCR)试剂盒、双荧光报告检测试剂盒(Promega,美国);SYBR实时荧光定量PCR试剂(TaKaRa,日本);倒置显微镜(Nikon,日本);离心机、微量可调加样器(Eppendorf,德国);CO_2细胞培养箱(Heraeus,德国);荧光定量PCR仪(Bio-Rad,美国)。

二、实验方法

1. HDPSC的分离与培养:来源于2018年1—10月新疆军区总医院口腔科的门诊患者6例,年龄17~25岁,因阻生拔除获得的完整的第三磨牙6颗,要求牙齿健康,无牙体牙周疾病,排除全身系统性疾病、慢性感染性疾病史、家族遗传病史、特殊药物服用与吸烟史以及近期急性感染。本研究已获新疆军区总医院医学伦理委员会批准(审批号:院字第201606号),参与研究的患者均已签署知情和许可同意书。

第三磨牙拔除后立即放入预冷的含双抗(青霉素、链霉素各100 U/mL)的α-MEM培养基中带回实验室,无菌条件下劈开牙齿,取出牙髓,切去根尖2 mm的牙髓组织,用含双抗的磷酸盐缓冲液(PBS)液冲洗干净后剪碎,置于3 mg/mL Ⅰ型胶原酶和4 mg/mL dispase的溶液中37 ℃消化1~1.5 h,加入含10% FBS的α-MEM完全培养液终止消化;轻吹打细胞,过70 μm滤网得到单细胞悬液,置于离心管中,1000 r/min离心5 min(离心半径13.5 cm)后弃上清,再用α-MEM完全培养液重悬,轻轻吹打使混匀,调整细胞密度至1×10^5/mL,接种于35 mm培养皿中,于5% CO_2、37 ℃培养箱中培养。

2. HDPSC分组与处理:(1)胰蛋白酶消化收集HDPSC,以7×10^5细胞/孔平铺细胞于6孔细胞培养皿,5% CO_2、37 ℃培养箱中培养8~24 h,细胞贴壁完全后即可开始处理;(2)细胞分组:共分为常氧组、常氧+GSI组、低氧组和低氧+GSI组4个组别,按照表1进行给药处理,其中$CoCl_2$工作浓度为100 μmol/L,DMSO和GSI工作浓度为20 μmol/L。

表1 人牙髓干细胞(HDPSC)的分组方法与给药处理

组别	$CoCl_2$	DMSO	GSI
常氧组	-	+	-
常氧+GSI组	-	-	+
低氧组	+	+	-
低氧+GSI组	+	-	+

注:+表示给药处理,-表示未给药处理;$CoCl_2$为氯化钴,DMSO为二甲基亚砜,GSI为γ分泌酶抑制剂

3. Western blot检测HIF-1α蛋白表达水平:分组处理后的细胞培养24 h后,移除培养液,PBS冲洗,加入适量的RIPA裂解液收集细胞,4 ℃条件下12 000 r/min离心10 min(离心半径9.5 cm),采用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度。SDS-聚丙烯酰胺电泳后将蛋白转至PVDF膜,用5%的脱脂奶粉封闭2 h后,在一抗中4 ℃孵育过夜;加入辣根过氧化酶标记的二抗,室温孵育45 min,洗膜,加入曝光底物显影。

4. HDPSC成牙本质向分化能力检测:(1)当细胞融合度达到80%~90%时,消化细胞,按照2×10^4细胞/孔接种在事先包被0.1%明胶的24孔板中,继续培养至细胞融合度达到60%~70%时,更换培养液为矿化诱导培养液(含50 g/L抗坏血酸、10 mmol/L

β-甘油磷酸钠、0.01 mmol/L地塞米松、体积分数为10% FBS的α-MEM),并按照表1中分组处理细胞;(2)每隔3天更换新鲜的矿化诱导分化培养基,并含相应药物,诱导28 d后,用茜素红进行染色;(3)茜红素染色:诱导分化结束后,移除培养基,用PBS冲洗1~2次,4%多聚甲醛固定10 min,PBS清洗后加入1%茜素红染色剂染色20 min,PBS洗涤2遍,显微镜下观察染色效果,40倍镜下拍照。

5. 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测基因mRNA表达水平:收集细胞,Trizol抽提DPSC的总RNA,利用Primescript逆转录试剂盒反转录cDNA;实时荧光定量PCR检测Notch下游靶基因*Hes1*与成骨/成牙本质相关基因骨唾液酸蛋白(*bone sialoprotein*, *BSP*)、骨钙素(*osteocalcin*, *OCN*)及齿质唾液磷酸蛋白(*dentine sialophosphate protein*, *DSPP*)基因的表达水平,*β-actin*作为内参对照基因,以$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算基因相对表达量。引物由华大基因合成,引物序列见表2。

表2 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)引物序列

基因	引物序列
Hes1	上游:5′-TGGAAATGACAGTGAAGCACCTC-3′
	下游:5′-TCGTTCATGCACTCGCTGAAG-3′
BSP	上游:5′-CTGGCACAGGGTATACAGGGTTAG-3′
	下游:5′-GCCTCTGTGCTGTTGGTACTGGT-3′
OCN	上游:5′-CATGAGAGCCCTCACA-3′
	下游:5′-AGAGCGACACCCTAGAC-3′
DSPP	上游:5′-ATATTGAGGGCTGGAATGGGGA-3′
	下游:5′-TTTGTGGCTCCAGCATTGTCA-3′
β-actin	上游:5′-TGGCACCCAGCACAATGAA-3′
	下游:5′-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3′

6. 荧光素酶检测:将NICD(NM_017617.5)的启动子区域2000 bp(转录起始位点的-2000到-1位置)构建到pGL3-basic报告载体,*HIF-1α*构建到pLV-puro载体,由武汉金开瑞合成。(1)收集细胞,按照1×10^5细胞/孔接种于24孔细胞培养板,继续培养至细胞贴壁完全后即可开始瞬时转染;(2)细胞转染:准备1.5 mL EP管,将构建好的报告质粒(pGL3-NICD-promotor)、过表达质粒(pLV-HIF-1α)以及海肾荧光素酶质粒(phRL-TK)DNA各0.5 μg加至100 μL Opti-Medium中混匀,继续加入2 μL Turbofect,轻柔混匀后,室温静置15 min。将混合液逐滴加入上述单层细胞的细胞培养基中,轻轻摇动培养皿混匀,5% CO_2、37 ℃温箱培养8~12 h后更换为37 ℃预热的含血清的培养基,继续培养48 h后,收集细胞,按照试剂盒说明在荧光仪上测定荧光素酶活性,以海肾荧光素酶活性作为内参,计算二者的比值为报告基因相对荧光值。

三、统计学处理方法

采用R version 3.5.3软件进行统计分析,计量资料进行正态检验,以$\bar{x}\pm s$(服从正态分布)或M_0(P_{25}, P_{75})(不服从正态分布)表示,多组间比较采用单因素方差分析(方差齐)或Kruskal-Wallis *H*检验(方差不齐),两两比较采用LSD-*t*检验(方差齐)或Mann-Whitney *U*检验(方差不齐)。检验水准α = 0.05。

结　果

一、HIF-1α蛋白表达检测结果

Western blot检测HIF-1α蛋白表达结果显示,在常氧条件下,几乎不能在HDPSC中检测到HIF-1α蛋白的表达,而在$CoCl_2$诱导的化学性低氧条件下检测到了HIF-1α蛋白的表达(图1),说明$CoCl_2$有效模拟了低氧环境。

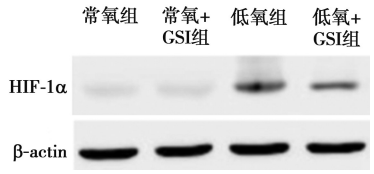

图1 低氧和Notch信号通路对HIF-1α蛋白表达的影响　GSI为γ分泌酶抑制剂

二、*Hes1* mRNA表达水平检测结果

实时荧光定量PCR检测Notch下游靶基因*Hes1* mRNA表达情况结果显示,$CoCl_2$处理后HDPSC的*Hes1* mRNA表达水平(1.46±0.12)相比常氧组(1.06±0.09)显著上调,差异有统计学意义($t=-4.64$, $P=0.012$),提示在$CoCl_2$模拟低氧环境下,Notch信号通路被激活了。GSI处理后,常氧组*Hes1* mRNA表达水平由1.06±0.09下调为0.30±0.09,差异有统计学意义($t=10.08$, $P=0.001$);低氧组*Hes1* mRNA表达水平也由1.46±0.12下调为0.82±0.14,差异也有统计学意义($t=5.98$, $P=0.004$),说明GSI有效抑制了Notch信号通路(图2)。

三、成牙本质向分化能力检测结果

HDPSC进行矿化诱导,28 d后茜素红染色,不同处理方式结果如图3所示:低氧处理后,细胞成牙本质分化能力下降;GSI处理后,细胞成牙本质向分化能力增强。实时荧光定量PCR检测成牙本质相

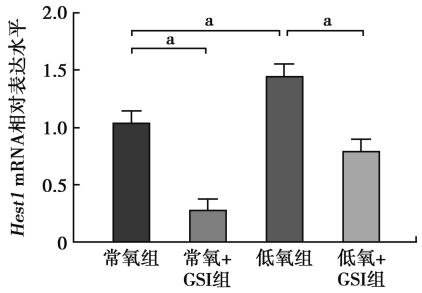

图2 低氧和Notch信号通路对*Hes1*基因表达的影响 GSI为γ分泌酶抑制剂;组间相比,差异有统计学意义($^aP<0.05$)

关基因*BSP*、*OCN*和*DSPP* mRNA表达情况,结果如图4、表3所示。低氧处理后,*BSP*、*OCN*和*DSPP* mRNA相对表达量相比常氧组显著降低,差异有统计学意义($t_{BSP}=6.30$,$P_{BSP}=0.003$;$t_{OCN}=4.07$,$P_{OCN}=0.015$;$t_{DSPP}=5.67$,$P_{DSPP}=0.005$);GSI处理后,低氧条件下*BSP*、*OCN*和*DSPP* mRNA相对表达量与处理前相比显著增高,差异有统计学意义($t_{BSP}=-4.17$,$P_{BSP}=0.014$;$t_{OCN}=-4.83$,$P_{OCN}=0.012$;$t_{DSPP}=-4.30$,$P_{DSPP}=0.017$),常氧条件下*BSP*、*OCN*和*DSPP* mRNA相对表达量与处理前相比也显著增高,差异有统计学意义($t_{BSP}=-3.84$,$P_{BSP}=0.027$;$t_{OCN}=-3.99$,$P_{OCN}=0.035$;$t_{DSPP}=-4.43$,$P_{DSPP}=0.011$)。

表3 低氧与Notch信号通路对人牙髓干细胞(HDPSC)中成牙本质相关基因mRNA表达水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	*BSP*	*OCN*	*DSPP*
常氧组	1.21±0.12	1.08±0.19	1.03±0.13
常氧+GSI组	1.73±0.20^a	1.55±0.08^a	1.52±0.14^a
低氧组	0.53±0.14^a	0.43±0.20^a	0.48±0.11^a
低氧+GSI组	0.99±0.13^b	1.09±0.13^b	0.95±0.16^b

注:与常氧组相比,$^aP<0.05$;与低氧组相比,$^bP<0.05$;GSI为γ分泌酶抑制剂

四、荧光素酶检测结果

为了进一步检测低氧诱导因子*HIF-1*α是否对Notch信号通路具有调控作用,本研究又在HDPSC中进行了报告基因实验。结果显示,加入*HIF-1*α可调控NICD promoter,使得双荧光素酶表达活性(5.37±0.12)与对照组(2.09±0.15)相比显著增强,差异有统计学意义($t=-28.92$,$P<0.001$,图5),提示HIF-1α可能使Notch信号通路激活。

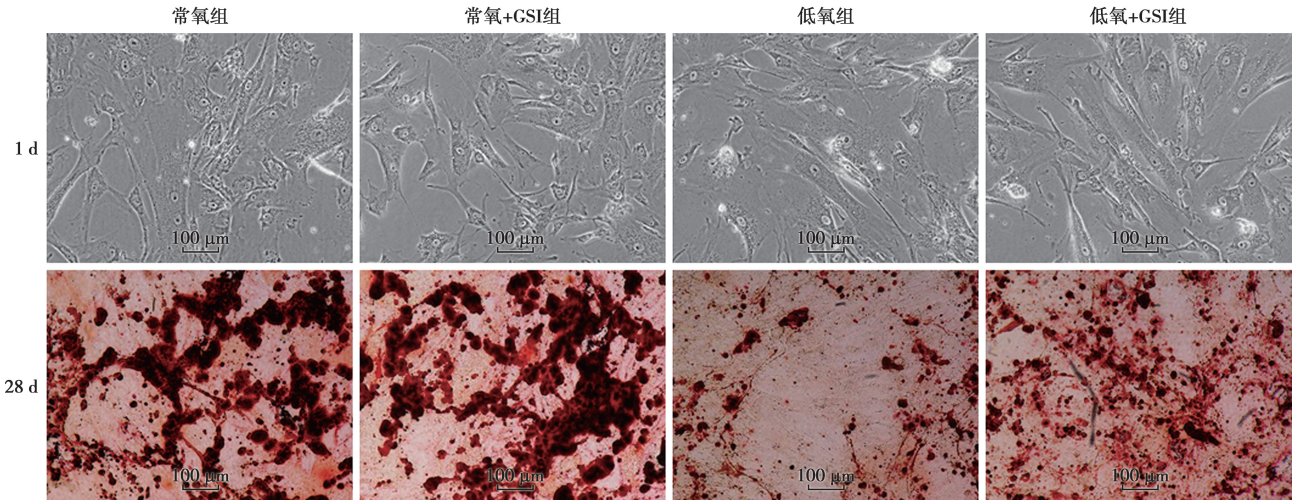

图3 人牙髓干细胞(HDPSC)成牙本质向分化能力检测结果(茜素红染色) GSI为γ分泌酶抑制剂

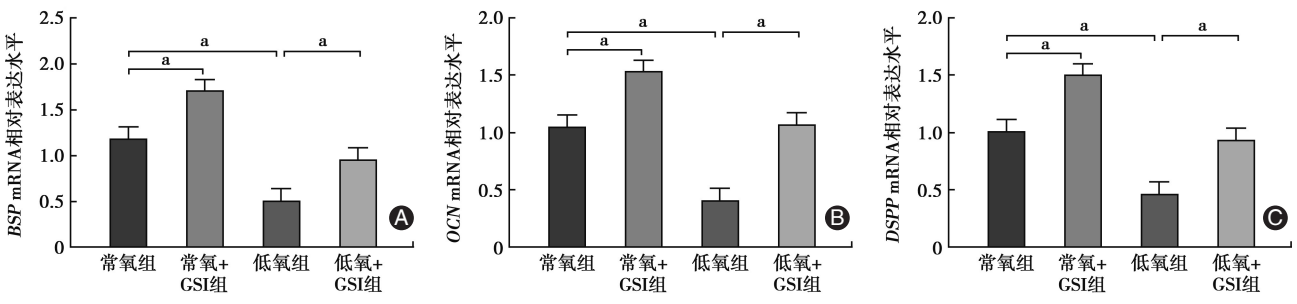

图4 低氧和Notch信号通路对牙本质分化相关基因表达的影响 A:*BSP*;B:*OCN*;C:*DSPP*;GSI为γ分泌酶抑制剂;组间相比,差异有统计学意义($^aP<0.05$)

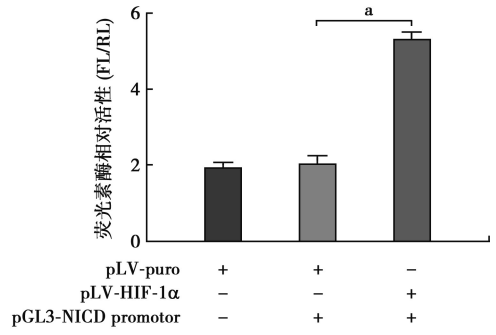

图5 荧光素酶活性检测*HIF-1α*对Notch活性的调控作用 GSI为γ分泌酶抑制剂;组间相比,差异有统计学意义($^aP<0.05$)

讨 论

$CoCl_2$是最常见的化学性低氧诱导试剂,其诱导低氧的主要机制是通过Co^{2+}与氧气结合后将氧感受器内的Fe^{2+}锁定在脱氧和状态,从而诱导细胞产生低氧状态,并上调细胞内HIF-1α的表达,达到同物理诱导低氧类似的效果[12-14]。本研究首先通过$CoCl_2$诱导化学性低氧环境,探讨低氧环境下阻断Notch信号通路对HDPSC分化能力的影响。结果显示:低氧条件下HDPSC的HIF-1α蛋白表达上调,Notch下游靶基因*Hes1* mRNA表达水平上调($P<0.05$),GSI处理阻断Notch信号通路后,HIF-1α蛋白水平下调,*Hes1* mRNA水平显著下调($P<0.01$),证实低氧可引起HDPSC中HIF-1α的表达上调,同时Notch信号通路也被激活了。进一步对HDPSC进行矿化诱导分化,并对诱导培养后的HDPSC行茜素红染色和成骨/牙本质相关基因mRNA表达水平检测,结果显示:低氧处理后HDPSC的成骨/牙本质分化能力下降($P<0.05$);GSI处理后,*Hes1* mRNA表达水平下调($P<0.05$),细胞成骨/牙本质向分化能力增强($P<0.05$),说明低氧能够有效抑制HDPSC的成骨/牙本质分化能力,但当Notch信号通路被阻断,低氧对细胞分化的抑制作用被抵消,提示Notch信号通路在低氧环境下对HDPSC的分化起到重要作用。进一步通过报告基因实验发现,*HIF-1α*能够对Notch信号通路的活性产生调控作用,并表现为对Notch活性的激活,提示低氧抑制HDPSC分化能力可能是通过*HIF-1α*激活Notch信号通路进行的。

氧气含量的变化是整个生命周期中重要的调节器,低氧能够影响细胞增殖、分化、调亡及损伤修复等生物学进程。低氧导致一系列转录诱导因子的表达,其中低氧诱导因子HIF-1α其中扮演了至关重要的作用[15-17]。有研究发现,HIF-1α能够竞争性结合Notch信号通路的Notch1胞内域(Notch1 intracellular domain,NICD),从而调控Notch信号的活性[6-7]。而作为高度保守的信号通路,Notch信号不仅在细胞增殖、分化等方面有着重要作用[18],在牙齿发育阶段对牙内皮-间充质相互作用以及牙齿成形也起着非常重要的作用[5]。Notch信号通路包括受体、配体和DNA结合蛋白3部分,受配体相结合后Notch信号通路被激活,Notch受体将其胞内段NICD释放进入细胞核,并与胞内转录调节因子CSL结合后,调控下游靶基因从而调节细胞的增殖、调亡及命运选择[19]。已证实,Notch信号通路在低氧环境下对维持干细胞的自我更新能力起到重要作用,以往的报道已经发现在胶质母细胞瘤干细胞中HIF-1α能够激活Notch信号通路,并在其干性维持中起着重要作用[6-7]。Weli等[20]的研究表明,Notch信号通路介导了体外培养的肌原干细胞与神经干细胞在低氧条件下的分化,HIF-1α在低氧时表达上调,同时又与Notch信号的启动子NICD结合,并启动*Hes*、*Hey*等下游基因的表达,进而影响干细胞的多向分化能力。Xu等[21]发现,低氧可以抑制骨髓间充质干细胞的分化,而这种作用又是通过激活Notch信号通路完成的。对HDPSC的研究结果进一步证实:低氧引起HDPSC中HIF-1α升高并可能通过激活Notch信号通路抑制其分化能力。低氧环境能够促进HDPSC的增殖,抑制HDPSC的分化,而这种作用可能是通过激活Notch信号通路来实现的。但对DPSC而言,Notch信号通路在低氧状态下对细胞增殖与分化影响的具体的分子机制仍有待进一步研究。

综上所述,本研究以HDPSC为对象,通过模拟低氧环境影响细胞内HIF-1α的表达,发现HIF-1α可能通过激活Notch信号通路进而影响HDPSC的分化能力,为进一步阐明HDPSC在牙髓损伤修复及再生机制中的作用提供有益依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

志谢 感谢新疆医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学教研室刘早玲和王永治老师指导并审核了数据统计分析

参 考 文 献

[1] Gronthos S, Mankani M, Brahim J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo[J]. Proc Nati Acad Sci U S A, 2000, 97(25): 13625-13630. DOI: 10.1073/pnas.240309797.

[2] Bousnaki M, Bakopoulou A, Papadogianni D, et al. Fibro/

chondrogenic differentiation of dental stem cells into chitosan/alginate scaffolds towards temporomandibular joint disc regeneration[J]. J Mater Sci Mater Med, 2018,29(7):97. DOI:10.1007/s10856-018-6109-6.

[3] Han YJ, Kang YH, Shivakumar SB, et al. Stem cells from cryopreserved human dental pulp tissues sequentially differentiate into definitive endoderm and hepatocyte-like cells in vitro[J]. Int J Med Sci, 2017,14(13):1418. DOI:10.7150/ijms.22152.

[4] Suchánek J, Nasry SA, Soukup T. The differentiation potential of human natal dental pulp stem cells into insulin-producing cells [J]. Folia Biol (Praha), 2017,63(4):132-138.

[5] Guo X, Mu H, Yan S, et al. Exploring the molecular disorder and dysfunction mechanism of human dental pulp cells under hypoxia by comprehensive multivariate analysis[J]. Gene, 2020, 735:144332. DOI:10.1016/j.gene.2020.144332.

[6] Kakkar A, Sharma P, Sankar MM, et al. Effect of hypoxia on stemness and differentiation of dental pulp derived stem cells[J]. IOSR J Dent Med Sci, 2016,15(8):102-111. DOI:10.9790/0853-150807102111.

[7] Iida K, Takeda - Kawaguchi T, Tezuka Y, et al. Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells[J]. Arch Oral Biol, 2010,55(9):648-654. DOI:10.1016/j.archoralbio.2010.06.005.

[8] 项海东,李浩渤,陈惠珍. 脂多糖调控 Notch 信号通路作用于人牙髓干细胞增殖、分化、凋亡的实验研究[J]. 中国免疫学杂志, 2017,33(10):1483-1486,1497. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2017.10.009.

[9] Hu YY, Fu LA, Li SZ, et al. Hif-1α and Hif-2α differentially regulate Notch signaling through competitive interaction with the intracellular domain of Notch receptors in glioma stem cells[J]. Cancer Lett, 2014,349(1):67-76. DOI:10.1016/j.canlet.2014.03.035.

[10] Torun ZÖ, Torun D, Demirkaya K, et al. Hypoxia inhibits mineralization ability of human dental pulp cells treated with TEGDMA but increases cell survival in accordance with the culture time[J]. Arch Oral Bio, 2016,71:59-64. DOI:10.1016/j.archoralbio.2016.07.002.

[11] Qiang L, Wu T, Zhang HW, et al. HIF-1α is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating Notch signaling pathway[J]. Cell Death Differ, 2012,19(2):284-294. DOI:10.1038/cdd.2011.95.

[12] Ahmed MA. Exploring the impact of hypoxia mimetic agents on multipotent stem cell biology[D]. Keele University, 2018.

[13] Teti G, Focaroli S, Salvatore V, et al. The hypoxia - mimetic agent cobalt chloride differently affects human mesenchymal stem cells in their chondrogenic potential[J]. Stem Cells Int, 2018, 2018:3237253. DOI:10.1155/2018/3237253.

[14] Laksana K, Sooampon S, Pavasant P, et al. Cobalt chloride enhances the stemness of human dental pulp cells[J]. J Endod, 2017,43(5):760-765. DOI:10.1016/j.joen.2017.01.005.

[15] Keith B, Simon MC. Hypoxia inducible factors, stem cells and cancer[J]. Cell, 2007,129(3):465-472. DOI:10.1016/j.cell.2007.04.019.

[16] Kumar S, Vaidya M. Hypoxia inhibits mesenchymal stem cell proliferation through HIF1α-dependent regulation of P27[J]. Mol Cell Biochem, 2016,415(1-2):29-38. DOI:10.1007/s11010-016-2674-5.

[17] Lee HJ, Jung YH, Choi GE, et al. Role of HIF1α Regulatory Factors in Stem Cells[J]. Int J Stem Cells, 2019,12(1):8-20. DOI:10.15283/ijsc18109.

[18] Lloyd-Lewis B, Mourikis P, Fre S. Notch signalling: sensor and instructor of the microenvironment to coordinate cell fate and organ morphogenesis[J]. Curr Opin Cell Biol, 2019,61:16-23. DOI:10.1016/j.ceb.2019.06.003.

[19] Nandagopal N, Santat LA, LeBon L, et al. Dynamic ligand discrimination in the Notch signaling pathway[J]. Cell, 2018, 172(4):869-880.e19. DOI:10.1016/j.cell.2018.01.002.

[20] Weli SC, Fink T, Cetinkaya C, et al. Notch and Hedgehog signaling cooperate to maintain self-renewal of human embryonic stem cells exposed to low oxygen concentration[J]. Int J Stem Cells, 2010,3(2):129. DOI:10.15283/ijsc.2010.3.2.129.

[21] Xu N, Liu H, Qu F, et al. Hypoxia inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts by activation of Notch signaling[J]. Exp Mol Pathol, 2013,94(1):33-39. DOI:10.1016/j.yexmp.2012.08.003.

(收稿日期:2020-03-26)

(本文编辑:王嫚)