

# GREM1对根尖牙乳头干细胞成骨/成牙分化功能的影响机制研究\*

朱行燕<sup>1</sup>, 刁树<sup>2</sup>, 杨东梅<sup>2△</sup>, 范志朋<sup>3△</sup>

1. 国家儿童医学中心 首都医科大学附属北京儿童医院 口腔科 (北京 100045);

2. 首都医科大学附属北京口腔医院 儿童口腔科 (北京 100050);

3. 首都医科大学附属北京口腔医院研究所 全牙再生及口腔组织功能重建北京市重点实验室 (北京 100050)

**【摘要】** 目的 研究骨形态生成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)拮抗剂Gremlin1(GREM1)对根尖牙乳头干细胞(stem cells from the apical papilla, SCAPs)功能的影响,并探索其机制。方法 体外分离培养SCAPs,免疫荧光染色实验检测GREM1在SCAPs的亚细胞定位;利用GREM1shRNA慢病毒转染,敲低GREM1;分别对GREM1敲低组和对照组SCAPs进行成骨诱导,实时荧光定量PCR(Real time-PCR)和Western blot检测转染后GREM1的敲低效果。取两组细胞,成骨诱导7 d后进行碱性磷酸酶(ALP)活性测定,成骨/成牙本质诱导3周后进行茜素红染色,并用Real time-PCR检测成骨诱导0周、1周、2周、3周后成骨/成牙相关基因骨钙素(OCN)、骨桥素(OPN)、骨涎蛋白(BSP)、牙本质基质蛋白(DMP1)、牙本质涎磷蛋白(DSPP)以及成骨/成牙关键转录因子Runx相关转录因子2(RUNX2)、成骨细胞特异性转录因子(OSX)、同源盒基因2(DLX2)的表达。取两组细胞,CCK8和流式细胞术检测细胞增殖能力变化;Real time-PCR检测衰老相关基因p53、细胞周期调控因子1(Waf1)和干性相关基因kruppel样因子4(KLF4)、性别决定区Y框蛋白2(SOX2)的表达,以及BMPs相关基因(BMP2、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP9)的表达。结果 免疫荧光实验表明GREM1在胞核内表达量比胞浆中更高;Real time-PCR和Western blot验证了GREM1敲低组的敲低效果。GREM1敲低组ALP活性高于对照组( $P<0.05$ ),茜素红染色浅于对照组;OCN、DMP1在1周、2周、3周时表达均有升高,OPN在2周时升高,BSP在3周时升高,DSPP在1周时升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),成骨关键转录因子RUNX2、OSX、DLX2均在不同时段升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。CCK-8法和流式细胞术显示GREM1敲低组增殖能力较对照组下降( $P<0.05$ )。与对照组相比,GREM1敲低组BMP2、BMP6、BMP7表达升高,SOX2、KLF4表达升高( $P<0.05$ ),P53、Waf1表达下降( $P<0.05$ )。结论 GREM1敲低后,能促进SCAPs成骨/成牙分化及干性,抑制SCAPs的增殖及衰老;GREM1对SCAPs的功能作用可能是通过在mRNA水平调控BMP2、BMP6、BMP7的表达实现的。

**【关键词】** 根尖牙乳头干细胞 GREM1 骨形态生成蛋白 成骨/成牙分化

## The Mechanism of GREM1's Effect on Osteogenic/Odontogenic Differentiation of Stem Cells from Apical Papilla

ZHU Xing-yan<sup>1</sup>, DIAO shu<sup>2</sup>, YANG Dong-mei<sup>2△</sup>, FAN Zhi-peng<sup>3△</sup>. 1. Department of Dentistry, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, National Center for Children's Health, Beijing 100045, China; 2. Department of Pediatric Dentistry, Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 3. Beijing Key Laboratory of Tooth Regeneration and Function Reconstruction, Research Institute of Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

△ Corresponding author, YANG Dong-mei, E-mail: yangdm1004@126.com; FAN Zhi-peng, E-mail: zpfan@ccmu.edu.cn

**【Abstract】** **Objective** To study the effect of bone morphogenetic protein (BMP) antagonist Gremlin 1 (GREM1) on the function of stem cells from apical papilla (SCAPs) and explore its mechanism. **Methods** After isolation and culturing of stem cells from apical papilla *in vitro*, immunofluorescent staining was done to examine the subcellular localization of GREM1 in SCAPs. Transfection with lentiviral GREM1 shRNA was done to knock-down the GREM1. The SCAPs were subjected to osteogenic induction in both the GREM1 knockdown group and the control group, and the knockdown effect of GREM1 was examined using real time-PCR and Western blot. Two groups of cells were collected and the alkaline phosphatase (ALP) activity was measured 7 d after osteogenic induction. Alizarin red staining was done 3 weeks after osteogenic/odontogenic induction and real time-PCR was done after 0, 1, 2, 3 weeks of osteogenic induction to examine the expression of osteogenic/odontogenic marker genes, including osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP), dentin matrix protein 1 (DMP1), dentin sialophosphoprotein (DSPP) and the critical transcription factor osterix (OSX), Runx-related transcription factor 2 (RUNX2), and distal-less homebox 2 (DLX2). Two groups of cells were collected, and CCK-8 and CFSE assay were used to evaluate changes in cell proliferation. In addition,

\* 国家自然科学基金(No. 81800923)资助

△ 通信作者, 杨东梅, E-mail: yangdm1004@126.com; 范志朋, E-mail: zpfan@ccmu.edu.cn

real time-PCR was used to examine the expression of senescence-related genes *p53* and wide-type activated factor 1 (*Waf1*), a regulatory factor of the cell cycle, stemness associated gene *kruppel-like factor 4 (KLF4)*, and *SRY* related HMG box-2 (*SOX2*), and the expression of bone morphogenetic protein (*BMP*) 2, 4, 5, 6, 7, 9 after *GREM1* knockdown.

**Results** Immunofluorescence staining showed that the expression of *GREM1* in the nucleus was higher than that in the cytoplasm. Real time-PCR and Western blot affirmed that *GREM1* was knocked down steadily. The ALP activity of the *GREM1* knockdown group was higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ), and the alizarin red staining was lighter than that of the control group. The expression of *OCN* and *DMP1* increased in the first, second and third week, *OPN* was increased in the second week, *BSP* increased in the third week, *DSPP* increased in the first week, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The key osteogenic transcription factors *RUNX2*, *OSX*, and *DLX2* all increased at different stages, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). CCK-8 and CFSE assay showed that the proliferation ability of the *GREM1* knockdown group decreased ( $P < 0.05$ ). In the *GREM1* knockdown group, the expression of *BMP2*, 6, and 7 increased, the expression of *SOX2* and *KLF4* increased, while the expression of *p53* and *Waf1* decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The knockdown of *GREM1* enhanced the osteogenic/odontogenic differentiation and stemness of SCAPs and inhibited the proliferation and senescence of SCAPs. Effects of *GREM1* on the function of SCAPs maybe achieved through regulating the gene expression of *BMP2*, *BMP6*, and *BMP7* at the mRNA level.

**【Key words】** Stem cells from the apical papilla *GREM1* Bone morphogenetic protein  
Osteogenic/odontogenic differentiation

目前,牙再生已成为国际口腔医学的研究热点。在牙齿组织工程中,间充质干细胞借助支架材料,在宿主微环境作用下重建牙根及牙齿支持组织。根尖牙乳头干细胞(stem cells from the apical papilla, SCAPs)来源于年轻恒牙的根尖周组织,是具有高度增殖、自我更新能力和分化潜能的成体干细胞,对牙根的形成和发育起着重要作用<sup>[1]</sup>。骨形态生成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)是一组分泌型多功能蛋白,能刺激牙源性干细胞向成软骨细胞、成骨细胞和成牙本质细胞分化。BMP家族成员在牙发育过程中不同的时相和部位联合表达,对牙胚发育、形态形成,细胞分化和基质分泌有重要的调控作用<sup>[2-3]</sup>。Gremlin(*GREM*)属于BMP拮抗剂家族的成员,分为*GREM1*、*GREM2*、*GREM3*三种,它是高度保守的糖化和磷酸化分泌型蛋白,有糖基化和非糖基化两种形式,存在于细胞外、细胞内内质网和高尔基体中。*GREM*包含两个外显子和一个内含子, mRNA全长4 175 bp,编码184个氨基酸的蛋白质,与其他BMP拮抗剂一样, C端有8个氨基酸环的半胱氨酸结<sup>[4-5]</sup>。*GREM*作为BMP的内源性拮抗剂,不仅能在细胞外绑定BMP,而且通过胞内*GREM*-BMP相互作用,阻止BMP的活性,并有效抑制其分泌<sup>[6-7]</sup>。值得关注的是,*GREM1*除了作为BMP的抑制剂外,也是血管内皮生长因子受体的激动剂。越来越多的研究表明,其在组织分化、机体形态发育、器官形成等方面都发挥了重要影响<sup>[8]</sup>。

本课题组前期通过基因分析发现,相对于根尖牙乳头组织,体外分离培养的SCAPs的*BMP2*、*BMP5*、*BMP6*、*BMP7*表达明显下调,而BMP拮抗剂*GREM1*显著升高;并

通过实验研究证实BMP6促进根尖牙乳头干细胞成骨/成牙分化<sup>[9]</sup>,而BMP的拮抗剂*GREM1*对SCAPs的功能影响以及在牙源性干细胞微环境中*GREM1*是否与BMP存在相互作用尚不明确。本研究拟通过在根尖牙乳头干细胞敲除*GREM1*进行研究,揭示*GREM1*对根尖牙乳头干细胞生物学功能的影响,旨在发现微环境中调控牙源性干细胞功能及其稳态的关键基因,为促进牙再生的研究提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和设备

$\alpha$ -MEM培养基(GIBCO, 美国),碱性磷酸酶(ALP)试剂盒、茜素红溶液、转染增强剂Polybrene(Sigma-Aldrich, 美国),PCR引物(上海生工), QuantiTect SYBR Green PCR试剂盒(Qiagen, 德国),逆转录试剂盒(Promega, 美国),定量PCR试剂盒(ABI, 美国),*GREM1*-Home-590病毒上清液、Consh-NC(K22AZ)病毒上清液(苏州吉玛),CCK-8细胞计数试剂盒(日本同仁化学研究所),羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE)试剂盒(Life technology, 美国)。倒置显微镜及照相系统(日本Olympus公司),Gene Amp PCR system 9700(美国Applied Biosystems 公司),Mx3005P Real time-PCR仪(美国Stratagene公司)。

### 1.2 体外分离培养 SCAPs

在患者知情同意下,将拔除的阻生第三磨牙置于组织缓冲液中,4 h内取出根尖牙乳头组织。此获取方案得到首都医科大学附属北京口腔医院伦理委员会批准(2018科研第020号)。PBS反复清洗,剪碎,置于I型胶原

酶(3 g/L)和Dispase(4 g/L)的消化液, 37 °C消化30~60 min, 消化后加入2倍消化酶体积的培养基中和, 1 000 r/min离心10 min, 弃上清, 加入培养基重悬, 过70 μm细胞筛形成单细胞悬液, 将细胞接种于直径35 mm细胞培养皿中, 置于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>孵箱内培养, 每3 d换液1次。当细胞生长至75%融合时, 用胰蛋白酶消化传代, 获得大量扩增的SCAPs。

### 1.3 免疫荧光染色检测GREM1在SCAPs的亚细胞定位

SCAPs以1×10<sup>5</sup>/孔接种于24孔板中12 h; 去培养基, 用体积分数1%多聚甲醛或甲醛溶液固定, TBST洗2次, 每次间隔5 min; 5%Triton破膜10~30 min, 继续用TBST洗2次, 每隔10 min一次; 用封闭液封闭30 min; GREM1一抗(1:1 000)及指示细胞骨架的胞浆抗体Anti-PDI(1:100)4 °C孵育过夜; TBST洗3次, 每次间隔10 min; 在二抗中避光孵育1 h; TBST洗2次, 每次间隔10 min; DAPI避光孵育5 min; TBST洗10 min; 固定在载玻片上, 显微镜观察, 采集图像, 观察GREM1在SCAPs的亚细胞定位。用第3代细胞进行后续实验。

### 1.4 慢病毒转染敲低GREM1并检测敲低效果

**1.4.1 病毒转染** 取第4代SCAPs铺板过夜, 待细胞生长融合至50%~60%时, 在6 μg/mL Polybrene作用下, 实验组加入GREM1-Home-590病毒上清液, 对照组加入LV-3病毒上清液(以下简称Consh), 转染12 h后, 更换培养基。用6 μg/mL嘌呤霉素筛选3 d, 得到慢病毒转染的GREM1敲低(GREM1sh)的SCAPs。

**1.4.2 Real time-PCR检测转染后GREM1的表达** Primer3及oligo6等生物软件设计GREM1的引物。Trizol提取GREM1敲低组及Consh对照组细胞RNA, 并利用紫外分光光度仪下测定总RNA的浓度及纯度后, 逆转录为cDNA。引物序列: 内参GAPDH, F: 5'-CGGACCAATACGACCAAATCCG-3', R: 5'-AGCCACATCGCTCAGACACC-3'; GREM1, F: 5'-AAGTGACAGAATGAATCGCA-3', R: 5'-CCGCTTTGACTTAATCCAAG-3'。扩增反应程序: 95 °C 120 s, 95 °C 20 s, 60 °C 25 s, 72 °C 20 s, 40个循环。目的基因表达量按2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算。

**1.4.3 Western blot定性检测GREM1敲低情况** 4 °C预冷PBS漂洗GREM1敲低组和Consh对照组细胞, 细胞刮刀刮取细胞, 4 °C, 11 000 r/min离心3 min, 弃上清。1 mL PBS重悬细胞, 4 °C, 7 200 r/min离心2 min, 弃上清。滴入蛋白裂解液100 μL吹打混匀, 冰上反应15 min, 取上清液, -80 °C保存; BCA法测定蛋白浓度; 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 封闭, 放入5%BSA稀释的一抗稀释液中(Anti-GREM1, 1:1 000), 4 °C摇床过夜, TBST洗膜, ECL发光,

凝胶成像系统采集图像。内参蛋白为GAPDH。定性观察GREM1敲低组和Consh对照组GREM1条带显影。

### 1.5 检测GREM1敲低后对SCAPs成骨功能的影响

**1.5.1 ALP活性测定和茜素红染色** 将GREM1敲低组和Consh对照组根尖牙乳头干细胞均以2×10<sup>5</sup>/孔的密度接种于6孔板中, 每组5个样本, 37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>孵箱内培养。待细胞达到80%融合时, 更换为成骨培养基培养。成骨/成牙本质诱导7 d后, 检测ALP活性参考ALP实验试剂盒的实验步骤; 成骨/成牙本质诱导3周后, 茜素红染色检测细胞矿化能力, 去培养基, PBS洗2次, 乙醇4 °C固定1 h, 双蒸水洗2次, 40 mmol/L茜素红溶液(pH4.2)室温染色1~10 min, 肉眼观察着色情况, 双蒸水洗5次, 轻轻吹打, 计算机采集图像。

**1.5.2 Real time-PCR检测成骨/成牙本质相关基因的表达** 分别提取成骨诱导0周、1周、2周、3周后GREM1敲低组和Consh对照组SCAPs的RNA, 检测成骨/成牙相关基因骨钙素(OCN)、骨桥素(OPN)、骨涎蛋白(BSP)、牙本质基质蛋白(DMP1)、牙本质涎磷蛋白(DSPP)以及成骨/成牙关键转录因子runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2, RUNX2)、成骨细胞特异性转录因子(osterix, OSX)、同源盒基因2(distal-less homebox 2, DLX2)的表达。相关引物序列见表1。以GAPDH为内参基因, 方法同前。

### 1.6 CCK-8和流式细胞术检测细胞增殖能力

**CCK-8实验:** 将GREM1敲低组和Consh对照组对数生长期细胞经过消化、计数后, 按3×10<sup>3</sup>/孔接种于96孔板, 每组18个孔, 分别按每孔100 μL培养基培养。将培养

表1 成骨/成牙相关基因引物序列

Table 1 Primer sequence of osteogenesis/odontogenesis-related genes

Gene	Primer sequence (5'-3')
BSP	F: CAGGCCACGATATTATCTTTACA R: CTCCTCTTCTCTCTCTCTCTCTCT
OCN	F: AGCAAAGGTGCAGCCTTTGT R: GCGCCTGGGTCTCTCACT
OPN	F: TTGCAGTGATTGCTTTTGC R: GCCACAGCATCTGGGTATT
DSPP	F: CGACATAGGTCACAATGAGGATGTCC R: TTGCTTCCAGCTACTTGAGGTC
DMP1	F: CGTGGACAAGAAGATAGCAACTCCACG R: TTCCGGCTCTCTATCTCAATGTT
OSX	F: CCTCCTCAGCTCACCTTCTC R: GTTGGGAGCCAAATAGAAA
RUNX2	F: TCTTAGAACAAATTCTGCCCTTT R: TGCTTTGGTCTTGAAA TCACA
DLX2	F: AAACGGGAAGCCAAAGAAAGTC R: CGGGAAGTGCCAGGTATTGAG

BSP: Bone sialoprotein; OCN: Osteocalcin; OPN: Osteopontin; DSPP: Dentin sialophosphoprotein; DMP1: Dentin matrix protein 1; OSX: Osterix; RUNX2: Runt-related transcription factor 2; DLX2: Distal-less homebox 2.

板置于37 ℃、体积分数5%CO<sub>2</sub>孵箱内分别培养1、2、3 d后,加入CCK-8溶液,按试剂盒说明操作。用酶标仪测定在450 nm处的光密度值(OD<sub>450</sub>),观察各组细胞增殖能力的差异。OD<sub>450</sub>值正比于细胞增殖能力。

**流式细胞术:**将第4代的SCAPs制作成 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 细胞悬液约3 mL,之后按CFSE试剂盒说明书操作,进行流式细胞分析,由ModFit LT软件分析得出增殖指数值(proliferation index, PI)。

### 1.7 Real time-PCR检测GREM1敲低后衰老和干性相关基因、BMP相关基因的表达

分别提取GREM1敲低组和Consh对照组第4代SCAPs RNA,进行Real time-PCR检测衰老相关基因p53、细胞周期调控因子1(Waf1)和干性相关基因kruppel样因子4(KLF4)、性别决定区Y框蛋白2(SOX2)的表达,以及BMP相关基因BMP2、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP9的表达。以GAPDH为内参基因,方法同前。

### 1.8 统计学方法

组间比较采用独立样本t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SCAPs体外分离培养后检测GREM1亚细胞定位的结果

见图1。免疫荧光染色实验中,通过带荧光的蛋白抗体标记目的蛋白(绿色),DAPI标记胞核(蓝色), $\alpha$ -PDI标记胞浆骨架蛋白(红色),结果显示,GREM1在细

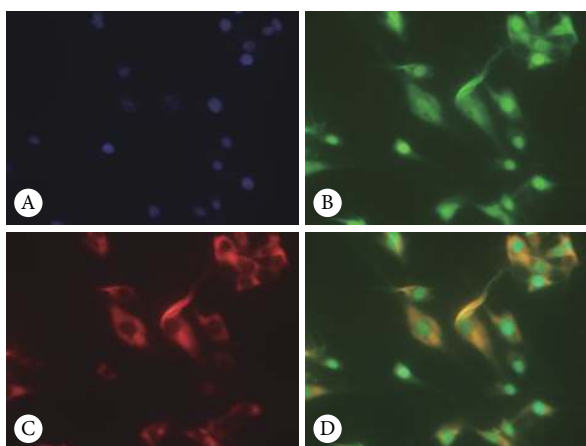


图1 免疫荧光染色检测GREM1亚细胞定位。×400

Fig 1 Nuclear localization of GREM1 in SCAPs through immunofluorescent staining. ×400

A: DAPI labeling of the nucleus (blue); B: Target protein GREM1 labeled with secondary antibody (green); C:  $\alpha$ -PDI labeled cytoplasmic skeletal protein (red); D: A, B, C composite D, indicating the expression of the target protein in the nucleus and cytoplasm.

胞胞浆和胞核内均有表达,而在胞核内表达高于胞浆(图1D)。

### 2.2 慢病毒转染敲低GREM1并检测敲低效率的结果

倒置显微镜下,Consh对照组SCAPs生长旺盛,多呈梭形,形态趋于一致(图2A);GREM1敲低组SCAPs相比Consh对照组,生长较为缓慢,部分胞体形态呈长梭形(图2B)。Real time-PCR在RNA水平检测GREM1敲低效果,发现Consh对照组GREM1基因表达量( $1.01 \pm 0.130$ )约为GREM1敲低组( $0.09 \pm 0.009$ )的10倍,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );Western blot显示Consh对照组条带颜色较GREM1敲低组深,蛋白表达量高(图2C)。

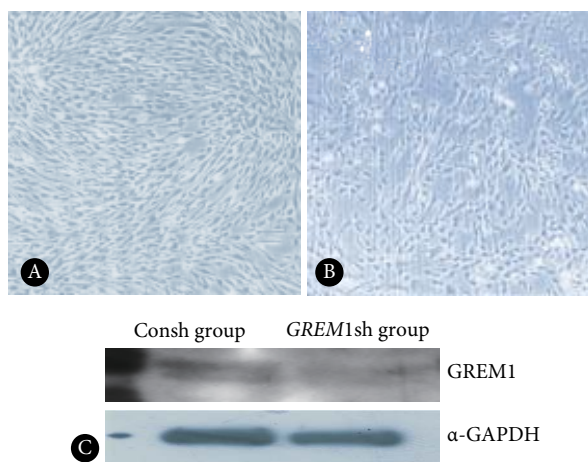


图2 倒置显微镜下(A、B, ×40)及Western blot(C)观察GREM1敲低情况

Fig 2 Microscopic examination of GREM1 knock-down (A & B, ×40) and through Western blot (C)

A: Control group; B: GREM1sh group; C: Western blot.

### 2.3 ALP活性测定和茜素红染色实验结果

GREM1敲低组ALP活性( $2.838 \pm 0.079$ )高于Consh对照组( $2.016 \pm 0.468$ ),差异有统计学意义( $P < 0.05$ );茜素红染色显示GREM1敲低组与Consh对照组相比略浅(图3)。

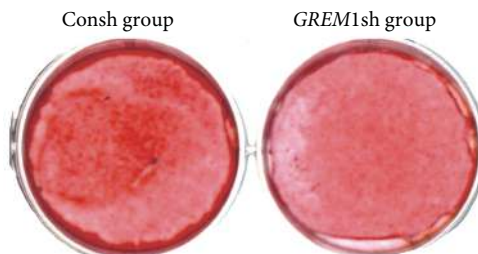


图3 茜素红染色检测SCAPs矿化能力

Fig 3 Alizarin red staining was used to examine the mineralization of SCAPs in vitro

### 2.4 Real time-PCR 检测细胞成骨/成牙相关基因的结果

成骨诱导第0、1、2、3周后,Real time-PCR结果显示

相对于Consh对照组, *GREM1*敲低组 *OCN*、*DMP1*在1周、2周、3周时表达均有升高, *OPN*在2周时升高, *BSP*在3周时升高, *DSPP*在1周时升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 成骨关键转录因子 *RUNX2*、*OSX*、*DLX2*均在不同时段有升高(图4), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.5 细胞增殖结果

CCK-8实验结果显示第24、48、72 h *GREM1*敲低组的 $OD_{450}$ 值均低于Consh对照组(图5A), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。流式细胞分析结果(图5B)显示Consh对照组细胞增殖指数为14.13, *GREM1*敲低组增殖指数为6.91,

与Consh对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.6 Real time-PCR检测 *GREM1*敲低后衰老和干性相关基因的表达

*GREM1*敲低组干性相关基因 *SOX2*、*KLF4*表达升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 而衰老指标 *p53*、*Waf1*表达下降(表2), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.7 Real time-PCR检测 *GREM1*敲低后 *BMP*表达

见表3。 *GREM1*敲低组 *BMP2*、*BMP6*、*BMP7*表达升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); *BMP4*、*BMP5*、*BMP9*表达变化不明显。

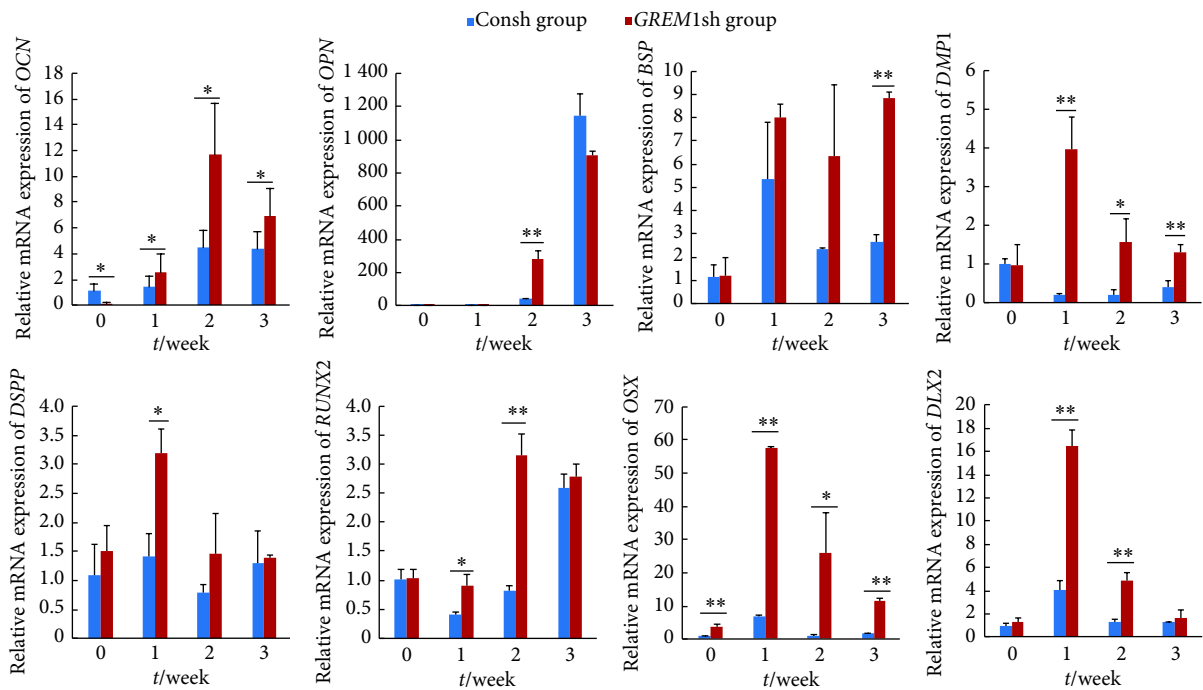


图 4 Real time-PCR检测SCAPs成骨分化相关基因的表达

Fig 4 Real time-PCR was done to assess the expression of osteogenic differentiation-related genes, including *OCN*, *OPN*, *BSP*, *DMP1*, *DSPP*, *RUNX2*, *OSX*, and *DLX2* in SCAPs

$n=6$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

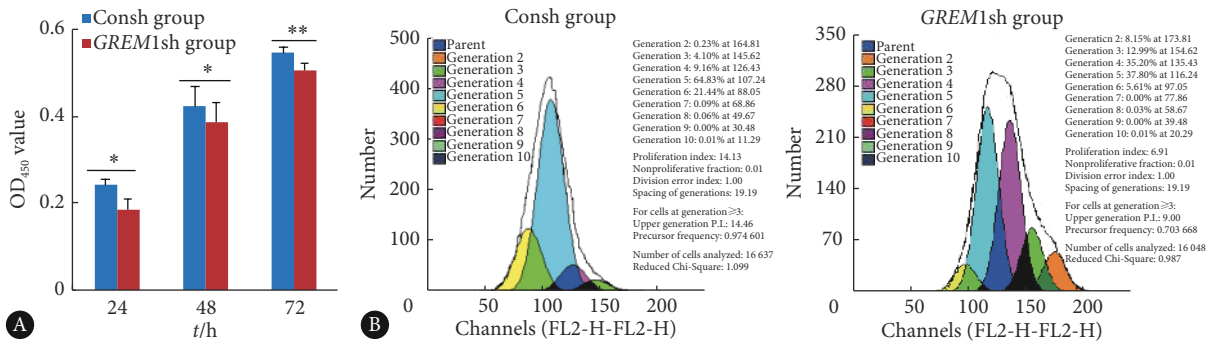


图 5 CCK-8和流式细胞术检测细胞增殖能力

Fig 5 Examination of the proliferation of SCAPs with CCK-8 and CFSE assay

A: CCK-8 ( $n=6$ ); B: Flow cytometry ( $n=6$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

表 2 Real time-PCR检测干性和衰老相关基因表达

Table 2 Real time-PCR assessment of the expression of stemness and senescence-related genes in *GREM1*sh group and Consh group

Gene	Consh group (n=6)	<i>GREM1</i> sh group (n=6)	P
SOX2	1.00±0.042	2.49±0.732	0.039
<i>KLF4</i>	1.00±0.057	2.03±0.116	0.009
<i>p53</i>	1.00±0.028	0.03±0.002	0.000 1
<i>Waf1</i>	1.00±0.065	0.67±0.128	0.030

SOX2: SRY related HMG box-2; *KLF4*: Kruppel-like factor 4; *Waf1*: Wide-type activated factor 1.

表 3 Real time-PCR检测BMP基因表达

Table 3 Real time-PCR assessment of gene expression of BMP in *GREM1*sh group and Consh group

Gene	Consh group (n=6)	<i>GREM1</i> sh group (n=6)	P
<i>BMP2</i>	1.01±0.155	2.45±0.484	0.029
<i>BMP4</i>	1.01±0.159	1.14±0.136	0.248
<i>BMP5</i>	1.01±0.189	0.77±0.194	0.184
<i>BMP6</i>	1.00±0.117	3.57±0.432	0.007
<i>BMP7</i>	1.04±0.337	2.79±0.273	0.019
<i>BMP9</i>	1.00±0.083	0.93±0.077	0.216

### 3 讨论

在牙源性干细胞的微环境中,许多生长因子相互作用以维持干细胞的功能和稳态,对促进牙源性干细胞介导的牙再生有重要作用。一直以来,BMP在骨组织再生及牙再生中均扮演着重要角色,相关研究者们致力于筛选出在颌面部硬组织缺损修复中安全性和有效性最佳的几种BMP蛋白<sup>[10]</sup>。然而,有学者发现阻断BMP的拮抗剂可以上调ALP、OCN的表达,并认为阻断BMP拮抗剂的方法比单纯添加外源性BMP的方法更能有效促进牙齿缺失修复的种植体周围骨形成<sup>[11]</sup>。*GREM1*作为BMP的拮抗剂,能够抑制脂肪干细胞的成骨分化、衰老及BMP的转录<sup>[12]</sup>,但其对牙源性干细胞的功能影响尚不明确。本研究通过丧失性功能研究揭示了*GREM1*敲低后对SCAPs功能的影响,并初步探索*GREM1*与BMP的相互作用机制。

高度增殖能力是干细胞的一个重要生物学特性。有学者通过体外实验研究证实*GREM1*过表达明显地增加骨髓间充质干细胞的增殖能力<sup>[13]</sup>。而在本研究中,我们通过CCK-8及流式细胞实验发现:*GREM1*敲低后SCAPs增殖能力下降。因此,我们推测*GREM1*可能促进SCAPs的增殖。

*BSP*、*OPN*、*OCN*、*RUNX2*、*OSX*、*DLX2*均属于成骨特异性基因,而*DSPP*、*DMP1*是成牙本质细胞的标志物。

*RUNX2*和*OSX*是干细胞成骨分化过程中最早和最具特异性的标志基因。*OCN*是成骨细胞分泌的非胶原骨基质蛋白,通常在骨矿化峰期之后才出现积聚,因此可作为鉴定成骨细胞以及干细胞成骨分化的晚期标志物。在本研究中,通过Real time-PCR发现*GREM1*敲低后成骨/成牙相关基因*OCN*、*OPN*、*BSP*、*DMP1*、*DSPP*表达上调,成骨关键转录因子*RUNX2*、*OSX*、*DLX2*表达上调,提示*GREM1*敲低后可以促进SCAPs骨向/牙向分化能力。*ALP*作为早期成骨分化指标,可以水解有机磷酸酯,提高局部无机磷离子的浓度,促进钙化发生。本实验中*GREM1*敲低后,SCAPs的*ALP*活性高于对照组( $P < 0.05$ )。茜素红染色可用于观察干细胞成骨分化终末期体外矿化能力。我们发现,成骨诱导3周时*GREM1*敲低组的茜素红染色较对照组着色略浅,说明*GREM1*敲低后SCAPs体外矿化能力下降。由此可见,敲低*GREM1*对成骨诱导后的SCAPs各时期的成骨/成牙分化指标产生影响,且其调控作用在成骨分化不同时期可能存在差异。

BMP-Smad 信号通路在细胞外和细胞内水平均受到负向自体反馈环路调节,在胞外BMP的活性能够被*GREM1*调节<sup>[14-15]</sup>。*SUZUKI*等<sup>[16]</sup>发现*GREM1*能完全抑制*BMP2*和*BMP4*诱导的基因活性,降低*BMP6*和*BMP7*诱导的30%的基因活性。本研究中,免疫荧光染色实验显示*GREM1*在SCAPs的胞核及胞浆内均有表达,而胞核内表达量高于胞浆;*GREM1*敲低后SCAPs中*BMP2*、*BMP6*、*BMP7*及成骨/成牙分化相关基因均表达升高,推测*GREM1*在胞核内直接调控*BMP2*、*BMP6*、*BMP7*在mRNA水平的表达,进而通过BMP蛋白调控SCAPs的生物学功能,但具体机制还有待进一步验证。

综上所述,本研究表明*GREM1*是SCAP成骨/成牙分化的抑制基因,在SCAPs中*GREM1*与BMP存在相互作用,有助于为筛选牙源性干细胞微环境中维持干细胞稳态及促进间充质干细胞成骨/成牙分化的关键基因提供理论依据。在下一步实验中,拟运用基因敲除小鼠构建动物模型进行组织学观察,研究体内微环境下*GREM1*及BMP对SCAPs的定向调控作用。

\* \* \*

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参 考 文 献

- [1] KANG J, FAN W G, DENG Q Y, et al. Stem cells from the apical papilla: a promising source for stem cell-based therapy. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 6104738[2019-01-17]. <https://doi.org/10.1155/2019/6104738>.
- [2] YANG X C, VAN DER KRAAN P M, DOLDER J, et al. STRO-1

- selected rat dental pulp stem cells transfected with adenoviral-mediated human bone morphogenetic protein 2 gene show enhanced odontogenic differentiation. *Tissue Eng*, 2007, 13(11): 2803–2812.
- [3] YANG X C, VAN DER KRAAN P M, BIAN Z, *et al*. Mineralized tissue formation by BMP2-transfected pulp stem cells. *J Dent Res*, 2009, 88(11): 1020–1025.
- [4] CANALIS E, PARKER K, ZANOTTI S. GREM1 is required for skeletal development and postnatal skeletal homeostasis. *J Cell Physiol*, 2012, 227(1): 269–277.
- [5] WANG Y H, KEENAN S R, LYNN J, *et al*. GREM1 induces anterior-posterior limb bifurcations in developing xenopus limbs but does not enhance limb regeneration. *Mech Dev*, 2015, 138: 256–267.
- [6] CHURCH R H, KRISHNAKUMAR A, URBANEK A, *et al*. GREM1 preferentially binds to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and BMP-4 over BMP-7. *Biochem J*, 2015, 466(1): 55–68.
- [7] MICHOS O, PANMAN L, VINTERSTEN K, *et al*. Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development*, 2004, 131: 3401–3410.
- [8] LIU Y, LI Y C, HOU R Z, *et al*. Knockdown GREM1 suppresses cell growth, angiogenesis, and epithelial-mesenchymal transition in colon cancer. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 5583–5596.
- [9] DIAO S, LIN X, WANG L P. Analysis of gene expression profiles between apical papilla tissues, stem cells from apical papilla and cell sheet to identify the key modulators in MSCs niche. *Cell Prolif*, 2017, 50(3): e12337[2021-01-17]. <https://doi.org/10.1111/cpr.12337>.
- [10] KUZNETSOVA V S, VASILYEV A V, BUHAROVA T B, *et al*. Safety and efficacy of BMP-2 and BMP-7 use in dentistry. *Stomatologiia*, 2019, 98(1): 64–69.
- [11] OLIVARES-NAVARRETE R, HYZY S L, PAN Q F, *et al*. Osteoblast maturation on microtextured titanium involves paracrine regulation of bone morphogenetic protein signaling. *J Biomed Mater Res A*, 2015, 103(5): 1721–17431.
- [12] LIU H N, HAN X, YANG H Q, *et al*. GREM1 inhibits osteogenic differentiation, senescence and BMP transcription of adipose-derived stem cells. *Connect Tissue Res*, 2021, 62(3): 325–336.
- [13] XIANG Q, LIAO Y, CAO Y, *et al*. Overexpression of GREM1 in mesenchymal stem cells improves hindlimb ischemia in mice by enhancing cell survival. *J Cell Physiol*, 2017, 232(5): 996–1007.
- [14] BAKOPOULOU A, LEYHAUSEN G, VOLK J, *et al*. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol*, 2011, 56(7): 709–721.
- [15] SUZUKI D, YAMADA A, AIZAWA R, *et al*. BMP2 differentially regulates the expression of GREM1 and GREM2, the negative regulators of BMP function, during osteoblast differentiation. *Calcif Tissue Int*, 2012, 91(1): 88–96.
- [16] SUZUKI M, SHIGEMATSU H, SHAMES D S, *et al*. DNA methylation-associated inactivation of TGF- $\beta$ -related genes DRM/GREM, RUNX3, and HPP1 in human cancers. *Br J Cancer*, 2013, 109(12): 1029–1037.

(2021-02-20收稿, 2021-04-10修回)

编辑 吕熙