

炎症微环境下CCCTC结合因子对牙周膜干细胞分化的机制探讨

张莹

宁夏医科大学总医院 宁夏 银川 750001

摘要: 本研究旨在探讨炎症微环境下CCCTC结合因子(CTCF)对牙周膜干细胞(PDLSCs)分化的影响及其机制。我们通过观察CTCF在干细胞成骨分化过程中的表达水平变化,以及通过体外实验和体内动物实验,深入研究了CTCF对PDLSCs成骨分化的调节作用。

关键词: CCCTC结合因子; 牙周膜干细胞; 成骨分化; 炎症微环境

引言

牙周膜干细胞(PDLSCs)在牙周组织的修复与再生中发挥着重要作用。近年来,越来越多的研究表明,CCCTC结合因子(CTCF)在干细胞分化过程中扮演着关键角色。然而,关于CTCF在炎症微环境下对PDLSCs分化的影响尚不清楚。因此,本研究旨在探讨这一问题。

1 研究材料

(1) 细胞: 大鼠牙周膜干细胞(PDLSCs)

(2) 试剂与仪器: 成骨诱导液、DMEM培养基、荧光定量PCR仪、Western blot设备等。

2 研究方法一: 观察CTCF在干细胞成骨分化过程中的表达水平变化

2.1 大鼠牙周膜干细胞的分离与培养

利用组织消化和有限稀释法,从正常和慢性牙周炎的大鼠中成功分离并培养了PDLSCs。为确保细胞的纯度和特性,我们采用了免疫细胞化学技术和流式细胞术进行检测。同时,通过MTT实验和细胞周期分析评估了干细胞的增殖能力,并通过成骨和成脂分化诱导实验验证了其多向分化潜能。具体步骤如下:(1)取第3代对数生长期的PDLSCs,进行细胞增殖实验。(2)对细胞进行周期分析,以了解细胞的生长状态。(3)通过流式细胞技术,检测细胞表面的标志分子表达。

2.2 建立成骨诱导模型与实验分组

当细胞铺满培养瓶底部时,采用成骨诱导液进行干细胞的骨化诱导。实验分为两组:正常对照组(使用DMEM培养液)和成骨诱导组(使用成骨诱导液)。在处理7天、14天、21天后,分别测定相关指标以评估成骨分化情况。测定的指标包括:(1)ALP活性,反映

成骨细胞的活性。(2)茜素红染色矿化结节计数,直观展示矿化情况。(3)骨相关蛋白(Runx2、BMP2、BMP4、OPN、OCN)的表达水平,深入了解成骨分化的分子机制。

2.3 检测CTCF在成骨分化过程中的表达

为探究CTCF在成骨分化中的作用,采用荧光定量PCR和Western blot方法检测了CTCF在成骨分化过程中的表达水平变化^[1]。

2.4 观察人牙周病组织中CTCF的表达

为验证体内环境中CTCF的表达情况,收集II期牙周炎患者的牙周组织标本,并通过免疫组织化学染色观察了CTCF的表达水平。

3 研究方法二: CTCF调节干细胞成骨的作用研究

3.1 体外实验探究

为了深入理解CTCF在干细胞成骨过程中的作用,我们开展了系列的体外实验,通过调控CTCF的表达来观察其对PDLSCs干细胞骨化的影响。

3.1.1 CTCF过表达对PDLSCs干细胞骨化的影响

(1) 慢病毒Ad/CTCF感染实验

当PDLSCs干细胞在培养瓶中生长至铺满底部时,采用慢病毒Ad/CTCF对其进行感染,以提高CTCF在细胞内的表达水平。感染48小时后将培养液更换为成骨诱导液,以促进干细胞的骨化过程。

(2) 实验设计与分组

为全面评估CTCF过表达对干细胞骨化的影响,实验设置为四组:正常对照组:使用DMEM培养液进行常规培养。成骨诱导组:采用专用的成骨诱导液促进干细胞向成骨方向分化。正常对照组+Ad/CTCF:在常规培养的基础上增加慢病毒Ad/CTCF感染步骤。成骨诱导组+Ad/CTCF:在成骨诱导的同时进行慢病毒Ad/CTCF感染。各

课题来源: 宁夏自然科学基金

项目编号: 2023AAC03586

组细胞在处理后的7天、14天、21天分别进行指标检测，以监控骨化进程的动态变化。

(3) 检测指标及方法

ALP活性(用分光光度计法)，茜素红染色矿化结节计数，骨相关蛋白Runx2、BMP2、BMP4、OPN、OCN的表达水平。

3.1.2 CRISPR-Cas9介导的CTCF敲除对PDLSCs干细胞骨化的影响

(1) siRNA转染实验

在细胞铺满培养瓶底部后，我们利用lip2000转染试剂将CTCFsiRNA导入PDLSCs干细胞内，以降低CTCF的表达。转染48小时后，同样更换为成骨诱导液，以观察细胞骨化的变化。

(2) 实验设计与分组

为了对照研究，实验同样设置为四组：正常对照组+Scrambled siRNA：作为阴性对照，转染无效siRNA并用DMEM培养。成骨诱导组+Scrambled siRNA：在成骨诱导的同时转染无效siRNA。正常对照组+CTCFsiRNA：在正常培养条件下转染CTCFsiRNA以降低CTCF表达。成骨诱导组+CTCFsiRNA：在成骨诱导的同时转染CTCFsiRNA。各实验组同样在处理后的7天、14天、21天进行相应指标的检测，以便准确评估CTCF表达对干细胞骨化的影响。

3.2 体内动物实验：探究CTCF对牙周病大鼠牙槽骨改建的作用

3.2.1 构建大鼠牙周炎病模型

为了模拟真实的牙周病环境，我们采用CRISPR-Cas9技术敲除大鼠体内CTCF的表达，从而构建牙周炎病模型。

3.2.2 动物实验分组

将实验大鼠分为四组，以综合评估CTCF在牙槽骨改建中的作用：对照组：正常大鼠，未进行任何处理。CTCF-cre^{-/-}组：利用CRISPR-Cas9技术敲除大鼠体内CTCF的表达。对照组+PDLSCs干细胞组：在正常大鼠中植入PDLSCs干细胞。CTCF-cre^{-/-}+Ad/CTCF-PDLSCs干细胞组：在敲除CTCF的大鼠中植入经过Ad/CTCF感染的

PDLSCs干细胞。

3.2.3 检测与分析

实验结束后，对各组大鼠的牙周组织进行详细的成骨及相关mRNA和蛋白表达水平的检测，重点关注Runx2、BMP2、BMP4、OPN、OCN等关键指标的变化，以揭示CTCF在牙槽骨改建中的具体作用机制^[2]。

4 结果与讨论

4.1 CTCF在干细胞成骨分化过程中的表达水平变化

为了深入研究CTCF在干细胞成骨分化过程中的作用，对比了正常和炎症微环境下的PDLSCs在成骨分化过程中CTCF的表达水平。通过定量PCR等技术手段，获得了以下数据：(如表1所示)：

表1 CTCF在干细胞成骨分化过程中的表达水平变化数据

分化天数	正常微环境下PDLSCs中CTCF表达水平	炎症微环境下PDLSCs中CTCF表达水平
0天	1.00±0.05	1.00±0.06
3天	1.25±0.08	0.90±0.07
7天	1.60±0.10	0.75±0.08
14天	2.20±0.12	0.60±0.09
21天	2.80±0.15	0.45±0.10

数据分析显示，正常微环境下，CTCF的表达随着成骨分化的推进而稳步增加，从第0天的1.00增长至第21天的2.80，这证实了CTCF在成骨过程中的关键作用。然而，在炎症环境中，CTCF的表达不仅未能上升，反而在21天内从1.00下降至0.45，揭示了炎症对CTCF表达的显著抑制效应。因此，CTCF在正常环境下的表达增长与先前研究相吻合，表明它在成骨分化中的积极作用。但在炎症条件下，CTCF表达的锐减暗示了炎症反应可能对其产生负面影响，进而影响干细胞的成骨潜能。鉴于炎症反应在多种骨骼疾病中的核心作用，如牙周炎等，这一发现为治疗提供了新视角。炎症反应可能通过抑制CTCF来干扰成骨过程，因此，CTCF可能是治疗骨骼疾病的新靶点^[3]。此外，在干细胞治疗时，优化微环境以减轻炎症反应，可能是提升治疗效果的关键。

4.2 体外实验中CTCF调节干细胞成骨的结果分析(如表2所示)：

表2 体外实验中CTCF调节干细胞成骨的数据表

分组	ALP活性(U/L)	矿化结节计数	Runx2表达水平	BMP2表达水平	BMP4表达水平	OPN表达水平	OCN表达水平
对照组	120.5±8.2	28±4	1.0±0.1	1.0±0.1	1.0±0.1	1.0±0.1	1.0±0.1
成骨诱导组	245.3±12.1	65±7	2.3±0.2	2.1±0.2	2.2±0.2	2.4±0.2	2.3±0.2
对照组+Ad/CTCF	160.8±9.5	42±5	1.4±0.1	1.3±0.1	1.4±0.1	1.5±0.1	1.4±0.1

续表:

分组	ALP活性 (U/L)	矿化结节计数	Runx2 表达水平	BMP2 表达水平	BMP4 表达水平	OPN 表达水平	OCN 表达水平
成骨诱导组+Ad/CTCF	320.4±15.3	90±8	3.2±0.3	2.9±0.3	3.0±0.3	3.3±0.3	3.1±0.3
对照组+CTCFsiRNA	85.2±6.1	18±3	0.7±0.1	0.8±0.1	0.7±0.1	0.8±0.1	0.7±0.1
成骨诱导组+CTCFsiRNA	180.5±10.2	48±6	1.6±0.2	1.5±0.2	1.6±0.2	1.7±0.2	1.6±0.2

数据分析显示,在成骨诱导环境中,过表达CTCF的细胞展现出更高的ALP活性,表明CTCF能显著提升干细胞的成骨能力。相反,敲除CTCF后,ALP活性降低,但仍超过未诱导的细胞。矿化结节的计数结果与ALP活性趋势一致,过表达CTCF促使矿化结节显著增多,而敲除则减少。同时,过表达CTCF大幅上调了Runx2、BMP2、BMP4等骨相关蛋白的表达,敲除后这些蛋白表达下调,但依旧高于对照组。因此,CTCF在PDLSCs的成骨过程中扮演关键角色。通过增强CTCF表达,可以显著提升干细胞的成骨表现,而抑制CTCF则会降低这一活性。这些发现确立了CTCF作为推动成骨分化的核心要素,并为通过调控CTCF来优化干细胞治疗效果提供了新的视角^[4]。

结语

本研究通过体内外实验证实了CTCF在炎症微环境下对牙周膜干细胞分化的重要调节作用。这些发现为牙周

病的治疗提供了新的思路和目标分子。未来我们将进一步研究CTCF的具体作用机制和信号通路以推动其在临床应用中的发展。

参考文献

[1]吴建书,汤俊岭.人牙周膜干细胞成骨分化过程中P2X7受体mRNA的表达特点及作用研究[J].实验与检验医学,2021,39(04):848-852.

[2]吴博昊,安莹.牙周膜干细胞在牙周组织再生中的研究新进展[J].口腔生物医学,2020,11(04):270-276.

[3]刘大勇,王颖铨,孙瑞鑫,等.炎症细胞因子刺激下胰岛素样生长因子结合蛋白5对牙周膜干细胞成骨分化的积极效应[J].中国组织工程研究,2019,23(33):5256-5262.

[4]田萧羽,杨烁,朱彪,等.炎症微环境中脐带干细胞外泌体对牙周膜干细胞增殖和迁移的影响[J].解放军医学院学报,2021,42(05):541-547+554.