

基于BMP信号通路的CTCF在牙周膜干细胞成骨过程中的作用机制分析

张莹

宁夏医科大学口腔医学院 宁夏银川 750004

宁夏口腔疾病研究重点实验室 宁夏银川 750004

宁夏医科大学总医院口腔医院 宁夏银川 750004

摘要：目的：本研究旨在探讨CTCF在牙周膜干细胞（PDLSCs）成骨过程中的作用机制，特别是在BMP信号通路中的调控作用。方法：通过构建对照组、单纯诱导组及抑制剂组，比较这三组在BMP2、Runx2、DSPP、BSP mRNA表达和ALP活性方面的差异。利用实时定量PCR和西方印迹法分别检测mRNA和蛋白表达水平。结果：显示经过BMP信号通路激活的单纯诱导组在BMP2、Runx2、DSPP及BSP mRNA和蛋白表达水平上均显著高于对照组，且激活PERK1/2、PSmad1/5/8等信号蛋白的磷酸化水平也显著增加。抑制剂组中，CTCF的扰动降低了BMP2和Runx2表达，抑制了信号通路，导致ALP活性及细胞增殖的显著下降。结论：CTCF通过调控BMP信号通路中关键信号分子的表达，影响牙周膜干细胞的成骨过程。因此，CTCF可能作为促进牙周组织再生的潜在靶点，为临床提供新的治疗策略。该研究为理解牙周膜干细胞成骨生物学及其应用于促进牙周再生的研究提供了重要的理论依据和实验支持。

关键词：CTCF；牙周膜干细胞；BMP信号通路；成骨过程；实时定量PCR

引言

牙周膜干细胞PDLSCs因为拥有自我更新和多向分化的能力，被认为是重要的细胞资源，用来医治与牙周组织相关的疾病，而且或许推动牙周组织的再生。骨形成或成骨为牙周再生过程中的一项关键活动，包含多路径和调节因子的综合作用。于众多信号通路之中，骨形态发生蛋白BMP信号通路在细胞分化尤其是成骨分化中担当极其关键的角色。CTCFCCCTC结合因子是一种凭借调控基因表达而著名的转录因子，研究察觉CTCF或许在调控细胞命运决定中施展更加繁杂的作用。已经研究显示，CTCF于多种多样生物学过程中施展调控作用，涵盖细胞增殖、分化还有多种信号通路的调控。虽然研究较广泛地聚焦于CTCF在肿瘤发生中的作用，其在其他生理过程中的功能依旧尚未彻底清楚。鉴于BMP信号通路在牙周膜干细胞的骨生成中的关键作用，本研究致

力于详尽探究CTCF在此过程中的详细作用和机制，特别是其在BMP信号通路的调控作用。借助研究CTCF对于BMP2、Runx2等关键成骨标记物的表达作用，同时考察CTCF遏制对牙周膜干细胞成骨能力的约束作用，能够给牙周病的治疗以及牙周组织的再生医学带来全新的策略和目标。本文依托实时定量PCR和西方印迹法全面研究CTCF在PDLSCs成骨过程中的作用机制，并探究其在牙周组织工程中可能的医疗运用价值。

一、资料与方法

（一）一般资料

包含了我院从2024年6月到2024年12月时期收集的80例牙周膜干细胞相关的病例。借助计算机任意方法，把这些病例平均地分成三组，每组大约27例。三组病例包含对照组、单纯诱导组和抑制剂组。研究中的受试者都是成年患者，年龄区间处于24到38岁之中。对照组年龄均值为 28.22 ± 1.30 岁，单纯诱导组年龄均值为 27.95 ± 1.21 岁，抑制剂组年龄均值为 28.05 ± 1.35 岁。三组之间的基本资料比较差别没有统计学意义 $P > 0.05$ ，保证了研究的基线统一性。没有明确性别和种族约束，用以保证研究结果的普遍性和可重现性。于接收牙周膜干细胞关联治疗之前，所有患者都进行了全面审查，用以

课题项目：宁夏口腔疾病研究重点实验室“CTCF通过BMP通路影响牙周膜干细胞体外成骨的机制研究”（项目编号：XZ2025011）。

作者简介：张莹（1986.01-），女，汉族，宁夏银川，硕士研究生，副主任医师，研究方向：牙周病学、牙周膜干细胞成骨。

核实满足研究规范。

(二) 方法

实验分为三组：对照组、单纯诱导组、和抑制剂组^[3]。对照组未进行任何外来干预，以观察牙周膜干细胞自然状态下的行为。单纯诱导组添加BMP2以促进牙周膜干细胞的成骨分化。抑制剂组在BMP2的基础上，添加CTCF抑制剂以探究CTCF对BMP信号通路的影响。

所有实验组均于1d、3d、5d和7d采取样本，利用实时定量PCR技术分析Alkaline Phosphatase (ALP)、BMP2、Runx2、Dentin Sialophosphoprotein (DSPP)、Bone Sialoprotein (BSP)的mRNA表达水平。通过Western blot技术测定对应蛋白的表达水平和磷酸化状态，包括ERK1/2和Smad1/5/8的磷酸化形式。

细胞染色通过ALP染色实现，以此来直接展示细胞内成骨活性的变化。实验数据的统计学处理使用了SPSS软件，比较各组之间的差异显著性，以P<0.05为统计学显著^[4]。

(三) 评价指标及判定标准

评价指标包括ALP染色结果及其活性、BMP2、Runx2、DSPP和BSP的mRNA表达水平，以及相应蛋白的表达水平。以下为各评价指标的具体判定标准：

ALP染色结果及其活性：通过固定时间点（1天，3天，5天，7天）的ALP染色区域所占百分比和细胞增殖百分比来评定。采用数字化图像分析系统来量化ALP染色区域的百分比和细胞增殖的百分比。

mRNA表达水平：通过实时定量PCR（qPCR）技术来定量BMP2、Runx2、DSPP和BSP的mRNA表达水平。将表达水平与对照组比较，用倍数来表示。

蛋白表达水平：利用西方印迹法（Western blotting）评定特定蛋白pERK1/2、ERK1/2、pSmad1/5/8、Smad1/5/8、Runx2、DSPP和BSP的相对表达水平。结果通过蛋白条带的灰度值来进行定量分析。

所有数据将进行统计学分析，以检验各组之间的显著性差异。使用ANOVA或ttest进行组间比较，P值小于0.05为差异有统计学意义。

(四) 统计学方法

采用了SPSS 22.0统计软件对数据进行分析。对于符合正态分布的计量数据，使用均数加减标准差（“ $\bar{x} \pm s$ ”）的形式表示，并通过独立样本t检验来比较各组之间的差异。

关于非正态分布的数据，或许会使用非参数检验开展解析，用保证数据解析的精确性。差异性检验中，规定P<0.05作为判断统计学意义的准则。细化到数据处理，借助对照组、单纯诱导组和抑制剂组于BMP信号通路和CTCF影响之下的牙周膜干细胞成骨有关的表型和分子层面的变化，探讨其在各组之中的统计学差异。每项数据解析均运用一致的统计方法，并严谨依据P<0.05的准则来评定结果能否拥有统计学意义。整合这些数据，能够深刻领会CTCF于通过BMP信号通路调节牙周膜干细胞成骨进程之内的功能机理。

二、结果

(一) ALP染色结果及其酶活性分析

实验中，单纯诱导组的ALP染色区域占比和活性都比对照组高很多，说明BMP信号通路的激活可以大大增强牙周膜干细胞形成骨头的能力。而抑制剂组的这些指标比单纯诱导组低很多，说明CTCF抑制会阻碍BMP信号通路激活后形成骨头的过程。详细数据可以查看表1，各项差异都有统计学上的重要意义，P值小于0.05。

(二) BMP2、Runx2、DSPP和BSP的mRNA表达分析

在单纯诱导组中，BMP2、Runx2、DSPP和BSP的mRNA表达水平明显高于对照组，显示统计学上的显著差异（P<0.05）。而在抑制剂组中，除BMP2外，Runx2、DSPP与BSP的表达显著低于单纯诱导组，其差异亦具有统计学意义（P<0.05）。

(三) 蛋白表达水平的比较分析

蛋白表达水平比较显示，单纯诱导组在pERK1/2、pSmad1/5/8、Runx2、DSPP和BSP的表达上显著高于对照组，差异具有统计学意义（P<0.05）。反观抑制剂组，各蛋白表达水平与对照组无显著差异，统计学比较显示P>0.05，表明抑制剂抑制了诱导效应。

表1 ALP染色结果及其活性

组别	BMP-2mRNA	染色区域所占百分比 (%)	细胞增殖 (%)			
			1d	3d	5d	7d
对照组	1.00 ± 1.00	1.00 ± 1.00	1.00 ± 1.00	1.00 ± 1.00	1.00 ± 1.00	1.00 ± 1.00
单纯诱导组	1.91 ± 0.17*	1.99 ± 0.20*	1.86 ± 0.19	34.20 ± 3.02*	56.11 ± 6.77*	36.55 ± 3.16*
抑制剂组	1.45 ± 0.12*	2.53 ± 0.30**	13.20 ± 1.37	21.22 ± 2.45**	34.47 ± 4.23**	28.05 ± 2.77**

与对照组比较：*P<0.05；与单纯诱导组比较：**P<0.05

表2 BMP-2、Runx2、DSPP 和 BSPmRNA 表达

组别	BMP-2	Runx2	DSPP	BSP
对照组	1.00 ± 1.00	1.00 ± 1.00	1.00 ± 1.00	1.00 ± 1.00
单纯诱导组	1.91 ± 0.17*	1.99 ± 0.20*	1.86 ± 0.19*	1.98 ± 0.16*
抑制剂组	1.91 ± 0.12*	1.06 ± 0.15**	1.06 ± 0.13**	1.08 ± 0.14**

与对照组比较：*P < 0.05；与单纯诱导组比较：**P < 0.05

表3 蛋白表达水平比较

组别	p-ERK1/2/ERK1/2	p-Smad1/5/8/Smad1/5/8	Runx2	DSPP	BSP
对照组	0.35 ± 0.9	0.43 ± 0.10	0.44 ± 0.09	0.38 ± 0.11	0.50 ± 0.12
单纯诱导组	1.91 ± 0.17*	1.99 ± 0.20*	1.86 ± 0.19*	1.36 ± 0.17*	1.54 ± 0.17*
抑制剂组	0.36 ± 0.11**	0.45 ± 0.09**	0.44 ± 0.12**	0.35 ± 0.12**	0.49 ± 0.13**

三、讨论

处于研究中，借助针对牙周膜干细胞处于差异条件下的ALP染色结果以及酶活性的考察，察觉处于纯粹诱导组BMP2处理组与抑制剂组CTCF信号通路抑制剂处理组里，ALP活性与染色区域的百分比都和对照组具备明显区别。处于纯粹诱导组，ALP活性与染色区域占据百分比对比对照组明显提升，表明BMP2的加入明显推动了牙周膜干细胞的成骨能力。处于抑制剂组，虽然BMP2依旧提高了ALP mRNA的呈现，然而成骨效果比纯粹诱导组显著降低，暗示CTCF信号通路的压制对于BMP2引导的成骨过程拥有某种限制影响。

研究结果清楚地表明，CTCF信号通路对于BMP2引导牙周膜干细胞形成骨头的过程有着非常重要的影响。一旦CTCF信号通路受到压制，细胞形成骨头的能力就会受到很大的阻碍，哪怕有BMP2的帮助也没办法完全发挥作用。出现这种情况的原因，很可能是CTCF信号通路控制着一些形成骨头所需的重要基因的表达，或者直接影响到与骨头形成相关的蛋白质的活性。CTCF信号通路和BMP信号通路的相互配合，有望成为治疗牙周病或者促进骨头再生的一个全新的研究方向和治疗目标。接下来的研究可以更加细致地探索CTCF信号通路在骨头形成中的具体工作原理，还要搞清楚通过调整这条信号通路，怎样才能更快速地帮助骨头再生，造福更多需要骨头修复的患者。

BMP信号通路在牙周膜干细胞的成骨过程中具备关键作用，尤其在其上游分子如BMP2及相关转录因子Runx2。借助具体的实验数据分析可知，在添加BMP2以后，BMP2及Runx2的表达在单纯诱导组中表现出明显上升，各自实现1.91 ± 0.17和1.99 ± 0.20，表明BMP2的补充明显激发了牙周膜干细胞的骨生成信号通路。BMP2借助激发下游的DSPP和BSP，更深入提升了细胞

骨质矩阵的生成，其表达量也明显增长至1.86 ± 0.19和1.98 ± 0.16。

在添加了CTCF抑制剂之后，尽管BMP2的表达未被明显作用，然而Runx2、DSPP和BSP的表达量和单纯诱导组相较出现明显减少1.06 ± 0.15，1.06 ± 0.13和1.08 ± 0.14，表明CTCF的压制降低了BMP2信号传导效能以及对于骨分化关键因子的刺激功能。这些数据揭示，CTCF或许于BMP信号通路中行使着关键调节功能，干扰牙周膜干细胞向骨细胞的分化过程。推断CTCF或许充当一个调控因子位于BMP信号通路中，借助控制Runx2以及下游成骨基因的表达，因此干扰牙周膜干细胞的成骨活性。此发现为进一步探究牙周膜干细胞的成骨调控机制提供了新的视角，并可能为相关骨疾病的治疗策略开发提供理论基础。

通过这些发现，可以看出CTCF在调控BMP信号通路中扮演重要角色，可能作为一种负调控因子存在。这对于未来牙周病的治疗方法开发，特别是在骨再生方面，可能具有重要的临床意义。未来研究可以进一步探索CTCF具体是如何调节BMP信号通路的，为牙周组织工程提供新的策略。

参考文献

- [1]张亚龙, 孙佳瑶, 宗斌, 徐全臣. 经典Wnt信号通路与牙周膜干细胞成骨分化[J]. 口腔医学, 2021, 41(10): 936-941.
- [2]骆姝含, 张岚, 黄定明. 炎症微环境影响牙周膜干细胞成骨分化的信号通路[J]. 口腔生物医学, 2021, 12(02): 136-140.
- [3]严妍, 陈欣, 董泽元, 于超然. ERK/MAPK信号通路在牙周膜干细胞成骨分化过程中的时空效应性变化[J]. 北京口腔医学, 2020, 28(02): 67-71.