doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.05.004

沉默 NHEJ 修复通路中关键蛋白 Ku70 在牙髓干细胞增殖和凋亡中的作用及其机制研究 *

林红杰[1] 王 迪[2] 叶艳艳[2] 熊 宇[2] 税桦桦[2] 黄文静[2] 丁大莲[2] 谭力芯[2△]

(1 重庆市沙坪坝区人民医院口腔科 重庆 400030;2 陆军军医大学第一附属医院口腔科 重庆 400038)

摘要 目的:研究沉默非同源重组修复(non-homologous endjoining,NHEJ)通路中关键蛋白 Ku70 在牙髓干细胞增殖和凋亡中的作用,分析其机制。**方法:**提取健康恒牙牙髓组织,进行牙髓干细胞培养。采用脂多糖诱导人牙髓干细胞,分为对照组、阴性对照组、脂多糖组、沉默组和沉默 + 脂多糖组。观察 Ku70 免疫组化情况,进行细胞增殖、细胞凋亡实验,检测γ-H2A.X、Ku70、X 线修复交叉互补基因 4(X-ray repair cross complementary gene 4,Xrcc4)、Rad51 mRNA、Cleaved Caspase-3、p-p38 水平。**结果:**与沉默组相比,对照组、阴性对照组、脂多糖组、沉默 + 脂多糖组各时间段牙髓干细胞增殖降低;沉默 + 脂多糖牙髓干细胞增殖高于脂多糖组($P<0.05$)。随时间延长,脂多糖组牙髓干细胞增殖不断降低,其他四组牙髓干细胞增殖不断升高,其中在第 5 d 变化最明显。第 5d,与沉默组相比,对照组、阴性对照组牙髓干细胞凋亡率、γ-H2A.X、Rad51 mRNA,Cleaved Caspase-3 降低,p-p38 升高;脂多糖组、沉默 + 脂多糖组各项指标较高,p-p38 降低;对照组、阴性对照组、脂多糖组、沉默 + 脂多糖组 Ku70、Xrcc4 mRNA 降低($P<0.05$)。沉默 + 脂多糖组牙髓干细胞凋亡率、γ-H2A.X、Rad51 mRNA,Cleaved Caspase-3 低于脂多糖组,p-p38 高于脂多糖组($P<0.05$)。**结论:**沉默 Ku70 能促进脂多糖诱导的牙髓干细胞增殖,抑制其凋亡,其可能与γ-H2A.X、Rad51 mRNA 表达降低,Ku70,Xrcc4 升高有关。

关键词:非同源重组修复通路;Ku70;牙髓干细胞

中图分类号:R-33;Q593.6;R331.2;R78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)05-819-06

Role and Mechanism of Ku70 in Proliferation and Apoptosis of Dental Pulp Stem Cells

LIN Hong-jie[1], WANG Di[2], YE Yan-yan[2], XIONG Yu[2], SHUI Hua-hua[2], HUANG Wen-jing[2], DING Da-lian[2], TAN Li-xin[2△]

(1 Department of Stomatology, People's Hospital of Shapingba District, Chongqing, 400030, China;

2 Department of Stomatology, First Affiliated Hospital of Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

ABSTRACT Objective: To study the role of the key protein Ku70 in the silent non-homologous endjoining (NHEJ) pathway in the proliferation and apoptosis of dental pulp stem cells and to analyze its mechanism. **Methods:** The pulp tissue of healthy permanent teeth was extracted and cultured with pulp stem cells.LPS was used to induce human dental pulp stem cells, which were divided into control group, negative control group, LPS group, silencing group and silencing + LPS group. The immunohistochemistry of Ku70 was observed, cell proliferation and apoptosis experiments were conducted to detect the levels of gourie-h21. X, Ku70, X-ray repair cross complementary gene 4 (Xrcc4), Rad51 mRNA, Cleaved caspase-3 and p-p38. **Results:** Compared with the silence group, the proliferation of dental pulp stem cells decreased in the control group, the negative control group, the LPS group and the silence + LPS group. The proliferation of dental pulp stem cells in the silencing + LPS group was higher than that in the LPS group ($P<0.05$). With the extension of time, the proliferation of dental pulp stem cells in the LPS group decreased continuously, while the proliferation of dental pulp stem cells in the other four groups increased continuously, among which the change was most obvious on the 5th day. On the 5th day, compared with the silence group, the apoptosis rate of dental pulp stem cells, lap-h21. X, Rad51 mRNA, and Cleaved caspase-3 in the control group and the negative control group decreased, but p-p38 increased.In the LPS group and the silencing + LPS group, all indexes were higher and p-p38 was lower. The levels of Ku70 and Xrcc4 mRNA were decreased in the control group, the negative control group, the LPS group, and the silence + LPS group ($P<0.05$). The apoptosis rate of dental pulp stem cells, lap-h2a2.X, Rad51 mRNA, Cleaved caspase-3 in the silencing + LPS group were lower than those in the LPS group, while p-p38 was higher than those in the LPS group ($P<0.05$). **Conclusions:** Silencing Ku70 could promote the proliferation of lps-induced dental pulp stem cells and inhibit their apoptosis, which might be related to the decreased expression of γ-H2A.X and Rad51 mRNA, and the increase of Ku70 and Xrcc4.

Key words: Non homologous recombination repair pathway; Ku70; Dental pulp stem cells

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q593.6; R331.2; R78 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2021)05-819-06

* 基金项目:教育部留学回国人员科研启动基金项目(HG2015-002);院级军科基金项目(SWH2016JSTSYB-40N)

作者简介:林红杰(1989-),女,硕士,主治医师,主要研究方向:口腔颌面外科

△ 通讯作者:谭力芯(1989-),男,硕士,主治医师,主要研究方向:口腔颌面外科,电话:023-68754439,E-mail:736460853@qq.com

(收稿日期:2020-08-07 接受日期:2020-08-31)

前言

牙髓干细胞在成年牙髓组织中广泛存在，有分化潜能，能实现自我更新。目前牙髓干细胞是口腔医学研究的重点，其增殖潜能较突出，体外研究显示，通过对牙髓干细胞给予适当的引导，会促进其向成骨 / 成牙等分化[1,2]。一般情况下，牙髓干细胞为静息状态，在牙髓细胞功能、新旧交替中维持其稳定，一旦牙髓成牙本质细胞发生损伤，牙髓干细胞在牙髓组织重建、修复损伤过程中发挥着重要作用 [3,4]。NHEJ 参与哺乳动物 DNA 双链断裂损伤的修复过程，Ku70 是 NHEJ 修复中主要蛋白，同时也是 DNA 磷酸蛋白激酶主要的组成部分，在 DNA 转录调节过程中发挥着重要作用，可以独立参与细胞抗凋亡、DNA 修复过程[5,6]。目前临床中关于 Ku70 在牙髓干细胞的相关研究较少。本文旨在研究沉默 NHEJ 修复通路中关键蛋白 Ku70 在牙髓干细胞增殖和凋亡中的作用分析其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

选取在我院口腔颌面外科门诊就诊的 18-25 岁患者阻生拔除以及正畸新鲜的健康恒牙，所有患者均知情同意。磷酸盐缓冲溶液（PBS）由；MEM 培养液（美国 Gibco 公司）CO_2 孵育箱（德国 Heraeus 公司）；倒置显微镜（日本 Olympus 公司）；脂多糖（美国 Invivogen 公司）；CCK-8 溶液、膜联蛋白 V（Annexin V）- 异硫 / 碘化丙锭（propidium iodide, PI）溶液（中国碧云天生物技术研究所提供）；流式细胞仪（美国 BD 公司）；ALP、DSPP、DMP1 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 人牙髓干细胞分离及培养 将搜集到的健康恒牙在无菌条件下将牙髓组织取出，采用磷酸盐缓冲溶液（PBS）冲洗 3 次，在离心试管中加入到少量的 MEM 培养液。将牙髓组织剪成 1 mm×1 mm×0.5 mm，离心处理后将上清液摒弃，加 3 mL/L 中的Ⅰ型胶原酶，在 37℃、50 mL/L CO_2 孵育箱中处理 30 min，加培养液反应终止，再次离心处理分离后，将牙髓组织在培养皿中平铺，使用玻璃盖片将组织覆盖，在 MEM 培养液中加入 200 mL/L 的胎牛血清，在孵育箱中继续培养，每间隔 3 d 更换一次培养液，在倒置显微镜下观察牙髓干细胞生长情况，等到细胞生长至培养皿底 80%，加 2.5 g/L 胰蛋白酶给予消化，1:3 传代，采集对数生长的第一代细胞，通过限元稀释法对牙髓干细胞进行克隆培养。

1.2.2 脂多糖诱导人牙髓干细胞 将培养好的牙髓干细胞按 1×10^3 个 /mL 接种在六孔板中，在培养箱中继续培养。第 2 d，将 1 mg/mL 的脂多糖使用培养基稀释后，最终浓度为 10 ng/mL。使用脂多糖每 24 h 刺激牙髓干细胞，时间为 6 h，更换培养基，连续刺激 6 次。

1.2.3 细胞分组 待培养好的牙髓干细胞在六孔板中融合达到 90%，对照组：牙髓干细胞只加生理盐水；阴性对照组：牙髓干细胞中加入一段无义序列；脂多糖组，沉默组：牙髓干细胞在接种后的第三日转染 Ku70siRNA（Sense 5'-GAGUG 从 GAU-GAGUUGAC-Att-3'；Antisense 5'-UGUCAACUCAUCUUCACU Ctg -3'）；沉默 + 脂多糖组：牙髓干细胞经脂多糖诱导后并在细胞接种于培养皿后第三日转染 Ku70siRNA。siRNA 序列均由 Ambion 公司合完成。

1.2.4 Ku70 免疫组化观察 将标本经 10%甲醛固定后，用常规石蜡包埋、切片，厚度为 5 μm/ 片。黏附于载玻片烘干，对组织切片进行常规脱模、水化，Ku70 采用 pH 6.0 柠檬酸高压抗原修复，自然冷却至室温，3%H_2O_2 避光孵育 10 min 阻断内源性过氧化物酶活性。经 PBS 冲洗，加入 Ku7 抗体，26℃水浴孵育1h，洗净加入一抗，26℃水浴孵育 15 min，DAB 显色溶液显色，苏木素复染，脱水封片。并以已知阳性组织作为阳性对照组，以PBS 代替一抗作为阴性对照，具体操作步骤严格按照说明书进行。

1.2.5 细胞增殖实验 将第 3 代牙髓干细胞接种在六孔培养板中，在培养箱中继续培养。每孔中分别加入 10 μL CCK-8 溶液，在 37℃，5%的 CO_2 培养箱中孵育，时间为 2 h，观察第 1 d、3 d、5 d、7 d 细胞增殖情况。

1.2.6 细胞凋亡实验 收集各组培养第 5 d 的牙髓干细胞，使用 PBS 缓冲液洗涤细胞 1 次后，离心处理后摒弃上清液，加 400 μL 缓冲液进行细胞重悬，待细胞沉淀后加入 5 μL 膜联蛋白 V（Annexin V）- 异硫 / 碘化丙锭（propidium iodide, PI）溶液，混合均匀后，在室温中避光孵育，时间为 10-15 min，再次离心处理将细胞沉淀，使用 PBS 洗涤，通过流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.7 γ-H2A.X、Ku70、Xrcc4、Rad51 mRNA 检测 采用荧光定量 RT-PCR 技术检测，将采集到的血液标本，使用 Ficoll 液分离单个核细胞，TRIzol 提取细胞 RNA，经过电泳检测 RNA 并定量，经过逆转录合成 cDNA。之后进行实时荧光定量 PCR 实验，探针或 SYBR 反应 25 μL，反应条件满足：94℃ 5 min，94℃ 45s，60℃ 1 min，40 个循环，设置标准组和空白对照。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析 γ-H2A.X、Ku70、Xrcc4、Rad51 mRNA 水平。

1.2.8 增殖、凋亡相关蛋白相对表达量检测 采用 Western Blot 检测，将采集到的标本 10000×g 离心处理 10 min，对上清液进行提取后，BCA 进行蛋白定量检测，在 2×SDS 凝胶缓冲液中加入 50 μg 蛋白，在 100℃环境中加热 5 min 有助于蛋白发生变性。凝胶电泳完、转膜，取膜，4 ℃环境下在 5%脱脂牛奶中固定、封闭处理时间为 1 h，将一抗使用 0.05%-0.1% TBST 给予稀释（Cleaved Caspase-3、p-p3 一抗为 1:1000），4℃孵育过夜保存，之后使用 0.05%-0.1% TBST 洗膜，3 次，每次为 5 min，二抗被 0.05%-0.1% TBST 稀释（1:10000），摇动孵育时间为 1h，再次采用 TBST 连续洗膜 3 次，处理时间为 5 min。DAB 显色，定量分析蛋白表达情况。以 GAPDH 为内参。

1.3 统计学分析

采用 SPSS21.0 统计软件进行分析，计量资料采用（$\bar{x}\pm s$）进行描述，多组间比较采用 F 值检验，两组间比较采用实施独立样本 t 检验，$P<0.05$ 则说明差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 原代牙髓干细胞克隆培养

分离后的牙髓干细胞在第 3 d 开始生长，大部分细胞是纤维细胞，显示为梭形、多角形，经过单克隆培养，细胞大小、形态一致，表现为梭形。见图 1。

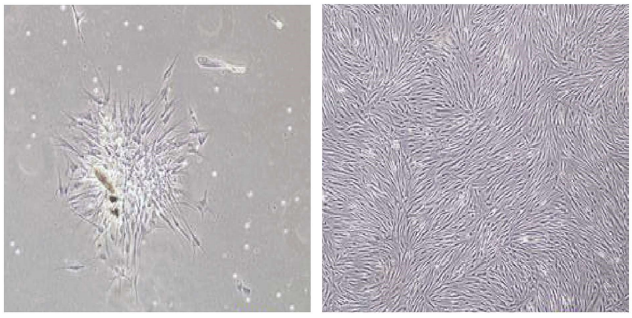


图 1 原代牙髓干细胞克隆培养

Fig.1 Cloning and culture of primary dental pulp stem cells

注：a 牙髓干细胞分离第 3 d；b 牙髓干细胞单克隆培养后。

Note: a the third day after the separation of dental pulp stem cells; b the monoclonal culture of dental pulp stem cells.

2.2 各组 Ku70 表达情况比较

对照组与阴性对照组牙髓干细胞 Ku70 表达比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。对照组与阴性对照组牙髓干细胞 γ-H2A.X、Ku70、Xrcc4、Rad51 mRNA 比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。与沉默组相比，对照组、阴性对照组、脂多糖组、沉默＋脂多糖组牙髓干细胞 Ku70 降低；与沉默＋脂多糖组相比，对照组、阴性对照组 Ku70 升高，脂多糖组降低，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。见图 2。

2.3 沉默 Ku70 对脂多糖诱导牙髓干细胞增殖的影响

对照组与阴性对照组在第 1 d、3 d、5 d、7 d 牙髓干细胞增殖比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。与沉默组相比，对照组、阴性对照组、脂多糖组、沉默＋脂多糖组各时间段牙髓干细胞增殖降低，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。与沉默＋脂多糖组相比，对照组、阴性对照组各时间段牙髓干细胞增殖升高，脂多糖组降低，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。随时间延长，对照组、阴性对照组、沉默组、沉默＋脂多糖组牙髓干细胞增殖不断升高，脂多糖组牙髓干细胞增殖不断降低，其中在第 5 d 变化最明显。见图 3。

2.4 沉默 Ku70 对脂多糖诱导牙髓干细胞凋亡的影响

第 5d，对照组与阴性对照组牙髓干细胞凋亡率比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。与沉默组相比，对照组、阴性对照组、脂多糖组、沉默＋脂多糖组牙髓干细胞凋亡率较高，差异具有

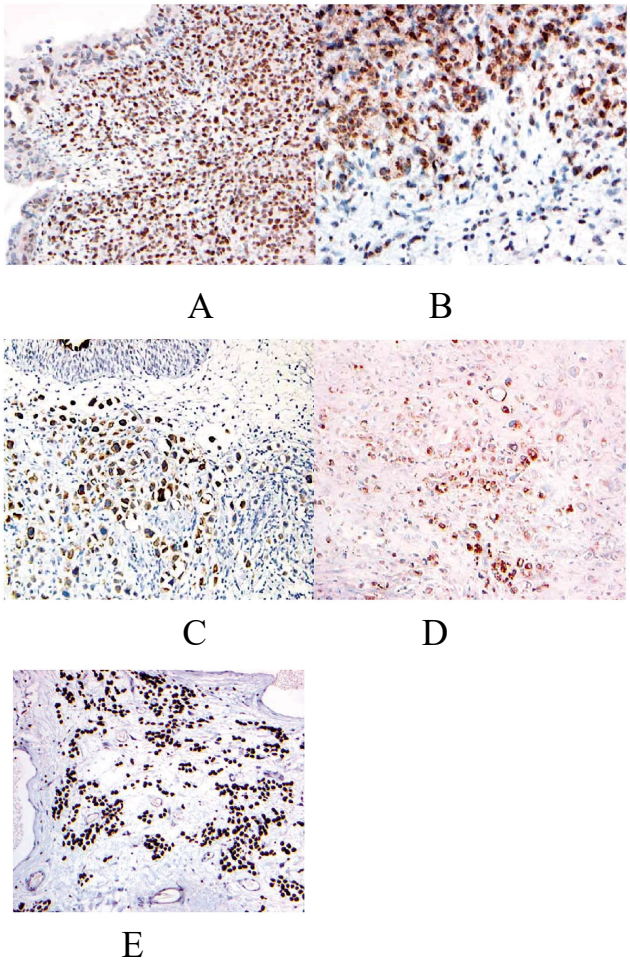
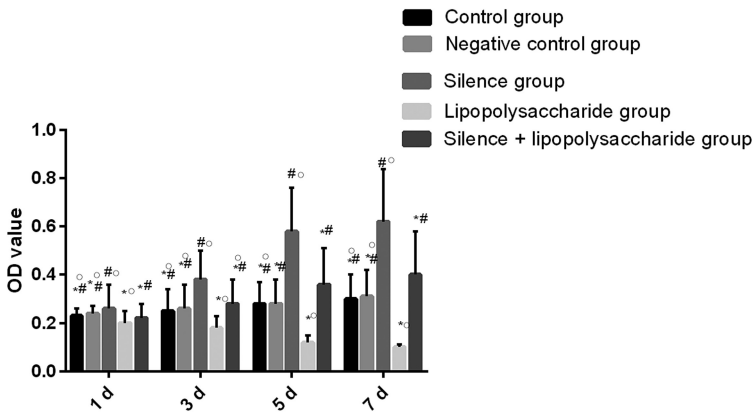


图 2 各组 Ku70 免疫组化图（× 100）

Fig. 2 Immunohistochemistry of Ku70 in each group

注：A 对照组；B 阴性对照组；C 沉默＋脂多糖组；D 脂多糖组；E 沉默组

Note: A Control group; B Negative control group; C Silence + lipopolysaccharide group; D Lipopolysaccharide group; E Silence group



3 各组各时间段牙髓干细胞增殖情况比较（OD 值）

Fig. 3 Comparison of proliferation of dental pulp stem cells in each group（OD value）

注：与沉默组相比，*$P<0.001$；与脂多糖组相比，#$P<0.001$；与沉默＋脂多糖组相比，°$P<0.001$。

Note: compared with the silent group, *$P<0.001$; compared with lipopolysaccharide group, #$P<0.001$; compared with the silence + lipopolysaccharide group, °$P<0.001$.

统计学意义($P<0.05$)。与沉默+脂多糖组相比,对照组、阴性对照组牙髓干细胞凋亡率降低,脂多糖组升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图4。

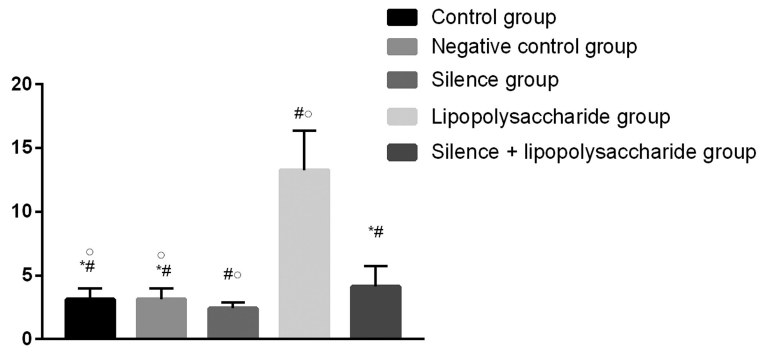


图4 各组牙髓干细胞第5 d凋亡情况比较(%)

Fig.4 Comparison of apoptosis of dental pulp stem cells in each group on the 5th day (%)

注:与沉默组相比,*$P<0.001$;与脂多糖组相比,#$P<0.001$;与沉默+脂多糖组相比,°$P<0.001$。

Note: compared with the silent group, *$P<0.001$; compared with lipopolysaccharide group, #$P<0.001$;compared with the silence + lipopolysaccharide group, °$P<0.001$.

2.5 沉默Ku70对脂多糖诱导牙髓干细胞γ-H2A.X、Ku70、Xrcc4、Rad51 mRNA的影响

第5d,对照组与阴性对照组牙髓干细胞γ-H2A.X、Ku70、Xrcc4、Rad51 mRNA比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与沉默组相比,对照组、阴性对照组、脂多糖组、沉默+脂多糖组牙髓干细胞γ-H2A.X、Rad51 mRNA升高,对照组、阴性对照组、脂多糖组、沉默+脂多糖组牙髓干细胞Ku70、Xrcc4 mRNA降低;与沉默+脂多糖组相比,对照组、阴性对照组牙髓干细胞γ-H2A.X、Rad51 mRNA降低,脂多糖组升高;对照组、阴性对照组Ku70、Xrcc4 mRNA升高,脂多糖组降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图5。

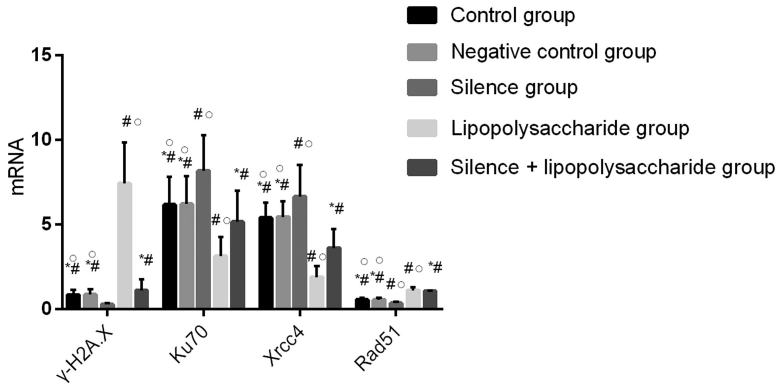


图5 各组第5 d γ-H2A.X、Ku70、Xrcc4、Rad51 mRNA比较

Fig.5 Comparison of γ-H2A.X,Ku70,Xrcc4,and Rad51 mRNA in each group on 5th day

注:与沉默组相比,*$P<0.001$;与脂多糖组相比,#$P<0.001$;与沉默+脂多糖组相比,°$P<0.001$。

Note: compared with the silent group, *$P<0.001$; compared with lipopolysaccharide group, #$P<0.001$;compared with the silence + lipopolysaccharide group, °$P<0.001$.

2.6 沉默Ku70对脂多糖诱导牙髓干细胞增殖、凋亡相关蛋白相对表达量的影响

第5d,对照组与阴性对照组牙髓干细胞Cleaved Caspase-3、p-p38比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与沉默组相比,对照组、阴性对照组、脂多糖组、沉默+脂多糖组Cleaved Caspase-3表达高,p-p38降低;与沉默+脂多糖组相比,对照组、阴性对照组牙髓干细胞Cleaved Caspase-3降低,p-p38升高;脂多糖组Cleaved Caspase-3升高,p-p38降低;差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图6、图7。

3 讨论

Ku作为一种修复蛋白,是DNA双链断裂损伤中主要的修复途径,Ku在机体细胞DNA损伤修复,在哺乳动物基因稳定以及遗传完整中具有维持作用[7,8]。相关研究认为,当机体损伤不能被完全修复,Ku表达水平会逐渐降低,将下游诸多效应分子激活后,会导致细胞发生凋亡,加快肿瘤形成[9,10]。Ku蛋白与其他肿瘤标志物不同,Ku表达异常与肿瘤发病有关,在口腔肿瘤组织中,当Ku表达降低,会影响外源性损伤刺激修复,当Ku表达水平过高,细胞抗凋亡能力较高[11,12]。Ku70参与DNA依赖性蛋白激酶(DNA-PK)组成过程,融合了多种生物活性,在细胞凋亡、DNA修复中发挥着重要作用[13]。

牙髓干细胞已经成为口腔医学研究的重中之重,其增殖潜

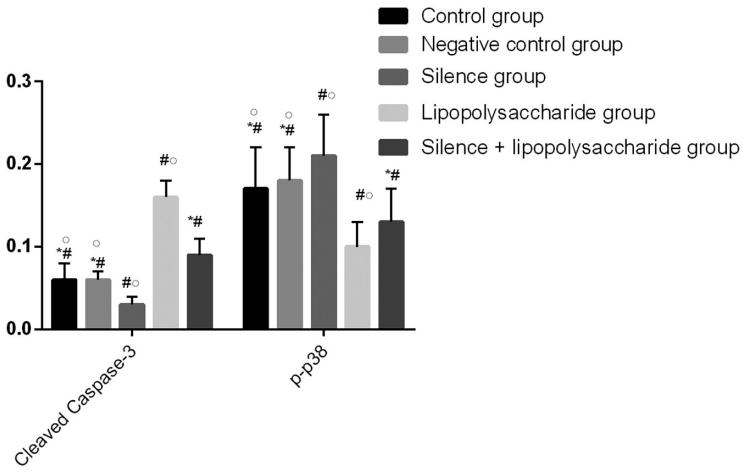


图 6 各组第 5 d 增殖、凋亡相关蛋白相对表达量比较

Fig. 6 Comparison of relative expression of proliferation and apoptosis related proteins in each group on the 5th day

注：与沉默组相比，*P<0.001；与脂多糖组相比，#P<0.001；与沉默 + 脂多糖组相比，°P<0.001。

Note: compared with the silent group, *P<0.001; compared with the lipopolysaccharide group, #P<0.001; compared with the silence + lipopolysaccharide group, °P<0.001.

能显著，在体外研究中进行适当的诱导，会促进其向成骨 / 成牙、成脂、成神经分化，在牙髓组织重建、修复中具有重要作用[14,15]。细菌内毒素脂多糖在间充质干细胞分化、增殖过程中发挥着重要作用。有研究显示，高剂量脂多糖对牙髓细胞向牙本质细胞分化中起到一定的抑制作用，能诱导牙髓细胞凋亡，当牙髓发生损伤，脂多糖能刺激牙髓干细胞[16]，目前在临床医学中，关于脂多糖对牙髓干细胞的生物学特性的影响机制尚不明了。

临床中关于 Ku70 蛋白在牙髓干细胞中表达的相关研究较少，本文研究结果显示，沉默 Ku70 牙髓干细胞增殖升高；脂多糖诱导牙髓干细胞，沉默 Ku70 各时间段牙髓干细胞增殖升高。说明沉默 Ku70 对牙髓干细胞增殖有一定的促进作用。与 Huang Y[17]研究结果保持一致。并且随时间延长，对照组、阴性对照组、沉默组、沉默 + 脂多糖组牙髓干细胞增殖不断升高。在第 5 d 增殖变化最明显。因此本文研究第 5 d 牙髓干细胞凋亡以及相关基因、蛋白表达情况。在本文中，沉默组、沉默 + 脂多糖组两组细胞凋亡率有不同程度的降低，提示牙髓干细胞凋亡可能与沉默 Ku70 有关。

NHEJ 参与整个细胞周期，是 DNA 双链断裂修复的主要途径，通过 Ku70、Ku80 二聚体与 DNA 断端，通过与下游 DNA-PKcs、Xrcc4 等在断端处聚集，完成对 DNA 断端处理，连接[18,19]。γ-H2A.X 在 DNA 双链断裂中属于一种敏感蛋白，具有一定的特异性，其磷酸化程度受 DNA 双链断裂的影响，DNA 双链断裂逐渐被修复，γ-H2A.X 磷酸化程度越低[20,21]。Rad51 属于一种同源重组蛋白，其表达下降会对 DNA 双链断裂修复产生不良影响[22]。相关研究中指出，Xrcc4 是 NHEJ DNA 双链断裂修复中重要的组成成分，通过适应辐射促进其磷酸化[23]。本文研究显示，沉默组 γ-H2A.X、Rad51 mRNA 降低，Ku70、Xrcc4 mRNA 降低；与脂多糖组相比，γ-H2A.X、Rad51 mRNA 降低，Ku70、Xrcc4 mRNA 降低。说明沉默 Ku70 能改善牙髓干细胞 NHEJ 通路中 γ-H2A.X、Rad51、Ku70、Xrcc4 mRNA，从而促进 DNA 双链断裂修复。Zhai Y[24]研究也指出，NHEJ 信号通路参与牙髓干细胞衰老以及修复过程。

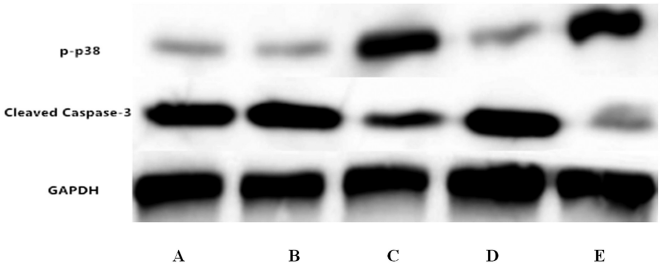


图 7 各组 Cleaved Caspase-3、p-p38 表达 WB 图

Fig. 7 WB of cleared caspase-3 and p-p38 in each group

注：A 对照组；B 阴性对照组；C 沉默 + 脂多糖组；D 脂多糖组；E 沉默组

Note: A Control group; B Negative control group; C Silence + lipopolysaccharide group; D Lipopolysaccharide group; E Silence group

细胞凋亡参与牙胚组织、牙源性细胞发育过程，研究认为，细胞凋亡会对牙胚发育中的形态、结构产生一定的影响[25]。研究中认为，细胞凋亡与 Caspase 蛋白调控有关，Caspase-3 在细胞凋亡通路中发挥着关键性的作用，在 Caspase 级联反应下游，一旦被激活会促进细胞凋亡[26,27]。研究显示，Caspase-3 激活会促进细胞凋亡，丝裂原活性蛋白激酶在细胞增殖、凋亡以及基因表达中起到重要的调控作用，参与多种信号传递[28]。在牙髓干细胞转化为成牙本质细胞过程中，p38 MAPK 信号通路发挥着关键性的作用[29]。Seifrtová M[30]在研究中，经过顺铂处理后的牙髓干细胞可引起 p53 和 p21 表达增加，促进丝氨酸 15 的 p53 磷酸化，较高浓度的顺铂会降低牙髓干细胞活性，诱导 caspases 3/7 和 9 活化。本文研究显示，沉默 Ku70 能促进牙髓干细胞中 Cleaved Caspase-3 水平降低，p-p38 水平升高；经过脂多糖诱导，沉默 Ku70 Cleaved Caspase-3 水平也随之降低，p-p38 水平升高。说明沉默 Ku70 通过调控 Cleaved Caspase-3、p-p38 水平，从而能促进牙髓干细胞增殖，抑制其凋亡。

综上所述,沉默 Ku70 能促进脂多糖诱导的牙髓干细胞增殖,抑制其凋亡,其可能与 γ-H2A.X、Rad51 mRNA 表达降低,Ku70,Xrcc4,Rad54 升高有关。

参 考 文 献(References)

[1] Fracaro L, Senegaglia AC, Herai RH, et al. The Expression Profile of Dental Pulp-Derived Stromal Cells Supports Their Limited Capacity to Differentiate into Adipogenic Cells [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8). doi:10.3390/ijms21082753

[2] Lo Monaco M, Gervois P, Beaumont J, et al. Therapeutic Potential of Dental Pulp Stem Cells and Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin for Osteoarthritis[J]. Cells, 2020, 9(4). doi:10.3390/cells9040980

[3] Alomar RK, Aladhyani SM, Aldossary MN, et al. A prospective Saudi dental stem-cell bank from the perspective of the public and dental practitioners: A cross sectional survey [J]. J Family Med Prim Care, 2020, 9(2): 864-870

[4] Hii SC, Luddin N, Kannan TP, et al. The Biological Evaluation of Conventional and Nano-Hydroxyapatite-Silica Glass Ionomer Cement on Dental Pulp Stem Cells: A Comparative Study [J]. Contemp Clin Dent, 2019, 10(2): 324-332

[5] Knyazhanskaya E, Anisenko A, Shadrina O, et al. NHEJ pathway is involved in post-integrational DNA repair due to Ku70 binding to HIV-1 integrase[J]. Retrovirology, 2019, 16(1): 30

[6] Arnoult N, Correia A, Ma J, et al. Regulation of DNA repair pathway choice in S and G2 phases by the NHEJ inhibitor CYREN[J]. Nature, 2017, 549(7673): 548-552

[7] Jin H, Lee B, Luo Y, et al. FOXL2 directs DNA double-strand break repair pathways by differentially interacting with Ku[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2010

[8] Ingram SP, Warmenhoven JW, Henthorn NT, et al. Mechanistic modelling supports entwined rather than exclusively competitive DNA double-strand break repair pathway [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 6359

[9] Ihara M, Shichijo K, Kudo T, et al. Reactivation of heat-inactivated Ku proteins by heat shock cognate protein HSC73[J]. Int J Hyperthermia, 2019, 36(1): 438-443

[10] Chen G, Magis AT, Xu K, et al. Targeting Mcl-1 enhances DNA replication stress sensitivity to cancer therapy [J]. J Clin Invest, 2018, 128(1): 500-516

[11] Geng F, Zhang Y, Lu Z, et al. *Fusobacterium nucleatum* Caused DNA Damage and Promoted Cell Proliferation by the *Ku70/ p53* Pathway in Oral Cancer Cells [J]. DNA Cell Biol, 2020, 39(1): 144-151

[12] Koike M, Yutoku Y, Koike A. Feline XLF accumulates at DNA damage sites in a Ku-dependent manner [J]. FEBS Open Bio, 2019, 9(6): 1052-1062

[13] Tadi SK, Tellier-Lebègue C, Nemoz C, et al. PAXX Is an Accessory c-NHEJ Factor that Associates with Ku70 and Has Overlapping Functions with XLF[J]. Cell Rep, 2016, 17(2): 541-550

[14] Ma L, Hu J, Cao Y, et al. Maintained Properties of Aged Dental Pulp Stem Cells for Superior Periodontal Tissue Regeneration [J]. Aging Dis, 2019, 10(4): 793-806

[15] Sun X, Meng L, Qiao W, et al. Vascular endothelial growth factor A/Vascular endothelial growth factor receptor 2 axis promotes human dental pulp stem cell migration via the FAK/PI3K/Akt and p38 MAPK signalling pathways[J]. Int Endod J, 2019, 52(12): 1691-1703

[16] Chung M, Lee S, Chen D, et al. Effects of Different Calcium Silicate Cements on the Inflammatory Response and Odontogenic Differentiation of Lipopolysaccharide-Stimulated Human Dental Pulp Stem Cells[J]. Materials (Basel), 2019, 12(8): 1259

[17] Huang Y, Qiao W, Wang X, et al. Role of Ku70 in the apoptosis of inflamed dental pulp stem cells[J]. Inflamm Res, 2018, 67(9):777-788

[18] Xing M, Oksenych V. Genetic interaction between DNA repair factors PAXX, XLF, XRCC4 and DNA-PKcs in human cells [J]. FEBS Open Bio, 2019, 9(7): 1315-1326

[19] Amiri Moghani AR, Sharma MK, Matsumoto Y. In cellulo phosphorylation of DNA double-strand break repair protein XRCC4 on Ser260 by DNA-PK[J]. J Radiat Res, 2018, 59(6): 700-708

[20] Siril YJ, Kouketsu A, Oikawa M, et al. Immunohistochemical assessment of chromatin licensing and DNA replication factor 1, geminin, and γ-H2A.X in oral epithelial precursor lesions and squamous cell carcinoma [J]. J Oral Pathol Med, 2019, 48(10): 888-896

[21] Sharma D, De Falco L, Padavattan S, et al. PARP1 exhibits enhanced association and catalytic efficiency with γH2A.X-nucleosome[J].Nat Commun, 2019, 10(1): 5751

[22] Bhattacharya S, Srinivasan K, Abdisalaam S, et al. RAD51 interconnects between DNA replication, DNA repair and immunity [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(8): 4590-4605

[23] Gerodimos CA, Chang HHY, Watanabe G, et al. Effects of DNA end configuration on XRCC4-DNA ligase IV and its stimulation of Artemis activity[J]. J Biol Chem, 2017, 292(34): 13914-13924

[24] Zhai Y, Wei R, Liu J, et al. Drug-induced premature senescence model in human dental follicle stem cells [J]. Oncotarget, 2017, 8(5): 7276-7293

[25] Mahmoudinia S, Niapour A, Ghasemi Hamidabadi H, et al. 2,4-D causes oxidative stress induction and apoptosis in human dental pulp stem cells (hDPSCs)[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2019, 26(25): 26170-26183

[26] Khalilzadeh B, Shadjou N, Kanberoglu GS, et al. Advances in nanomaterial based optical biosensing and bioimaging of apoptosis via caspase-3 activity: a review [J]. Mikrochim Acta, 2018, 185(9): 434

[27] Crowley LC, Waterhouse NJ. Detecting Cleaved Caspase-3 in Apoptotic Cells by Flow Cytometry [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2016, 2016(11). doi: 10.1101/pdb.prot087312

[28] Liu YT, Chuang YC, Lo YS, et al. Asiatic Acid, Extracted from Centella asiatica and Induces Apoptosis Pathway through the Phosphorylation p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Cisplatin-Resistant Nasopharyngeal Carcinoma Cells[J]. Biomolecules, 2020, 10(2). doi: 10.3390/biom10020184

[29] Ge X, Li Z, Jing S, et al. Parathyroid hormone enhances the osteo/odontogenic differentiation of dental pulp stem cells via ERK and P38 MAPK pathways[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(2): 1209-1221

[30] Seifrtová M, Havelek R, Cmielová J, et al. The response of human ectomesenchymal dental pulp stem cells to cisplatin treatment [J]. Int Endod J, 2012, 45(5): 401-12