骨向分化的能力。且从不可逆性牙髓炎中分离出的hDPSC经冷冻保存后，可保持正常特性和多向分化潜能[6]。一直以来，众多学者通过研究发现，参与调控hDPSC增殖与分化的信号通路众多，但近年来的研究显示，Wnt信号通路是维持人体器官组织细胞同源性，促进组织损伤修复和再生能力的重要通路之一，Wnt信号通路在调控人牙生长发育与hDPSC增殖分化过程中发挥着十分重要的作用：在牙源性上皮和间充质组织的发育过程中，激活的Wnt/β-catenin信号通路参与牙冠、牙根和牙周膜的形成[7]；而当Wnt信号通路被抑制时，hDPSC朝成牙骨质细胞方向分化能力减弱；且即便能分化为成牙骨质细胞，该成牙骨质细胞也不能分泌出足够的牙骨质，会造成牙骨质形成障碍，从而进一步导致牙周膜附着丧失[8]。

1 Wnt家族及Wnt信号通路的作用机制

Wnt蛋白具有调节人体多种类型干细胞自我更新和增殖的功能，参与众多组织细胞的生长发育过程。Wnt家族主要由19种Wnt蛋白（如Wnt1、Wnt3a、Wnt5等），以及Wnt受体（卷曲蛋白，frizzled）、β-连环蛋白（β-catenin）、糖原合成酶激酶3β（glycogen synthase kinase-3β，GSK-3β）、轴抑制蛋白（axis inhibitor，Axin）、腺瘤样息肉蛋白（adenoatous polyposis coli，APC）、淋巴增强因子（lymphatic enhancer factor，LEF）/T细胞因子（T cell transcription factor，TCF）下游靶基因[如Dickkopf（DKK1）、c-myc、cyclin D1等]组成[9]。

Wnt信号通路分为2类：经典Wnt/β-catenin信号通路和非经典Wnt信号通路。非经典Wnt信号通路又分为Wnt/Ca^{2+}信号通路和Wnt/PCP（平面细胞极性）信号通路等[10]。在经典Wnt信号通路中，当细胞Wnt信号通路处于未激活状态时，细胞质中的β-catenin同Axin、APC、GSK-3β结合组成四聚体，四聚体中的GSK-3β能持续性使β-catenin磷酸化，经磷酸化后的β-catenin在蛋白酶（如26S蛋白酶）的作用下，启动β-TrCP介导的遍在蛋白（俗称泛素）-蛋白酶体途径降解，从而抑制Wnt信号通路的信号转导。当细胞膜表面Wnt受体家族中卷曲蛋白同低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6（the low-density lipoprotein receptor-related proteins 5 and 6，LRP5/6）结合后，激活Wnt信号通路，从而产生传导信号抑制细胞质中Axin、APC和GSK-3的活性，使细胞质中的β-catenin积聚增加；随后，未降解的β-catenin进入细胞核，同LEF/TCF家族中转录因子结合，最终开启Wnt信号通路下游靶基因的转录[5]。

2 Wnt 信号通路参与调控hDPSC的炎症损伤修复

在炎症牙髓组织中，仍有一部分细胞具有hDPSC的特征，众多的研究显示：增强Wnt信号通路的表达，能促进炎症状态下hDPSC的增殖与分化、同时使凋亡细胞的数量显著减少，从而有效促进牙髓损伤的修复。He等[5]在研究炎症状态下牙髓组织中hDPSC的增殖情况时发现：低浓度的LPS（1 μg·mL^{-1}）可通过增强Wnt5a的表达来促进hDPSC的增殖。Shao等[11]发现：在牙髓损伤的情况下，β-catenin可在细胞质中积聚并进入细胞核，从而通过激活Wnt信号通路来调控下游转换生长因子-1的表达，促进牙髓损伤的修复。另有研究[12]显示：在急性牙髓损伤的情况下，Wnt3a可通过激活Wnt信号通路来降低hDPSC中细胞凋亡蛋白酶的表达，同时，促进hDPSC的增殖和成牙本质向分化，进而形成修复性牙本质，参与牙髓损伤修复的过程。Zhang等[13]通过慢病毒转染技术使hDPSC细胞质中Wnt10a的表达上升，结果显示：Wnt10a过表达可促进hDPSC增殖、抑制其成牙本质细胞向分化；进而他们推测，在牙损伤早期，Wnt信号通路可能通过调控增强hDPSC的自我增殖能力，抑制其分化能力来加快损伤修复的过程。

3 Wnt信号通路参与调控hDPSC、SHED的分化

3.1 参与成骨向分化

Wnt/β-catenin信号通路是机体进化过程中高度保守的信号通路，参与调节多种生物过程，尤以在骨细胞生物学中的作用研究更为广泛，Wnt信号通路能促进hDPSC的成骨向分化。Jiang等[14]在诱导敲减kif3a基因的hDPSC成骨向分化时发现：在其成骨诱导液中加入Wnt3a后，可使成骨细胞标志物ALP、Wnt信号通路标志物β-catenin等表达显著增加，而Wnt信号通路标志物p-GSK3β表达减少，示意kif3a可能通过激活Wnt信号通路来促进hDPSC的成骨向分化。Liu等[15]指出：β-catenin可作为端粒酶逆转录酶的下游调控蛋白，在低浓度

乙酰水杨酸的作用下，能通过提高端粒酶逆转录酶的活性、增强β-catenin的表达来上调Wnt信号通路的表达，从而促进SHED的成骨向分化。Feng等[16]发现：低浓度（10 ng·mL^{-1}）的肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor α，TNF-α）能增强Wnt信号通路激动剂SIRT1的表达，进而激活Wnt信号通路来促进hDPSC的成骨向分化。

Wnt信号通路调控hDPSC、SHED向成骨细胞分化的生物学作用十分复杂，往往需要联系其他通路发生交叉作用，彼此协同，共同促进hDPSC的成骨向分化。促丝裂原激活蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）信号转导通路中的p38-MAPK能使Wnt信号通路中的重要组成之一的GSK-3β磷酸化，故其成为了联系两种通路之间的纽带[17]。Li等[18]发现：高浓度碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factor，bFGF）（100 ng·mL^{-1}）可激活SHED成骨向分化中的细胞外调节蛋白激酶1/2（extracellular regulated protein kinases 1/2，ERK1/2）通路、抑制β-catenin的表达，进而通过增强MAPK通路、减弱Wnt通路的传导，两种通路共同作用减弱SHED的成骨向分化。Yang等[19]的研究发现：在骨形态蛋白2（bone morphogenetic protein 2，BMP2）的刺激作用下，Wnt信号通路和p38 MAPK信号通路均被激活，两条通路共同调控hDPSC的成骨向分化。

3.2 参与牙本质向分化

牙本质是组成牙齿、维持牙齿形态的重要物质，能否诱导hDPSC和SHED朝成牙本质向分化、分泌出牙本质、重新构建出完整的牙齿结构，在牙再生组织工程中具有重要作用。近年来，研究显示：可通过激活Wnt信号通路来促进hDPSC和SHED向成牙本质向分化。Hunter等[12]的研究显示：Wnt信号通路在成牙本质细胞的整个生命过程中均发生了作用。Chen等[20]在研究长链非编码RNA（long noncoding RNA，lncRNA）DANCR对hDPSC朝成牙本质向分化作用时发现：当lncRNA DANCR表达上调，Wnt信号通路被抑制时，牙本质涎磷蛋白（detin sialophosphoprotein，DSPP）等牙本质标记物减少，即lncRNA DANCR可能通过抑制Wnt信号通路的传导来抑制hDPSC的成牙本质向分化。Yang等[21]通过逆转录病毒转染hDPSC，使其SOX2基因表达上升，结果发现：过表达的hDPSC-SOX2在经成牙本质向分化诱导时，较未经逆病毒转染的hDPSC的牙本质相关蛋白DPSS和牙本质基质蛋白1（dentin matrix protein-1，DMP-1）表达显著增高，且与此同时Wnt信号通路被激活，揭示SOX2能通过激活Wnt信号通路促进hDPSC的成牙本质向分化。Lian等[22]的研究显示：JAB1蛋白可通过增加hDPSC细胞核中β-catenin的积聚来激活Wnt信号通路，提高DSPP的表达，从而促进hDPSC的成牙本质向分化。Song等[23]则发现：神经纤毛蛋白家族中的神经纤毛蛋白1（neuropilin-1，NRP1）能通过激活Wnt信号通路来促hDPSC的成牙本质向分化。另有报道[24]显示：被抑制的PIN1能通过激活Wnt信号通路来促进hDPSC的成牙本质向分化，抑制其成脂向分化。相反，研究[25]显示：当添加Wnt信号通路抑制剂XAV-939时，hDPSC的成脂向分化被明显抑制。然而相矛盾的是，一些研究显示Wnt信号通路能抑制hDPSC的成牙本质向分化。Scheller等[26]的研究显示：Wnt1能抑制hDPSC的成牙本质向分化，其团队通过用逆病毒构建DPSC/Wnt-1细胞使Wnt1高表达，检测发现成牙本质向分化早期标志物碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）活性明显降低；且通过用S37Aβ-catenin突变体转染hDPSC使其胞内β-catenin持续不被磷酸化，激活Wnt信号通路，结果显示：ALP活性和矿化结节数明显降低，提示Wnt信号通路参与抑制hDPSC的成牙本质向分化。

尽管目前越来越多的研究揭示了Wnt信号通路在hDPSC朝成牙本质细胞分化中起到了积极的促分化作用，但不能否认的是仍有部分研究显示Wnt信号通路参与抑制成牙本质向分化。由于Wnt信号通路家族包含众多的蛋白、受体及因子，其各自作用同其相互影响共同作用于hDPSC朝成牙本质向分化时可能存在一些差异，其具体机制仍有待进一步的研究。即便研究显示hDPSC能分化出成牙本质样细胞，但这些成牙本质样细胞是否能形成具有功能作用的牙本质，仍有待今后进一步的研究。

3.3 参与其他方向的分化

Wnt信号通路在调控人牙髓细胞朝其他方向分化中也发挥着重要作用，激活的Wnt信号通路，能促hDPSC朝成神经、成血管、成肝、成胰腺等方向分化，抑制其成脂向分化。Zhang等[27]发现：壳聚糖支架可通过激活Wnt/β-catenin信号通路来诱导hDPSC的成神经向分化。Zhang等[28]通过在hDPSC和SHED的成血管向诱导培养液中添加

Wnt1，结果发现有芽状的血管内皮细胞样细胞出现；在体内实验中，将经成血管向诱导培养液诱导后的hDPSC和SHED植入免疫缺陷小鼠的背部，结果发现植入部位有血管生成。Kim等[29]发现：在诱导hDPSC的成肝向分化中，腺病毒转染PIN1能抑制hDPSC的成肝向分化，而当加入rh-Wnt3a后能反转其对hDPSC成肝向分化的抑制作用；然而，在加入Wnt信号通路抑制剂DKK-1时，却能进一步加强其对hDPSC成肝向分化的抑制作用。此外，一些学者通过构建急性肝损伤纤维化小鼠的模型，结果发现：hDPSC不仅可以迁移至损伤位点，分化出类肝细胞样细胞，参与肝损伤的修复过程；还能诱导肝细胞分化，或者通过产生一些细胞因子来促进肝损伤的愈合过程。Okada等[30]在hDPSC成胰腺向分化培养基中加入0.1 ng·mL^{-1}的H_2S后，实时反转录聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）检测出Wnt信号通路相关基因表达增加，提示H_2S可能通过激活Wnt信号通路来促进hDPSC向产胰岛素细胞分化。

4 小结与展望

从人牙髓中分离出来的hDPSC和SHED因其方便获取且不违背伦理道德，在组织再生工程中具有很好的应用前景。目前，有关Wnt信号通路对hDPSC和SHED的增殖、分化调控作用的相关研究，主要集中在对其信号诱导机制及信号转导机制方面。随着对Wnt信号通路研究的深入，发现其在调控炎症与非炎症条件下均可促进hDPSC和SHED的增殖；在外源性诱导环境中，Wnt信号作用增强，可使hDPSC和SHED朝成骨、成牙本质细胞等众多方向分化，发挥hDPSC的组织工程用途。但Wnt信号通路内部上下游元件间具体调控机制以及与其他信号通路之间的关系目前尚不清楚，仍有待今后进一步的深入研究。

5 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 Natl Acad Sci USA, 2000, 97(25): 13625-13630.

[2] Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(10):5807-5812.

[3] Pisciotta A, Carnevale G, Meloni S, et al. Human dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations[J]. BMC Dev Biol, 2015, 15:14.

[4] 王志刚, 刘兴容. 牙髓干细胞及其表面特异标志物[J]. 国际口腔医学杂志, 2010, 37(1):56-58.
Wang ZG, Liu XR. Dental pulp stem cells and it's specific surface markers[J]. Int J Stomatol, 2010, 37(1):56-58.

[5] He W, Wang Z, Zhou Z, et al. Lipopolysaccharide enhances Wnt5a expression through toll-like receptor 4, myeloid differentiating factor 88, phosphatidylinositol 3-OH kinase/AKT and nuclear factor kappa B pathways in human dental pulp stem cells[J]. J Endod, 2014, 40(1):69-75.

[6] Malekfar A, Valli KS, Kanafi MM, et al. Isolation and characterization of human dental pulp stem cells from cryopreserved pulp tissues obtained from teeth with irreversible pulpitis[J]. J Endod, 2016, 42(1):76-81.

[7] Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, et al. Wnt/β-catenin signaling regulates dental pulp stem cells' responses to pulp injury by resinous monomers[J]. Dent Mater, 2015, 31(5):542-555.

[8] Yin X, Li J, Salmon B, et al. Wnt signaling and its contribution to craniofacial tissue homeostasis[J]. J Dent Res, 2015, 94(11):1487-1494.

[9] Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A. Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways[J]. Trends Cell Biol, 2009, 19(3):119-129.

[10] Rao TP, Kühl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more[J]. Circ Res, 2010, 106(12):1798-1806.

[11] Shao MY, Cheng R, Wang FM, et al. β-catenin and Rho GTPases as downstream targets of TGF-β1 during pulp repair[J]. Cell Biol Int, 2011, 35(2):105-109.

[12] Hunter DJ, Bardet C, Mouraret S, et al. Wnt acts as a prosurvival signal to enhance dentin regeneration[J]. J Bone Miner Res, 2015, 30(7):1150-1159.

[13] Zhang Z, Guo Q, Tian H, et al. Effects of WNT10A on proliferation and differentiation of human dental pulp cells[J]. J Endod, 2014, 40(10):1593-1599.

[14] Jiang S, Chen G, Feng L, et al. Disruption of kif3a results in defective osteoblastic differentiation in dental mesenchymal stem/precursor cells via the Wnt signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2016, 14 (3):1891-1900.

[15] Liu Y, Chen C, Liu S, et al. Acetylsalicylic acid treatment improves differentiation and immunomodulation of SHED[J]. J Dent Res, 2015, 94(1):209-218.

[16] Feng G, Zheng K, Song D, et al. SIRT1 was involved in TNF-α-promoted osteogenic differentiation of human DPSCs through Wnt/β-catenin signal[J]. *In Vitro* Cell Dev Biol Anim, 2016, 52(10):1001-1011.

[17] Bikkavilli RK, Feigin ME, Malbon CC. p38 mitogen-activated protein kinase regulates canonical Wnt-beta-catenin signaling by inactivation of GSK3beta [J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 21):3598-3607.

[18] Li B, Qu C, Chen C, et al. Basic fibroblast growth factor inhibits osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth through ERK signaling[J]. Oral Dis, 2012, 18(3):285-292.

[19] Yang J, Ye L, Hui TQ, et al. Bone morphogenetic protein 2-induced human dental pulp cell differentiation involves p38 mitogen-activated protein kinase-activated canonical WNT pathway[J]. Int J Oral Sci, 2015, 7(2):95-102.

[20] Chen L, Song Z, Huang S, et al. lncRNA DANCR suppresses odontoblast-like differentiation of human dental pulp cells by inhibiting wnt/β-catenin pathway [J]. Cell Tissue Res, 2016, 364(2):309-318.

[21] Yang Y, Zhao Y, Liu X, et al. Effect of SOX2 on odontoblast differentiation of dental pulp stem cells [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(6):9659-9663.

[22] Lian M, Zhang Y, Shen Q, et al. JAB1 accelerates odontogenic differentiation of dental pulp stem cells [J]. J Mol Histol, 2016, 47(3):317-324.

[23] Song Y, Liu X, Feng X, et al. NRP1 accelerates odontoblast differentiation of dental pulp stem cells through classical Wnt/β-catenin signaling[J]. Cell Reprogram, 2017, 19(5):324-330.

[24] Lee YM, Shin SY, Jue SS, et al. The role of PIN1 on odontogenic and adipogenic differentiation in human dental pulp stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2014, 23 (6):618-630.

[25] 文军, 徐帅妹, 刘影. Wnt通路抑制剂XAV-939对牙髓干细胞成脂分化的影响[J]. 口腔疾病防治, 2016, 24(8):459-463.
Wen J, Xu SM, Liu Y. Wnt inhibitor XAV-939 promote the adipogenic differentiation of dental pulp stem cells[J]. J Dent Prev Treat, 2016, 24(8):459-463.

[26] Scheller EL, Chang J, Wang CY. Wnt/beta-catenin inhibits dental pulp stem cell differentiation[J]. J Dent Res, 2008, 87(2):126-130.

[27] Zhang J, Lu X, Feng G, et al. Chitosan scaffolds induce human dental pulp stem cells to neural differentiation: potential roles for spinal cord injury therapy[J]. Cell Tissue Res, 2016, 366(1):129-142.

[28] Zhang Z, Nör F, Oh M, et al. Wnt/β-catenin signaling determines the vasculogenic fate of postnatal mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2016, 34 (6):1576-1587.

[29] Kim HJ, Cho YA, Lee YM, et al. PIN1 suppresses the hepatic differentiation of pulp stem cells via Wnt3a[J]. J Dent Res, 2016, 95(12):1415-1424.

[30] Okada M, Imai T, Yaegaki K, et al. Regeneration of insulin-producing pancreatic cells using a volatile bioactive compound and human teeth[J]. J Breath Res, 2014, 8(4):046004.

（本文编辑 王姝）