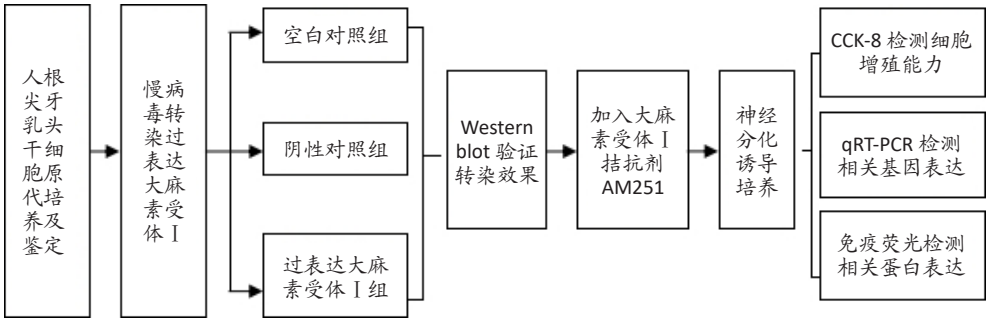
大麻素受体Ⅰ对人根尖牙乳头干细胞神经向分化的影响

刘紫薇，尼加提·吐尔逊，殷 瑞，李淑慧，周 晶

https://doi.org/10.12307/2026.509
采用日期：2024-12-17
修回日期：2025-02-12
在线日期：2025-02-25
中图分类号：
R459.9；R329.2；R749.1
文章编号：
2095-4344(2026)01-00093-08
文献标识码：A

文章快速阅读： 大麻素受体Ⅰ促进人根尖牙乳头干细胞神经向分化



文题释义：

人根尖牙乳头干细胞：源自人类尚未发育成熟的第三磨牙根尖部的软组织，具有自我更新、克隆和多能分化能力。这类干细胞起源于神经嵴，具有向神经细胞分化的特性，可分化为神经元和施万细胞，为周围神经损伤的治疗开辟了新路径。

大麻素受体Ⅰ：作为G蛋白偶联受体家族的一员，是中枢神经系统中分布最广泛的G蛋白偶联受体，主要在大脑的神经元和神经胶质细胞中表达。大麻素受体Ⅰ对神经干细胞的命运具有调控作用，能够影响神经元的生长及功能性突触的形成。

摘要

背景：研究证实大麻素受体Ⅰ能够促进神经干细胞和间充质干细胞的增殖及神经向分化，也可以调节人根尖牙乳头干细胞的增殖和矿化能力。然而，关于大麻素受体Ⅰ过表达对人根尖牙乳头干细胞神经分化的影响，目前国内外相关研究较少。

目的：探讨大麻素受体Ⅰ在体外环境下对人根尖牙乳头干细胞神经向分化能力的影响。

方法：收集因正畸治疗需要拔除的根尖尚未完全发育成熟的健康第三磨牙，采用组织块法和酶消化法进行原代人根尖牙乳头干细胞的分离培养。通过慢病毒介导的转染技术，将大麻素受体Ⅰ基因引入人根尖牙乳头干细胞中，设置空白对照组、阴性对照组和过表达大麻素受体Ⅰ组，通过Western blot验证过表达大麻素受体Ⅰ慢病毒转染效果；设置对照组、阴性对照组、过表达大麻素受体Ⅰ组和过表达大麻素受体Ⅰ+AM251(大麻素受体Ⅰ拮抗剂)组，分别在成神经诱导第1，5，10天采用CCK-8法检测细胞增殖能力，成神经诱导第10天采用qRT-PCR检测TH、NeuroD-1、NCAM1基因表达水平以及免疫荧光检测Nestin、TUBB3蛋白表达。

结果与结论：①与空白对照组和阴性对照组相比，过表达大麻素受体Ⅰ组大麻素受体Ⅰ蛋白表达量明显升高，差异有显著性意义($P < 0.05$)；②与空白对照组和阴性对照组相比，成神经诱导第5，10天时，过表达大麻素受体Ⅰ组人根尖牙乳头干细胞的增殖能力最强($P < 0.05$)；③与空白对照组和阴性对照组相比，过表达大麻素受体Ⅰ组人根尖牙乳头干细胞中NeuroD-1、NCAM1、TH mRNA表达量显著增加，Nestin和TUBB3荧光强度显著增强($P < 0.05$)；④与过表达大麻素受体Ⅰ组相比，过表达大麻素受体Ⅰ+AM251组人根尖牙乳头干细胞增殖能力显著下降，NeuroD-1、NCAM1、TH mRNA表达量以及Nestin、TUBB3荧光强度显著降低($P < 0.05$)。结果表明：过表达大麻素受体Ⅰ能促进人根尖牙乳头干细胞的增殖及神经向分化。

关键词：人根尖牙乳头干细胞；牙乳头；大麻素受体Ⅰ；神经分化；增殖；慢病毒；AM251；神经损伤

Effect of cannabinoid type I receptors on neuronal differentiation of human apical papilla stem cells

Liu Ziwei, Nijati · Tursun, Yin Rui, Li Shuhui, Zhou Jing

Department of Stomatology, Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Liu Ziwei, Master candidate, Department of Stomatology, Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Zhou Jing, MS, Associate chief physician, Department of Stomatology, Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have demonstrated that the cannabinoid type I receptor can enhance the proliferation and neural differentiation of neural stem cells and mesenchymal stem cells. Moreover, cannabinoid type I also governs the proliferation and mineralization capacity of human apical papilla stem cells. However, there are relatively few investigations concerning the impact of cannabinoid type I overexpression on the neural differentiation of human apical papilla stem cells.

新疆医科大学第二附属医院口腔科，新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830063
第一作者：刘紫薇，女，1999年生，新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市人，汉族，新疆医科大学在读硕士，主要从事口腔种植与修复研究。
通讯作者：周晶，硕士，副主任医师，新疆医科大学第二附属医院口腔科，新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830063
https://orcid.org/0009-0001-0786-8035(刘紫薇)

基金资助：新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2022D01C274)，项目负责人：周晶
引用本文：刘紫薇，尼加提·吐尔逊，殷瑞，李淑慧，周晶 . 大麻素受体Ⅰ对人根尖牙乳头干细胞神经向分化的影响 [J]. 中国组织工程研究，2026，30(1):93-100.

OBJECTIVE: To investigate the effect of cannabinoid type I on neural differentiation of human apical papilla stem cells *in vitro*.
METHODS: Healthy third molars with immature root tips that need to be removed for orthodontic treatment were collected, and human apical papilla stem cells were isolated and cultured by tissue block method combined with enzyme digestion method. Cannabinoid type I gene was introduced into human apical papilla stem cells by lentivirus-mediated transfection technique. A blank control group, a negative control group, and cannabinoid type I overexpression group were set up. The transfection effect of overexpression of cannabinoid type I lentivirus on human apical papilla stem cells was verified by Western Blot. The control group, negative control group, cannabinoid type I overexpression group and cannabinoid type I overexpression + AM251 (cannabinoid type I receptor antagonist) group were set up. Cell proliferation was detected by CCK-8 assay at 1, 5, and 10 days after neural induction. On day 10 of neural induction, the expression levels of TH, NeuroD-1, and NCAM1 genes were detected by qRT-PCR, and the protein expression levels of Nestin and TUBB3 were detected by immunofluorescence.
RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with the blank control group and the negative control group, the expression of cannabinoid receptor I protein in the cannabinoid receptor I overexpression group was significantly increased, and the difference was significant ($P < 0.05$). (2) Compared with the blank control group and the negative control group, the proliferation ability of human apical papilla stem cells in the cannabinoid type I overexpression group was the strongest at 5 and 10 days after neural induction ($P < 0.05$). (3) Compared with the blank control group and the negative control group, the mRNA expression of NeuroD-1, NCAM1, and TH in the stem cells of the human apical papilla in the cannabinoid type I overexpression group was significantly increased, and the fluorescence intensity of Nestin and TUBB3 was significantly enhanced ($P < 0.05$). (4) Compared with the cannabinoid type I overexpression group, the proliferation ability, mRNA expression level of NeuroD-1, NCAM1, and TH, as well as the fluorescence intensity of Nestin and TUBB3, were significantly decreased in the cannabinoid type I overexpression + AM251 group ($P < 0.05$). These findings conclude that overexpression of cannabinoid type I promoted the proliferation and neural differentiation of human apical dentin papilla stem cells.
Key words: human apical dental papilla stem cell; dental papilla; cannabinoid type I receptor; neural differentiation; proliferation; lentivirus; AM251; nerve injury

Funding: *Xinjiang Uygur Autonomous Region Natural Science Foundation, No. 2022D01C274 (to ZJ)*
How to cite this article: *LIU ZW, TURSUN N, YIN R, LI SH, ZHOU J. Effect of cannabinoid type I receptors on neuronal differentiation of human apical papilla stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2026;30(1):93-100.*

0 引言 Introduction

周围神经损伤可造成感觉、运动功能障碍，若不及时有效进行正确修复治疗，预后效果极差，可导致终身残疾[1]。尽管再生医学取得了显著进展，但自体神经移植仍是恢复受损神经结构和功能的金标准。然而，由于自体神经的可用性有限、取材区域神经功能易受到损害，以及取材部位有神经瘤形成的风险，这些因素限制了自体神经移植在临床实践中的广泛应用[2-4]。

随着干细胞技术的发展，以干细胞为基础的组织再生疗法治疗周围神经损伤前景广阔[5]。牙源性干细胞具有与间充质干细胞相似的特性，例如自我更新和多向分化潜力，已成为组织工程领域的重要种子细胞[6-7]。牙源性干细胞起源于神经嵴，在特定条件下能够诱导分化为神经样细胞，而且由于易获得性和无伦理争议问题，为神经再生提供了新的选择[8-9]。研究证实，根尖牙乳头干细胞具有向软骨组织、成骨组织、神经组织分化的潜力[10-12]。此外，人根尖牙乳头干细胞能够释放出调节三叉神经元轴突生长的可溶性因子，在经过成神经分化后，这些干细胞能有效用于治疗神经退行性疾病，成为神经组织修复的理想选择[13-14]。

内源性大麻素系统在中枢神经系统的发育过程中具有重要作用，其核心组成部分是大麻素 (cannabinoid，CB) 受体，主要包含大麻素受体Ⅰ (CB1) 型和大麻素受体Ⅱ (CB2) 型，它们均属于 G 蛋白偶联受体家族，参与调节神经元的生长、发育、分化和存活等基本生命过程[15-16]。CB1 是中枢神经系统中表达最多的 G 蛋白偶联受体，主要存在于大脑的神经元和胶质细胞中，在牙龈成纤维细胞、口腔上皮细胞和牙周韧带细胞中也均有表达[17-18]。研究表明，小鼠神经干细胞经过 CB1 受体激动剂处理后，会引发 ERK1/2 信号通路的持续性抑制，进而促进神经元分化和成熟[19]；大麻二酚可激活人牙龈间充质干细胞中的 CB1 受体，通过与促分裂原活化蛋白激酶相互作用，显著上调神经分化相关基因的表达 (如 CES1、CHRM2、NEFM 等)，促进神经祖细胞分化[20]。然而 CB1 对人根尖牙乳头干细胞神经向分化的影响还未见报道。该研究拟进行体外细胞实验探讨 CB1 对人根尖牙乳头干细胞增殖活性及神经向分化的影响，为后续神经再生研究及对周围神经损伤疾病的治疗提供参考。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学观察实验。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 4 月至 2024 年 4 月在新疆医科大学第二附属医院自治区重点实验室完成。

1.3 材料 胎牛血清 (依科赛，中国)；α-MEM、青霉素－链霉素双抗、0.25% 胰酶 (Gibco，澳大利亚)；分散酶Ⅱ (索莱宝，北京)；PBS(中杉金桥，中国)；二甲基亚砜 (Sigma，德国)；表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、STRO-1 抗体 (Proteintech，美国)；B-27™ 添加剂、Neurobasal™-A 培养基 (赛默飞，美国)；CB1 拮抗剂 AM251(MCE，美国)；CB1 过表达慢病毒、阴性对照 (和元生物，中国)；Nestin 抗体 (Affinity，澳大利亚)；TUBB3 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司)；BCA 试剂盒 (全式金，中国)；RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂 (武汉博士德生物)；PVDF 膜 (Millipore，美国)；山羊抗兔 IgG H&L、山羊抗小鼠 IgG H&L(Abcam，英国)；CD24、CD45、CD146 抗体 (Biolegend，美国)；胶原酶 (上海源叶生物，中国)；CO_2 细胞培养箱、生物安全柜 (力康生物，中国)；流式细胞仪 (优利特，中国)；荧光倒置显微镜 (日本尼康公司)；恒温水浴槽 (上海精宏实验设备有限公司)；

−20 ℃、−80 ℃低温冰箱 (美菱，中国)。

1.4 实验方法

1.4.1 人根尖牙乳头干细胞的分离培养 该实验通过新疆医科大学第二附属医院伦理委员会批准 (伦理批准编号：2022H010)，选取在正畸过程中因治疗需要拔除的根尖尚未完全发育且无龋坏的第三磨牙 (已获取患者签署的知情同意书)，通过组织块法和酶消化法进行原代人根尖牙乳头干细胞的分离培养 [21]。在无菌超净台中，采用含有青霉素 − 链霉素双抗的 PBS 反复彻底清洗牙齿，分离根尖牙乳头组织，在无菌条件下剪碎，剪碎后的组织置于含有 3 mg/mL 胶原酶Ⅰ和 4 mg/mL 分散酶Ⅱ溶液中，37 ℃消化 50 min，利用细胞筛过滤消化液以获得单细胞悬液，接种至 6 孔培养板内，在 37 ℃、体积分数为 5% CO_2 恒温培养箱中，采用 α-MEM 培养基 (含体积分数为 15% 胎牛血清 +100 U/mL 青霉素 − 链霉素双抗) 进行培养，每两三天换液 1 次，7−10 d 后细胞生长融合，采用胰蛋白酶消化法 (0.2% 胰蛋白酶 +0.02% EDTA) 消化收集细胞，按 1 ： 3 比例传代，3−5 d 传代 1 次，共传 3 代。

1.4.2 人根尖牙乳头干细胞的鉴定 取对数期生长的第 3 代人根尖牙乳头干细胞，采用有限稀释法克隆化培养纯化人牙根尖牙乳头干细胞，0.25% 胰蛋白酶消化细胞，PBS 冲洗 3 遍，加入 α-MEM 培养基重悬细胞，调整细胞浓度为 1×10^{10} L^{-1}，每一 EP 管内加入 100 μL 单细胞悬液，再分别加入适量鼠抗人 STRO-1、CD24、CD146 和 CD45 单克隆抗体，室温避光孵育 30 min，上流式细胞仪检测。

1.4.3 实验分组 取对数期生长的第 3 代人根尖牙乳头干细胞进行实验。第一部分实验：明确慢病毒转染条件，探索出最适感染条件和慢病毒感染复数，设置常规培养基组、HiTransG A 组、HiTransG P 组。第二部分实验：根据第一部分实验得出的感染复数值，探究 CB1 对人根尖牙乳头干细胞增殖及神经分化的影响，将细胞随机分为 4 组：①空白对照组：α-MEM 培养基培养 72 h，随后使用神经源性分化培养基 (含 2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、20 ng/mL 表皮生长因子、40 ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子和 20 μg/mL B27 的 Neurobasal™-A 培养基) 培养；②阴性对照组：α-MEM 培养基中加入阴性对照慢病毒干预 72 h，随后使用神经源性分化培养基培养；③过表达 CB1 组：α-MEM 培养基中加入过表达 CB1 慢病毒干预 72 h，随后使用神经源性分化培养基培养；④过表达 CB1+AM251 组：α-MEM 培养基中加入过表达 CB1 慢病毒干预 72 h，随后使用神经源性分化培养基培养，同时给予 10 μmol/L AM251 干预。

1.4.4 慢病毒转染条件确定 取对数期生长的第 3 代人根尖牙乳头干细胞，用 0.25% 胰蛋白酶消化，吹打使细胞均匀分散，制备成细胞浓度为 5×10^{7} L^{-1} 的单细胞悬液，接种于 96 孔板中，每孔 100 μL，在 37 ℃、体积分数 5% CO_2 培养箱培养 24 h，倒置显微镜下观察细胞汇合度达到约 30%，将阴性对照病毒滴度依次稀释至 1×10^{8}，1×10^{7}，1×10^{6} TU/mL，根据感染复数值 (1，10，100) 向含感染增强液各孔中加入 50 μL 相应滴度的病毒，充分混匀，继续培养，感染 12 h 后换回标准培养基，感染 72 h 后使用荧光倒置显微镜观察感染效率达到约 80%(绿色荧光亮度较强)，且细胞生长状态良好时，所对应的感染复数作为最佳感染条件。

1.4.5 过表达 CB1 慢病毒转染 取对数期生长的第 3 代人根尖牙乳头干细胞，用 α-MEM 培养基将细胞浓度调整至 1×10^{8} L^{-1}，形成单细胞悬液，均匀接种至 6 孔板中，每孔 2 mL，待细胞生长过夜并贴壁后，按照感染复数为 10 向孔板中加入阴性对照慢病毒、CB1 过表达慢病毒，同时设立空白对照组；转染 72 h，PBS 清洗，提取总蛋白，Western blot 法检测 CB1 蛋白的表达。

1.4.6 神经源性分化诱导 各组人根尖牙乳头干细胞在神经源性分化培养基中诱导分化 1，5，10 d 时，在光学显微镜下观察各组神经元样细胞形态改变。

1.4.7 CCK-8 检测细胞增殖 将第 3 代人根尖牙乳头干细胞以 5×10^{7} L^{-1} 细胞浓度接种至 96 孔板中，每孔 100 μL，在 37 ℃、体积分数为 5% CO_2 培养箱中培养，贴壁生长 24 h 后，弃去原有培养基，按照 1.4.3 第二部分实验分组进行干预处理，每组均进行 5 次重复。各组细胞在成神经诱导培养第 1，5，10 天，弃去原培养基，每孔加入 100 μL 预先配置好的 10% CCK-8 溶液，在 37 ℃、体积分数为 5% CO_2 培养箱中继续培养 1 h，使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值。

1.4.8 qRT-PCR 检测 TH、NeuroD-1、NCAM1 mRNA 表达 将第 3 代人根尖牙乳头干细胞以 1×10^{8} L^{-1} 细胞浓度接种至 6 孔板中，每孔 2 mL，在 37 ℃、体积分数为 5% CO_2 培养箱中培养，贴壁生长 24 h 后，弃去原有培养基，按照 1.4.3 第二部分实验分组进行干预处理，各组细胞在成神经诱导培养第 10 天，弃去上清液，向每孔加入 1 mL Trizol，反复均匀摇晃至贴壁细胞消化下来，将细胞悬液转移至 1.5 mL EP 管中，按照 TRIzol 说明书提取总 RNA，用核酸蛋白定量仪检测 RNA 浓度及纯度，采用 5× All-In-One RT MasterMix 试剂盒，以 GAPDH 为内参基因，将总 RNA 反转录为 cDNA。实验所需 PCR 引物由上海生工生物公司合成，反应条件为：95 ℃预变性 3 min，1 个循环；95 ℃变性 15 s，60 ℃退火 / 延伸 1 min，40 个循环。实验单独重复 3 次，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对所得数据进行统计分析，计算 TH、NeuroD-1 及 NCAM1 基因的相对表达水平，引物序列见**表 1**。

表 1 | 荧光定量 mRNA 检测引物序列
Table 1 | Primer sequences for fluorescent quantitative mRNA assay

基因	引物序列 (5' to 3')	产物大小
TH	F：GGG CTG TGT AAG CAG AAC G	107 bp
	R：AAG GCC CGA ATC TCA GGC T	
NeuroD-1	F：ATG ACC AAA TCG TAC AGC GAG	141 bp
	R：GTT CAT GGC TTC GAG GTC GT	
NCAM1	F：GGC ATT TAC AAG TGT GTG GTT AC	100 bp
	R：TTG GCG CAT TCT TGA ACA TGA	
hsa GAPDH	F：TGT TGC CAT CAA TGA CCC CTT	202 bp
	R：CTC CAC GAC GTA CTC AGC G	

1.4.9 免疫荧光检测 Nestin 和 TUBB3 蛋白表达 将第 3 代人根尖牙乳头干细胞浓度调整为 1×10^8 L^{-1}，取 200 μL 滴加至黏附性载玻片上，培养 24 h 至细胞贴壁后，按照 1.4.3 第二部分实验分组进行干预处理后，各组细胞在成神经诱导培养第 10 天，取出载玻片，PBS 洗涤 1 次；40 g/L 多聚甲醛固定 10 min，PBS 洗涤 3 次，每次 2 min；0.5%Triton X-100 室温通透化处理 20 min，PBS 洗涤 3 次，每次 2 min；1%BSA 室温封闭处理 40 min，去除封闭液；分别滴加 80 μL 质量浓度为 2 μg/mL 的 Anti-Nestin 和 Anti-TUBB3 抗体，4 ℃孵育过夜，PBS 洗涤 3 次，每次 2 min；向载玻片上滴加 80 μL 2 μg/mL 二抗山羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor® 488) 和山羊抗小鼠 IgG H&L (Alexa Fluor® 594)，避光条件下 37 ℃孵育 1 h，PBS 冲洗 3 次，每次 2 min；滴加 80 μL 1 μg/mL DAPI 进行细胞核染色，避光室温孵育 5 min，PBS 冲洗 3 次，每次 2 min；50% 甘油封固处理，在激光共聚焦显微镜下观察 Nestin 和 TUBB3 蛋白表达及亚细胞定位，利用 Image J 软件对荧光强度进行定量分析。每组重复 3 次。

1.5 主要观察指标 ①流式细胞仪检测人根尖牙乳头干细胞中 STRO-1、CD24、CD146 和 CD45 的表达；②慢病毒转染条件的确定，Western blot 验证过表达 CB1 慢病毒转染人根尖牙乳头干细胞的效果；③ CCK-8 检测各组人根尖牙乳头干细胞的增殖能力；④ qRT-PCR 检测各组人根尖牙乳头干细胞中 TH、NeuroD-1、NCAM1 基因表达水平；⑤免疫荧光检测各组人根尖牙乳头干细胞中 Nestin 和 TUBB3 蛋白表达。

1.6 统计学分析 每组实验均至少重复 3 次。运用 SPSS 19.0 统计软件分析各组数据，实验数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，比较多组间数据时，选用单因素方差分析方法进行统计推断，以评估各组之间的差异是否具有显著性意义，两组间数据差异比较采用独立样本 *t* 检验。$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。该文所采用的统计学方法已经过新疆医科大学生物统计学专家的严格审核，确保其科学性与合理性。

2 结果 Results

2.1 人根尖牙乳头干细胞形态 组织取材自新鲜拔除的牙根尚未发育完全的恒牙根尖部，酶消化法联合组织块法培养原代根尖牙乳头干细胞，培养 3 d 后发现培养瓶底部有少量不规则多角形细胞爬出 (**图 1A**)，培养 5 d 后可见细胞数量增加，中央有卵圆形核，胞质向外伸出长短不同的突起 (**图 1B**)，培养 7 d 后细胞呈现均一的长梭形 (**图 1C**)，培养 10 d 后大量细胞聚集，相互紧密连接 (**图 1D**)。细胞生长速度快，融合度在 70%–80% 时，胰酶消化传代，扩大培养。

2.2 人根尖牙乳头干细胞流式鉴定结果 对人根尖牙乳头干细胞进行流式细胞术分析，结果显示，间充质干细胞标志物 CD24、CD146 和 STRO-1 表达率分别为 93.5%，44.29% 和 35.79%，而造血干细胞标志物 CD45 表达率为 0.00%，见**图 2**。

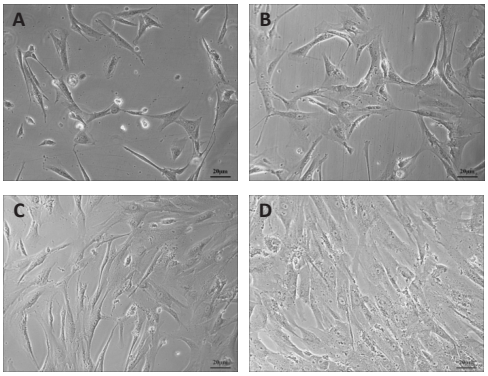
2.3 慢病毒最佳感染条件 荧光显微镜下观察荧光强度，与其他两组相比，感染 72 h 后，HitransG A 感染增强液、感染复数 =10 条件下，人根尖牙乳头干细胞感染效率达 80% 以上，荧光亮度表达最强，且细胞生长状况良好，见**图 3**。因此，选取该条件进行后续慢病毒感染实验。

2.4 Western blot 检测人根尖牙乳头干细胞内 CB1 的表达 与阴性对照组及空白对照组相比，过表达 CB1 组 CB1 蛋白表达量明显升高，差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。空白对照组与阴性对照组的 CB1 蛋白表达量无显著差异 ($P > 0.05$)，见**图 4**。

2.5 细胞增殖检测结果 CCK-8 检测结果显示：人根尖牙乳头干细胞成神经诱导第 1 天时，各组间吸光度值无明显差异。人根尖牙乳头干细胞成神经诱导第 5，10 天时，与空白对照组及阴性对照组相比，过表达 CB1 组人根尖牙乳头干细胞的增殖能力显著升高 ($P < 0.05$)；与过表达 CB1 组相比，过表达 CB1+AM251 组人根尖牙乳头干细胞的增殖能力显著下降 ($P < 0.05$)，见**图 5**，提示 CB1 基因过表达促进人根尖牙乳头干细胞的增殖，AM251 的加入抑制了人根尖牙乳头干细胞的增殖。

2.6 各组人根尖牙乳头干细胞形态 神经分化诱导 1 d 时可见少数具有细长形突起的星状细胞，细胞分布较为分散，各组间未见显著差异。神经分化诱导 5 d 时，与阴性对照组及空白对照组相比，过表达 CB1 组的细胞数量明显增多，细胞突起长度增长，分支数量增多，突起之间形成网络状连接；神经分化诱导 10 d 时，细胞增殖速度有所下降，细胞形态由梭形转变为圆形，形成了具有多极突起的典型神经细胞形态，表明 CB1 基因可促进人根尖牙乳头干细胞神经突起的生长。神经分化诱导第 5，10 天时，与过表达 CB1 相比，过表达 CB1+AM251 组细胞数量减少，胞质向外伸出两三个长短不同的突起，细胞间连接较为松散，神经细胞样形态不明显，提示 AM251 抑制人根尖牙乳头干细胞向神经细胞分化，见**图 6**。

2.7 qRT-PCR 检测 TH、NeuroD-1、NCAM1 mRNA 表达 与空白对照组与阴性对照组相比，过表达 CB1 组 TH、NeuroD-1、NCAM1 mRNA 表达量升高，差异有显著性意义 ($P < 0.05$)；空



图注：图 A 为培养 3 d，少量不规则多角形细胞爬出；B 为培养 5 d，细胞数量增加；C 为培养 7 d，细胞呈现均一的长梭形；D 为培养 10 d，大量细胞聚集。

图 1 | 原代培养人根尖牙乳头干细胞的形态 (×100)

Figure 1 | **Morphology of human apical dental papilla stem cells in primary culture (×100)**

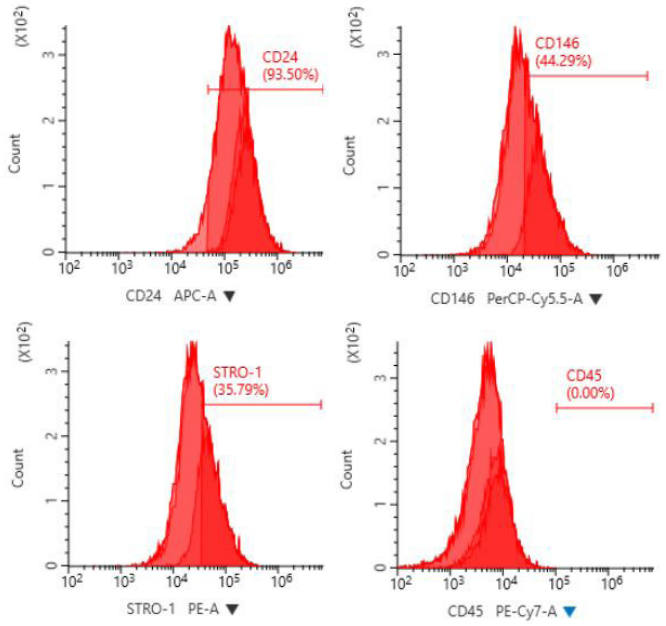


图 2 | 流式鉴定人根尖牙乳头干细胞的表面标志物

Figure 2 | **Flow cytometric characterization of surface markers of human apical dental papilla stem cells**

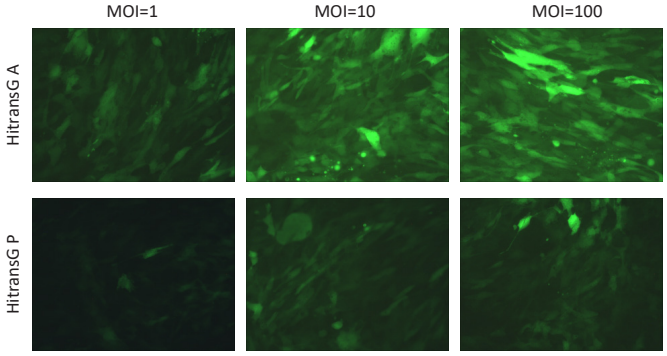
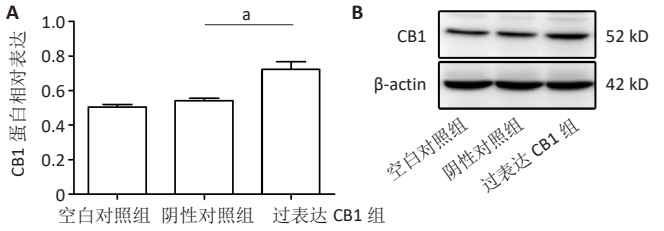


图 3 | 不同助感染试剂用不同感染复数 (MOI) 转染人根尖牙乳头干细胞 (×100)

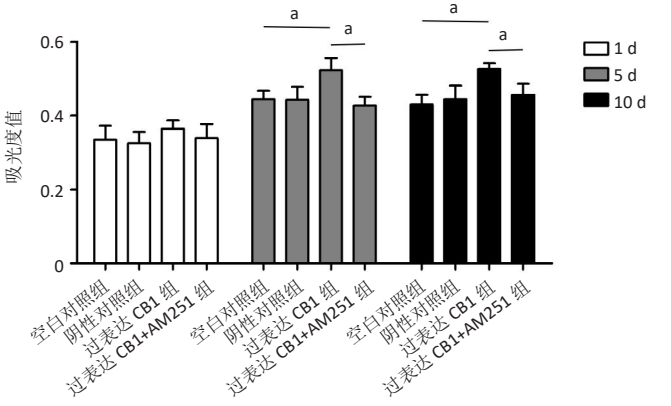
Figure 3 | **Transfection of human apical dental papilla stem cells with different co-infection reagents using different multiplicities of infection (×100)**



图注：图 A 为 CB1 蛋白表达量，$^aP < 0.05$；B 为 CB1 目的蛋白条带。

图 4 | 慢病毒转染人根尖牙乳头干细胞中大麻素受体Ⅰ (CB1) 蛋白表达

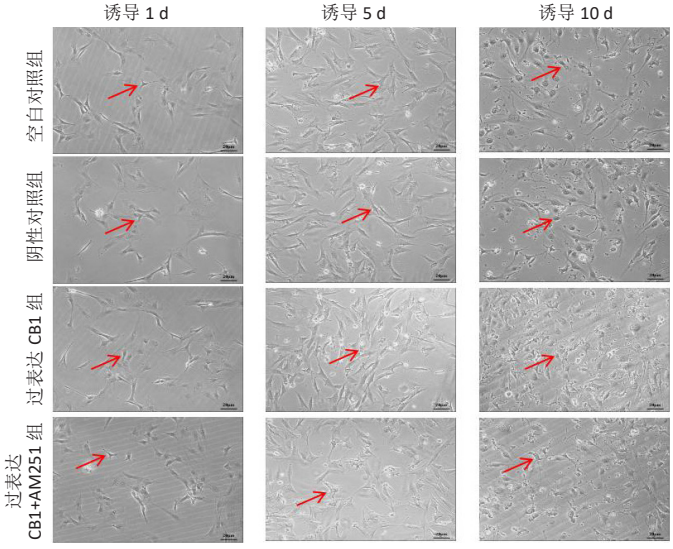
Figure 4 | **Lentiviral transfection of human apical dental papilla stem cells with cannabinoid type I (CB1) protein expression**



图注：$^aP < 0.05$。

图 5 | 过表达大麻素受体Ⅰ (CB1) 对人根尖牙乳头干细胞增殖活性的影响

Figure 5 | **Effect of cannabinoid type I (CB1) overexpression on proliferative activity of human apical dental papilla stem cells**



图注：标尺为 20 μm，箭头所指为细胞。

图 6 | 各组人根尖牙乳头干细胞成神经诱导分化后的细胞形态 (×100)

Figure 6 | **Morphology of human apical papilla stem cells after neural differentiation in each group (×100)**

白对照组与阴性对照组间 TH、NeuroD-1、NCAM1 mRNA 表达量无显著差异；与过表达 CB1 组相比，过表达 CB1+AM251 组 TH、NeuroD-1、NCAM1 mRNA 表达量降低，差异有显著性意义 ($P < 0.05$)，见图 **7**。

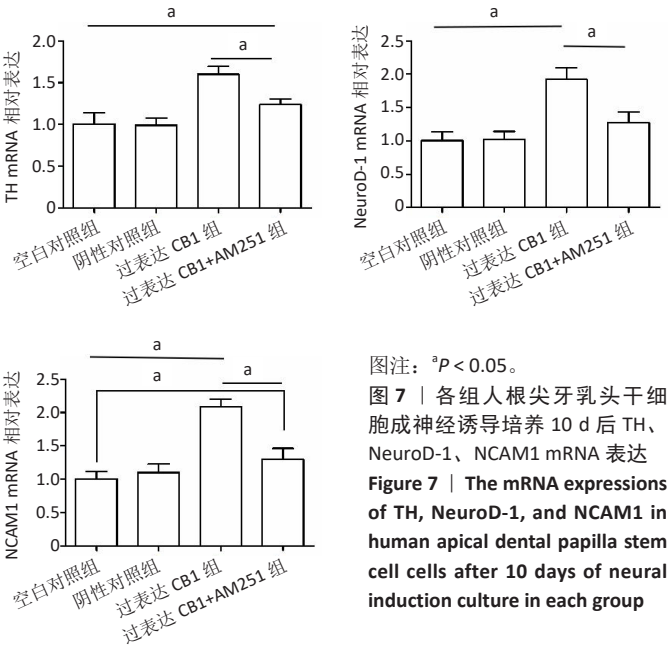
2.8 免疫荧光检测 Nestin 和 TUBB3 蛋白表达 免疫荧光检测结果显示，与空白对照组与阴性对照组相比，过表达 CB1 组 Nestin 和 TUBB3 蛋白表达升高，荧光亮度表达最强，差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。与过表达 CB1 组相比，过表达 CB1+AM251 组 Nestin 和 TUBB3 蛋白表达降低，差异有显著性意义 ($P < 0.05$)，见**图 8**。

3 讨论 Discussion

帕金森病、阿尔茨海默病、脊髓损伤是最常见的神经系统疾病，通常会导致暂时性或永久性的功能改变，主要病理特征为神经元丧失，这使得神经祖细胞对中枢神经系统进行内源性修复的能力受到阻碍[22]。基于干细胞疗法的外源性干细胞神经移植术被视为治疗神经退行性疾病最有前景的方法之一。从未成熟人类第三磨牙根尖中分离的根尖牙乳头干细胞是神经嵴衍生的间充质干细胞，其成神经诱导分化后在治疗神经退行性疾病方面展现出了巨大的潜力[23]。SHEN 等[24]研究证实根尖牙乳头干细胞促进神经再生具有显著优势，由于其可获得性、能够表达神经元标志物和神经营养因子，以及具备神经源性分化的潜力，已成为当前生物医学领域的研究热点。

内源性大麻素系统在人体中参与多种生理和病理调节作用，包括镇痛、抗炎、神经保护、免疫和内分泌调节[25-26]。CB1 受体主要分布于神经系统，在中枢神经系统中介导疼痛控制、记忆形成、认知功能维持和体内平衡调节[27-28]。多项研究表明，大麻素具有神经保护特性，在神经退行性疾病如帕金森病的治疗中展现出潜在的应用价值[29-31]。但在一系列体内和体外兴奋毒性模型中显示，大麻素的神经保护作用可能依赖于 CB1 受体的介导[32]。一项脑损伤小鼠动物实验中，研究结果揭示了单酰基甘油脂酶失活导致的创伤性脑损伤的神经保护作用机制，主要归因于 2-AG 信号的增强，而该信号又进一步激活了 CB1 受体介导的信号通路[33]。在口腔医学领域，有研究发现内源性大麻素系统与根尖牙乳头干细胞存在密切联系，根尖牙乳头干细胞表达内源性大麻素合成与降解过程中相关酶的基因，而内源性大麻素参与调控根尖牙乳头干细胞的活性、矿化能力和基因表达[34]。该实验 CCK-8 结果显示，CB1 过表达可显著促进人根尖牙乳头干细胞的增殖。QUE 等[35]研究发现人牙本质细胞可以表达功能性 CB1 受体，这些受体在牙齿感觉传导、生物矿化和组织修复中发挥作用。

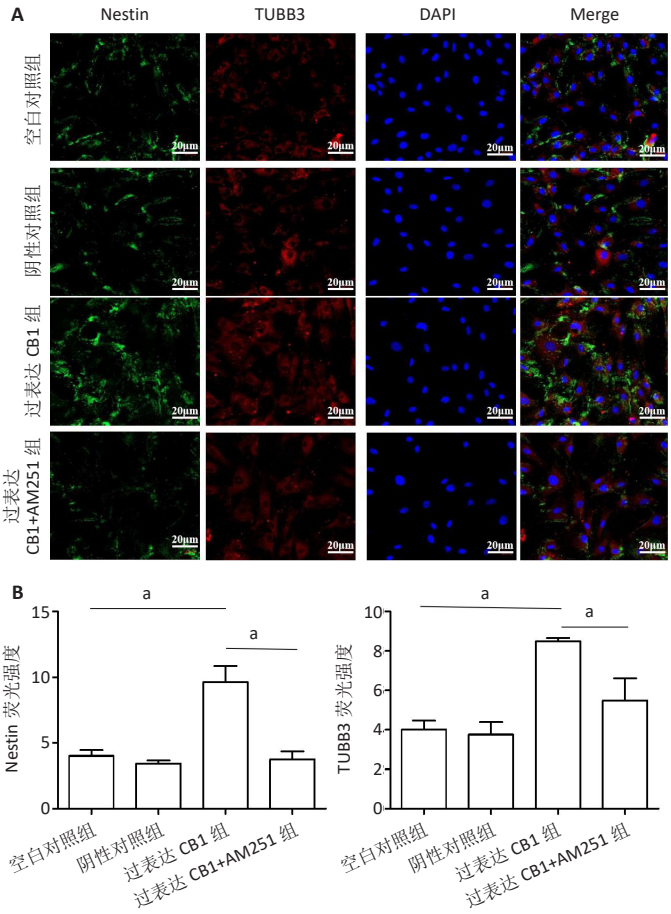
NeuroD-1 是一种调控神经元命运的强效因子，能够在体内将反应性神经胶质细胞转化为功能性神经元[36]。NCAM1 是主要表达于神经系统中的细胞黏附分子，参与调控神经突生长，轴突和树突延伸，神经元迁移和细胞定位[37]。TH 是



图注：$^{a}P < 0.05$。

图 7 | 各组人根尖牙乳头干细胞成神经诱导培养 10 d 后 TH、NeuroD-1、NCAM1 mRNA 表达

Figure 7 | **The mRNA expressions of TH, NeuroD-1, and NCAM1 in human apical dental papilla stem cell cells after 10 days of neural induction culture in each group**



图注：图 A 为各组神经标志物 Nestin(绿色) 及 TUBB3(红色) 免疫荧光染色及细胞核 DAPI(蓝色) 染色，Merge 为 DAPI 细胞核染色图与目的蛋白染色图合成图，标尺为 20 μm；B 为各组 Nestin 和 TUBB3 蛋白表达定量分析 ($^{a}P < 0.05$)。

图 8 | 免疫荧光检测各组人根尖牙乳头干细胞成神经诱导 10 d 后 Nestin 和 TUBB3 蛋白表达

Figure 8 | **Expression of Nestin and TUBB3 proteins in human apical papilla stem cells of each group detected by immunofluorescence after 10 days of neural induction**

多巴胺生物合成过程中的限速酶，其蛋白静态调节对维持大脑神经递质的正常平衡至关重要[38]。CB1 受体在大脑发育过程中发挥重要作用，它通过调节 NCAM 和 TH 基因的表达，促进神经干细胞的增殖、神经元的迁移以及轴突的伸长[39]。VALERI 等[40]将 NSC-34 细胞系暴露于不同浓度的大麻酚中，结果显示 CB1 受体的激活可促进神经元分化，且 7.5 μmol/L 大麻酚能显著提高 NeuroD-1 基因的表达水平。该实验结果显示，与空白对照组和阴性对照组相比，过表达 CB1 组细胞中 NeuroD-1、NCAM1 和 TH 神经标志物的表达水平均升高，提示 CB1 过表达对人根尖牙乳头干细胞向神经谱系分化具有强烈刺激作用。Nestin 是神经上皮细胞和放射状胶质细胞的特异性标记蛋白，该蛋白在中间丝的组装和分解过程中发挥重要的作用，从而维持发育中神经细胞的结构完整性并调节细胞生长[41]。TUBB3 是一种神经元特异性微管蛋白，在神经发生过程中特异性表达，是轴突生长的关键调控因子[42]。该实验免疫荧光检测结果显示，与空白对照组和阴性对照组相比，过表达 CB1 组人根尖牙乳头干细胞中 Nestin 和 TUBB3 蛋白表达均呈现出显著上升趋势，有力地证明了 CB1 对促进人根尖牙乳头干细胞向神经方向分化具有积极引导作用。

AM251 是选择性 CB1 受体拮抗剂，能够有效阻断 CB1 受体诱导神经干细胞向神经元方向的分化。研究发现，CB1 受体激活小鼠侧脑室下区的神经干细胞，Nestin、NeuN 阳性表达，促进神经干细胞分化为神经元，使用 AM251 预处理后，可显著抑制神经祖细胞的增殖，Nestin、NeuN 蛋白表达量明显减少[43]。孙军等[44]发现 CB1 受体在人成牙本质细胞中表达，加入 AM251 后大麻受体激动剂花生四烯酸乙醇胺诱导的人成牙本质样细胞中基质金属蛋白酶 9 表达水平下降。既往研究已证实，10 μmol/L AM251 可以阻断 CB1 过表达诱导的人牙周膜干细胞成骨 / 牙本质分化[45]，鉴于人根尖牙乳头干细胞与人牙周膜干细胞均属于牙源性间充质干细胞，且二者生物学特性相似，故该研究采用 10 μmol/L AM251 进行干预。该实验在过表达 CB1 基因的人根尖牙乳头干细胞的基础上，通过加入 CB1 受体拮抗剂 AM251 进行预处理，研究发现人根尖牙乳头干细胞增殖活性显著降低，以及特异性神经标志物表达量显著下降。这些结果进一步表明 CB1 受体激活可促进人根尖牙乳头干细胞向神经元的分化。

综上所述，该实验证实了人根尖牙乳头干细胞具有向神经谱系分化的潜在趋势。CB1 能够有效诱导神经祖细胞标记基因的表达，从而协同增强神经元诱导培养基中神经细胞的分化效率。采用免疫荧光检测以评估神经干细胞的分化潜力，该方法仅针对有限数量的细胞进行分析而存在一定的局限性，难以准确反映人根尖牙乳头干细胞的分化潜力。此外，鉴于当前 CB1 调控人根尖牙乳头干细胞神经向分化的研究主要聚焦于体外实验，而体内环境与体外环境之间存在显著差异，因此，未来有必要深入探究 CB1 在体内调节人根尖牙乳头干细胞向神经谱系分化过程中的关键影响因素，旨在为神经系统损伤性疾病的治疗提供更为科学合理的解决方案。

作者贡献：周晶负责实验设计，刘紫薇负责实验实施、撰写论文，尼加提·吐尔逊负责文章审校，殷瑞负责查阅文献、收集资料，李淑慧负责分析处理数据。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名－非商业性使用－相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] DILL-MACKY AS, LEE EN, WERTHEIM JA, et al. Glia in tissue engineering: From biomaterial tools to transplantation. Acta Biomater. 2024;190:24-49.

[2] GUAN Y, REN Z, YANG B, et al. Dual-bionic regenerative microenvironment for peripheral nerve repair. Bioact Mater. 2023; 26:370-386.

[3] QI T, ZHANG X, GU X, et al. Experimental Study on Repairing Peripheral Nerve Defects with Novel Bionic Tissue Engineering. Adv Healthc Mater. 2023;12(17): e2203199.

[4] 高欣 , 孔令驰 , 史安琪 , 等 . 内芯外鞘神经导管的制备及表征 [J]. 东华大学学报 (自然科学版),2024,50(6):30-36.

[5] FENG Y, LI Y, SHEN PP, et al. Gene-Modified Stem Cells for Spinal Cord Injury: a Promising Better Alternative Therapy. Stem Cell Rev Rep. 2022;18(8):2662-2682.

[6] KONG H, LIU P, LI H, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: The Novel Therapeutic Option for Regenerative Dentistry. Stem Cell Rev Rep. 2023;19(1):46-58.

[7] 王钊鑫 , 尼加提 • 吐尔逊 , 代慧娟 , 等 . 巨噬细胞炎性蛋白 1α 对人牙周膜干细胞生物学行为的影响 [J]. 中国组织工程研究 ,2023, 27(10):1521-1527.

[8] MEAD B, LOGAN A, BERRY M, et al. Concise Review: Dental Pulp Stem Cells: A Novel Cell Therapy for Retinal and Central Nervous System Repair. Stem Cells. 2017;35(1):61-67.

[9] 蔡韵竹 , 朱姝 , 刘尧 , 等 . 牙源性干细胞用于治疗神经系统疾病的研究进展 [J]. 国际口腔医学杂志 ,2022,49(3):255-262.

[10] BASABRAIN MS, ZHONG J, LUO H, et al. Formation of Three-Dimensional Spheres Enhances the Neurogenic Potential of Stem Cells from Apical Papilla. Bioengineering (Basel). 2022;9(11):604.

[11] NGAI P, LEE AHC, XU J, et al. Effects of L-Chg10-Teixobactin on Viability, Proliferation, and Osteo/Odontogenic Differentiation of Stem Cells from Apical Papilla. J Endod. 2023;49(2):162-168.

[12] XIAO Y, CHEN L, XU Y, et al. Circ-ZNF236 mediates stem cells from apical papilla differentiation by regulating LGR4-induced autophagy. Int Endod J. 2024;57(4):431-450.
[13] MARTENS W, BRONCKAERS A, POLITIS C, et al. Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: an update. Clin Oral Investig. 2013;17(9):1969-1983.
[14] SONGSAAD AT, THAIRAT S, SEEMAUNG P, et al. Characterization of neural stem cells derived from human stem cells from the apical papilla undergoing three-dimensional neurosphere induction. J Appl Oral Sci. 2023;31:e20230209.
[15] MOLINA-HOLGADO E, ESTEBAN PF, AREVALO-MARTIN Á, et al. Endocannabinoid signaling in oligodendroglia. Glia. 2023;71(1):91-102.
[16] SELVARAJ P, TANAKA M, WEN J, et al. The Novel Monoacylglycerol Lipase Inhibitor MJN110 Suppresses Neuroinflammation, Normalizes Synaptic Composition and Improves Behavioral Performance in the Repetitive Traumatic Brain Injury Mouse Model. Cells. 2021;10(12): 3454.
[17] RAMESH K, ROSENBAUM DM. Molecular basis for ligand modulation of the cannabinoid CB1 receptor. Br J Pharmacol. 2022;179(14):3487-3495.
[18] MONTEIRO VIANA JC, DA SILVA GOMES GE, DUARTE OLIVEIRA FJ, et al. The Role of Different Types of Cannabinoids in Periodontal Disease: An Integrative Review. Pharmaceutics. 2024;16(7):893.
[19] BLANDO S, RAFFAELE I, CHIRICOSTA L, et al. Cannabidiol Promotes Neuronal Differentiation Using Akt and Erk Pathways Triggered by Cb1 Signaling. Molecules. 2022;27(17):5644.
[20] SOUNDARA RAJAN T, GIACOPPO S, SCIONTI D, et al. Cannabidiol Activates Neuronal Precursor Genes in Human Gingival Mesenchymal Stromal Cells. J Cell Biochem. 2017;118(6):1531-1546.
[21] 马玉 , 段子文 , 李淑慧 , 等 . 牙周膜干细胞与根尖牙乳头干细胞成骨及成牙本质能力比较的实验研究 [J]. 口腔医学 ,2018,38(1):5-9.
[22] ZIPSER CM, CRAGG JJ, GUEST JD, et al. Cell-based and stem-cell-based treatments for spinal cord injury: evidence from clinical trials. Lancet Neurol. 2022;21(7):659-670.
[23] SONGSAAD A, GONMANEE T, RUANGSAWASDI N, et al. Potential of resveratrol in enrichment of neural progenitor-like cell induction of human stem cells from apical papilla. Stem Cell Res Ther. 2020; 11(1):542.
[24] SHEN Z, TSAO H, LARUE S, et al. Vascular Endothelial Growth Factor and/or Nerve Growth Factor Treatment Induces Expression of Dentinogenic, Neuronal, and Healing Markers in Stem Cells of the Apical Papilla. J Endod. 2021;47(6):924-931.
[25] BLEBEA NM, PRICOPIE AI, VLAD RA, et al. Phytocannabinoids: Exploring Pharmacological Profiles and Their Impact on Therapeutical Use. Int J Mol Sci. 2024;25(8):4204.
[26] ABIDI AH, ABHYANKAR V, ALGHAMDI SS, et al. Phytocannabinoids regulate inflammation in IL-1β-stimulated human gingival fibroblasts. J Periodontal Res. 2022;57(6):1127-1138.
[27] MARTINEZ RAMIREZ CE, RUIZ-PÉREZ G, STOLLENWERK TM, et al. Endocannabinoid signaling in the central nervous system. Glia. 2023; 71(1):5-35.
[28] 李永丰 , 任维 , 刘一辉 .CB1 受体通过钾离子通道介导外周镇痛作用 [J]. 中国病理生理杂志 ,2019,35(4):660-666.
[29] MADHUBALA D, PATRA A, KHAN MR, et al. Phytomedicine for neurodegenerative diseases: The road ahead. Phytother Res. 2024; 38(6):2993-3019.
[30] 乐明霞 , 周瑞 , 黄杜娟 , 等 . 大麻素 -CB1/CB2 受体系统对多巴胺神经元调节作用及其与帕金森病发生的研究进展 [J]. 神经解剖学杂志 ,2017,33(6):753-757.
[31] 王海军 , 牛亚凯 , 陈巍 . 内源性大麻素系统在运动促进脑健康中的研究进展 [J]. 生命科学 ,2021,33(9):1096-1103.
[32] MORRIS G, WALDER K, KLOIBER S, et al. The endocannabinoidome in neuropsychiatry: Opportunities and potential risks. Pharmacol Res. 2021;170:105729.
[33] HU M, ZHU D, ZHANG J, et al. Enhancing endocannabinoid signalling in astrocytes promotes recovery from traumatic brain injury. Brain. 2022;145(1):179-193.
[34] MENESES CCB, PIZZATTO LN, SIPERT CR, et al. Endocannabinoids Regulate Stem Cells of the Apical Papilla via a Cannabinoid Receptor and TRPV1-Independent Mechanism. J Endod. 2021;47(10): 1617-1624.
[35] QUE K, HE D, JIN Y, et al. Expression of Cannabinoid Type 1 Receptors in Human Odontoblast Cells. J Endod. 2017;43(2):283-288.
[36] PATASKAR A, JUNG J, SMIALOWSKI P, et al. NeuroD1 reprograms chromatin and transcription factor landscapes to induce the neuronal program. EMBO J. 2016;35(1):24-45.
[37] PARCERISAS A, ORTEGA-GASCÓ A, PUJADAS L, et al. The Hidden Side of NCAM Family: NCAM2, a Key Cytoskeleton Organization Molecule Regulating Multiple Neural Functions. Int J Mol Sci. 2021;22(18):10021.
[38] 李含章 , 李亚楠 , 郭磊 , 等 . 电针对帕金森病小鼠肠道 NEK7/NLRP3 炎症信号通路的影响 [J]. 北京中医药大学学报 ,2024,47(10): 1466-1473.
[39] FERNÁNDEZ-RUIZ J, GÓMEZ M, HERNÁNDEZ M, et al. Cannabinoids and gene expression during brain development. Neurotox Res. 2004; 6(5):389-401.
[40] VALERI A, CHIRICOSTA L, GUGLIANDOLO A, et al. Cannabinerol and NSC-34 Transcriptomic Analysis: Is the Dose Who Makes Neuronal Differentiation. Int J Mol Sci. 2022;23(14):7541.
[41] SIMONOVIC J, TOLJIC B, LAZAREVIC M, et al. The Effect of Liquid-Phase Exfoliated Graphene Film on Neurodifferentiation of Stem Cells from Apical Papilla. Nanomaterials (Basel). 2022;12(18):3116.
[42] RADWITZ J, HAUSRAT TJ, HEISLER FF, et al. Tubb3 expression levels are sensitive to neuronal activity changes and determine microtubule growth and kinesin-mediated transport. Cell Mol Life Sci. 2022;79(11):575.
[43] XAPELLI S, AGASSE F, SARDÀ-ARROYO L, et al. Activation of type 1 cannabinoid receptor (CB1R) promotes neurogenesis in murine subventricular zone cell cultures. PLoS One. 2013;8(5):e63529.
[44] 孙军 , 娄雅昕 , 苏凡 , 等 . 花生四烯酸氨基乙醇对人成牙本质细胞样细胞 MMP-9 表达的影响 [J]. 北京口腔医学 ,2023,31(6):385-390.
[45] YAN W, CAO Y, YANG H, et al. CB1 enhanced the osteo/dentinogenic differentiation ability of periodontal ligament stem cells via p38 MAPK and JNK in an inflammatory environment. Cell Prolif. 2019;52(6):e12691.

(责任编辑：马征华，邱杨，张楠)