

网络出版时间: 2017-5-20 11:13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170520.1113.009.html>

# 抑制 Kv1.3 表达能够降低 人牙周膜成纤维细胞增殖和分化成骨能力

朱庆勇<sup>1</sup>, 陈文君<sup>1</sup>, 朱慧<sup>2</sup>, 沈洋<sup>1</sup>, 祝心威<sup>3</sup>, 蒋勇<sup>4</sup>

**摘要** 目的 探讨 Kv1.3 在人牙周膜成纤维细胞 (hPDLFs) 增殖和分化成骨能力中的作用。方法 通过体外分离并培养健康人和牙周炎患者牙周膜成纤维细胞,应用细胞免疫荧光法、Q-PCR 和 Western blot 检测 Kv1.3 在牙周炎 hPDLFs 中表达变化;并通过 siRNA 沉默抑制 Kv1.3 表达,使用 MTT 和流式细胞仪观察对 hPDLFs 的增殖和分化成骨能力的作用。结果 细胞免疫荧光结果显示与健康组比较,牙周炎组 hPDLFs 中 Kv1.3 显著低表达 ( $P < 0.05$ );Western blot 结果显示 Kv1.3-siRNA 能够明显抑制细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1) 和 C-myc 蛋白表达 ( $P < 0.05$ );流式细胞仪检测显示 Kv1.3-siRNA 能够显著抑制细胞 G2/M 期;同时,Western blot 结果显示 Kv1.3-siRNA 明显降低碱性磷酸酶 (ALP) 和骨钙素 (OCN) 蛋白表达。结论 抑制 Kv1.3 表达能够明显抑制 hPDLFs 的增殖和分化成骨能力。

**关键词** Kv1.3; 人牙周膜成纤维细胞; 增殖; 分化

中图分类号 R 781.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)06-0819-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.06.009

人牙周膜成纤维细胞 (human periodontal ligament fibroblasts, hPDLFs) 是牙周组织再生的主要效应和反应细胞,其增殖和分化成骨能力则反映牙周组织健康的指标<sup>[1]</sup>。发生牙周炎或牙周组织受到创伤时, hPDLFs 增殖和分化成骨能力的降低抑制了牙周组织的再生,从而降低牙根和牙槽骨之间的连接导致牙齿脱落<sup>[1-3]</sup>。研究<sup>[3]</sup>表明,增加 hPDLFs 增殖和分化成骨能力能够修复或重构牙周组织中的损伤,近年来如何增加 hPDLFs 增殖和分化能力也是治疗牙周病的研究热点。

Kv1.3 通道是钾离子通道家族中钾离子选择性通道,其广泛分布在机体组织中,通过调控钾离子浓度参与细胞的增殖、迁移、凋亡等多种生理病理过程<sup>[4]</sup>。众多文献<sup>[5-6]</sup>报道,抑制 Kv1.3 表达能够通过调节细胞内离子稳态调节降低 T 细胞、巨噬细胞等增殖和炎症因子的分泌,但是 Kv1.3 在 hPDLFs 中的作用未被阐明。该研究通过 siRNA 沉默技术抑制 Kv1.3 的表达,探讨其对 hPDLFs 的增殖和分化成骨能力的影响,为治疗牙周病提供基础研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和器材

**1.1.1 实验材料** 胎牛血清购于美国 Cyagen 公司; Opti-MEM 购于美国 Gibco 公司; DMEM 高糖培养基购于美国 Hyclone 公司; Reverse Transcription System 逆转录试剂盒均购于日本 TaKaRa 公司; Lipofectamine™ 2000 Reagent 和 TRIzol 均购于美国 Invitrogen 公司; 胰酶细胞消化液、RIPA 裂解液和细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒均购于上海碧云天生物技术有限公司; TransStart Tip Green qPCR Super Mix 购于北京全式金生物技术有限公司; Kv1.3 抗体购于美国 Abcam 公司; 小鼠抗  $\beta$ -actin 抗体购于美国 Santa Cruz 公司; 波形蛋白 (Vimentin)、C-myc 和细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1) 抗体购于美国 Cell signaling 公司; 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 和骨钙素 (osteocalcin, OCN) 抗体均购于武汉博士德生物工程有限公司; Q-PCR 引物合成由上海生工生物工程股份有限公司提供。

**1.1.2 实验器材** MK3 型酶标仪由荷兰雷勃公司生产; SW-CJ-4F 型超净工作台由江苏苏净集团苏州安泰空气技术有限公司生产; Bio-Rad 电泳仪购于美国伯乐公司; PCR 扩增仪购于德国 Eppendorf 公司; COULTZER EPICS XL-MCL 流式细胞仪购于美国 Beckman Counter 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 hPDLFs 的原代培养** 选取临床中 9~18 (16 $\pm$ 1.8) 岁的健康人和牙周炎患者, 拔出其恒牙。

2017-01-02 接收

基金项目: 安徽省科技计划项目 (编号: 12070403062)

作者单位: 中国人民解放军第 105 医院<sup>1</sup> 口腔科、<sup>2</sup> 检验科, 合肥 230031

<sup>3</sup> 安徽医科大学口腔医学院, 安徽医科大学附属口腔医院, 安徽省口腔疾病研究中心实验室, 合肥 230032

<sup>4</sup> 安徽医科大学第四附属医院口腔科, 合肥 230022

作者简介: 朱庆勇, 男, 主治医师, 学士;

蒋勇, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: j6263@163.com

在超净工作台中的无菌条件下,轻轻刮取牙根部位 1/3 的牙周膜组织,用生理盐水清洗 2 次,将分离下的组织剪成小组织块(大小约 1 mm<sup>3</sup>)。将剪下的组织块贴种于培养瓶底板上,加入含 20% 血清培养基,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养瓶倒置培养 6 ~ 8 h 后,摆正培养瓶继续培养。选取第 3 ~ 8 代细胞进行实验。取于健康人的 hPDLFs 为健康组,取于牙周炎患者的 hPDLFs 为牙周炎组。

**1.2.2 将 Kv1.3-siRNA 转染到 hPDLFs** 在第 3 ~ 8 代对数期取 hPDLFs 细胞,胰酶消化后用培养基(含 20% 胎牛血清)在培养瓶中继续培养,注意调整细胞浓度为(1.0 ~ 2.0) × 10<sup>5</sup>/ml;24 h 后弃去培养基并进行转染,转染步骤为用 500 μl Opti-MEM 分别稀释 8 μl Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 与 16 μl 的 siRNA,室温下孵育 5 min 后混合,再静置 20 min 后加入培养瓶中,补充 Opti-MEM 至 4 ml,常规培养 6 h,换用培养基(含 20% 胎牛血清)继续培养 48 h,再用于实验。Kv1.3-siRNA 的序列为:5'-CCAUGACAACU-GUUGGUUATT-3'; 5'-UAACCAACAGUUGUCAUGGTT-3'。

**1.2.3 细胞增殖试验** 取 hPDLFs 细胞(处于对数生长期)制成单细胞悬液,接种于 96 孔板,控制其密度为 1 × 10<sup>4</sup>/ml,每孔加入约 100 μl 悬液,在 37 ℃ 环境中过夜。当细胞完全贴壁时,用 Kv1.3-siRNA 处理细胞 48 h,然后每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl,37 ℃ 环境中孵育 4 h 后,弃去上清液。通过每孔加入 150 μl DMSO 来溶解细胞内结晶后,室温下振荡溶解约 10 min,用紫外分光光度计在 492 nm 波长处测其吸光度(A)值。细胞存活率(%) = Kv1.3-siRNA 组/对照组 × 100%。

**1.2.4 流式细胞术检测细胞周期** 将对数期的 hPDLFs 细胞接种在培养瓶中并用 Kv1.3-siRNA 处理 48 h。用 PBS 清洗收集的细胞 3 次,用 70% 冷乙醇固定一夜。再次用 PBS 洗涤收集的细胞 1 次。用 PI 染液在室温下 DNA 染色 30 min,使用流式细胞仪进行检测。

**1.2.5 Q-PCR 检测 Kv1.3 mRNA 的表达** 用 TRIzol 溶液从 hPDLFs 提取总 RNA 并逆转录得到 cDNA。按照 TransStart Tip Green qPCR Super Mix 说明书指示将 Kv1.3 引物与 SYBR Green 混合,通过 Q-PCR 检测 Kv1.3 的 mRNA 的表达。Kv1.3 引物序列为:5'-GTACTTTCGACCCGCTCCGCAATGA-3',5'-GGGCAAGCAAAGAATCGCACCCAG-3'; β-actin 引物序列为:5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3';5'-CT-

TCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'。

**1.2.6 Western blot 法检测 Kv1.3、CyclinD1、C-myc、ALP 和 OCN 的蛋白表达** 向处理后的 hPDLFs 细胞加入 400 μl 的 RIPA 细胞裂解液(含 PMSF),置于冰上,自然裂解 30 min 后;置于离心机离心 30 min(4 ℃、12 000 r/min);取上清液,向其中加入 SDS 上样缓冲液后在 99.9 ℃ 环境下变性 10 min。用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离样品,电泳结束后通过电转将蛋白转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶在室温下孵育 3 h 后,用 TBST 洗膜 3 次,每次 15 min;一抗(Kv1.3(1 : 500)、CyclinD1(1 : 1 000)、C-myc(1 : 1 000)、ALP(1 : 200)和 OCN(1 : 200)孵育过夜后,再用 TBST 洗膜 4 次,每次 10 min,室温下二抗(浓度均为 1 : 10 000)再孵育 1 h。最后用 ECL 发光试剂盒于暗室中显影。

**1.2.7 细胞免疫荧光** 将 hPDLFs 细胞(对数期)种于 6 孔板中,接种后 24 h,用冷丙酮固定取出的盖玻片并用 10% FBS 封闭 10 min 后,用 PBS 清洗 3 次。滴加抗体混合液(Vimentin 和 Kv1.3)孵育过夜后,再用 PBS 洗 3 次。滴加荧光标记二抗后,PBS 洗 3 次。滴加 DAPI 后,PBS 洗 1 次。最后置于荧光显微镜下观察并拍照。

**1.3 统计学处理** 实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理,所有数据结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 One-Way ANOVA 检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ ,所有检验均为双侧检验。

## 2 结果

**2.1 Kv1.3 在牙周炎 hPDLFs 中低表达** 通过体外培养法,分离 hPDLFs,并使用细胞免疫荧光染色,结果显示细胞均呈长梭形,并且抗波形丝蛋白显示为阳性,表明为 hPDLFs,见图 1A;并且牙周炎 hPDLFs 中 Kv1.3 的荧光强度明显降低;由图 1B 和 1C 得出 Western blot 和 Q-PCR 结果显示,牙周炎 hPDLFs 中 Kv1.3 表达显著降低( $F = 55.63、51.10, P < 0.01$ )。

**2.2 Kv1.3-siRNA 沉默 Kv1.3 表达后抑制 hPDLFs 增殖** 取健康组 hPDLFs 细胞,使用 Kv1.3-siRNA 沉默 Kv1.3 表达后,Q-PCR 和 Western blot 结果显示,Kv1.3 mRNA 和蛋白表达明显降低( $F = 58.20、48.89, P < 0.01$ )。由图 2 所示,Kv1.3-siRNA 能够显著降低 CyclinD1 和 C-myc 蛋白表达( $F = 39.20、48.89, P < 0.01$ );流式细胞仪检测结果显示,对照组 G2/M 期为(10.31 ± 0.98),Kv1.3-siRNA

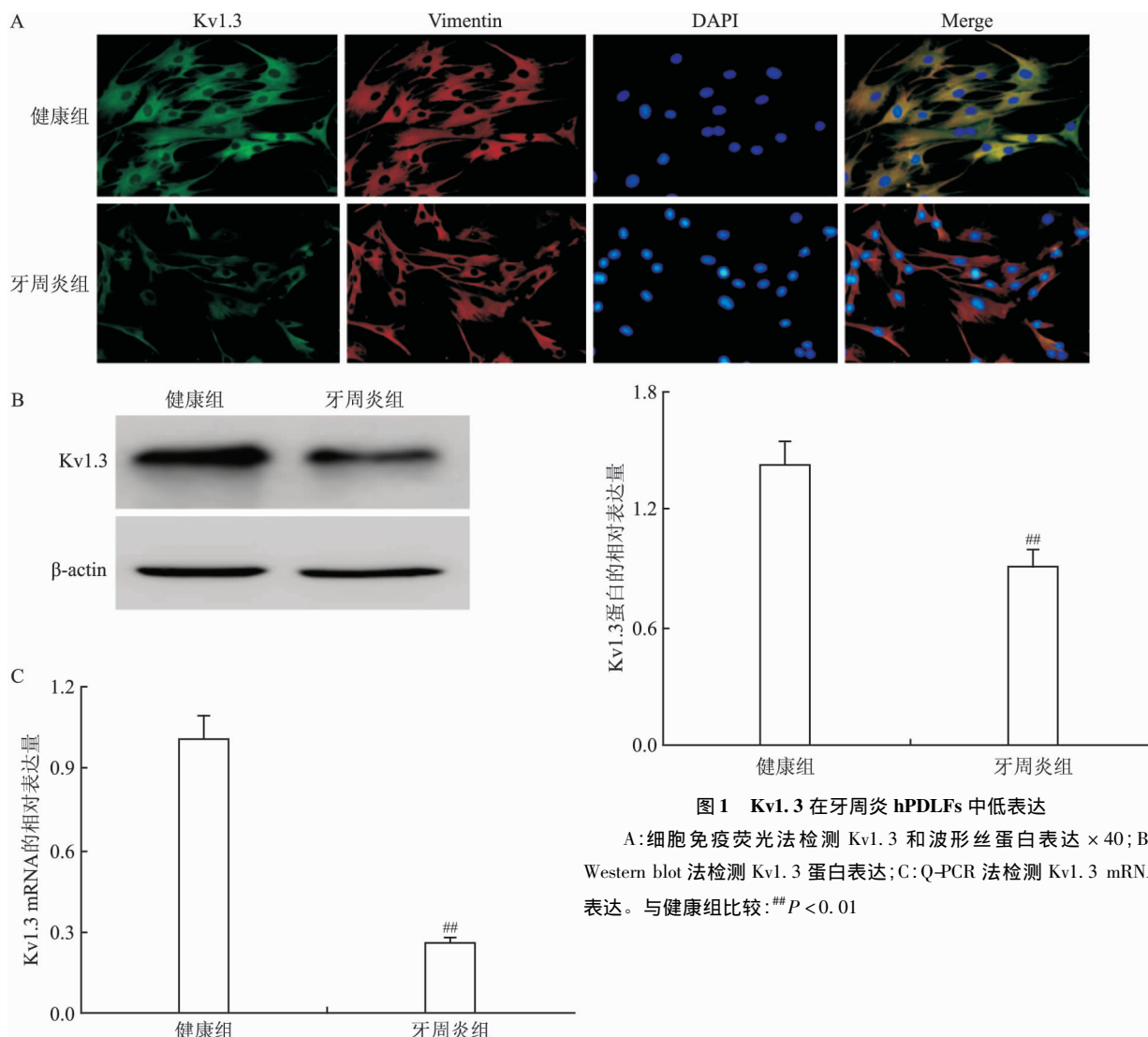


图1 Kv1.3在牙周炎hPDLFs中低表达

A:细胞免疫荧光法检测Kv1.3和波形丝蛋白表达 $\times 40$ ; B: Western blot法检测Kv1.3蛋白表达; C: Q-PCR法检测Kv1.3 mRNA表达。与健康组比较:## $P < 0.01$

组显著降低G2/M期为 $(5.32 \pm 0.52)$  ( $F = 53.12$ ,  $P < 0.05$ );同时,MTT结果表明,与对照组存活率100%比较,Kv1.3-siRNA组细胞存活率为 $(71.83 \pm 1.23)\%$  ( $F = 26.74$ ,  $P < 0.05$ ),表明抑制Kv1.3表达能够抑制hPDLFs细胞的增殖。

**2.3 Kv1.3-siRNA沉默Kv1.3表达后抑制hPDLFs分化成骨** Western blot结果表明,在对照组hPDLFs细胞中使用Kv1.3-siRNA沉默Kv1.3表达后,hPDLFs分化成骨的指标蛋白ALP和OCN表达明显降低( $F = 53.12, 44.91$ ,  $P < 0.01$ )表明抑制Kv1.3表达能够抑制hPDLFs细胞分化成骨。见图3。

### 3 讨论

牙周炎是常见的牙周组织感染并引起牙周组织损伤甚至坏死的疾病。hPDLFs作为牙周膜组织中的主要细胞,不仅可以增殖改善牙周组织环境,还可

向骨细胞、软骨细胞分化,具有成纤维样细胞和成骨细胞的双重特征<sup>[7]</sup>,显著改善牙周炎等疾病。

Kv1.3通道是钾离子通道家族中钾离子选择性通道,在动脉粥样硬化、胰腺癌、乳腺癌等疾病中异常表达,已经成为治疗疾病的重要靶点。本研究显示,Kv1.3在牙周炎hPDLFs细胞中低表达。同时使用siRNA沉默Kv1.3表达后能够显著抑制细胞周期蛋白CyclinD1和癌基因c-myc表达。CyclinD1和c-myc表达能够反映细胞增殖情况<sup>[8]</sup>,其表达随着细胞增殖增加而增加。为了进一步观察Kv1.3对hPDLFs细胞增殖的作用,本课题使用PI单标流式细胞仪检测,结果显示与阴性对照组比较,Kv1.3-siRNA能够显著抑制hPDLFs细胞G2/M,同时MTT也证实了这一结果。表明抑制Kv1.3表达能够明显抑制hPDLFs细胞增殖。牙周病发生后,hPDLFs的增殖受到抑制,降低牙周组织损伤的修复能力,而

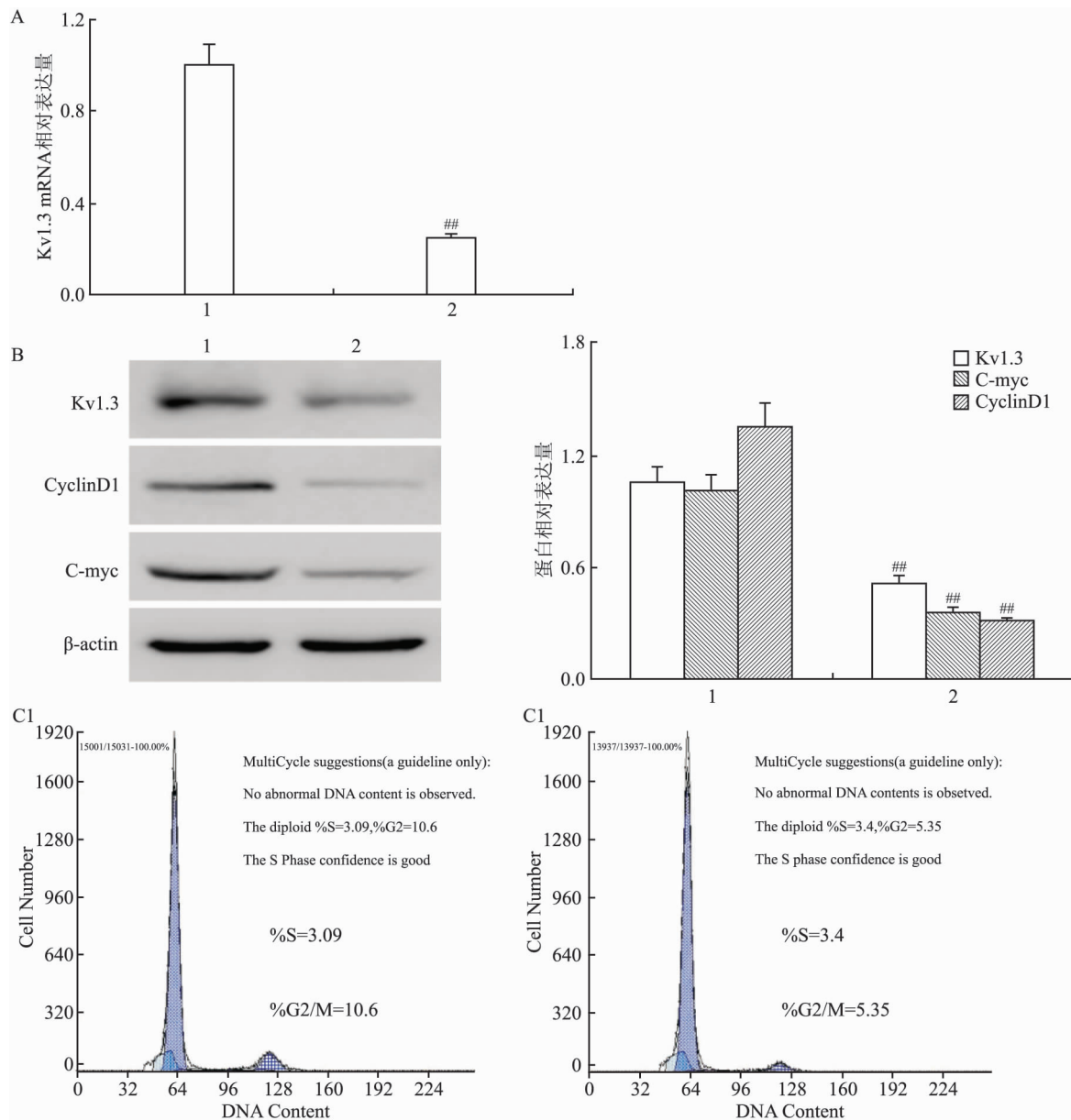


图2 Kv1.3-siRNA 沉默 Kv1.3 表达后抑制 hPDLFs 增殖

A: Q-PCR 法检测 Kv1.3 mRNA 表达; B: Western blot 法检测 Kv1.3、CyclinD1 和 C-myc 蛋白表达; C: 流式细胞术检测 hPDLFs 细胞周期; 1: 对照组; 2: Kv1.3-siRNA 组; 与对照组比较: ###  $P < 0.01$

本研究显示增加 Kv1.3 表达能够诱导 hPDLFs 增殖, 从而增加其修复能力。李卫红等<sup>[1]</sup>研究发现, 尼古丁能够抑制 hPDLFs 细胞增殖能力, 本研究显示增加 Kv1.3 表达有可能增加 hPDLFs 细胞增殖, 改善吸烟造成的牙周疾病。

研究<sup>[9]</sup>表明, 牙周病的骨丢失主要是细胞成骨因子的下调, 而不是炎性因子的分泌增加。如何使牙周细胞的增殖和分化成骨能力提高将显著改善或修复损伤的牙周组织一直是研究的热点。hPDLFs 细胞增殖数量到一定程度时会分化成骨改善牙骨质。ALP 和 OCN 分别作为细胞分化为早期成骨细

胞和成熟成骨细胞的标志, 能够通过钙等矿物质形成矿化相关蛋白, 组建并分化成骨<sup>[10]</sup>。ALP 能够随着细胞分化成骨细胞数目的增加而增加, 是骨形成所必需的关键酶; 随着分化成骨的增加, 细胞逐渐钙化, OCN 是骨质钙化的必要成分。本研究中 Western blot 结果显示, 抑制 Kv1.3 表达能够明显降低 ALP 和 OCN 表达, 表明抑制 Kv1.3 表达能够显著降低 hPDLFs 细胞分化成骨能力。Kv1.3 作为钾离子膜通道, 能够通过调控细胞膜内外钾离子浓度来改变细胞的生理功能, 笔者认为 Kv1.3 可能是通过调控钾离子浓度从而影响 hPDLFs 细胞的增殖和

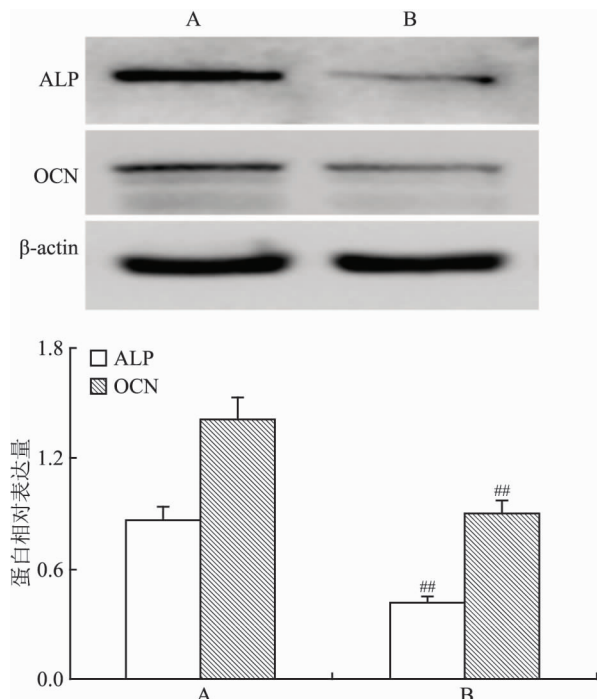


图3 Kv1.3-siRNA 沉默 Kv1.3 表达后抑制 hPDLFs 分化成骨  
A:对照组;B:Kv1.3-siRNA 组;与对照组比较:## $P < 0.01$

分化能力。

综上所述,本研究结果首次证明 Kv1.3 在 hPDLFs 细胞中具有重要作用,抑制 Kv1.3 表达能够抑制 hPDLFs 细胞增殖和分化能力,可能与细胞内钾离子浓度有关,但具体机制尚需进一步研究。

## Inhibition expression of Kv1.3 could reduce human periodontal ligament fibroblasts proliferation and osteogenic differentiation capacity

Zhu Qinyong<sup>1</sup>, Chen Wenjun<sup>1</sup>, Zhu Hui<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Stomatology, <sup>2</sup>Dept of Clinical Laboratory, The 105th Hospital of PLA, Hefei 230031)

**Abstract Objective** To investigate the value of Kv1.3 on proliferation and osteogenic differentiation capacity in human periodontal ligament fibroblasts (hPDLFs). **Methods** hPDLFs were isolated and cultured *in vitro* from normal and periodontitis, the differential expression of Kv1.3 was evaluated by immunofluorescence, Q-PCR and Western blot. With siRNA silencing Kv1.3 expression, the proliferation and osteogenic differentiation was evaluated in hPDLFs by flow cytometry and MTT. **Results** Compared with normal controls, Kv1.3 expression was significantly lower in periodontitis hPDLFs by immunofluorescence assay. Western blot results showed that Kv1.3-siRNA could inhibit CyclinD1 and C-myc protein expression ( $P < 0.05$ ); Flow cytometry results showed that Kv1.3-siRNA could significantly inhibit cell G2/M phase; Western blot results showed that Kv1.3-siRNA decreased expression of ALP and OCN. **Conclusion** The expression of Kv1.3 silencing can inhibit the proliferation and differentiation of osteogenic in hPDLFs significantly.

**Key words** Kv1.3; human periodontal ligament fibroblasts; proliferation; differentiation

## 参考文献

- [1] 李卫红, 刘晓勇, 葛丽华, 等. 尼古丁对人牙周膜成纤维细胞增殖能力的影响[J]. 口腔医学研究, 2009, 25(1): 41-3.
- [2] Wang J, Qiang Z, Song S, et al. Temporal expression of Pelp1 during proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e75477.
- [3] 薛敏, 于江波, 张月, 等. TGF- $\beta$ 1 在应力介导的牙周膜成纤维细胞增殖中的作用及其机制[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(7): 1240-3.
- [4] Toldi G, Munoz L, Herrmann M, et al. The effects of Kv1.3 and IKCa1 channel inhibition on cytokine production and calcium influx of T lymphocytes in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis[J]. Immunol Res, 2016, 64(2): 627-31.
- [5] 屈碧辉, 蔡威, 何涛, 等. T淋巴细胞 Kv1.3 通道的抑制表达对于血管老化的影响[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(10): 1586-9.
- [6] 周群, 吴宝明, 孟晓明, 等. Kv1.3 在 LPS 诱导的小鼠急性肝损伤模型中表达变化[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(5): 649-55.
- [7] 王燕, 丁寅, 李永明, 等. 人外周血单个核细胞对人牙周膜成纤维细胞增殖和分化的影响[J]. 临床口腔医学杂志, 2005, 21(10): 610-2.
- [8] Woods N, Trevino J, Coppola D, et al. Fendiline inhibits proliferation and invasion of pancreatic cancer cells by interfering with ADAM10 activation and  $\beta$ -catenin signaling[J]. Oncotarget, 2015, 6(34): 35931-48.
- [9] Nokhbehsaim M, Deschner B, Winter J, et al. Contribution of orthodontic load to inflammation-mediated periodontal destruction[J]. J Orofac Orthop, 2010, 71(6): 390-402.
- [10] Liu H, Hao W, Wang X, et al. miR-23b targets Smad3 and ameliorates the LPS-inhibited osteogenic differentiation in preosteoblast MC3T3-E1 cells[J]. J Toxicol Sci, 2016, 41(2): 185-93.