

网络出版时间: 2016-6-6 13:52:32 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160606.1352.020.html

低氧对人牙周膜干细胞骨向分化的影响

刘衍钊, 孙世林, 顾 旷, 刘 雨, 邹多宏, 王元银

摘要 目的 探讨低氧对人牙周膜干细胞(PDLSCs)骨向分化的影响。方法 采用组织块法体外分离培养 PDLSCs, 分别在常氧和低氧条件下培养 PDLSCs, 低氧组在 2% O₂ 浓度下培养 6、12、24、48 h 后检测其碱性磷酸酶(ALP)活性, 并通过荧光定量 PCR 检测低氧培养的 PDLSCs 中骨钙素(OCN)、低氧诱导因子 1 α (Hif-1 α)、碱性磷酸酶(ALP)以及成骨相关基因核心结合因子(Runx-2)等基因的表达变化; 通过 Western blot 法检测低氧培养的 PDLSCs 中 Runx-2、Hif-1 α 等蛋白的表达变化。结果 低氧组的 PDLSCs 的 ALP 水平高于常氧组, 但低氧 48 h 开始抑制 ALP 水平, 荧光定量 PCR 和 Western blot 结果显示低氧培养 48 h 内的 PDLSCs 的成骨能力高于常氧组, 但低氧培养 48 h 则抑制其成骨能力。结论 48 h 内低氧可显著增强 PDLSCs 骨向分化作用, 48 h 则开始抑制其成骨能力。

关键词 牙周膜干细胞; 低氧; 骨向分化

中图分类号 R 329.24; R 781.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)07-0965-05

牙周膜是一种有高度韧性的结缔组织, 有丰富的血管网, 为周围的细胞提供了丰富的氧气^[1]。对于牙周病患者, 由于慢性炎症其牙周的血管受损, 使得牙周细胞处于低氧状态^[2]。在进行牙齿正畸牵引时, 作用于牙齿的机械应力会通过牙周膜传递到牙槽骨上, 机械应力会引起牙周膜压力区循环障碍和低氧, 导致牙周膜细胞处于低氧环境中^[3]。低氧是肿瘤微环境、缺血性疾病、以及组织损伤的一个重要组成部分^[4-6]。当机体处于贫血、外伤、组织坏死等情况下, 组织或细胞通常会处于低氧状态。低氧导致一系列转录诱导因子的表达, 其中, 低氧诱导因

子-1 α (hypoxia inducible factor, Hif-1 α)对血管的形成及细胞的生长起决定性作用^[7]。近年来研究^[8]显示, Hif-1 α 除了可以诱导血管生成外, 对骨形成也有一定的作用。牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSCs)是牙周组织中的成体干细胞, 有高度增殖、自我更新能力和多分化潜能, 在一定的条件下可以诱导其骨向及血管向的分化^[9]。PDLSCs的生理病理活动是在低氧状态下进行的, 牙周膜是位于牙槽骨和牙骨质之间高度血管化的组织, 长期处于咬合及咀嚼作用导致的机械负荷下; 患有牙周炎以及进行正畸的患者, 由于炎症以及过度的机械力使得牙周组织严重受损, 这都导致了 PDLSCs 处于一种低氧的微环境中^[10]。该研究通过探讨低氧对于 PDLSCs 的成骨能力的影响, 以期对于牙周炎患者牙周组织进行有效的修复。

1 材料与方法

1.1 材料 DMEM 培养液、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司); 胎牛血清(美国 HyClone 公司); 青霉素 100 U/ml、链霉素 100 mg/L、二甲基亚砜(美国 Sigma 公司); 低氧培养箱(德国 MEMMERT 公司); 高速冷冻离心机(美国 Centrifuge 公司); 超微量分光光度计(美国 NanoDrop 公司); 超净工作台(中国苏州净化公司)。

1.2 PDLSCs 的分离和培养 选择 11~18 岁因正畸需要减数拔除的前磨牙, 收集前获得患者及其监护人的知情同意。取材后, 在超净工作台内, 将牙齿牙冠向下用 PBS 冲洗牙齿 30 s, 然后将牙冠部分浸入 75% 酒精内消毒约 2 min, 再用 PBS 冲洗 30 s, 无菌条件下用锐利手术刀片刮取牙根中部 1/3 的牙周膜组织; 在 DMEM 培养液浸润下, 剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的碎块, 均匀铺于 6 孔板底部, 用盖玻片压紧, 加入 2 ml 含 20% FBS、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 的链霉素的 DMEM 培养液。置于 37℃、饱和湿度条件下培养, 每 3 d 换液, 约 7~15 d 当细胞从组织块周围游出并达 70%~80% 融合时, 用 0.25% 胰酶消化传代, 首次传代比例为 1:1。

1.3 低氧培养 PDLSCs 将状态良好的 P2~P3 代

2016-03-04 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81271162); 安徽省科技攻关计划项目(编号: 1401045013)

作者单位: 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

作者简介: 刘衍钊, 男, 硕士研究生;

王元银, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wyy1970548@sohu.com;

邹多宏, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zouduhongy@163.com

PDLSCs 以 5×10^4 个/ml 的密度接种于 6 孔板中,在常氧培养箱(含 20% O_2 、5% CO_2 和 75% N_2) 中培养 3 d,然后将细胞分为两组,低氧组(2%) 和常氧组(20%),低氧组和常氧组分别设置 6、12、24、48 h 4 个时间点,低氧组的细胞置于含 2% O_2 、5% CO_2 和 93% N_2 的低氧培养箱中培养。

1.4 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP) 活性

将 PDLSCs 以 5×10^4 个/ml 的密度接种于含 20% FBS、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 的链霉素的 DMEM 培养基的 6 孔板中,培养 6、12、24、48 h 收集细胞通过 ALP 检测试剂盒检测细胞的 ALP 活性。实验重复 3 次。

1.5 RNA 提取及荧光定量 PCR 使用 TRIzol Reagent 提取不同时间点细胞的总 RNA,通过 Prime-ScriptTM RT 试剂盒进行逆转录。使用 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)进行 PCR 的扩增,总反应体系 20 μ l。所涉及的引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	长度(bp)
OCN	F: ATGAGAGCCCTCACACTCCT	117
	R: CTTGGACACAAGGCTGCAC	
Runx-2	F: CGCCTCACAAACAACCACAG	146
	R: ACTGCTTGACGCCTTAAATGAC	
Hif-1 α	F: TTACGTTCTTCGATCAGTTGTA	105
	R: GAGGAGGTTCTTGCAATTGGAGTC	
β -actin	F: TGGCACCCAGCACAATGAA	186
	R: CTAAGTCAGAGTCCGCCTAGAAGCA	
ALP	F: GGACCATTCCCACGTCTTCAC	192
	R: CCTGTAGCCAGGCCCATTTG	

1.6 总蛋白提取及 Western blot 法检测 在不同的时间点用 RAPA 蛋白裂解液裂解细胞,冰上放置 30 min,4 $^{\circ}C$ 、8 000 r/min 离心 10 min,取上清液。使用 BCA 蛋白试剂盒(中国碧云天公司)检测蛋白浓度。按 4 : 1 的比例向样本中加入蛋白上样缓冲液,100 $^{\circ}C$ 煮 10 min。SDS-PAGE 电泳分离蛋白,然后将蛋白质电转至 PVDF 膜上,0.5 g/L 脱脂牛奶(中国光明公司)封闭膜上的非特异性位点。孵育一抗,二抗,用化学发光法 ECL Western blot 试剂盒(英国 Amersham Biosciences 公司)检测抗原抗体复合物。GAPDH 作为内参对照。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析,两组数据间的比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 原代 PDLSCs 培养 7 ~ 15 d 时镜下可见从组

织块周围爬出的长梭形 PDLSCs(图 1)。待原代细胞融合至孔底的 80% 时,按 1 : 1 传代。

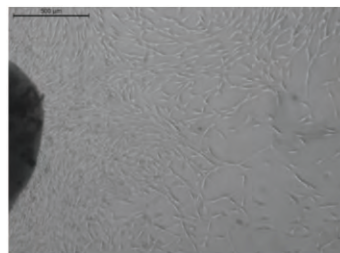


图 1 原代 PDLSCs $\times 40$

2.2 低氧对于 PDLSCs ALP 活性的影响 与常氧组比较,低氧组 PDLSCs 的 ALP 活性逐渐增加,但低氧培养 48 h 的 PDLSCs 的 ALP 活性则显著下降,与常氧组差异无统计学意义。其中低氧 12 h ($t = 4.79, P < 0.05$)、24 h ($t = 4.70, P < 0.05$) 差异有统计学意义,6、48 h 差异无统计学意义(图 2)。

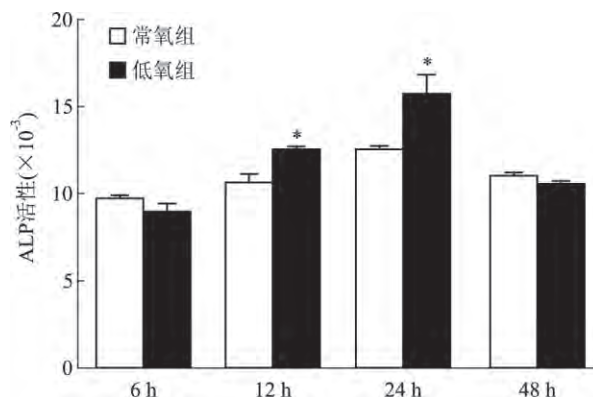


图 2 低氧对于 PDLSCs ALP 活性的影响

与常氧组比较: * $P < 0.05$

2.3 低氧对于 PDLSCs 成骨基因表达的影响 与常氧组比较,低氧组 PDLSCs 的成骨相关基因核心结合因子(runt-related transcription factor 2, Runx-2)均高表达,其中低氧 12、24、48 h 差异有统计学意义($t = 5.73885、14.00861、4.98224, P < 0.05$),6 h 差异无统计学意义。骨钙素(osteocalcin, OCN)和 ALP 表达 24 h 差异有统计学意义($t = 4.07125、8.41482, P < 0.05$),6、12、48 h 差异无统计学意义。低氧组 Hif-1 α 表达高于常氧组,但 48 h 低氧组 Hif-1 α 则无表达,其中低氧 12 h 差异有统计学意义($t = 6.22065, P < 0.05$),低氧 6、24 h 差异无统计学意义(图 3)。

2.4 低氧对于 PDLSCs 成骨蛋白表达的影响 与常氧组比较,低氧组 6、12、24、48 h Runx-2 和 Hif-1 α 的表达均明显高于常氧组(图 4)。

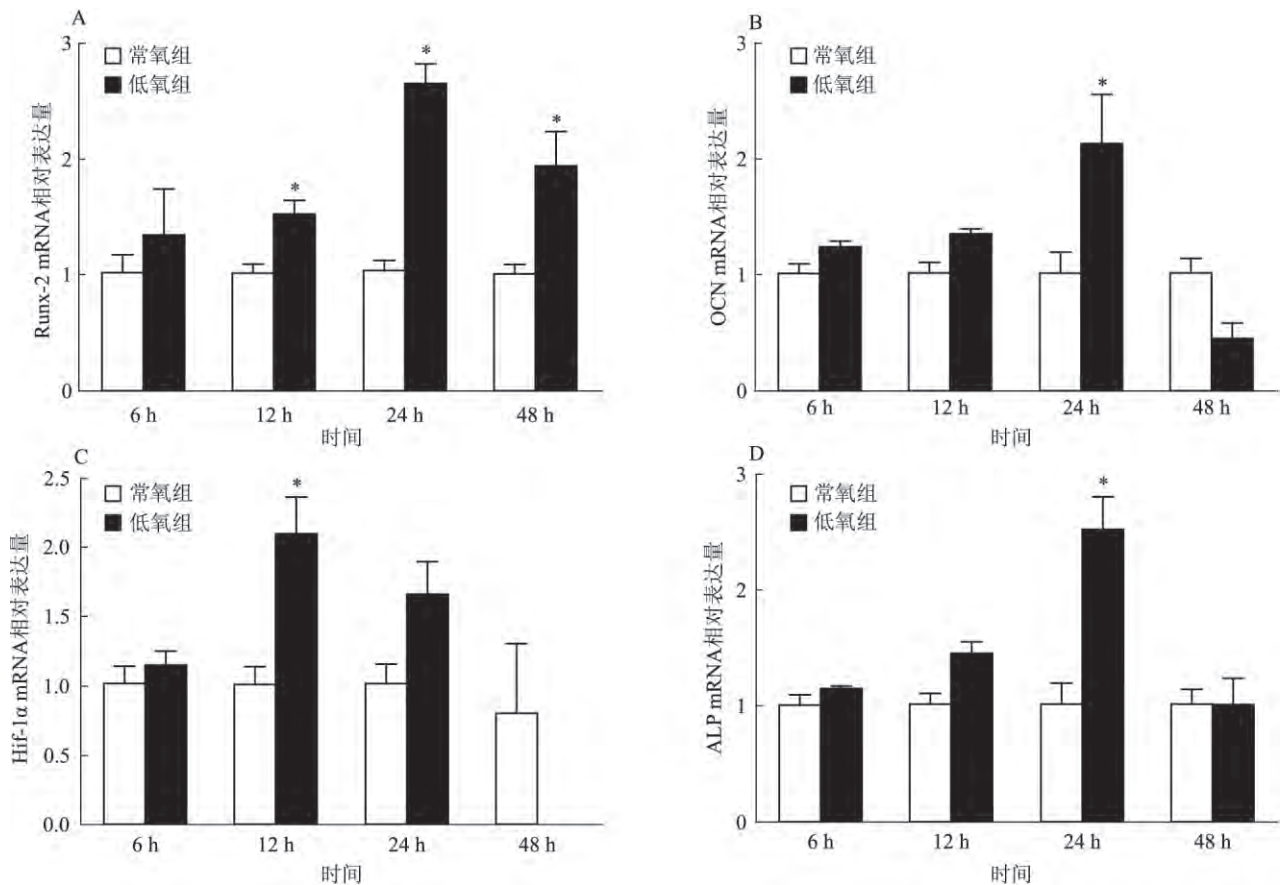


图3 低氧对于 PDLSCs 骨向基因 Runx-2、OCN、Hif-1α、ALP 表达的影响

A: Runx-2 mRNA; B: OCN mRNA; C: Hif-1α mRNA; D: ALP mRNA; 与常氧组比较: * P < 0.05

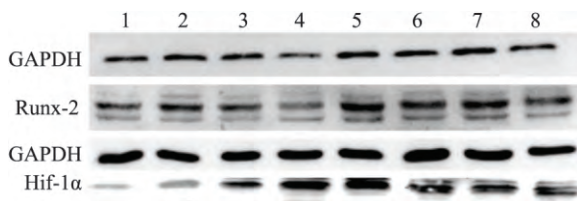


图4 低氧对于 PDLSCs 成骨蛋白表达的影响

1~4: 常氧培养 6、12、24、48 h; 5~8: 低氧培养 6、12、24、48 h

3 讨论

氧气对于几乎所有的生命都是不可缺少的,其能维持细胞的代谢和功能,当机体生命活动所需的氧不能得到充足的供给时,组织细胞就会处于一种缺氧代谢的过程中。由于向组织中供应的氧气不足,会引起一些生理及病理性的变化,并且还会导致胚胎和成体干细胞的生理特性的改变。在牙周组织中,低氧是引起牙周炎的重要因素之一。正常牙周组织中的氧含量为 2.9% ~ 5.7%,但当牙周组织发生病变时,牙周组织的血流量减少,造成供氧不足,

引起牙周组织炎症,从而导致牙周细胞处于局部性的低氧环境中^[11-13]。

PDLSCs 作为牙周来源的间充质干细胞,有高度增殖、自我更新、多向分化的潜能,并且能够形成牙骨质及牙周组织,可作为牙周组织再生的重要种子细胞。Runx-2 作为成骨细胞的特异性转录因子,调控并诱导成骨细胞分化和骨的形成。OCN 由成骨细胞合成和分泌,由于 OCN 主要在矿化形成期出现,所以还被认为是成骨细胞向矿化期分化的标记之一。本实验利用荧光定量 PCR 技术与 Western blot 检测 Runx-2、OCN、Hif-1α、ALP 4 种成骨指标,结果显示,无论从基因水平还是蛋白水平,48 h 内低氧促进 PDLSCs 的骨向分化能力。通过在低氧环境下诱导干细胞的成骨分化,对牙周组织及骨组织的缺失来进行有效的修复。

到目前为止,低氧对于 PDLSCs 骨向分化影响的机制没有被完全明确,以往骨髓间充质干细胞由于其易于取得并且有良好的成骨能力受到广泛关注^[14]。一些生理微环境,例如机械应力、低氧等在

骨再生中发挥着重要作用,尤其是低氧被认为是调控成骨分化的关键。PDLSCs 作为牙周组织来源的间充质干细胞,其 STRO-1/CD146 的表达和骨髓间充质干细胞类似,在体内可以形成牙骨质及牙周膜,使得 PDLSCs 成为一种独特的干细胞^[5]。最近的研究^[6]表明,低氧环境可以上调转录因子 Runx-2 的表达,激活多种细胞外信号通路,如 MEK/ERK 和 p38 MAPK 通路,继而启动成骨相关特异性基因的转录及上调其表达促进矿化结节的形成以及 ALP 活性的升高,诱导其骨向分化。MAPK 信号通路被认为是骨向分化以及成骨相关基因表达的关键,MAPK 信号通路能够磷酸化 Runx-2,继而启动成骨特异基因的转录。ERK 在细胞外基质诱导成骨中也发挥着重要作用。目前对于低氧的研究越来越多,但由于试验中对于氧气浓度的选择,干细胞来源以及种类的不同,使得研究结果并不一致,对于低氧的研究仍然具有争议,因此需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Wu Y, Yang Y, Yang P, et al. The osteogenic differentiation of PDLSCs is mediated through MEK/ERK and p38 MAPK signaling under hypoxia [J]. *Arch Oral Biol*, 2013, 58(10): 1357 – 68.
- [2] Pradeep A R, Prapulla D V, Sharma A, et al. Gingival crevicular fluid and serum vascular endothelial growth factor: their relationship in periodontal health, disease and after treatment [J]. *Cytokine*, 2011, 54(2): 200 – 4.
- [3] Ku S J, Chang Y I, Chae C H, et al. Static tensional forces increase osteogenic gene expression in three-dimensional periodontal ligament cell culture [J]. *BMB Rep*, 2009, 42(7): 427 – 32.
- [4] Paris S, Denis H, Delaive E, et al. Up-regulation of 94-kDa glucose-regulated protein by hypoxia-inducible factor-1 in human endothelial cells in response to hypoxia [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(1): 105 – 14.
- [5] Sluimer J C, Gasc J M, van Wanroij J L, et al. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51(13): 1258 – 65.
- [6] Salim A, Nacamuli R P, Morgan E F, et al. Transient changes in oxygen tension inhibit osteogenic differentiation and Runx-2 expression in osteoblasts [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(38): 40007 – 16.
- [7] Patella F, Rainaldi G. MicroRNAs mediate metabolic stresses and angiogenesis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(7): 1049 – 65.
- [8] Li L, Han M X, Li S, et al. Hypoxia regulates the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells under cyclic tensile stress via mitogen-activated protein kinase pathways [J]. *J Periodontol*, 2014, 85(3): 498 – 508.
- [9] Seo B M, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament [J]. *Lancet*, 2004, 364(9429): 149 – 55.
- [10] Wu Y, Cao H, Yang Y, et al. Effects of vascular endothelial cells on osteogenic differentiation of noncontact co-cultured periodontal ligament stem cells under hypoxia. [J]. *J Periodontal Res*, 2013, 48(1): 52 – 65.
- [11] Lou Y L, Guo F, Liu F, et al. miR-210 activates notch signaling pathway in angiogenesis induced by cerebral ischemia [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 370(1–2): 45 – 51.
- [12] Chae H S, Park H J, Hwang H R, et al. The effect of antioxidants on the production of pro-inflammatory cytokines and orthodontic tooth movement [J]. *Mol Cells*, 2011, 32(2): 189 – 96.
- [13] Hanioka T, Tanaka M, Takaya K, et al. Association of oxygen tension in human periodontal pockets with gingival inflammation [J]. *J Periodontol*, 2000, 71(4): 550 – 4.
- [14] Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(2): 150 – 61.
- [15] Huang G T, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine [J]. *J Dent Res*, 2009, 88(9): 792 – 806.
- [16] Lee S H, Lee Y J, Song C H, et al. Role of FAK phosphorylation in hypoxia-induced hMSCS migration: involvement of VEGF as well as MAPKS and eNOS pathways [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 298(4): C847 – 56.

Effects of hypoxia on the osteogenic differentiation of PDLSCs

Liu Yanzhao, Sun Shilin, Gu Kuang, et al

(*Stomatology College of Anhui Medical University, Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Key Laboratory of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032*)

Abstract Objective To investigate the effects of the hypoxia on the osteogenic differentiation of the human periodontal ligament stem cells (PDLSCs). **Methods** The PDLSCs were cultured under hypoxia and normal condition. Cells in the hypoxia group were incubated in 2% O₂ for 6, 12, 24, 48 h, and then ALP activity analysis was used to analyze the relative ALP activity. The expressions of OCN, Hif-1 α , ALP, Runx-2 mRNA were detected by QPCR,

网络出版时间: 2016-6-6 13:52:32 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160606.1352.022.html

硼替佐米对小鼠骨髓移植后 Th1/Th2/Th17 细胞亚群分化的影响

王永庆, 李庆生, 吴 炜, 夏雷鸣

摘要 目的 观察硼替佐米对小鼠急性移植物抗宿主病(aGVHD)后辅助性T细胞(Th)1/Th2/Th17细胞亚群分化及其主要的效应性细胞因子 γ -干扰素(IFN- γ)、白细胞介素(IL)-4、IL-17A表达的影响。方法 建立小鼠aGVHD动物模型,将小鼠随机分3组:正常对照组、移植对照组、移植+硼替佐米组。观察各组小鼠的生存时间、aGVHD表现和嵌合度,流式细胞术检测第7天外周血Th1/Th2/Th17细胞亚群的表达,ELISA法检测血清中IFN- γ 、IL-4、IL-17A水平。结果 移植对照组小鼠出现典型的aGVHD症状,2周内死于aGVHD,平均存活时间为11 d,移植+硼替佐米组小鼠aGVHD症状明显减轻,平均生存时间较移植对照组显著延长,60 d时生存率为60%。移植对照组小鼠Th1/Th17细胞亚群明显升高($P < 0.01$),Th2细胞亚群比例降低($P < 0.01$)。输注硼替佐米后Th1/Th17细胞亚群比例降低,但仍高于正常对照($P < 0.05$),Th2细胞亚群比例上升,与正常对照差异无统计学意义。移植对照组小鼠血清IFN- γ 和IL-17A水平明显升高($P < 0.01$),IL-4水平显著降低($P < 0.01$)。输注硼替佐米后IFN- γ 和IL-17A水平降低,但仍高于正常对照($P < 0.05$),IL-4水平上升,低于正常对照($P < 0.05$)。结论 移植后早期输注硼替佐米可通过下调Th1/Th17细胞分化比例及IFN- γ 和IL-17A的表达来减轻小鼠异基因移植后的aGVHD,提高生存率。

关键词 硼替佐米; 小鼠; 急性移植物抗宿主病; Th1细胞; Th2细胞; Th17细胞

中图分类号 R 457.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)07-0969-05

2016-03-25 接收

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金项目(编号: KJ2011Z165)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院血液内科, 合肥 230022

作者简介: 王永庆,男,副主任医师;

李庆生,男,博士,副主任医师,责任作者, E-mail: wshysh@sina.com

异基因造血干细胞移植是治疗恶性血液病和某些非恶性遗传性缺陷病的最有效方法之一,但移植后急性移植物抗宿主病(acute graft-versus-host disease, aGVHD)的发生率高达20%~80%,是造成患者死亡和生活质量下降的主要原因之一^[1]。因此,寻找新的药物和方法防治aGVHD成为目前研究的热点。硼替佐米作为首个应用于临床的蛋白酶体抑制剂,其作用机制与核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)途径的抑制有关^[2]。NF- κ B途径在活化的自身反应性T细胞中的活性明显增强,而自身反应性T细胞的异常活化正是aGVHD的主要发病机制^[3]。早期的研究^[4-5]证实移植后早期输注硼替佐米可减轻小鼠异基因移植后的aGVHD、提高生存率;而移植后延期输注硼替佐米则会加重aGVHD,但移植后早期输注硼替佐米减轻小鼠异基因移植后的aGVHD作用机制尚不明确。该研究观察aGVHD时小鼠经早期输注硼替佐米作用后外周血辅助性T细胞(helper T cell, Th)1/Th2/Th17细胞亚群分化及其主要的效应性细胞因子 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素(interleukin, IL)-4、IL-17A表达,以探讨硼替佐米防治aGVHD的作用机制,为其进一步临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 小鼠移植模型的建立

1.1.1 药品、试剂和设备 硼替佐米购自美国Millennium公司;刺激剂PMA、Ionomycin购自美国Sigma公司;FITC标记的anti-mouse CD3、PE标记的anti-mouse CD4、APC标记的anti-mouse IFN- γ 、IL-4、

while Western blot was used to analyze the expressions of Runx-2, Hif-1 α protein. **Results** The osteogenic differentiation of PDLSCs under hypoxia condition was higher than the osteogenic differentiation of PDLSCs cultured under normoxia condition, however, the osteogenic differentiation of PDLSCs cultured under hypoxia condition for 48 h was inhibited. **Conclusion** Hypoxia can enhance the osteogenic differentiation of PDLSCs within 48 h, however, inhibit the osteogenic differentiation of PDLSCs after 48 h.

Key words human periodontal ligament stem cells; hypoxia; osteogenic