

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.07.001 [http://www.crter.org]

彭伟, 廖春晖, 钟小龙, 陈珊. 雌激素与机械张应力骨重建相关因子的作用[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(7):1141-1145.

雌激素与机械张应力对骨重建相关因子的作用*

彭伟¹, 廖春晖², 钟小龙¹, 陈珊¹

1 中山大学附属第一医院口腔正畸科, 广东省广州市 510080

2 广州市妇女儿童医疗中心口腔科, 广东省广州市 510623

文章亮点:

采用机械张应力与雌激素(10^{-10} mol/L, 10^{-7} mol/L)联合作用于牙周膜成纤维细胞, 对牙周膜成纤维细胞的核因子 κ B 受体活化子配体和骨保护素 mRNA 水平影响很大, 从力学刺激角度观察了牙周膜成纤维细胞受雌激素作用后对骨重建相关因子的影响, 揭示了临床正畸治疗过程中雌激素在牙槽骨吸收与重建中的作用机制。

关键词:

组织构建; 软骨组织构建; 牙周膜成纤维细胞; 张应力; 雌激素; 骨保护素; 核因子 κ B 受体活化子配体; 骨重建; 组织构建图片文章

摘要

背景: 牙槽骨是人体骨代谢最活跃的区域之一, 对于在正畸治疗过程中的女性患者容易受到雌激素水平的影响。

目的: 观察雌激素对机械张应力作用下的牙周膜成纤维细胞骨重建相关因子骨保护素、核因子 κ B 受体活化子配体 mRNA 表达水平的影响。

方法: 利用一定浓度雌激素干预人牙周膜成纤维细胞后使用四点弯曲加力装置对细胞进行不同时间段的机械张应力加载, 并利用 RT-PCR 检测雌激素与机械张应力共同作用后牙周膜成纤维细胞骨保护素、核因子 κ B 受体活化子配体基因表达变化。

结果与结论: 雌激素刺激后再进行机械张应力加载的人牙周膜成纤维细胞跟单纯受到机械张应力作用的人牙周膜成纤维细胞相比, 骨保护素 mRNA 表达量明显上调, 而核因子 κ B 受体活化子配体 mRNA 表达量显著下降。实验表明雌激素对机械张应力状态下的牙周膜成纤维细胞骨重建相关因子核因子 κ B 受体活化子配体、骨保护素有较强调控作用。

彭伟★, 男, 1984年生, 江西省高安市人, 汉族, 2011年中山大学医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事雌激素及生物力学对牙周组织影响的研究。
Penghuihui123@yahoo.cn

通讯作者: 钟小龙, 副主任医师, 中山大学附属第一医院口腔正畸科, 广东省广州市 510080
chunhuijiao@163.com

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2013)07-01141-05

收稿日期: 2012-06-18
修回日期: 2012-08-27
(20120409012/M·W)

Changes in bone remodeling-related factors under estrogen and tensile stress

Peng Wei¹, Liao Chun-hui², Zhong Xiao-long¹, Chen Shan¹

1 Department of Orthodontics, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

2 Department of Stomatology, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510623, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Alveolar bone is one of the most active areas in bone metabolism, and it is liable to be affected by estrogen in orthodontic treatment for female patients.

OBJECTIVE: To investigate the effect of estrogen on receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin secreted by human periodontal ligament fibroblasts under mechanical tensile stress.

METHODS: Human periodontal ligament fibroblasts were subjected to certain tensile stress loaded by four-point bending strain system after stimulated by different concentrations of estrogen. Reverse

Peng Wei★, Master, Physician,
Department of Orthodontics,
the First Affiliated Hospital of
Sun Yat-sen University,
Guangzhou 510080,
Guangdong Province, China
Penghuihui123@yahoo.cn

Corresponding author: Zhong
Xiao-long, Associate chief
physician, Department of
Orthodontics, the First Affiliated
Hospital of Sun Yat-sen
University, Guangzhou
510080, Guangdong Province,
China
chunhuijiao@163.com

Received: 2012-06-18
Accepted: 2012-08-27

transcription-PCR detection was used to investigate the changes of bone reconstruction related factors.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with pure machinery stimulation, human periodontal ligament fibroblasts intervened by estrogen expressed an osteoprotegerin mRNA raised trend, and a decreased trend in the mRNA expression of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand. Estrogen can strongly modulate the mRNA expression of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in human periodontal ligament fibroblasts under mechanical tensile stress.

Key Words: tissue construction; cartilage tissue construction; periodontal ligament fibroblasts; tensile stress; estrogen; osteoprotegerin; receptor activator of nuclear factor kappa B ligand; bone reconstruction; tissue construction photographs-containing paper

Peng W, Liao CH, Zhong XL, Chen S. Changes in bone remodeling-related factors under estrogen and tensile strain. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(7): 1141-1145.

0 引言

在正畸治疗中, 牙周膜成纤维细胞是感受正畸矫治力并引起牙槽骨重建的直接效应细胞, 对于牙槽骨重建具有重要影响^[1]。研究表明, 雌激素可能通过其经典受体—— β 受体对牙周膜成纤维细胞起作用, 影响牙周膜成纤维细胞在骨重建过程中具有重要调控作用的细胞因子——核因子 κ B受体活化子配体及骨保护素的表达, 进而影响牙槽骨的重建^[2-3]。雌激素与机械张应力联合作用对于牙周膜成纤维细胞的作用影响如何? 体内雌激素含量异常的女性患者在正畸治疗过程中, 正畸力作用会不会促进牙槽骨重建, 抑或是导致更严重的骨吸收? 基于上述问题, 实验采用四点弯曲细胞体外力学加载装置, 探究这两种因素联合作用下骨保护素、核因子 κ B受体活化子配体 mRNA的表达变化, 为了解牙周膜成纤维细胞参与骨改建的机制和正畸牙移动的骨改建机制提供实验依据。

1 材料和方法

设计: 随机对照细胞学实验。

时间及地点: 于2009年7月至2011年6月在四川大学华西口腔国家重点实验室完成。

材料: 于四川大学华西口腔医院口腔颌面外科门诊选取因正畸需要而拔除的双尖牙。所选牙齿无牙体、牙髓、牙周疾病。患者同意将其用于科学研究, 并签署知情同意书。

试剂及仪器:

Reagents and instruments:

试剂及仪器	来源
Forcel 四点弯曲体外细胞力学加载装置	华西口腔正畸科与电子科大联合研制
酶联免疫检测仪、PTC-200PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
17 β -雌二醇	美国 Sigma 公司
DMEM 培养基	美国 GIBCO 公司

方法:

人牙周膜成纤维细胞的原代培养: 在超净工作台内用手术刀刮取根中1/3的牙周膜, 加入浓度为0.1%的 I 型胶原酶5 mL, 37 °C 下水浴振荡40 min后, 加入含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养基, 置于37 °C、体积分数为5%CO₂和饱和湿度的孵箱培养。当细胞铺满瓶底80%时, 胰蛋白酶消化, 1:2 传代, 取第5代细胞进行实验, 并按常规ABC免疫细胞化学染色法进行波形丝蛋白、细胞角蛋白染色鉴定。

MTT检测17β-雌二醇对细胞增殖活性的影响: 用胰蛋白酶消化细胞, 接种于24孔细胞培养板, 将培养板置于37 °C饱和湿度下培养。待细胞贴壁后, 加入雌激素(10⁻¹⁰-10⁻⁷ mol/L)干预24 h。MTT法检测雌激素刺激牙周膜成纤维细胞后的细胞活性。根据实验结果, 选择浓度为10⁻⁷ mol/L 17β-雌二醇进行以下实验。

未经17β-雌二醇刺激的细胞加力: 加胰蛋白酶消化细胞后制成细胞悬液, 以1.0×10⁸ L⁻¹分别接种于加力用细胞培养板中1/3部分, 每板接种1 mL细胞悬液(即1×10⁵/板), 置于37 °C恒温孵箱中培养。24 h后将接种在加力板上的人牙周膜成纤维细胞置于Forecl四点弯曲力学加载装置, 按0, 3, 6, 12 h不同时间段进行加力, 频率0.5 Hz, 力值为3 000 με。各组重复3次。

17β-雌二醇刺激后的细胞加力: 用胰蛋白酶消化细胞, 接种于加力板, 将培养板置于37 °C饱和湿度下培养。待细胞贴壁后, 加入17β-雌二醇(10⁻⁷ mol/L)干预24 h, 同样按0, 3, 6, 12 h不同时间段进行加力, 频率0.5 Hz, 力值为3 000 με。各组重复3次。

RT-PCR检测: Trizol Invitrogen 试剂盒提取细胞总RNA, 反转录试剂盒合成cDNA, PCR 引物序列查Genebank。反应条件: 94 °C预变性5 min 1个循环, 94 °C变性30 s, 60°C退火1 min, 72 °C延伸30 s, 35个循环。所有循环最后均72 °C延伸8 min。取PCR产物10 μL加样于1%的琼脂糖凝胶胶孔, 用电泳进行扩增产物检测, 紫外线分析基因条带的吸光度值。

主要观察指标: 17β-雌二醇对骨保护素及核因子κB受体活化因子配体表达的影响。

统计学分析: 采用SPSS13.0软件对数据进行重复测量资料的方差分析, 显著水平值α=0.05。

2 结果

2.1 细胞免疫组织化学染色鉴定 细胞以长梭形居多, 胞核呈圆形, 胞体丰满。细胞长满瓶底后呈旋涡状、栅栏状排列。细胞的抗波形丝蛋白染色呈阳性, 抗细胞角蛋白染色阴性, 符合中胚层来源的成纤维细胞样细胞的特征^[4-6], 见图1。

2.2 MTT 检测不同浓度17β-雌二醇对人牙周膜成纤维细胞增殖的影响 各实验组吸光度值均有升高。其中浓度为10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷ mol/L 17β-雌二醇与对照组比较差异有显著性意义, 见表1。以上结果表明: 加入生理浓度的雌激素可以促进细胞生长, 并且在生理浓度范围

内呈剂量依赖性增长。

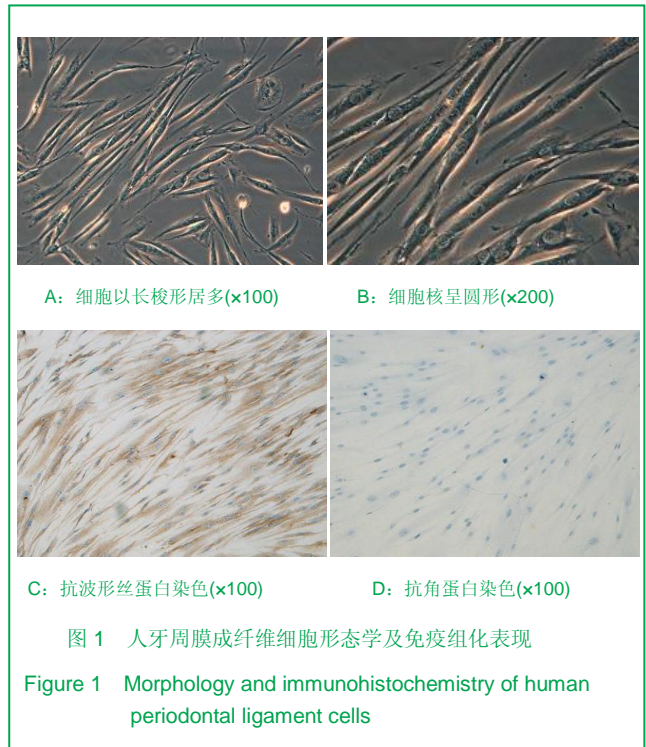


表1 雌激素对人牙周膜成纤维细胞增殖活性影响

Table 1 The influence of estrogen to human periodontal ligament cells proliferation (x±s, n=5, absorbance)

雌激素浓度 (mol/L)	增殖活性
0	1.000±0.000
10 ⁻¹⁰	1.003±0.167
10 ⁻⁹	1.270±0.213 ^a
10 ⁻⁸	1.395±0.297 ^a
10 ⁻⁷	1.607±0.411 ^b

与0 mol/L组比较, ^aP<0.05, ^bP<0.01。
注: 加入生理浓度的雌激素可以促进细胞生长, 且呈剂量依赖性增长。

2.3 人牙周膜成纤维细胞骨保护素mRNA表达变化 见表2, 图2。

表2 雌激素/机械张应力刺激人牙周膜成纤维细胞后骨保护素mRNA的表达变化

Table 2 The changes of osteoprotegerin mRNA of human periodontal ligament fibroblasts after stimulated by estrogen and mechanical tensile stress (x±s, n=4)

雌激素/机械张应力	0 h	3 h	6 h	12 h
0 mol/L+3 000 με	1	7.46±0.37	9.85±0.53	6.50±0.33
10 ⁻⁷ mol/L+3 000 με	27.86±1.57 ^a	30.56±1.13 ^a	128.00±4.01 ^b	188.00±5.34 ^b

与0 mol/L+3 000 με组比较, ^aP<0.05, ^bP<0.01。

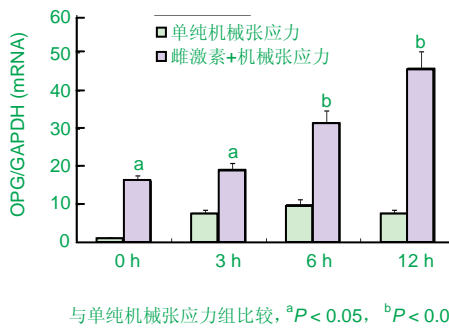


图2 雌激素/机械张应力刺激人牙周膜成纤维细胞后骨保护素 mRNA 表达趋势对比图

Figure 2 Trend contrast figure of osteoprotegerin mRNA expression after stimulated by estrogen and mechanical tensile stress

由表2和图2可见, 骨保护素mRNA无论是在单纯机械张应力作用下还是雌激素与机械张应力共同作用下, 其表达量均呈上升趋势。单纯机械力激素下, 骨保护素mRNA在6 h时达到最高, 之后有轻微下降。雌激素刺激后的人牙周膜成纤维细胞跟未受雌激素作用的人牙周膜成纤维细胞相比, 骨保护素mRNA表达量呈上调趋势。

2.4 雌激素/机械张应力刺激人牙周膜成纤维细胞后核因子κB受体活化子配体mRNA表达变化 核因子κB受体活化子配体mRNA在单纯机械张应力作用下及雌激素与机械张应力共同作用下, 其表达量均呈下降趋势。与单纯机械张应力作用相比下, 雌激素刺激后的人牙周膜成纤维细胞核因子κB受体活化子配体mRNA表达量呈下调趋势, 见表3, 图3。

表3 雌激素/机械张应力刺激人牙周膜成纤维细胞后核因子κB受体活化子配体 mRNA 的表达变化

Table 3 The changes of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand mRNA of human periodontal ligament fibroblasts after stimulated by estrogen and mechanical tensile stress ($\bar{x} \pm s, n=4$)

雌激素/机械张应力	0 h	3 h	6 h	12 h
0 mol/L+ 3 000 με	1	1.147±0.373	1.072±0.381	0.812±0.211
10 ⁻⁷ mol/L +3 000 με	0.500±0.137 ^a	0.358±0.128 ^a	0.301±0.109 ^a	0.285±0.119 ^a

与 0 mol/L+3 000 με 组比较, ^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01。

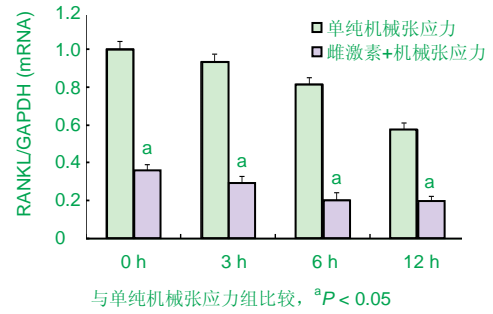


图3 雌激素/机械张应力刺激人牙周膜成纤维细胞后核因子κB受体活化子配体 mRNA 表达趋势对比图

Figure 3 Trend contrast figure of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand mRNA expression after stimulated by estrogen and mechanical tensile stress

2.5 RT-PCR 产物电泳图 各组均有骨保护素mRNA、核因子κB受体活化子配体mRNA表达, 见图4, 5。GAPDH mRNA象素比值结果分析显示人牙周膜成纤维细胞的骨保护素mRNA表达量呈上调趋势, 核因子κB受体活化子配体mRNA表达量均呈下降趋势。

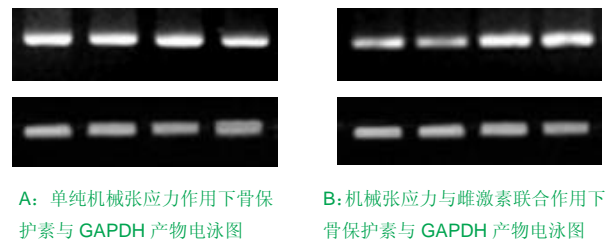


图4 骨保护素电泳图

Figure 4 Electrophoresis pattern of osteoprotegerin

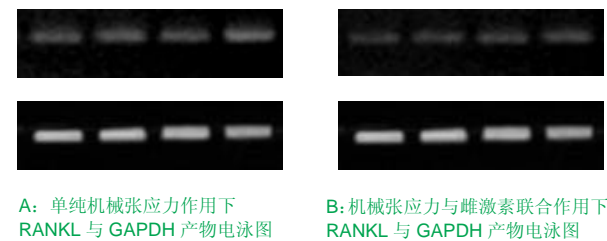


图5 核因子κB受体活化子配体电泳图

Figure 5 Electrophoresis pattern of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand

3 讨论

牙周膜成纤维细胞在牙周膜中数量最多, 功能作用

最大, 它们是感受正畸矫治力并引起牙槽骨改建的直接效应细胞^[7], 可通过直接表达骨保护素及核因子 κ B受体活化因子配体参与牙周骨重建。四川大学华西口腔医学院正畸科与成都电子科技大学联合开发的Forcel四点弯曲加力装置可间接地对贴壁生长于培养板表面的细胞产生一个精确、恒定、统一的周期性单轴应力, 被认为是一种可靠且重复性较高的体外细胞力学加载仪^[8-9]。在使用机械张应力对人牙周膜成纤维细胞进行刺激时, 只有当力值为1 500-2 500 μE 时, 人牙周膜成纤维细胞才会产生反应。一般认为, 3 000 μE 在人牙周膜成纤维细胞所受机械张应力的生理范围之内。而且, 使用0.5 Hz应力刺激频率可以使细胞得到最佳生长活力^[10]。因此, 将3 000 μE , 频率0.5 Hz作为实验力值。同时这种加力方式在加力过程中细胞相对液体移动产生一定的剪切力, 使细胞受力更符合在生物体内的生理状态。

目前, 有关雌激素对人牙周膜成纤维细胞增殖活性的影响目前还存在争议, 一部分学者的研究认为, 雌激素对人牙周膜成纤维细胞增殖活性无明显影响, 另一部分学者的研究结果与本实验相同, 认为雌激素能够促进人牙周膜成纤维细胞的增殖活性。实验选用对人牙周膜成纤维细胞增殖活性影响最大的 10^{-7} mol/L为实验浓度。

核因子 κ B受体活化因子配体和骨保护素是牙周组织改建的重要调节因素^[11]。实验表明在人牙周膜成纤维细胞加力前加入雌激素, 可以提高骨保护素mRNA表达水平, 同时降低核因子 κ B受体活化因子配体的mRNA表达水平。从实验结果看出, 雌激素对骨保护素mRNA水平的影响呈上升趋势, 且具有时间依赖性。从3 h开始, 上升的幅度显著变大。对于核因子 κ B受体活化因子配体的mRNA水平影响, 也同样存在时间依赖性, 但在6 h以后下调趋势趋于平缓。骨保护素与核因子 κ B受体活化因子配体mRNA变化均未出现峰值, 可能是由于实验采用的时间点较少, 因此结果有一定的局限性, 在后续研究中将加大加力的时间范围。

综上所述, 雌激素与机械张应力两者的共同作用对人牙周膜成纤维细胞的核因子 κ B受体活化因子配体、骨保护素mRNA的表达影响非常大。因此, 作者推测, 在临床正畸治疗过程中, 雌激素对牙周组织局部细胞因子表达的调控作用比未进行正畸治疗时更强, 对牙周骨重建的影响也更大。对于雌激素缺乏患者, 如绝经期女性进行正畸治疗时应当考虑有牙周组织骨吸收加重的可能。

作者贡献: 实验设计为廖春晖, 实验实施为彭伟, 实验评估为钟小龙, 资料收集为陈珊。彭伟成文, 廖春晖审校, 钟小龙对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 参与研究的患病个体同意将其诊疗经过信息用于科学研究, 在充分了解本治疗方案的前提下签署“知情同意书”; 治疗方案获医院伦理委员会批准。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Tanaka M, Toyooka E, Kohno S, et al. Long-term changes in trabecular structure of aged rat alveolar bone after ovariectomy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95(4):495-502.
- [2] Jönsson D. The biological role of the female sex hormone estrogen in the periodontium--studies on human periodontal ligament cells. *Swed Dent J Suppl.* 2007;(187):11-54.
- [3] Liang L, Yu JF, Wang Y, et al. Estrogen regulates expression of osteoprotegerin and RANKL in human periodontal ligament cells through estrogen receptor beta. *J Periodontol.* 2008; 79(9):1745-1751.
- [4] Fini M, Motta A, Torricelli P, et al. The healing of confined critical size cancellous defects in the presence of silk fibroin hydrogel. *Biomaterials.* 2005;26(17):3527-3536.
- [5] Li C, Vepari C, Jin HJ, et al. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006;27(16): 3115-3124.
- [6] Altman GH, Horan RL, Lu HH, et al. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials.* 2002; 23(20):4131-4141.
- [7] Zhang KH, Yu SF. Beijing: People's Medical Publishing House. 2001:308.
章魁华, 于世凤. 实验口腔病理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001:308.
- [8] Song JL, Zhao ZH, Luo SJ, et al. *Kouqiang Yixue.* 2006; 26(4): 241-243.
宋锦璘, 赵志河, 罗颂椒, 等. 周期性牵张应力下成肌细胞面积、周长的变化研究[J]. 口腔医学, 2006, 26(4):241-243.
- [9] Liu J, Liu T, Zheng Y, et al. Early responses of osteoblast-like cells to different mechanical signals through various signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;348(3): 1167-1173.
- [10] Powell CA, Smiley BL, Mills J, et al. Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;283(5):C1557-1565.
- [11] Ge ZL, Yang CX, Lu JJ, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2011;15(20):3733-3736.
葛振林, 杨彩霞, 卢嘉静, 等. 犬切牙压低移动过程中牙周组织骨保护素/核因子 κ B受体活化因子配体的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(20):3733-3736.