

炎症微环境下人牙周膜干细胞的生物学特性

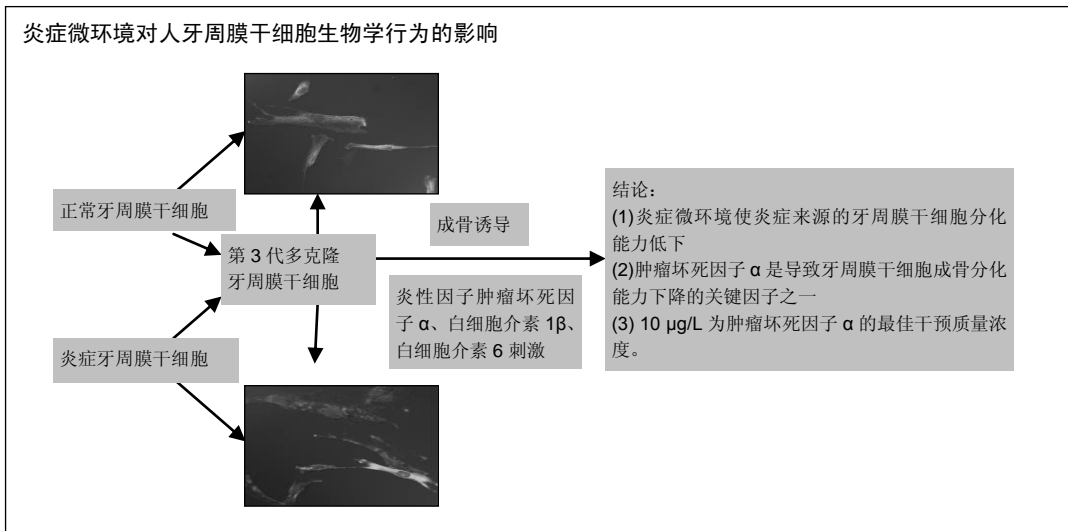
袁萍, 李淑慧, 赵璐, 于莉, 周春梅, 吴佩玲(新疆医科大学第二附属医院口腔科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830063)

引用本文: 袁萍, 李淑慧, 赵璐, 于莉, 周春梅, 吴佩玲. 炎症微环境下人牙周膜干细胞的生物学特性[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(6):898-905.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.06.020

ORCID: 0000-0002-4293-4392 (吴佩玲)

文章快速阅读:



袁萍, 女, 1989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, 主要从事牙体牙髓病学研究。

通讯作者: 吴佩玲, 主任医师, 教授, 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

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2016)06-00898-08

稿件接受: 2015-12-12

http://WWW.crter.org

文题释义:

牙周膜干细胞: 是从离体牙的牙周膜中分离出的, 表现间充质干细胞特性, 具有自我增殖、克隆及分化能力的一类干细胞, 而且还具有形成牙骨质、牙槽骨及牙周膜的能力。

炎症微环境: 慢性炎症疾病中组织的再生修复能力明显下降, 最新研究显示其原因是炎症环境下干细胞再生能力受到明显抑制。炎症不仅有可能改变干细胞微环境的平衡, 还可能影响干细胞内源性信号的调控作用。牙周炎导致的牙周支持组织的丧失可能与牙周膜干细胞的生物学行为受到炎症因子刺激有关。

摘要

背景: 牙周膜干细胞可促进牙周组织修复再生, 为牙周炎的治疗提供了新的思路。

目的: 观察炎症微环境对人牙周膜干细胞生物学行为的影响。

方法: 组织块酶消化法培养从健康个体获得的牙周膜干细胞和牙周炎患者获得的牙周膜干细胞, 并经有限稀释法纯化及干细胞表面标志物 CD146 及牙周膜干细胞表面蛋白 STRO-1 鉴定后, 分别取第3代健康和炎症来源的牙周膜干细胞, 标注为正常组和炎症组, 各加入成骨诱导液进行成骨诱导。

结果与结论: ①两种组织来源的细胞经纯化后均可表达间充质干细胞表面标志物 STRO-1 和 CD146; 炎症组牙周膜干细胞比健康组牙周膜干细胞具有更强的增殖能力, 但炎症组牙周膜干细胞的成骨分化能力要低于健康组牙周膜干细胞。②正常组织来源的牙周膜干细胞在成骨诱导时分别加入不同的炎症因子肿瘤坏死因子α、白细胞介素1β、白细胞介素6刺激后, 经 RT-PCR 检测发现, 与诱导组相比, 肿瘤坏死因子α处理组成骨相关基因核心因子 Runx2 和 Osterix 的表达显著下降($P < 0.05$)。③而白细胞介素1β和白细胞介素6处理组并未对牙周膜干细胞的成骨能力产生显著影响。④在肿瘤坏死因子α质量浓度为 0.1, 1 μg/L 处理组中, 成骨相关基因 Runx2 的表达与诱导组相比无显著影响, 而在肿瘤坏死因子α质量浓度为 10 μg/L 处理组, 成骨相关基因 Runx2 的表达与诱导组相比明显降低($P < 0.05$)。⑤结果证实, 炎症微环境改变了牙周膜干细胞内部的分子信号机制, 使炎症来源的牙周膜干细胞分化能力低下, 其中肿瘤坏死因子α是导致牙周膜干细胞成骨分化能力下降的关键因子之一, 10 μg/L 为肿瘤坏死因子α的最佳干预质量浓度。

关键词:

干细胞; 培养; 牙周膜干细胞; 成骨; 牙周炎; RT-PCR; 肿瘤坏死因子α; 白细胞介素1β; 白细胞介

Yuan Ping, studying for master's degree.
Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Wu Pei-ling, Chief physician, Professor, Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

素6; 核心因子 Runx2; 炎症微环境; 国家自然科学基金
主题词:
干细胞; 组织工程; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素1 β
基金资助:
国家自然科学基金(81460103)

Biological properties of human periodontal ligament stem cells under inflammatory microenvironment

Yuan Ping, Li Shu-hui, Zhao Lu, Yu Li, Zhou Chun-mei, Wu Pei-ling (Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: The periodontal ligament stem cells can promote periodontal tissue regeneration, providing a new way for the treatment of periodontitis.

OBJECTIVE: To observe the inflammatory microenvironment effects on the biological properties of periodontal ligament stem cells.

METHODS: Periodontal ligament stem cells from healthy controls and patients with periodontitis were primarily cultured by tissue digestion method, purified using limited dilution method, and identified through detection of CD146 and STRO-1. Then, passage 3 cells were taken and denoted as normal control and inflammation groups followed by osteogenic induction.

RESULTS AND CONCLUSION: Purified cells from two sources both expressed STRO-1 and CD146. Periodontal ligament stem cells in the inflammation group showed higher multiplication capacity, but the osteogenesis ability was lower compared with the normal control group. The expressions of Runx2 mRNA and Osterix mRNA were dropped significantly after the stimulus of tumor necrosis factor- α ($P < 0.05$), but the interleukin-1 β and interleukin-6 did not have a significant impact. Tumor necrosis factor- α at 0.1 and 1 $\mu\text{g/L}$ had no significant effects on the expression of Runx2 mRNA, but the expression of Runx2 mRNA was decreased significantly after treatment with 10 $\mu\text{g/L}$ tumor necrosis factor- α ($P < 0.05$). It is confirmed that the molecular signaling mechanism inside the periodontal ligament stem cells is changed under inflammatory microenvironment, so that the differentiation capacity of cells from the inflammatory sources is lowered. Moreover, tumor necrosis factor- α is one of the key factors and its optimal concentration is 10 $\mu\text{g/L}$.

Subject headings: Stem Cells; Tissue Engineering; Tumor Necrosis Factor-alpha; Interleukin-1beta

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81460103

Cite this article: Yuan P, Li SH, Zhao L, Yu L, Zhou CM, Wu PL. Biological properties of human periodontal ligament stem cells under inflammatory microenvironment. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(6):898-905.

0 引言 Introduction

专家学者推测牙周膜中可能存在能再生牙周膜和牙骨质的多潜能干细胞,直到2004年, Seo等^[1]首次从健康成年人牙周组织获得具有克隆形成能力、高度增殖和分化能力的牙周膜干细胞,这使得利用干细胞促进牙周组织再生成为研究的热点问题。

牙周炎通常是指由革兰阴性厌氧菌感染牙周支持组织而引起的慢性感染性疾病。牙周炎在成年人中的发病率高达80%,其中20%患有重度牙周炎^[2]。其不可逆转地侵袭破坏牙周组织,牙周再生能力丧失是造成牙周组织缺损最终导致牙齿丧失的最常见原因。终止牙周软、硬组织的破坏,恢复功能和美观,促进牙周组织的

再生和修复^[3-4],是牙周治疗的最终目的。而缺损牙槽骨的再生和修复是影响牙周病治疗的关键因素。

现有的治疗方法主要包括牙周刮治、骨移植和引导组织再生术等,但仍然无法实现真正的牙周组织再生。牙周组织缺损能否获得再生,关键在于能否募集并激活所需细胞并使其发挥作用^[5]。

干细胞是维持组织器官再生能力的重要基础,2004年, Seo^[1]等利用单细胞克隆技术,从牙周膜中成功分离、鉴定出了一种新的成体干细胞即为牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSCs)。

口腔组织中包含多种成体干细胞,如骨髓基质干细胞、表皮干细胞、肌肉干细胞等,但只有骨髓干细胞和

牙周膜干细胞为口腔特有的成体干细胞^[6]。而牙周组织再生修复与牙周膜干细胞的异质性有密切关系。牙周膜干细胞可处于不同的分化阶段或具有不定向的分化趋势^[7-8]，能增殖产生成骨细胞、成纤维细胞和成牙骨质细胞，从而使牙周组织再生进入了一个新的领域。

除了健康牙周膜来源的干细胞外，实验还从牙周炎牙周膜组织中成功分离了炎性来源的人牙周膜干细胞。这种牙周膜干细胞的发现为牙周炎的治疗提供了新的思路和方法^[9]。

牙周膜干细胞具有成体干细胞共有的特性，具有很强的自我更新能力和自我分化能力，这些功能使其成为牙周组织再生修复的重要种子细胞^[10]。但是，慢性炎症疾病中组织的再生修复能力明显下降^[11]，最新研究显示其原因是炎症环境下干细胞再生能力受到明显抑制。炎症不仅有可能改变干细胞微环境的平衡，还可能影响干细胞内源性信号的调控作用。因此，牙周炎导致的牙周支持组织的丧失可能与牙周膜干细胞的生物学行为受到炎性因子刺激有关。

1975年，Carswell等发现了一种能抑制并杀伤体外培养的肿瘤细胞的蛋白质，并将其命名为肿瘤坏死因子。Shalaby等^[12-13]将巨噬细胞产生的肿瘤坏死因子命名为肿瘤坏死因子 α 。牙周炎的致病菌主要是革兰阴性菌，革兰阴性菌细胞壁表面的LPS(lipolysaccharide)主要激活巨噬细胞而产生许多的肿瘤坏死因子 α ，肿瘤坏死因子 α 与牙周炎的病程发展密切相关^[14-15]。LPS与炎症性骨疾病如骨髓炎和牙周炎等的发病机制相关密切^[16-17]，单核细胞、巨噬细胞及内皮细胞通过信号转导级联反应而释放促炎性因子，包括肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 和白细胞介素6等^[18-19]。

实验分别从健康及慢性牙周炎患者离体牙中分离培养牙周膜干细胞(H-PDLSCs, P-PDLSCs)，进行体外扩增，并进行表型鉴定和生物学行为观察比较，探讨炎症微环境对干细胞的影响及进一步认识牙周炎导致牙周支持组织丧失的原因。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外实验。

1.2 时间及地点 于2015年3至9月在新疆医科大学第一附属医院临床研究院干细胞实验室完成。

1.3 材料 离体牙来自2015年3至9月在新疆医科大学第二附属医院口腔科就诊患者因正畸减数或阻生而拔除的前磨牙、第三磨牙。

正常组织来源: 20-40岁志愿者因正畸减数或阻生而拔除的前磨牙、第三磨牙10例，均无牙周组织炎症，无牙髓炎、根尖周炎和牙根吸收。

炎症组织来源: 20-45岁患者因慢性牙周炎而拔除的患牙13例，均无牙髓炎、根尖周炎、牙根吸收。慢性牙周炎的诊断标准参照Armitage的推荐标准^[20]：X射线片显示牙槽骨吸收达到牙根2/3，一个以上的牙周袋探诊深度 ≥ 5 mm。

所有纳入个体均无系统性疾病和已知的可以影响牙周状况的疾病，无吸烟史，近6个月无特殊服药史。拔牙前对患者进行口腔洁治，拔牙时碘伏消毒，牙齿拔除后立即侵入含双抗的培养液中。

1.4 实验方法

1.4.1 正常和炎症组织来源牙周膜干细胞的培养和鉴定 原代培养：在SW-CJ-2D型超净工作台(苏州净化设备有限公司，中国)上，用含双抗(Hyclone公司，美国)的PBS根冠向冲洗3遍，然后刮取根中1/3牙周膜，将其剪成 1 mm^3 的组织块，离心，弃上清后加入约组织体积5倍量的3 g/L的I型胶原酶(Gibco，美国)，吹散，于 37°C 水浴箱中消化30 min后离心，弃上清，用1 mL α -MEM细胞培养液(体积分数15% FBS、50 mg/L抗坏血酸、2 mmol/L谷氨酰胺、100 U/mL双抗；Gibco，美国)重悬后接种于6孔板，置于 37°C ，体积分数5% CO_2 孵箱(Thermo Scientific，美国)中培养，每隔3 d换液1次，直至3-8 d后细胞从组织边缘爬出。

1.4.2 有限稀释法纯化细胞并传代 当细胞浓度达到80%汇合时，用体积分数0.25%胰蛋白酶消化，离心弃上清， α -MEM培养基重悬并调整细胞浓度为 $(10-20)\times 10^3$ 个后，接种于96孔板，置于 37°C ，体积分数5% CO_2 孵箱中培养，次日在XDS-1B型倒置相差显微镜(莱卡，德国)下标记出单个细胞孔后继续培养，每隔3 d换液1次，待孔中的细胞形成较大克隆集落是胰酶消化，常规传代培养。标记H-PDLSCs为正常组织来源的牙周膜干细胞，P-PDLSCs为牙周炎症组织来源的牙周膜干细胞。采用第3-5代克隆牙周膜干细胞用于后续实验。

1.4.3 细胞表面标记物检测 分别取正常和炎症第3代牙周膜干细胞，体积分数0.25%胰酶消化，离心弃上清，培养基重悬，以 $4\times 10^7\text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种于共聚焦小皿中，待细胞浓度50%汇合时弃原培养液，PBS洗2遍，加入40 g/L的多聚甲醛固定1 h后弃液，PBS洗2遍，加入体积分数5%羊血清封闭半小时，弃液，加入STRO-1

(美国)和CD146(博奥森, 北京)一抗, 4 °C过夜。次日弃一抗, PBS洗2遍, 避光条件下加入FITC标记的IgM二抗(博奥森, 北京)1 h, 弃液, 加DAPI染色10 min, PBS洗2遍, 激光共聚焦显微镜观察, 拍照。观察胞浆及细胞膜染色情况, 强阳性为明亮的荧光绿, 记为(+++); 弱阳性为淡绿色, 记为(+); 阴性为不着色, 记为(-)。

1.4.4 细胞生长曲线检测 分别取正常和炎症来源的处于对数生长期的第3代牙周膜干细胞, 以 1×10^3 /孔的密度接种于96孔板, 每组设3个副孔和1个空白对照孔(以无细胞的空白孔调零), 分别记为正常组1, 2, 3及正常对照孔, 炎性组1, 2, 3及炎性对照孔。加入200 μ L/孔培养液, 37 °C、体积分数5%CO₂条件下培养过夜。次日更换新鲜培养液, 每孔180 μ L液体(无血清), 5 h后观察细胞, 在第1天的孔中加入20 μ L MTT液, 37 °C孵育4 h后吸弃培养液, 加入150 μ L的DMSO, 将96孔板置于酶标仪水平震荡5 min混匀, 于450 nm波长处检测吸光度(吸光度值), 取均值。

检测结束后将每孔检测液吸出, PBS洗2遍, 加入培养液继续培养, 连续检测7 d, 每3 d换液1次。以时间为横轴, 吸光度值为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.4.5 成骨诱导培养 取正常组织来源和炎症组织来源第3代牙周膜干细胞, 体积分数0.25 %胰酶消化, 离心弃上清, 培养基重悬, 以细胞浓度为 2×10^7 L⁻¹接种于6孔板中, 待细胞浓度达50%时更换为矿化诱导培养液(体积分数5%FBS α -MEM, 10 mmol/L β -甘油磷酸钠, 质量浓度50 mg/L 抗坏血酸, 100 nmol/L地塞米松)进行矿化诱导, 每隔3 d更换新鲜矿化诱导液, 于第7天用茜素红染色, 染色后用去离子水反复冲洗, 加入十六烷基吡啶孵育15 min, 用分光光度计在紫外线波长为540 nm处测吸光度值。

1.4.6 不同炎症因子及不同质量浓度的肿瘤坏死因子 α 刺激后Real Time PCR检测成骨相关基因的表达 取正常来源的处于对数生长期的第3代牙周膜干细胞, 成骨诱导时分别加入肿瘤坏死因子 α (0.1, 1, 10 μ g/L)、白细胞介素1 β (10 μ g/L)、白细胞介素6(10 μ g/L), 设成骨诱导组作对照, 成骨诱导3 d后用Trizol裂解并提取细胞总RNA, 经紫外分光光度计测定RNA浓度后, 用反转录试剂盒(Thermo, 美国)分别反转录合成cDNA; 然后以cDNA为模板, 以 β -actin为内参照, 用Syber Green荧光定量PCR检测试剂盒(Thermo, 美国)进行荧光定量PCR, 分别检测Runx2和Osterix mRNA表达水平。反应体系均为20 μ L引物序列。

PCR反应条件: 95 °C变性10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40个循环。ABI型实时定量PCR仪(Applied Biosystems, 德国)检测记录数据, 结果根据标准曲线由软件自动计算得出。实验进行3次重复。

引物序列:

基因	引物序列	扩增产物
Runx2	正义: 5'-CCC GTG GCC TTC AAG GT-3'	529 bp
	反义: 5'-CGT TAC CCG CCA TGA CAG TA-3'	
Osterix	正义: 5'-GGA CCA TTC CCA CGT CTT CAC-3'	617 bp
	反义: 5'-CCT TGT AGC CAG GCC CAT TG-3'	
β -actin	正义: 5'-TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACF-3'	202 bp
	反义: 5'-GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT-3'	

1.5 主要观察指标 各组细胞形态学、生长曲线观察, 成骨诱导后, 两组矿化结节定量分析及成骨相关基因的表达结果。

1.6 统计学分析 采用SPSS 17.0软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析法, 组间数据两两比较采用独立样本 t 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果 Results

2.1 两种组织来源的牙周膜干细胞的形态学变化 正常和炎症来源的牙周膜组织经组织块酶消化法原代培养3-8 d后, 可见牙周膜组织块边缘有细胞爬出(图1), 大部分细胞呈长梭形或不规则形, 类似成纤维细胞。有限稀释法克隆化培养约8 d出现细胞克隆, 所得细胞即为H-PDLSCs和P-PDLSCs(图1)。倒置显微镜下观察, 两种细胞呈纺锤形, 呈螺旋簇集落生长。两种细胞在形态学上无明显差异(图1)。

2.2 培养的人牙周膜干细胞细胞表面标记物的表达 用免疫荧光染色观察显示, 正常和炎症来源的牙周膜干细胞细胞膜及胞浆均阳性表达间充质干细胞表面标志物STRO-1和CD146, 呈明亮的绿色荧光(+++), 结果见图2。

2.3 正常和炎症牙周膜干细胞生长曲线比较 H-PDLSCs和P-PDLSCs的细胞生长曲线均呈“S”型, 培养第6天前细胞生长数量呈现上升趋势, 且P-PDLSCs生长速度明显高于H-PDLSCs, 尤其是在培养第3, 4天, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 培养第6天起细胞生长速度趋于平缓, 细胞增殖进入“平台期”, 之后P-PDLSCs生长速度低于H-PDLSCs, 但差异无显著

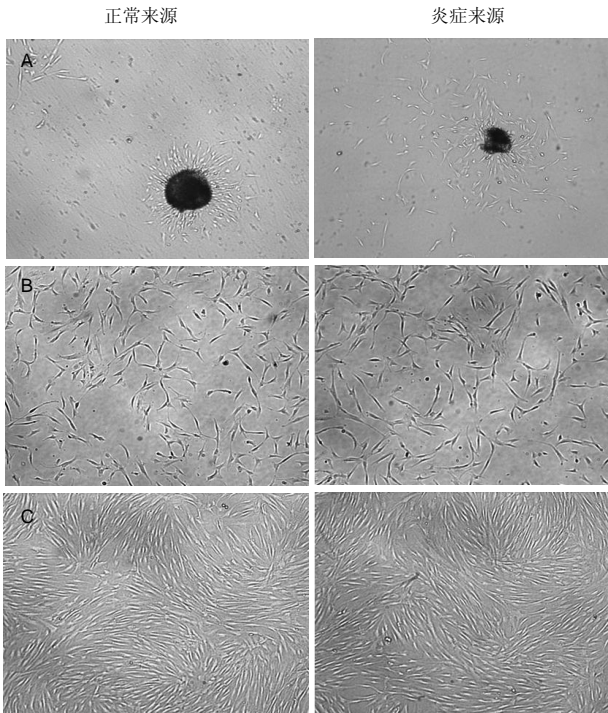


图1 正常和炎症牙周膜干细胞形态(x50)

Figure 1 Morphology of periodontal ligament stem cells from healthy controls and patients with periodontitis (x50)

图注: 图A两种来源的牙周膜组织经组织块酶消化法培养3-8 d后, 可见牙周膜组织块边缘有呈长梭形或不规则形的细胞爬出; B为有限稀释法克隆化继续培养约8 d, 两种来源的细胞均可出现细胞克隆增殖, 细胞呈典型的长梭形。两种来源的细胞形态无明显差异; C为倒置显微镜下观察, 两种来源的细胞均成纺锤形, 呈螺旋簇集落生长, 形态无差异。

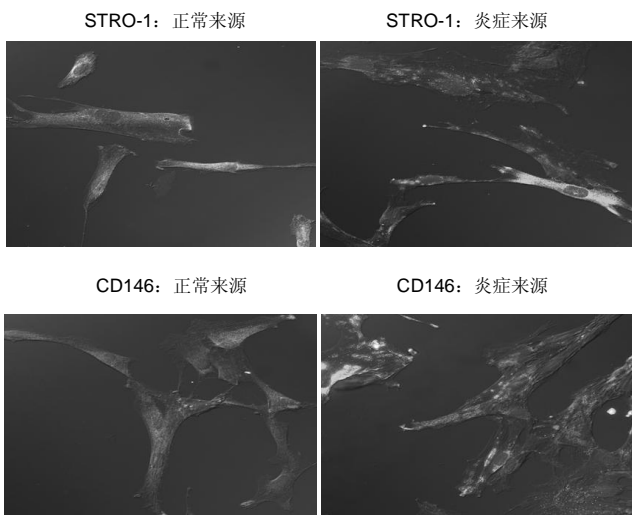


图2 两种牙周膜干细胞中STRO-1和CD146的表达(免疫荧光染色, x200)

Figure 2 Expression of CD146 and STRO-1 in periodontal ligament stem cells from healthy controls and patients with periodontitis (immunofluorescence staining, x200)

图注: 正常和炎症来源组细胞, 蓝色细胞核外的胞浆及细胞膜均呈现明亮的STRO-1和CD146阳性表达绿色荧光, 绿色荧光亮度为强阳性(+++).

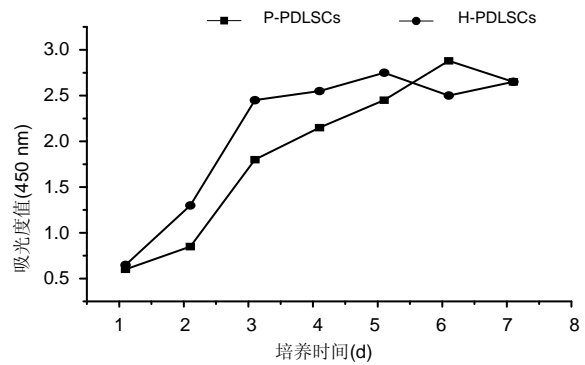


图3 两种牙周膜干细胞的生长曲线

Figure 3 Growth curves of periodontal ligament stem cells from healthy controls and patients with periodontitis

图注: 两种细胞的生长曲线均呈“S”型, 6 d前细胞生长数量呈现上升趋势, 且炎症来源牙周膜干细胞(P-PDLSCs)生长速度明显高于正常来源牙周膜干细胞(H-PDLSCs), 尤其是在第3, 4天差异有显著性意义($P < 0.05$); 第6天起细胞生长速度趋于平缓, 细胞增殖进入“平台期”, 之后P-PDLSCs生长速度低于H-PDLSCs, 但差异无显著性意义($P > 0.05$)。

性意义($P > 0.05$; 图3)。

2.4 两种来源牙周膜干细胞成骨分化能力的比较 将两种细胞进行成骨诱导, 成骨诱导7 d矿化结节定量结果显示, P-PDLSCs的吸光度值低于H-PDLSCs(表1; $P < 0.05$), 说明P-PDLSCs的成骨分化能力远不如H-PDLSCs。

成骨诱导3 d后, RT-PCR检测成骨相关基因的表达, 结果显示, H-PDLSCs的Runx2和Osterix mRNA的表达均高于P-PDLSCs($P < 0.05$; 表1)。

表1 两种牙周膜干细胞成骨分化能力的比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 Osteogenic ability of periodontal ligament stem cells from healthy controls versus patients with periodontitis

组别	矿化结节 定量(%)	Runx2 mRNA 相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Osterix mRNA 相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
正常组织来源组	97.3±0.92	2.93±0.24	3.03±0.36
炎症组织来源组	37.2±0.78 ^a	1.86±0.38 ^a	2.14±0.23 ^a

表注: 与正常组织来源组比较, ^a $P < 0.05$ 。

2.5 不同炎症因子刺激后RT-PCR检测牙周膜干细胞中Runx2及Osterix mRNA的表达 成骨诱导时分别加入肿瘤坏死因子 α (10 $\mu\text{g/L}$)、白细胞介素1 β (10 $\mu\text{g/L}$)、白细胞介素6(10 $\mu\text{g/L}$), 诱导3 d后, 在肿瘤坏死因子 α 处理组, Runx2及Osterix mRNA表达均明显下调; 而在白细胞介素1 β 、白细胞介素6处理组, Runx2及Osterix mRNA的表达水平与成骨诱导组相比差异无显著性意义(表2)。

表2 炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 、白细胞介素6对牙周膜干细胞中成骨分化能力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 2 Effects of tumor necrosis factor- α , interleukin- 1β and interleukin-6 on osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells from healthy controls and patients with periodontitis

组别	Runx2 mRNA 相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	Osterix mRNA 相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
成骨诱导组	4.53 \pm 0.36	4.93 \pm 0.40
肿瘤坏死因子 α 处理组	1.85 \pm 0.18 ^a	1.61 \pm 0.09 ^a
白细胞介素 1β 处理组	2.51 \pm 0.23	3.86 \pm 0.36
白细胞介素6处理组	3.72 \pm 0.39	2.95 \pm 0.22

表注: 与成骨诱导组比较, ^a $P < 0.05$ 。

2.6 不同质量浓度肿瘤坏死因子 α 对牙周膜干细胞成骨分化的影响 各组浓度刺激成骨诱导培养下, 在成骨诱导组、肿瘤坏死因子 α (0.1, 1 $\mu\text{g/L}$) 处理组, Runx2 mRNA的表达差异无显著性意义; 但在肿瘤坏死因子 α (10 $\mu\text{g/L}$)刺激下, Runx2 mRNA的表达下调明显($P < 0.05$; 表3)。

3 讨论 Discussion

为了观察炎症微环境对牙周膜干细胞的生物学行为是否产生影响, 实验参照 Seo 等^[1]的方法, 分别从正常和炎性牙周组织中分离培养出了两种来源的牙周膜干细胞(H-PDLSCs 与 P-PDLSCs), 并对这两种来源的牙周膜干细胞的增殖和分化能力做了对比研究, 经比较, 两种细胞均呈现成纤维细胞样的长梭形, 在形态学上并无明显差异, 这表明牙周膜干细胞的存在和形态不受炎症环境的影响。

实验采用免疫荧光染色法检测细胞表面标记, H-PDLSCs 和 P-PDLSCs 均表达干细胞的表面分子, 且表达基本相同, 这说明实验得到的均为牙周组织来源的干细胞, 炎症感染的牙周组织中同样存在牙周膜干细胞, 为牙周炎患者的牙周组织自体修复提供了种子细胞。

实验从 MTT 生长曲线的结果对比发现 P-PDLSCs 的增殖能力强于 H-PDLSCs。实验进一步对 P-PDLSCs 的成骨相关能力进行了观察, 无论从矿化结节定量分析, 还是成骨相关基因的结果均显示, P-PDLSCs 的成骨能力要低于 H-PDLSCs。这说明炎症微环境影响下, 牙周膜干细胞的行为发生了改变, 慢性炎症性疾病如牙周病是造成骨组织损伤的重大疾病, 在慢性牙周病中骨的形成和再生能力受到了不同程度的抑制, 导致这种情

表3 不同质量浓度的肿瘤坏死因子 α 对牙周膜干细胞中成骨相关基因 Runx2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 Effects of tumor necrosis factor- α with different concentrations on Runx2 mRNA expression in periodontal ligament stem cells

组别	Runx2 mRNA 相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
成骨诱导组	3.21 \pm 0.33
肿瘤坏死因子 α 0.1 $\mu\text{g/L}$ 处理组	3.94 \pm 0.31
肿瘤坏死因子 α 1 $\mu\text{g/L}$ 处理组	3.45 \pm 0.28
肿瘤坏死因子 α 10 $\mu\text{g/L}$ 处理组	1.82 \pm 0.10 ^a

表注: 与成骨诱导组比较, ^a $P < 0.05$ 。

况的关键因素可能是由于炎症微环境的改变及在炎症微环境的影响下干细胞的功能发生了变化^[21-22]。

牙周炎的牙周组织破坏是在菌斑的刺激下局部组织产生过度免疫造成的^[23-24]。LPS 是菌斑最主要的产物, 可刺激宿主细胞产生炎症因子, 如肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 等^[25-27]。在这些炎症因子中, 肿瘤坏死因子 α 被认为是其他因子的上游因子, 在炎症发生中起重要作用, 其在骨病理生理过程中扮演重要角色^[28-31], 通过抑制转录方式调节 Runx2 表达^[32], 还有研究表明, 肿瘤坏死因子 α 能抑制成骨细胞分化及矿化结节的形成^[33-35]。

实验发现, 只有肿瘤坏死因子 α 组可以显著抑制牙周膜干细胞的成骨分化, 而白细胞介素 1β 、白细胞介素6并未对牙周膜干细胞的成骨能力造成明显影响, 这说明在牙周炎这个炎症微环境中, 肿瘤坏死因子 α 是使牙周膜干细胞成骨能力下降的关键炎症因子。

目前, 肿瘤坏死因子 α 对干细胞成骨分化的作用有不同的报道, 有的认为其是抑制成骨的, 如 Zhou 等^[36]发现, 在炎症反应发生中, 肿瘤坏死因子 α 可激活成骨细胞中的 p38 MAPK^[37], 抑制成骨细胞的分化。也有研究表明肿瘤坏死因子 α 在干细胞成骨分化中起着积极的作用, 通过激活核转录因子 kB 途径^[38], 提高成骨相关蛋白的表达, 使基质矿化增多^[39]。

实验利用肿瘤坏死因子 α 刺激 H-PDLSCs 来模拟炎症环境, 比较不同质量浓度肿瘤坏死因子 α 刺激对牙周膜干细胞成骨能力的影响, 结果表明, 在肿瘤坏死因子 α 低浓度时对成骨能力没有明显影响, 浓度越低成骨能力反而呈增高趋势, 如在肿瘤坏死因子 α 质量浓度为 0.1, 1 $\mu\text{g/L}$ 时, Runx2 mRNA 的表达与成骨诱导组相比有上调趋势, 但差异无显著性意义; 而在高浓度时成

骨能力受到抑制, 且质量浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 时, 成骨分化抑制尤其显著。因此试验选择质量浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 作为肿瘤坏死因子 α 的刺激浓度, 这为未来牙周炎导致牙周支持组织的丧失提供了新思路。

致谢: 衷心感谢新疆医科大学第二附属医院口腔科吴佩玲教授及李淑慧老师在实验设计方面的指导, 感谢口腔科全科工作人员对本次实验的支持与帮助。

作者贡献: 实验设计为第一、第二作者, 实施为第一作者, 数据收集及文章撰写为第一作者, 通讯作者审核并对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 实验经新疆医科大学第一附属医院伦理委员会批准。实验在收集标本时已获得供者知情。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Inrestigation of multipotent postnatal stem cells from human periodintal ligament. *Lancet*. 2004;364(9429): 149-155.
- [2] Humphrey LL, Fu R, Buckley DI, et al. Periodotal disease and coronary heart disease incidence: A systematic review and meta-analysis. *J Gen Intern Med*. 2008;23:2079-2086.
- [3] Kao DW, Fiorellini JP. Regenerative periodontal therapy. *Front Oral Biol*. 2012;15:149-159.
- [4] Mudda JA, Bajaj M. Stem cell therapy: a challenge to periodontist. *Indian J Dent Res*. 2011;22:132-139.
- [5] Wang HL, Cooke J. Periodontal regeneration techniques for treatment of periodontal diseases. *Dent Clin Nerth Am*. 2005;49(3):637-659.
- [6] 萨日娜, 吴岩. 干细胞在口腔医学中的研究与应用特点[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(14): 2635-2637.
- [7] 钟志华, 周先略, 贺国权, 等. 人牙周膜干细胞的多向分化潜能实验[J]. *临床口腔医学杂志*, 2012, 28(4): 211-214.
- [8] Du L, Yang P, Ge S. Stromal cell-derived factor-1 significantly induces proliferation, migration, and collagen type I expression in a human periodontal ligament stem cell subpopulation. *J Periodontol*. 2012; 83(3):379-388.
- [9] Monje ML, Todah, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*. 2003;302(5651):1760-1765.
- [10] Pluchino S, Muzio L, Imitola J, et al. Persistent inflammation alters the function of the endogenous brain stem cell compartment. *Brain*. 2008;131(pt10): 2564-2578.
- [11] Heitz-Mayfield LJ, Trombelli, Heitz F, et al. A systematic review of the effect of surgical debridement vs non-surgical debridement for the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002;29 Suppl 3: 92-102; discussion 160-102.
- [12] Angaji M, Gelskey S, Nogueira-Filho G, et al. A systematic review of clinical efficacy of adjuvntive antibiotics in the treatment of smokers with periodontitis. *J Periodontol*. 2010;81(11):1518-1528.
- [13] Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rve Immunol*. 2007;7(6):454-465.
- [14] Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trend cell Biol*. 2001;11:372-377.
- [15] Suffredini AF, Reda D, Banks SM, et al. Effects of recombinant dimeric TNF receptor on human inflammatory responses following intravenous endotoxin administration. *J Immunol*. 1995;155(10):5038-5045.
- [16] Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, et al. Assesement of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*. 1994;65(2):147-153.
- [17] Montes AH, Asensi V, Alvarez V, et al. The Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism is a risk factor for gram-negative and haematogenous osteomyelitis. *Clin Exp Immunol*. 2006;143:404-413.
- [18] Itoh K, Udagawa N, Kobayashi K, et al. Lipopolysaccharide promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor4. *J Immunol*. 2003;170:3688-3695.
- [19] Lynn WA, Golenbock DT. Lipopolysaccharide antago-nists. *Immunol Today*. 1992;13:271-276.
- [20] Armitage GC, Wu Y, Wang HY, et al. Low prevalence of a periodontitiss associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. *J Periodontol*. 2000;71(2):164-171.
- [21] Ding J, Ghali O, Lencel P, et al. TNF-alpha and IL-1 bqta inhibit RUNX2 and collagen expression but increase allealine phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. *Life Sci*. 2009;84 (15-16): 499-504.

- [22] Palacios D, Mozzelta C, Consalvis, et al. TNF/p38/polycomb signaling to epigenetic control of muscle regeneration. *Cell Stem Cell*. 2010;7(4): 455-469.
- [23] Slots J, Genco RJ Black-pigmented Bacteroides species, Capnocytophaga species, and Actinobacillus actinomycetemitans in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res*. 1984;63:412-421.
- [24] Lindemann RA, Economou JS, Rothermel H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. *J Dent Res*. 1988;67:1131-1135.
- [25] Jang CH, Choi JH, Byun MS, et al. Chloroquine inhibits production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocyte by different modes. *Rheumatology*. 2006;45: 703-710.
- [26] Manjunath BC, Praveen K, Chandrashekar BR, et al. Periodontal infections: a risk factor for various systemic diseases. *Natl Med J India*. 2011;24:214-219.
- [27] Lakschevitz F, Aboodi G, Tenenbaum H, et al. Diabetes and periodontal diseases: interplay and links. *Curr Diabetes Rev*. 2011;7:433-439.
- [28] Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:437-457.
- [29] Hla T, Lee MJ, Ancellin N, et al. Lyso-phospholipids-receptor revelations. *Science* 2001;294:1875-1878.
- [30] Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7: 803-815.
- [31] Wei S, Kitaura H, Zhou P, et al. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115:282-290.
- [32] Redlich K, Hayer S, Ricci R, et al. Osteoclasts are essential for TNF-a-mediated joint destruction. *J Clin Invest*. 2002;110:1419-1427.
- [33] Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, et al. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med*. 2000;343:1594-1602.
- [34] Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD, et al. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N Engl J Med*. 1999; 340: 253-259.
- [35] Gilbert LC, Rubin J, Nanes MS. The p55 TNF receptor mediates TNF inhibition of osteoblast differentiation independently of apoptosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288:E1011-E1018.
- [36] Zhou FH, Foster BK, Zhou XF, et al. TNF-alpha mediates p38 MAP kinase activation and negatively regulates bone formation at the injured growth plate in rats. *J Bone Miner Res*. 2006;21:1075-1088.
- [37] Kitaura H, Sands MS, Aya K, et al. Marrow stromal cells and osteoclast precursors differentially contribute to TNF-a-induced osteoclastogenesis in vivo. *J Immunol*. 2004;173:4838-4846.
- [38] Nanes MS Tumor necrosis factor: Molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene*. 2003;321:1-15.
- [39] Hess K, Ushmorov A, Fiedler J, et al. TNF-alpha promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF-kappaB signaling pathway. *Bone*. 2009;45:367-376.