

白细胞介素 10 对高糖环境下牙槽骨在正畸力作用下骨改建的影响

https://doi.org/10.12307/2022.821

韩瑜, 李文静, 吴洁, 崔占琴

投稿日期: 2021-04-16

采用日期: 2021-06-01

修回日期: 2021-10-08

在线日期: 2021-10-28

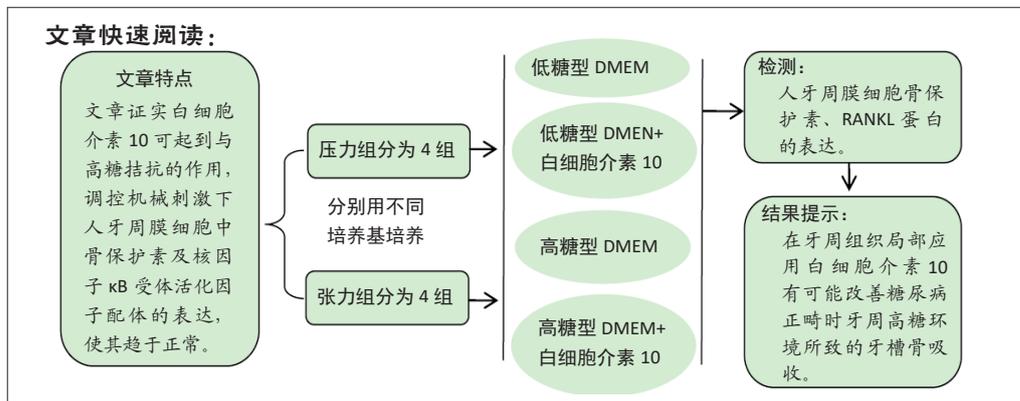
中图分类号:

R783; R446; R318

文章编号:

2095-4344(2022)26-04180-06

文献标识码: A



文题释义:

球冠模型: 球面被平面所截得的一部分叫做球冠, 截得的圆叫做球冠的底, 垂直于截面的直径被截得的一段叫做球冠的高。球冠也可以看成一段圆弧经过它的一个端点的直径旋转所成的曲面。球冠不是几何体, 而是一种曲面, 是球面的一部分, 是球面被一个平面截成的, 球冠的任何部分都不能展开成平面图形。

信号通路: 是指当细胞里要发生某种反应时, 信号从细胞外到细胞内传递了一种信息, 细胞要根据这种信息来做出反应的现象。1980年, M. Rodbell在一篇综述中提到信号转导(signal transduction), 此后这个概念被广泛使用。信号通路是指能将细胞外的分子信号经细胞膜传入细胞内发挥效应的一系列酶促反应通路。这些细胞外的分子信号(称为配体, ligand)包括激素、生长因子、细胞因子、神经递质以及其他小分子化合物等。

摘要

背景: 在正畸矫治力的作用下牙周组织中各种细胞因子水平发生变化, 促使牙槽骨压力侧骨吸收和张力侧骨形成。而糖尿病患者体内的高糖水平及其他炎症因子水平的变化使其骨的代谢表现为吸收大于形成的不平衡状态。

目的: 观察高糖环境下白细胞介素10与机械刺激对人牙周膜细胞中骨保护素、核因子κB受体活化因子配体表达的影响, 探究白细胞介素10对糖尿病患者牙槽骨在正畸力作用下骨改建的影响。

方法: 组织块法培养人牙周膜细胞并鉴定。根据人牙周膜细胞所受机械刺激分为压力组(又分为A, B, C, D组)和张力组(又分为E, F, G, H组), 两组中的4个小组按字母顺序分别用低糖型DMEM、低糖型DMEM+白细胞介素10、高糖型DMEM、高糖型DMEM+白细胞介素10培养基培养, 在0, 12, 24, 48, 72 h 5个时段收集细胞培养上清。采用ELISA法检测各组细胞培养上清液中骨保护素、核因子κB受体活化因子配体蛋白的表达。

结果与结论: ①压力可使人牙周膜细胞骨保护素蛋白表达减少, 核因子κB受体活化因子配体蛋白表达增多, 骨保护素/核因子κB受体活化因子配体比值减小, 高糖可促进此过程, 白细胞介素10与高糖作用相反; 张力可使人牙周膜细胞骨保护素蛋白表达增多, 核因子κB受体活化因子配体蛋白表达减少, 二者的比值升高; 说明高糖抑制此过程, 白细胞介素10与高糖作用相反; ②结果提示, 高糖环境可使机械刺激下的人牙周膜细胞中骨保护素表达减少, 核因子κB受体活化因子配体表达增多, 骨保护素/核因子κB受体活化因子配体比值减小, 白细胞介素10可拮抗高糖的作用。

关键词: 高糖环境; 白细胞介素10; 骨保护素; RANKL; 人牙周膜细胞

缩略语: 核因子κB受体活化因子配体: receptor activator of NF-κB ligand, RANKL; 核因子κB受体活化因子: receptor activator of NF-κB, RANK; 骨保护素: osteoprotegerin, OPG

Effects of interleukin-10 on alveolar bone remodeling under orthodontic force in a high glucose condition

Han Yu, Li Wenjing, Wu Jie, Cui Zhanqin

The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Han Yu, Master, Physician, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Corresponding author: Cui Zhanqin, Master, Professor, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

河北医科大学第二医院, 河北省石家庄市 050000

第一作者: 韩瑜, 女, 1995年生, 河北省邢台市人, 汉族, 2021年河北医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事细胞基础研究。

通讯作者: 崔占琴, 硕士, 教授, 河北医科大学第二医院, 河北省石家庄市 050000

https://orcid.org/0000-0002-1243-2084 (韩瑜)

引用本文: 韩瑜, 李文静, 吴洁, 崔占琴. 白细胞介素 10 对高糖环境下牙槽骨在正畸力作用下骨改建的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(26):4180-4185.



Abstract

BACKGROUND: Orthodontic treatment can change the levels of various cytokines in periodontal tissue, which promotes bone resorption on the tooth pressure side and bone formation on the tooth tension side. Changes in high glucose level and other inflammatory factor levels in diabetic patients induce an imbalance in bone metabolism where absorbed bone tissue is more than that formed.

OBJECTIVE: To observe the effects of interleukin-10 and mechanical stimulation on the expressions of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in human periodontal ligament cells under high glucose environment, and to explore the effect of interleukin-10 on bone remodeling of alveolar bone in diabetic patients under orthodontic force.

METHODS: Human periodontal ligament cells were cultured by tissue explant method. According to the mechanical stimulation the cells received, the cells were divided into stress group (A, B, C, D subgroups) and tension group (E, F, G, H subgroups). Both stress and tension groups included four subgroups (low-glucose DMEM group, low-glucose DMEM group+interleukin-10 group, high-glucose DMEM group, high-glucose DMEM+interleukin-10 group). Cell supernatant was collected at 0, 12, 24, 48, and 72 hours after culture. The expressions of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in the supernatant were detected by ELISA.

RESULTS AND CONCLUSION: Pressure could decrease the expression of osteoprotegerin and increase the expression of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in human periodontal ligament cells, and decreased their ratio. High glucose could promote this process, while the effect of interleukin-10 was opposite to that of high glucose. Tension could increase the expression of osteoprotegerin, decrease the expression of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in human periodontal ligament cells, and increase their ratio. High glucose could inhibit this process, and interleukin-10 had an effect that was opposite to high glucose. To conclude, high glucose environment can reduce the expression of osteoprotegerin, increase the expression of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in human periodontal ligament cells, and decrease their ratio under mechanical stimulation. Whereas, interleukin-10 can antagonize the effect of high glucose.

Key words: high glucose environment; interleukin-10; osteoprotegerin; receptor activator of nuclear factor kappa B ligand; human periodontal ligament cells

How to cite this article: HAN Y, LI WJ, WU J, CUI ZQ. Effects of interleukin-10 on alveolar bone remodeling under orthodontic force in a high glucose condition. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(26):4180-4185.

0 引言 Introduction

牙周组织的改建是正畸治疗的生物学基础，牙齿受到正畸力后压力侧骨吸收、张力侧骨形成，从而达到牙齿移动的目的。而许多影响骨代谢的疾病如牙周炎、糖尿病、骨质疏松、佝偻病等骨代谢的病理状态会影响正畸治疗牙周组织改建的过程，出现牙齿移动速度减慢、牙齿松动等问题^[1-3]。其中糖尿病炎症学说认为，糖尿病患者体内高水平的炎症因子所引起的一系列信号转导等生物学作用会使糖尿病患者骨吸收与骨形成过程的平衡被打破^[4]，最终导致骨质丢失^[5-7]。因此如何避免糖尿病正畸患者骨代谢的紊乱受到了口腔正畸医师的广泛关注。

骨保护素 (osteoprotegerin, OPG)/ 核因子 κ B 受体活化因子 (receptor activator of NF- κ B, RANK)/ 核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) 系统是近年来发现的一条调控破骨细胞分化、形成和成熟的重要通路。骨保护素是一种分泌型糖蛋白，其主要作用是抑制破骨细胞的形成及其活性，从而抑制骨吸收活性；RANKL 为能向破骨细胞的前体细胞传递信息使之分化成破骨细胞的 II 型跨膜蛋白，其主要作用是诱导破骨细胞的前体细胞形成破骨细胞，进而使骨吸收活动增加；RANK 是 I 型跨膜蛋白，是 RANKL 的信号受体，RANKL 与 RANK 结合可促进破骨细胞的分化，激活破骨细胞活性^[8-9]。

白细胞介素 10 作为一种抗炎因子，参与机体的免疫调节^[10]，可上调骨保护素的表达并下调 RANKL 的表达^[11-12]，抵抗炎症因子导致的 OPG/RANKL 下降出现的骨质疏松等临床表现^[13]。以往研究证实糖尿病患者的血清及龈沟液中白细胞介素 10 的含量明显比正常人减少^[14-16]。糖尿病患者的高血糖水平和各种炎症因子水平的变化通过影响 OPG/RANKL/RANK 系统的生物学作用，使糖尿病患者的骨质改变，影响牙齿移动和正畸治疗进程^[17-19]；同时该系统还参与正畸骨改建的过程^[20-21]，且在人牙周膜细胞 (human periodontal ligament cells, hPDLs) 中表达^[22-23]。

此次研究旨在观察高糖环境与白细胞介素 10 对机械刺激下人牙周膜细胞中骨保护素、RANKL 表达的影响，以探究白细胞介素 10 对高糖环境中正畸力作用下牙周组织改建过程的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验观察，采用方差分析进行各组间的比较。

1.2 时间及地点 实验于 2020 年 9 月至 2021 年 3 月在河北医科大学第二医院科研楼完成。

1.3 材料

1.3.1 实验用主要试剂和仪器 低糖 DMEM 培养基 (C1188500BT)、高糖 DMEM 培养基 (C11995500BT)、0.25% 胰蛋白酶 (25200056) 均为美国 Gibco 公司产品；青霉素 / 链霉素溶液 (RC1002, 河北瑞帕特生物科技有限公司)；FBS(P30-3301, 德国 PAN-Biotech 公司)；PBS(O2-024-1ACS, 以色列 Biological Industries 公司)；VIM(ET1610-39)、CK19(ER1803-79) 均为杭州华安生物技术有限公司产品；通用型 SP 试剂盒 (SP-9000, 北京中杉金桥生物技术有限公司)；人骨保护素 ELISA 试剂盒 (ARG81418, 杭州联科生物技术股份有限公司)；人 RANKL ELISA 试剂盒 (RK00341, 武汉爱博泰克生物技术有限公司)。

超净工作台 (Class II BSC, 新加坡 ESCO 公司)；CO₂ 细胞培养箱 (371, 美国赛默飞世尔科技公司)；倒置相差显微镜及摄像系统 (Axio Vert A1)、光学显微镜 (Imager.D2) (均为德国 ZEISS 公司)；低速离心机 (SC-04, 安徽中科中佳科学仪器有限公司)；多功能酶标仪 (Synergy-H1, 河北正皓医疗器械有限公司)。

1.3.2 人牙周膜细胞 取自河北医科大学第二医院口腔科 12-20 岁因正畸治疗需要而拔除的健康前磨牙，取材前向患者及家属说明用途，并获取患者及家属知情同意，同时研究也已得到河北医科大学第二医院伦理委员会批准。

1.4 实验方法

1.4.1 人牙周膜细胞原代培养 人牙周膜细胞取正畸治疗

需要而拔除的健康前磨牙，拔牙前嘱患者含漱氯己定 1.0–2.0 min，用乙醇棉球仔细擦拭待拔除牙齿的牙面。牙离体后，牙冠朝下，牙根朝上在无菌条件下用 PBS 冲洗牙根部，冲去血污后立即置入 4 °C 预冷含双抗 (100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素) 无血清的低糖型 DMEM 培养基中，于 0.5 h 内送至超净工作台进行处理。

在超净工作台中将标本移入培养皿中，使用含双抗的 PBS 反复冲洗直至牙根表面无血污及其他杂质，冲洗液清亮，之后用低糖型 DMEM 培养液漂洗 2 次。更换培养皿，在含有双抗和体积分数 20%FBS 的低糖型 DMEM 培养基润湿的条件下，用手术刀片刮取牙根中 1/3 的牙周膜组织。取 0.5 mL 含有双抗和体积分数 20%FBS 的低糖型 DMEM 培养基润湿培养瓶底，将获取的牙周膜组织块均匀铺于无菌的 50 mL 细胞培养瓶底，瓶底向上反放入 CO₂ 细胞培养箱内培养。2.5–3 h 后翻转培养瓶缓慢加入含双抗和体积分数 20%FBS 的低糖型 DMEM 培养基至 3 mL，继续培养。3 d 后换液，之后两三天换液 1 次，并每天在倒置显微镜下观察细胞生长情况，拍照记录。

人牙周膜细胞原代培养及鉴定

细胞来源	人牙周膜细胞取自因正畸治疗需要而拔除的健康前磨牙
培养基介绍	含有双抗和体积分数 20%FBS 的低糖型 DMEM 培养基
添加材料	100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素；体积分数 20%FBS
培养时间	将牙周膜组织块均匀铺于无菌的 50 mL 细胞培养瓶底，培养 2.5–3 h 后翻转培养瓶缓慢加入含双抗和体积分数 20%FBS 的低糖型 DMEM 培养基至 3 mL，继续培养 3 d
细胞传代	两三天换液 1 次，取第 3 代细胞进行细胞鉴定
细胞鉴定	通过苏木精-伊红染色和免疫组织化学染色进行细胞鉴定
伦理学批准	研究方案的实施符合河北医科大学第二医院的相关伦理要求 (医院伦理批件号：2021-R244，审批时间：2021-03-22)

1.4.2 细胞鉴定 取培养所得第 3 代细胞制作细胞爬片。

(1) 苏木精-伊红染色：制备好的细胞爬片苏木素染液染色 1.0–2.0 min，流动水冲洗；浸入伊红染液染色 2.0–3.0 min，流动水冲洗；自然晾干后中性树胶封固。

(2) 免疫组织化学染色：用 SP 法对人牙周膜细胞进行 CK 和 VIM 染色。取制备好的细胞爬片，滴加适量封闭用山羊血清工作液，室温孵育 10–15 min，倾去血清；滴加适量的一抗 (CK 1 : 100 稀释，VIM 1 : 200 稀释)，PBS 做阴性对照，37 °C 孵育 60 min，PBS 冲洗 3 次，3 min/次；滴加适量生物素标记山羊抗小鼠/兔 IgG，室温孵育 10–15 min，PBS 冲洗 3 次，3 min/次；滴加适量辣根霉标记链霉卵白素工作液，室温孵育 10–15 min，PBS 冲洗 3 次，3 min/次；加入适量新鲜配置的 DAB 显色液，室温孵育，同时在显微镜下观察，显色后流动水冲洗，苏木素染色液染色数秒，流动水冲洗。将细胞爬片梯度乙醇脱水、二甲苯透明，自然晾干后中性树胶封固。

1.4.3 人牙周膜细胞分组 人牙周膜细胞分组前全部用含双抗和体积分数 20%FBS 的低糖型 DMEM 培养基培养。根据人

牙周膜细胞所受机械刺激不同将细胞分为压力组和张力组，分组时以细胞浓度 $1 \times 10^8 L^{-1}$ 接种于培养皿中，每皿 2 mL 培养基。细胞接种后 24 h 全部换液，待细胞接近单层铺满培养皿底时，全部换液，同时根据实验分组进行相应干预。两组各分为 4 个小组，分别用低糖、低糖 + 白细胞介素 10、高糖、高糖 + 白细胞介素 10 培养基培养。具体操作如下：

压力组的 4 个小组，记为 A, B, C, D。A, B 组使用含双抗和体积分数 20%FBS 的低糖型 DMEM (含 D-glucose 1 100 mg/L) 培养基模拟体外正常血糖环境；C, D 组使用含双抗和体积分数 20%FBS 的高糖型 DMEM (含 D-glucose 4 500 mg/L) 培养基模拟体外高糖环境；A, C 组不加白细胞介素 10 干预^[24]；B, D 组加入白细胞介素 10 (25 μg/L) 进行干预。张力组的 4 个小组，记为 E, F, G, H。E, F 组使用含双抗和体积分数 20%FBS 的低糖型 DMEM 培养基模拟体外正常血糖环境；G, H 组使用含双抗和体积分数 20%FBS 的高糖型 DMEM 培养基模拟体外高糖环境；E, G 组不加白细胞介素 10；F, H 组加入白细胞介素 10 (25 μg/L) 进行干预。分别在 0, 12, 24, 48, 72 h 5 个时点收集细胞培养上清，每个时点设 3 个样本。

1.4.4 人牙周膜细胞机械刺激装置

(1) 细胞静态压力刺激装置：人牙周膜细胞静态加压装置见图 1。该装置主要由平底六孔板和圆形玻璃片组成。加力时，直接将已消毒的玻璃片置于接近铺满单层人牙周膜细胞的平底六孔板中，细胞即受玻璃片的单向压力。细胞所受压力计算公式： $P = \rho h$ (P 指细胞所受压力， ρ 为玻璃密度， h 为玻璃厚度)，此次实验选择 $2 g/cm^2$ 压强值^[25-27]。

(2) 细胞静态张力刺激装置：人牙周膜细胞静态拉伸装置见图 2。该装置主要由弹性培养皿、球冠底座和橡皮圈组成。加力时，将接近铺满单层人牙周膜细胞的弹性培养皿置于球冠模型上并用橡皮圈将两者扎紧固定，使培养皿的弹性底面与模具充分接触发生形变，从而可将培养皿底面所受拉伸力传递给生长于其表面的细胞。拉伸应变变量计算公式为：设 $r =$ 球半径， $R =$ 球冠半径， $h =$ 球冠高度，细胞所受的拉伸应变 $=$ (变形后的球冠表面积 - 变形前的球冠表面积) / 球冠底面积 $= (2\pi r h - \pi R^2) / \pi R^2 = 2rh/R^2 - 1$ ，已知 $R = 1.75 cm$ ，改变 r 及 h 即可得出所需要的拉伸应变变量，此次实验选择的弹性膜形变量为 12%^[28-29]。

1.4.5 ELISA 法检测各组骨保护素、RANKL 的表达 ①准备所有的试剂和梯度稀释的标准品。酶标板加入 300 μL 1× 洗液静置浸泡 30 s；②标准品孔加入 100 μL 2 倍倍比稀释的标准品；空白孔加入 100 μL 标准品稀释液；③样本孔加入 100 μL 细胞培养上清；④每孔加入 50 μL 1 : 100 稀释的检测抗体；⑤封板膜封板，室温孵育 2 h；洗涤 6 次；⑥每孔加入 100 μL 1 : 100 稀释的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素；⑦封板膜封板，室温孵育 45 min，洗涤 6 次；⑧每孔加入 100 μL 显色底物，避光，室温孵育 5–30 min；⑨每孔加入 100 μL 终止液；⑩ 5 min 内，在 450 nm 波长检测 A 值并记录数据。

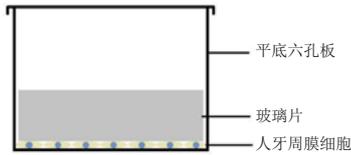
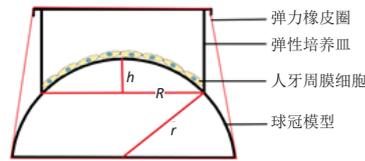


图 1 | 人牙周膜细胞静态机械加压装置示意图
Figure 1 | Static mechanical pressure sketch map of human periodontal ligament cells



图注: r 为球半径; R 为球冠半径; h 为球冠高度

图 2 | 人牙周膜细胞静态机械拉伸装置示意图

Figure 2 | Static mechanical stretch sketch map of human periodontal ligament cells

1.4.6 ELISA 结果计算 取标准品、空白对照和待测样本的 A 值平均值, 所有标准品和待测样本的平均 A 值减去空白对照的 A 值后, 根据标准品 A 值绘制标准曲线, X 轴为标准品的浓度, Y 轴为标准品的平均 A 值, 得到曲线后根据待测样本的 A 值算出相应的浓度。

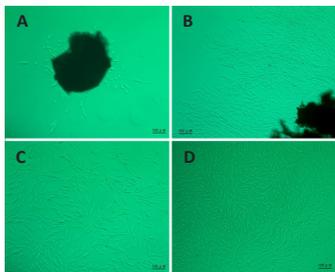
1.5 主要观察指标 ①人牙周膜细胞的原代培养及鉴定; ②压力刺激下高糖与白细胞介素 10 对人牙周膜细胞骨保护素、RANKL 蛋白表达的影响; ③张力刺激下高糖与白细胞介素 10 对人牙周膜细胞骨保护素、RANKL 蛋白表达的影响。

1.6 统计学分析 各组实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析进行各组间的比较, 使用 SPSS 19.0 软件统计, 检验水准 $\alpha=0.05$, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 人牙周膜细胞培养及鉴定结果

2.1.1 倒置显微镜观察 培养 2.5-3 h 后, 组织块基本紧贴培养瓶底; 培养 5-8 d 后可见组织块周围有细胞游出, 胞体为短梭形或多角形, 透明度大, 胞质丰满, 细胞核呈圆形或椭圆形, 位于细胞中央, 内含两三个核仁, 见图 3A; 培养 10-14 d 后可见大量细胞围绕组织块生长, 向四周呈放射状分布, 见图 3B; 待细胞生长面积达培养瓶底 80% 左右时, 即可对细胞进行传代; 传代后的细胞分布均匀, 生长速度增快, 呈束状、旋涡状或放射状分布, 镜下可见细胞呈长梭形, 胞浆均匀, 胞体丰满, 核圆, 核仁清晰, 见图 3C, D。



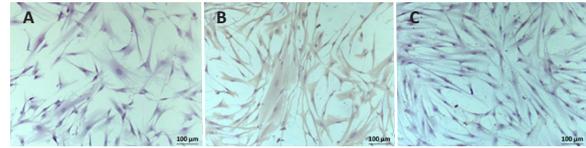
图注: 图 A 为原代培养第 8 天; B 为原代培养第 14 天; C 为第 4 代细胞传代 1 d; D 为第 4 代细胞传代 4 d

图 3 | 人牙周膜细胞原代和传代培养结果 (标尺 =100 μ m)

Figure 3 | The primary and passage culture of human periodontal ligament cells (scale bars=100 μ m)

2.1.2 苏木精-伊红染色光镜下观察 胞体为长梭形或星形, 胞质嗜伊红, 胞核嗜碱性, 为圆形或椭圆形, 位于细胞中央, 内含两三个核仁, 见图 4A。

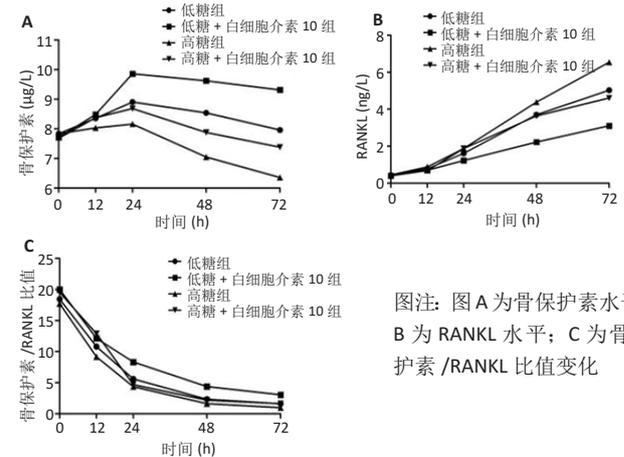
2.1.3 免疫组化染色光镜下观察 VIM 染色阳性, 细胞胞浆呈棕黄色, CK(19) 染色阴性, 见图 4B, C。培养的细胞符合间充质来源的细胞特征, 结合取材部位, 判定所培养细胞为人牙周膜细胞。



图注: 图 A 为苏木精-伊红染色; B 为 VIM 染色阳性; C 为 CK(19) 染色阴性

图 4 | 人牙周膜细胞苏木精-伊红染色及免疫组化染色结果 (标尺 =100 μ m)
Figure 4 | Hematoxylin-eosin staining and immunohistochemical staining of human periodontal ligament cells (scale bars=100 μ m)

2.2 压力刺激下高糖与白细胞介素 10 对人牙周膜细胞骨保护素、RANKL 表达的影响 各组骨保护素蛋白质量浓度在 0-24 h 呈上升趋势, 随后下降, 见图 5A; RANKL 蛋白质量浓度随时间呈上升趋势, 见图 5B; 各组 OPG/RANKL 比值随时间呈下降趋势, 见图 5C。各组骨保护素、RANKL 蛋白质量浓度变化见表 1, 2。



图注: 图 A 为骨保护素水平; B 为 RANKL 水平; C 为骨保护素/RANKL 比值变化

图 5 | 压力组各人牙周膜细胞骨保护素、核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 蛋白水平及二者比值变化

Figure 5 | The protein levels of osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) and OPG/RANKL ratio in different pressure subgroups

表 1 | ELISA 检测压力组各人牙周膜细胞骨保护素蛋白质量浓度 ($\bar{x} \pm s$, μ g/L)
Table 1 | The levels of osteoprotegerin detected by ELISA in different pressure subgroups

加力时间	压力组			
	A 组 (低糖)	B 组 (低糖 + 白细胞介素 10)	C 组 (高糖)	D 组 (高糖 + 白细胞介素 10)
0 h	7.836 8±0.584 3	7.712 0±1.006 4	7.836 7±0.584 3	7.682 1±1.309 0
12 h	8.357 8±0.704 0	8.485 4±1.003 5 ^a	8.031 1±0.165 3 ^a	8.376 9±0.840 7 ^b
24 h	8.906 0±0.512 3	9.862 4±0.403 1 ^a	8.159 2±0.453 4 ^{ac}	8.684 0±0.414 1 ^b
48 h	8.541 3±0.344 5	9.622 7±0.568 0 ^a	7.047 3±0.937 9 ^{ac}	7.879 0±0.398 6 ^b
72 h	7.960 3±0.372 4	9.315 1±0.590 3 ^a	6.355 7±0.559 5 ^{ac}	7.379 6±0.791 9 ^b

表注: 与 A 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 C 组比较, ^b $P < 0.05$; 组内与 12 h 比较, ^c $P < 0.05$

表2 | ELISA 检测压力组各組人牙周膜细胞 RANKL 蛋白质质量浓度 ($\bar{x}\pm s$, ng/L)
Table 2 | The levels of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand detected by ELISA in different pressure subgroups

加力时间	压力组			
	A 组 (低糖)	B 组 (低糖 + 白细胞介素 10)	C 组 (高糖)	D 组 (高糖 + 白细胞介素 10)
0 h	0.425 0±0.018 2	0.396 2±0.084 8	0.441 9±0.005 0	0.394 9±0.049 7
12 h	0.776 7±0.032 0	0.698 2±0.041 0 ^a	0.878 3±0.033 5 ^a	0.685 6±0.170 7 ^b
24 h	1.613 1±0.198 5	1.220 4±0.293 9 ^a	1.877 2±0.051 6 ^a	1.867 3±0.097 1 ^b
48 h	3.704 1±0.222 2	2.220 2±0.299 3 ^a	4.380 5±0.424 9 ^a	3.635 1±0.287 5 ^b
72 h	5.032 1±0.547 1	3.100 1±0.468 0 ^a	6.542 9±0.501 5 ^a	4.608 7±0.377 9 ^b

表注: 与 A 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 C 组比较, ^b $P < 0.05$; 各組组内各时点间两两比较, 均 $P < 0.05$ 。RANKL: 核因子 κB 受体活化因子配体

2.3 张力刺激下高糖与白细胞介素 10 对人牙周膜细胞骨保护素、RANKL 表达的影响 各組骨保护素质量浓度随时间呈上升趋势, 见图 6A; E, F 组 RANKL 质量浓度 0-24 h 呈上升趋势, 后随时间逐渐下降; G, H 组 RANKL 质量浓度 0-48 h 呈上升趋势, 后随时间开始下降, 见图 6B; E, F 组 OPG/RANKL 比值随时间呈上升趋势, G, H 组 OPG/RANKL 比值 0-48 h 呈下降趋势, 后随时间开始上升, 见图 6C。各組骨保护素、RANKL 质量浓度变化见表 3, 4。

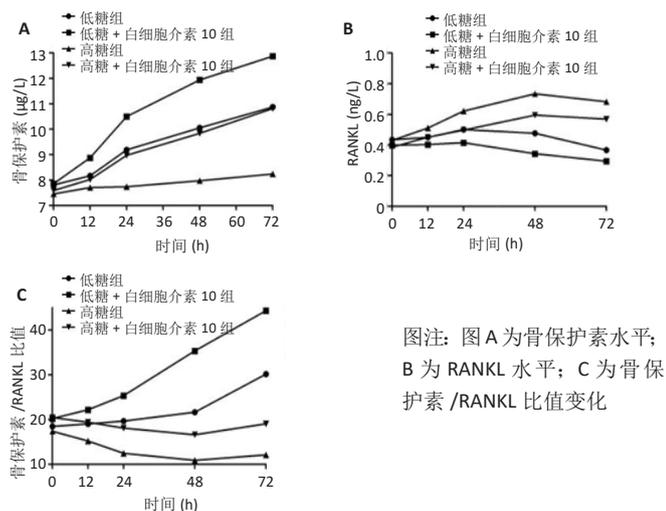


图 6 | 张力组各組人牙周膜细胞骨保护素、核因子 κB 受体活化因子配体 (RANKL) 蛋白水平及二者比值变化

Figure 6 | The protein levels of osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) and OPG/RANKL ratio in different tension groups

表3 | ELISA 检测张力组各組人牙周膜细胞骨保护素蛋白质质量浓度 ($\bar{x}\pm s$, $\mu g/L$)
Table 3 | The levels of osteoprotegerin detected by ELISA in different tension subgroups

加力时间	张力组			
	E 组 (低糖)	F 组 (低糖 + 白细胞介素 10)	G 组 (高糖)	H 组 (高糖 + 白细胞介素 10)
0 h	7.809 5±0.890 6	7.858 3±0.969 1	7.454 3±0.740 5 ^a	7.586 7±1.136 3 ^{bc}
12 h	8.166 4±0.665 1	8.875 7±0.790 1 ^{ad}	7.701 9±0.089 6 ^a	8.021 2±0.946 5 ^{bc}
24 h	9.189 4±1.016 8	10.499 1±0.556 4 ^{ade}	7.735 8±0.559 0 ^a	8.970 1±0.518 5 ^{bc}
48 h	10.051 1±0.045 8 ^c	11.939 4±0.842 9 ^{ade}	7.972 9±0.294 4 ^a	3.635 1±0.287 5 ^{bc}
72 h	10.870 9±0.366 4 ^c	12.872 4±0.971 3 ^{ade}	8.238 8±0.122 5 ^{af}	10.814 0±0.374 9 ^b

表注: 与 E 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 G 组比较, ^b $P < 0.05$; E 组内与 0 和 12 h 比较, ^c $P < 0.05$; F 组内与 0 h 比较, ^d $P < 0.05$; 与 12 h 比较, ^e $P < 0.05$; G 组内与 12 h 比较, ^f $P < 0.05$; H 组内与 72 h 比较, ^{bc} $P < 0.05$

表4 | ELISA 检测张力组各組人牙周膜细胞 RANKL 蛋白质质量浓度 ($\bar{x}\pm s$, ng/L)
Table 4 | The levels of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand detected by ELISA in different tension subgroups

加力时间	张力组			
	E 组 (低糖)	F 组 (低糖 + 白细胞介素 10)	G 组 (高糖)	H 组 (高糖 + 白细胞介素 10)
0 h	0.433 9±0.071 3	0.397 6±0.066 8 ^a	0.429 9±0.010 4	0.385 3±0.084 3 ^b
12 h	0.449 7±0.124 3	0.403 0±0.045 8 ^a	0.510 5±0.050 4 ^a	0.450 2±0.123 7 ^b
24 h	0.500 6±0.168 3	0.414 6±0.019 5 ^a	0.621 3±0.022 8 ^{ad}	0.497 0±0.011 2 ^b
48 h	0.476 3±0.095 7	0.342 8±0.058 5 ^a	0.733 4±0.014 5 ^{ade}	0.594 4±0.017 2 ^{bc}
72 h	0.366 4±0.057 8	0.293 9±0.029 0 ^{ac}	0.682 4±0.018 8 ^{adef}	0.5684±0.0165 ^{bc}

表注: 与 E 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 G 组比较, ^b $P < 0.05$; F 组内与 24 h 比较, ^c $P < 0.05$; G 组内与 0 和 12 h 比较, ^d $P < 0.05$; 与 24 h 比较, ^e $P < 0.05$; 与 48 h 比较, ^f $P < 0.05$; H 组内与 0, 12, 24 h 比较, ^{bc} $P < 0.05$ 。RANKL: 核因子 κB 受体活化因子配体

3 讨论 Discussion

人牙周膜细胞是牙周膜中数量最多、功能最重要的细胞, 也是正畸过程中的主效应细胞^[30]。在正畸治疗的过程中, 牙齿受到正畸力后将机械应力传递给牙周膜, 人牙周膜细胞首先感受到正畸力并将所受到的力学信号转变为化学信号, 引发牙周组织一系列生物学改变与牙槽骨改建, 可见人牙周膜细胞是牙周组织改建的生物学基础。因此作者通过体外培养人牙周膜细胞探究在高糖环境下机械刺激合并白细胞介素 10 干预能否影响人牙周膜细胞中骨保护素、RANKL 的表达, 以探讨白细胞介素 10 能否对糖尿病患者正畸治疗过程中骨改建产生有利的调控作用。

此次实验发现, 人牙周膜细胞受到压力刺激后骨保护素先小幅上升后下降, RANKL 则随时间逐渐上升, OPG/RANKL 比值随时间逐渐下降, 符合正畸治疗压力侧骨吸收的理论。人牙周膜细胞受到张力刺激后骨保护素随时间逐渐上升, RANKL 则在小幅度上升后下降, OPG/RANKL 比值随时间逐渐上升, 符合正畸治疗张力侧骨形成的理论。高糖环境可加速压力刺激下人牙周膜细胞中骨保护素的下降及 RANKL 的上升, 同时减缓张力刺激下人牙周膜细胞中骨保护素的上升, 加速 RANKL 的下降, 且各时间点 OPG/RANKL 比值较正常明显降低。说明高糖环境中牙槽骨压力侧的骨吸收活动更明显, 张力侧的骨形成活动更微弱, 提示在正畸临床上对于糖尿病患者应予以轻力矫治, 避免矫治力过大引起牙槽骨的异常骨吸收及牙齿松动, 影响正畸进程及患者牙齿、牙周的健康。实验中加入白细胞介素 10 进行干预后发现白细胞介素 10 可上调骨保护素下调 RANKL, 使骨保护素、RANKL 的表达及 OPG/RANKL 比值趋近于正常, 说明高糖环境中白细胞介素 10 可调控人牙周膜细胞受机械刺激后骨保护素及 RANKL 的表达。

实验中所用的自制压力及张力装置结构简单易于获取, 使用前进行高温高压消毒或环氧乙烷消毒即可, 能反复使用, 与其他细胞加力装置相比价格低廉易于获取且使用方法简单易于掌握。其中压力装置在加力时将玻璃片直接放入平底六孔板的培养皿中, 玻璃片的质量使细胞受单向压力, 与正畸临床加力后压力侧细胞受力情况相近, 此次实验选择 2 g/cm²

压强值^[25-27]。张力装置加力时用橡皮圈将弹力培养皿和球冠模型扎紧固定,弹力培养皿底部随球冠模型发生形变,使位于皿底的细胞受到拉伸力发生相应形变,与正畸临床加力后拉力侧细胞受力情况相似。球冠的高度和底面积不同,细胞受到的拉伸力也不同,拉伸应变通过计算球冠表面积的变化得出,此次实验选择的弹性膜形变量为12%^[28-29]。

结论:综上所述,在人牙周膜细胞受到机械刺激条件下,高糖环境可使人牙周膜细胞中骨保护素表达减少,RANKL表达增多,OPG/RANKL比值减小。而白细胞介素10则可拮抗高糖的作用,使人牙周膜细胞中骨保护素表达增多,RANKL表达减少,OPG/RANKL比值增大。结果提示在牙周组织局部应用白细胞介素10有可能对糖尿病患者正畸治疗中的骨改建产生有利的调控作用。因此次实验为细胞实验,所得结果有一定的局限性,相关的动物及临床试验仍需进一步研究。

作者贡献:韩瑜(第一作者)实验设计并实施,李文静(第二作者)实验设计,吴洁(第三作者)进行实验实施,崔占琴(通讯作者)进行实验评估,为盲法评估。

经费支持:该文章没有接受任何经费支持。

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。

机构伦理问题:研究方案的实施符合河北医科大学第二医院的相关伦理要求(医院伦理批件号:2021-R244,审批时间2021-03-22)。

知情同意问题:患者和家属对取材及用途均完全知情同意。

写作指南:该研究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》。

文章查重: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。

文章外审: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。

生物统计学声明:文章统计学方法已经河北医科大学第二医院生物统计学专家审核。

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。

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。

4 参考文献 References

- GRAVES DT, DING Z, YANG Y. The impact of diabetes on periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2020;82(1):214-224.
- PICKE AK, CAMPBELL G, NAPOLI N, et al. Update on the impact of type 2 diabetes mellitus on bone metabolism and material properties. *Endocr Connect*. 2019;8(3):55-70.
- NAJEEB S, SIDDIQUI F, QASIM SB, et al. Influence of uncontrolled diabetes mellitus on periodontal tissues during orthodontic tooth movement: a systematic review of animal studies. *Prog Orthod*. 2017;18(1):5-12.
- 迟家敏. 实用糖尿病学 [M]. 4版. 北京:人民卫生出版社, 2015.
- 勾忠平, 李秀钧. 糖尿病属慢性炎症性疾病——慢性炎症新概念释义与讨论 [J]. *实用糖尿病杂志*, 2007,3(2): 5-7.
- ACHARYA AB, THAKUR S, MUDDAPUR MV. Evaluation of serum interleukin-10 levels as a predictor of glycemic alteration in chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *J Indian Soc Periodontol*. 2015;19(4):388-392.
- RODIC T, WÖLFEL EM, MILOVANOVIC P, et al. Bone quality analysis of jaw bones in individuals with type 2 diabetes mellitus-post mortem anatomical and microstructural evaluation. *Clin Oral Investig*. 2021; 25(7):4377-4400.

- THEOLEVRE S, WITTRANT Y, TAT SK, et al. The molecular triad OPG/RANK/RANKL:involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;5(6):457-475.
- TROUVIN AP, GOËB V. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging*. 2010;19(5):345-354.
- BOBHATE A, VISWANATHAN V, ARAVINDHAN V. Anti-inflammatory cytokines IL-27, IL-10, IL-1Ra and TGF- β in subjects with increasing grades of glucose intolerance (DM-LTB-2). *Cytokine*. 2021;137:155333.
- RIOS-ARCE ND, DAGENAIS A, FEENSTRA D, et al. Loss of interleukin-10 exacerbates early Type-1 diabetes-induced bone loss. *Cell Physiol*. 2020;235(3):2350-2365.
- ZHENG J, CHEN S, ALBIERO ML, et al. Diabetes Activates Periodontal Ligament Fibroblasts via NF- κ B In Vivo. *Dent Res*. 2018;97(5):580-588.
- JEON HH, TEIXEIRA H, TSAI A. Mechanistic Insight into Orthodontic Tooth Movement Based on Animal Studies: A Critical Review. *J Clin Med*. 2021;10(8):1733.
- VAN EXEL E, GUSSEKLOO J, DE CRAEN AJ, et al. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes*. 2002;51(4): 1088-1092.
- RIOS-ARCE ND, DAGENAIS A, FEENSTRA D, et al. Loss of interleukin-10 exacerbates early Type-1 diabetes-induced bone loss. *Cell Physiol*. 2020;235(3):2350-2365.
- RIBEIRO IS, PEREIRA ÍS, SANTOS DP, et al. Association between body composition and inflammation: A central role of IL-17 and IL-10 in diabetic and hypertensive elderly women. *Exp Gerontol*. 2019;127: 110734.
- ZHANG F, YANG Y, LEI H, et al. A meta-analysis about the association between-1082G/A and-819C/T polymorphisms of IL-10 gene and risk of type 2 diabetes. *Hum Immunol*. 2013;74(5):618-626.
- TAI N, YASUDA H, XIANG Y, et al. IL-10-conditioned dendritic cells prevent autoimmune diabetes in NOD and humanized HLA-DQ8/RIP-B7.1 mice. *Clin Immunol*. 2011;139(3):336-349.
- LI Y, JACOX LA, LITTLE SH, et al. Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications. *Kaohsiung J Med Sci*. 2018;34(4): 207-214.
- YANG CY, JEON HH, ALSHABAB A, et al. RANKL deletion in periodontal ligament and bone lining cells blocks orthodontic tooth movement. *Int J Oral Sci*. 2018;10(1):27-35.
- NAJEEB S, SIDDIQUI F, QASIM SB, et al. Influence of uncontrolled diabetes mellitus on periodontal tissues during orthodontic tooth movement: a systematic review of animal studies. *Prog Orthod*. 2017; 18(1):1-7.
- SANTAMARIA-JR M, DO NASCIMENTO ERA, BAGNE L, et al. Palpal outcomes in orthodontic tooth movement in diabetes mellitus. *Odontology*. 2021;109(4):921-929.
- SASAKI F, HAYASHI M, ONO T, et al. The regulation of RANKL by mechanical force. *J Bone Miner Metab*. 2021;39(1):34-44.
- ZHANG L, DING Y, RAO GZ, et al. Effects of IL-10 and glucose on expression of OPG and RANKL in human periodontal ligament fibroblasts. *Braz J Med Biol Res*. 2016;49(4):e4324.
- JANJIC M, DOCHEVA D, TRICKOVIC JANJIC O, et al. In Vitro Weight-Loaded Cell Models for Understanding Mechanodependent Molecular Pathways Involved in Orthodontic Tooth Movement: A Systematic Review. *Stem Cells Int*. 2018;2018:1-17.
- KANZAKI H, CHIBA M, SHIMIZU Y, et al. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *Bone Miner Res*. 2002;17(2):210-220.
- 黄生高, 张兴建, 熊培颖, 等. 持续静压力对人人牙周膜细胞 OPG 及 ODFmRNA 表达的影响 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2006,22(6):347-350.
- NGAN P, SAITO S, SAITO M, et al. The interactive effects of mechanical stress and interleukin-1 beta on prostaglandin E and cyclic AMP production in human periodontal ligament fibroblasts in vitro: comparison with cloned osteoblastic cells of mouse (MC3T3-E1). *Arch Oral Biol*. 1990;35(9):717-725.
- 麻健丰, 胡军, 张秀华, 等. 静态拉伸应变对人人牙周膜成纤维细胞的影响 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2003,19(5):439-442.
- WEIDER M, SCHRÖDER A, DOCHEVA D, et al. A Human Periodontal Ligament Fibroblast Cell Line as a New Model to Study Periodontal Stress. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):7961.

(责任编辑: WZH, ZN, SX)