

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.12.004

静态压力对人牙周膜干细胞凋亡相关蛋白表达的影响*

申琳¹ 刘文佳² 杨振华¹ 马小杰¹ 李彦尧¹ 金钊^{1△}

(1 第四军医大学口腔医院正畸科 军事口腔医学国家重点实验室 陕西 西安 710032;

2 第四军医大学口腔医院组织工程研发中心 军事口腔医学国家重点实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨体外模拟正畸牙移动过程中机械压力对人牙周膜干细胞(HPDLSC)凋亡相关蛋白表达的影响。**方法:**将体外培养的 HPDLSC 分别在自行研发的加压力装置中进行 100、200 Kpa 加压 1、6 和 12 h 后, 检测和比较其凋亡相关蛋白 caspase-3 和 caspase-8 的表达; 流式细胞仪检测其凋亡状态。**结果:**100 Kpa 加压 1 h 的 HPDLSCs 中 caspase-3 和 caspase-8 的蛋白表达及其凋亡水平均显著高于对照组($P<0.05$), 而加力 12 h 的 HPDLSCs 中 caspase-3 和 caspase-8 的蛋白表达和凋亡水平与对照组比较无统计学差异($P>0.05$)。200 Kpa 加力 1 h 的 HPDLSCs 中 caspase-3 和 caspase-8 的蛋白表达和凋亡水平均显著低于对照组($P<0.05$), 而加力 12 h 的 HPDLSCs 中 caspase-3 和 caspase-8 的蛋白表达和凋亡水平与对照组比较无统计学差异($P>0.05$)。**结论:**在体外模拟正畸牙移动过程中, 不同强度静态压力作用不同时间对人牙周膜干细胞的凋亡作用不同, 100 Kpa 静态加力加压 1 h 可更有效地促进人牙周膜干细胞的凋亡, 而 200 Kpa 静态加力加压 1 h 可抑制人牙周膜干细胞的凋亡。

关键词:静态压力; 人牙周膜干细胞; 细胞凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-8

中图分类号:R783.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)12-2213-06

Effect of Static Pressure on the Expression of Apoptosis Related Protein in HPDLSC*

SHEN Lin¹, LIU Wen-jia², YANG Zhen-hua¹, MA Xiao-jie¹, LI Yan-jiao¹, JIN Fang^{1△}

(1 State Key Laboratory of Military Stomatology, Department of Orthodontics, School of Stomatology, The Fourth Military University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2 State Key Laboratory of Military Stomatology, Center for Tissue Engineering, School of Stomatology, The Fourth Military University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of static pressure on the expression of apoptosis related protein in HPDLSCs. **Methods:** HPDLSCs cultured in vitro were incubated under continuous static pressure of 100 Kpa and 200 Kpa for 1 h, 6 h and 12 h. The expression of apoptosis related protein caspase-3 and caspase-8 in HPDLSCs were tested by Western Blot. The apoptosis level of HPDLSCs was determined by Flow cytometry. **Results:** Under the static pressure of 100 Kpa for 1 h, both the expressions of the apoptosis related protein caspase-3 and caspase-8 and the level of apoptosis increased more significantly than that of the controls ($P<0.05$), but no statistical significance was found when the static pressure continued for 12 h ($P>0.05$). Under the static pressure of 200 Kpa for 1 h, both the expressions of the apoptosis related protein caspase-3 and caspase-8 and the level of apoptosis were lower than that of the controls ($P<0.05$), but no statistical significance was found when the static pressure continued for 12 h ($P>0.05$). **Conclusions:** Continuous static pressure of 100 kpa for 1 h promotes apoptosis, while continuous static pressure of 200 kpa for 1 h inhibits apoptosis.

Key words: Static pressure; HPDLSC; Apoptosis; Caspase-3; Caspase-8

Chinese Library Classification (CLC): R783.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)12-2213-06

前言

细胞凋亡(apoptosis)是基因调控下细胞主动而有序的死亡过程, 又称程序性细胞死亡, 在个体发育和维持机体内环境稳定方面具有重要的生物学意义^[1]。在牙周组织生长发育和正常改建过程中, 牙周膜细胞不断进行新陈代谢, 自我更新, 存在大量的细胞增殖和细胞凋亡, 而后者在此过程中具有重要作用。研究发现细胞凋亡与组织的重建密切相关, 而力学因素可促进

组织的改建^[2]。

在正畸牙移动过程中, 牙齿在机械力的作用下不断在牙槽骨中发生移动, 进而实现牙周组织的适应性改建。而这种压力环境是否会增强牙周膜细胞凋亡? 这个问题与牙周组织的改建、牙槽骨吸收等问题的产生机制直接相关。本研究通过体外模拟正畸牙齿移动过程, 观察压力环境下人牙周膜成纤维细胞凋亡相关蛋白表达水平的变化, 旨在为正畸牙移动生物力学机制和牙周组织重建提供实验和理论基础。

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81171001)

作者简介: 申琳(1988-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 口腔正畸生物力学, E-mail: 773673513@qq.com

△ 通讯作者: 金钊(1973-), 男, 硕士生导师, 副教授, 副主任医师, 主要研究方向: 口腔正畸生物力学, E-mail: jinfang@fimmu.edu.cn

(收稿日期: 2014-11-18 接受日期: 2014-12-12)

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂和仪器

α -MEM 培养基胰蛋白酶(Gibco, 美国); 体视显微镜, 倒置相差显微镜(OLYMPUS, 日本); 酶标仪(BIO-TEC, 美国); 6 孔板(Thermo, 美国); 12 孔板(Thermo, 美国); 细胞培养箱(Thermo, 美国); 25 cm² 培养瓶; 75 cm² 培养瓶; Annexin V PE 细胞凋亡检测试剂盒(BD, 美国); 胎牛血清(杭州四季青); β -Actin、caspase-3、caspase-8、PPAR- γ 、IPL、ALP 和 sp7 单克隆抗体(abcam, 美国); YJ-875 型超净工作台(苏州净化设备厂); 流式细胞仪(Beckman-Coulter, 美国); 离心机(Kubota2100, 日本)。

1.2 HPDLSC 的分离培养和干细胞特性鉴定

1.2.1 HPDLSC 的分离培养 第四军医大学口腔医院门诊颌面外科取因正畸需要而拔除的前磨牙, 采用全牙消化法进行原代培养牙周膜干细胞, 37 °C, 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养, 待细胞贴壁达 80% 后, 再经低密度接种法筛选出人牙周膜干细胞, 取第 3-5 代 HPDLSC 细胞备用。

1.2.2 HPDLSC 的多向分化能力鉴定 将 HPDLSC 接种于六孔板和 75 cm² 培养瓶中, 分别进行成骨和成脂诱导, 并采用 Western Blot 检测 PPAR- γ 、IPL、ALP 和 sp7 的蛋白表达。

1.3 HPDLSC 压力加载

取生长良好的第 3 代 hPDLSC, 以 1×10^5 个 /mL 接种在 6 孔板中, 培养 24 h 后进行加力。实验组分为 100 Kpa/1 h、100 Kpa/6 h 和 100 Kpa/12 h 组; 200 Kpa/1 h、200 Kpa/6 h 和 200 Kpa/12 h 组; 设置对照组: 培养板置加压箱内, 不加压作为对照。实验组加力采用专为本系列研究自行设计制作的可控液压细胞加载系统, 类似于 Yousefian 系统。采用国产元件设置高压

舱, 加压气流量调控器和气流量调控器, 进出加压舱的气流量可调且较恒定。本系统的加压范围在 0-300 Kpa, 可任意调节加载值, 误差 <1 kpa, 系统密闭性好, 可对细胞加以恒定载荷。

1.4 凋亡相关蛋白 caspase-3 和 caspase-8 的检测

分别取加载 100 Kpa/1 h、100 Kpa/6 h 和 100 Kpa/12 h; 200 Kpa/1 h、200 Kpa/6 h 和 200 Kpa/12 h 的 hPDLSC, 用细胞裂解液提取样品细胞蛋白; 超生仪震荡后, 进行离心 12000 r/min, 10 min; BCA 法测定蛋白浓度后, 定量, 利用制胶板配置好后进行加样, SDS-PAGE 电泳, 转膜, 封闭, 利用免疫反应化学发光剂上机检测 caspase-3 和 caspase-8 蛋白的表达, 以 β -Actin 作为内参。

1.5 凋亡水平的检测

分别取加载 100 Kpa/1 h、100 Kpa/6 h 和 100 Kpa/12 h; 200 Kpa/1 h、200 Kpa/6 h 和 200 Kpa/12 h 的 hPDLSC, 胰酶消化后将细胞重悬于含 30 mL/L 胎牛血清的 PBS, 调整细胞密度至每组 1×10^6 个 /mL, 按照 Annexin V PE 细胞凋亡检测试剂盒说明检测各组细胞的凋亡水平。

1.6 统计学分析

使用 SPSS19.0 软件进行统计分析, 多组间计量资料的比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 snk-q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 人牙周膜干细胞的培养与鉴定

纯化后的人牙周膜干细胞呈长梭形生长, 见图 1。经成骨成脂诱导结果显示其 PPAR- γ 、IPL、ALP 和 sp7 的蛋白表达均显著增加, 提示具有多向分化能力, 符合干细胞特性, 见图 2。

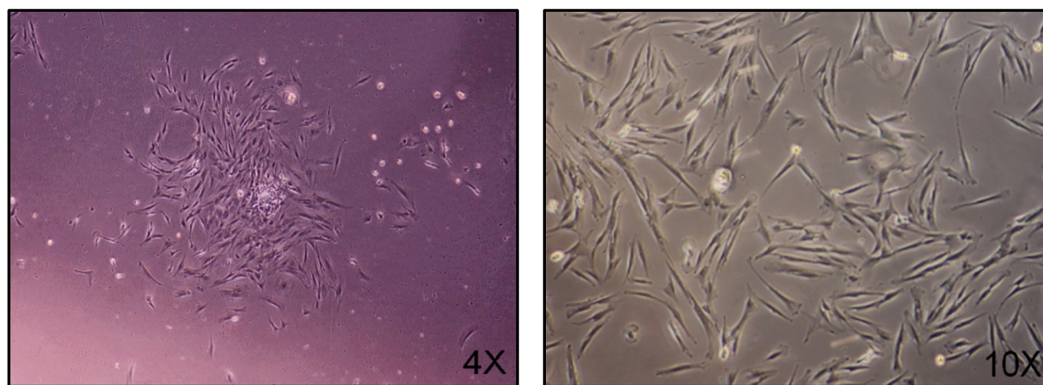


图 1 原代和传代培养的 HPDLSCs

Fig.1 Primary culture and subculture of HPDLSCs

2.2 不同程度静态压力对 HPDLSCs 中 caspase-3 和 caspase-8 蛋白表达的影响

100 Kpa 加力 1 h 的 HPDLSCs 中 caspase-3 和 caspase-8 的蛋白表达均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而加力 12 h 的 HPDLSCs 中 caspase-3 和 caspase-8 的蛋白表达与对照组比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 见图 3。200 Kpa 加力 1 h 的 HPDLSCs 中 caspase-3 和 caspase-8 的蛋白表达均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 而加力 12 h 的 HPDLSCs 中 caspase-3 和 caspase-8 的蛋白表达与对照组比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 见图 4。100 Kpa 加

力 1h 的 HPDLSCs 中 caspase-3 和 caspase-8 的蛋白表达均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 200 Kpa 加力 1 h 的 HPDLSCs 中 caspase-3 和 caspase-8 的蛋白表达均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 见图 5。

2.3 不同程度静态压力对 HPDLSCs 凋亡的影响

人牙周膜干细胞在体外静态加压组 100 Kpa 加力 1 h 的凋亡水平明显高于对照组 ($P < 0.05$), 而加力 12h 的 HPDLSCs 的凋亡水平与对照组比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 见图 6。200 Kpa 加力 1h 的 HPDLSCs 凋亡水平显著低于对照组 ($P < 0.05$), 而加

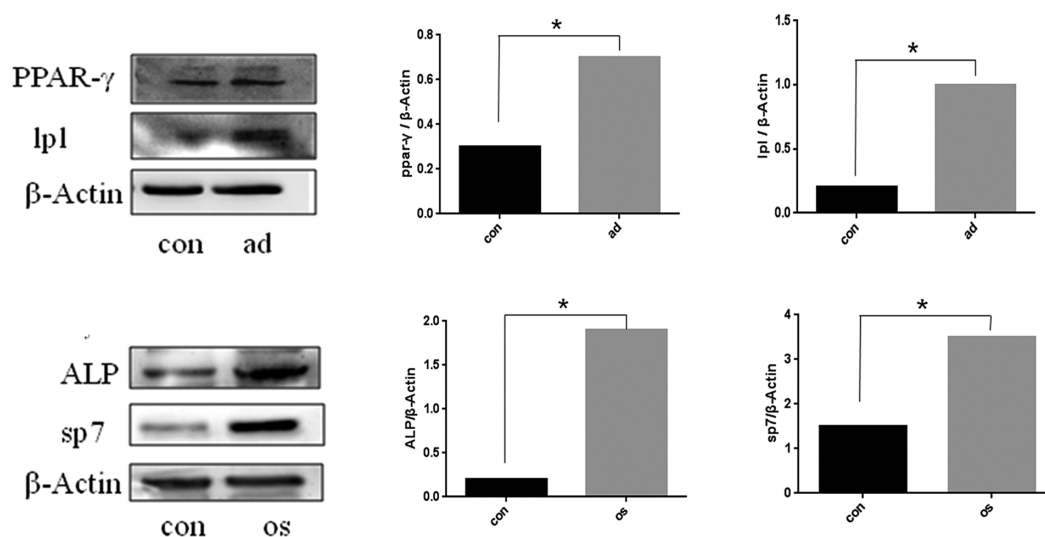


图 2 HPDLSCs 中成骨成脂诱导后相应蛋白的表达(* $P < 0.05$)

Fig.2 Expressions of related proteins in the HPDLSCs after osteogenesis and adipogenesis induction(* $P < 0.05$)

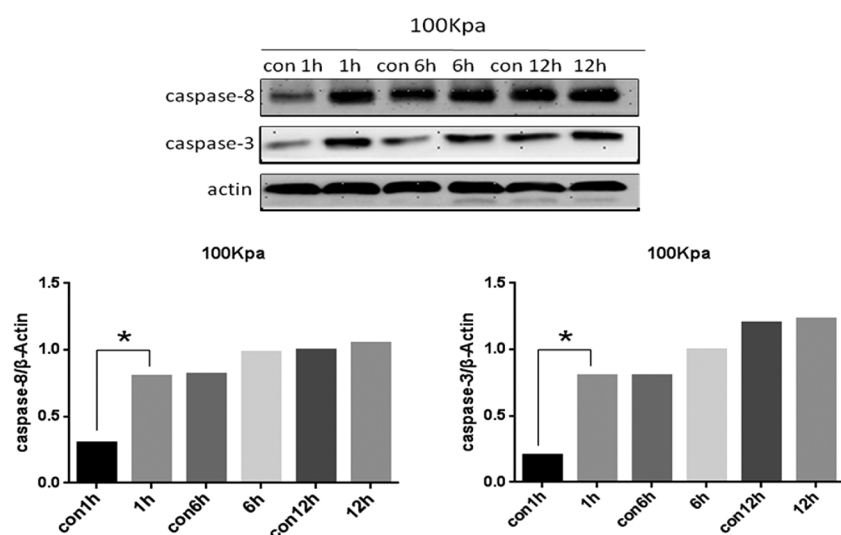


图 3 100 Kpa 静态压力加力 1、6 和 12 h 对 HPDLSCs 中 caspase-3 和 caspase-8 蛋白表达的影响(* $P < 0.05$)

Fig.3 Effect of 100 Kpa static pressure on the expressions of the apoptosis related protein caspase-3 and caspase-8(* $P < 0.05$)

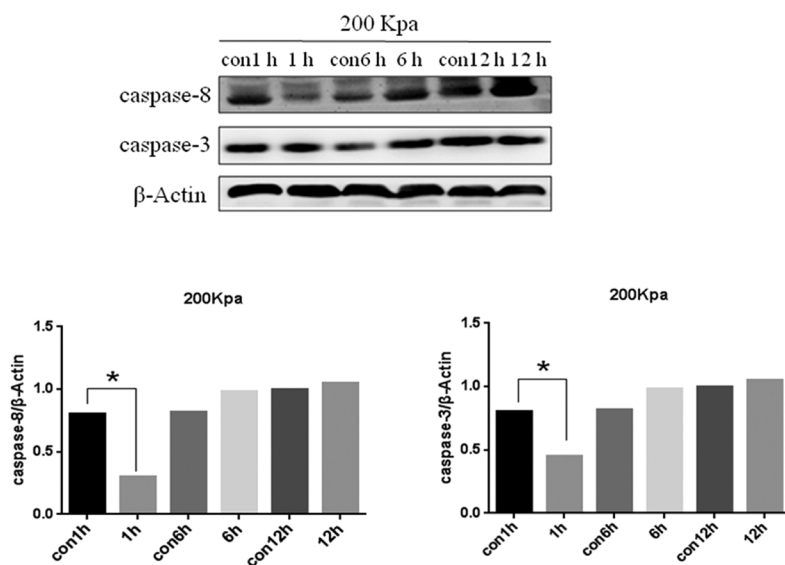


图 4 200 Kpa 静态压力加力 1、6 和 12 h 对 HPDLSCs 中 caspase-3 和 caspase-8 蛋白表达的影响(* $P < 0.05$)

Fig.4 Effect of 200 Kpa static pressure on the expressions of the apoptosis related protein caspase-3 and caspase-8(* $P < 0.05$)

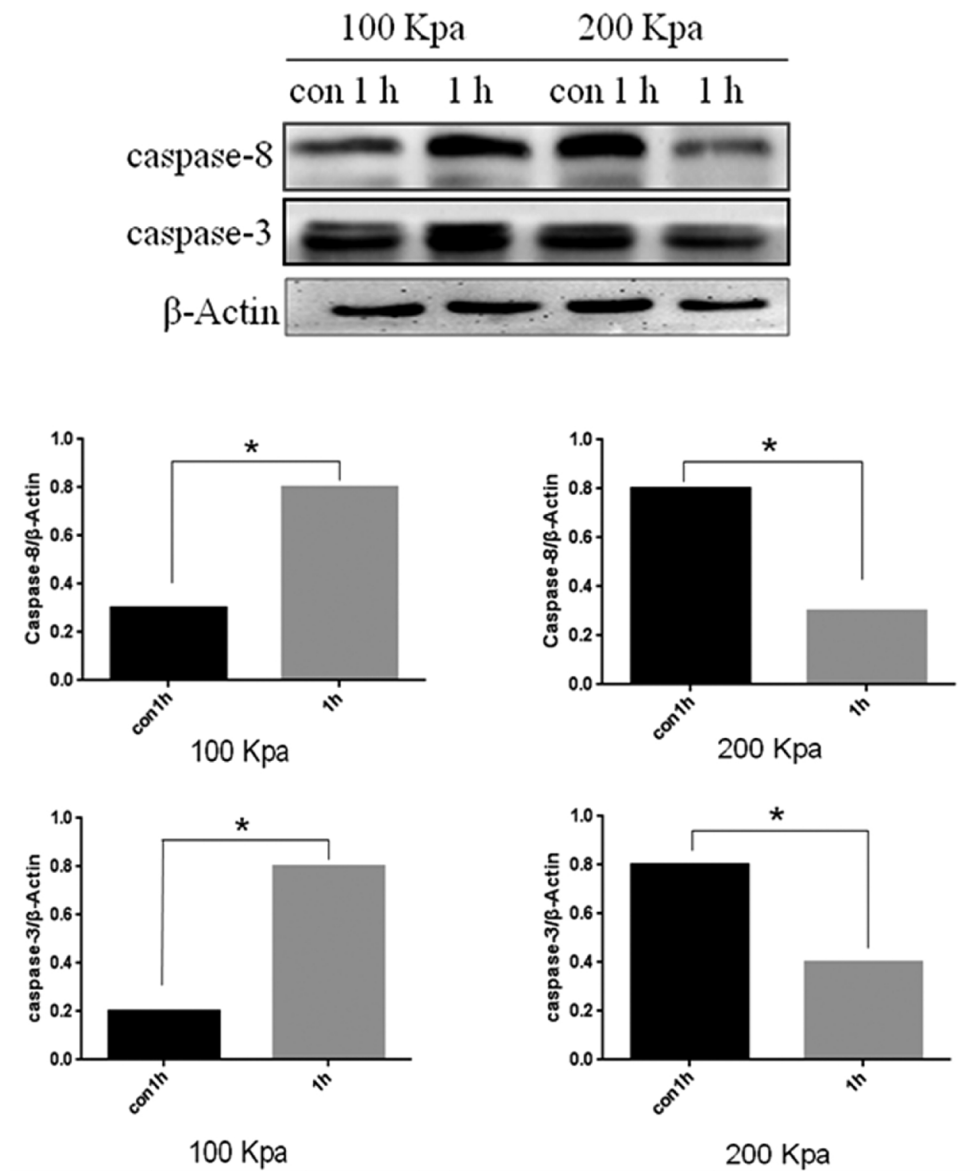


图 5 100Kpa 和 200 Kpa 静态压力加力 1 h 对 HPDLSCs 中 caspase-3 和 caspase-8 蛋白表达的影响(* $P < 0.05$)

Fig.5 Effect of 100Kpa and 200 Kpa static pressure on the expressions of the apoptosis related protein caspase-3 and caspase-8(* $P < 0.05$)

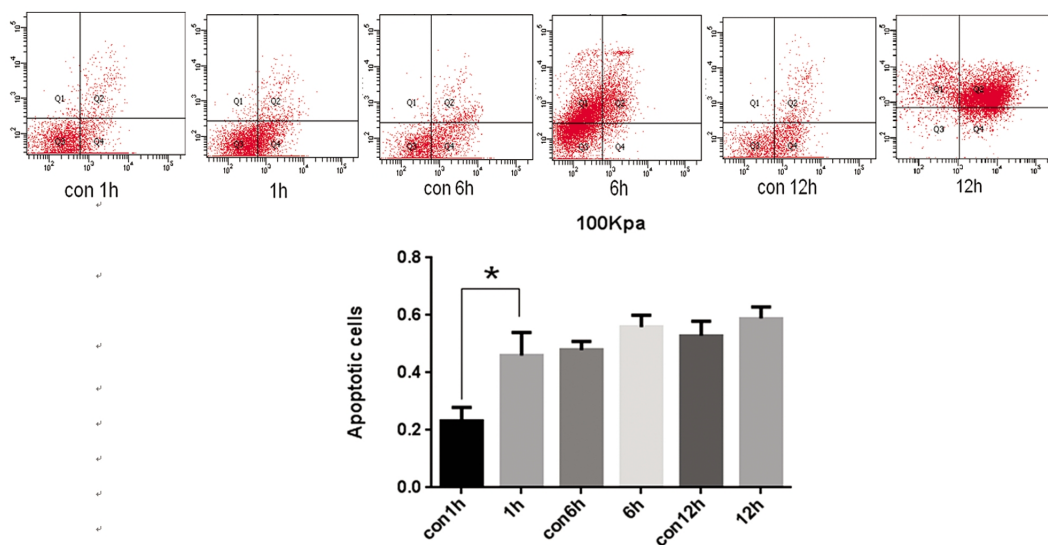


图 6 100 Kpa 静态压力加力 1、6 和 12 h 对 HPDLSCs 凋亡水平的影响(* $P < 0.05$)

Fig.6 Effect of 100 Kpa static pressure on the apoptosis (* $P < 0.05$)

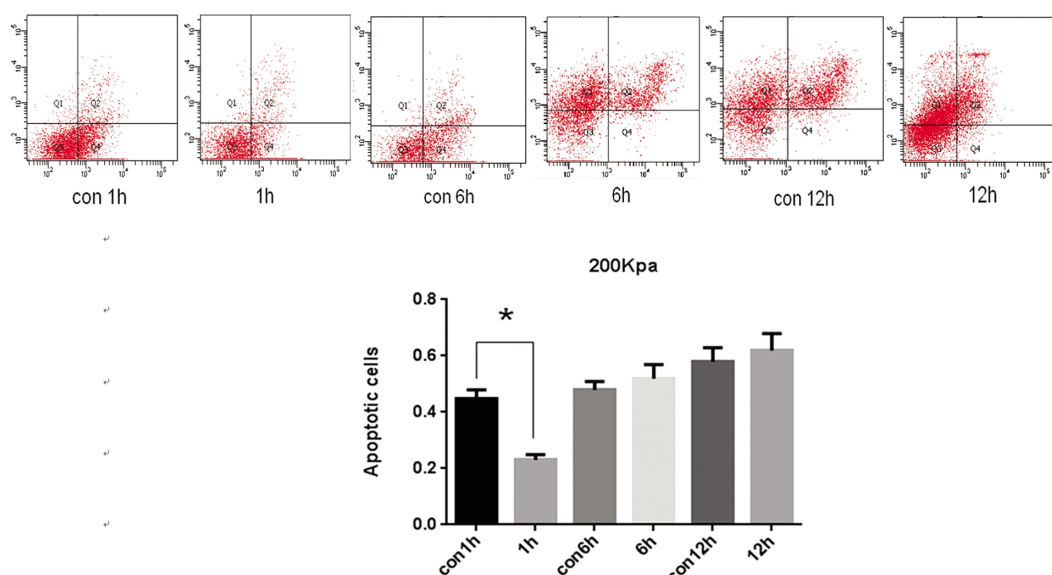


图 7 200 Kpa 静态压力加力 1、6 和 12 h 对 HPDLSCs 凋亡水平的影响(*P<0.05)

Fig.7 Effect of 200 Kpa static pressure on the apoptosis (*P<0.05)

力 12h 的 HPDLSCs 凋亡水平与对照组比较无统计学差异 (P>0.05), 见图 7。

3 讨论

正畸牙齿移动是在正畸矫治力的作用下, 牙齿在牙槽骨内按照预定的方向移动, 从而治疗各种错颌畸形, 而牙齿移动的生物学机制在于牙周组织的改建。当正畸矫治力传递到牙周膜上时, 牙周膜发生一定的损伤, 尤其是其压力侧的牙周膜纤维被压缩, 血管受压血流量减少, 胶原纤维和细胞基质降解吸收, 细胞凋亡^[3], 进而促使牙周膜细胞合成分泌多种细胞因子^[4], 并分化出破骨细胞; 张力侧的牙周膜纤维被拉伸, 胶原纤维和细胞基质增生, 成纤维细胞增殖, 成骨细胞分化^[5]。因此正畸牙齿的移动过程就是压力侧骨吸收和张应力侧骨形成的动态平衡过程^[6]。它并不是从一个位置到另一个位置的简单性机械移位, 而是一个生物 - 机械移位过程, 其中伴随着复杂的牙周组织改建, 牙周组织吸收和增生的交替是其生物学基础^[6]。

Rana^[7]等通过体外加力装置, 模拟牙齿移动过程中牙周膜细胞的受力方式, 研究发现细胞凋亡参与了牙周组织改建。研究认为凋亡可能在压力侧牙周膜细胞的消亡, 胶原纤维的减少以及透明样变形区域的形成过程中发挥了一定的作用。Schwarz^[8]认为在牙齿移动过程中, 压力侧的静压力接近或略低于毛细血管的内压力 (20-25 g/cm²) 时, 能够使毛细血管被轻微压迫, 血流量减少, 毛细血管轻微堵塞, 胶原纤维和基质降解吸收, 牙槽骨表面出现直接性骨吸收; 而当压力侧的静压力大于毛细血管的内压力时, 就会使毛细血管完全闭塞, 从而使局部的牙周膜血供丧失, 最终导致牙周膜细胞的破坏、牙周膜组织发生透明样变性, 发生间接性骨吸收。

本实验通过分离培养人牙周膜干细胞, 探讨体外加载静态压力后, 其生物学特性的改变。结果显示体外加载静态压力 100 Kpa/1h 后, HPDLSC 的 caspase-3 和 caspase-8 蛋白的表达明显高于对照组。Caspase 家族与细胞凋亡关系密切, 主要通过激活核酸内切酶来实现介导细胞凋亡。Caspase-3 位于凋亡环

节的核心部位, 在细胞凋亡过程中发挥重要作用^[9]。因此该结果提示体外加载 100 Kpa/1 h 后 HPDLSC 的凋亡水平明显增强。说明在正畸牙移动过程的早期轻力作用下细胞凋亡水平增强, 细胞代谢活动增强, 胶原纤维和基质降解吸收, 牙周组织不断的更新与改建, 最终得以维持其内环境的稳态^[6]。而在静态压力 100 Kpa/12 h 作用下调亡不明显。从细胞生物力学的角度分析, 牙周膜干细胞具有生物膜性材料的特征, 属粘弹性材料, 具有蠕变和应力松弛的特征^[10]。在静压力的作用下, 细胞发生形变, 细胞的增殖和代谢在短时间内会受到影响, 但形变发生在一段时间后细胞会趋向稳定, 对应力失去敏感性, 从而出现凋亡不明显的现象。但其具体分子调控机制并不清楚, 因此需要进一步研究探讨^[11]。

本实验另一结果表明, 人牙周膜干细胞在静态压力 100 Kpa/1 h 作用下凋亡增强, 200 Kpa/1 h 作用下细胞凋亡减弱。Garant^[12]研究发现在轻力作用下破骨细胞周围的成纤维细胞胶原蛋白大量增加, 牙周膜改建非常活跃。当牙周膜局部受到重力作用后破骨细胞的分化受到抑制, 被无菌坏死性物质所取代^[13], 发生潜掘性吸收, 当巨噬细胞侵入坏死组织中, 并将之清除后, 才会发生牙齿的移动, 使得牙齿移动延迟^[14]。Hatai^[15]研究发现在正畸力作用下牙齿发生潜掘性吸收过程中, 细胞凋亡减弱, 而本实验研究结果与其相符。说明持续轻力可以刺激细胞活性, 不完全阻塞牙周膜内血管, 通过直接骨吸收, 牙齿发生连续移动^[6]; 而重力作用使细胞活性降低, 血管完全阻塞, 切断了牙周膜某一区域的血液供应^[17], 发生潜掘性吸收, 牙齿移动延迟^[18]。因此本实验研究结果可以解释临床上在一定范围内, 矫治力增加, 牙齿移动快速, 超出这个范围牙齿移动反而受阻这一现象^[20]。但其具体分子调控机制并不清楚, 因此需要进一步研究探讨。

总之, 本实验研究发现在体外模拟正畸牙移动过程中, 不同加力力值和不同加力时间对人牙周膜干细胞的凋亡作用不同。同一加压力值不同加压时间时, 100 Kpa 加压 1 h 更有效的促进 HPDLSC 的凋亡; 同一加压时间不同加压力值时, 100

Kpa/1 h 促进细胞凋亡, 200 Kpa/1 h 抑制细胞凋亡。

参 考 文 献(References)

- [1] McManus A, Utreja A, Chen J, et al. Evaluation of BSP expression and apoptosis in the periodontal ligament during orthodontic relapse: a preliminary study[J]. *Orthod Craniofac Res*, 2014, 17(4): 239-248
- [2] Qi S, Song Y, Peng Y, et al. ZEB2 mediates multiple pathways regulating cell proliferation, migration, invasion, and apoptosis in glioma[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38842
- [3] Shahveisi K, Mousavi SH, Hosseini M, et al. The role of local renin-angiotensin system on high glucose-induced cell toxicity, apoptosis and reactive oxygen species production in PC12 cells[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2014, 17(8): 613-621
- [4] Yu BH, Zhou Q, Wang ZL. Periodontal ligament versus bone marrow mesenchymal stem cells in combination with Bio-Oss scaffolds for ectopic and in situ bone formation: A comparative study in the rat[J]. *J Biomater Appl*, 2014, 29(2): 243-253
- [5] Moura AP, Taddei SR, Queiroz-Junior CM, et al. The relevance of leukotrienes for bone resorption induced by mechanical loading[J]. *Bone*, 2014, 69C: 133-138
- [6] Cao H, Kou X, Yang R, et al. Force-induced ADRB2 in Periodontal Ligament Cells Promotes Tooth Movement [J]. *J DENT RES*, 2014, 93(11): 1163-1169
- [7] Rana M W, Pothisiri V, Killiany D M, et al. Detection of apoptosis during orthodontic tooth movement in rats [J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2001, 119(5): 516-521
- [8] Schwarz A. Tissue changes incident to orthodontic tooth movement [J]. *Int J Orthod*, 1932, 18(3): 31-52
- [9] Diercke K, Kohl A, Lux CJ, et al. Compression of human primary cementoblasts leads to apoptosis: A possible cause of dental root resorption[J]. *J Orofac Orthop*, 2014, 75(6): 430-445
- [10] Boyce B, Rosenberg E, de Papp A, et al. The osteoclast bone remodeling and treatment of metabolic bone disease [J]. *Eur J Clin Invest*, 2012, 42(12): 1332-1341
- [11] V Krishnan, Z Davidovitch. Cellular, molecular and tissue-level reactions to orthodontic force [J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2006, 129(4): 1-32
- [12] Garant PR, Lee YL. Immunocytochemical in vivo localization of fibronectin-rich contact sites on fibroblasts of normal periodontal ligament and inflamed gingiva [J]. *J Periodontol Res*, 1988, 23(4): 230-238
- [13] D F Madureira, A Taddei Sde, M H Abreu, et al. Kinetics of interleukin-6 and chemokine ligands 2 and 3 expression of periodontal tissues during orthodontic tooth movement [J]. *The American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 2012, 142(4): 494-500
- [14] 汤楚华, 施生根, 牛忠英, 等. 机械压力对人牙周膜成纤维细胞增殖活力的影响[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2011, 21(9): 506-509
Tang Chu-hua, Shi Sheng-gen, Niu Zhong-ying, et al. Effects of mechanical stress on the proliferating activity of human periodontal ligament fibroblasts[J]. *Chin J Conserv Dent*, 2011, 21(9): 506-509
- [15] Hatai T, Yokozeki M, Funato N, et al. Apoptosis of periodontal ligament cells induced by mechanical stress during tooth movement [J]. *Oral Dis*, 2001, 7: 287-290
- [16] P J Brooks, A F Heckler, K Wei, et al. M-CSF accelerates orthodontic tooth movement by targeting preosteoclasts in mice [J]. *Angle Orthodontist*, 2011, 81(2): 277-283
- [17] Li G, White G, Connolly C, et al. Cell proliferation and apoptosis during fracture healing[J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(5): 791-799
- [18] S R Taddei, A P Moura, I Andrade Jr, et al. Experimental model of tooth movement in mice: a standardized protocol for studying bone remodeling under compression and tensile strains [J]. *J Biomech*, 2012, 45(16): 2729-2735
- [19] Sogole Moin, Zana Kalajzic, Achint Utreja, et al. Osteocyte death during orthodontic tooth movement in mice [J]. *The Angle Orthodontist*, 2014, 84(6): 1086-1092
- [20] N Hamamç?, F Acun Kaya, E Uysal, et al. Identification of interleukin 2, 6, and 8 levels around miniscrews during orthodontic tooth movement[J]. *European Journal of Orthodontics*, 2012, 34(3): 357-361