

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.19.003

缺氧通过 HIF-1 α 抑制 hPDLFs 内毒素耐受 *

武 曦¹ 张 纲² 冯晓丹¹ 冯小倩¹ 谭颖徽^{2 Δ}

(1 陆军军医大学新桥医院口腔科 重庆 400037; 2 陆军军医大学新桥医院口腔颌面外科 重庆 400037)

摘要 目的:观察缺氧对人牙周膜成纤维细胞(human Periodontal Ligament Fibroblasts, hPDLFs) 内毒素耐受(Endotoxin Tolerance, ET)的影响并初步探讨其可能作用机制。**方法:**人牙周膜经组织块和胰蛋白酶消化,原代分离培养 hPDLFs 并鉴定后,给予缺氧诱导,检测其炎症因子白介素-6(IL-6)和白介素-8(IL-8)的分泌情况。进一步在常氧环境下通过慢病毒过表达增强缺氧诱导因子-1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 α , HIF-1 α) 表达或在缺氧环境下利用特异性抑制剂 YC-1 (3-(5-Hydroxymethyl-20-furyl)-1-benzylindazole)抑制 hPDLFs 中 HIF-1 α 表达,分析 hPDLFs 炎症因子 IL-6 和 IL-8 的分泌情况的变化。**结果:**① 缺氧时,脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)再次刺激 hPDLFs 分泌炎症因子白介素 IL-6、IL-8 没有明显减少($P>0.05$),提示 hPDLFs 的 ET 能力受到抑制。② 常氧环境下,与 HIF-1 α 未过表达组相比,过表达组的 hPDLFs 受到 LPS 再次刺激后,其分泌炎症因子 IL-6 或 IL-8 的能力并未显著降低 ($P>0.05$);而在缺氧环境下,hPDLFs HIF-1 α 表达受到抑制后,LPS 再次刺激可以显著抑制 hPDLFs 分泌 IL-6 或 IL-8($P<0.05$)。**结论:**缺氧可能通过诱导 HIF-1 α 抑制 hPDLFs 的 ET,调节 hPDLFs 的免疫应答,从而加重牙周组织的免疫损伤。

关键词:牙周炎;牙周膜成纤维细胞;内毒素耐受;缺氧;缺氧诱导因子-1 α

中图分类号:R-33;R781.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)19-3611-05

Hypoxia inhibits the Endotoxin Tolerance of hPDLFs by Upregulating HIF-1 α Expression*

WU Xi¹, ZHANG Gang², FENG Xiao-dan¹, FENG Xiao-qian¹, TAN Ying-hui^{2 Δ}

(1 Dept. of Stomatology, Xinqiao Hospital, Army Medical University, Chongqing, 400037, China;

2 Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Xinqiao Hospital, Army Medical University, Chongqing, 400037, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of hypoxia on the endotoxin tolerance (ET) of human periodontal ligament fibroblasts (hPDLFs), and preliminarily investigate the underlying mechanism. **Methods:** hPDLFs were cultured and identified after human periodontium were cut into pieces and digested with trypsin. Then to observe the effect of hypoxia and hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) on the secretions of cytokines interleukin-6 (IL-6) and IL-8 by hPDLFs, HIF-1 α was overexpressed by lentivirus vector in normoxia or inhibited by specific inhibitor YC-1 in hypoxia. **Results:** ① When hPDLFs were stimulated by lipopolysaccharides (LPS) again, the secretions of cytokines interleukin-6 (IL-6) and IL-8 were not significantly reduced compared with the initial stimulation in hypoxia ($P>0.05$), indicating that the activities of ET in hPDLFs were inhibited in hypoxia. ② Compared with the HIF-1 α unoverexpressed group, the secretion of inflammatory factor IL-6 or IL-8 by hPDLFs was not significantly decreased in the HIF-1 α overexpressed group upon LPS re-stimulation in normoxia ($P>0.05$), while the secretion was significantly inhibited when the expression of HIF-1 α in hPDLFs was inhibited in hypoxia ($P<0.05$). **Conclusion:** Hypoxia may inhibit hPDLFs ET through inducing the expression of HIF-1 α to enhance the immune injury of periodontal tissues, suggesting a new potential mechanism for hypoxia aggravating periodontitis.

Key words: Periodontitis; hPDLFs; Endotoxin tolerance; Hypoxia; HIF-1 α

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R781.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)19-3611-05

前言

牙周炎是一类严重危害人类口腔健康的慢性感染性疾病,是导致成人牙齿丧失的首要原因^[1,2]。研究表明缺氧能加重牙周

炎病变,影响牙周组织的防御与修复,但其机制尚不完全明确^[3,4]。研究显示 ET 在维持牙周组织局部免疫稳态中发挥重要作用,其抑制能影响组织细胞的免疫应答,维持炎症因子的高水平分泌,造成牙周组织过度的免疫损伤^[5]。课题组前期研究显

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81600873)

作者简介:武曦(1987-),博士研究生,讲师,主要研究方向:牙体牙髓牙周病学,电话:023-68774645, E-mail: ahys_wuxi@126.com

Δ 通讯作者:谭颖徽(1962-),博士生导师,教授,主要研究方向:口腔颌面部创伤及牙体牙髓牙周病学,

电话:023-68755632, E-mail: tanyh1962@outlook.com

(收稿日期:2019-02-23 接受日期:2019-03-18)

示常氧时 hPDLFs 存在 ET, 表现为 LPS 再刺激后其炎症因子如 IL-6、IL-8 分泌水平显著降低^[6]。

鉴于缺氧能加重牙周炎, 同时 ET 在抑制宿主炎症因子高水平分泌中发挥重要作用, 我们推测缺氧能通过抑制 hPDLFs ET 能力, 调节其炎症因子分泌, 从而加重牙周组织炎症损伤。为此, 本研究首先观察缺氧环境下 hPDLFs ET 能力的变化, 而后对缺氧调节 hPDLFs ET 能力变化的具体机制进行了初步探讨, 旨在深入理解缺氧与宿主炎症相互作用的分子机制, 同时为缺氧环境下牙周炎的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

人牙周膜细胞为原代分离培养所得, 来源于 2016 年 7 月因正畸就诊于新桥医院口腔科的牙周健康患者(12-18 岁)。高糖 DMEM 培养基由 Hyclone 公司提供; 胎牛血清和胰蛋白酶由 Gibco 公司提供; 小鼠抗人角蛋白抗体、小鼠抗人波形蛋白抗体为北京中杉金桥生物技术有限公司产品; *Escherichia coli* (*E.coli*) LPS、I 型胶原酶、YC-1 由 Sigma 公司提供; *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) LPS 由 Invivogen 公司提供; 青霉素-链霉素、BCA 蛋白浓度测试盒、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) 均由 Beyotime 公司提供; Mouse anti-human HIF-1 α 抗体由 BD Biosciences 公司提供; Human IL-6 Precoated ELISA kit、Human IL-8 Precoated ELISA kit 为北京达科为生物技术有限公司产品。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 hPDLFs 的分离、培养以及鉴定 hPDLFs 分离、培养以及鉴定方法参照我们的前期研究^[6], 简要描述如下: 采用组织块结合酶消化法进行 hPDLFs 原代细胞分离和培养。收集因正畸完整拔除的人健康前磨牙, 牙齿离体后立即置于含双抗(青霉素-链霉素)的冰 DMEM 培养液中, 于超净台沿冠根单向刮下根中 1/3 的牙周膜组织, 剪碎后加入 0.1% I 型胶原酶 37℃ 处理牙周膜 45 min, 离心将沉淀均匀接种于 6 孔板中, 加入 DMEM 完全培养基(含双抗及 10% 胎牛血清), 将培养瓶放入含 37℃、5% CO₂ 的培养箱中孵育。每 3 天换液一次, 当细胞从组织块中爬出达 80% 以上融合时进行传代。经波形蛋白和角蛋白抗体染色方法鉴定细胞来源后, 取 4-6 代细胞用于后续实验。

1.2.2 细胞缺氧处理 将 hPDLFs 接种入培养板, 分别在常氧 CO₂ 培养箱 (5% CO₂、21% O₂、74% N₂) 及缺氧三气培养箱 (5% CO₂、1% O₂、94% N₂) 中培养。

1.2.3 hPDLFs ET 模型构建 实验分 5 组: ① 对照组(未加处理因素); 即在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中培养的细胞; ② *Pg/Ec-naive* 组: 即在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养 48 h 后分别加入 1000 ng/mL *Pg/E.coli* LPS 培养 24 h 的细胞; ③ *Pg/Ec-tolerance* 组: 即在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养 24 h 后先加入 1000 ng/mL *Pg/E.coli* LPS 培养 24 h 再加入 1000 ng/mL *Pg/E.coli* LPS 培养 24 h 的细胞。具体研究方案参照我们之前发表的文章^[6], 实验步骤大致如下: hPDLFs 铺板培养 24 h 后, 加入 1000 ng/mL *Pg* LPS 或 *E.coli* LPS 进行初次刺激。预刺激 24 h 后加入 1000 ng/mL *Pg* LPS 或 *E.coli* LPS 再次刺激。24 h 后, 收集细胞培养上清, 进行炎症因

子 IL-6 和 IL-8 浓度测定, 具体检测方法参照 ELISA kit 操作。

1.2.4 HIF-1 α 慢病毒过表达载体构建、包装及感染 目的病毒及阴性对照病毒由深圳市百恩维生物科技有限公司构建包装, 并进行测序鉴定和病毒滴度的检测。HIF-1 α 过表达载体和阴性对照载体均表达绿色荧光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP)。hPDLFs 铺板培养 24 h 后, 根据测得的病毒滴度计算 MOI (Multiplicities of Infection) 值, 分别按 MOI 值为 1、2、5、10、20、50、100、200 所需的病毒原液量进行转染, 同时加入终浓度为 5 μ g/mL polybrene。病毒转染细胞 24 h 后, 更换为新鲜的完全培养基; 转染 48 h 后, 荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况, 并进一步进行 Western blot 检测 HIF-1 α 蛋白表达, 确定病毒的转染效率。

1.2.5 YC-1 抑制 hPDLFs HIF-1 α 表达 hPDLFs 铺板培养 24 h 后, YC-1 按照浓度梯度为 0、5、10、20 μ M 加入培养基中, 培养 24 h 后收集细胞进行 Western blot 检测, 观察不同浓度 YC-1 对 HIF-1 α 蛋白表达的抑制作用。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达 收集目的细胞, 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度后, 进行 12% SDS-PAGE 电泳。将分离的蛋白转膜, 5% 脱脂奶粉常温振荡封闭 1 h 后, 加入 Mouse anti-human HIF-1 α 抗体 (1:1000), 4℃ 孵育过夜后, 加入辣根过氧化物酶标记二抗 (1:5000), 室温振荡孵育 1 h, ECL 显影检测蛋白表达。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism version 6 软件对实验数据进行统计学分析, 计量数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间比较差异用非参数检验 (Mann-Whitney test) 和单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧抑制 hPDLFs 的 ET 能力

我们既往采用小鼠抗人角蛋白抗体和小鼠抗人波形蛋白抗体证实分离细胞为 hPDLFs, 同时发现 hPDLFs 在常氧环境中存在 ET, 能抑制宿主分泌炎症因子^[6]。因此, 本研究首先观察 hPDLFs 在缺氧环境中 ET 能力的变化, 结果显示 (图 1) 常氧环境中, *Pg* LPS 或 *E.coli* LPS 再次刺激均能显著抑制 hPDLFs 炎症因子 IL-6 和 IL-8 的分泌, 与初次刺激相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 而在缺氧环境下, *Pg* LPS 或 *E.coli* LPS 初次刺激虽然能明显增强上述两种炎症因子分泌, 但再次刺激并不能下调 IL-6 和 IL-8 的分泌, 与初次刺激相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。上述结果提示缺氧能抑制 hPDLFs 的 ET 能力。

2.2 HIF-1 α 表达改变对 hPDLFs ET 能力的影响

HIF-1 是细胞在缺氧或氧气含量减少情况下活化的重要转录因子, HIF-1 α 是其活性亚基, 介导细胞参与多种生物学过程^[7,8]。为了探讨 HIF-1 α 在缺氧调节 hPDLFs ET 能力中的作用, 我们首先构建 hPDLFs 过表达 HIF-1 α 或 HIF-1 α 表达抑制平台, 通过慢病毒转染诱导 hPDLFs 过表达 HIF-1 α , 或使用特异性抑制剂 YC-1 抑制 hPDLFs 表达 HIF-1 α 蛋白^[9,10]。我们在常氧环境下摸索不同 MOI 值对目的细胞转染效率的影响, 并以 HEK293 细胞作为对照细胞, 观察公司合成病毒的转染效率。结果显示当 MOI 值为 100 时, 慢病毒转染效率最高, 约 90% 目

的细胞均表达 GFP(图 2A)。同时,我们对缺氧环境下 YC-1 抑制 hPDLFs HIF-1 α 蛋白表达的浓度进行摸索。结果显示当 YC-1 加入浓度为 20 μ M 时,hPDLFs HIF-1 α 蛋白表达几乎完

全被抑制(图 2B)。通过上述实验,我们成功构建 hPDLFs HIF-1 α 蛋白过表达或抑制平台,为进一步探讨 HIF-1 α 调节 hPDLFs 的 ET 能力奠定基础。

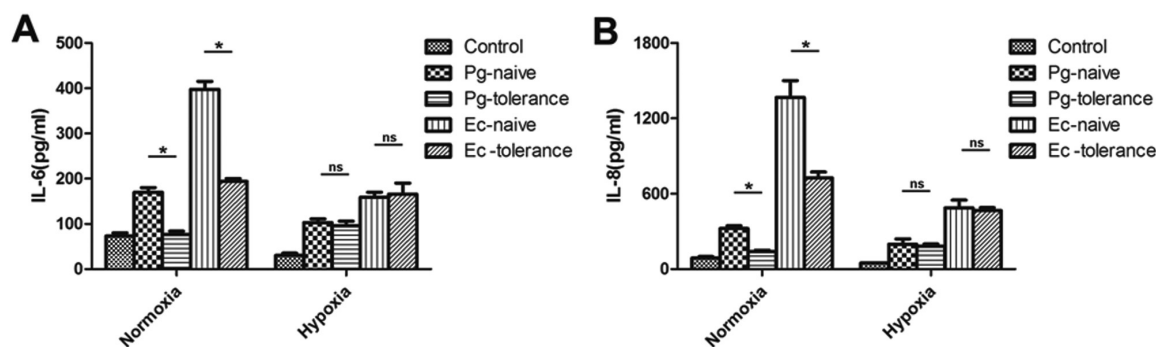


图 1 缺氧对 LPS 刺激 24 h 后 hPDLFs 分泌 IL-6 和 IL-8 的影响

Fig.1 Effects of hypoxia on the secretion of IL-6 and IL-8 by hPDLFs after stimulation with LPS for 24 h

Note: * $P<0.05$; ns (no significance): $P>0.05$.

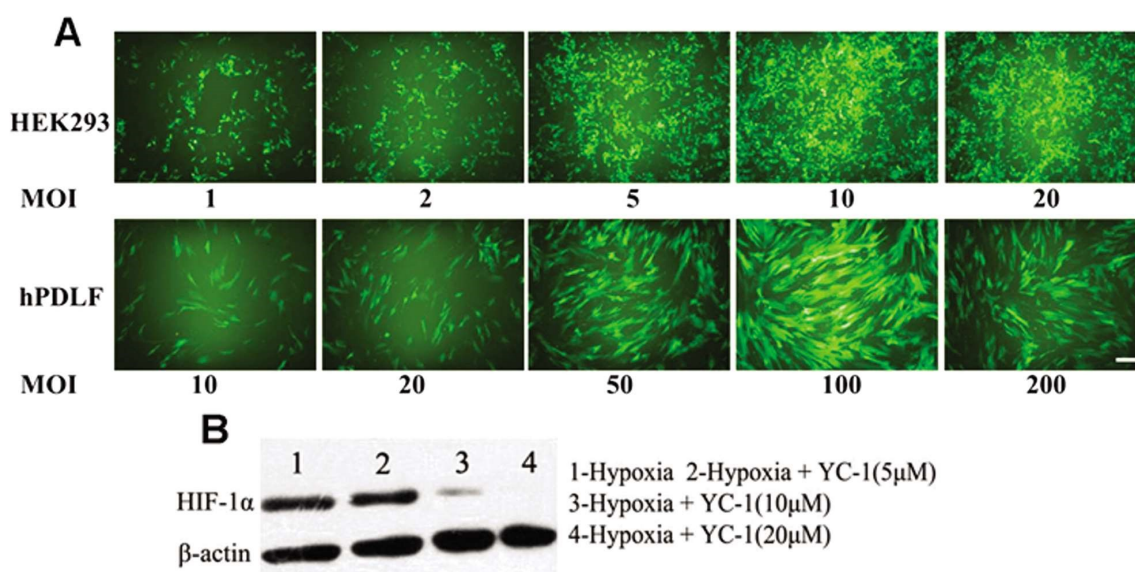


图 2 构建 hPDLFs 过表达 HIF-1 α 或 HIF-1 α 表达抑制平台

A.慢病毒转染过表达 HIF-1 α (100 $\times$);B.YC-1 抑制 hPDLFs HIF-1 α 表达

Fig. 2 Construction of platforms for promoting or inhibiting the expression of HIF-1 α in hPDLFs

A. Lentivirus transfection for over-expression of HIF-1 α (100 $\times$); Note: bar=10 μ m;

B. Inhibition of HIF-1 α expression in hPDLFs by YC-1

为进一步探讨 HIF-1 α 在 hPDLFs ET 中的作用,我们首先在常氧或缺氧环境下,对 LPS 刺激 hPDLFs 后 HIF-1 α 表达情况进行 Western blot 检测。结果显示在常氧环境下,无论 LPS 初次或再次刺激 hPDLFs,其 HIF-1 α 均处于低水平表达;而在缺氧环境中,hPDLFs 受到 LPS 初次或再次刺激后,HIF-1 α 表达显著增加(图 3A)。Western blot 结果也显示常氧环境下,MOI 值为 100 时,慢病毒转染可以诱导目的细胞过表达 HIF-1 α ;在缺氧环境下,加入 20 μ M YC-1 后,hPDLFs 中 HIF-1 α 表达受到显著抑制(图 3A)。我们随后观察常氧环境下过表达 HIF-1 α 以及缺氧环境下抑制 HIF-1 α 表达对 hPDLFs ET 的影响。结果显示在常氧环境下,与 HIF-1 α 未过表达组相比,过表达组的 hPDLFs 受到 LPS 再次刺激后,其分泌炎症因子 IL-6 或 IL-8 的能力并未显著降低,ET 受到抑制;而在缺氧环境下,hPDLFs HIF-1 α 表达受到抑制后,LPS 再次刺激可以显著抑制 hPDLFs

分泌 IL-6 或 IL-8,表现出 ET 能力。上述结果表明缺氧可能通过诱导 HIF-1 α 的表达抑制 hPDLFs 的 ET 能力。

3 讨论

牙周炎是一种累及牙周支持组织(牙龈、牙周膜、牙骨质、牙槽骨)的慢性感染性疾病,以牙龈炎症、牙周袋形成、牙槽骨丧失和牙齿松动为主要特征,严重者可导致牙齿缺失,其不仅是危害现代人类口腔健康的首要疾病,而且还与许多全身疾病密切相关^[11,12]。牙周炎的病因机制极为复杂,在始动因子-菌斑微生物的慢性刺激下,伴随局部和全身易感因素,一方面对牙周支持组织造成直接损伤,另一方面刺激牙周组织内细胞大量释放炎症介质,并诱导单核、巨噬细胞等多种免疫细胞活化,活化的免疫细胞进一步增强炎症介质释放,并介导免疫细胞黏附移行募集到局部炎症部位,产生放大的免疫损伤,最终造成牙

周组织不可逆的降解^[13,14]。高原环境下空气稀薄、含氧量低,机体对缺氧环境适应能力不足,导致组织细胞不同程度地缺氧,从而产生各种变化。研究表明缺氧环境可以加重牙周炎的病理损伤,影响牙周微环境的菌群种类,并直接诱导牙周组织细胞的凋亡。本课题组前期研究显示在模拟高原缺氧环境下,牙周

炎动物模型的病变可因缺氧加重,尽管当前缺氧对牙周炎作用的研究取得一定进展,但具体机制仍不明确^[15,16]。缺氧与炎症能相互影响,暴露在高原缺氧环境常常伴随炎症介质的增高^[17,18]。因此,缺氧可能通过影响牙周组织细胞炎症因子的释放,从而增强免疫损伤。

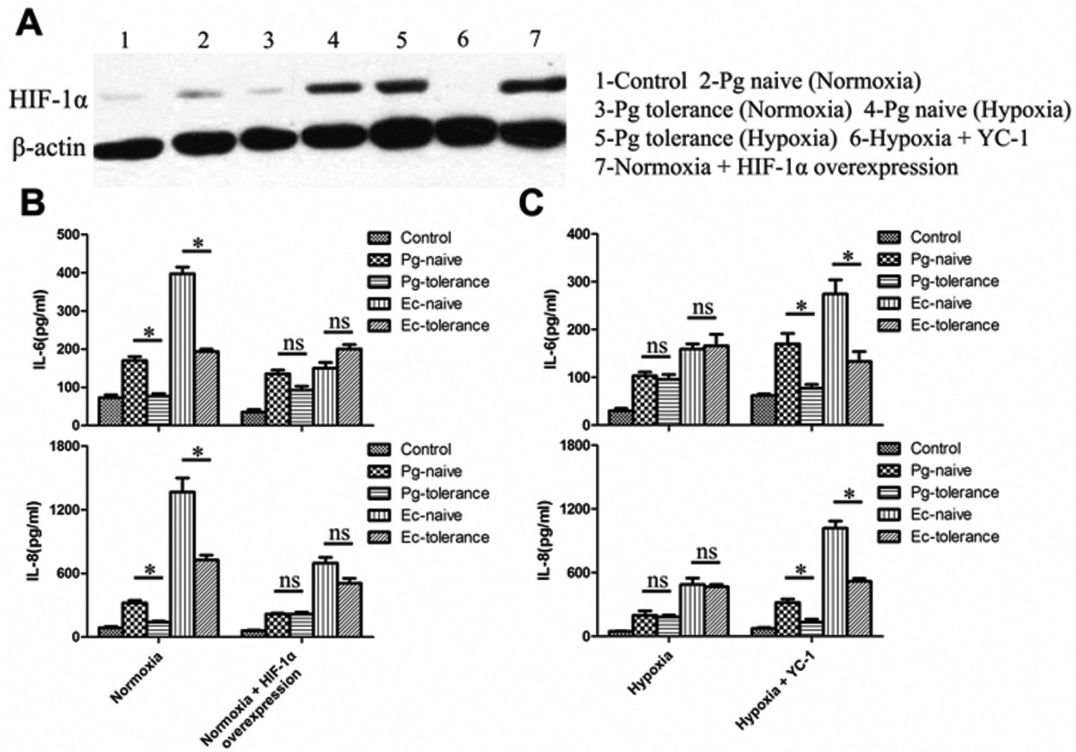


图3 HIF-1 α 对hPDLFs ET能力的影响

A. Western blot 检测 hPDLFs HIF-1 α 表达; B. HIF-1 α 对 LPS 刺激 24 h 后 hPDLFs 分泌 IL-6 和 IL-8 的影响

Fig.3 Effects of HIF-1 α on ET of hPDLFs

A. Detection of HIF-1 α expression in hPDLFs by Western blot;

B. Effects of HIF-1 α on the secretion of IL-6 and IL-8 by hPDLFs after stimulation with LPS for 24 h

Note: * $P < 0.05$; ns (no significance): $P > 0.05$.

ET 是指机体以小剂量 LPS 预刺激后,对后续 LPS 刺激呈低反应或无反应的一种状态,表现为发热、死亡等组织损伤现象减轻甚至消失,或是细胞反应性降低,炎症介质分泌减少。目前研究认为 ET 是一种适应性应答,保护机体免受过度损伤^[19,20]。牙周组织持续暴露于各种不同的微生物和代谢产物中,菌群与宿主间动态平衡的维系需要各种内源性调节机制,ET 可能是维持牙周局部免疫稳态的调节机制之一。研究表明在牙周炎发生发展过程中,细菌 LPS 诱导的 ET 可能是宿主下调炎症反应、避免组织过度损伤的重要途径之一^[5]。因此,我们推测缺氧可能通过抑制牙周组织细胞产生 ET,从而维持其炎症因子的分泌。hPDLFs 是牙周膜中数量最多、功能最重要的细胞,在机体内能不断形成新的主纤维和牙骨质,改建牙周组织,受到破坏时产生牙周组织疾病。此外,hPDLFs 还具有独特的生物学功能和免疫活性,在病原物质、炎症介质、机械刺激等多种刺激因素下可表达和分泌多种生物活性物质,并能参与免疫细胞的粘附、迁移、分化等重要过程^[21]。研究证实 hPDLFs 能通过其表面的 Toll 样受体(Toll-like Receptor, TLR)2、TLR4 识别细菌 LPS,刺激炎症因子大量释放^[22]。课题组前期研究发现常氧时 LPS 再

次刺激能诱导 hPDLFs 产生 ET,表现为炎症因子 IL-6、IL-8 分泌水平显著降低^[6]。在本研究中,我们发现缺氧时 LPS 诱导 hPDLFs ET 能力减弱,IL-6、IL-8 分泌没有明显降低,这表明缺氧可能通过抑制 LPS 诱导 hPDLFs 产生 ET,维持炎症因子的分泌,从而增强牙周组织的免疫损伤。那么,缺氧是如何抑制 LPS 诱导 hPDLFs ET 的呢?

缺氧和炎症存在复杂的联系,缺氧能促进组织炎症反应,反之炎症可以加重局部组织和细胞缺氧^[23-25]。HIF-1 是缺氧时哺乳动物体内产生的重要转录调节因子,常氧时其活性亚基 HIF-1 α 羟基化后迅速被降解,转录活性受到抑制;而缺氧时 HIF-1 α 羟基化受阻并聚集入核,与 HIF-1 β 结合形成异二聚体,再与低氧反应元件结合后能诱导多种靶基因转录^[8]。本研究通过正反向实验验证了 HIF-1 α 在 LPS 诱导 hPDLFs ET 中的作用。结果显示常氧时增强 hPDLFs 中 HIF-1 α 的表达能抑制宿主细胞产生 ET,表现为 LPS 再刺激时 hPDLFs 分泌的 IL-6、IL-8 没有降低;而缺氧时抑制 hPDLFs 中 HIF-1 α 表达,则能抑制 LPS 再刺激时 IL-6、IL-8 的分泌,使 hPDLFs 显示出 ET 能力。这表明缺氧可以通过 HIF-1 α 的表达抑制 LPS 诱导 hPDLFs

产生 ET,维持其炎症因子的分泌,这可能加重了缺氧时牙周组织的免疫损伤。但是,目前关于 HIF-1 α 调节 hPDLFs ET 的分子机制,以及缺氧抑制 hPDLFs ET 在牙周炎中的作用仍有待进一步研究。

研究表明 HIF-1 α 与核转录因子 κ B (Nuclear Factor- κ B, NF- κ B) 之间关系密切,NF- κ B 则是许多炎症因子的转录调节子,在炎症反应中起着关键作用^[26-28]。在缺氧环境下,中性粒细胞可以通过 HIF-1 α 依赖的方式增强 NF- κ B 活化;而在巨噬细胞中,HIF-1 α 的表达则受到 NF- κ B 的调节^[29]。由此,我们猜测缺氧可能通过 HIF-1 α 调节 NF- κ B 活性,从而在抑制 LPS 诱导的 ET 中发挥重要作用。LPS 识别受体 TLR4 及其胞内信号通路在诱导细胞 ET 中起着至关重要的作用。当 LPS 与受体复合物(TLR4、CD14、MD2)结合后,能激活胞内髓样分化因子 88 (Myeloid Differentiation 88,MyD88)依赖和 MyD88 非依赖两条信号通路。前者通过活化 NF- κ B, 诱导细胞表达炎症因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 等。目前研究表明 ET 主要与 MyD88-NF- κ B 调节途径相关^[30,31]。结合 hPDLFs 在 LPS 刺激下诱导表达的炎症因子类型(IL-6、IL-8等),我们推测缺氧可能通过影响 hPDLFs 中 TLR4-MyD88-NF- κ B 活化途径,从而调节 hPDLFs ET 能力,但具体机制仍需深入研究。

综上所述,本研究结果表明缺氧可能通过 HIF-1 α 抑制 hPDLFs ET,调节 hPDLFs 的免疫应答,从而加重牙周组织的免疫损伤。后续我们将对 HIF-1 α 调节 hPDLFs ET 的具体机制以及缺氧抑制 hPDLFs ET 在牙周炎中的作用进行深入探讨。本研究不仅进一步明确了缺氧对牙周组织的免疫损伤,同时也有助于深入理解缺氧加重牙周炎的病理机制,为牙周炎的防治提供了新的思路。

参考文献(References)

- [1] Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(1): 30-44
- [2] Slots J. Periodontitis: facts, fallacies and the future [J]. *Periodontol* 2000, 2017, 75(1): 7-23
- [3] Golz L, Memmert S, Rath-Deschner B, et al. LPS from *P. gingivalis* and hypoxia increases oxidative stress in periodontal ligament fibroblasts and contributes to periodontitis [J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014: 986264
- [4] Golz L, Memmert S, Rath-Deschner B, et al. Hypoxia and *P. gingivalis* synergistically induce HIF-1 and NF- κ B activation in PDL cells and periodontal diseases[J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 438085
- [5] Muthukuru M, Jotwani R, Cutler CW. Oral mucosal endotoxin tolerance induction in chronic periodontitis[J]. *Infect Immun*, 2005, 73(2): 687-694
- [6] Wu X, Zhang G, Wang X, et al. Endotoxin tolerance induction in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with different bacterial lipopolysaccharides[J]. *Arch Oral Biol*, 2015, 60(3): 463-470
- [7] Koyasu S, Kobayashi M, Goto Y, et al. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(3): 560-571
- [8] Choudhry H, Harris AL. Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology [J]. *Cell Metab*, 2018, 27(2): 281-298
- [9] Wang X, Liu C, Wu L, et al. Potent ameliorating effect of Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) antagonist YC-1 on combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) in Rats[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2016, 788: 343-350
- [10] Ding X, Kong J, Xu W, et al. ATPase inhibitory factor 1 inhibition improves the antitumor of YC-1 against hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16: 5230-5236
- [11] Hegde R, Awan KH. Effects of periodontal disease on systemic health [J]. *Dis Mon*, 2018[Epub ahead of print]
- [12] Cardoso EM, Reis C, Manzaneres-Céspedes MC. Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases[J]. *Postgrad Med*, 2018, 130(1): 98-104
- [13] Bosshardt DD. The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences[J]. *Periodontol* 2000, 2018, 76(1): 43-50
- [14] Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17038
- [15] 张纲, 谭颖徽. 高原地区牙周病的系列研究[J]. *国际口腔医学杂志*, 2013, 40(2): 141-147
- [16] 武曦, 张纲, 谭颖徽. 高原低氧环境下牙周炎的发病机制 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(13): 2587-2593
- [17] Taylor CT, Colgan SP. Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(12): 774-785
- [18] McGarry T, Biniecka M, Veale DJ, et al. Hypoxia, oxidative stress and inflammation[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 125: 15-24
- [19] Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance [J]. *Trends Immunol*, 2009, 30(10): 475-487
- [20] Cavaillon JM. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines[J]. *Toxicon*, 2018, 149: 45-53
- [21] Jiang N, Guo W, Chen M, et al. Periodontal Ligament and Alveolar Bone in Health and Adaptation: Tooth Movement[J]. *Front Oral Biol*, 2016, 18: 1-8
- [22] Tang L, Zhou XD, Wang Q, et al. Expression of TRAF6 and pro-inflammatory cytokines through activation of TLR2, TLR4, NOD1, and NOD2 in human periodontal ligament fibroblasts [J]. *Arch Oral Biol*, 2011, 56(10): 1064-1072
- [23] Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(7): 656-665
- [24] Biddlestone J, Bandarra D, Rocha S. The role of hypoxia in inflammatory disease[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(4): 859-869
- [25] Cummins EP, Crean D. Hypoxia and inflammatory bowel disease[J]. *Microbes Infect*, 2017, 19(3): 210-221
- [26] Wu L, Huang X, Li L, et al. Insights on biology and pathology of HIF-1 α -2 α , TGF β /BMP, Wnt/ β -catenin, and NF- κ B pathways in osteoarthritis[J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(22): 3293-3312
- [27] Cummins EP, Keogh CE, Crean D, et al. The role of HIF in immunity and inflammation[J]. *Mol Aspects Med*, 2016, 47-48: 24-34
- [28] Deng W, Feng X, Li X, et al. Hypoxia-inducible factor 1 in autoimmune diseases[J]. *Cell Immunol*, 2016, 303: 7-15
- [29] D'Ignazio L, Bandarra D, Rocha S. NF- κ B and HIF crosstalk in immune responses[J]. *FEBS J*, 2016, 283(3): 413-424
- [30] Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance [J]. *Trends Immunol*, 2009, 30(10): 475-487
- [31] Yang Y, Li D, Tian Z, et al. Looped limulus anti-lipopolysaccharide derived peptide CLP-19 induces endotoxin tolerance involved inhibition of NF- κ B activation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 480(3): 486-491