

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.08.004

TGF- β 1 诱导人牙周膜细胞细胞骨架重排的机制*王莉 汪廷乐 欧学平 宋萌[△] 潘劲松[△]

(上海交通大学附属第一人民医院口腔科 上海 200080)

摘要 目的:牙周病是由多种因素引起的,特别是人牙周膜细胞的缺失。转化生长因子- β 1(TGF- β 1)是一种多功能细胞因子,在治疗牙周病中发挥重要的作用,但很少有人清楚地研究 TGF- β 1 对人牙周膜细胞的影响。因此,本研究的目的是探讨 TGF- β 1 诱导人牙周膜细胞细胞骨架重排的信号通路。**方法:**人牙周膜细胞取自健康的前磨牙,并向同步化处理的细胞中加入 10 ng/ml 的 TGF- β 1,并通过相差显微镜观察它们的形态学变化。通过免疫组化和共聚焦显微镜观察 F-肌动蛋白重排。用 Western blot 分析蛋白表达情况。**结果:**我们发现 TGF- β 1 诱导人牙周膜细胞细胞骨架重排,激活 ROCK 蛋白的表达,并增加 p-LIMK 和 p-cofilin 的蛋白表达。ROCK 抑制剂 Y-27632 使 ROCK, p-LIMK 和 p-cofilin 的蛋白表达下降。**结论:**TGF- β 1 可以诱导人牙周膜细胞细胞骨架重排,并且是通过上调 ROCK, p-LIMK 和 p-cofilin 的活性完成的。本研究可以增强对 TGF- β 1 在治疗牙周疾病方面的作用机制的了解。

关键词:转化生长因子- β 1;人牙周膜细胞;细胞骨架重排;Rho 信号通路

中图分类号:R78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)08-1415-05

The Mechanism of TGF- β 1-Induced Cytoskeletal Rearrangement of Human Periodontal Ligament Cells*WANG Li, WANG Ting-le, OU Xue-ping, SONG Meng[△], PAN Jin-song[△]

(Department of Dental, the first People's of Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: Periodontal disease caused by a variety of factors, particularly the loss of hPDLs. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) is a multifunctional cytokine known to play an important role in periodontal disease, but little is known about the effects of TGF- β 1 on human PDL cells. The aim of our study is to elucidate the signaling pathway that mediates these effects. **Methods:** The human PDL cells were obtained from healthy premolars. Serum-starved hPDLs were incubated with 10 ng/ml TGF- β 1, their morphological changes were examined by phase-contrast microscopy. F-actin reorganization was observed by immunocytochemistry and confocal microscopy. Protein expression was analyzed by Western Blot analysis. **Results:** TGF- β 1 treatment induced cytoskeletal reorganization, activated ROCK protein expression, and increased the phosphorylation of LIM kinase and cofilin. Additionally, protein expression of ROCK and the phosphorylation of LIM kinase and cofilin were decreased by the ROCK inhibitor Y-27632. **Conclusion:** TGF- β 1 can induce hPDLs to undergo cytoskeletal rearrangement, and it is through upregulating ROCK, p-LIM kinase and p-cofilin activity. This study may help our better understanding of the mechanism of TGF- β 1 in curing periodontal disease.

Key words: TGF- β 1; Human Periodontal Ligament Cells; Cytoskeletal Rearrangement; Rho signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R78 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)08-1415-05

前言

牙周膜(PDL)起源于颅神经嵴外胚间充质细胞^[1],是位于牙根和牙槽骨之间的结缔组织。一旦 PDL 组织严重受损,如牙周炎,它再生就很困难,最终将导致牙齿脱落^[2]。因此,发展治疗牙周炎的方法是需要的。TGF- β 1 是 TGF- β 家族的一员,是一种多功能细胞因子,调节各种细胞活动,包括增殖,分化和合成细胞外基质(ECM)蛋白^[3,4]。此外,TGF- β 1 还可以调节 I 型胶原的表达^[5-7]。虽然有文献报道过 TGF- β 1 诱导 PDL 细胞的增殖^[8]和 ECM 成分的表达^[9],但 TGF- β 1 对牙周膜细胞细胞骨架重排的影响并没有清楚地被研究过。

细胞骨架是广泛存在于真核细胞中的一种复杂的蛋白质,可以引起细胞的运动,维持细胞的形态^[10]。在牙周疾病发生过程中,牙周组织发生了重建,牙周膜细胞细胞骨架也相应的发生了变化^[11]。这表明细胞骨架在这个过程中起着重要的作用。然而,人牙周膜细胞的细胞骨架是怎样变化的,以及其中的信号转导通路的确切机制尚未清楚地了解。

TGF- β 1 可以诱导细胞内的多种信号转导通路,如 Rho 家族 GTP 酶,Smad 通路, Rac /Pak 通路和 PI3K/Akt 通路^[12-15],但哪个信号通路在 TGF- β 1 诱导的人牙周膜细胞细胞骨架重排方面发挥了重要作用尚待阐明。

最近的一项研究表明,小 Rho GTP 酶及其下游的 Rho 激酶

* 基金项目:国家自然科学基金项目(11172177);上海交通大学医工交叉基金项目(YG2010MS07)

作者简介:王莉(1987-),女,硕士研究生,电话:15821123635, E-mail:wlcomeon@sina.com

[△] 通讯作者:宋萌,男,教授, Tel:021-63240090-5521, E-mail:smgzh160@sohu.com

潘劲松,男,副主任医师, Tel:021-63240090-5523, E-mail:pip0003@163.com

(收稿日期:2013-09-11 接受日期:2013-10-10)

(ROCK)介导 TGF- β 1 诱导的乳腺上皮细胞之间接触的重排^[16]。这一发现是特别有意义,因为 Rho 是细胞骨架的主要调控者^[17]。Rho 调节肌动蛋白纤维是通过激活 ROCK, LIM 激酶磷酸化,反过来又磷酸化 cofilin 的形成。Cofilin 结合肌动蛋白单体及聚合物,并促进肌动蛋白丝的拆卸,但这个功能被 cofilin 的磷酸化抑制了。这些观察使我们推测 ROCK / cofilin 信号通路可能在 TGF- β 1 介导的细胞骨架重排中起着重要作用。

当前研究的目的是阐明 TGF- β 1 改变人牙周膜细胞细胞骨架重排的机制。我们首先研究发现了 TGF- β 1 可以诱导人牙周膜细胞细胞骨架重排。然后,我们力求通过 western blot 法确定介导这些效应的信号转导通路,并通过特定的化学抑制剂发现可能由 ROCK/LIMK/cofilin 通路介导。该研究成果将提高我们对 TGF- β 1 治疗牙周病的机制的理解。

1 材料与方法

1.1 人牙周膜细胞的培养与鉴定

用酶消化法培养获取人牙周膜细胞并体外培养和传代。取因正畸矫治需要而拔除的健康牙齿,在超净台中用含双抗(青霉素 100 mg/L,链霉素 100 mg/L)的 Hanks 液冲洗数次,用手术刀刮取牙根中部 1/3 处牙周膜细胞,加入 1 g/L 的 I 型胶原酶消化 20 min,离心,沉淀移入 25 mL 的培养瓶,加入含 10% 胎牛血清,100 mg/L 青霉素,100 mg/L 链霉素的 DMEM 完全培养液,置含 5% CO₂ 的培养箱 37℃ 孵育。4 d 后,有细胞从组织块中爬出。2 w 后,第 1 次传代。然后,采用波形蛋白和角蛋白染色进行人牙周膜细胞的形态学观察和免疫组织化学鉴定,取第 4~8 代细胞用于后续实验。

1.2 TGF- β 1 对细胞形态和细胞骨架的影响

首先我们测定 TGF- β 1 对细胞形态的影响,我们将重组 TGF- β 1 (10 ng/ml)(R&D Systems)加入到生长停滞的单层细胞中。然后通过倒置显微镜观察细胞形态变化。

接下来,我们观察 TGF- β 1 对细胞骨架的影响。我们将细胞培养在 24 孔板的细胞爬片上,并周步化后,加入 TGF- β 1 刺

激,在 24 小时和 48 小时,将细胞在 PBS 中漂洗 3 分钟,在 5% 多聚甲醛(PFA)中固定 30 分钟,0.1% 的 Triton 透膜液作用 10 分钟。用 1% BSA / PBS 封闭 1 小时后,将细胞用 FITC 标记的鬼笔环肽以 1:100 稀释,在室温下孵育 30 分钟。最后将细胞用 1:200 稀释的 DAPI 染色,在室温下孵育 5 分钟。用 PBS 洗涤后,用封片剂封片(Calbiochem 公司,美国),通过共聚焦显微镜(Leica 公司 TCS 4D,德国)观察分析。

1.3 蛋白免疫印迹检测(Western Blotting)

用蛋白裂解液提取 TGF- β 1 刺激 6 小时,24 小时或未刺激的人牙周膜细胞蛋白;蛋白免疫印迹实验检测 Rho-GDIa 以及 ROCK, p-limk, p-cofilin 的表达量,用 β -actin, limk and cofilin 作为内参。一抗浓度: ROCK 抗体,1:500 (Zymed Technologies); β -actin 抗体,1:5000 (Santa Cruz Technologies); p-limk, p-cofilin,1:500 (Cell Signaling Technologies); limk, cofilin,1:500 (Cell Signaling Technologies)。以 Bio-rad 图像扫描分析系统进行光密度积分值分析作统计分析。

1.4 抑制实验

以 ROCK 抑制剂 Y-27632 (10 μ M)预孵育人牙周膜细胞 2 h,然后 TGF- β 1 刺激 6 h 或者 24 h,不添加抑制剂的细胞加入相同量的 DMSO 作为对照,提取总蛋白,免疫印迹检测蛋白变化。

1.5 统计学分析

各组间实验数据以均数标准差 (Mean $\pm$ SD) 表示。两组数据间的差异用 Students't 检验,每次实验至少重复三次, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 人牙周膜细胞的形态和鉴定

传至第 3 代的牙周膜细胞呈细长的梭形(图 1A)。用免疫组化鉴定培养的细胞,结果显示阴性对照组和角蛋白染色组阴性(图 1B,C),而波形蛋白染色组阳性(图 1D),证实该细胞为中胚层来源,再根据取材部位,最终确定为人牙周膜细胞^[18]。

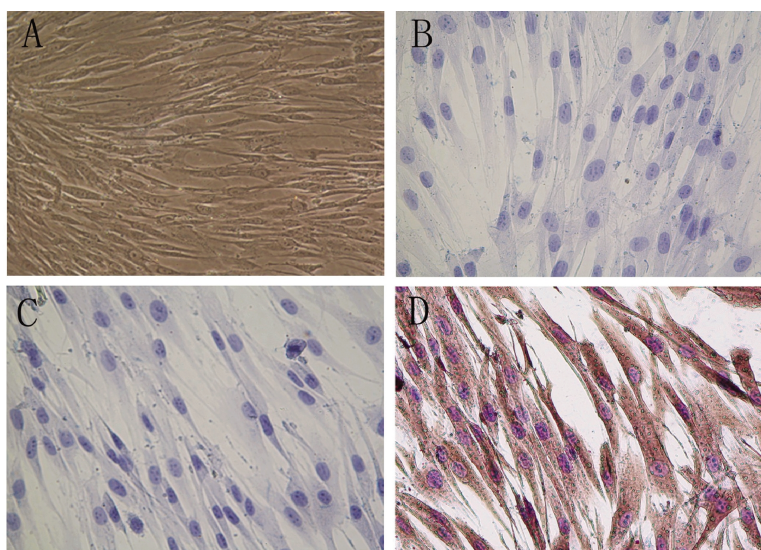


图 1A 牙周膜细胞呈细长的梭形;图 1B 阴性对照组染色阴性;图 1C 角蛋白染色组阴性;图 1D 波形蛋白染色组阳性($\times 200$)

Fig. 1A Periodontal ligament cells were elongated spindle; Fig. 1B Negative control group were stained negative;

Fig. 1C Cytokeratin group were stained negative; Fig. 1D Vimentin group were stained positive($\times 200$)

2.2 TGF- β 1 增加人牙周膜细胞细胞骨架的重排

我们研究 TGF- β 1 对细胞骨架重排的影响。未刺激的对照

细胞细胞质的纤维随机排列,而 TGF- β 1 处理的细胞有较厚的中央应力纤维,且纤维长轴相互平行(图 2)。

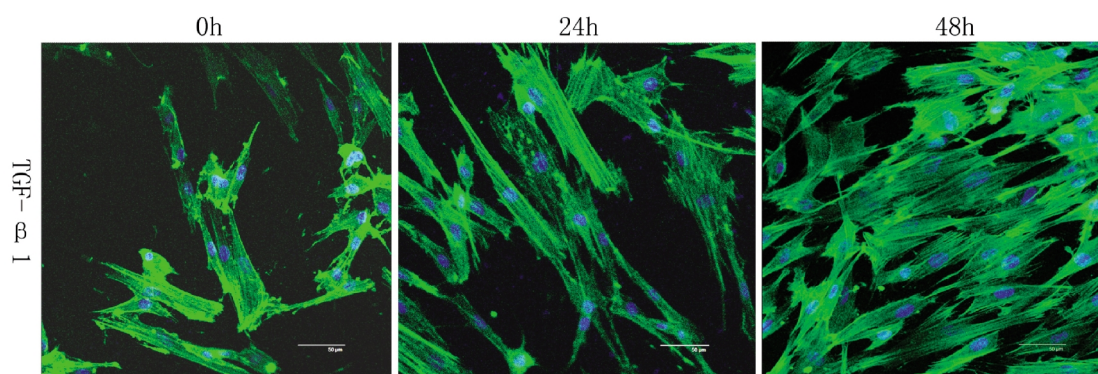


图2 GF- β 1 对人牙周膜细胞细胞骨架的影响(标尺:50 μ m)

Fig.2 The effects of TGF-beta1 on cytoskeletal rearrangements of human periodontal ligament cells(Bar: 50 μ m)

2.3 ROCK 参与 TGF- β 1 诱导的细胞骨架重排

由于 Rho GTP 酶是可以增加应力纤维形成的, 这些小 GTP 酶在 TGF- β 1 引起的人牙周膜细胞的变化中可能起关键作用。ROCK 是 Rho 信号通路的主要成员。我们推测, ROCK 可能参与 TGF- β 1 诱导的细胞迁移和细胞骨架重排。因此, 我们使用免疫印迹检测 TGF- β 1 对 ROCK 的表达的影响。我们发

现, TGF- β 1 增加 ROCK 的蛋白表达水平(图 3A)。

然后, 我们在加入 TGF- β 1 前 2 小时用 ROCK 抑制剂预处理人牙周膜细胞。ROCK 抑制剂 Y-27632 抑制 TGF- β 1 诱导的 ROCK 蛋白表达的上升(图 3B)。这些观察使我们推测 ROCK 很可能是 TGF- β 1 诱导细胞骨架重排的关键信号分子。

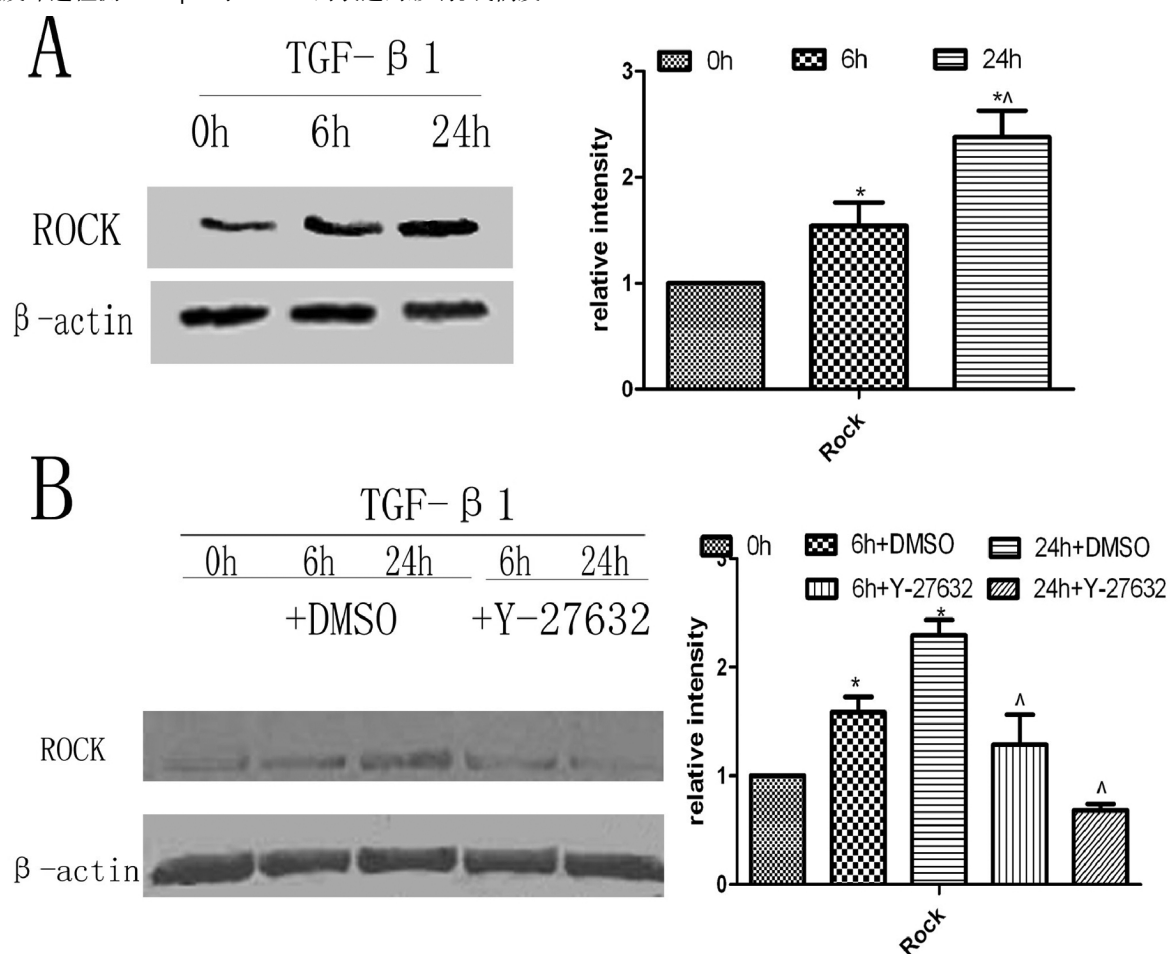


图3 ROCK 参与 TGF- β 1 诱导的细胞骨架重排

Fig.3 ROCK is involved in TGF-beta1 induced cytoskeletal rearrangements

(Mean $\pm$ SD *P < 0.05, TGF- β 1(0h) vs. TGF- β 1 (6 h) and (24h);

A ^P < 0.05, TGF- β 1 (6 h) vs. TGF- β 1 (24h)

B ^P < 0.05, Y-27632 group vs. DMSO group N $\geq$ 3)

2.4 LIMK/cofilin 作为 TGF- β 1 治疗牙周病的 Rho 通路的下游信号分子

最近的研究表明,cofilin 的磷酸化可以由 Rho GTP 酶激活,阻断肌动蛋白解聚,从而诱导细胞骨架重排。因此,我们检测人牙周膜细胞 TGF- β 1 处理后是否会影响丝切蛋白磷酸化。同步化处理的细胞经 TGF- β 1 刺激 6 小时或 24 小时后, p-limk, p-cofilin, limk, 和 cofilin 蛋白表达用免疫印迹方法进行

检测分析。TGF- β 1 处理在整个实验过程中增强 p-limk 和 p-cofilin 的表达(图 4A)。因此, TGF- β 1 抑制肌动蛋白切断丝切蛋白活性。

为了证实这些结果,我们用 ROCK 抑制剂 Y-27632 预处理人牙周膜细胞,然后用 TGF- β 1 刺激细胞。该抑制剂抑制丝切蛋白磷酸化(图 4B)。因此, LIMK 和 cofilin 的确作为 TGF- β 1 治疗牙周病的 Rho 通路的下游信号分子。

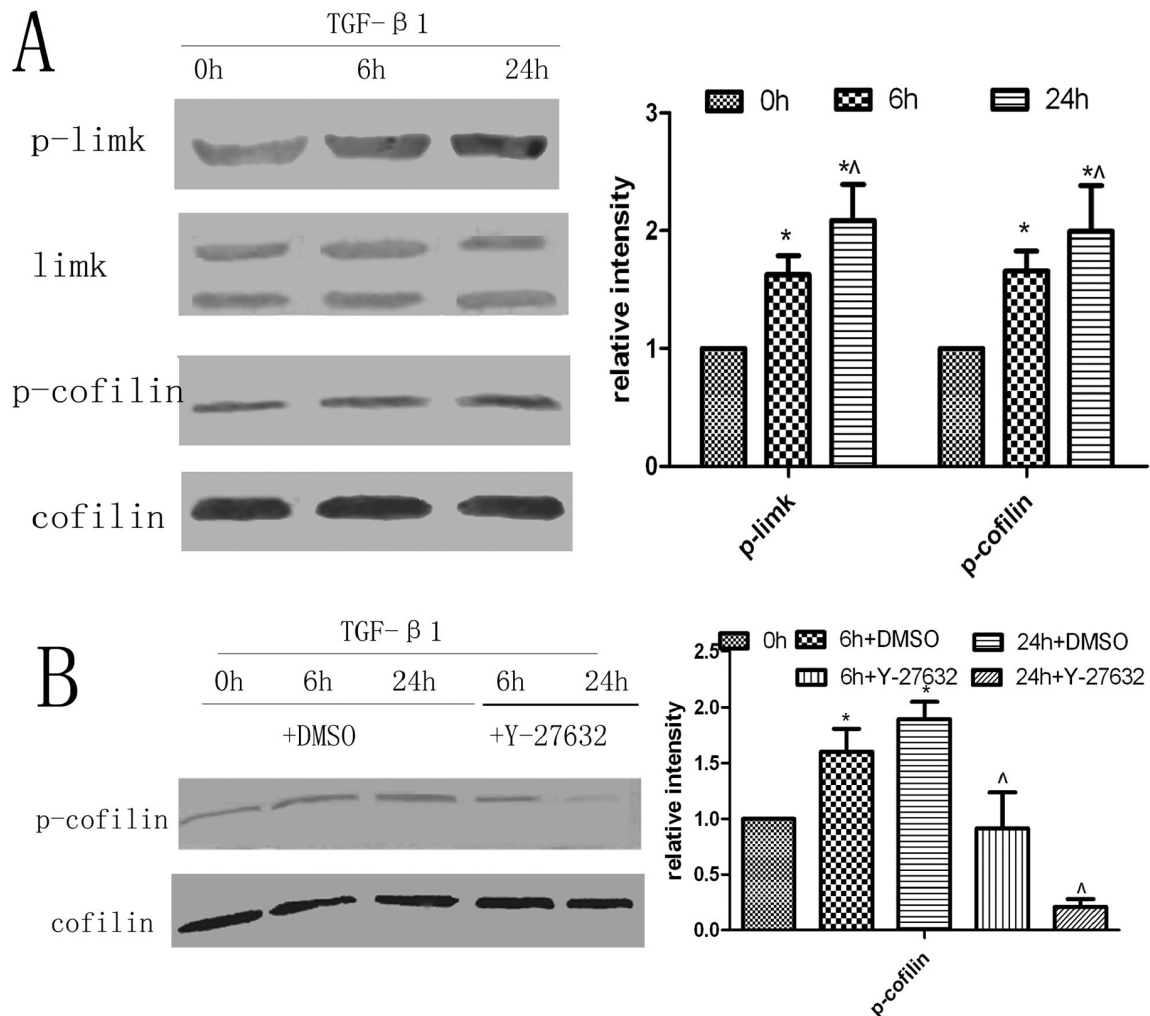


图 4 LIMK/cofilin 作为 TGF- β 1 治疗牙周病的 Rho 通路的下游信号分子

Fig.4 Rho-GDIa is a downstream signaling molecule of the Rho pathway in TGF-beta1 treatment of periodontal disease
(Mean $\pm$ SD *P<0.05, TGF- β 1(0h) vs. TGF- β 1 (6 h) and (24h);
A ^P<0.05, TGF- β 1 (6 h) vs. TGF- β 1 (24h)
B ^P<0.05, Y-27632 group vs. DMSO group

3 讨论

牙周膜细胞在牙周炎的发病中发挥了至关重要的作用,因为一旦他们缺失或损坏,可诱发牙周病。虽然 TGF- β 1 在治疗牙周病方面具有重要的作用,但它所涉及的机制尚不清楚。在这项研究中,我们首次发现 Rock-cofilin 途径在 TGF- β 1 诱导人牙周膜细胞的细胞骨架重排中起着重要作用。

要探索参与 TGF- β 1 治疗牙周病的机制,我们首先培养了

人牙周膜细胞,观察其生物学特性^[9]。然后我们发现, TGF- β 1 诱导牙周膜细胞细胞骨架重排。接下来我们试图找出其中的关键信号通路。我们推测,小 GTPase Rho 可能参与 TGF- β 1 介导的牙周膜细胞形态变化,因为 Rho 是众所周知的在应力纤维的形成中发挥重要作用的分子^[17]。ROCK 是 Rho 信号通路的主要成员。事实上,我们发现 TGF- β 1 上调 ROCK 在人牙周膜细胞中的表达。然后为证明我们的发现,我们用 ROCK 化学抑制剂 Y-27632 预处理细胞,结果我们发现 Y-27632 抑制了 TGF- β 1

对人牙周膜细胞的作用。

无论是在体外和体内, LIMK 和 cofilin 都是 ROCK 的下游信号分子^[20]。丝切蛋白在肌动蛋白解聚反应中起着重要的作用。在这项研究中我们发现, TGF- β 1 处理增加 LIMK 和 cofilin 的磷酸化, 这些效果又被 ROCK 化学抑制剂 Y-27632 抑制。因此, TGF- β 1 刺激增加人牙周膜细胞中 LIMK 和 cofilin 的磷酸化。丝切蛋白磷酸化进而促进肌动蛋白聚合, 导致人牙周膜细胞迁移和细胞骨架重排, 进而起到治疗牙周病的作用。

总之, 本实验初步揭示了 TGF- β 1 作用下人牙周膜细胞细胞骨架形态结构变化的规律, 并研究了其中的作用机制, 即 TGF- β 1 激活 ROCK, 也上调 p-LIMK 和 p-cofilin 的活性。P-cofilin 促进肌动蛋白聚合, 最终导致细胞骨架重排。该结果增强了我们对 TGF- β 1 在治疗牙周病方面的作用机制的了解, 为后续的研究提供了方向。针对这一信号通路, 可能会产生未来治疗牙周病的新的疗法。

参考文献(References)

- [1] Chai Y, Jiang X, Ito Y, et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis [J]. *Development*, 2000, 127: 1671-1679
- [2] Shinsuke Fujii, Hidefumi Maeda, Atsushi Tomokiyo, et al. Effects of TGF- β 1 on the proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells and a human periodontal ligament stem/progenitor cell line[J]. *Cell Tissue Res.*, 2010, 342: 233-242
- [3] Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors and new genetic tests of function in different organisms [J]. *Genes Dev*, 1994, 8: 133-146
- [4] Hu YL, Liu Z, Jiao DK, et al. The effect of RhoA/Rho kinase signal pathway on TGF-beta1-induced phenotypic differentiation of human dermal fibroblasts [J]. *Chinese Journal of Plastic Surgery*, 2011, 27 (5): 376-80
- [5] Katagiri T, Lee T, Takeshima H, et al. Transforming growth factor- β modulates proliferation and differentiation of mouse clonal osteoblastic MC3T3-E1 cells depending on their maturation stages [J]. *Bone Miner*, 1990, 11: 285-293
- [6] Heredia A, Villena J, Romaris M, et al. The effect of TGF-beta 1 on cell proliferation and proteoglycan production in human melanoma cells depends on the degree of cell differentiation [J]. *Cancer Lett*, 1996, 109: 39-47
- [7] Ono Y, Sensui H, Okutsu S, et al. Notch2 negatively regulates myofibroblastic differentiation of myoblasts [J]. *Cell Physiol*, 2007, 210: 358-369
- [8] Okubo K, Kobayashi M, Takiguchi T, et al. Participation of endogenous IGF-I and TGF- β 1 with enamel matrix derivative-stimulated cell growth in human periodontal ligament cells [J]. *Periodont Res*, 2003, 38: 1-9
- [9] Fujita T, Shiba H, Thomas EVD, et al. Differential effects of growth factors and cytokines on the synthesis of SPARC, DNA, fibronectin and alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament cells [J]. *Cell Biol Int.*, 2004, 28: 281-286
- [10] Daniel AF, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton [J]. *Nature*, 2010, 463(7280): 485-492
- [11] 马佳音, 胥春, 郝轶, 等. 动态牵张应变对人牙周膜细胞的细胞骨架的影响[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2012, 28(11): 42-47
Ma Jia-yin, Xu Chun, Hao Yi, et al. Effects of cyclic stretching strain on cytoskeleton of human periodontal ligament cells [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*, 2012, 28(11): 42-47
- [12] Jungeun Lee, Meekyung Ko, and Choun-Kijoo. Rho Plays a Key Role in TGF- β 1-Induced Cytoskeletal Rearrangement in Human Retinal Pigment Epithelium[J]. *Cellular Physiology*, 2008, 216: 520-526
- [13] Lin CS, Chen MF, Wang YS, et al. IL-6 restores dendritic cell maturation inhibited by tumor-derived TGF- β through interfering Smad 2/3 nuclear translocation[J]. *Cytokine*, 2013, 62(3): 352-359
- [14] Chen YS, Mathias RA, Mathivanan S, et al. Proteomics profiling of Madin-Darby canine kidney plasma membranes reveals Wnt-5a involvement during oncogenic H-Ras/TGF-beta-mediated epithelial-mesenchymal transition[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(2): M110. 001131
- [15] Pozzi A. PI3-kinase and TGF- β in glomerular nephropathy: which comes first?[J]. *Kidney Int*, 2012, 82(5): 507-509
- [16] Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, et al. Transforming growth factor- β 1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism [J]. *Mol Biol Cell*, 2001, 12: 27-36
- [17] Hall A. Rho GTPase and the actin cytoskeleton [J]. *Science*, 1998, 279: 509-514
- [18] 李隽, 胥春, 郝轶, 等. 人牙周膜细胞原代培养及鉴定[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2008, 28(11): 1373-1376
Li Jun, Xu Chun, Hao Yi, et al. Primary culture and identification of human periodontal ligament cells [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*, 2008, 28(11): 1373-1376
- [19] Itaya T, Kagami H, Okada K, et al. Characteristic changes of periodontal ligament-derived cells during passage[J]. *Periodont Res*, 2009, 44(4): 425-433
- [20] Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, et al. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase [J]. *Nature*, 1998, 393: 805-809