

文章编号 1006-8147(2015)04-0299-05

论著

牙龈卟啉单胞菌脂多糖对人牙周膜细胞成骨分化能力的影响

薛 栋, 蒋少云, 邓嘉胤, 董允允, 张 蕊

(天津医科大学口腔医院牙周科, 天津医科大学口腔医学院, 天津 300070)

摘要 目的: 观察牙龈卟啉单胞菌(*P.g*)脂多糖(LPS)对人牙周膜细胞(HPDLCs)成骨分化的影响, 探索其作用机制。方法: I型胶原酶+组织块法获得 HPDLCs 后, 分3组培养细胞: α -MEM 培养(A组)、成骨诱导液培养(B组)和 $1 \mu\text{g/mL}$ *P.g* LPS+成骨诱导培养(C组)。MTT法检测3组 HPDLCs 的增殖能力; 碱性磷酸酶染色、茜素红染色及其 OD 值分析, 观察 HPDLCs 的成骨分化能力; 采用实时定量 PCR 检测第3天、第7天以及第14天成骨相关基因的表达。结果: B组与C组细胞增殖无明显差异($P>0.05$); B组和C组 ALP 染色及茜素红染色均为阳性, 两者茜素红 OD 值与 A 组相比明显增高($P<0.05$), 但 C 组 OD 值明显低于 B 组($P<0.05$); B 组与 C 组中成骨相关基因的表达均较 A 组升高, 但与 B 组相比, C 组成骨相关基因水平下降($P<0.05$)。结论: *P.g* LPS 通过抑制成骨相关基因的表达, 干扰 HPDLCs 的成骨分化能力, 从而影响牙周组织在成骨方面的自我修复。

关键词 牙龈卟啉单胞菌; 脂多糖; 人牙周膜细胞; 牙周炎; 成骨分化

中图分类号 R781.4

文献标志码 A

Effects of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells

XUE Dong, JIANG Shao-yun, DENG Jia-yin, DONG Yun-yun, ZHANG Rui

(Department of Periodontics, Hospital of Stomatology, School of Dentistry, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate the influence and mechanism of *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) lipopolysaccharide (LPS) on osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells (HPDLCs). **Methods:** HPDLCs were obtained from the primary culture of the tissues, and cultured in α -MEM (group A) and osteogenic induced medium (group B), as well as osteogenic induced medium containing $1 \mu\text{g/mL}$ *P.g* LPS (group C). The proliferation ability of HPDLCs was analyzed by MTT assay. Alkaline phosphatase (ALP) staining and alizarin red staining were applied to detect the mineralization ability. The expression levels of osteogenic differentiation related-genes collagen I (COL1), ALP, runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and osteocalcin (OCN) were detected by real-time PCR. **Results:** No obvious difference in cell proliferation was found between group B and group C ($P>0.05$). ALP staining and alizarin red staining in group B and group C were positive. Compared with group A, OD values in group B and group C were significantly increased ($P<0.05$), but the OD value in group C was lower than that in group B ($P<0.05$). Although the expression of osteogenic differentiation related-genes increased significantly in group B and group C, the levels of these genes were higher in group B than that in group C ($P<0.05$). **Conclusion:** *P.g* LPS has negative effect on osteogenic differentiation ability of HPDLCs through inhibiting the expressions of osteogenic differentiation related-genes, resulting in impaired self-repair of periodontal tissue.

Key words *Porphyromonas gingivalis*; lipopolysaccharide; human periodontal ligament cells; periodontitis; osteogenic differentiation

人牙周膜细胞(human periodontal ligament cells, HPDLCs)是包括了成牙骨质细胞、成骨细胞、成纤维细胞以及这些细胞的前体细胞或成体干细胞的特异性细胞群^[1], 具有成纤维细胞样和成骨细胞样双重特征, 能够维持牙周膜功能的稳定, 在细胞更新、组织修复以及组织再生中发挥重要的作用, 具有干细胞的特性以及多向分化的潜能。牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P.g*)脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是牙周病重要的致病因子, 其不仅

能够直接作用于牙周组织引起组织的破坏; 同时, 也是一种潜在的细胞活化因子, 诱导细胞分泌多种炎性因子, 在牙周病的发生及发展过程中发挥重要作用。本实验通过体外 *P.g* LPS 刺激 HPDLCs, 观察其对 HPDLCs 成骨分化的影响, 同时探讨 *P.g* LPS 对 HPDLCs 成骨分化的调节机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 DMEM 细胞培养基、 α -MEM 细胞培养基、胎牛血清、青/链霉素、0.25%胰蛋白酶(Gibco 公司, 美国); I型胶原酶、 β -甘油磷酸盐、地塞米松、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

作者简介 薛栋(1987-), 女, 硕士在读, 研究方向: 牙周炎发病机制;
通信作者: 蒋少云, E-mail: jiangshaoyun11@126.com。

diphenyl tetrazolium bromide (MTT)、L-抗坏血酸 (Sigma 公司, 美国); PBS 缓冲液; Trizol 总 RNA 提取试剂 (Invitrogen, 美国); cDNA 逆转录试剂盒、PCR 试剂盒、real-time PCR 试剂盒 (Promega, 美国); *P.g* LPS (Invivogen, 美国); 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate/nitrobluetetrazolium (BCIP/NBT) 溶液 (华兴博创生物, 中国)。

1.2 HPDLCs 体外培养^[2-3] 经患者知情同意, 选取 12~18 岁因正畸治疗需要拔除的新鲜健康的双尖牙, PBS 反复冲洗, 刮取根中 1/3 牙周膜组织剪碎成 1 mm³ 小组织块, 采用 I 型胶原酶+组织块法进行 HPDLCs 的原代培养, 待细胞从组织块中爬出并达 80% 汇合时, 进行首次传代, 取第 3~4 代细胞用于实验。

1.3 方法

1.3.1 实验分组 将细胞分为 3 组进行实验。A 组: 含 5% 胎牛血清的 α -MEM 培养液培养 HPDLCs; B 组: 成骨诱导培养 (含 10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 μ g/mL 维生素 C、 1×10^{-8} mol/L 地塞米松、5% 胎牛血清、 α -MEM 培养液) 培养 HPDLCs; C 组: 1 μ g/mL *P.g* LPS+成骨诱导培养。

1.3.2 MTT 法检测 HPDLCs 的增殖能力 依照上述分组, 将 HPDLCs 接种于每孔 2×10^3 个细胞的 96 孔培养板内。每组分别设 5 个复孔, 隔天换液。用 0.5 mg/mL MTT 检测细胞增殖活性, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后, 于波长 490 nm 测各孔光密度 (optical density, OD) 值。

1.3.3 碱性磷酸酶染色 将 HPDLCs 以 5×10^4 /孔接种于 6 孔板, 培养 24 h 后, 弃原培养液, 依照上述分组分别加入培养液。培养 7 d 后, PBS 洗涤, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 2~3 遍, 每孔加入 1 mL BCIP/NBT 工作液, 室温避光放置 15 min, PBS 洗涤 2~3 遍, 观察染色情况。

1.3.4 茜素红染色以及茜素红半定量检测 培养同上, 第 21 天后吸弃培养液, PBS 清洗, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 2~3 遍, 加入 0.1% 茜素红 (alizarin red -S), 室温放置 30 min, PBS 清洗 2~3 遍, 拍照观察。照相后, 吸弃 PBS, 每孔加入 1 mL 氯化十六烷吡啶, 室温放置 15 min, 将溶液移入 96 孔板, 150 μ L/孔, 酶联免疫检测仪于波长 562 nm 检测 OD 值。

1.4 Real-time PCR 检测成骨相关基因的 mRNA 表达 分组同前。分别于第 3、7 及 14 天采用 Trizol 总 RNA 法提取各组细胞 RNA, 参照试剂盒说明书合成 cDNA 模版, 用获得的 cDNA 进行 real-time PCR

检测成骨相关基因: I 型胶原蛋白 (collagen 1, COL1)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、Runt 相关转录因子 (runt-related transcription factor 2, RUNX2) 和骨钙素 (osteocalcin, OCN)。其引物序列见表 1。以 GAPDH 作为组内对照, 所得数据用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行处理。

表 1 合成引物序列及聚合酶链反应产物长度

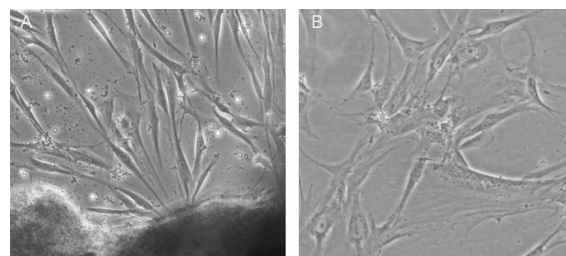
Tab 1 Primer sequences and the length of polymerase chain reaction products

基因	合成序列 (5'-3')	产物长度/bp
COL1	AGGGCCAAGACGAAGACATC	138
	AGATCACGTCATCGCACAACA	
ALP	ACCATTCCACGCTCTTCACATTTG	162
	AGACATTCTCTCGTTCACCGCC	
RUNX2	TCTGGCCTTCCACTCTCAGT	161
	GACTGGCGGGGTGTAAGTAA	
OCN	ATGAGAGCCCTCACACTCCTCG	255
	GTCAGCCAACTCGTCACAGTC	
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	142
	ATGCTGCTGAAGACGCCAGT	

1.5 统计学方法 使用 SPSS 19.0 统计分析软件, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 对所得数据分别进行方差分析, 并用 Bonferroni 法进行多样本均数的两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPDLCs 的培养 原代细胞培养 5~9 d 时, 组织块周围有细胞爬出, 3 周左右可达 80% 汇合。细胞呈长梭形、多边形等, 胞质形成的突起向外呈放射状 (图 1)。



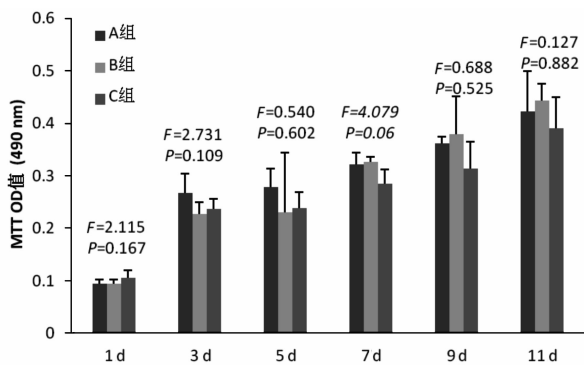
A: 人牙周膜的原代培养; B: 第 2 代人牙周膜细胞的原代培养

图 1 体外培养的人牙周膜细胞 ($\times 100$)

Fig 1 Human periodontal ligament cells cultured *in vitro* ($\times 100$)

2.2 HPDLCs 的增殖能力 第 3~5 天, B 组与 C 组的 OD 值低于 A 组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 且 B 组与 C 组间无统计学差异 ($P > 0.05$)。随后, A、B 及 C 3 组间均无统计学差异 ($P > 0.05$) (图 2)。

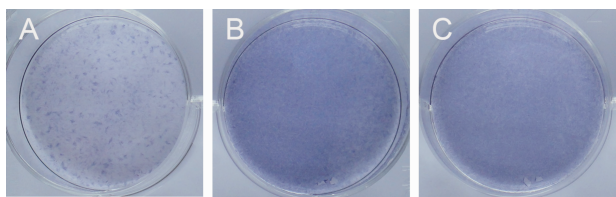
2.3 *P.g* LPS 刺激后碱性磷酸酶染色结果 第 7 天 B 组与 C 组的碱性磷酸酶活性均明显强于 A 组, 而且 B 组的染色最明显 (图 3)。



A组: α -MEM 培养; B组: 成骨诱导液培养; C组: $1 \mu\text{g/mL}$ *P.g* LPS+成骨诱导培养

图2 3组不同培养条件下 HPDLCs 的增殖能力

Fig 2 Proliferation of HPDLCs in three groups

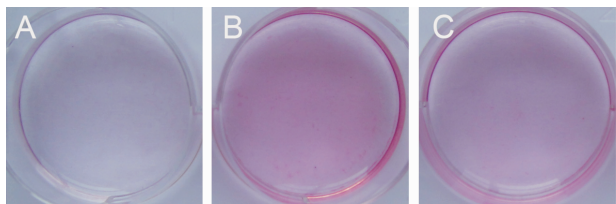


A组: α -MEM 培养; B组: 成骨诱导液培养; C组: $1 \mu\text{g/mL}$ *P.g* LPS+成骨诱导培养

图3 碱性磷酸酶染色

Fig 3 Alkaline phosphatase staining

2.4 *P.g* LPS 刺激后茜素红染色和茜素红半定量检测的结果 21 d后茜素红染色,与A组相比,B组与C组均可见茜素红染色阳性矿化结节形成(图4)。茜素红染色定量结果显示,B组与C组的OD值均明显增高(图5),其差异与A组具有统计学意义($P<0.05$);但C组的OD值明显低于B组,且差别有统计学意义($P<0.05$)。



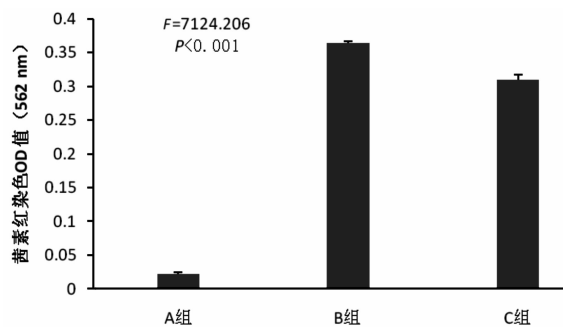
A组: α -MEM 培养; B组: 成骨诱导液培养; C组: $1 \mu\text{g/mL}$ *P.g* LPS+成骨诱导培养

图4 茜素红染色

Fig 4 Alizarin red staining

2.5 *P.g* LPS 刺激后 real-time PCR 检测成骨相关基因的表达水平

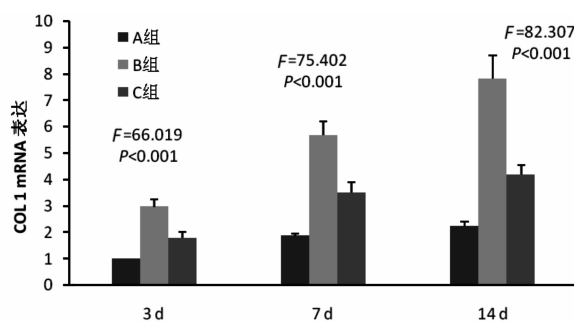
2.5.1 COL1 mRNA 的表达 在第3、7、14天,与A组相比,B组与C组COL1表达均升高($P<0.05$),而C组较B组COL1表达降低,其差异具有统计学意义($P<0.05$)(图6)。



A组: α -MEM 培养; B组: 成骨诱导液培养; C组: $1 \mu\text{g/mL}$ *P.g* LPS+成骨诱导培养

图5 茜素红染色定量检测

Fig 5 Quantitative detection of alizarin red staining

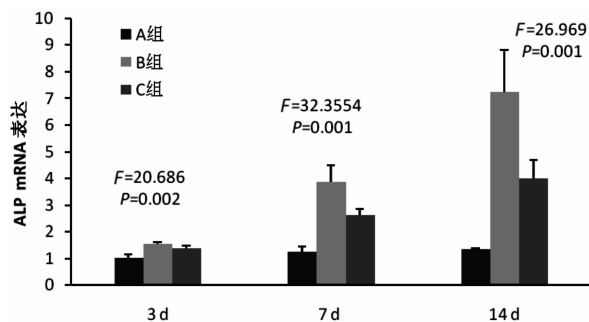


A组: α -MEM 培养; B组: 成骨诱导液培养; C组: $1 \mu\text{g/mL}$ *P.g* LPS+成骨诱导培养

图6 Real-time PCR 测定 COL1 mRNA 水平

Fig 6 The expression of COL1 mRNA in HPDLCs

2.5.2 ALP mRNA 的表达 在3、7、14 d,与A组相比,B组与C组ALP表达均升高($P<0.05$);但在3 d时,B组与C组间ALP表达无统计学差异($P>0.05$),而在7 d及14 d时,C组ALP表达明显低于B组,且具有统计学差异($P<0.05$)(图7)。

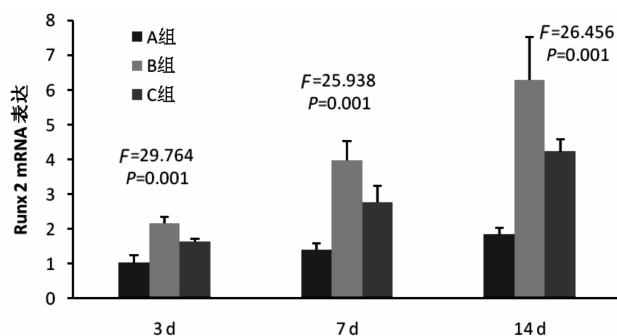


A组: α -MEM 培养; B组: 成骨诱导液培养; C组: $1 \mu\text{g/mL}$ *P.g* LPS+成骨诱导培养

图7 Real-time PCR 测定 ALP mRNA 水平

Fig 7 The expression of ALP mRNA in HPDLCs

2.5.3 RUNX2 mRNA 的表达 与A组相比,B组与C组RUNX2表达明显升高($P<0.05$),且呈时间依赖性,随着时间的延长其表达更明显;同时C组较B组RUNX2表达显著降低($P<0.05$)(图8)。

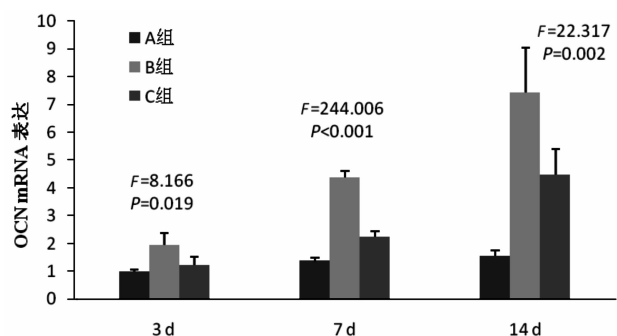


A 组: α -MEM 培养; B 组: 成骨诱导液培养; C 组: 1 μ g/mL *P.g* LPS + 成骨诱导培养

图 8 Real-time PCR 测定 RUNX2 mRNA 水平

Fig 8 The expression of RUNX2 mRNA in HPDLCs

2.5.4 OCN mRNA 的表达 3 d 时, 与 A 组相比, B 组与 C 组 OCN 表达升高, 但两两比较时 C 组与 A 组间无统计学差异 ($P>0.05$), B 组与 A 组间有统计学差异 ($P<0.05$), C 组较 B 组 OCN 表达明显减少 ($P<0.05$); 在 7 d 及 14 d, B 组与 C 组 OCN 表达均较 A 组升高 ($P<0.05$), 而且 C 组较 B 组 OCN 表达明显减少 ($P<0.05$) (图 9)。



A 组: α -MEM 培养; B 组: 成骨诱导液培养; C 组: 1 μ g/mL *P.g* LPS + 成骨诱导培养

图 9 Real-time PCR 测定 OCN mRNA 水平

Fig 9 The expression of OCN mRNA in HPDLCs

3 讨论

牙周膜细胞是牙周及根尖周组织中的主要细胞成分, 其在牙周支持组织的发育、修复以及再生的过程中发挥了重要作用。研究表明 HPDLCs 具有成骨的能力, 能表达较高的 ALP 水平, 产生较高的与矿化相关蛋白质及 I 型胶原等^[4], 因此牙周膜细胞被认为是研究牙周组织修复重建的重要细胞之一。本研究通过 ALP 染色、茜素红染色以及成骨相关基因的检测进一步证实了牙周膜韧带细胞具有成骨分化的能力。

张凤秋等^[5]研究牙周优势菌内毒素对 HPDLCs 增殖的影响发现, 当 *P.g* LPS 浓度小于 0.1 μ g/mL 时促进 HPDLCs 增殖, 浓度在 1 μ g/mL 时对细胞增殖

无明显影响, 而当其浓度大于 10 μ g/mL 时则可抑制 HPDLCs 的生长。同时也有研究表明 *P.g* LPS 浓度低于 0.1 μ g/mL 时对 HPDLCs 既无增殖也无抑制作用, 而浓度达 1 μ g/mL 时对 HPDLCs 有明显抑制作用^[6]。笔者前期实验表明, 当 *P.g* LPS 浓度为 10 μ g/mL 可明显抑制 HPDLCs 的增殖, 这与部分学者的报道一致^[5-6]。而 1 μ g/mL *P.g* LPS 对细胞增殖无明显影响。为排除细胞增殖的改变对细胞分化结果的影响, 本研究以此浓度建立炎症状态下细胞骨向分化模型。

ALP 是参与骨等矿化组织代谢以及再生的标志性酶, 其表达的增多或降低是决定骨矿化程度是否良好的关键条件^[7]。本实验通过 ALP 染色以及实时定量 PCR 显示, 当 *P.g* LPS 刺激后, ALP 的 mRNA 表达较单纯成骨诱导组降低, 从而导致 ALP 活性下降, 提示 *P.g* LPS 降低了 HPDLCs 成骨分化的矿化程度, 从而影响了牙周组织的修复及改建过程。

COL1 是成骨细胞分化过程中的重要基质, 为组织的矿化提供基础。从笔者的研究结果显示, *P.g* LPS 降低 COL1 的表达, 使得细胞分化、组织矿化过程中的矿化基质降低, 从而干扰矿化过程。茜素红染色结果显示矿化结节在 *P.g* LPS 刺激下明显减少, 可能是由于矿化基质的减少所致。Viale-Bouroncle 等^[8]研究结果显示, COL1 促进牙囊细胞表达 ALP, 但是不刺激其矿化过程。因而推测, 在本研究中 ALP 的下降有可能与 COL1 降低有关, 但因细胞的种类不同需要进一步验证。

间充质干细胞细胞的成骨分化是由特定的转录因子调控。在非成骨细胞及成纤维细胞中过表达 RUNX2 能够诱导成骨相关基因的表达, RUNX2 作为成骨特异性激活因子, 在成骨细胞发育、分化以及骨形成与重建过程中起到重要的作用^[9-11]。在 *P.g* LPS 刺激后细胞中 RUNX2 的表达明显下降, 从而干扰了细胞的成骨向分化。

OCN 是骨组织中最丰富的非胶原蛋白, 能够反映骨形成的速率, 是骨细胞活性和骨代谢的特异性指标; 其维持骨正常的矿化速率, 抑制异常羟基磷灰石结晶的形成, 抑制软骨的矿化速率^[12-14]。Pacios 等^[15]研究伴放线杆菌引起的牙周炎症糖尿病动物模型中发现, 在使用抗生素治疗后 OCN 表达升高, 说明在炎症状态下, OCN 的水平降低, 导致牙周骨组织的形成减少, 阻碍了正常的骨改建过程。本实验中, *P.g* LPS 刺激能使 OCN mRNA 的表达较单纯成骨诱导组降低, 可见 *P.g* LPS 干扰了 HPDLCs 的成骨矿化过程, 降低了其骨形成的速率。

炎性微环境下 HPDLCs 的成骨分化功能受多方面调控。有研究发现,炎症组织来源的 PDLCs 成骨分化能力较健康组织来源的 PDLCs 明显降低^[16]。Gilbert 等^[17]发现,肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 可能通过作用于胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) I, 骨形成蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMP)-6 或骨骼肌 LIM 蛋白 (skeletal LIM protein, LMP)-1 表达的远端,从而抑制细胞的成骨分化。在我们课题组的前期研究中发现 *P.g* LPS 能刺激人牙龈成纤维细胞分泌 TNF- α 、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)^[18], 而且其他学者也证实牙周致病菌及 *P.g* LPS 能刺激 HPDLCs 分泌 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8^[19], 笔者推测, 可能是 *P.g* LPS 改变了 HPDLCs 生存的微环境, 产生了过多的炎性细胞因子, 这些细胞因子对细胞的成骨分化产生抑制作用。本实验通过研究 HPDLCs 在炎性状态下成骨分化能力的变化, 提出炎性状态下外界刺激可能通过负调节 HPDLCs 中骨相关基因的表达, 从而抑制其成骨分化能力, 进一步降低牙周组织的自我修复和重建能力, 从而说明了消除炎症是促进牙周组织再生的必需条件。

参考文献:

- [1] Seo B M, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament [J]. Lancet, 2004,364(9429):149
- [2] Ragnarsson B, Carr G, Daniel J C. Isolation and growth of human periodontal ligament cells in vitro [J]. J Dent Res, 1985,64(8):1026
- [3] 王祥, 张斌, 关呈超, 等. 提高人牙周膜成纤维细胞体外培养成功率的方法总结 [J]. 现代口腔医学杂志, 2011,25(6):467
- [4] Arceo N, Sauk J J, Moehring J, et al. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro [J]. J Periodontol, 1991,62(8):499
- [5] 张凤秋, 吴织芬, 万玲, 等. 牙周优势菌内毒素对人牙周膜细胞增殖和碱性磷酸酶活性的影响 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2003, 13(1):27
- [6] 黄美香, 闫福华, 姚丽艳, 等. 环孢素 A 联合脂多糖对牙周膜成纤维细胞增殖的影响 [J]. 中华口腔医学研究杂志: 电子版, 2011, 5(5):470
- [7] Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation [J]. J Cell Biochem, 2005,95(4):827
- [8] Viale-Bouroncle S, Gosau M, Morscheck C. Collagen I induces the expression of alkaline phosphatase and osteopontin via Independent activations of FAK and ERK signalling pathways [J]. Arch Oral Biol, 2014,59(12):1249
- [9] Franceschi R T, Xiao G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways [J]. J Cell Biochem, 2003,88(3):446
- [10] Komori T. Regulation of bone development and maintenance by Runx2 [J]. Front Biosci, 2008,13(13):898
- [11] Greenblatt M B, Shim J H, Glimcher L H, et al. Mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2013,29:63
- [12] Lian J B, Stein G S, Stein J L, et al. The osteocalcin gene promoter provides a molecular blueprint for regulatory mechanisms controlling bone tissue formation: role of transcription factors involved in development [J]. Connect Tissue Res, 1996,35(1/4):15
- [13] Stein G S, Lian J B, Stein J L, et al. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation [J]. Physiol Rev, 1996,76(2):593
- [14] Kondo A, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, et al. Rho-kinase limits BMP-4-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts: regulation of the p38 MAP kinase pathway [J]. Life Sci, 2014,96(1/2):18
- [15] Pacios S, Andriankaja O, Kang J, et al. Bacterial infection increases periodontal bone loss in diabetic rats through enhanced apoptosis [J]. Am J Pathol, 2013,183(6):1928
- [16] Park J C, Kim J M, Jung I H, et al. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations [J]. J Clin Periodontol, 2011,38(8):721
- [17] Gilbert L, He X, Farmer P, et al. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor- α [J]. Endocrinology, 2000, 141(11):3956
- [18] 魏丛丛, 蒋少云, 邓嘉胤. 牙龈卟啉单胞菌脂多糖对人牙龈成纤维细胞炎症刺激作用的研究 [J]. 天津医药, 2013,41(5):419
- [19] Sun Y, Shu R, Li C L, et al. Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of Toll-like receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells [J]. J Periodontol, 2010, 81(10):1488

(2014-12-02 收稿)