

文章编号:1004-7220(2009)03-0211-06

· 基础研究 ·

ERK 信号通路参与调控周期性张应变 诱导的人牙周膜细胞增殖

韩悦^b, 潘劲松^a, 陈丹鹏^a, 毛晓燕^a, 齐颖新^b, 严志强^b

(上海交通大学 a. 附属第一人民医院口腔科, 上海 200080; b. 力学生物学与医学工程实验室, 上海 200240)

摘要: 目的 探讨周期性张应变对人牙周膜细胞 (human periodontal ligament cells, hPDLs) 增殖的影响及其相关机制。方法 应用 FX-4000T 细胞应变加载系统, 对体外培养的 hPDLs 施加周期性张应变, 幅度分别为 10% 和 20%, 加载时间为 6 h 和 24 h, 频率均为 0.1 Hz, 以未加载的静态细胞作为对照组。应用流式细胞术检测人牙周膜细胞细胞周期的变化, 并应用 Western blot 法检测细胞增殖细胞核抗原 (PCNA) 和细胞内信号转导分子 p-ERK1/2 表达的变化。用 ERK1/2 的特异性抑制剂 PD 98059 预处理细胞后, 在 0.1 Hz, 10% 幅度条件下, 加载 6 h, 检测 p-ERK1/2 的表达水平变化对细胞 PCNA 表达的影响。结果 与静态组相比, 周期性张应变增加了 S 期人牙周膜细胞的比例, 并诱导人牙周膜细胞的 PCNA 和 p-ERK1/2 表达增加, 10% 幅度和 20% 幅度相比无显著性差异。同一幅度张应变, 加载 6 h 和 24 h 对细胞 PCNA 和 p-ERK1/2 表达的影响无显著性差异。ERK1/2 的抑制剂 PD98059 不仅可以明显抑制张应变诱导的 p-ERK1/2 活化, 而且张应变诱导的细胞 PCNA 表达也被明显抑制。结论 周期性张应变可激活 ERK 信号通路, 促进体外培养人牙周膜细胞的增殖。

关键词: 周期性张应变; 牙周膜细胞; 增殖; 增殖细胞核抗原; ERK 信号通路

中图分类号: R318.01 文献标志码: A

Proliferation of human periodontal ligament cells promoted by cyclic strain via ERK signaling pathway

HAN Yue^b, PAN Jin-song^a, CHEN Dan-peng^a, MAO Xiao-yan^a, QI Ying-xin^b, YAN Zhi-qi-ang^b. (a. Department of Stomatology, Shanghai 1st People's Hospital, Shanghai 200080, China; b. Institute of Mechanobiology and Medical Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Objective To explore the role of extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway on cyclic strain induced proliferation of human periodontal ligament cells (hPDLs). **Method** The hPDLs cultured in vitro were subjected to cyclic strain by FX-4000T system with 10% or 20% -elongation magnitude, 6 or 24 hours-duration respectively, at the same frequency of 0.1 Hz. The cell cycles of hPDLs were measured by FCM. The expressions of p-ERK1/2 and PCNA in hPDLs were analyzed by Western blotting. To investigate the effect of p-ERK on cell proliferation, hPDLs were incubated with PD98059, a specific ERK kinase inhibitor, and then the expression of PCNA was also analyzed by Western blot after hPDLs were exposed to 10% -cyclic strain at 0.1Hz-frequency for 6 hours. **Result** Cyclic strain obviously increased the ratio of S period in the cell cycles, the expressions of PCNA and p-ERK1/2 in hPDLs, in which the magnitude and duration of cyclic strain had no significant difference. PD98059 could repress not only the activation of p-ERK1/2 but the ex-

收稿日期:2008-12-15; 修回日期:2009-01-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10502034)

作者简介:韩悦(1983-),女,工学硕士,研究方向:力学生物学

通讯作者:潘劲松,副主任医师, Tel:(021)63240090-5523; E-mail: pip0003@163.com

pression of PCNA induced by cyclic strain in hPDLs. **Conclusions** Cyclic strain promotes the proliferation of hPDLs through ERK signaling pathway.

Key words: Cyclic strain; Periodontal ligament cells (PDLs); Proliferation; Proliferating cell nuclear antigen (PCNA); ERK signaling pathway

人牙周膜细胞 (Human periodontal ligament cells, hPDLs) 作为牙周膜中的主体细胞, 是口腔正畸矫治力的效应细胞。他可将机械负荷转化为分子信号, 调节细胞功能, 在机械应力介导的正畸牙周组织重建中起重要作用。牙周组织重建是多因素参与的复杂的生物学过程, 涉及多种细胞的黏附、增殖和分化等^[1]。在这一过程中起主要作用的细胞是牙周膜细胞, 它具有不断增殖的能力。然而, 关于机械应力(应变)作用下人牙周膜细胞增殖变化及其机制尚需要深入探讨。

增殖细胞核抗原 (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 由 Miyachi 等在系统性红斑狼疮患者的血清中首次发现并命名^[2]。PCNA 是一种相对分子质量为 36 KD 的蛋白质, 在细胞核内合成, 并存在于细胞核内, 为 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白。研究发现, PCNA 只存在于增殖细胞细胞核内; 其量的变化与 DNA 合成一致, 在细胞增殖的启动上起重要作用, 检测其在细胞中的表达, 可反映细胞增殖状态, 是评价细胞增殖状态的一个重要指标^[3]。丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen activated protein kinases, MAPKs) 信号途径由 ERK、JNK 和 p38 组成, 是介导细胞反应的重要信号系统。ERK 主要有 ERK1 和 ERK2 两种同工酶, 细胞外信号调节激酶 ERK1/2 信号通路 (Ras→Raf→MEK1/2→ERK1/2) 是经典的 MAPK 信号转导途径。磷酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) 是 ERK 的活性形式, 可进入细胞核, 通过磷酸化活化转录因子, 影响靶基因表达, 调控细胞增殖和分化。ERK 信号通路是否参与了机械应变诱导的人牙周膜细胞增殖调控, 目前仍不清楚。

本文应用 Flexercell 细胞应变加载装置对体外培养的人牙周膜细胞施加不同大小和时间的张应变, 观察人牙周膜细胞 PCNA 表达和细胞周期的变化以及 ERK 信号通路的调控影响。

1 材料和方法

1.1 人牙周膜细胞的培养与鉴定

用酶消化法获取人牙周膜细胞并体外培养并传

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 α -MEM 完全培养液, 置含 5% CO₂ 的培养箱 37 °C 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 ABC 法, 波丝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 细胞周期性张应变加载

将消化好的人牙周膜细胞计数后, 按 3×10^5 个/孔的浓度接种于 Bio-Flex6 孔培养板中; 每孔加 2 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 次日换成无血清 DMEM 培养基培养 24 h。采用 Flexercell 细胞应变加载系统 (FX-4000, Flexcell International, 美国), 整个加载装置放置于 CO₂ 孵育箱内, 由 FX-4000 计算机自动控制。加载方案为: 幅度为 10% 和 20%, 加载时间为 6 h 和 24 h, 频率均为 0.1 Hz。以不加载的静态细胞作为对照组。

1.3 流式细胞术分析细胞周期

以未加载的静态细胞作为对照, 周期性张应变加载结束后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 制成单细胞悬液, PBS 清洗, PI 染色 30 min, 用流式细胞仪检测细胞周期。应用 WinMDI 2.9 分析软件检测各组细胞细胞周期中 S 期细胞所占的百分比。

1.4 蛋白免疫印迹检测 (Western Blotting)

用 2×蛋白裂解液提取人牙周膜细胞蛋白; 蛋白免疫印迹实验检测 p-ERK1/2 以及 PCNA 的表达量, 分别用 T-ERK1/2 和 GAPDH 作为内参。一抗浓度: PCNA 抗体, 1:500 (Zymed Technologies); GAPDH 抗体, 1:500 (Santa Cruz Technologies); p-ERK1/2 多克隆抗体, 1:500 (Cell Signaling Technologies); T-ERK1/2 多克隆抗体, 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,计算 p-ERK1/2 与 T-ERK1/2,PCNA 与 GAPDH 的比值用作统计分析。

1.5 抑制实验

以 ERK1/2 的抑制剂 PD98059 (10 $\mu\text{mol/L}$) 预孵育人牙周膜细胞 2 h, 然后施加 0.1 Hz、10 % 牵拉幅度的张应变 6 h, 不添加抑制剂的孔加入相同量的 DMSO 作为对照, 提取总蛋白, 免疫印迹检测 PCNA 和 p-ERK1/2 的含量, 分别用 GAPDH 和 T-ERK1/2 作为内参基因。

1.6 统计学分析

各组间实验数据以均数 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示。两组数据间的差异用 Student's *t* 检验。 $P < 0.05$ 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 1)。用免疫组化鉴定培养的细胞, 结果显示细胞波形蛋白染色阳性 (图 2), 而角蛋白染色阴性, 证实该细胞为中胚层来源, 确定为人牙周膜细胞。

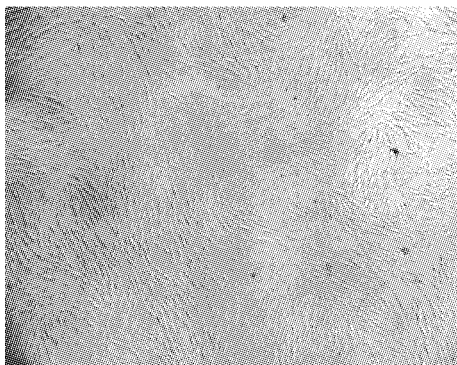


图 1 原代培养后传代的人牙周膜细胞 ($P_3, 5\times$)

Fig.1 Morphology of hPDLs ($P_3, 5\times$)

2.2 周期性张应变诱导了人牙周膜细胞 S 期细胞比例增加

为检测周期性张应变对细胞周期的影响, 利用流式细胞仪 PI 染色分析, 分别得到加载组 and 对照组细胞周期反映增殖的 DNA 合成期细胞所占的百分比 (S %), 如图 3、4 所示。结果显示, 与静态对照组相比, 对牙周膜细胞加载不同的时间, 10 % 幅度的加载组 S 期所占的百分比相对于静态组均显著

性增加 ($P < 0.05$); 20 % 幅度的加载组与 10 % 加载组 S 期所占的比例无显著性差异 ($P > 0.05$)。结果显示, 周期性张应变促使人牙周膜细胞 S 期所占比例增加。

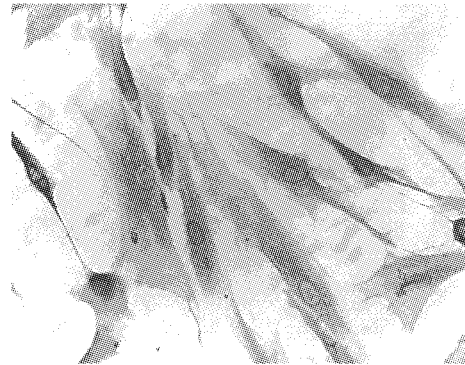


图 2 人牙周膜细胞的波形蛋白免疫组化鉴定 ($40\times$)

Fig.2 Identification of hPDLs with Vimentin 物镜 ($40\times$)

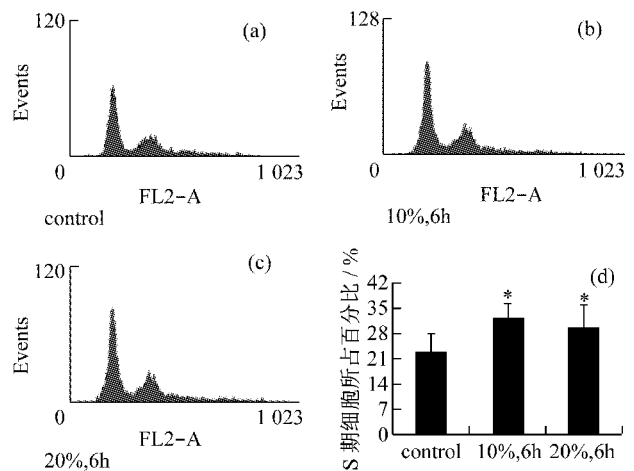


图 3 不同幅度张应变对人牙周膜细胞细胞周期的影响 (加载 6 h)

Fig.3 Effects of different magnitude of cyclic strains on the cell cycle of hPDLs for 6 hours. (a) control-6 h; (b) 10 %-6 h; (c) 20 %-6 h; (d) the ratio of S period in cell cycles (Mean \pm SD* $P < 0.05$ versus the static, $N = 3$)

2.3 周期性张应变诱导人牙周膜细胞 PCNA 表达增加

对体外培养的人牙周膜细胞施加周期性张应变, 幅度分别为 10 % 和 20 %, 加载时间为 6 h 和 24 h, 频率均为 0.1 Hz, 以未加载的静态细胞作为对照组。蛋白免疫印迹实验结果, 如图 5 所示, 与静态对照组相比, 在同一加载时间条件下, 10 % 和 20 % 幅度的周期性张应变均诱导细胞 PCNA 的表

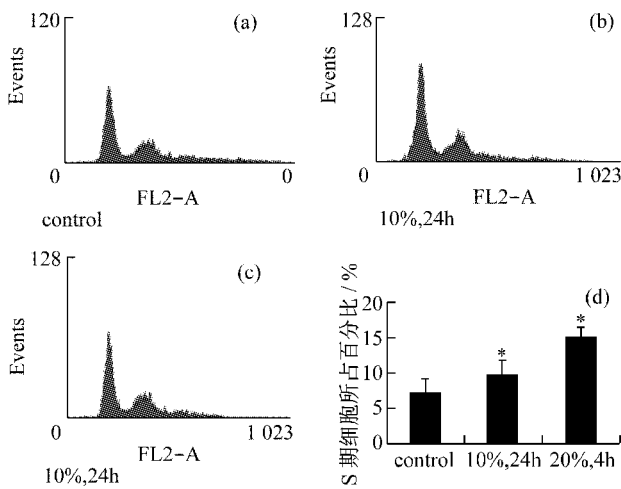


图4 不同幅度张应变对人牙周膜细胞细胞周期的影响(加载24 h)
Fig.4 Effects of different magnitude of cyclic strains on the cell cycle of hPDLs for 24 hours. (a) control-24h; (b) 10 %-24 h; (c) 20 %-24h; (d) the ratio of S period in cell cycles(Mean \pm SD* $P < 0.05$ versus the static, $N = 3$)

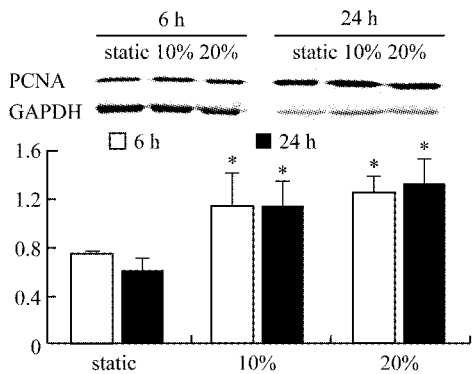


图5 不同幅度、不同时间相点周期性张应变对人牙周膜细胞 PCNA 表达的影响
Fig.5 Effects of different magnitude of cyclic strains on PCNA expression of hPDLs at the different time course.(Mean \pm SD* $P < 0.05$ versus the static, $N = 3$)

达显著增加($P < 0.05$),20%幅度加载细胞的PCNA表达较10%幅度加载的细胞略有增加,但无显著性差异($P > 0.05$)。同一加载幅度条件下,6h和24h加载时间对细胞PCNA表达的影响无显著性差异($P > 0.05$)。

上述细胞流式术和蛋白免疫印迹实验结果表明,周期性张应变促进了人牙周膜细胞增殖。

2.4 周期性张应变促进人牙周膜细胞 ERK1/2 磷酸化

在加载幅度分别为10%和20%,加载时间为

6h,频率为0.1 Hz周期性张应变条件下的牙周膜细胞作为牵拉组,以未加载的静态细胞作为对照组,进行蛋白免疫印迹实验。结果如图6所示,与静态组相比,周期性张应变使牙周膜细胞 p-ERK1/2 的表达显著增加($P < 0.05$);但不同牵张幅度(10%和20%)对细胞 p-ERK1/2 表达的影响并没有显著性差异($P > 0.05$)。

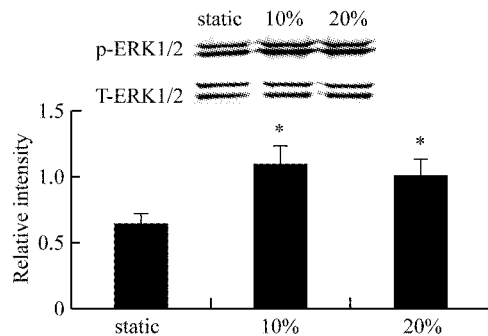


图6 不同张应变幅度对人牙周膜细胞 p- ERK1/2 表达的影响
Fig.6 Effects of different magnitude of cyclic strains on ERK1/2 activation of hPDLs.(Mean \pm SD* $P < 0.05$ versus static, $N = 3$)

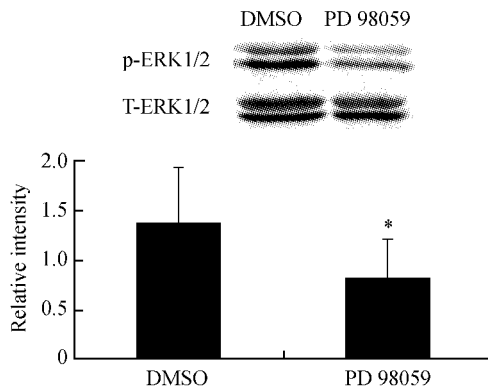


图7 抑制剂对张应变诱导的人牙周膜细胞 p-ERK1/2 活化的抑制作用
Fig.7 Effects of inhibitor PD98059 on the activation of p-ERK1/2 of hPDLs.(Mean \pm SD* $P < 0.05$ versus the static, $N = 3$)

以上结果提示,周期性张应变通过 ERK 信号通路促进了人牙周膜细胞增殖。

3 讨论

牙齿具有承受、传递和分散咬合力等功能,这些功能与牙周膜的生物力学性质紧密相关。研究牙周膜的生物力学性质及其影响因素,对于认识口腔生理、指导牙体或牙列缺损的修复^[4]。在口腔正颌领

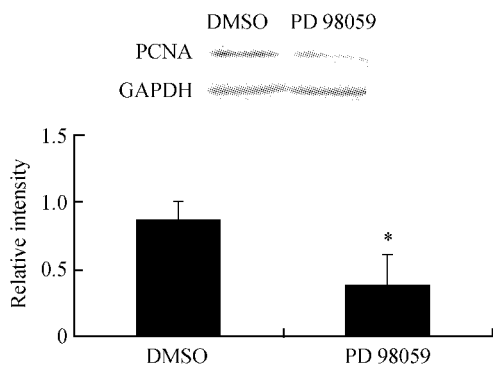


图8 抑制剂对张应变诱导的人牙周膜细胞 PCNA 表达的抑制作用
 Fig.8 Effects of inhibitor PD98059 on the expression of PCNA of hPDLCS. (Mean \pm SD * $P < 0.05$ versus the static, $N = 3$)

域,通过施加矫治力,在不同部位、不同组织间产生一定的应力分布,进而产生一定的生物学效应(组织的吸收和增生等)发生组织重建,最后达到矫治的目的,目前从生物力学角度探讨矫治力传递所致应力分布和规律以探索矫治机制已成为正畸学中的重要研究内容,生物力学已成为口腔正畸学的重要理论与临床技术基础^[5]。

本实验利用 Flexcell 细胞周期性张应变加载系统,对体外培养的人牙周膜细胞进行加载,观察细胞周期、PCNA 蛋白表达和 ERK 信号通路的变化,并应用 ERK 通路特异性的抑制剂 PD98059,探讨 ERK 通路对张应变诱导的牙周膜细胞增殖的作用。

细胞具有极其复杂的信号转导网络,其中 MAPK 信号转导通路包括一组高度保守的蛋白激酶,是细胞外信号引起细胞生理反应的共同途径^[6]。MAPK/ERK 通路被公认为经典的 MAPK 信号转导通路。ERK 正常定位于胞质,当激活后转位至胞核,调节转录因子活性,产生细胞效应^[7]。ERK 作为 MAPK 家族中的一员,其信号传导途径是涉及调节细胞生长、发育及分裂的信号网络的核心^[8]。ERK 的药理学抑制剂 PD98059 能够通过选择性抑制 ERK1/2 的激酶活性,阻止 ERK1/2 信号通路的活化,并能显著抑制急性骨髓性白血病细胞的增殖,促进其凋亡进程^[9]。

Chiba 等^[10]报道,对体外培养的 hPDLCS 施加机械应力可使其碱性磷酸酶活性和细胞骨架发生变化。也有报道,施加频率为 0.1 Hz、幅度 12% 的牵张对培养的人牙周膜成纤维细胞的增殖起一定的促进作用^[11]。

本文对体外培养的人牙周膜细胞施加不同幅度和不同加载时间的同一频率周期性张应变,与静态对照组相比,细胞 S 期所占比例和 PCNA 的表达均有显著增加;同一时相点,不同幅度的张应变使 S 期所占比例和 PCNA 表达略有增加,但差异并不显著;同一加载幅度条件下,加载时间对细胞 S 期所占比例和 PCNA 的表达无显著的影响。同样,周期性张应变使牙周膜细胞 p-ERK1/2 的表达显著增加;但不同加载幅度使 p-ERK1/2 的表达并没有显著的差异。ERK1/2 的抑制剂 PD98059 不仅可以显著地抑制张应变诱导的 p-ERK1/2 活化,而且张应变诱导的细胞 PCNA 表达也被显著抑制。上述结果表明,周期性张应变可以诱导体外培养的人牙周膜细胞增殖。

4 结语

本文结果证明了周期性张应变通过 ERK1/2 信号通路促进了人牙周膜细胞 PCNA 的表达,提示周期性张应变通过 ERK1/2 信号通路参与了人牙周膜细胞增殖调控。正畸牙齿移动使牙周组织受到外力作用从而产生复杂的生理反应过程;而牙齿移动最主要的影响因素是所施加的力,包括力的大小、方向、时间、作用点及瞬时加载率^[12]。本文探讨不同张应变刺激对人牙周膜细胞增殖的影响,有助于进一步阐明人正畸牙周组织重建的机制,对矫治机理研究具有理论和临床意义。

参考文献:

- [1] Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration [J]. Periodontol, 2000, 2006, 40(2):164-172.
- [2] Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM. Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues: comparison with flow cytometric analysis. Am J Pathol 1989; 134: 733-739.
- [3] Haracska L, Torres Ramos CA, Johnson RE, et al. Opposing effects of ubiquitin conjugation and SUMO modification of PCNA on replicational bypass of DNA lesions in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24 : 4267-4274.
- [4] 刘宇, 施生根, 程静涛. 牙周膜的生物力学性质及其研究进展 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2001(1): 53-55.

(下转第 222 页)