

MIP-1 α 对人牙周膜干细胞骨向分化的影响及其机制王钊鑫^{1,2}, 李淑慧¹, 代慧娟^{1,2}, 齐鲁¹, 刘紫薇^{1,2}, 尼加提·吐尔逊^{1*}¹新疆医科大学第二附属医院口腔科, 新疆乌鲁木齐 830011; ²新疆医科大学研究生院, 新疆乌鲁木齐 830011

[中图分类号] R781.4 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2023.03.0283

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 王钊鑫, 李淑慧, 代慧娟, 等. MIP-1 α 对人牙周膜干细胞骨向分化的影响及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(3): 283-291.

[收稿日期] 2022-05-13 [录用日期] 2022-11-04 [上线日期] 2022-12-30

[摘要] **目的** 探讨巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)对人牙周膜干细胞(hPDLSCs)增殖、迁移、骨向分化的影响及其可能的机制。**方法** 收集2020年11月—2021年10月在新疆医科大学第二附属医院口腔科门诊就诊的12~25岁患者拔除的健康牙(正畸减数前磨牙或阻生的第三磨牙)共16颗, 组织块法联合酶消化法培养原代干细胞, 并采用流式细胞术鉴定细胞表型。(1)细胞生物学特性实验: 第3代hPDLSCs分为0(对照组)、1、10 μ g/ml MIP-1 α 组, 各组再分别加入含体积分数为10%胎牛血清、100 U/ml青链霉素、2 mmol/L谷氨酰胺的 α -MEM培养基, 干预24、48、72 h后采用CCK-8法检测各组细胞增殖能力, 干预24 h后采用划痕实验检测各组细胞横向迁移能力。(2)对骨向分化的影响及可能的机制: 第3代hPDLSCs分为0(对照组)、1、10 μ g/ml MIP-1 α 组, 分别加入成骨诱导液, 干预7 d后采用碱性磷酸酶(ALP)染色及半定量分析、干预14 d后采用茜素红染色及半定量分析检测细胞成骨能力; 干预7 d后采用qRT-PCR和Western blotting检测成骨相关基因Runx2(转录因子2)、骨桥蛋白(OPN)、转录因子SP7(Osterix)及Notch信号通路相关分子Notch1受体、Jagged1配体及下游因子Hey1的mRNA及蛋白表达情况。**结果** 流式细胞术检测结果显示, hPDLSCs STRO-1、CD146呈阳性表达, CD34呈阴性表达。(1)细胞生物学特性实验中, CCK-8法结果显示, 与对照组比较, 24、48 h时1、10 μ g/ml MIP-1 α 组hPDLSCs OD值差异无统计学意义($P>0.05$); 72 h时, 与对照组比较, 1 μ g/ml MIP-1 α 组hPDLSCs OD值差异无统计学意义($P>0.05$), 而10 μ g/ml MIP-1 α 组hPDLSCs OD值明显增高($P<0.05$)。划痕实验结果显示, 与对照组比较, 1 μ g/ml MIP-1 α 组细胞划痕愈合率差异无统计学意义($P>0.05$), 而10 μ g/ml MIP-1 α 组划痕愈合率明显增高($P<0.05$)。(2)对骨向分化的影响及可能的机制实验中, ALP染色及半定量结果显示, 1、10 μ g/ml MIP-1 α 组ALP活性均明显低于对照组($P<0.05$)。茜素红染色及半定量结果显示, 1、10 μ g/ml MIP-1 α 组矿化结节数量均明显少于对照组($P<0.05$)。qRT-PCR和Western blotting结果显示, 与对照组比较, 1 μ g/ml MIP-1 α 组hPDLSCs的成骨相关基因Runx2、OPN及Osterix mRNA及蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$), 而10 μ g/ml MIP-1 α 组均明显降低($P<0.05$)。1、10 μ g/ml MIP-1 α 组Notch1 mRNA及蛋白表达水平均明显低于对照组($P<0.05$); 与对照组比较, 10 μ g/ml MIP-1 α 组Jagged1、Hey1 mRNA及蛋白表达水平均低于对照组($P<0.05$), 而1 μ g/ml MIP-1 α 组差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** MIP-1 α 可促进hPDLSCs增殖, 抑制hPDLSCs骨向分化, 其机制可能与抑制Notch信号通路的激活相关。

[关键词] 人牙周膜干细胞; Notch信号通路; 巨噬细胞炎性蛋白-1 α ; 成骨分化**Effect and mechanism of MIP-1 α on osteo-differentiation of human periodontal ligament stem cells**Wang Zhao-Xin^{1,2}, Li Shu-Hui¹, Dai Hui-Juan^{1,2}, Qi Lu¹, Liu Zi-Wei^{1,2}, Negati Tursun^{1*}¹Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China²Graduate School of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China

*Corresponding author, E-mail: kqnijate@126.com

This work was supported by the Graduate Innovation and Entrepreneurship Project of Xinjiang Medical University (CXC2022023), and the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2019D01C231)

[基金项目] 新疆医科大学研究生科研创新项目(CXC2022023); 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2019D01C231)**[作者简介]** 王钊鑫, 硕士研究生, 主要从事口腔修复与种植方面的研究**[通信作者]** 尼加提·吐尔逊, E-mail: kqnijate@126.com

[Abstract] Objective To investigate the effect of macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) on proliferation, migration and osteo-differentiation of human periodontal stem cells (hPDLSCs) and its possible mechanism. **Methods** A total of 16 healthy teeth (orthodontic minus premolar or blocked third molar) extracted from patients aged 12 to 25 years attending the outpatient clinic of the Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University from November 2020 to October 2021 were collected and primary stem cells were cultured by tissue block method combined with enzymatic digestion, and the cell phenotype was identified by flow cytometry. (1) Cell biological characteristics experiment: the 3rd generation hPDLSCs were divided into 0 (control group), 1 and 10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α groups, and each group was then added with α -MEM medium containing volume fraction of 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, and 2 mmol/L glutamine, respectively, and the proliferation ability of each group was detected by CCK-8 method after 24, 48 and 72 h of intervention. The lateral migration ability of cells in each group was detected by scratch assay after 24 h of intervention. (2) Effect and possible mechanism of osteo-differentiation: 3rd generation hPDLSCs were divided into 0 (control group) 1 and 10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α groups, and osteogenic induction solution was added to each group, and osteogenic ability of cells was detected by alkaline phosphatase (ALP) staining and semi-quantitative analysis 7 d after intervention and by alizarin red staining and semi-quantitative analysis 14 d after intervention; osteogenic ability of cells was detected by qRT-PCR and Western blotting. The mRNA and protein expression of osteogenic genes Runt-related transcription factor 2 (Runx2), bone bridge protein (OPN) and transcription factor SP7 (Osterix) and Notch1 receptor, Jagged 1 ligand and downstream factor Hey1 were detected by qRT-PCR and Western blotting 7 d after intervention. **Results** Flow cytometry results showed that hPDLSCs STRO-1 and CD146 showed positive expression, and CD34 showed negative expression. (1) In the experiment of cell biological characteristics, the results of CCK-8 method showed that the differences in OD values of hPDLSCs were not statistically significant ($P>0.05$) in 1 $\mu\text{g/ml}$ and 10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α groups at 24 h and 48 h compared with control group; at 72 h, the differences in OD values of hPDLSCs were not statistically significant ($P>0.05$) in 1 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α group compared with control group, while the differences in OD values of hPDLSCs in 10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α group were significantly higher ($P<0.05$). The results of scratch assay showed that the difference of scratch healing rate of cells in 1 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α group was not statistically significant compared with that in control group ($P>0.05$), while the scratch healing rate of 10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α group was significantly higher ($P<0.05$). (2) In the experiments of the effect of osteo-differentiation and possible mechanism, ALP staining and semi-quantitative results showed that the ALP activity was obviously lower in 1 $\mu\text{g/ml}$ and 10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α groups than that in control group ($P<0.05$). The results of alizarin red staining and semi-quantification showed that the number of mineralized nodules in 1 $\mu\text{g/ml}$ and 10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α groups were significantly less than that in control group ($P<0.05$). qRT-PCR and Western blotting results showed that the osteogenesis-related genes *Runx2*, *OPN* and *Osterix* mRNA and protein expression levels in 1 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α group of hPDLSCs were not statistically significant compared with control group, while those in the 10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α group were significantly lower ($P<0.05$). *Notch1* mRNA and protein expression levels in 1 $\mu\text{g/ml}$ and 10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α groups were significantly lower than those in control group ($P<0.05$); *Jagged1* and *Hey1* mRNA and protein expression levels in 10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α group were lower than those in control group ($P<0.05$), while the differences were not statistically significant in the 1 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α group ($P>0.05$). **Conclusion** MIP-1 α can promote proliferation and inhibit the osteo-differentiation of hPDLSCs, and the mechanism may be related to the inhibition of Notch signaling pathway activation.

[Key words] human periodontal membrane stem cells; Notch signaling pathway; macrophage inflammatory protein-1 α ; osteogenesis differentiation

牙周炎是以牙周支持组织进行性破坏为主的慢性炎症性疾病, 可导致牙槽骨吸收、牙齿松动、移位等, 严重影响患者的面形美观和生活质量^[1]。随着炎症介质的募集, 破骨细胞的骨吸收增加, 成骨细胞的骨形成被抑制, 造成牙槽骨平衡失调。修复牙槽骨缺损是口腔临床治疗的难点, 引导组织再生术、牙周手术等传统治疗方法不能从根本上恢复牙周组织。近年来基于干细胞的组织工程替代疗法已成为研究热点, 以干细胞、生物学因子、骨替代材料及支架为基础的组织工程技术已被证实是有效的^[2]。既往的研究着重于筛选种子干细胞^[3], 比较不同骨替代材料^[4], 不同细胞因子的成骨效

果^[5]。研究证实, 人牙周膜干细胞 (human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs) 具有较强的自我更新能力、多向分化潜能, 是修复牙槽骨缺损的首选种子细胞, 并有望通过成骨向分化潜能促进牙周骨组织缺损的再生修复^[6-8]。近年来研究发现, 牙周组织中多种细胞 (如成纤维细胞、内皮细胞、巨噬细胞等) 均可表达并分泌趋化因子至牙龈组织和龈沟液中^[9]。巨噬细胞炎症蛋白-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α) 是C-C趋化因子家族成员之一, 又名CCL3, 是一类能够激活和促进多种白细胞及骨细胞迁移的炎性细胞因子^[10]。MIP-1 α 对骨髓微环境中破骨细胞的

聚集及分化起关键作用^[11-12], 可通过刺激骨吸收及诱导组织损伤的方式参与牙周组织破坏。然而, 它与hPDLSCs的关系和作用机制尚不明确。Notch信号通路直接参与不同类型细胞的生存和功能重塑, 同时也是炎症微环境下影响干细胞成骨分化的重要调节途径, 如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)^[13]等多种炎症因子可激活或抑制Notch信号通路调控相关基因的表达, 但MIP-1 α 介导的Notch信号通路对hPDLSCs的具体作用机制尚不明确。本研究采用不同浓度MIP-1 α 进行干预, 探讨MIP-1 α 对hPDLSCs增殖、迁移、骨向分化的影响及可能的机制, 旨在为牙周组织再生研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 胎牛血清购自美国Gibco公司, I型胶原酶、胰蛋白酶购自美国Corning公司, α -MEM培养基、PBS、0.25%胰蛋白酶、100 U/ml青链霉素、2 mmol/L谷氨酰胺均购自以色列BI公司, 基质细胞抗原1(stromal cells antigen 1, STRO-1)、PE标记的抗人CD146抗体(CD146)、FITC标记的抗人CD34抗体(CD34)购自美国Invitrogen公司, CCK-8试剂盒购自武汉博士德公司, 成骨诱导液购自广州赛业公司, 茜素红染色液、RIPA细胞裂解液购自北京索莱宝公司, 碱性磷酸酶(ALP)染色液购自武汉赛维尔公司, *Runx2*、*OPN*、*Osterix*、*Notch1*、*Jagged1*、*Hey1*、*GAPDH*引物均购自上海生工生物工程股份有限公司, 反转录试剂盒、PrimeScriptTM RT reagent Kit试剂盒均购自日本TaKaRa公司, 兔抗OPN、Osterix、Notch1、Jagged1及 β -actin抗体均购自美国Abcam公司, 兔抗Runx2抗体购自美国Cell Signaling Technology公司, 兔抗Hey1抗体购自中国Affinity公司。流式细胞仪购自美国艾森公司, 正置显微镜、倒置显微镜购自德国Leica公司, 恒温水浴槽购自上海一恒科技有限公司, 荧光定量PCR仪购自美国Bio-Rad公司。

1.2 hPDLSCs的分离培养及鉴定 人牙周膜干细胞取自于2020年11月—2021年10月在新疆医科大学第二附属医院口腔科门诊就诊的12~25岁^[14]患者拔除的健康牙(正畸减数前磨牙或阻生的第三磨牙)共16颗。本研究获新疆医科大学第二附属医院伦理委员会批准(20190712-07), 且所有患者均签署知情同意书。在无菌超净台中, 通过组织块法联合酶消化法提取原代细胞, 分离刮取牙根中1/3处牙周膜组织并剪碎, I型胶原酶6 mg溶于2 ml PBS(3 mg/ml), 过滤备用, 37℃、水浴15 min摇床, 加入2 ml完全培养基(含体积分数为10%胎牛血清, 100 U/ml

双抗, 2 mmol/L谷氨酰胺的DMEM培养基)终止消化, 1000 r/min离心5 min, 1 ml完全培养基重悬, 将细胞接种于T25细胞培养瓶, 十字摇匀, 37℃、5%CO₂条件下培养, 每3 d换液1次, 倒置显微镜观察其生长形态, 待细胞生长汇合至接近80%时, 消化传代。将第3代hPDLSCs以每孔 1×10^6 个细胞接种于6孔板, 37℃、5%CO₂培养过夜, 消化收集细胞, 100 μ l PBS重悬, 加入1 μ l STRO-1-PE、CD146-PE、CD34-FITC抗体, 4℃避光孵育30 min, 加入2 ml PBS洗涤1次, 4℃下400 \times g离心5 min, 弃上清, 加入400 μ l PBS重悬细胞, 4℃避光保存。采用流式细胞仪检测确定其干细胞特性, 分选细胞, 选择第3代hPDLSCs进行后续实验。

1.3 MIP-1 α 对hPDLSCs生物学特性的影响

1.3.1 CCK-8法检测hPDLSCs增殖能力 将第3代hPDLSCs以 5×10^3 个细胞/孔接种于96孔板, 设4个复孔, 37℃、5%CO₂条件下培养, 隔夜待细胞贴壁后, 弃原培养液, 分别给予含0(对照组)、1、10 μ g/ml MIP-1 α 完全培养基, 继续培养, 每3 d换液1次, 分别在24、48、72 h随机取出一块96孔板, 每孔加入10 μ l CCK-8液, 37℃、5%CO₂条件下避光孵育1 h后, 酶标仪检测450 nm波长处的吸光度(OD)值。

1.3.2 划痕实验检测hPDLSCs迁移能力 将第3代hPDLSCs以 1×10^5 个细胞/孔接种于6孔培养皿中, 待细胞融合至70%~80%时, 用200 μ l枪头在孔内划线, PBS洗3次, 标记拍照。更换为含0(对照组)、1、10 μ g/ml MIP-1 α 及2%血清的完全培养基培养, 于37℃、5%CO₂条件下孵育24 h, 在倒置显微镜下观察细胞迁移情况并拍照。使用ImageJ软件测定划痕宽度, 计算划痕愈合率。划痕愈合率=(0 h划痕宽度-24 h划痕宽度)/0 h划痕的宽度 \times 100%。实验重复3次。

1.4 MIP-1 α 对hPDLSCs骨向分化的影响及可能的机制

1.4.1 ALP染色及半定量分析 将第3代hPDLSCs以 6×10^4 个细胞/孔接种于6孔培养皿中, 待细胞融合至70%~80%时, 更换为含0(对照组)、1、10 μ g/ml MIP-1 α 的成骨诱导液培养, 每3 d换液1次, 诱导7 d后, PBS洗涤2次, 加入1 ml 4%多聚甲醛固定30 min, 蒸馏水洗涤2次, 每孔加入1 ml ALP染色液, 室温染色20 min, 双蒸水洗涤3次至无色, 加入蒸馏水覆盖细胞, 于倒置显微镜下观察, 采用Image Pro Plus 6.0软件对ALP染色图像进行分析。实验重复3次。

1.4.2 茜素红染色及半定量分析 将第3代hPDLSCs以 1×10^5 个细胞/孔接种于6孔培养皿中,

待细胞融合至70%~80%时, 更换为含0(对照组)、1、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MIP-1 α 的成骨诱导液培养, 每3 d换液1次, 诱导14 d后, PBS洗2次, 加入1 ml 40 g/L多聚甲醛固定30 min, 蒸馏水洗涤2次, 每孔加入1 ml 1%茜素红S染液室温染色20 min, 双蒸水洗涤3次至无色, 加入蒸馏水覆盖细胞, 于倒置显微镜下观察矿化结节形成情况。采用Image Pro Plus 6.0软件对茜素红染色图像进行分析。实验重复3次。

1.4.3 qRT-PCR检测成骨及Notch信号通路相关基因表达情况 将第3代hPDLSCs以 6×10^4 个细胞/孔接种于6 cm培养皿中, 待细胞融合至70%~80%时, 更换为含0(对照组)、1、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MIP-1 α 的成骨诱导液培养, 于第7天终止培养, PBS洗1次, 采用Trizol法提取总RNA, 分光光度计检测mRNA浓度及纯度, 使用PrimeScriptTM RT reagent Kit试剂盒合成cDNA。所用引物均由上海生工生物公司合成。反应条件如下: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 变性95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 退火及延伸60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 40个循环。实验重复3次, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各组间成骨相关因子Runx2、OPN、Osterix及Notch信号通路受体Notch1、配体Jagged1和下游因子Hey1的相对表达水平。引物序列见表1。

表1 qRT-PCR引物序列

Tab.1 qRT-PCR primer sequences

基因	引物序列(5'-3')
Runx2	正义: AGGCAGTTCCTCAAGCATTTCATCC
	反义: TGCCAGGTAGGTGTGGTAGTGAG
OPN	正义: CAGCCGTGGGAACAGTTATG
	反义: TCACATCGGAATGCTCATTGCTCTC
Osterix	正义: ATAGTGGGCAGCTAGAAGGGAGTG
	反义: ATTAGGGCAGTCGCAGGAGGAG
Notch1	正义: TCCACCAGTTTGAATGGTCAAT
	反义: CGCAGAGGGTTGTATTGGTTTC
Jagged1	正义: ATTACCAGGATAACTGTGCGAA
	反义: CAAATGTGCTCCGTAGTAAGAC
Hey1	正义: GAAGTTGCGCGTTATCTGAG
	反义: GTTGAGATGCGAAACCAGTC
GAPDH	正义: ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG
	反义: GCCATCACGCCACAGTTTC

1.4.4 Western blotting检测成骨及Notch信号通路相关蛋白表达情况 将第3代hPDLSCs以 6×10^4 个细胞/孔接种于6 cm培养皿中, 待细胞融合至70%~80%时, 更换为含0(对照组)、1、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MIP-1 α 的成骨诱导液培养, 于第7天终止培养, PBS洗1次, 用RIPA裂解提取总蛋白, BCA法检测蛋白浓度并定量, 加上样缓冲液, 煮沸变性, 上样行SDS-PAGE电泳, 湿转PVDF膜, 5%脱脂牛奶封闭2 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 一抗

(Runx2、OPN、Osterix、Notch1、Jagged1、Hey1、 β -actin, 稀释比例1:1000)孵育过夜, 次日加二抗(HRP标记山羊抗兔抗体, 稀释比例1:5000)孵育2 h, 使用ECL化学发光法曝光显色, 并使用Image J软件分析其灰度值, 以 β -actin为内参蛋白, 计算目的蛋白(Runx2、OPN、Osterix、Notch1、Jagged1、Hey1)的相对表达量。

1.5 统计学处理 采用GraphPad Prism 8及SPSS 24.0软件进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hPDLSCs的分离培养及鉴定 牙周膜组织块培养至第8天, 见细胞呈长梭形, 簇样漩涡状生长(图1A); 当组织团块周围细胞融合至80%~90%时, 即可传代, 细胞传至第3代时呈长梭形, 漩涡状生长, 细胞状态良好(图1B)。细胞鉴定结果显示其CD146、STRO-1呈阳性表达, 阳性率分别为97.36%、98.24%, CD34呈阴性表达, 阳性率仅为1.77%(图2)。

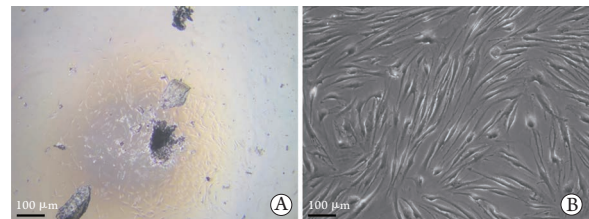


图1 倒置相差显微镜下观察hPDLSCs原代(A)及第3代(B)细胞形态

Fig.1 Morphology of hPDLSCs primary (A) and 3rd generation cells (B) (Inverted phase contrast microscope)

hPDLSCs. 人牙周膜干细胞; A. 原代细胞, 第8天; B. 第3代细胞

2.2 MIP-1 α 对hPDLSCs生物学特性的影响

2.2.1 各组hPDLSCs增殖活性比较 CCK-8法检测结果显示, MIP-1 α 处理24、48 h时, 与对照组比较, 1、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MIP-1 α 组hPDLSCs OD值差异无统计学意义($P > 0.05$)。MIP-1 α 处理72 h时, 与对照组比较, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MIP-1 α 组hPDLSCs OD值差异无统计学意义($P > 0.05$), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MIP-1 α 组hPDLSCs OD值明显增高($P < 0.05$)(图3)。

2.2.2 不同浓度MIP-1 α 对hPDLSCs划痕愈合率的影响 划痕实验结果显示, 干预24 h时, 与对照组(27.9% \pm 3.7%)比较, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MIP-1 α 组划痕愈合率(41.3% \pm 4.9%)差异无统计学意义($P > 0.05$), 而10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MIP-1 α 组(79.5% \pm 3.4%)划痕愈合率明显增高($P < 0.05$)(图4)。

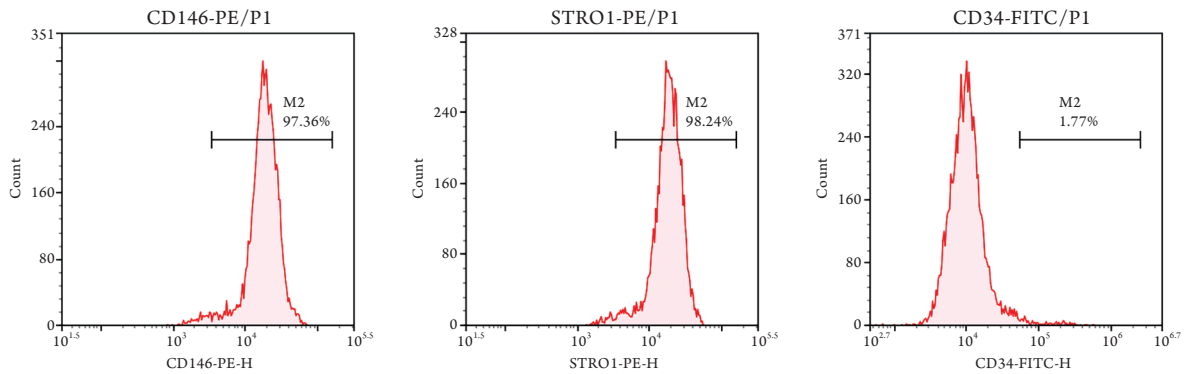


图2 hPDLSCs表面标志物的表达情况(n=3)

Fig.2 Cell surface markers of human periodontal ligament stem cells (n=3) hPDLSCs. 人牙周膜干细胞

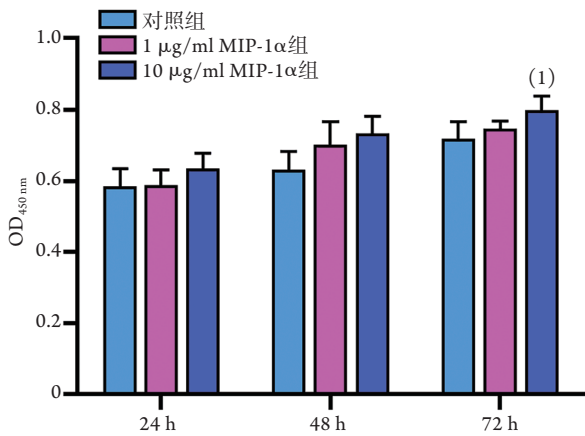


图3 MIP-1α对hPDLSCs增殖的影响($\bar{x}\pm s$, n=4)

Fig.3 Effect of MIP-1α on the proliferation of hPDLSCs ($\bar{x}\pm s$, n=4)

MIP-1α. 巨噬细胞阳性蛋白-1α; hPDLSCs. 人牙周膜干细胞; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$

2.3 MIP-1α对hPDLSCs骨向分化的影响及其可能的机制

2.3.1 各组hPDLSCs的ALP染色及半定量分析结果 在成骨诱导第7天, ALP染色结果显示, 各组均可见ALP染色阳性细胞, 胞质呈棕黑色, 细胞核呈浅蓝色(图5A)。脱色后ALP的相对表达水平结果显示, 与对照组比较, 1、10 μg/ml MIP-1α组hPDLSCs的ALP表达水平明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(图5B)。

2.3.2 各组茜素红染色结果比较 在成骨诱导第14天, 茜素红染色结果显示, 各组均可见阳性骨基质沉积的矿化结节(图6A)。脱色后对钙盐沉积量的相对表达水平进行分析显示, 与对照组比较, 1、10 μg/ml MIP-1α矿化结节数目减少、钙盐沉积含量降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(图6B)。

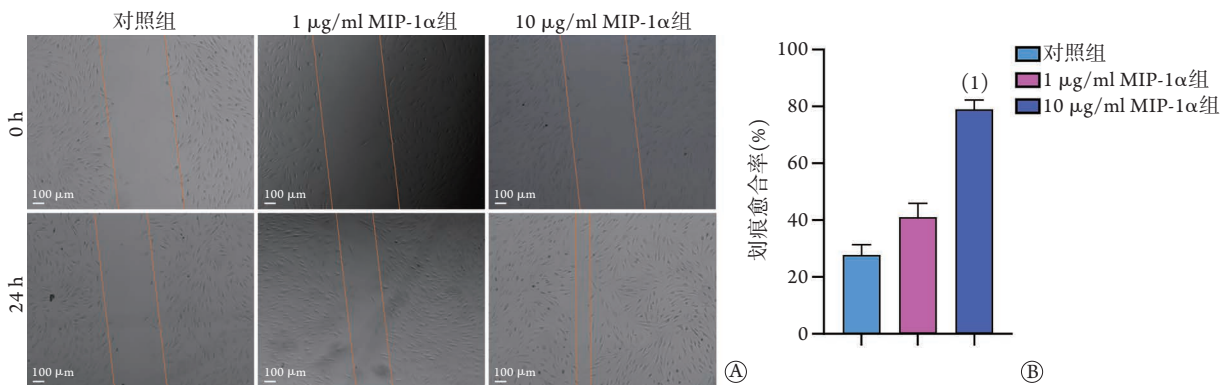


图4 MIP-1α对hPDLSCs划痕愈合率的影响

Fig.4 Effect of MIP-1α on the migration of hPDLSCs

MIP-1α. 巨噬细胞阳性蛋白-1α; hPDLSCs. 人牙周膜干细胞; A. 划痕实验; B. 划痕愈合率($\bar{x}\pm s$, n=3); 与对照组比较, (1) $P < 0.05$

2.3.3 各组成骨及Notch信号通路相关基因mRNA表达情况 qRT-PCR检测结果显示, 成骨诱导7 d后, 与对照组比较, 1 μg/ml MIP-1α组中Runx2、OPN及Osterix mRNA的表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$), 但10 μg/ml MIP-1α组则明显降低

($P < 0.05$); 与对照组比较, 1、10 μg/ml MIP-1α组中Notch1 mRNA表达水平降低($P < 0.05$), 10 μg/ml MIP-1α组Jag1、Hey1 mRNA表达水平明显降低($P < 0.05$), 而1 μg/ml MIP-1α组差异无统计学意义($P > 0.05$)(图7)。

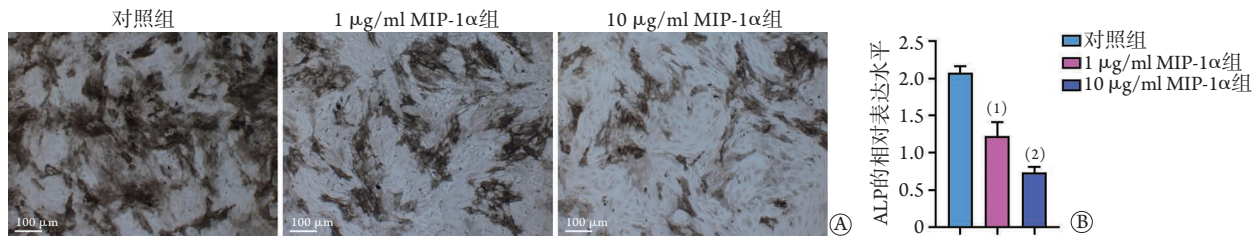


图5 MIP-1 α 对hPDLSCs作用7 d后ALP染色及半定量结果

Fig.5 Effect of MIP-1 α on alkaline phosphatase of hPDLSCs for 7 days

MIP-1 α . 巨噬细胞阳性蛋白-1 α ; hPDLSCs. 人牙周膜干细胞; ALP. 碱性磷酸酶; A. ALP染色; B. ALP的相对表达水平($\bar{x}\pm s, n=3$); 与对照组比较, (1) $P<0.05$, (2) $P<0.01$

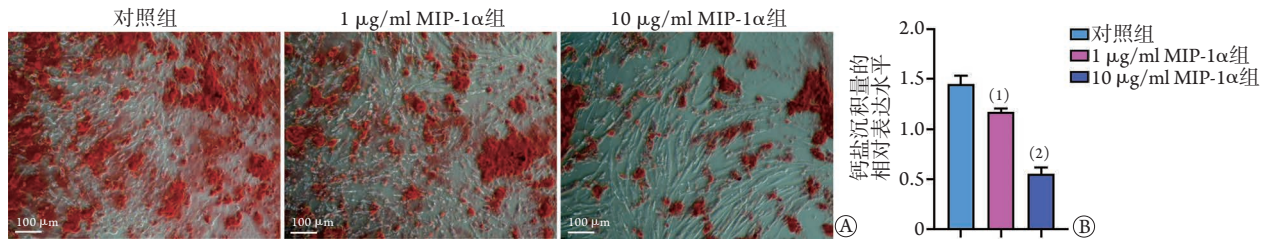


图6 MIP-1 α 对hPDLSCs作用14 d后茜素红染色及半定量结果

Fig.6 Effect of MIP-1 α on the staining of human periodontal membrane stem cells for 14 days

MIP-1 α . 巨噬细胞阳性蛋白-1 α ; hPDLSCs. 人牙周膜干细胞; A. 茜素红染色结果; B. 钙盐沉积量的相对表达水平($\bar{x}\pm s, n=3$); 与对照组比较, (1) $P<0.05$, (2) $P<0.01$

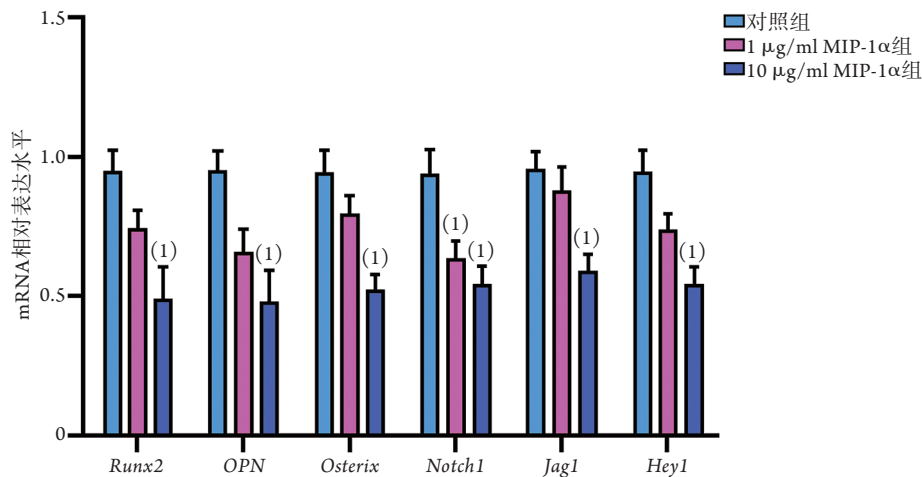


图7 MIP-1 α 对hPDLSCs成骨及Notch信号通路相关基因mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.7 Effects of MIP-1 α on the mRNA expression of osteogenic- and Notch signaling pathway-related genes in hPDLSCs ($\bar{x}\pm s, n=3$)

MIP-1 α . 巨噬细胞阳性蛋白-1 α ; hPDLSCs. 人牙周膜干细胞; 与对照组比较, (1) $P<0.05$

2.3.4 各组成骨及Notch信号通路相关蛋白表达情况 Western blotting检测结果显示, 成骨诱导7 d后, 与对照组比较, 1 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α 组中成骨相关蛋白Runx2、OPN及Osterix的表达水平差异无统计学意义($P>0.05$), 而10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α 组明显降低($P<0.05$); 与对照组比较, 1、10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α 组Notch1蛋白表达水平明显降低($P<0.05$), 10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α 组Jag1、Hey1蛋白表达水平明显降低($P<0.05$), 而1 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α 组Jag1、Hey1蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)(图8)。

3 讨论

口腔来源干细胞的增殖、分化是牙周组织再生的关键^[15], 其过程受微环境中细胞因子、信号通路的调节^[16-17]。本课题组袁萍等^[18]的前期研究发现, 正常来源和炎症来源hPDLSCs在细胞生物学特性和Notch信号通路相关分子表达方面均存在明显差异。马玉等^[14]在以TNF- α 为炎性刺激因子的实验中发现, 10 ng/ml TNF- α 可促进hPDLSCs增殖, 抑制其骨向分化能力, 同时抑制Notch信号通路相关分子的表达。另有研究发现, 炎性因子可调节趋化因

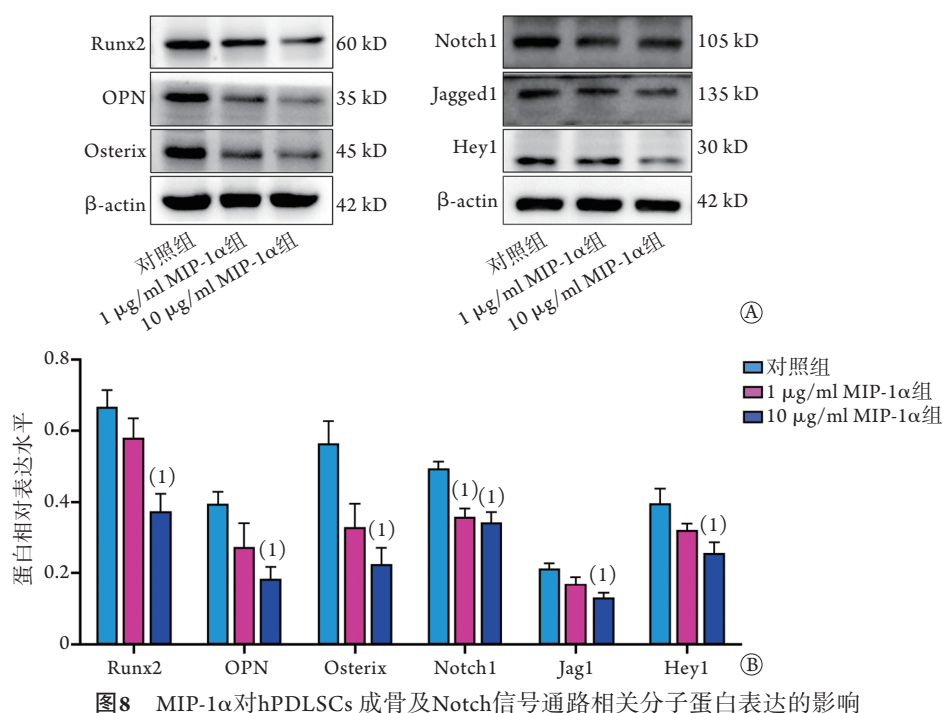


图8 MIP-1 α 对hPDLSCs成骨及Notch信号通路相关分子蛋白表达的影响

Fig.8 Effect of MIP-1 α on the expression of osteogenic and Notch signaling pathway-related molecules in hPDLSCs

MIP-1 α . 巨噬细胞阳性蛋白-1 α ; hPDLSCs. 人牙周膜干细胞; A. Western blotting检测; B. 各相关分子蛋白的表达水平($\bar{x}\pm s$, $n=3$); 与对照组比较, (1) $P<0.05$

子, 通过刺激骨吸收和诱导组织损伤的方式参与牙周组织破坏, 加剧局部炎症反应^[19]。本研究以趋化因子MIP-1 α 作为研究对象, 观察MIP-1 α 对hPDLSCs骨向分化的影响及可能的机制。

本研究体外分离培养hPDLSCs, 流式细胞术鉴定细胞表型结果显示, STRO-1和CD146表达阳性, CD34表达阴性, 表明其为间充质干细胞。Sheng等^[20]发现, MIP-1 α 可调节干细胞增殖和迁移。此外, 在干细胞的再生医学领域中, 利用适宜浓度的生长因子调控干细胞的增殖、迁移、分化也一度成为研究的热点^[21]。王斌等^[22]发现, MIP-1 α 可促进成纤维细胞增殖。此外, 还有研究发现MIP-1 α 在口腔来源的炎症牙髓组织中高表达^[23]。本研究结果显示, MIP-1 α 可调节hPDLSCs的增殖活性及迁移能力, 10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α 干预72 h后hPDLSCs的增殖能力明显增强, 干预24 h后hPDLSCs的迁移能力明显增强, 与马玉等^[14]、程实等^[24]以10 $\mu\text{g/ml}$ TNF- α 作用于hPDLSCs的结果相似。目前, 牙周病的干细胞治疗主要是将细胞培养物输送至牙周缺损处, 促进伤口愈合及组织修复和再生。

茜素红染色及半定量分析可评估细胞矿化和骨基质钙盐沉积能力, 而矿化结节的形成是成骨晚期的重要标志。ALP形成于成骨细胞分化的早期阶段, 其表达水平可反映细胞的矿化能力和成骨分化趋势。Vallet等^[25]发现, MIP-1 α 具有分解代谢能力和抑制成骨细胞的作用, 从而可减少骨形成。

本研究发现, 1、10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α 均可明显降低hPDLSCs的钙盐沉积和ALP表达水平, 其中10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α 抑制作用更强。Runx2是成骨细胞分化和软骨细胞成熟所必需的转录因子^[26]。Osterix是骨形成调控中必不可少的成骨细胞特异性转录因子。OPN可发挥催化剂作用, 加速钙盐沉积、骨质矿化及促进成骨细胞形成, 常存在于骨细胞中^[27]。本研究选择Runx2、Osterix和OPN 3个成骨相关基因进行分析, 结果显示, 与对照组比较, 1 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α 组hPDLSCs Runx2、OPN及Osterix的mRNA及蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$), 而10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α 组则明显降低 ($P<0.05$)。此外, 本研究结果还发现, MIP-1 α 可抑制hPDLSCs的钙盐沉积及矿化结节形成, 抑制ALP活性, 且10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α 还可抑制成骨相关基因的表达。趋化因子MIP-1 α 是导致牙槽骨缺损的重要影响因素^[28-29]。Notch信号通路在修复牙槽骨缺损中也发挥重要作用, 其具体作用和分子机制可能与种属、供体来源、细胞状态及特异性有关^[30-31]。Notch信号通路可调控细胞增殖、成骨分化、炎症反应等多个生理病理过程^[32]。Notch信号系统被激活可使hPDLSCs发生增殖分化^[33]。有研究发现, Notch信号通路受体Notch1在间充质干细胞的成骨分化过程中起重要作用^[34-35]。

本研究检测了Notch信号通路相关分子的表达, 发现1、10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α 组Notch1 mRNA及蛋白的表达水平, 以及10 $\mu\text{g/ml}$ MIP-1 α 组Jag1、

Hey1 mRNA及蛋白表达水平较对照组明显降低 ($P<0.05$), 提示10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MIP-1 α 可抑制Notch信号通路相关分子的表达, 可能与抑制hPDLSCs骨向分化之间存在相关性, 其机制可能与Notch信号通路的抑制有关, 与国内学者的研究结果^[14,33,36-38]一致。

综上所述, 本研究通过体外培养hPDLSCs, 探讨了MIP-1 α 对hPDLSCs增殖、迁移及成骨分化能力的影响及可能的机制, 结果显示10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MIP-1 α 可促进hPDLSCs的增殖及迁移能力, 同时可抑制成骨, 抑制Notch信号通路的激活, 为进一步阐明牙槽骨缺损修复的分子机制提供了新线索。但本研究尚存在不足之处, 如缺少更长时间的成骨诱导实验观察, 同时Notch信号通路直接或间接参与MIP-1 α 对hPDLSCs成骨分化的调控过程尚不明确。后续本课题组将进行体内实验, 以进一步寻找临床治疗牙槽骨缺损的潜在靶点。

【参考文献】

- [1] Li XH, Li XY, Mao TJ, *et al.* Cannabidiol promotes proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal stem cells[J]. *Chin Tis Eng Res*, 2022, 26(30): 4867-4872. [李熙恒, 李欣悦, 毛天娇, 等. 大麻二酚促进人牙周膜干细胞增殖和成骨分化[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(30): 4867-4872.]
- [2] Chen YZ, Gao Y, Li T, *et al.* Enhancement of the repair of dog alveolar cleft by an autologous iliac bone, bone marrow-derived mesenchymal stem cell, and platelet-rich fibrin mixture[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2015, 135(5): 1405-1412.
- [3] Dong ZM, Liu R, Liu LC, *et al.* Advances in the study of seed cells in periodontal tissue regeneration therapy[J]. *Int J Stomatol*, 2019, 46(1): 48-54. [董正谋, 刘锐, 刘鲁川, 等. 种子细胞在牙周组织再生治疗中的研究进展[J]. *国际口腔医学杂志*, 2019, 46(1): 48-54.]
- [4] He J, Li ZL, Xie ZG. Research progress on osteoinductive properties of bone replacement materials[J]. *Oral Dis Control*, 2018, 26(2): 124-127. [贺钧, 李自良, 谢志刚. 骨替代材料的骨诱导性能研究进展[J]. *口腔疾病防治*, 2018, 26(2): 124-127.]
- [5] Yan FH, Li LL. Advances in periodontal regenerative therapy research[J]. *J Oral Sci Res*, 2018, 34(3): 217-222. [闫福华, 李丽丽. 牙周再生治疗研究进展[J]. *口腔医学研究*, 2018, 34(3): 217-222.]
- [6] Hassan NT, AbdelAziz NA. Oral mucosal stem cells, human immature dental pulp stem cells and hair follicle bulge stem cells as adult stem cells able to correct limbal stem cell deficiency[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2018, 13(5): 356-361.
- [7] Bollero P, Passarelli PC, D'Addona A, *et al.* Oral management of adult patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(4): 876-887.
- [8] Li XM, Yuan CY, Liu ZX, *et al.* Research progress of tooth-derived stem cells in the field of alveolar bone regeneration[J]. *Stomatology*, 2017, 37(8): 755-759. [李晓明, 袁长永, 刘宗响, 等. 牙源性干细胞在牙槽骨再生领域的研究进展[J]. *口腔医学*, 2017, 37(8): 755-759.]
- [9] Palomino DC, Marti LC. Chemokines and immunity[J]. *Einstein (Sao Paulo)*, 2015, 13(3): 469-473.
- [10] Li XL, Yu YQ, Qiu LH, *et al.* Effect of lipopolysaccharide of porphyromonas aeruginosa on the expression of MCP-1 in mouse osteoblasts[J]. *Shanghai Stomatol*, 2018, 27(1): 1-5. [李晓琳, 于雅琼, 仇丽鸿, 等. 牙髓卟啉单胞菌脂多糖对小鼠成骨细胞表达MCP-1的影响[J]. *上海口腔医学*, 2018, 27(1): 1-5.]
- [11] Jia B, Qiu XL, Chu HX, *et al.* Effects of macrophage inflammatory protein-1 β on proliferation and apoptosis of human tongue squamous carcinoma cells CAL-27[J]. *J Southern Med Univ*, 2017, 37(8): 1104-1109. [贾搏, 邱小玲, 褚洪星, 等. 巨噬细胞炎症蛋白-1 β 对人舌鳞癌细胞CAL-27增殖和凋亡的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2017, 37(8): 1104-1109.]
- [12] Kam YW, Ahmed MY, Amrun SN, *et al.* Systematic analysis of disease-specific immunological signatures in patients with febrile illness from Saudi Arabia[J]. *Clin Transl Immunology*, 2020, 9(8): e1163.
- [13] Li JS, Fan LY, Yuan M, *et al.* Salidroside inhibits lipopolysaccharide-ethanol-induced activation of proinflammatory macrophages via Notch signaling pathway[J]. *Curr Med Sci*, 2019, 39(4): 526-533.
- [14] Ma Y, Li SH, Ding XX, *et al.* Effect of tumor necrosis factor- α on osteo-differentiation of periodontal stem cells and Notch signaling pathway[J]. *West Chin J Stomatol*, 2018, 36(2): 184-189. [马玉, 李淑慧, 丁欣欣, 等. 肿瘤坏死因子- α 对牙周膜干细胞骨向分化及Notch信号通路的影响[J]. *华西口腔医学杂志*, 2018, 36(2): 184-189.]
- [15] Kukolj T, Trivanović D, Djordjević IO, *et al.* Lipopolysaccharide can modify differentiation and immunomodulatory potential of periodontal ligament stem cells via ERK1, 2 signaling[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(1): 447-462.
- [16] Li X, Yang H, Zhang Z, *et al.* Platelet-rich fibrin exudate promotes the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells *in vitro*[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(5): 4477-4485.
- [17] Ren M, Zhao Y, He Z, *et al.* Baicalein inhibits inflammatory response and promotes osteogenic activity in periodontal ligament cells challenged with lipopolysaccharides[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1): 43.
- [18] Yuan P, Li SH, Zhao L, *et al.* Biological properties of human periodontal stem cells under inflammatory microenvironment[J]. *Chin J Tis Eng Res*, 2016, 20(6): 898-905. [袁萍, 李淑慧, 赵璐, 等. 炎症微环境下人牙周膜干细胞的生物学特性[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(6): 898-905.]
- [19] Wang RL. Expression of MCP-1 and MIP-1 α in body liquid from healthy individuals gingivitis and periodontitis[J]. *Chin J Lab Diag*, 2021, 25(10): 1476-1479. [王仁兰. MCP-1和MIP-1 α 在牙龈炎和牙周炎患者体液中的表达水平及意义[J]. *中国实验诊断学*, 2021, 25(10): 1476-1479.]
- [20] Sheng D, Ma W, Zhang R, *et al.* Ccl3 enhances docetaxel chemosensitivity in breast cancer by triggering proinflammatory macrophage polarization[J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(5): e003793.
- [21] Park TS, Huo JS, Peters A, *et al.* Growth factor-activated stem cell circuits and stromal signals cooperatively accelerate non-integrated iPSC reprogramming of human myeloid progenitors[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42838.

- [22] Wang B, Tang FL, Li J, *et al.* Effect of macrophage inflammatory protein-1 α on the proliferative response of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis[J]. *Beijing Med J*, 2002, 24(6): 391-393. [王斌, 唐福林, 李军, 等. 巨噬细胞炎症蛋白-1 α 对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖反应的影响[J]. *北京医学*, 2002, 24(6): 391-393.]
- [23] Li NN, Zhang ZM, Wang CK, *et al.* Expression and significance of macrophage inflammatory protein 1 α mRNA in human inflammatory dental pulp tissue[J]. *J Jilin Univ (Med Ed)*, 2011, 37(2): 312-314, 395. [李男男, 张志民, 王成坤, 等. 巨噬细胞炎症蛋白1 α mRNA在人炎症牙髓组织中的表达及意义[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2011, 37(2): 312-314, 395.]
- [24] Cheng S, Lin LH, Ying JW, *et al.* Effects of low concentration of TNF- α on proliferation and migration of rat medullary mesenchymal stem cells[J]. *Orthop J Chin*, 2018, 26(3): 242-247. [程实, 林凌瀚, 应金威, 等. 低浓度TNF- α 对大鼠髓核间充质干细胞增殖及迁移的影响[J]. *中国矫形外科杂志*, 2018, 26(3): 242-247.]
- [25] Vallet S, Pozzi S, Patel K, *et al.* A novel role for CCL3 (MIP-1 α) in myeloma-induced bone disease via osteocalcin downregulation and inhibition of osteoblast function[J]. *Leukemia*, 2011, 25(7): 1174-1181.
- [26] Komori T. Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation[J]. *Histochem Cell Biol*, 2018, 149(4): 313-323.
- [27] Carvalho MS, Silva JC, Hoff CM, *et al.* Loss and rescue of osteocalcin and osteopontin modulate osteogenic and angiogenic features of mesenchymal stem/stromal cells[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(10): 7496-7515.
- [28] Kornsthisopon C, Manokawinchoke J, Sonpoung O, *et al.* Interleukin 15 participates in Jagged1-induced mineralization in human dental pulp cells[J]. *Arch Oral Biol*, 2021, 128: 105163.
- [29] Guo X, Jiang H, Zong X, *et al.* The implication of the Notch signaling pathway in biphasic calcium phosphate ceramic-induced ectopic bone formation: a preliminary experiment[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2020, 108(5): 1035-1044.
- [30] Zhou H, Zhang L, Chen Y, *et al.* Research progress on the hedgehog signalling pathway in regulating bone formation and homeostasis[J]. *Cell Prolif*, 2022, 55(1): e13162.
- [31] Manokawinchoke J, Sumrejkanchanakij P, Boonprakong L, *et al.* NOTCH2 participates in Jagged1-induced osteogenic differentiation in human periodontal ligament cells[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 13329.
- [32] Wang L, Wang X, Ji N, *et al.* Mechanically activated ion channel piezo protein Piezo1 mediates osteogenic differentiation of periodontal membrane stem cells through Notch signaling pathway[J]. *West China J Stomatol*, 2020, 38(6): 628-636. [王林, 王熙, 季楠, 等. 机械激活性离子通道压电蛋白Piezo1通过Notch信号通路介导牙周膜干细胞成骨分化作用机制研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2020, 38(6): 628-636.]
- [33] Zhu YC, Zhai L, Yan YZ, *et al.* Effect of overexpression of ADAM10 on osteogenic differentiation of periodontal stem cells through regulation of Notch signaling pathway[J]. *J Oral Sci Res*, 2021, 37(5): 468-473. [朱永翠, 翟蕾, 闫亚姿, 等. 过表达ADAM10通过调控Notch信号通路对牙周膜干细胞成骨分化的影响[J]. *口腔医学研究*, 2021, 37(5): 468-473.]
- [34] Semenova D, Bogdanova M, Kostina A, *et al.* Dose-dependent mechanism of Notch action in promoting osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Cell Tissue Res*, 2020, 379(1): 169-179.
- [35] Deng Y, Li R, Wang H, *et al.* Biomaterial-mediated presentation of jagged-1 mimetic ligand enhances cellular activation of Notch signaling and bone regeneration[J]. *ACS Nano*, 2022, 16(1): 1051-1062.
- [36] Qiu SC, Long Y, Chen XY, *et al.* Effect of overexpression of Notch intracellular structural domain on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal stem cells[J]. *Chin J Stomatol*, 2019, 54(5): 315-321. [邱申彩, 龙晏, 陈晓燕, 等. 超表达Notch胞内结构域对人牙周膜干细胞增殖及成骨分化的影响[J]. *中华口腔医学杂志*, 2019, 54(5): 315-321.]
- [37] Che M, Gong W, Liu M, *et al.* Long noncoding RNA HCG18 inhibits the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in osteoporosis by targeting miR-30a-5p/NOTCH1 axis[J]. *Mol Med*, 2020, 26(1): 106.
- [38] Miao H, Ye T, He F, *et al.* Study on the role of miR-146a-5p in the mechanism of osteogenic differentiation of Notch2-regulated periodontal membrane stem cells[J]. *J Oral Maxillofacial Prosthetics*, 2019, 20(6): 321-325. [苗辉, 叶涛, 何峰, 等. miR-146a-5p在Notch2调控牙周膜干细胞成骨分化机制的作用研究[J]. *口腔颌面修复学杂志*, 2019, 20(6): 321-325.]

(责任编辑: 张小利)