

白细胞介素 1 β 对人牙周膜干细胞和骨髓间充质干细胞骨向分化的影响



扫码阅读电子版

张静^{1,2,3} 李晨晨³ 孟箭^{2,3}

¹徐州市医学科学研究所 221009; ²徐州医科大学徐州临床学院 221009; ³徐州市中心医院口腔科 221009

通信作者:张静, Email: jingz77@163.com

【摘要】 目的 研究白细胞介素 1 β (IL-1 β)作用下人牙周膜干细胞(PDLSC)和骨髓间充质干细胞(BMSC)骨向分化的差异。**方法** 应用茜素红染色、碱性磷酸酶(ALP)活性检测、细胞增殖能力(MTT)法和实时荧光聚合酶链反应(PCR)对PDLSC和BMSC在IL-1 β 作用下的骨向分化能力进行检测,并比较两者之间的差异。实验组为含有IL-1 β 的各处理组,对照组内未加IL-1 β 。采用单因素方差分析和 t 检验对数据进行统计分析。**结果** 随IL-1 β 浓度的增高,PDLSC形成矿化结节减少,茜素红染色逐渐变浅;而BMSC骨向分化能力未见明显减弱;ALP活性实验结果表明,在7 d时PDLSC各实验组与对照组相比差异具有统计学意义($F=2361.11, P<0.001$),BMSC各实验组与对照组相比ALP活性差异具有统计学意义($F=240.68, P<0.001$);在14 d时PDLSC随炎症因子浓度增高,ALP活性显著降低,差异具有统计学意义($F=1519.89, P<0.001$),BMSC在IL-1 β 浓度为0.001、0.01、1 ng/mL的实验组与对照组相比ALP活性差异具有统计学意义($F=22.52, P<0.001$),两种干细胞在IL-1 β 最大浓度时(1 ng/mL)ALP活性最低;MTT结果表明,IL-1 β 能抑制干细胞的增殖能力,与PDLSC相比,BMSC增殖能力较低。实时荧光PCR结果显示,与对照组相比,两种干细胞实验组内ALP、Col-1、OCN和Runx2 mRNA表达水平均降低,BMSC内实验组中骨向分化基因表达与PDLSC内实验组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 在IL-1 β 作用下,BMSC的成骨能力较PDLSC高。

【关键词】 炎症,细胞因子类; 干细胞; 细胞分化; 骨向分化

基金项目:国家自然科学基金(31700814);徐州市科技项目(KC18032)

引用著录格式:张静,李晨晨,孟箭. 白细胞介素 1 β 对人牙周膜干细胞和骨髓间充质干细胞骨向分化的影响[J/CD]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2020, 14(2): 88-94.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2020.02.005

The effect of interleukin-1 β on the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells

Zhang Jing^{1,2,3}, Li Chenchen³, Meng Jian^{2,3}

¹Xuzhou Institute of Medical Science, Xuzhou 221009, China; ²Xuzhou Clinical College of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221009, China; ³Department of Stomatology, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou 221009, China

Corresponding author: Zhang Jing, Email: jingz77@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of interleukin-1 β (IL-1 β) on the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells (PDLSCs) and bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** The osteogenic differentiation ability of PDLSCs and BMSCs was tested by Alizarin Red staining, alkaline phosphatase (ALP) activity, MTT, and real-time PCR with the presence of IL-1 β . The PDLSCs or BMSCs cultured with IL-1 β were the experimental groups, while the control group was cultured without IL-1 β . One-Way ANOVA and t -test were applied to perform the statistical analysis of the data. **Results** Mineralization staining showed that an inhibitory effect of IL-1 β on the osteogenic differentiation of PDLSCs with increasing dose. However, BMSCs were more resistant to the inflammatory

cytokine compared to PDLSCs in terms of a stronger alizarin red staining. The results of ALP activity test showed that a significant difference between the PDLSCs experimental groups and the control group was found at 7 days ($F = 2361.11, P < 0.001$); for BMSCs, a similar result was also observed between the experimental groups and the control group ($F = 240.68, P < 0.001$). At 14 days, with the increase of inflammatory factor concentration, the activity of ALP in PDLSCs decreased significantly ($F = 1519.89, P < 0.001$). The ALP activity of the experimental groups with IL-1 β concentration of 0.001, 0.01 and 1 ng/mL in BMSCs was significantly different from that of the control group ($F = 22.52, P < 0.001$). ALP activity of the two kinds of stem cells was the lowest with the presence of the maximum concentration of IL-1 β (1 ng/mL). Proliferation results showed that IL-1 β exhibited inhibitory effects on cell proliferation and BMSCs possessed a lower proliferative potential than PDLSCs. Real-time PCR analysis of osteoblast lineage gene expression revealed that the IL-1 β suppressed the expression levels of *ALP*, *Col-1*, *OCN* and *Runx2* mRNA in PDLSCs and BMSCs at 14 days compared with the control group. The difference of mRNA expression levels was statistically significant between the BMSCs experimental group and the PDLSCs experimental group. **Conclusions** A significant difference on the osteogenesis between PDLSCs and BMSCs was observed. Compared with PDLSCs, BMSCs showed a stronger capacity of modulation in local microenvironment via anti-inflammatory functions.

[Key words] Inflammation, cytokines; Stem cells; Cell differentiation; Osteogenic differentiation

Fund programs: National Natural Science Foundation of China(31700814); Science and Technology Project of Xuzhou (KC18032)

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2020.02.005

牙周炎是临床上的常见病和难治病,最终导致骨吸收^[1-2]。如何利用再生治疗方法获得牙周组织的完全性再生,恢复天然牙齿的生理功能是国内外学者所追求的目标和着力研究的热点课题。成体干细胞具有来源丰富、可塑性强、无免疫排斥等特点,因此是研究细胞分化、骨组织改建等生命活动最理想模型。尽管当前牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cell, PDLSC)被大量应用于修复牙周组织缺损的研究^[3-4],然而仍受到诸多因素限制。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)与PDLSC相比具有以下优点:(1)取材方便、来源广泛,对机体损伤小;(2)易在体外培养、扩增和诱导;(3)取自自体,避免了伦理争议和免疫排斥反应,为牙周组织缺损的修复提供了新的思路。

炎症因子在牙周炎的发生、发展中具有重要作用。研究表明,牙周炎患者龈沟液中白细胞介素1 β (IL-1 β)含量较高且随炎症加重而明显增加^[5]。该因子具有广泛的细胞免疫调节作用:促进破骨细胞形成和骨吸收;激活核转录因子 κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)的信号通路从而加重牙周病变^[5-7]。因此,本研究应用IL-1 β 来研究两种干细胞的骨向分化能力,探讨BMSC在修复牙周缺损中的是否具有优势。

材料与方法

一、主要材料和仪器

茜素红(Sigma,美国);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性试剂盒(北京中生生物高科技有限公司);重组人IL-1 β (Peprotech,美国);平底6孔板(Nunclon,丹麦);96孔板(Coster,美国);逆转录试剂盒(TaKaRa,日本);总RNA提取试剂TRIzol Reagent(GIBCOBRL,美国);酶连免疫检测仪(Bio-Tek,美国);紫外线分光光度仪(Eppendorf,德国);ABI 7500 Real-time PCR 仪(美国)。

二、实验方法

人PDLSC来源于临床12~18岁因正畸需要而拔除的、牙周健康、无龋的新鲜前磨牙;人BMSC来源于5名男性健康志愿者。两种干细胞的分离培养及鉴定依据以往描述方法^[8-9]。

1. 分组方法:样本采用简单随机化分组(掷币法)分为实验组和对照组,对照组也称成骨诱导组(osteogenic medium, OM)是指在更换培养液过程中只加入矿化诱导液(IL-1 β 为0 ng/mL),实验组依据加入IL-1 β 浓度不同分为4个浓度梯度(0.001、0.01、0.1、1 ng/mL),每组样本设3复孔,每个实验重复3次。

2. 矿化结节染色:将第四代PDLSC及BMSC细胞悬液,分别接种于24孔板中(1×10^4 个/孔),10%胎

牛血清(fetal bovine serum, FBS)的DMEM培养24 h后,磷酸盐缓冲液(PBS)洗3遍,换矿化诱导液(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、2% FBS的DMEM培养液)同时加入不同浓度(0.001、0.01、0.1、1 ng/mL)的IL-1 β 连续培养。每3~4天换液时加入IL-1 β 。至4周时弃原培养液,按试剂说明用茜素红染色,观察矿化结节形成情况。

3. 碱性磷酸酶活性检测:将PDLSC及BMSC以 3×10^3 个/孔的密度分别接种于96孔板内,24 h后PBS洗3遍,换矿化诱导液同时加入不同浓度(0.001、0.01、0.1、1 ng/mL)IL-1 β 连续培养。每3天换液1次,IL-1 β 在每次换液时加入。分别在第7和14天弃去培养液,使用ALP试剂盒检测活性,选择波长405 nm,用酶联仪检测标准孔和实验孔的吸光度(A)值,实验重复3次,每组各取3孔进行活性检测,取平均值。

4. IL-1 β 作用下对两种干细胞增殖能力的影响:选取第四代PDLSC和BMSC细胞悬液,以 4×10^3 细胞/孔的密度接种于96孔板,按前述步骤在1、4和7 d,每孔加入MTT(5 mg/ml)20 μ L,37 $^{\circ}$ C下继续培养4 h后终止培养,小心吸弃孔内培养液,每孔加入150 μ L DMSO,振荡10 min,使结晶物充分溶解。选取490 nm波长在酶联免疫检测仪上测定各孔A值并记录结果。实验重复3次,每次实验组和对照组各取3孔进行活性检测,取平均值。

5. 实时荧光PCR技术从RNA水平鉴定成骨相关基因(ALP、OCN、Col-1、Runx2)的表达:将第四代PDLSC及BMSC细胞悬液,分别接种于25 mm培养瓶中,用10% FBS的DMEM培养,细胞汇合至80%时用PBS洗3遍,换矿化诱导液同时加入IL-1 β (1 ng/mL)连续培养,在14 d提取细胞总RNA。实验重复3次,每组各取4管进行检测,取平均值。

6. 引物设计与合成:引物设计软件采用Primer Premier 5.0, β -actin作为内参照基因(表1)。

三、统计学处理方法

采用SPSS 16.0统计软件对数据进行分析。在ALP活性和MTT实验中A值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据符合方差分析条件,在每个时间点进行单因素的方差分析,组间两两比较采用LSD多重检验,以成骨诱导组作为对照组进行比较。在PCR实验中,对ALP、Col-1、OCN、Runx2基因的表达采用t检验进行分析,实验均重复3次,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表1 实时定量PCR引物序列

基因	引物序列
ALP	正向:5'-GGACCAITCCCACGTCTTCAC-3' 反向:5'-CCTTG TAGCCAGGCCAATTG-3'
Col-1	正向:5'-CCAGAAG AACTGGTACATCAGCAA-3' 反向:5'-CGCCATACTCGAACTGGAATC-3'
OCN	正向:5'-AGCAAAGGTGCAGCCTTTGT-3' 反向:5'-GCG CCTGGGTCTCTTCACT-3'
Runx2	正向:5'-CCCCTGGCCTTCAAGGT-3' 反向:5'-CGTTACCCGCCATGACAGTA-3'
β -actin	正向:5'-CAGGCTGTGCTATCCCTGTA-3' 反向:5'-CATACCCTCGTAGATGG GC-3'

结 果

一、矿化结节染色

茜素红染色结果显示,PDLSC骨向分化能力与IL-1 β 浓度呈负相关,浓度越高,形成矿化结节减少,茜素红染色逐渐变浅;而BMSC的骨向分化能力随浓度的增高未见明显减弱(图1)。

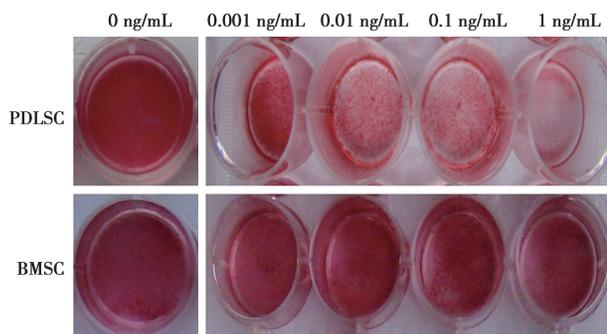


图1 牙周膜干细胞(PDLSC)和骨髓间充质干细胞(BMSC)茜素红染色

二、碱性磷酸酶活性

在7 d时,随着IL-1 β 浓度增高,两种干细胞内ALP活性均降低。PDLSC实验组与对照组(0 ng/mL)相比ALP活性差异具有统计学意义($F = 2361.11$, $P < 0.001$);BMSC实验组与对照组(0 ng/mL)相比ALP活性差异具有统计学意义($F = 240.68$, $P < 0.001$)。

PDLSC在低浓度的IL-1 β (0.001、0.01 ng/mL)作用下比BMSC的ALP活性高,最大浓度时(1 ng/mL)PDLSC活性抑制作用最明显;而BMSC内ALP活性下降较缓慢(图2A)。

在14 d时,两种干细胞内ALP活性均较7 d时增高;PDLSC随炎症因子浓度增高,ALP活性显著降低,IL-1 β 浓度为0.001、0.01、0.1、1 ng/mL的各实验组与浓度为0的对照组相比ALP活性差异具有

统计学意义($F = 1519.89, P < 0.001$), BMSC在IL-1 β 浓度为0.001、0.01、1 ng/mL的各实验组与对照组(0 ng/mL)相比ALP活性差异具有统计学意义($F = 22.52, P < 0.001$), 而0.1和0 ng/mL两组以及0.01和1 ng/mL两组细胞ALP活性之间差异无统计学意义(图2B)。

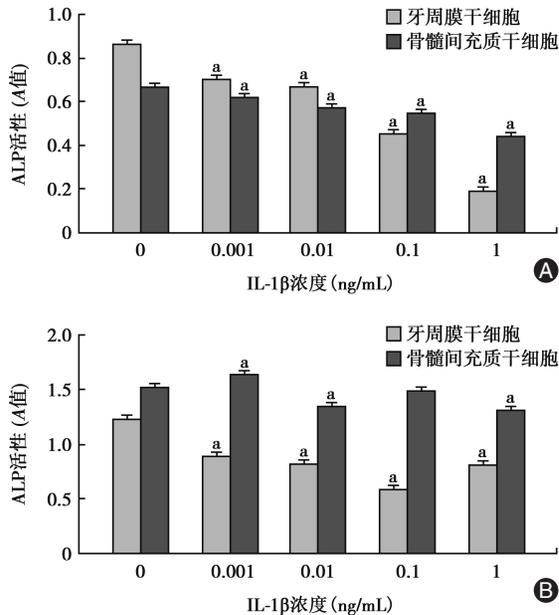


图2 不同浓度IL-1 β 处理牙周膜干细胞(PDLSC)和骨髓间充质干细胞(BMSC)后各组相对碱性磷酸酶(ALP)活性统计图 相同时间点上同种干细胞各实验组与对照组(0 ng/mL)相比,* $P < 0.001$; A: 7 d; B: 14 d

从上述结果可以看出, 14 d时两种干细胞在炎症因子IL-1 β 浓度最大时(1 ng/mL)ALP活性差异最明显($A_{PDLSC} = 0.305 \pm 0.010, A_{BMSC} = 1.312 \pm 0.131$, 表2)。因此, 本课题组后续实验选取IL-1 β (1 ng/mL)来研究骨向分化调控差异。

三、白细胞介素1 β 作用下对两种干细胞增殖能力的影响

在培养1 d时, 随着IL-1 β 浓度增高, 两种干细胞增殖活性均降低。PDLSC实验组与对照组(0 ng/mL)相比, 细胞增殖差异具有统计学意义($F = 86.33, P < 0.001$, 图3), 而0.01、0.1 ng/mL两组细胞增殖活性差异无统计学意义($P > 0.05$); BMSC实验组与对照组(0 ng/mL)相比, 细胞增殖活性差异具有统计学意义($F = 18.48, P < 0.001$), 而0与1 ng/mL、0.001与0.01 ng/mL以及0.1与1 ng/mL组间细胞增殖活性差异无统计学意义($P > 0.05$)。

在培养4 d时, PDLSC各实验组与对照组(0 ng/mL)相比, 细胞增殖差异具有统计学意义($F = 172.29$,

$P < 0.001$), 而0.01和0.1 ng/mL两组细胞增殖活性之间差异无统计学意义($P > 0.05$); BMSC各实验组与对照组(0 ng/mL)相比, 细胞增殖差异具有统计学意义($F = 538.77, P < 0.001$), 而0.01和0.1 ng/mL两组细胞增殖活性之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

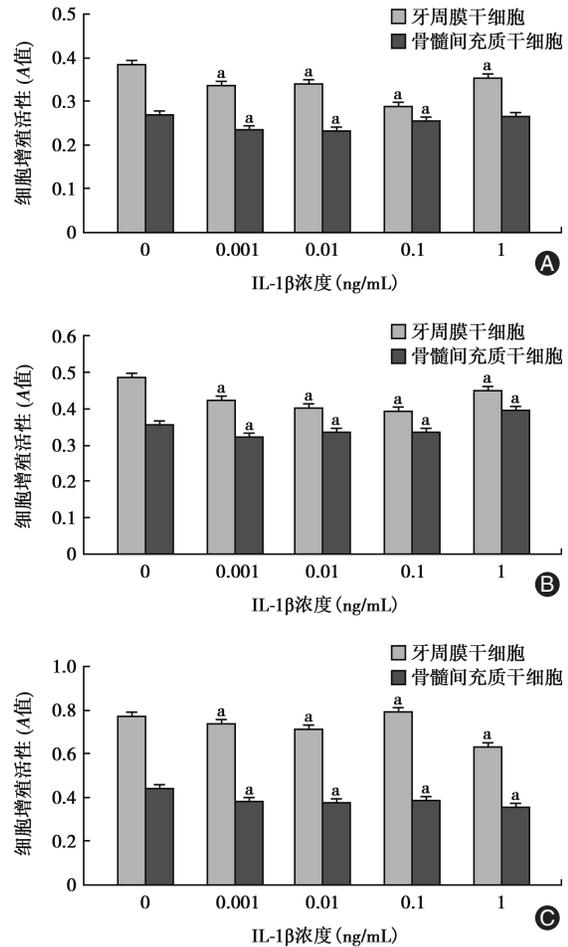


图3 不同浓度IL-1 β 处理牙周膜干细胞(PDLSC)和骨髓间充质干细胞(BMSC)后各组相对细胞增殖活性统计图 相同时间点上同种干细胞各实验组与对照组(0 ng/mL)相比,* $P < 0.001$; A: 1 d; B: 4 d; C: 7 d

在7 d时, PDLSC各实验组与对照组(0 ng/mL)相比, 细胞增殖差异具有统计学意义($F = 308.15, P < 0.001$); BMSC各实验组与对照组(0 ng/mL)相比, 细胞增殖差异具有统计学意义($F = 77.21, P < 0.001$), 而0.001、0.01和0.1 ng/mL三组细胞增殖活性之间差异无统计学意义($P > 0.05$); 上述结果显示, 随时间变化PDLSC增殖能力逐渐增加, 而BMSC增殖能力增加缓慢(表3)。

四、骨向分化基因检测

14 d时, 提取两种干细胞内RNA, 实时荧光PCR结果显示: IL-1 β 作用下两种干细胞内成骨相关标志因子ALP表达水平均明显降低, 两种干细胞的实验

表2 不同浓度IL-1 β 对牙周膜干细胞(PDLSC)和骨髓间充质干细胞(BMSC)碱性磷酸酶(ALP)活性的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	7 d		14 d	
		PDLSC	BMSC	PDLSC	BMSC
实验组	9	0.864 \pm 0.015	0.664 \pm 0.014	1.229 \pm 0.023	1.518 \pm 0.038
对照组					
0.001 ng/mL	9	0.702 \pm 0.014 ^a	0.618 \pm 0.012 ^a	0.894 \pm 0.032 ^a	1.633 \pm 0.057 ^a
0.01 ng/mL	9	0.665 \pm 0.015 ^a	0.573 \pm 0.014 ^a	0.819 \pm 0.018 ^a	1.343 \pm 0.028 ^a
0.1 ng/mL	9	0.452 \pm 0.010 ^a	0.545 \pm 0.014 ^a	0.582 \pm 0.018 ^a	1.482 \pm 0.011
1 ng/mL	9	0.193 \pm 0.007 ^a	0.440 \pm 0.010 ^a	0.305 \pm 0.010 ^a	1.312 \pm 0.131 ^a
F值		2361.11	240.68	1519.89	22.52
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:相同时间点上同种干细胞各实验组与对照组(0 ng/mL)相比,^a $P < 0.001$

表3 不同浓度IL-1 β 对牙周膜干细胞(PDLSC)和骨髓间充质干细胞(BMSC)细胞增殖活性的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	1 d		4 d		7 d	
		PDLSC	BMSC	PDLSC	BMSC	PDLSC	BMSC
实验组	9	0.384 \pm 0.004	0.271 \pm 0.006	0.487 \pm 0.006	0.355 \pm 0.001	0.773 \pm 0.005	0.443 \pm 0.009
对照组							
0.001 ng/mL	9	0.337 \pm 0.003 ^a	0.236 \pm 0.006 ^a	0.421 \pm 0.004 ^a	0.323 \pm 0.002 ^a	0.739 \pm 0.006 ^a	0.383 \pm 0.006 ^a
0.01 ng/mL	9	0.338 \pm 0.003 ^a	0.232 \pm 0.003 ^a	0.401 \pm 0.004 ^a	0.334 \pm 0.002 ^a	0.715 \pm 0.002 ^a	0.377 \pm 0.004 ^a
0.1 ng/mL	9	0.289 \pm 0.003 ^a	0.256 \pm 0.004 ^a	0.393 \pm 0.005 ^a	0.334 \pm 0.002 ^a	0.796 \pm 0.008 ^a	0.387 \pm 0.002 ^a
1 ng/mL	9	0.355 \pm 0.012 ^a	0.266 \pm 0.011	0.448 \pm 0.004 ^a	0.394 \pm 0.002 ^a	0.632 \pm 0.008	0.358 \pm 0.006 ^a
F值		86.33	18.48	172.29	538.77	308.15	77.21
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:相同时间点上同种干细胞各实验组与对照组(0 ng/ml)相比,^a $P < 0.001$

表4 IL-1 β 作用下牙周膜干细胞(PDLSC)和骨髓间充质干细胞(BMSC)骨向分化相关基因mRNA表达水平的统计结果($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	ALP	Col-1	OCN	Runx2
PDLSC 对照组	12	1.000 \pm 0.117 ^a	1.000 \pm 0.110 ^a	1.000 \pm 0.124 ^a	1.000 \pm 0.108 ^a
PDLSC 实验组	12	0.053 \pm 0.004 ^b	0.446 \pm 0.038 ^b	0.291 \pm 0.052 ^b	0.116 \pm 0.017 ^b
BMSC 对照组	12	13.157 \pm 1.517 ^c	2.235 \pm 0.278	4.286 \pm 0.570 ^c	2.142 \pm 0.374 ^c
BMSC 实验组	12	3.119 \pm 0.744 ^b	1.870 \pm 0.312 ^b	1.770 \pm 0.358 ^b	0.824 \pm 0.257 ^b

注:^a表示PDLSC对照组与实验组之间差异有统计学意义($P < 0.05$);^b表示PDLSC实验组与BMSC实验组之间差异有统计学意义($P < 0.05$);^c表示BMSC对照组与实验组之间差异有统计学意义($P < 0.05$)

组与对照组相比ALP表达量差异均具有统计学意义($t_{\text{PDLSC}} = 398.28, P_{\text{PDLSC}} < 0.001; t_{\text{BMSC}} = 10.29, P_{\text{BMSC}} = 0.002$),两种干细胞实验组ALP的表达量差异也具有统计学意义($t = 7.14, P = 0.019$,表4);PDLSC实验组Col-1表达量为 0.446 ± 0.038 ,与对照组相比差异有统计学意义($t = 24.93, P = 0.002$);而BMSC实验组Col-1表达量与对照组相比差异无统计学意义($t = 1.51, P = 0.206$),两种干细胞实验组的Col-1表达量差异具有统计学意义($t = -7.83, P = 0.015$);PDLSC实验组与对照组、BMSC实验组与对照组OCN表达量差异均具有统计学意义($t_{\text{PDLSC}} = 23.49, P_{\text{PDLSC}} = 0.002; t_{\text{BMSC}} = 6.47, P_{\text{BMSC}} = 0.005$),两种干细胞实验组

的OCN表达量相比,差异也具有统计学意义($t = 7.08, P = 0.017$);PDLSC实验组与对照组、BMSC实验组与对照组Runx2表达量差异均具有统计学意义($t_{\text{PDLSC}} = 87.46, P_{\text{PDLSC}} < 0.001; t_{\text{BMSC}} = 5.02, P_{\text{BMSC}} = 0.010$),两种干细胞实验组的Runx2表达量差异也具有统计学意义($t = 4.76, P = 0.041$)。

以上结果显示,IL-1 β 作用下PDLSC和BMSC内成骨基因ALP、Col-1、OCN、Runx2表达均降低,但BMSC内基因表达量较PDLSC高(图4)。

讨论

研究证实,IL-1 β 为牙周组织的主要破坏因子之

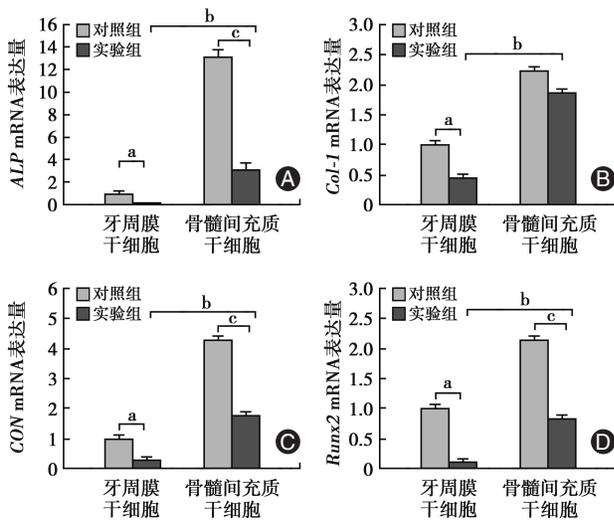


图4 14 d时牙周膜干细胞(PDLSC)和骨髓间充质干细胞(BMSC)骨向分化基因的表达(* $P < 0.05$) A:ALP;B:Col-1;C:OCN;D:Runx2

一,其表达升高与牙槽骨吸收呈正相关关系^[10-11]。本研究应用IL-1 β 来比较两种干细胞骨向分化能力之间的差异,对进一步应用BMSC修复牙周骨组织的缺损具有一定意义。

本研究结果表明,随着IL-1 β 浓度的增加PDLSC形成的矿化结节量减少,茜素红染色逐渐变浅;而BMSC的骨向分化能力未见明显降低。文献显示,ALP的活性增高与细胞分化程度密切相关,在组织矿化过程中具有重要作用。本实验结果显示,随IL-1 β 浓度增高PDLSC内ALP活性显著下降;而BMSC的ALP活性降低较少且在14 d时ALP活性较PDLSC高。本课题组进一步对干细胞在炎症环境下骨向分化与增殖之间的相互关系进行研究,结果显示IL-1 β 作用下,PDLSC增殖能力强于BMSC。在一定条件下细胞的增殖和分化是一相对过程,因此这一结果表明BMSC的骨向分化能力优于PDLSC。随后对成骨基因的表达检测结果显示:BMSC和PDLSC在炎症环境下成骨基因的表达有差异,BMSC成骨能力强于PDLSC,进一步验证BMSC对炎症刺激抵抗较强。

以往对干细胞修复牙周组织缺损的研究对象主要集中在一种干细胞,对两种不同来源的干细胞,比较其骨向分化能力的研究较少。本研究应用了两种干细胞来比较IL-1 β 刺激下骨向分化能力,结果显示两者之间具有差异性,BMSC骨向分化能力较强,然而其具体调控机制尚不清楚。间充质干细胞(MSC)的分化受其生存微环境的调控,涉及很多细胞因子和信号分子,彼此构成了复杂的网络系

统相互作用调控干细胞的定向分化^[12-13]。以往研究显示,NF- κ B在炎症和免疫应答中发挥重要作用^[14],在慢性牙周炎的发生、发展中也起着关键作用:炎症环境下NF- κ B信号通路激活在PDLSC骨向分化调节起主导作用,成骨基因表达降低^[15]、骨向分化受抑制,而对BMSC骨向分化能力影响较小^[16]。

有研究证实,MSC能够发挥抗炎功能的一个重要机制是其能诱导调节性T细胞(Treg)形成^[17-18]。对机理进一步分析显示间充质干细胞能分泌可溶性因子,包括TGF- β 1、IL-6、IL-8、IDO、PGE2等转化生长因子。这些可溶性因子使MSC与免疫细胞相互作用,通过调节损伤局部微环境、减少炎症因子分泌发挥其抗炎和免疫抑制作用^[19-20]。因此进一步深入研究炎症环境下,BMSC的免疫调节功能将对干细胞应用于牙周病的治疗提供新的理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Chen FM, Sun HH, Lu H, et al. Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(27):6320-6644. DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.05.048.
- [2] Li G, Hu J, Chen H, et al. Enamel matrix derivative enhances the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells on the titanium implant surface [J]. *Organogenesis*, 2017, 13(3):103-113. DOI:10.1080/15476278.2017.1331196.
- [3] Wang T, Kang W, Du L, et al. Rho-kinase inhibitor Y-27632 facilitates the proliferation, migration and pluripotency of human periodontal ligament stem cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(11):3100-3112. DOI:10.1111/jcmm.13222.
- [4] Gu X, Li M, Jin Y, et al. Identification and integrated analysis of differentially expressed lncRNAs and circRNAs reveal the potential ceRNA networks during PDLSC osteogenic differentiation [J]. *BMC Genet*, 2017, 18(1):100. DOI:10.1186/s12863-017-0569-4.
- [5] Faizuddin M, Bharathi SH, Rohini NV. Estimation of interleukin-1beta levels in the gingival crevicular fluid in health and in inflammatory periodontal disease [J]. *J Periodontol Res*, 2003, 38(2):111-114. DOI:10.1034/j.1600-0765.2003.01649.x.
- [6] Toyman U, Tüter G, Kurtiş B, et al. Evaluation of gingival crevicular fluid levels of tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor 2, matrix metalloproteinase-3 and interleukin 1- β in patients with different periodontal diseases [J]. *J Periodontol Res*, 2015, 50(1):44-51. DOI:10.1111/jre.12179.
- [7] Gonzales JR, Herrmann JM, Boedeker RH, et al. Concentration of interleukin-1beta and neutrophil elastase activity in gingival crevicular fluid during experimental gingivitis [J]. *J Clin Periodontol*, 2001, 28(6):544-549. DOI:10.1034/j.1600-051x.

- 2001.028006544.x.
- [8] Yang ZH, Zhang XJ, Dang NN, et al. Apical tooth germ cell-conditioned medium enhances the differentiation of periodontal ligament stem cells into cementum/periodontal ligament-like tissues[J]. *J Periodontol Res*, 2009, 44(2): 199-210. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2008.01106.x.
- [9] 张静,陈彬,段银钟,等. 炎性环境下牙周膜、骨髓间充质干细胞骨向分化差异性的研究[J]. *口腔医学研究*, 2014, 30(10): 939-944. DOI: 10.13701/j.cnki.kqxyj.2014.10.007.
- [10] Offenbacher S, Barros S, Mendoza L, et al. Changes in gingival crevicular fluid inflammatory mediator levels during the induction and resolution of experimental gingivitis in humans[J]. *J Clin Periodontol*, 2010, 37(4): 324-333. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2010.01543.x.
- [11] Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis?[J]. *J Clin Periodontol*, 2011, 38 Suppl 11: 60-84. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2010.01671.x.
- [12] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147. DOI: 10.1126/science.284.5411.143.
- [13] Mao CY, Wang YG, Zhang X, et al. Double-edged-sword effect of IL-1 β on the osteogenesis of periodontal ligament stem cells via crosstalk between the NF- κ B, MAPK and BMP/Smad signaling pathways[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7:e2296. DOI: 10.1038/cddis.2016.204.
- [14] Chang J, Wang Z, Tang E, et al. Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor-kappaB[J]. *Nat Med*, 2009, 15(6): 682-689. DOI: 10.1038/nm.1954.
- [15] Chen X, Hu C, Wang G, et al. Nuclear factor- κ B modulates osteogenesis of periodontal ligament stem cells through competition with β -catenin signaling in inflammatory microenvironments[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4:e510. DOI: 10.1038/cddis.2013.14.
- [16] Li C, Li B, Dong Z, et al. Lipopolysaccharide differentially affects the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells through Toll-like receptor 4 mediated nuclear factor κ B pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(3): 67. DOI: 10.1186/s12929-014-0046-4.
- [17] Kavanagh H, Mahon BP. Allogeneic mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation by inducing murine regulatory T cells[J]. *Allergy*, 2011, 66(4): 523-531. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2010.02509.x.
- [18] Burr SP, Dazzi F, Garden OA. Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: the Yin and Yang of peripheral tolerance?[J]. *Immunol Cell Biol*, 2013, 91(1): 12-18. DOI: 10.1038/icb.2012.60.
- [19] Melief SM, Schrama E, Brugman MH, et al. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(9): 1980-1991. DOI: 10.1002/stem.1432.
- [20] Carty F, Mahon BP, English K. The influence of macrophages on mesenchymal stromal cell therapy: passive or aggressive agents?[J]. *Clin Exp Immunol*, 2017, 188(1): 1-11. DOI: 10.1111/cei.12929.

(收稿日期:2019-10-22)

(本文编辑:王嫚)