

TRAF6敲低对低氧状态下IL-17调控人牙周膜成纤维细胞表达OPG及RANKL的影响

王振婷¹, 吴偲偲¹, 吴程宇¹, 燕珂¹, 徐艳^{1,2*}, 陈旭^{1,2*}

¹南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, ²南京医科大学附属口腔医院牙周科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨敲低肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)对人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament cells, hPDLs)在低氧状态经白介素17(interleukin 17, IL-17)刺激表达骨保护素(osteoprotegerin, OPG)及核因子κB受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor-κB ligand, RANKL)的影响。方法:将hPDLs细胞设为常氧加IL-17组、低氧加IL-17组以及单纯低氧组,每组内分为阴性对照组(TRAF6-NC组)和干扰组(TRAF6-shRNA组)。将靶向TRAF6基因的shRNA慢病毒载体(TRAF6-shRNA)感染hPDLs,通过倒置显微镜观察病毒感染效率并用RT-PCR方法验证,用Western blot及RT-PCR方法检测分析hPDLs低氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)、OPG及RANKL的表达变化。结果:低氧加IL-17组RANKL与OPG蛋白相对表达量的比值RANKL/OPG高于常氧加IL-17组及低氧组。在低氧加IL-17条件下,与TRAF6-NC组相比,TRAF6-shRNA组RANKL表达减少,RANKL与OPG相对表达量的比值RANKL/OPG减少。结论:TRAF6参与低氧状态下IL-17刺激hPDLs表达骨吸收分子的调控,敲低TRAF6可使低氧状态下IL-17诱导的hPDLs表达骨吸收分子减少。

[关键词] 牙周炎;TRAF6;RANKL;OPG;低氧

[中图分类号] R781.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)07-922-06

doi:10.7655/NYDXBNS20180710

Effects of TRAF6 knockdown on the IL-17 modulating the expression of OPG and RANKL in periodontal ligament cells under hypoxia

Wang Zhenting¹, Wu Sisi¹, Wu Chengyu¹, Yan Ke¹, Xu Yan^{1,2*}, Chen Xu^{1,2*}

¹Jiangsu Key Laboratory of Oral Diseases, NMU, ²Department of Periodontics, the Affiliated Stomatological Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aimed at the effect of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) knockdown on interleukin-17 (IL-17) modulating the expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator for nuclear factor-κB ligand (RANKL) in human periodontal ligament cells (hPDLs) under hypoxia. **Methods:** The experiment was set as the normoxia plus IL-17 group, the hypoxia plus IL-17 group and the hypoxia group. Each group was divided into the negative control group (the TRAF6-NC group) and the disturbance group (the TRAF6-shRNA group). The shRNA lentiviral vector was used to infect hPDLs. The efficiency of infection was observed by inverted microscope and verified by RT-PCR. The expression of HIF-1α, RANKL and OPG in human periodontal ligament cells were detected by Western blot and RT-PCR. **Results:** The ratio of RANKL/OPG relative expression of RANKL and OPG protein in the hypoxia plus IL-17 group was higher than that in the hypoxia group. Under hypoxia plus IL-17 conditions, the expression of RANKL was decreased in the TRAF6-shRNA group compared with the TRAF6-NC group, and the ratio of RANKL/OPG relative expression of RANKL and OPG was decreased. **Conclusion:** TRAF6 is involved in the regulation of IL-17-stimulated expression of bone resorption molecules in human periodontal ligament cells in hypoxic conditions. Knocking down TRAF6 can reduce IL-17-induced expression of bone resorption molecules in human periodontal ligament cells.

[Key words] periodontitis; TRAF6; RANKL; OPG; hypoxia

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(07):922-927]

[基金项目] 国家自然科学基金(81771074, 81470749);江苏省高校自然科学研究重大项目(16KJA320001);江苏省高层次人才“六个一工程”(LGY2016048);江苏省高校优势学科建设工程资助项目(2014-37)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yanxu@njmu.edu.cn, chenxu.hei@outlook.com

牙周炎是以牙周结缔组织降解、牙槽骨吸收为主要特征的慢性炎症性疾病。牙槽骨的改建处于动态平衡中,包括骨形成与骨吸收;当组织处于炎症浸润状态,牙槽骨改建的动态平衡被打破。核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)/骨保护素(osteoprotegerin, OPG)体系是调节破骨细胞分化成熟、发挥骨吸收功能的关键因子,二者比例变化可引起骨改建的发生^[1]。体外实验培养证明,牙周膜细胞也能产生RANKL、OPG^[2]。辅助性T细胞17(T helper cell 17, Th17)是一种CD4⁺T细胞亚群,以分泌白介素17(interleukin 17, IL-17)为主要特征。研究发现患有慢性牙周炎的牙龈中存在Th17细胞,炎症牙龈、牙槽骨中有IL-17的表达^[3]。在炎症组织中,因细胞代谢活跃及微循环障碍,使得局部组织容易形成低氧微环境^[4],研究发现慢性牙周炎患者的炎症牙龈组织中低氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)的表达明显高于健康对照组^[5],说明牙周炎时牙周组织处于低氧状态。因此,在低氧状态下的机制研究更接近于发生牙周炎时局部微环境的表现。还有研究发现,在缺氧诱导的风湿性关节炎模型中,HIF-1 α 过表达增强了RAS介导的炎症Th1和Th17细胞的扩张,导致促炎性IFN- γ 和IL-17产生^[6]。肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)属于肿瘤坏死因子超家族,可介导多条信号通路,激活转录因子NF- κ B等,引起炎症反应^[7]。最新研究发现,在TRAF6条件性敲除的小鼠模型中,破骨细胞的形成被显著抑制^[8]。

本课题组前期实验证实,IL-17在常氧状态下可促进人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament cells, hPDLCs)中RANKL的表达,且IL-17处理hPDLCs 24 h后RANKL表达最强^[9],提示IL-17可通过调控hPDLCs骨吸收相关分子的表达,诱导破骨细胞生成,参与骨代谢。此外,常氧条件下IL-17可通过TRAF6/TBK1-JNK/NF- κ B途径调控RANKL及OPG的表达进而发挥骨破坏的作用,在JNK、NF- κ B抑制剂作用于hPDLCs及采用RNA干扰技术下调hPDLCs中TRAF6基因表达后发现,常氧下IL-17诱导的hPDLCs表达RANKL明显下调^[10]。当氧体积分数在5%的低氧状态下,RANKL/OPG的比例被最大程度地上调^[11]。基于上述研究,本实验应用RNA干扰技术下调hPDLCs中TRAF6的表达,研究TRAF6敲低对hPDLCs在5%低氧状态下,经过IL-17刺激24 h后表达RANKL及OPG的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM培养液、胎牛血清(FBS)、双抗(青霉素100 U/L、链霉素100 U/L)、胰蛋白酶(Gibco公司,美国),重组人IL-17(Peprtech公司,美国),BCA蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),TRIzol(Invitrogen公司,美国),PrimeScript逆转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq定量PCR酶混合物试剂盒(TaKaRa公司,日本),兔抗人RANKL抗体、兔抗人OPG抗体(Abcam公司,英国),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)(Peprtech公司,美国)。ABI7300实时定量RT-PCR仪(ABI公司,美国),二氧化碳三气培养箱(Thermo公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 hPDLCs的体外培养

于2016年6—9月取南京医科大学附属口腔医院口腔颌面外科门诊12~18岁健康青少年因正畸需要拔除的前磨牙,于生物安全柜刮取根中1/3的牙周膜组织,剪碎后均匀接种于25 cm²培养瓶中,加入5 mL含有10% FBS的DMEM培养液,置于5% CO₂ 37 °C培养箱中孵育,等待组织块贴壁,4~6 h后缓慢翻转培养瓶。获得原代细胞后每3 d换1次液。经波形丝蛋白抗体染色方法鉴定细胞来源后,取3~7代hPDLCs用于后续实验。

1.2.2 慢病毒干扰载体的构建与包装

携带靶向TRAF6基因的shRNA慢病毒载体(TRAF6-shRNA)和靶向无关序列的阴性对照慢病毒(TRAF6-NC)均由上海吉凯基因化学技术有限公司合成并包装,并进行测序鉴定和病毒滴度的测定。干扰载体和阴性对照载体均表达绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)。慢病毒载体及阴性对照载体的名称与靶向基因序列见表1。

表1 TRAF6 shRNA序列及阴性对照序列

Table 1 Target sequences of three shRNA and negative control of TRAF6

名称	靶向基因序列(5'→3')
TRAF6-RNAi(57659-1)	CACGGGAAATATGTAATAT
TRAF6-RNAi(57660-21)	TCTCAGAGGTCCGGAATTT
TRAF6-RNAi(57661-1)	GGTGAAATGTCCAAATGAA
NC	TTCTCCGAACGTGTACGT

1.2.3 慢病毒感染hPDLCs

将3~7代hPDLCs以每皿1×10⁶个细胞数接种于

培养皿,24 h后分别加入适量的各 TRAF6-shRNA 和对照 TRAF6-NC 慢病毒溶液(感染复数均为5),并加入终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 polybrene 进行病毒转染。12 h后更换为常规培养基,72 h后于倒置荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况,以此确定病毒的转染效率,并提取 RNA 检测 TRAF6 基因表达变化。

1.2.4 实验分组

选择干扰效果最佳的 TRAF6-shRNA 病毒载体感染 hPDLcs 细胞,TRAF6-NC 作为阴性对照。72 h后,将细胞接种于6孔板,细胞密度为 3×10^5 个/孔。设为常氧加 IL-17 组、低氧加 IL-17 组及单纯低氧组。低氧加 IL-17 组加入终浓度为 50 mg/L 的 IL-17,再与单纯低氧组细胞一起放入氧浓度为 5% 的乏氧箱中,常氧加 IL-17 组加入终浓度为 50 mg/L 的 IL-17 后在普通培养箱中培养,24 h后提取蛋白及 RNA。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达

各组细胞中加入 150 μL RIPA 蛋白裂解液,冰上裂解 20 min。刮下裂解的细胞,用移液枪移至 EP 管中,超声震荡 80 s。予以 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 10 min,取总蛋白,BCA 法检测蛋白质浓度,调整蛋白浓度一致,按体积加入 5 \times SDS 蛋白上样缓冲液,煮沸 5 min, -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。配制 SDS-PAGE 凝胶,上样(15~20 μL)。以 60 V 恒压电泳,300 mA 恒流 1 h 电转至 PVDF 膜,置于 5% 脱脂奶粉中室温封闭 2 h。加稀释度 1:1 000 的抗 RANKL、OPG 及 GAPDH 抗体,封膜后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加相应的二抗,室温孵育 50 min。TBST 洗膜 6 次,每次 10 min。加发光剂,避光,暗室曝光。ImageJ 软件进行数据及图像处理和分析。

1.2.6 实时定量 RT-PCR 检测基因表达

在细胞中加入 TRIzol 裂解液提取细胞总 RNA。利用 PrimerScript 逆转录试剂盒,将 1 μg RNA 逆转录为 cDNA。利用 SYBR Premix Ex Taq 定量 PCR 酶混合物试剂盒进行实时定量 PCR。使用 ABI 7300 仪器进行 RT-PCR 反应。PCR 反应条件如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 31 s,共 40 个循环。按照 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算各组特定基因的相对表达量。实验重复 3 次。RT-PCR 所用引物由南京思普金生物科技有限公司设计合成(表 2),以 GAPDH 为内参。

1.3 统计学方法

采用 SPSS19.0 进行统计学分析。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,病毒感染阴性对照组与实验组的比较采用配对 *t* 检验;采用单因素方差分析比较多样本均数; $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 2 RT-PCR 引物序列

Table 2 The primers in real-time RT-PCR

基因	引物	序列(5'→3')
GAPDH	Forward	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	Reverse	GAGATGGTGTATGGGATTTC
TRAF6	Forward	CCTTTGGCAAATGTCATCTGTG
	Reverse	CTCTGCATCTTTTCATGGCAAC
HIF-1 α	Forward	TCCAAGAAGCCCTAACGTGT
	Reverse	ATGATCGTCTGGCTGCTGTA

2 结果

2.1 TRAF6-shRNA 慢病毒感染 hPDLcs

将阴性对照病毒和载有 TRAF6-shRNA 的慢病毒分别感染 hPDLcs,在倒置荧光显微镜下观察 hPDLcs 的感染效率。结果显示,在 TRAF6-NC 组和 TRAF6-shRNA 组中,绝大部分 hPDLcs 在镜下可见绿色荧光,提示两组细胞均有效感染了慢病毒(图 1)。细胞经扩大培养后用于后续研究。

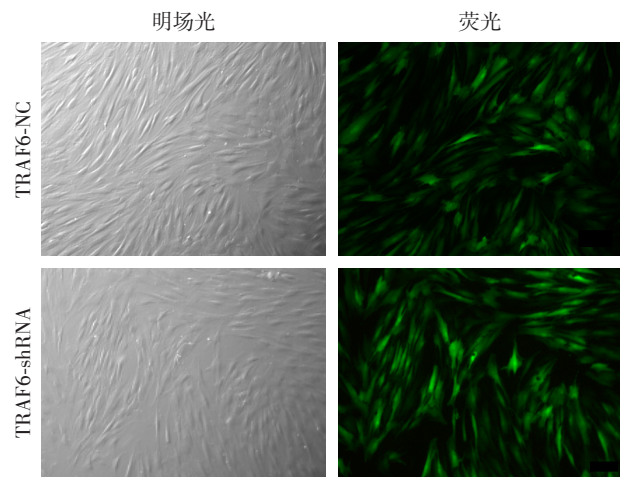


图 1 TRAF6-shRNA 慢病毒感染 hPDLcs($\times 100$)

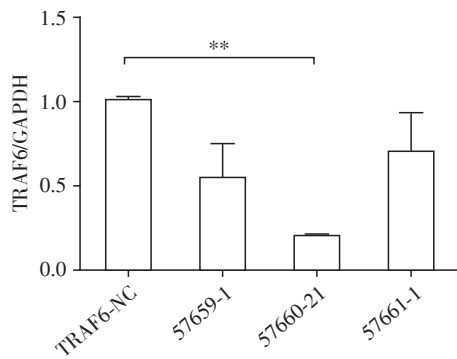
Figure 1 TRAF6-shRNA lentivirus infected hPDLcs ($\times 100$)

2.2 TRAF6-shRNA 慢病毒感染 hPDLcs 对 TRAF6 mRNA 表达的影响

为明确 TRAF6-shRNA 慢病毒对 hPDLcs 中 TRAF6 干扰效果,RT-PCR 检测 hPDLcs 中 TRAF6 基因水平。结果显示(图 2),3 个不同的 shRNA 干扰慢病毒中,57660-21 干扰 TRAF6 的效果最佳,其 TRAF6 基因水平显著低于 TRAF6-NC 组($P < 0.01$),故采用 57660-21 干扰慢病毒用于后续实验。

2.3 TRAF6-shRNA 慢病毒感染 hPDLcs 对 OPG、RANKL 及其比值 RANKL/OPG 的影响

为研究下调 TRAF6 表达对 hPDLcs 在低氧状态



两组比较, ** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图2 TRAF6-shRNA慢病毒感染对hPDLCs中TRAF6基因表达水平的影响

Figure 2 Effect of TRAF6-shRNA lentivirus infection on the expression level of TRAF6 gene in hPDLCs

下经IL-17刺激24 h后RANKL、OPG表达的影响, 采用Western blot检测OPG与RANKL蛋白表达变化(图3A)。对Western blot结果进行灰度值分析, 结果显示: 在常氧加IL-17组、低氧加IL-17组及低氧组各组内, 与TRAF6-NC组比较, TRAF6-shRNA组hPDLCs中RANKL表达均减少($P < 0.05$, 图3C); 此外, 各组内RANKL/OPG比值均下降($P < 0.05$), 各组间经TRAF6-shRNA慢病毒感染后, 低氧加IL-17组RANKL/OPG比值高于常氧加IL-17组及低氧组($P < 0.05$, 图3D)。

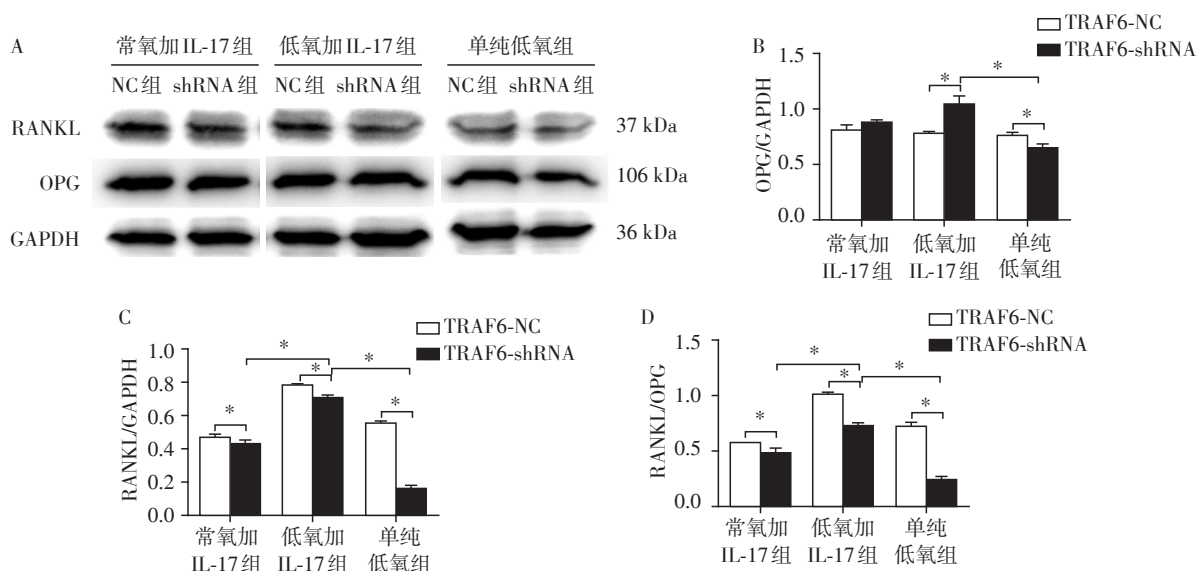
2.4 TRAF6-shRNA慢病毒感染hPDLCs对HIF-1 α 表达的影响

为研究下调TRAF6表达对hPDLCs在低氧状态

下经IL-17刺激后HIF-1 α 表达的影响, 采用Western blot检测HIF-1 α 蛋白表达变化, 采用RT-PCR检测HIF-1 α mRNA表达变化。Western blot结果显示(图4A), 在常氧加IL-17组、低氧加IL-17组及低氧组各组内, 与TRAF6-NC组比较, TRAF6-shRNA组hPDLCs中HIF-1 α 蛋白表达均增加($P < 0.05$); 经TRAF6-shRNA慢病毒感染后, 低氧加IL-17组HIF-1 α 蛋白表达量低于常氧加IL-17组及低氧组($P < 0.05$, 图4B)。RT-PCR结果显示: 在常氧加IL-17组、低氧加IL-17组及低氧组各组内, 与TRAF6-NC组比较, TRAF6-shRNA组hPDLCs中HIF-1 α mRNA表达均增加, 经TRAF6-shRNA慢病毒感染后, 低氧加IL-17组HIF-1 α mRNA表达量高于常氧加IL-17组但低于低氧组($P < 0.05$, 图4C)。

3 讨论

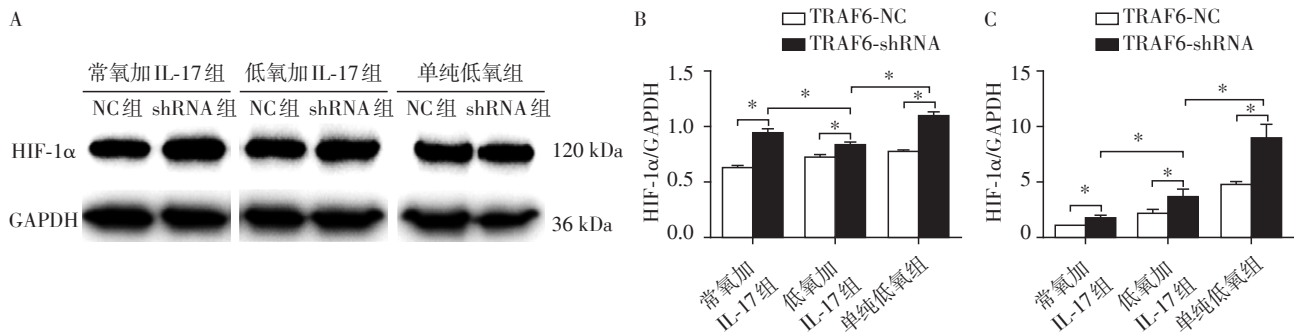
牙槽骨吸收是牙周炎的主要病理变化之一, 因此, 明确牙周炎牙槽骨吸收的分子机制对于阐明牙周炎发病机制及制定有效的治疗方案具有十分重要的意义。近年来研究发现, IL-17可刺激牙周膜成纤维细胞表面RANKL的表达, 间接诱导破骨前体细胞分化成熟, 促进骨吸收^[12]。本课题组前期证实: 常氧状态下IL-17可通过TRAF6信号分子调节hPDLCs骨吸收相关分子的表达, 干扰TRAF6信号分子后, RANKL表达减少, OPG表达增加, RANKL/OPG比值下调, 破骨趋势小于成骨趋势^[10]。该实验是在常氧状态下进行的, 而低氧状态更接近牙周



A: Western blot检测蛋白表达变化; B、C、D: 蛋白灰度值分析结果, * $P < 0.05$, $n=3$ 。

图3 TRAF6-shRNA慢病毒感染对hPDLCs中RANKL、OPG及RANKL/OPG表达水平的影响

Figure 3 Effect of TRAF6-shRNA lentivirus infection on the expression of RANKL, OPG in hPDLCs



A: Western blot 检测 HIF-1 α 蛋白表达变化; B: 蛋白灰度值分析; C: RT-PCR 检测 HIF-1 α 基因表达变化, $P < 0.05, n = 3$ 。

图4 TRAF6-shRNA 慢病毒感染对 hPDLs 中 HIF-1 α 表达水平的影响

Figure 4 Effect of TRAF6-shRNA lentivirus infection on the expression of HIF-1 α in hPDLs

炎的低氧微环境。因此,本课题组在体外低氧环境下培养 hPDLs, 建立模拟牙周组织局部缺氧的模型, 继而探讨干扰 TRAF6 表达对 hPDLs 在低氧下经过 IL-17 刺激后对 RANKL 及 OPG 表达的影响。

首先, 利用 RNA 干扰技术将 TRAF6-shRNA 慢病毒载体感染 hPDLs, 成功构建稳定敲低 TRAF6 的细胞株。本研究通过 Western blot 实验及蛋白灰度值分析发现, 敲低 TRAF6 可使经过 IL-17 刺激的 hPDLs 在低氧环境下表达 RANKL 蛋白减少, RANKL/OPG 比值下降, 进而导致 hPDLs 促破骨分化能力减弱。在常氧加 IL-17 组及单纯低氧组内, 与 TRAF6-NC 组相比, TRAF6-shRNA 组同样出现 RANKL 蛋白减少, RANKL/OPG 比值下降现象, 这说明 TRAF6 信号分子参与常氧状态加 IL-17 刺激及单纯低氧状态下 hPDLs 骨吸收相关信号分子表达的调控。在均经 TRAF6-shRNA 慢病毒感染后, 与常氧加 IL-17 组及单纯低氧组比较, 低氧加 IL-17 组 RANKL、OPG 蛋白相对表达量的比值 RANKL/OPG 增加, 该结果提示 IL-17 在低氧状态下具有较强的促进 hPDLs 表达骨吸收相关分子蛋白的作用。动物实验证实, 使用抗 IL-17 抗体可以减轻雌性激素缺陷小鼠骨质疏松的症状^[13]。丁鳌等^[14]发现在人源化小鼠的牙周炎模型组, 使用已制备的 IL-17 抗体后, 其牙周情况明显好于单纯牙周炎组, 建立的动物疾病模型结果均证实 IL-17 在炎症状态下的破骨作用。Kim 等^[15]发现在类风湿性关节炎中, 通过抑制 TRAF6 的表达可以使 IL-17 诱导的 RANKL 表达下降, 这说明 TRAF6 参与类风湿性关节炎低氧微环境下 IL-17 诱导的骨吸收相关分子表达。Yu 等^[16]发现 2% 氧浓度可导致 hPDLs OPG 表达减少, RANKL 增加。HIF-1 是细胞感应低氧环境的一个重要调节蛋白, 参与调控血管生成、糖代谢以及细胞增殖与存

活等生命过程^[17]。本研究中, 通过 Western blot 及 RT-PCR 实验发现, 在三种条件下, 敲低 TRAF6 信号分子后, HIF-1 α 表达均上调。有研究发现, 体外实验中 IL-17 可以抑制低氧状态下 HIF-1 α 的表达^[18], 低氧加 IL-17 组 HIF-1 α 表达显著低于低氧组, 说明在低氧环境下 IL-17 对 hPDLs 表达 HIF-1 α 同样具有抑制作用; 此外, 在基因水平上, 常氧加 IL-17 组 HIF-1 α mRNA 相对表达量较低氧加 IL-17 组及单纯低氧组相比显著减少, 而蛋白水平上, 常氧加 IL-17 组 HIF-1 α 表达高于低氧加 IL-17 组。基因水平与蛋白水平的结果不一致, 推测可能与常氧状态下 HIF-1 α 不能稳定存在有关, 常氧状态下基因调控蛋白翻译后, 相关 mRNA 可能发生部分降解。有学者证实, 短期低氧条件下 HIF-1 表达水平高于长期低氧条件, 这可能与短期低氧避免了负反馈机制有关^[19]。虽然 HIF-1 α 在低氧状态下有所增加, 但是并未导致实验组骨吸收相关分子表达随之增加, 说明 TRAF6 信号分子在调控骨吸收信号分子表达方面作用强于 HIF-1 α 。

综上所述, 本研究构建了敲低 TRAF6 基因表达的 hPDLs, 并发现 TRAF6 在对低氧状态下 IL-17 作用于 hPDLs 产生 RANKL 及 OPG 有着重要影响。随后, 我们将继续研究 TRAF6 信号通路相关下游信号分子对低氧状态下 IL-17 诱导 hPDLs 表达骨吸收相关分子的作用, 进一步明确骨吸收的具体机制, 为牙周炎的诊断和治疗提供新的靶点。

[参考文献]

- [1] Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology [J]. J Clin Periodontol, 2012, 39 (3): 239-248
- [2] Soompon S, Manokawinchoke J, Pavasant P. Transient receptor potential vanilloid - 1 regulates osteoprotegerin/

- RANKL homeostasis in human periodontal ligament cells [J]. *J Periodontol Res*, 2013, 48(1): 22-29
- [3] Chen XT, Tan JY, Lei LH, et al. Cytokine levels in plasma and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis [J]. *Am J Dent*, 2015, 28(1): 9-12
- [4] Colgan SP, Taylor CT. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7(5): 281-287
- [5] Ng KT, Li JP, Ng KM, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α in human periodontal tissue [J]. *J Periodontol*, 2011, 82(1): 136
- [6] Domingo-Gonzalez R, Das S, Griffiths KL, et al. Interleukin-17 limits hypoxia-inducible factor 1 α and development of hypoxic granulomas during tuberculosis [J]. *JCI Insight*, 2017, 2(19), doi: 10.1172/jci.insight.92973
- [7] Pevida M, González-Rodríguez S, Lastra A, et al. Involvement of spinal chemokine CCL2 in the hyperalgesia evoked by bone cancer in mice: a role for astroglia and microglia [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2014, 34(1): 143-156
- [8] Oya A, Katsuyama E, Morita M, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 is required to inhibit foreign body giant cell formation and activate osteoclasts under inflammatory and infectious conditions [J]. *J Bone Miner Metab*, 2017, doi: 10.1007/s0074-017-0890-Z
- [9] 林丹萍,王威栋,李璐,等. IL-17对人牙周膜成纤维细胞RANKL表达的影响[J]. *口腔医学*, 2014, 34(6): 405-408
- [10] Lin D, Li L, Sun Y, et al. IL-17 regulates the expressions of RANKL and OPG in human periodontal ligament cell via TRAF6/TBK1-JNK/NF- κ B pathways [J]. *Immunology*, 2014, 144(3): 472-485
- [11] 茅飞飞,李璐,王振婷,等. 乏氧对IL-17调控牙周膜细胞RANKL及OPG表达的影响[J]. *口腔医学*, 2017, 37(5): 385-389
- [12] 李琳娟,黎敏,彭娟敏,等. 白细胞介素-17对人牙周膜成纤维细胞表达RANKL、OPG的影响[J]. *重庆医学*, 2017, 46(23): 3177-3179
- [13] Tyagi AM, Mansoori MN, Srivastava K, et al. Enhanced immunoprotective effects by anti-IL-17 antibody translates to improved skeletal parameters under estrogen deficiency compared with anti-RANKL and anti-TNF- α antibodies [J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(9): 1981-1992
- [14] 丁鳌,张志宏,王勤涛. IL-17抗体在动物实验性牙周炎中作用的研究[C]//第十次全国牙周病学学术会议论文摘要汇编, 2014
- [15] Kim KW, Kim HR, Kim BM, et al. Th17 cytokines regulate osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(11): 3011-3024
- [16] Yu XJ, Xiao CJ, Du YM, et al. Effect of hypoxia on the expression of RANKL/OPG in human periodontal ligament cells *in vitro* [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10): 12929-12935
- [17] 陈国强. 低氧、低氧诱导因子-1和白血病细胞分化[J]. *中国科学(生命科学)*, 2014, 44(2): 114-118
- [18] Atsumi T, Singh R, Sabharwal L, et al. Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(1): 8-14
- [19] Wang H, Flach H, Onizawa M, et al. Negative regulation of Hif1 α expression and TH17 differentiation by the hypoxia-regulated microRNA miR-210 [J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(4): 393-401

[收稿日期] 2018-02-27

(上接第921页)

- blasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides [J]. *Infect Immun*, 1995, 63(9): 3576-3581
- [18] Ciucurel EC, Vlahos AE, Sefton MV. Using Del-1 to tip the angiogenic balance in endothelial cells in modular constructs [J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(7-8): 1222-1234
- [19] 李耀民,刘亚伟,漆松涛. Del-1/EDIL3的研究进展及其在肿瘤微环境中的作用[J]. *肿瘤防治研究*, 2017, 44(2): 142-146
- [20] Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? [J]. *Lancet*, 2001, 357(9255): 539-545
- [21] Niu X, Chang W, Liu R, et al. mRNA and protein expression of the angiogenesis-related genes EDIL3, AMOT and ECM1 in mesenchymal stem cells in psoriatic dermis [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2016, 41(5): 533-540
- [22] Wang Z, Tran MC, Bhatia NJ, et al. Del1 knockout mice developed more severe osteoarthritis associated with increased susceptibility of chondrocytes to apoptosis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160684
- [23] Layhshmitt G, Lu S, Navid F, et al. Generation and differentiation of induced pluripotent stem cells reveal ankylosing spondylitis risk gene expression in bone progenitors [J]. *Clin Rheumatol*, 2017, 36(1): 143-154
- [24] Folwaczny M, Karnesi E, Berger T, et al. Clinical association between chronic periodontitis and the leukocyte extravasation inhibitors developmental endothelial locus-1 and pentraxin-3 [J]. *Eur J Oral Sci*, 2017, 125(4): 258-264

[收稿日期] 2018-02-25