

Del-1 在人牙周膜成纤维细胞中的表达及相关炎症机制初探

王玉珍, 陈旭, 吴偲偲, 葛舒, 徐艳*, 叶宇*

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

[摘要] **目的:**检测 Del-1 蛋白在人牙周膜成纤维细胞中的表达情况, 并观察内毒素(lipopolysaccharides, LPS)对人牙周膜成纤维细胞 Del-1 表达的影响, 探讨其在牙周炎进展中的可能作用机制。**方法:**组织块法取人牙周膜成纤维细胞, 用细胞免疫荧光、流式细胞术及体外管腔形成试验鉴别细胞来源, 细胞免疫荧光检测 Del-1 蛋白在人牙周膜成纤维细胞中的表达情况; 用不同浓度 LPS 刺激细胞, 检测 Del-1 蛋白的表达水平, 以 Del-1 减少最显著的 LPS 浓度为最佳刺激浓度, 再用该浓度的 LPS 刺激细胞不同时间, 检测 Del-1 及炎症因子 IL-6 的表达水平; 用不同浓度的 Del-1 蛋白预刺激细胞 1 h, 再用最佳浓度的 LPS 刺激细胞 24 h, 检测炎症因子 IL-6 的表达情况; 用最适宜浓度的 Del-1 蛋白预刺激细胞 1 h, 再用 LPS 刺激细胞 10 min, 检测 I κ B α 的激活情况。**结果:**Del-1 蛋白在人牙周膜成纤维细胞中有表达, 定位于细胞的胞浆中; LPS 刺激细胞时 Del-1 的表达水平降低, 并随浓度的升高和处理时间的延长而下降, IL-6 的表达与之相反; Del-1 蛋白可下调 LPS 诱导的炎症因子 IL-6 的表达, 抑制 I κ B α 的磷酸化。**结论:**本研究首次发现 Del-1 可以在人牙周膜成纤维细胞中表达, 且在 LPS 刺激人牙周膜成纤维细胞时表达量降低, Del-1 蛋白可通过抑制 NF- κ B 通路的激活, 在牙周炎的发生发展中发挥拮抗作用。

[关键词] 牙周膜成纤维细胞; Del-1/Edil 3; 炎症; 内毒素

[中图分类号] R781.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)07-915-07

doi:10.7655/NYDXBNS20180709

Expression of Del-1 in human periodontal ligament cells and its related inflammatory mechanism

Wang Yuzhen, Chen Xu, Wu Sisi, Ge Shu, Xu Yan*, Ye Yu*

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

[Abstract] **Objective:** To investigate whether Del-1 is expressed in human periodontal ligament cells (hPDLs), and the effect of lipopolysaccharides (LPS) on the expression of Del-1 in hPDLs, and to explore the potential mechanism of Del-1 in the development of periodontitis. **Methods:** hPDLs were isolated and cultured by tissue block method, and immunofluorescence assay, flow cytometry and Matrigel assay were used to identify cells. Immunofluorescence was used to detect if Del-1 was expressed in hPDLs. Then variable concentrations of LPS were used to stimulate hPDLs, and the expression of Del-1 was detected. The optimal concentration of LPS was selected, based on the most significant decrease of Del-1. The optimal concentration was selected to be used in the time-dependent experiment. The expressions of Del-1 and IL-6 were respectively assayed. hPDLs were pretreated with Del-1 of variable concentrations (0, 0.05, 0.5 and 5 μ g/mL) for 1 h, and then stimulated with LPS for 24 h. The expressions of IL-6 were assayed. hPDLs were pretreated with the optimal concentration of Del-1 for 1 h, and then stimulated with LPS for 10 min, for detecting the phosphorylation of I κ B α . **Results:** Del-1 could be expressed in hPDLs, locating in cytoplasm of hPDLs. The expressions of Del-1 were significantly down-regulated by LPS in a dose-independent and time-independent manner, which were contrary to IL-6. Del-1 could down-regulate the expression of IL-6 which was induced by LPS and inhibit the phosphorylation of I κ B α in hPDLs. **Conclusions:** Our study discovered for the first time that Del-1 could be expressed in hPDLs, and it was down-regulated by LPS in hPDLs, Del-1 could suppress the phosphorylation of NF- κ B, playing an antagonistic role in the development of periodontitis.

[Key words] periodontal ligament cells; Del-1/EDIL3; inflammation; LPS

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(07):915-921, 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); 江苏省高层次卫生人才“六个一工程”(LGY2016048); 江苏省高校优势学科建设工程资助(2014-37)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yanxu@njmu.edu.cn; yuxuantianqing@163.com

牙周炎是发生于牙周支持组织的慢性感染性疾病,菌斑生物膜是其始动因子。越来越多的研究发现牙周炎与宿主的易感性相关,牙周炎的大部分组织破坏是由于宿主对感染的免疫应答,引起大量的免疫细胞和炎症细胞入侵牙周组织并释放多种细胞因子,最终导致牙周袋的形成、牙槽骨的吸收和进行性附着丧失^[1]。牙周致病菌内毒素(lipopolysaccharides, LPS)是一种重要的毒力因子,能直接作用于牙周组织细胞,引起牙周组织的破坏。同时,它也是一种潜在的细胞激活因子。早期研究证明LPS能通过活化核因子(nuclear factor, NF)- κ B通路诱导牙周组织细胞表达并释放炎症因子,如白介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等,为LPS靶基因创造促炎微环境,其中IL-6可抑制成骨细胞胶原和非胶原蛋白的合成,作用于破骨细胞前体细胞,促进骨吸收,导致牙周组织的破坏^[2-3]。人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblasts, hPDLs)是牙周膜中最主要的细胞,其在LPS刺激下可产生炎症反应。作为LPS刺激的靶细胞,hPDLs常被用作体外研究牙周炎的实验载体。

Del-1 (developmental endothelial locus-1), 又名EDIL3 (EGF-like repeats and discoidin I-like domain 3), 最初以内皮细胞分泌的一种糖蛋白而被发现^[4]。近年来有研究表明Del-1以组织特异性的方式在小鼠脑、肺及眼组织中高表达,在牙龈组织中也有表达。以前研究认为Del-1是一种很好的促血管再生因子,现在发现它还是一种免疫调节因子^[5],在炎症性疾病中具有抗炎作用。

有研究发现牙周炎患者牙龈组织中Del-1表达减少,而健康牙龈组织中Del-1表达较多^[6]。此外研究发现人牙龈上皮细胞可以表达Del-1^[7],而Del-1在hPDLs中是否表达尚未见报道,并且其在牙周炎发生发展中的作用的研究仍较少,在国内尚无相关报道。因此,本研究观察了Del-1在hPDLs中的表达,及在LPS作用下Del-1表达的变化,为进一步探究Del-1在LPS通路调控牙周炎骨破坏中机制提供基础,并为研究牙周炎的免疫学机制提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)为南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室保存。

DMEM、胎牛血清(FBS)、双抗(青霉素100 U/L、链霉素100 μ g/L)、胰蛋白酶(Gibco公司,美国);兔抗人Del-1抗体(Abcam公司,英国),鼠抗人CD31抗体(CST公司,美国),兔抗人vWF抗体(Abcam公司,英国),Cy3标记山羊抗兔IgG(H+L)、FITC标记山羊抗鼠IgG(H+L)、DAPI(上海碧云天公司),正常山羊血清封闭液(武汉博士德公司),辣根酶标记山羊抗兔IgG(H+L)(Peprotech公司,美国),CCK8试剂盒(武汉Biosharp公司),脂多糖LPS(Invivogen公司,美国),人IL-6定量分析酶联免疫检测试剂盒、重组Del-1蛋白(R&D公司,美国),兔抗人p-I κ B α 抗体、兔抗人I κ B α 抗体(南京巴傲得生物),CO₂三气培养箱(Thermo公司,美国),CD31-PE抗体(Biolegend公司,美国),vWF-FITC抗体(Abcam公司,英国),Martrigel基质胶(BD公司,美国),FIX&PERM Kit固定破膜剂(南京福麦斯公司)。

1.2 方法

1.2.1 hPDLs的体外培养

于2016年6—9月收集本院口腔颌面外科门诊12~18岁健康青少年因正畸需要而拔除的正常前磨牙,获得患者及监护人的知情同意后,无菌条件下刮取根中1/3的牙周膜组织并剪碎;将剪好的组织块均匀置于25 cm²的培养瓶内壁上,加入4 mL含15% FBS的DMEM培养液,置于5% CO₂, 37 °C培养箱中孵育使组织块贴壁,4~6 h后再缓慢翻转培养瓶。获得原代细胞后,每隔3~4 d换液。经波形丝蛋白表达鉴定后取4~8代细胞用于实验。

1.2.2 流式细胞术鉴定细胞表型

取第4代hPDLs和HUVECs,胰酶消化制成细胞悬液,离心,弃上清,用1 mL冰冷的PBS(含5%FBS)重悬细胞并计数,调节细胞浓度为1.0 \times 10⁶个/管,1 200 r/min离心5 min,弃上清,每管加入100 μ L PE标记的CD31抗体或PBS阴性对照,轻轻涡旋混匀,室温下避光孵育15 min,洗涤,300 g离心5 min \times 2;每管加入100 μ L A液(固定剂),室温下避光孵育15 min,洗涤,300 g离心5 min \times 2;每管加入100 μ L B液(破膜剂),室温下避光孵育15 min,洗涤,300 g离心5 min \times 2;每管加入100 μ L FITC标记的vWF抗体或PBS阴性对照,室温下避光孵育15 min,洗涤,300 g离心5 min \times 2;向每个试管中加入300 μ L PBS重悬细胞,上流式细胞仪检测。

1.2.3 体外管腔形成试验

取第4代hPDLs和HUVECs,胰酶消化,离心,弃上清,加各自的细胞培养液制成细胞悬液,细胞计

数板计数,调整细胞密度为 2.0×10^5 个/mL,接种于铺有 Matrigel 胶的 96 孔板中,每组加入 200 μ L 细胞悬液,在细胞培养箱中培养 24 h,倒置显微镜下观察。

1.2.4 细胞免疫荧光检测蛋白表达

取对数生长期的 hPDLCs,胰酶消化制成细胞悬液,调整细胞密度为 2.0×10^4 个/mL,接种于铺有盖玻片的 12 孔板,每孔 2 mL,24 h 后取出盖玻片,用 4% 的多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,0.5% 的 Triton X-100 稀释液通透 10 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,加入正常山羊血清封闭液在 37 $^{\circ}$ C 恒温箱内孵育 1 h,吸出血清,加入兔抗人 Del-1 抗体(1:250)、鼠抗人 CD31 抗体(1:1 000)、兔抗人 vWF 抗体(1:250)、4 $^{\circ}$ C 湿盒内过夜。PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,加入二抗: Cy3 标记山羊抗兔 IgG(H+L) 和 FITC 标记山羊抗鼠 IgG(H+L),稀释比例均为 1:500,湿盒内避光 37 $^{\circ}$ C 恒温箱内孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,避光加入 DAPI 80 s,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。用抗免疫荧光淬灭剂封片,用合适波段激发,倒置荧光显微镜下观察并照相保存。

1.2.5 实验分组

将 4~8 代 hPDLCs 按 2.5×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中,以含不同浓度 LPS(0、1、2、10 μ g/mL) 的 DMEM 培养液刺激细胞,根据 Del-1 蛋白减少情况选择最佳处理浓度;再以该浓度 LPS 处理细胞不同时间(0、6、12、24、48 h),利用 Western blot 和 ELISA 分别检测各组 Del-1 蛋白及 IL-6 的表达水平。用不同浓度的 Del-1 蛋白(0、0.05、0.50、5.00 μ g/mL) 预处理细胞 1 h,再改用含最佳浓度 LPS 的 DMEM 培养液培养 24 h,利用 ELISA 检测各组 IL-6 的表达水平。最后用最适宜浓度的 Del-1 蛋白预处理细胞 1 h,再改用含低浓度和最适宜浓度 LPS 的 DMEM 培养液培养 10 min,利用 Western blot 检测各组 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 和 $\text{p-I}\kappa\text{B}\alpha$ 蛋白的表达水平。

1.2.6 CCK8 比色法检测细胞增殖

取对数生长期的细胞,胰酶消化制成悬液,调整细胞密度为 2.0×10^4 个/mL,接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,常规培养 24 h 后根据实验分组加入不同浓度的 LPS(0、1、2、10 μ g/mL)。每组设 5 个复孔,分别培养 24 h 和 48 h,实验终止时每孔加入 10 μ L CCK8 溶液,在细胞培养箱中避光孵育 2 h,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光值。

1.2.7 Western blot 检测蛋白表达

细胞相应处理后,收集各组细胞,参照试剂说明提取蛋白。考马斯亮蓝法检测各组蛋白浓度,调

整蛋白浓度一致后加样进行电泳,将蛋白转移至 PVDF 膜,用 5% 的脱脂奶粉或 5% 的 BSA 进行封闭,加一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育(GAPDH 和 β -Tubulin 为内参,1:1 000 稀释;目的蛋白 Del-1 按照 1:10 000 稀释, $\text{p-I}\kappa\text{B}\alpha$ 和 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 按照 1:1 000 稀释)。二抗常温孵育 1 h,清洗后加 ECL 发光剂,置于 ImageQuant 凝胶成像系统成像。

1.2.8 ELISA 检测细胞因子 IL-6 的表达

将收集的细胞条件培养液常温下溶解,按照 ELISA 试剂盒的说明书。分别将不同浓度的标准品或细胞条件培养液(100 μ L/孔)加入包被了人 IL-6 单抗的 96 孔板中,采用双抗体夹心法检测 IL-6 细胞因子的表达水平。终止反应后,用微孔板分光光度计检测 450 nm 的吸光度值。根据 IL-6 标准品 450 nm 处的吸光度值绘制标准曲线,计算所测定的细胞条件培养液中 IL-6 的含量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,多组定量资料比较采用单因素方差分析,多组间两两比较选用 LSD-*t* 检验(方差齐时)或 Dunnett's T3 检验(方差不齐时),以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织块法获取的 hPDLCs 的鉴定

细胞免疫荧光结果显示 hPDLCs 不表达内皮细胞特异性标记物 CD31 和 vWF(图 1)。流式细胞术实验结果(图 2)进一步证明了此结果。体外管腔形成试验结果显示,组织块法所培养的 hPDLCs 不能在 Matrigel 胶上形成管腔样结构(图 3A),而 HU-VECs 可以在 Matrigel 胶上形成管腔样结构(图 3B)。综上所述,组织块法获取的 hPDLCs 为牙周膜来源的成纤维细胞,其中不含血管内皮细胞。

2.2 Del-1 蛋白可在 hPDLCs 中表达

细胞免疫荧光检测 Del-1 蛋白在 hPDLCs 的表达情况。结果显示 Del-1 在 hPDLCs 中表达,并定位于 hPDLCs 的胞浆中,Del-1 蛋白显示为红色荧光,细胞核显示为蓝色荧光(图 4)。

2.3 LPS 对 hPDLCs 细胞增殖的影响

CCK8 实验结果显示,不同浓度 LPS 在 24 h 及 48 h 时对 hPDLCs 的增殖无明显影响,组间无统计学差异($P > 0.05$,图 5)。

2.4 LPS 刺激对 hPDLCs 表达 Del-1 蛋白的影响

Western blot 检测 LPS 刺激对 Del-1 表达的影响。结果显示,在 LPS 刺激下,Del-1 表达减少,且在

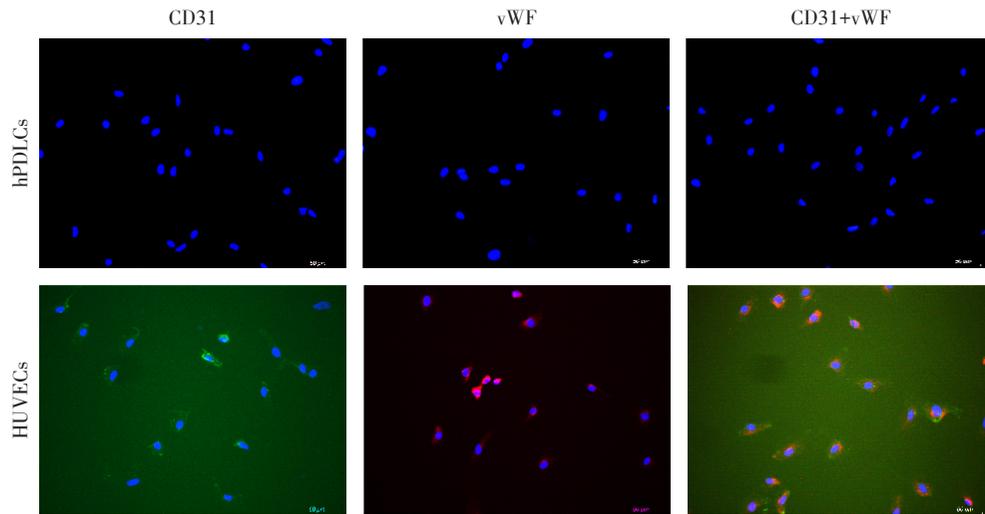


图1 细胞免疫荧光鉴定hPDLCs(×100)

Figure 1 Identification of hPDLCs by immunofluorescence assay (×100)

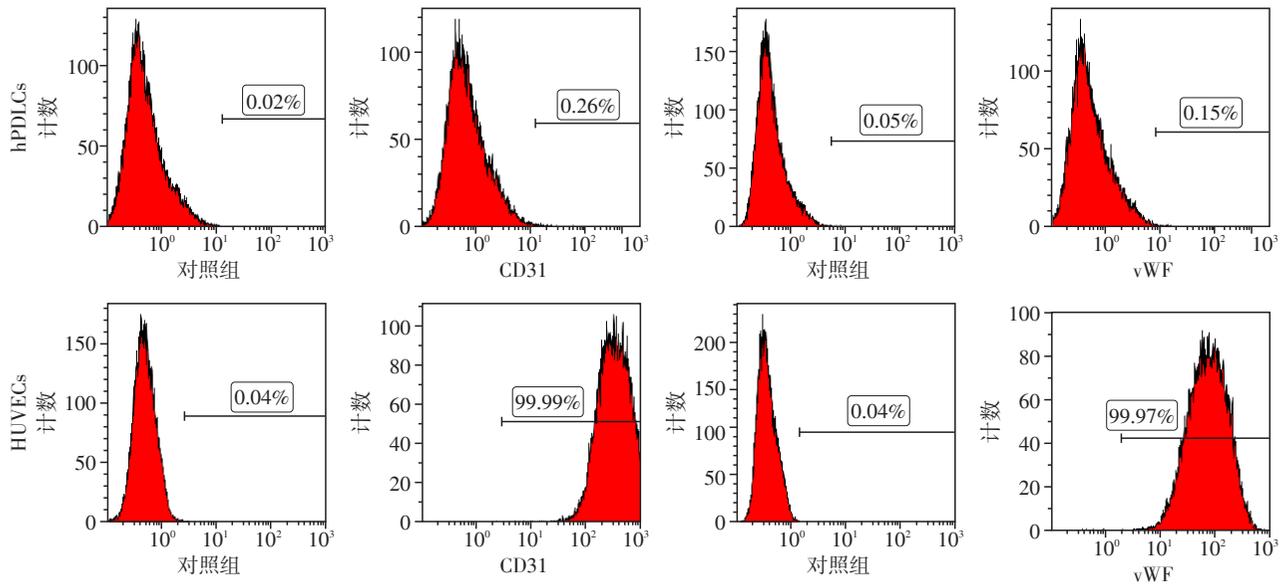
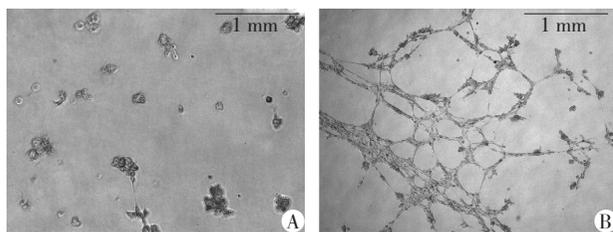


图2 流式细胞术鉴定hPDLCs的表型

Figure 2 Identification the phenotype of hPDLCs by flow cytometry



A:组织块法取得的hPDLCs在Matrigel基质胶上的生长形态;
B:HUVECs在Matrigel基质胶上的生长形态。

图3 体外管腔形成实验结果(×100)

Figure 3 Results of Matrigel assay (×100)

1 μg/mL时减少最显著,但其水平不随LPS浓度的增加而减少(图6)。采用1 μg/mL LPS处理细胞不同

时间,结果显示随刺激时间的延长Del-1蛋白表达减少,在24 h时表达减少最多(图6),差异具有统计学意义($P < 0.01$),说明LPS可下调hPDLCs Del-1的表达。

2.5 LPS刺激hPDLCs对IL-6表达的影响

结果显示,hPDLCs中IL-6蛋白的表达随LPS浓度的增加而增多,且在1 μg/mL时增加最显著(图7A)。采用1 μg/mL LPS处理细胞不同时间,结果显示IL-6蛋白在刺激24 h后表达的增加最显著(图7B),说明LPS可促进hPDLCs表达IL-6。该趋势与Del-1表达趋势相反,提示Del-1可能对IL-6的表达有一定的调控作用。

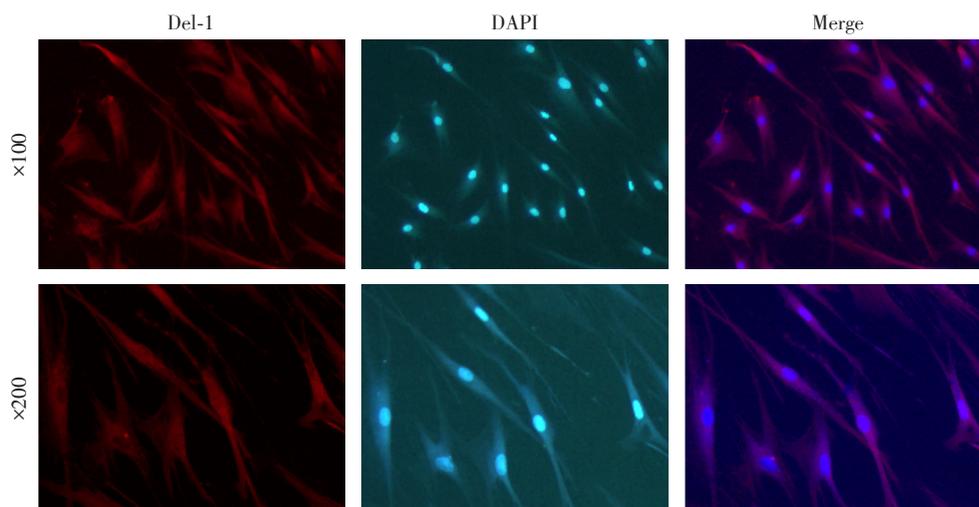


图4 细胞免疫荧光检测 Del-1 蛋白在 hPDLs 中的表达

Figure 4 Immunofluorescence assay the expression of Del-1 in hPDLs

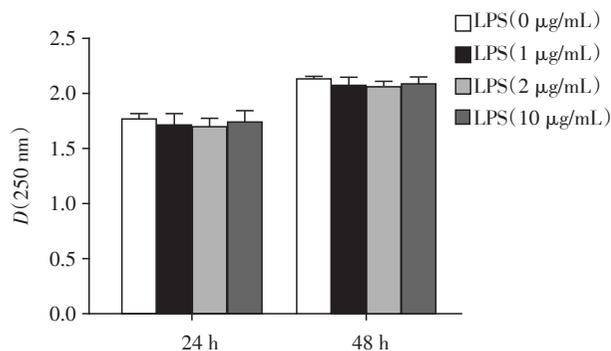


图5 CCK8 检测 24 h 和 48 h 时 hPDLs 在不同 LPS 浓度下的增殖情况

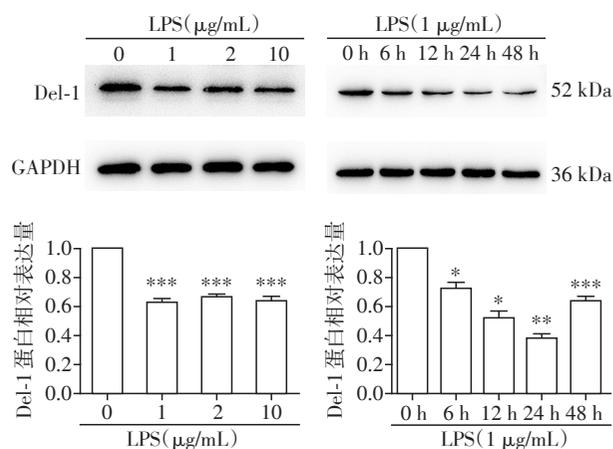
Figure 5 CCK8 assay under different LPS concentrations at 24 h and 48 h

2.6 Del-1 对 LPS 诱导的 IL-6 表达的影响

用不同浓度(0、0.05、0.50 和 5.00 μg/mL)的 Del-1 蛋白预处理 hPDLs 1 h,再用 1 μg/mL 的 LPS 刺激各组细胞 24 h,利用 ELISA 检测各组 IL-6 的表达水平。结果显示,随着 Del-1 蛋白浓度的升高,IL-6 表达减少,在 0.50 μg/mL 时减少最为显著,随后基本保持稳定(图 8)。提示 Del-1 对 hPDLs 在 LPS 刺激下的 IL-6 表达有一定的调控作用。

2.7 Del-1 对 LPS 诱导 hPDLs IκBα 磷酸化的影响

按照实验分组用 0.5 μg/mL 的 Del-1 蛋白预处理细胞 1 h,再用低浓度(0.1 μg/mL)或最适宜浓度(1.0 μg/mL)的 LPS 刺激细胞 10 min,Western blot 检测 p-IκBα 及 IκBα 的表达水平。结果显示,在 hPDLs 中,低浓度和最佳浓度的 LPS 均可使 IκBα 磷酸化,最佳浓度的 LPS 作用更强,而 Del-1 可抑制 LPS 诱导的 IκBα 磷酸化(图 9),从而抑制 NF-κB 通路的



不同浓度 LPS 和 1 μg/mL LPS 处理 hPDLs 不同时间后 Del-1 蛋白的表达。与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;n=3。

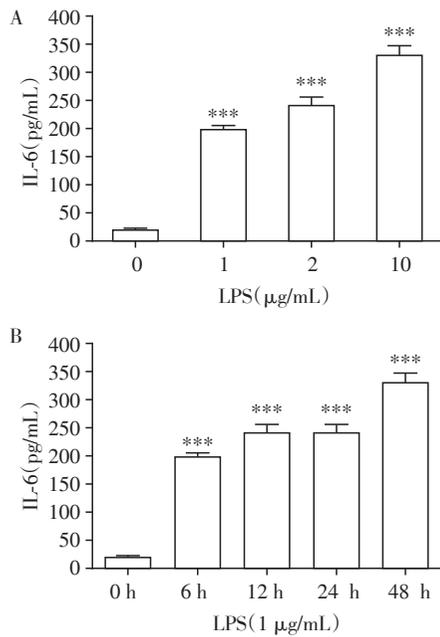
图6 Western blot 检测 LPS 对 hPDLs 表达 Del-1 蛋白的影响

Figure 6 Effects of LPS on the expression of Del-1 protein in hPDLs

激活。提示 Del-1 可通过 NF-κB 通路抑制炎症因子 IL-6 的表达。

3 讨论

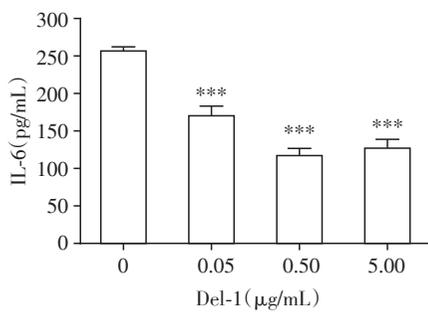
最初研究发现 Del-1 蛋白来源于胚胎发育过程中的内皮组织和胸腺组织,出生后不再表达^[2],之后研究发现 Del-1 在出生后个体的内皮细胞、某些类别的巨噬细胞和肥大软骨细胞中表达^[5]。最近研究发现中枢神经系统的神经元细胞、牙龈上皮细胞、牙龈内皮细胞及人和小鼠的破骨细胞、成骨细胞也可以表达 Del-1^[7-11]。本课题组前期通过组织块法成



A:不同浓度LPS对hPDLs表达IL-6的影响;B:1 μg/mL LPS处理hPDLs细胞不同时间IL-6表达的变化;与对照组相比,*** $P < 0.001, n=3$ 。

图7 LPS对hPDLs表达IL-6的影响

Figure 7 Effects of LPS on the expression of IL-6 in hPDLs



与对照组相比,*** $P < 0.001, n=3$ 。

图8 不同浓度Del-1对LPS诱导hPDLs表达IL-6的影响
Figure 8 Concentration-dependent effects of Del-1 on the expression of IL-6 in hPDLs under the induction of 1 μg/mL LPS

功获得人牙周膜成纤维细胞,并通过波形丝蛋白抗体鉴定其为中胚层来源^[12],本研究通过细胞免疫荧光、流式细胞术及体外管腔形成试验证明所获得的细胞中不含血管内皮细胞,与司晓辉等^[13]研究结果一致。本研究通过细胞免疫荧光及Western blot首次证明Del-1可在人牙周膜细胞中表达,细胞免疫荧光实验结果提示Del-1位于hPDLs的胞浆中。

研究表明牙龈炎患者龈沟液内LPS的含量在2 μg/mL左右^[14],故本实验结合以往的研究,选择了1、2、10 μg/mL的LPS作用于hPDLs,观察不同浓度

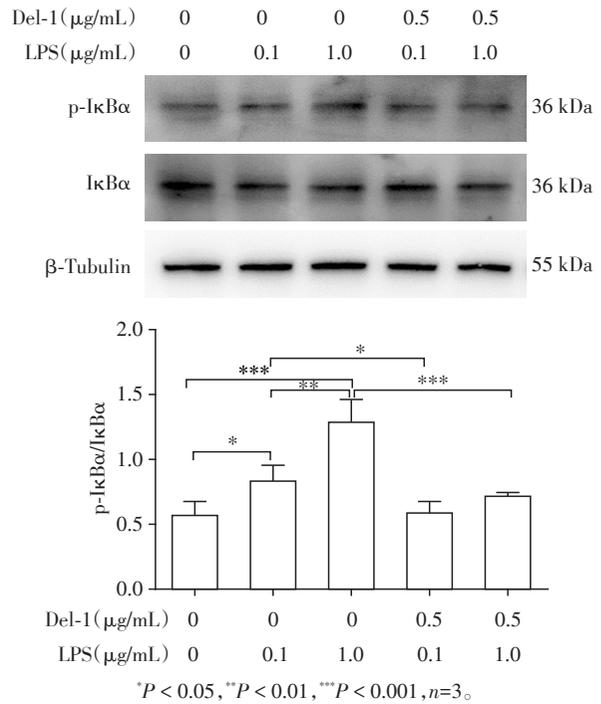


图9 Western blot检测hPDLs中p-IκBα和IκBα蛋白表达量

Figure 9 Expression of p-IκBα and IκBα protein in hPDLs

LPS对Del-1蛋白表达的影响。张凤秋等^[15]发现1 μg/mL LPS对hPDLs的增殖无影响,10 μg/mL时抑制细胞的增殖。但黄美香等^[16]发现1 μg/mL的LPS对hPDLs的增殖有明显的抑制作用。本研究发现LPS浓度在1、2和10 μg/mL时对hPDLs的增殖均无明显影响,与Yamaji等^[17]的研究结果一致。各文献实验结果不尽一致,可能是hPDLs的来源不同、LPS的种类及来源不同、LPS对细胞作用的时间不同所致。

Del-1在最初的研究中被证实是一种促血管生成的因子,可使血管形成增加^[18]。随后研究发现,作为一种特殊的细胞因子,Del-1可被表达并释放到肿瘤微环境中,促进肿瘤血管生成,促进肿瘤生长及转移^[19]。现代肿瘤学认为,肿瘤微环境的显著特点之一正是肿瘤相关性炎症^[20],更进一步将Del-1与炎症的关系联系起来。近年来,越来越多的研究将焦点集中在Del-1与炎症的关系中。研究证实Del-1参与了类风湿性关节炎、多发性硬化、银屑病等多种免疫炎症性疾病的发生发展^[21-23],在不同组织的炎性反应中,Del-1都起到了抗炎作用。最近Del-1与牙周炎的关系也开始受到关注。Shin等^[9]发现Del-1可调节破骨细胞的分化,限制破骨细胞的生成;给灵长类动物猕猴牙龈组织局部注射Del-1

蛋白可抑制牙槽骨的吸收。Folwaczny等^[24]发现牙周炎患者牙龈组织中Del-1表达减少,并随疾病严重程度增加,Del-1减少更加明显。Fujimura等^[7]的体外实验发现小剂量二极管激光照射人牙龈上皮细胞可使Del-1表达增多,IL-6表达减少,提示Del-1在牙周炎症免疫调节中有重要作用。

本研究发现,hPDLCs中IL-6的表达水平随LPS浓度的增加及时间的延长而增多。姜竹玲等^[14]的体内实验也显示,牙周袋或龈沟液中LPS的含量与牙周组织的炎症程度相关。说明在LPS刺激下,hPDLCs作为体外研究牙周炎模型构建成功。在LPS刺激下,hPDLCs表达的Del-1蛋白减少,但其表达水平随LPS浓度的增加基本保持稳定,可能由于LPS仅作为开关作用,抑制了hPDLCs中Del-1的表达,其表达水平不随LPS浓度的增加而发生变化。在1 μg/mL LPS刺激下,随刺激时间的延长,hPDLCs表达Del-1减少,在24 h时减少最多,48 h时略有增加,但与24 h相比,基本趋于稳定。本体外实验研究结果表明,在LPS刺激下hPDLCs表达Del-1减少,与IL-6的增加呈负相关,提示可通过调控Del-1的表达调节牙周炎的发生发展。进一步的研究结果表明在hPDLCs中,Del-1可抑制LPS诱导的炎症因子IL-6的表达,其抑制作用随Del-1浓度的升高而增强,在0.5 μg/mL时抑制作用最强。此外本研究表明在hPDLCs中,Del-1可抑制LPS诱导的IκBα的磷酸化,说明Del-1蛋白可通过抑制NF-κB通路的激活,在牙周炎的发生发展中发挥拮抗作用。

本研究首次发现Del-1蛋白在hPDLCs中表达,牙周致病菌内毒素LPS可显著下调hPDLCs中Del-1的表达,与IL-6的上调趋势相反。Del-1蛋白可通过抑制NF-κB通路的激活,抑制IL-6的表达,进而发挥拮抗效应。但Del-1在牙周炎中的相关具体机制仍需进一步的研究。

[参考文献]

[1] Williams RC. Periodontal disease [J]. *N Engl J Med*, 1990,322(6):373-382
[2] Salvi GE, Brown CE, Fujihashi K, et al. Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis[J]. *J Periodontal Res*, 1998,33(4):212-225
[3] Yamamoto T, Kita M, Oseko F, et al. Cytokine production in human periodontal ligament cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* [J]. *J Periodontal Res*, 2006, 41(6):554-559
[4] Hidai C, Zupancic T, Penta K, et al. Cloning and charac-

terization of developmental endothelial locus-1: An embryonic endothelial cell protein that binds the αvβ3 integrin receptor[J]. *Genes Dev*, 1998,12(1):21-33
[5] Choi EY, Chavakis E, Czabanka MA, et al. Del-1, an endogenous leukocyte-endothelial adhesion inhibitor, limits inflammatory cell recruitment [J]. *Science*, 2008, 322(5904):1101-1104
[6] Eskan MA, Jotwani R, Abe T, et al. The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(5):465-473
[7] Fujimura T, Mitani A, Fukuda M, et al. Irradiation with a low-level diode laser induces the developmental endothelial locus-1 gene and reduces proinflammatory cytokines in epithelial cells[J]. *Lasers Med Sci*, 2014,29(3):987-994
[8] Choi EY, Lim JH, Neuwirth A, et al. Developmental endothelial locus-1 (Del-1) is a homeostatic factor in the central nervous system limiting neuroinflammation and demyelination[J]. *Mol Psychiatry*, 2015, 20(7):880-888
[9] Shin J, Maekawa T, Abe T, et al. DEL-1 restrains osteoclastogenesis and inhibits inflammatory bone loss in non-human primates [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(307):307ra155
[10] Oh SH, Kim JW, Kim Y, et al. The extracellular matrix protein Edil3 stimulates osteoblast differentiation through the integrin α5β1/ERK/Runx2 pathway [J]. *PLoS One*, 2017, 12(11):e0188749
[11] Shin J, Hosur KB, Pyaram K, et al. Expression and function of the homeostatic molecule Del-1 in endothelial cells and the periodontal tissue [J]. *Clin Dev Immunol*, 2013,2013(1):617809
[12] Lin D, Li L, Sun Y, et al. IL-17 regulates the expressions of RANKL and OPG in human periodontal ligament cells via TRAF6/TBK1-JNK/NF-κB pathways. [J]. *Immunology*, 2014, 144(3):472-485
[13] 司晓辉,刘正. 人牙周膜成纤维细胞的体外培养及其生物学性状[J]. *陕西医学杂志*, 2001, 30(4):195-197
[14] 姜竹玲,高睿,陈萌萌,等. 糖尿病牙周病大鼠牙周龈沟液中TNF-α, IL-1β和LPS水平的研究[J]. *口腔医学研究*, 2014, 30(6):493-496
[15] 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):27-29
[16] 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):11-15
[17] Yamaji Y, Kubota T, Sasaguri K, et al. Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibro-

(下转第927页)

- 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调控牙周膜成纤维细胞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