

[文章编号] 1000-1182(2008)04-0352-03

· 基础研究 ·

碱性成纤维细胞生长因子对人牙周膜成纤维细胞内核心蛋白多糖基因表达的影响

王思聪¹, 林崇韬¹, 聂代邦², 欧阳红生²

(1.吉林大学口腔医院 牙周病科, 吉林 长春 130041; 2.吉林大学农学部 动物技术系, 吉林 长春 130062)

[摘要] 目的 研究碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对人牙周膜成纤维细胞内核心蛋白多糖(decorin)的影响, 探讨bFGF在牙周再生中的意义。方法 体外原代培养人牙周膜成纤维细胞, 用外源性bFGF刺激细胞, 半定量RT-PCR法检测牙周膜成纤维细胞内decorin基因表达的变化。结果 电泳结果表明, bFGF抑制人牙周膜成纤维细胞内decorin的mRNA合成, 并且随着质量浓度的增加抑制作用减弱。结论 decorin具有很多生物学功能, bFGF对decorin的抑制作用很可能是牙周炎损伤修复过程中一个重要的调节因素, 为bFGF在牙周组织再生中的作用提供理论基础。

[关键词] 碱性成纤维细胞生长因子; 核心蛋白多糖; 牙周膜成纤维细胞; 牙周组织再生

[中图分类号] Q786 [文献标识码] A

The effect of basic fibroblast growth factor on the gene expression of decorin by periodontal ligament fibroblasts in culture WANG Si-cong¹, LIN Chong-tao¹, NIE Dai-bang², OUYANG Hong-sheng². (1. Dept. of Periodontology, Stomatology Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China; 2. Dept. of Animal Biotechnology, School of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

[Abstract] Objective To study the effect of basic fibroblast growth factor(bFGF) on the gene expression of decorin by periodontal ligament fibroblasts(PLFs) in culture, and discuss the effect of bFGF in periodontal regeneration. Methods Human PLFs were cultured and stimulated by exogenous bFGF. Gene expression of decorin was assessed by semi-quantitative RT-PCR. Results The mRNA expression of decorin was suppressed by bFGF and the effect was dose-dependent. When the dose of bFGF increased, the inhibitive effect decreased. Conclusion Decorin has many biological effects. The inhibitive effect may be one of important factors which participate in the healing process of periodontitis, and provide partly theoretical basis of bFGF in periodontal regeneration.

[Key words] basic fibroblast growth factor; decorin; periodontal ligament fibroblasts; periodontal regeneration

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是一种肝素黏合多肽, 具有促进细胞增殖、分化和黏附作用等多种细胞生物活性, bFGF也是促进牙周膜成纤维细胞(periodontal ligament fibroblasts, PLFs)趋化和分裂增殖的有效因子, 酸性或碱性成纤维细胞生长因子均存在于骨基质, 并且都能刺激DNA的合成和细胞的复制^[1]。核心蛋白多糖(decorin)是富含亮氨酸的间质蛋白多糖(small leucine-rich proteoglycans, SLRP)的一种, decorin核心蛋白由较短的原肽序列(14个氨基酸)组成。人类decorin基因位于染色体12q23区。它广泛分布于细胞外基质, 如骨、软骨、肌腱、皮肤和牙龈。

decorin通过核心蛋白介导, 与Ⅰ型胶原有很紧密的联系。在软组织中, decorin位于Ⅰ型胶原的d带或e带。本实验通过研究bFGF对体外培养的人牙周膜成纤维细胞内decorin的作用, 进一步探讨bFGF抑制Ⅰ型胶原的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

高糖DMEM培养基、Ⅰ型胶原酶(Gibco公司, 美国), 胎牛血清(PAA公司, 奥地利), 青霉素(华北制药集团有限责任公司), 链霉素(大连美罗制药厂), 抗波形丝蛋白、角蛋白抗体、SP试剂盒、bFGF(Cytolab公司, 英国), 焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)(Sigma公司, 美国), TRIZOL试剂(Invitrogen公司, 美国), RT-PCR试剂盒、PCR Marker、DNA回收试剂盒、T载体(Takara公司, 日

[收稿日期] 2007-12-26; [修回日期] 2008-04-14

[基金项目] 吉林省科技发展计划基金资助项目(200705342)

[作者简介] 王思聪(1981-), 女, 吉林人, 住院医师, 硕士

[通讯作者] 林崇韬, Tel: 0431-88796039

本)。

1.2 牙周膜成纤维细胞的培养和鉴定

1.2.1 细胞的培养 选取2例就诊于吉林大学口腔医院口腔颌面外科的患者,年龄12~18岁,牙周膜成纤维细胞来自其因正畸需要拔除的2颗前磨牙。刮取前磨牙根中1/3的牙周膜组织,胶原酶消化组织块法进行牙周膜成纤维细胞原代培养。用Ⅰ型胶原酶消化12~15 h,离心收集消化后的组织块和细胞继续培养48~72 h,待细胞和组织块贴壁后常规培养。取第3代细胞用于鉴定,第6代细胞用于实验。

1.2.2 细胞的鉴定 采用免疫组化SP法进行波形丝蛋白、角蛋白染色,波形丝蛋白阳性、角蛋白阴性为牙周膜成纤维细胞。阴性对照组用PBS代替一抗。

1.3 外源性bFGF刺激牙周膜成纤维细胞

取第6代生长良好的牙周膜成纤维细胞,分为实验组和空白组,每组3瓶细胞。实验组分别用0.1、1、10 ng/mL的外源性bFGF刺激细胞,刺激时间为24 h。空白组仅使用含20%胎牛血清、1 000 U/mL青霉素和1 000 mg/mL链霉素的高糖DMEM培养液。

1.4 检测细胞内decorin mRNA的变化

1.4.1 引物设计 使用Primer Premier 5.0软件设计decorin和 β -肌动蛋白(β -actin,内参照)的引物序列,由北京赛百盛公司合成引物。decorin的上游引物序列为:5'-GTCTGGACAAAGTGCCAAAGGA-3';下游引物序列为:5'-ATCAGCAATGCGGATGTAGGAG-3'。 β -actin的上游引物序列为:5'-GGCATC-GTGATGGACTCCC-3';下游引物序列为:5'-TCG-CTGTCCACCTTCCAGC-3'。

1.4.2 细胞内总RNA的提取和RT-PCR检测 按照TRIZOL试剂说明书分别提取每瓶牙周膜成纤维细胞的总RNA。按照RT-PCR试剂盒说明书进行逆转录及cDNA的扩增。decorin的PCR扩增程序为94℃预变性3 min,以后94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s,共30个循环,72℃ 10 min延伸终止反应。 β -actin的PCR扩增程序为94℃预变性3 min,以后94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s,共30个循环,72℃ 10 min延伸终止反应。

1.4.3 PCR产物的检测 PCR产物用2%水平琼脂糖凝胶电泳,电泳结束后取出凝胶,进行吸光度扫描,得到各扩增带光密度值和面积值,然后用其表达量与对应的 β -actin表达量的比值进行比较。

1.4.4 PCR产物的测序 PCR产物用2%水平琼脂糖凝胶电泳,电泳结束后用刀片将扩增带割下,按照DNA回收试剂盒的说明书将扩增后的DNA产物回收。将回收后的目的DNA连接至T载体上,按照T载体说明书标识的方法操作,送至上海生工测序。

1.5 统计学分析

将测量后的各扩增带的数值代入公式,计算 $\text{decorin}(\text{光密度值} \times \text{面积值}) / \beta\text{-actin}(\text{光密度值} \times \text{面积值})$,根据比值来比较各组间的差异。比值的变化可以反映decorin量的变化。

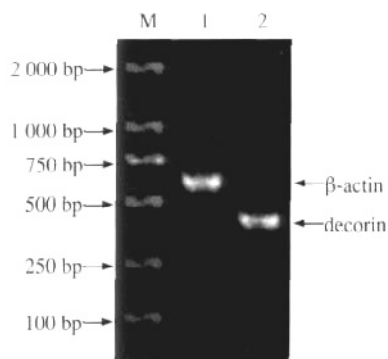
2 结果

2.1 细胞的鉴定结果

对培养的细胞行免疫组化SP法染色,结果为波形丝蛋白阳性,角蛋白阴性,证实为牙周膜成纤维细胞。

2.2 PCR产物的电泳结果及分析

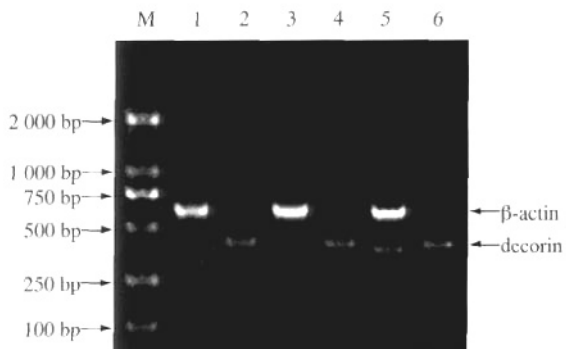
RT-PCR琼脂糖凝胶电泳结果见图1、2,图像经GIS凝胶分析系统分析,测得decorin和 β -actin的光密度值和面积值,代入公式计算,0.1 ng/mL组、1 ng/mL组、10 ng/mL组、空白组结果分别为0.60、0.86、0.90、1.19。结果表明,bFGF对牙周膜成纤维细胞内的decorin具有抑制作用,并且具有质量浓度依赖性,随着bFGF质量浓度的增加其抑制作用减弱。在3个实验组中,bFGF在0.1 ng/mL时抑制作用最强,而在10 ng/mL时抑制作用最弱。



M: DNA Marker, DL-2000; 1: β -actin; 2: decorin

图1 空白组的电泳结果

Fig 1 Results of control group



M: DNA Marker, DL-2000; 1、2: 分别为0.1 ng/mL组的 β -actin和decorin; 3、4: 分别为1 ng/mL组的 β -actin和decorin; 5、6: 分别为10 ng/mL组的 β -actin和decorin

图2 实验组的电泳结果

Fig 2 Results of experimental group

3 讨论

decorin是SLRP的一种。SLRP是小的细胞外蛋白多糖中的一个亚类,能粘接到其他基质分子上,辅助胶原生成或不同组织成分之间行使桥分子的功能^[2]。成熟的decorin(相对分子质量为 1×10^5)由核心蛋白、一条硫酸皮肤素或硫酸软骨素糖胺多糖单链、靠近N-末端和C-末端的半胱氨酸结构和2个或3个天冬氨酸结合的低聚糖组成。decorin的核心蛋白呈马蹄形,内部的空腔可能为I型胶原提供结合位点^[3]。decorin与I型胶原纤维关系密切,它可以通过核心蛋白结合不同类型的胶原纤维,如I型胶原和II型胶原^[4]。它们之间的相互作用在大量生物学过程中都起到关键的作用,如在生长、发育和损伤修复过程中细胞外基质胶原支架的维持和聚集等^[5]。还有研究表明decorin可以调节成纤维细胞对胶原的吞噬作用。低浓度的decorin可以抑制成纤维细胞对胶原的摄取^[3]。decorin另外一个作用就是调节细胞增殖。在细胞休眠期它的表达水平增高,而在细胞活跃增殖的时候或者在变异的细胞内它的表达水平很低,具有生长抑制的作用^[6]。decorin在牙齿矿化过程中的作用还不很清楚,但是它的糖胺多糖结构可以结合钙离子并且和羟磷灰石相互作用,它还出现在矿化前组织中,如类骨质和前期牙本质^[6]。

bFGF具有多种生物学功能。它能明显促进牙周膜成纤维细胞的增殖、移行^[7]。bFGF在10 ng/mL质量浓度时对牙周膜成纤维细胞的增殖作用最强^[8]。对富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白和碱性磷酸酶有抑制作用^[9]。bFGF还能提高层粘连蛋白的mRNA水平^[8]。研究表明,bFGF抑制牙周膜成纤维细胞内I型胶原的合成^[10],decorin与I型胶原合成和分解的关系密切,提示bFGF抑制decorin的合成也许是bFGF抑制I型胶原合成的途径之一。bFGF抑制decorin的合成也很可能参与细胞外基质的环境改变,也可能是参与牙周炎症损伤修复过程的重要调节因素之一。有研究认为bFGF也可能通过促进血管再生和诱导未成熟牙周膜成纤维细胞的生长及抑制牙周膜成纤维细胞转化为矿化组织形成细胞来促进牙周再生^[11],bFGF对decorin的抑制作用是否是这个过程的调节因素还不清楚,也许这种抑制作用参与到了bFGF抑制牙周膜成纤维细胞转化为矿化组织形成细胞的过程。bFGF能促进牙周膜成纤维细胞的增殖,bFGF抑制decorin的合成很可能是bFGF促进牙周膜成纤维细胞增殖的重要调节因素之一。

总之,牙周组织再生是一个十分复杂的过程,

而牙周膜成纤维细胞在牙周组织再生中的具体作用还不甚清楚。对各种生长因子在牙周组织再生过程中的作用机制和生长因子的综合作用的研究还需要一个漫长的过程。通过研究bFGF对牙周膜成纤维细胞中decorin基因表达的影响来探讨bFGF在牙周再生中的作用,为牙周组织再生提供一定的理论基础。

【参考文献】

- [1] 涂小丽. 生长因子与牙周组织工程[J]. 国外医学生物医学工程分册, 2002, 25(2): 70-72.
TU Xiao-li. Growth factors and periodontal tissue engineering[J]. Foreign Medical Sciences Biomedical Engineering, 2002, 25(2): 70-72.
- [2] 钱虹, 樊明文. 富含亮氨酸的间质蛋白多糖及其在牙和牙周组织中作用的研究[J]. 国外医学口腔医学分册, 2004, 31(2): 107-109.
QIAN Hong, FAN Ming-wen. Research of the role of small leucine-rich proteoglycans in teeth and periodontal tissue[J]. Foreign Medical Sciences(Stomatology), 2004, 31(2): 107-109.
- [3] Bhide VM, Laschinger CA, Arora PD, et al. Collagen phagocytosis by fibroblasts is regulated by decorin[J]. J Biol Chem, 2005, 280(24): 23103-23113.
- [4] Nareyck G, Seidler DG, Troyer D, et al. Differential interactions of decorin and decorin mutants with type I and type II collagens[J]. Eur J Biochem, 2004, 271(16): 3389-3398.
- [5] Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix[J]. Matrix Biol, 1998, 17(1): 1-19.
- [6] Embery G, Hall R, Waddington R, et al. Proteoglycans in dentinogenesis[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 2001, 12(4): 331-349.
- [7] 谭震, 宫苹, 赵青. 碱性成纤维细胞生长因子对成骨细胞和牙周膜成纤维细胞迁移、增殖的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2005, 23(3): 201-203.
TAN Zhen, GONG Ping, ZHAO Qing. Influence of basic fibroblast growth factors on the migration, proliferation of osteoblasts and periodontal ligament fibroblasts[J]. West China J Stomatol, 2005, 23(3): 201-203.
- [8] Takayama S, Murakami S, Miki Y, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells[J]. J Periodontol Res, 1997, 32(8): 667-675.
- [9] Fujita T, Shiba H, Van Dyke TE, et al. Differential effects of growth factors and cytokines on the synthesis of SPARC, DNA, fibronectin and alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament cells[J]. Cell Biol Int, 2004, 28(4): 281-286.
- [10] Palmon A, Roos H, Reichenberg E, et al. Basic fibroblast growth factor suppresses tropoelastin gene expression in cultured human periodontal fibroblasts[J]. J Periodontol Res, 2001, 36(2): 65-70.
- [11] Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, et al. Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor[J]. J Periodontol Res, 1999, 34(7): 425-430.

(本文编辑 王 晴)