

唑来膦酸对牙龈成纤维细胞生物学特性的影响研究

董文杰¹ 王禹鋈¹ 岳文江^{2*}

(1. 牡丹江医学院第二附属医院口腔科 黑龙江 牡丹江 157000;

2. 牡丹江医学院第二附属医院五官科 黑龙江 牡丹江 157000)

[摘要] 目的:探讨唑来膦酸对牙龈成纤维细胞增殖、凋亡、分化的影响及机制。方法:从牙龈组织分离原代人牙龈成纤维细胞(HGFs),0.5、1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的唑来膦酸处理 HGFs 24、48、72 h 后,CCK8 实验检测细胞的增殖;流式细胞仪检测 10 $\mu\text{mol/L}$ 的唑来膦酸处理 HGFs 72 h 后的细胞凋亡情况;加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的唑来膦酸的成骨诱导分化液培养 HGFs 7 d 后,碱性磷酸酶(ALP)试剂盒检测 ALP 活性,Western blot 检测 Runx2 和 OPN 的蛋白表达;10 $\mu\text{mol/L}$ 的唑来膦酸处理 HGFs 72 h 后,Western blot 检测 NF- κB 信号通路 p65、I $\kappa\text{B}\alpha$ 蛋白表达。结果:唑来膦酸可呈剂量依赖抑制 HGFs 细胞增殖($P<0.01$);唑来膦酸组细胞的凋亡率显著高于对照组,ALP 活性及 Runx2、OPN 蛋白表达显著高于对照组,p65、I $\kappa\text{B}\alpha$ 的蛋白表达显著低于对照组($P<0.01$)。结论:唑来膦酸可抑制 HGFs 增殖,促进细胞的凋亡和分化,其机制与下调 NF- κB 信号通路有关。

[关键词] 唑来膦酸 牙龈成纤维细胞 增殖 凋亡 分化 NF- κB 信号通路

[中图分类号] R781.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2017)11—1169—04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqyxyj.2017.11.009

Effects of Zoledronic Acid on Biological Characteristics of Gingival Fibroblasts. DONG Wen-jie¹, WANG Yu-kun¹, YUE Wen-jiang^{2*}. 1. Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157000, China; 2. Department of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, the Second Affiliated Hospital of Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157000, China.

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of zoledronic acid on proliferation, apoptosis, and differentiation of gingival fibroblasts. **Methods:** Primary human gingival fibroblasts (HGFs) isolated from the gingival tissue were treated with 0.5, 1, 5, and 10 $\mu\text{mol/L}$ zoledronic acid for 24, 48, and 72h. Cell proliferation was detected by CCK8 assay. Cell apoptosis was detected by flow cytometry in 10 $\mu\text{mol/L}$ zoledronic acid treated HGFs cells for 72h. Alkaline phosphatase (ALP) activity was detected by ALP kit, the expression of Runx2 and OPN protein were detected by Western blot as well as p65 and I $\kappa\text{B}\alpha$ protein after treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ zoledronic acid for 72h. **Results:** Zoledronic acid inhibited proliferation of HGFs in a dose dependent manner ($P<0.01$). Apoptosis rate of cells in zoledronic acid was significantly higher than that of control group. ALP activity and the expression of Runx2 and OPN protein were significantly higher than those of control group, whereas the protein expressions of p65 and I $\kappa\text{B}\alpha$ were significantly lower than the control group ($P<0.01$). **Conclusion:** Zoledronic acid can inhibit the proliferation but promote the apoptosis and differentiation of HGFs by downregulating NF- κB signaling pathway.

[Key words] Zoledronic acid Gingival fibroblast Proliferation Apoptosis Differentiation NF- κB pathway

牙周炎是一种细菌感染性疾病,可引起牙槽骨、牙周膜等牙周组织的破坏,最终引起牙齿的松动脱落,是引起成年人缺牙的主要原因,有高达 90% 的发病率,因此,如何促进牙周组织的再生受到广泛关注^[1]。牙龈是牙周组织中的重要组成部分,主要的

细胞成分为人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblast, HGFs),主要的体内功能是参与胶原纤维的降解和合成,有研究发现,在体外特定条件下 HGFs 能表达成骨相关的基因,且可诱导矿化,这为牙周再生提供了一个新的途径^[2]。双磷酸盐是强有力的一种骨吸收抑制剂,在变形性骨炎、骨痛症、骨质疏松症、恶性肿瘤引起的高钙血症等有广泛的应用。唑来膦酸(zoledronic acid, ZA)为第三代双磷酸盐中最有效的,可结合到羟磷灰石上而抑制由破

基金项目 黑龙江省自然科学基金项目(编号:H201596)

作者简介 董文杰(1975~),女,河北省苏路县人,学士,主治医师,主要从事口腔医学方面的工作。

*** 通讯作者** 岳文江,电话:13206887799

骨细胞诱导的骨吸收^[3]。一些体内实验显示唑来膦酸能更有效的预防骨相关事件且居留时间最长,用其他的双磷酸盐效果不佳时,替换为唑来膦酸仍旧能缓解骨痛,且唑来膦酸有更广泛的适应症,也是目前在各种肿瘤骨转移中唯一被批准使用的双磷酸盐^[4]。目前,唑来膦酸对牙周炎的作用还未清楚。因此,本研究旨在唑来膦酸对牙龈成纤维细胞增殖、凋亡、分化的影响,并进一步研究其作用机制,为牙周组织的再生和重建提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 唑来膦酸由瑞士 Novartis 公司惠赠;Runx2(Runt-related transcription factor 2)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、p65、I κ B α 抗体购自美国 abcam 公司;CCK8 试剂盒、BCA 试剂盒、Annexin V-FITC 凋亡试剂盒、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所。

1.2 人牙龈成纤维细胞(HGFs)的原代培养 取在牡丹江医学院第二附属医院口腔颌面外科因阻生智齿拔除术就诊的志愿者中分离的健康牙龈组织,年龄 14~20 岁,均无牙周病和牙龋病,用含有 100 U 青链霉素双抗的 PBS 液冲洗,以去除掉口腔中可能存在的微生物及表面的血凝块,利用常规的组织块法培养原代 HGFs,显微镜下观察细胞的生长情况,细胞长满 70%~80%瓶底时,用 0.25%的胰蛋白酶消化细胞,按照 1:2 传代。实验所用细胞为第 3 代细胞。

1.3 细胞增殖检测 取生长良好的 HGFs,0.25%的胰蛋白酶消化细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL,接种至 96 孔细胞培养板中,设只加培养基而不加细胞作为空白对照孔,每组设置 5 个复孔。每孔中加入含有 10%的胎牛血清的 DMEM 细胞培养基 100 μ L,培养 24 h 后弃掉原培养基,加入含有 0.5、1、5、10 μ mol/L 的唑来膦酸的不含血清的 DMEM 培养基,不加唑来膦酸的为对照组,继续处理 24、48、72 h 后,每孔细胞中加入 CCK8 试剂 10 μ L,培养箱继续孵育 2 h,收集细胞。利用空白对照孔调零,酶标仪测定 490 nm 的 A 值,实验重复 3 次。

1.4 细胞凋亡检测 以 1×10^5 个/mL 的浓度将 HGFs 接种于 6 孔细胞培养板中,细胞生长稳定后分别加入不含血清的 DMEM 培养及 10 μ mol/L 的唑来膦酸的不含血清的 DMEM 培养基,继续培养 72 h 后收集细胞,胰蛋白酶消化细胞,离心后收集细胞,按照细胞凋亡试剂盒的操作说明检测各组细

胞的凋亡情况。

1.5 ALP 活性及 Runx2 和 OPN 的蛋白表达检测

取第 3 代 HGFs,以 2×10^4 个/孔接种于 6 孔细胞培养板中,细胞贴壁后更换为含有 3%胎牛血清、L-DMEM、 1×10^{-7} μ mol/L 地塞米松、 1×10^{-3} μ mol/L β -甘油磷酸钠、 2×10^{-3} μ mol/L 的 L-谷氨酰胺和 5 mg/L 的抗坏血酸及 10 μ mol/L 的唑来膦酸的培养基,不加唑来膦酸的为对照组,每 3 d 换液 1 次,培养至第 7 天,利用 ALP 检测试剂盒检测 ALP 的活性,Western blot 检测 Runx2 和 osteopontin 的蛋白表达。简要操作步骤如下:细胞中加入适量裂解液于冰上充分裂解,离心后收集上清,取少量蛋白二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒检测蛋白浓度。取 30 μ g 蛋白样品依次进行 12%的 SDS-PAGE 电泳分离、PVDF 转膜、5%脱脂奶粉封闭,分别加入 Runx2 和 OPN(均按照 1:500 稀释)和 GAPDH(1:1000 稀释)一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗涤后加入 1:5000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,室温孵育 1 h, ECL 显色,显影后采用 Gel-Pro analyzer 分析各个条带的光密度,以 GAPDH 作为内参蛋白,分析 Runx2 和 OPN 的蛋白相对表达量。

1.6 NF- κ B 信号通路 p65、I κ B α 蛋白表达检测

10 μ mol/L 的唑来膦酸处理 HGFs 细胞 72 h 后,提取细胞中的总蛋白,按照 1.5 方法检测各组细胞中 p65、I κ B α 的蛋白表达。

1.7 统计学方法 所有实验数据采用 SPSS21.0 软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间差异比较采用单因素方差分析,两组比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 唑来膦酸抑制 HGFs 增殖 唑来膦酸可呈剂量依赖抑制 HGFs 增殖(24 h: $t_{0.5\mu\text{mol/L}} = 3.107$, $P_{0.5\mu\text{mol/L}} = 0.036$; $t_{1\mu\text{mol/L}} = 3.968$, $P_{1\mu\text{mol/L}} = 0.017$; $t_{5\mu\text{mol/L}} = 5.889$, $P_{5\mu\text{mol/L}} = 0.004$; $t_{10\mu\text{mol/L}} = 8.179$, $P_{10\mu\text{mol/L}} = 0.001$; 48 h: $t_{0.5\mu\text{mol/L}} = 4.185$, $P_{0.5\mu\text{mol/L}} = 0.014$; $t_{1\mu\text{mol/L}} = 5.733$, $P_{1\mu\text{mol/L}} = 0.005$; $t_{5\mu\text{mol/L}} = 9.828$, $P_{5\mu\text{mol/L}} = 0.001$; $t_{10\mu\text{mol/L}} = 13.513$, $P_{10\mu\text{mol/L}} = 0.000$; 72 h: $t_{0.5\mu\text{mol/L}} = 4.040$, $P_{0.5\mu\text{mol/L}} = 0.016$; $t_{1\mu\text{mol/L}} = 6.321$, $P_{1\mu\text{mol/L}} = 0.003$; $t_{5\mu\text{mol/L}} = 9.617$, $P_{5\mu\text{mol/L}} = 0.001$; $t_{10\mu\text{mol/L}} = 13.910$, $P_{10\mu\text{mol/L}} = 0.000$),见表 1。

2.2 唑来膦酸促进 HGFs 凋亡 对照组和唑来膦酸组细胞的凋亡率分别为(1.02 \pm 0.32)%、(11.36 \pm 0.57)% ,唑来膦酸组细胞的凋亡率显著高于对照

组 ($t = 27.398, P = 0.000$), 见图 1。

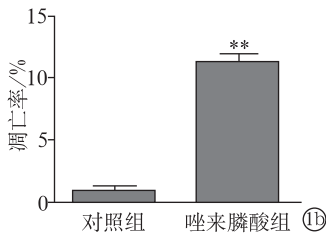
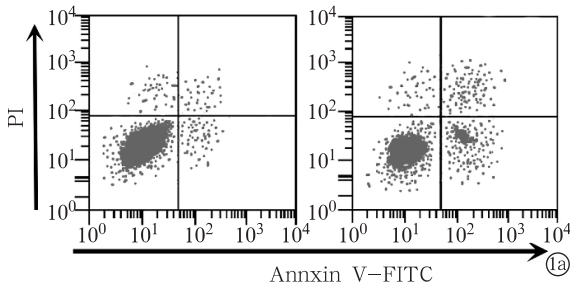
表 1 唑来膦酸对人 HGFs 增殖的影响

Table 1 Effect of zoledronic acid on proliferation of human HGFs

浓度	A 值		
	24 h	48 h	72 h
0 $\mu\text{mol/L}$	0.344 ± 0.047	0.689 ± 0.056	1.223 ± 0.074
0.5 $\mu\text{mol/L}$	0.242 ± 0.032	0.506 ± 0.051	0.987 ± 0.069
1 $\mu\text{mol/L}$	0.215 ± 0.031	0.447 ± 0.047	0.873 ± 0.061
5 $\mu\text{mol/L}$	0.163 ± 0.025	0.305 ± 0.038	0.687 ± 0.062
10 $\mu\text{mol/L}$	0.108 ± 0.017	0.197 ± 0.029	0.492 ± 0.053

注:每一时间点各浓度与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较, $P < 0.05$

2.3 唑来膦酸促进 HGFs 分化 对照组和唑来膦酸组 ALP 活性分别为 (1.00 ± 0.11)、(5.13 ± 0.44), Runx2 的蛋白表达分别为 (0.291 ± 0.036)、(0.547 ± 0.053), OPN 的蛋白表达分别为 (0.216 ± 0.029)、(0.335 ± 0.038), 唑来膦酸组 ALP 活性及 Runx2 和 OPN 的蛋白表达均显著高于对照组 ($t_{\text{ALP}} = 15.772, P_{\text{ALP}} = 0.000$; $t_{\text{Runx2}} = 6.921, P_{\text{Runx2}} = 0.002$; $t_{\text{OPN}} = 4.312, P_{\text{OPN}} = 0.013$), 见图 2。

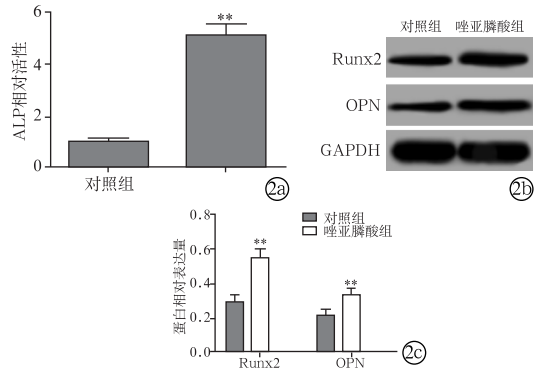


1a: 流式细胞仪检测唑来膦酸处理后 HGFs 的凋亡; 1b: 各组细胞的凋亡率; 与对照组比较, $** P < 0.05$

图 1 唑来膦酸对 HGFs 凋亡的影响

Fig. 1 Effect of zoledronic acid on apoptosis of HGFs

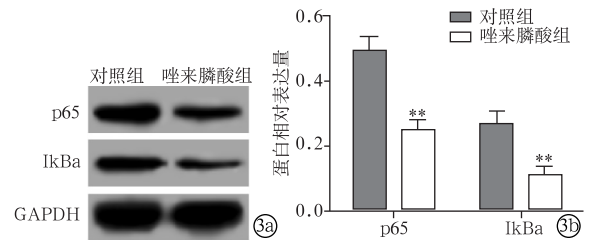
2.4 唑来膦酸对 NF- κ B 信号通路 p65、I κ B α 蛋白表达的影响 对照组和唑来膦酸组 p65 的蛋白表达分别为 (0.492 ± 0.043)、(0.248 ± 0.032), I κ B α 的蛋白表达分别为 (0.271 ± 0.035)、(0.112 ± 0.024), 唑来膦酸组 p65、I κ B α 蛋白表达均显著低于对照组 ($t_{\text{p65}} = 7.885, P_{\text{p65}} = 0.001$; $t_{\text{I}\kappa\text{B}\alpha} = 6.490, P_{\text{I}\kappa\text{B}\alpha} = 0.003$), 见图 3。



2a: ALP 活性检测结果; 2b: Western blot 检测 Runx2 和 OPN 的蛋白表达; 2c: Runx2 和 OPN 的蛋白相对表达量; 与对照组比较, $** P < 0.05$

图 2 唑来膦酸对 HGFs 分化的影响

Fig. 2 Effect of zoledronic acid on the differentiation of HGFs



3a: Western blot 检测 p65、I κ B α 蛋白表达; 3b: p65、I κ B α 的蛋白相对表达量; 与对照组比较, $** P < 0.05$

图 3 唑来膦酸对 p65、I κ B α 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of zoledronic acid on the expression of p65 and I κ B α protein

3 讨论

成纤维细胞参与调控器官和组织的发生, 维持在创伤、炎症过程中机体内环境的稳定, 且是一种在结缔组织含量最丰富的细胞类型^[5]。牙龈成纤维细胞是牙龈组织的主要成分, 具有比一般成纤维细胞更高的潜能, 即具有一定的胚胎样细胞表型, 并能起免疫调节和抗炎调节作用^[6]。有研究显示, 在牙龈组织中分离的牙龈源性间充质干细胞能在体外成脂或成骨分化, 并可检测到成骨相关基因的表达, 而在有炎症的牙龈组织也能分离出牙龈源性间充质干细胞, 且有健康牙龈同样的功能^[7]。这提示在牙周组织再生中可利用牙龈成纤维细胞作用种子细胞。唑来膦酸是一种对所有骨转移有效的双磷酸盐, 可使破骨细胞发生凋亡, 降低血清钙的水平, 减少骨损伤^[8]。

ALP 是骨形成中重要的酶, 其活性是一个可反映成骨细胞分化水平的重要指标, 其活性越高说明成骨细胞的分化越多^[9]。Runx2 是骨基质矿化及成骨分化过程中的一个关键转录因子, 有研究发现, 在前成骨细胞中可通过 Runx2 的活化促进成骨细

胞的分化, OPN 在多种细胞及组织中广泛分布, 属于细胞外的一种基质蛋白, 目前已明确其在骨的代谢、重建和矿化中的作用^[10]。本研究检测结果显示, 唑来膦酸可显著抑制牙龈成纤维细胞增殖, 促进细胞的凋亡, 可增加 ALP 活性及上调 Runx2、OPN 蛋白表达。

NF- κ B 转录因子家族有 p65、NF- κ Bp50、NF- κ Bp52、c-Rel 和 RelB 五个成员, 在多种细胞内上调表达, 增加促炎因子的表达, 进而引起炎症的继发, 增加脊髓组织的损伤^[11]。有研究显示, 降低 NF- κ B 的表达后可明显减少脑出血引起的炎症损伤^[12]; 抑制 NF- κ B 信号通路可逆转 TNF- α 引起的成骨分化能力降低^[13]。本研究检测 NF- κ B 通路 p65、I κ B α 蛋白表达, 结果显示, 唑来膦酸可显著下调牙龈成纤维细胞 p65、I κ B α 的蛋白表达。

综上所述, 唑来膦酸可通过影响 NF- κ B 信号通路抑制 HGFs 增殖, 促进细胞的凋亡和分化。该研究为牙周组织的再生和重建提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response [J]. Trends in immunology, 2014, 35(1) : 3-11
- [2] Gamal AY, Al-Berry NN, Hassan AA, et al. In vitro evaluation of the human gingival fibroblast/gingival mesenchymal stem cell dynamics through perforated guided tissue membranes: cell migration, proliferation and membrane stiffness assay [J]. Journal of Periodontal Research, 2017, 52(3) : 628-635
- [3] Nagaoka Y, Kajiyama H, Ozeki S, et al. Mevalonates restore zoledronic acid-induced osteoclastogenesis inhibition [J]. Journal of dental research, 2015, 94(4) : 594-601
- [4] Smith MR, Halabi S, Ryan CJ, et al. Randomized controlled trial of early zoledronic acid in men with castration-sensitive prostate cancer and bone metastases: results of CALGB

- 90202 (alliance) [J]. Journal of Clinical Oncology, 2014, 32(11) : 1143-1150
- [5] 王贺, 张娟, 尹硕, 等. MMP-3 诱导人牙髓成纤维细胞 CCN2mRNA 的表达及意义 [J]. 口腔医学研究, 2014, 30(5) : 399-402
- [6] Cheung JWC, McCulloch CAG, Santerre JP. Establishing a gingival fibroblast phenotype in a perfused degradable polyurethane scaffold: Mediation by TGF- β 1, FGF-2, β 1-integrin, and focal adhesion kinase [J]. Biomaterials, 2014, 35(38) : 10025-10032
- [7] Eid AA, Hussein KA, Niu L, et al. Effects of tricalcium silicate cements on osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro [J]. Acta biomaterialia, 2014, 10(7) : 3327-3334
- [8] Mozzati M, Martinasso G, Maggiora M, et al. Oral mucosa produces cytokines and factors influencing osteoclast activity and endothelial cell proliferation, in patients with osteonecrosis of jaw after treatment with zoledronic acid [J]. Clinical oral investigations, 2013, 17(4) : 1259-1266
- [9] Lallès JP. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects [J]. Nutrition reviews, 2014, 72(2) : 82-94
- [10] Wei J, Shimazu J, Makinistoglu MP, et al. Glucose uptake and Runx2 synergize to orchestrate osteoblast differentiation and bone formation [J]. Cell, 2015, 161(7) : 1576-1591
- [11] Gentle IE, Wong WWL, Evans JM, et al. In TNF-stimulated cells, RIPK1 promotes cell survival by stabilizing TRAF2 and cIAP1, which limits induction of non-canonical NF- κ B and activation of caspase-8 [J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(5) : 2547-2547
- [12] Zhao XR, Gonzales N, Aronowski J. Pleiotropic role of PPAR γ in intracerebral hemorrhage: an intricate system involving Nrf2, RXR, and NF- κ B [J]. CNS neuroscience & therapeutics, 2015, 21(4) : 357-366
- [13] Feng X, Feng G, Xing J, et al. TNF- α triggers osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells via the NF- κ B signalling pathway [J]. Cell Biology International, 2013, 37(12) : 1267-1275

[收稿日期: 2017-06-19]

(本文编辑 汪喻忠)