

雌孕激素对人牙周膜细胞成骨分化影响的研究

程海燕^{1,2} 沈兰花^{1,2*} 张瑞² 孟玲娜² 刘迪² 刑北昱² 陶冠男²

(1. 佳木斯大学 黑龙江 佳木斯 154000; 2. 黑龙江省医院南岗区口腔科 黑龙江 哈尔滨 150001)

[摘要] **目的:**研究雌孕激素对牙周膜细胞 hPDLs 的成骨化的影响,探讨雌孕激素是否有协同作用。**方法:**原代培养 hPDLs,取第 4~6 代细胞用于实验。分为空白对照组,孕酮组,雌二醇组,孕酮组和雌二醇共同处理组。用含有 50 nmol/L 孕酮、50 nmol/L 雌二醇的培养液培养 hPDLs 24 h 或 48 h 后,采用 MTT 法检测在孕激素、雌激素作用下 hPDLs 的增殖情况。通过 Real-time PCR 方法检测雌孕激素对牙周膜细胞 hPDLs 中 PLAP-1、OPG、ODF、Col-1 和 MMP-9 等成骨分化相关基因表达的影响。茜素红染色定量分析雌孕激素对矿化 hPDLs 细胞成骨分化的影响。**结果:**孕酮、雌激素干预 hPDLs 后,细胞的增殖显著高于对照组($P < 0.05$),孕酮和雌激素共同处理组显著高于两者分别处理组($P < 0.05$)。与普通培养组相比较,孕酮和雌激素对成骨促进相关基因表达有显著的提高作用($P < 0.05$),两者共同作用促进相关基因更为明显。雌孕激素处理对矿化 hPDLs 细胞成骨分化的影响高于对照组($P < 0.05$),两者联合显著高于单独处理组($P < 0.01$)。**结论:**孕酮和雌激素能够协同促进人牙周膜细胞的增殖和成骨分化。

[关键词] 孕酮 雌二醇 人牙周膜细胞 细胞增殖 成骨分化

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2019)07—0657—04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.07.010

Estrogen and Progesterone Modulates Proliferation and Differentiation of Human Periodontal Ligament Cells. CHENG Haiyan^{1,2}, SHEN Lanhua^{1,2*}, ZHANG Rui², MENG Lingna², LIU Di², XING Beiyu², TAO Guannan². 1. University of Jiamusi, Henlongjiang Province, Jiamusi 154000; 2. Department of Stomatology, Nangang Branch of Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150001, China.

[Abstract] **Objective:** To detect the proliferation and the expression of related genes of osteogenic differentiation in human periodontal ligament cells (hPDLs) by estrogen and progesterone. **Methods:** The hPDLs were isolated, cultured and stimulated with estrogen and/or progesterone for 24h or 72h. MTT assay was performed to assess the effects of estrogen and/or progesterone on cell proliferation. To quantify the effects of estrogen and/or progesterone on osteogenic differentiation of hPDLs, real-time PCR was performed in estrogen and/or progesterone-treated hPDLs. **Results:** Estrogen and/or progesterone could stimulate the proliferation of the hPDLs, and promote the expression of PLAP-1, OPG, MGP, ODF, COL-1, and MMP-9 in hPDLs. Furthermore, estrogen and/or progesterone exerted the synergistic effect in the promotion of cell proliferation and differentiation of hPDLs. The effect of estrogen or progesterone treatment on osteoblast differentiation of mineralized hPDLs cells was increased in contrast to the control group ($P < 0.05$). The combined treatment group was significantly higher than the single treatment group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Estrogen and progesterone can synergistically stimulate the proliferation and differentiation of the hPDLs.

[Key words] estrogen progesterone human periodontal ligament cells cell proliferation differentiation

骨质疏松症是以骨强度下降而易于骨折为特征的骨骼系统疾病^[1]。有研究表明雌孕激素的下降是绝经后妇女的骨质疏松的主要原因^[2],而骨质疏松

症被认为是牙周病及牙齿缺失的重要原因^[3]。大量研究证实,在女性绝经之后,体内的雌激素逐渐减少,其牙周疾病的发病率呈现上升趋势^[4]。人牙周膜成纤维细胞(hPDLs),在牙齿支持组织的发育及损伤修复再生过程中起重要作用^[5]。其表达的 PLAP-1、OPG、ODF、Col-1 和 MMP-9 等因子与成骨分化相关^[6]。雌孕激素在牙周病症状的预防和治

基金项目 黑龙江省自然科学基金(编号:H2016044)

作者简介 程海燕(1987~),女,山东省济宁市人,硕士,研究方向:口腔正畸学,雌孕激素水平对正畸牙齿移动影响。

*通信作者 沈兰花,电话:0451-88025095

疗中可有效控制牙槽骨的吸收^[7]。过去的研究多单独研究雌激素或孕激素对人牙周膜成纤维细胞的分化的影响,目前尚未见雌激素和孕激素联合给药对hPDLCS的成骨促进作用的报道?本研究从基因水平上对雌孕激素联合应用对hPDLCS的影响进行检测,为雌孕激素在牙周病预防中的应用奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器 α -MEM 培养基(美国 Gibco 公司),胰酶、孕酮(P4)、17 β -雌二醇(E2)(美国 Sigma 公司),TRNzol(天根生化科技有限公司),Prime-ScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser, SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (TliRNaseH Plus)和 DL2,000 DNA Marker(日本宝生物公司),引物由 Invitrogen 公司合成,氯化十六烷基吡啶(美国 sigma 公司)。实时定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司),酶标仪(美国 BioTek 公司)分光光度计 NANODROP 2000(美国 Thermo scientific 公司)。

1.2 人牙周膜成纤维细胞的培养 选取因正畸治疗需要拔除的健康前磨牙 6 颗,分别来自 3 名身体健康的女性患者(16~25 岁),拔牙前已征得了患者的知情同意。在超净工作台内,用 0.01 mol/L PBS 将拔除的前磨牙冲洗 3 遍,然后用无菌手术刀片刮取根中 1/3 区域的牙周膜组织,避免牙龈和根尖组织的污染。在无酚红 α -MEM 培养基的浸润下将组织块切割成约 1.0 mm \times 1.0 mm \times 1.0 mm 的小块,将牙周膜组织碎块均匀放置在 6 孔板中,加入 10% 的 FBS、100 U/mL 的青霉素和 100 U/mL 链霉素的 α -MEM 培养液 2 mL,置于细胞培养箱,在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下培养,每 3 d 更换 1 次培养液。当细胞铺满瓶底 80%~90% 时,用 0.25% 的胰酶消化,按 1:2 或 1:3 的比例传代。实验选用 4~6 代的细胞。

1.3 人牙周膜成纤维细胞的鉴定 培养后的细胞用 western-blot 方法检测细胞波形丝蛋白和角蛋白的表达,结合细胞的取材部位,证实细胞来源。使用细胞刮刀刮离贴壁细胞,离心收集细胞。冰上加入裂解液裂解细胞(含蛋白酶抑制剂),10,000 r/min 离心 10 min 后收集上清即裂解液。采用考马斯亮蓝法以 BSA 作为标准品进行蛋白定量。采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品。待蛋白分离完毕后以恒压 20 V 转硝酸纤维素膜 90 min。以封闭液室温封闭 1 h。加入波形丝蛋白或角蛋白的一抗稀释液室温 1 h。以相应的 HRP 标记的二抗稀

释液室温孵育 1 h。采用化学发光显色收集蛋白信号。

1.4 hPDLCS 增殖 实验分为空白对照组(普通培养液)、孕酮组(普通培养液,50 nmol/L 孕酮)、雌二醇组(普通培养液,50 nmol/L 雌二醇)、雌孕激素联合组(普通培养液,50 nmol/L 孕酮,50 nmol/L 雌二醇)。培养 24 或 48 h 后,吸弃液体,加入 0.5 g/L 溶解于培养基的 MTT 培养基 100 μ L/孔。4~6 h 后,弃上清,加 DMSO 100 μ L/孔过夜。采用酶标仪检测其在 570 nm 处 A 值。

1.5 Real-time PCR 检测检测 hPDLCS 分化相关基因的表达 实验分为空白对照组(普通培养液)、孕酮组(普通培养液,50 nmol/L 孕酮)、雌二醇组(普通培养液,50 nmol/L 雌二醇)、雌孕激素联合组(普通培养液,50 nmol/L 孕酮,50 nmol/L 雌二醇)。培养 24 或 48 h 后,收集细胞。采用 TRNzol 进行样本 RNA 提取,使用 NanoDrop[®] ND-2000 测定 RNA 浓度和纯度,采用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行 cDNA 反转录,最后采用 Real-time PCR 检测相关基因的表达。Real-time PCR 按以下程序进行:95 $^{\circ}$ C, 30 s; 40 个 PCR 循环(95 $^{\circ}$ C, 10 s; 60 $^{\circ}$ C, 60 s; 95 $^{\circ}$ C, 15 s)。各样品的目的基因和内参分别进行 Real-time PCR 反应,每个样本检测 3 个复孔。数据采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法进行分析,引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequence

基因名称	引物序列(5'→3')
PLAP-1	F: 5'-CCTCAGTCCCAACCAACATT-3' R: 5'-GACAGATACAGCCTTCGCAAC-3'
OPG	F: 5'-GGCGCTACCTTGAGATAGAGTTC-3' R: 5'-TTGTGTGTTTTCTACAGGGTGCT-3'
MGP	F: 5'-GCCTTAGCGGTAGTAACTTTGTG-3' R: 5'-GGCTTAGAGCGTTCTCGGAT-3'
ODF	F: 5'-CCCTGATGAAAAGGAGGAAGC-3' R: 5'-GTTGGAGACCTCGATGCTGA-3'
Col-1	F: 5'-TGATGCCAATGTGGTTTCGTG-3' R: 5'-TTGGTTGGGGTCAATCCAGTA-3'
MMP-9	F: 5'-ATTGAGGGAGACGCCATTT-3' R: 5'-GGCAGGGTTTCCCATCAG-3'
18srRNA	F: 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' R: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'

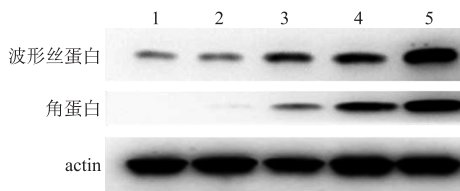
1.6 茜素红染色定量分析雌孕激素对矿化 hPDLCS 细胞成骨分化的影响。为进一步研究雌孕激素对 hPDLCS 细胞成骨分化的影响,采用成骨诱导液(10 mmol/L β -甘油磷酸钠,50 mg/L 维生

素 C, 10 nmol/L 地塞米松, 10% FBS, α -MEM 培养液) 对 hPDLCs 细胞进行诱导。设置为诱导对照组 (成骨诱导液), 诱导孕酮组 (成骨诱导液, 100 nmol/L 孕酮), 诱导雌二醇组 (成骨诱导液, 50 nmol/L 雌二醇)、诱导雌孕激素联合组 (成骨诱导液, 50 nmol/L 孕酮, 50 nmol/L 雌二醇)。连续培养 21 d。各组培养至 21 d, 弃培养液用 PBS 缓冲液反复漂洗 3 遍, 经 4% 多聚甲醛固定 15~20 min, PBS 缓冲液洗 3 遍, 加入茜素红染液, 37 °C 孵育 15 min, 弃茜素红染液, PBS 漂洗。加入 200 μ L 10% 氯化十六烷基吡啶 (Sigma) 溶解 1 h, 收集染料, 分光光度计 590 nm 处 A 值。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 12.0 统计软件包, 测量结果进行单因素方差分析, 并对数据进行统计处理。实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 人牙周膜成纤维细胞的鉴定 波形丝蛋白和角蛋白是牙周成纤维细胞的标志蛋白, 本实验采用 Western blot 检测培养后的 hPDLCs 细胞, 发现两种蛋白的表达随细胞数目的增加而增多。结合细胞



1: 1×10^3 ; 2: 2×10^3 ; 3: 1×10^4 ; 4: 2×10^4 ; 5: 5×10^4

图 1 分离得到的人牙周膜成纤维细胞中特征蛋白的表达情况

Fig. 1 The expression of characteristic proteins in isolated hPDLCs.

表 2 雌孕激素处理 24 h 对 hPDLCs 成骨分化相关基因表达的影响

Tab. 2 mRNA expression of osteogenic genes induced by estrogen and/or progesterone for 24h

组别	PLAP-1 mRNA	OPG mRNA	ODF mRNA	Col-1 mRNA	MMP-9 mRNA
空白组	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.08
雌激素组	0.45 ± 0.20*	3.12 ± 0.10*	0.77 ± 0.05	13.88 ± 0.80**	0.31 ± 0.03*
孕激素组	0.78 ± 0.70*	4.31 ± 0.90*	0.09 ± 0.00*	105.02 ± 7.00**	0.07 ± 0.00*
孕激素和雌激素组	0.03 ± 0.04*	51.57 ± 0.13*	0.02 ± 0.00*	1545.10 ± 8.12**	0.03 ± 0.00*

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$

表 3 雌孕激素处理 48 h 对 hPDLCs 成骨分化相关基因表达的影响

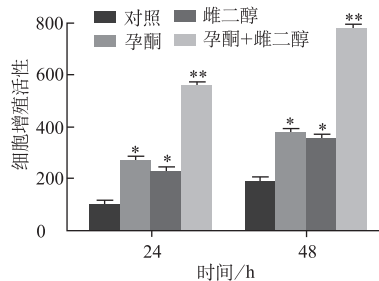
Tab. 3 mRNA expression of osteogenic genes induced by estrogen and/or progesterone for 48h

组别	PLAP-1 mRNA	OPG mRNA	ODF mRNA	Col-1 mRNA	MMP-9 mRNA
空白组	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.09
雌激素组	0.47 ± 0.07*	12.93 ± 0.20*	0.09 ± 0.07*	18.58 ± 0.90*	0.01 ± 0.00*
孕激素组	0.37 ± 0.03*	8.94 ± 0.70*	0.08 ± 0.00*	117.02 ± 6.00*	0.01 ± 0.00*
雌激素和孕激素组	0.06 ± 0.00*	70.00 ± 3.00*	0.02 ± 0.00*	5096.30 ± 10.00*	0.00 ± 0.00*

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$

的取材部位, 证实细胞为人牙周膜成纤维细胞 (图 1)。

2.2 雌孕激素对 hPDLCs 细胞增殖的影响 在细胞培养 24 h 或 48 h 后, 孕酮组、雌二醇组和雌孕激素联合组 hPDLCs 的增殖活性明显升高, 显著高于空白对照组 hPDLCs 的增殖 ($P < 0.05$)。其中雌孕激素联合组显著高于孕酮组或雌二醇组单独处理组 ($P < 0.05$, 图 2)。



* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

图 2 雌孕激素对 hPDLCs 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of estrogen and/or progesterone on proliferation of hPDLCs.

2.3 Real-timePCR 检测雌孕激素对成骨分化相关基因 mRNA 表达的影响 在细胞培养 24 h 或 48 h 后, 孕酮组、雌二醇组和雌孕激素联合组 hPDLCs 中与成骨细胞分化相关的 Col-1 和 OPG 的表达明显高于空白对照组 ($P < 0.05$)。孕酮组、雌二醇组和雌孕激素联合组 hPDLCs 中与骨细胞分化相关的 PLAP-1、破骨细胞分化相关的 ODF、MMP-9 基因表达显著下降, 低于空白对照组 ($P < 0.05$)。其中雌孕激素联合组显著高于孕酮组或雌二醇组单独处理组的叠加, 说明两者存在协同作用 (表 2、表 3)。

2.4 茜素红染色定量分析雌孕激素对矿化 hPDLCs 细胞成骨分化的影响 在空白对照组茜素红 A 值为 (0.22 ± 0.10) , 孕酮组为 (1.05 ± 0.11) , 雌二醇组为 (1.58 ± 0.02) 和雌孕激素联合组为 (2.70 ± 0.06) 。由结果可知:孕酮组、雌二醇组和雌孕激素联合组 hPDLCs 中的钙化明显高于空白对照组。其中雌孕激素联合组显著高于孕酮组或雌二醇组单独处理组的叠加,说明两者在矿化诱导的 hPDLCs 细胞成骨分化中也存在协同作用。

3 讨论

最近的研究发现,孕激素与雌激素具有协同治疗骨质疏松症的作用。Schmidt 等^[8]发现雌激素和孕激素都能有效的抑制骨小梁数目的减少。Yamamoto 等^[9]对联合应用雌孕激素组可促进卵巢切除大鼠的骨体积和骨形成。将 36 名绝经后的妇女分成 3 组,雌激素治疗组、雌孕激素联合治疗组和对照组,发现在联合治疗组的骨量丢失显著低于单独给药组^[10]。此外,孕酮与雌二醇联合应用能显著促进人类成骨肉瘤细胞细胞的增殖^[11]。

本研究发现,在孕激素、雌激素和雌孕激素联合作用下, h PDLCs 的增殖和成骨分化都发生了变化。本研究结果表明,与空白对照组相比,孕酮、雌二醇和雌孕激素联合应用都能促进 hPDLCs 的增殖,其中雌孕激素共同处理组显著高于孕酮和雌二醇单独处理组。说明雌孕激素对 h PDLCs 的增殖起到协同的作用。

破骨细胞抑制因子(OPG),又叫骨保护素,是一种生长因子受体,OPG 是 RANKL(破骨细胞分化因子)的诱导受体,通过与 RANKL 的结合减少破骨细胞的产生。1 型胶原(Col-1)促进成骨细胞分化。雌孕激素联合应用与单独应用相比,对 hPDLCs 中 Col-1 和 OPG 的表达有显著的促进作用。牙周膜相关蛋白 1(PLAP-1)可负性调节牙周组织的分化和矿化过程。破骨细胞分化因子(ODF)诱导骨髓细胞向破骨细胞分化。基质金属蛋白酶-9(MMP-9)破骨细胞标志基因。雌孕激素联合应用与单独应用相比,对 hPDLCs 中 PLAP-1、

ODF 和 MMP-9 的表达有显著的抑制作用。综上,雌孕联合应用与单独应用相比能够促进成骨细胞分化相关因子的表达,抑制破骨分化因子的表达。本研究为研究绝经妇女牙槽骨吸收的激素替代治疗提供一定的参考。

参考文献

- [1] 王爽,丰培勋,陈悦,等. 釉基质蛋白衍生物对人牙周膜干细胞分化、增殖的影响[J]. 中国组织工程研究, 2015, 18(23): 3716-3722.
- [2] Shum I, Leung PC, Kwok A, et al. Periodontal conditions in elderly men with and without osteoporosis or osteopenia [J]. J Periodontol, 2010, 81(10):1396-1402.
- [3] Crofton PM, Evans N, Bath LE, et al. Physiological versus standard sex steroid replacement in young women with premature ovarian failure: effects on bone mass acquisition and turnover [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2010, 73(6):707-714.
- [4] Lerner UH. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis [J]. J Dent Res, 2006, 85(7):584-595.
- [5] Lekic P, Rojas J, Birek C, et al. Phenotypic comparison of periodontal ligament cells *in vivo* and *in vitro* [J]. J Periodontal Res, 2001, 36(2):71-79.
- [6] Vansant L, Cadenas De Llano-Pérula M, Verdonck A, et al. Expression of biological mediators during orthodontic tooth movement: A systematic review [J]. Arch Oral Biol, 2018, 95:170-186.
- [7] 沈兰花,张瑞,孟玲娜. 雌激素受体对去势大鼠牙周膜干细胞成骨分化能力的影响[J]. 口腔医学研究, 2018, 34(4):448-451.
- [8] Schmidt IU, Wakley GK, Turner RT. Effects of estrogen and progesterone on tibial histomorphometry in growing rats [J]. Calcif Tissue Int, 2000, 67(1):47-52.
- [9] Yamamoto Y, Kurabayashi T, Tojo Y, et al. Effects of progestins on the metabolism of cancellous bone in aged oophorectomized rats [J]. Bone, 1998, 22(5):533-537.
- [10] Mizunuma H, Okano H, Soda M, et al. Prevention of post-menopausal bone loss with minimal uterine bleeding using low dose continuous estrogen/progestin therapy: a 2-year prospective study [J]. Maturitas, 1997, 27(1): 69-76.
- [11] Sloomweg MC, Ederveen AG, Schot LP, et al. Oestrogen and progesterone synergistically stimulate human and rat osteoblast proliferation [J]. J Endocrinol, 1992, 133(2): R5-R8.

[收稿日期:2018-11-15]

(本文编辑 李四群)