

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.09.0954

· 论 著 ·

## 降钙素促进人牙周膜干细胞的胶原合成和成骨作用

黄美能<sup>1△</sup>, 李 博<sup>2△</sup>, 蔚一博<sup>1\*</sup>, 韩 煦<sup>1</sup>, 杨欣谕<sup>1</sup>, 全知恂<sup>1</sup>, 方 奥<sup>1</sup>, 蓝雨吟<sup>1</sup>

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院口腔科, 上海 200433

2. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院骨科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 考察降钙素(CT)促进人牙周膜干细胞(hPDLSC)的胶原合成和成骨作用。**方法** 将50名成人受试者分为慢性牙周炎(CP)组( $n=25$ )和对照组( $n=25$ )。CP组中,选择探诊深度 $\geq 5$  mm的上颌前部和有骨丢失影像学证据的部位,从每例患者的6个上颌位点收集龈沟液(GCF)样本。对照组中,对没有炎症的多个部位(每名受试者10~12个)进行取样以确保收集足够量的GCF。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测GCF中CT、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ )和骨形态发生蛋白(BMP)2/4/7的表达,通过Spearman相关分析考察CT表达与临床参数牙周袋探诊深度(PD)、临床附着丧失(CAL)和牙龈指数(GI)及上述指标的相关性。用携带CT基因的重组腺病毒(Ad.CT)感染hPDLSC,并通过实时定量PCR和蛋白质印迹法分别检测TGF- $\beta 1$ 、BMP2/4/7、碱性磷酸酶(ALP)、骨钙蛋白(OCN)和I/III型胶原蛋白(Col I/III)的mRNA和蛋白质表达。**结果** CP组患者GCF中CT表达水平高于对照组[( $32.62 \pm 1.46$ ) ng/mL vs ( $17.70 \pm 0.76$ ) ng/mL,  $P < 0.01$ ]。CP组患者CT表达与临床参数PD、CAL、GI呈负相关( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ )。CP组患者GCF中BMP2/4/7和TGF- $\beta 1$ 的表达水平均高于对照组[BMP2: ( $138.67 \pm 4.04$ ) ng/mL vs ( $103.96 \pm 2.78$ ) ng/mL; BMP4: ( $155.53 \pm 3.55$ ) ng/mL vs ( $133.15 \pm 2.92$ ) ng/mL; BMP7: ( $106.59 \pm 2.85$ ) ng/mL vs ( $90.22 \pm 1.56$ ) ng/mL; TGF- $\beta 1$ : ( $105.92 \pm 3.40$ ) ng/mL vs ( $89.85 \pm 2.42$ ) ng/mL;  $P$ 均 $< 0.01$ ]。且CP患者上述指标均与CT表达呈正相关( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ )。腺病毒感染的CT过表达使hPDLSC中TGF- $\beta 1$ 、Col I/III及成骨细胞标志物BMP2/4、ALP和OCN表达增加( $P$ 均 $< 0.01$ )。与Ad.CT和空载腺病毒共同感染的细胞相比,用Ad.CT和特异性阻断TGF- $\beta 1$ 小干扰RNA(siRNA)的重组腺病毒(Ad.TGF- $\beta 1$  siRNA)共同感染的细胞胶原蛋白表达水平更低(Col I:  $0.16 \pm 0.02$  vs  $0.22 \pm 0.03$ ; Col III:  $0.11 \pm 0.01$  vs  $0.15 \pm 0.02$ ;  $P$ 均 $< 0.01$ )。与Ad.CT感染的细胞相比,Ad.CT和头蛋白共处理细胞中ALP和OCN的蛋白质表达水平更低(ALP:  $0.19 \pm 0.02$  vs  $0.25 \pm 0.03$ ; OCN:  $0.13 \pm 0.01$  vs  $0.19 \pm 0.02$ ;  $P$ 均 $< 0.01$ )。**结论** CT通过TGF- $\beta 1$ 和BMP信号转导途径促进hPDLSC的胶原合成和成骨作用。

**[关键词]** 降钙素; 人牙周膜干细胞; 胶原; 骨生成**[中图分类号]** R 781.42 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)09-0954-09

### Calcitonin promotes collagen synthesis and osteogenesis in human periodontal ligament stem cells

HUANG Mei-neng<sup>1△</sup>, LI Bo<sup>2△</sup>, WEI Yi-bo<sup>1\*</sup>, HAN Xu<sup>1</sup>, YANG Xin-yu<sup>1</sup>, QUAN Zhi-zen<sup>1</sup>, FANG Ao<sup>1</sup>, LAN Yu-yin<sup>1</sup>

1. Department of Stomatology, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Orthopaedics, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of calcitonin (CT) on promoting collagen synthesis and osteogenesis of human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs). **Methods** Fifty adult participants were divided into chronic periodontitis (CP) group ( $n=25$ ) and control group ( $n=25$ ). In the CP group, the anterior maxilla with probing depth  $\geq 5$  mm and the sites with imaging evidence of bone loss were selected. The gingival crevicular fluid (GCF) samples were collected from 6 maxillary sites in each patient. In the control group, multiple sites without inflammation (10 to 12 per subject)

**[收稿日期]** 2019-05-18 **[接受日期]** 2019-06-24**[基金项目]** 国家自然科学基金青年科学基金(8180041799),上海市科研项目(18ZR1438300). Supported by Youth Project of National Natural Science Foundation of China (8180041799) and Scientific Research Project of Shanghai (18ZR1438300).**[作者简介]** 黄美能, 硕士生. E-mail: 289549835@qq.com; 李 博, 硕士生, 主治医师. E-mail: smmulibo@163.com<sup>△</sup>共同第一作者(Co-first authors).<sup>\*</sup>通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31162488, E-mail: weiyibo1982@126.com

were sampled to ensure that a sufficient amount of GCF was collected. The expression of CT, transforming growth factor  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) and bone morphogenetic protein (BMP) 2/4/7 in GCF was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and the correlation between CT expression and clinical parameters such as periodontal pocket probing depth (PD), clinical attachment loss (CAL) and gingival index (GI), and the above-mentioned indicators was investigated with Spearman correlation analysis. hPDLSCs were infected with the adenoviruses carrying CT gene (Ad.CT) and the expression of mRNA and protein of TGF- $\beta 1$ , BMP2/4/7, alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN) and collagen type I/III (Col I/III) were detected by quantitative real-time PCR and Western blotting. **Results** The expression level of CT in GCF of the CP group was significantly higher than that of the control group ( $[32.62 \pm 1.46]$  ng/mL vs  $[17.70 \pm 0.76]$  ng/mL,  $P < 0.01$ ). The expression of CT was positively correlated with clinical parameters such as PD, CAL and GI ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). The expression levels of BMP2/4/7 and TGF- $\beta 1$  in GCF of the CP group were significantly higher than those of the control group (BMP2:  $[138.67 \pm 4.04]$  ng/mL vs  $[103.96 \pm 2.78]$  ng/mL, BMP4:  $[155.53 \pm 3.55]$  ng/mL vs  $[133.15 \pm 2.92]$  ng/mL; BMP7:  $[106.59 \pm 2.85]$  ng/mL vs  $[90.22 \pm 1.56]$  ng/mL; TGF- $\beta 1$ :  $[105.92 \pm 3.40]$  ng/mL vs  $[89.85 \pm 2.42]$  ng/mL; all  $P < 0.01$ ). The expression of BMP2/4/7 and TGF- $\beta 1$  was negatively correlated with CT expression ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). The overexpression of CT significantly increased the expression of TGF- $\beta 1$ , Col I/III and osteoblast markers BMP2/4, ALP and OCN in GCF (all  $P < 0.01$ ). Compared with the cells co-infected with Ad.CT and Ad.Null, the cells co-infected with Ad.CT and small interfering RNA specifically blocking TGF- $\beta 1$  (Ad.TGF- $\beta 1$  siRNA) had significantly lower collagen expression (Col I:  $0.16 \pm 0.02$  vs  $0.22 \pm 0.03$ ; Col III:  $0.11 \pm 0.01$  vs  $0.15 \pm 0.02$ ; both  $P < 0.01$ ). Compared with Ad.CT infected cells, the protein expression levels of ALP and OCN were significantly decreased in Ad.CT and noggin co-treated cells (ALP:  $0.19 \pm 0.02$  vs  $0.25 \pm 0.03$ ; OCN:  $0.13 \pm 0.01$  vs  $0.19 \pm 0.02$ ; both  $P < 0.01$ ). **Conclusion** CT can promote collagen synthesis and osteogenesis in hPDLSCs through TGF- $\beta 1$  and BMP signaling transduction pathways.

**[Key words]** calcitonin; human periodontal ligament stem cells; collagen; osteogenesis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(9): 954-962]

牙周炎是由微生物引起、发病后会影响到牙槽骨吸收和修复之间动态平衡的一种牙周支持组织的慢性炎症<sup>[1-2]</sup>。牙周炎发病后牙槽骨的修复弱于吸收,导致牙槽骨的高度降低<sup>[3-5]</sup>。牙周炎治疗的目不仅要控制炎症、阻止病变进展,还要促进牙周组织的修复再生并形成新的组织<sup>[6-8]</sup>。因此,明确牙槽骨形成相关的基础细胞学和分子机制对于确定牙槽骨高度修复和促进牙周组织再生的特定靶标至关重要。

牙周韧带 (periodontal ligament, PDL) 是位于牙槽骨和牙骨质之间的纤维结缔组织带,可防止咀嚼时牙齿和牙槽骨受损<sup>[9]</sup>,在牙周组织生理性形态与功能维持、病理性损坏和再生修复中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。此外, PDL 使牙齿能够在正畸治疗时通过牙周再生移动<sup>[11]</sup>。PDL 由异质细胞群组成,包括成骨细胞、破骨细胞、成纤维细胞、成牙骨质细胞、间充质细胞、肥大细胞和吞噬细胞。人牙周膜干细胞 (human periodontal ligament stem cell, hPDLSC) 是存在于人牙周膜内间质来源的未分化细胞。Wang 等<sup>[12]</sup>报道,无论是牙根还是牙槽骨表面的牙周膜干细胞 (periodontal ligament stem cell, PDLSC) 均具有形成牙骨质/牙周膜样结构的

功能。牙周韧带成纤维细胞 (periodontal ligament fibroblast, PDLF) 具有产生富含胶原纤维的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)<sup>[13]</sup>的能力, PDLSC 与 PDLF 为相同来源的间质细胞,具有很高的相似性,可生成 I 型胶原蛋白 (collagen type I, Col I)、III 型胶原蛋白 (collagen type III, Col III)<sup>[14]</sup>并调节牙周组织中成骨细胞和破骨细胞的分化<sup>[15-16]</sup>,推测 PDLSC 在牙周组织的完整性和修复性<sup>[17]</sup>及牙周疾病的预防<sup>[18]</sup>方面有一定作用。

降钙素 (calcitonin, CT) 由 32 个氨基酸构成,在 1 位和 7 位具有二硫键,并且末端羧基酰胺化,其生理功能多种多样,应用范围也越来越广。CT 具有调节钙稳态的生理作用<sup>[19]</sup>,还是骨代谢的重要调节剂<sup>[20]</sup>,能有效地防止骨质流失,临床上用于治疗绝经后骨质疏松症<sup>[21-22]</sup>。Cheng 等<sup>[23]</sup>报道 CT 不仅调节骨代谢,也通过上调胶原蛋白表达和抑制基质金属蛋白酶影响 ECM 的合成。然而,目前尚不清楚 CT 是否在牙周炎的 PDLSC 中参与调节 ECM 合成和成骨细胞分化。

本实验检测了慢性牙周炎 (chronic periodontitis, CP) 患者和健康受试者龈沟液 (gingival crevicular

fluid, GCF) 中 CT 的表达水平, 并分析了 CT 表达与患者临床参数之间的关系, 还在体外用携带 CT 基因的重组腺病毒 (Ad.CT) 感染原代培养的 hPDLSC, 考察了 CT 对 hPDLSC 胶原合成和成骨作用的影响及潜在机制。

## 1 材料和方法

**1.1 研究对象** 本研究方案经海军军医大学 (第二军医大学) 长海医院医学伦理委员会审批, 患者均签署了知情同意书。50 名成人受试者来自海军军医大学 (第二军医大学) 长海医院口腔科。CP 根据美国牙周病学会的牙周病分类标准 (1999 年)<sup>[24]</sup> 诊断。牙周临床参数包括牙周袋探诊深度 (probing pocket depth, PD)、临床附着丧失 (clinical attachment loss, CAL) 和牙龈指数 (gingival index, GI)。每个牙齿需检查 6 个部位: 近颊、颊、离颊、近舌、舌和离舌。所有检测均由同一名检验员完成。通过 GI、PD、CAL 和骨丢失的影像学证据将所有受试者分为 2 组, 每组 25 例。对照组受试者具有健康的牙周组织,  $GI < 1$ 、 $PD < 3$  mm、 $CAL = 0$  mm, 未显示骨丢失的迹象; CP 组患者有临床炎症迹象,  $GI > 1$ 、 $PD \geq 4$  mm、 $CAL \geq 2$  mm, 有骨丢失的影像学证据。所有受试者均未患任何急性或慢性全身性疾病, 且过去 6 个月未接受任何手术或非手术牙周治疗。排除在过去 6 个月内有吸烟、使用抗生素或免疫抑制药物史、怀孕或正在口服避孕药的患者。

**1.2 位点选择与 GCF 样本采集** CP 组中选择探诊深度  $\geq 5$  mm 的上颌前部和有骨丢失影像学证据的部位, 从每例患者的 6 个上颌位点收集 GCF 样本。对照组中, 对没有炎症的多个部位 (每名受试者 10~12 个) 进行取样以确保收集足够量的 GCF。将纸条轻轻地放置在龈沟的入口处以获得 GCF 样本, 该区域使用棉卷隔离以避免唾液污染。小心地取出龈上菌斑并轻轻风干该部位。将条带以 1~2 mm 深度插入缝隙中 30 s。使用 Periotron 8000 龈沟液测量仪 (美国 Oraflow 公司) 测定 GCF 体积。将来自每名受试者的条带置于含有 300  $\mu$ L pH 为 7.2 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 和蛋白酶抑制剂的标记管中。摇动 20 min 后除去条带, 将洗脱液以 5 800 $\times$ g 离心 5 min 除去菌斑和细胞成分。将收集的 GCF 立即转移并在 -70  $^{\circ}$ C 储存直至测定时

间。根据 Tymkiw 等<sup>[25]</sup> 的研究, 用酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 测定 GCF 中 CT 的表达水平。

**1.3 细胞培养与免疫化学测定** hPDLSC 细胞系来自 ScienCell 的健康捐献者并培养至第 10 代。将 hPDLSC 置于含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 培养液中, 于 37  $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$  的加湿室中培养。每 2 d 更换培养液 1 次, 在 80% 细胞融合度时传代。

用流式细胞仪分析鉴定 hPDLSC。牙周膜细胞 (periodontal ligament cell, PDLC) 表面抗原基质细胞抗原 1 (stromal cell antigen 1, STRO-1) 和 CD146 检测阳性率较低, 而在 hPDLSC 中阳性率较高, 因此 STRO-1 和 CD146 高表达的细胞鉴定为 hPDLSC。将 hPDLSC 继续传代培养至第 5 代进行细胞感染。

**1.4 细胞感染** 使用 AdEasy 系统分别构建过表达人 CT 的重组腺病毒 (Ad.CT)、过表达人头蛋白 (noggin) 的重组腺病毒 (Ad.noggin) 和特异性阻断转化生长因子  $\beta 1$  (transforming growth factor  $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ ) 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 的重组腺病毒 (Ad.TGF- $\beta 1$  siRNA)。扩增人 CT、头蛋白基因, 合成 TGF- $\beta 1$  siRNA 序列 (5'-GGT GGA AAC CCA CAA CGA ATT-3'), 分别克隆到 pShuttleCMV 质粒中。Ad.CT、Ad.noggin、Ad.TGF- $\beta 1$  siRNA 和空载腺病毒 (Ad.Null) 在人胚胎肾细胞中增殖, 并使用美国 BD 公司 Adeno-XTM 病毒纯化试剂盒将其纯化。使用美国 BD 公司 Adeno-XTM 快速滴定试剂盒通过噬斑检测法测定腺病毒的分子活性。用 Ad.CT 或 Ad.Null 感染 hPDLSC (感染复数为 100), 37  $^{\circ}$ C 下保持 12 h。经绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 检测, 感染细胞百分比为 87.3%。

**1.5 实时定量 PCR 检测** 在重组腺病毒感染后 72 h 用 TRIzol 试剂提取 hPDLSC 总 RNA 并用 POWERSCRIPT 反转录试剂盒 (美国 BD 公司) 合成第一链 cDNA。基因特异性引物如下: 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 正义引物 5'-ACT GGT ACT CAG ACA ACG AGA T-3', 反义引物 5'-ACG TCA ATG TCC CTG ATG TTA TG-3'; 骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 2 正义引物 5'-GTA TCG CAG GCA CTC AGG TC-3', 反义引物 5'-CCT GAA GCT CTG CTG



AGG TG-3'; *BMP4* 正义引物 5'-AAA GTC GCC GAG ATT CAG GG-3', 反义引物 5'-GAC GGC ACT CTT GCT AGG C-3'; *BMP7* 正义引物 5'-TCG GCA CCC ATG TTC ATG C-3', 反义引物 5'-GAG GAA ATG GCT ATC TTG CAG G-3'; *Col I* 正义引物 5'-CTC CAA CGA GAT CGA GAT CC-3', 反义引物 5'-GAA GCC GAA TTC CTG GTC TG-3'; *Col III* 正义引物 5'-CAG TTC TGG AGG ATG GTT GC-3', 反义引物 5'-TCT CAC AGC CTT GCG TGT TC-3'; 骨钙蛋白 (osteocalcin, *OCN*) 正义引物 5'-GAA GTT TCG CAG ACC TGA CAT-3', 反义引物 5'-GTA TGC ACC ATT CAA CTC CTC G-3'; *TGF-β1* 正义引物 5'-GGC CAG ATC CTG TCC AAG C-3', 反义引物 5'-GTG GGT TTC CAC CAT TAG CAC-3'; 18S rRNA 正义引物 5'-CGG ACA CGG ACA GGA TTG AC-3', 反义引物 5'-GCA TGC CAG AGT CTC GTT CG-3'。在 LightCycler 480 实时 PCR 系统 (德国 Roche 公司) 上使用即用型 2×反应混合液 (Fast Start Master SYBR Green Kit, 德国 Roche 公司) 进行实时定量 PCR。用 RealQuant 软件 (德国 Roche 公司) 分析靶基因的 mRNA 表达, 并将其标准化为 18S rRNA 的水平。

1.6 蛋白质印迹法检测 在重组腺病毒感染后 72 h 用细胞裂解缓冲液提取 hPDLSC 总蛋白质, 并通过 BCA 法测定总蛋白质浓度。取 20 mg 蛋白质进行 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并通过半干法将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上。将膜用 5% 脱脂乳在室温下封闭 2 h, 然后在 4 °C 下用 Tris 盐酸盐缓冲液+Tween (TBST) 稀释的小鼠抗人单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司) 孵育过夜。次晨用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 并在室温下用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗孵育 2 h, 用 TBST 洗涤 3 次后进行增强化学发光成像。使用 LabWork 4.0 程序分析蛋白质表达, 并将其标准化为 β-肌动蛋白 (β-actin) 的表达水平。

1.7 统计学处理 用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。用 Spearman 相关分析评估 CT 表达水平与 PD、CAL、GI、TGF-β1 和 BMP2/4/7 的相关性。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验。计数资料以例数和百分数表示, 两组间比较采用  $\chi^2$  检验。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 两组患者基线资料比较 见表 1, CP 组患者 GI、PD 和 CAL 水平均高于对照组受试者 ( $P$  均  $< 0.01$ )。两组受试者年龄、性别差异均无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ ), 具有可比性。

表 1 两组患者基线资料比较

Tab 1 Comparison of general characteristics between two groups

Index	N=25	
	Control group	CP group
Age (year), $\bar{x} \pm s$	50.00 ± 0.52	49.52 ± 0.36
Female/male <i>n</i>	9/16	14/11
GI $\bar{x} \pm s$	0.72 ± 0.09	3.84 ± 0.07**
PD <i>d</i> /mm, $\bar{x} \pm s$	2.54 ± 0.07	5.45 ± 0.06**
CAL <i>d</i> /mm, $\bar{x} \pm s$	0.79 ± 0.07	6.26 ± 0.07**

CP: Chronic periodontitis; GI: Gingival index; PD: Probing pocket depth; CAL: Clinical attachment loss. \*\* $P < 0.01$  vs control group

2.2 两组患者 CT 的表达水平比较及其与 CP 患者临床参数的关系 ELISA 检测结果显示, CP 组患者 GCF 中 CT 表达水平高于对照组 [(32.62 ± 1.46) ng/mL vs (17.70 ± 0.76) ng/mL,  $P < 0.01$ ]; CP 组患者 CT 的表达水平与 GI、PD、CAL 均呈负相关 ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ , 表 2), 而 CT 表达与年龄、性别等因素之间没有明显相关性 ( $P$  均  $> 0.05$ )。

表 2 CP 患者的 CT 表达水平与临床参数的 Spearman 相关分析结果

Tab 2 Spearman correlation between CT expression and clinical parameters in CP patients

Index	<i>r</i>			
	CT	GI	PD	CAL
CT	1			
GI	-0.545**	1		
PD	-0.627**	0.493*	1	
CAL	-0.486*	0.320	0.419*	1

CP: Chronic periodontitis; CT: Calcitonin; GI: Gingival index; PD: Probing pocket depth; CAL: Clinical attachment loss. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

2.3 CP 患者 BMP 2/4/7 和 TGF-β1 的表达及其与 CT 表达的相关性 ELISA 检测结果显示, CP 组患者 GCF 中 BMP2/4/7 和 TGF-β1 的表达水平均高于对照组 [BMP2: (138.67 ± 4.04)

ng/mL vs (103.96 ± 2.78) ng/mL; BMP4: (155.53 ± 3.55) ng/mL vs (133.15 ± 2.92) ng/mL; BMP7: (106.59 ± 2.85) ng/mL vs (90.22 ± 1.56) ng/mL; TGF-β1: (105.92 ± 3.40) ng/mL vs (89.85 ± 2.42) ng/mL, *P* 均 < 0.01], 且 CP 患者上述指标的表达水平均与 CT 表达呈正相关 (*P* < 0.01、*P* < 0.05, 表 3)。

2.4 过表达 CT 增加 Col I/III 表达并诱导 hPDLSC 成骨细胞分化 经流式细胞仪分析鉴定, PDLC 表面抗原 STRO-1 和 CD146 检测阳性率分别为 12.7% 及 13.3% (图 1A、1B), 而在 hPDLSC 中阳性率分别为 98.9% 及 98.6% (图 1C、1D), 表明在 PDLC 中成功分离出了纯度较高的 hPDLSC。

实时定量 PCR 和蛋白质印迹法分析结果 (图 2) 显示, 与 Ad.Null 感染的 hPDLSC 相比,

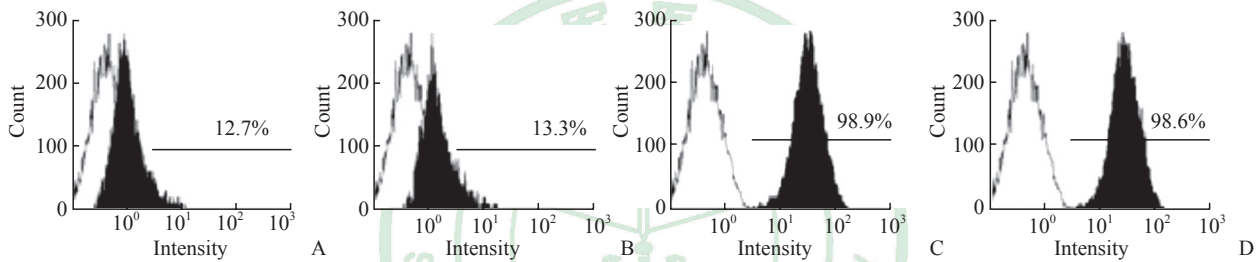


图 1 流式细胞术检测 PDLC 和 hPDLSC 中 STRO-1 与 CD146 阳性细胞

Fig 1 STRO-1 and CD146 positive cells in PDLC and hPDLSC detected by flow cytometry

A, B: PDLC; C, D: hPDLSC. A, C: STRO-1; B, D: CD146. PDLC: Periodontal ligament cell; hPDLSC: Human periodontal ligament stem cell; STRO-1: Stromal cell antigen 1

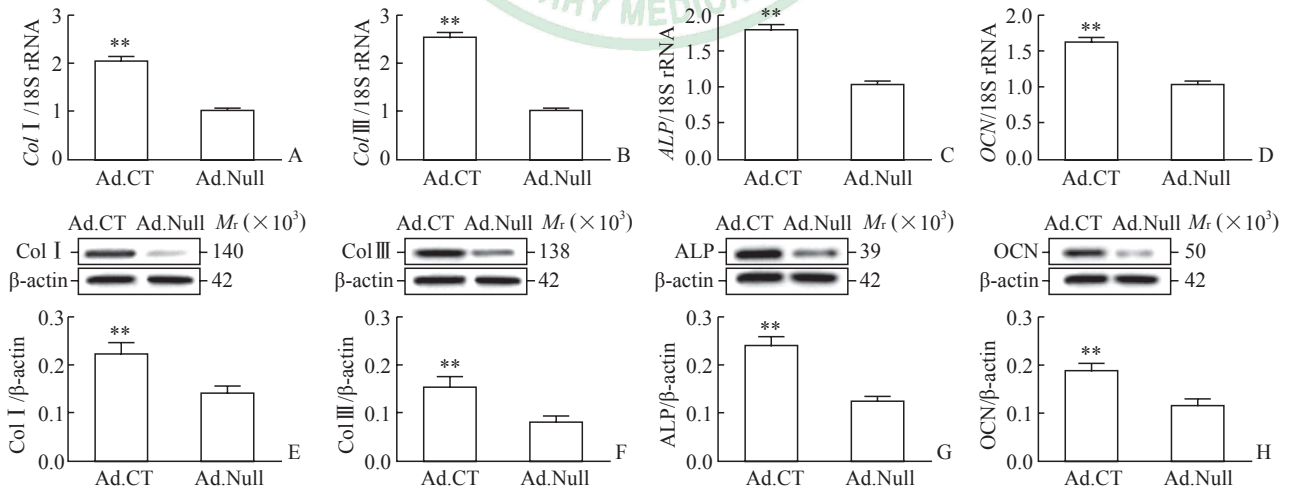


图 2 过表达 CT 上调 hPDLSC 中 Col I/III、ALP、OCN 的表达

Fig 2 CT overexpression upregulating Col I/III, ALP and OCN expression in hPDLSC

Relative mRNA expression of Col I (A), Col III (B), ALP (C) and OCN (D) and relative protein expression of Col I (E), Col III (F), ALP (G) and OCN (H) in hPDLSC infected with Ad.CT or Ad.Null were detected by quantitative real-time PCR and Western blotting, respectively. CT: Calcitonin; hPDLSC: Human periodontal ligament stem cell; Col: Collagen; ALP: Alkaline phosphatase; OCN: Osteocalcin; Ad.CT: Recombinant adenovirus carrying CT gene; Ad.Null: Empty vector adenovirus. \*\**P* < 0.01 vs Ad.Null group. *n* = 4,  $\bar{x} \pm s$

Ad.CT 感染的 hPDLSC 中 Col I/III、ALP、OCN 的 mRNA 和蛋白质表达水平均上调, 差异均有统计学意义 (*P* 均 < 0.01)。

表 3 CP 患者 CT 表达与 TGF-β1 和 BMP2/4/7 表达的 Spearman 相关分析结果

Tab 3 Spearman correlation of CT expression with TGF-β1 and BMP2/4/7 expression in CP patients

Index	<i>r</i>				
	CT	TGF-β1	BMP2	BMP4	BMP7
CT	1				
TGF-β1	0.765**	1			
BMP2	0.513**	0.197	1		
BMP4	0.615**	0.511*	0.112	1	
BMP7	0.428*	0.483**	0.626**	0.330	1

CP: Chronic periodontitis; CT: Calcitonin; TGF-β1: Transforming growth factor β1; BMP: Bone morphogenetic protein. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01

2.5 CT 通过 TGF- $\beta$ 1 介导的通路上调 hPDLSC 中 Col I/III 的表达 与 Ad.Null 感染的 hPDLSC 相比, Ad.CT 感染的 hPDLSC 中 TGF- $\beta$ 1 的 mRNA 和蛋白质表达均上调 ( $P$  均 $<0.01$ , 图 3A、3B); 与 Ad.CT 和 Ad.Null 共同感染的 hPDLSC

相比, 用 Ad.CT 和 Ad.TGF- $\beta$ 1 siRNA 共感染的细胞中 Col I/III 表达水平更低 (Col I:  $0.16 \pm 0.02$  vs  $0.22 \pm 0.03$ ; Col III:  $0.11 \pm 0.01$  vs  $0.15 \pm 0.02$ ;  $P$  均 $<0.01$ ; 图 3C、3D)。

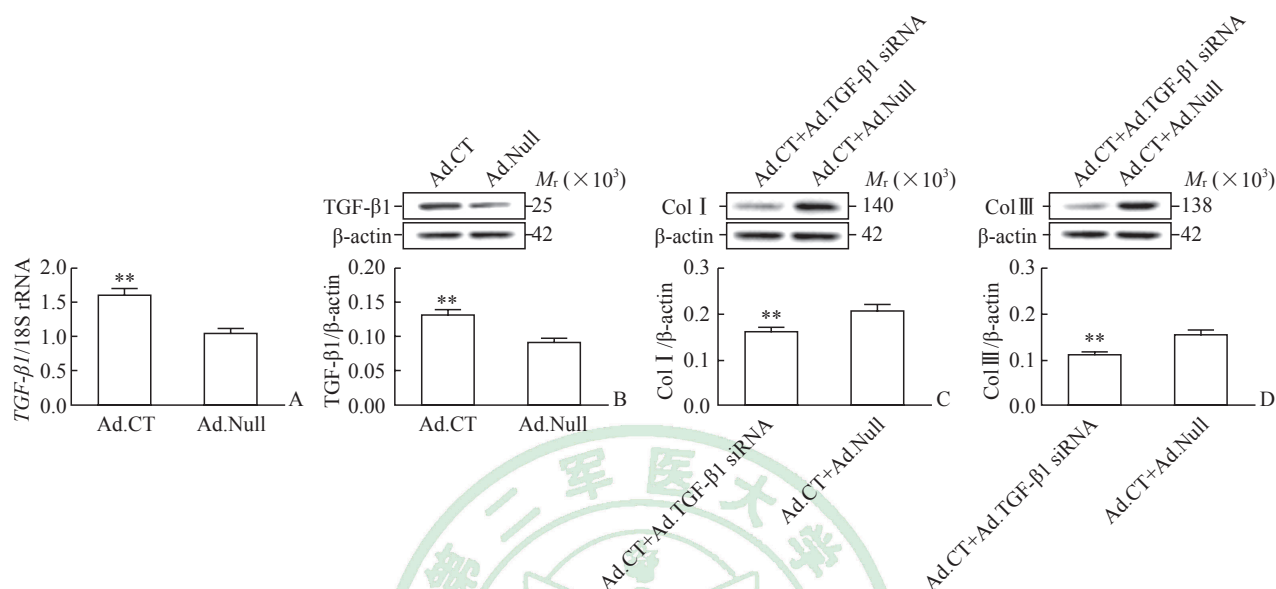


图3 CT 通过促进 TGF- $\beta$ 1 表达上调 hPDLSC 中 Col I/III 的表达

Fig 3 CT elevating Col I/III expression by increasing TGF- $\beta$ 1 expression in hPDLSC

Relative mRNA (A) and protein (B) expression of TGF- $\beta$ 1 in hPDLSC infected with Ad.CT or Ad.Null, and relative protein expression of Col I (C) and Col III (D) in hPDLSC co-infected with Ad.CT+Ad.TGF- $\beta$ 1 siRNA or Ad.CT+Ad.Null were detected by quantitative real-time PCR and Western blotting, respectively. CT: Calcitonin; TGF- $\beta$ 1: Transforming growth factor  $\beta$ 1; hPDLSC: Human periodontal ligament stem cell; Col: Collagen; Ad.CT: Recombinant adenovirus carrying CT gene; Ad.Null: Empty vector adenovirus; Ad.TGF- $\beta$ 1 siRNA: Recombinant adenovirus specifically blocking small interfering RNA of TGF- $\beta$ 1. \*\* $P<0.01$  vs Ad.Null group (A, B) or Ad.CT+Ad.Null group (C, D).  $n=4$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.6 CT 通过 BMP2/4 介导的通路诱导 hPDLSC 成骨细胞分化 与 Ad.Null 感染的 hPDLSC 相比, Ad.CT 感染的 hPDLSC 中 BMP2/4 的 mRNA 和蛋白质表达水平均升高 ( $P$  均 $<0.01$ , 图 4A、4B、4D、4E), 然而 BMP7 的 mRNA 和蛋白质表达在两组间差异均无统计学意义(图 4C、4F)。另外, 与 Ad.CT 感染的 hPDLSC 相比, Ad.CT 和 Ad.noggin 共处理的 hPDLSC 中 ALP 和 OCN 的蛋白质表达均降低 (ALP:  $0.19 \pm 0.02$  vs  $0.25 \pm 0.03$ ; OCN:  $0.13 \pm 0.01$  vs  $0.19 \pm 0.02$ ;  $P$  均 $<0.01$ ; 图 4G、4H)。

### 3 讨论

hPDLSC 具有向牙周膜、牙骨质等多种牙周组织细胞分化的潜能, 在牙周组织再生过程中发挥重要作用。研究显示, hPDLSC 成骨分化受到牙

周组织局部微环境中多种细胞因子的调控<sup>[26]</sup>。而 hPDLSC 与 PDLF 为相同来源的间质细胞, 具有很大相似性。有研究报道, CT 家族成员通过增强 PDLF 中胶原合成和成骨细胞分化, 促进牙周炎发病后的损伤修复<sup>[27-28]</sup>。我们推测, CT 也同样能增强 hPDLSC 中胶原合成和成骨分化。

本实验表明, CP 患者组 GCF 中 CT 的表达高于对照组, 同时 CT 的表达与 CP 的临床指标 GI、PD、CAL 均呈负相关, 提示 CT 与 CP 发病有关并能促进其损伤修复。其中, hPDLSC 分化是修复的一个关键过程<sup>[16]</sup>。牙周炎动物模型研究显示, 牙槽骨修复时 hPDLSC 的增殖和基质蛋白的表达均增加(如 ALP 和 OCN)<sup>[29]</sup>, 提示牙槽骨的修复可能是通过 hPDLSC 中的 ECM 合成和成骨细胞分化完成的<sup>[29-30]</sup>。本实验中, CT 上调了成骨细胞标志物

(BMP2/4、ALP、OCN) 和 Col I/Ⅲ的表达, 增强了胶原合成并促进了成骨细胞分化。我们认为 CT 可

能通过增强 hPDLSC 中的 ECM 合成和成骨细胞分化来促进牙周炎发病后牙槽骨的损伤修复。

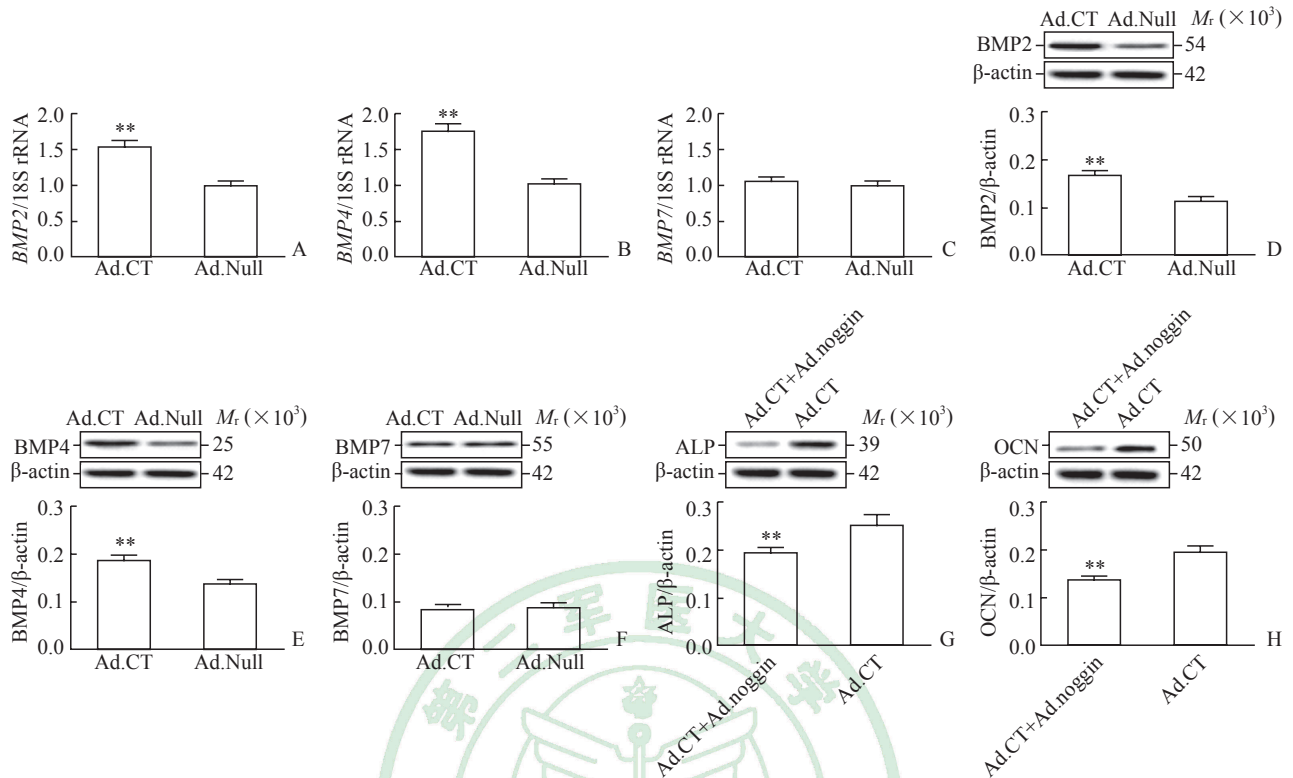


图 4 CT 通过 BMP2/4 介导的途径诱导 hPDLSC 成骨细胞分化

Fig 4 CT inducing hPDLSC osteoblastic differentiation through BMP2/4-mediated pathway

Relative mRNA and protein expression of BMP-2 (A, D), BMP4 (B, E) and BMP7 (C, F) in hPDLSC infected with Ad.CT or Ad.Null, and relative protein expression of ALP (G) and OCN (H) in hPDLSC co-treated with Ad.CT+Ad.noggin or treated with Ad.CT alone were detected by quantitative real-time PCR and Western blotting, respectively. CT: Calcitonin; BMP: Bone morphogenetic protein; hPDLSC: Human periodontal ligament stem cell; Col: Collagen; ALP: Alkaline phosphatase; OCN: Osteocalcin; Ad.CT: Recombinant adenovirus carrying CT gene; Ad.Null: Empty vector adenovirus. \*\* $P < 0.01$  vs Ad.Null group (A-F) or Ad.CT group (G, H).  $n = 4, \bar{x} \pm s$

TGF-β1 家族的成员如 TGF-β1 和 BMP 等都有调节 hPDLSC 中 ECM 合成和成骨细胞分化的功能<sup>[31]</sup>。Tian 等<sup>[32]</sup>报道 CT 家族成员降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 可以调节人骨肉瘤细胞系 MG-63 中 BMP2 的表达和诱导成骨分化。同时, CT 和 CGRP 识别相同的细胞受体<sup>[33]</sup>, 并通过与 CGRP 相同的途径调节 hPDLSC 中胶原合成和成骨细胞分化。故我们推测 TGF-β1 家族某些成员与 CT 调节 ECM 合成和成骨作用有关。

有学者发现用 TGF-β1 处理后人 PDLF 中基质蛋白如胶原蛋白表达增加<sup>[34]</sup>, 提示 TGF-β1 能增强 PDLF 的 ECM 合成。我们推测, 与人 PDLF 来源相同的 hPDLSC 中的胶原蛋白经 TGF-β1 处理后表达也增加。本实验结果表明 CT 和 TGF-β1 在 CP

患者的 GCF 中表达均较高, 且 CT 可促进 TGF-β1 表达, 抑制 TGF-β1 可逆转 CT 对 hPDLSC 胶原合成的促进作用。因此, 我们认为 CT/TGF-β1 通路可能参与了 CP 的发生、发展, CT 通过自身分泌或旁分泌作用上调内源性 TGF-β1 表达, 促进 hPDLSC 的胶原合成。

目前已知多种 BMP 如 BMP2、4、7 与细胞成骨分化密切相关<sup>[35]</sup>。Hashimi<sup>[36]</sup>和 Mi 等<sup>[37]</sup>研究表明, 上调 BMP2/4 可诱导人 PDLF 的钙化和成骨; 还有研究报道 BMP7 的局部释放可以修复大鼠损伤修复模型中丢失的牙周支持结构<sup>[38]</sup>。我们推测, hPDLSC 中 BMP2/4 通路也可调节成骨分化。本实验结果表明 BMP2/4 的表达与 CP 患者的 CT 表达有关, CT 提高了 BMP2/4 的表达并诱导 hPDLSC 成骨分化, 同时通过阻断 BMP 通路抑制 CT 诱



导的 hPDLSC 成骨分化。另一方面, 本实验中虽然 BMP7 表达在 CP 患者中升高, 且与 CT 表达有关, 但 CT 过表达并未明显增强 hPDLSC 中 BMP7 的表达, 表明 CT 可能通过 hPDLSC 中的 BMP2/4 通路调节成骨分化, 但没有激活 BMP7 通路。

临床研究结果显示, CT 与牙周炎之间存在相关性而非因果关系<sup>[39]</sup>。结合本实验中 CT 可诱导 hPDLSC 中胶原蛋白合成和成骨分化的结果, 我们认为 CT 可以促进 CP 发病后的组织修复, CT 水平较高的 CP 患者表现出相对轻微的症状。虽然动物实验<sup>[40]</sup>和我们的体外细胞实验都表明 CT 过表达在牙周损伤修复过程中发挥作用, 但仍需大量临床样本和动物模型进一步研究。

### 参考文献

- [1] CHENG R, LIU W, ZHANG R, FENG Y, BHOWMICK N A, HU T. *Porphyromonas gingivalis*-derived lipopolysaccharide combines hypoxia to induce caspase-1 activation in periodontitis[J/OL]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 474. doi: 10.3389/fcimb.2017.00474.
- [2] KETHARANATHAN V, TORGERSEN G R, PETROVSKI B É, PREUS H R. Radiographic alveolar bone level and levels of serum 25-OH-vitamin D in ethnic Norwegian and Tamil periodontitis patients and their periodontally healthy controls[J/OL]. *BMC Oral Health*, 2019, 19: 83. doi: 10.1186/s12903-019-0769-6.
- [3] AVILA-ORTIZ G, NEIVA R, GALINDO-MORENO P, RUDEK I, BENAVIDES E, WANG H L. Analysis of the influence of residual alveolar bone height on sinus augmentation outcomes[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2012, 23: 1082-1088.
- [4] TRIPUWABHRUT P, MUSTAFA K, BRUDVIK P, MUSTAFA M. Initial responses of osteoblasts derived from human alveolar bone to various compressive forces[J]. *Eur J Oral Sci*, 2012, 120: 311-318.
- [5] YODTHONG N, CHAROEMRATROTE C, LEETHANAKUL C. Factors related to alveolar bone thickness during upper incisor retraction[J]. *Angle Orthod*, 2013, 83: 394-401.
- [6] CHEN F M, JIN Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010, 16: 219-255.
- [7] KAO D W, FIORELLINI J P. Regenerative periodontal therapy[J]. *Front Oral Biol*, 2012, 15: 149-159.
- [8] RAMSEIER C A, ASPERINI G, BATIA S, GIANNOBILE W V. Advanced reconstructive technologies for periodontal tissue repair[J]. *Periodontol*, 2000, 2012, 59: 185-202.
- [9] NAVEH G R, LEV-TOV CHATTAH N, ZASLANSKY P, SHAHAR R, WEINER S. Tooth-PDL-bone complex: response to compressive loads encountered during mastication—a review[J]. *Arch Oral Biol*, 2012, 57: 1575-1584.
- [10] WYGANOWSKA-SWIATKOWSKA M, NOHAWICA M M. Effect of tobacco smoking on human gingival and periodontal fibroblasts. A systematic review of literature[J]. *Przegl Lek*, 2015, 72: 158-160.
- [11] NODA K, NAKAMURA Y, KOGURE K, NOMURA Y. Morphological changes in the rat periodontal ligament and its vascularity after experimental tooth movement using superelastic forces[J]. *Eur J Orthod*, 2009, 31: 37-45.
- [12] WANG L, SHEN H, ZHENG W, TANG L, YANG Z, GAO Y, et al. Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament[J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(7/8): 1015-1026.
- [13] LALLIER T E, YUKNA R, MOSES R L. Extracellular matrix molecules improve periodontal ligament cell adhesion to anorganic bone matrix[J]. *J Dent Res*, 2001, 80: 1748-1752.
- [14] XU H, HAN X, MENG Y, GAO L, GUO Y, JING Y, et al. Favorable effect of myofibroblasts on collagen synthesis and osteocalcin production in the periodontal ligament[J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2014, 145: 469-479.
- [15] JACOBS C, GRIMM S, ZIEBART T, WALTER C, WEHRBEIN H. Osteogenic differentiation of periodontal fibroblasts is dependent on the strength of mechanical strain[J]. *Arch Oral Biol*, 2013, 58: 896-904.
- [16] KONSTANTONIS D, PAPADOPOULOU A, MAKOU M, ELIADES T, BASDRA E K, KLETAS D. Senescent human periodontal ligament fibroblasts after replicative exhaustion or ionizing radiation have a decreased capacity towards osteoblastic differentiation[J]. *Biogerontology*, 2013, 14: 741-751.
- [17] KONERMANN A, STABENOW D, KNOLLE P A, HELD S A, DESCHNER J, JÄGER A. Regulatory role of periodontal ligament fibroblasts for innate immune cell function and differentiation[J]. *Innate Immun*, 2012, 18: 745-752.
- [18] EL-AWADY A R, LAPP C A, GAMAL A Y, SHARAWY M M, WENGER K H, CUTLER C W, et al. Human periodontal ligament fibroblast responses to compression in chronic periodontitis[J]. *J Clin Periodontol*, 2013, 40: 661-671.
- [19] GRECO K V, NALESSO G, KANEVA M K, SHERWOOD J, IQBAL A J, MORADI-BIDHENDI N, et al. Analyses on the mechanisms that underlie the chondroprotective properties of calcitonin[J]. *Biochem*



- Pharmacol, 2014, 91: 348-358.
- [20] DAVEY R A, FINDLAY D M. Calcitonin: physiology or fantasy?[J]. *J Bone Miner Res*, 2013, 28: 973-979.
- [21] KARACHALIOS T, LYRITIS G P, KALOUDIS J, ROIDIS N, KATSIRI M. The effects of calcitonin on acute bone loss after petrochanteric fractures. A prospective, randomised trial[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2004, 86: 350-358.
- [22] MITCHNER N A, HARRIS S T. Current and emerging therapies for osteoporosis[J]. *J Fam Pract*, 2009, 58(7 Suppl Osteoporosis): S45-S49.
- [23] CHENG T, ZHANG L, FU X, WANG W, XU H, SONG H, et al. The potential protective effects of calcitonin involved in coordinating chondrocyte response, extracellular matrix, and subchondral trabecular bone in experimental osteoarthritis[J]. *Connect Tissue Res*, 2013, 54: 139-146.
- [24] 1999 International International Workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999[J]. *Ann Periodontol*, 1999, 4: i, 1-112.
- [25] TYMKIWI K D, THUNELL D H, JOHNSON G K, JOLY S, BURNELL K K, CAVANAUGH J E, et al. Influence of smoking on gingival crevicular fluid cytokines in severe chronic periodontitis[J]. *J Clin Periodontol*, 2011, 38: 219-228.
- [26] MAMALIS A, MARKOPOULOU C, LAGOU A, VROTSOS I. Oestrogen regulates proliferation, osteoblastic differentiation, collagen synthesis and periostin gene expression in human periodontal ligament cells through oestrogen receptor beta[J]. *Arch Oral Biol*, 2011, 56: 446-455.
- [27] SUCHÁNEK J, BROWNE K Z, KLEPLOVÁ T S, MAZUROVÁ Y. Protocols for dental-related stem cells isolation, amplification and differentiation[M]//ZAVAN B, BRESSAN E. *Dental stem cells: regenerative potential*. Cham: Humana Press, 2016: 27-56.
- [28] MA W, ZHANG X, SHI S, ZHANG Y. Neuropeptides stimulate human osteoblast activity and promote gap junctional intercellular communication[J]. *Neuropeptides*, 2013, 47: 179-186.
- [29] SAITO M, TSUJI T. Extracellular matrix administration as a potential therapeutic strategy for periodontal ligament regeneration[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12: 299-309.
- [30] DANGARIA S J, ITO Y, LUAN X, DIEKWISCH T G. Successful periodontal ligament regeneration by periodontal progenitor preseeded on natural tooth root surfaces[J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20: 1659-1668.
- [31] LI Y, TIAN A Y, OPHENE J, TIAN M Y, YAO Z, CHEN S, et al. TGF- $\beta$  stimulates endochondral differentiation after denervation[J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14: 382-389.
- [32] TIAN G, ZHANG G, TAN Y H. Calcitonin gene-related peptide stimulates BMP-2 expression and the differentiation of human osteoblast-like cells *in vitro*[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34: 1467-1474.
- [33] NAOT D, CORNISH J. The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism[J]. *Bone*, 2008, 43: 813-818.
- [34] LIU X, LONG X, LIU W, ZHAO Y, HAYASHI T, YAMATO M, et al. Type I collagen induces mesenchymal cell differentiation into myofibroblasts through YAP-induced TGF- $\beta$ 1 activation[J]. *Biochimie*, 2018, 150: 110-130.
- [35] CHEN G, DENG C, LI Y P. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8: 272-288.
- [36] HASHIMI S M. Exogenous noggin binds the BMP-2 receptor and induces alkaline phosphatase activity in osteoblasts[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120: 13237-13242.
- [37] MI H W, LEE M C, FU E, CHOW L P, LIN C P. Highly efficient multipotent differentiation of human periodontal ligament fibroblasts induced by combined BMP4 and hTERT gene transfer[J]. *Gene Ther*, 2011, 18: 452-461.
- [38] MOON J S, KIM M J, KO H M, KIM Y J, JUNG J Y, KIM J H, et al. The role of Hedgehog signaling in cementoblast differentiation[J]. *Arch Oral Biol*, 2018, 90: 100-107.
- [39] ANKAM A, KODUGANTI R R. Calcitonin receptor gene polymorphisms at codon 447 in patients with osteoporosis and chronic periodontitis in South Indian population—an observational study[J]. *J Indian Soc Periodontol*, 2017, 21: 107-111.
- [40] WADA-MIHARA C, SETO H, OHBA H, TOKUNAGA K, KIDO J I, NAGATA T, et al. Local administration of calcitonin inhibits alveolar bone loss in an experimental periodontitis in rats[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 765-770.