

程序性坏死特异性抑制剂-1对高糖环境下牙周膜干细胞增殖和成骨分化的影响

柳成林^{1,2} 荀文兴¹ 杨海珍¹ 范素萌¹ 刘宇博¹ 张红梅¹

¹空军军医大学第二附属医院口腔科,西安 710038; ²解放军964医院口腔科,长春 130000

通信作者:张红梅,Email:zhanghongmei0911@126.com

【摘要】目的 探讨程序性坏死特异性抑制剂-1(Nec-1)对高糖环境下牙周膜干细胞(PDLSC)的增殖和成骨分化的影响。**方法** 体外克隆培养的PDLSC,按照如下处理方法分为3组:对照组(5 mmol/L葡萄糖)、高糖组(25 mmol/L葡萄糖)和高糖+Nec-1组(25 mmol/L葡萄糖+30 μ mol/L Nec-1)。通过蛋白免疫印迹(Western blot)检测细胞坏死性凋亡相关分子RIP1、RIP3的表达,噻唑蓝(MTT)比色法检测各组细胞增殖活力,通过茜素红染色、碱性磷酸酶(ALP)定量检测和实时荧光定量PCR等方法分析PDLSC的成骨分化情况。使用SPSS 26.0软件进行统计分析,采用单因素方差分析比较各组间细胞增殖活力(MTT吸光度A值)、ALP表达含量及成骨相关基因(*COL1*、*RUNX2*、*OCN*)相对表达水平,并用LSD-*t*检验进行组间多重比较。**结果** Western blot结果显示,高糖组PDLSC的RIP1和RIP3的表达较对照组明显增加,而高糖+Nec-1组的RIP1和RIP3的表达明显弱于高糖组。PDLSC培养7 d后,高糖组增殖活力较对照组明显降低,其吸光度A值(0.67 ± 0.06)显著低于对照组(1.23 ± 0.12),差异有统计学意义($t=9.652, P<0.001$);而Nec-1抑制后,PDLSC的增殖活力明显增加,高糖+Nec-1组吸光度A值(1.12 ± 0.11)显著高于高糖组(0.67 ± 0.06),差异有统计学意义($t=8.185, P<0.001$)。经矿化诱导后,高糖组PDLSC 14 d时形成的矿化结节、7 d时ALP表达含量(3.42 ± 0.37)和成骨相关基因*COL1*(1.86 ± 0.16)、*RUNX2*(1.55 ± 0.23)、*OCN*(1.08 ± 0.20)的相对表达量均较对照组均显著减少,差异均有统计学意义($t_{ALP}=13.149, t_{COL1}=14.257, t_{RUNX2}=7.593, t_{OCN}=8.606, P$ 均 <0.001);而Nec-1抑制后,PDLSC的成骨分化增加,高糖+Nec-1组PDLSC 14 d时形成的矿化结节、7 d时ALP表达含量(6.06 ± 0.26)和成骨相关基因*COL1*(3.64 ± 0.30)、*RUNX2*(2.53 ± 0.26)、*OCN*(2.14 ± 0.30)的相对表达量较高糖组均显著升高,差异均有统计学意义($t_{ALP}=13.033, t_{COL1}=11.636, t_{RUNX2}=6.332, t_{OCN}=6.573, P$ 均 <0.001)。**结论** 体外培养条件下,高糖环境抑制了PDLSC的增殖和成骨分化,而Nec-1明显改善了高糖环境下PDLSC的增殖和成骨分化。

【关键词】 程序性坏死特异性抑制剂-1; 牙周韧带; 干细胞; 生物学特性; 成骨分化

引用著录格式:柳成林,荀文兴,杨海珍,等.程序性坏死特异性抑制剂-1对高糖环境下牙周膜干细胞增殖和成骨分化的影响[J].中华口腔医学研究杂志(电子版),2022,16(3):160-167.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2022.03.005

Necrostatin - 1 promotes the proliferation and osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells in high-glucose environment

Liu Chenglin^{1,2}, Xun Wenxing¹, Yang Haizhen¹, Fan Sumeng¹, Liu Yubo¹, Zhang Hongmei¹

¹Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710038, China; ²Department of Stomatology, 964th Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Changchun 130000, China

Corresponding author: Zhang Hongmei, Email: zhanghongmei0911@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of necrostatin - 1 (Nec - 1) on the biological characteristics of periodontal ligament stem cells (PDLSCs) in the high - glucose environments *in vitro*. **Methods** PDLSCs were successfully cultured by single colony and divided into three groups according to

the following treatments: control group (5 mmol/L glucose), high-glucose group (25 mmol/L glucose), high-glucose + Nec-1 group (25 mmol/L glucose + 30 μ mol/L Nec-1). Western blot was used to detect the expression of necroptosis related molecules (RIP1 and RIP3) and the cell proliferation of PDLSCs were evaluated by MTT assay in the above three groups. The osteogenic differentiation of PDLSCs were evaluated by alizarin red staining, the quantitative detection of alkaline phosphatase (ALP) and real-time quantitative PCR assay. All statistical analyses were used SPSS 26.0 software. One way ANOVA was used to compare the cell proliferation activity (A value of the MTT absorbance), the expression of ALP and the relative levels of osteogenesis related genes (*COL1*, *RUNX2*, *OCN*) among the groups, and the LSD-*t* test was used for multiple comparisons between the groups. **Results** Western blot showed that the expression levels of RIP1 and RIP3 in high-glucose group were significantly higher than those in control group, while significantly lower in high-glucose + Nec-1 group than in high-glucose group. The proliferation activity of PDLSCs at day 7 in high-glucose group was significantly lower than that in the control group, and its MTT absorbance (0.67 ± 0.06) was significantly lower than that of the control group (1.23 ± 0.12) ($t = 9.652$, $P < 0.001$). After the inhibition of Nec-1, the proliferation activity of PDLSCs increased significantly, and the MTT absorbance at day 7 of high-glucose + Nec-1 group (1.12 ± 0.11) was significantly higher than that of high-glucose group (0.67 ± 0.06) ($t = 8.185$, $P < 0.001$). Compared with the control group, the mineralized nodules formed by PDLSCs at day 14, the levels of ALP (3.42 ± 0.37) and the relative expression of osteogenesis related genes *COL1* (1.86 ± 0.16), *RUNX2* (1.55 ± 0.23), *OCN* (1.08 ± 0.20) at day 7 were significantly lower in high-glucose group ($t_{ALP} = 13.149$, $t_{COL1} = 14.257$, $t_{RUNX2} = 7.593$, $t_{OCN} = 8.606$, all $P < 0.001$). After the inhibition of Nec-1, the osteogenic differentiation of PDLSCs increased, and the mineralized nodules formed by PDLSCs at day 14, the levels of ALP (6.06 ± 0.26) and the relative expression of osteogenesis related genes *COL1* (3.64 ± 0.30), *RUNX2* (2.53 ± 0.26), *OCN* (2.14 ± 0.30) at day 7 of high-glucose + Nec-1 group were significantly higher than those of high-glucose group ($t_{ALP} = 13.033$, $t_{COL1} = 11.636$, $t_{RUNX2} = 6.332$, $t_{OCN} = 6.573$, all $P < 0.001$). **Conclusions** The proliferation and osteogenic differentiation of PDLSCs were inhibited in the high-glucose environments *in vitro*. Nec-1 significantly improved the proliferation and osteogenic differentiation of PDLSCs in the high-glucose environments.

【Key words】 Necrostatin - 1; Periodontal ligament; Stem cells; Biological characteristic; Osteogenic differentiation

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2022.03.005

糖尿病患者的牙周组织容易损伤,并且自我修复能力差。牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cell, PDLSC)具有自我更新和多向分化等特点,在特定环境下,可形成牙骨质/牙周膜组织结构,是牙周组织缺损修复和再生的关键细胞群^[1]。然而,糖尿病患者的高糖环境抑制了PDLSC的增殖与分化,降低了其牙周组织修复能力,具体机制尚不清楚^[2]。研究发现,糖尿病患者的牙周组织中存在大量肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)^[3], TNF- α 介导的程序性坏死(necroptosis)信号已证实在炎症疾病中发挥着重要的作用^[4]。本研究通过探讨高糖环境下程序性坏死特异性抑制剂-1(necrostatin-1, Nec-1)对PDLSC的生物学特性的影响,为糖尿病患者牙周组织再生与修复的机制研究提供一定的实验和理论依据。

材料与方法

一、主要试剂与仪器

I型胶原酶、基质细胞抗原1(STRO-1)单克隆抗体、Nec-1抑制剂(Abcam,美国);RIPA裂解液、茜素红染色剂、甲苯胺蓝染色剂、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒(Sigma,美国);实时荧光定量PCR试剂盒(TaKaRa,日本);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS;浙江天杭生物科技公司);细胞总RNA提取试剂盒、胰蛋白酶、 α -MEM培养基(GIBCOBRL,美国);照相系统(OLYMPUS,日本);实时荧光定量PCR仪器(Applied Biosystems,美国)。

二、细胞培养与鉴定

1. 原代细胞培养:取青少年因正畸治疗拔除的新鲜健康牙齿,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,用刀片轻刮根

中部位的牙周膜,手术剪剪碎、清洗,加入1:1的I型胶原酶(3 mg/mL)和Dispase(4 mg/mL),消化40 min,含 $\varphi=10\%$ FBS的 α -MEM中止消化,1000 r/min离心5 min(离心半径13.5 cm)后,接种于6孔板, α -MEM培养基中培养,每3 d换液1次。

2. 细胞克隆培养、鉴定:取培养的第1代(P1代)细胞, α -MEM(含 $\varphi=10\%$ FBS)培养液调整细胞密度为10个/mL,分别接种于10 cm培养皿和96孔板中克隆培养14 d,弃去培养液,PBS清洗2遍,培养皿加入 $w=0.5\%$ 甲苯胺蓝染色液10 mL染色,室温20 min,PBS清洗2遍,照相。镜下观察96孔板中的细胞长满至孔底80%时,胰酶消化,传代培养,取P3代PDLSC用于实验。

将培养的PDLSC调整细胞密度为 1×10^5 个/mL, $\varphi=75\%$ 乙醇溶液固定,PBS清洗,滴入 $0.5 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 的FITC标记鼠抗人STRO-1抗体,4 °C孵育30 min,流式细胞仪检测。

3. 实验分组方法:体外克隆培养的同批次PDLSC,按照如下处理方法分为3组。(1)对照组:PDLSC在 α -MEM(含葡萄糖5 mmol/L)培养液中培养;(2)高糖组:PDLSC在含有葡萄糖(25 mmol/L)培养液中培养;(3)高糖+Nec-1组:PDLSC在含有葡萄糖(25 mmol/L)+Nec-1(30 $\mu\text{mol}/\text{L}$)培养液中培养。

三、蛋白免疫印迹(Western blot)检测

将对数生长期的PDLSC以 2×10^4 个/孔细胞密度均匀接种于6孔板,培养7 d后,加50 μL RIPA裂解液,刮取细胞蛋白,12 000 r/min离心10 min(离心半径13.5 cm),取上清,置于-80 °C冰箱冻存。蛋白4 μL 上样,煮沸10 min,电泳分离待测蛋白、转膜, $w=5\%$ 脱脂奶粉封闭,加入抗体 β -actin、RIP1和RIP3,4 °C孵育10 h,TBST洗涤,二抗孵育1 h,进行化学发光、图像分析,结果以目的蛋白与 β -actin的灰度比值表示。

四、细胞的增殖检测

将P3代PDLSC以 1×10^3 个/孔细胞密度接种于

96孔板培养,每组设5个复孔,每2 d换液1次,于实验第1、3和7天时间点,按照噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)说明书方法进行检测,每孔滴入20 μL MTT,培养4 h,弃去孔内液体,加入二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)150 μL ,酶标仪于490 nm波长检测吸光度(A)值。

五、细胞的茜素红染色

将PDLSC以每孔 2×10^4 个/孔细胞密度均匀接种于12孔板培养24 h后,换成每组成骨诱导液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗坏血酸+10 mol/L地塞米松+10 mmol/L β -甘油磷酸钠)继续培养,每2 d换液1次,于实验第14天,弃去各孔原培养液,按照试剂说明进行茜素红染色。

六、细胞的碱性磷酸酶染色和检测

PDLSC以每孔 1×10^3 个细胞分别均匀接种于24孔板和96孔板中,培养24 h后,矿化诱导液培养7 d,弃去24孔板中各孔的培养液,PBS洗涤3次, $w=4\%$ 多聚甲醛溶液固定30 min,PBS再次清洗,ALP染色液5 min;分别在实验第1、3和7天时间点,弃去96孔板每孔培养液,PBS洗涤,按照ALP试剂盒操作进行活性检测,在酶联仪在波长520 nm处检测每个孔的A值,取均值。

七、细胞成骨的相关基因实时荧光定量PCR检测

PDLSC以每孔 2×10^4 个细胞密度均匀接种于6孔板中培养24 h后,矿化诱导培养7 d,每2 d换液1次,提取细胞RNA,按照反转录试剂盒说明书将mRNA反转录成cDNA,参照实时荧光定量PCR试剂盒说明书,检测细胞成骨相关基因(*COL1*、*RUNX2*、*OCN*)的表达。PCR引物序列见表1。

八、统计学处理方法

采用SPSS 26.0软件进行数据处理与统计分析,计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。在MTT检测细胞增殖及ALP定量检测实验中,A值采用重复测量资料的

表1 实时荧光定量PCR引物序列

目的基因	引物序列	产物长度(bp)	基因库登记号
<i>COL1</i>	F:5'-GGGCGAGTGTGCTTT-3'	180	NM_000089.4
	R:5'-GACCCATTGGACCTGAACC-3'		
<i>RUNX2</i>	F:5'-CACTGGCGCTGCAACAAGA-3'	176	NM_001015051.4
	R:5'-ACTTGGTTTTTCATAACAGCGGA-3'		
<i>OCN</i>	F:5'-ATGAGGACCCTCTCTGCTC-3'	155	NM_199173.6
	R:5'-CTAAACGGTGGTGCATAGAT-3'		
β -actin	F:5'-GAGACCTCAACACCCAGCC-3'	160	NM_001101.5
	R:5'-CATAGCACAGCTTCTTTAA-3'		

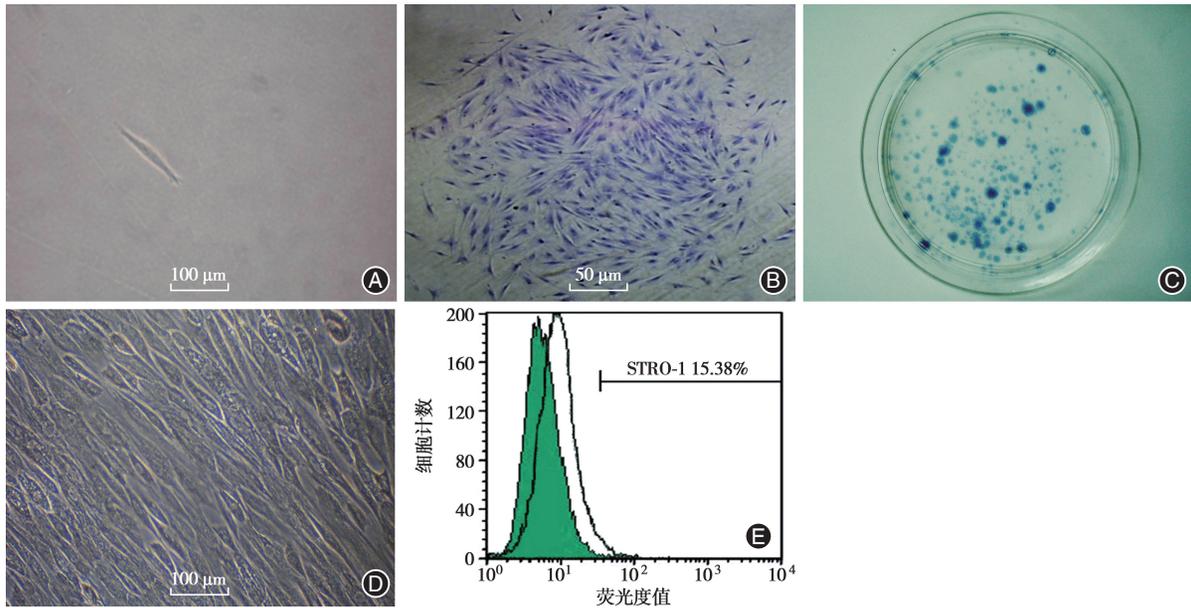


图1 牙周膜干细胞(PDLSC)的特性 A:单个PDLSC(低倍放大);B:PDLSC克隆($w=0.5\%$ 甲苯胺蓝染色 低倍放大);C:肉眼观PDLSC克隆($w=0.5\%$ 甲苯胺蓝染色);D:第3代PDLSC(低倍放大);E:流式细胞检测PDLSC中STRO-1的表达。

方差分析,细胞增殖及ALP表达量与时间存在交互作用,每个时间点进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),并采用LSD- t 检验进行高糖组与对照组、高糖组与高糖+Nec-1组之间的多重比较。成骨相关基因检测实时荧光定量PCR实验中,数据采用单因素方差分析和LSD- t 检验进行比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、体外培养的牙周膜干细胞

原代接种PDLSC,培养1 d后贴壁,2 d后在组织周围有细胞游离出来,14 d左右细胞汇合至80%,可传代。在96孔板中,有限稀释法克隆化培养的PDLSC,在接种后4 h细胞贴壁,8 h伸展(图1A),14 d左右形成细胞克隆(图1B~1C)。纯化培养的PDLSC,繁殖能力强,3 d左右可再次传代。倒置显微镜下观察,克隆培养的PDLSC胞体丰满,胞质均匀,胞核呈椭圆形或圆形,细胞形状多数呈现长梭形的纤维样细胞,少数有多角形或不规则形(图1D)。流式细胞检测PDLSC STRO-1表达15.38%(图1E)。

二、高糖环境下牙周膜干细胞中RIP1、RIP3的表达

高糖环境下培养PDLSC,Western blot检测结果显示:高糖组与对照组相比,RIP1、RIP3的表达明显增强,而Nec-1抑制后,RIP1、RIP3的表达明显减弱(图2)。

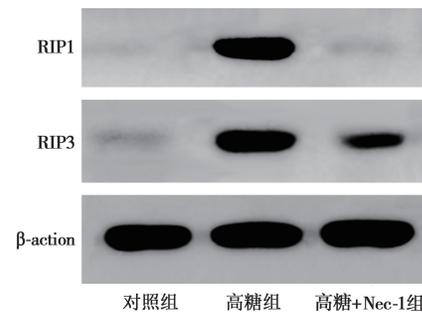


图2 高糖环境对牙周膜干细胞中RIP1和RIP3表达的影响

三、程序性坏死特异性抑制剂-1对高糖环境下牙周膜干细胞增殖的影响

细胞培养7 d,MTT检测细胞增殖情况,可见各组490 nm波长A值均逐渐升高,各组PDLSC的增殖活性随着培养时间的延长而持续增高(表2)。高糖组A值在实验第1、3和7天均显著低于对照组($t_{1d} = 3.980, P_{1d} = 0.004; t_{3d} = 7.046, P_{3d} < 0.001; t_{7d} = 9.652, P_{7d} < 0.001$),其PDLSC的增殖活力较对照组明显降低。高糖+Nec-1组与高糖组相比,其A值在培养第1、3和7天时均显著升高($t_{1d} = 2.866, P_{1d} = 0.021; t_{3d} = 5.298, P_{3d} = 0.001; t_{7d} = 8.185, P_{7d} < 0.001$),PDLSC的增殖活力明显增加。而高糖+Nec-1组与对照组之间各时间点A值差异均无统计学意义($t_{1d} = 1.551, P_{1d} = 0.159; t_{3d} = 1.637, P_{3d} = 0.140; t_{7d} = 1.547, P_{7d} = 0.161$),二者PDLSC的增殖活力无显著变化(图3)。

表2 各组牙周膜干细胞(PDLSC)的增殖活力比较(MTT法检测490 nm波长吸光度A值)

组别	样本量	第1天	第3天	第7天	F值	P值
对照组	5	0.28±0.04	0.56±0.05	1.23±0.12	192.229	<0.001
高糖组	5	0.17±0.05	0.32±0.05	0.67±0.06	116.245	<0.001
高糖+Nec-1组	5	0.25±0.03	0.51±0.06	1.12±0.11	184.496	<0.001
F值		9.585	26.425	45.902		
P值		0.003	<0.001	<0.001		

注:单因素方差分析比较实验第1、3和7天时,各组PDLSC增殖情况(490 nm波长吸光度A值),并用LSD-*t*检验进行组间多重比较。

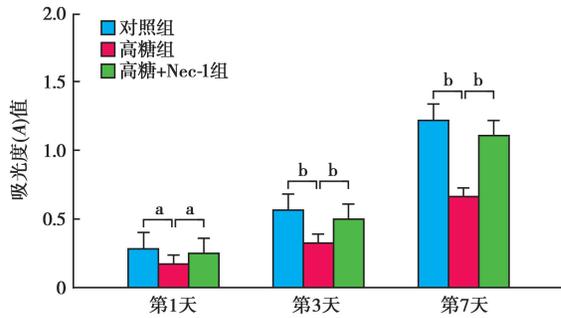


图3 高糖环境下程序性坏死特异性抑制剂-1(Nec-1)对牙周膜干细胞(PDLSC)增殖的影响 组间比较差异有统计学意义(* $P < 0.05$ 、[#] $P < 0.001$)。

四、程序性坏死特异性抑制剂-1对高糖环境下牙周膜干细胞成骨能力的影响

茜素红染色结果显示,3组PDLSC经矿化诱导

后均形成红染钙化结节,高糖组与对照组相比,PDLSC矿化形成的红染钙化结节量少;而高糖+Nec-1组与高糖组相比,PDLSC形成红染钙化结节量多(图4)。

五、程序性坏死特异性抑制剂-1对高糖环境下牙周膜干细胞碱性磷酸酶表达的影响

ALP染色结果显示,3组细胞矿化诱导7 d后均有不同程度的蓝色ALP染色,蓝染程度越深,ALP活性越大。高糖组的ALP蓝色染色较对照组浅,ALP活性弱(图5A~5B);而经Nec-1抑制后,高糖+Nec-1组的ALP蓝色染色较高糖组深,ALP活性强(图5C)。

ALP定量检测,细胞矿化诱导培养7 d,各组PDLSC的ALP表达水平随矿化诱导培养时间延长而逐渐升高,高糖组PDLSC的ALP表达含量在实验第

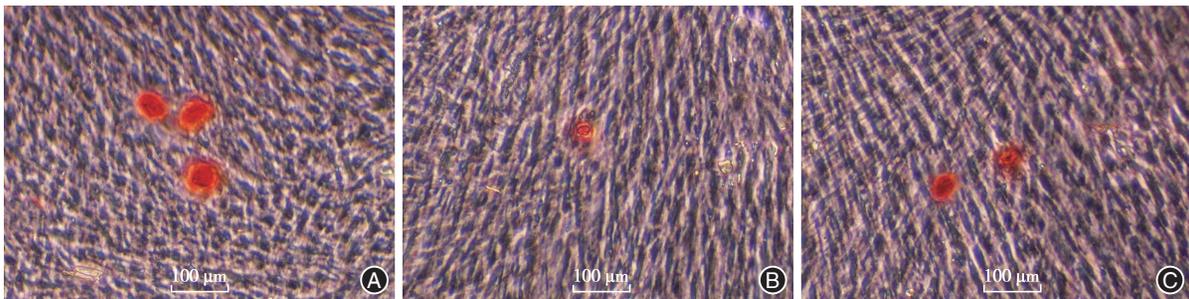


图4 程序性坏死特异性抑制剂-1(Nec-1)对高糖环境下牙周膜干细胞(PDLSC)矿化能力的影响 A:对照组;B:高糖组;C:高糖+Nec-1组。

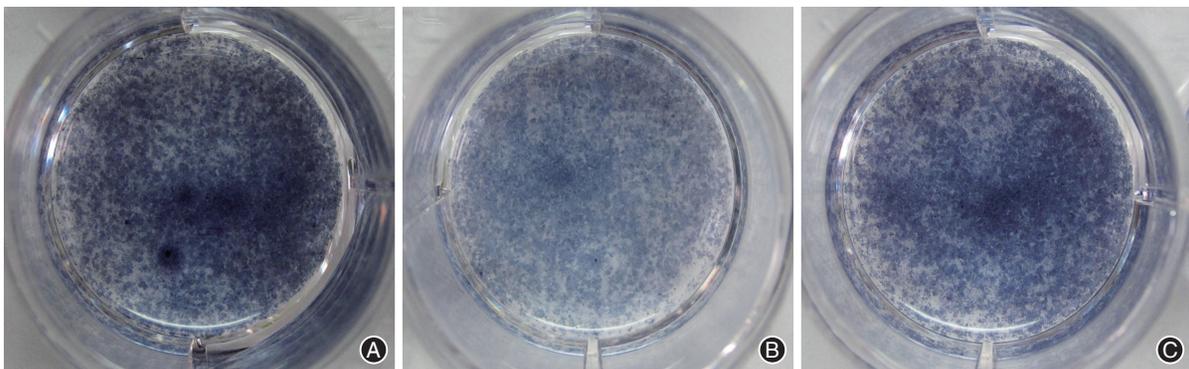


图5 程序性坏死特异性抑制剂-1(Nec-1)对高糖环境下牙周膜干细胞(PDLSC)碱性磷酸酶(ALP)表达的影响 A:对照组矿化诱导7 d;B:高糖组矿化诱导7 d;C:高糖+Nec-1组矿化诱导7 d。

表3 各组牙周膜干细胞(PDLSC)的碱性磷酸酶表达含量比较(520 nm 波长吸光度 A 值)

组别	样本量	第1天	第3天	第7天	F 值	P 值
对照组	5	1.71 ± 0.14	3.28 ± 0.33	6.25 ± 0.31	358.298	< 0.001
高糖组	5	0.87 ± 0.17	1.80 ± 0.24	3.42 ± 0.37	112.192	< 0.001
高糖+Nec-1组	5	1.31 ± 0.17	2.99 ± 0.39	6.06 ± 0.26	350.625	< 0.001
F 值		35.019	28.970	125.009		
P 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001		

注:单因素方差分析比较实验第1、3和7天时,各组PDLSC的ALP表达含量(吸光度A值),并用LSD-t检验进行组间多重比较。

1、3和7天均显著低于对照组($t_{1d}=8.646, P_{1d}<0.001$; $t_{3d}=8.086, P_{3d}<0.001$; $t_{7d}=13.149, P_{7d}<0.001$);经Nec-1抑制后,高糖+Nec-1组与高糖组相比,其ALP表达含量在培养第1、3和7天时均显著升高($t_{1d}=4.166, P_{1d}=0.003$; $t_{3d}=5.798, P_{3d}<0.001$; $t_{7d}=13.033, P_{7d}<0.001$);而高糖+Nec-1组与对照组之间在实验第3和7天时,ALP表达含量差异均无统计学意义($t_{3d}=1.274, P_{3d}=0.238$; $t_{7d}=1.050, P_{7d}=0.324$;表3、图6)。

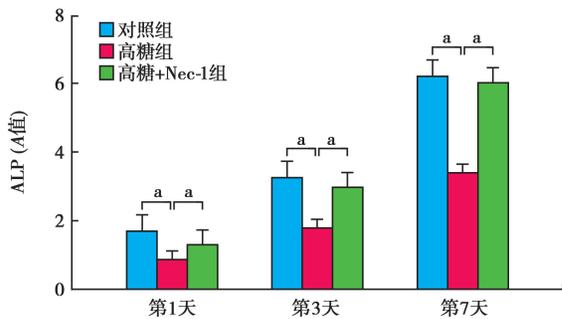


图6 程序性坏死特异性抑制剂-1(Nec-1)对高糖环境下牙周膜干细胞(PDLSC)碱性磷酸酶(ALP)表达的影响定量检测 组间比较差异有统计学意义(* $P < 0.01$)。

六、程序性坏死特异性抑制剂-1对高糖环境下牙周膜干细胞成骨基因表达的影响

实时荧光定量PCR检测细胞成骨培养7d后,每组PDLSC的成骨基因COL1、RUNX2、OCN均有表达,高糖组与对照组相比,PDLSC形成的COL1、RUNX2、OCN相对表达量均显著降低($t_{COL1}=14.257, P_{COL1}<0.001$; $t_{RUNX2}=7.593, P_{RUNX2}<0.001$; $t_{OCN}=8.606, P_{OCN}<0.001$);高糖+Nec-1组与高糖组相比,PDLSC形成的COL1、RUNX2、OCN相对表达量均显著增加($t_{COL1}=11.636, P_{COL1}<0.001$; $t_{RUNX2}=6.332, P_{RUNX2}<0.001$; $t_{OCN}=6.573, P_{OCN}<0.001$);而高糖+Nec-1组与对照组之间,成骨相关基因COL1、RUNX2、OCN的相对表达量,差异均无统计学意义($t_{COL1}=0.791, P_{COL1}=0.452$; $t_{RUNX2}=1.268, P_{RUNX2}=0.240$; $t_{OCN}=0.943, P_{OCN}=0.373$;表4、图7)。

表4 各组牙周膜干细胞(PDLSC)的成骨相关基因表达含量比较

组别	样本量	成骨相关基因		
		COL1	RUNX2	OCN
对照组	5	3.78 ± 0.26	2.74 ± 0.26	2.30 ± 0.24
高糖组	5	1.86 ± 0.16	1.55 ± 0.23	1.08 ± 0.20
高糖+Nec-1组	5	3.64 ± 0.30	2.53 ± 0.26	2.14 ± 0.30
F 值		93.976	31.962	34.932
P 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001

注:单因素方差分析比较各组PDLSC的成骨相关基因(COL1、RUNX2、OCN)相对表达量,并用LSD-t检验进行组间多重比较。

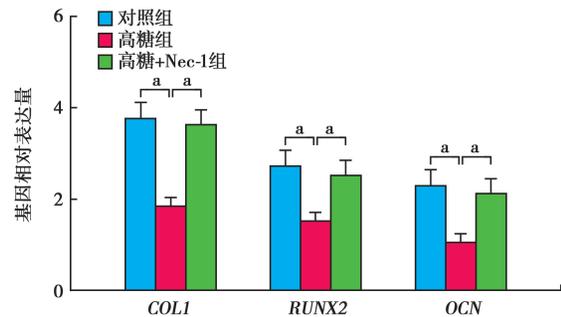


图7 实时荧光定量PCR检测牙周膜干细胞(PDLSC)成骨相关基因的表达 COL1为I型胶原;RUNX2为RUNX家族转录因子2;OCN为骨钙素;组间比较差异有统计学意义(* $P < 0.001$)。

讨论

牙周病的最终治疗目标是实现牙周组织的再生,恢复牙周组织的生理结构与功能^[5]。位于牙周组织中的PDLSC可分化为牙周膜细胞、成骨细胞和成牙骨质细胞,决定着牙周再生的成功与否^[6-8]。本实验通过单克隆方法培养的PDLSC表达了STRO-1 15.38%,文献已证明STRO-1为早期间充质干细胞的标记物^[9],提示培养的PDLSC为间充质干细胞,然而,PDLSC的增殖和分化等功能受到其所处微环境的影响^[10-11]。

糖尿病患者的高浓度血糖抑制了组织器官细胞的增殖与分化,包括PDLSC和成骨细胞。文献已

证实,高糖环境中PDLSC的增殖能力和成骨分化能力降低,形成牙骨质/牙周膜样复合体能力也降低,炎性因子增加^[12-13]。如何提高高糖环境中PDLSC的增殖与分化能力是糖尿病牙周组织再生中亟待解决的问题。

有研究发现,程序性坏死信号在糖尿病发展中也起着至关重要的作用^[14]。高糖环境下,T细胞、单核细胞、心脏心肌细胞等多种细胞均发生了程序性坏死,增加了组织炎症反应^[15-16]。本研究发现,高糖环境下培养的PDLSC,其RIP1、RIP3表达明显较对照组增强(程序性坏死的生物学标志物),抑制剂Nec-1抑制后,RIP1、RIP3表达明显减弱,表明了高糖环境下,PDLSC存在程序性坏死,Nec-1抑制了高糖环境下的程序性坏死。

Nec-1对脑外伤、脑缺血、视网膜脱落、心梗起着保护性作用,Nec-1通过抑制RIP-1激酶的活性阻断细胞发生程序性坏死。本研究发现高糖环境下,PDLSC的细胞增殖活力较对照组下降,而Nec-1抑制后PDLSC的细胞增殖活力增强,说明Nec-1在高糖环境下对PDLSC增殖有保护作用。由此推测,Nec-1可能通过抑制PDLSC的程序性坏死的发生,从而逆转高糖环境对PDLSC的细胞增殖的影响。

研究发现,Nec-1促进了糖皮质激素诱导的骨质疏松症大鼠的新骨形成,骨密度增加^[17]。本课题组前期的实验也得知在炎性状态下,Nec-1对PDLSC成骨的生物学特性具有一定的保护作用,并有效抑制了PDLSC的死亡促进了牙周组织再生^[18],说明Nec-1在某些特定环境下可以保护骨再生。本实验中,高糖环境下,PDLSC经成骨矿化诱导后形成的钙化结节减少,Nec-1抑制后形成的钙化结节增多;3组细胞矿化后,均有不同程度的ALP蓝色染色,高糖环境下,PDLSC成骨诱导后形成的ALP蓝色染色浅,Nec-1抑制后形成ALP蓝色染色较深,ALP蓝色染色程度,代表了不同程度的ALP活性,颜色越深ALP活性越大,说明Nec-1抑制后PDLSC成骨诱导后形成ALP多。此外,ALP和PCR的定量检测也发现高糖环境下,PDLSC经矿化7d后形成的ALP水平及成骨相关基因COL1、RUNX2、OCN的相对表达量明显比对照组减少,而高糖+Nec-1组ALP和COL1、RUNX2、OCN的表达量比高糖组明显增多。ALP、COL1、RUNX2、OCN等成骨矿化相关蛋白,在成骨、成牙的细胞基质中有广泛且明确的表达,在成骨和成牙的过程中起着重要作用^[19-20],进一

步证明了Nec-1保护了高糖环境PDLSC的成骨。

本研究证实了高糖环境下,程序性坏死信号参与了高糖微环境下的PDLSC的生物学特性,其抑制剂Nec-1保护了高糖环境下PDLSC的增殖活性和成骨分化,丰富了程序性坏死信号与糖尿病相关的研究内容,具有重要的理论与临床意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 柳成林、荀文兴:实验操作、论文撰写;杨海珍、范素萌:数据整理、统计分析;刘宇博:论文修改;张红梅:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] Tomokiyo A, Wada N, Maeda H. Periodontal ligament stem cells: Regenerative potency in periodontium [J]. *Stem Cells Dev*, 2019, 28(15):974-985. DOI:10.1089/scd.2019.0031.
- [2] Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, et al. High glucose concentrations suppress the proliferation of human periodontal ligament stem cells and their differentiation into osteoblasts [J]. *J Periodontol*, 2016, 87(4):44-51. DOI:10.1902/jop.2015.150474.
- [3] Liu Q, Hu CH, Zhou CH, et al. DKK1 rescues osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from periodontal ligaments of patients with diabetes mellitus induced periodontitis [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13142. DOI: 10.1038/srep13142.
- [4] Grootjans S, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: An overview [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(7): 1184-1195. DOI: 10.1038/cdd.2017.65.
- [5] 边东潇,包幸福,邹浩,等.利用细胞膜片技术进行牙周重建的研究进展[JOL].中华口腔医学研究杂志(电子版),2021,15(2):119-123. DOI:10.3877/ema.j.issn.1674-1366.2021.02.010.
- [6] Trubiani O, Pizzicannella J, Caputi S, et al. Periodontal ligament stem cells: Current knowledge and future perspectives [J]. *Stem Cells Dev*, 2019, 28(15): 995-1003. DOI: 10.1089/scd.2019.0025.
- [7] Zhang Z, Deng M, Hao M, et al. Periodontal ligament stem cells in the periodontitis niche: Inseparable interactions and mechanisms [J]. *J Leukoc Biol*, 2021, 110(3): 565-576. DOI: 10.1002/JLB.4MR0421-750R.
- [8] Nagata M, Iwasaki K, Akazawa K, et al. Conditioned medium from periodontal ligament stem cells enhances periodontal regeneration [J]. *Tissue Eng Part A*, 2017, 23(9/10): 367-377. DOI: 10.1089/ten.TEA.2016.0274.
- [9] Avinash K, Malaippan S, Dooraiswamy JN. Methods of isolation and characterization of stem cells from different regions of oral cavity using markers: A systematic review [J]. *Int J Stem Cells*, 2017, 10(1):12-20. DOI:10.15283/ijsc17010.
- [10] Zhai Q, Dong Z, Wang W, et al. Dental stem cell and dental tissue regeneration [J]. *Front Med*, 2019, 13(2):152-159. DOI:

- 10.1007/s11684-018-0628-x.
- [11] Ayoub S, Berbéri A, Fayyad-Kazan M. An update on human periapical cyst - mesenchymal stem cells and their potential applications in regenerative medicine[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(3):2381-2389. DOI:10.1007/s11033-020-05298-6.
- [12] Zheng DH, Han ZQ, Wang XX, et al. Erythropoietin attenuates high glucose-induced oxidative stress and inhibition of osteogenic differentiation in periodontal ligament stem cell (PDLSCs)[J]. Chem Biol Interact, 2019, 305:40-47. DOI:10.1016/j.cbi.2019.03.007.
- [13] Jiang R, Wang M, Shen X, et al. SUMO1 modification of IGF-1R combining with SNAIL2 inhibited osteogenic differentiation of PDLSCs stimulated by high glucose[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1):543. DOI:10.1186/s13287-021-02618-w.
- [14] Mendes KL, Lelis DF, Santos SHS. Nuclear sirtuins and inflammatory signaling pathways [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2017, 38:98-105. DOI:10.1016/j.cytogfr.2017.11.001.
- [15] Kang P, Wang J, Fang D, et al. Activation of ALDH2 attenuates high glucose induced rat cardiomyocyte fibrosis and necroptosis [J]. Free Radic Biol Med, 2020, 146:198-210. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.416.
- [16] LaRocca TJ, Sosunov SA, Shakerley NL, et al. Hyperglycemic conditions prime cells for RIP1-dependent necroptosis[J]. J Biol Chem, 2016, 291(26):13753-13761. DOI:10.1074/jbc.M116.716027.
- [17] Feng M, Qiang H, Zhang RR, et al. Necrostatin-1 inhibits the cell death of osteoblasts induced by glucocorticoid[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11(2):675-684.
- [18] Yan B, Zhang H, Dai T. Necrostatin - 1 promotes ectopic periodontal tissue like structure regeneration in LPS - treated PDLSCs[J]. PLoS One, 2018, 13(11):e0207760. DOI:10.1371/journal.pone.0207760.
- [19] 邬扬绚,向黎,黄志强,等. 釉基质蛋白衍生物调节牙龈卟啉单胞菌感染牙周膜干细胞成骨分化的作用及机制[J]. 口腔医学研究, 2020, 36(6):534-538. DOI:10.13701/j.cnki.kqxyj.2020.06.008.
- [20] Yang S, Huang Y, Jian P, et al. Enhanced cell affinity and osteogenic differentiation of liquid crystal - based substrate via surface bio-functionalization[J]. J Biomed Mater Res A, 2021, 109(6):938-950. DOI:10.1002/jbm.a.37084.

(收稿日期:2022-02-22)

(本文编辑:王嫚)