

## 基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001981

## 缺氧对人牙周膜细胞增殖、迁移能力及 IGF-1 表达的影响

谢佳颖, 尹东青

(重庆医科大学附属口腔医院修复科、口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆 401147)

**【摘要】目的:**探讨缺氧对人牙周膜细胞(human periodontal ligament cells, hPDLs)生物学活性的影响。**方法:**选择第 5 代 hPDLs, 在严重缺氧(1% O<sub>2</sub>)、轻度缺氧(5% O<sub>2</sub>)和常氧(21% O<sub>2</sub>)3 种环境下培养, 用 MTT 法评价细胞增殖率, 用倒置显微镜观察细胞形态变化, 细胞划痕试验评价细胞迁移能力, 用免疫荧光染色研究细胞中低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)的表达及分布情况, 用 RT-PCR 及 Western blot 检测 HIF 和 IGF-1 在不同氧浓度环境下的 mRNA 及蛋白表达水平。**结果:**①与正常 hPDLs 相比, 在 1% O<sub>2</sub> 浓度下, hPDLs 的数量在一个显微镜视野下明显减少, 排列稀疏, 结构发生改变。② hPDLs 的增长速率随着氧浓度的下降而减少, 氧气浓度越低, 增殖速率越慢。③在划痕处理后 72 h, 在 3 组不同氧浓度下, hPDLs 均向划痕区域迁移, 但严重缺氧组的移动速率明显小于轻度缺氧和常氧组(划痕 72 h: 1% O<sub>2</sub> 组 0.917 ± 0.023, 5% O<sub>2</sub> 组 0.742 ± 0.046, 21% O<sub>2</sub> 组 0.453 ± 0.039,  $F=530.237, P=0.002$ )。④HIF/DAPI 染色结果显示在常氧条件下, HIF-1 主要表达在细胞质中, 随着氧气浓度降低, HIF 逐渐转移至细胞核内。**结论:**缺氧能够抑制人牙周膜细胞的增殖和迁移能力, 改变 hPDLs 的形态。在缺氧条件下, HIF 从细胞质转移到细胞核中, HIF 和 IGF-1 的表达增加, 提示缺氧微环境对人牙周膜细胞的生物学活性有一定影响。

**【关键词】**缺氧; 人牙周膜细胞; 细胞增殖; 细胞迁移; 低氧诱导因子-1

**【中图分类号】**R783.6; R783.3

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2018-01-10

## Influence of hypoxia on proliferation, migration, and insulin-like growth factor-1 expression of human periodontal ligament cells

Xie Jiaying, Yin Dongqing

(Department of Prosthodontics, the Affiliated Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Chongqing)

**【Abstract】Objective:** To investigate the influence of hypoxia on the bioactivities of human periodontal ligament fibroblasts(hPDLs). **Methods:** The fifth-generation hPDLs were selected and cultured under the condition of severe hypoxia(1% O<sub>2</sub>), mild hypoxia(5% O<sub>2</sub>), or normoxia(21% O<sub>2</sub>). MTT assay was used to measure the proliferation rate of hPDLs. An inverted microscope was used to observe cell morphological changes. Wound healing assay was used to observe the migration ability of hPDLs. Immunofluorescence staining was used to measure the expression and distribution of hypoxia inducible factor-1(HIF-1) in hPDLs, and RT-PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of HIF-1 and insulin-like growth factor-1(IGF-1) under different levels of O<sub>2</sub>. **Results:** Compared with normal hPDLs, the hPDLs cultured in 1% O<sub>2</sub> had a significant reduction in cell number in a microscopic field, with sparse arrangement and a change in structure. The growth rate of hPDLs decreased with the reduction in oxygen concentration; the lower the oxygen concentration, the slower the proliferation rate. At 72 hours after scratch in the wound healing assay, hPDLs migrated to the scratched area in all three groups, but the severe hypoxia group had a significantly lower migration rate than the mild hypoxia group and the normoxia group(0.917 ± 0.023 vs. 0.742 ± 0.046/0.453 ± 0.039,  $F=530.237, P=0.002$ ). HIF/DAPI staining showed that under the condition of normal oxygen, HIF-1 was mainly expressed in the cytoplasm, and with the

gradual reduction in oxygen concentration, HIF-1 gradually migrated to the nucleus. **Conclusion:** Hypoxia can inhibit the proliferation and migration of hPDLs and change their morphology. Under the hypoxic condition, HIF-1 gradually migrates from the cytoplasm to the nucleus, and there are increases in the expression of HIF-1 and IGF-1, suggesting that hypoxia has certain influence on the bioactivity of hPDLs.

**【Key words】**hypoxia; human periodontal ligament cell; cell proliferation; cell migration; hypoxia-inducible factor-1

作者介绍: 谢佳颖, Email: cavawu1994@163.com,

研究方向: 牙周疾病及口腔材料。

通信作者: 尹东青, Email: wymfyxy@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81700982); 重庆市卫生局高端人才资助项目(编号: 2015HBRC010); 重庆市医学科研计划资助项目(编号: 2013-2-071); 重庆市渝北区科技计划资助项目(编号: 2016(社)18号)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190522.0859.006.html>  
(2019-05-22)

氧气对于人体的生长发育是不可或缺的,在新陈代谢过程中起着重要作用。当组织中的血液供应受阻或减少时,氧气的量随之减少,即可导致缺氧的发生,对循环紊乱最敏感的大脑和心脏,缺氧将会导致严重的后果。

牙周膜(periodontal ligament, PDL)是牙周组织中非常重要的组成部分,连接着牙齿和周围组织,作为牙槽骨和牙齿之间的缓冲。牙周膜成纤维细胞又叫牙周膜细胞(periodontal ligament cells, PDLCs),在牙周组织中起主导作用,不仅参与细胞外基质的合成和重构,还拥有特殊的生理功能,如参与细胞粘附、运输和矿化等<sup>[1-2]</sup>。除此之外,它们不断产生新的牙周纤维、牙骨质并重建牙槽骨<sup>[3]</sup>。生理状态下,在咀嚼运动时,PDL 承受着各种形式的力,而牙周膜细胞在这个过程中发挥着重要作用,维持着牙周组织的稳定<sup>[4]</sup>。各种因素可导致牙周组织缺氧。如当牙周组织出现炎症时,其血液微循环被破坏,牙周组织会出现缺氧的情况。正畸治疗时,受压侧牙周组织会出现局部缺血的现象,导致牙周组织缺氧。

缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factors, HIF)是一种在细胞环境中的转录因子,主要是在氧气减少或缺氧的情况下活化。细胞中 HIF 信号级联反应会受到缺氧状态的影响。缺氧状态促进了血管新生,伤口处的缺氧状态也促进了角质细胞的移动与上皮组织的修护。普遍情况下,HIF-1 是细胞发育的关键因子,对于软骨细胞的存亡有重大的影响,它能使软骨细胞适应在骨骼间生长的缺氧环境。HIF-1 在人类的代谢调节中,属于一个核心角色<sup>[5]</sup>。胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)也被称为生长调节素 C,属于酪氨酸激酶受体家族。IGF-1 是一种在分子结构上与多肽类胰岛素类似的激素,在生长发育和成人的合成代谢中有重要作用,可引起骨骼肌或其他组织的过度增殖<sup>[6]</sup>。

缺氧环境会对牙周组织造成重要的生物学影响。因此,本实验选择人类牙周膜细胞(human periodontal ligament, hPDLCs)作为研究对象,旨在探讨缺氧对 hPDLCs 增殖、迁移、形态和 HIF-1 $\alpha$  及 IGF-1 等细胞因子表达的影响,在某种程度上揭示 hPDLCs 在缺氧条件下的生理变化,为后续实验提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

磷酸盐缓冲液(PBS)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Hyclone, 美国);DMEM(Hyclone, 美国);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO);0.25%胰蛋白酶(Gibco, 美国);ABC 型免疫组化检测试剂盒、鼠抗人波形丝蛋白单抗(Vimentin)、鼠抗人角蛋白(Keratin)多克隆抗体(博士德公司, 中国);MTT 试剂盒;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色液;兔抗人 HIF-1 $\alpha$  抗体;羊抗兔 IgG;兔抗 IGF-1 抗体(SC-9013)(Santa Cruz 公司, 美国);Trizol 试剂盒(Invitrogen, 美国);SYB<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 试剂盒(Perfect Real Time, Takara, 大连);Applied Biosystems 7500 PCR 系统(Thermo Fisher Scientific, 美国)低氧工作站(COY, 美国),荧光显微镜(Nikon, 日本);倒置相差显微镜(Olympus, 日本)。

### 1.2 方法

1.2.1 人牙周膜细胞的体外分离培养 收集 2016 年 3 至 9 月于重庆医科大学附属口腔医院口腔科因正畸治疗需要拔除的牙周组织健康、无龋坏的前磨牙。患者年龄 12~18 岁。牙齿拔出后用 0.9%的无菌氯化钠溶液从牙体根顶部向冠部冲洗,随后放入含双抗的 PBS 液中,刮取新鲜牙根中 1/3 的牙周膜组织,剪成约 1 mm  $\times$  1 mm  $\times$  1 mm 小块。将所得组织均匀接种于含 10% FBS 的双抗 DMEM 培养基 1.5 mL 的培养瓶中,倒置于培养箱中 4 h。当组织块贴壁牢固后翻转。次日再加入 2.5 mL 培养基。每 3~4 d 换液 1 次,待细胞生长至 80%后胰酶消化传代,取生长良好的第 5 代细胞用于后续实验。

1.2.2 人牙周膜细胞的鉴定 取第 5 代生长良好的人牙周膜细胞制备细胞爬片后用 SABC 法进行角蛋白 Keratin、波形丝蛋白 Vimentin 免疫组化染色。用 PBS 代替一抗作为阴性对照,进行细胞来源的鉴定,在显微镜下观察。

1.2.3 MTT 实验检测缺氧对人牙周膜细胞增殖的影响 实验分为①严重缺氧组:1% O<sub>2</sub>;②轻度缺氧组:5% O<sub>2</sub>;③常氧组:21% O<sub>2</sub>。严重缺氧和轻度缺氧组置于低氧工作站中充入 N<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub>,参数设定在 37  $^{\circ}$ C,饱和湿度,常氧组参数设定在 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>,普通培养箱。取对数生长期的第 4~7 代 hPDLCs,胰酶消化吹打重悬为单细胞悬液,以 3  $\times$  10<sup>4</sup> 个/mL 密度接种于 3 组 12 孔板中。待细胞贴壁后,弃去原培养液及未贴壁细胞,加入无血清 DMEM 培养基饥饿过夜。弃去培养基,加入 200  $\mu$ L 含 10%FBS 的 DMEM 培养基,根据分组将 3 组 12 孔板分别放入不同培养箱中。分别在第 1~7 天各取出 1 组细胞,加入 20  $\mu$ L MTT 液,继续培养 4 h 后,去上清液后,每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L 振荡 10 min,使结晶充分溶解,用酶标仪在 490 nm 波长处检测吸光度(absorbance, A)值,实验重复

3次。

1.2.4 倒置显微镜观察缺氧对人牙周膜细胞形态的影响 取处于对数生长期的第 4~7 代 hPDLCs, 胰酶消化吹打重悬为单细胞悬液, 以  $3 \times 10^4$  个/mL 密度接种于 12 孔细胞培养板, 在不同氧浓度环境下培养 7、14 d 后, 制取细胞爬片分别用倒置显微镜观察在不同氧浓度下的人牙周膜细胞形态变化。

1.2.5 细胞划痕实验检测缺氧对人牙周膜细胞迁移的影响 取处于对数生长期的第 4~7 代 hPDLCs, 胰酶消化吹打重悬为单细胞悬液, 以  $3 \times 10^4$  个/mL 密度接种于 12 孔细胞培养板, 放入培养箱中过夜培养。待细胞长成单层即弃去培养液, 用吸管在 12 孔板每孔中央划出一划痕, 洗去死细胞后在倒置显微镜下观察。根据实验设计分别置于严重缺氧(1% O<sub>2</sub>)、轻度缺氧(5% O<sub>2</sub>)、常氧(21% O<sub>2</sub>)环境下。48 h 后, 在同一观察点处用倒置显微镜观察细胞迁移情况, 实验重复 3 次。利用 Image Pro Plus 6.0 软件测量每孔划痕间距, 取均值, 并用处理前的距离减去处理后的距离计算 48 h 细胞迁移距离, 所得数据用统计软件进行分析。

1.2.6 免疫荧光染色观察缺氧对人牙周膜细胞 HIF-1 $\alpha$  表达的影响 取处于对数生长期的第 4~7 代 hPDLCs, 胰酶消化吹打重悬为单细胞悬液, 计数板计数, 以  $3 \times 10^4$  个/mL 密度接种于 12 孔细胞培养板, 根据实验分组, 在严重缺氧(1% O<sub>2</sub>)、轻度缺氧(5% O<sub>2</sub>)、常氧(21% O<sub>2</sub>)环境下分别培养 7 d。制取细胞爬片, 用 PBS 洗涤并在室温下固定于 4% 多聚甲醛缓冲液中; 滴加正常山羊血清, 室温封闭 30 min; 甩去多余液体后, 分别滴加兔抗人 HIF-1 $\alpha$  抗体(PBS 作为对照代替一抗), 4 °C 过夜后 PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加荧光标记的羊抗兔 IgG, 37 °C 反应 60 min 后, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 随后加入 4'-6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色液, 于室温下染核 30 min, 用 PBS 在室温漂洗 3 次, 每次 10 min; 用荧光显微镜观察在不同氧浓度下牙周膜细胞 HIF-1 表达的变化。

1.2.7 Western blot 检测缺氧对人牙周膜细胞 HIF-1 $\alpha$ 、IGF-1 表达的影响 将各组培养 7 d 的 hPDLCs 提取蛋白后, 采用 Bradford 法检测蛋白浓度。每组取 100  $\mu$ g 总蛋白行 SDS-PAGE, 电泳后转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 分别加入兔抗人 HIF-1 $\alpha$  (1:1 000)、兔抗人 IGF-1 (1:1 000) 于 4 °C 过夜, GAPDH 作为内参, 次日加入辣根过氧化物酶标记二抗(1:10 000), 室温摇床孵育 2 h。TBST 洗膜后, 化学发光试剂显色。采用凝胶成像系统分析灰度值及蛋白条带密度。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件对实验所得数据进行分析 and 检验, 实验数据均以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析; 组间两两比较采用 Bonferroni 法; 重复测量数据采用单因素方差分析。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

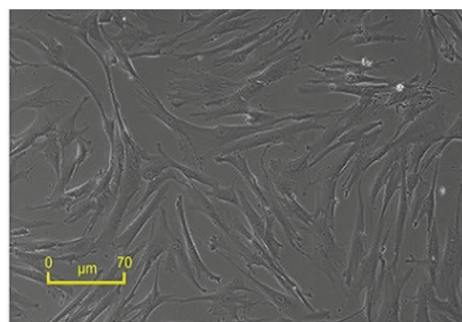
## 2 结果

### 2.1 人牙周膜细胞的分离培养

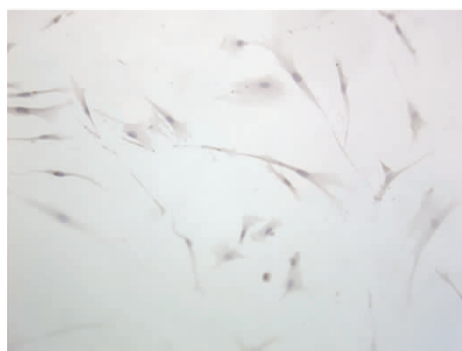
本实验采用组织块法培养 hPDLCs。观察到 48 h 后, hPDLCs 开始从组织块的边缘游离, 2 周后组织块解体。从组织块爬出的细胞大部分呈长梭形, 少量呈多角形、纺锤形、椭圆形, 充分伸展, 胞浆丰富, 核为圆形或卵圆形, 居中(图 1A)。爬出的细胞逐渐在组织块周围呈漩涡状、放射状排列。

### 2.2 人牙周膜细胞的鉴定

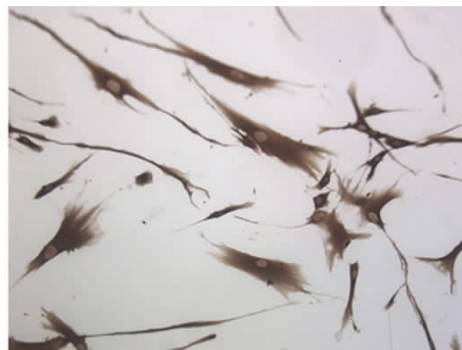
免疫细胞化学染色显示 hPDLC 抗波形蛋白染色呈阳性表达, 胞浆着色(图 1B); 抗角蛋白染色呈阴性表达, 胞浆不着色(图 1C)。结果表明, hPDLCs 来源于胚胎中胚层间充质细胞。



A. 人牙周膜细胞形态



B. 人牙周膜细胞抗波形蛋白染色



C. 人牙周膜细胞抗角蛋白染色

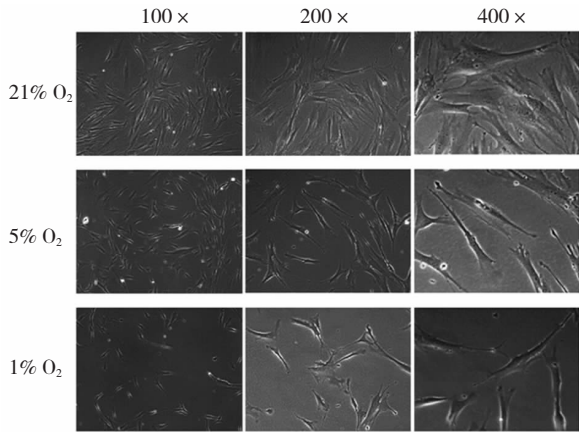
图 1 人牙周膜细胞的鉴定

2.3 缺氧对人牙周膜细胞形态的影响

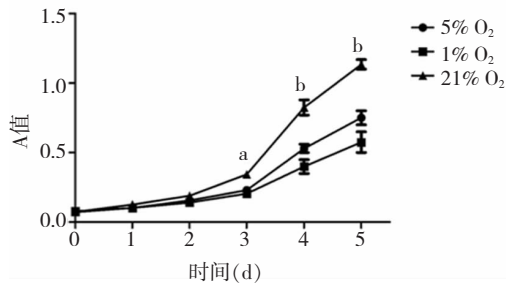
本实验用倒置显微镜观察 1~14 d 在各种氧浓度下 hPDLCs 的形态变化,发现在第 14 天时,细胞形态出现了明显的差异,与正常 hPDLCs 相比,在 1% O<sub>2</sub> 浓度下,hPDLCs 的数量在一个显微镜视野下明显减少,排列稀疏,且结构发生改变。正常人牙周膜细胞突触粗大,胞体饱满,胞核呈圆形或卵圆形,位于细胞中央,而在缺氧条件下,牙周膜细胞突触数目减少,且形态纤细,胞体狭长,胞核偏居于细胞的一侧(图 2A)。

2.4 缺氧对人牙周膜细胞增殖的影响

本实验分别在第 1~5 天检测在各种氧浓度条件下 A 值的改变。研究表明,hPDLCs 的增长速率随着氧浓度的下降而减少,氧气浓度越低,增殖速率越慢,与常氧组相比,差异具有统计学意义(图 2B,表 1)。



A. 不同氧浓度下人牙周膜细胞形态



a:21%组与 1%组比较有统计学差异, $P<0.05$ ;b:21%组与 1%组比较有统计学差异, $P<0.01$

B. 不同氧浓度下牙周膜细胞增殖曲线

图 2 不同氧浓度下牙周膜细胞形态及增殖能力检测 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

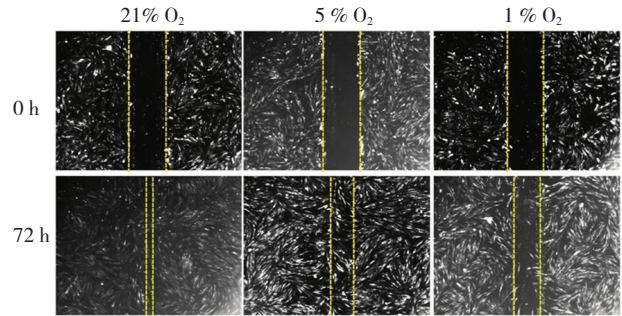
表 1 不同氧浓度下牙周膜细胞增殖能力检测 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
1% O <sub>2</sub>	0.132 ± 0.037	0.179 ± 0.145	0.280 ± 0.189	0.357 ± 0.169	0.457 ± 0.632	0.537 ± 0.532
5% O <sub>2</sub>	0.103 ± 0.022	0.195 ± 0.176	0.297 ± 0.167	0.383 ± 0.231	0.536 ± 0.736	0.739 ± 0.739
21% O <sub>2</sub>	0.116 ± 0.039	0.207 ± 0.194	0.312 ± 0.239	0.439 ± 0.297 <sup>a</sup>	0.891 ± 0.825 <sup>b</sup>	1.232 ± 0.762 <sup>b</sup>

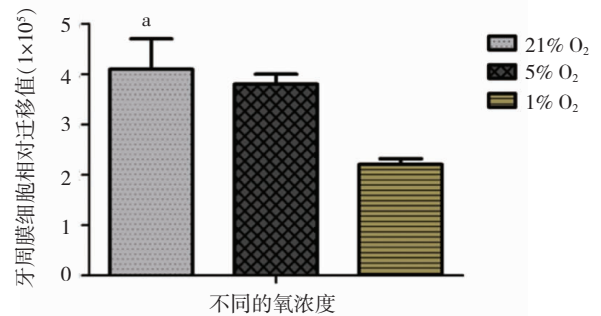
注:重复测量方差分析显示,时间因素有统计学意义 ( $F=350.891, P=0.000$ ),说明组内指标随时间变化趋势为上升趋势;浓度因素有统计学意义 ( $F=226.076, P=0.000$ ),说明浓度因素随着分组的不同而不同。进一步做两两比较,a:实验组 1% O<sub>2</sub> 与对照组 21% O<sub>2</sub> 比较,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ );b:实验组 1% O<sub>2</sub> 与对照组 21% O<sub>2</sub> 比较,差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )

2.5 缺氧对人牙周膜细胞迁移的影响

本实验用倒置显微镜观察到在划痕处理后 72 h,在 3 组不同氧浓度下,hPDLCs 均向划痕区域迁移,但严重缺氧组的移动速率明显小于轻度缺氧和常氧组,差异具有统计学意义,轻度缺氧组与常氧组细胞间细胞迁移无明显差异。提示,严重缺氧能明显减弱 hPDLCs 的迁移能力(图 3,表 2)。



A. 不同氧浓度下人牙周膜细胞迁移距离



a:实验组 1% O<sub>2</sub> 和对照组 21% O<sub>2</sub> 比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )

B. 不同氧浓度下人牙周膜细胞相对迁移距离柱状图

图 3 不同氧浓度下人牙周膜细胞迁移的距离比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

2.6 缺氧对人牙周膜细胞 HIF-1 $\alpha$ 、IGF 表达的影响

HIF 免疫组化染色结果显示,1% O<sub>2</sub> 条件下,HIF 有明显的高表达。HIF/DAPI 染色结果表明,在常氧条件下,HIF-1 主要表达在细胞质中,但随着氧气浓度降低,HIF 逐渐转移至细胞核内,主要在细胞核中积聚,这表明缺氧能抑制 HIF-1 降解并促进其转移到细胞核内,形成功能性复合体(图 4A、B)。Western blot 结果显示,HIF-1 $\alpha$ 、IGF-1 的蛋白质表达均随着氧气浓度的降低而增高(图 4C,表 3)。

表 2 不同氧浓度下人牙周膜细胞相对迁移率检测 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

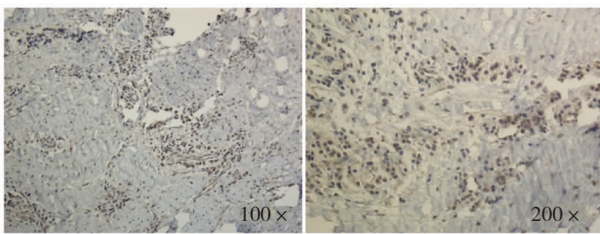
组别	72 h 迁移率
1% O <sub>2</sub>	0.917 ± 0.023 <sup>a</sup>
5% O <sub>2</sub>	0.742 ± 0.046
21% O <sub>2</sub>	0.453 ± 0.039
F 值	530.237
P 值	0.002

注: a, 实验组 1% O<sub>2</sub> 与对照组 21% O<sub>2</sub> 组间比较, 差异有统计学差异 (P<0.05)

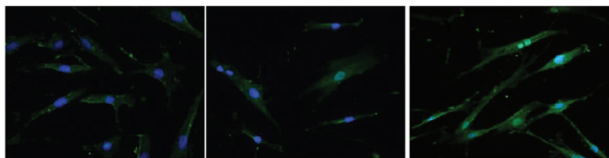
表 3 不同氧浓度下 HIF-1 $\alpha$ 、IGF-1 蛋白相对表达量检测 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	HIF-1 $\alpha$	IGF-1
1% O <sub>2</sub>	1.073 ± 0.049 <sup>a</sup>	0.907 ± 0.023 <sup>a</sup>
5% O <sub>2</sub>	0.642 ± 0.037	0.561 ± 0.049
21% O <sub>2</sub>	0.475 ± 0.021	0.513 ± 0.024
F 值	563.362	317.093
P 值	0.000	0.001

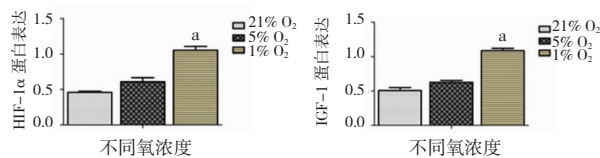
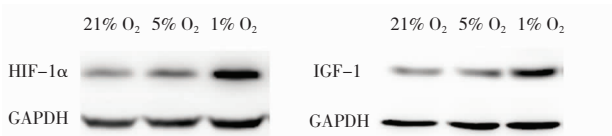
注: a, 实验组 1% O<sub>2</sub> 与对照组 21% O<sub>2</sub> 组间比较, 差异有统计学差异 (P=0.000)



A. 1% O<sub>2</sub> 浓度下人牙周膜细胞免疫组化染色  
21% O<sub>2</sub>      5% O<sub>2</sub>      1% O<sub>2</sub>



B. 不同氧浓度下 HIF/DAPI 染色



a: 实验组 1% O<sub>2</sub> 与对照组 21% O<sub>2</sub> 组间比较, 差异有统计学意义 (P<0.01)

C. 不同氧浓度下 HIF-1 $\alpha$ 、IGF-1 蛋白表达情况

图 4 不同氧浓度对人牙周膜细胞 HIF-1 $\alpha$ 、IGF 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

### 3 讨论

牙周膜(periodontal ligament, PDL)是一个高度胶原结构,连接牙齿和周围的牙槽骨,提供支持和减震功能<sup>[7]</sup>。牙周组织修复和再生对牙周组织疾病具有重要意义,研究表明它是一个复杂的过程,多个因素参与调控。人牙周膜细胞(human periodontal ligament cells, hPDLs)是牙周组织中数目最多的细胞,在牙周组织的修复、再生和维持牙周膜完整性中发挥着关键作用,是一种具有自我更新能力的多能细胞,包括有不同功能的成熟细胞和具有分化潜能的未分化间充质细胞。在病理状态下或受到外界刺激时, hPDLs 被激活,开始增殖和分化成多能细胞<sup>[8-10]</sup>。

缺氧是生命发展的基本环境,也是一种生理性刺激。局部组织或细胞在缺氧条件下发生适应性的反应,从而促进生理或病理过程的发展。缺氧应激反应通过一系列的调控机制影响细胞存活和血管形成,在牙周组织改建中也起着重要作用<sup>[11]</sup>。有许多原因可导致牙周组织缺氧的发生。例如,牙周炎时,牙周组织的微循环受损而导致缺氧。在正畸治疗过程中,受压侧缺血,导致牙周组织缺氧。因此,对 hPDLs 在缺氧条件下的各种生物学活性的研究可以为牙周组织修复、重建机制提供理论基础。

本实验根据氧气浓度高低分为严重缺氧(1% O<sub>2</sub>)、轻度缺氧(5% O<sub>2</sub>)、常氧(21% O<sub>2</sub>)3 组,观察缺氧对 hPDLs 增殖、迁移及 HIF-1 表达的影响。采用组织块培养方法分离、培养 hPDLs,根据免疫组化检测结果,显示 hPDLs 来源于胚胎中胚层。将 hPDLs 传代培养,选择增殖稳定、生长活跃的第 4~7 代作为研究对象,在倒置显微镜下观察,发现大部分细胞呈长梭形,伸展良好,胞浆丰富,核圆居中,呈漩涡状、放射状排列。细胞增殖在维持细胞数目和正常的生物学功能方面起着重要作用。MTT 实验结果表明,在各种氧浓度条件下, hPDLs 的增长速度随着氧浓度的降低而下降。本实验结果显示,3 组不同氧浓度条件下 hPDLs 的生长曲线均呈 S 形生长,且在第 6 天时细胞增殖达到最大值。这表明低氧对 hPDL 增殖的影响呈浓度及时间依赖性,长期低氧环境可抑制细胞增殖。划痕实验检测 hPDLs

的迁移能力,显示严重缺氧能明显抑制 hPDLCs 的迁移能力。

缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)可根据外界氧浓度的高低来调控其下游相应基因的表达,以维持细胞内氧环境的稳定,是机体重要的缺氧传递信号因子<sup>[12]</sup>。它是一种异二聚体转录因子,主要由对氧敏感的 HIF-1 $\alpha$  和对氧不敏感的 HIF-1 $\beta$  组成<sup>[13]</sup>。HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  均属于真核细胞碱性螺旋-环-螺旋(basic-helix-loop-helix, bHLH)-PAS(PER、ARNT、SIM)蛋白家族成员。HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  均包含 bHLH 结构域、PAS 结构域、梭基末端的反式活化结构域(transactivation domain, TAD)及入核信号。HIF-1 $\beta$  是一种芳基烃核转运蛋白(aryl hydrocarbon nuclear translocator, ARNT),而 HIF-1 $\alpha$  与缺氧反应之间存在着特异性的关系<sup>[14]</sup>。HIF-1 的表达量主要由 HIF-1 $\alpha$  决定,受氧浓度的影响,而 HIF-1 $\beta$  表达相对稳定,不受氧浓度的调节和影响<sup>[15]</sup>。在正常情况下,HIF-1 $\alpha$  被脯氨酰羟化酶迅速降解,通常检测不到。然而,缺氧环境会阻止羟基化的过程,因此在缺氧条件下,HIF-1 $\alpha$  能够稳定表达并能转移到细胞核中。在细胞核中,HIF-1 $\alpha$  结合其二聚体 HIF-1 $\beta$ ,从而刺激一系列氧依赖的基因表达,如促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、葡萄糖转运蛋白-1(glucose transporter-1, GLUT-1)、一氧化氮合酶(i-NOS)、血红素氧合酶 1、转铁蛋白、酪氨酸羟化酶等,几乎每一个基因都是通过糖酵解途径来增强细胞对缺氧的适应能力<sup>[16-17]</sup>。所有这些靶基因都包含至少一个与 HIF-1 的特异性结合位点,它们翻译的蛋白在适应急性和慢性缺氧环境中起着重要作用,介导着适应性反应,如血管生成、红细胞生成、糖酵解、细胞的生长与凋亡等反应,使器官或组织迅速恢复到常氧状态<sup>[18-19]</sup>。Hisada 等<sup>[17]</sup>发现 HIF-1 $\alpha$  过度表达短期内能够促进细胞增殖,而长期则会抑制细胞增殖。本实验发现,随氧浓度降低,HIF 表达逐渐增加,并逐渐从细胞质转移到细胞核,尤其是在严重缺氧(1% O<sub>2</sub>)条件下,HIF 的表达明显高于对照组,且主要表达于细胞核中。唐开亮等<sup>[20]</sup>发现 HIF-1 $\alpha$  的 mRNA 在常氧组和低氧组间的表达差异无统计学意义,说明人牙周膜细胞 HIF-1 $\alpha$  的 mRNA 表达可能不受缺氧时间及氧浓度

高低影响。而 HIF-1 $\alpha$  蛋白在缺氧 24 h 时在本研究中呈高度表达,提示 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达与蛋白的表达可能无较大相关性。本研究显示 mRNA 水平和蛋白水平 HIF 的表达均随着氧浓度的降低而升高,但具体反馈调节机制有待进一步研究。

IGF-1 由 70 个氨基酸组成,为单一肽链的碱性多肽,它与其结合蛋白和受体组成胰岛素样生长因子系统,包含 6 个结合蛋白和 3 个配体<sup>[21]</sup>。在体内,多种器官和组织能合成并分泌 IGF-1,循环中的 IGF-1 主要由肝脏合成,与相应的结合蛋白结合,通过内分泌、自分泌和旁分泌等方式作用于受体而发挥各种生理作用,主要有①近期作用:类似胰岛素的代谢作用,能促进葡萄糖摄取,糖原合成,抑制脂质降解。②远期作用:在有丝分裂中促进蛋白质、DNA、RNA 的合成、复制,促进细胞增殖、细胞生长,并抑制细胞凋亡<sup>[22]</sup>。已有研究表明 IGF-1 在神经保护、神经形成中具有重要作用,还可以调节免疫功能<sup>[23-25]</sup>。近年来,有实验报道 IGF-1 在神经元缺血、缺氧中具有一定的保护作用,但作用机制还有待进一步的研究<sup>[26]</sup>。本实验数据显示 IGF-1 在 mRNA 水平和蛋白水平均随着氧气浓度的降低而升高表达。

HIF 和 IGF 缺氧的调控机制尚不十分明确,已有研究显示,在缺氧条件下,HIF 的调控途径较为复杂,可诱导其下游多种靶基因的表达,如参与并调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路<sup>[27-28]</sup>。近期研究发现 HIF 系统还可以对细胞功能产生不利的影响,它可以产生一些特异性细胞周期停滞和凋亡前体蛋白,如 DEC (defective chorion)-1, BNIP (Bcl2/adenovirus E1B19 kD-interacting protein)-3 和 cyclin G2 等。此外,凋亡前体蛋白 p53 与 HIF-1 $\alpha$  也有着生理与功能上的联系<sup>[29]</sup>。在恶性细胞中,有研究表明 IGF-1 能诱导 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达;反之,HIF-1 $\alpha$  又能进一步促进 IGF-1 的表达<sup>[30]</sup>。本实验中 HIF-1 $\alpha$  和 IGF-1 的表达与缺氧程度成正相关,数据显示,HIF-1 $\alpha$  与 IGF-1 可能参与调节缺氧条件下人牙周膜细胞的增殖、迁移等细胞生物学行为,对 hPDLCs 生物学行为及活性有着不可忽略的协同作用和累加效应,但两者之间的相互作用分子机制还有待进一步的研究。

综上所述,本研究表明,缺氧能抑制人牙周膜细胞增殖和迁移的能力,改变 hPDLCs 的形态,抑制 HIF-1 表达并促进其转移到细胞核中,提示缺氧微

环境对人牙周膜细胞的生物学活性有一定影响。

### 参 考 文 献

- [1] Marchesan JT, Scanlon CS, Soehren S, et al. Implications of cultured periodontal ligament cells for the clinical and experimental setting: a review[J]. *Arch Oral Biol*, 2011, 56(10):933-943.
- [2] Yu Y, Mu J, Fan Z, et al. Insulin-like growth factor 1 enhances the proliferation and osteogenic mineralization of human peri-odontal ligament stem cells via ERK and JNK MAPK pathways[J]. *Histochem Cell Biol*, 2012, 137(4):513-525.
- [3] Choe Y, Yu JY, Son YO, et al. Continuously generated H2O2 stimulates the proliferation and osteoblastic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(4):1426-1436.
- [4] Konermann A, Stabenow D, Knolle PA, et al. Regulatory role of periodontal ligament fibroblasts for innate immune cell function and differentiation[J]. *Innate Immun*, 2011, 18:745-752.
- [5] 李培勇, 辛军, 伍佰聪, 等. HIF-1 $\alpha$ 、MMP-9、MVD 在肾细胞癌中的表达及临床意义[J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(2):151-154.
- [6] 姜蓉, 段江洁, 田静, 等. 胎儿骨髓间充质干细胞 EGF 受体或 IGF 受体的表达与其向上皮细胞分化的关系[J]. *重庆医科大学学报*, 2012, 37(1):39-42.
- [7] 黄辉祥, 汤文成, 吴斌, 等. 基于超弹性模型的牙周膜力学行为数值模拟[J]. *上海交通大学学报*, 2014, 48(9):1263-1273.
- [8] Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament[J]. *Lancet*, 2004, 364(9429):149-155.
- [9] Murakami Y, Kojima T, Nagasawa T, et al. Novel isolation of alkaline phosphatase-positive subpopulation from periodontal ligament fibroblasts[J]. *J Peri*, 2003, 74(6):780-786.
- [10] Kaneda T, Miyauchi M, Takekoshi T, et al. Characteristics of periodontal ligament subpopulations obtained by sequential enzymatic digestion of rat molar periodontal ligament[J]. *Bone*, 2006, 38(3):420-426.
- [11] Salim A, Nacamuli RP, Morgan EF, et al. Transient changes in oxygen tension inhibit osteogenic differentiation and Rux2 expression in osteoblast[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(38):40007-40016.
- [12] Mylonis I, Sembongi H, Befani C, et al. Hypoxia causes triglyceride accumulation via HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression[J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt14):3485-3493.
- [13] 蔡秀红, 黄飴涛, 张子平, 等. 缺氧诱导因子-1(HIF-1)及其在水生动物中的研究进展[J]. *农业生物技术学报*, 2014, 22(1):119-132.
- [14] Pichon A, Zhenzhong B, Favret F, et al. Long-term ventilatory adaptation and ventilatory response to hypoxia in plateau pika (*Ochotona curzoniae*): role of nNOS and dopamine[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009, 297(4):978-987.
- [15] Rowland KJ, Yao J, Wang L, et al. Up-regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha and hemodynamic responses following massive small bowel resection[J]. *J Pediatr Surg*, 2013, 48(6):1330-1339.
- [16] Guillemin K, Krasnow MA. The hypoxic response: huffing and HIFing[J]. *Cell*, 1997, 89(1):9-12.
- [17] Hisada T, Ayaori M, Ohru N, et al. Statin inhibits hypoxia-induced endothelin-1 via accelerated degradation of HIF-1 $\alpha$  in vascular smooth muscle cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 95(2):251-259.
- [18] Bento CF, Pereira P. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 and the loss of the cellular response to hypoxia in diabetes[J]. *Diabetologia*, 2011, 54(8):1946-1956.
- [19] Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86(2):236-242.
- [20] 唐开亮, 于西佼, 杜毅. 乏氧诱导因子-1 $\alpha$  在人牙周膜细胞的表达[J]. *中国医学创新*, 2013, 8(13):6-7.
- [21] Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, et al. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice[J]. *Nature*, 2003, 421(6919):182-187.
- [22] Burnol AF, Morzyglod L, Popineau L. Cross-talk between insulin signaling and cell proliferation pathways[J]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2013, 74(2):74-78.
- [23] Quesada A, Lee BY, Micevych PE. PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease[J]. *Dev Neurobiol*, 2008, 68(5):632-644.
- [24] Perez-Martin M, Cifuentes M, Grondona JM, et al. Neurogenesis in explants from the walls of the lateral ventricle of adult bovine brain: role of endogenous IGF-1 as a survival factor[J]. *Eur J Neurosci*, 2003, 17(2):205-211.
- [25] Kim Y, Li E, Park S. Insulin-like growth factor-1 inhibits 6-hydroxydopaminemediated endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis via regulation of hemeoxygenase-1 and Nrf2 expression in PC12 cells[J]. *Int J Neurosci*, 2012, 122(11):641-649.
- [26] Beresewicz M, Majewska M, Makarewicz D, et al. Changes in the expression of insulin-like growth factor 1 variants in the post natal brain development and in neonatal hypoxia-ischaemia[J]. *Int J Devneurosci*, 2010, 28(1):91-97.
- [27] Kaidi A, Williams AC, Paraskeva C. Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia[J]. *Nature Cell Biology*, 2007, 9(2):210-217.
- [28] Lim JH, Chun YS, Park JW. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  obstructs a Wnt signaling pathway by inhibiting the hARD1-mediated activation of beta-catenin[J]. *Cancer Research*, 2008, 68(13):5177-5184.
- [29] Acker T, Plate KH. A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology[J]. *J Mol Med*, 2002, 80(9):562-575.
- [30] Slomiany MG, Rosenzweig SA. IGF-1-induced VEGF and IGF-BP-3 secretion correlates with increased HIF-1 $\alpha$  expression and activity in retinal pigment epithelial cell line D407[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(8):2838-2847.

(责任编辑: 冉明会)