

[文章编号] 1000-1182(2010)05-0488-04

碱性成纤维细胞生长因子对牙周膜成纤维细胞整合素 $\beta 1$ 亚单位mRNA表达的影响

李红艳 林崇韬 李博

(吉林大学口腔医院 牙周病科, 吉林 长春 130041)

[摘要] 目的 研究碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对人牙周膜成纤维细胞整合素 $\beta 1$ 亚单位mRNA表达的影响,探讨bFGF在牙周组织再生中的意义。方法 体外培养人牙周膜成纤维细胞,分别用质量浓度0.1、1.0、10.0 ng·mL⁻¹的bFGF刺激细胞,培养24、48、72 h,采用实时荧光定量聚合酶链反应法检测牙周膜成纤维细胞内整合素 $\beta 1$ 亚单位mRNA表达的变化。结果 bFGF可促进人牙周膜成纤维细胞内整合素 $\beta 1$ 亚单位mRNA的合成,在培养24、48、72 h时,1.0 ng·mL⁻¹组整合素 $\beta 1$ 亚单位表达均明显高于对照组;培养72 h时各实验组整合素 $\beta 1$ 亚单位表达均明显高于培养24、48 h时。结论 bFGF通过提高整合素 $\beta 1$ 亚单位mRNA的表达,促进牙周膜成纤维细胞的黏附,在牙周组织修复再生中起作用。

[关键词] 碱性成纤维细胞生长因子; 整合素 $\beta 1$ 亚单位; 牙周膜成纤维细胞; 牙周组织再生

[中图分类号] R 781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.05.008

The effect of basic fibroblast growth factor on the mRNA expression of $\beta 1$ integrin subunit by periodontal ligament fibroblasts in culture LI Hong-yan, LIN Chong-tao, LI Bo. (Dept. of Periodontology, Stomatology Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of basic fibroblast growth factor on the mRNA expression of $\beta 1$ integrin subunit by periodontal ligament fibroblasts in culture; to discuss the effect of basic fibroblast growth factor in periodontal regeneration. **Methods** Human periodontal ligament fibroblasts were cultured and stimulated by basic fibroblast growth factor(0.1, 1.0, 10.0 ng·mL⁻¹) for 24, 48, 72 h respectively, and then mRNA expression of $\beta 1$ integrin subunit was assessed by fluorescent quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. **Results** Basic fibroblast growth factor enhanced the mRNA expression of $\beta 1$ integrin subunit, and there was optimal effect when the concentration of basic fibroblast growth factor was 1.0 ng·mL⁻¹ at 24, 48, 72 h respectively; the mRNA expression of $\beta 1$ integrin subunit at 72 h was higher than that at 24, 48 h. **Conclusion** Basic fibroblast growth factor can strengthen human periodontal ligament fibroblasts' adhesion and may be one of important factors which participate in the periodontal regeneration.

[Key words] basic fibroblast growth factor; $\beta 1$ integrin subunit; periodontal ligament fibroblast; periodontal regeneration

牙周病治疗的理想结果是在消除炎症的基础上重建已破坏的牙周组织,形成功能性的牙周附着结构。牙周膜成纤维细胞(periodontal ligament fibroblast, PDLF)可以发育为成骨细胞和成牙骨质细胞,是牙周组织修复、再生的主要细胞群。PDLF在根面或支架材料上的黏附、增殖是其行使生物功能的基础,是形成牙周新附着的前提和关键。因此,研究PDLF黏附的机制,使其更有效地在根面或支架材料

上黏附、移动、增殖和分化,已成为牙周组织再生研究的重点。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是一种肝素黏合多肽,在牙周组织再生中有重要作用。bFGF能促进PDLF的增殖,促进透明质酸合成并抑制I型胶原和碱性磷酸酶的合成等。整合素是一个细胞表面受体家族,是介导细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)黏附的主要作用因子。本实验采用外源性bFGF刺激人PDLF,检测整合素 $\beta 1$ 亚单位mRNA的变化,探讨bFGF促进PDLF黏附的机制,以及在牙周炎症损伤修复和牙周组织再生中的作用。

[收稿日期] 2009-11-11; [修回日期] 2010-03-20

[作者简介] 李红艳(1980—),女,河北人,硕士

[通讯作者] 林崇韬, Tel: 0431-88796039

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

高糖DMEM培养基(Gibco公司,美国);胎牛血清(PAA公司,奥地利);青霉素(石家庄华北制药股份有限公司)、链霉素(大连美罗药业股份有限公司);型胶原酶(Gibco公司,美国);抗波形丝蛋白、角蛋白抗体,SP试剂盒,bFGF(Cytolab Ltd公司,美国);焦炭酸二己酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)(Sigma公司,美国);胰蛋白酶(Gibco公司,美国);二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)(Sigma公司,美国);Bio Basic Inc-BS583总RNA提取试剂盒(Omega公司,美国),实时荧光定量PCR试剂盒(Toyobo公司,日本);倒置显微镜(Olympus公司,日本)。

1.2 PDLF的培养和鉴定

PDLF来自因正畸需要而拔除的健康前磨牙,患者年龄12~18岁。牙齿拔除后,立即刮取前磨牙根中1/3的牙周膜组织,采用胶原酶消化组织块法培养PDLF。培养液为含20%胎牛血清、1 000 U·mL⁻¹青霉素和1 000 g·L⁻¹链霉素的高糖DMEM培养液。用型胶原酶消化牙周膜组织12~15 h,离心收集消化的组织块和细胞,继续培养48~72 h,待细胞和组织块贴壁后常规培养。每3 d更换1次培养液。待细胞生长至90%融合时,用0.25%胰蛋白酶消化传代。取第3代细胞用于鉴定,第5代细胞用于实验。细胞培养成功后采用免疫组化SP法进行波形丝蛋白和角蛋白染色,若波形丝蛋白染色阳性且角蛋白染色阴性则为PDLF。

1.3 外源性bFGF刺激PDLF

取第5代PDLF,分为实验组和对照组,每组3瓶细胞。实验组分别用含bFGF(终质量浓度分别为0.1、1.0、10.0 ng·mL⁻¹)的DMEM培养液于标准条件下培养24、48、72 h;对照组用DMEM培养液在标准条件下培养相同时间。于倒置显微镜下观察2组细胞的变化。

1.4 实时荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测整合素β1亚单位的mRNA表达

1.4.1 细胞内总RNA的提取、纯度测定及反转录按照Bio Basic Inc-BS583总RNA提取试剂盒的说明提取各组PDLF内的总RNA。取4 μL RNA样品加蒸馏水到1 mL,用1 mL蒸馏水作空白对照,于分光光度计上测定230、260、280 nm处的光密度值A,以 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 和 $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ 的值表示RNA的纯度。取10 μL RNA样品(约2 μg RNA)行甲醛琼脂糖凝胶电

泳,检测28 S、18 S和5 S带的情况以测定RNA的完整性。将RNA产物反转录成cDNA, -20 °C保存。

1.4.2 引物设计 用Primer Premier 5.0软件设计整合素β1亚单位和内参照甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的引物,由上海生工生物工程有限公司合成。整合素β1亚单位引物序列包括:上游引物为5'-CCCTTTCCT-CAGAAGTCATTTTG-3',下游引物为5'-TTCGC-TTTGGCATTACATTCAC-3';GAPDH引物序列包括:上游引物为5'-GTCTTACCACCATGGAGAAG-GCT-3',下游引物为5'-CATGCCAGTGAGCTTCCC-CGTTCA-3'。

1.4.3 实时荧光定量PCR反应 1)PCR反应体系及条件:按实时荧光定量PCR试剂盒说明进行cDNA扩增。PCR反应条件为预变性95 °C 60 s;95 °C 30 s、54 °C 45 s、72 °C 60 s,共30个循环;72 °C延伸10 min。2)比较基因扩增效率:选取cDNA样品模板进行10倍梯度稀释,用整合素β1亚单位和引物分别进行实时荧光定量PCR反应,反应结束后仪器自动显示出二者的荧光曲线,通过cDNA质量浓度梯度的对数值对 ΔCT 值作图以比较2个基因的扩增效率。每例样品及对照组均设4个平行复孔,重复3次取均值。反应结束后,由电脑自动得出荧光反应曲线。

1.5 数据整理和统计分析

应用SPSS 11.0统计学软件计算重复样品间CT均值及标准差,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[1]处理数据。CT值是每个反应体系中的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数, ΔCT 是目的基因与内参照基因CT值之差, $\Delta\Delta CT$ 是实验组与对照组 ΔCT 值之差, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示实验组目的基因相对于对照组变化的倍数。实验组与对照组的比较采用t检验,实验组组间的比较采用SNK法或q检验,检验水准为双侧 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞来源鉴定

培养细胞的鉴定结果为波形丝蛋白染色阳性(图1),角蛋白染色阴性(图2),证实为PDLF。

2.2 外源性bFGF刺激PDLF

对照组PDLF于镜下观察,未见明显变化;实验组PDLF可见细胞增殖,bFGF刺激前瓶底细胞较稀疏的区域在刺激后细胞密集。

2.3 RNA提取结果鉴定

细胞内总RNA提取的电泳结果可见3条明显的条带,分别代表28 S、18 S和5 S,为细胞内总RNA的特征带型,提示总RNA未被降解。 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}=1.817$, $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}=1.704$,2个比值均在正常范围

内,表明所提取的RNA基本无蛋白质污染,无盐分残存。

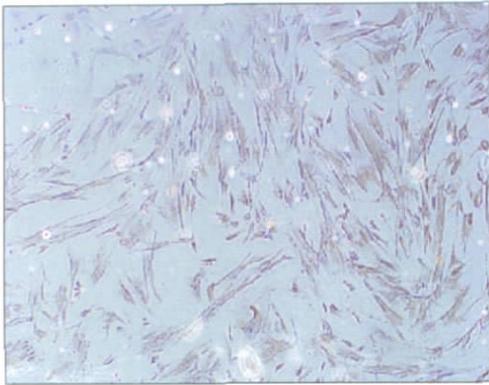


图1 波形丝蛋白染色阳性 SP ×100

Fig 1 Staining of crinkle fibroin was positive SP ×100

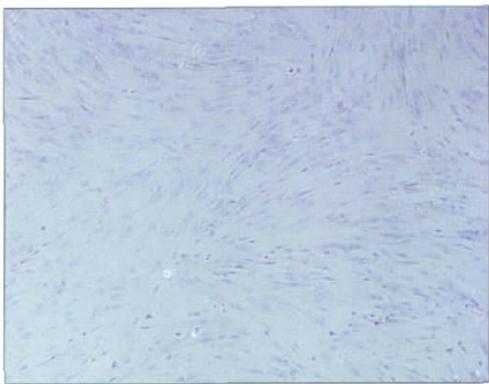


图2 角蛋白染色阴性 SP ×100

Fig 2 Staining of keratin was negative SP ×100

2.4 实时荧光定量PCR结果及数据分析

2.4.1 基因扩增效率的比较 根据整合素β1亚单位和GAPDH的ΔCT值作图(图3),得出直线斜率为0.044 3,该斜率绝对值小于0.1,说明目的基因整合素β1亚单位和内参照基因GAPDH的扩增效率基本相同,可以应用2^{-ΔΔCT}法进行相对定量分析。

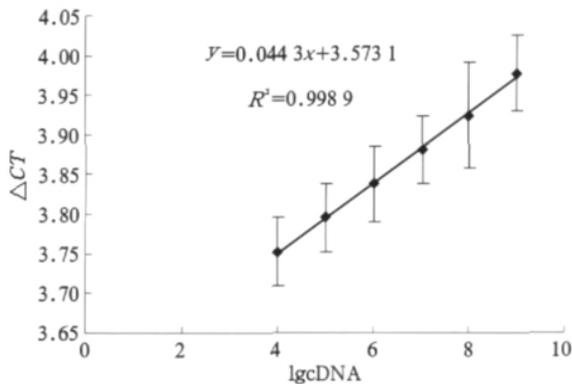


图3 目的基因与内参照基因扩增效率的比较

Fig 3 Comparison of amplification efficiency of objective gene and reference gene

2.4.2 实验组与对照组细胞在不同培养时间内整合素β1亚单位mRNA表达的差异 采用2^{-ΔΔCT}法计算2组细胞整合素β1亚单位mRNA表达的差异,其在不同

同培养时间的2^{-ΔΔCT}值见表1。对表1的数据进行纵向和横向比较,结果如下。

表1 实验组与对照组细胞在培养24、48、72 h时整合素β1亚单位mRNA表达的2^{-ΔΔCT}值

Tab 1 2^{-ΔΔCT} of β1 integrin subunit mRNA in 24, 48, 72 h of experimental and control groups

组别	培养时间/h		
	24	48	72
对照组	1	1	1
0.1 ng·mL ⁻¹ 组	1.28±0.14	1.14±0.08	2.35±0.27
1.0 ng·mL ⁻¹ 组	1.70±0.09	1.24±0.04	5.41±0.07
10.0 ng·mL ⁻¹ 组	1.18±0.09	0.91±0.07	6.66±0.59

1)培养24 h时,1.0 ng·mL⁻¹组整合素β1亚单位的表达量明显高于对照组(P<0.05),0.1 ng·mL⁻¹组、10.0 ng·mL⁻¹组与对照组的差异无统计学意义(P>0.05);实验组组间比较,1.0 ng·mL⁻¹组明显高于0.1 ng·mL⁻¹和10.0 ng·mL⁻¹组(P<0.05),而0.1 ng·mL⁻¹组与10.0 ng·mL⁻¹组的差异无统计学意义(P>0.05)。2)培养48 h时,1.0 ng·mL⁻¹组的表达量明显高于对照组(P<0.05),0.1 ng·mL⁻¹组、10.0 ng·mL⁻¹组与对照组比较无明显差异(P>0.05);实验组组间比较,1.0 ng·mL⁻¹组明显高于10.0 ng·mL⁻¹组(P<0.05),而0.1 ng·mL⁻¹组与其他2个实验组的差异无统计学意义(P>0.05)。3)培养72 h时,3个实验组的表达量均明显高于对照组(P<0.05);实验组组间比较,0.1 ng·mL⁻¹组明显低于其他2组(P<0.05),1.0 ng·mL⁻¹组与10.0 ng·mL⁻¹组的差异无统计学意义(P>0.05)。

0.1、1.0、10.0 ng·mL⁻¹组在培养24 h时其整合素β1亚单位表达量与培养48 h时无明显差异(P>0.05),而培养72 h时的表达量明显高于培养24、48 h时(P<0.05)。

3 讨论

在牙周组织修复再生过程中,首先发生的生物学行为是PDLF在牙根面的黏附,黏附质量的高低对后续发生的增殖、分化等生物学行为具有重要的影响。bFGF是一种具有广泛生物学作用的肽类物质,现已证明bFGF具有调控PDLF增殖、分化、矿化等生物学作用。整合素是介导细胞与ECM黏附作用的主要因子,由α、β亚基组成,其中β亚基是细胞黏附所必需的,而α亚基只起调节作用。整合素胞外部分识别并结合ECM中的RGD(Arg-Gly-Asp)序列,胞内部分则通过某些黏合斑胞质蛋白与细胞骨架(cytoskeleton, CSK)中的微丝和中间纤维相连。将含有RGD序列的蛋白涂在牙根面上,有助于PDLF黏附^[2],而RGD序列抑制肽可以阻止PDLF黏附^[3];中间

纤维连接细胞核表面和核基质,在细胞质中又与微管、微丝及其他细胞器广泛相联。ECM、整合素、CSK和细胞核形成了一个完整的网架系统,细胞外的机械力信号和化学信号就沿此“轨道”传导^[4]。整合素 $\beta 1$ 亚单位介导PDLF黏附于ECM,主要的信号转导途径包括:FAK-ERK1/2途径^[5],FAK-Ras-MAPK途径,FAK-P123k途径^[6-8]等。整合素与ECM结合,导致信号转导途径激活,对细胞黏附和趋化很重要。研究^[9]表明:整合素 $\beta 1$ 亚单位的激活有助于黏附细胞其余信号途径的后续激活,包括PI3K/Akt途径,后者的激活已被证明可参与FAs(focal adhesions)和肌动蛋白细胞骨架的重组。

PDLF的ECM主要成分是I型胶原,整合素介导PDLF黏附于胶原^[2],参与ECM的黏附调节。有研究^[10]发现,整合素 $\alpha 11\beta 1$ 是小鼠胚胎成纤维细胞型胶原的主要受体,是PDLF移动和胶原重组所必需的,是牙齿胎向萌出的动力。整合素 $\alpha 11\beta 1$ 基因缺陷小鼠的胚胎成纤维细胞表现出以下特点:细胞在I型胶原表面的黏附和伸展大大降低,对胶原网络的收缩能力降低,细胞增殖减少。整合素 $\beta 1$ 主要参与I、II型胶原的收缩,说明整合素在ECM修复、牙周组织再生中起重要作用。

本实验采用实时荧光定量PCR法检测bFGF对人PDLF表达整合素 $\beta 1$ 亚单位的影响。实时荧光定量PCR有绝对定量和相对定量之分,绝对定量通过标准曲线得到起始模板的精确拷贝数,相对定量通过内参照的标定可分析基因在样本中的表达差异,分为相对标准曲线法和比较 CT 法($2^{-\Delta\Delta CT}$ 法)。本研究采用相对定量法,通过优化反应条件,使目的基因和内参照基因扩增效率基本一致,应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法处理数据。结果发现,1.0 ng·mL⁻¹组在培养24、48、72 h时整合素 $\beta 1$ 亚单位的表达均明显高于对照组,说明1.0 ng·mL⁻¹的bFGF对PDLF表达整合素 $\beta 1$ 亚单位的促进作用最强,可以作为临床应用bFGF的参考。培养72 h时,各实验组整合素 $\beta 1$ 亚单位的表达均明显高于24、48 h,可能是因为整合素对bFGF具有反作用所致。整合素信号可以使bFGF受体发生磷酸化而激活^[11],还可通过微丝骨架调节bFGF的作用,从而影响细胞的迁移、分化和增殖,在基因转录水平参与对成纤维细胞合成ECM的调控^[12],在牙周组织修复再生中起作用。

目前很多学者试图采用组织工程的方法达到牙周组织再生的目的。组织工程的三大要素是种子细胞、支架材料和生长因子。bFGF是研究较多的生长因子,它可调节PDLF的黏附、增殖、分化和矿化,

在牙周组织工程中具有多重作用。本研究发现,bFGF通过提高整合素 $\beta 1$ 亚单位的表达,促进PDLF增殖,参与ECM的调节,促进牙周组织再生,但其具体作用机制还有待于进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [2] Schliephake H, Scharnweber D, Dard M, et al. Functionalization of dental implant surfaces using adhesion molecules[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005, 73(1):88-96.
- [3] Hatakeyama J, Hatakeyama Y, Takahashi I, et al. Proliferation and adhesion of periodontal ligament cells on synthetic biominerals[J]. Oral Dis, 2007, 13(5):500-506.
- [4] 王丹,毛靖.细胞骨架系统与机械-生物信号转导[J].临床口腔医学杂志,2007,23(4):245-247.
WANG Dan, MAO Jing. Cytoskeleton system and mechanical-biological signal transduction[J]. J Clin Stomatol, 2007, 23(4):245-247.
- [5] Kasaj A, Willershausen B, Reichert C, et al. Human periodontal fibroblast response to a nanostructured hydroxyapatite bone replacement graft *in vitro*[J]. Arch Oral Biol, 2008, 53(7):683-689.
- [6] Salazar EP, Rozengurt E. Src family kinases are required for integrin-mediated but not for G protein-coupled receptor stimulation of focal adhesion kinase autophosphorylation at Tyr-397[J]. J Biol Chem, 2001, 276(21):17788-17795.
- [7] Cary LA, Han DC, Polte TR, et al. Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration[J]. J Cell Biol, 1998, 140(1):211-221.
- [8] Matter ML, Ruoslahti E. A signaling pathway from the $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha (v)\beta 3$ integrins that elevates bcl-2 transcription[J]. J Biol Chem, 2001, 276(30):27757-27763.
- [9] Wang HQ, Bai L, Shen BR, et al. Coculture with endothelial cells enhances vascular smooth muscle cell adhesion and spreading via activation of $\beta 1$ -integrin and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt[J]. Eur J Cell Biol, 2007, 86(1):51-62.
- [10] Popova SN, Barczyk M, Tiger CF, et al. $\alpha 11\beta 1$ integrin-dependent regulation of periodontal ligament function in the erupting mouse incisor[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(12):4306-4316.
- [11] 田芳,章雄文,林莉萍,等.整合素与生长因子受体之间的相互作用[J].中国癌症杂志,2005,15(4):392-394.
TIAN Fang, ZHANG Xiong-wen, LIN Li-ping, et al. Cross-talk between integrin and growth factor receptors[J]. China Oncology, 2005, 15(4):392-394.
- [12] 顾海峰,何清瀛,林子豪,等.微丝在碱性成纤维细胞生长因子调节伤口愈合中的作用[J].中华创伤杂志,2000,16(6):331-333.
GU Hai-feng, HE Qing-yan, LIN Zi-hao, et al. Effects of micro-filaments on basic fibroblast growth factor in regulating wound healing[J]. Chin J Traumatol, 2000, 16(6):331-333.