

[文章编号] 1000-1182(2008)02-0194-04

# 机械应力对人牙周膜成纤维细胞整合素 1 mRNA表达的调节

朱庆党<sup>1,2</sup>, 巢永烈<sup>2</sup>, 陈新民<sup>2</sup>, 赵 鹃<sup>1</sup>

(1. 浙江大学医学院附属口腔医院 修复科, 浙江 杭州 310006;

2. 口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 观察机械力刺激对人牙周膜成纤维细胞整合素 1 mRNA表达的影响。方法 用Forcel四点弯曲加载装置通过对体外培养的人牙周膜成纤维细胞分别施加不同动态张、压应力(强度为1 000、2 000、4 000  $\mu$ strain, 加力时间为0、0.5、1、4、8、12 h), 采用实时荧光定量PCR法研究机械力对人牙周膜成纤维细胞整合素 1 mRNA表达的影响。结果 施加动态的张、压应力后, 人牙周膜成纤维细胞整合素 1 mRNA表达量下调, 这种下调变化与所施加应力的性质、大小和作用持续时间相关。人牙周膜成纤维细胞整合素 1对张、压应力刺激的感应不完全一致, 机械力刺激越强, 整合素 1表达越明显。结论 动态张、压应力刺激在本实验提供的微应力范围内可以促进目的基因mRNA表达改变, 不同的机械力对细胞整合素 1效应不同。

[关键词] 人牙周膜成纤维细胞; 张应力; 压应力; 整合素 1

[中图分类号] R783 [文献标识码] A

Regulation of integrin 1 mRNA expression by mechanical stress in human periodontal ligament fibroblasts  
ZHU Qing-dang<sup>1,2</sup>, CHAO Yong-lie<sup>2</sup>, CHEN Xin-min<sup>2</sup>, ZHAO Juan<sup>1</sup>. (1. Dept. of Prosthodontics, The Affiliated Hospital of Stomatology, Medicine College of Zhejiang University, Hangzhou 310006, China; 2. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective To investigate the effect of different kinds of mechanical stress on the mRNA expression of integrin 1 subunit in cultured human periodontal ligament fibroblasts(hPDLF). Methods To scalp and remove the periodontal ligament attached to the mid-third part of the fresh root of young premolars extracted for the cause of orthodontics. Cultured hPDLF by the method of digesting by  $\alpha$ -type collagenase combining with tissue adhering. Then hPDLF was isolated and purified by cells passage. The sixth passage's cells were selected to be loaded. A new cyclic strain loading apparatus. Forcel four point bending device was used for mechanically loading. Cells were loaded by three levels(1 000, 2 000, 4 000  $\mu$ strain) of tensional and compressive forces and collected at different times(0, 0.5, 1, 4, 8, 12 h) course after strain loading. The quantity of integrin 1 mRNA in every group was analyzed by means of quantitative real-time PCR with the special primers of up- and down-regulated genes. Results Dynamic mechanical forces down-regulated the expression of integrin 1 subunit mRNA in hPDLF and the difference in groups by different magnitude, different kinds, and different time of mechanical forces loading were statistically significant. The stronger stimulated forces, the more down-regulated expression. Compression down-regulated the expression of integrin 1 subunit mRNA more than tension did. Conclusion Dynamic mechanical forces could regulate the expression of integrin 1 subunit mRNA. The difference among all the groups by different magnitudes, different kinds, and different time of mechanical forces loading were statistically significant.

[Key words] human periodontal ligament fibroblasts; tensional force; compressive force; integrin 1

整合素(integrins)是一类重要的细胞表面受体,

是机械信号传导中重要的跨膜分子, 其配体主要为细胞外基质蛋白, 如胶原蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白等。整合素的聚集和构型改变是细胞响应各种机械应力的起始, 并由此导致一系列胞内信号事件的级联反应。目前, 关于整合素在细胞响应机械应

[收稿日期] 2007-08-20; [修回日期] 2007-10-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30700959); 浙江省医药卫生科学研究基金资助项目(2007A131)

[作者简介] 朱庆党(1972-), 男, 云南人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 巢永烈, Tel: 028-85502335

力中的作用的研究较多为肌细胞、内皮细胞、骨细胞等<sup>[1-4]</sup>,而对于整合素在人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblasts, hPDLF)机械力信号传导中的作用研究较少。本实验拟用Forcel四点弯曲细胞力学加载装置对体外培养的hPDLF施加不同强度的动态张、压应力,采用实时荧光定量PCR法研究动态张、压应力对hPDLF整合素 1 mRNA表达的影响,为进一步探讨机械应力在hPDLF中的信号传导机制奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料与试剂、仪器设备

细胞加力板:75 cm<sup>2</sup>聚苯乙烯组织培养瓶(Falcon公司,美国),瓶壁切割成8.0 cm×8.5 cm的加力板,总RNA提取试剂(Gibco BRL公司,美国),RT-PCR试剂盒(TaKaRa公司,日本),dNTP、TaqDNA聚合酶(MBI公司,立陶宛),引物与探针(上海生物工程有限公司),GeneAmp PCR System 9600 PCR扩增仪(PE公司,美国),Gel Doc 1000凝胶成像系统(BIO-RAD公司,美国),FTC2000实时荧光定量基因扩增仪(加拿大枫岭公司),Forcel四点弯曲加力装置(四川大学华西口腔医院正畸科与成都电子科技大学联合开发)。

### 1.2 人牙周膜成纤维细胞加力

刮取牙根中1/3牙周膜组织,采用型胶原酶消化结合组织块贴附法进行hPDLF原代培养,传代分离、纯化,取第6代细胞,每瓶细胞消化、计数后,以每毫升2×10<sup>5</sup>个的密度接种于加力板上,每板细胞数量为2 mL。然后将加力板放入培养皿中,待细胞完全贴壁后加入生长培养基,37℃、饱和湿度、体积分数为95%空气、体积分数为5%CO<sub>2</sub>孵箱中培养。48 h后,将培养板浸泡于另一培养皿的生长培养基中,继续培养3 d,隔日换液。在细胞加力前1 d,将生长培养基换为分化培养基,在分化培养基中继

续培养1 d后使用,以促进细胞分化,让细胞充分融合,避免细胞融合对实验结果的影响。

采用Forcel四点弯曲加力装置,对接种了细胞的加力板加力,频率0.5 Hz,位移0.5 mm,加力板变形量1 000  $\mu$ strain(细胞变形量0.1%);位移1 mm,加力板变形量2 000  $\mu$ strain(细胞变形量0.2%);位移2 mm,加力板变形量4 000  $\mu$ strain(细胞变形量0.4%)。按照0、0.5、1、4、8、12 h分为6个加力时间段加力组,0 h组即为未加力组。

### 1.3 人牙周膜成纤维细胞整合素 1 mRNA定量分析

细胞加力后,将细胞按RNA提取试剂说明书提取总RNA,用RT-PCR法扩增目的基因cDNA片段,整合素 1引物的设计与合成:上游引物为5'-GG-CAGTGCATGTGACTGTT-3',下游引物为5'-CTGA-ACACATTCTTTATGCTC-3',Taqman探针为5'-CAG-ACCTGCCTTGGTGTCTG-3'。利用荧光定量PCR检测目的基因在人牙周膜成纤维细胞中的表达,扩增条件如下:94℃ 1 min;94℃ 10 s;55℃ 30 s;72℃ 1 min,45个循环。选GAPDH做管家基因,根据绘制的动力学曲线得到目的基因和管家基因的量,再将目的基因同管家基因的比值作为待测细胞目的基因相对拷贝数即定量的最后结果。

### 1.4 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件对数据进行统计处理。因所得数据均呈指数变化,所以采用求对数的方法计数平均拷贝数。对荧光定量PCR所得数据取常用对数后行ANOVA分析,并用SNK法进行两两比较。P<0.05为有统计学意义。

## 2 结果

从各样品定量PCR结果得出基因的相对拷贝数进行分析,数据结果以每微克RNA样品中的mRNA相对拷贝数表示(表1)。

表1 人牙周膜成纤维细胞整合素 1 mRNA的表达 Ig拷贝数/ $\mu$ g,  $\bar{x} \pm s$

Tab 1 mRNA expression of integrin 1 in hPDLF Igcopy/ $\mu$ g,  $\bar{x} \pm s$

应力( $\mu$ strain)	整合素 1 mRNA的表达					
	未加力组	0.5 h	1 h	4 h	8 h	12 h
张应力	1 000	1.105 $\pm$ 0.005	1.000 $\pm$ 0.001*	0.951 $\pm$ 0.001*	1.026 $\pm$ 0.004*	1.083 $\pm$ 0.003
	2 000	1.100 $\pm$ 0.005	0.900 $\pm$ 0.016*	1.024 $\pm$ 0.006*	1.119 $\pm$ 0.010	1.056 $\pm$ 0.014
	4 000	1.108 $\pm$ 0.008	1.081 $\pm$ 0.004	1.053 $\pm$ 0.003*	1.056 $\pm$ 0.001*	1.048 $\pm$ 0.008*
压应力	1 000	1.100 $\pm$ 0.002	1.118 $\pm$ 0.002	1.053 $\pm$ 0.003*	1.056 $\pm$ 0.001*	1.000 $\pm$ 0.001*
	2 000	1.105 $\pm$ 0.005	1.083 $\pm$ 0.003	1.000 $\pm$ 0.002*	1.056 $\pm$ 0.002*	1.000 $\pm$ 0.003*
	4 000	1.110 $\pm$ 0.002	1.000 $\pm$ 0.005*	1.048 $\pm$ 0.008*	1.025 $\pm$ 0.003*	0.919 $\pm$ 0.001*

注:同未加力组比较,\*P<0.05

经统计学分析比较动态张、压应力与加力时间的关系后发现：1)施加张应力1 000  $\mu\text{strain}$ 时，整合素  $\beta 1$  mRNA表达量随着加力时间延长逐渐下降，1 h达谷底，后表达量又开始升高，8 h升至未加力组水平( $P>0.05$ )，在加力0.5、1、4 h时表达量低于未加力组( $P<0.05$ )；施加张应力2 000  $\mu\text{strain}$ 时，整合素

1 mRNA表达量随着加力时间延长逐渐下降，下降较1 000  $\mu\text{strain}$ 组快，1 h达谷底，后表达量又开始升高，4 h升至未加力组水平( $P>0.05$ )，在加力0.5、1 h表达量低于未加力组( $P<0.05$ )；施加张应力4 000  $\mu\text{strain}$ 时，整合素 1 mRNA表达量加力后逐渐下降，除0.5 h，其余时段与未加力组比较，差异均有统计学意义( $P<0.05$ )，图1)。2)施加压应力1 000  $\mu\text{strain}$ 时，整合素 1 mRNA表达量随着加力时间延长逐渐下降，在加力1、4、8、12 h时其表达差异均有统计学意义( $P<0.05$ )；施加压应力2 000  $\mu\text{strain}$ 时，mRNA表达量变化与1 000  $\mu\text{strain}$ 组相同，两种大小力比较，其差异没有统计学意义( $P>0.05$ )；施加压应力4 000  $\mu\text{strain}$ 时，整合素 1 mRNA表达量随着加力时间延长逐渐下降，在每一时段与未加力组比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )，图2)。

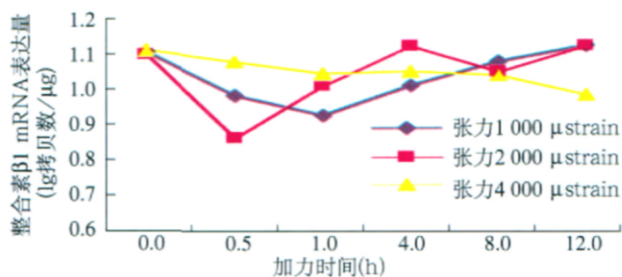


图1 张力组整合素 $\beta 1$  mRNA表达量与加力时间的关系

Fig 1 The relation between integrin  $\beta 1$  mRNA expression and loading time in tensile forces group

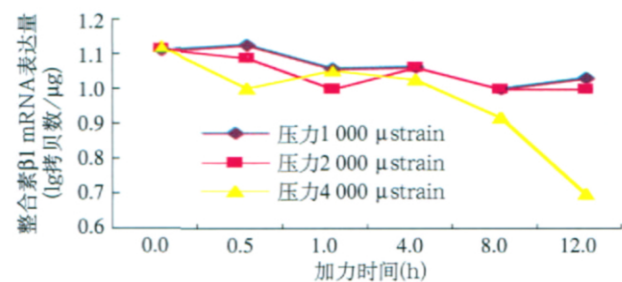


图2 压力组整合素 $\beta 1$  mRNA表达量与加力时间的关系

Fig 2 The relation between integrin  $\beta 1$  mRNA expression and loading time in compressive forces group

经统计学分析比较不同动态张、压应力大小与加力时间的关系后发现：1)加力1 000  $\mu\text{strain}$ 时，张应力与压应力组随着加力时间延长变化不同，张应力组整合素 1 mRNA表达量随着加力时间延长逐渐下降，1 h达谷底，后表达量又开始升高，8 h升至

未加力组水平( $P>0.05$ )；压应力组整合素 1 mRNA表达量加力以后逐渐下降，在加力1、4、8、12 h时的表达差异均有统计学意义( $P<0.05$ )，图3)。2)加力2 000  $\mu\text{strain}$ 时，张应力与压应力组随着加力时间延长变化也不同，整合素 1 mRNA表达量随着加力时间延长逐渐下降，1 h达谷底，后表达量又开始升高，4 h升至未加力组水平( $P>0.05$ )，在加力0.5、1 h表达量低于未加力组( $P<0.05$ )；压应力组加力后mRNA表达量逐渐下降，在加力1、4、8、12 h时的表达差异均有统计学意义( $P<0.05$ )，图4)。3)加力4 000  $\mu\text{strain}$ 时，张应力组与压应力组整合素 1 mRNA表达量随着加力时间延长均出现逐渐下降，张应力组下降速度较压应力组慢，下降幅度较压应力组小，两者差异有统计学意义( $P<0.05$ )，图5)。

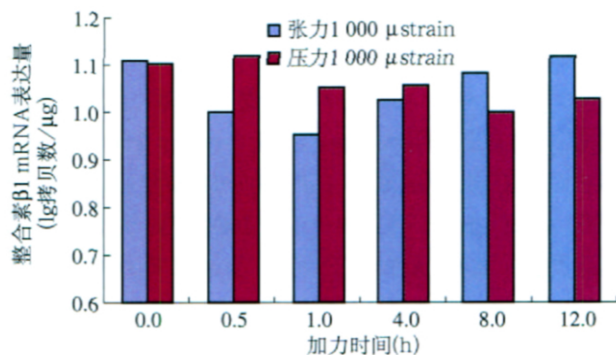


图3 1 000  $\mu\text{strain}$ 张、压应力与整合素 $\beta 1$  mRNA表达量的效应关系

Fig 3 The effect of 1 000  $\mu\text{strain}$  tensile and compressive forces on integrin  $\beta 1$  mRNA expression

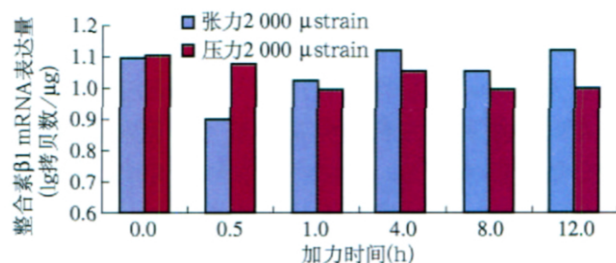


图4 2 000  $\mu\text{strain}$ 张、压应力与整合素 $\beta 1$  mRNA表达量的效应关系

Fig 4 The effect of 2 000  $\mu\text{strain}$  tensile and compressive forces on integrin  $\beta 1$  mRNA expression

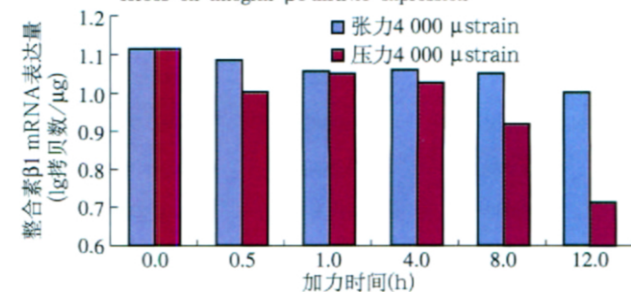


图5 4 000  $\mu\text{strain}$ 张、压应力与整合素 $\beta 1$  mRNA表达量的效应关系

Fig 5 The effect of 4 000  $\mu\text{strain}$  tensile and compressive forces on integrin  $\beta 1$  mRNA expression

### 3 讨论

越来越多的研究表明整合素的聚集和构型改变是细胞响应各种机械应力的起始,并由此导致一系列胞内信号事件的级联反应,整合素主要集中于聚焦黏附区域,起到变力学信号为化学信号的作用<sup>[5-9]</sup>。Wang等<sup>[7]</sup>采用裱衬了纤粘连蛋白的微球对细胞进行剪切加载发现,力可以直接传入细胞骨架(表现为细胞硬度指数随应变增大而增高),而若微球未裱衬或裱衬其他非整合素的配体,则力信号不能直接传入细胞骨架;利用磁扭转细胞计,将机械应力直接作用于细胞表面受体证实:整合素1能将机械信号传递至细胞骨架,诱导聚焦黏附的形成,支持力依赖性细胞硬度反应。这说明整合素是外力传向细胞骨架的通道,细胞通过其表面的整合素受体即时响应机械应力,以张力整(tensegrity)的形式将响应的力信号有选择地转换到细胞和核内的不同结构部件上,如聚焦黏附斑中的信号分子、细胞膜中的离子通道、核糖体、核膜孔、染色体、甚至可能是单个基因,实现力化学转化,从而调节细胞的生理机能,对维持细胞的铺展和生长,影响细胞的功能产生调控作用。

对于整合素在机械传导中的作用仍需进一步研究,如不同类型的细胞在不同形式的机械应力中响应情况,不同类型的整合素作为机械导体在功能上的专一性;整合素与其他信号分子间的相互作用等。目前,对于机械应力与整合素介导的信号传导关系研究较多的有平滑肌细胞、内皮细胞、骨细胞等<sup>[1-4]</sup>,对于整合素在牙周膜成纤维细胞的机械应力信号传导中的作用研究较少。

有学者研究<sup>[9]</sup>发现hPDLF表面有多种整合素亚族的存在,含量最丰富的是整合素1亚族。关于hPDLF中整合素在机械力刺激后的变化的研究较少。Bolcato-Bellemin等<sup>[9]</sup>对hPDLF施加20 kPa的持续性牵张力12 h后,发现整合素4 mRNA在加力前后无变化,而整合素6和1的mRNA在加力后增加,整合素5表达减少。

本研究采用Forcel四点弯曲细胞力学加载装置对体外培养的hPDLF施加不同强度的动态张、压应力,用实时荧光定量PCR法研究动态张、压应力对人牙周膜成纤维细胞整合素1 mRNA表达的影响。实验结果表明:体外培养的hPDLF在受到本实验提供的动态张、压应力作用下,整合素1 mRNA表达量下调,这种下调变化与所施加应力的性质、大小和作用持续时间相关。较小的张应力作用使整合素

1 mRNA表达量很快下调,随着时间延长又很快恢复至对照组水平,较大的张应力使整合素1 mRNA表达量持续下调;较小的压应力和较大的压应力均使整合素1 mRNA表达量持续下调,应力越大,表达量下调的量越大;相同大小的张应力和压应力比较,作用结果有显著差异,较小的张应力使整合素1 mRNA表达量下调后又上调,较小的压应力整合素1 mRNA表达量持续下调,较大的张、压应力均使整合素1 mRNA表达量持续下调,压应力下调的幅度较相同的张应力要大。结果提示:hPDLF整合素1参与了机械力的信号传导,但整合素1对张应力和压应力刺激的感应不完全一致。初步揭示了机械力作用下hPDLF整合素1的变化规律,为机械应力在hPDLF中传导的后续研究提供了基础。

### [参考文献]

- [1] Ogle BM, Mooradian DL. The role of vascular smooth muscle cell integrins in the compaction and mechanical strengthening of a tissue-engineered blood vessel[J]. *Tissue Eng*, 1999, 5(4):387-402.
- [2] Shyy JY, Chien S. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress[J]. *Circ Res*, 2002, 91(9):769-775.
- [3] Bierbaum S, Notbohm H. Tyrosine phosphorylation of 40 kDa proteins in osteoblastic cells after mechanical stimulation of beta1-integrins[J]. *Eur J Cell Biol*, 1998, 77(1):60-67.
- [4] 张京剧, 陈扬熙, 肖立伟, 等. 正畸移动后大鼠牙周炎整合素1 mRNA变化的实验研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2005, 23(2):161-163.  
ZHANG Jing-ju, CHEN Yang-xi, XIAO Li-wei, et al. The integrin 1 mRNA changes after orthodontic movement of teeth in periodontitis rats[J]. *West China J Stomatol*, 2005, 23(2):161-163.
- [5] Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: Functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin superfamily members[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002, 42:283-323.
- [6] Schwartz MA. Integrin signaling revisited[J]. *Trends Cell Biol*, 2001, 11(12):466-470.
- [7] Wang N, Butler JP, Ingber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton[J]. *Science*, 1993, 260(5111):1124-1127.
- [8] Palaiologou AA, Yukna RA, Moses R, et al. Gingival, dermal, and periodontal ligament fibroblasts express different extracellular matrix receptor[J]. *J Periodontol*, 2001, 72(6):798-807.
- [9] Bolcato-Bellemin AL, Elkaim R, Abehsera A, et al. Expression of mRNAs encoding for alpha and beta integrin subunits, MMPs, and TIMPs in stretched human periodontal ligament and gingival fibroblasts[J]. *J Dent Res*, 2000, 79(9):1712-1716.

(本文编辑 汤亚玲)