

Sirt1 促进炎症牙周膜干细胞成骨分化的机制

孔祥伟,尹伟,王晨辰,张林,程义成

摘要 目的 探讨去乙酰化酶 1(Sirt1)对炎症牙周膜干细胞(PDLSCs)成骨分化的作用,并研究其可能的分子机制。**方法** 分离、培养正常及炎症 PDLSCs,观察 Sirt1 在两种细胞中的表达;将炎症 PDLSCs 进行成骨诱导,同时使用 Sirt1 激动剂白芦藜醇上调炎症 PDLSCs 中的 Sirt1,观察炎症 PDLSCs 的成骨分化情况,Western blot 检测 Runx2、乙酰化 NF- κ B、乙酰化 FoxO1 和 FoxO1 的表达。**结果** 炎症 PDLSCs 中 Sirt1 的表达较正常 PDLSCs 减少($P < 0.01$);白芦藜醇可上调炎症 PDLSCs 中 Sirt1 的表达;与成骨诱导组比较,成骨诱导 + 白芦藜醇组炎症 PDLSCs 中 BSP($t = 14.045, P < 0.01$)、Runx2($t = 3.349, P < 0.01$)、OCN($t = 7.218, P < 0.01$)和 Osx($t = 4.544, P < 0.01$) mRNA 的表达增加,ALP 染色增强($P < 0.01$);炎症 PDLSCs 成骨诱导后 FoxO1($t = 8.737, P < 0.01$)和 Runx2($t = 6.152, P < 0.01$)的表达增强;使用白芦藜醇上调 Sirt1 的表达后, FoxO1($t = 5.912, P < 0.01$)和 Runx2($t = 6.277, P < 0.01$)的表达较成骨诱导组进一步增加,而乙酰化 NF- κ B($F = 184.033, P < 0.01$)和乙酰化 FoxO1($F = 301.454, P < 0.01$)的表达较对照组和成骨诱导组明显降低。**结论** 去乙酰化酶 Sirt1 可以通过去乙酰化 NF- κ B 和 FoxO1,从而促进炎症 PDLSCs 的成骨分化。

关键词 去乙酰化酶 Sirt1; 炎症牙周膜干细胞;成骨分化

中图分类号 R 781.4+2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0876-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.030

牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSCs)在牙周组织再生修复中发挥重要作用^[1]。然而,炎症 PDLSCs 的再生功能受损,给牙周炎患者使用自体 PDLSCs 治疗带来困难^[2-3]。细菌感染和慢性炎症会导致细胞发生表观遗传修饰的改变,从而导致再生能力的下降。去乙酰化酶 1(Sirtuin 1, Sirt1)在多细胞有机体中广泛存在,通过将组蛋白去乙酰化,参与多种生命过程^[4]。Sirt1 也是骨密度的

重要调节因子^[5]。但 Sirt1 对炎症 PDLSCs 成骨分化的影响及其机制尚未见相关研究报道。该研究在炎症 PDLSCs 成骨诱导过程中使用 Sirt1 激动剂白芦藜醇上调细胞中的 Sirt1,观察 Sirt1 对炎症 PDLSCs 成骨分化的影响;同时,检测叉头框蛋白 O(forkhead box O protein, FoxO)和核内转录调节因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的表达,明确 Sirt1 调控炎症 PDLSCs 的分子机制可以为恢复疾病状态下干细胞的再生能力提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 DMEM 培养基、胎牛血清、青霉素、链霉素、PBS(美国 Gibco 公司);I 型胶原酶、胰蛋白酶、 β -甘油磷酸钠、地塞米松、LPS(美国 Sigma 公司);白芦藜醇(美国 Selleckchemicals 公司);谷氨酰胺、TRIzol Reagent(美国 Invitrogen 公司);BCIP/NBT 碱性磷酸酶染色试剂盒、RIPA 细胞裂解液、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒(日本 Takara 公司);Sirt1 抗体、Runx2 抗体(美国 Cell Signaling 公司);乙酰化 NF- κ B 抗体、乙酰化 FoxO1 抗体、FoxO1 抗体(美国 Abcam 公司); β -actin 抗体(江苏康为世纪生物技术有限公司);ECL 发光试剂盒(美国 Pierce 公司);7500 型快速实时荧光定量 PCR 仪(德国 Applied Biosystems 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);JS-860A 自动凝胶成像仪(上海培清科技有限公司)。

1.2 正常与炎症 PDLSCs 的分离和培养 正常 PDLSCs 来自于健康个体,年龄 20~35(28.00 \pm 3.53)岁;炎症 PDLSCs 来自于慢性牙周炎患者,年龄 31~40(35.00 \pm 4.27)岁。两种组织均来自于因正畸需要而拔除的、无龋坏的前磨牙。用无菌手术刀片刮取牙齿根中 1/3 的牙周膜组织,接种至 6 孔板内,每隔 3 d 更换培养液,直至有细胞从组织块边缘爬出。细胞生长达 80% 汇合时胰酶消化传代。取第 3~5 代细胞用于本实验研究。

1.3 成骨诱导分化 取炎症 PDLSCs 制备细胞悬

2022-12-09 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81901046);江苏省自然科学基金(编号:BK20170115)

作者单位:东部战区总医院口腔科,南京 210002

作者简介:孔祥伟,女,主治医师;

程义成,男,副主任医师,责任作者, E-mail: chengyicheng0220@163.com

液,以 2×10^4 /孔的密度接种于 6 孔板中,在细胞达到 70% 汇合后,将培养液更换为成骨诱导液(含 5% 胎牛血清的 DMEM,地塞米松 0.1 mol/L , β -甘油磷酸钠 0.01 mol/L ,维生素 C $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$),每隔 3 d 换液。倒置相差显微镜下观察,细胞呈复层生长并出现圆形结节。实验分为 4 组,① 对照组:炎症 PDLSCs;② 白芦藜醇组:炎症 PDLSCs + 白芦藜醇;③ 成骨诱导组:炎症 PDLSCs + 成骨诱导;④ 成骨诱导 + 白芦藜醇组:炎症 PDLSCs + 成骨诱导 + 白芦藜醇。

1.4 ALP 染色 吸弃培养液,PBS 洗涤,4% 多聚甲醛固定 1 h,PBS 洗涤后,每孔加入 1 ml BCIP/NBT 工作液,室温避光放置 30 min,吸弃工作液,PBS 洗涤,显微镜下拍照。

1.5 实时定量 PCR 检测 收集培养的炎症 PDLSCs,加入 TRIzol Reagent 裂解细胞,提取总 RNA。反转录操作步骤按照反转录试剂盒的说明书进行。进行反转录反应后,将得到的 cDNA 模板按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa Code: DRR081) 操作说明书加入检测体系,使用 ABI 7500 实时定量仪进行 Real-time PCR 反应。检测 ALP、Runx2、OCN 和 Osx 的表达, β -actin 为内参。引物序列由上海生物工程公司设计合成,见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列
ALP	F:5'-GGACCATCCACGCTCTTCAC-3' R:5'-CCTTGTAGCCAGGCCATTG-3'
Runx2	F:5'-CCCGTGGCCTTCAAGGT-3' R:5'-CGTTACCCGCCATGACAGTA-3'
OCN	F:5'-CCCAGGCGTACCTGTATCAA-3' R:5'-GGTCAGCCAACTCGTCACAGTC-3'
Osx	F:5'-CCAGAAGAAGTGGTACATCAGCAA-3' R:5'-CGCCATACTCGAAGTGAATC-3'
Sirt1	F:5'-CCCAGAACATAGACACGCTGGA-3' R:5'-ATCAGCTGGGCACCTAGGACA-3'
β -actin	F:5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3' R:5'-CTAAGTCATAGTCCGCTAGAAGCA-3'

1.6 Western blot 检测 使用 RIPA 裂解液提取细胞蛋白。使用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。按照 4 : 1 的比例加入 $5 \times$ loading buffer, $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5 min 水煮变性。将蛋白样本用 $1 \times$ loading buffer 调整到同一体积。进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳停止后切胶、转膜。5% 牛血清白蛋白室温封闭 2 h。封一抗, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜。复温 1 h 后洗膜液冲洗 3 次,放入二抗,室温孵育 1 h。ECL 发光液 A : B

= 1 : 1 混合,注意避光,均匀滴加在膜上,放入 JS-860A 自动凝胶成像仪曝光。用 QuantityOne 软件分析各条带的灰度值,以 β -actin 为参照,计算相对灰度值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,以上实验均重复 3 次,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Sirt1 在正常 PDLSCs 和炎症 PDLSCs 中的表达 通过有限稀释法获取人正常和炎症组织来源的 PDLSCs,Western blot 检测两种 PDLSCs 中去乙酰化酶 Sirt1 的表达情况。Western blot 结果显示,在正常 PDLSCs 中 Sirt1 的蛋白表达水平较高,而在炎症 PDLSCs 中 Sirt1 的表达受到抑制,差异有统计学意义($t = 5.237, P < 0.01$)。见图 1。

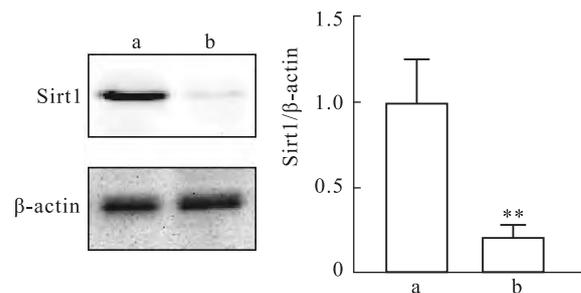


图 1 Western blot 检测 Sirt1

在正常 PDLSCs 和炎症 PDLSCs 中的表达

a: 正常 PDLSCs; b: 炎症 PDLSCs; 与正常 PDLSCs 比较: ** $P < 0.01$

2.2 白芦藜醇对炎症 PDLSCs 成骨分化的影响

在培养的炎症 PDLSCs 中加入 Sirt1 激动剂白芦藜醇,实时定量 PCR 和 Western blot 检测 Sirt1 的表达。结果表明,白芦藜醇可增加炎症 PDLSCs 中 Sirt1 的表达。将炎症 PDLSCs 进行成骨诱导,同时使用白芦藜醇上调炎症 PDLSCs 中的 Sirt1,诱导 3 d 后实时定量 PCR 检测 BSP、Runx2、OCN 和 Osx mRNA 的表达,诱导 7 d 后进行 ALP 染色。实时定量 PCR 结果显示,与成骨诱导组比较,在成骨诱导时加入白芦藜醇可增加 BSP ($t = 14.045, P < 0.01$)、Runx2 ($t = 3.349, P < 0.01$)、OCN ($t = 7.218, P < 0.01$) 和 Osx ($t = 4.544, P < 0.01$) mRNA 的表达。ALP 染色结果表明,成骨诱导 + 白芦藜醇组的 ALP 染色较成骨诱导组增强 ($t = 11.513, P < 0.01$),说明白芦藜醇可增强炎症 PDLSCs 的成骨分化。见图 2、表 2。

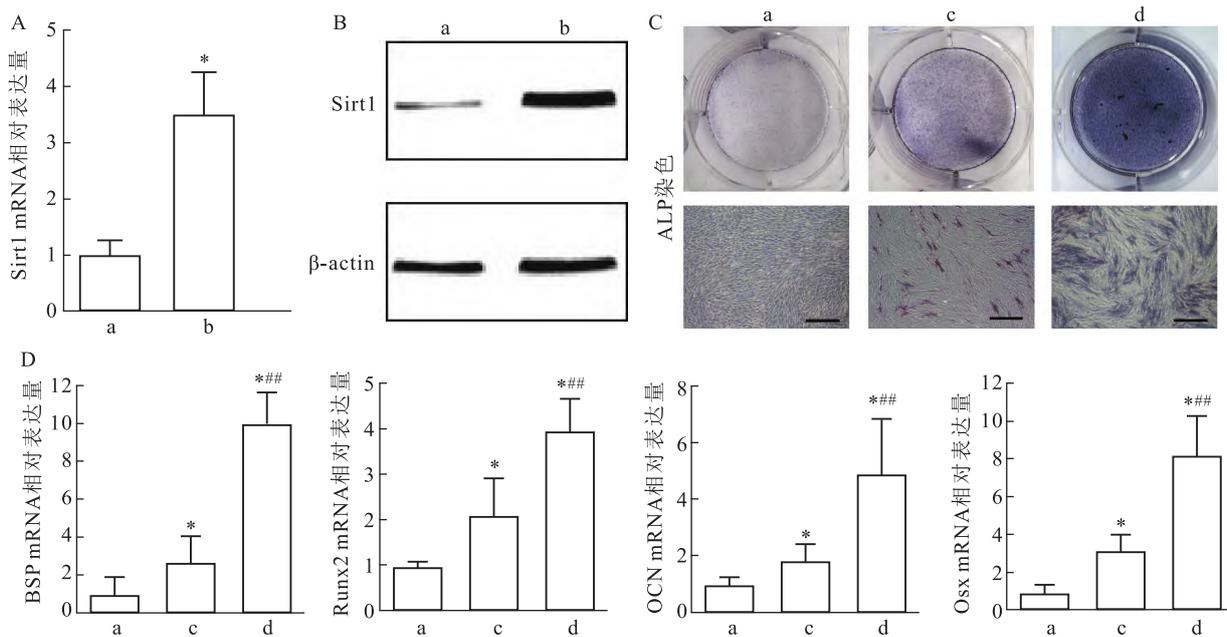


图2 实时定量PCR和Western blot检测白芦藜醇对炎症PDLSCs中Sirt1表达的影响

A:实时定量PCR检测Sirt1 mRNA的表达;B:Western blot检测Sirt1的表达;C:ALP染色(Bar = 100 μm);D:实时定量PCR检测BSP、Runx2、OCN和Osx mRNA的表达;a:对照组;b:白芦藜醇组;c:成骨诱导组;d:成骨诱导 + 白芦藜醇组;与对照组比较:* P < 0.05;与成骨诱导组比较:## P < 0.05

表2 实时定量PCR检测BSP、Runx2、OCN和Osx mRNA相对表达量(̄x ± s)

组别	BSP	Runx2	OCN	Osx
对照	0.880 7 ± 0.806 8	0.956 7 ± 0.112 5	0.960 7 ± 0.283 3	0.879 6 ± 0.458 7
成骨诱导	2.651 0 ± 1.367 3 *	2.080 0 ± 0.826 6 *	1.810 0 ± 0.592 5 *	3.135 0 ± 0.876 6 *
成骨诱导 + 白芦藜醇	9.980 0 ± 1.645 7 *##	3.926 7 ± 0.735 0 *##	4.876 7 ± 1.949 3 *##	8.172 3 ± 2.030 3 *##

与对照组比较:* P < 0.05;与成骨诱导组比较:## P < 0.01

2.3 Sirt1对炎症PDLSCs成骨诱导过程中FoxO1和NF-κB表达的影响 将炎症PDLSCs进行成骨诱导,同时使用白芦藜醇上调炎症PDLSCs中的Sirt1,成骨诱导7 d,Western blot检测Sirt1、乙酰化NF-κB、乙酰化FoxO1、FoxO1和Runx2的表达。结果显示:与对照组比较,炎症PDLSCs成骨诱导后FoxO1($t = 8.737, P < 0.01$)和Runx2($t = 6.152, P < 0.01$)的表达增强;在成骨诱导 + 白芦藜醇组中,炎症PDLSCs中Sirt1($F = 71.260, P < 0.01$)的表达较对照组和成骨诱导组上调,同时FoxO1($t = 5.912, P < 0.01$)和Runx2($t = 6.277, P < 0.01$)的表达较成骨诱导组进一步增加,而乙酰化NF-κB($F = 184.033, P < 0.01$)和乙酰化FoxO1($F = 301.454, P < 0.01$)的表达较对照组和成骨诱导组明显降低。见图3。

3 讨论

表观遗传学是指在基因的核苷酸序列不发生改

变的情况下,由于体内、外环境因素的影响,基因表达了可遗传的变化^[6]。近年来研究发现,人体多种疾病的发生、发展都与表观遗传密切相关。类风湿关节炎患者的间充质干细胞表现出较低的增殖能力,并且数量会随着年龄的增加而减少^[7]。系统性红斑狼疮患者的骨髓间充质干细胞则表现出成骨能力的下降^[8]。课题组在前期的实验中^[9]观察到炎症PDLSCs在脱离炎症环境后,经过长期的体外培养和传代,仍然存在成骨功能的缺陷,这可能是由于在长期的慢性炎症微环境中PDLSCs发生了表观遗传的改变。

表观遗传现象包括DNA甲基化,组蛋白甲基化、乙酰化和泛素化等。其中,组蛋白乙酰化作用主要由两种功能相反的酶——组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferases, HATs)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)来完成。HATs通过对组蛋白产生乙酰化作用,导致特定位点的染色质解螺旋,从而起到转录活化的作用;而HDACs可

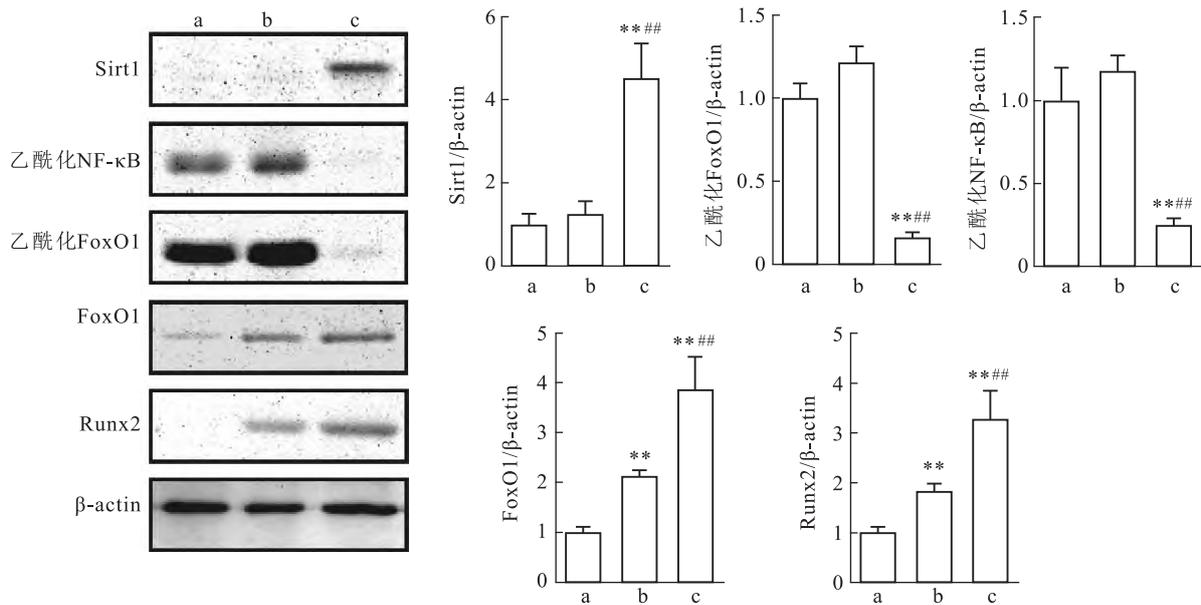


图3 Western blot 检测炎症 PDLSCs 中 Sirt1、乙酰化 NF-κB、乙酰化 FoxO1、FoxO1 和 Runx2 的表达

a: 对照组; b: 成骨诱导组; c: 成骨诱导 + 白芦藜醇组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与成骨诱导组比较: ## $P < 0.01$

将组蛋白尾部的乙酰基去除,起转录抑制的作用^[10]。Sirt1 是一种在细胞中广泛存在的去乙酰化酶,可通过去乙酰化作用,维持细胞内环境的稳态,调控基因的表达,参与细胞的增殖、分化、衰老、凋亡和炎症等生命活动过程^[11]。Sirt1 通过对多种转录后调节因子的去乙酰化,如 p53、FOXO、NF-κB 以及过氧化物酶体增殖体激活受体 γ 等,调控细胞周期,参与 DNA 双链修复以及基因沉默等过程,与众多疾病相关^[11]。本研究比较了正常及炎症组织来源的 PDLSCs 中 Sirt1 的表达,发现在正常 PDLSCs 中 Sirt1 的蛋白表达水平较高,而在炎症 PDLSCs 中 Sirt1 的表达受到抑制。有研究^[12]报道,在动脉粥样硬化小鼠主动脉中 Sirt1 的表达受到抑制,与 miR-29c 的表达上调有关。同样,LPS 诱导的外周血单核细胞中 Sirt1 的表达下调,可能与 miR-217 的高表达有关^[13]。由此推测,炎症 PDLSCs 中 Sirt1 的表达下调可能与干细胞微环境的改变有关。本研究使用 Sirt1 激动剂白芦藜醇上调炎症 PDLSCs 中的 Sirt1,结果发现白芦藜醇可以有效促进炎症 PDLSCs 的成骨分化,说明 Sirt1 在炎症 PDLSCs 成骨分化的过程中起到了积极的作用。

目前已知受到 Sirt1 调控的分子包括 NF-κB、FoxO1 等转录因子。NF-κB 的乙酰化是其发挥转录活性、激活炎症反应的必要条件。Chen et al^[14]研究表明,TNF- α 激活 NF-κB 后,PDLSCs 成骨分化受到

抑制。本研究发现,在炎症 PDLSCs 中 Sirt1 的表达较低而乙酰化 NF-κB 的表达较高;在加入白芦藜醇上调 Sirt1 后,乙酰化 NF-κB 的表达下降,成骨相关蛋白 Runx2 的表达增多,说明乙酰化 NF-κB 在炎症 PDLSCs 的成骨分化中起负向调控作用。FoxO1 是调控成骨的重要因子。在成骨细胞中 FoxO1 可对抗骨骼内的氧化应激反应,维持成骨细胞的正常增殖;在破骨细胞中 FoxO1 可促进成骨细胞前体向成骨细胞分化,对破骨细胞有抑制作用^[15]。FoxO1 的乙酰化能够促进其磷酸化,从而进一步发生泛素化降解。本研究发现,炎症 PDLSCs 成骨诱导后 FoxO1 的表达较对照组增强,在加入白芦藜醇上调 Sirt1 后 FoxO1 的表达进一步增强,与成骨相关蛋白 Runx2 的表达趋势一致,而乙酰化 FoxO1 的表达与 FoxO1 相反。以上结果表明,Sirt1 可以上调炎症 PDLSCs 中 FoxO1 的表达,同时下调乙酰化 FoxO1 的表达,促进炎症 PDLSCs 的成骨分化。

综上所述,去乙酰化酶 Sirt1 可能通过去乙酰化 NF-κB 和 FoxO1,从而促进炎症 PDLSCs 的成骨分化,明确 Sirt1 调控炎症 PDLSCs 成骨分化的分子机制可以为恢复干细胞的再生能力提供理论依据,为恢复牙周炎中牙周膜干细胞的再生能力提供新的靶点。

参考文献

[1] Fretwurst T, Larsson L, Yu S, et al. Periodontal tissue bioengineer-

- ing:is the future now [J]. *Compend Contin Educ Dent*,2018,39(4):218-23.
- [2] Liu N, Shi S, Deng M, et al. High levels of beta-catenin signaling reduce osteogenic differentiation of stem cells in inflammatory microenvironments through inhibition of the noncanonical wnt pathway [J]. *J Bone Miner Res*,2011,26(9):2082-95.
- [3] Liu Y, Liu W, Hu C, et al. Mir-17 modulates osteogenic differentiation through a coherent feed-forward loop in mesenchymal stem cells isolated from periodontal ligaments of patients with periodontitis [J]. *Stem Cells*,2011,29(11):1804-16.
- [4] 王杠杠, 宋 崑. Sirt1 对间充质干细胞分化的影响. [J]. *中国组织工程研究*,2018,22(21):3438-44.
- [5] Wang H, Hu Z, Wu J, et al. Sirt1 promotes osteogenic differentiation and increases alveolar bone mass via bmi1 activation in mice [J]. *J Bone Miner Res*,2019,34(6):1169-81.
- [6] Motavalli R, Majidi T, Poulrak T, et al. The clinical significance of the glucocorticoid receptors: genetics and epigenetics [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*,2021,16(7):105-17.
- [7] Lee H J, Lee H, Na C B, et al. Evaluation of the age- and sex-related changes of the osteogenic differentiation potentials of healthy bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Medicina (Kaunas)*,2021,57(6):520-34.
- [8] Geng L, Tang X, Wang S, et al. Reduced let-7f in bone marrow-derived mesenchymal stem cells triggers treg/th17 imbalance in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Front Immunol*,2020,11(2):233-44.
- [9] Kong X, Liu Y, Ye R, et al. GSK3 β is a checkpoint for TNF- α -mediated impaired osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in inflammatory microenvironments [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*,2013,1380(11):5119-29.
- [10] 孙 欣, 赵德明, 杨利峰. 组蛋白去乙酰化酶 2 的结构及其在疾病中的作用 [J]. *中国比较医学杂志*,2018,28(4):116-9.
- [11] Singh V, Ubaid S. Role of silent information regulator 1 (sirt1) in regulating oxidative stress and inflammation [J]. *Inflammation*,2020,43(5):1589-98.
- [12] 李贞贞, 唐海涛, 王 怡, 等. Mir-29c 通过调控 sirt1 表达介导动脉粥样硬化氧化应激与炎症反应 [J]. *安徽医科大学学报*,2020,55(2):172-6.
- [13] 郭淑芳, 姜婷婷. 下调 mir-217 抑制类风湿关节炎患者外周血单个核细胞炎症反应的实验研究 [J]. *中国免疫学杂志*,2020,36(8):933-8.
- [14] Chen X, Hu C, Wang G, et al. Nuclear factor-kappaB modulates osteogenesis of periodontal ligament stem cells through competition with beta-catenin signaling in inflammatory microenvironments [J]. *Cell Death Dis*,2013,4(2):510-24.
- [15] 谭学莲, 黄定明, 张 崑. 叉头框蛋白 α 转录因子调节骨平衡. [J]. *口腔生物医学*,2016,7(1):42-5.

The study of Sirt1 promotes the osteogenic differentiation of inflammatory PDLSCs

Kong Xiangwei, Yin Wei, Wang Chenchen, Zhang Lin, Cheng Yicheng

(Dept of Stomatology, the Eastern Theater General Hospital, Nanjing 210002)

Abstract Objective To study the positive effect and mechanism of histone deacetylase Sirtuin 1 (Sirt1) on the osteogenic capacity of inflammatory PDLSCs. **Methods** PDLSCs were isolated and cultured from the healthy individuals and periodontitis patients, the expression of Sirt1 in two types of PDLSCs was observed; osteogenic induction of inflammatory PDLSCs was performed, concurrently Sirt1 agonist resveratrol was used to up-regulate the expression of Sirt1, then the osteogenic differentiation was observed, the expressions of Runx2, acetylated NF- κ B, acetylated FoxO1 and FoxO1 were assessed by Western blot. **Results** The protein expression of Sirt1 was suppressed in inflamed PDLSCs ($P < 0.01$); resveratrol could up-regulate the expression of Sirt1 in inflamed PDLSCs; compared with the osteogenic induction group, the osteogenesis + resveratrol group increased the expression of BSP ($t = 14.045, P < 0.01$), Runx2 ($t = 3.349, P < 0.01$), OCN ($t = 7.218, P < 0.01$) and Osx ($t = 4.544, P < 0.01$) mRNA in inflamed PDLSCs, and enhanced ALP staining ($P < 0.01$); expression of FoxO1 ($t = 8.737, P < 0.01$) and Runx2 ($t = 6.152, P < 0.01$) increased after osteogenesis of inflamed PDLSCs; in the osteogenesis + resveratrol group, the expression of Sirt1 was up-regulated, and the expression of FoxO1 ($t = 5.912, P < 0.01$) and Runx2 ($t = 6.277, P < 0.01$) further increased compared with the osteogenic induction group, while the expression of acetylated NF- κ B ($F = 184.033, P < 0.01$) and acetylated FoxO1 ($F = 301.454, P < 0.01$) was significantly lower than that of control group and osteogenic induction group. **Conclusion** The deacetylase Sirt1 could promote the osteogenic differentiation of inflammatory PDLSCs through deacetylating NF- κ B and FoxO1.

Key words Sirt1; inflammatory PDLSCs; osteogenic differentiation