

巨噬细胞极化对牙周膜干细胞增殖、迁移、成骨分化的影响

李克朋^{1,2} 沈振国¹ 刘向东² 程甜甜² 王元银¹

摘要 目的 探究不同极化类型巨噬细胞(M ϕ s)对牙周膜干细胞(PDLSCs)增殖、迁移、成骨分化的影响。方法 组织块法分离培养PDLSCs;刺激人髓系白血病单核细胞(THP-1)活化为未分化的M ϕ s(M0)型后诱导极化为I型M ϕ s(M1)和II型M ϕ s(M2),实时荧光定量PCR(qPCR)检测炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-10和转化生长因子 β (TGF- β)的mRNA表达水平;收集不同极化类型M ϕ s的培养上清液后刺激PDLSCs,对照(NC)组不添加M ϕ s的培养上清液,噻唑蓝(MTT)法检测对PDLSCs增殖的影响,划痕实验检测对PDLSCs迁移的影响,Western blot检测Runt相关转录因子2(RUNX2)和碱性磷酸酶(ALP)蛋白表达以及茜素红染色探究PDLSCs钙化结节沉积。结果 qPCR显示M1型M ϕ s中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6表达量较M0和M2型M ϕ s升高($P < 0.05$),M2型M ϕ s中IL-10和TGF- β 表达量较M0和M1型M ϕ s升高($P < 0.05$);Western blot显示,与NC组相比,M0和M2组PDLSCs中RUNX2和ALP蛋白表达升高($P < 0.05$);茜素红染色显示,相较于NC组,M0、M1和M2组PDLSCs中钙化结节沉积增多;MTT结果表明M0和M1组PDLSCs的增殖较NC组受抑制($P < 0.05$);划痕实验显示M1和M2组PDLSCs迁移能力强于NC组。结论 M0和M1型M ϕ s抑制PDLSCs增殖,M1和M2型M ϕ s促进PDLSCs迁移,不同类型的M ϕ s均促进PDLSCs成骨分化。

关键词 巨噬细胞;牙周膜干细胞;增殖;迁移;成骨分化

中图分类号 R 781.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)08-1392-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.015

慢性牙周炎是口腔常见细菌感染性疾病,主要症状为牙周软组织附着丧失和牙槽骨吸收,是成年人失牙的主要原因。牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSCs)是牙周组织再生最重要的干细胞,其成骨分化能力直接影响组织是否能获得

有效的组织再生^[1]。

巨噬细胞(macrophages, M ϕ s)是机体的重要免疫细胞,在慢性牙周炎发生进展修复的不同阶段具有重要的作用^[2]。未分化的M ϕ s(M0)可随所在器官微环境和生理病理条件极化成两个极端表型,即I型M ϕ s(M1)和II型M ϕ s(M2),二者具有显著不同特性。M1型M ϕ s参与急性促炎反应,清除入侵病原体和肿瘤细胞。M2型M ϕ s对炎症刺激不敏感,参与杀伤胞外病原体、碎片清除、血管发生、组织重建和伤口愈合,调节和抑制免疫炎症^[3]。近年来,有研究^[4]报道,M ϕ s参与的微环境对于干细胞成骨分化有一定的影响,而不同的极化类型扮演着不同的成骨诱导角色。基于以上的临床现状和研究背景,该研究采用人髓系白血病单核细胞(tohoku hospital pediatrics-1, THP-1)诱导M ϕ s向不同方向极化,选用人牙周膜来源的原代PDLSCs为研究对象,检测M ϕ s极化对PDLSCs增殖、迁移、成骨分化的影响,从而筛选出有利于PDLSCs增殖、迁移、成骨分化的M ϕ s类型,以期为临床治疗和预防提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料 THP-1细胞系购自中国科学院典型培养物保藏委员会;胎牛血清购自美国Clark Bioscience公司;DMEM高糖培养基和RPMI-1640培养基购自美国Gibco公司;大肠埃希菌脂多糖(*E. coli* Lipopolysaccharides, *E. coli*-LPS)、茜素红染液、L-抗坏血酸、 β -磷酸甘油购自美国Sigma公司;TRIzol、SYBR购自湖南艾瑞科公司; γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)重组蛋白、白细胞介素(interleukin, IL)-4重组蛋白;佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)购自美国PeproTech公司;Runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2, RUNX2)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)抗体购自美国Abcam公司。

1.2 THP-1细胞的活化与诱导极化 按照 1×10^6 个/孔的数量将THP-1细胞铺入6孔板中,每孔加入2 ml含10%胎牛血清和1%双抗的RPMI-1640

2024-05-26 接收

基金项目:安徽省卫生健康科研项目(编号:AHWJ2022a012)

作者单位:¹安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究重点实验室,合肥 230032

²安庆一一六医院,安庆 246004

作者简介:李克朋,男,硕士研究生;

王元银,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, wyy1970548@sohu.com

完全培养基 加入终浓度为 100 ng/ml 的 PMA 诱导 THP-1 细胞活化 24 h, 此时 THP-1 细胞贴壁, 且活化为 M0 型 $M_{\phi}s$, 去除培养基, PBS 漂洗 3 次后更换 DMEM 高糖完全培养基, 再分别加入终浓度为 100 ng/ml *Ecoli*-LPS 和 20 ng/ml IFN- γ 刺激 24 h, 诱导 $M_{\phi}s$ 极化为 M1 型, 加入终浓度为 40 ng/ml 的 IL-4 刺激 24 h, 诱导 $M_{\phi}s$ 极化为 M2 型。诱导 $M_{\phi}s$ 极化完成后, 去除培养基, PBS 漂洗 3 次后更换新的 DMEM 高糖培养基, 培养 24 h 后收集培养基用于后续实验。

1.3 RNA 提取与实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 向待检测的 $M_{\phi}s$ 中加入 1 ml TRIzol 裂解液, 冰上裂解 5 min, 收集裂解液, 加入 200 μ l 三氯甲烷混匀, 冰上静置 5 min 后以 14 500 r/min 离心 15 min, 吸取水样层后加入等体积异丙醇混匀, 冰上静置 10 min 后以 14 500 r/min 离心 15 min, 弃液体后加入 1 ml 75% 乙醇, 以 14 500 r/min 离心 15 min, 弃液体后充分干燥, 加入 10 μ l DEPC 水溶解 RNA 沉淀, 测浓度后, 经逆转录, 经 qPCR 后得到 C_T 值, 参照 β -actin 通过 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算基因表达差异。肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, *TNF*) - α 、*IL-1 β* 、*IL-6*、转化生长因子 (transforming growth factor, *TGF*) - β 、*IL-10* 的基因引物序列见下表。

表 1 qPCR 引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')
<i>TNF-α</i>	F: CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG
	R: GAGACCTGGGAGTAGATGAG
<i>IL-1β</i>	F: TTCGACACATGGGATAACGAGG
	R: TTTTGCTGTGAGTCCCGGAG
<i>IL-6</i>	F: ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG
	R: CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTC
<i>TGF-β</i>	F: CTAATGGTGGAACCCACAACG
	R: TATGCCAGGAATTGTTGCTG
<i>IL-10</i>	F: GACTTTAAGGTTACCTGGGTTG
	R: TCACATGCCCTTGATGTCTG
β -actin	F: CATGTACGTTGCTATCCAGGC
	R: CTCCTTAATGTCACGCACGAT

1.4 PDLSCs 的分离与培养 从安徽医科大学口腔颌面外科门诊收集到 12 ~ 18 岁因正畸需要拔除的健康前磨牙, 在无菌环境下使用预冷的 PBS 冲洗牙根直至血凝块脱离牙根。使用 11 号手术刀刮取牙根中 1/3 的牙周膜组织, 使用显微剪刀将组织块剪成 1 mm³ 大小, 将修剪后的组织块放入 6 孔板内, 滴入少量含有 20% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM

高糖培养基后放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱培养 5 min, 然后将无菌盖玻片盖在组织块上, 在 6 孔板中添加培养基 2 ml, 置于细胞培养箱中培养, 此后每 3 d 更换 1 次培养基, 待从组织块中爬出的细胞至 80% 后, 胰酶消化, 传代培养。取处于对数生长期的 P2 代细胞用于后续实验。

1.5 PDLSCs 的免疫组化鉴定 取 P2 代 PDLSCs 培养在铺有细胞爬片的 6 孔板中, 待细胞生长至细胞爬片面积的 60% 时, 取出细胞爬片, 采用免疫组化对细胞进行角蛋白和波形蛋白染色, 光镜下观察染色结果。

1.6 PDLSCs 成骨分化诱导 将 P2 代的 PDLSCs 按照 5×10^5 个/孔的数量铺入 6 孔板中, 过夜待细胞贴壁后更换 1 ml 含 20 mmol/L β -磷酸甘油钠、100 μ g/ml L-抗坏血酸和 20 nmol/L 地塞米松的 DMEM 高糖完全培养基并加入 1 ml $M_{\phi}s$ 培养上清液, 对照组 (negative control, NC) 加入 2 ml 含 10 mmol/L β -磷酸甘油钠、50 μ g/ml L-抗坏血酸和 10 nmol/L 地塞米松的 DMEM 高糖完全培养基。每 3 d 更换 1 次培养液。

1.7 蛋白样本收集与 Western blot 将待检测的 PDLSCs 细胞弃去培养基, PBS 洗去脱落细胞, 每孔加入 100 μ l 含有 1% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上裂解 5 min 后收集裂解液, 离心后取上清液加入 5 \times 蛋白上样缓冲液, 99 $^{\circ}$ C 加热 10 min, -20 $^{\circ}$ C 保存样本待测。然后将蛋白样本经 PAGE 胶电泳, 转膜后, 脱脂牛奶封闭, 孵育一抗、二抗, 最后显影获得条带图像。使用 Image J 软件分析各条带灰度值, 并计算相对表达量。

1.8 茜素红染色 将培养 21 d 的 PDLSCs 使用 PBS 漂洗 3 次洗去脱落细胞, 然后加入 4% 多聚甲醛固定 15 min, 再使用 PBS 漂洗 3 次, 然后加入茜素红染液避光染色 20 min, 弃去染液, PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min 洗去浮色。

1.9 噻唑蓝 (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 法细胞增殖实验 将 P2 代的 PDLSCs 制备成单细胞悬液, 以 2 000 个/孔铺入 96 孔板中, 待过夜后分别加入收集好的 $M_{\phi}s$ 培养上清液与 DMEM 高糖培养基的 1 : 1 混合液 200 μ l, NC 组加入 DMEM 高糖培养基 200 μ l, 每个实验组设置 5 个复孔, 每 3 d 更换 1 次培养液, 培养 7 d 后, 每孔加入 20 μ l 0.5% MTT 溶液, 继续培养 4 h 后, 弃去培养液, 每孔加入 200 μ l 二甲基亚砷, 摇床上避光缓慢振荡 5 min, 然后使用酶标仪测量 490 nm 处的吸光

度值,计算每个实验组复孔平均值。

1.10 细胞划痕实验 使用6孔板中生长至70%的PDLSCs进行实验,利用黄枪头在孔板中笔直地划出一道划痕,使用PBS漂洗3次洗去漂浮细胞,分别加入收集好的Mφs培养上清液与无血清的DMEM高糖培养基的1:1混合液2ml,NC组加入无血清的DMEM高糖培养基2ml,并拍照留存,此时记为0h,此后在24h和48h拍照记录。

1.11 统计学处理 使用GraphPad Prism 9进行统计分析,所有数据都是使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,3组及3组以上数据使用单因素方差分析进行数据分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 THP-1 细胞系活化与 Mφs 极化诱导 THP-1 细胞在未活化前悬浮于培养基中,光镜下观察可见透明光亮圆形的细胞(图1A)。在经100 ng/ml的PMA活化24h后,THP-1细胞贴附于培养皿底面,部分细胞生出触角,折光性良好(图1B),表明THP-1细胞系已成功活化为Mφs。qPCR检测诱导极化后的Mφs中的炎症因子mRNA表达水平,结果显示,*TNF-α* mRNA表达量在M1型Mφs中表达较M0型($P = 0.0007$)和M2型($P = 0.0003$)Mφs均有不同程度升高($F = 40.25, P = 0.0003$),且差异有统计学意义;*IL-1β* mRNA表达量在M1型Mφs中表达较M0型($P = 0.012$)和M2型($P = 0.004$)Mφs升高($F = 14.53, P = 0.005$),且差异有统计学意义;*IL-6* mRNA表达量在M1型Mφs中较M0型($P = 0.009$)和M2型($P = 0.005$)Mφs升高($F = 14.1, P = 0.005$),且差异有统计学意义;*TGF-β* mRNA表达量在M2型Mφs中较M0型($P < 0.0001$)和M1型($P < 0.0001$)Mφs升高($F = 115.8, P < 0.0001$),且差异有统计学意义;*IL-10* mRNA表达量在M2型Mφs中较M0型($P = 0.011$)和M1型($P = 0.003$)Mφs升高($F = 16.8, P = 0.004$),且差异有统计学意义(图1C)。

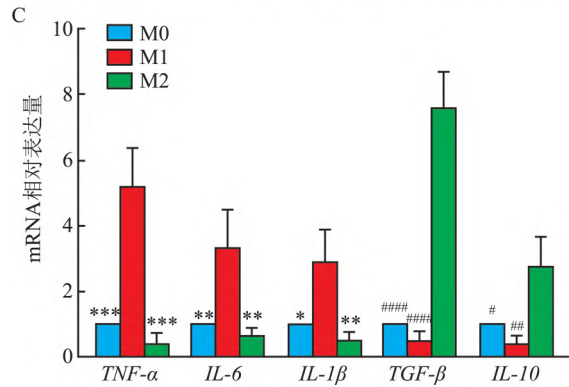
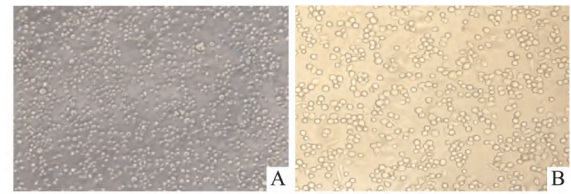


图1 THP-1 细胞系活化与 Mφs 极化诱导

A: PMA 诱导前 THP-1 光镜下照片 ×100; B: PMA 诱导 24 h 后 THP-1 光镜下照片 ×100; C: qPCR 检测诱导极化后 Mφs 中的各炎症因子 mRNA 表达水平; 与 M1 型比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 M2 型比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.0001$

2.2 PDLSCs 的分离培养与鉴定 采用组织块法分离培养原代细胞,约7~15d可观察到部分组织块边缘有细胞爬出(图2A),传代后观察到细胞生长状态良好,细胞多呈长梭形,胞体丰满,核仁清晰,并呈放射状或旋涡状排列,少数细胞为多角形或圆形(图2B)。免疫组化检测显示,波形蛋白染色,胞质着色呈棕黄色,结果呈阳性(图2C);角蛋白染色,胞质不做色,结果呈阴性(图2D),证实细胞源自中胚层。成骨诱导21d后茜素红染色显示有大量钙化结节产生(图2E)。

2.3 Mφs 极化对 PDLSCs 成骨分化的影响 通过 Western blot 分析检测不同 Mφs 极化类型上清液刺激 PDLSCs 7 d 后成骨分化关键蛋白特异性 RUNX2 和 ALP 的蛋白表达水平,并使用 Image J 软件分析条带。结果表明,相较于 NC 组,RUNX2 蛋白表达量($F = 10.46, P = 0.038$)在 M0 组($P = 0.002$)和

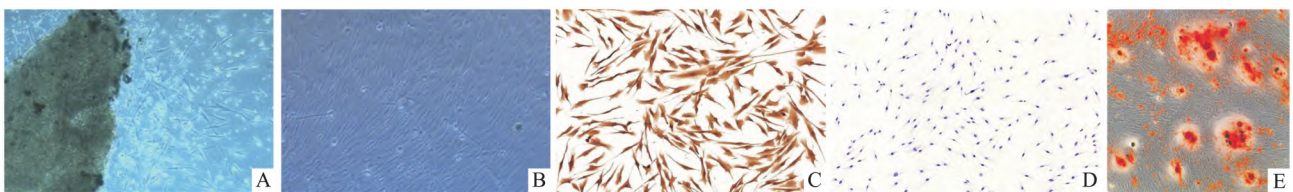


图2 PDLSCs 的分离培养与鉴定 ×100

A: 原代 PDLSCs; B: 传代培养后的 PDLSCs; C: 抗波形蛋白阳性; D: 抗角蛋白阴性; E: PDLSCs 诱导成骨分化 21 d 后茜素红染色钙化结节

M2 组 ($P = 0.007$) 中均上升,其差异具有统计学意义,而在 M1 组 ($P = 0.136$) 中虽有上升,但无同统计学差异;相较于 NC 组,ALP 蛋白表达量 ($F = 4.207, P = 0.046$) 在 M0 组 ($P = 0.034$) 和 M2 组 ($P = 0.048$) 中上升,其差异具有统计学意义,而在 M1 组 ($P = 0.338$) 中虽有上升,但无同统计学差异(图 3A)。利用茜素红染色检测不同 M ϕ s 极化类型上清液刺激 PDLSCs 21 d 后钙化结节的产生量。以上结果, M0 和 M2 组染色最深表明钙化结节最多,且二者之间大体观无显著差异; M1 组染色较浅表明钙化结节较 M0 和 M2 组少,但 M0、M1 和 M2 三组染色均较 NC 组深,表明钙化结节多于 NC 组(图 3B)。

2.4 M ϕ s 极化对 PDLSCs 增殖的影响 使用 MTT 法检测不同 M ϕ s 极化类型上清液刺激 7d 后 PDLSCs 的增殖情况。MTT 检测的结果显示:细胞培养 7 d 后,与 NC 组相比, M0 组吸光度值明显下降 ($F = 6.049, P = 0.001$), M1 组吸光度值明显下降 ($F = 1.342, P = 0.021$), 组间差异具有统计学意义。而与空白对照组相比, M2 组吸光度值则无统计学差异 ($F = 7.819, P = 0.280$) (图 4)。这表明 M0 型和 M1 型 M ϕ s 上清液对 PDLSCs 的增殖具有抑制作用,而 M2 型 M ϕ s 上清液对 PDLSCs 的增殖则无抑制作用。

2.5 M ϕ s 极化对 PDLSCs 迁移的影响 使用划痕实验检测不同 M ϕ s 极化类型上清液刺激 PDLSCs 后的迁移情况。结果显示,相较于 NC 组, M1 组和 M2 组迁移距离明显减小; M0 组的迁移距离无差异(图

5)。这表明 M1 型和 M2 型 M ϕ s 上清液对 PDLSCs 的迁移具有促进作用,而 M0 型 M ϕ s 上清液对 PDLSCs 的迁移无显著作用。

3 讨论

PDLSCs 是最具有成骨分化潜能的口腔来源的间充质干细胞之一^[5],其在组织工程学中具有极高的应用潜力,目前已针对 PDLSCs 开展了大量的成骨分化、增殖、迁移相关的研究。本研究通过体外检测 ALP 和 RUNX2 的蛋白表达改变及茜素红染色结果可以反映 PDLSCs 向成骨细胞分化的程度。RUNX2 是成骨分化过程中关键的转录因子,ALP 的表达增强是成骨细胞分化的一个明显特征^[6]。而茜素红染色反应出的钙化结节的多少更是反应细胞成骨分化数量多少的金标准。

在牙周膜组织中存在多种细胞,其中通过免疫组化结果显示提取的细胞波形蛋白阳性,角蛋白阴性的结果可以确定所提取的细胞来源于中胚层^[7],形态学观察显示所提取的细胞为长梭形,可确定为 PDLSCs 或牙周膜成纤维细胞。由于牙周膜成纤维细胞成骨分化能力显著弱于 PDLSCs,相同条件下诱导成骨分化产生的钙化结节不明显^[8],但本研究所提取细胞的诱导的钙化结节明显,可以确定所提取的细胞为 PDLSCs。

M1 型是 M ϕ s 的促炎表型,释放相关促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等,能够诱导局部炎症反应; M2 型是 M ϕ s 的抗炎表型,释放相关抗炎因子 TGF- β 、

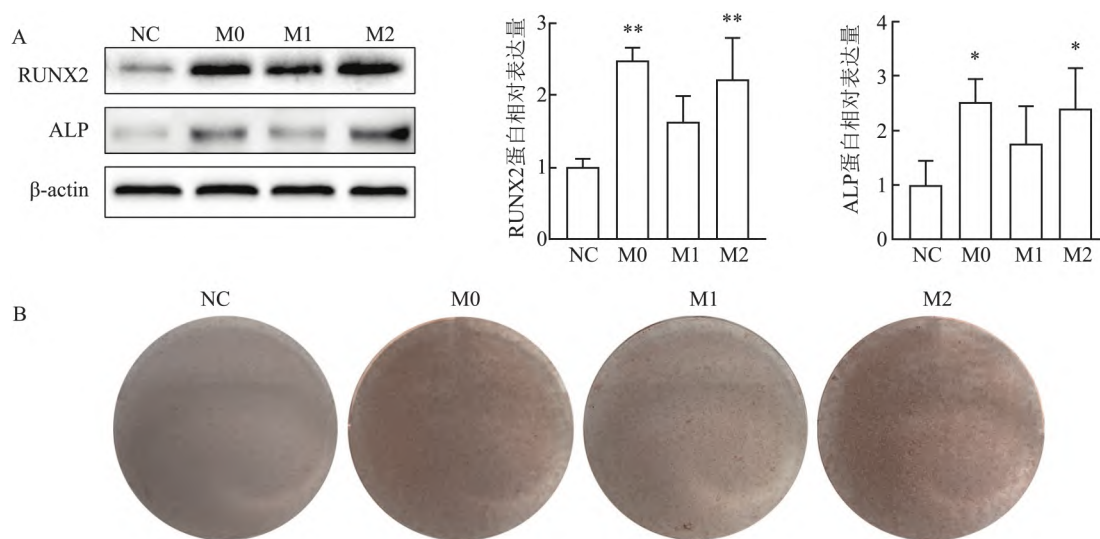


图3 M ϕ s 极化对 PDLSCs 成骨分化的影响

A: Western blot 检测 RUNX2 和 ALP 的蛋白表达水平; B: 茜素红染色检测钙化结节含量; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

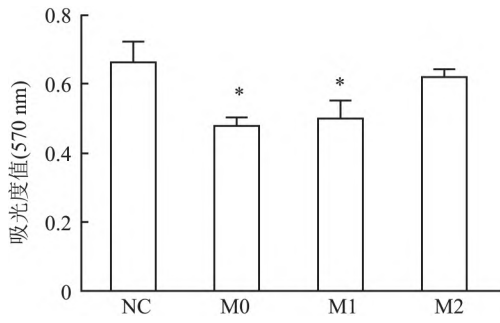


图4 MTT 法检测 PDLSCs 增殖
与 NC 组比较: * $P < 0.05$

IL-10 等,促进组织修复并加速伤口愈合^[9]。实验结果显示,不同极化类型的 M ϕ s 均能够促进 PDLSCs 成骨分化,其中 M0 和 M2 型促成骨分化能力较强,而 M1 型促成骨分化能力较弱。M ϕ s 可通过分泌包括骨形态发生蛋白(BMP)-2、抑瘤素 M(oncostatin M, OSM) 等细胞因子^[10],调节 PDLSCs 中主要的成骨分化信号通路影响骨形成。将 M ϕ s 与骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-SCs) 共培养,将其诱导成骨分化,观察 M ϕ s 对新骨形成的影响。结果显示,与单独的 BMSCs 相比,不同类型的 M ϕ s 均增加了成骨分化^[11],这与本实验

中不同类型的 M ϕ s 均诱导 PDLSCs 成骨分化结果一致然而,无论是牙周炎来源的 PDLSCs 或者炎症因子刺激下的 PDLSCs 在体外诱导成骨分化表现出来的成骨分化能力都低于正常 PDLSCs,这表明炎症环境下 PDLSCs 的成骨分化潜能下降^[12]。

同时,实验结果表明,M0 和 M1 型 M ϕ s 会抑制 PDLSCs 的增殖,而 M2 型 M ϕ s 对 PDLSCs 的增殖没有影响。本实验采用的 100 ng/ml PMA 刺激 THP-1 活化的方式是一种被广泛应用的方法,但是 PMA 刺激会增强 THP-1 诱导产生的 M0 型 M ϕ s TNF- α 、IL-1 β 等促炎因子的表达,抑制 IL-10 的表达^[13]。促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 已经被证明会抑制 PDLSCs 的增殖。此外,研究表明,M1 和 M2 型 M ϕ s 均能促进 PDLSCs 迁移。在炎症初期,M1 型 M ϕ s 活化可以促进干细胞募集到缺损部位,完成缺损修复的早期准备^[14]。同时,M2 型 M ϕ s 释放的外泌体已被广泛证明可以促进细胞迁移^[15]。

该实验从成骨分化、增殖、迁移三个角度探究 M ϕ s 极化对 PDLSCs 的影响,M0 和 M1 型 M ϕ s 抑制 PDLSCs 增殖,M1 和 M2 型 M ϕ s 促进 PDLSCs 迁移;不同类型的 M ϕ s 均促进 PDLSCs 成骨分化。然而,这其中涉及到的具体的分子机制尚不完全明确,仍需进行深入研究。

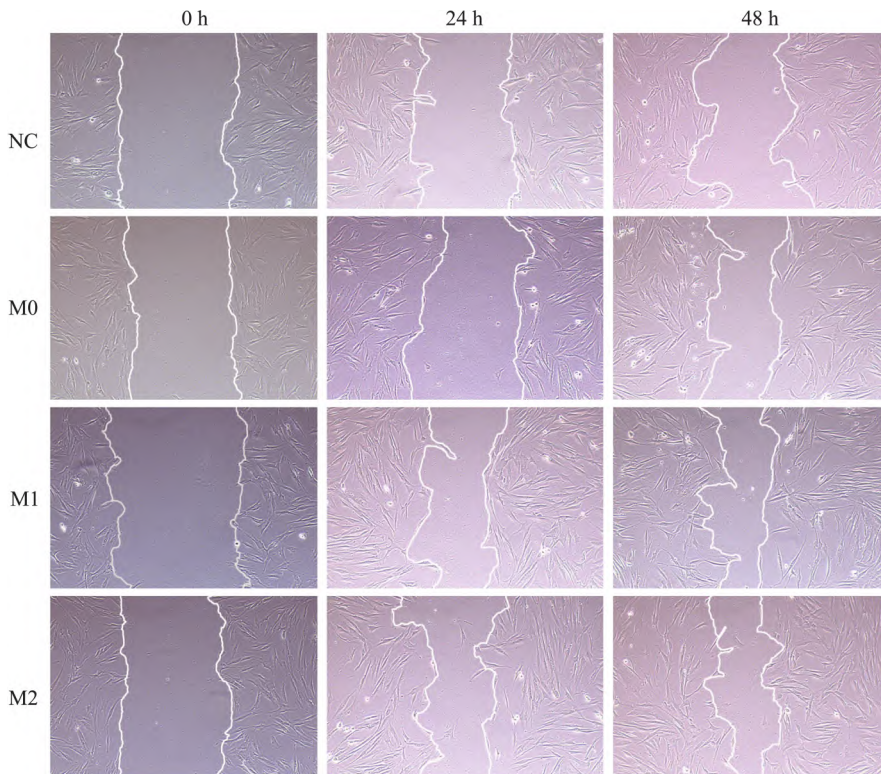


图5 划痕实验检测 PDLSCs 迁移能力 ×100

参考文献

- [1] 吴梦鑫,梁文红,杨 琨,等. 牙周膜干细胞促进牙周组织再生的影响因素[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(30): 4912 - 20.
- [2] Li X, He X T, Kong D Q, et al. M2 macrophages enhance the cementoblastic differentiation of periodontal ligament stem cells *via* the Akt and JNK pathways[J]. *Stem Cells*, 2019, 37(12): 1567 - 80.
- [3] Chen C, Liu T, Tang Y, et al. Epigenetic regulation of macrophage polarization in wound healing[J]. *Burns Trauma*, 2023, 11: tkac057.
- [4] Niu Y, Wang Z, Shi Y, et al. Modulating macrophage activities to promote endogenous bone regeneration: biological mechanisms and engineering approaches[J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(1): 244 - 61.
- [5] Qu G, Li Y, Chen L, et al. Comparison of osteogenic differentiation potential of human dental-derived stem cells isolated from dental pulp, periodontal ligament, dental follicle, and alveolar bone[J]. *Stem Cells Int*, 2021, 2021: 6631905.
- [6] 王 芳,李汉青,何家才. CGRP 对人牙周膜干细胞成骨分化和成血管能力影响的体外研究[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(3): 356 - 62.
- [7] 张 璐. DMOG 对人牙周膜干细胞成骨分化和成血管能力影响的体外研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2018.
- [8] Lin C, Yang Y, Wang Y, et al. Periodontal ligament fibroblasts-derived exosomes induced by PGE(2) inhibit human periodontal ligament stem cells osteogenic differentiation *via* activating miR-34c-5p/SATB2/ERK [J]. *Exp Cell Res*, 2022, 419 (2): 113318.
- [9] Yu Y, Yue Z, Xu M, et al. Macrophages play a key role in tissue repair and regeneration[J]. *PeerJ*, 2022, 10: e14053.
- [10] Wu H, Yin Y, Hu X, et al. Effects of environmental pH on macrophage polarization and osteoimmunomodulation[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2019, 5(10): 5548 - 57.
- [11] Romero-López M, Li Z, Rhee C, et al. Macrophage effects on mesenchymal stem cell osteogenesis in a three-dimensional *in vitro* bone model[J]. *Tissue Eng Part A*, 2020, 26(19 - 20): 1099 - 111.
- [12] Yin Y, Tian B M, Li X, et al. Gold nanoparticles targeting the autophagy-lysosome system to combat the inflammation-compromised osteogenic potential of periodontal ligament stem cells: From mechanism to therapy[J]. *Biomaterials*, 2022, 288: 121743.
- [13] Kim N Y, Kim S, Park H M, et al. Cinnamomum verum extract inhibits NOX2/ROS and PKC δ /JNK/AP-1/NF- κ B pathway-mediated inflammatory response in PMA-stimulated THP-1 monocytes[J]. *Phytomedicine*, 2023, 112: 154685.
- [14] Lei H, He M, He X, et al. METTL3 induces bone marrow mesenchymal stem cells osteogenic differentiation and migration through facilitating M1 macrophage differentiation[J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(5): 4376 - 88.
- [15] Huang J H, He H, Chen Y N, et al. Exosomes derived from M2 macrophages improve angiogenesis and functional recovery after spinal cord injury through HIF-1 α /VEGF axis[J]. *Brain Sci*, 2022, 12(10): 1322.

Effect of macrophages polarization on proliferation, migration and osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells

Li Kepeng^{1, 2}, Shen Zhenguo¹, Liu Xiangdong², Cheng Tiantian², Wang Yuanyin¹

(¹College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University, Key Lab of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032; ²Anqing 116 Hospital, Anqing 246004)

Abstract Objective To explore the effects of different phenotypes macrophages (M ϕ s) on the proliferation, migration and osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells (PDLSCs). **Methods** PDLSCs were isolated and cultured by tissue block method. Tohoku Hospital Pediatrics-1 (THP-1) cell line was stimulated to activate into unpolarized M ϕ s (M0), then induced to polarize into type I M ϕ s (M1) and type II M ϕ s (M2). Quantitative real-time PCR (qPCR) detected the inflammatory factors tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin (IL) -1 β , IL-6, IL-10 and transforming growth factor- β (TGF- β) mRNA expression level. After collecting culture supernatants with different phenotypes, PDLSCs were stimulated, native control (NC) group did not receive the culture supernatant of M ϕ s. The effects of PDLSCs proliferation were assessed *via* Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay, while scratch assays were employed to evaluate their migration. Western blot was utilized to analyze the protein expression of Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and alkaline phosphatase (ALP). Additionally, Alizarin Red staining was performed to investigate the deposition of calcified nodules in PDLSCs. **Results** qPCR showed the relative expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in M1 M ϕ s were higher than those in M0

麻黄碱调控 TGF- β 1/Smads 通路对 支气管哮喘小鼠气道重塑的影响

范慧慧¹, 任玉梅², 田新磊¹, 张凯¹, 李晓丽¹

摘要 目的 探究麻黄碱对支气管哮喘小鼠气道重塑的影响及对转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)/Smads 通路的调控作用。方法 将所有小鼠随机分为对照组、模型组、地塞米松组、麻黄碱低剂量组、麻黄碱高剂量组、麻黄碱高 + TGF- β 1 激活剂组, 每组 12 只。除对照组, 其余组小鼠腹腔注射含有 40 μ g 卵清蛋白 (OVA) 和 2 mg 10% 氢氧化铝的致敏液诱导哮喘模型。8 周后, 检测各组小鼠气道高反应性; 对支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中嗜酸性粒细胞进行计数; ELISA 检测 BALF 中白细胞介素 (IL) 4、IL-5 和 IL-13 的水平; 苏木精-伊红 (HE) 染色和 Masson 染色观察小鼠肺组织的病理学变化及胶原纤维面积; 免疫组织化学检测小鼠肺组织中 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 表达; Western blot 检测小鼠肺组织中 TGF- β 1/Smads 通路相关蛋白的表达。结果 与对照组相比, 模型组小鼠不同乙酰甲胆碱剂量下的气道高反应性、气道壁的总面积 (Wat)/基底膜的周长 (Pbm) 比值、胶原纤维面积、嗜酸性粒细胞及 IL-4、IL-5、IL-13 含量、 α -SMA、TGF- β 1 表达及 p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 比值均升高 ($P < 0.05$), Smad7 表达降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 地塞米松组和麻黄碱低、高剂量组小鼠不同乙酰甲胆碱剂量下的气道高反应性、Wat/Pbm 比值、胶原纤维面积、嗜酸性粒细胞及 IL-4、IL-5、IL-13 含量、 α -SMA、TGF- β 1 表达及 p-Smad2/

Smad2、p-Smad3/Smad3 比值均降低 ($P < 0.05$), Smad7 表达升高 ($P < 0.05$); 与麻黄碱高剂量组相比, 麻黄碱高 + TGF- β 1 激活剂组小鼠不同乙酰甲胆碱剂量下的气道高反应性、Wat/Pbm 比值、胶原纤维面积、嗜酸性粒细胞及 IL-4、IL-5、IL-13 含量、 α -SMA、TGF- β 1 表达及 p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 比值均升高 ($P < 0.05$), Smad7 表达降低 ($P < 0.05$)。结论 麻黄碱可以改善支气管哮喘小鼠的气道重塑, 其机制与调控 TGF- β 1/Smads 信号通路有关。

关键词 麻黄碱; 支气管哮喘; 转化生长因子 β 1; Smad 蛋白; 气道重塑

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)08-1398-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.016

哮喘是一种慢性炎症性疾病, 其发病特征是慢性气道炎症、重塑和高反应性, 其中由气道重塑引起的肺功能恶化是哮喘频繁发作的主因^[1]。目前, 皮质类固醇和 β 肾上腺素能激动剂或白三烯被认为是治疗哮喘的有效选择, 但仍有患者症状难以控制^[2]。因此, 了解哮喘气道重塑的机制对寻找治疗哮喘的药物非常重要。转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 是调节哮喘气道重塑的主要因子之一, 可影响气道壁的胶原沉积, Smad 是 TGF- β 信号途径的重要成员^[3]。抑制 TGF- β 1/Smads 通路可调节哮喘小鼠的气道重塑^[4]。麻黄碱是麻黄属植物中提取的一种化合物, 通常被用作肾上腺素能药物, 调节各种疾病的炎症反应^[5]。如麻黄碱可通过抑制炎症反应减轻肺损伤, 提高呼

2024-04-25 接收

基金项目: 河南省中医药科学研究专项(编号: 20-21ZY2057)

作者单位: ¹ 河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院) 儿科, 郑州 450000

² 河南中医药大学儿科医学院, 郑州 450000

作者简介: 范慧慧, 女, 硕士研究生;

任玉梅, 女, 硕士, 副教授, 责任作者, E-mail: xiaoxiannv800@163.com

and M2 M ϕ s ($P < 0.05$), and the relative expression of IL-10 and TGF- β in M2 M ϕ s were higher than those in M0 and M1 M ϕ s ($P < 0.05$); Western blot showed the expression of RUNX2 and ALP proteins in PDLSCs in M0 and M2 groups was higher than those in the NC group ($P < 0.05$), Alizarin Red staining showed increased calcified nodule deposition in PDLSCs in M0, M1 and M2 groups compared to the NC group; MTT assay showed the proliferation of PDLSCs in the M0 and M1 groups was suppressed compared to the NC group ($P < 0.05$); and scratch experiment showed the migratory capacity of PDLSCs in the M1 and M2 groups was stronger than that in the NC group. **Conclusion** M0 and M1 M ϕ s inhibit PDLSCs proliferation, M1 and M2 M ϕ s promote PDLSCs migration, and all types of M ϕ s promote osteogenic differentiation of PDLSCs.

Key words macrophages; periodontal ligament stem cells; proliferation; migration; osteogenic differentiation