文章编号:1000-5404(2013)05-0435-03

论著

IRE1α促进人牙周膜成纤维细胞增殖

彭志庆[1],李苹苹[2],初颜兵[3],王 燕[4] (402160 重庆,重庆医科大学附属永川医院口腔科[1];400015 重庆,重庆医科大学附属口腔医院上清寺牙体牙髓科[2];400038 重庆,第三军医大学西南医院口腔科[3];401147 重庆,重庆医科大学附属口腔医院儿童牙病中心及口腔预防科[4])

[摘要] **目的** 研究内质网跨膜蛋白IRE1α对人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblasts,hPDLFs)增殖的影响。**方法** 将成功构建的人IRE1α基因重组质粒染入hPDLFs细胞,采用免疫印迹法检测IRE1α重组基因在真核细胞内的表达情况,XTT法和流式细胞仪(FCM)检测转染后hPDLFs细胞增殖和细胞周期变化。**结果** 酶切及测序结果证实IRE1α重组质粒构建成功;免疫印迹分析结果证实,IRE1α重组质粒能在hPDLFs细胞内正确表达;在内质网应激(ERS)状态下,与衣霉素(tunicamycin,TM)对照组相比,XTT检测结果显示:IRE1α实验组hPDLFs细胞增殖率明显增高($P<0.01$);FCM结果分析显示:IRE1α实验组hPDLFs细胞S期比例增加而G_1期减少($P<0.05$)。**结论** 在ERS状态下,IRE1α促进hPDLFs细胞增殖,促进hPDLFs细胞从G_1期进入S期。

[关键词] IRE1α;牙周膜成纤维细胞;细胞增殖;细胞周期
[中图法分类号] R329.28; R341; R394.2 [文献标志码] A

Effect of IRE1α on proliferation of human periodontal ligament fibroblasts

Peng Zhiqing[1], Li Pingping[2], Chu Yanbin[3], Wang Yan[4] ([1]Department of Stomatology, Affiliated Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 402160; [2]Department of Endodontics, Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing, 400015; [3]Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [4]Department of Children's Dental Center and Dental Prevention, Affiliated of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing, 401147, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of IRE1α on the proliferation of human periodontal ligament fibroblasts (hPDLFs). **Methods** The IRE1α full-length eukaryotic expression vectors were constructed and transiently transferred into hPDLFs, and the expression of IRE1α was identified by Western blot analysis. The proliferation of hPDLFs was analyzed by XTT assay, and the changes of cell cycle were detected by flow cytometry (FCM). **Results** Restriction enzyme digestion and gene sequencing identified that the IRE1α recombinant plasmid was successfully constructed, and the correct expression of IRE1α in hPDLFs was detected by Western blotting. Compared with the control group (tunicamycin), the XTT results showed that the cell proliferation rate of the IRE1α group increased significantly ($P<0.01$), and the FCM results showed that the cell proportion increased at S phase and decreased at G_1 phase in the IRE1α group ($P<0.05$). **Conclusion** IRE1α can improve hPDLFs proliferation, and promote hPDLFs from G_1 phase into S phase.

[**Key words**] IRE1α; hPDLFs; cell proliferation; cell cycle

Corresponding author: Li Pingping, Tel: 86-23-89035821-8303, E-mail: nancy-fred@163.com

人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblasts,hPDLFs)是牙周膜中主要的感受性和效应性细胞,是牙周组织再生和形成新附着的重要成分,其增殖活性直接反映了牙周组织的状态。牙周炎症或创伤时,hPDLFs数量的减少及生物学功能的降低阻碍了牙周组织的再生。目前国内外对通过使用药物、外源性生长因子、激素等促进hPDLFs增殖等方面的报道较多,但少见探讨内质网信号通路肌醇需酶1α(inositol requiring enzyme 1α,IRE1α)对该种细胞增殖情况的影响。

内质网膜上IRE1α活化后,首先通过特异的剪接X-盒结合蛋白(X box-binding protein 1,XBP1) mRNA产生蛋白活性更强的XBP1(u),能促进含内质网应激反应元件(endoplasmic reticulum stress responsive element, ERSE)的未折叠蛋白应激(unfolded protein response,UPR)靶分子的基因转录,上调内质网分子伴侣蛋白的表达,诱导UPR,降低未折叠或错误折叠蛋白在内质网内的积累,恢复内质网的正常功能,使细胞恢复到正常状态,但如果应激继续加重,IRE1α就会激活细胞的凋亡通路[1]。虽然目前发现了IRE1α与各种细胞的存活与凋亡密切相关,但其具体机制尚不清楚。本实验主要通过观察IRE1α对hPDLFs细胞增殖和细胞周期的影响,为牙周组织再生的机制研究提供一定的理论基础。

[通信作者] 李苹苹,电话:(023)89035821-8303, E-mail: nancy-fred@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121219.1741.015.html(2012-12-19)

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人牙周膜成纤维细胞株(hPDLFs)由重庆医科大学钟晓波教授惠赠,用含10%胎牛血清的DMEM(HyClone)培养基于37 ℃、5% CO_2培养箱内常规培养。待细胞密度在80%左右时传代,用5~8代的细胞进行实验。

1.2 分子生物学试剂和仪器

人pcDNA3.1-IRE1α全长由日本东京大学Kadowaki Hideki教授惠赠[2],大肠杆菌DH5α和pcDNA3.1-空载体均为重庆医科大学生命科学院提供;限制性内切酶,引物合成由TaKaRa公司提供服务;T_4连接酶购自Promega公司;TM购自Sigma公司;质粒小量提取纯化试剂盒购自Omega公司。重组质粒测序由华东基因公司提供服务。脂质体Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司;XTT试剂盒为凯基生物公司产品;抗体购自Santa Cruz公司;SDS-PAGE凝胶配置试剂盒、ECL化学发光试剂盒购于中国碧云天生物技术研究所。酶标仪、凝胶成像分析仪为Bio-Rad公司产品。

1.3 IRE1α重组质粒的鉴定

将人pcDNA3.1-IRE1α全长质粒转化扩增后,经*Xho* Ⅰ和*Hind*Ⅲ酶切鉴定,初步鉴定正确后送华大公司测序。测序结果比对正确后将IRE1α重组质粒转染到hPDLFs细胞,并设立未处理的阴性对照组(NC)和转染pcDNA3.1的空质粒组(Vector),24 h后收集细胞提取蛋白,Western blot检测IRE1α重组质粒在真核细胞中的表达。

1.4 XTT检测IRE1α对hPDLFs细胞增殖的影响

取对数生长期hPDLFs细胞以3×10^3/孔接种于96孔板,于37 ℃,5% CO_2细胞培养箱培养24 h。在TM(终浓度为5 μg/mL)处理条件下转染pIRE1α重组质粒,并设调零孔组、转染空载体对照组(Vector),每组设定5个复孔;分别在转染前和转染后培养1、2、3、4 d相应时间终止,每孔加入50 μL的XTT工作液(加入XTT前将培养基弃去换PBS),37 ℃下孵育4 h;用酶标仪测450 nm波长处的光密度值[D(450)],实验重复3次。按以下公式计算细胞增殖率(PR):PR=[实验组平均D(450)值-对照组平均D(450)值]/对照组平均D(450)值×100%。

1.5 流式细胞仪检测IRE1α对hPDLFs细胞周期的影响

取对数生长期hPDLFs细胞接种于6孔板,待细胞融合率达60%~80%时分别转染pcDNA3.1、IRE1α重组质粒,并设立未转染的阴性对照组,每个实验组设2个复孔。在TM终浓度为5 μg/mL时处理24 h,收集各组细胞用1 mL预冷70%乙醇溶液4 ℃固定18~24 h后,加入等体积的50 mg/L的碘化丙啶(PI)染液染色,FCM标准程序进行细胞周期分析。实验重复3次。

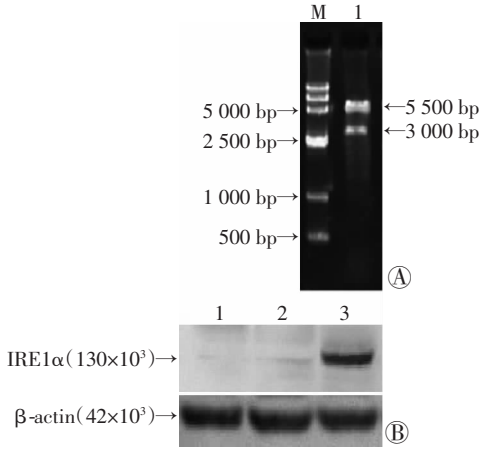
1.6 统计学分析

所有实验数据以$\bar{x}\pm s$来表示,多组数据间比较采用单因素方差分析,2组间差异比较用成组t检验。

2 结果

2.1 IRE1α体重组质粒的鉴定

将扩增得到的IRE1α重组质粒经*Xho* Ⅰ和*Hind*Ⅲ酶切鉴定,得到约2 944 bp的外源DNA插入片段(图1A),说明克隆成功,送华大基因公司测序。重组质粒序列测定结果经NTI软件比对证明,IRE1α重组质粒编码区序列与目的基因序列完全一致,说明重组质粒构建正确。Western blot检测结果显示,瞬时转染的IRE1α重组质粒可以在hPDLFs细胞内正确表达(图1B),其中转染组有少量内源性IRE1α,可能原因是脂质体转染处理引起的轻微ERS环境。

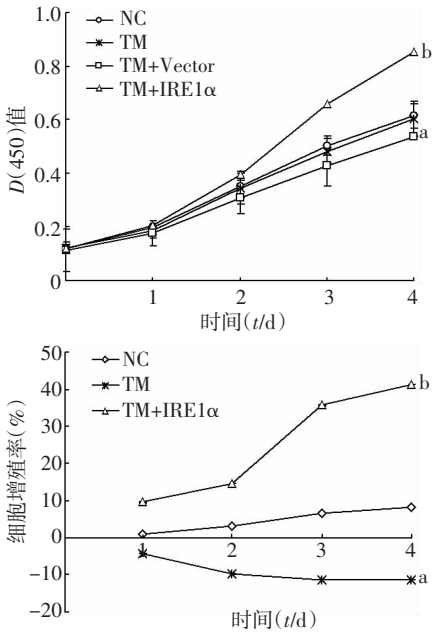


A:IRE1α重组质粒*Xho* Ⅰ和*Hind* Ⅲ双酶切琼脂糖电泳结果 M:DNA标准(DL 12000);1:pIRE1α;B:Western blot检测IRE1α重组质粒在hPDLFs细胞中的表达 1:未处理组(NC);2:空质粒组;3:IRE1α质粒(pIRE1α)

图1 IRE1α真核表达载体的鉴定

2.2 XTT法检测IRE1α对hPDLFs细胞增殖的影响

XTT法检测结果显示,与未处理组比较,TM组各时间点的hPDLFs细胞增殖明显受到抑制,抑制率分别为4.25%、9.67%、11.24%、11.35%,说明本实验的ERS环境建模成功;在TM处理条件下,TM+IRE1α组各时间点的hPDLFs细胞增殖率见图2,差异有统计学意义($P<0.01$)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与NC比较

A:转染前及在TM处理条件下转染空载体(TM+Vector)、IRE1α重组质粒(TM+IRE1α)后各组培养不同时间光密度值;B:转染后各时相点细胞的增长率

图2 XTT检测IRE1α对hPDLFs细胞增殖的影响

2.3 FCM检测IRE1α对hPDLFs细胞周期的影响

FCM检测结果显示,在TM刺激诱导ERS条件下,TM组和TM + IRE1α组处于S期的hPDLFs细胞分别为27.05%、39.23%,TM + IRE1α组hPDLFs细胞S期比例明显增多($P < 0.05$);而G_1期细胞比例(42.15%)低于TM组(60.72%,$P < 0.05$)。这些表明IRE1α促进hPDLFs细胞从G_1期进入S期。

3 讨论

牙周炎是牙周组织的感染性疾病,近年来,内质网应激(ERS)被认为可能是慢性牙周炎的致病途径[3-4]。因此在ERS引起牙周炎的机制中,如果人工处理某一环节使诱导牙周炎的机制中断,促进牙周组织修复和再生,则可望控制疾病的发展,是一种治疗牙周疾病的新思路。因此本实验通过对hPDLFs细胞进行预处理并激活适度的ERS,从而启动细胞内源性保护机制,提高hPDLFs的抗损伤能力。

内质网是膜蛋白和分泌性蛋白合成、翻译后修饰、折叠组装等的场所。在没有ERS状态时,内质网分子伴侣葡萄糖调节蛋白78(GRP78)分别和3个ERS感受蛋白:肌醇需酶(IRE1)、PKR样ER调节激酶(PERK)、活化转录因子6(ATF6)结合处于无活性状态;当牙周炎症引起ERS时,细胞就会启动一组细胞内信号传导通路,统称为UPR,UPR是存在于真核细胞中的一种保护性应激反应,通过未折叠蛋白在内质网内堆积,使GRP78/Bip从3种感受蛋白上解离,转而去结合未折叠蛋白,解离后的感受蛋白被活化并启动UPR,降低未折叠或错误折叠蛋白在内质网内的积累,从而增加细胞对内质网压力应激的耐受性,恢复内质网的正常功能。然而,长时间的UPR会导致内环境稳态不能重建,最终将会诱导细胞凋亡[5]。IRE1有IRE1α和IRE1β两个同源体[6-7]。IRE1α是目前研究最多的一条通路,在体内广泛存在,多项研究已证实IRE1α在未折叠蛋白积聚引起的ERS条件下对细胞的生存起到关键作用,能促进细胞增殖[8],是细胞在UPR中存活时起决定性作用[5,8]。

TM是蛋白质N-糖基化作用的抑制剂,具有抑制蛋白质折叠的作用,常用作ERS的诱导剂[9-10]。因此,本研究应用TM建立hPDLFs的ERS模型。结果显示,TM处理刺激hPDLFs后,引起hPDLFs对化学刺激的内质网应激,从而激活UPR。XTT法检测转染IRE1α重组质粒后ERS状态下对hPDLFs增殖的影响,结果分析表明,IRE1α实验组hPDLFs的细胞增殖率明显高于TM对照组($P < 0.01$)。FCM检测ERS条件下IRE1α重组质粒对hPDLFs的各周期比例,结果显示,IRE1α实验组hPDLFs处于S期的比例高于TM对照组($P < 0.05$),G_1期细胞比例低于TM对照组($P < 0.05$),表明IRE1α可在ERS状态下促进hPDLFs从G_1期进入S期,加速细胞周期的进程,从而促进细胞的增殖。

本实验将与ERS相关的IRE1信号通路与hPDLFs细胞的生长联系起来,结果发现IRE1α可在ERS状态下可促进hPDLFs细胞增殖。由于牙周组织再生修复的过程复杂,本实验仅在体外环境完成,当其作用于人体复杂环境中其作用是否发生改变尚不清楚,在今后的进一步研究中可能会发现应激状态下hPDLFs生长的深层机制,为牙周组织再生的研究机制提供一定的理论基础。

参考文献:

[1] Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, *et al*. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor[J]. Cell, 2001, 107(7): 881-891.

[2] Nagai A, Kadowaki H, Maruyama T, *et al*. USP14 inhibits ER-associated degradation via interaction with IRE1alpha[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379(4): 995-1000.

[3] Domon H, Takahashi N, Honda T, *et al*. Up-regulation of the endoplasmic reticulum stress-response in periodontal disease[J]. Clin Chim Acta, 2009, 401(1/2): 134-140.

[4] 聂敏, 何健民, 冯利, 等. 内质网应激诱导的细胞凋亡在慢性牙周炎中的作用初探[J]. 口腔医学研究, 2012, 28(2): 152-154.

[5] Lin J H, Li H, Yasumura D, *et al*. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response[J]. Science, 2007, 318(5852): 944-949.

[6] Tirasophon W, Lee K, Callaghan B, *et al*. The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response[J]. Genes Dev, 2000, 14(21): 2725-2736.

[7] Iwawaki T, Hosoda A, Okuda T, *et al*. Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(2): 158-164.

[8] Li X, Zhu H, Huang H, *et al*. Study on the effect of IRE1a on cell growth and apoptosis via modulation PLK1 in ER stress response[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 365(1/2): 99-108.

[9] 刘卉芳, 张惠洁, 刘晓燕, 等. 内质网应激对巨噬细胞类泛素折叠修饰蛋白Ufm1表达的影响[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2012, 32(3): 252-256.

[10] Guo F, Lin E A, Liu P, *et al*. XBP1U inhibits the XBP1S-mediated upregulation of the iNOS gene expression in mammalian ER stress response[J]. Cell Signal, 2010, 22(12): 1818-1828.

(**收稿**:2012-09-23;**修回**:2012-10-26)

(编辑 张 维)