

# 组蛋白乙酰化在慢性牙周炎来源牙周膜干细胞成骨分化中的作用

孙晋 刘芸 屈茜 曲娟 罗伟 张锋 吴敏

南方医科大学附属深圳市妇幼保健院口腔病防治中心, 深圳 518048

**[摘要]** 表观遗传是指基因序列不发生改变的前提下, 基因表达却发生改变, 且这种改变能够遗传至后代。其中, 组蛋白乙酰化属于表观遗传范畴中重要的一种类型。现有的研究表明慢性牙周炎的发生与表观遗传修饰具有一定的关系。结合已有研究, 本文对组蛋白乙酰化在慢性牙周炎来源牙周膜干细胞成骨分化中的作用作一综述。

**[关键词]** 组蛋白乙酰化; 慢性牙周炎; 牙周膜干细胞; 成骨分化

**[中图分类号]** Q 786 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2019.01.020

**Effect of histone acetylation on osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells derived from periodontitis tissue** Sun Jin, Liu Yun, Qu Qian, Qu Juan, Luo Wei, Zhang Feng, Wu Min. (Stomatology Health Care Center, Shenzhen Maternity & Child Healthcare Hospital, Southern Medical University, Shenzhen 518048, China)

Supported by: Shenzhen Science and Technology Innovation Committee (JCYJ20160427191204874); Biostime Maternal and Infant Nutrition and Health Research Project of National Center for Women and Children's Health, China CDC (2018FYH013).

Correspondence: Wu Min, E-mail: szwumin1998@126.com.

**[Abstract]** Epigenetics is defined as a change in gene expression without the alteration of the genetic sequence. Such a change would be inherited by offspring. Histone acetylation is a type of epigenetics. Existing studies proposed that chronic periodontitis is related to epigenetic modification. In this review, we summarised the influence of chronic periodontitis on periodontal ligament stem cells by histone acetylation.

**[Key words]** histone acetylation; chronic periodontitis; periodontal ligament stem cells; osteogenic differentiation

慢性牙周炎是一种以细菌感染为主的多因素进展性疾病, 其发病机制及发展过程复杂, 与细菌、细菌产物、口腔细胞及细胞因子等因素密切相关<sup>[1]</sup>。在慢性牙周炎的临床表现中, 以牙槽骨丧失的影响最为严重<sup>[2]</sup>。近年来越来越多的研究表明, 慢性牙周炎与表观遗传修饰有关, 然而缺乏系统性的总结。本文就表观遗传中组蛋白乙酰化与慢性牙周炎来源牙周膜干细胞 (periodontal ligament stem cells, PDLSCs) 成骨分化能力下降原因的相关性作一综述, 对慢性牙周炎牙槽骨吸收的发生机制进行新的思考。

## 1 组蛋白乙酰化属于表观遗传修饰的一种

细胞内基因的表达是从基因序列转变为蛋白质的过程, 主要分为两步: 转录与翻译, 即一段DNA序列通过转录因子合成信使RNA (message RNA, mRNA), 继而借助转运RNA (transcription RNA, tRNA) 以mRNA为模板将氨基酸装配为蛋白质<sup>[3]</sup>。经典遗传学“孟德尔定律”认为基因序列决定一个物种的性状表达<sup>[4]</sup>。然而, 直至沃丁顿以及霍利迪提出的表观遗传概念开始<sup>[5]</sup>, 人类逐渐认识到了基因结构的改变能够干扰基因序列原定的表达, 从而出现新的性状, 即表观遗传学的思路。表观遗传的定义为无DNA序列的改变但发生蛋白质表达的变化, 并可以在发育和细胞增殖过程中稳定地传递, 其机制主要是通过调控基因转录时以及翻译前的过程来调节基因表达, 主要包括DNA甲基化、组蛋白乙酰

**[收稿日期]** 2018-02-16; **[修回日期]** 2018-11-03

**[基金项目]** 深圳市科创委立项 (JCYJ20160427191204874); 中国疾病预防控制中心妇幼保健中心合生元母婴营养与健康研究项目 (2018FYH013)

**[作者简介]** 孙晋, 住院医师, 硕士, E-mail: 631589163@qq.com

**[通信作者]** 吴敏, 主任医师, 硕士, E-mail: szwumin1998@126.com

化、微小RNA (micro RNA, miRNA) 修饰、长链非编码RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 修饰等<sup>[6]</sup>。

组蛋白乙酰化属于表观遗传修饰的一种, 当组蛋白结构发生改变时会影响基因的转录<sup>[2]</sup>。组蛋白与缠绕其外周的DNA组成核小体, 一连串的核小体结合为染色质。由于组蛋白中氨基基团带正电荷, 而外周的DNA带负电荷, 形成的电势平衡使DNA紧密缠绕在组蛋白四周, 因为转录因子与DNA序列结合出现困难, 此时DNA序列的转录受到抑制。当组蛋白乙酰基转移酶 (histone acetyltransferase, HAT) 将乙酰辅酶A的乙酰基部分转移至组蛋白氨基末端上特定赖氨酸残基的 $\epsilon$ -氨基基团上时, 带负电的乙酰基打破了组蛋白的原本电势平衡, 致使外周DNA序列的结构发生松弛展开, 促进转录因子与DNA序列接触, 此时DNA序列的转录增强<sup>[6]</sup>。因为HAT分为15种, 同时每一种HAT会倾向于针对某一种或几种组蛋白上面的特定赖氨酸位点, 故组蛋白乙酰化具有特异性激活特定基因转录过程的特点<sup>[7]</sup>。而组蛋白去乙酰基转移酶 (histone deacetylase, HDAC) 具有移除乙酰基的功能, 当其移去组蛋白赖氨酸残基上的乙酰基时, 组蛋白恢复正电性, 增加了与DNA之间的吸引力, 使转录因子不易接近启动子, 从而反向抑制特定基因的转录<sup>[8]</sup>。

目前有关组蛋白修饰的研究大多集中在组蛋白乙酰化方面, 同时, 学者们进行的组蛋白修饰研究主要为肿瘤及免疫学等领域, 而在口腔牙周炎方面的研究较少。

## 2 组蛋白乙酰化与牙周炎发生的关系

目前, 关于表观遗传与牙周炎的发生主要集中在DNA甲基化方面, 而在组蛋白乙酰化领域的研究很少, 且较为表浅。研究<sup>[9]</sup>发现, HDAC在牙龈卟啉单胞菌的毒力因子作用下促进牙龈上皮细胞内的Toll样受体2/4或蛋白酶激活受体表达, 从而激活核因子 $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 信号通路、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 信号通路等引发牙周炎。在牙龈卟啉单胞菌大鼠实验性牙周炎模型中加入HDAC抑制剂能够减少牙槽骨丧失<sup>[10]</sup>。Lindroth等<sup>[11]</sup>发现当NF- $\kappa$ B募集至白细胞介素 (interleukin, IL) -1、IL-2、IL-6、IL-8、IL-10及IL-12基因的启动子上时, 上述基因的H3K9乙酰化程度升高, 接着上调上述基因的表达。Sun等<sup>[12]</sup>利用实时定量聚合酶链式反应 (quantitative real time-polymerase chain reaction, qRT-PCR)

通过对比正常及牙周炎来源PDLSCs中HAT家族的表达水平, 发现与正常来源PDLSCs相比较, 牙周炎来源PDLSCs中的GCN5、MOZ、MORF、EP300及HAT1基因表达出现显著的下降。上述研究表明, HAT与牙周炎的发生具有明显的相关性。

## 3 慢性牙周炎来源PDLSCs成骨分化能力的下降

牙周炎是一类以牙龈炎症和牙槽骨吸收为主要特征的慢性炎症性疾病, 可造成牙周支持组织的进行性破坏, 牙槽骨不可逆地吸收, 最终导致牙齿丧失<sup>[13]</sup>。牙周炎的致病因素主要为细菌及其产物, 在脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的刺激下, 宿主牙周组织中的免疫细胞产生炎症因子如肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-1 $\beta$ 及IL-6等引发一系列炎症表现<sup>[14]</sup>。其中, 局部促进因素 (口腔卫生不良、牙石堆积、食物嵌塞、不良修复体刺激及吸烟等) 及全身促进因素 (糖尿病、心血管疾病、骨质疏松、获得性免疫缺陷综合征及遗传疾病等) 均能够通过促进炎症因子的释放推动牙周炎的发展<sup>[15]</sup>。

牙周组织包括牙槽骨、牙龈、牙周膜及牙骨质等主要结构, 其中于牙周膜中存在大量的PDLSCs, 在牙周组织的成骨平衡中发挥着重要的作用<sup>[16]</sup>。自2004年美国国立卫生研究院牙科与颌面研究中心的研究人员首次从牙周组织中取材并体外扩大培养具有克隆形成、增殖及分化能力的PDLSCs后<sup>[17]</sup>, 口腔学者开始把焦点放到其上。

由于微环境时刻影响着干细胞的行为, 学者们认为牙周炎引发的牙槽骨吸收与PDLSCs成骨分化能力的改变具有相当的关系<sup>[18]</sup>。在健康的牙周组织中, 正常微环境保护着PDLSCs, 形成正确的成骨与破骨平衡, 牙槽骨高度无异常变化; 但发生牙周炎时, PDLSCs周围的微环境发生消极影响, 炎症因子干扰PDLSCs, 致使其成骨分化能力下降, 甚至出现了破骨分化能力增强的现象<sup>[7]</sup>。对于牙周炎来源PDLSCs成骨分化能力的降低, 目前较为公认的机制有以下几种: 经典Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的激活抑制PDLSCs成骨分化能力<sup>[19]</sup>、非经典 (Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ ) 信号通路的激活促进PDLSCs成骨分化能力<sup>[20]</sup>, PERK信号通路的激活促进PDLSCs成骨分化能力<sup>[21]</sup>。其机制大致可以理解为由于牙周致病菌释放LPS以后激活或抑制PDLSCs中上述通路, 中间引发了炎症因子的释放, 进而于细胞核中调控转录因子, 影响成骨相关基因的表达, 最终抑制细胞的成骨分化能力。

#### 4 慢性牙周炎通过降低组蛋白乙酰化水平抑制PDLSCs的成骨分化能力

由口腔细菌引起的牙周炎是一种复杂的免疫-炎症反应<sup>[22]</sup>,会导致以牙槽骨吸收为主的进展性疾病<sup>[23]</sup>。与健康来源PDLSCs相比较,慢性牙周炎来源PDLSCs在体外培养过程中呈现出低水平的成骨分化现象,并且这种现象在细胞传代中持续维持着,这似乎是对先前炎症环境的“记忆”,于是有学者<sup>[7]</sup>认为这种现象的发生可能是因为表观遗传修饰层面的改变。此外,Ye等<sup>[24]</sup>发现干细胞在表观遗传层面上发生改变时,能够引起成骨基因启动子上的组蛋白发生甲基化或者去乙酰化修饰,从而特异性地下调某些成骨基因的转录。同时有研究<sup>[25]</sup>表明,表观遗传修饰的改变需要一段长时间的积累,因此这提示,从表观遗传角度来解释慢性牙周炎来源PDLSCs成骨分化能力下降较为恰当。

关于慢性牙周炎如何通过组蛋白乙酰化影响PDLSCs成骨分化能力的研究主要开始于2015年。Li等<sup>[7]</sup>在2016年通过比较正常来源及牙周炎来源的PDLSCs发现,HAT GCN5能够特异性乙酰化Dickkopf相关蛋白1(Dickkopf-related protein 1, DKK1)基因核小体中的组蛋白H3K9及H3K14,而慢性牙周炎能抑制GCN5基因的表达,诱发经典Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的激活,所以PDLSCs的成骨分化能力发生降低。袁林等<sup>[2,26]</sup>发现与正常来源PDLSCs相比较,牙周炎来源PDLSCs中的HAT GCN5和MORF基因及蛋白表达下降。当采用小干扰RNA下调两者表达时,PDLSCs的成骨分化能力受到抑制。Xue等<sup>[27]</sup>在2016年于内质网应激的基础上发现慢性牙周炎通过负向影响HAT MORF,继而激活PERK通路,上调非折叠蛋白(unfolded protein response, UPR),最终抑制PDLSCs的成骨分化能力。Sun等<sup>[12]</sup>在2017年于体外细胞实验及大鼠牙槽骨缺损模型发现通过上调HAT MORF或MOZ可逆转牙周炎来源的PDLSCs的成骨分化能力,从而反向证实慢性牙周炎通过组蛋白乙酰化影响PDLSCs的成骨分化能力。此外,对于HDAC的研究,杨倩娟<sup>[28]</sup>发现HDAC9能够将组蛋白H3K14和H4K16去乙酰化,抑制microRNA17-92家族,从而导致牙周炎PDLSCs成骨分化能力的降低。

上述前瞻性研究均说明慢性牙周炎通过改变PDLSCs中的组蛋白乙酰化状态从而影响细胞的成骨分化能力。其中,较为明确的HAT包括GCN5、MORF、MOZ,HDAC为HDAC9。然而,笔者认为目前的研究仍然欠缺。表观遗传,由表观及遗传组

成。表观即基因序列以外的结构;遗传即修饰能够通过细胞传代稳定传递下去。即使根据上述研究,能够在分子层面上确定表观遗传修饰与慢性牙周炎PDLSCs成骨分化两者的联系,但是仍没在功能学上观察到修饰导致的改变在细胞传代中的传递。笔者推测在接下来的研究中,学者们可以从动物实验出发,探讨环境诱导母代对于动物后代性状变化的影响。这对于治疗因慢性牙周炎导致的牙槽骨丧失具有深远的意义。

综上所述,由于慢性牙周炎持续刺激牙周组织中的PDLSCs,致使细胞内部分HAT的下调或部分HDAC的上调,从而降低特定组蛋白的乙酰化水平,进而激活经典Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路或抑制部分中间因子,影响着细胞中特定成骨相关基因的转录与翻译,破坏PDLSCs的成骨分化能力,最终导致牙槽骨发生不可逆的吸收。

鉴于此,在临床上可以运用分子手段或药物在慢性牙周炎患者的牙周组织中针对性上调成骨基因的乙酰化水平,从根本上恢复患者PDLSCs成骨分化能力,逆转慢性牙周炎导致的牙槽骨骨量降低,并且将这种性状在牙周组织中长期地保持。

#### [参考文献]

- [1] 孟焕新. 牙周病学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 156-157.  
Meng HX. Periodontology[M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 156-157.
- [2] 袁林, 孙晋, 程峰, 等. 牙周膜干细胞中乙酰基转移酶MORF调控成骨的研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2016, 32(6): 778-782.  
Yuan L, Sun J, Cheng F, et al. Acetyltransferase MORF regulates osteogenic differentiation potential of periodontal ligament stem cells[J]. J Pract Stomatol, 2016, 32(6): 778-782.
- [3] Roberfroid S, Vanderleyden J, Steenackers H. Gene expression variability in clonal populations: causes and consequences[J]. Crit Rev Microbiol, 2016, 42(6): 969-984.
- [4] van Dijk PJ, Ellis TH. The full breadth of Mendel's genetics[J]. Genetics, 2016, 204(4): 1327-1336.
- [5] Holliday R. DNA methylation and epigenetic defects in carcinogenesis[J]. Mutat Res, 1987, 181(2): 215-217.
- [6] 雷丹, 姜苏, 吴亚菲, 等. 表观遗传修饰和牙周病的相关性[J]. 国际口腔医学杂志, 2012, 39(2): 257-259.  
Lei D, Jiang S, Wu YF, et al. Association between epigenetic modification and periodontal diseases[J]. Int J Stomatol, 2012, 39(2): 257-259.



- [7] Li B, Sun J, Dong Z, et al. GCN5 modulates osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through DKK1 acetylation in inflammatory microenvironment[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26542.
- [8] Timmermann S, Lehrmann H, Polesskaya A, et al. Histone acetylation and disease[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58(5/6): 728-736.
- [9] Lavu V, Venkatesan V, Rao SR. The epigenetic paradigm in periodontitis pathogenesis[J]. *J Indian Soc Periodontol*, 2015, 19(2): 142-149.
- [10] Ari G, Cherukuri S, Namasivayam A. Epigenetics and periodontitis: a contemporary review[J]. *J Clin Diagn Res*, 2016, 10(11): ZE07-ZE09.
- [11] Lindroth AM, Park YJ. Epigenetic biomarkers: a step forward for understanding periodontitis[J]. *J Periodontal Implant Sci*, 2013, 43(3): 111-120.
- [12] Sun J, Dong Z, Zhang Y, et al. Osteole improves function of periodontitis periodontal ligament stem cells via epigenetic modification in cell sheets engineering[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5254.
- [13] Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases[J]. *Lancet*, 2005, 366(9499): 1809-1820.
- [14] Lindemann RA, Economou JS, Rothermel H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides[J]. *J Dent Res*, 1988, 67(8): 1131-1135.
- [15] Manjunath BC, Praveen K, Chandrashekar BR, et al. Periodontal infections: a risk factor for various systemic diseases[J]. *Natl Med J India*, 2011, 24(4): 214-219.
- [16] Xu Q, Li B, Yuan L, et al. Combination of platelet-rich plasma within periodontal ligament stemcell sheets enhances cell differentiation and matrix production[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017, 11(3): 627-636.
- [17] Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament[J]. *Lancet*, 2004, 364(9429): 149-155.
- [18] Ohlstein B, Kai T, Decotto E, et al. The stem cell niche: theme and variations[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(6): 693-699.
- [19] 孔祥伟, 叶瑞东, 刘文佳, 等. 炎症微环境中经典Wnt信号通路对牙周膜干细胞成骨分化的调控作用[J]. *口腔生物医学*, 2015, 6(3): 129-136.
- Kong XW, Ye RD, Liu WJ, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway mediates the impaired osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells in inflammatory microenvironment[J]. *Oral Biomed*, 2015, 6(3): 129-136.
- [20] 刘娜, 石海刚, 张维, 等. 炎症微环境作用下经典及非经典Wnt通路平衡对牙周膜干细胞成骨分化的调控作用[J]. *中华口腔医学杂志*, 2016, 51(11): 673-679.
- Liu N, Shi HG, Zhang W, et al. The crosstalk between canonical and noncanonical Wnt signaling pathway in osteoblast differentiation of periodontal ligament stem cells in inflammatory microenvironments[J]. *Chin J Stomatol*, 2016, 51(11): 673-679.
- [21] Tan J, Zhou LH, Xue P, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  attenuates the osteogenic differentiation capacity of periodontal ligament stem cells by activating protein kinase like endoplasmic reticulum kinase signaling[J]. *J Periodontol*, 2016, 87(8): e159-e171.
- [22] 白林, 辛月娇, 段丁瑜, 等. 巨噬细胞功能和炎症消退机制及与牙周炎关系研究进展[J]. *华西口腔医学杂志*, 2017, 35(4): 427-432.
- Bai L, Xin YJ, Duan DY, et al. Advances in macrophage function and its anti-inflammatory and proresolving activity and role in periodontitis development[J]. *West Chin J Stomatol*, 2017, 35(4): 427-432.
- [23] Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease[J]. *J Periodontol*, 2008, 79(8): 1601-1608.
- [24] Ye L, Fan Z, Yu B, et al. Histone demethylases KDM4B and KDM6B promote osteogenic differentiation of human MSCs[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(6): 898-899.
- [25] Gomez RS, Dutra WO, Moreira PR. Epigenetics and periodontal disease: future perspectives[J]. *Inflamm Res*, 2009, 58(10): 625-629.
- [26] 袁林, 孙晋, 杨征毅, 等. 乙酰基转移酶KAT2A调控牙周膜干细胞成骨分化的研究[J]. *口腔生物医学*, 2015, 6(3): 155-159.
- Yuan L, Sun J, Yang ZY, et al. Study of acetyltransferase KAT2A regulating osteogenic differentiation potential of periodontal ligament stem cells[J]. *Oral Biomed*, 2015, 6(3): 155-159.
- [27] Xue P, Li B, An Y, et al. Decreased MORF leads to prolonged endoplasmic reticulum stress in periodontitis-associated chronic inflammation[J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(11): 1862-1872.
- [28] 杨倩娟. miR-17-92家族介导的HDAC9炎症牙周膜干细胞成骨分化能力的影响[D]. 西安: 第四军医大学, 2016.
- Yang QJ. miR-17-92 cluster mediated HDAC9 effects on the osteogenetic capability of the inflammatory PDLSCs[D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University, 2016.