

文章编号:1004-7220(2016)03-0272-06

牵张应变对人牙周膜细胞中 NLRP3 炎症体通路相关因子表达的影响

赵丹^{1,2}, 吴雅琴^{1,2}, 胥春^{1,2}, 张富强^{1,2}

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院 口腔修复科, 上海 200011;

2. 上海市口腔医学研究所, 上海市口腔医学重点实验室, 上海 200011)

摘要:目的 研究牵张应变对人牙周膜细胞(human periodontal ligament cells, HPDLCs)表达炎症体通路相关因子的影响。方法 对体外培养的 HPDLCs 施加 20% 牵张应变 6、24 h, 分别采用实时定量 PCR 以及免疫印迹技术检测 NLRP3、Caspase-1 及 IL-1 β 的 mRNA 及蛋白表达的变化。对体外培养的 HPDLCs 施加 20% 牵张应变 1、2、4、6 h 后, 采用酶联免疫吸附实验检测细胞分泌的 IL-1 β 蛋白变化。对照组 HPDLCs 培养于弹性培养皿中, 与动态牵张应变加载组的培养条件一致, 但不加载应变。结果 6 h 牵张应变作用下 HPDLCs 中 NLRP3、caspase-1 及 IL-1 β 的 mRNA 及蛋白表达较对照组增加 ($P < 0.05$); 24 h 牵张应变作用下 HPDLCs 中 NLRP3 的蛋白表达水平上调 ($P < 0.05$); 加载牵张应变 4、6 h 后, 细胞培养上清中 IL-1 β 含量随牵张时间的增长而增加 ($P < 0.05$)。结论 20% 机械牵张 6 h 能诱导 HPDLCs 中 NLRP3/Caspase-1 炎症体-IL-1 β 通路因子的表达。

关键词: 人牙周膜细胞; 机械牵张; 炎症体; 体外培养

中图分类号: R318.01 **文献标志码:** A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2016.03.272

The influence of mechanical stretch on expression of NLRP3 inflammasome related factors in human periodontal ligament cells

ZHAO Dan^{1,2}, WU Ya-qin^{1,2}, XU Chun^{1,2}, ZHANG Fu-qiang^{1,2} (1. Department of Prosthodontics, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 2. Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai 200011, China)

Abstract: Objective To study the effect of mechanical stretch on expression of inflammasome related factors in human periodontal ligament cells (HPDLCs). **Methods** HPDLCs were subjected to mechanical stretch with a 20% elongation magnitude for 6 h or 24 h, respectively. The mRNA and protein expression levels of IL-1 β , Caspase-1 and NLRP3 were detected by real-time quantitative PCR and Western blot. The levels of IL-1 β in the cell-culture medium of HPLCs in response to mechanical stretch for 1, 2, 4, 6 h were detected by ELISA, respectively. In control group, HPDLCs were cultured in similar conditions but not subjected with stretch. **Results** The mRNA and protein expression levels of IL-1 β , Caspase-1 and NLRP3 were up-regulated with mechanical stretch for 6 h ($P < 0.05$). The protein expression level of NLRP3 was up-regulated with mechanical stretch for 24 h ($P < 0.05$). Compared with control group, the content of IL-1 β in the cell-culture medium of HPLCs was increased significantly in response to mechanical stretch for 4 h and 6 h ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression

收稿日期:2015-12-08; 修回日期:2016-01-17

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31470903,31270991,30900282),上海市浦江人才计划资助项目(13PJD021),上海市青年科技启明星计划(A类)项目(10QA1404200),上海市重点学科建设项目(T0202,S30206-sms02)。

通信作者:胥春,副主任医师, E-mail:inxuchun@163.com;张富强,主任医师, E-mail: fqzhang@vip.163.com。

of NLRP3/Caspase-1/IL-1 β related factors in HPDLCs can be induced by 20% mechanical stretch for 6 h.

Key words: Human periodontal ligament cells (HPDLCs); Mechanical stretch; Inflammasome; *In vitro* culture

牙周膜在咀嚼过程中不断承受着牙齿所传递来的咬合力,并将这一力量分散到牙槽骨上。动物实验及临床观察中均发现,适宜的咬合力有利于牙周组织的健康,咬合力减弱、丧失(如牙齿咬合接触不良、对颌牙缺失)则可导致牙周组织萎缩、吸收^[1],而咬合力过大(如牙齿咬合过高、义齿制作不当致基牙咬合力过大、创伤牙合等)可导致牙周膜受力过大发生损伤、牙周组织破坏吸收,最终导致牙齿脱落或拔除^[2]。口腔正畸治疗中,对牙齿施加适宜的力可使牙周组织改建、牙齿移动,而施力过大则会造成牙周组织破坏吸收、牙齿松动甚至脱落^[3]。

人牙周膜细胞(human periodontal ligament cells, HPDLCs)是牙周膜中的主体细胞,牙周膜中的应力通过基质、胶原传递到 HPDLCs,使其产生机械应变。通过对体外培养的 HPDLCs 施加机械力发现,机械力(牵张、压缩、剪切等)促进其分泌多种炎症因子,如白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)^[4]、前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)^[5]、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)^[6]、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)^[7]、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)^[8]等。动物体内实验也显示,机械应力上调实验动物龈沟液中的 IL-1 β 和 PGE₂ 的表达^[9]。力学刺激可引起牙周组织细胞的炎症反应,但其具体作用机制尚不清楚。

炎症体(inflammasome)由核苷酸结合寡聚化结构域蛋白样受体(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors, NLRs)[如含核苷酸结合寡聚化结构域、富含亮氨酸重复序列、热蛋白结构域蛋白(nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat and pyrin domain-containing, NLRP)]、凋亡相关点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)和炎性天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(cysteine-dependent aspartate-specific proteases, Caspase)构成,是一种通过介导 IL-1 β 等炎症因子的释放来参与炎症反应的蛋白复合体,是机体天然免疫系统对炎症信号进行处理、转导的重要平台^[10]。NLRP3 炎症体是目前发现的一种典型的炎症体,由 ASC、Caspase-1 和 NLRP3 共同组成。

在免疫细胞应对外界有害刺激因素时,NLRP3 炎症体通路是介导炎症反应过程中的关键环节,它能够活化 Caspase-1,继而诱导下游分子 IL-1 β 的加工与释放,参与机体固有免疫应答^[11]。之前对固有免疫防御反应的研究主要集中于免疫细胞,而鲜有对非免疫细胞的研究。最新报道显示,眼、口腔、肺、血管、肾脏以及子宫的上皮细胞作为非免疫细胞也能表达 NLRP3 炎症体^[12],而其中血管上皮细胞和肺上皮细胞在力学刺激下会上调 NLRP3 炎症体的表达^[13-14]。

研究发现,多种细菌都能激活牙周组织中的 NLRP3 炎症体通路导致牙周炎症^[15],而作为非免疫细胞的 HPDLCs 在受到机械力这一牙周组织常见刺激时是否会激活相关炎症体通路,目前鲜有报道^[16]。因此,本研究通过检测 HPDLCs 受到牵张应变刺激后 NLRP3 炎症体通路相关因子的表达,以期为今后进一步探索机械力引起牙周炎症的机制提供必要参考。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

DMEM 培养基(Hyclone 公司,美国);胎牛血清(Gibco 公司,美国);胰酶(Gibco 公司,美国);D-Hank's 缓冲液(自配,含 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素);4% 多聚甲醛固定液(自配);TRIZOL(Invitrogen 公司,美国);ViiA 7 Real-time PCR 仪(Applied Biosystems 公司,美国);反转录试剂盒试剂盒(Takara 公司,日本);CO₂ 培养箱(Heraeus 公司,德国);FX-5000 Tension Flexcell 体外细胞力学加载装置(Flexcell 公司,美国);6 孔弹性基底培养皿(Flexcell 公司,美国);倒置相差显微镜(Leica 公司,德国);兔抗人 NLRP3 抗体(Abcam 公司,英国);兔抗人 Caspase-1、IL-1 β 抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国);兔抗人 GAPDH 抗体(碧云天公司,中国);羊抗兔二抗(上海康成生物公司,中国);IL-1 β ELISA 试剂盒(R&D 公司,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 HPDLCs 体外培养及鉴定 在取得监护人

知情同意下收集因正畸需要拔除的12~13岁青少年患者的健康前磨牙,无菌条件下用刀片将牙根中1/3的牙周膜组织刮下,剪碎后接种于培养皿,盖玻片固定后于恒温细胞培养箱中静置密闭培养(37℃,5%CO₂)。当细胞从组织块中爬出后继续培养,待细胞铺满皿底80%~90%时即进行传代。取第2代细胞爬片,用免疫组化SP法进行波丝蛋白和角蛋白染色,进行细胞组织来源鉴定。取第4~6代细胞作为实验用细胞。

1.2.2 HPDLCs 应变加载 将第4代HPDLCs(1.5×10⁵/孔)接种于6孔弹性基底培养皿,常规培养72h至细胞接近汇合,更换含10%胎牛血清的培养基。根据前期以及参考相关研究文献[17-18]的研究结果,采用Flexcell力学加载装置对其分别加载20%动态牵张应变6、24h(实时定量PCR以及免疫印迹实验),或1、2、4、6h(酶联免疫吸附实验),加载频率为6次/min,5s拉伸,5s松弛。对照组HPDLCs培养于弹性培养皿中,与动态牵张应变加载组的培养条件一致,但不加载应变。每个加载组重复实验3次。

1.2.3 检测牵张应变作用下的基因变化 牵张加载完成后,用TRIZOL法提取总RNA,并以此作为模板,用反转录试剂盒合成cDNA。引物由日本Takara公司设计合成,以GAPDH为内参(见表1)。PCR条件为:95℃预变性30s,95℃变性5s,58℃退火1min,72℃延伸30s,共40个循环。

表1 基因引物序列

Tab.1 Gene primer sequences

基因	双向引物序列
GAPDH	F:5' GGGAACTGTGGCGTGAT 3' R:5' GAGTGGGTGTCGCTGTTGA 3'
CASP1	F:5' GGACAAGTCAAGCCGCACA 3' R:5' CATGTCCGAAGCAGTGAGAT 3'
Nlrp3	F:5' GAGCACCAGCCAGAGTCTAA 3' R:5' CCGAATGTTACAGCCAGGATGC 3'
IL-1β	F:5' CGAATCTCCGACCACCACTACA 3' R:5' AGGGAACCAGCATCTTCCTCAG 3'

1.2.4 检测牵张应变作用下蛋白变化 牵张加载完成后,冰上于弹性基底培养皿各孔加入200μL细胞裂解液,裂解细胞,低温离心,获取上清。采用

BCA蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。取等量总蛋白的各组样品,进行SDS-PAGE蛋白电泳,后将蛋白带转移到聚偏二氟乙烯膜上,封闭液封闭,加入一抗4℃过夜,漂洗后加入稀释的二抗,摇动反应1~2h进行杂交,显色。实验以GAPDH作为内参,分析测定目的条带的相对积分光密度,分析目标蛋白的表达水平。

1.2.5 检测细胞培养上清IL-1β含量变化 牵张加载完成后,取培养液上清,用ELISA试剂盒检测细胞培养上清中IL-1β的含量。

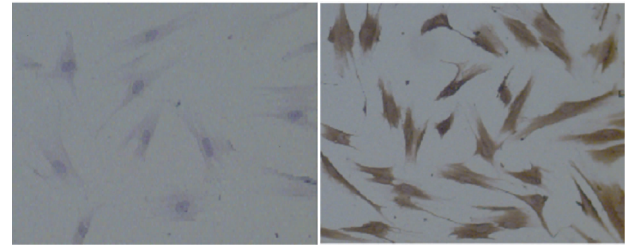
1.3 统计学分析

应用SPSS 13.0软件对数据进行单因素方差分析,组间比较采用LSD法,检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 HPDLCs 体外培养及鉴定

所培养细胞在倒置相差显微镜下观察呈长梭形,胞体丰满,胞浆均匀,胞核呈圆形或卵圆形,传代后细胞生长旺盛、性状稳定,免疫细胞化学检测结果为抗波丝蛋白阳性、抗角蛋白阴性,显示为间充质来源,符合牙周膜细胞特征(见图1)。



(a) 抗角蛋白染色阴性

(b) 抗波丝蛋白染色阳性

图1 免疫组化染色照片

Fig.1 Immunohistochemical staining images (a) Anti-keratin staining negative, (b) Anti-vimentin staining positive

2.2 牵张应变对NLRP3、Caspase-1及IL-1β mRNA表达的影响

如图2所示,6h牵张应变作用下,HPDLCs中NLRP3、Caspase-1及IL-1β的mRNA表达均较对照组增加($P < 0.05$)。24h牵张应变作用下,HPDLCs中NLRP3、Caspase-1及IL-1β的mRNA表达较6h牵张应变作用下减少($P < 0.05$)。24h牵张应变作用下,HPDLCs中Caspase-1及IL-1β的mRNA表达均较对照组减少($P < 0.05$)。

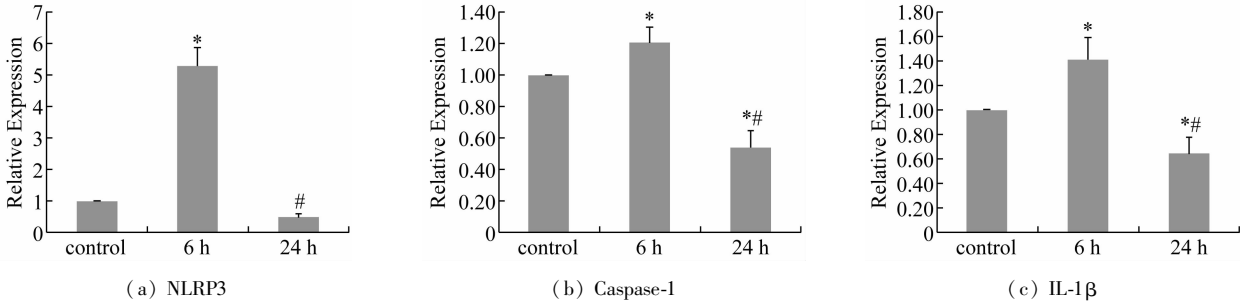


图2 牵张应变对 NLRP3、Caspase-1 以及 IL-1β mRNA 表达的影响 (* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与 6 h 牵张组相比)

Fig. 2 Effects of mechanical stretch on the expression of NLRP3, Caspase-1 and IL-1β mRNA (a) NLRP3, (b) Caspase-1, (c) IL-1β

2.3 牵张应变对 NLRP3、Caspase-1 及 IL-1β 蛋白表达的影响

如图 3 所示, 6、24 h 牵张应变均上调 NLRP3 蛋白表达 ($P < 0.05$), 24 h 牵张组上调更明显 ($P < 0.05$)。

6 h 牵张应变使未活化以及活化的 Caspase-1 蛋白表达均有明显的增加 ($P < 0.05$), 而 24 h 牵张组其表达下调 ($P < 0.05$)。6 h 牵张应变使未活化以及活化的 IL-1β 蛋白明显增加 ($P < 0.05$)。

2.4 牵张应变对细胞培养上清中 IL-1β 含量的影响

如图 4 所示, 牵张应变 2 h 以内, 细胞培养上清中 IL-1β 含量未见明显变化 ($P > 0.05$)。而牵张应变 4、6 h 后, 细胞培养上清中 IL-1β 含量明显增加 ($P < 0.05$), 并在 6 h 内随牵张时间的增长而增加 ($P < 0.05$)。

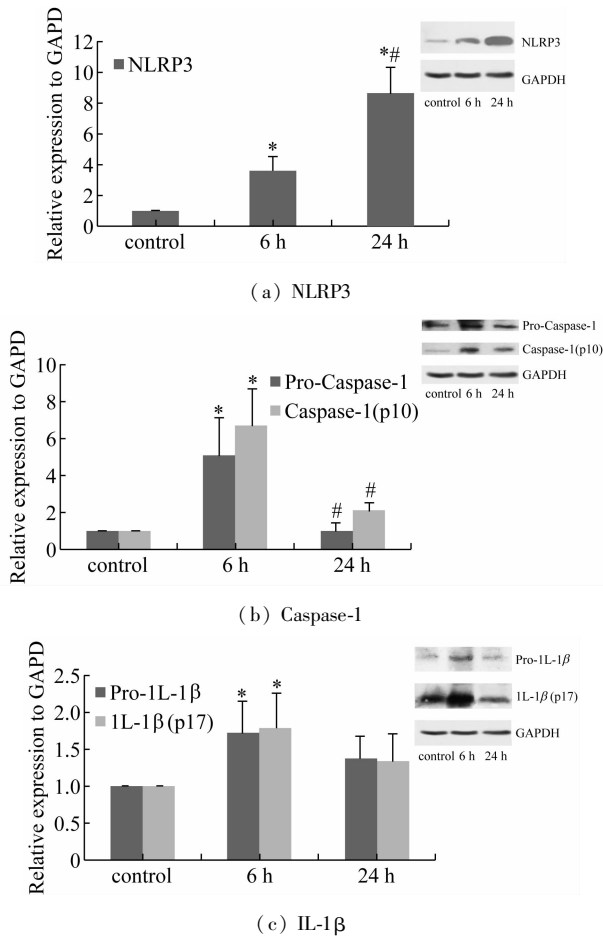


图3 牵张应变对 NLRP3、Caspase-1 及 IL-1β 蛋白表达的影响 (* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与 6 h 牵张组相比)

Fig. 3 Effects of mechanical stretch on the expression of NLRP3, Caspase-1 and IL-1β proteins (a) NLRP3, (b) Caspase-1, (c) IL-1β

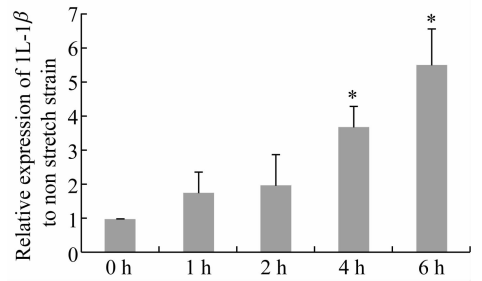


图4 牵张应变对细胞培养上清中 IL-1β 含量的影响

(* $P < 0.05$, 与对照组相比)

Fig. 4 Effects of mechanical stretch on the release of IL-1β in the cell-culture medium

3 讨论

近年来, 随着对炎症体研究的不断深入, 研究者们发现了炎症体及炎性 Caspases 在多种疾病发生、发展中的重要作用, 并为治疗相关疾病提供了新的思路。本实验发现, 机械力加载能诱导体外培养 HPDLCs 中 NLRP3 炎症体信号通路相关因子在基因和蛋白水平的变化, 并同时促进炎症因子 IL-1β 的分泌, 从而参与宿主细胞的固有免疫防御反应。

在牙周炎症的发生、发展过程中, IL-1β 作为一

种重要的炎性介质起到了至关重要的作用,能通过其自身或其下游的信号通路造成牙周软组织的破坏,并通过激活破骨过程、抑制成骨过程造成牙周骨质的吸收。研究显示,当 IL-1 β 作用于 HPDLCs 时,能通过上调 COX-2 表达而刺激 PGE₂ 合成^[12],并能上调 IL-8 的表达^[8],促进基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的表达,并抑制金属蛋白酶组织抑制剂-II(tissue inhibitor of metalloproteinase-II, TIMP-II)的表达,下调骨钙素(osteocalcin, OC)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)等成骨蛋白的表达^[19],从而促进牙周软组织的破坏和牙周骨质的吸收。细胞实验研究显示,HPDLCs 受到力学刺激会激活炎症信号通路从而导致多种炎症因子的表达,其中 IL-1 β 的表达明显上调,并对牙周炎症的发生、发展起到关键的作用^[4]。动物实验也发现,一定正畸力作用下牙周组织中表达 IL-1 β mRNA^[20]。本研究通过对体外培养的 HPDLCs 进行不同时长的牵张应变,发现细胞中 IL-1 β 的基因、蛋白表达水平以及分泌量均有变化,进一步揭示了机械力与牙周组织炎症反应之间的关系。Wu 等^[18]对于机械通气导致肺泡细胞损伤的研究结果显示,2、4 h 牵张力学刺激会上调肺泡巨噬细胞 IL-1 β 的分泌量。本研究也发现,4、6 h 牵张应变促进了 HPDLCs 分泌 IL-1 β ,与上述机械力致肺泡细胞损伤的研究结果类似,且 IL-1 β 的分泌量随牵张时间延长而增加。这一发现提示,机械力刺激导致牙周组织炎症的过程中可能存在着与机械力导致肺泡细胞损伤类似的机制。

研究显示,NLRP3 在牙龈炎、侵袭性牙周炎及慢性牙周炎患者牙龈组织中的表达均明显增加^[21],牙龈上皮细胞在被牙周致病菌牙龈卟啉单胞菌感染后 NLRP3 炎症体活化^[22],提示 NLRP3 炎症体在牙周炎症发生过程中可能扮演着重要的角色。现阶段对机械牵张诱导肺损伤的研究报道,初步揭示了 NLRP3/Caspase-1 炎症体在力刺激引起肺部炎症、损伤中的作用^[18]。牵张应变诱导 HPDLCs 释放炎症因子过程中是否有类似的炎症体信号通路的参与呢?本研究发现,牵张应变与之前报道的细菌刺激一样,可以使 HPDLCs 中的 NLRP3/Caspase-1 炎症体表达明显增加。其中,Caspase-1 的表达在 6 h 牵张应变作用下明显上调;NLRP3 的表达在 6、24 h 牵

张应变作用下均有明显上调,且 24 h 牵张作用下上调更加明显。现阶段对机械牵张诱导肺损伤的研究发现,2、4 h 的牵张力刺激都会上调 NLRP3 和 Caspase-1 表达^[18]。对牙周炎症的研究也发现,细菌刺激 6 h 后牙周膜细胞中 NLRP3 表达明显上调,且在牙周炎患者的龈沟液中也发现 NLRP3 的高表达^[21]。本研究发现的牵张刺激下 HPDLCs 中 NLRP3/Caspase-1 炎症体表达的变化情况与上述研究中的结果相似,提示 NLRP3 /Caspase-1 炎症体可能在机械牵张诱导 HPDLCs 分泌 IL-1 β 等炎症因子的过程中具有重要的作用。

现阶段免疫学研究成果显示,NLRP3/Caspase-1 炎症体-IL-1 β 信号通路在多种刺激因素(细菌、力等)作用下会参与机体炎症免疫反应^[18,21-22],但有关这一信号通路在机械力刺激诱导牙周膜细胞炎症反应中的作用还鲜有报道。研究提示,活性氧(reactive oxygen species, ROS)的形成可以激活炎症体通路^[23],并且在肺损伤的研究中牵张应变是通过 ROS 激活肺泡巨噬细胞中 NLRP3/Caspase-1 炎症体-IL-1 β 信号通路诱导肺损伤^[18]。本实验从基因和蛋白层面证实了机械力刺激能诱导牙周膜细胞中 NLRP3/Caspase-1 炎症体-IL-1 β 信号通路因子的表达,为后续进一步研究炎症体通路在力刺激诱导牙周炎症中的作用及其机制奠定基础。

参考文献:

- [1] Kaneko S, Ohashi K, Soma K, *et al.* Occlusal hypofunction causes changes of proteoglycan content in the rat periodontal ligament [J]. *J Periodontal Res*, 2001, 36(1): 9-17.
- [2] Kaku M, Uoshima K, Yamashita Y, *et al.* Investigation of periodontal ligament reaction upon excessive occlusal load-osteopontin induction among periodontal ligament cells [J]. *J Periodontal Res*, 2005, 40(1): 59-66.
- [3] 胡海楠, 张晓蓉. 隐形矫治技术生物力学研究进展 [J]. *医用生物力学*, 2014, 29(4): 392-385.
Hu HN, Zhang XR. Progress of biomechanical research on invisible appliance technology [J]. *J Med Biomech*, 2014, 29(4): 392-385.
- [4] Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, *et al.* Cyclic-tension force stimulates interleukin- β production by human periodontal ligament cells [J]. *J Periodont Res*, 1994, 29(5):

- 328-333.
- [5] Saito M, Saito S, Ngan P, *et al.* Interleukin 1 beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress *in vivo* and *in vitro* [J]. *Am J Orthodontic Orthop*, 1991, 99(3) : 226-240.
- [6] Shimizu N, Ozawa Y, Yamaguchi M, *et al.* Induction of COX-2 expression by mechanical tension force in human periodontal ligament cells [J]. *J Periodontol*, 1998, 69(6) : 670-677.
- [7] Jacobs C, Walter C, Ziebart T, *et al.* Induction of IL-6 and MMP-8 in human periodontal fibroblasts by static tensile strain [J]. *Clin Oral Invest*, 2014, 18(3) : 901-908.
- [8] Maeda A, Soejima K, Bandow K, *et al.* Force-induced IL-8 from periodontal ligament cells requires IL-1 β [J]. *J Dent Res*, 2007, 86(7) : 629-634.
- [9] Ren Y, Vissink A. Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement [J]. *Eur J Oral Sci*, 2008, 116(2) : 89-97.
- [10] Yazdi AS, Guarda G, D'Ombrain MC, *et al.* Inflammatory caspases in innate immunity and inflammation [J]. *J Innate Immun*, 2010, 2(3) : 228-237.
- [11] Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: Guardians of the body. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27 : 229-265.
- [12] Santana P, Martel J, Lai HC, *et al.* Is the inflammasome relevant for epithelial cell function [J]. *Microbes Infect*, 2015, 11(8) : 93-101.
- [13] Xiao H, Lu M, Lin TY, *et al.* Sterol regulatory element binding protein 2 activation of NLRP3 inflammasome in endothelium mediates hemodynamic-induced atherosclerosis susceptibility [J]. *Circ Res*, 2013, 128(6) : 632-642.
- [14] Kuipers MT, Aslami H, Janczy JR, *et al.* Ventilator-induced lung injury is mediated by the NLRP3 inflammasome [J]. *Anesthesiology*, 2012, 116(5) : 1104-1115.
- [15] Bostanci N, Emingil G, Saygan B, *et al.* Expression and regulation of the NALP3 inflammasome complex in periodontal diseases [J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 157(3) : 415-422.
- [16] 吴雅琴, 胥春. 炎症体及相关蛋白在力诱导牙周炎症反应中的作用 [J]. *医用生物力学*, 2015, 30(5) : 474-478.
- Wu YQ, Xu C. The role of inflammasomes and related proteins in periodontal inflammation induced by mechanical forces [J]. *J Med Biomech*, 2015, 30(5) : 474-478.
- [17] Xu C, Hao Y, Wei B, *et al.* Apoptotic gene expression by human periodontal ligament cells following cyclic stretch [J]. *J Periodontal Res*, 2011, 46(12) : 742-748.
- [18] Wu J, Yan Z, Schwartz DE, *et al.* Activation of NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages contributes to mechanical stretch-induced lung inflammation and injury [J]. *J Immunol*, 2013, 190(7) : 3590-3599.
- [19] Long P, Liu F, Piesco NP, *et al.* Signaling by mechanical strain involves transcriptional regulation of proinflammatory genes in human periodontal ligament cells *in vitro* [J]. *Bone*, 2002, 30(4) : 547-552.
- [20] Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, *et al.* Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines [J]. *Am J Orthodontofacial Orthop*, 2001, 119(3) : 307-312.
- [21] Bostanci N, Emingil G, Saygan B, *et al.* Expression and regulation of the NALP3 inflammasome complex in periodontal diseases [J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 157(3) : 415-422.
- [22] Yilmaz O, Sater AA, Yao L, *et al.* ATP-dependent activation of an inflammasome in primary gingival epithelial cells infected by *Porphyromonas gingivalis* [J]. *Cell Microbiol*, 2010, 12(2) : 188-198.
- [23] Dostert C, Pettrilli V, Van BR, *et al.* Innate immune activation through NALP3 inflammasome sensing of asbestos and silica [J]. *Science*, 2008, 320(5876) : 674-677.