

文章编号:1004-7220(2017)02-0181-07

牵张应变诱导人牙周膜细胞凋亡过程中 caspase 蛋白酶表达的初步研究

吴雅琴^{1,2}, 赵丹^{1,2}, 庄嘉宝^{1,2}, 胥春^{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** 研究在牵张应变诱导人牙周膜细胞凋亡过程中 caspase 蛋白酶表达的变化。**方法** 对体外培养的人牙周膜细胞分别施加 20% 牵张应变 6、24 h, 采用流式细胞术测定细胞凋亡率, 采用免疫印迹技术检测 caspase-3、-5、-7、-8、-9 的蛋白表达, 并采用分光光度比色法测定 caspase-3、-5、-8、-9 的蛋白酶活性变化。**结果** 20% 牵张应变加载 6、24 h 可诱导人牙周膜细胞发生凋亡。caspase-3 的蛋白表达及蛋白酶活性和 caspase-7 的蛋白表达在 24 h 牵张应变作用下较对照组增加, caspase-5、-8、-9 的蛋白表达及蛋白酶活性在 6、24 h 牵张应变作用下较对照组增加。**结论** 20% 牵张应变能诱导体外培养的人牙周膜细胞凋亡, 此过程中伴随发生了 caspase-3、-5、-7、-8、-9 蛋白酶的活化。

关键词: 人牙周膜细胞; 牵张; 细胞凋亡; caspase 蛋白酶

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2017.02.013

A preliminary study on the expression of caspases in stretch-induced apoptosis in human periodontal ligament cells

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

Abstract: **Objective** To study the expression of caspases in stretch-induced apoptosis in human periodontal ligament cells (HPDLCs). **Methods** HPDLCs *in vitro* were subjected to mechanical stretch with 20% strain for 6 h or 24 h. The apoptotic rates were analyzed by flow cytometry. The protein expression of caspase-3, -5, -7, -8 and -9 was detected by Western blotting, and the activity of caspase-3, -5, -8 and -9 was measured using colorimetric assay. **Results** Mechanical stretches with 20% strain for 6 h and 24 h could induce apoptosis in HPDLCs. Compared with non-stretching control group, the protein expression level and activity of caspase-3, as well as the protein expression level of caspase-7 were up-regulated by 24 h-stretch. The protein expression level and activity of caspase-5, -8, -9 were up-regulated after stretches for 6 h and 24 h. **Conclusions** Mechanical stretch with 20% strain can induce apoptosis in HPDLCs *in vitro*, with the activation of caspase-3, -5, -7, -8 and -9.

Key words: Human periodontal ligament cells (HPDLCs); Stretch; Cell apoptosis; Caspases

收稿日期:2016-04-28; 修回日期:2016-05-30

基金项目:国家自然科学基金项目(31470903,31270991,30900282),上海市浦江人才计划项目(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,Tel:(021)53315691;E-mail:imxuchun@163.com。

牙周膜 (periodontal ligament, PDL) 位于牙槽骨和牙骨质之间, 将牙齿固定于牙槽窝内^[1]。在咬合和正畸牙齿移动的过程中, PDL 直接受到机械力的作用, 并将力量分散到牙槽骨^[2]。越来越多的证据表明, 适宜的力学刺激对维持牙周组织的健康具有重要意义^[3], 而咬合力的异常改变或不适当的正畸力则可能导致牙周组织的局部缺血和细胞死亡^[4]。

凋亡是一种细胞主动的程序性死亡过程^[5]。细胞凋亡的主要途径分为: 死亡受体介导的外源性途径和线粒体介导的内源性途径^[6]。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (cysteiny aspartate specific protease, caspase) 根据其结构和功能的不同分别在传导凋亡信号和介导炎症反应中发挥重要作用^[7]。凋亡相关 caspase 蛋白酶可分为起始蛋白 caspase-2、-8、-9、-10 和效应蛋白 caspase-3、-6、-7。其中, caspase-8 和 caspase-9 分别参与介导外源性和内源性凋亡通路, 激活下游的 caspase-3 和 caspase-7^[8]。炎症相关 caspase 蛋白酶包括 caspase-1、-4、-5、-11、-12, 可诱导多种炎症因子的表达^[9]。

近年来, 陆续有文献报道了力学刺激诱导细胞发生凋亡^[10-11], PDL 细胞在力学刺激下发生凋亡也常见报道^[12-13]。动物体内实验结果显示, 正畸力可引起 PDL 细胞凋亡^[12-13]。本课题组前期研究发现, 对体外培养的人牙周膜细胞 (human periodontal ligament cells, HPDLCs) 施加牵张应变, 亦可诱导其发生凋亡, 且凋亡率呈牵张时间和强度依赖^[14]。与此同时, 牵张应变上调了 caspase-3 的蛋白酶活性^[15], 并促进编码 caspase-7、-8、-9 蛋白酶的基因表达^[16]。此外, 值得一提的是, real-time PCR 芯片技术还检测到编码 caspase-5 的基因表达上调^[16]。caspase-5 与 caspase-1、-4 具有高度的氨基酸序列同源性, 并参与细胞的凋亡、炎症、增殖和分化过程^[17]。这些研究结果提示, caspase-3、-5、-7、-8、-9 蛋白酶可能参与力学刺激引起的 PDL 细胞凋亡的信号转导, 但其具体机制并不清楚。

凋亡信号通路涉及复杂的信号转导, caspase 蛋白酶作为凋亡通路中的重要信号分子, 如何参与介导机械力诱导的细胞凋亡, 至今尚不明确。本文对体外培养的 HPDLCs 施加牵张应变, 检测细胞凋亡率的变化和 caspase-3、-5、-7、-8、-9 蛋白酶的表达, 以及 caspase-3、-5、-8、-9 蛋白酶活性的变化, 为今后

进一步揭示机械力引起 PDL 细胞凋亡、牙周组织破坏机制提供必要的参考。

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); PBS 缓冲液 (自配, 含 8 g/L 氯化钠、0.2 g/L 氯化钾、0.2 g/L 磷酸二氢钾、3.44 g/L 磷酸氢二钠); D-Hank's 缓冲液 (自配, 含 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素); CO₂ 细胞培养箱 (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); BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (碧云天公司, 中国); 兔抗人 GAPDH 抗体 (碧云天公司, 中国); 兔抗人 caspase-3、-5、-9 抗体 (Cell Signaling Technology 公司, 美国); 小鼠抗人 caspase-7、-8 抗体 (Cell Signaling Technology 公司, 美国); 羊抗兔二抗、羊抗小鼠二抗 (上海康成生物公司, 中国); PBST 缓冲液 (自配, 500 mL PBS 缓冲液 + 500 μL Tween 20); ECL 显影液 (Thermo Scientific 公司, 美国); FITC Annexin V 凋亡检测试剂盒 (Becton Dickinson 公司, 美国); BD FACSCalibur 流式细胞仪 (Becton Dickinson 公司, 美国); caspase-3、-5、-8、-9 的蛋白酶活性检测试剂盒 (比色法) (BioVision 公司, 美国); ELx800 酶标仪 (Biotec 公司, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 HPDLCs 体外培养及鉴定 在取得患者本人及其监护人的知情同意后, 收集因正畸需要拔除的 11 ~ 13 周岁青少年的健康前磨牙。用无菌刀片刮下牙根中 1/3 的 PDL 组织, 接种于培养皿内, 盖玻片固定, 加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 放置于恒温培养箱 (37 °C, 5% CO₂) 中培养。待细胞从组织块中爬出并铺满皿底 80% ~ 90% 时传代。取第 2 代细胞爬片, HE 染色观察细胞形态, 免疫组化 SP 法进行角蛋白和波丝蛋白染色, 鉴定细胞组织来源。每 3 ~ 4 d 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基换液, 取第 4 ~ 6 代细胞作为实验用细胞。

1.2.2 HPDLCs 牵张应变加载 将第 4 ~ 6 代 HPDLCs 以 1.5×10^5 /孔密度接种于 6 孔弹性基底

培养皿中,常规培养3 d待细胞接近汇合。Yamaguchi等^[18]研究发现,对入上中切牙施加500 g的正畸力时,PDL发生的最大张应变约为23%;不超过24%的牵张应变加载1 d,不会引起HPDLCs数量和ALP活性的显著降低。本课题组前期研究显示,对HPDLCs施加20%牵张应变6、24 h,可分别检测到显著的早期凋亡和晚期凋亡现象^[14-16]。Wang等^[19]研究表明,20%牵张应变可使HPDLCs的凋亡率显著增加。因此,根据前期研究结果以及参考相关文献,采用FX-5000 Tension Flexcell体外细胞力学加载装置对细胞分别加载20%牵张应变6和24 h,加载频率为6次/min(5 s拉伸,5 s松弛)。对照组的HPDLCs按上述要求接种于6孔弹性基底培养皿中,培养条件与牵张应变加载组一致,但不加载牵张应变。每个加载实验重复3次。利用倒置相差显微镜观察HPDLCs在牵张应变加载前后的细胞形态和排列改变。

1.2.3 流式细胞术检测凋亡率 牵张应变加载完成后,收集弹性基底培养皿内的上清和细胞,1 000 r/min离心5 min,收集沉淀物。预冷PBS缓冲液漂洗2次,并用100 μ L 1 \times Binding Buffer缓冲液充分混匀。加入5 μ L Annexin V和5 μ L PI室温避光放置15 min后,再用400 μ L 1 \times Binding Buffer缓冲液混匀。使用BD FACSCalibur流式细胞仪检测各样本的凋亡率。

1.2.4 免疫印记检测 caspase-3、-5、-7、-8、-9 蛋白表达水平 牵张应变加载完成后,收集弹性基底培养皿内的细胞。加入200 μ L细胞裂解液,冰上裂解30 min,12 000 r/min低温离心15 min,收集上清。使用BCA蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度。各组样本取等量总蛋白,12% SDS-PAGE蛋白电泳后将蛋白转移至0.22 μ m孔径的PVDF膜上,5%脱脂牛奶封闭1.5 h,一抗4 $^{\circ}$ C过夜,用PBST漂洗15 min(5 min \times 3次)后加入二抗,室温孵育1 h,用PBST再次漂洗45 min(15 min \times 3次),ECL显影液显影。以GAPDH作为内参,使用Image-Pro Plus 6.0读取目的条带灰度值,分析目标蛋白的表达水平。

1.2.5 分光光度比色法测定 caspase-3、-5、-8、-9 蛋白酶活性 牵张应变加载完成后,收集弹性基底培养皿内的细胞。加入200 μ L细胞裂解液,冰上裂解30 min,12 000 r/min低温离心15 min,收集上清。

使用BCA蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度。用蛋白稀释液将100 μ g蛋白稀释至50 μ L,加入50 μ L 2 \times Reaction Buffer缓冲液(含10 mmol/L DTT)和4 mmol/L标志物(caspase-3: Ac-DEVD-pNA; caspase-5: WEHD-pNA; caspase-8: IETD-pNA; caspase-9: LETD-pNA),充分混匀,37 $^{\circ}$ C孵育1 h后用酶标仪测定405 nm波长下的吸光度值。

1.3 统计学分析

应用SPSS 19.0软件对数据进行单因素方差分析(ANOVA),组间比较采用SNK法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HPDLCs体外培养及鉴定

利用倒置相差显微镜观察HPDLCs。HE染色显示,细胞呈长梭形或多角形,胞核呈圆形或卵圆形,位于细胞中央,胞质嗜伊红,胞核嗜碱性。免疫组化染色结果为抗角蛋白阴性、抗波丝蛋白阳性,为间充质来源,符合PDL细胞特征(见图1)。

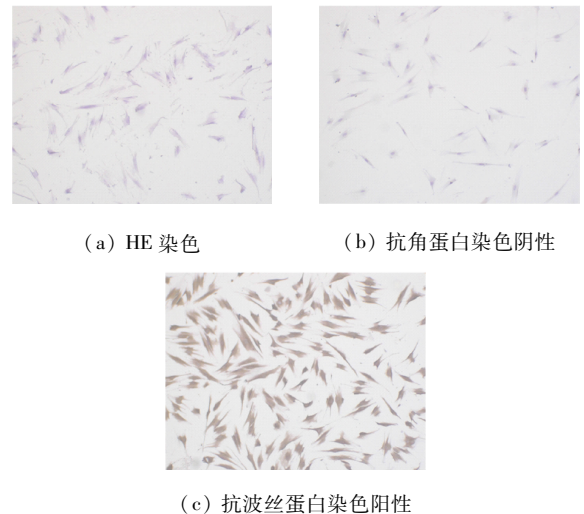
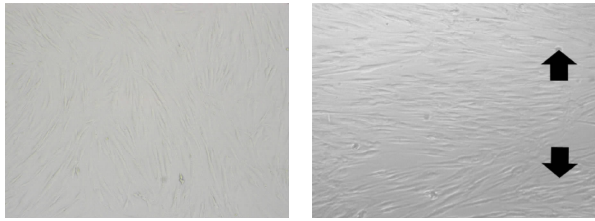


图1 第2代HPDLCs的HE染色及免疫组化染色照片($\times 100$)
Fig. 1 HE staining and immunohistochemical staining images of HPDLCs at passage 2 (a) HE staining, (b) Anti-keratin staining negative, (c) Anti-vimentin staining positive

2.2 牵张应变对HPDLCs形态及排列的影响

倒置相差显微镜观察发现,20%牵张应变诱导HPDLCs的形态和排列发生改变。牵张加载后胞体被拉长,细胞之间呈现出相互平行排列的趋势,其长轴垂直于牵张应变的方向(见图2)。



(a) 对照组 (b) 20%牵张应变-24 h加载组

图2 20%牵张应变加载24 h后 HPDLCs 形态变化 (×100)

Fig.2 Morphological changes of HPDLCs after 24 h-stretch with 20% strain (a) Control group, (b) Loading group with 20% mechanical stretch for 24 h

2.3 牵张应变对 HPDLCs 凋亡率的影响

通过 Annexin V 和 PI 双染法和流式细胞术检测凋亡细胞。图3中,流式细胞散点图右下角细胞(Annexin V 染色阳性/PI 染色阴性, Annexin V +/PI-)为处于凋亡早期阶段细胞,右上角细胞(Annexin V 染色阳性/PI 染色阳性, Annexin V +/PI+)为处于凋亡晚期阶段细胞,两者相加即为凋亡细胞的总数。在6、24 h 牵张应变作用下,HPDLCs 的总凋亡率均较对照组显著增加($P < 0.01$, 见图3)。

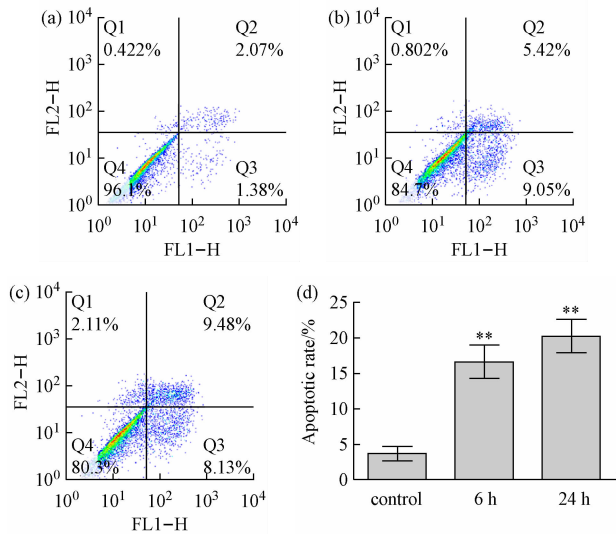


图3 20%牵张应变加载前后 HPDLCs 凋亡率变化 (a) 对照组, (b)20%牵张应变-6 h 加载组, (c) 20%牵张应变-24 h 加载组, (d) 凋亡率统计分析 (** $P < 0.01$)

Fig.3 Changes of apoptotic rates in HPDLCs after stretching with 20% strain (a) Control group, (b) Loading group with 20% mechanical stretch for 6 h, (c) Loading group with 20% mechanical stretch for 24 h, (d) Statistical analysis of apoptotic rates

2.4 牵张应变对 caspase-3、-5、-7、-8、-9 蛋白表达的影响

24 h 牵张应变上调活化态 caspase-3 的蛋白表达($P < 0.05$),同时还上调了未活化态以及活化态 caspase-7 的蛋白表达($P < 0.01$)。活化态 caspase-5 ($P < 0.01$)、未活化态以及活化态 caspase-8 ($P < 0.05$)、-9($P < 0.01$)的蛋白表达在6、24 h 牵张应变作用下均显著上调(见图4)。

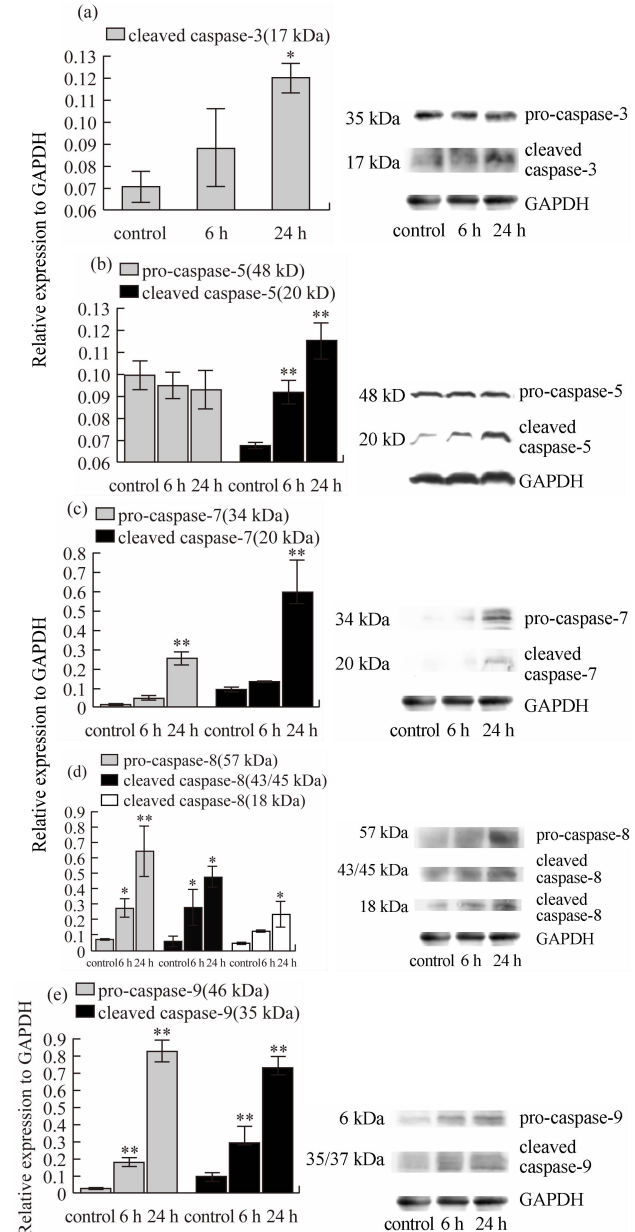


图4 牵张应变对 caspase 蛋白表达的影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) (a) caspase-3, (b) caspase -5, (c) caspase -7, (d) caspase -8, (e) caspase -9

Fig.4 Effect of mechanical stretch on the expression level of caspase

2.5 牵张应变对 caspase-3、-5、-8、-9 蛋白酶活性的影响

与对照组相比,24 h 牵张应变上调了 caspase-3 的蛋白酶活性($P < 0.05$),而 6、24 h 牵张应变均显著上调 caspase-5($P < 0.01$)、-8($P < 0.05$)、-9($P < 0.01$)的蛋白酶活性(见图 5)。

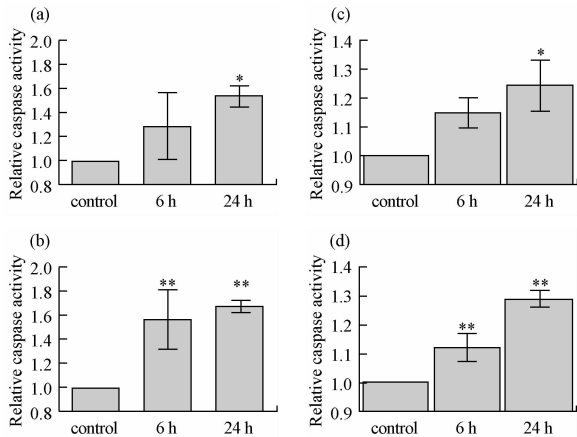


图 5 牵张应变对 caspase 蛋白酶活性的影响(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)
(a) caspase-3, (b) caspase-5, (c) caspase-8, (d) caspase-9

Fig. 5 Effects of mechanical stretch on the activity of caspase

3 讨论

近年来,越来越多的研究报道了 caspase 蛋白酶在凋亡和炎症通路中发挥着重要作用^[20-21]。前期研究发现,牵张应变可诱导 HPDLCs 发生凋亡^[14-15],但其作用机制目前尚不清楚。本文利用 20% 牵张应变诱导体外培养的 HPDLCs 发生凋亡,并研究此过程中 caspase-3、-5、-7、-8、-9 的蛋白表达及蛋白酶活性变化,为今后进一步探索机械力引起 PDL 细胞凋亡、导致牙周组织破坏的机制提供必要的参考。

在 20% 牵张应变作用下,HPDLCs 胞体被拉长,细胞相互平行排列,其长轴垂直于牵张应变的方向。该现象与本课题组前期研究结果类似^[14-15,22],可防止细胞被过度牵张,并对所受机械力起到缓冲作用,对于维持牙周组织结构的稳定具有重要作用。此外,6、24 h 牵张应变均可导致 HPDLCs 总凋亡率显著增加,这也与本课题组前期研究结果类似^[14-15],从而进一步证实,牵张应变可诱导 HPDLCs 发生凋亡。

caspase-3 和 caspase-7 是重要的凋亡执行蛋白,并在功能和结构上具有高度的相似性^[23-24]。6 h 牵

张应变对 HPDLCs 中 caspase-3 的蛋白酶活性以及 caspase-3 和 caspase-7 的蛋白表达无显著影响,而 24 h 牵张应变则增加了 caspase-3 的蛋白酶活性和活化态 caspase-3 的蛋白表达,并显著上调活化态和未活化态 caspase-7 的蛋白表达。结合本课题组前期研究发现的 HPDLCs 中 BAG3、BIRC3 和 BIRC6 等抑凋亡基因在 6 h 牵张应变作用下表达上调的结果^[16],提示在凋亡的早期阶段,细胞可能通过一种自我保护机制调控凋亡的发生发展,抑制了 caspase-3 和 caspase-7 的活化;然而随着促凋亡因素的持续作用,caspase-3 和 caspase-7 蛋白酶活化,从而促进了细胞凋亡的发生发展。

caspase-8 和 caspase-9 是重要的凋亡起始蛋白,分别参与介导外源性和内源性凋亡通路。外源性通路又称为死亡受体通路。肿瘤坏死因子受体-1 (tumor necrosis factor receptor-1, TNFR-1)、Fas 等死亡受体与其配体结合后,通过连接蛋白 (Fas-associated protein with death domain, FADD) 的信号转导,形成凋亡诱导复合物 (death inducing signaling complex, DISC),进而活化 caspase-8 蛋白酶^[25]。内源性通路又称线粒体途径。线粒体是控制细胞生命活动的中心,不仅能够调控细胞的呼吸链和氧化磷酸化作用,还参与调控细胞的凋亡过程。内源性刺激诱导线粒体释放细胞色素 c,与凋亡相关因子 1 (apoptosis protease activating factor-1, Apaf-1) 结合并形成多聚体,促进 caspase-9 蛋白酶的活化^[26]。活化的 caspase-8 和 caspase-9 进一步激活下游的凋亡执行蛋白 caspase-3 和 caspase-7,凋亡从而发生。6、24 h 牵张应变均显著上调 HPDLCs 中 caspase-8 和 caspase-9 的蛋白表达和蛋白酶活性。本课题组前期研究中利用 real-time PCR 芯片技术检测到 HPDLCs 中编码 caspase-8 和 caspase-9 的基因分别在牵张 6、24 h 后表达上调,而 6、24 h 牵张应变均可显著上调 FAS 和 TNFRSF10B 等外源性凋亡通路相关基因的表达^[16]。此外,阻断 caspase-9 则可显著抑制牵张诱导的 caspase-3 蛋白酶活性上调^[15]。综合上述研究结果,提示牵张应变诱导的 HPDLCs 凋亡可能同时涉及外源性和内源性两条凋亡信号通路。

caspase-5 被认为是一种与炎症相关的 caspase 蛋白酶,研究显示其在炎症和凋亡过程中均具有重要作用。Kamada 等^[27]报道,caspase-5 的过量表达

可导致 Rat-1 细胞发生凋亡。Zhu 等^[28] 研究发现, 阻断 caspase-5 可显著抑制低氧刺激诱导的人口腔肿瘤细胞凋亡。本课题组前期研究发现, HPDLCs 中编码 caspase-5 的基因 CASP5 在 6、24 h 牵张应变作用下表达显著增加^[16]。Ritter 等^[29] 研究发现, 6 h 牵张应变上调了人牙周膜成纤维细胞中 CASP5 的表达。caspase-5 的蛋白表达和蛋白酶活性在 6、24 h 牵张应变后均明显增加, 提示 caspase-5 可能参与了牵张应变诱导的 HPDLCs 凋亡。研究发现, 机械力可诱导牙周组织分泌多种炎症细胞因子, 包括 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 等^[30]。已有研究指出, caspase-5 与 NLRP1 炎症体的形成和活化存在密切关联, 可促进 IL-1 β 的激活与释放^[31]。此外, 研究表明, 炎症体可能参与机械力所诱导的机体组织炎症反应。一些机械力相关炎症性疾病, 如外伤性脑损伤、动脉粥样硬化、肺损伤等的发生发展与炎症体的关联已有报道^[32-34]。因此, caspase-5 是否参与机械力所诱导的牙周组织炎症反应, 值得深入研究。

本研究发现, 牵张应变可诱导 HPDLCs 发生凋亡, 且在此过程中伴随发生了 caspase-3、-5、-7、-8、-9 的活化, 提示内源性和外源性凋亡信号通路可能共同参与牵张诱导 HPDLCs 凋亡的过程。事实上, 这两条凋亡信号通路并非完全独立, 而是存在着多方式、多水平的交联, 构成了复杂的凋亡信号传递网络。内质网通路也可能参与细胞凋亡的发生^[35]。因此, 机械力引起 PDL 细胞凋亡、导致牙周组织破坏的具体机制尚需进一步深入研究。而 caspase-5 及炎症体是否参与机械力所诱导的牙周组织炎症反应, 也是一个有待进一步探索的问题。

参考文献:

[1] MATSUDA N, YOKOYAMA K, TAKESHITA S, *et al.* Role of epidermal growth factor and its receptor in mechanical stress-induced differentiation of human periodontal ligament cells *in vitro* [J]. Arch Oral Biol, 1998, 43(12): 987-997.

[2] CAO H, KOU X, YANG R, *et al.* Force-induced Adrb2 in periodontal ligament cells promotes tooth movement [J]. J Dent Res, 2014, 93(11): 1163-1169.

[3] MCCULLOCH CA, LEKIC P, MCKEE MD. Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament [J]. Periodontology, 2000, 24(1): 56-72.

[4] KAKU M, UOSHIMA K, YAMASHITA Y, *et al.* Investiga-

tion of periodontal ligament reaction upon excessive occlusal load-osteopontin induction among periodontal ligament cells [J]. J Periodontal Res, 2005, 40(1): 59-66.

[5] 李珣, 张晓玲, 沈刚, 等. 周期性张应变作用下成骨细胞凋亡的体外研究 [J]. 医用生物力学, 2009, 24(3): 223-227. LI H, ZHANG XL, SHEN G. Study on osteoblast apoptosis in response to mechanical stretch *in vitro* [J]. J Med Biomech, 2009, 24(3): 223-227.

[6] 赵丹, 胥春. 力学影响细胞凋亡及其信号转导机制研究进展 [J]. 医用生物力学, 2014, 29(2): 188-192. ZHAO D, XU C. Advances in force-affected cell apoptosis and its signal pathways [J]. J Med Biomech, 2014, 29(2): 188-192.

[7] ADAMIEC-MROCZEK J, ZAJAC-PYTRUS H, MISIUK-HOJLO M. Caspase-dependent apoptosis of retinal ganglion cells during the development of diabetic retinopathy [J]. Adv Clin Exp Med, 2015, 24(3): 531-535.

[8] WU MH, JIN XK, YU AQ, *et al.* Caspase-mediated apoptosis in crustaceans: Cloning and functional characterization of EsCaspase-3-like protein from Eriocheir sinensis [J]. Fish Shellfish Immunol, 2014, 41(2): 625-632.

[9] MARTINON F, TSCHOPP J. Inflammatory caspases and inflammasomes: Master switches of inflammation [J]. Cell Death Differ, 2007, 14(1): 10-22.

[10] ZHAO D, SUN Y, WEI X, *et al.* cIAP1 attenuates shear stress-induced hBMSC apoptosis for tissue-engineered blood vessels through the inhibition of the mitochondrial apoptosis pathway [J]. Life Sci, 2015, 137: 81-88.

[11] HAN Y, WANG L, YAO QP, *et al.* Nuclear envelope proteins Nesprin2 and LaminA regulate proliferation and apoptosis of vascular endothelial cells in response to shear stress [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1853(5): 1165-1173.

[12] HATAI T, YOKOZEKI M, FUNATO N, *et al.* Apoptosis of periodontal ligament cells induced by mechanical stress during tooth movement [J]. Oral Dis, 2001, 7(5): 287-290.

[13] MABUCHI R, MATSUZAKA K, SHIMONO M. Cell proliferation and cell death in periodontal ligaments during orthodontic tooth movement [J]. J Periodontal Res, 2002, 37(2): 118-24.

[14] ZHONG W, XU C, ZHANG F, *et al.* Cyclic stretching force-induced early apoptosis in human periodontal ligament cells [J]. Oral Dis, 2008, 14(3): 270-276.

[15] HAO Y, XU C, SUN SY, *et al.* Cyclic stretching force induces apoptosis in human periodontal ligament cells via caspase-9 [J]. Arch Oral Biol, 2009, 54(9): 864-870.

[16] 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(6): 742-748.
- [17] BIAN ZM, ELNER SG, KHANNA H, *et al.* Expression and functional roles of caspase-5 in inflammatory responses of human retinal pigment epithelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(12): 8646-8456.
- [18] YAMAGUCHI M, SHIMIZU N, SHIBATA Y, *et al.* Effects of different magnitudes of tension-force on alkaline phosphatase activity in periodontal ligament cells [J]. *J Dent Res*, 1996, 75(3): 889-894.
- [19] WANG L, PAN J, WANG T, *et al.* Pathological cyclic strain-induced apoptosis in human periodontal ligament cells through the RhoGDIa/Caspase-3/PARP pathway [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e75973.
- [20] LOISON F, ZHU H, KARATEPE K, *et al.* Proteinase 3-dependent caspase-3 cleavage modulates neutrophil death and inflammation [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(10): 4445-4458.
- [21] GAO P, HE FF, TANG H, *et al.* NADPH oxidase-induced NALP3 inflammasome activation is driven by thioredoxin-interacting protein which contributes to podocyte injury in hyperglycemia [J]. *J Diabetes Res*, 2015, 2015: 504761.
- [22] XU C, FAN Z, SHAN W, *et al.* Cyclic stretch influenced expression of membrane connexin 43 in human periodontal ligament cell [J]. *Arch Oral Biol*, 2012, 57(12): 1602-1608.
- [23] SRIVASTAVA S K, BHARDWAJ A, ARORA S, *et al.* MicroRNA-345 induces apoptosis in pancreatic cancer cells through potentiation of caspase-dependent and-independent pathways [J]. *Br J Cancer*, 2015, 113(4): 660-668.
- [24] QU T, HUANG B, ZHANG L, *et al.* Identification and functional characterization of two executioner caspases in *Crassostrea gigas* [J]. *Plos One*, 2014, 9(2): e89040.
- [25] STEL AJ, TEN CB, JACOBS S, *et al.* Fas receptor clustering and involvement of the death receptor pathway in rituximab-mediated apoptosis with concomitant sensitization of lymphoma B cells to fas-induced apoptosis [J]. *J Immunol*, 2007, 178(4): 2287-2295.
- [26] TAIT SWG, GREEN DR. Mitochondria and cell death; Outer membrane permeabilization and beyond [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(9): 621-632.
- [27] KAMADA S, FUNAHASHI Y, TSUJIMOTO Y. Caspase-4 and caspase-5, members of the ICE/CED-3 family of cysteine proteases, are CrmA-inhibitable proteases [J]. *Cell Death Differ*, 1997, 4(6): 473-478.
- [28] ZHU Q, LIN L, QI C, *et al.* The role of acid sphingomyelinase and caspase 5 in hypoxia-induced HuR cleavage and subsequent apoptosis in hepatocytes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821(12): 1453-1461.
- [29] RITTER N, MUSSIG E, STEINBERG T, *et al.* Elevated expression of genes assigned to NF-kappaB and apoptotic pathways in human periodontal ligament fibroblasts following mechanical stretch [J]. *Cell Tissue Res*, 2007, 328(3): 537-48.
- [30] 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.
- [31] DEGTEREV A, BOYCE M, YUAN J. A decade of caspases [J]. *Oncogene*, 2003, 22(53): 8543-8567.
- [32] DE RIVERO VACCARI JP, LOTOCKI G, ALONSO OF, *et al.* Therapeutic neutralization of the NLRP1 inflammasome reduces the innate immune response and improves histopathology after traumatic brain injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(7): 1251-1261.
- [33] CHEN Z, MARTIN M, LI Z, *et al.* Endothelial dysfunction: The role of sterol regulatory element-binding protein-induced NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3 inflammasome in atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2014, 25(5): 339-349.
- [34] GAJIC O, DARA SI, MENDEZ JL, *et al.* Ventilator-associated lung injury in patients without acute lung injury at the onset of mechanical ventilation [J]. *Crit Care Med*, 2004, 32(9): 1817-1824.
- [35] MOMOI T. Caspases involved in ER stress-mediated cell death [J]. *J Chem Neuroanat*, 2004, 28(1-2): 101-105.