

血小板反应蛋白-1对人牙周膜成纤维细胞表达 IL-6及 COX-2的影响

刘笑笑, 沈振国, 赵荣权, 邢田, 侯爱兵

摘要 目的 探究血小板反应蛋白(TSP)-1对人牙周膜成纤维细胞(hPDLFs)表达白细胞介素(IL)-6和环氧化酶(COX)-2的影响。方法 选取12只6周龄雄性SD大鼠随机均分为正常组和牙周炎组,丝线结扎法建立实验性牙周炎大鼠模型;Western blot检测大鼠牙龈组织中TSP-1的蛋白表达;qRT-PCR检测每组牙龈组织中TSP-1、IL-6、COX-2 mRNA表达。组织块法分离培养hPDLFs,构建携带TSP-1基因的重组腺病毒(Ad-TSP-1-GFP),同时以空载腺病毒(Ad-GFP)作为阴性对照,转染细胞;或在hPDLFs培养上清液中添加重组TSP-1蛋白(rTSP-1)。ELISA检测hPDLFs表达IL-6的蛋白水平;Western blot检测hPDLFs表达COX-2的蛋白水平;qRT-PCR检测IL-6、COX-2 mRNA表达水平。结果 与正常组比较,实验性牙周炎大鼠牙龈组织中TSP-1蛋白和mRNA表达升高,且IL-6和COX-2 mRNA表达升高。与Ad-GFP组比较,Ad-TSP-1-GFP转染hPDLFs可明显提高细胞TSP-1蛋白和mRNA水平,同时可促进hPDLFs表达IL-6、COX-2蛋白和mRNA水平。与空白对照组比较,添加rTSP-1也可促进hPDLFs表达IL-6、COX-2蛋白和mRNA水平。结论 TSP-1能够显著上调hPDLFs表达IL-6、COX-2的水平,进而加重牙周炎症症状。

关键词 TSP-1;人牙周膜成纤维细胞;腺病毒;重组蛋白;牙周炎

中图分类号 R 781.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)04-0550-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.013

慢性牙周炎是口腔常见的细菌感染性疾病,已成为成人牙齿缺失的重要原因。口腔微生物感染为始动因子,可直接造成牙周组织破坏,也可引发宿主免疫反应和炎症反应,释放大炎症介质、细胞因子,间接造成牙周组织破坏。血小板反应蛋白

(thrombospondin,TSP)-1是Baenziger et al^[1] 1971年从凝血酶激活的血小板 α 颗粒中分离出来的糖蛋白,继而发现多种类别的细胞均可表达^[2]。近年来研究^[3]发现,TSP-1在感染和炎症免疫性疾病中具有促炎抗炎、调节免疫、局部组织重建等重要作用。2014年Gokyu et al^[4]发现,深牙周袋的患者的牙龈组织,TSP-1 mRNA的表达水平要高于浅的牙周袋和正常牙周的牙龈组织。

现通过丝线结扎法构建大鼠牙周炎模型^[5],检测大鼠牙龈组织中TSP-1的表达水平。分离培养原代人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblast,hPDLFs),通过添加重组TSP-1蛋白(recombinant TSP-1 protein,rTSP-1)或过表达TSP-1质粒至hPDLFs,观察hPDLFs表达白细胞介素(interleukin,IL)-6,环氧化酶(cyclooxygenase,COX)-2的变化,从而进一步探讨TSP-1在慢性牙周炎进展中的重要作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级6周龄雄性SD大鼠12只,体质量200~250 g,分笼饲养,自由摄食饮水,适应性喂养1周。室温保持在22~24℃,湿度50%~60%,每12 h变换昼夜节律,由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.2 材料 腺病毒(上海汉恒生物科技有限公司);rTSP-1(美国R&D公司);牙龈卟啉单胞菌(*porphyromonas gingivalis*,*P. gingivalis*)脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)(美国invivogen公司);兔抗vimentin、兔抗keratin、兔抗TSP-1、兔抗COX-2抗体(美国abcam公司);鼠抗 β -actin抗体(武汉三鹰公司);HRP羊抗兔IgG、HRP羊抗鼠IgG抗体(北京中杉金桥公司);qRT-PCR引物(上海生工生物工程股份有限公司);人IL-6 ELISA试剂盒(杭州联科生物科技股份有限公司)。体式显微镜(德国Leica公司);荧光倒置显微镜(日本Olympus公司);实时荧光定量PCR仪(美国Agilent公司);化学发光成像仪(美国Bio-Rad公司);酶标仪(瑞士Tecan公司)。

2019-10-08 接收

基金项目 安徽省自然科学基金(编号:1908085MH256);安徽医科大学博士科研资助基金(编号:XJ201708);国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:201810366041)

作者单位 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 230031

作者简介 刘笑笑,女,硕士研究生;

侯爱兵,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:houaibing1964@sohu.com

1.3 方法

1.3.1 实验性大鼠牙周炎模型建立 随机取 6 只大鼠为正常组,剩余 6 只大鼠以 10% 的水合氯醛按 3 ml/kg 体质量腹腔注射麻醉。使用 3-0 丝线结扎双侧上下颌第一磨牙颈部 1 圈,结扎丝尽量靠近龈缘,于舌腭侧打结。正常组不做处理。成功结扎 4 周后,所有大鼠腹腔注射过量 10% 水合氯醛处死,取双侧上下颌组织(牙龈、牙槽骨、牙齿)。

1.3.2 骨丧失量测量 将大鼠上下颌骨置于 1 mol/L 的 NaOH 溶液中去除软组织。用 10 g/L 的甲苯胺蓝染色,体式显微镜下观察并测量骨丧失(alveolar bone loss, ABL)情况,即测量釉牙骨质界到牙槽嵴顶的距离。每个实验牙分别测量颊、腭(舌)侧的近、中、远 6 个位点,取 6 个位点的均值作为实验牙的 ABL 值。

1.3.3 hPDLFs 的分离培养 实验所涉及的牙经安徽医科大学伦理委员会同意。取 12~18 岁因正畸减数拔除的健康前磨牙,在无菌环境下 PBS 缓冲液及 DMEM 培养基各冲洗 3 次,运用组织块法刮取根中 1/3 部位的牙周膜组织,剪成 1 mm³ 的组织块,置于含 20% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养基中,37℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养,2 d 换液 1 次,待组织块游出的细胞长至 80% 时,胰酶消化并传代。取状态较好的 3~8 代的细胞用于后续实验。

1.3.4 hPDLFs 的免疫组化鉴定 取第 3 代 hPDLFs 培养于铺有盖玻片的 6 孔板中,待细胞长满盖玻片 70% 时,取出盖玻片,采用免疫组化法进行角蛋白和波形丝蛋白染色,光镜下观察染色结果。

1.3.5 *P. gingivalis* LPS (10 μg/ml) 诱导 hPDLFs 将 hPDLFs 以 1 × 10⁵/ml 的密度铺至 6 孔板中,分为 2 组:① 空白对照组;② *P. gingivalis* LPS 组。

1.3.6 携带 TSP-1 基因的重组腺病毒(Ad-TSP-1-GFP)体外转染 hPDLFs Ad-TSP-1-GFP 在感染复数(multiplicity of infection, MOI)值为 50、100、150 及 200 分别感染细胞 48 h,置于荧光显微镜下观察绿色荧光,确定最佳 MOI 值,并以此用于后续实验。将 hPDLFs 以 1 × 10⁵/ml 的密度铺至 6 孔板中,验证过表达结果时,同时用空白对照和阴性对照,分为 3 组:① 空白对照组;② Ad-GFP 组;③ Ad-TSP-1-GFP 组。分析 Ad-TSP-1-GFP 对 hPDLFs 炎症相关细胞因子 IL-6、COX-2 表达影响时分组如下:① Ad-GFP 组;② Ad-GFP + *P. gingivalis* LPS 组;③ Ad-TSP-1-GFP 组。

1.3.7 rTSP-1 体外刺激 hPDLFs 将 hPDLFs 以 1

× 10⁵/ml 的密度铺至 6 孔板中,分为 3 组:① 空白对照组;② *P. gingivalis* LPS 组;③ rTSP-1 组。研究 rTSP-1 (1 μg/ml) 对 hPDLFs 炎症相关细胞因子 IL-6、COX-2 表达的影响。

1.3.8 qRT-PCR 检测 mRNA 水平 使用 TRIzol 试剂提取细胞、组织总 RNA,测定总 RNA 的浓度以及纯度。以总 RNA 为模板逆转录成 cDNA; qRT-PCR 采用 SYBR-Green 法,β-actin 作为校正内参,2^{-ΔΔCt} 法分析基因相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 β-actin、TSP-1、IL-6、COX-2 基因 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
TSP-1 (人)	F: CCCCAACCTTCCCACTA R: TCACAGCGGTCTCCACA
IL-6 (人)	F: GGCACTGGCAGAAAACAACC R: GCTCTGGCTTGTTCCTCACT
COX-2 (人)	F: CCACCCGAGTACAGAAAGT R: CAGGATACAGCTCCACAGCA
β-actin (人)	F: CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT R: CAGGGCAGTGATCTCCTTCT
TSP-1 (鼠)	F: CGAGTCGCAAGGGAGATGT R: ACCACGTTGTTGTCAAGGGT
IL-6 (鼠)	F: CCACTGCCTTCCTACTTCA R: ACACTGCATCATCGCTGTTC
COX-2 (鼠)	F: CTCAGCCATGCAGCAAATCC R: GGGTGGGCTTCAGCAGTAAT
β-actin (鼠)	F: CCCGCGAGTACAACCTTCTTG R: GTCATCCATGGCGAACTGGTG

1.3.9 ELISA 检测细胞培养上清液中 IL-6 水平 取出 -80℃ 保存的细胞培养上清液,1 000 r/min 离心 5 min,取上清液,应用 ELISA 技术检测 IL-6 水平,操作步骤按照试剂盒说明书。

1.3.10 Western blot 检测蛋白水平 将处理后的组织、细胞置于冰上裂解,提取总蛋白。取 20 μg 蛋白样品上样,经电泳、转膜、牛奶封闭,加一抗 TSP-1 (1:1 000)、COX-2 (1:1 000)、β-actin (1:2 000),4℃ 孵育过夜,二抗 (1:10 000) 室温孵育 90 min, ECL 发光显影。用 ImageJ 图像处理软件分析各条带灰度值,计算相对表达量。

1.4 统计学处理 实验数据均采用 GraphPad 5.0 软件分析,均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组独立样本均数的比较采用 *t* 检验,多组样本均数的比较采用单因素方差分析,以 *P* < 0.05 为统计学差异的标准。

2 结果

2.1 大鼠实验牙 ABL 检测 大鼠牙槽骨实验牙经甲苯胺蓝染色后,体式显微镜下拍照,见正常组未见

明显骨吸收,牙周炎组骨吸收达根分叉处(图1A、B),测量后的骨丧失量经统计学分析,结果显示,与正常组比较,牙周炎组骨丧失量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图1C。

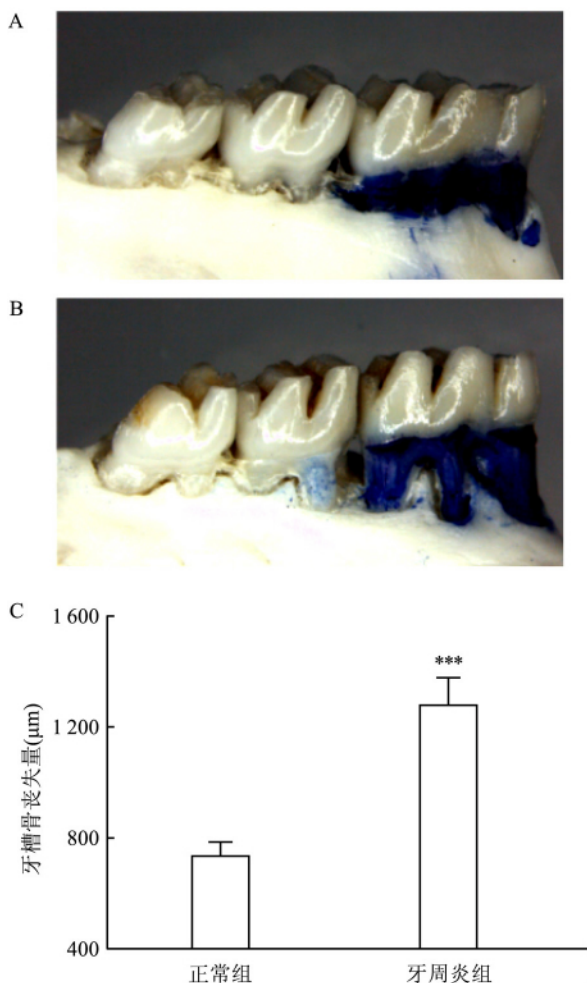


图1 体式显微镜观察测量牙槽骨骨丧失量 ×20

A: 正常组; B: 牙周炎组; C: 2组牙槽骨丧失量; 与正常组比较:

*** $P < 0.001$

2.2 大鼠牙龈组织中 TSP-1、IL-6、COX-2 的表达

Western blot 检测大鼠牙龈组织中 TSP-1 蛋白表达,结果显示:与正常组比较,牙周炎组 TSP-1 蛋白表达上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图2A。qRT-PCR 检测大鼠牙龈组织中 TSP-1、IL-6、COX-2 mRNA 的表达,结果显示:与正常组比较,牙周炎组 TSP-1、COX-2、IL-6 mRNA 表达均不同程度升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图2B。

2.3 hPDLFs 的免疫组化鉴定 采用组织块法原代培养 hPDLFs,可见多数细胞呈梭形放射状排列,少数细胞为多角形或小圆形。免疫组化检测显示,波形丝蛋白染色,胞质着色呈棕黄色,结果呈阳性

(图3A);角蛋白染色,胞质不着色,结果呈阴性,证实细胞源自中胚层(图3B)。

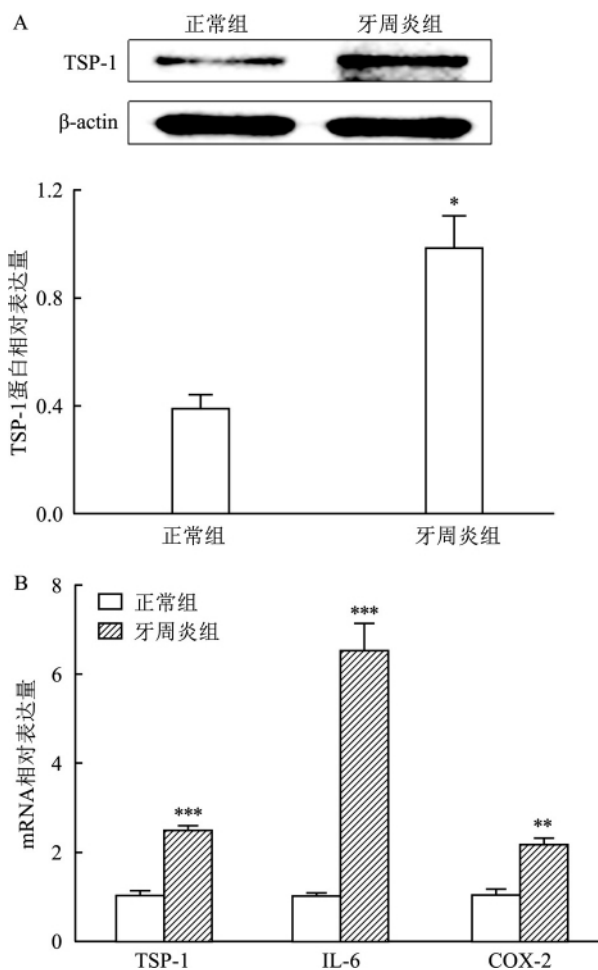


图2 大鼠牙龈组织 TSP-1、IL-6、COX-2 表达变化

A: Western blot 法检测 TSP-1 相对表达量; B: qRT-PCR 法检测 TSP-1、IL-6、COX-2 mRNA 相对表达量; 与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

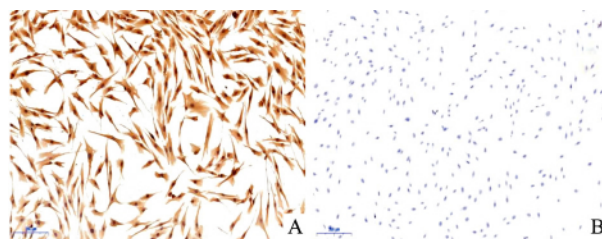


图3 hPDLFs 免疫组化 ×100

A: 抗波形丝蛋白阳性; B: 抗角蛋白阴性

2.4 *P. gingivalis* LPS 促进 hPDLFs TSP-1 表达

Western blot 和 qRT-PCR 检测结果显示,与空白对照组比较,*P. gingivalis* LPS (10 μg/ml) 可促进 TSP-1 蛋白和 mRNA 表达,差异有统计学意义 ($P <$

0.05)。见图4。

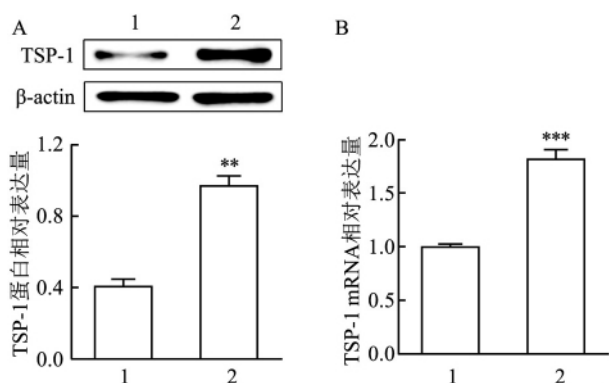


图4 *P. gingivalis* LPS 促进 hPDLFs TSP-1 表达

A: Western blot 法检测 TSP-1 相对表达量; B: qRT-PCR 法检测 TSP-1 mRNA 相对表达量; 1. 空白对照组; 2. *P. gingivalis* LPS 组; 与空白对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.5 细胞转染效率 以不同 MOI 值的 Ad-TSP-1-GFP 转染 hPDLFs, 转染 48 h 后观察 GFP 表达情况。当 MOI 为 50 时, 开始出现绿色荧光, 荧光强度比较弱, 阳性细胞较少。随着 MOI 的增加, 荧光强度逐渐增强, 阳性细胞逐渐增多。当 MOI > 150 时, 继续增加 MOI, 但荧光强度的增强不明显(图5), 阳性细胞比例基本达到高峰, 因此后续实验均采用 MOI 值为 150。

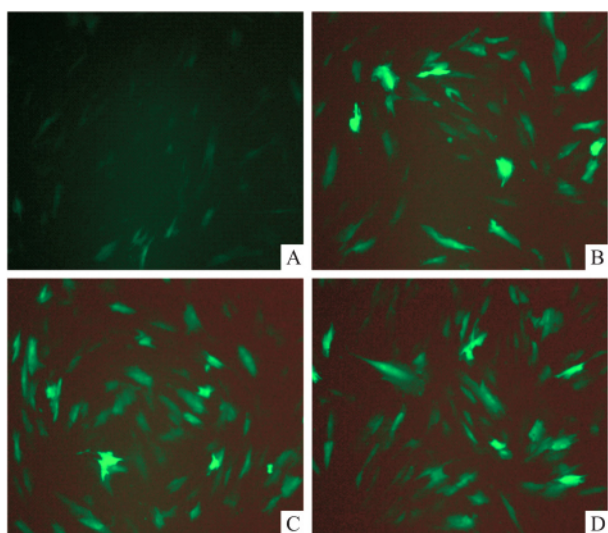


图5 Ad-TSP-1-GFP 转染 hPDLFs 荧光观察 ×200

A: MOI = 50; B: MOI = 100; C: MOI = 150; D: MOI = 200

2.6 Ad-TSP-1-GFP 转染 hPDLFs 的效果 Western blot 和 qRT-PCR 检测结果显示, 与 Ad-GFP 组比较, 转染 Ad-TSP-1-GFP 可提高 TSP-1 蛋白和 mRNA 的表达水平, 差异有统计学意义 ($F_{\text{蛋白}} = 24.14$,

$F_{\text{mRNA}} = 550.5$, $P < 0.05$)。见图6。

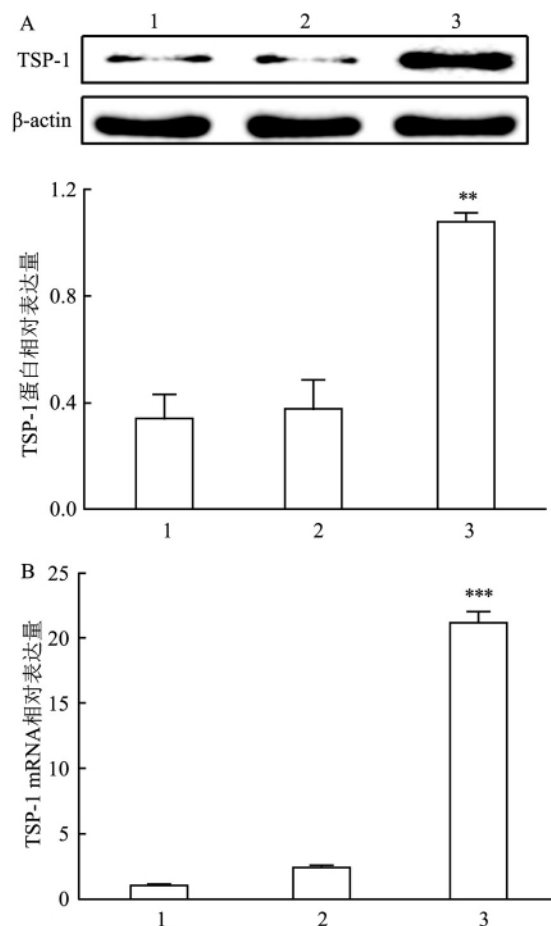


图6 Ad-TSP-1-GFP 转染 hPDLFs TSP-1 的表达变化

A: Western blot 法检测 TSP-1 相对表达量; B: qRT-PCR 法检测 TSP-1 mRNA 相对表达量; 1. 空白对照组; 2. Ad-GFP 组; 3. Ad-TSP-1-GFP 组; 与 Ad-GFP 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.7 TSP-1 促进 hPDLFs IL-6 的表达 转染 Ad-TSP-1-GFP 48 h, 收集细胞培养上清液, ELISA 检测 IL-6 蛋白含量, 结果显示: 与 Ad-GFP 组比较, 转染 Ad-TSP-1-GFP 可提高细胞 IL-6 蛋白表达水平, 差异有统计学意义 ($F = 28.41$, $P < 0.01$, 图7A); qRT-PCR 检测结果显示: 与 Ad-GFP 组比较, 转染 Ad-TSP-1-GFP 可促进 IL-6 mRNA 的表达 ($F = 85.29$, $P < 0.001$, 图7B)。在细胞培养中添加 rTSP-1, 收集细胞培养上清液, ELISA 法检测 IL-6 含量, 结果显示: 与空白对照组比较, rTSP-1 可活化细胞, 上调其 IL-6 蛋白表达, 差异均有统计学意义 ($F = 36.19$, $P < 0.01$, 图8A); qRT-PCR 的结果显示 rTSP-1 可促进 IL-6 mRNA 的表达, 与空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($F = 30.67$, $P < 0.001$, 图8B)。

2.8 TSP-1 促进 hPDLFs COX-2 的表达 转染

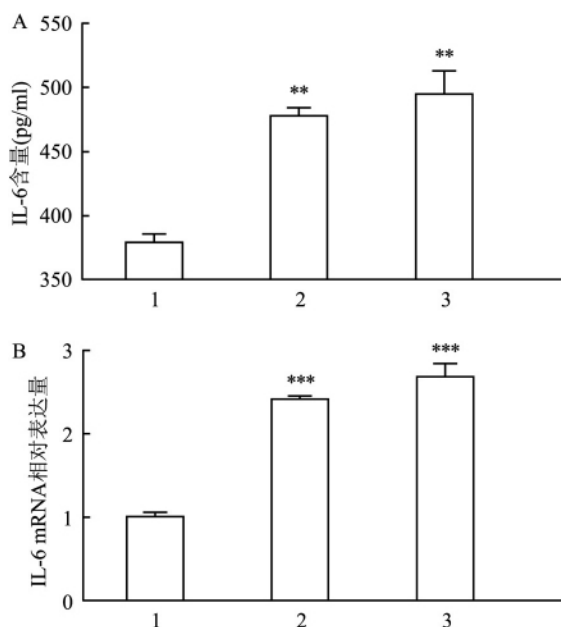


图7 Ad-TSP-1-GFP对hPDLFs IL-6表达的影响

A: ELISA 法检测 IL-6 含量; B: qRT-PCR 法检测 IL-6 mRNA 相对表达量; 1: Ad-GFP 组; 2: Ad-GFP + *P. gingivalis* LPS 组; 3: Ad-TSP-1-GFP 组; 与 Ad-GFP 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

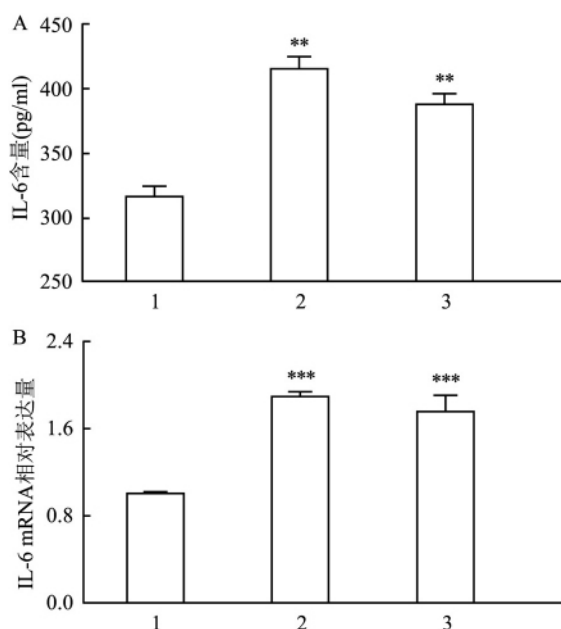


图8 rTSP-1对hPDLFs IL-6表达的影响

A: ELISA 法检测 IL-6 含量; B: qRT-PCR 法检测 IL-6 mRNA 相对表达量; 1: 空白对照组; 2: *P. gingivalis* LPS 组; 3: rTSP-1 组; 与空白对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Ad-TSP-1-GFP 48 h, 分别收集细胞提取总蛋白和总 RNA。Western blot 检测 hPDLFs COX-2 蛋白相对表达量, 结果显示: 与 Ad-GFP 组比较, 转染 Ad-TSP-1-GFP 可明显增高 COX-2 蛋白表达, 差异有统计学意义 ($F = 4.508, P < 0.05$, 图 9A); qRT-PCR 检测结果

显示: 与 Ad-GFP 组比较, 转染 Ad-TSP-1-GFP 可促进 COX-2 mRNA 相对表达量 ($F = 42.69, P < 0.001$, 图 9B)。在细胞培养中添加 rTSP-1, 分别收集细胞提取总蛋白和总 RNA。Western blot 检测 hPDLFs COX-2 蛋白相对表达量, 结果显示: 与空白对照组比较, rTSP-1 可活化细胞上调其 COX-2 蛋白相对表达量, 差异均有统计学意义 ($F = 9.954, P < 0.05$, 图 10A); qRT-PCR 的结果显示: rTSP-1 可促进 COX-2 mRNA 相对表达量, 与空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($F = 34.73, P < 0.01$, 图 10B)。

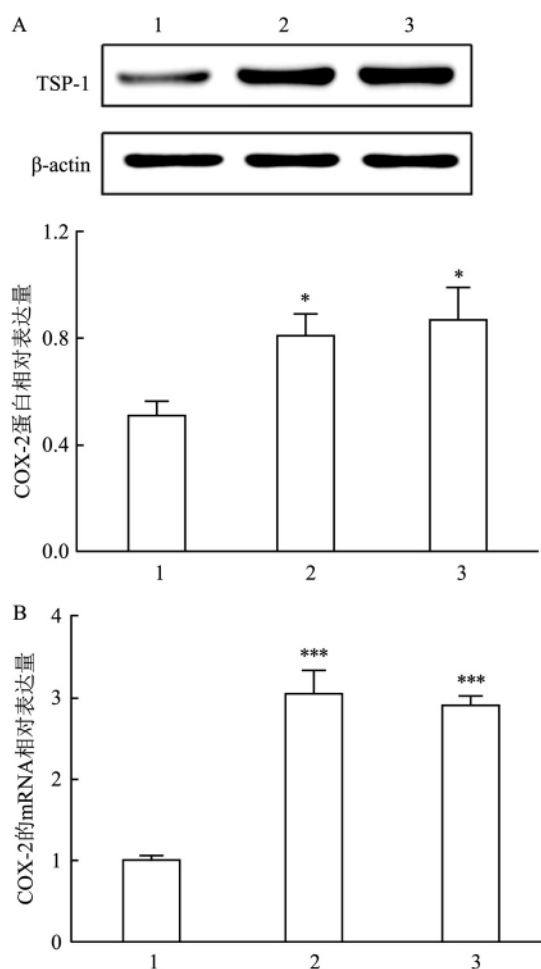


图9 Ad-TSP-1-GFP对hPDLFs COX-2表达的影响

A: Western blot 法检测 COX-2 相对表达量; B: qRT-PCR 法检测 COX-2 mRNA 相对表达量; 1: Ad-GFP 组; 2: Ad-GFP + *P. gingivalis* LPS 组; 3: Ad-TSP-1-GFP 组; 与 Ad-GFP 组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

3 讨论

慢性牙周炎的发生涉及一系列免疫炎症反应, 微生物等通过活化组织细胞, 释放细胞因子, 如 IL-6、COX-2 等, 加剧炎症应答^[6-7]。IL-6 可促进血管

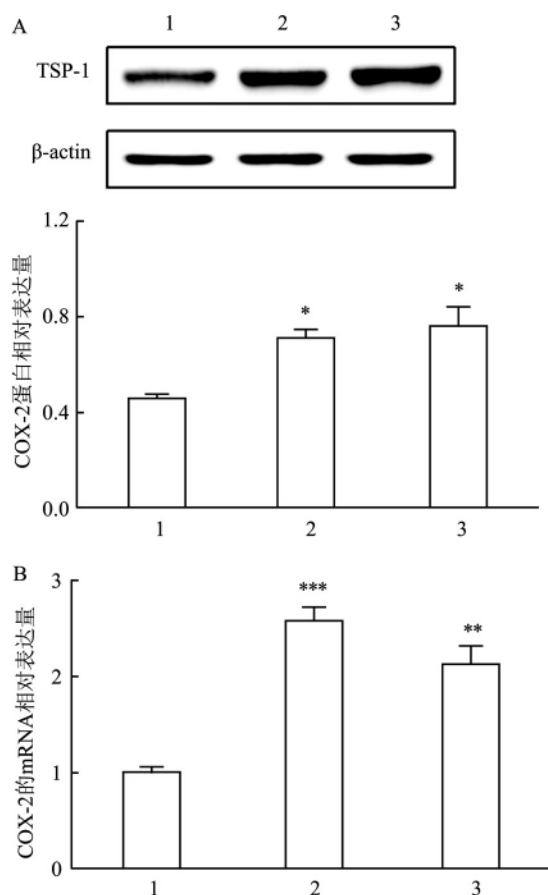


图10 rTSP-1对hPDLFs COX-2表达的影响

A: Western blot 法检测 COX-2 相对表达量; B: qRT-PCR 法检测 COX-2 mRNA 相对表达量; 1: 空白对照组; 2: *P. gingivalis* LPS 组; 3: rTSP-1 组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

生成,趋化炎症细胞,且能延缓巨噬细胞的吞噬作用,加重局部炎症反应。COX-2 经刺激迅速产生,作为高度可诱导性的 COX,可催化花生四烯酸转化为前列腺素,参与炎症反应,加剧组织破坏。

正常生理状态下 TSP-1 表达水平很低,可限制人巨噬细胞产生 IL-1 β ,具有一定的免疫自稳的作用。当组织细胞受到外源性刺激活化,可大量分泌 TSP-1,在病理情况下发挥重要作用,从而参与真菌、细菌等微生物感染性疾病和关节炎、肺纤维化等炎症免疫性疾病进展^[8]。研究^[9]发现,慢性牙周炎龈下菌斑中的 *P. gingivalis* LPS 亦可引起人单核细胞 TSP-1 的表达,IL-17 能够显著促进这一蛋白的表达。本课题组的前期研究^[8]也证实活化的人巨噬细胞可高表达 TSP-1,继而通过 NF- κ B 信号通路调节炎症细胞因子的分泌水平。

本研究构建大鼠牙周炎模型,采集炎症牙龈组织,检测 IL-6、COX-2 表达,显示局部组织中 IL-6、

COX-2 mRNA 表达升高,同时 TSP-1 蛋白和 mRNA 表达水平亦升高。hPDLFs 是牙周膜中数目最多,功能最重要的细胞,不仅作为机械屏障参与防御,同时具有免疫调节作用。本研究体外实验中,分离培养 hPDLFs,用 *P. gingivalis* LPS 诱导活化细胞,TSP-1 蛋白和 mRNA 表达水平均上调。结果表明,除了单核巨噬细胞之外,活化的 hPDLFs 也是 TSP-1 的重要来源。

之后,本研究构建过表达 TSP-1 质粒的重组腺病毒,通过基因转染技术上调 hPDLFs 自身 TSP-1 表达水平,结果显示 TSP-1 基因转染使 hPDLFs 在蛋白和 mRNA 水平均表现出 TSP-1 表达上调。同时,细胞过表达 TSP-1 后,可促进 IL-6 蛋白和 mRNA 的表达,这与重组小鼠 TSP-1 蛋白促进平滑肌细胞 IL-6 分泌的相关研究^[10]一致。有研究^[11]指出在紫外线辐射导致的皮肤癌中,TSP-1 通过抑制 COX-2 改善紫外线对皮肤的损伤。然而在本研究中,增加 hPDLFs 自身 TSP-1 的表达,可促进 IL-6 和 COX-2 蛋白和 mRNA 表达。随后,本研究直接在细胞培养中添加 rTSP-1,刺激细胞 24 h 后,IL-6、COX-2 蛋白和 mRNA 水平均升高,提示外源性的 TSP-1 亦可正向调控细胞 IL-6 和 COX-2 的表达,且 TSP-1 对于 IL-6 和 COX-2 的诱导作用与 *P. gingivalis* LPS 类似。

综上所述,慢性牙周炎疾病进程中,感染细菌作为始动因子活化 hPDLFs,使其高表达 TSP-1,TSP-1 继而作为炎症介质,进一步促进 hPDLFs 牙周炎相关细胞因子的释放。在宿主对细菌的应答作用中,TSP-1 的参与使得局部组织随着疾病进展进一步崩解破坏。但目前 TSP-1 通过何种途径调节炎症因子的表达,以及在动物模型中下调 TSP-1 的表达能否改善牙周局部组织破坏情况,尚需系统的实验研究来进一步的探索。

参考文献

- Baenziger N L, Brodie G N, Majerus P W. A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971, 68(1):240-3.
- Adams J C, Lawler J. The thrombospondins [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(6):961-8.
- Guillon J, Petit C, Moreau M, et al. Regulation of senescence escape by TSP1 and CD47 following chemotherapy treatment [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(3):199.
- Gokyu M, Kobayashi H, Nanbara H, et al. Thrombospondin-1 production is enhanced by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in THP-1 cells [J]. PLoS One, 2014, 9(12):e115107.
- Jiang C, Yang W, Wang C, et al. Methylene blue-mediated pho-

- todynamic therapy induces macrophage apoptosis via ROS and reduces bone resorption in periodontitis [1]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:1529520.
- [6] Lee H J, Lee H, Kim M H, et al. Angelica dahurica ameliorates the inflammation of gingival tissue via regulation of pro-inflammatory mediators in experimental model for periodontitis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 205: 16–21.
- [7] 崔晓宇, 王国芳, 李小红, 等. β -隐黄素对实验性牙周炎大鼠氧化应激的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(10): 1499–502.
- [8] Zhang J, Li C, Zheng Y, et al. Inhibition of angiogenesis by arsenic trioxide via TSP-1-TGF- β 1-CTGF-VEGF functional module in rheumatoid arthritis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43): 73529–46.
- [9] Xing T, Wang Y, Ding W J, et al. Thrombospondin-1 production regulates the inflammatory cytokine secretion in THP-1 cells through NF- κ B signaling pathway [J]. *Inflammation*, 2017, 40(5): 1606–21.
- [10] Zeng T, Yuan J, Gan J, et al. Thrombospondin 1 is increased in the aorta and plasma of patients with acute aortic dissection [J]. *Can J Cardiol*, 2019, 35(1): 42–50.
- [11] Tong X, Mirzoeva S, Veliceasa D, et al. Chemopreventive apigenin controls UVB-induced cutaneous proliferation and angiogenesis through HuR and thrombospondin-1 [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(22): 11413–27.

Effects of thrombospondin 1 on expression of IL-6 and COX-2 in human periodontal fibroblasts

Liu Xiaoxiao, Shen Zhenguo, Zhao Rongquan, et al

(College of Stomatology, Hospital of Stomatology, Key Lab of Oral Diseases
Research of Anhui Province, Anhui Medical University, Hefei 230031)

Abstract Objective To explore the expressions of TSP-1 in the gingiva tissues of rat periodontitis model, and to verify the effect of TSP-1 on the expressions of interleukin-6 (IL-6) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in primary cultured human periodontal ligament fibroblasts (hPDLFs). **Methods** 12 female SD rats were randomized into 2 groups, periodontitis group (ligature induced, $n=6$), control group (left unligated, $n=6$). Western blot was used to detect the protein level of TSP-1, and qRT-PCR was used to detect the mRNA level of TSP-1, IL-6 and COX-2 in the gingiva tissues in each group. After primary culturing hPDLFs with tissue block method, recombinant adenovirus (Ad-TSP-1-GFP) carrying TSP-1 gene was constructed and cells were transfected with no-load adenovirus (Ad-GFP) as a negative control, or add recombinant tsp-1 protein (rtsp-1) to the supernatant of hPDLFs culture. IL-6 expression level of hPDLFs was detected by ELISA. The expression of COX-2 in hPDLFs was detected by Western blot. mRNA expression levels of IL-6 and COX-2 were detected by qRT-PCR. **Results** Compared to the normal group, TSP-1 expressions in gingiva tissues were markedly increased in periodontitis group, and mRNA levels of IL-6 and COX-2 were synchronously elevated. Compared with Ad-GFP group, the level of TSP-1 was significantly higher in Ad-TSP-1-GFP group, meantime, the expression of IL-6 and COX-2 at both protein and mRNA levels in Ad-TSP-1-GFP group were also promoted. The results were confirmed by adding rTSP-1 into cell culture, since the Western blot and qRT-PCR analyses revealed a prominent upregulation of IL-6 and COX-2 after being induced by rTSP-1. **Conclusion** TSP-1 can significantly upregulate the expressions of IL-6 and COX-2 in hPDLFs, and then aggravate the symptoms of periodontitis.

Key words TSP-1; human periodontal membrane fibroblast; adenovirus; recombinant protein; periodontitis