

网络出版时间: 2019-5-30 10:50 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190527.1648.012.html>

N-乙酰半胱氨酸对脂多糖诱导的人牙周膜成纤维细胞表达相关蛋白和基因的影响

郑睿, 谭裕洁, 古萌琴, 康婷, 郭玲

摘要 目的 研究 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对脂多糖(LPS)诱导的人牙周膜成纤维细胞(hPDLFs)中关于人类肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)合成的影响。方法 hPDLFs 通过原代培养获得。以不同浓度的 NAC 或 LPS 刺激细胞,使用细胞计数试剂盒 8(CCK-8)在不同时间点(24、48、72 h)测量细胞增殖情况,以此得到药物的最适浓度。通过实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)分析测定 IL-1 β , TNF- α 和核转录因子(NF- κ B)的 mRNA 水平。通过酶联免疫吸附测定(ELISA)测量 IL-1 β , TNF- α 和 NF- κ B 的蛋白质水平。结果 随着 NAC 药物浓度的升高,细胞的增殖

率上升,并且在 NAC 处于 1 mmol/L 时到达顶峰,此后细胞增殖率随 NAC 浓度增高而下降。LPS 可诱导 hPDLFs 中的 IL-1 β , TNF- α 和 NF- κ B mRNA 及蛋白表达的增加。然而 NAC 预处理抑制了这些效应。结论 NAC 通过抑制 NF- κ B 活性,从而抑制 LPS 诱导的 hPDLFs 中 TNF- α 和 IL-1 β 的合成。

关键词 N-乙酰半胱氨酸; 脂多糖; TNF- α ; IL-1 β ; 人牙周膜成纤维细胞

中图分类号 R 781.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)06-0925-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.018

2019-01-30 接收

基金项目: 四川省科技厅面上项目(编号:2017JY0111);泸州市-校联合(编号2016LZXNYD-J20);西南医科大学重点项目(编号:2016013);西南医科学青年基金(编号:23)

作者单位: 西南医科大学附属口腔医院修复科,泸州 646000

作者简介: 郑睿,男,硕士研究生;

郭玲,女,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: 372083745@qq.com

牙周炎(periodontitis, PD)是由特定微生物引起的一种常见的口腔疾病,可导致牙周支持组织的破坏^[1-2]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)通过诱导炎性细胞因子如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等的释放,并使口腔微生物群从共生状

inhibitor and null control inhibitor, and three exosomes (N-Exo, I-Exo and Exo) were obtained by ultracentrifugation. The morphology of exosomes was observed by transmission electron microscope, and the content of miR-126 was detected by qPCR. 160 clean grade SD rats were taken and divided into 4 groups. Control group (sham operation + PBS), sepsis group (CLP + PBS), N-Exo group (CLP + N-Exo), I-Exo group (CLP + I-Exo). A rat sepsis model was constructed using cecal ligation and puncture (CLP). Blood biochemical parameters (serum ALT, AST, BUN, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β content) were measured at 48 h after operation in each group. Taking lung and kidney, HE staining for pathological score, measuring the ratio of vascular microleakage index and dry/wet weight; Western blot was used to analyze high mobility group box-1 protein (HMGB1), advanced glycation end product receptor (RAGE), Toll-like receptor 2 (TRL-2), TRL-4, p-p65 protein content, qPCR measurement the content of miR-126-3p and miR-126-5p; Finally, the survival rate of rats in each group was observed at 7 days. **Results** ① miR-126 content: N-Exo > Exo > I-Exo ($P < 0.05$); ② 7 d survival rate: the sepsis group and the I-Exo group were significantly lower than the N-Exo group and the control group ($P < 0.05$); ③ The ratio of liver and kidney function and inflammatory factors, lung and renal pathological score, vascular microleakage and dry/wet weight: the sepsis group and the I-Exo group were significantly higher than the N-Exo group and the control group ($P < 0.05$); ④ Contents of miR-126-3p, miR-126-5p and HMGB1, RAGE, TRL-2, TRL-4, and p-p65 in the kidney: the sepsis group and the I-Exo group were significantly lower than the N-Exo group and the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** N-Exo may inhibit inflammatory response through miR-126-HMGB1-NF- κ B, protect vascular endothelial cells, and ultimately improve the survival rate of septic rats.

Key words sepsis; micro RNA-126; exosomes; high mobility group box-1 protein

态转变为生态不良状态来诱导牙周炎症。N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl cysteine, NAC)作为一种抗氧化剂和谷胱甘肽(glutathione, GSH)的前体,能促进GSH的合成,从而发挥抗氧化、稳定细胞膜及抗炎等作用^[3-4]。课题组前期研究^[5]表明NAC能抑制成骨细胞中LPS诱导的核转录因子(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的活化以及IL-6等炎症因子的表达,但关于NAC作用于人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblast cells, hPDLFs)的报道较少。该实验以hPDLFs为研究对象,采用原代培养法建立体外细胞模型,研究NAC作为抗氧化剂对LPS介导的TNF- α 和IL-1 β 合成的影响。此外,实验还通过研究NF- κ B蛋白的活化探索了NAC潜在抗炎作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 hPDLFs(原代培养);实时定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)试剂盒购自德国Hamburg公司;波形蛋白和细胞角蛋白抗体购自美国Proteintech Group公司;青-链霉素混合液、IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B ELISA试剂盒购自日本同仁化学研究所;DMEM低糖培养基、胎牛血清购自美国Hyclone公司;LPS(大肠杆菌属)和NAC购自美国Sigma公司;细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)购自北京正四柏生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 原代细胞培养 2018年1月~3月期间从西南医科大学附属口腔医院口腔外科收集年龄范围为12~15岁,中位年龄为13岁,患者的健康前磨牙(共30颗)。并从患者父母处获得知情同意书以及西南医科大学附属口腔医院伦理道德委员会的批准。所有样本用含5%青-链霉素(成品)的磷酸盐缓冲液(PBS)彻底洗涤。从牙根中三分之一切取牙周组织,手术刀切成1 mm³的小片。加入0.1%胶原酶-I,在CO₂培养箱中孵40 min后,补充加入10%胎牛血清的DMEM培养基(低糖)及2%的青-链霉素,在5% CO₂、37℃的培养箱中培养。每3 d更新一次培养基,用倒置相差显微镜观察,当细胞爬出约占培养皿底部80%时开始传代,传至P4冻存备用。

1.2.2 CCK-8法测定NAC/LPS对hPDLFs增殖的影响 将第4代处于对数生长期的hPDLFs以1×10⁵/ml的密度接种到96孔板中,每孔100 μl,在

5% CO₂、37℃的培养箱中培养24 h后,更换无血清DMEM培养基(低糖)培养12 h,分别加入100 μl预先设计好浓度的LPS(0.1、0.5、1、2.5、5 μg/ml),NAC(0.25、0.5、1、2.5、5 mmol/L),培养24、48、72 h,并设置未添加任何药物的对照组,以及不含细胞的空白组,每组4个复孔。培养相应时间后,更换100 μl单纯DEME低糖培养基,每孔加入10 μl CCK-8试剂,培养4 h后在酶联免疫检测仪上以450 nm波长测定每孔的吸光度(optical density, OD)值,取平均值为样本检测值,实验重复3次。

1.2.3 RT-qPCR法测量IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B mRNA的相对表达量 将第4代处于对数生长期的hPDLFs以1×10⁵/ml的密度接种到6孔板中,每孔2 ml。在5% CO₂、37℃的培养箱中培养24 h后更换2 ml无血清DMEM培养基(低糖)培养12 h。细胞随机分为4组:对照组, LPS组(1 μg/ml), NAC组(1 mmol/L), LPS + NAC组(NAC预先作用30 min后,再使用LPS与NAC一起作用),每组3个复孔。在5% CO₂、37℃的培养箱中培养3、6、12 h后,按照试剂盒说明书,快速提取细胞总RNA,以RT-qPCR法测量IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B mRNA的相对表达量,实验重复3次。RT-qPCR法所用引物见表1。

表1 RT-qPCR引物

引物	引物序列(5'-3')	碱基长度(bp)
IL-1 β	F: GCGGCATCCAGCTACGAATCTC	101
	R: GCGGCATCCAGCTACGAATCTC	
NF- κ B	F: ACCAGGCTGGCAGCTCTTCTC	120
	R: AGGCACAACCTCTTCATCCTCTCC	
TNF- α	F: AGCTGGTGGTGCCATCAGAGG	124
	R: TGCTAGGAGACGGCGATGCG	
β -actin	F: CCTGGCAGCCAGCACAAT	70
	R: GCCGATCCACACGGAGTA	

1.2.4 ELISA法检测人牙周膜成纤维细胞IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B蛋白表达量 将第4代处于对数生长期的hPDLFs以1×10⁵/ml的密度接种到6孔板中,每孔2 ml。在5% CO₂、37℃的培养箱中培养24 h后更换2 ml无血清DMEM培养基(低糖)培养12 h。细胞随机分为4组:对照组, LPS组(1 μg/ml), NAC组(1 mmol/L), LPS + NAC组(NAC预先作用30 min后,再使用LPS与NAC一起作用),每个组3个复孔。在5% CO₂、37℃的培养箱中培养12、24、48 h后,收集上清液,按照ELISA试剂盒说明书进行IL-1 β 、TNF- α 蛋白的测定,余下细胞沉淀用于检

测 NF- κ B 的蛋白表达量,实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较以单因素方差分析进行, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞原代培养与鉴定 在第 4 天时观察到组织块中有细胞爬出,细胞表现为星形和长梭形,见图 1A。取第四代生长良好的细胞,以 5×10^4 /ml 的密度接种至预先放置好玻璃爬片的 6 孔板中,待细胞长至约 80% 时进行多聚甲醛的固定并根据免疫组化试剂盒说明书进行细胞爬片的染色鉴定,光学显微镜下见细胞抗波形丝蛋白染色结果阳性见图 1B,细胞抗角蛋白染色结果阴性见图 1C。证明细胞来源于间充质而非上皮,结合细胞形态,可以确定原代培养结果为 hPDLFs。

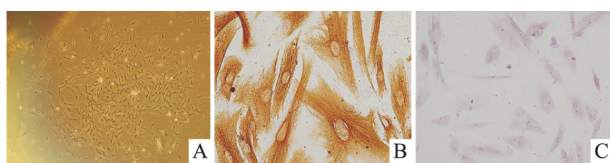


图 1 细胞原代培养及鉴定

A: 细胞从组织块爬出 $\times 40$; B: 抗波形丝蛋白染色阳性 $\times 100$; C: 抗角蛋白染色阴性 $\times 100$

2.2 CCK-8 检测在不同浓度的 LPS/NAC 影响下 hPDLFs 增殖率的变化 各实验组与对照组之间均有统计学意义 (LPS 组: $F_{24h} = 45.92$, $F_{48h} = 42.81$, $F_{72h} = 37.24$; NAC 组: $F_{24h} = 38.51$, $F_{48h} = 31.98$, $F_{72h} = 46.11$; $P < 0.05$)。低浓度 LPS 对成纤维细胞的增殖有促进作用,并在 $1 \mu\text{g/ml}$ 时到达顶峰,增殖率随 LPS 浓度增高而下降,见图 2,最终确定试验用 LPS 浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$ 。NAC 也表现出类似的趋势,见图 3。最终确定 1 mmol/L 为实验所用 NAC 浓度。

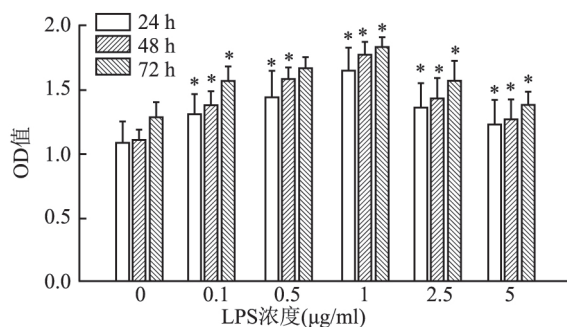


图 2 hPDLFs 在不同浓度 LPS 刺激下细胞增殖率的变化

与对照组 (LPS 0 $\mu\text{g/ml}$) 比较: * $P < 0.05$

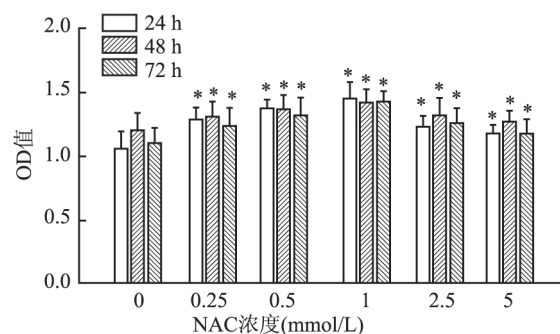


图 3 hPDLFs 在不同浓度 NAC 刺激下细胞增殖率的变化
与对照组 (NAC 0 mmol/L) 比较: * $P < 0.05$

2.3 NAC 对 LPS 刺激下的 hPDLFs 分泌 IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B mRNA 的影响 RT-qPCR 法结果显示 hPDLFs 在 LPS 的刺激下,IL-1 β ($F = 2199.07$, 图 4)、TNF- α ($F = 174.35$, 图 5)、NF- κ B ($F = 1525.11$, 图 6) mRNA 的相对表达量增加,与对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。加入 NAC 后该作用受到抑制,与 LPS 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与此同时,单纯加入 NAC 时,IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B mRNA 的相对表达量相比于对照组,也有所下降。表明 NAC 对 LPS 上调人牙周膜成纤维细胞 IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B mRNA 有抑制作用。

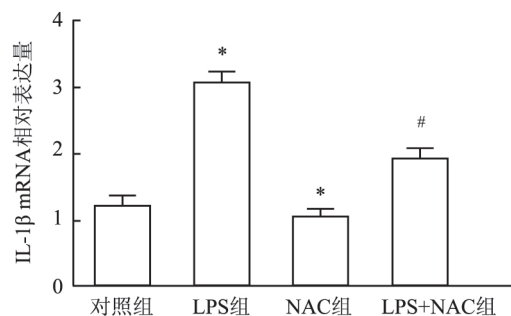


图 4 12 h 时 NAC 对 LPS 诱导 hPDLFs 表达 IL-1 β mRNA 的影响
与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$

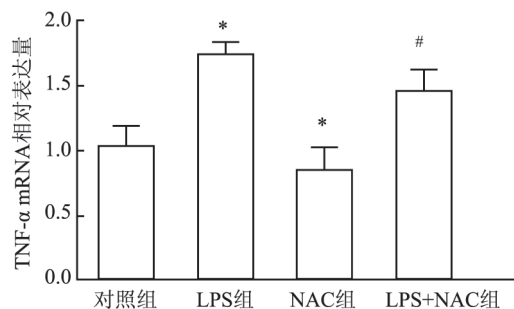


图 5 12 h 时 NAC 对 LPS 诱导 hPDLFs 表达 TNF- α mRNA 的影响
与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$

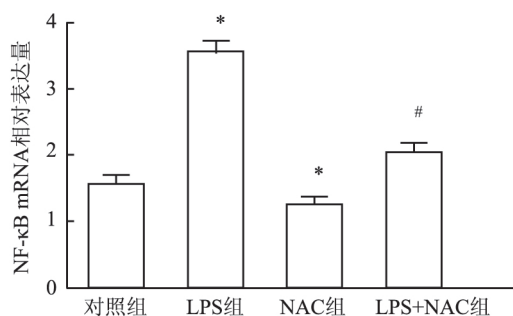


图6 12 h 时 NAC 对 LPS 诱导 hPDLFs 表达 NF-κB mRNA 的影响
与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$

2.4 NAC 对 LPS 刺激下的 hPDLFs 分泌 IL-1β、TNF-α、NF-κB 蛋白的影响 IL-1β ($F_{12h} = 22.25$, $F_{24h} = 29.52$, $F_{48h} = 148.49$)、TNF-α ($F_{12h} = 977.37$, $F_{24h} = 773.86$, $F_{48h} = 999.28$)、NF-κB ($F_{3h} = 41.12$, $F_{6h} = 69.12$, $F_{12h} = 34.38$) LPS 组与对照组相比, IL-1β、TNF-α 和 NF-κB 的蛋白量均有所增加。LPS + NAC 组结果提示 NAC 抑制了 LPS 介导的 IL-1β、TNF-α 以及 NF-κB 蛋白的表达。见表 2~4。

表2 不同时间点 NAC 对 LPS 诱导的 hPDLFs 表达 IL-1β 的影响 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	12 h	24 h	48 h
对照	44.23 ± 3.18	52.85 ± 2.88	58.96 ± 4.84
LPS	70.83 ± 4.01*	76.27 ± 5.04*	80.90 ± 3.01*
NAC	31.16 ± 7.58*	33.59 ± 3.35*	38.20 ± 2.10*
LPS + NAC	50.50 ± 5.52#	61.91 ± 5.92#	73.96 ± 2.25#

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$

表3 不同时间点 NAC 对 LPS 诱导的 hPDLFs 表达 TNF-α 的影响 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	12 h	24 h	48 h
对照	25.83 ± 0.91	42.93 ± 0.64	45.03 ± 0.76
LPS	53.93 ± 0.51*	67.93 ± 0.91*	71.43 ± 0.87*
NAC	21.30 ± 0.71*	35.83 ± 0.60*	37.80 ± 0.96*
LPS + NAC	37.63 ± 0.74#	56.56 ± 0.93#	59.56 ± 0.88#

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$

表4 不同时间点 NAC 对 LPS 诱导 hPDLFs 表达 NF-κB 的影响 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	3 h	6 h	12 h
对照	810.88 ± 21.62	785.10 ± 18.77	781.35 ± 24.58
LPS	927.97 ± 13.97*	899.24 ± 13.15*	888.57 ± 12.15*
NAC	732.46 ± 15.99*	713.47 ± 12.11*	728.91 ± 15.64*
LPS + NAC	882.02 ± 15.58#	864.01 ± 11.14#	854.93 ± 12.30#

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

PD 是一种常见的口腔疾病, 通常表现为牙周支持组织的丧失以及牙齿的松动甚至脱落^[6-7]。与 PD 相关的主要病原体是革兰阴性细菌, 如牙龈卟啉

单胞菌^[8], 作为革兰阴性菌的毒力因子, LPS 可刺激 hPDLFs 分泌产生 IL-1β 和 TNF-α。研究^[9]表明 IL-1β 和 TNF-α 具有相互重叠、促进的作用, 并诱导破骨细胞形成, 加剧牙周骨组织的破坏, 如果能找到一种同时抑制 IL-1β 和 TNF-α 的药物, 对于牙周组织炎症的控制和牙槽骨的吸收破坏将具有一定的积极意义。

NF-κB 广泛存在于哺乳动物的细胞中, 通过调节基因的中心转录参与炎症以及细胞凋亡等多种细胞生理过程的早期阶段。NF-κB 蛋白的活化导致下游受其调控的各类炎症因子的合成, 研究^[10-11]证明 IL-1β 和 TNF-α 的合成受上游 NF-κB 蛋白的调控。本研究 NF-κB 蛋白的测定在 3、6、12 h 三个时间点均得到较明显阳性结果, 提示药物干预后 3 h, hPDLFs 中已经出现了 NF-κB 蛋白的变化, IL-1β 与 TNF-α 蛋白测量的阳性结果则是在 12、24、48 h 时出现。

NAC 作为 GSH 的前体, 具有抗氧化、清除氧自由基等作用。NAC 可以促进 GSH 的合成, 预防或调节体内氧化还原反应的失衡, 抑制体内活性氧及其衍生物产生的核转录因子抑制蛋白活化酶的活化, 导致 NF-κB 的激活被抑制, 从而抑制 IL-1β、TNF-α 等受 NF-κB 调控的炎症细胞因子的释放^[12-15]。

本研究免疫组化结果显示细胞波形丝蛋白染色阳性及角蛋白染色阴性, 证明细胞源于间充质, 结合细胞形态, 可以判定原代细胞为 hPDLFs, 符合实验要求。CCK-8 结果提示低浓度 NAC 对 hPDLFs 增殖有促进作用, 当浓度超过 1 mmol/L 后, 细胞增殖开始受到抑制, 表明高浓度 NAC (大于 1 mmol/L) 能抑制 hPDLFs 的增殖。ELISA 实验结果显示 LPS 组 (1 μg/ml) 与对照组相比, IL-1β、TNF-α 和 NF-κB 的蛋白表达量显著升高, 而 LPS + NAC 组中以 NAC (1 mmol/L) 预处理细胞 30 min 后, 再用 LPS (1 μg/ml) 刺激细胞, 显示 IL-1β、TNF-α 和 NF-κB 的蛋白表达量均显著低于 LPS 组。RT-qPCR 结果提示 LPS 上调 hPDLFs 中 NF-κB 以及 IL-1β 和 TNF-α 的 mRNA 的相对表达量, NAC 抑制了 LPS 诱导的 IL-1β、TNF-α 和 NF-κB mRNA 相对表达量的增高, 结合 ELISA 结果说明 NAC 可以抑制 LPS 诱导的 hPDLFs 中 NF-κB 的活化, 进而抑制 IL-1β 和 TNF-α 的合成, 从而减轻了由 IL-1β 和 TNF-α 引起的牙周炎症及牙周支持组织的破坏。

作为一种危害人类口腔健康的主要疾病, PD 及其相关治疗已成为一个研究热点。NAC 通过抑制

NF- κ B 的活化从而抑制 LPS 诱导的人 hPDLFs 中 TNF- α 和 IL-1 β 的合成,这可能为临床预防和治疗牙周组织炎症提供一种具有潜力的、崭新的药物,但在应用于临床前还需要进一步的深入研究和临床试验来验证。

参考文献

- [1] Gözl L, Memmert S, Rathdeschner B, et al. Hypoxia and P. gingivalis synergistically induce HIF-1 and NF- κ B activation in PDL cells and periodontal diseases [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 438085.
- [2] Lu W L, Song D Z, Yue J L, et al. NLRP3 inflammasome may regulate inflammatory response of human periodontal ligament fibroblasts in an apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) dependent manner [J]. *Int Endod J*, 2017, 50(10): 967–75.
- [3] Islam M A, Proll M, Holker M, et al. Alveolar macrophage phagocytic activity is enhanced with LPS priming, and combined stimulation of LPS and lipoteichoic acid synergistically induce pro-inflammatory cytokines in pigs [J]. *Innate Immun*, 2013, 19(6): 631–43.
- [4] Shin E S, Hwang H J, Kim I H, et al. A glycoprotein from *Porphyra yezoensis* produces anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-stimulated macrophages via the TLR4 signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 28(5): 809–15.
- [5] 张 慧,李汪阳,黄 英,等. N-乙酰半胱氨酸对脂多糖诱导的成骨细胞相关基因及蛋白表达影响的研究 [J]. *口腔医学研究*, 2017, 33(11): 1151–5.
- [6] 朱庆勇,陈文君,朱 慧,等. 抑制 Kv1.3 表达能够降低入牙周膜成纤维细胞增殖和分化成骨能力 [J]. *安徽医科大学学报* 2017 52(6): 819–23.
- [7] Heaton B, Dietrich T. Causal theory and the etiology of periodontal diseases [J]. *Periodontol*, 2000, 58(1): 26–36.
- [8] Wakabayashi H, Kondo I, Kobayashi T, et al. Periodontitis, periodontopathic bacteria and lactoferrin [J]. *Biometals*, 2010, 23(3): 419–24.
- [9] Gillespie M T. Impact of cytokines and T lymphocytes upon osteoclast differentiation and function [J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(2): 103.
- [10] Dou W, Zhang J, Sun A, et al. Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF- κ B signaling [J]. *Brit J Nutr*, 2013, 110(4): 599–608.
- [11] Wang H, Tian Y, Wang J, et al. Inflammatory cytokines induce notch signaling in nucleus pulposus cells: Implications in intervertebral disc degeneration [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(23): 16761–74.
- [12] Park J H, Kang S S, Kim J Y, et al. The antioxidant N-acetylcysteine inhibits inflammatory and apoptotic processes in human conjunctival epithelial cells in a high-glucose environment [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(9): 5614–21.
- [13] Moura F A, de Andrade K Q, dos Santos J C, et al. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? [J]. *Redox Biol*, 2015, 6: 617–39.
- [14] Sims N A, Vrahnas C. Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 561: 22–8.
- [15] Sarir H, Mortaz E, Karimi K, et al. Cigarette smoke regulates the expression of TLR4 and IL-8 production by human macrophages [J]. *J Inflamm (Lond)*, 2009, 6: 12.

Effects of N – acetylcysteine on lipopolysaccharide – induced expression of proteins and genes in human periodontal ligament fibroblasts

Zheng Rui, Tan Yujie, Gu Mengqin, et al

(Dept of Prosthodontics, Hospital of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000)

Abstract Objective To investigate the role of n-acetyl cysteine (NAC) in the lipopolysaccharide (LPS)-mediated induction of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) synthesis by human periodontal ligament fibroblast cells (hPDLFs). **Methods** HPDLFs were obtained by primary culture. Cells were stimulated with various concentrations of NAC or LPS. Cell proliferation was measured at various time-points with the cell counting kit 8 (CCK-8) assay (24, 48, 72 h) to get the most suitable drug concentration for the experiment. mRNA levels of IL-1 β , nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and TNF- α were determined by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis. Protein levels of IL-1 β , NF- κ B and TNF- α were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** With the increase of NAC drug concentration, the cell proliferation increased, and reached the peak when the NAC was at 1 mmol/L. After that, the cell proliferation decreased with the increase of NAC concentration. The results showed that LPS treatment in hPDLFs induced mRNA and protein expression of IL-1 β , TNF- α , and NF- κ B. However, these effects were inhibited by pretreatment with NAC. **Conclusion** NAC inhibits LPS-mediated synthesis of IL-1 β and TNF- α in hPDLFs through inhibiting the active of NF- κ B.

Key words N-acetyl cysteine; lipopolysaccharide; tumor necrosis factor- α ; interleukin-1 β ; human periodontal ligament fibroblast cells