

牙龈卟啉单胞菌对牙周膜成纤维细胞活性、 炎性因子与骨代谢基因表达的影响研究

杨洋¹, 徐燕¹, 孟明理¹, 汪晨¹, 王敬¹, 王晓静¹, 周永敏¹, 沈继龙²

摘要 目的 探讨牙龈卟啉单胞菌(*P. gingivalis*)活菌感染牙周膜成纤维细胞(PDLF)后对细胞活性、炎性因子和骨代谢相关基因表达的影响。方法 *P. gingivalis*活菌分别以 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 CFU/ml浓度感染PDLF 6 h,检测细胞活性和白细胞介素-6(IL-6)、IL-8、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、RANKL、骨保护素(OPG)的基因表达。结果 *P.*

*gingivalis*攻击PDLF 6 h后,细胞活性差异无统计学意义。与对照组比较,*P. gingivalis*浓度分别达到 10^8 CFU/ml和 10^7 CFU/ml时,IL-6和IL-8基因表达上升,差异有统计学意义($P < 0.01$)。当*P. gingivalis*浓度达到 10^9 CFU/ml时,IL-1 β 、TNF- α 基因表达上升,差异有统计学意义($P < 0.01$)。各实验组OPG基因表达均下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。RANKL基因表达差异无统计学意义。结论 *P. gingivalis*活菌感染PDLF后,可产生一系列的细胞因子,参与牙周组织的破坏与改建。

关键词 牙龈卟啉单胞菌;牙周膜成纤维细胞;细胞因子;破骨细胞

中图分类号 R 780.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)06-0786-05

2016-04-01 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1408085MKL28)

作者单位:¹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中心实验室,合肥 230032

²安徽医科大学人兽共患病安徽省重点实验室,合肥 230032

作者简介:杨洋,女,硕士研究生;

徐燕,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: 173236344@qq.com

牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)是慢性牙周炎的主要致病菌,含有一系列

Impact on proliferation of K1 cells in papillary thyroid carcinoma under the inhibition of siRNA on HMGA1 gene

Zhou Daxin^{1,2}, Zhou Rui¹, Li Dequn¹, et al

(¹Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Hefei 233004; ²Huaibei Clinical Institute of Anhui Medical University, Dept of General Surgery, Huaibei People's Hospital, Huaibei 235100)

Abstract **Objective** To study the effect of HMGA1-siRNA gene on proliferation of K1 cells in papillary thyroid carcinoma. **Methods** Experimental group was transfected with HMGA1 by small interfering RNA (siRNA); the negative contrast group was transfected with HMGA1 nonrelevant sequence, and transfected with K1 cells of thyroid papillary carcinoma. The impact on the proliferation of K1 cells after the transfection of HMGA1-siRNA was tested by CCK-8. The HMGA1-mRNA expression in the normal group was tested by RT-PCR. The HMGA1 protein expression in the three groups was tested by Western blot. The invasion of K1 cells transfected with HMGA1-siRNA gene was detected by Transwell invasion assay in three groups. **Results** The effect of HMGA1-siRNA gene on the proliferation of K1 cells was obvious, which was relevant to time and dosage. The expression of mRNA and protein in K1 cells was significantly lower than that in normal in HMGA1-siRNA cells. The expression of mRNA and protein in K1 cells was significantly lower than that in the normal group and the negative control group. The invasion ability of K1 cells in HMGA1-siRNA group was significantly lower than that in the normal group and the negative control group. **Conclusion** siRNA can silence HMGA1 gene, and slow down the proliferation of papillary thyroid carcinoma K1 cells.

Key words HMGA1-siRNA gene; papillary thyroid carcinoma; K1 cell; RNA interference technology

的毒力因子。其中脂多糖、菌毛、牙龈素等是 *P. gingivalis* 表面最重要的致病因子。脂多糖可刺激巨噬细胞分泌多种细胞因子和炎症介质,牙龈素可通过大量的蛋白水解活动侵袭破坏宿主组织。*P. gingivalis* 可侵入宿主细胞、抵抗宿主先天性免疫系统、分泌大量毒力因子、引发机体的免疫炎症反应,进而导致牙周组织的破坏^[1]。牙周膜成纤维细胞(periodontal ligament fibroblasts, PDLF)是牙周膜中最主要的细胞^[2],对于牙周炎的发生发展以及组织修复和改建具有重要作用。炎症状态下,PDLF可表达细胞因子并与破骨前体细胞表面的受体连接进而刺激其向破骨细胞分化^[3]。该研究旨在观察 *P. gingivalis* 体外对 PDLF 的攻击,探讨 *P. gingivalis* 对 PDLF 活性、细胞因子和骨代谢的基因表达的影响,以期为进一步研究 *P. gingivalis* 对 PDLF 的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂 DMEM 培养基、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);胎牛血清(FBS)(杭州四季青公司);RT-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);台盼蓝(美国 Sigma 公司);倒置相差显微镜(德国 Leica 公司);*P. gingivalis* (ATCC33277, 本课题组平行实验赠予);紫外可见分光光度计 UV-7504(上海欣茂仪器有限公司);Countstar 细胞计数仪(上海睿钰生物科技有限公司)。

1.2 PDLF 的分离培养 取 12~22 岁因正畸减数拔除的健康前磨牙,运用组织块法用刀片刮取根中 1/3 部位的牙周膜,将组织块置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养^[2]。

1.3 *P. gingivalis* 活菌体外感染 PDLF 取第 3~4 代 PDLF 胰酶消化离散细胞,含 10% FBS 的 DMEM 重悬,以 2×10^5 /ml 密度接种于 6 孔板(每孔 2 ml),培养 24 h 后待细胞贴壁,换不含双抗的 DMEM 培养基培养,待细胞汇合,分为 6 组(5 组实验组,1 组对照组)。将 *P. gingivalis* 用 PBS 重悬,紫外可见分光光度计测量浓度,调整至 10^9 CFU/ml,当光密度(optical density, OD)值 OD₆₆₀ = 0.8 时,细菌浓度为 10^9 CFU/ml^[4],1 000 r/min 离心 5 min 后加入等量不含双抗的 DMEM 培养基重悬。将含 *P. gingivalis* 的 DMEM 培养基稀释制成不同浓度: 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 CFU/ml,分别加入 PDLF 中培养 6 h,对照组 PDLF 以等量 DMEM 培养基培养相同时间^[5],观察

细胞形态。

1.4 台盼蓝染色法检测细胞活性 参考文献^[6]报道,采用台盼蓝染色检测细胞活性。取第 3~4 代 PDLF 胰酶消化,以 1×10^5 /ml 接种于 24 孔板中,待细胞汇合 *P. gingivalis* 活菌感染 6 h 后,PBS 冲洗 3 次,胰酶消化,加等量含 10% FBS 的 DMEM 培养基终止消化。取 10 μ l 细胞悬液与 10 μ l 0.2% 台盼蓝染液混合,细胞计数仪计数,计算细胞活率。

1.5 实时定量 PCR 法检测 分别取 *P. gingivalis* 活菌体外感染 6 h 后的 PDLF,加入 TRIzol 裂解细胞,Ex Taq™ II 反应体系测定白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)、白细胞介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、骨保护素(osteoprotegerin, OPG)、RANKL 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的 mRNA 表达。95 °C 预变性 10 min,95 °C、30 s,58 °C、1 min,72 °C、1 min,共 40 个循环^[7]。实验所用引物见表 1,引物由生工生物工程上海有限公司和宝生物工程(大连)有限公司合成,以 β -actin 为内参,其他各基因产物分别与相应 β -actin 产物作比较,所得比值为相关基因 mRNA 的相对水平。

表 1 炎症因子和骨代谢基因表达的相关引物序列

基因	引物序列(5'-3')	引物长度(bp)
IL-6	F: CTTCCGGTCCAGTTGCCCTTCT	40
	R: GTGAGTGGCTGTCTGTGTGG	
IL-8	F: TTTCAGAGACAGCAGAGCACA	40
	R: GCCAGCTTGGAAAGTCATGTT	
TNF- α	F: TGCTTGTCTCTCAGCCTCTCT	43
	R: CAGAGGGCTGATTAGAGAGAGGT	
IL-1 β	F: TGAAGCAGCCATGGCAGAAG	41
	R: GGTCCGAGATTCTAGCTGGA	
OPG	F: GGCATTCTTCAGGTTTGCTG	43
	R: TCCTCTTACACTCTCTGCGTTT	
RANKL	F: GCCTTTCAAGGAGCTGTGCAA	45
	R: ATCTAACCATGAGCCATCCACCAT	

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件对数据进行方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 *P. gingivalis* 活菌感染 PDLF 后的细胞形态学观察 接种 *P. gingivalis* 活菌 6 h 后,倒置相差显微镜下观察,细胞形态呈梭形或多角形。当细菌浓度达到 10^9 CFU/ml 时,肉眼观察可见培养基浑浊,倒置相差显微镜下观察,细胞形态不规则,胞膜不完整,胞核不清晰。见图 1。

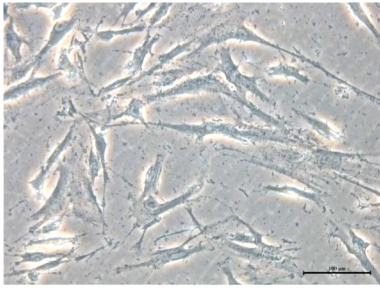


图1 10^9 CFU/ml *P. gingivalis* 感染 PDLF 6 h 后于倒置相差显微镜下观察 $\times 200$

2.2 台盼蓝染色检测细胞活性 与对照组比较, *P. gingivalis* 活菌感染 PDLF 6 h 后, 细胞活率均下降, 随着细菌浓度的升高, 细胞活率逐渐下降, 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 CFU/ml 及对照组的细胞活率分别为 $(75.5 \pm 2.55)\%$ 、 $(76.2 \pm 9.98)\%$ 、 $(78.0 \pm 7.77)\%$ 、 $(78.8 \pm 4.95)\%$ 、 $(79.9 \pm 4.61)\%$ 、 $(91.9 \pm 6.27)\%$, 但各组间差异无统计学意义 ($F = 2.595$, $P > 0.05$)。

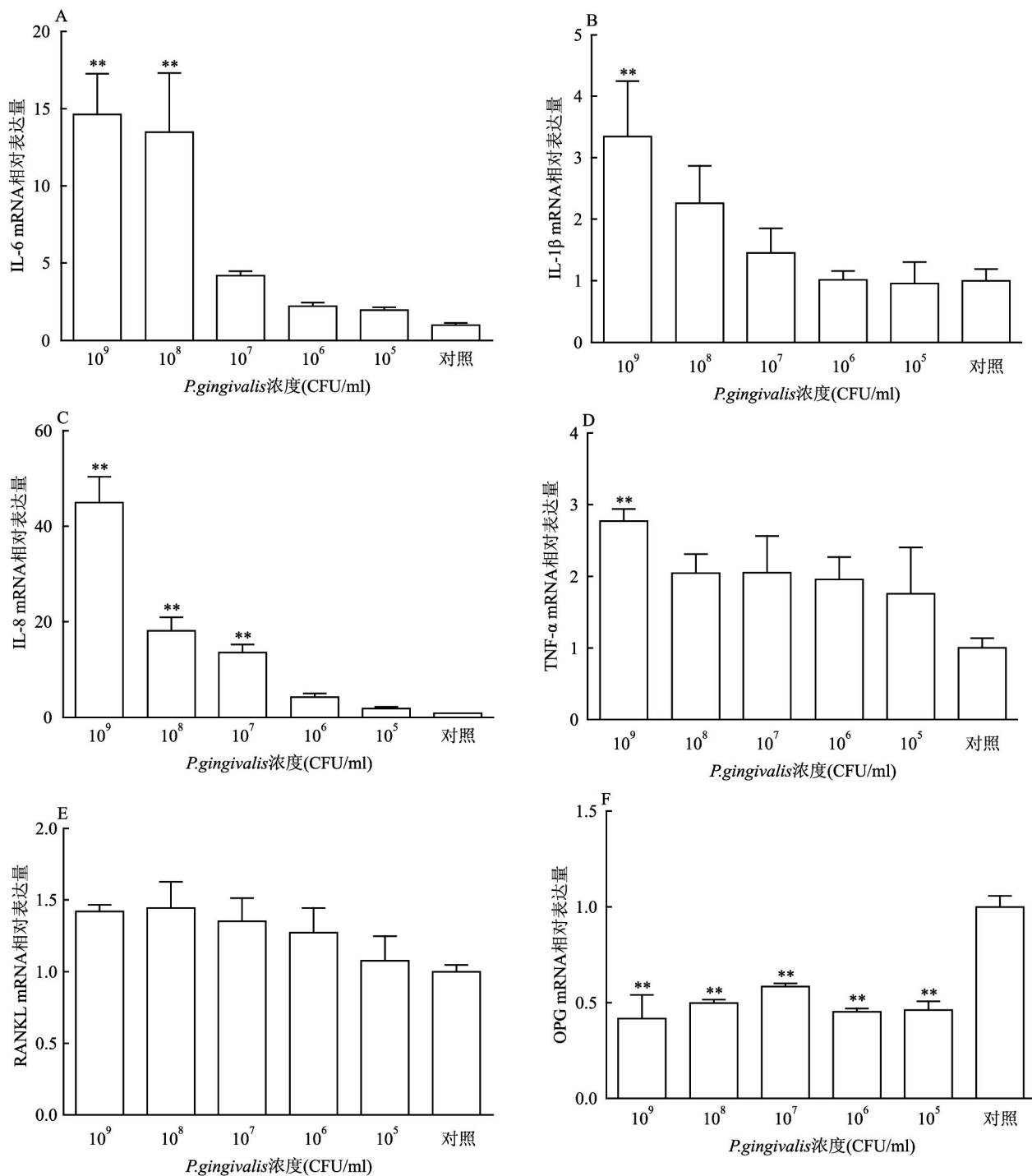
2.3 实时定量 qRT-PCR 法检测 *P. gingivalis* 活菌感染 PDLF 6 h 后的 mRNA 表达 采用 qRT-PCR 法检测 *P. gingivalis* 活菌感染 PDLF 6 h 后 IL-6、IL-8、OPG、RANKL、IL-1 β 、TNF- α 的 mRNA 相对表达情况。qRT-PCR 结果显示 *P. gingivalis* 活菌浓度从 10^5 CFU/ml 升高至 10^9 CFU/ml, 促炎细胞因子 IL-6 (图 2A)、IL-1 β (图 2B)、TNF- α (图 2D) 和 RANKL (图 2E) 的 mRNA 表达呈相对升高趋势。*P. gingivalis* 浓度达到 10^8 CFU/ml 时, IL-6 的 mRNA 相对表达量与对照组比较差异有统计学意义 ($F = 30.960$, $P < 0.01$)。 *P. gingivalis* 浓度达到 10^9 CFU/ml 时, IL-1 β 、TNF- α 的 mRNA 相对表达量与对照组比较差异有统计学意义 ($F = 11.021$ 、 6.537 , $P < 0.01$)。 *P. gingivalis* 活菌感染 PDLF 6 h 后趋化因子 IL-8 (图 2C) 的 mRNA 相对表达量相对升高, 当 *P. gingivalis* 活菌浓度达到 10^7 CFU/ml 时, 差异有统计学意义 ($F = 128.297$, $P < 0.01$)。此外 *P. gingivalis* 活菌浓度从 10^5 CFU/ml 升高至 10^9 CFU/ml, RANKL 的 mRNA 表达亦呈升高趋势, 于 10^8 CFU/ml 浓度下相对表达量最高, 与对照组比较差异无统计学意义 ($F = 5.082$, $P > 0.05$)。 *P. gingivalis* 活菌感染 PDLF 6 h 后所有实验组 OPG (图 2F) 的 mRNA 表达均明显下降, 差异有统计学意义 ($F = 39.839$, $P < 0.01$), 当 *P. gingivalis* 活菌浓度为 10^9 CFU/ml 时, OPG 的 mRNA 相对表达量最低。

3 讨论

近年来关于 *P. gingivalis* 活菌及其各毒力因子感染机体细胞的研究日益增多。作为牙周炎的主要致病菌之一, 探讨 *P. gingivalis* 活菌对牙周组织细胞的作用对于研究牙周炎的发生、发展至关重要。本实验结果显示 *P. gingivalis* 活菌感染 PDLF 6 h 后, 细胞活率虽然有所下降, 但差异无统计学意义。与 *P. gingivalis* 活菌不同, 分别用脂多糖或者高温灭活后的 *P. gingivalis* 感染牙龈上皮细胞, 可诱发程序性细胞死亡, 但是含有大量 *P. gingivalis* 的牙龈上皮细胞并未发生程序性细胞死亡或者坏死, 其原因在于 *P. gingivalis* 活菌可通过内源性信号通路抑制牙龈上皮细胞程序性死亡^[8]。由此推测 *P. gingivalis* 活菌侵入 PDLF 中, 可抑制细胞程序性死亡, 进而逃避宿主免疫防御机制, 从而使自身能在宿主细胞内长期存留, 引发深层感染。

单纯的牙周致病菌存在并不是导致牙周组织破坏的唯一原因^[9], 宿主对菌斑生物膜的免疫炎症反应是导致牙周软硬组织破坏的主要原因^[10]。本实验检测了 *P. gingivalis* 活菌感染 PDLF 6 h 后, 促炎细胞因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和趋化因子 IL-8 的基因表达。当 *P. gingivalis* 活菌浓度达到 10^8 CFU/ml 和 10^7 CFU/ml 时, IL-6 和 IL-8 的 mRNA 相对表达量均升高, 差异有统计学意义。由于 *P. gingivalis* 脂多糖和 *P. gingivalis* 产生的硫化氢气体均可促进牙周膜细胞 IL-6、IL-8 的 mRNA 表达, 同时二者还能协同促进牙周膜细胞 IL-6、IL-8 的 mRNA 表达^[11], 故而推测本实验中 IL-6、IL-8 基因表达的升高可能是 *P. gingivalis* 活菌表面的毒力因子(如脂多糖) 及其产生的毒性产物(如硫化氢气体) 共同作用的结果。当 *P. gingivalis* 活菌浓度达到 10^9 CFU/ml 时, IL-1 β 、TNF- α 的 mRNA 表达升高, 差异有统计学意义。Kato et al^[12] 发现 *P. gingivalis* 脂多糖可促进牙周膜干细胞 IL-6、IL-8、IL-1 β 的产生。研究^[13] 表明利用 *P. gingivalis* 超声提取物作用肝癌细胞系 Hepa-1.6 6 h 后, 细胞的 TNF- α 的 mRNA 亦升高。 *P. gingivalis* 属口腔正常菌群, 达到一定的数量可成为致病优势菌。本实验结果亦提示炎症因子相对表达量的多少可能与 *P. gingivalis* 活菌的浓度有关。

本实验结果显示 *P. gingivalis* 活菌感染 PDLF 6 h 后, RANKL 的 mRNA 相对表达量虽有升高但差异无统计学意义, 而所有实验组 OPG 的 mRNA 相对表达量均降低, 差异有统计学意义。Scheres et al^[5] 以

图2 *P. gingivalis* 活菌感染 PDLF 6 h 后 IL-6、IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、RANKL、OPG 的 mRNA 表达A: IL-6 mRNA; B: IL-1 β mRNA; C: IL-8 mRNA; D: TNF- α mRNA; E: RANKL mRNA; F: OPG mRNA; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

10^8 CFU/ml 的 *P. gingivalis* 活菌攻击 PDLF 6 h 后, RANKL 的 mRNA 表达与对照组比较差异无统计学意义。RANKL/OPG 是一对与牙槽骨吸收和改建密切相关的细胞因子。RANKL 是破骨生成的关键因子,可与核因子 κ B 受体活化因子(receptor activator of NF- κ B, RANK) 结合,促进破骨细胞的分化、活化

和成熟。OPG 可作为诱骗受体与 RANKL 结合竞争性抑制 RANKL/RANK 信号系统,抑制破骨细胞的分化和活化并促进破骨细胞凋亡,是破骨细胞生成的负调节因子^[14]。由此推测 *P. gingivalis* 感染 6 h 内, PDLF 可通过下调 OPG 的基因表达参与骨代谢的调控。

综上所述, PDLF 可在 *P. gingivalis* 感染后产生一系列不同的细胞因子, 参与牙周组织的破坏与改建。PDLF 在牙周炎的炎性与骨代谢相关的细胞因子产生中具有重要的作用。但是 PDLF 产生这些细胞因子的具体机制, 如何调控其基因表达使其产生更有利于牙周组织修复与改建的细胞因子尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 张宇, 艾丽思, 林莉. 牙龈卟啉单胞菌菌体表面毒力因子及其致病性研究进展 [J]. 中国实用口腔科杂志, 2015, 8(1): 43-7.
- [2] 徐燕, 李頌, 程继光, 等. 人牙龈成纤维细胞和牙周膜成纤维细胞的培养和生物学特征 [J]. 口腔医学研究, 2002, 18(6): 375-7.
- [3] Sokos D, Everts V, de Vries T J. Role of periodontal ligament fibroblasts in osteoclastogenesis: a review [J]. *J Periodontol Res*, 2014, 50(2): 152-9.
- [4] Koizumi Y, Kurita-Ochiai T, Oguchi S, et al. Nasal immunization with *Porphyromonas gingivalis* outer membrane protein decreases *P. gingivalis*-induced atherosclerosis and inflammation in spontaneously hyperlipidemic mice [J]. *Infect Immun*, 2008, 76(7): 2958-65.
- [5] Scheres N, Laine M L, de Vries T J, et al. Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable *Porphyromonas gingivalis* [J]. *J Periodontol Res*, 2010, 45(2): 262-70.
- [6] Yee M, Kim A, Alpagot T, et al. *Porphyromonas gingivalis* stimulates IL-18 secretion in human monocytic THP-1 cells [J]. *Microbes Infect*, 2012, 14(9): 684-9.
- [7] 赵晶蕾, 江凌勇, 毛丽霞, 等. 人牙周膜干细胞成骨相诱导后相关基因的表达变化 [J]. 上海口腔医学, 2014, 23(4): 391-6.
- [8] 潘亚萍, 刘静波. 牙龈卟啉单胞菌研究进展 [J]. 国际口腔医学杂志, 2011, 38(2): 125-7.
- [9] Yamamoto T, Kita M, Oseko F, et al. Cytokine production in human periodontal ligament cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* [J]. *J Periodontol Res*, 2006, 41(6): 554-9.
- [10] Xu Y, Wei W. A comparative study of systemic subantimicrobial and topical treatment of minocycline in experimental periodontitis of rats [J]. *Arch Oral Biol*, 2006, 51(9): 794-803.
- [11] Chi X P, Ouyang X Y, Wang Y X. Hydrogen sulfide synergistically upregulates *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced expression of IL-6 and IL-8 via NF- κ B signalling in periodontal fibroblasts [J]. *Arch Oral Biol*, 2014, 59(9): 954-61.
- [12] Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, et al. *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells [J]. *Arch Oral Biol*, 2014, 59(2): 167-75.
- [13] Takano M, Sugano N, Mochizuki S, et al. Hepatocytes produce tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in response to *Porphyromonas gingivalis* [J]. *J Periodontol Res*, 2012, 47(1): 89-94.
- [14] 李鹏, 夏琳, 扈英伟, 等. 免疫反应在牙周病牙槽骨吸收中的作用 [J]. 北京口腔医学, 2013, 21(5): 295-7.

Effects of viable *Porphyromonas gingivalis* on the viability and gene expression of inflammatory cytokines and bone metabolism of periodontal ligament fibroblasts

Yang Yang, Xu Yan, Meng Mingli, et al

(Stomatologic College of Anhui Medical University, The Affiliated Stomatologic Hospital of Anhui Medical University, Key Lab. of Oral Diseases Research of Anhui Province Hefei 230032)

Abstract Objective To study the cell viability and gene expression of inflammatory cytokines and bone metabolism of periodontal ligament fibroblasts (PDLF) upon challenge by viable *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). **Methods** Human PDLF was challenged *in vitro* by viable *P. gingivalis* for 6 hours and then the cell viability and gene expression of inflammatory cytokines such as IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α , RANKL, OPG were analyzed. **Results** No obvious change in cell viability was observed before and after challenged by viable *P. gingivalis*. The expressions of both IL-6 and IL-8 were strongly induced when the concentration of viable *P. gingivalis* was 10⁸ CFU/ml and 10⁷ CFU/ml. The expression of IL-1 β and TNF- α also increased significantly when the concentration of viable *P. gingivalis* was 10⁹ CFU/ml. The expression of OPG was suppressed significantly by *P. gingivalis* in PDLF while the gene expression of RANKL remained unchanged. **Conclusion** When challenged by *P. gingivalis*, PDLF participates in the regeneration and remodeling of periodontal tissue by producing cytokines.

Key words *Porphyromonas gingivalis*; periodontal ligament fibroblasts; cytokines; osteoclast