

伴放线放线杆菌对2型糖尿病患者多形核白细胞分泌白细胞介素-6和凋亡的影响

郑义¹ 马宁¹ 胡小燕² 张莉³

(1. 吉林大学口腔医院 牙周病科, 长春 130021;
2. 山东大学医学院 生物化学研究所, 济南 250012;
3. 吉林大学口腔医院 急诊科, 长春 130021)

[摘要] 目的 研究2型糖尿病患者多形核白细胞(PMN)分泌功能和凋亡情况以及伴放线放线杆菌(*A.actinomycetem*)对其的影响。方法 Percoll不连续梯度离心法分离非糖尿病者和2型糖尿病患者外周血中的PMN, 实验组的PMN加入*A.actinomycetem*的超声滤液刺激, 对照组为PMN的PBS悬浮液。培养20、40、60 min后定量酶联免疫吸附试验(ELISA)检测其白细胞介素-6(IL-6)的分泌水平; 另外在培养6、12 h后使用流式细胞分析仪检测各组PMN的凋亡率。结果糖尿病患者的PMN无论是否受到*A.actinomycetem*超声滤液刺激, 在实验各个时段的IL-6分泌水平均高于非糖尿病患者, 且细胞凋亡率明显降低($P<0.001$)。结论 2型糖尿病患者的PMN具有过度炎症反应特征, 在受到牙周致病菌刺激后, 凋亡推迟, 分泌炎症介质, 从而造成严重的牙周组织破坏。

[关键词] 2型糖尿病; 多形核白细胞; 白细胞介素-6; 细胞凋亡

[中图分类号] R 781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.03.017

Effect of *Actinobacillus actinomycetem* on the secretion of interleukin-6 and apoptosis rate of polymorphonuclear leukocyte in type 2 diabetes patients ZHENG Yi¹, MA Ning¹, HU Xiao-yan², ZHANG Li³. (1. Dept. of Periodontology, Hospital of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Institute of Biochemistry, College of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China; 3. Dept. of Emergency, Hospital of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of *Actinobacillus actinomycetem*(*A.actinomycetem*) on the secretion and apoptosis rate of polymorphonuclear leukocytes(PMN) in type 2 diabetes patients. **Methods** Peripheral PMN from healthy and type 2 diabetes patients were isolated by Percoll gradient centrifugation. The PMN were stimulated with filtrate of ultrasonic pulverization from *A.actinomycetem* as the experiment group. As the control group, PMN suspension was incubated with PBS. The release of interleukin-6(IL-6) was measured at 20, 40, 60 min by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) technique. The apoptosis rate of PMN was tested at 6 and 12 hours by flow cytometry. **Results** Incubated with filtrate of ultrasonic pulverization from *A.actinomycetem*, the PMN of type 2 diabetes patients released significantly higher levels of IL-6 compared with the healthy subjects($P<0.001$). The apoptosis rate of PMN from the healthy subjects was higher than that from type 2 diabetes patients($P<0.001$). Regardless of body condition, interaction with filtrate of ultrasonic pulverization from *A.actinomycetem* could induce the secretion of IL-6 and reduce the apoptosis rate. **Conclusion** The PMN of type 2 diabetes patients may possess hyper-reactive inflammatory response trait.

[Key words] type 2 diabetes; polymorphonuclear leukocyte; interleukin-6; cell apoptosis

牙周炎是最常见的2种口腔疾病之一, 是中国成年人牙齿缺失的首位原因^[1]。同时, 牙周炎严重危害人们的全身健康, 与多种系统性疾病关系密切, 目前研究已证实了糖尿病与牙周炎之间存在双向关系^[2]。

多形核白细胞(polymorphonuclear leukocyte, PMN)是机体抗牙周致病菌的第一道防线, 具有吞噬作用, 能够在感染组织中迁移, 预防炎症扩散, 主要通过释放多种蛋白酶水解而发挥杀菌作用^[3]; 另一方面, PMN也是一把双刃剑, 在某些病理情况下, 也可损伤正常组织^[4]。有研究^[5]证明: 在某些机体状态中, PMN具有过度炎症反应特征, 在炎症组织中的寿命延长, 凋亡延迟, 释放高水平的炎性介质。

[收稿日期] 2010-07-20; [修回日期] 2011-01-10

[基金项目] 吉林省科技厅基金资助项目(20090437)

[作者简介] 郑义(1983—), 男, 山东人, 硕士

[通讯作者] 马宁, Tel: 0431-88796039

目前,对于糖尿病患者易发生较重牙周炎的机制研究尚不明确,有鉴于此,本实验比较2型糖尿病患者与非糖尿病者外周血中PMN的白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)分泌水平以及细胞凋亡率情况的差异,研究糖尿病患者的PMN是否具有过度炎症反应特征,从而探讨PMN与2型糖尿病牙周炎的关系。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

伴放线放线杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *A.actinomycetem*)Y4(b型;上海市口腔研究所), Percoll淋巴细胞分离液(GE Healthcare公司,瑞典), 人IL-6酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immune sorbent assay, ELISA)检测试剂盒(武汉博士德有限公司), Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒(凯基生物有限公司), 超净工作台(浙江赛因科学仪器有限公司), 倒置显微镜(Nikon公司,日本), 超声波粉碎机(上海金鹏分析仪器有限公司), 流式细胞分析仪(Becton Dickinson公司,美国), 高速低温离心机(Hemecus公司,德国), 酶标仪(上海精密仪器仪表)。

1.2 研究对象

选取患有2型糖尿病和非糖尿病患者各4例, 年龄38~55岁, 均知情同意。糖尿病患者均符合以下条件: 2型糖尿病诊断1年以上; 糖化血红蛋白>8%; 全身状况好; 近期糖尿病状况及用药无明显变化; 不吸烟。非糖尿病者要求全身健康, 无系统性疾病, 无吸烟史。2组均要求牙周状况良好, 牙龈无炎症及出血, 无牙周袋形成和附着丧失。

1.3 方法

1.3.1 *A.actinomycetem*的培养和超声滤液的制备 将*A.actinomycetem*冻干株活化培养, 利用密集划线法大量繁殖, 收集培养基表面的细菌, 并将其重新悬浮在少量无菌去离子水中进行超声粉碎, 超声功率60 W, 时间3 min。用0.45 μm滤膜过滤, 弃沉淀, 上清液冻干备用, -4℃保存。

1.3.2 PMN悬浮液的制备 取所有研究对象静脉血, 每人15 mL(每毫升血用20单位枸橼酸钠抗凝)。将同体积的75% Percoll和60% Percoll先后置于塑料试管中, 然后用毛细吸管吸取正常人抗凝全血, 体积比为2:2:1。水平离心机离心25 min, 转速1 700 r·min⁻¹。细胞分层后, 用毛细吸管轻轻插到第2层白膜, 吸出此层细胞, 移入另一试管中, pH7.2的PBS洗2次, 每次10 min转速1 000 r·min⁻¹。计数后, 将细胞悬于培养基中备用。

1.3.3 细菌超声滤液作用于PMN 将糖尿病患者与非糖尿病者的PMN悬液以每孔每毫升2×10⁶个分别加入

24孔细胞培养板, 每孔1 mL。实验组培养孔内加入*A.actinomycetem*超声粉碎滤液的冻干产物(质量浓度为100 μg·mL⁻¹), 对照组仅加入细胞培养液。各实验孔均设复孔, 5%CO₂、37℃孵育。

1.3.4 *A.actinomycetem*滤液作用于PMN IL-6含量的检测 于20、40、60 min取出各实验孔中的细胞上清液, 2 500 r·min⁻¹离心3 min。将待测样品用稀释液稀释后按分组加入酶标板空白微孔中, 每孔加100 μL。按照ELISA试剂盒说明书要求进行操作。所有标准品和样品的吸光度值减去空白显色孔吸光度值后, 以吸光度值为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 画出曲线。根据样品的吸光度值在坐标上找出对应质量浓度。

1.3.5 流式细胞仪检测PMN细胞凋亡率 实验组将*A.actinomycetem*超声滤液作用于PMN, 对照组为PMN的悬浮液, 5%CO₂、37℃孵育6、12 h。用不含EDTA的胰酶消化液收集细胞, PBS洗涤2次, 2 000 r·min⁻¹, 离心5 min。加入500 μL的Binding Buffer悬浮细胞。加入5 μL Annexin V-FITC混匀后再加5 μL Propidium Iodide, 室温, 避光反应10 min, 流式细胞分析仪检测。

1.4 统计学分析

所有数据用SAS 9.1统计软件进行分析。使用2×2析因实验设计方差分析实验组和对照组不同身体状态PMN分泌IL-6及细胞凋亡率的差异。

2 结果

2.1 不同身体状态PMN分泌IL-6的比较

在*A.actinomycetem*超声滤液的作用下实验组各时间段PMN的IL-6分泌量均明显高于对照组($P<0.001$)。对照组中, 糖尿病患者PMN分泌IL-6显著多于非糖尿病者($P<0.001$, 表1)。实验组中, 糖尿病患者和非糖尿病者PMN分泌IL-6量在各时间段均有显著差异($P<0.001$)。

表1 不同身体状态者PMN分泌IL-6的比较

Tab 1 Comparision of IL-6 from PMN in different human ng·mL⁻¹

分组	IL-6分泌量		
	20 min	40 min	60 min
对照组			
非糖尿病者	0.084±0.004	0.090±0.002	0.140±0.002
糖尿病患者	0.122±0.004 ^①	0.150±0.004 ^①	0.170±0.003 ^①
实验组			
非糖尿病者	0.167±0.006	0.236±0.057	0.262±0.003
糖尿病患者	0.327±0.012 ^{②③}	0.349±0.040 ^{②③}	0.478±0.011 ^{②③}

注: 1)与对照组非糖尿病PMN比较, $P<0.001$; 2)与实验组非糖尿病者PMN比较, $P<0.001$; 3)与对照组PMN比较, $P<0.001$ 。

2.2 不同身体状态PMN凋亡率的比较

对照组中糖尿病患者的PMN与非糖尿病者相比, 凋亡率明显下降($P<0.001$); 实验组中糖尿病患者和非糖尿病者的PMN的凋亡率存在差异($P<0.001$)。此外, 实验组与对照组相比, 各时间段的PMN的凋亡率均低于对照组($P<0.001$, 表2)。

表 2 不同身体状态者PMN凋亡率的比较

Tab 2 Comparision of apoptosis rate of PMN in different human %

分组	凋亡率	
	6 h	12 h
对照组		
非糖尿病者	3.6±0.22	4.1±0.28
糖尿病患者	2.4±0.29 ¹⁾	2.8±0.22 ¹⁾
实验组		
非糖尿病者	2.7±0.16	3.2±0.65
糖尿病患者	2.1±0.22 ^{2) 3)}	2.6±0.37 ^{2) 3)}

注: 1)与对照组非糖尿病PMN比较, $P<0.001$; 2)与实验组非糖尿病者PMN比较, $P<0.001$; 3)与对照组PMN比较, $P<0.001$ 。

3 讨论

随着生活方式的变化和老龄化的进程加速, 中国糖尿病的患病率正呈快速上升趋势。另一方面, 与年龄相关的牙周炎作为口腔常见病和多发病, 其发病率也逐渐增加, 这2种疾病都严重影响人类的健康水平。国内外的研究都已证实了这2种疾病之间相互影响, 互为高危因素^[6]。糖尿病可显著增加牙周炎的发病风险及严重程度, 主要表现为牙龈不易控制的反复肿胀、出血以及有多发性牙周肿胀、牙槽骨破坏、牙齿松动移位和脱落缺失^[7]。

*A.actinomycetem*是近年来牙周炎细菌病因学研究中的热点, 是一种公认的牙周致病菌, 特别是与侵袭性牙周炎密切相关^[8]。*A.actinomycetem*可以产生多种毒性因子, 其中白细胞毒素(leukotoxin, LTX)是其特有的一种毒性因子, LTX可损伤牙龈内外周血中的PMN及单核细胞的细胞膜, 导致溶酶体的释放, 加重牙周组织的损伤^[9]。本实验利用超声波将*A.actinomycetem*粉碎并过滤, 所得超声滤液中含有*A.actinomycetem*的大多数可溶性介质, 避免了菌体本身的不确定性与成分的单一, 同时使用细菌超声滤液可防止因细菌在实验期间扩增产生的干扰, 能更好地反映*A.actinomycetem*毒力因子的作用效果。

机体过度炎症和免疫反应是牙周组织破坏的主要原因。PMN是炎症反应的主要参与细胞, 在炎症牙周组织和龈沟液中数量巨大, 是牙周病病损区细胞因子的主要来源, 在牙周炎的发生、发展中起重要作用

用^[10]。此外, PMN与糖尿病的关系也非常密切, Ten-nenberg等^[11]发现糖尿病患者PMN在脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导下凋亡减少, 导致PMN功能性寿命下降和感染部位清除增加。Glowacka等^[12]证实了1型糖尿病及糖尿病前期患者PMN较正常者在LPS作用凋亡下降, 其细胞因子产物IL-8、IL-10增加。

IL-6作为白细胞介素家族的成员, 主要通过加重炎症反应、使牙周组织的修复能力减弱和破坏牙槽骨3个方面参与牙周炎的各种病理过程。大量研究^[13]表明: 病变牙周组织和牙周炎患牙的龈沟液中IL-6的水平都较高, 与牙周组织炎症和破坏过程有关。本实验中利用ELISA法检测实验组和对照组PMN分泌IL-6的量, 以观察2型糖尿病患者与非糖尿病者PMN不同反应。结果显示: 实验组与对照组中糖尿病患者和非糖尿病者PMN分泌IL-6量均有显著性差异($P<0.001$)。说明2型糖尿病患者外周血中PMN分泌IL-6的水平高于非糖尿病者, 提示2型糖尿病患者PMN存在过度炎症反应特征; 另外, 无论是否患有糖尿病, 在*A.actinomycetem*超声滤液的刺激下, 实验组PMN分泌IL-6的水平显著高于对照组, 提示在牙周致病菌作用下, PMN可分泌高水平的炎症介质损伤牙周组织。而由于2型糖尿病患者PMN具有过度炎症反应特征, 同时, 牙周致病菌又进一步刺激PMN分泌促炎症介质, 从而加重了牙周组织炎症破坏。

细胞凋亡实验的结果显示: 随着时间的增加, PMN的凋亡率逐渐增高, 各组的2型糖尿病患者PMN的凋亡率均低于非糖尿病者($P<0.001$); 在*A.actinomycetem*超声滤液的作用下, 实验组PMN的凋亡率低于对照组。结果提示: 高血糖环境下, PMN的凋亡率明显下降, 在受到牙周致病菌刺激后, PMN在2型糖尿病患者牙周组织中的寿命延长, 并释放高水平胞内炎症介质和毒性物质, 导致炎症的持续和牙周组织的过度损伤。

[参考文献]

- [1] 第三次全国口腔健康流行病学调查技术指导小组. 第三次全国口腔健康流行病学调查[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 15-20. Instructor of The Third Epidemiological Investigation of National Oral Health. The third epidemiological investigation of national oral health[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007: 15-20.
- [2] Kardeşler L, Buduneli N, Cetinkalp S, et al. Adipokines and inflammatory mediators after initial periodontal treatment in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis[J]. J Periodontol, 2010, 81(1): 24-33.
- [3] Iwata T, Kantarci A, Yagi M, et al. Ceruloplasmin induces poly-

态和活力,也在于上皮细胞的形态和对微生物的敏感性。本实验的研究表明:白假丝酵母菌的代谢产物对内皮细胞增殖有诱导作用,但其机制还有待于进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 陈晓,蒋文晖.念珠菌性白斑的研究概况[J].国外医学口腔医学分册,2004,31(2):138-143.
CHEN Xiao, JIANG Wen-hui. The research overview of *Candida* leukoplakia[J]. Foreign Medical Sciences(Stomatology), 2004, 31(2):138-143.
- [2] 魏昕,周学东,李秉琦,等.健康老年人口腔念珠菌与义齿修复的相关研究[J].华西口腔医学杂志,2006,24(1):39-41,47.
WEI Xin, ZHOU Xue-dong, LI Bing-qi, et al. Correlation of oral *Candida* spp. and denture-wearing in healthy elderly[J]. West China J Stomatol, 2006, 24(1):39-41, 47.
- [3] 陈方淳,林梅.口腔念珠菌病患者口内菌株的检出和药敏性观察[J].华西口腔医学杂志,2007,25(1):37-41.
CHEN Fang-chun, LIN Mei. Oral isolates of *Saccharomyces* in patients with oral fungal infection and their susceptibility to anti-fungal drugs[J]. West China J Stomatol, 2007, 25(1):37-41.
- [4] 李秉琦.口腔黏膜病学[M].北京:人民卫生出版社,2003:88-92.
LI Bing-qi. Oral mucosal diseases[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003:88-92.
- [5] 于世凤.口腔组织病理学[M].北京:人民卫生出版社,2003:194-197.

- YU Shi-feng. Oral histopathology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003:194-197.
- [6] Zhu W, Filler SG. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells[J]. Cell Microbiol, 2010, 12(3):273-282.
- [7] Silverman DJ, Bond SB. Infection of human vascular endothelial cells by *Rickettsia rickettsii*[J]. J Infect Dis, 1984, 149(2):201-206.
- [8] Taweekaisupapong S, Choopan T, Singhara S, et al. *In vitro* inhibitory effect of *Streblus asper* leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells[J]. J Ethnopharmacol, 2005, 96(1/2):221-226.
- [9] 孙立新.白色念珠菌病的发病机制[J].山东医药,2001,41(17):58-59.
SUN Li-xin. Pathogenesis of *Candida albicans*[J]. Shandong Pharmaceutical, 2001, 41(17):58-59.
- [10] 张凌,唐晓琳,王兆元,等.白色念珠菌对口腔上皮细胞细胞周期的影响[J].实用口腔医学杂志,2007,23(1):111-113.
ZHANG Ling, TANG Xiao-lin, WANG Zhao-yuan, et al. Effect of *Candida albicans* on cell cycle distribution of KB cells[J]. J Pract Stomatol, 2007, 23(1):111-113.
- [11] 高岩,刘鼎新.口腔念珠菌白斑的细胞增殖[J].中华口腔医学杂志,1993,28(1):35-37.
GAO Yan, LIU Ding-xin. Cell proliferation in oral *Candidiasis* leukoplakia[J]. Chin J Stomatol, 1993, 28(1):35-37.
- [12] Dalle F, Wächter B, L'Ollivier C, et al. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes[J]. Cell Microbiol, 2010, 12(2):248-271.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第288页)

- morphonuclear leukocyte priming in localized aggressive periodontitis[J]. J Periodontol, 2009, 80(8):1300-1306.
- [4] Guentsch A, Puklo M, Preshaw PM, et al. Neutrophils in chronic and aggressive periodontitis in interaction with *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*[J]. J Periodontol Res, 2009, 44(3):368-377.
- [5] Kantarci A, Oyaizu K, Van Dyke TE. Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: Findings from localized aggressive periodontitis[J]. J Periodontol, 2003, 74(1):66-75.
- [6] Iacopino AM, Cutler CW. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: Recent concepts involving serum lipids[J]. J Periodontol, 2000, 71(8):1375-1384.
- [7] Ezzo PJ, Cutler CW. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease[J]. Periodontol 2000, 2003, 32:24-35.
- [8] 张洁,张丁.糖尿病与口腔疾病的关系[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2008,2(9):1079-1085.
ZHANG Jie, ZHANG Ding. The relation between diabetes and oral disease[J/CD]. Chin J Clinicians: Electronic Edition, 2008, 2(9):1079-1085.
- [9] Claesson R, Johansson A, Belibasakis G, et al. Release and activation of matrix metalloproteinase 8 from human neutrophils triggered by the leukotoxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*[J]. J Periodontol Res, 2002, 37(5):353-359.

- [10] 欧阳玉玲,吴亚菲,赵蕾,等.不同fimA基因型牙龈卟啉单胞菌刺激中性粒细胞产生基质金属蛋白酶8和9的比较[J].华西口腔医学杂志,2009,27(2):206-209.
OUYANG Yu-ling, WU Ya-fei, ZHAO Lei, et al. Matrix metalloproteinase 8 and 9 regulations of polymorphonuclear leukocytes stimulated by *Porphyromonas gingivalis* with different fimA genotypes[J]. West China J Stomatol, 2009, 27(2):206-209.
- [11] Tennenberg SD, Finkenauer R, Dwivedi A. Absence of lipopolysaccharide-induced inhibition of neutrophil apoptosis in patients with diabetes[J]. Arch Surg, 1999, 134(11):1229-1233.
- [12] Glowacka E, Banasik M, Lewkowicz P, et al. The effect of LPS on neutrophils from patients with high risk of type 1 diabetes mellitus in relation to IL-8, IL-10 and IL-12 production and apoptosis *in vitro*[J]. Scand J Immunol, 2002, 55(2):210-217.
- [13] 宋娟,郑义,马宁,等.龈下刮治一次法与四分法治疗慢性牙周炎的疗效观察[J].口腔医学研究,2009,26(6):756-758.
SONG Juan, ZHENG Yi, MA Ning, et al. Clinical evaluation of one-stage full-mouth and conventional sub-gingival scaling treatment of chronic periodontitis[J]. J Oral Sci Res, 2009, 26(6):756-758.

(本文编辑 汤亚玲)