

[文章编号] 1000-1182(2010)06-0656-04

氧化苦参碱对内毒素作用下人牙周膜细胞 白细胞介素-6和白细胞介素-1 β mRNA表达的影响

吴赟¹ 陈凌¹ 骆凯² 闫福华²

(1.福建医科大学附属第一医院 口腔科, 福建 福州 350004;

2.福建医科大学附属口腔医院 牙周科, 福建 福州 350002)

[摘要] 目的 研究氧化苦参碱对内毒素(LPS)作用下人牙周膜细胞(PDLC)白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-1 β (IL-1 β) mRNA表达的影响, 探讨氧化苦参碱抑制LPS所造成的牙周炎症反应的机制。方法 体外分离及培养PDLC, 实验组分别为LPS和不同质量浓度的氧化苦参碱溶液的不同组合, 对照组为仅含1% FBS的DMEM培养液。采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测IL-6和IL-1 β mRNA的水平。结果 质量浓度为25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS能够有效地增强IL-6和IL-1 β mRNA水平的表达, 实验组高于对照组, 差异有统计学意义, 加入氧化苦参碱进行干预后实验组与对照组IL-6和IL-1 β mRNA的表达无显著差异。结论 氧化苦参碱可抑制LPS所造成的PDLC IL-6和IL-1 β mRNA表达。

[关键词] 氧化苦参碱; 内毒素; 牙周膜细胞; 炎症

[中图分类号] R 781.4 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.06.022

The effects of oxymatrine on expression of interleukin-6 and interleukin-1 β mRNA of human periodontal ligament cell stimulated by lipopolysaccharides WU Yun¹, CHEN Ling¹, LUO Kai², YAN FU-hua². (1. Dept. of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China; 2. Dept. of Periodontology, School of Stomatology, Fujian Medical University, Fuzhou 350002, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of oxymatrine on the expression of interleukin-6(IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) mRNA of human periodontal ligament cell(PDLC) stimulated by lipopolysaccharides(LPS), and to discuss oxymatrine's inhibition mechanism on periodontal inflammation stimulated by LPS. **Methods** Firstly, isolate PDLC externally and culture them; for oxymatrine experimental group we used different combination of LPS and oxymatrine in different concentration, and for the matched group we use DEME nutrient solutions of 1% FBS. Then reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) for checking the level of IL-6 and IL-1 β mRNA. **Results** 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS can significantly enhance the expression of both IL-6 and IL-1 β mRNA's level, and oxymatrine could restrain above phenomena. **Conclusion** Oxymatrine can restrain the expression of IL-6 and IL-1 β mRNA of human PDLC stimulated by LPS.

[Key words] oxymatrine; lipopolysaccharides; periodontal ligament cell; inflammation

宿主的炎症反应在牙周组织病变过程中发挥重要的作用, 龈沟液中许多炎症介质如白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等细胞因子是牙周炎发生时的重要炎症介质, 阻断炎症介质mRNA的表达对预防和治疗牙周病具有十分重要的意义。氧化苦参碱是从中

药苦参中提取的主要生物碱, 近年来对其药理和临床研究发现, 氧化苦参碱具有抗病毒、抗炎、抗肿瘤等多种药理作用。众多的相关研究成果表明氧化苦参碱可以抑制多种炎症介质的产生, 为进一步明确其相关机制, 本实验采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测内毒素(lipopolysaccharides, LPS)作用下, 人牙周膜细胞(periodontal ligament cell, PDLC)IL-6和IL-1 β mRNA的水平, 并采用氧化苦参碱作为拮抗, 从分子水平探讨其对LPS作用下人PDLC的影响, 以期氧化苦参碱在慢性牙周炎治疗中的应用

[收稿日期] 2010-01-05; [修回日期] 2010-02-21

[基金项目] 福建省科技厅青年人才基金资助项目(2006F3051); 福建医科大学附属口腔医院重点学科建设学术发展基金资助项目[闽医大口腔(2008)39号]

[作者简介] 吴赟(1979—), 女, 福建人, 主治医师, 硕士

[通讯作者] 骆凯, Tel: 0591-83736427

提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要实验试剂和实验仪器

氧化苦参碱(陕西惠科生物工程), DMEM培养液、胰蛋白酶、新生牛血清(Gibco公司, 美国), 牙龈卟啉菌单胞菌LPS(中国晶美生物工程公司), 逆转录试剂盒(Promega公司, 美国), CO₂孵箱(Heraeus公司, 德国), Hfsafe-1200超净工作台(上海力申科学仪器有限公司), 倒置相差显微镜及照相系统(Olympus公司, 日本), WD-9413B型凝胶成像分析系统(北京六一科学仪器厂), PCR扩增仪(Eppendorf公司, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 人PDLCL的体外培养 收集临床因正畸拔除的前磨牙, 要求无龋坏、无根尖尖周炎及无牙周疾病, 牙拔出后即放入装有无血清DMEM培养液的小瓶中, 在超净工作台内用含有抗生素(青霉素100 U·mL⁻¹, 链霉素100 μg·mL⁻¹)的PBS反复冲洗。刮取根中1/3牙周膜组织, 加入20%FBS的DMEM培养液4 mL, 在饱和湿度、5%CO₂、95%空气、37℃标准环境下静置孵育, 待原代人PDLCL细胞从组织块周围游出并铺满培养板底70%左右时, 消化传代, 取4~6代细胞用于实验, 实验前对细胞进行免疫组织化学角蛋白和波形丝蛋白染色, 鉴定细胞起源。

取生长良好的人PDLCL, 接种于6孔培养板, 每孔2 mL, 接种细胞密度为每毫升1×10⁵个, 孵育24 h贴壁后, 弃原培养液, PBS清洗2次加药, 每组设4个复孔。分组如下: A为LPS 25 μg·mL⁻¹加0 μg·mL⁻¹氧化苦参碱24 h刺激组; B为LPS 25 μg·mL⁻¹加10 μg·mL⁻¹氧化苦参碱24 h刺激组; C为空白对照组, 空白对照组仅含1% FBS的DMEM培养液。

1.2.2 人PDLCL RNA的提取 48 h后使用Trizol RNA提取液提取人PDLCL中的RNA。具体步骤如下(以下

步骤中的实验器材均用DEPC水处理过): 6孔板中的细胞用无菌PBS洗涤2遍; 每孔加入1 mL Trizol, 轻轻摇晃后, 室温静置5 min; 用吸样器将细胞从孔底吹散, 移入1.5 mL EP管中; 加入0.2 mL氯仿, 盖紧, 用手剧烈振摇15 s, 室温静置3 min; 4℃ 12 000 r·min⁻¹离心15 min; 小心吸取上清至1.5 mL EP管中, 加0.5 mL异丙醇, 混匀后室温静置10 min; 4℃ 12 000 r·min⁻¹离心10 min; 弃上清, 用吸样器吸除余下液体, 加入1 mL 75%乙醇, 盖紧轻弹; 4℃ 8 000 r·min⁻¹离心15 min, 弃上清, 室温干燥, RNA沉淀10 min, 加入50 μL H₂O溶解, -20℃保存; 取适量的RNA分别进行定量与琼脂糖凝胶电泳, 鉴定提取效果。

1.2.3 人PDLCL总cDNA的合成 将从人PDLCL中提取的总RNA, 通过逆转录合成cDNA, 使用的试剂盒为Promega逆转录试剂盒, 具体步骤如下: 将人PDLCL总RNA置于70℃温浴10 min, 在离心机上旋转数秒后立即置于冰上。RT反应体系如下: 总体积20 μL、MgCl₂(25 mmol·L⁻¹)4 μL、dNTP(10 mmol·L⁻¹)2 μL、RNA酶抑制剂0.5 μL、AMV 逆转录酶1 μL、Oligo(dT)₁₅引物1 μL、总RNA(143 μg·mL⁻¹)7.0 μL。混匀后, 42℃ 60 min, 95℃ 5 min, 置于冰上5 min。

1.2.4 IL-6与IL-1β编码序列的扩增 以人PDLCL总cDNA为模板, 进行IL-6与IL-1β编码序列扩增, PCR反应总体积为25 μL, 使用TAKALA probebest高保真扩增酶系。反应体系如下: 总体积25 μL、待扩增的模板(cDNA)2.0 μL、dNTP(2.5 μmol·L⁻¹)2.0 μL、上游引物(25 μmol·L⁻¹)0.3 μL、下游引物(25 μmol·L⁻¹)0.3 μL、Probebest DNA聚合酶(5 U·μL⁻¹)0.2 μL。混匀后, 94℃预变性5 min, 按下列参数: 94℃ 45 s, 58℃ 45 s, 72℃ 60 s, 共35个循环。最后1个循环结束后继续在72℃延伸6 min PCR扩增, RT-PCR引物序列、产物长度及退火温度见表1。

表1 RT-PCR引物序列、产物长度及退火温度

Tab 1 RT-PCR primer sequence, the length of the product and anneal temperature

引物	引物序列(5'-3')	产物长度/bp	退火温度/℃
β-actin	上游 CTACAATGAGCTGCGTGTGGC	271	可变
	下游 CAGGTCCAGACGCAGGATGCG		
IL-6	上游 ATGAACCTCTCTCCACAAGCGC	628	58
	下游 GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG		
IL-1β	上游 AGCTGACCCTAAACAGATGA	523	58
	下游 GATCTACACTCTCCAGCTGTAGC		

1.2.5 电泳 将PCR产物与上样缓冲液以5:1混合后, 在琼脂糖凝胶中, 电压90 V, 电泳30 min, 用凝胶图像分析仪自动分析成像, 以目的基因与β-actin的吸光度比值进行分析求得IL-6和IL-1β mRNA

相对含量。

1.3 统计学分析

用SPSS 11.0统计软件进行统计分析, 多组间的比较用方差分析。

2 结果

2.1 细胞培养和鉴定

体外培养14 d左右，人PDLC 即可从组织块中
游出，镜下观察可见细胞多为长梭形或纺锤形，胞
体丰满，胞浆均匀，核呈圆形或卵圆形(图1)。细
胞波形丝蛋白染色阳性(图2)，角蛋白染色阴性(图
3)，证明为中胚层组织来源。

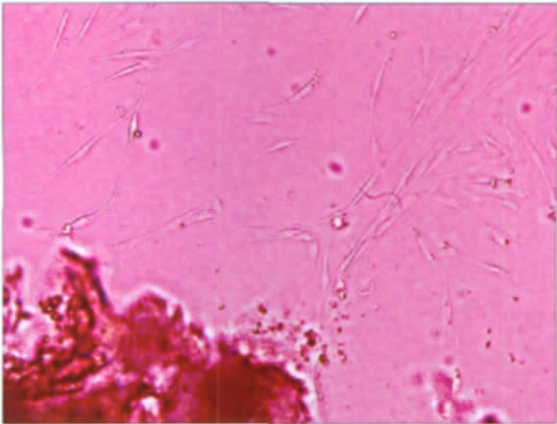


图 1 人PDLC原代培养 倒置相差显微镜 ×10
Fig 1 Human PDLC primary cultured inverted phase contrast
microscope ×10



图 2 波形丝蛋白染色 ABC ×200
Fig 2 Expression of waveform silk protein ABC ×200

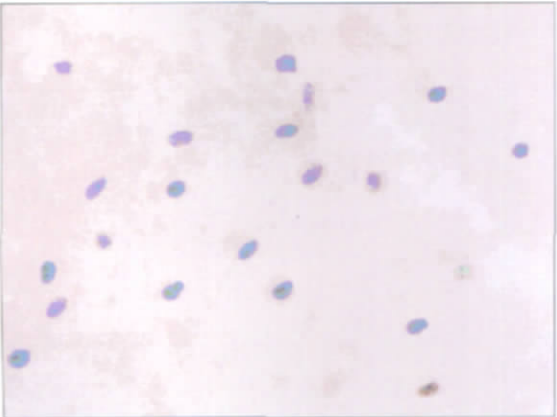
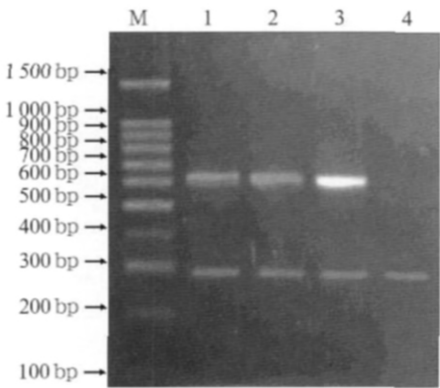


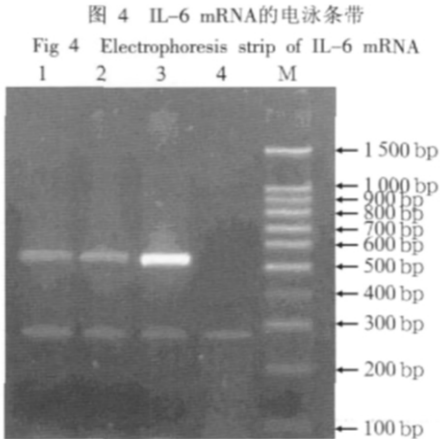
图 3 角蛋白染色 ABC ×200
Fig 3 Expression of keratin protein ABC ×200

2.2 电泳图谱

LPS激活的PDLC IL-6和 IL-1β mRNA的表达与
空白对照组相比明显增高，加入氧化苦参碱进行干
预后PDLC IL-6和IL-1β mRNA的表达明显下降，与
正常对照相比无明显差别(图4、5)。



M: Bio DL100 Marker; 1: 空白对照组; 2: LPS 25 μg·mL⁻¹
加10 μg·mL⁻¹氧化苦参碱24 h刺激组; 3: LPS 25 μg·mL⁻¹ 24 h刺激
组; 4: 阴性对照。



M: Bio DL100 Marker; 1: 空白对照组; 2: LPS 25 μg·mL⁻¹加
10 μg·mL⁻¹ 氧化苦参碱24 h刺激组; 3: LPS 25 μg·mL⁻¹ 24 h刺激组;
4: 阴性对照。

2.3 IL-6和IL-1β mRNA与β-actin吸光度比值

空白对照组与LPS 25 μg·mL⁻¹加10 μg·mL⁻¹氧化
苦参碱24 h刺激组比较无差异。空白对照组、LPS
25 μg·mL⁻¹加10 μg·mL⁻¹ 氧化苦参碱24 h刺激组与
LPS 25 μg·mL⁻¹ 24 h刺激组比较有差异(表2)。

表 2 IL-6和IL-1β mRNA与β-actin吸光度比值

Tab 2 The optical absorption ratio value of IL-6
and IL-1β mRNA compared to β-actin

组别	$\bar{x} \pm s$	
	IL-6	IL-1β
A	5.14±0.11 [△]	5.39±0.12 [△]
B	1.12±0.11*	1.34±0.15*
C	1.10±0.14	1.27±0.16

注：*与空白对照组相比， $P>0.05$ ；[△]与空白对照组相比， $P<0.05$ ；A组与B组相比， $P<0.05$ 。

3 讨论

与单核巨噬细胞一样,人牙周膜细胞在受到LPS刺激时也会分泌IL-1 β 、IL-6和IL-8等炎症因子^[1]。IL-6是一种多功能的细胞因子,在体内具有广泛的生物学效应,是构成机体细胞因子网络的重要成员,参与牙周炎、根尖周病变的发生和发展。Geivelis等^[2]研究了龈沟液中IL-6含量与牙周病临床指标之间的关系,结果表明,IL-6的含量与牙周袋深度有显著的相关性。IL-1 β 是炎症反应的重要介导因子,在牙槽骨吸收、结缔组织破坏等牙周炎症病理过程中起重要作用。在牙周病患者的龈沟液及牙周组织中存在大量的IL-1 β ,且其水平与牙周炎的活动性相关。牙周炎患者的血单核细胞在受到牙龈卟啉单胞菌LPS刺激时能比健康人产生更多的IL-1 β ^[3]。Hoenig等^[4]检测牙周炎患者牙龈组织中IL-1 β 含量,发现牙周炎组织中IL-1 β 的含量较高,而正常的牙龈组织中未能检测出IL-1 β ,且牙周病变部位的龈沟液中IL-1 β 含量也高于健康对照组。证实了IL-1 β 参与牙周组织的免疫应答、炎症反应及牙槽骨吸收。阻断IL-1 β 的过量产生,使其恢复细胞因子网络平衡,对阻断牙周炎症的发生与发展有十分重要的意义。

氧化苦参碱是有激素样作用而无激素副作用的强力抗炎药,可抑制炎症过程的各个阶段。苦参碱及氧化苦参碱等苦豆子生物碱对白三烯具有明显的抑制作用,并呈良好的量效关系。研究还发现苦参碱还可抑制大鼠肝脏枯否细胞,肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)和IL-6的分泌,大鼠足跖肿胀实验证明苦参碱能直接抑制致炎性损伤的酶-磷脂酶A2。苦参碱还可抑制TNF- α 、IL-1、IL-6等炎性因子介导的免疫性肝损伤。以往的大量研究证实了氧化苦参碱可以降低组织中TNF- α 、IL-1、IL-6等炎性因子的水平,而对其机制及发挥作用的具体途径的相关研究较少,本研究直接证实了氧化苦参碱可降低LPS诱导的IL-6和IL-1 β mRNA高水平的表达,导致相关蛋白质翻译的减少,阻断IL-6和IL-1 β 的过量产生,从而对牙周炎症的发生与发展产生一定的影响。

核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)体系主要涉及机体防御反应、组织损伤和应激、细胞

分化和凋亡以及肿瘤生长抑制过程的信息传递。在多数细胞类型, NF- κ B在胞浆与抑制性蛋白质结合形成无活性的复合物。当肿瘤坏死因子等作用于相应受体后,激活此系统,而脂多糖、病毒感染、活性氧中间体、双链RNA可直接激活NF- κ B。激活过程是通过磷酸化抑制性蛋白使其构象改变而从NF- κ B脱落,使得NF- κ B得以活化。活化的NF- κ B进入细胞核,与DNA接触,并启动或抑制有关基因的转录。Zheng等^[5]研究发现,氧化苦参碱可降低实验性结肠炎大鼠血清中的TNF- α 、IL-6的水平,同时炎症结肠黏膜内NF- κ B及细胞内黏附分子-1(inter-cellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达也相对减弱。氧化苦参碱拮抗LPS介导的人牙周膜细胞损伤,可能的途径是氧化苦参碱干预下已经被LPS激活的NF- κ B的表达相对减弱,而从基因转录水平抑制了其下方的有关IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子基因的转录表达,本实验显示的10 μ g \cdot mL⁻¹能明显降低LPS诱导IL-6和IL-1 β mRNA表达很可能是通过这个途径介导的,但尚需进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] 张凤秋, 吴织芬, 万玲, 等. 牙周优势菌内毒素对人牙周膜细胞分泌IL-6、TNF- α 的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2002, 12(10) 531-534.
ZHANG Feng-qiu, WU Zhi-fen, WAN Ling, et al. Production of IL-6 and TNF- α in PDL cells stimulated by lipopolysaccharides[J]. Chin J Conserv Dent, 2002, 12(10) 531-534.
- [2] Geivelis M, Turner DW, Pederson ED, et al. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease[J]. J Periodontol, 1993, 64(10) 980-983.
- [3] McFarlane CG, Reynolds JJ, Meikle MC. The release of interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with periodontitis[J]. J Periodontol Res, 1990, 25(4) 207-210.
- [4] Hoenig JF, Rordorf-Adam C, Siegmund C, et al. Measurement of interleukin 1 alpha and 1 beta(IL-1 alpha and IL-1 beta) in human cystic lesions of the jaw. Implications for the pathogenesis of radicular cysts[J]. Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol, 1991, 34(2) 67-72.
- [5] Zheng P, Niu FL, Liu WZ, et al. Anti-inflammatory mechanism of oxymatrine in dextran sulfate sodium-induced colitis of rats[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(31) 4912-4915.

(本文编辑 汤亚玲)