

[文章编号] 1000-1182(2010)04-0443-04

高迁移率族蛋白B1对牙周膜成纤维细胞 表达细胞因子影响的研究

孙钦峰¹ 徐岩² 宋晖¹ 扈英伟¹ 杨丕山¹

(1.山东大学口腔医院 牙周科, 山东 济南 250012; 2.济南市口腔医院东院 口腔内科, 山东 济南 250014)

[摘要] 目的 观察高迁移率族蛋白B1(HMGB1)对人牙周膜成纤维细胞表达白细胞介素-6(IL-6)、破骨细胞核因子 κ B受体活化因子(RANKL)、骨保护因子(OPG)的影响,初步探讨HMGB1在牙周疾病的作用。方法 采用原代组织块培养法,培养人牙周膜成纤维细胞,用第4~6代的细胞进行实验。分别用10、30、100 ng·mL⁻¹质量浓度的HMGB1孵育牙周膜成纤维细胞24 h后,RT-PCR检测IL-6、RANKL、OPG的mRNA表达;Western blot法检测RANKL、OPG的蛋白表达。均以0 ng·mL⁻¹质量浓度组为对照,所得数据用单因素方差分析处理。结果 HMGB1在10、30、100 ng·mL⁻¹质量浓度时,细胞中的RANKL/OPG mRNA的比值增高($P<0.05$),100 ng·mL⁻¹质量浓度时细胞中的IL-6 mRNA的表达量增高($P<0.05$)。Western blot检测结果显示10 ng·mL⁻¹质量浓度组的RANKL/OPG的比值有明显增高。结论 一定浓度的HMGB1可使牙周膜细胞中的RANKL/OPG比值增高,还会诱导炎症因子IL-6 mRNA表达上调。提示HMGB1可能会在牙周炎的发病以及炎症进展中发挥作用。

[关键词] 高迁移率族蛋白B1; 牙周膜成纤维细胞; 白细胞介素-6

[中图分类号] R 781 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.04.025

Effects of high mobility group box 1 in activating periodontal ligament fibroblasts to express cytokine SUN Qin-feng¹, XU Yan², SONG Hui¹, HU Ying-wei¹, YANG Pi-shan¹. (1. Dept. of Periodontology, School of Stomatology, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Dept. of Oral Medicine, East Branch of Jinan Stomatologic Hospital, Jinan 250014, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of high mobility group box 1(HMGB1) on the expression of interleukin 6(IL-6), receptor activator of nuclear factor- κ B ligand(RANKL) and osteoprotegerin(OPG) on periodontal ligament fibroblasts. **Methods** Human periodontal ligament fibroblasts were stimulated with HMGB1 at concentrations of 10, 30, and 100 ng·mL⁻¹ for 24 h. RT-PCR and Western blot analysis were performed to check mRNA and protein expression of IL-6, RANKL and OPG on the cells. **Results** The ratio of RANKL/OPG was increased at both mRNA and protein level after HMGB1 stimulation at 10, 30, 100 ng·mL⁻¹. Inflammatory cytokine IL-6 was up-regulated by HMGB1 at the concentration of 100 ng·mL⁻¹. **Conclusion** Increased ratio of RANKL/OPG and IL-6 on periodontal ligament fibroblasts suggests that HMGB1 might play a role in the pathogenesis and progression of periodontal disease.

[Key words] high mobility group box 1; periodontal ligament fibroblasts; interleukin-6

牙周病是一种慢性感染性疾病,炎症是造成牙周软硬组织破坏的最主要原因。一些炎症因子如白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6、IL-8以及前列腺素E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)等与

牙周病的发生发展有很大关联。近期发现^[1]高迁移率族蛋白B1(high mobility group box 1, HMGB1)是在炎症晚期发挥作用的一种重要炎症因子。无论是体内^[2]、体外^[3]实验,还是临床患者检测^[4],均可说明HMGB1在炎症免疫中发挥着重要的作用,尤为重要是HMGB1和其他多种炎性因子的相互正反馈调节,导致炎症过程的维持、延长及纵向恶化。目前已知HMGB1与心脏疾病^[5]、胰腺炎^[4]、早产儿^[2]、肿瘤^[3]等疾病有关。本研究拟观察HMGB1对人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblasts,

[收稿日期] 2009-09-25; [修回日期] 2009-12-29

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30772425);山东省科技攻关基金资助项目(2009GG10002052)

[作者简介] 孙钦峰(1967—),男,山东人,副教授,博士

[通讯作者] 杨丕山, Tel: 0531-88382368

hPDLF)分泌IL-6、破骨细胞核因子- κ B受体活化因子配基(receptor activator nuclear factor- κ B ligand, RANKL)、骨保护因子(osteoprotegerin, OPG)的影响,初步探讨HMGB1在牙周疾病中的作用。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

DMEM培养基、胰蛋白酶(Gibco公司,美国),MTT(Amresco公司,美国),HMGB1(Abcam公司,英国),波形丝蛋白抗体、细胞角蛋白抗体(武汉博士德生物工程有限公司),RNeasy Mini Kit(Qiagen公司,德国),SuperScriptTM Reverse Transcriptase(Invitrogen公司,美国),TaKaRa Ex Taq和DL 2000 DNA Marker(宝生物工程有限公司),Western blot及IP细胞裂解液、BCA蛋白质量浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究所);ECL Western blot分析系统(Amersham Biosciences公司,英国);兔抗人RANKL、OPG、 β -actin(Santa Cruz公司,美国);IXZ-ILL100型倒置显微镜(Olympus公司,日本),Multiskan MK₃型酶联免疫分光光度计(Thermo Lab-systems公司,芬兰),GDS-8000 System凝胶成像系统(UVP公司,美国)。

1.2 hPDLF培养与鉴定

收集临床因正畸拔除的健康前磨牙,刮下根中1/3部位的牙周膜组织,按组织块贴壁法,用含15%

胎牛血清的DMEM培养液在37℃、5%CO₂条件下培养。待细胞长满瓶底的70%~80%,按1:2传代。取第3代hPDLF,以含15%血清的DMEM溶液制备成密度为每毫升 1×10^4 个的细胞悬液,行细胞爬片,30 ml·L⁻¹过氧化氢液滴在爬片表面入37℃温箱孵育20 min,羊血清37℃温箱封闭30 min,分别滴加波形丝蛋白和角蛋白抗体一抗,DAB显色试剂盒显色,倒置显微镜下观察。

1.3 外源性HMGB1作用于hPDLF

将HMGB1用含0.5%胎牛血清的DMEM稀释成10、30、100 ng·mL⁻¹ 3个质量浓度实验组,以不加HMGB1的DMEM为对照组。取第4~6代的hPDLF,用胰蛋白酶消化后,以每毫升 1×10^5 个接种于24孔板中,每孔液量为1 mL。细胞在含10%FBS的DMEM培养液中孵育24 h后,在倒置显微镜下观察见大多数hPDLF贴壁并伸展后,弃去孔内液体及不贴壁细胞,将各质量浓度组的HMGB1分别加入培养板中,每组4孔,每孔0.5 mL。然后将24孔板放入37℃、5%CO₂的培养箱中继续培养24 h,后续实验用。

1.4 RT-PCR检测细胞因子RANKL、OPG、IL-6的mRNA的表达

1.4.1 引物设计 使用Primer5.0 软件分别设RANKL、OPG、IL-6和内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的引物序列(表1)。

表1 RANKL、OPG、IL-6的引物序列

Tab 1 Primers of RANKL, OPG, IL-6 for RT-PCR

基因	上游引物	下游引物	产物大小/bp
OPG	3'-GGCAACACAGCTCACAAGAA-5'	3'-GTGTCTTGTCGCCATTTT-5'	298
RANKL	3'-AAGGAGCTGTGCAAAAGGAA-5'	3'-ACTTGGGATTTTGATGCTGG-5'	383
IL-6	3'-AAAGAGGCACTGGCAGAAAA-5'	3'-CAGGGGTGTTATTGCATCT-5'	259
GAPDH	5'-GCTCTCCAGAATCTTACC-3'	5'-GTGTGCTGTTGAAGTCAG-3'	266

1.4.2 细胞内总RNA的提取和RT-PCR检测 根据RNeasy Mini Kit试剂说明书分别提取每孔牙周膜成纤维细胞的总RNA。用SuperScriptTM III Reverse Transcriptase进行逆转录,按照TaKaRa Ex Taq PCR试剂说明书进行cDNA的扩增。反应程序为94℃预变性5 min,94℃变性30 s,57℃退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环,最后72℃延伸7 min终止反应。

1.4.3 PCR产物的检测 PCR产物用2%水平琼脂糖凝胶电泳,80 V、20 min后,在GDS-8000 System凝胶成像系统中成像,用凝胶成像分析系统分析,得出积分光密度(integrated option density, IOD)值。

1.5 Western blot检测细胞中RANKL、OPG蛋白表达 将hPDLF接种于50 mL培养瓶中,与不同质量浓

度HMGB1共培养24 h,用Western blot及IP细胞裂解液裂解细胞,离心细胞裂解物并提取蛋白质($13\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1} \times 10\text{ min}$, 4℃),用BCA蛋白质量浓度测定试剂盒测定蛋白质量浓度后,每孔蛋白含量35 μ g,煮沸变性5 min,6%浓缩胶与12%分离胶分离蛋白,然后将蛋白质电转至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉封闭膜上的非特异性位点。首先孵育一抗(兔抗人RANKL和OPG),然后孵育二抗(羊抗兔IgG),抗体滴度从1:200到1:1 000。ECL发光,曝光5 min,最后显影。 β -actin作为上样量对照,其他步骤不变。

1.6 统计分析

运用SPSS 11软件包,采用单因素方差分析对各

组间的样本均数进行统计学分析。

2 结果

2.1 hPDLF来源鉴定

细胞形态呈梭形类似成纤维样细胞，细胞核呈圆形或椭圆形、较大，经免疫组织化学鉴定，所培养的细胞表现为抗波形丝蛋白阳性(图1)，抗角蛋白阴性(图2)，证明所培养的细胞是来源于中胚层的hPDLF细胞。



图 1 hPDLF抗波形丝蛋白免疫组织化学染色阳性 ABC × 100

Fig 1 Immunohistochemistry result of hPDLF showed anti-vimentin positive ABC × 100



图 2 hPDLF抗角蛋白免疫组织化学染色阴性 ABC × 100

Fig 2 Immunohistochemistry result of hPDLF showed anti-keratin negative ABC × 100

2.2 RT-PCR检测hPDLF中RANKL、OPG、IL-6的mRNA表达

4种质量浓度HMGB1刺激牙周膜成纤维细胞后，RT-PCR检测结果发现HMGB1在100 ng·mL⁻¹质量浓度时，促使牙周膜成纤维细胞中的IL-6 mRNA表达量显著增多($P<0.05$)。虽然在10、30、100 ng·mL⁻¹组时，RANKL与OPG的表达没有明显差异，但是两者的比值RANKL/OPG与对照组比较有显著差异($P<0.05$)(表2、图3)。

表 2 HMGB1刺激hPDLF细胞因子的mRNA检测($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Defection of HMGB1 activates hPDLF to produce cytokine($\bar{x}\pm s$)

项目	HMGB1质量浓度/ng·mL ⁻¹			
	0	10	30	100
RANKL	0.827±0.297	1.291±0.424	0.970±0.277	1.108±0.725
OPG	1.128±0.448	1.244±0.531	0.965±0.294	1.097±0.903
RANKL/OPG	0.768±0.067	1.053±0.256*	1.009±0.200*	1.017±0.188*
IL-6	0.500±0.209	0.783±0.304	0.963±0.433	2.089±0.730*

注：与0 ng·mL⁻¹组比较，* $P<0.05$ 。

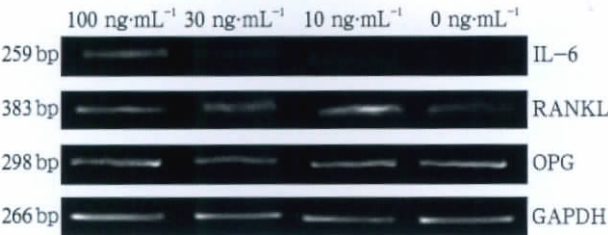


图 3 IL-6、RANKL、OPG的mRNA的RT-PCR电泳结果

Fig 3 Polyacrylamide gel electrophoresis of RT-PCR products for IL-6, RANKL and OPG

比有明显的差异，这也与RT-PCR结果一致。

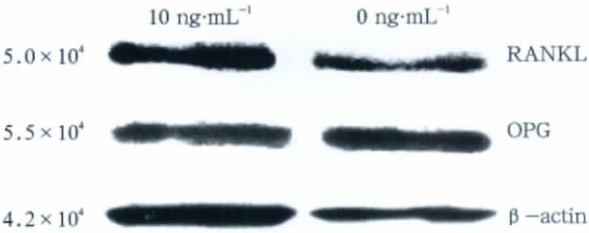


图 4 0 ng·mL⁻¹组和10 ng·mL⁻¹组RANKL、OPG蛋白的Western blot分析

Fig 4 Analysis of RANKL and OPG protein level between 0 ng·mL⁻¹ group and 10 ng·mL⁻¹ group by Western blot

2.3 Western blot检测hPDLF中RANKL、OPG蛋白的表达

Western blot检测不同质量浓度HMGB1对hPDLF刺激后的RANKL、OPG蛋白的表达结果如图4。在24 h时，10 ng·mL⁻¹组RANKL/OPG之比与对照组相

3 讨论

HMGB1是存在于真核细胞内的一类丰富的非组蛋白染色体结合蛋白，以往的研究主要集中于核内

HMGB1的生物学功能研究。近年来研究发现胞内HMGB1可通过活化细胞的主动分泌,如活化的单核/巨噬细胞和坏死或受损细胞的被动释放进入胞外,与细胞表面晚期糖基化终末产物受体等结合后引发信号转导,诱导其他炎症介质的产生,如TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-15、IL-8等的进一步释放^[6]。而其他炎症因子的产生又会导致更多的HMGB1的释放,如此,炎症反应被增强扩大。Morimoto等^[7]首次通过免疫组化和免疫荧光技术,检测了慢性牙周炎患者牙龈组织中HMGB1的表达以及通过Western blot方法检测了患者龈沟液中HMGB1蛋白的表达,结果显示HMGB1在牙龈上皮细胞的胞质和胞核中都有高表达;通过TNF- α 的刺激,患者龈沟液中HMGB1的量显著增高。表明HMGB1在牙周病的进展中具有重要作用。Palumbo等^[8]认为, HMGB1作为组织损伤信号,在低浓度下可诱导干细胞向损伤部位迁移并增殖,有利于清除外来侵害和组织坏死后的修复,但在较高浓度时可引起病理损伤。

IL-6是来源广泛的多功能细胞因子,在体内具有广泛的生物学效应,其多项功能可能与牙周炎的发生发展有关^[9],如IL-6可以促进牙槽骨的吸收,抑制成骨形成;降低成纤维细胞的附着力,影响牙周膜的修复和代谢功能;参与牙周炎的炎症反应等。Yang等^[10]研究得出,在低血清培养基环境中,重组的HMGB1可以促进骨髓基质干细胞释放IL-6。本实验证实,用不同质量浓度HMGB1孵育牙周膜成纤维细胞24 h后,牙周膜成纤维细胞中IL-6 mRNA在100 ng·mL⁻¹组表达有明显增加,提示HMGB1在一定质量浓度下,可以促进牙周膜成纤维细胞释放IL-6。表明HMGB1可以通过促进牙周膜成纤维细胞产生炎症因子IL-6,促进牙周病的发展以及牙槽骨的吸收,继而加重牙周病的病情。Johnson等^[11]的研究亦表明,牙周炎患者炎症部位的IL-6水平明显增高,并且炎症程度与IL-6在组织中的表达成正比。

RANKL、RANK以及诱饵受体OPG是近年来骨吸收机制研究中调节破骨细胞分化成熟和骨吸收功能的关键因子,三者共同参与调节破骨细胞的分化和功能的发挥。在体内骨吸收和骨形成的平衡关系中,RANKL/OPG比率是一个重要的杠杆^[12]。在慢性牙周炎患者牙龈组织中,RANKL的浓度在患病位点升高,而OPG的表达比正常人群要低。RANKL/OPG之比的下降可能是牙周炎进展的一个危险因素。本实验结果发现,24 h组牙周膜成纤维细胞中RANKL mRNA和OPG mRNA的表达在各组间虽然没有明显

差异,但是在各实验组中RANKL/OPG的比值显著增大($P<0.05$);同时,Western blot检查亦发现10 ng·mL⁻¹组RANKL/OPG与对照组相比有明显的差异,这表明HMGB1可以加大牙周膜成纤维细胞RANKL/OPG的比值,有助于破骨细胞生成,促进牙槽骨的破坏吸收。同时,根据实验结果可以推测:HMGB1有可能通过RANKL/RANK/OPG轴参与牙周骨组织的改建和破骨细胞的分化作用。

【参考文献】

- [1] Chen G, Ward MF, Sama AE, et al. Extracellular HMGB1 as a proinflammatory cytokine[J]. J Interferon Cytokine Res, 2004, 24(6) 329-333.
- [2] Buhimschi CS, Baumbusch MA, Dulay AT, et al. Characterization of RAGE, HMGB1, and S100beta in inflammation-induced preterm birth and fetal tissue injury[J]. Am J Pathol, 2009, 175(3) 958-975.
- [3] Bassi R, Giussani P, Anelli V, et al. HMGB1 as an autocrine stimulus in human T98G glioblastoma cells: Role in cell growth and migration[J]. J Neurooncol, 2008, 87(1) 23-33.
- [4] Kocsis AK, Szabolcs A, Hofner P, et al. Plasma concentrations of high-mobility group box protein 1, soluble receptor for advanced glycation end-products and circulating DNA in patients with acute pancreatitis[J]. Pancreatology, 2009, 9(4) 383-391.
- [5] Andrassy M, Volz HC, Iqwe JC, et al. High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart[J]. Circulation, 2008, 117(25) 3216-3226.
- [6] Andersson U, Wang H, Palmblad K, et al. High mobility group 1 protein(HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes[J]. J Exp Med, 2000, 192(4) 565-570.
- [7] Morimoto Y, Kawahara KI, Tanchaoren S, et al. Tumor necrosis factor- α stimulates gingival epithelial cells to release high mobility-group box 1[J]. J Periodontal Res, 2008, 43(1) 76-83.
- [8] Palumbo R, Sampaulesi M, De Marchis F, et al. Extracellular HMGB1 a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation[J]. J Cell Biol, 2004, 164(3) 441-449.
- [9] Baker PJ, Dixon M, Evans RT, et al. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice[J]. Infect Immun, 1999, 67(6) 2804-2809.
- [10] Yang J, Shah R, Robling AG, et al. HMGB1 is a bone-active cytokine[J]. J Cell Physiol, 2008, 214(3) 730-739.
- [11] Johnson RB, Serio FG, Dai X. Vascular endothelial growth factors and progression of periodontal diseases[J]. J Periodontol, 1999, 70(8) 849-852.
- [12] Kostenuik PJ. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength[J]. Curr Opin Pharmacol, 2005, 5(6) 618-625.

(本文编辑 汤亚玲)