

[文章编号] 1000-1182(2010)02-0135-04

牙髓卟啉单胞菌内毒素诱导成骨细胞 表达炎症因子的信号通路研究

杨谛¹ 仇丽鸿¹ 李任¹ 李子木¹ 李琛²

(1.中国医科大学口腔医院 牙体牙髓科;

2.中国医科大学口腔医学院 中心实验室, 辽宁 沈阳 110002)

[摘要] 目的 检测细胞外信号调节激酶(ERK)1/2和p38丝裂原活化蛋白激酶抑制剂对牙髓卟啉单胞菌内毒素(LPS)诱导成骨细胞白细胞介素(IL)-1 β mRNA和IL-6 mRNA的影响,探讨根尖周病变牙槽骨吸收的可能病理机制。方法 成骨细胞MG-63经PD98059和SB203580预处理1 h后,加入牙髓卟啉单胞菌LPS作用6 h,应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测IL-1 β mRNA和IL-6 mRNA的表达水平。结果 PD98059预处理后,牙髓卟啉单胞菌LPS诱导MG-63表达IL-1 β mRNA的水平下降。SB203580预处理后,牙髓卟啉单胞菌LPS诱导MG-63表达IL-1 β mRNA和IL-6 mRNA水平均下降。结论 牙髓卟啉单胞菌LPS诱导MG-63细胞表达IL-1 β mRNA依赖ERK1/2和p38MAPK信号转导通路,表达IL-6 mRNA依赖p38MAPK信号转导通路。

[关键词] 牙髓卟啉单胞菌; 内毒素; 成骨细胞; 细胞外信号调节激酶1/2; p38丝裂原活化蛋白激酶

[中图分类号] R 780.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.02.006

Study of signal transduction pathway in the expression of inflammatory factors stimulated by lipopolysaccharides from *Porphyromonas endodontalis* in osteoblasts YANG Di¹, QIU Li-hong¹, LI Ren¹, LI Zi-mu¹, LI Chen². (1. Dept. of Endodontics, School of Stomatology, China Medical University, Shenyang 110002, China; 2. Central Laboratory, School of Stomatology, China Medical University, Shenyang 110002, China)

[Abstract] **Objective** To quantify the interleukin(IL)-1 β mRNA and IL-6 mRNA expression induced by lipopolysaccharides(LPS) extracted from *Porphyromonas endodontalis* (*P.endodontalis*) in osteoblasts, and to relate *P.endodontalis* LPS to the bone resorptive pathogenesis in the lesions of chronic apical periodontitis. **Methods** MG63 cells was pretreated with PD98059 or SB203580 for 1 h and then treated with *P.endodontalis* LPS for 6 h. The expression of IL-1 β mRNA and IL-6 mRNA were detected by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) technique. **Results** The production of IL-1 β mRNA induced by *P.endodontalis* LPS decreased in osteoblasts pretreated with PD98059. Both of the production of IL-1 β mRNA and IL-6 mRNA induced by *P.endodontalis* LPS decreased in osteoblasts pretreated with SB203580. **Conclusion** The synthesis of IL-1 β mRNA stimulated by *P.endodontalis* LPS in MG63 probably occur via extracellular signal-regulated kinase(ERK) 1/2 and p38 mitogen activated protein kinase(MAPK) signal transduction system. The synthesis of IL-6 mRNA stimulated by *P.endodontalis* LPS in MG63 probably occur via p38MAPK signal transduction system.

[Key words] *Porphyromonas endodontalis*; lipopolysaccharides; osteoblasts; extracellular signal-regulated kinase 1/2; p38 mitogen activated protein kinase

感染根管是厌氧菌为主的混合感染,其中牙髓卟啉单胞菌(*Porphyromonas endodontalis*, *P.endodontalis*)几乎只在感染根管内出现,且检出率较高,被认为是牙髓感染的特有病原菌^[1]。牙髓卟啉单胞菌

是革兰阴性菌,其细胞壁外膜的内毒素(lipopolysaccharides, LPS)是主要的毒力因子。前期实验表明,牙髓卟啉单胞菌LPS以剂量和时间依赖方式诱导成骨细胞表达白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 和IL-6^[2],但其具体机制尚不清楚。本实验将检测抑制剂对牙髓卟啉单胞菌LPS诱导成骨细胞表达IL-1 β mRNA和IL-6 mRNA的影响。

[收稿日期] 2009-06-03; [修回日期] 2009-12-15

[基金项目] 辽宁省高等学校科研计划基金资助项目(2008819)

[作者简介] 杨谛(1983—),女,内蒙古人,硕士

[通讯作者] 仇丽鸿, Tel: 024-22891701

1 材料和方法

1.1 材料

牙髓卟啉单胞菌国际标准株ATCC35406(首都医科大学附属北京口腔医院口腔医学研究所), 人骨肉瘤细胞系MG63(中国细胞库典藏细胞中心), 脑心浸液(brain heart infusion, BHI)培养基(BD公司, 美国), RNAiso Plus及逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂(Takara公司, 日本), 细胞外信号调节激酶(extra-cellular signal-regulated kinase, ERK)1/2抑制剂PD98059(Cell Signaling公司, 美国), p38丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)抑制剂SB203580(Promega公司, 美国)。

1.2 牙髓卟啉单胞菌的培养

冻干保存的牙髓卟啉单胞菌在37℃厌氧箱(80% N₂、10%CO₂、10%H₂)中复苏培养, 培养基为添加5%脱纤维羊血、5 μg·mL⁻¹氯化血红素、1 μg·mL⁻¹维生素K的BHI琼脂培养基, 复苏培养72 h, 革兰染色及生化鉴定为纯培养物, BHI液体培养基增菌48 h, 3 500 r·min⁻¹离心15 min收集细菌, 4倍体积的生理盐水和无热原水各洗涤1次, -20℃保存备用。

1.3 牙髓卟啉单胞菌LPS的提取和定性分析

采用热酚水方法^[2-3]提取牙髓卟啉单胞菌LPS。采用凝胶鲎试剂方法对所提取的内毒素进行定性分析, 操作步骤依据鲎试剂说明书进行。本实验提取的LPS的最小凝集鲎试剂浓度为10 ng·mL⁻¹。

1.4 成骨细胞MG-63的培养

成骨细胞MG-63生长于含10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素和100 U·mL⁻¹链霉素的RPMI1640培养基中, 置于含5%CO₂、37℃、饱和湿度的培养箱中培养。

1.5 实验分组

实验将同一代、生长状态相同的细胞分为4组。阴性对照组为不加任何刺激的正常细胞。根据前期实验结果^[2], 阳性对照组为10 μg·mL⁻¹的牙髓卟啉单胞菌LPS作用于细胞6 h。抑制剂与LPS联合作用组分别用10 μmol·L⁻¹ PD98059和10 μmol·L⁻¹ SB203580预处理细胞1 h, 加入终浓度为10 μg·mL⁻¹的牙髓卟啉单胞菌LPS, 继续培养6 h。抑制剂单独处理组为10 μmol·L⁻¹ PD98059和10 μmol·L⁻¹ SB203580分别处理细胞7 h。同一时间点收集各组细胞, -80℃保存。实验重复3次。

1.6 RT-PCR法检测IL-1β mRNA和IL-6 mRNA表达

按照RNAiso Plus试剂说明书提取各组细胞的总RNA, 逆转录反应合成第一链cDNA, PCR反应扩增

各组细胞表达的IL-1β mRNA和IL-6 mRNA, 以β-actin作为内参。IL-1β上游引物序列为: 5'-AAAC-AGATGAAGTGTCTCCTTCCAGG-3', 下游引物序列为: 5'-TGGAGAACACCACTTGTGCTCCA-3', 产物大小为391 bp。IL-6上游引物序列为: 5'-CATC-CTCGACGGCATCTCAGC-3', 下游引物序列为: 5'-TTGGGTCAGGGGTGGTTATTG-3', 产物大小为332 bp。β-actin上游引物序列为: 5'-CAGAGCAA-GAGAGGCATCC-3', 下游引物序列为: 5'-CTG-GGGTGTGAAGGTCTC-3', 产物大小为217 bp。反应条件为: 94℃预变性3 min, 94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 60 s, 共35个循环, 72℃ 10 min延伸终止反应。PCR产物与Gene Finder以5:1体积比混合后, 在2%琼脂糖凝胶中进行电泳, 凝胶成像处理系统得到目的基因和β-actin的平均灰度值。

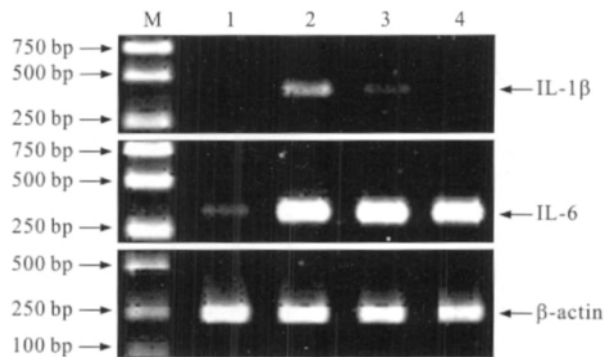
1.7 统计学分析

所有实验数据应用SPSS 11.0软件包建立数据库, 行单因素方差分析和SNK-q检验。

2 结果

2.1 PD98059对牙髓卟啉单胞菌LPS诱导MG-63细胞表达IL-1β mRNA和IL-6 mRNA的影响

10 μmol·L⁻¹ PD98059预处理后, 与未加抑制剂组比较, 牙髓卟啉单胞菌LPS诱导IL-1β mRNA的表达水平降低($P<0.01$), IL-6 mRNA的表达水平无明显变化($P>0.05$), 且PD98059单独处理组促进IL-6 mRNA的表达增加(图1)。



M: Marker; 1: 阴性对照组; 2: 阳性对照组; 3: PD98059与LPS联合作用组; 4: PD98059单独处理组。

图1 牙髓卟啉单胞菌LPS诱导PD98059预处理的MG-63细胞表达IL-1β mRNA和IL-6 mRNA

Fig 1 Expression of IL-1β mRNA and IL-6 mRNA in PD98059-pretreated MG-63 induced by *P. endodontalis* LPS

2.2 SB203580对牙髓卟啉单胞菌LPS诱导MG-63细胞表达IL-1β mRNA和IL-6 mRNA的影响

10 μmol·L⁻¹ SB203580预处理后, 与未加抑制剂组比较, 牙髓卟啉单胞菌LPS诱导IL-1β mRNA和IL-6 mRNA的表达均受到抑制($P<0.01$)(图2)。

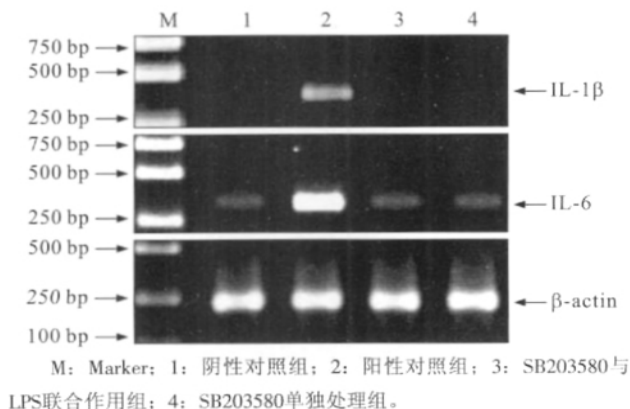


图2 牙髓卟啉单胞菌LPS诱导SB203580预处理的MG-63细胞表达IL-1 β mRNA和IL-6 mRNA

Fig 2 Expression of IL-1 β mRNA and IL-6 mRNA in SB203580-pretreated MG-63 induced by *P.endodontalis* LPS

3 讨论

根尖周病变的骨组织吸收和炎症细胞浸润与多种细胞因子的产生有关。IL-1 β 和IL-6是主要的前炎症因子，具有较强的致炎作用，直接或间接参与破骨细胞的骨吸收，在根尖病变组织中，检测出高度表达的IL-1 β 和IL-6^[4-5]。在成骨细胞和破骨细胞的表面均存在着IL-6受体，牙髓卟啉单胞菌LPS刺激成骨细胞产生IL-6，一方面可以反过来刺激成骨细胞本身继续产生其他炎症因子；另一方面，可以作用于根尖周组织中的破骨细胞前体细胞，加速破骨细胞的分化和骨组织吸收。IL-6也可以直接与破骨细胞表面的特异性受体结合，激活受体本身的酪氨酸蛋白激酶，并依赖此激酶的活性完成信号的跨膜传递，使细胞内靶蛋白酪氨酸残基磷酸化，从而引起破骨细胞反应^[6-7]。牙髓卟啉单胞菌LPS刺激成骨细胞产生的IL-1 β 可以通过调节黏附分子、免疫球蛋白FC受体、一氧化氮的合成以及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的产生促进结缔组织、成纤维细胞的激活，还可以通过激活单核巨噬细胞释放炎症因子的产生，相互间协同作用共同刺激根尖周病变中炎症反应和骨吸收的发生。

在成骨细胞膜表面存在着CD14^[8]，LPS介导细胞激活首先需要与细胞膜上的LPS结合蛋白和CD14相结合，其中LPS结合蛋白负责将LPS转运到细胞膜上与CD14结合，CD14与LPS及LPS结合蛋白形成三联复合物，三联复合物与作为LPS低亲和力的Toll样受体4结合，从而形成具备高亲和力结合和信号转导功能的受体复合体，通过信号通路的逐级传递，将信号转导至细胞核内^[9]。MAPK是真核细胞内一组非常保守的丝/苏氨酸蛋白激酶，在上游双特异性激酶的作用下，由氨基酸序列的苏氨酸、酪氨酸位点发

生磷酸化而激活。经典的MAPK级联由MAPK激酶激酶、MAPK激酶和MAPK组成。它们通过蛋白磷酸化反应顺序激活，通过其主要底物核转录因子磷酸化并与特异DNA序列结合从而启动转录过程，将细胞外刺激信号传导至核内。目前，MAPK家族有5大成员，分别为ERK1/2、c-Jun氨基末端激酶/应激激活蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK)、p38MAPK、ERK5/大分子MAPK 1(big mitogen activated protein kinase 1, BMK1)和ERK3/4等。这些不同的激酶受不同的上游激酶调节，并介导不同的细胞反应，其中MAPK的激酶1(mitogen activated protein kinase kinase 1, MEK1)、MEK2分别激活ERK1和ERK2，MEK3和MEK6激活p38MAPK^[10]。信号通路的存在一定程度上赋予了生物反应的独特性，也给LPS诱导炎症反应的药物治疗提供可供选择的靶位，阻断病理性信号的传入，减轻机体病理学反应是信号阻断治疗的根本目的。

PD98059和SB203580分别是ERK1/2和p38MAPK通路的专一性抑制剂，利用抑制剂特异性的阻断来确定信号通路的依赖与否，是目前该领域普遍采用的研究方法。本实验结果表明SB203580和PD98059对牙髓卟啉单胞菌LPS诱导MG-63细胞表达IL-1 β mRNA均有抑制作用，但只有SB203580能够抑制IL-6 mRNA的表达。PD98059本身能够诱导MG-63细胞表达IL-6 mRNA，对于这一现象尚未有科学的解释。PD98059除了抑制剂的作用外，其本身是否也是成骨细胞表达IL-6 mRNA的一个促进因子还需进一步研究。Kondo等^[11]研究表明SB203580和PD98059均能够抑制大肠杆菌内毒素诱导成骨细胞表达IL-6，且SB203580的抑制作用强于PD98059。这也证明了Darveau等^[12]的观点，即不同菌种之间，内毒素的主要毒力成分脂肪酸酰基的构成存在差异，从而导致宿主细胞反应的不同，依赖的信号转导通路也不同。MAPK的底物多为核转录因子，有关对MAPK的作用将直接影响相关物质mRNA的转录，从而为从基因水平控制LPS诱导的炎症反应提供了新的途径。

由于来源于不同菌种的LPS与LPS结合蛋白和CD14的结合力存在差异，从而引起宿主的炎症反应程度也不同^[13]。牙髓卟啉单胞菌是牙髓根尖周病的主要致病菌，应用牙髓卟啉单胞菌LPS探讨根尖周病骨吸收的病理机制，可以为根尖周病的治疗提供科学的理论和实验依据。

【参考文献】

- [1] 谭红, 汤亚玲, 周学东, 等. 黄芩对牙髓卟啉单胞菌生长、形态影响的体外实验[J]. 四川大学学报: 医学版, 2003, 34(3): 504-

- 506.
- TAN Hong, TANG Ya-ling, ZHOU Xue-dong, et al. Effect of Radix Scutellariae on the growth and form of *Porphyromonas endodontalis* in vitro[J]. J Sichuan University : Medical Sciences, 2003, 34(3) :504-506.
- [2] 杨谛, 李任, 仇丽鸿, 等. 牙髓卟啉单胞菌内毒素对成骨细胞表达IL-1 β mRNA和IL-6 mRNA的影响[J]. 上海口腔医学, 2009, 18(2) :194-197.
- YANG Di, LI Ren, QIU Li-hong, et al. Effects of lipopolysaccharides extracted from *Porphyromonas endodontalis* on the expression of IL-1 β mRNA and IL-6 mRNA in osteoblasts[J]. Shanghai J Stomatol, 2009, 18(2) :194-197.
- [3] 严杰, 方平楚. 幽门螺杆菌脂多糖生物学活性的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1994, 14(3) :196-198.
- YAN Jie, FANG Ping-chu. Research on biological activities of the lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori*[J]. Chin J Microbiology Immunology, 1994, 14(3) :196-198.
- [4] 杨文东, 李志新, 高学军. IL-1 β mRNA和TNF- α mRNA在慢性根尖周病损组织中的表达[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2007, 17(4) :187-191.
- YANG Wen-dong, LI Zhi-xin, GAO Xue-jun. Expression of IL-1 β mRNA and TNF- α mRNA in apical periodontitis[J]. Chin J Conserv Dent, 2007, 17(4) :187-191.
- [5] Danin J, Linder L, Lundqvist G, et al. Cytokines in periradicular lesions : The effect of linezolid treatment[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2003, 96(4) :492-498.
- [6] 章捍东, 刘洪臣. 白细胞介素-6与牙周组织的改建[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2005, 15(6) :354-357.
- ZHANG Han-dong, LIU Hong-chen. Relationship between interleukin-6 and periodontium remodeling[J]. Chin J Conserv Dent, 2005, 15(6) :354-357.
- [7] 赵秀敏, 艾红军, 常新. 成骨细胞和破骨细胞的传导通路和相关因子[J]. 中国实用口腔科杂志, 2009, 2(3) :176-179.
- ZHAO Xiu-min, AI Hong-jun, CHANG Xin. The transduction pathway of osteoblasts and osteoclasts and related factors[J]. Chin J Pract Stomatol, 2009, 2(3) :176-179.
- [8] Amano S, Kawakami K, Iwahashi H, et al. Functional role of endogenous CD14 in lipopolysaccharide-stimulated bone resorption[J]. J Cell Physiol, 1997, 173(3) :301-309.
- [9] 杨一新, 李桂源. LPS所介导的信号转导通路研究进展[J]. 中南大学学报 : 医学版, 2006, 31(1) :141-145.
- YANG Yi-xin, LI Gui-yuan. Progression of lipopolysaccharide signal pathway[J]. J Central South University : Medical Sciences, 2006, 31(1) :141-145.
- [10] Dunn KL, Espino PS, Drobiec B, et al. The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling[J]. Biochem Cell Biol, 2005, 83(1) :1-14.
- [11] Kondo A, Koshihara Y, Togari A. Signal transduction system for interleukin-6 synthesis stimulated by lipopolysaccharide in human osteoblasts[J]. J Interferon Cytokine Res, 2001, 21(11) :943-950.
- [12] Darveau RP, Arbabi S, Garcia I, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide is both agonist and antagonist for p38 mitogen-activated protein kinase activation[J]. Infect Immun, 2002, 70(4) :1867-1873.
- [13] Cunningham MD, Seachord C, Ratcliffe K, et al. *Helicobacter pylori* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides are poorly transferred to recombinant soluble CD14[J]. Infect Immun, 1996, 64(9) :3601-3608.

(本文编辑 王晴)

(上接第134页)

- 形态学观察[J]. 首都医科大学学报, 2006, 27(2) :257-260.
- SHI Bao-jiang, ZHANG Chen, HOU Ben-xiang. Interfacial micromorphology of total-etching vers self-etching system created in dentin[J]. J Capital University Medical Sciences, 2006, 27(2) :257-260.
- [3] Esclassan Noirrit E, Grégoire G, Cournot M. Morphological study of fiber-reinforced post-bonding system-root dentin interface by evaluation of two bonding systems[J]. J Dent, 2008, 36(3) :204-213.
- [4] Haller B. Recent developments in dentin bonding[J]. Am J Dent, 2000, 13(1) :44-50.
- [5] Bonfante EA, Pegoraro LF, de Góes MF, et al. SEM observation of the bond integrity of fiber-reinforced composite posts cemented into root canals[J]. Dent Mater, 2008, 24(4) :483-491.
- [6] Mannocci F, Innocenti M, Ferrari M, et al. Confocal and scanning electron microscopic study of teeth restored with fiber posts, metal posts, and composite resins[J]. J Endod, 1999, 25(12) :789-794.
- [7] da Silveira Teixeira C, Santos Felipe MC, Silva-Sousa YT, et al. Interfacial evaluation of experimentally weakened roots restored with adhesive materials and fibre posts : An SEM analysis[J]. J Dent, 2008, 36(9) :672-682.
- [8] Ciocca L, Gallina I, Navacchia E, et al. A new method for quantitative analysis of dentinal tubules[J]. Comput Biol Med, 2007, 37(3) :277-286.
- [9] De-Deus G, Paciornik S, Pinho Mauricio MH, et al. Real-time atomic force microscopy of root dentine during demineralization when subjected to chelating agents[J]. Int Endod J, 2006, 39(9) :683-692.
- [10] 黄鹂, 陈吉华, 沈丽娟, 等. 七种双固化树脂粘结剂与根管内牙本质粘结性能的实验研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2008, 24(3) :160-162.
- HUANG Li, CHEN Ji-hua, SHEN Li-juan, et al. The bonding strengths of seven dual-cure composite core materials to root canal dentine[J]. J Clin Stomatol, 2008, 24(3) :160-162.
- [11] Tay FR, Pashley DH, Yoshiyama M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives[J]. J Dent Res, 2002, 81(7) :472-476.
- [12] Mjör IA, Smith MR, Ferrari M, et al. The structure of dentine in the apical region of human teeth[J]. Int Endod J, 2001, 34(5) :346-353.

(本文编辑 王晴)