

[文章编号] 1000-1182(2008)05-0473-02

# 内氏放线菌细胞壁成分诱导人成纤维细胞产生白细胞介素-1 $\beta$ 、-6和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 的研究

赵丽娟<sup>1</sup>, 李文<sup>2</sup>, 郑燕<sup>3</sup>

1.大连大学附属新华医院 口腔科, 辽宁 大连 116021;

2.四川大学华西口腔医院 牙体牙髓科, 四川 成都 610041; 3.大连大学医学院 口腔教研室, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的 探讨内氏放线菌菌株ATCC19246细胞壁成分能否诱导人成纤维细胞产生白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )。方法 采用提取脂磷壁酸(LTA)的方法提取内氏放线菌菌株ATCC19246细胞壁成分,用3种质量浓度(分别为1、10、100 mg/mL)提取物分别刺激人成纤维细胞THP-1细胞株,用ELISA方法测定细胞培养上清中的IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ 。结果 THP-1细胞株可以产生一定量的IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ ,以质量浓度为10 mg/mL时诱导产生的量最高。结论 内氏放线菌细胞壁提取物可以诱导THP-1细胞株产生IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$ ,但随着质量浓度变化产生的量存在差异。

[关键词] 内氏放线菌; 白细胞介素; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; 成纤维细胞

[中图分类号] R379.1 [文献标识码] A

**Production of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and tumor necrosis factor  $\alpha$  in cultured human fibroblast with stimulation of abstract from *Actinomyces naeslundii* ATCC19246** ZHAO Li-juan<sup>1</sup>, LI Wen<sup>2</sup>, ZHENG Yan<sup>3</sup>. (1. Dept. of Stomatology, Xinhua Hospital of Dalian University, Dalian 116021, China; 2. Dept. of Operative Dentistry and Endodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Dept. of Stomatology, Medical College of Dalian University, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective** To observe the production of interleukin(IL)-1 $\beta$ , IL-6 and tumor necrosis factor  $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) from stimulated human fibroblast with abstract from cell wall of *Actinomyces naeslundii* ATCC19246. **Methods** The abstract from the cell wall from *Actinomyces naeslundii* were extracted and purified with the method of purifying lipoteichoic acid(LTA) and stimulated the THP-1 with three different concentrations(1, 10, 100 mg/mL). The level of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  in the supernatant was quantitatively analyzed by ELISA. **Results** Abstracts at the concentrations of 10, 100 mg/mL significantly produced IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$ , especially 10 mg/mL. **Conclusion** The abstract from cell wall of *Actinomyces naeslundii* may significantly increase IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  level in the supernatant of THP-1, and the increasing level is different with the concentrations.

[Key words] *Actinomyces naeslundii*; interleukin; tumor necrosis factor  $\alpha$ ; fibroblast

内氏放线菌是口腔内常驻菌,它不仅是主要致龋菌之一,还与牙周炎的发病有一定的关系<sup>[1]</sup>。研究发现内氏放线菌能诱导牙龈成纤维细胞、上皮细胞、牙髓细胞产生一些细胞因子,主要为白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ )等,这些因子进一

步诱发局部免疫反应,加重局部的炎症<sup>[2-3]</sup>。以往的研究常利用细菌菌体、超声波破碎菌体、酶提取细胞壁成分来研究内氏放线菌的免疫学特性。由于内氏放线菌细胞壁不仅含有菌毛,还具有革兰阳性菌共有的细胞壁成分——脂磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA),另外用超声波或者酶处理细菌,可能使一些成分的结构发生改变,而且提取的成分里含有细胞内部蛋白,进而影响到细胞壁表面成分免疫学特性。本研究采用提取LTA方法<sup>[4]</sup>来提取内氏放线菌的细胞壁成分,旨在通过研究内氏放线菌细胞壁成分诱导成纤维细胞产生细胞因子,进一步推断内氏放线菌在牙周炎症中可能存在的作用。

[收稿日期] 2008-02-26; [修回日期] 2008-04-09

[基金项目] 大连市卫生局科研基金资助项目(2004);辽宁省教育厅科研基金资助项目(20040044)

[作者简介] 赵丽娟(1966-),女,辽宁人,主任医师,博士

[通讯作者] 赵丽娟, Tel: 0411-82182474

## 1 材料和方法

### 1.1 内氏放线菌的培养

在90%CO<sub>2</sub>、5%N<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>条件下,将内氏放线菌ATCC19246冻干株用TSB培养基在36℃下培养48 h,传代3代后,革兰染色及生化反应鉴定为内氏放线菌后接种于TSB液体培养基中,上述条件培养48 h,0℃条件下4 000 r/min离心15 min,收集菌体,PBS缓冲液冲洗3次后离心,冻干备用。

### 1.2 内氏放线菌细胞壁成分的提取

按照链球菌LTA提取方法进行<sup>[4]</sup>,将一定量的冻干细菌溶于20 mL蒸馏水中,70℃用酚与蒸馏水的混合物(比例为4:1)进行萃取,经过Sephrose6B提纯后,用氯仿-甲醇混合液去除部分多糖及核酸,并用二乙氨基乙基(diethylaminoethyl, DEAE)纤维素层析进一步纯化,透析2 d后,冻干。

### 1.3 人成纤维细胞的培养

将人成纤维细胞THP-1细胞株于RPMI1640完全培养基(含10%小牛血清、0.2%NaHCO<sub>3</sub>、10 mmol/L N-2-羧乙基呱嗪N'-2-乙磺酸)中培养,将培养皿置于含5%CO<sub>2</sub>、37℃、饱和湿度下,每2 d传代1次,本实验共传代5代。

### 1.4 内氏放线菌细胞壁成分刺激THP-1细胞株

用电子天平称取冻干的内氏放线菌细胞壁提取物,用PBS配制成质量浓度为1、10、100 mg/mL,备用。将每毫升7.5×10<sup>4</sup>个THP-1细胞接种在96孔培养板,分别加入内氏放线菌冻干细胞壁提取物、PBS(空白对照组)、0.1 mg/mL大肠杆菌055:B5菌株脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(日本东北大学惠赠,阳性对照组),每组6孔,培养24 h后,提取培养上清,-70℃冻存备用。按照ELISA检测试剂盒说明检测IL-1β、IL-6和TNFα。

### 1.5 统计学分析

利用SPSS 10.0统计软件,采用两样本间及多样本间的秩和检验,P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

不同质量浓度细胞壁成分及LPS刺激THP-1细胞株产生IL-1β、IL-6、TNFα的检测结果见表1。内氏放线菌细胞壁提取物诱导THP-1细胞株均可产生IL-1β、IL-6、TNFα。但10、100 mg/mL实验组产生的IL-1β、IL-6、TNFα与空白对照组相比,差异均具有统计学意义(P<0.05),1 mg/mL实验组产生的IL-1β、IL-6、TNFα非常少(P>0.05)。100 mg/mL实验组产生的IL-6、TNFα与10 mg/mL实验组产生的IL-6、TNFα相比,差异有统计学意义(P<0.05)。

表 1 不同质量浓度细胞壁成分及LPS刺激THP-1细胞株产生IL-1β、IL-6、TNFα的水平(n=6, ng/mL)

Tab 1 The level of IL-1β, IL-6, TNFα production from THP-1 cell induced by the abstract from the cell wall with three different concentration and LPS(n=6, ng/mL)

分组	IL-1β	IL-6	TNFα
1 mg/mL实验组	0.46±0.15	0.40±0.10	0.33±0.12
10 mg/mL实验组	0.70±0.21	0.79±0.27	0.63±0.32
100 mg/mL实验组	0.68±0.23	0.57±0.28	0.57±0.25
阳性对照组	1.27±0.14	1.34±0.19	1.30±0.29
空白对照组	0.36±0.11	0.32±0.15	0.25±0.09

## 3 讨论

内氏放线菌是口腔内常驻细菌,而且在牙周炎症部位检出率较高,许多研究证实它与牙周炎的发展有一定的关系<sup>[1]</sup>。由于它的细胞壁富含碳水化合物的抗原,与菌斑中革兰阴性厌氧菌的LPS一样,可能诱导出相当量的炎症细胞因子,这些释放在局部的细胞因子最终导致牙周组织炎症,甚至组织破坏<sup>[3]</sup>。许多研究结果也证实,内氏放线菌体及其菌体提取物可以诱导巨噬细胞、成纤维细胞产生炎症细胞因子如IL-1、IL-6、TNFα及IL-8等<sup>[2-3]</sup>。

由于内氏放线菌是革兰阳性菌,其细胞壁中主要成分为肽聚糖和LTA,因此本实验利用酚提取LTA方法提取内氏放线菌的细胞壁成分,尽管没有进一步纯化,但提取物是含有LTA成分的。诱导THP-1细胞株24 h后,在实验组中均检测到IL-1β、IL-6、TNFα,其中以10、100 mg/mL实验组产生的量较多,与空白对照组比较差异具有统计学意义(P<0.05),尤其是10 mg/mL实验组可以产生大量的IL-6及TNFα。质量浓度为100 mg/mL时,IL-1β、IL-6及TNFα产生的量均有一定程度的下降。Zhou等<sup>[5]</sup>用牙龈卟啉单胞菌的LPS及菌毛诱导THP-1细胞株,也产生大量的IL-6及TNFα,而产生的IL-1β略少,但产生的IL-6的量为TNFα的3倍,这种显著差异是在诱导THP-1细胞株4~24 h产生的,可能是因为用纯的LPS诱导THP-1细胞株导致结果的差异。同时也发现,当加入细胞壁提取物质量浓度达到很高时,THP-1细胞株出现大量死亡,具体的原因尚不清楚,但可以肯定的是当细胞壁成分达到适当质量浓度时,可以产生高质量浓度的细胞因子,之后随着细胞壁成分质量浓度的增加,产生的细胞因子

- gene transfection[J]. J Pract Stomatol, 2005, 21(6) :762-766.
- [3] 李 文, 温玉明, 王力红, 等. nm23-h1转染腺样囊性癌细胞及其增殖能力的实验研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(2) : 109-111.
- LI Wen, WEN Yu-ming, WANG Li-hong, et al. *In vitro* and *in vivo* study on proliferation of adnoid cystic carcinoma cell lines after nm23-h1 introduction[J]. West China J Stomatol, 2004, 22 (2) :109-111.
- [4] 鄧克謙, 陈伟辉, 温玉明. nm23-H1质粒和顺铂白蛋白联合治疗裸鼠移植瘤[J]. 华西口腔医学杂志, 2006, 24(2) :170-172.
- ZHI Ke-qian, CHEN Wei-hui, WEN Yu-ming. Effect on xeno-graft of nude mouse by combination therapy of nm23-H1 and protein-cisplatin[J]. West China J Stomatol, 2006, 24(2) :170-172.
- [5] Bookman MA, Ozols RF. Factoring outcomes in ovarian cancer[J]. J Clin Oncol, 1996, 14(2) 325-327.
- [6] Wang YF, Chow KC, Chang SY, et al. Prognostic significance of nm23-H1 expression in oral squamous cell carcinoma[J]. Br J Cancer, 2004, 90(11) 2186-2193.
- [7] Scambia G, Ferrandina G, Marone M, et al. nm23 in ovarian cancer : Correlation with clinical outcome and other clinicopathologic and biochemical prognostic parameters[J]. J Clin Oncol, 1996, 14(2) 334-342.
- [8] Ferguson AW, Flatow U, MacDonald NJ, et al. Increased sensitivity to cisplatin by nm23-transfected tumor cell lines [J]. Cancer Res, 1996, 56(13) 2931-2935.
- [9] Lizuka N, Miyamoto K, Tangoku A, et al. Downregulation of intracellular nm23-H1 prevents cisplatin-induced DNA damage in oesophageal cancer cells : Possible association with Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase[J]. Br J Cancer, 2000, 83(9) :1209-1215.
- [10] Marshall LJ, Muimo R, Riemen CE, et al. Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> regulate the phosphorylation state of nucleoside diphosphate kinase in human airway epithelium[J]. Am J Physiol, 1999, 276(1 Pt 1) : C109-C119.
- [11] Perez RP. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance[J]. Eur J Cancer, 1998, 34(10) :1535-1542.
- [12] Johnsson A, Olsson C, Anderson H, et al. Evaluation of a method for quantitative immunohistochemical analysis of cisplatin-DNA adducts in tissues from nude mice[J]. Cytometry, 1994, 17(2) : 142-150.
- [13] Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis[J]. Annu Rev Physiol, 1998, 60(1) 619-642.
- [14] Eguchi Y, Srinivasan A, Tomaselli KJ, et al. ATP-dependent steps in apoptotic signal transduction[J]. Cancer Res, 1999, 59 (9) 2174-2181.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第474页)

反而出现下降趋势。

IL-1、TNF $\alpha$ 是调节结缔组织基质降解和牙槽骨吸收活性最强的细胞因子，也是参与调节中性粒细胞聚集、释放溶酶体酶和超氧离子的重要因子。研究也证实，IL-1 $\beta$ 的活性与牙周炎的病变程度、临床症状密切相关<sup>[6-7]</sup>。IL-6是促进骨吸收的重要因子，成骨细胞和破骨细胞膜上均存在IL-6受体，成骨细胞产生的IL-6以自分泌和旁分泌的方式调节破骨细胞的形成，龈沟液中的IL-6高于正常水平，与牙周病的严重程度呈正相关关系<sup>[8]</sup>。本实验按照提纯LTA的方法提取细胞壁成分，虽然没有做进一步的鉴定，但认为提取的成分中含有大量的LTA。根据实验结果可以认为内氏放线菌细胞壁的LTA样成分可以诱导炎性细胞因子，通过这些细胞因子，引进局部炎症反应和牙槽骨破坏，导致牙周病加剧。

#### [参考文献]

- [1] Dalwai F, Spratt DA, Pratten J. Modeling shifts in microbial populations associated with health or disease[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(5) 3678-3684.
- [2] Sugano N, Ikeda K, Oshikawa M, et al. Differential cytokine in-

duction by two types of *Porphyromonas gingivalis*[J]. Oral Microbiol Immunol, 2004, 19(2) :121-123.

- [3] Takada H, Kimura S, Hamada S. Induction of inflammatory cytokines by a soluble moiety prepared from an enzyme lysate of *Actinomyces viscosus* cell walls[J]. J Med Microbiol, 1993, 38 (6) 395-400.
- [4] Josephson SL, Stinson MW, Millar SJ, et al. Purification of lipoteichoic acid by chromatography in water-organic solvent systems[J]. Infect Immun, 1986, 51(2) 378-384.
- [5] Zhou Q, Amar S. Identification of proteins differentially expressed in human monocytes exposed to *Porphyromonas gingivalis* and its purified components by high-throughput immunoblotting[J]. Infect Immun, 2006, 74(2) :1204-1214.
- [6] Zini N, Lisignoli G, Solimando L, et al. IL1-beta and TNF-alpha induce changes in the nuclear polyphosphoinositide signalling system in osteoblasts similar to that occurring in patients with rheumatoid arthritis : An immunochemical and immunocytochemical study[J]. Histochem Cell Biol, 2003, 120(3) 243-250.
- [7] Galbraith GM, Hagan C, Steed RB, et al. Cytokine production by oral and peripheral blood neutrophils in adult periodontitis[J]. J Periodontol, 1997, 68(9) 832-838.
- [8] Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level[J]. J Clin Periodontol, 2003, 30(2) :145-153.

(本文编辑 王 晴)