

[文章编号] 1000-1182(2008)06-0652-04

不同fimA基因型牙龈卟啉单胞菌刺激 口腔上皮细胞白细胞介素-8的表达

郭永华^{1,2}, 吴亚菲³, 刘天佳³, 张静宜¹, 肖晓蓉¹, 赵 蕾³

(1.口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041;

2.首都医科大学附属北京口腔医院 牙周黏膜科, 北京 100050;

3.四川大学华西口腔医学院 口腔内科学教研室, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 比较不同fimA基因型牙龈卟啉单胞菌(*P.gingivalis*)刺激下口腔上皮细胞白细胞介素-8(IL-8)的表达水平, 初步探讨*P.gingivalis*致病性与其fimA基因型的关系。方法 *P.gingivalis* ATCC 33277(型fimA)、W83、47A-1(型fimA)和KB细胞ATCC CCL-17共同孵育24 h, 以未受刺激的KB细胞作为对照组, 分别在1、3、6、24 h收集细胞和培养上清液。RT-PCR检测KB细胞IL-8 mRNA的动态表达, 酶联免疫反应检测培养上清液中IL-8的动态变化。结果 2种fimA基因型菌株刺激1 h, KB细胞IL-8 mRNA的表达上调至峰值, 高于对照组, 3~24 h IL-8 mRNA的表达水平接近对照组; *P.gingivalis*感染细胞后3~24 h, 上清液中的IL-8水平低于对照组, 型菌株低于型菌株; IL-8 mRNA及其蛋白表达不完全一致, 提示IL-8的表达存在转录后水平的调节。结论 fimA基因型与口腔上皮细胞IL-8的表达水平相关, 提示*P.gingivalis*致病性与其fimA基因型相关。

[关键词] 牙龈卟啉单胞菌; fimA基因型; 口腔上皮细胞; 白细胞介素-8

[中图分类号] R781.4 **[文献标识码]** A

Interleukin-8 regulations of oral epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis* with different fimA genotypes

GUO Yong-hua^{1,2}, WU Ya-fei³, LIU Tian-jia³, ZHANG Jing-yi¹, XIAO Xiao-rong¹, ZHAO Lei³. (1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Periodontics and Oral Medicine, Beijing Stomatological Hospital, Capital University of Medical Science, Beijing 100050, China; 3. Dept. of Oral Medicine, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** The expression of heterogenic virulence properties depends on its clonal diversity. The aim of the study was to investigate the mechanism of interleukin-8 (IL-8) regulations of oral epithelial cells by challenge of *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) with different fimA genotypes, discuss the relation between fimA genotype and its pathogenicity. **Methods** *P.gingivalis* ATCC 33277 (type), W83 (type), 47A -1 (type) were assessed for their inductions of IL-8 expression in human oral epithelial cells (KB cell line, ATCC CCL-17). KB cells without stimulation of *P.gingivalis* were used as control group. IL-8 mRNA expression was determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) at different time intervals (1, 3, 6, 24 h) following continuous co culture of bacteria with KB cell line, and IL-8 protein levels in culture supernatant was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** IL-8 mRNA levels were up-regulated and reached its high peak at 1 h following both genotypes infection, then decreased to base level till 24 h. Attenuation of IL-8 protein levels was down-regulated when KB cell co-cultured with both genotypes for 3 h till 24 h, and type was lower than type . IL-8 and IL-6 mRNA expression were not consistent with their protein levels, which indicated post-transcriptional regulations. **Conclusion** fimA genotypes of *P.gingivalis* are related with the effect of IL-8 inductions, which indicates fimA genotype is associated with pathogenesis of *P.gingivalis*.

[Key words] *Porphyromonas gingivalis*; fimA genotype; oral epithelial cell; interleukin-8

[收稿日期] 2008-03-05; [修回日期] 2008-06-30

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30471890)

[作者简介] 郭永华(1977-), 女, 山东人, 住院医师, 博士

[通讯作者] 吴亚菲, Tel: 028-81801057

白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)是在正常龈沟中唯一能检测到的细胞因子, 可以趋化中性粒细胞、巨噬细胞及抗原呈递细胞至牙龈微环境, 监控

牙周袋内的细菌,对维护临床健康的牙周状态发挥关键作用^[1]。

牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)是目前公认的主要的牙周致病菌,菌毛是其主要的毒力因子,根据菌毛编码基因fimA开放阅读框架(open reading frame, ORF)核苷酸序列的差异, fimA基因分为6型(到 a, b),分子流行病学调查研究^[2-4]显示, *P.gingivalis* fimA基因型与牙周炎的发生发展密切相关,提示*P.gingivalis*致病性与其fimA基因型相关。因此,本研究拟采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)从蛋白和mRNA水平,比较不同 fimA基因型*P.gingivalis*刺激下口腔上皮细胞IL-8的表达水平,初步探讨*P.gingivalis*致病性与其fimA基因型的关系。

1 材料和方法

1.1 *P.gingivalis*的培养

将脱脂牛奶内冻存的*P.gingivalis* ATCC 33277 (W83型)和47A-1(型)复苏(四川大学口腔疾病研究国家重点实验室提供),接种在牛心脑浸液(brain heart immersion, BHI)培养基(含5%冻融兔血和1%血晶素)上,37℃厌氧培养5~7 d,生化鉴定后传次代。取对数生长期的菌株悬浮于新鲜配置的PBS中制备成菌悬液,6 000 r/min, 10 min,洗涤2次,采用比浊仪(CrystalSpec™公司,美国)将菌悬液密度调至每毫升 1×10^8 个,6 000 r/min, 15 min,然后用含10%小牛血清的低糖DMEM重悬备用。

1.2 口腔上皮细胞株KB细胞的培养

KB细胞ATCC CCL-17(成都基因治疗肿瘤药物工程技术研究中心提供)是永生化的角化口腔上皮细胞,是目前国际通用的口腔上皮细胞模型。将KB细胞培养在75 cm²细胞培养瓶中,加入含10%小牛血清的低糖DMEM培养基(Gibco公司,美国),瓶底向上,放入37℃、10%CO₂孵箱中,每3 d换液1次,细胞长满瓶底后用0.25%的胰蛋白酶(Gibco公司,美国)消化,按1:4传代培养。

1.3 不同fimA基因型*P.gingivalis*刺激口腔上皮细胞

取生长旺盛的KB细胞(存活率>95%),调整细胞数为每毫升 5×10^5 个,接种于6孔培养板,每孔2 mL,观察细胞有90%以上的贴壁率,弃上清液, PBS洗涤2次,加入配置好的含每毫升 1×10^8 个的*P.gingivalis*的DMEM培养基2 mL,对照组加入新鲜培养基2 mL,复种2孔,细菌感染细胞的比率为100:1,

连续培养24 h。分别在1、3、6、24 h吸取上清液,置-150℃冰箱待检,用于IL-8蛋白水平的检测。上清液收集后向培养板中加入Trizol (Invitrogen公司,美国),收集KB细胞,每孔1 mL,反复吹打数次,室温(15℃~30℃)放置2~3 min, EP管收集, -20℃冻存,用于IL-8 mRNA的检测。

1.4 RT-PCR检测IL-8 mRNA表达

1.4.1 逆转录合成cDNA第1条链 使用Trizol抽提细胞总RNA,用Fermentas公司的RevertAid™试剂盒,根据说明书,从提取的RNA逆转录合成cDNA第1链, -20℃冻存备用。

1.4.2 引物的设计合成 本研究采用GAPDH作为内对照,根据已公布的人IL-8 cDNA和GAPDH cDNA序列,采用Oligo 6.0软件设计引物,引物序列如下(引物均由成都申能博采公司合成)。IL-8的P1: TGCAGTTTTGCCAAGGAGTG; P2: ACAACCCTCTGCACCCAGTT; 片段长度为200 bp。GAPDH的P1: TCATCATCTCTGCCCCCTCT; P2: ATGAGGTCCAC-CACCCTGTT, 片段长度为620 bp。

1.4.3 RT-PCR第2步的反应体系 以逆转录合成的第1条链为模板,总反应体积为25 μL,反应体系如下: 10×reaction Buffer 2.5 μL, Mg²⁺(25 mmol/L) 1.5 μL, 10 mmol/L dNTP 0.5 μL, P1(20 pmol/μL) 0.25 μL, P2(20 pmol/μL) 0.25 μL, Taq DNA酶(成都申能博采有限公司) 0.125 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O 17.875 μL。

1.4.4 PCR反应扩增条件 IL-8: 94℃变性5 min, (94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s)33个循环, 72℃延伸5 min。GAPDH: 94℃变性5 min, (94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s)23个循环, 72℃延伸5 min。

1.4.5 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳 各取2.5 μL PCR产物,电压选择为90 V,于2%低熔点琼脂糖凝胶(Takara公司,日本)电泳分析,以DL2000(Takara公司,日本)作为相对分子质量Marker,用Quantity One软件(Bio-Rad公司,美国)做条带灰度分析,以IL-8 mRNA与GAPDH mRNA的比值来比较不同样本间的相对量。

1.5 ELISA检测IL-8蛋白表达

本研究采用人IL-8 ELISA试剂盒(深圳晶美生物工程公司),根据使用说明书来绘制标准曲线,每孔加入100 μL待测样本,采用HTS 7000 plus多孔板高效分析仪(PE公司,美国)动态检测,用双波长465 nm/635 nm读数,每孔读取4个点取均值,由分析仪软件自动换算出样本量pg/mL。

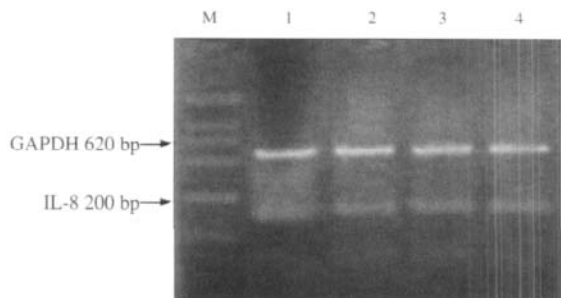
1.6 统计方法

采用多组样本的秩和检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 RT-PCR产物电泳结果

口腔上皮细胞总RNA经RT-PCR扩增后, IL-8和GAPDH特异性引物扩增后的目的片段与预计相同, 产物电泳结果见图1。



M: DL2000 Marker; 1: 对照组; 2: ATCC 33277; 3: W83; 4: 47A-1

图1 IL-8和GAPDH的RT-PCR扩增后的电泳结果

Fig 1 Amplification products of IL-8 and GAPDH by RT-PCR

表1 不同fimA基因型*P.gingivalis*刺激下KB细胞表达IL-8 mRNA的比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 IL-8 mRNA expression levels of KB cells stimulated by *P.gingivalis* with different fimA genotypes($\bar{x}\pm s$)

时间(h)	IL-8 mRNA的表达			
	对照组	ATCC 33277	W83	47A-1
1	0.705 9±0.031 0	0.976 6±0.061 3*	1.080 6±0.143 4*	1.079 6±0.278 9*
3	0.701 0±0.082 9	0.722 7±0.035 0	0.693 4±0.026 8	0.696 1±0.057 8
6	0.749 3±0.107 5	0.717 3±0.082 0	0.673 0±0.016 6	0.719 0±0.032 0
24	0.704 3±0.058 2	0.720 3±0.062 1	0.721 4±0.023 5	0.727 5±0.123 6

注: *实验组与对照组比较, $P<0.05$

表2 不同fimA基因型*P.gingivalis*刺激下KB细胞表达IL-8的比较($\mu\text{g/mL}$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 IL-8 protein levels of KB cells stimulated by *P.gingivalis* with different fimA genotypes($\mu\text{g/mL}$, $\bar{x}\pm s$)

时间(h)	IL-8的表达			
	对照组	ATCC 33277	W83	47A-1
1	23.283±3.282	25.526±6.454	20.963±3.938	24.018±0.383
3	131.145±26.368	104.581±21.523	89.362±14.141*	81.214±26.466*
6	229.845±0.488	158.626±29.521*	107.360±21.652*#	112.105±14.941*#
24	312.390±19.460	228.915±27.881*	212.880±29.911*#	194.665±18.293*#

注: *实验组与对照组比较, $P<0.05$; # 型菌毛组与 型菌毛组, $P<0.05$

3 讨论

内化的*P.gingivalis*不仅可以在上皮细胞内增殖, 而且还可抑制上皮细胞的凋亡, 调节上皮细胞多种细胞因子和黏附分子的表达^[5-8], 调节宿主免疫反应。KB细胞是转化的口腔上皮细胞株, 研究^[9-11]显示KB细胞与*P.gingivalis*相互作用的方式类似于牙龈上皮细胞; 并且KB细胞的增殖频率是恒定的, 能够提供良好的实验重复性, 故KB细胞株能作为牙龈上皮细胞的代表, 作为本研究*P.gingivalis*攻击的靶细胞。

2.2 IL-8的检测结果

2.2.1 IL-8 mRNA的检测结果 不同fimA基因型*P.gingivalis*刺激下IL-8 mRNA的检测结果见表1, *P.gingivalis*与KB细胞共同孵育1 h时, 实验组IL-8 mRNA的表达至峰值, 高于对照组($P<0.05$), 型菌株的调节作用略强于 型菌株, 但差别无统计学意义($P>0.05$), 其后实验组IL-8 mRNA的表达下调, 3 h达最低点, 共同孵育至24 h, 实验组IL-8 mRNA的表达水平接近对照组; 不同基因型*P.gingivalis*菌株对IL-8 mRNA表达的调节作用相近。

2.2.2 IL-8蛋白量的检测结果 不同fimA基因型*P.gingivalis*刺激下细胞培养上清液中IL-8的蛋白含量见表2, 随着时间的延长, 各组IL-8的水平均呈增长趋势。*P.gingivalis*与KB细胞共同孵育1 h后, 实验组与对照组IL-8水平无差异, 共同孵育3~24 h, 实验组IL-8水平低于对照组($P<0.05$), 6~24 h, 型菌株IL-8的水平低于 型菌株($P<0.05$)。

国外学者在对*P.gingivalis*调节宿主细胞表达IL-8等细胞因子的研究中存在2种不同的结论和观点。第1种观点认为: *P.gingivalis*是IL-8等细胞因子积聚的强烈抑制剂, 能阻止感染部位细胞因子的积聚, 躲避宿主防御机制。第2种观点认为: *P.gingivalis*的感染可能引发局部牙龈组织过度表达趋化因子, 造成大量炎性细胞聚积, 加重局部免疫反应。Darveau等^[12]报道*P.gingivalis*刺激人牙龈上皮细胞后, 培养基中IL-8蛋白低于对照组, 可能与*P.gingivalis*抑制牙龈上皮细胞IL-8 mRNA的表达有关。Nassar等^[13]研究

则显示,在*P.gingivalis*刺激下,静脉内皮细胞IL-8 mRNA的表达上调,但细胞分泌的IL-8减少。Kang等^[14]应用*P.gingivalis* 381、同源fimA缺陷株DPG3和同源牙龈素缺陷株MT10W刺激静脉内皮细胞发现,实验组在蛋白和mRNA水平表达IL-8的量均高于对照组。学者们认为2种研究结果不同的原因可能与实验条件、细胞和菌种的选择等有关。

本研究IL-8 mRNA的表达与Huang等^[15]的研究结果接近,提示*P.gingivalis*可能是通过2种信号途径调节IL-8 mRNA的表达水平,一种信号上调IL-8 mRNA的表达,而一种信号下调IL-8 mRNA的表达,IL-8 mRNA的表达是2种机制共同作用的结果。*P.gingivalis*通过配体与宿主细胞膜上相应的受体复合体CD11/CD18/TLRs结合,通过Toll样受体-细胞内信号传导途径,活化NF- κ B,诱导细胞因子的表达,上调IL-8 mRNA的表达;与此同时,*P.gingivalis*通过菌毛可以黏附和入侵上皮细胞,入侵的*P.gingivalis*对上皮细胞没有细胞毒性作用,并通过某种机制抑制IL-8向细胞外的分泌,使细胞内的IL-8聚积,发生负反馈作用,下调但不完全抑制IL-8 mRNA的表达^[6-8]。本研究发现 型菌株和 型菌株对KB细胞IL-8 mRNA表达的调节水平相似。

本研究结果显示未受刺激的KB细胞上清液中IL-8的水平随时间延长呈聚积趋势,提示KB细胞IL-8的表达在基线水平就比较高。不同基因型*P.gingivalis*刺激KB细胞3、6、24 h后,培养上清液中IL-8的水平低于对照组, fimA型低于 fimA型。这与Darveau等^[12]的研究结果相一致。IL-8蛋白水平的表达与mRNA的表达不完全一致,提示IL-8的表达涉及转录后水平的调节,*P.gingivalis*的蛋白酶可能也参与了对IL-8的降解,提示 型*P.gingivalis*蛋白酶的降解作用强于 型*P.gingivalis*。

IL-8的表达与牙龈稳态相关,*P.gingivalis*对上皮细胞外IL-8的降解作用对牙周组织的天然屏障系统起着巨大的破坏作用,使宿主不能探测到侵入的细菌,无法趋化免疫细胞到达目标感染区,这种免疫抑制作用有助于*P.gingivalis*在感染区的生长和增殖^[16],*P.gingivalis*的这种致病机制与白细胞黏附缺陷和 相似。根据本研究结果推测 fimA型*P.gingivalis*的这种致病性强于 fimA型*P.gingivalis*,提示*P.gingivalis*致病性与其fimA基因型相关。

[参考文献]

[1] 郭永华,张蕴惠. IL-8与牙周炎关系的探讨[J]. 广东牙病防治, 2002, 10(4): 312-313.
GUO Yong-hua, ZHANG Yun-hui. The relationship between IL-

8 and periodontitis[J]. J Dent Prevent Treat, 2002, 10(4): 312-313.

[2] Nakagawa I, Amano A, Kimura RK, et al. Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gingivalis* carrying a new type of fimA gene[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(5): 1909-1914.

[3] Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, et al. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with fimA genotypes in periodontitis patients[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(5): 1426-1430.

[4] Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I, et al. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis* fimA and periodontal health status[J]. J Dent Res, 2000, 79(9): 1664-1668.

[5] Sugano N, Ikeda K, Oshikawa M, et al. Differential cytokine induction by two types of *Porphyromonas gingivalis*[J]. Oral Microbiol Immunol, 2004, 19(2): 121-123.

[6] Yilmaz O, Watanabe K, Lamont RJ. Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*[J]. Cell Microbiol, 2002, 4(5): 305-314.

[7] Watanabe K, Yilmaz O, Nakhjiri SF, et al. Association of mitogen-activated protein kinase pathways with gingival epithelial cell responses to *Porphyromonas gingivalis* infection[J]. Infect Immun, 2001, 69(11): 6731-6737.

[8] Nakhjiri SF, Park Y, Yilmaz O, et al. Inhibition of epithelial cell apoptosis by *Porphyromonas gingivalis* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 200(2): 145-149.

[9] Sandros J, Papapanou PN, Nannmark U, et al. *Porphyromonas gingivalis* invades human pocket epithelium *in vitro*[J]. J Periodontol Res, 1994, 29(1): 62-69.

[10] Njoroge T, Genco RJ, Sojar HT. A role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells[J]. Infect Immun, 1997, 65(5): 1980-1984.

[11] Houalet-Jeanne S, Pellen-Mussi P, Tricot-Doleux S, et al. Assessment of internalization and viability of *Porphyromonas gingivalis* in KB epithelial cells by confocal microscopy[J]. Infect Immun, 2001, 69(11): 7146-7151.

[12] Darveau RP, Belton CM, Reife RA, et al. Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*[J]. Infect Immun, 1998, 66(4): 1660-1665.

[13] Nassar H, Chou HH, Khlgatian M, et al. Role for fimbriae and lysine-specific cysteine proteinase gingipain K in expression of IL-8 and MCP-1 in *Porphyromonas gingivalis* infected endothelial cells[J]. Infect Immun, 2002, 70(1): 268-276.

[14] Kang IC, Kuramitsu HK. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 by *Porphyromonas gingivalis* in human endothelial cells [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2002, 34(4): 311-317.

[15] Huang GT, Kim D, Lee JK, et al. Interleukin-8 and intercellular adhesion molecule 1 regulation in oral epithelial cells by selected periodontal bacteria: Multiple effects of *Porphyromonas gingivalis* via antagonistic mechanisms[J]. Infect Immun, 2001, 69(3): 1364-1372.

[16] Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. *Porphyromonas gingivalis* - epithelial cell interactions in periodontitis[J]. J Dent Res, 2006, 85(5): 392-403.