

[文章编号] 1000-1182(2009)01-0037-04

Nod/Rip2信号通路参与牙龈卟啉单胞菌 诱导牙髓细胞白细胞介素-6表达

王倩¹ 罗世高¹ 卢煜¹ 张岚¹ 周学东² 黄定明²

(1.口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学; 2.四川大学华西口腔医院 牙体牙髓病科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 探讨牙龈卟啉单胞菌刺激牙髓细胞产生细胞因子的信号转导通路。方法 厌氧培养牙龈卟啉单胞菌(*P.gingivalis*), 胞内感染原代培养牙髓细胞, RNA抽提, 实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)检测Nods、Rip2, ELISA检测白细胞介素-6(IL-6)的表达水平。结果 牙髓细胞基础表达Nods、Rip2 mRNA及IL-6。 *P.gingivalis*感染后2 h, Nods和Rip2 mRNA增高, 达到高峰, 6 h出现下降趋势。而*P.gingivalis*活菌刺激牙髓细胞能增强IL-6表达水平。结论 *P.gingivalis*能激活牙髓细胞固有免疫反应, 通过Nod/Rip2途径进行信号转导上调细胞因子IL-6表达。

[关键词] 牙龈卟啉单胞菌; 牙髓细胞; 白细胞介素-6

[中图分类号] R781.3 **[文献标识码]** A

***Porphyromonas gingivalis* induced interleukin-6 expression by Nod/Rip2-mediated signaling pathway** WANG Qian¹, LUO Shi-gao¹, LU Yu¹, ZHANG Lan¹, ZHOU Xue-dong², HUANG Ding-ming². (1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Endodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To investigate into the signaling pathway of *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) on cytokine expression in human dental pulp cells(HDPC). **Methods** Anaerobic method was employed to culture *P.gingivalis*, and then HDPC were intracellularly infected by *P.gingivalis*. The extraction of total RNA, real-time quantitative polymerase chain reaction(qPCR) and enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) was used for mRNA expression of Nods and Rip2, protein secretion of interleukin-6(IL-6). **Results** HDPC expressed Nods, Rip2 mRNA and IL-6. The up-regulation of Nods and Rip2 mRNA started after *P.gingivalis* infection, reached maximal level at 2 h, and then decreased at 6 h; whereas elevated IL-6 was found when *P.gingivalis* infected. **Conclusion** *P.gingivalis* activate host innate immune responses in HDPC, and induce IL-6 production through Nod/Rip2-mediated signaling pathway.

[Key words] *Porphyromonas gingivalis*; dental pulp cells; interleukin-6

牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P.gingivalis*)为G⁻专性厌氧、产黑色素、有菌毛的杆菌,是公认的成人破坏性牙周炎致病菌之一。研究^[1-2]表明,牙龈卟啉单胞菌定植于感染根管内并与牙髓根尖周疾病的临床症状密切相关。牙龈卟啉单胞菌活菌能进入牙髓细胞内且能存活。牙龈卟啉单胞菌活菌胞内感染的牙髓细胞在一定时间内具有生物学活性^[3]。因此认为牙龈卟啉单胞菌可能是牙髓根尖周疾病的主要致病菌。一类含有核苷酸结合寡聚域

(nucleotide-binding oligomerization domain, Nod)的蛋白质家族存在于植物、线虫、脊椎动物和人类的细胞内,在遗传上高度保守,是一种细胞内类型识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)^[4]。研究^[5-6]表明,细菌及其产物进入宿主细胞后,可启动Nod对细菌进行识别,通过RICK/Rip2(receptor-interacting protein 2, Rip2)信号转导表达炎症细胞因子。牙龈卟啉单胞菌能侵入宿主细胞,诱导人成纤维细胞产生炎症细胞因子。但有关宿主细胞特别是口腔组织细胞,对牙龈卟啉单胞菌胞内感染的识别及其细胞因子表达与调控信号转导通路的研究,目前未见报道。因此本研究通过牙龈卟啉单胞菌侵入牙髓细胞内,应用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction RT-PCR)

[收稿日期] 2008-02-26; [修回日期] 2008-07-02

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30572034)

[作者简介] 王倩(1982-),女,四川人,硕士

[通讯作者] 黄定明, Tel: 028-81801178

实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)和酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 检测胞内类型识别受体Nod、信号转导因子Rip2以及细胞因子白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)的表达水平, 探讨牙龈卟啉单胞菌激活牙髓细胞固有免疫反应产生炎症因子的信号转导通路。

1 材料和方法

1.1 牙髓细胞复苏和传代

取第3代冻存牙髓细胞, 置于37 °C水浴快速解冻。取出细胞悬液, 用10%胎牛血清DMEM(Gibco公司, 美国)置入中号培养瓶, 放入5% CO₂ 孵箱37 °C培养。倒置相差显微镜下逐日观察, 在细胞贴壁80%以上后, 采用胰蛋白酶消化法收集细胞, 按1:3传代, 7~10代用于实验。

1.2 *P.gingivalis*活菌感染牙髓细胞

取7~10代牙髓细胞, 消化后计数, 用20%胎牛血清DMEM配成每毫升2×10⁵个细胞悬液, 接种于培养瓶, 每瓶5 mL, 置于5%CO₂, 37 °C孵箱培养24 h

后, 换无双抗无血清DMEM培养基, 培养24 h后备用。根据卢煜等^[3]提出的牙龈卟啉单胞菌胞内感染牙髓细胞方法, 按多重感染(multiplicitas of infection, MOI)为100, 将*P.gingivalis*活菌接种于牙髓细胞培养液中。阴性对照组以不含细菌的DMEM代替。

1.3 总RNA抽提和qPCR检测

Nod1、Nod2和Rip2分子引物序列见表1。利用提取总RNA的Trizol试剂, 采用异硫氰酸胍-酸-酚一步法, 利用Trizol试剂盒(Invitrogen公司, 美国), 按厂家说明书, 提取细胞总RNA, 分光光度仪测定A_{260 nm}/A_{280 nm}光密度值。采用ReverAid逆转录试剂盒(Fermentas公司, 立陶宛)合成cDNA, 然后进行PCR扩增反应。PCR条件为: 94 °C预变性5 min, 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35个循环后72 °C 5 min, PCR产物琼脂糖95 V电泳后, 制作标准曲线。按SYBR Premix EX Taq荧光定量PCR试剂盒(Takara公司, 日本)说明操作, 反应条件: 95 °C 10 s后, 95 °C 5 s, 60 °C 31 s, 72 °C 30 s, 40个循环, 根据标准曲线qPCR测定样本中Nod1、Nod2和Rip2 mRNA表达。

表 1 Nod1、Nod2和Rip2分子引物序列

Tab 1 Primers of Nod1, Nod2 and Rip2 for real-time PCR

基因	上游引物	下游引物	扩增产物大小(bp)
Nod1	5'-AGATGCGTTACAGAGCAACACTGG-3'	5'-CAGAGTGGCATTGCTGCTGA-3'	173
Nod2	5'-CAACAAATTGACTGACGGCTGTG-3'	5'-CCGCGGCAGTGATGTAGTTATTC-3'	104
Rip2	5'-GGATAGCACCATTCTGGATCTCAA-3'	5'-CTGGTTAAGGCAGGCTTCTGTCA-3'	193
β-actin	5'-ATTGCCGACAGGATGCAGA-3'	5'-GACTACTTGGCCTCAGGAGGA-3'	89

1.4 ELISA法测定培养上清液中IL-6质量浓度

按IL-6试剂盒(Diaclone公司, 法国)说明操作: 每孔加入100 μL重组标准品或待测样品和50 μL生物素标记的IL-6抗体, 放入恒温振荡器37 °C振荡孵育1 h(120 r/min), 3次洗板后加100 μL亲和素标记的HRP, 37 °C振荡孵育30 min, 3次洗板后再加入100 μL显示剂TMB, 室温, 暗室内孵育12~15 min, 加100 μL终止液硫酸后在450 nm波长下读取吸光度, 根据标准曲线计算IL-6质量浓度。

1.5 统计分析

采用SPSS 13.0统计软件进行分析, 实验结果均作正态性检验、方差分析和t检验。

2 结果

2.1 牙髓细胞能表达胞内类型识别受体Nod1、Nod2及其信号转导分子Rip2

牙髓细胞表达胞内类型识别受体Nod1、Nod2及其信号转导分子Rip2的情况见图1, 由图1可见, 人

牙髓细胞能基础表达胞内类型识别受体Nod1、Nod2和其信号转导分子Rip2 mRNA。

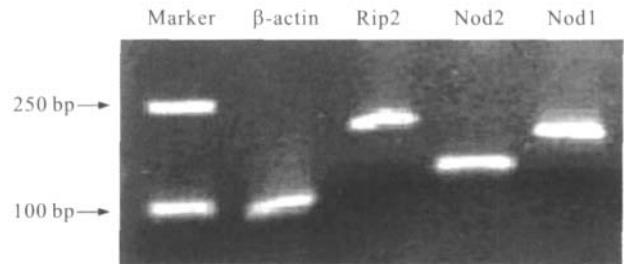


图 1 人牙髓细胞Nod1、Nod2和Rip2扩增片段琼脂糖凝胶电泳
Fig 1 The electrophoregram profile of Nod1, Nod2 and Rip2 amplification in human dental pulp cells with RT-PCR

2.2 qPCR定量检测Nod1、Nod2和Rip2 mRNA表达

qPCR定量检测Nod1、Nod2和Rip2 mRNA的表达见图2, 由图2可见, *P.gingivalis*胞内刺激人牙髓细胞后Nod1、Nod2 mRNA的表达高于未刺激对照细胞。感染2 h时Nod1、Nod2 mRNA的表达高于未受刺激组, 达到峰值, 然后逐渐降低, 刺激6 h后其转录水平仅有2 h的一半左右, 即使刺激24 h后, 其在

转录水平仍然高于未受刺激组。Rip2转录水平在刺激2 h后轻度增高,刺激6 h时与未受刺激组差别较小,刺激24 h后转录水平持续降低,甚至低于未受刺激组。

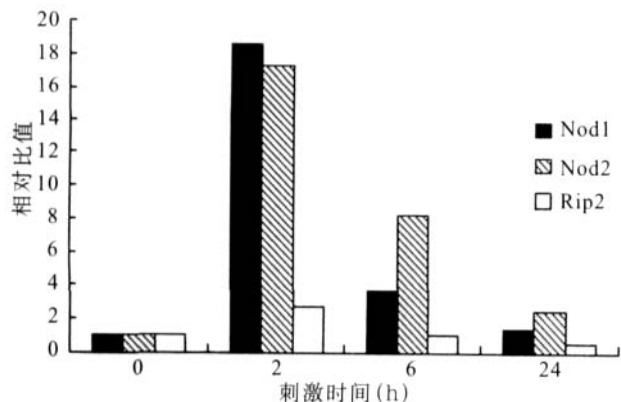


图2 牙龈卟啉单胞菌刺激牙髓细胞类型识别受体Nod1、Nod2以及信号转导分子Rip2 mRNA表达

Fig 2 The expressing level of Nod1, Nod2 and Rip2 mRNA infected by *P.gingivalis*

2.3 ELISA检测培养上清液中IL-6表达

ELISA检测培养上清液中IL-6表达见图3,由图3可见,人牙髓细胞基础表达IL-6。*P.gingivalis*活菌刺激人牙髓细胞后,培养上清液中IL-6的表达高于未刺激对照细胞。*P.gingivalis*活菌刺激人牙髓细胞1 h,IL-6水平表达开始增高,刺激后2 h表达出现下降,然后逐渐升高,持续至6 h,IL-6水平高于未受刺激组。

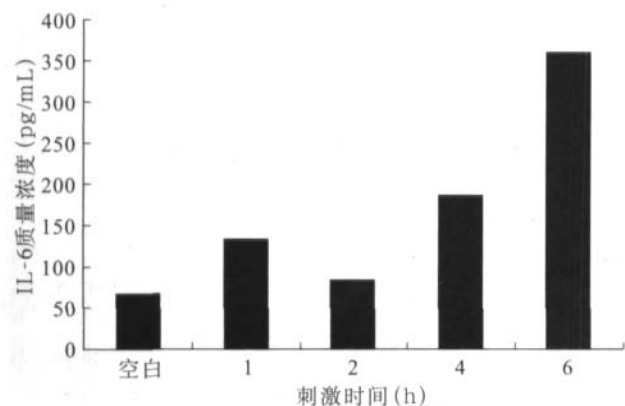


图3 不同时间牙龈卟啉单胞菌活菌刺激牙髓细胞IL-6的表达

Fig 3 The expressing level of IL-6 in human dental pulp cells infected by *P.gingivalis* in different periods

3 讨论

人宿主细胞固有免疫反应是机体防御外界微生物感染的第一道防线。当微生物刺激宿主细胞数分钟到数小时,宿主细胞通过类型识别受体对微生物识别,激活固有免疫反应产生细胞因子,清除微生物。当细菌胞内感染宿主细胞时,胞内类型识别受体Nod识别并启动信号转导通路产生免疫反应^[7]。

3.1 牙龈卟啉单胞菌能激活牙髓细胞胞内类型识别受体的表达上调

利用前期建立的牙龈卟啉单胞菌活菌攻击牙髓细胞体外模型^[3],观察活菌感染细胞后Nod1、Nod2 mRNA的表达水平,结果表明在活菌胞内感染牙髓细胞后Nod1、Nod2 mRNA的表达显著上调,并且随着刺激后时间的延长而减弱,而到刺激后24 h仍能检测到其表达的升高,证实了Nod1、Nod2在牙髓细胞对*P.gingivalis*活菌的识别中具有重要作用。特别是在*P.gingivalis*侵入细胞的早期,Nod1和Nod2转录水平的提高显示在细菌侵入的早期,牙髓即能对*P.gingivalis*进行识别和激活细菌入侵的信号,启动宿主的固有免疫系统功能,这对于牙髓组织对细菌的早期抵抗是非常重要的。

3.2 牙龈卟啉单胞菌能激活牙髓细胞固有免疫反应上调细胞因子IL-6表达

本实验研究结果显示牙髓细胞能表达IL-6。在*P.gingivalis*活菌刺激1 h后,IL-6水平即升高,刺激至6 h,IL-6水平仍高于未受刺激组,提示*P.gingivalis*通过牙髓细胞上调IL-6的表达,导致牙髓炎症反应的发生发展。这与其他学者研究^[8-10]结果一致,牙龈卟啉单胞菌能诱导人成纤维细胞产生炎症细胞因子IL-6。

Darveau等^[11]研究认为*P.gingivalis*侵袭宿主细胞表达细胞因子时,存在局限的化学因子麻痹(localized chemokine paralysis),这可能是由于*P.gingivalis*中脂多糖(lipopolysacchaid, LPS)^[12]、牙龈素^[13]除可以诱导宿主免疫反应外,亦能抑制细胞因子的表达,逃避宿主免疫防御机制。本实验研究结果显示*P.gingivalis*活菌刺激人牙髓细胞1 h,IL-6水平表达开始增高,刺激后2 h时表达出现下降,这可能与*P.gingivalis*的LPS、牙龈素降解产生的IL-6有关。

宿主抵御病原生物入侵的第一道防线是固有免疫,固有免疫的启动又调节和参与了适应性免疫^[14]。*P.gingivalis*活菌刺激细胞1 h,IL-6水平即升高,至刺激6 h,活菌组IL-6水平呈持续增长趋势。研究表明,活菌侵入细胞内行胞内感染,其早期就已启动牙髓组织固有免疫反应。经过初期阶段活菌在胞内持续感染,细胞因子表达持续增强,炎症反应进一步发展。这提示如果不能在牙髓炎症的早期就阻断炎症信号的转导,启动的固有免疫应答将调节适应性免疫应答,引导宿主级联反应,将会进展为广泛的不可逆的牙髓炎症。随着时间增加,活菌进入胞内后,不断进行生长繁殖,影响细胞活力,导致宿主细胞的生理功能受损,细胞因子产生下降,最后将死亡。

3.3 Rip2作为信号转导分子可能介导牙龈卟啉单胞菌诱导牙髓细胞产生IL-6

细菌进入宿主细胞时,启动细胞内Nod1和Nod2对细菌产生的肽聚糖进行识别,通过RICK/Rip2信号分子激活细胞核内转录因子NF- κ B转录,表达炎性细胞因子,该信号转导途径的RICK/Rip2是Nod识别细菌产生炎性细胞因子必不可少的分子^[15]。

本研究发现,均在刺激2 h时检测到牙髓细胞Nod1、Nod2和Rip2转录高峰,这表示*P.gingivalis*刺激细胞后,牙髓细胞的反应集中在接触刺激后2 h内,之后虽然细胞内仍然具有活菌,并且活菌的数量还在继续上升,但牙髓细胞针对细菌的特异信号通路的调控已经减弱。原因可能是由于随着细菌在胞内数量增加,牙髓细胞的活力逐渐下降所致。

*P.gingivalis*定植于口腔环境,通过不同途径攻击牙髓组织,且能诱导牙髓细胞表达炎性细胞因子,而宿主细胞对*P.gingivalis*的分子识别机制及其诱导炎性细胞因子表达的信号转导通路的研究,并不多见。本实验探讨了*P.gingivalis*对牙髓细胞表达IL-6的影响,结果证实牙龈卟啉单胞菌进入牙髓细胞内,通过Nod/Rip2途径诱导细胞表达IL-6。这一作用可能是牙髓根尖病变早期炎性细胞调控的重要机制,也是影响牙髓根尖病进程的重要因素之一。

【参考文献】

[1] 黄定明,凌均策,付春华,等.慢性根尖周炎感染根管内牙龈卟啉单胞菌和福赛斯拟杆菌的定植[J].上海口腔医学,2005,14(5):531-535.
HUANG Ding-ming, LING Jun-qi, FU Chun-hua, et al. Colonization relationship between *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* in the infected root canals with chronic apical periodontitis[J]. Shanghai J Stomatol, 2005, 14(5):531-535.

[2] Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, et al. Polymerase chain reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections[J]. J Endod, 2007, 33(9):1049-1052.

[3] 卢煜,罗世高,黄定明.牙龈卟啉单胞菌对牙髓成纤维细胞胞内感染的研究[J].华西口腔医学杂志,2008,26(1):87-89.
LU Yu, LUO Shi-gao, HUANG Ding-ming. Establishment of a model of intracellular infection on human dental pulp fibroblast

by *Porphyromonas gingivalis* in vitro[J]. West China J Stomatol, 2008, 26(1):87-89.

[4] Girardin SE, Travassos LH, Hervé M, et al. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2[J]. J Biol Chem, 2003, 278(43):41702-41708.

[5] Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from Gram-negative bacterial peptidoglycan[J]. Science, 2003, 300(6):1584-1587.

[6] Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide(MDP) detection[J]. J Biol Chem, 2003, 278(11):8869-8872.

[7] Inohara N, Nuñez G. Nods: Intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(5):371-382.

[8] Steffen MJ, Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis* induction of mediator and cytokine secretion by human gingival fibroblasts[J]. Oral Microbiol Immunol, 2000, 15(3):172-180.

[9] Tokuda M, Sakuta T, Fushuku A, et al. Regulation of IL-6 expression in human dental pulp cell cultures stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide[J]. J Endod, 2001, 27(4):273-277.

[10] Yang LC, Tsai CH, Huang FM, et al. Induction of interleukin-6 gene expression by pro-inflammatory cytokines and black-pigmented *Bacteroides* in human pulp cell cultures[J]. Int Endod J, 2003, 36(5):352-357.

[11] 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.

[12] Takii R, Kadowaki T, Baba A, et al. A functional virulence complex composed of gingipains, adhesins, and lipopolysaccharide shows high affinity to host cells and matrix proteins and escapes recognition by host immune systems[J]. Infect Immun, 2005, 73(2):883-893.

[13] Banbula AM, Bugno A, Kuster PC, et al. Rapid and efficient inactivation of IL-6 gingipains, lysine- and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 261(3):598-602.

[14] Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: Impact on the adaptive immune response[J]. Curr Opin Immunol, 1997, 9(1):4-9.

[15] Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD, et al. RICK/Rip2/CARDIAC mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems[J]. Nature, 2002, 416(3):194-199.

(本文编辑 汤亚玲)

《华西口腔医学杂志》被评为“中国精品科技期刊”

在国家科技部中国科学技术信息研究所12月9日举行的“2008中国科技论文统计结果发布会”公布了我国科技人员2007年在国内外发表论文数量和影响的统计分析结果,并首次在6000多种科技期刊中评选出300种中国精品科技期刊。教育部主管、四川大学主办的《华西口腔医学杂志》被评为“中国精品科技期刊”。

《华西口腔医学杂志》编辑部