

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.18.010

白介素-17在牙龈上皮细胞中调控趋化因子的机制研究*

冯艳^{1,2} 姜日文¹ 于龙¹ 华泽权^{2Δ}

(1 解放军第208医院461临床部 吉林 长春 130021; 2 沈阳军区总医院 辽宁 沈阳 110016)

摘要 目的:有研究发现白介素-17(IL-17)作为炎症反应的重要标志物在炎症反应中具有重要作用,并且其表达水平的高低与牙周疾病的严重程度有着正相关性,但是目前为止白介素-17对于牙龈上皮细胞的趋化因子生成的影响尚没有研究,所以本课题主要探索在牙龈上皮细胞(human gingival epithelial cells, HGECS)中白介素-17如何通过趋化因子调控炎症反应,并进一步探究其作用机制。**方法:**酶联免疫吸附剂测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)观察细胞中相关趋化因子分泌,同时蛋白印迹法(western blot)观察细胞中核转录因子 κ B的变化。**结果:**无IL-17刺激组与IL-17刺激组比较,IL-17刺激组的趋化因子白介素8(CXCL8)分泌量显著性增加而另一趋化因子单核细胞趋化蛋白-1(CCL2)却没有显著变化,并且通过磷酸化I κ B的表达量显著性增加提示NF- κ B被激活($P<0.05$);同时IL-17刺激组与IL-17+NF- κ B抑制剂组比较,IL-17+NF- κ B抑制剂组的CXCL8分泌量显著降低,而通过磷酸化I κ B的表达量显著减少提示NF- κ B的活性被抑制($P<0.05$)。**结论:**NF- κ B对IL-17刺激下的牙龈上皮细胞趋化因子的表达调控具有关键性作用,同时可能也为将来治疗IL-17诱导的牙周炎症性疾病提供了新的靶点。

关键词:白介素-17;白介素-8;单核细胞趋化蛋白-1;NF- κ B

中图分类号:Q-93-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)18-3438-03

Effect of Interleukin-17 on the Expression of Chemokines in Gingivalepithelial Cells*

FENG Yan^{1,2}, JIANG Ri-wen¹, YU Long¹, HUA Ze-quan^{2Δ}

(1 The 461 Clinical Division of PLA No. 208 Hospital, Changchun, Jilin, 130021, China;

2 General Hospital of Shenyang Military Region of PLA, Shenyang, Liaoning, 110016, China)

ABSTRACT Objective: The role of interleukin (IL)-17 in cellular communication in inflammation has been well described, and a positive correlation between the severity of periodontitis and the level of IL-17 was reported. Although epithelial cells are a major target of IL-17, little is known about the effect of IL-17 on the production of chemokines by human gingival epithelial cells (HGECS). The effects and the mechanism of IL-17 have been evaluated on the expression of CXCL8 and CCL2 by HGECS. **Methods:** After IL-17 stimulated the human gingival epithelial cells, We evaluated the effects of IL-17 on the expression of CXCL8 and CCL2 by HGECS using ELISA. In addition, the role of the nuclear factor (NF)- κ B signalling pathway in the IL-17-mediated expression of chemokines was assessed using a specific inhibitor by WESTERN BOLT. **Results:** Comparing no stimulation of IL-17 group with under stimulation of IL-17 group, the secretion of CXCL8 protein had significantly increased. And the protein expression of p-I κ B significantly increased indicate the activation of NF- κ B ($P<0.05$). Meanwhile, comparing stimulation of IL-17 group with stimulation of IL-17 plus the inhibitor of NF- κ B group, the secretion of CXCL8 protein had significantly decreased. And the protein expression of p-I κ B significantly decreased indicate the inhibition of NF- κ B ($P<0.05$). **Conclusion:** IL-17 is involved in the regulation of the innate immune response in HGECS by inducing CXCL8 production and the NF- κ B signalling pathway is involved, while it provides a new target for treatment of periodontitis induced by IL-17.

Key words: IL-17; CXCL8; CCL2; NF- κ B

Chinese Library Classification: Q-93-33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)18-3438-03

前言

牙龈上皮细胞除了具有抵御细菌感染的机械损伤的物理屏障作用外,其在调控先天性免疫反应和适应性免疫反应中也具有重要的作用^[1]。细菌和内源性物质在牙龈上皮细胞中分别

通过 Toll 样受体和特异的受体诱导产生多种促炎症因子^[2-5]和趋化因子^[6,7]。白介素 8 和单核细胞趋化蛋白 1 是牙龈上皮细胞产生的最主要的两个趋化因子,而 T 细胞起源的细胞因子,如干扰素 γ 可以调控趋化因子的表达^[8]。因此,在牙龈上皮细胞中适应性免疫反应可以调控先天性免疫反应。但是,这个调控的

* 基金项目:辽宁省科技攻关项目(201207223)

作者简介:冯艳(1973-),主治医师,主要研究方向:儿牙,牙体牙髓病的治疗

Δ 通讯作者:华泽权,电话:024-2453426, E-mail: pengchengfei2000@126.com

(收稿日期:2013-12-15 接受日期:2014-01-12)

过程以及调控的相关因子还不甚清楚。

白介素-17 属于新近发现的细胞因子家族,这个家族在联系先天性免疫与适应性免疫中具有重要的作用。其在细胞组织诱导的先天性免疫反应中与受体结合后诱导多个基因的表达,包括促炎症趋化因子、细胞因子和多个其他介质,涉及对抗细菌感染,组织重塑,启动炎症反应等。因此由于白介素-17 的这些生物活性,尤其是促炎症趋化因子生成,白介素-17 家族在牙周疾病的发病机制研究中一直是人们关注的焦点^[9]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验细胞与试剂 人牙龈上皮细胞系 epi4 是由吉林大学提供,参胎牛血清由美国 GIBCOBRL 公司提供;DMEM 培养基由美国 GIBCOBRL 公司提供;胰蛋白酶由美国 Sigma 公司提供,抗 p-IκB 与 T-IκB 由 Sigma 公司提供。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞培养 人牙龈上皮细胞系 epi4 培养于角化细胞特异性培养液(Humedia KG2)。

1.2.2 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测 IL-17 刺激人牙龈上皮细胞后的 CXCL8 与 CCL2 分泌:人牙龈上皮细胞用 Humedia KG2 细胞培养液培养于 96 孔板中至亚融合。实验前将人牙龈上皮细胞膜泡以 DMEM 稀释,使膜泡终浓度为 50μg/ml。将细胞培养于含有膜泡的 DMEM 中 12h 后以 ELISA 试剂盒检测上清中 CXCL8 与 CCL2。

1.2.3 蛋白印迹分析(Western blot) 检测 p-IκB 和 T-IκB 的表达,人牙龈上皮细胞以 DMEM 培养于 6 孔板中至亚融合。以 IL-17 刺激 12h 后,以 Trion- 裂解缓冲液处理细胞,收集细胞裂解液。蛋白样品经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转印于聚偏氟乙烯膜上。先后与 p-IκB 或 T-IκB 一次抗体及辣根过氧化物酶标记的二抗杂交后显影成像。

1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数±标准误($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS17.0 软件处理数据,两组间均数比较用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 无 IL-17 刺激以及 3 个浓度 IL-17 刺激 12h 后,人牙龈上皮细胞的 CXCL8 与 CCL2 分泌检测

无 IL-17 刺激以及 3 个浓度的 IL-17 刺激 12h 后,人牙龈上皮细胞分泌的 CXCL8 与 CCL2 的检测结果(图 1)。因为牙龈细胞中趋化因子的产生是先天性免疫反应最主要的功能,所以我们选择了 CXCL-8 与 CCL-2 两个最重要的趋化因子在 IL-17 刺激 epi4 细胞后的进行检测分析。结果显示:人牙龈细胞中的 CXCL-8 随着 IL-17 浓度的增加而逐渐增加,具有明显的剂量依赖效应。而 CCL-2 却在 IL-17 刺激后几乎没有分泌。

2.2 IL-17 刺激人牙龈上皮细胞的 CXCL8 的分泌可能是通过 NF-κB 信号通路

NF-κB 与 IκB 在胞浆中以三聚体方式结合存在,而 NF-κB

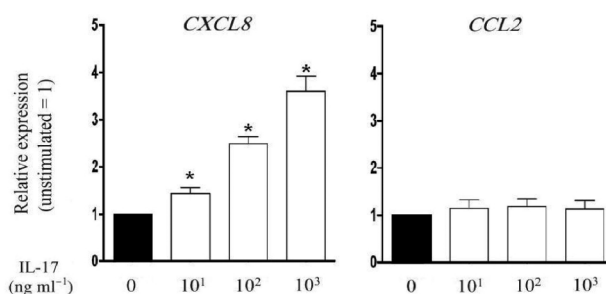


图 1 人牙龈上皮细胞 IL-17 刺激后的 CXCL8 与 CCL2 的分泌

Fig. 1 Effect of stimuli on HGECS production of CXCL8 and CCL2

注: $P<0.05$ 。实验重复三遍

Note: * $P<0.05$ N=3

的活化则需要 IκB 的磷酸化^[10],所以实验选择观察 IL-17 刺激 epi4 细胞后的磷酸化 IκB 的变化来分析 NF-κB 是否活化。结果发现:IL-17 刺激 epi4 细胞后诱导磷酸化 IκB 增加(图 2),说明 IL-17 可能是通过激活 NF-κB 信号通路诱导 CXCL8 的分泌。

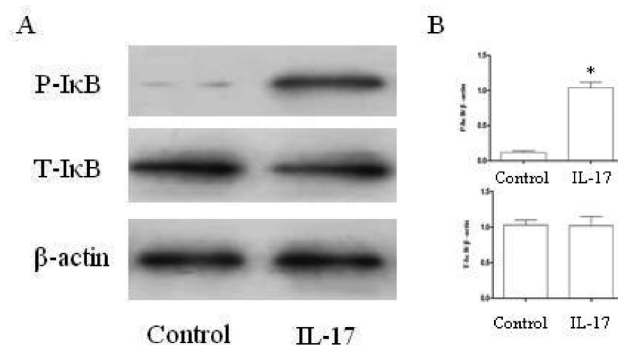


图 2 人牙龈上皮细胞蛋白印迹分析图

A: 2 组细胞中 p-IκB 和 T-IκB 的比较 WESTERN BLOT 图,β-actin 是内参。B: 统计分析图。数据采用均数±标准误(±SE)表示

Fig. 2 Expression of the P-IκB and IκB

Result are meas±SE. The group of IL-17 compare with the group of control

注: $P<0.05$ 。实验重复三遍

Note: * $P<0.05$ N=3

3 讨论

越来越多的证据表明白介素-17 在调控内环境平衡以及上皮细胞的屏障功能中具有重要的作用^[11]。白介素-17 可以保护机体免受微生物的感染侵袭,但同时它也是一些炎症性疾病的重要病理因素,例如:牛皮癣、哮喘以及炎症性肠道疾病。在牙周炎的一些研究中已经报道过,辅助性 T 细胞 17 作为产生白介素 17 的主要细胞,在牙周炎组织明显比健康以及牙龈炎组织有明显的增加^[12-17]。除此之外,在牙周炎患者的牙龈组织和龈沟液中白介素 17 是有所增加的。然而,白介素 17 在牙周炎病变中的作用还不甚清楚。鉴于白介素 17 在其他上皮细胞中的作用,白介素 17 在人牙龈上皮细胞与 T 细胞之间的作用可能与牙周疾病的发病机制有关。

除了作为一种物理屏障,牙龈上皮细胞诸如白介素 8 以及单核细胞趋化蛋白 2 的分泌,是对抗牙周细菌侵袭的重要保护机制。人牙龈上皮细胞分泌的白介素 8 调控嗜中性粒细胞在感

染部位的跨膜迁移和积聚^[18]。同样的,牙龈上皮细胞生成的单核细胞趋化蛋白 2 诱导单核细胞和巨噬细胞在相关结缔组织的积累,进而刺激适应性免疫应答^[19]。

在我们的研究中发现,白介素 17 可以诱导人牙龈上皮细胞白介素 8 的分泌,并且具有剂量依赖效应,但是对于单核细胞趋化蛋白 2 的分泌却没有作用。然而,在前期的研究中却报道过,单核细胞趋化蛋白 2 是白介素 17 的目标靶基因,在骨细胞^[20]、纤维细胞^[21]和多种上皮细胞^[22,23]中白介素 17 刺激后上调单核细胞趋化蛋白 2 的表达。究其原因,则可能是由于人牙龈上皮细胞的细胞特异性导致的。与此同时,白介素 17 调控白介素 8 的分泌的机制则是通过激活了 NF- κ B 信号通路。而 NF- κ B 作为核转录因子几乎存在所有类型的组织细胞中,激活后参与许多基因的调控,在免疫、炎症、氧化应激、细胞增殖和细胞凋亡等生理病理过程中发挥作用。

综上所述,本研究发现一旦牙龈损伤白介素 17 在牙龈上皮细胞中首先通过生成大量的白介素 8 激活先天性免疫反应。但是,与白介素 8 一样受白介素 17 的调控不同,单核细胞趋化蛋白 2 在牙龈上皮细胞并不受白介素 17 的调控,其具体机制、原因还需要进一步研究,然而在之前研究中发现一些其他细胞中单核细胞趋化蛋白 2 是受白介素 17 调控的。尽管研究的结果不相一致可能是由于不同的细胞不同的特性造成的,但是毕竟我们的研究是首次探讨白介素 17 在牙龈细胞中的生物学作用,同时也为将来临床治疗牙周炎症性疾病提供了新的靶点。

参考文献(References)

- [1] Becerik S, Ozsan N, Gurkan A, et al. Toll like receptor 4 and membrane-bound CD14 expressions in gingivitis, periodontitis and CsA-induced gingival overgrowth [J]. Arch Oral Biol, 2010, 56(5): 456-465
- [2] Eskin M, Hajishengallis G, Kinane D. Differential activation of human gingival epithelial cells and monocytes by Porphyromonas gingivalis fimbriae[J]. Infect Immun, 2007, 75(2):892-898
- [3] Kesavalu L, Chandrasekar B, Ebersole J. In vivo induction of proinflammatory cytokines in mouse tissue by Porphyromonas gingivalis and Actinobacillus actinomycetemcomitans [J]. Oral Microbiol Immunol, 2002, 17(3): 177-180
- [4] Njoroge T, Genco R, Sojar H, et al. A role for fimbriae in Porphyromonas gingivalis invasion of oral epithelial cells [J]. Infect Immun, 1997, 65(5): 1980-1984
- [5] Sandros J, Karlsson C, Lappin D, et al. Cytokine responses of oral epithelial cells to Porphyromonas gingivalis infection [J]. J Dent Res, 2000, 79(10): 1808-1814
- [6] Asai Y, Ohyama Y, Gen K, et al. Bacterial fimbriae and their peptides activate human gingival epithelial cells through Toll-like receptor 2 [J]. Infect Immun, 2001, 69(12): 7387-7395
- [7] Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K, et al. Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with Porphyromonas gingivalis via toll-like receptor 2[J]. J Periodontol, 2004, 75(3): 370-379
- [8] Uehara A, Sugawara S, Takada H. Priming of human oral epithelial cells by interferon to secrete cytokines in response to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans [J]. J Med Microbiol, 2002, 51(18): 626-634
- [9] Eyerich S, Eyerich K, Cavani A, et al. IL-17 and IL-22: siblings, not twins[C]. Trends Immunol, 2010, 31:354-361
- [10] Karin M, Y Ben-Neriah. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity [J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18: 621-663
- [11] Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, et al. IL-17 cytokine family [M]. J Allergy Clin Immunol, 2004, 114:1265-1273
- [12] Honda T, Aoki Y, Takahashi N, et al. Elevated expression of IL-17 and IL-12 genes in chronic inflammatory periodontal disease [J]. Clin Chim Acta, 2008,395(1-2):137-141
- [13] Johnson RB, Wood N, Serio FG. Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal disease [J]. J Periodontol, 2004,75(1): 37-43
- [14] Lester S, Bain J, Johnson R, et al. Gingival concentrations of interleukin-23 and -17 at healthy sites and at sites of clinical attachment loss[J]. J Periodontol, 2007,78: 1545-1550
- [15] Ohyama H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, et al. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis [J]. J Dent Res, 2009,88(7): 633-638
- [16] Takahashi K, Azuma T, Motohira H, et al. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease [J]. J Clin Periodontol, 2005,32(4): 369-374
- [17] Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, et al. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis [J]. J Clin Periodontol, 2005,32(4): 383-389
- [18] Madianos PN, Papapanou PN, Sandros J. Porphyromonas gingivalis infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration[J]. Infect Immun, 1997,65(10): 3983-3990
- [19] Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva[J]. J Clin Periodontol, 2005,32(Suppl 6):57-71
- [20] Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, et al. IL-17 cytokine family [C]. J Allergy Clin Immunol, 2004,114:1265-1273
- [21] Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva[J]. J Clin Periodontol, 2005,32(Suppl 6):57-71
- [22] Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, et al. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression[J]. J Leukoc Biol, 1994,56(5): 554-558