

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.28.014

丹皮酚对 TNF- α 诱导的人牙龈成纤维细胞黏附分子表达水平的影响

高菊荣 张春光 晁 洋 宋 扬 王慧媛

(解放军第 323 医院数字口腔中心 陕西 西安 710054)

摘要 目的:研究丹皮酚(Paeonol, Pae)对 TNF- α 诱导的人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblasts, HGF)黏附分子表达水平的影响。**方法:**使用 50 ng/mL 的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 诱导刺激人牙龈成纤维细胞,后分别加入浓度为 0、50、100、200 mmol/L 的 Pae 孵育培养 2、4、6 天后,用 Western blot 法检测细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule, ICAM)-1 以及血管细胞黏附分子(vascular cell adhesion molecule, VCAM)-1 的蛋白表达水平,用逆转录多聚酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测黏附分子的 mRNA 表达水平。**结果:**TNF- α 诱导的人牙龈成纤维细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 的蛋白和 mRNA 表达水平均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$);不同浓度的丹皮酚可显著降低 TNF- α 诱导的人牙龈成纤维细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 的蛋白和 mRNA 表达($P < 0.05$),且随 Pae 浓度的升高逐渐减少。当 Pae 浓度达到 100 mmol/L,蛋白和 mRNA 表达水平的抑制效果达到稳定程度($P > 0.05$),当 Pae 浓度达到 200 mmol/L 时,ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 抑制效果达到诱导前的水平($P > 0.05$)。诱导时间的长短对蛋白和 mRNA 表达水平抑制效果没有显著影响($P > 0.05$)。**结论:**丹皮酚可显著降低 TNF- α 诱导的人牙龈成纤维细胞黏附分子表达水平。

关键词:人牙龈成纤维细胞;牙周炎;黏附分子;丹皮酚

中图分类号:R781.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)28-5454-04

Influence of Paeonol on the Expression of Adhesion Molecules on Human Gingival Fibroblasts

GAO Ju-rong, ZHANG Chun-guang, CHAO Yang, SONG Yang, WANG Hui-yang

(Department of Stomatology, 323 Hospital of PLA, Xi'an, Shaanxi, 710054, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the influence of Paeonol on human gingival fibroblasts (HGF) stimulated by adhesion molecules. **Methods:** HGF were stimulated by 50 ng/mL tumor necrosis factor (TNF)- α , then different concentrations (0, 50, 100, 200 mmol/L) of Pae were added to the experimental group. The protein and mRNA expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 were examined by western blot and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** The protein and mRNA expression of ICAM-1 and VCAM-1 were increased by TNF- α stimulation ($P < 0.05$), while Pae inhibited the expression of ICAM-1 and VCAM-1 with the increase of Pae concentration ($P < 0.05$). There was no significant effect of inhibition on the expression of the protein and mRNA levels in induction time ($P > 0.05$). **Conclusion:** Paeonol had the potential to provide new method for the treatment of periodontal disease.

Key words: Human gingival fibroblasts; Periodontitis; Adhesion molecules; Paeonol

Chinese Library Classification(CLC): R781.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)28-5454-04

牙周炎是一种由牙周致病菌引起牙周组织破坏的慢性炎症,其主要特点是活性免疫细胞的转移和浸润,此过程是可控的,主要由 ICAM-1^[1]以及 VCAM-1^[2]等介导。这些免疫细胞可分泌肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)以及前列腺素 E2 等炎性因子,以 TNF- α 和 IL-1 β 与牙周炎症的关系最密切^[3]。人牙龈成纤维细胞具有维持牙周组织的作用,并可以调节机体的免疫反应^[4]。而牙龈成纤维细胞黏附分子的表达水平在牙周炎的治疗中具有重要作用。丹皮酚(Paeonol, Pae)是重要牡丹皮的重要活性成分,具有镇静、解热、抗炎、免疫调节以及抗氧化等药理特性^[5]。有研究显示,丹皮酚可以在体外抑制

血管内皮黏附分子的表达并且保护血管内皮的功能^[6]。本实验旨在研究丹皮酚对 TNF- α 刺激的人牙龈成纤维细胞黏附分子表达水平的影响和机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

丹皮酚(中国药品生物制品检定所,中国),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、小牛血清白蛋白、噻唑蓝(MTT)和重组人 TNF- α (Sigma 公司,美国),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Ptomega 公司,美国),Western blot 分析系统 (Amersham Biosciences 公司,英国),Westem 抗体 (Abcam 公司,英国),DMEM 培养基 (Gibco 公司,美国),CO₂ 培养箱(SANYO 公司,日本),PCR 仪、实时定量荧光 PCR 仪和酶标仪(Bio-Rad 公司,美国),倒置显微镜(Olympus 公司,日本)。

作者简介:高菊荣(1972-),女,本科,研究方向:口腔科管理,

E-mail:caffeyn@foxmail.com, Tel:029-84756138

(收稿日期:2013-12-19 接受日期:2014-01-16)

1.2 人牙龈成纤维细胞的提取和培养

在征得患者(3位男性,3位女性,年龄25~35岁)同意的基础上,收集拔除阻生牙时获得的正常牙龈组织。将组织用无血清DMEM培养液冲洗3次后,再将组织剪碎成为2 mm³大小的碎块,在CO₂培养箱(10% FBS、50 IU/mL青霉素、链霉素的DMEM培养液;37℃;5% CO₂;饱和湿度)中孵育。每日使用倒置显微镜观察组织细胞的形态和生长,当组织块贴壁后每两天半量换液,出现单层细胞融合后使用胰蛋白酶消化法(2%胰蛋白酶;0.2% EDTA)收集细胞,按1:2传代于新的培养瓶,取第4~6代的细胞用于本实验。

1.3 Western blot 分析

取30个T25培养瓶培养人牙龈成纤维细胞,分为P1、P2、P3、P4、P5五组,每组6瓶,P1为不加入TNF- α 的空白对照组,P2~P5组加入TNF- α ,终质量浓度调整为30 ng/mL,分别加入浓度为0、50、100、200 mmol/L的Pae 1 mL。分别于2d、4d、6d后收集细胞,每个时间点收集2瓶细胞,提取总蛋白质,各样本进行SDS-PAGE电泳,随后转移到聚偏氟乙烯(polyvinyl-

dene difluoride,PVDF)膜上,并在含5%脱脂奶粉的PBS缓冲液中孵育1h。然后加入1:250的兔抗-ICAM-1和羊抗-VCAM-1多克隆抗体,4℃孵育过夜。次日PBS洗涤后加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)偶联多克隆抗体IgG共同孵育1h。PBS洗涤3次后使用ECL化学发光剂检测特异性免疫结合。以GAPDH作为内参对照,在自显影胶片上曝光60s,蛋白条带经计算机图像扫描,进行灰度测定和分析,重复实验3次。

1.4 逆转录多聚酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)

取30个T25培养瓶培养人牙龈成纤维细胞,方法、分组同1.3,收集细胞后,采用Trizol法提取总RNA之后反转录成cDNA,并于-20℃保存。取1 μ g cDNA进行PCR扩增 real-time PCR检测,系统收集图像,以每例标本ICAM-1、VCAM-1与 β -actin条带灰度值比值作为该标本基因表达的相对值,重复实验3次。反应底物、扩增条件及引物设计见表1。

表1 PCR的反应底物、引物设计以及扩增条件

Table 1 The reaction substrate, primer design and amplification conditions on PCR process

Reaction substrate	Primer design	Amplification process
10 mmol/L dNTPs	ICAM-1 sequence	
	F:5'-ATCTGTGTCCCCCTCAAAAG-3'	ICAM-1(28) VCAM-1(28) GAPDH(25) cycle
	R:5'-GGTCTCTATGCCCAACAAC-3'	94℃ 30s denaturation
5 $\times$ 10 ⁻⁸ mmol/L Primer	VCAM-1 sequence	
	F:5'-TACAACCGTCTTGGTCAGCC-3'	60℃ 30s 59℃ 30s 55℃ 30s anneal
	R:5'-CCACAGGATTTTCGGAGCA-3'	72℃ 45s extension
2.5 U Taq polymerase 1.5 mmol/L MgCl ₂	GAPDH sequence	
	F:5'-GTCTTCACCACCATCGACAA-3'	72℃ 10min ending extension
	R:5'-ATCCACAGTCTTCTGGGTGC-3'	1% agarose gelelectrophoresis

1.5 统计学分析

采用SPSS 11.0软件进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析,两组之间的比较采用SNK-q检验,以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 丹皮酚对TNF- α 诱导的人牙龈成纤维细胞ICAM-1和VCAM-1蛋白表达水平的影响

如表2所示,TNF- α 诱导的人牙龈成纤维细胞ICAM-1和VCAM-1的表达水平均显著高于空白对照组(P2组与P1组相比,P<0.01),而加入丹皮酚后,ICAM-1和VCAM-1的表达较TNF- α 诱导的人牙龈成纤维细胞显著减少(P3、P4、P5组与P2组相比,P<0.05),表明Pae可以抑制TNF- α 诱导的ICAM-1和VCAM-1的蛋白表达。随着Pae浓度的升高,抑制效果更加显著(P4、P5组与P3组相比P<0.05),当Pae浓度达到100mmol/L,抑制效果达到稳定程度(P4与P5组相比,P>

0.05)。而诱导时间的长短对抑制效果没有显著影响(P>0.05)。

2.2 丹皮酚对TNF- α 诱导的人牙龈成纤维细胞ICAM-1和VCAM-1 mRNA表达水平的影响

如表3所示,TNF- α 诱导的人牙龈成纤维细胞ICAM-1和VCAM-1的mRNA表达水平均显著高于空白对照组(P2组与P1组相比,P<0.01),而加入丹皮酚后,ICAM-1和VCAM-1的mRNA表达较未加入Pae经TNF- α 诱导的人牙龈成纤维细胞显著减少(P3、P4、P5组与P2组相比,P<0.05),表明Pae可以抑制TNF- α 诱导的ICAM-1和VCAM-1的mRNA表达。随Pae浓度的升高,抑制效果更加显著(P4、P5组与P3组相比P<0.05),当Pae浓度达到100mmol/L,抑制效果同时达到稳定程度(P4与P5组相比,P>0.05),当Pae浓度达到200mmol/L时,ICAM-1和VCAM-1 mRNA抑制效果达到诱导前的水平(P5组与P1组相比,P>0.05)而诱导时间的长短对抑制效果没有显著影响(P>0.05)。

表 2 丹皮酚对 TNF- α 诱导的人牙龈成纤维细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白表达水平的影响Table 2 Effect of Pae on the protein expression of ICAM-1 and VCAM-1 induced by TNF- α in HGF

Group		P1	P2	P3	P4	P5
ICAM	2d	0.15 $\pm$ 0.027	0.83 $\pm$ 0.032 ^a	0.65 $\pm$ 0.025 ^{ab}	0.43 $\pm$ 0.026 ^{ab}	0.35 $\pm$ 0.024 ^{ab}
	4d	0.11 $\pm$ 0.019	0.78 $\pm$ 0.027 ^a	0.62 $\pm$ 0.021 ^{ab}	0.37 $\pm$ 0.033 ^{ab}	0.39 $\pm$ 0.032 ^{ab}
	6d	0.18 $\pm$ 0.022	0.81 $\pm$ 0.039 ^a	0.59 $\pm$ 0.034 ^{ab}	0.41 $\pm$ 0.028 ^{ab}	0.3 $\pm$ 0.029 ^{ab}
VCAM	2d	0.21 $\pm$ 0.026	0.88 $\pm$ 0.036 ^a	0.64 $\pm$ 0.029 ^{ab}	0.38 $\pm$ 0.021 ^{ab}	0.32 $\pm$ 0.028 ^{ab}
	4d	0.17 $\pm$ 0.031	0.81 $\pm$ 0.022 ^a	0.58 $\pm$ 0.024 ^{ab}	0.4 $\pm$ 0.039 ^{ab}	0.3 $\pm$ 0.027 ^{ab}
	6d	0.16 $\pm$ 0.025	0.8 $\pm$ 0.031 ^a	0.61 $\pm$ 0.039 ^{ab}	0.36 $\pm$ 0.022 ^{ab}	0.35 $\pm$ 0.02 ^{ab}

Note: a. compared with P1, P<0.05; b. compared with P2, P<0.05.

表 3 丹皮酚对 TNF- α 诱导的人牙龈成纤维细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达水平的影响Table 3 Effect of Pae on the mRNA expression of ICAM-1 and VCAM-1 stimulated by TNF- α in HGF

Group		P1	P2	P3	P4	P5
ICAM	2d	0.35 $\pm$ 0.018	0.91 $\pm$ 0.035 ^a	0.68 $\pm$ 0.028 ^{ab}	0.41 $\pm$ 0.029 ^{ab}	0.35 $\pm$ 0.025 ^a
	4d	0.3 $\pm$ 0.029	0.89 $\pm$ 0.021 ^a	0.72 $\pm$ 0.022 ^{ab}	0.47 $\pm$ 0.032 ^{ab}	0.38 $\pm$ 0.031 ^a
	6d	0.32 $\pm$ 0.026	0.93 $\pm$ 0.033 ^a	0.63 $\pm$ 0.032 ^{ab}	0.45 $\pm$ 0.021 ^{ab}	0.33 $\pm$ 0.024 ^a
VCAM	2d	0.39 $\pm$ 0.029	0.88 $\pm$ 0.039 ^a	0.61 $\pm$ 0.027 ^{ab}	0.48 $\pm$ 0.027 ^{ab}	0.44 $\pm$ 0.029 ^a
	4d	0.37 $\pm$ 0.032	0.91 $\pm$ 0.021 ^a	0.57 $\pm$ 0.023 ^{ab}	0.42 $\pm$ 0.023 ^{ab}	0.41 $\pm$ 0.022 ^a
	6d	0.32 $\pm$ 0.028	0.86 $\pm$ 0.038 ^a	0.63 $\pm$ 0.035 ^{ab}	0.45 $\pm$ 0.037 ^{ab}	0.39 $\pm$ 0.03 ^a

Note: a. compared with P1, P<0.05; b. compared with P2, P<0.050.

3 讨论

ICAM-1 和 VCAM-1 是重要的细胞黏附分子,正常生理情况下,HGF 仅表达微量的 ICAM-1 和 VCAM-1,其表达水平可以直接影响免疫细胞向牙周炎症组织内的浸润和转移,并影响牙周炎症的预后^[7]。丹皮酚($C_{15}H_{10}O_5$)是芍药科植物牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)的根皮、芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)的根中主要的药物活性成分,具有抗心律失常、抗动脉粥样硬化、保护缺血组织、促进微循环、提高免疫力、抗肿瘤、抗菌等多种药理作用^[8-10]。迄今为止,尚无研究报道 Pae 对牙周炎症中 HGF 的影响。本实验研究通过 TNF- α 诱导 HGF 模拟牙周炎,探讨 Pae 对 TNF- α 诱导的 HGF 黏附分子表达水平的影响。

有研究表明^[11,12],牙周炎的形成是通过多种炎症细胞因子对牙周组织进行持续刺激,在此过程中,TNF- α 是重要的炎症细胞因子之一,因为 TNF- α 的诱导可以使细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 的蛋白表达水平和 mRNA 表达水平均显著提高。有学者研究表明^[13],使用 TNF- α 阻滞剂可以减少炎症细胞向深层牙周结缔组织中浸润和转移,也说明了 TNF- α 在牙周病发生发展中的重要作用。而牙周炎的药物疗法主要是通过降低活性免疫细胞对牙周组织细胞血管的黏附,以达到控制牙周炎症的目的。

炎症因子的诱导刺激可使黏附分子的表达显著增强,加快免疫细胞的浸润和转移,从而使牙周炎症加剧^[14-17]。本实验中使用 TNF- α 诱导刺激 HGF 细胞,TNF- α 诱导的人牙龈成纤维细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 的蛋白和 mRNA 表达水平均显著高于空白对照组,而加入丹皮酚后,ICAM-1 和 VCAM-1 的蛋白和 mRNA 表达较 TNF- α 诱导的人牙龈成纤维细胞表达水平显著减少,表明 Pae 可以抑制 TNF- α 诱导的 ICAM-1 和 VCAM-1

的蛋白和 mRNA 表达。随 Pae 浓度的升高,抑制效果更加显著,当 Pae 浓度达到 100 mmol/L,蛋白和 mRNA 表达水平的抑制效果达到稳定程度,当 Pae 浓度达到 200 mmol/L 时,ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 抑制效果达到诱导前的水平,而诱导时间的长短对蛋白和 mRNA 表达水平抑制效果没有显著影响。此结果表明 Pae 可能通过减少 HGF 细胞 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达,阻止免疫细胞的浸润转移,进而促进牙周组织炎症愈合。

牙周病是口腔医学的主要疾病之一,迄今尚无有效的治疗手段,因此研究可行的治疗方法非常重要^[18,19]。由于牙周炎症多呈现慢性炎症的特点,中药^[20,21]以其成本低廉,副作用小的特点,是近年来牙周炎症治疗重要的组成部分。本研究的结果表明 Pae 能够降低 HGF 黏附分子蛋白和 mRNA 水平的表达,为牙周病的治疗提供了一颇具潜力的新方法。

参 考 文 献(References)

- [1] Murakami S, Shimabukuro Y, Saho T, et al. Immunoregulatory roles of adhesive interactions between lymphocytes and gingival fibroblasts [J]. J Periodontol Res, 1997, 32(1 Pt 2): 110-114
- [2] Murakami S, Okada H. Lymphocyte-fibroblast interactions [J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1997, 8(1): 40-50
- [3] Page R C, Offenbacher S, Schroeder H E, et al. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions [J]. Periodontol 2000, 1997, 14: 216-248
- [4] Luigi G, Adriana O, Assunta B M, et al. Human gingival fibroblast functions are stimulated by oxidized nano-structured titanium surfaces [J]. J Dent, 2013
- [5] Fan L, Song B, Sun G, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced resistance to Doxorubicin is reversed by paeonol treatment in human hepatocellular carcinoma cells[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62627

- [6] Yun C S, Choi Y G, Jeong M Y, et al. Moutan Cortex Radicis inhibits inflammatory changes of gene expression in lipopolysaccharide-stimulated gingival fibroblasts[J]. J Nat Med, 2013, 67(3): 576-589
- [7] Pabst A M, Happe A, Callaway A, et al. In vitro and in vivo characterization of porcine acellular dermal matrix for gingival augmentation procedures[J]. J Periodontal Res, 2013
- [8] Wang Y Q, Dai M, Zhong J C, et al. Paeonol inhibits oxidized low density lipoprotein-induced monocyte adhesion to vascular endothelial cells by inhibiting the mitogen activated protein kinase pathway[J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(5): 767-772
- [9] Zhang N, Li L, Wang P, et al. Pharmacokinetics of the main compounds absorbed into blood after oral administration of Liu Wei Di Huang Wan, a typical combinatorial intervention of Chinese medical formula[J]. J Nat Med, 2013, 67(1): 36-41
- [10] Li H, Wang S W, Zhang B L, et al. Simultaneous quantitative determination of 9 active components in traditional Chinese medicinal preparation ShuangDan oral liquid by RP-HPLC coupled with photodiode array detection [J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 56(4): 820-824
- [11] Bansal M, Rastogi S, Vineeth N. Influence of periodontal disease on systemic disease: inversion of a paradigm: a review [J]. J Med Life, 2013,6(2): 126-130
- [12] Chakraborty D S, Tewari D S, Sharma D R, et al. Effect of non-Surgical Periodontal Therapy on Serum Ferritin Levels: an Interventional Study[J]. J Periodontol, 2013
- [13] Andriankaja O M, Galicia J, Dong G, et al. Gene expression dynamics during diabetic periodontitis [J]. J Dent Res, 2012, 91 (12): 1160-1165
- [14] Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, et al. Oncostatin M synergistically induces CXCL10 and ICAM-1 expression in IL-1beta-stimulated-human gingival fibroblasts[J]. J Cell Biochem, 2010,111(1):40-48
- [15] Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, et al. Proinflammatory effects of tumour necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) on human gingival fibroblasts [J]. Clin Exp Immunol, 2006, 146 (3): 540-549
- [16] Chang L C, Kuo H C, Chang S F, et al. Regulation of ICAM-1 expression in gingival fibroblasts infected with high-glucose-treated P. gingivalis[J]. Cell Microbiol, 2013
- [17] Naim R, Braun T, Sauter A, et al. VCAM-1 increases levels of HGF in eosinophilic chronic rhinosinusitis cell culture [J]. In Vivo, 2008, 22(1): 77-81
- [18] Chatterjee A, Singh N, Saluja M. Gene therapy in periodontics [J]. J Indian Soc Periodontol, 2013, 17(2): 156-161
- [19] Herrera D, Matesanz P, Bascones-Martinez A, et al. Local and systemic antimicrobial therapy in periodontics[J]. J Evid Based Dent Pract, 2012, 12(3 Suppl): 50-60
- [20] Tu H P, Fu M M, Kuo P J, et al. Berberine's effect on periodontal tissue degradation by matrix metalloproteinases: an in vitro and in vivo experiment[J]. Phytomedicine, 2013
- [21] Xu Y Z, Zou H R, Wang X L, et al. Effects of Shuanghuangbu on the total protein content and ultrastructure in cultured human periodontal ligament cells[J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(11): 1693-1696

(上接第 5430 页)

- Zhang Jin-ling, Ma Xian-wen, Li Jia-hua, et al. RECK expression in giant cell tumor and its relationship with MMP-2[J]. J bone tumors of bone China, 2011, 10(2): 171-174
- [19] Steck P A, Pershouse M A, Jasser S A, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers [J]. Nat Genet,1997,15(4): 356-362
- [20] Chu E C, Tarnawski A S. PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology[J]. Med Sci Monit,2004,10(10):A235-A241
- [21] 陈述伟,杨述华,张劲松,等. PTEN、MMP-7、VEGF 在骨巨细胞瘤中的表达[J]. 肿瘤防治研究,2007, 34(4): 290-292
- Chen Shu-wei, Yang Shu-hua, Zhang Jin-song, et al. PTEN, MMP - 7, the expression of VEGF in giant cell tumor [J]. Journal of cancer prevention and control research, 2007, 34(4): 290-292
- [22] Mosakhani N, Pazzaglia L, Benassi M S, et al. MicroRNA expression profiles in metastatic and non-metastatic giant cell tumor of bone[J]. Histol Histopathol, 2013, 28(5): 671-678
- [23] Liu J, van Mil A, Agur E N, et al. MiR-155 inhibits cell migration of human cardiomyocyte progenitor cells (hCMPCs) via targeting of MMP-16[J]. J Cell Mol Med, 2012, 16(10): 2379-2386