

# 脂多糖通过促进透明质酸受体CD44向核转移介导牙周膜细胞白细胞介素6释放

徐燕群<sup>1</sup> 李平<sup>2</sup> 杨兴<sup>3</sup> 薛慧<sup>1</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学姑苏学院,南京医科大学附属苏州医院,苏州市立医院口腔科,苏州 215008; <sup>2</sup>南京医科大学姑苏学院,南京医科大学附属苏州医院,苏州市立医院中心实验室,苏州 215008; <sup>3</sup>南京医科大学姑苏学院,南京医科大学附属苏州医院,苏州市立医院骨科,苏州 215008

通信作者:薛慧,Email:huihui8277535@163.com

**【摘要】** 目的 初步探讨炎症状态下人牙周膜细胞(hPDLC)炎症反应的分子作用机制。方法 利用细胞免疫荧光法鉴定原代培养hPDLC波形丝蛋白、角蛋白,使用不同浓度(0、0.1、10和100  $\mu\text{mol/L}$ )的脂多糖(LPS)刺激hPDLC,流式细胞术检测细胞凋亡水平。选择不同的LPS刺激时间,酶联免疫检测方法(ELISA)检测细胞培养上清中透明质酸受体CD44的表达。使用ELISA、蛋白免疫印迹(Western blot)及细胞免疫荧光法等实验技术检测hPDLC在炎症环境下细胞质与细胞核中CD44、基质金属蛋白酶14(MMP-14)的表达变化,微量样本多指标流式蛋白定量技术(CBA)检测炎症因子的表达。进一步在炎症环境下加入MMP-14、Importin  $\beta$ 抑制剂,使用ELISA法检测细胞核内CD44的表达及定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测细胞白细胞介素6(IL-6) mRNA表达水平。结果 不同浓度(0.1、1、10、100  $\mu\text{mol/L}$ )LPS不会对hPDLC的凋亡产生影响。在1  $\mu\text{mol/L}$  LPS刺激hPDLC 4 h后,MMP-14荧光强度表达明显增强(233.75),对照组为107.53,差异有统计学意义( $t=10.10, P<0.001$ )。CD44荧光强度为106.7,对照组为84.58,差异有统计学意义( $t=3.13, P=0.02$ )。使用MMP-14抑制剂能够明显抑制细胞培养上清中CD44的表达,LPS+MMP-14抑制剂组较LPS组CD44表达明显下调,差异有统计学意义( $t=5.03, P=0.001$ )。LPS刺激hPDLC会导致细胞核内CD44与Importin  $\beta$ 表达量增加,差异有统计学意义( $P<0.001$ )。LPS刺激后细胞核内CD44与Importin  $\beta$ 也有上调表达的趋势,LPS会导致IL-6表达量增加,差异有统计学意义( $P<0.001$ ),并且LPS加入Importin  $\beta$ 抑制剂后细胞中IL-6 mRNA的表达量较LPS处理组明显减少,差异有统计学意义( $t=16.79, P<0.001$ )。结论 LPS能够导致hPDLC CD44、Importin  $\beta$ 与IL-6的上调表达,核内CD44上调表达显著,MMP-14、Importin  $\beta$ 抑制剂能够抑制炎症环境下CD44入核,抑制IL-6上调表达。提示在炎症状态下MMP-14与CD44参与hPDLC炎症反应,CD44能够向细胞核内转移介导IL-6的释放。

**【关键词】** 牙周炎; 人牙周膜细胞; 脂多糖; 透明质酸受体; CD44; 白细胞介素6

**基金项目:**江苏省科技计划专项资金(重点研发计划社会发展, BE2022737);苏州市科技发展计划(SYSD2020245、SYS2020177);苏州市第五批姑苏卫生人才培养项目(GSWs2019062);姑苏卫生人才培养项目(GSWs2020077);苏州市“科教兴卫”青年科技项目(KJXW2021039)

**引用著录格式:**徐燕群,李平,杨兴,等.脂多糖通过促进透明质酸受体CD44向核转移介导牙周膜细胞白细胞介素6释放[J/OL].中华口腔医学研究杂志(电子版),2023,17(5):335-344.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2023.05.004

**Lipopolysaccharide mediates interleukin-6 release from periodontal ligament cells by promoting hyaluronan receptor CD44 transfer to nuclear**

Xu Yanqun<sup>1</sup>, Li Ping<sup>2</sup>, Yang Xing<sup>3</sup>, Xue Hui<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Stomatology, Suzhou Municipal Hospital, The Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Gusu School, Nanjing Medical University, Suzhou 215008, China; <sup>2</sup>Department of Central Laboratory, Suzhou Municipal Hospital, The Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Gusu School, Nanjing Medical University, Suzhou 215008, China; <sup>3</sup>Department of Orthopedics,

Suzhou Municipal Hospital, The Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Gusu School, Nanjing Medical University, Suzhou 215008, China

Corresponding author: Xue Hui, Email: huihui8277535@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the molecular mechanism of inflammatory response in human periodontal ligament cells (hPDLs) under inflammatory conditions. **Methods** Vimentin and keratin were identified by immunofluorescence. hPDLs were stimulated with different concentrations (0, 0.1, 10, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) of lipopolysaccharide (LPS), and apoptosis was detected by flow cytometry. The expression of hyaluronan receptor CD44 in cell culture supernatant was detected by enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) after the LPS stimulation. The expression of CD44 and matrix metalloproteinase (MMP)-14 in the cytoplasm and nucleus of hPDLs in inflammatory environment was detected by ELISA, Western blot and cell immunofluorescence. The expression of inflammatory factors was detected by Cytometric Bead Array (CBA). Furthermore, MMP-14 and Importin  $\beta$  inhibitor were added in the inflammatory environment, and the expression of CD44 and interleukin-6 (*IL-6*) mRNA was detected by ELISA and RT-PCR, respectively. **Results** LPS did not affect the apoptosis of hPDLs at different concentrations (0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{mol/L}$ ). After 4 h stimulation with 1  $\mu\text{mol/L}$  LPS, the fluorescence intensity of MMP-14 in hPDLs significantly increased (233.75), while that in control group was 107.53, and the difference was statistically significant ( $t = 10.10, P < 0.001$ ). CD44 fluorescence intensity was 106.7 in the LPS group and 84.58 in the control group, and the difference was statistically significant ( $t = 3.13, P = 0.02$ ). MMP-14 inhibitor could significantly inhibit the expression of CD44 in cell culture supernatant, and the expression of CD44 in the LPS+MMP-14 inhibitor group was significantly lower than that in the LPS group, and the difference was statistically significant ( $t = 5.03, P = 0.001$ ). LPS stimulation of hPDLs increased the expression of CD44 and Importin  $\beta$  in the nucleus, and the difference was statistically significant ( $P < 0.001$ ). After LPS stimulation, the expression of CD44 and Importin  $\beta$  in the nucleus was also up-regulated. LPS increased the expression of *IL-6*, and the difference was statistically significant ( $P < 0.001$ ), and the expression of *IL-6* mRNA in the cells treated with LPS plus Importin  $\beta$  inhibitor was significantly lower than that in the LPS treatment group. The differences were statistically significant ( $t = 16.79, P < 0.001$ ). **Conclusions** LPS can up-regulate the expression of CD44, Importin  $\beta$  and *IL-6* in hPDLs. MMP-14 and Importin  $\beta$  inhibitor can inhibit the nuclear translocation of CD44 and the up-regulated expression of *IL-6* in inflammatory environment. These results suggested that MMP-14 and CD44 participated in the inflammatory response of hPDLs under inflammatory conditions, and CD44 can transfer to the nucleus and mediate the release of *IL-6*.

**【Key words】** Periodontitis; Human periodontal ligament cells; Lipopolysaccharide; Hyaluronan receptors; CD44; Interleukin-6

**Fund programs:** Program of Jiangsu Science and Technology Department (BE2022737); Suzhou Science and Technology Development Project (SYS2020245, SYS2020177); The Fifth Gusu Health Personnel Training Program of Suzhou (GSWS2019062); Gusu Health Personnel Training Program of Suzhou (GSWS2020077); Science and Technology Project of Ke Jiao Xing Wei (KJXW2021039)

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2023.05.004

牙周健康是牙齿维持正常功能的基础,进展性牙周炎破坏牙周组织环境并导致牙齿松动脱落<sup>[1]</sup>。人牙周膜细胞(human periodontal ligament cell, hPDL)作为牙周组织的重要组成部分,在牙周炎的进展和牙周组织的再生<sup>[2]</sup>,以及维持牙周微环境稳态方面发挥着重要的作用<sup>[3]</sup>。hPDL处于一个与细菌共存的特殊微环境中,牙周细菌不断干扰牙周防御系统,与宿主达成一个长期的动态平衡<sup>[4]</sup>。众所周知,牙周炎是公认的多因素慢性炎性疾病<sup>[5]</sup>,牙周组织

内的细菌失调是牙周组织疾病的起始因素<sup>[6]</sup>。细菌感染伴随着牙龈上皮细胞和牙周膜细胞大量释放促炎细胞因子和趋化因子,包括白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、趋化因子[(C-C motif)ligand-5, CCL-5]和CXC趋化因子配体-12(CXC chemokine ligand-12, CXCL-12)等<sup>[7]</sup>。这种促炎活性和细菌感染会引发先天免疫细胞的快速反应,包括自然杀伤(natural killer, NK)细胞、巨噬细胞、树突状细胞和中性粒细胞等<sup>[8]</sup>,最终

导致进展性牙周炎。而革兰氏阴性厌氧杆菌是牙周炎的主要致病菌,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是其细胞外膜的主要成分,是一种重要的毒力因子,口腔微生物产生的LPS被认为是牙周炎的主要原因<sup>[9]</sup>,可以刺激牙周组织产生多种炎症介质参与免疫反应,在牙周病的病理过程中发挥着重要作用<sup>[10-11]</sup>,对于细菌激活牙周膜细胞产生炎症因子的具体机制尚不清楚。

越来越多的证据表明,黏附分子不仅介导细胞黏附,而且参与信号传输到细胞中的各种过程。作为细胞主要的黏附分子,CD44在大多数类型细胞中表达,并涉及多项生理和病理进程,包括淋巴细胞归巢和激活、创面愈合、免疫细胞趋化和转移、调节肿瘤的细胞分裂和迁移等<sup>[12-13]</sup>。多项研究表明,CD44能向核内转导信号,Okamoto等<sup>[14]</sup>首次报道了CD44向核内转移并参与激活转录,并且细胞核质转运受体Importin  $\beta$ 被发现是CD44向核转移的转运蛋白<sup>[15]</sup>。CD44在核膜表面通过ERM(埃兹蛋白ezrin/根蛋白radixin/膜突蛋白moesin)与纤维型肌动蛋白F-actin链接,参与细胞的黏附与迁移<sup>[16]</sup>。基质金属蛋白酶14(matrix metalloproteinase-14, MMP-14)是一种定位在膜上的蛋白酶,能够结合细胞外基质酶,降解细胞外的基质成分<sup>[17]</sup>。IL-6和CD44水平之间存在显著的相关性。阻断IL-6/信号转导子和转录激活子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)信号通路能够减弱CD44的表达<sup>[18]</sup>。本研究通过使用LPS刺激hPDL,也发现CD44有向核转移的现象,并对其机制进行深入的研究,希望找到相关通路并进行干预。

## 材料与方法

### 一、伦理声明

本研究获得了南京医科大学医学伦理委员会审核批准(伦审批第K2016051号)。对于实验中涉及的人体样本,均获得所有患者和健康志愿者书面签署的知情同意书。所有的实验方法都是按照批准的指导方针进行的。

### 二、牙周膜细胞的原代培养

选取2022年1—9月在苏州市立医院口腔科就诊的12~15岁患者,获取由于正畸需求拔除的双尖牙(无牙周疾病),立即置于0.9%氯化钠溶液中浸泡,于超净工作台中使用于0.9%氯化钠溶液冲洗离体牙上残留的血液。使用解剖刀片刮取牙根1/3处的牙

周膜组织,置于含500  $\mu\text{L}$  I型胶原酶(C8140;北京索莱宝生物科技有限公司)的1.5 mL离心管中,每隔5 min涡旋振荡1次,在37  $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中消化30 min。离心,弃上清,使用含10%血清和青霉素链霉素双抗(100 U/mL)的DMEM高糖培养基(SH30243.01, HyClone, 美国)重悬沉淀组织,于60 mm培养皿中在37  $^{\circ}\text{C}$ 含5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养,直至原代细胞爬出。待细胞生长密度增至覆盖皿底80%左右,弃培养液,使用磷酸盐缓冲液(PBS)轻轻冲洗,胰酶消化细胞,离心弃去胰酶后使用DMEM完全培养基对细胞进行传代培养,使用细胞免疫荧光法鉴定波形丝蛋白Vimentin(abs130228, 上海爱必信生物科技有限公司)与角蛋白CK14(60320-1-1g, 武汉三鹰生物技术有限公司)表达来确定细胞来源。

### 三、流式细胞术检测细胞蛋白表达

取第四代hPDL约 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔于6孔细胞培养板中培养过夜。1  $\mu\text{mol/L}$  LPS(HY-D1056, MCE, 美国)刺激4 h后使用无菌的EP管收集对照组(0  $\mu\text{mol/L}$  LPS组)及1  $\mu\text{mol/L}$  LPS组细胞,使用预冷过的PBS清洗细胞2遍,25  $^{\circ}\text{C}$ , 400  $\times g$ 离心5 min。然后用预先配置好的MMP-14(FAB9181G, NOVUS, 美国)和CD44(F10-44-2, 武汉三鹰生物技术有限公司)流式抗体100  $\mu\text{L}$ ,轻柔重悬细胞,混匀后避光,在室温下孵育30 min。再次使用PBS清洗细胞2遍,25  $^{\circ}\text{C}$ , 400  $\times g$ 离心5 min。最后使用300  $\mu\text{L}$  PBS重悬细胞,在流式细胞仪上选择相应激发光检测细胞表面MMP-14及CD44的表达量及变化。继续使用300  $\mu\text{mol/L}$ 的MMP-14活性抑制剂(NSC 405020, MCE, 美国)预孵育hPDL,分别检测对照组、1  $\mu\text{mol/L}$  LPS组及LPS+MMP-14抑制剂组CD44的表达。

### 四、流式细胞术检测人牙周膜细胞凋亡

对第四代hPDL进行不同浓度(0、0.1、1、10和100  $\mu\text{mol/L}$ )LPS刺激4 h后使用无菌管收集 $1 \times 10^5$ 个细胞。用预冷过的PBS清洗细胞2遍,25  $^{\circ}\text{C}$ , 400  $\times g$ 离心5 min,弃去EP管中的上清液。使用细胞凋亡检测试剂盒(556547 Annexin V, BD, 美国)每管加入100  $\mu\text{L}$ 预先配置的流式抗体(100  $\mu\text{L}$  binding buffer + 5  $\mu\text{L}$  Annexin-V),轻柔重悬细胞并在避光条件下室温孵育15 min,再次加入300  $\mu\text{L}$  binding buffer重悬细胞,在流式细胞仪上选择相应的激发光检测死亡率,统计各组碘化丙啶(propidium iodide, PI)平均荧光强度。

### 五、细胞免疫荧光染色

使用24孔板,底部铺相应直径的圆形细胞爬

片,每孔内加入 $1\sim 2\times 10^5$ 个细胞左右, $1\ \mu\text{mol/L}$  LPS处理4 h后,对照组( $0\ \mu\text{mol/L}$  LPS组)及 $1\ \mu\text{mol/L}$  LPS组细胞使用PBS清洗3遍。室温下,每孔加入 $500\ \mu\text{L}$ 的4%多聚甲醛(BL539A,安徽白鲨生物科技有限公司),固定细胞15 min,清洗3遍。每孔加入 $500\ \mu\text{L}$   $0.1\%$  Triton X-100(P0096,上海碧云天生物技术有限公司),通透细胞10 min,清洗3遍。每孔加入 $200\ \mu\text{L}$  5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA),封闭细胞1 h,清洗3遍。接着根据试剂说明书推荐的免疫荧光染色比例,每孔加入 $500\ \mu\text{L}$ 的一抗稀释液(波形丝蛋白、角蛋白、CD44及Importin  $\beta$ 蛋白), $4\ ^\circ\text{C}$ 摇床孵育过夜,孵育结束后PBST清洗细胞3~5遍。在每孔加入与一抗种属相对应的荧光二抗,羊抗兔(ab150077, Abcam, 英国),羊抗鼠(ab150116, Abcam, 英国),使用5% BSA按说明书稀释,室温摇床避光孵育1 h,随后PBST轻柔清洗细胞3~5遍。将圆形玻片取出至载玻片,使用封片液固定圆形玻片四周,将载玻片置于激光共聚焦显微镜下观察拍摄图像进行分析。

#### 六、检测细胞培养上清中炎症因子表达

收集对照组( $0\ \mu\text{mol/L}$  LPS组)及 $1\ \mu\text{mol/L}$  LPS组hPDLC培养上清,根据BDTM微量样本多指标流式蛋白定量技术(BDTM Cytometric Bead Array, CBA, 美国)人Th1/Th2/Th17细胞因子试剂盒说明书,将每种捕获珠各 $5\ \mu\text{L}$ 混合在一起。 $200\times g$ 离心5 min后,轻弃上清液,用等量serum enhancement buffer重悬,混合捕获珠室温孵育避光30 min。在流式管中加入 $25\ \mu\text{L}$ 珠子+ $25\ \mu\text{L}$ 样品+ $25\ \mu\text{L}$ 抗体(Reagent),室温下避光孵育3 h。然后,在每个样品中加入1 mL洗涤缓冲液,在 $200\times g$ 离心5 min,小心丢弃上清液。每个样品中加入 $300\ \mu\text{L}$ 洗涤缓冲液,使用流式细胞仪(BD FACS Canto II, 美国)收集细胞培养上清中炎症因子IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、 $\gamma$ 干扰素(interferon-gamma, IFN- $\gamma$ )和IL-17A表达的数据。

#### 七、核蛋白提取

使用NE-PER(R) Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents(78833, Thermo, 美国)试剂盒提取hPDLC的细胞核与细胞质。 $1\ \mu\text{mol/L}$  LPS刺激hPDLC 24 h后,分别收集对照组( $0\ \mu\text{mol/L}$  LPS组)、 $1\ \mu\text{mol/L}$  LPS组 $2\times 10^6$ 个细胞,加入 $200\ \mu\text{L}$  CER I,重悬细胞充分混匀,冰上孵育10 min。继续向EP管加入 $11\ \mu\text{L}$  CER II,重悬细胞充分混匀,冰上孵育1 min。重悬细胞充分混匀,在 $4\ ^\circ\text{C}$ 条件下 $16\ 000\times g$

高速离心5 min。立即将EP管中的上清(胞质蛋白)移至新的EP管中,放置在 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱内保存待用。用预冷的NER重悬离心后的沉淀物,冰上孵育,每10 min重悬1次,共孵育40 min。在 $4\ ^\circ\text{C}$ 条件下, $16\ 000\times g$ 高速离心10 min,立即取EP管中的上清(核蛋白)移至新的EP管中, $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中保存待用。

#### 八、酶联免疫吸附剂测定(ELISA)法

使用 $1\ \mu\text{mol/L}$  LPS分别处理第四代hPDLC 0、1、2、3和4 h后收集细胞培养上清,分离细胞核与细胞质,分别检测CD44的表达。加入 $10\ \mu\text{mol/L}$  MMP-14抑制剂(NSC 405020, MCE, 美国)后,收集对照组( $0\ \mu\text{mol/L}$  LPS组)、 $1\ \mu\text{mol/L}$  LPS组及LPS+MMP-14抑制剂组细胞培养上清检测CD44的表达。使用 $10\ \mu\text{mol/L}$  转运蛋白Importin  $\beta$ 抑制剂(Importazole, HY-101091, MCE, 美国)预孵育hPDLC,检测对照组、 $1\ \mu\text{mol/L}$  LPS组、Importin  $\beta$ 抑制剂组及LPS+Importin  $\beta$ 抑制剂组细胞培养上清中CD44的表达。 $1\ \mu\text{mol/L}$  LPS处理hPDLC,检测对照组、 $1\ \mu\text{mol/L}$  LPS组细胞培养上清中IL-6的表达。准备好所有实验试剂、CD44(ab45912, Abcam, 英国)及IL-6(EK106, 杭州联科生物技术股份有限公司)的标准品、当次实验所需数量的孔板条。每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 检测抗体。使用封板膜封板,防止孔内液体因渗出或蒸发而丢失,室温条件下,孵育2 h;洗涤3遍。每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素,室温条件下,孵育20 min;洗涤3次;加底物显色:每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 显色底物TMB室温并且避光孵育5~30 min,加终止液:显色最佳状态下立即在每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 终止液,孔内液体颜色由蓝色变为黄色,如变色不明显可轻轻叩击板框,使终止液与孔内液体充分混匀;检测读数:终止反应后,尽快使用酶标仪进行双波长检测(30 min内),测定 $450\ \text{nm}$ 最大吸收波长的吸光度值( $A_{450}$ )。构建相应检测指标各自的标准曲线,并计算出各组样品相应的浓度。

#### 九、蛋白免疫印迹法(Western blot)

$1\ \mu\text{mol/L}$  LPS处理hPDLC 24 h后,使用RIPA裂解液收集对照组( $0\ \mu\text{mol/L}$  LPS组)及 $1\ \mu\text{mol/L}$  LPS组细胞蛋白,取出 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冻存的核质蛋白,加入蛋白 $5\times$  Loading Buffer(上海碧云天生物技术有限公司), $100\ ^\circ\text{C}$ 煮5 min。制备10%的聚丙烯酰胺蛋白凝胶(PG112, 上海雅酶生物医药科技有限公司),加样,

电压 70 V 条件下跑至 Marker 各条带分离。后加压至 110 V 直至实验完成。准备 PVDF 膜(Millipore, 美国)进行转膜,使用 5%脱脂奶粉进行 PVDF 膜封闭,孵育 CD44(15675-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司), Importin  $\beta$  (E1F1G, CST, 美国), GAPDH (D16H11, CST, 美国)一抗过夜,使用 PBST 洗膜 3 次,孵育相应羊抗兔二抗(GAR007, 杭州联科生物技术股份有限公司)室温孵育 1 h,使用 PBST 洗膜 3 次,制备 ECL 发光液(180-501;上海天能生命科学有限公司),使用蛋白曝光仪(5200Multi;上海天能生命科学有限公司)检测蛋白表达强度。

#### 十、RNA 提取、反转录与实时荧光定量 PCR

使用 1  $\mu\text{mol/L}$  LPS 处理 hPDLC 4 h 后,加入 Importin  $\beta$  抑制剂,使用 1 mL Trizol 收集对照组(0  $\mu\text{mol/L}$  LPS 组)、LPS 组、Importin  $\beta$  抑制剂组及 LPS+Importin  $\beta$  抑制剂组细胞,加入 200  $\mu\text{L}$  三氯甲烷,混匀后静置 5 min,4  $^{\circ}\text{C}$  12 000  $\times g$  离心 10 min。取上清,加入同比例的异丙醇,混匀后室温静置 30 min,4  $^{\circ}\text{C}$  12 000  $\times g$  离心 10 min。弃上清,加入 75%乙醇溶液,4  $^{\circ}\text{C}$  12 000  $\times g$  离心 10 min。小心吸弃乙醇,自然风干 10 min。加入适量的无 RNA 酶水。使用超微量分光光度计 Nanodrop Lite(Thermo, 美国)测量 RNA 浓度。使用反转录试剂(RR036A, TaKaRa, 日本)将 RNA 反转录为 cDNA。SYBR Premix Ex Taq 实时荧光定量试剂(RR820A, TaKaRa, 日本)进行荧光定量 PCR 检测 *IL-6* mRNA 表达,*IL-6* 序列为:正向 5'-AGACAGCCACTCACCTCTTC-3',反向 5'-AGTGCCTCTTTGCTGCTTTC-3';内参为:细胞骨架

蛋白  $\beta$ -actin(ACTB),序列为:正向 5'-CACGAAAC TACCTTCAACTCC-3',反向 5'-CATACTCCTGCTTG CTGATC-3'。总反应体系为 20  $\mu\text{L}$ :SYBR Premix Ex Taq II (2 $\times$ ) 10  $\mu\text{L}$ ,双蒸水 6.4  $\mu\text{L}$ ,正反向引物各 0.8  $\mu\text{L}$ ,cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ ,每组设 3 个平行,于 Light Cycler480 II (罗氏,美国)进行定量 PCR 扩增反应。扩增条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s;95  $^{\circ}\text{C}$  反应 5 s 和 60  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 s,循环 40 次;95  $^{\circ}\text{C}$  反应 5 s 和 60  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 min,95  $^{\circ}\text{C}$  分析溶解曲线。根据  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  方法计算 *IL-6* 基因的相对表达量。

#### 十一、统计学处理方法

使用 Graph Pad 7.0 进行数据统计分析。采用重复测量资料的数据进行 One-Way ANOVA 单因素方差分析。若方差齐则采用 Dunnett's 法进行实验组与对照组间差异比较;若方差不齐,则采用 Dunnett's T3 方法进行组间差异比较。实验中两组间均数采用重复测量,在每个时间点采用独立样本非配对 *t* 检验进行比较, $P < 0.05$  为组间统计差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、人牙周膜细胞的鉴定

hPDLC 为长梭形,形态均一,核圆形(图 1A~1B)。细胞生长速度较快,每 2~3 天传代 1 次。免疫荧光结果显示,原代培养的 hPDLC 波形丝蛋白染色阳性(图 1C)、角蛋白阴性(图 1D),符合牙周膜的生物学特性,结合细胞来源可以判定原代细胞培养成功,可以用于后续的研究。

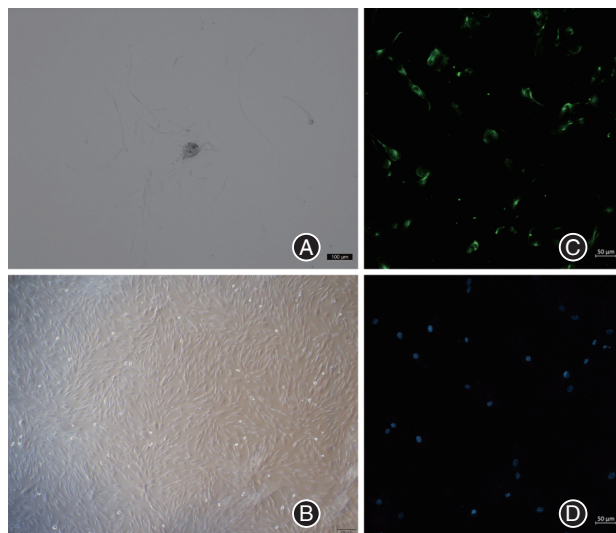


图1 人牙周膜细胞(hPDLC)形态观察与鉴定 A:原代细胞(倒置显微镜);B:第三代细胞(倒置显微镜);C:原代细胞波形丝蛋白阳性(免疫荧光,共聚焦显微镜);D:原代细胞角蛋白阴性(蓝色为DAPI核染色,免疫荧光,共聚焦显微镜)。

## 二、脂多糖通过刺激人牙周膜细胞MMP-14表达切割CD44

本研究分别使用不同浓度(0、0.1、1、10和100  $\mu\text{mol/L}$ )的LPS刺激hPDLC 4 h,使用流式细胞术检测细胞凋亡水平(图2A)。实验结果显示,0、0.1、1、10和100  $\mu\text{mol/L}$ 各组PI平均荧光强度分别是163.67、183.67、178.33、182和178.33,相较于0  $\mu\text{mol/L}$ 组差异均无统计学意义( $t_{0.1}=0.88, P_{0.1}=0.43; t_1=0.58,$

$P_1=0.59; t_{10}=0.65, P_{10}=0.55; t_{100}=0.51, P_{100}=0.64,$ 图2B)。说明不同浓度的LPS对hPDLC处理4 h均不会引起细胞凋亡。

然而,在使用1  $\mu\text{mol/L}$  LPS刺激hPDLC 4 h后,使用流式细胞术检测hPDLC MMP-14(图3A)与CD44(图3C)表达,对荧光强度进行统计,MMP-14对照组荧光强度为107.53, MMP-14组荧光强度为233.75, MMP-14组与对照组相比差异有统计学意义( $t=$

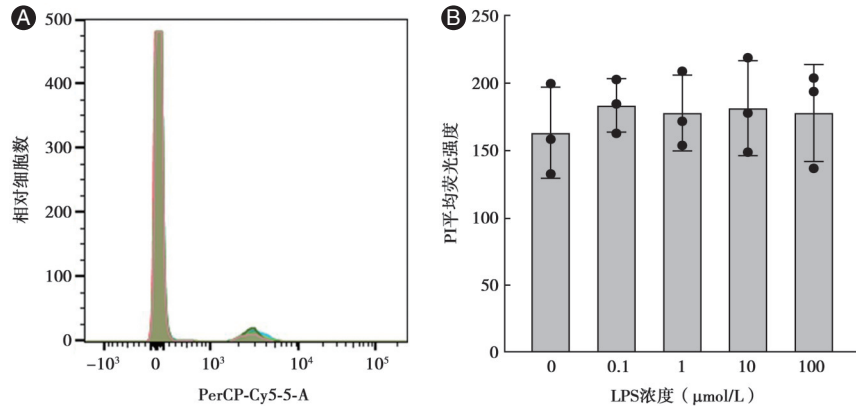


图2 流式细胞术检测不同浓度脂多糖(LPS)刺激人牙周膜细胞(hPDLC)凋亡情况 A:流式细胞术检测细胞凋亡图;B:细胞凋亡数据碘化丙啶(PI)平均荧光强度统计图。

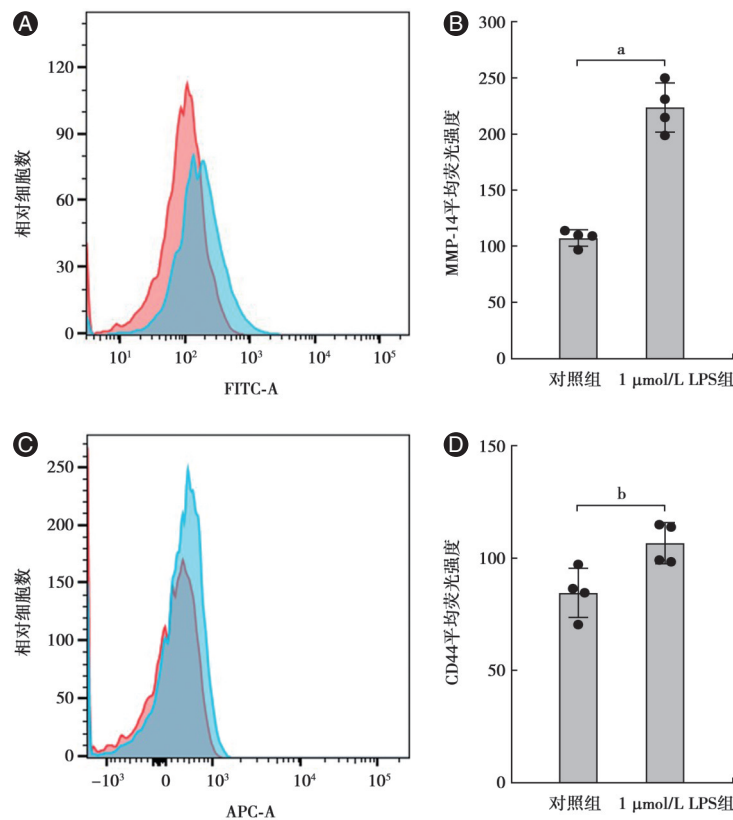


图3 流式细胞术检测1  $\mu\text{mol/L}$ 脂多糖(LPS)刺激人牙周膜细胞(hPDLC)4 h后的蛋白表达 A: MMP-14表达的流式细胞单参数图;B: MMP-14平均荧光强度统计图;C: CD44表达的流式细胞单参数图;D: CD44平均荧光强度统计图;黑色小圆点代表各组的重复数值,采用One-Way ANOVA分析统计组间差异,<sup>a</sup> $P < 0.001,$ <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

10.10,  $P < 0.001$ , 图3B)。CD44对照组荧光强度为84.58, CD44组荧光强度为106.7, CD44组荧光强度与对照组相比差异具有统计学意义( $t = 3.13, P = 0.02$ , 图3D)。

通过ELISA方法, 检测结果发现1  $\mu\text{mol/L}$  LPS分别处理hPDLc 0、1、2、3和4 h后, 培养上清中CD44表达量分别为409.75、408.45、407.69、428.56和436.62 pg/mL。相较于0 h组, 仅LPS处理hPDLc 4 h组CD44相对表达量差异有统计学意义( $t_1 = 0.25, P_1 = 0.81; t_2 = 0.46, P_2 = 0.66; t_3 = 2.03, P_3 = 0.11; t_4 = 5.11, P_4 = 0.007$ , 图4A), 说明LPS处理hPDLc 4 h后一部分CD44被释放。加入LPS+MMP-14抑制剂后, 对照组、LPS组及LPS+MMP-14抑制剂组细胞培养上清中CD44的表达量分别为396.00、464.00和406.60 pg/mL, LPS+MMP-14抑制剂组较LPS处理组明显下调, 差异具有统计学意义( $t = 5.03, P = 0.001$ , 图4B)。说明, MMP-14的活性抑制剂能够抑制LPS

引起的CD44的释放。

### 三、脂多糖刺激人牙周膜细胞CD44向核内转移

在本研究中, 使用1  $\mu\text{mol/L}$  LPS分别刺激hPDLc 0~4 h, ELISA检测结果显示胞质内0、1、2、3和4 h CD44表达量分别为37 000.18、36 723.51、36 532.23、37 060.72和36 765.31 pg/mL。LPS刺激hPDLc 1、2、3和4 h相较于0 h差异均无统计学意义( $t_1 = 0.18, P_1 = 0.87; t_2 = 0.35, P_2 = 0.75; t_3 = 0.05, P_3 = 0.96; t_4 = 0.23, P_4 = 0.83$ , 图5A)。LPS刺激hPDLc 0~4 h细胞核内0、1、2、3和4 h CD44表达量分别为3 726.64、5 125.54、12 570.15、14 091.70和14 050.91 pg/mL, 相较0 h组差异均有统计学意义( $t_1 = 19.10, P < 0.001; t_2 = 53.09, P < 0.001; t_3 = 25.74, P < 0.001; t_4 = 24.93, P < 0.001$ , 图5B)。

蛋白免疫印迹实验(图6A)显示对照组与LPS刺激组细胞总CD44相对表达量分别为0.77和0.90(图6B), Importin  $\beta$ 相对表达量分别为0.85和0.99

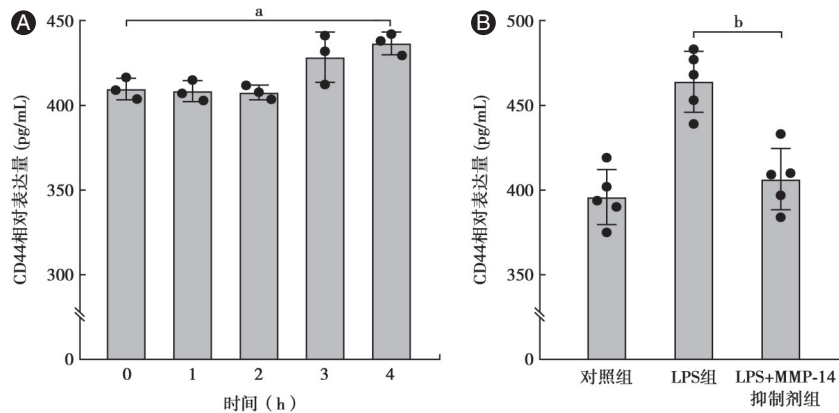


图4 ELISA法检测人牙周膜细胞(hPDLc)培养上清CD44表达 A:不同时间条件下1  $\mu\text{mol/L}$ 脂多糖(LPS)刺激hPDLc后细胞培养上清中CD44含量检测;B:对照组、LPS组及LPS+MMP-14抑制剂组hPDLc细胞培养上清中CD44含量检测;黑色小圆点代表各组的重复数值,采用One-Way ANOVA分析统计组间差异,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.001$ 。

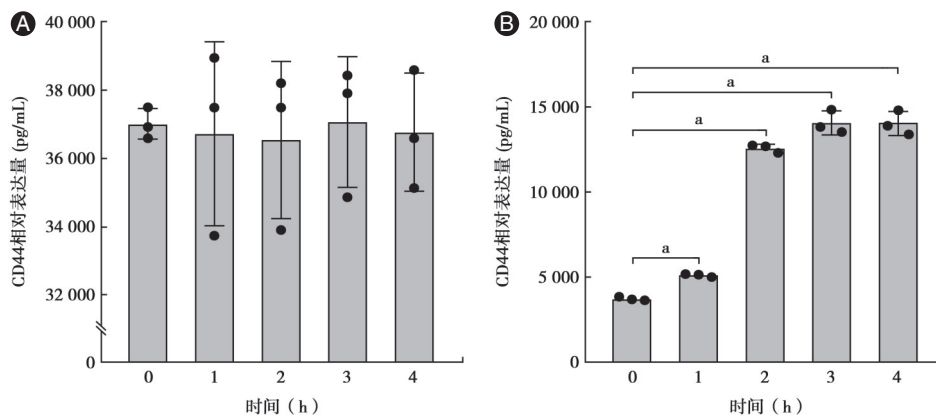


图5 脂多糖(LPS)刺激CD44入核相关指标检测 A:不同时间条件下1  $\mu\text{mol/L}$  LPS刺激人牙周膜细胞(hPDLc), ELISA检测胞质CD44相对表达量变化;B:不同时间条件下1  $\mu\text{mol/L}$  LPS刺激hPDLc, ELISA检测细胞核中CD44相对表达量变化;黑色小圆点代表各组的重复数值,采用One-Way ANOVA分析统计组间差异,<sup>a</sup> $P < 0.001$ 。

(图6C)。说明,LPS会导致hPDLC中CD44及Importin  $\beta$ 上调表达。对照组与LPS刺激组细胞核内CD44表达量分别为0.41和0.68,LPS刺激后细胞核内CD44相对表达量较对照组明显增加,差异有统计学意义( $t=3.10, P=0.04$ ,图6D)。说明CD44在向细胞外脱落的同时也向胞质内脱落,并进一步向核内转移,Importin  $\beta$ 可能在其中扮演着重要的角色。

通过细胞免疫荧光检测,结果显示1  $\mu\text{mol/L}$  LPS刺激hPDLC 4 h后,CD44与转运蛋白Importin  $\beta$ 表达增加(图7A)。并且使用Importin  $\beta$ 抑制剂后,ELISA

检测结果显示对照组、LPS组、Importin  $\beta$ 抑制剂组及LPS+Importin  $\beta$ 抑制剂组核内CD44的表达量分别为3 566.00、10 445.33、3 398.33和6 553.33 pg/mL。Importin  $\beta$ 抑制剂组较LPS组核内CD44表达明显降低,差异具有统计学意义( $t=11.13, P<0.001$ ,图7B)。说明CD44向核转移明显减少。

四、CD44向核内转移进一步促进白细胞介素6的表达

本研究使用CBA法检测培养上清中炎症因子的表达,结果发现1  $\mu\text{mol/L}$  LPS处理hPDLC后IL-6

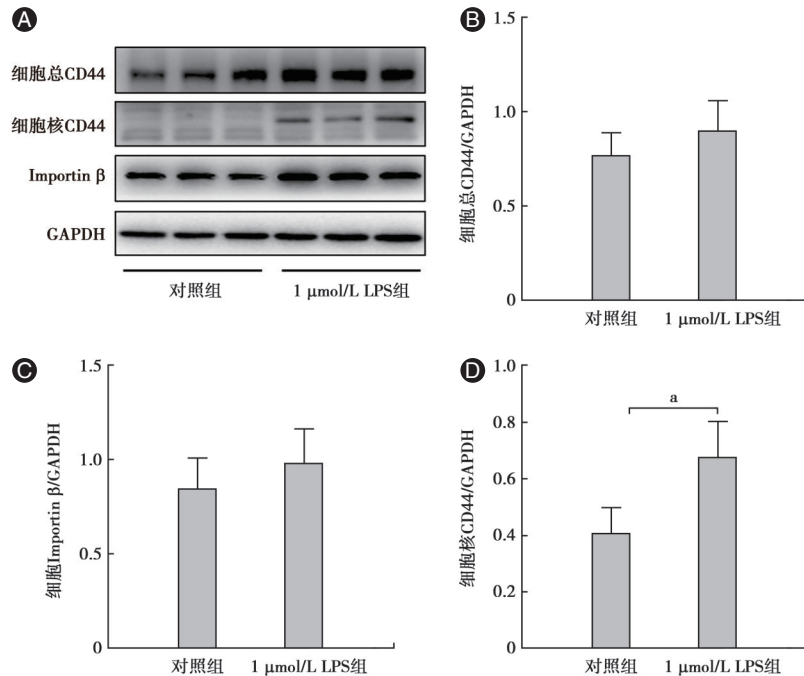


图6 蛋白免疫印迹法检测细胞及细胞核对照组及1  $\mu\text{mol/L}$ 脂多糖(LPS)组中蛋白表达 A:蛋白免疫印迹法检测结果;B:对A图中对照组及LPS组细胞总CD44蛋白表达灰度值进行数据统计分析;C:对A图中对照组及LPS组Importin  $\beta$ 蛋白表达灰度值进行数据统计分析;D:对A图中对照组及LPS组细胞核CD44蛋白表达灰度值进行数据统计分析;采用One-Way ANOVA分析统计组间差异,\* $P<0.05$ 。

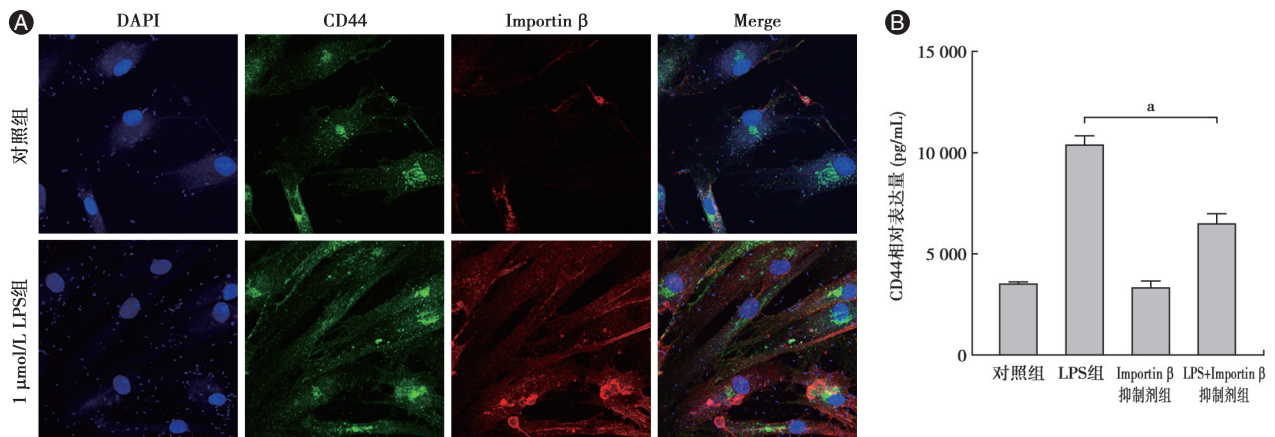


图7 细胞免疫荧光检测及CD44表达ELISA法检测 A:细胞免疫荧光检测人牙周膜细胞(hPDLC)中CD44与Importin  $\beta$ 表达(高倍放大);B:ELISA法检测对照组、脂多糖(LPS)组、Importin  $\beta$ 抑制剂组及LPS+Importin  $\beta$ 抑制剂组hPDLC细胞核中CD44含量检测;采用One-Way ANOVA分析统计组间差异,\* $P<0.001$ 。



的表达量为 470.1 pg/mL, 对照组 IL-6 的表达量为 194.04 pg/mL, LPS 处理组较对照组中 IL-6 的表达明显上调, 差异具有统计学意义 ( $t = 22.76, P < 0.001$ , 图 8A ~ 8B), 而其他炎症因子表达量变化不大。同时, ELISA 法结果显示 LPS 处理 hPDLC 后培养上清中 IL-6 的表达量为 474.5 pg/mL, 对照组 IL-6 的表达量为 179.4 pg/mL, LPS 处理组较对照组中 IL-6 的表达明显上调, 差异具有统计学意义 ( $t = 12.13, P < 0.001$ , 图 8C), 说明 LPS 会导致 hPDLC 分泌更多的 IL-6。同时, 进一步使用 LPS+Importin  $\beta$  抑制剂孵育 hPDLC, 对照组、LPS 组、Importin  $\beta$  组及 LPS+Importin  $\beta$  抑制剂相对表达量分别为 1.27、9.39、1.15 和 4.34, 发现加入 LPS+Importin  $\beta$  抑制剂后细胞中 IL-6 mRNA 的表达量较 LPS 处理组明显减少, 差异具有统计学意义 ( $t = 16.79, P < 0.001$ , 图 8D), 说明 Importin  $\beta$  抑制剂能够抑制 LPS 引起的 IL-6 的上调表达。

### 讨论

口腔是一个菌群丰富的部位, 牙周组织长期处在一个菌群平衡的微妙状态<sup>[19]</sup>。局部细菌对宿主

轻微的刺激可以维持牙周膜细胞的抑炎模式<sup>[20]</sup>。牙周炎可能会导致 hPDLC 进入促炎模式<sup>[21]</sup>。多种炎症因子分泌吸引大量免疫细胞浸润, 进一步加重牙周炎进展。因此, 维持牙周细胞稳态是防止牙周炎进展的一种有前景的方法。

本研究发现, 内毒素 LPS 可以导致 hPDLC 释放大量 IL-6 (图 8A ~ C), 促进炎症发展, 这与之前的研究是相似的; 进一步发现这种促炎反应在使用 Importin  $\beta$  抑制剂后明显降低 (图 8D)。同时本研究也在 LPS 刺激 hPDLC 后发现核内 CD44 明显升高 (图 5B、6D、7A), 进一步说明 LPS 通过增加核内 CD44 促进 IL-6 的表达。

同时, 本研究还发现 LPS 导致 hPDLC 黏附性降低, 并且首次提出这与 hPDLC 分泌 MMP-14 切割牙周膜细胞表面黏附分子 CD44 有关, 抑制 MMP-14 表达能减少 CD44 的分泌 (图 4B)。CD44 被认为是经典的黏附分子, 在多种细胞膜上表达。然而近年来在对多种细胞的研究中发现 CD44 作为一种信号分子可以进入核内<sup>[22-23]</sup>。有趣的是, 本研究在 hPDLC 上也发现 CD44 被切割后一部分进入胞质, 并最终

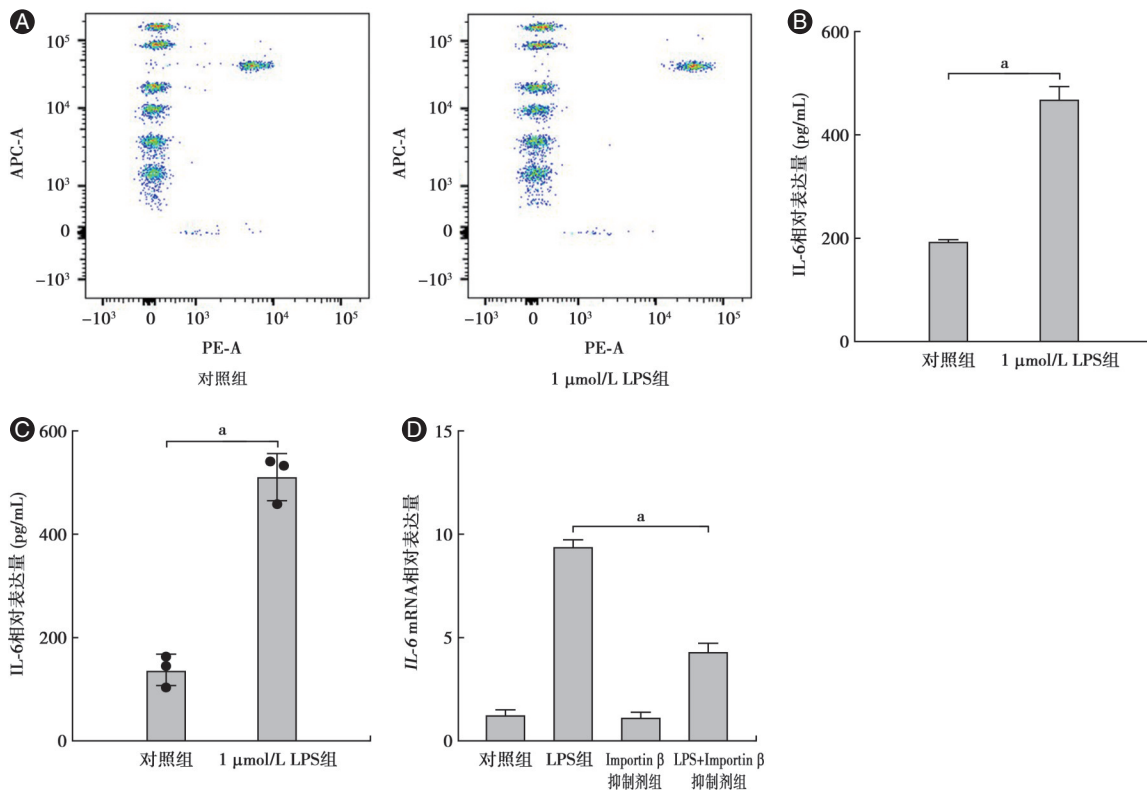


图8 脂多糖(LPS)影响白细胞介素6(IL-6)的表达 A: 对照组及1  $\mu\text{mol/L}$  LPS组刺激人牙周膜细胞(hPDLC)培养上清中炎症因子表达CBA流式细胞图; B: 对照组及1  $\mu\text{mol/L}$  LPS刺激组刺激hPDLC培养上清中IL-6的表达量统计图; C: ELISA检测对照组及1  $\mu\text{mol/L}$  LPS组hPDLC培养上清中IL-6的分泌; D: 使用Importin  $\beta$ 抑制剂后检测对照组、LPS组、Importin  $\beta$ 抑制剂组及LPS+Importin  $\beta$ 抑制剂组细胞中IL-6 mRNA表达; 采用One-Way ANOVA分析统计组间差异, \* $P < 0.001$ 。

在转运蛋白 Importin  $\beta$  的协助下进入核内。而抑制 Importin  $\beta$  的活性,可有效抑制 CD44 的分泌(图 7B),进而抑制牙周膜细胞 IL-6 的表达(图 8D)。因此,本研究认为 LPS 通过 CD44 的向核转运进一步促进了 IL-6 的表达,导致 hPDLC 进一步向促炎模式转化。

综上所述,本研究成功分离了原代牙周膜细胞,并通过实验发现 LPS 能够促进 hPDLC 分泌,通过转运蛋白 Importin  $\beta$  促进 CD44 向核转移,进而促进 IL-6 的分泌。进一步阐明了 LPS 介导牙周炎症的机制,这能够为临床牙周炎症的研究提出新的治疗靶点和思路。

**利益冲突** 所有作者声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 徐燕群: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、统计分析和解释数据、起草文章;李平: 分析和解释数据、统计分析、支持性贡献;杨兴: 对文章的知识性内容作批评性审阅,获取研究经费,行政、技术或材料支持,指导;薛慧: 酝酿和设计实验、对文章的知识性内容作批评性审阅、统计分析、获取研究经费、行政、技术或材料支持

### 参 考 文 献

- [1] 单誉晨,方进华. 侵袭性牙周炎的药物疗法研究进展[J]. 浙江临床医学, 2022, 24(9): 1416-1418.
- [2] Fan C, Zhang X, Upton Z. Anti-inflammatory effects of shikonin in human periodontal ligament cells [J]. *Pharm Biol*, 2018, 56(1): 415-421. DOI: 10.1080/13880209.2018.1506482.
- [3] 毛钊,吴织芬. 影响牙周膜细胞生物学功能的相关因素[J]. 医学研究生学报, 2003, 16(6): 459-460+464. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8199.2003.06.019.
- [4] 范华南,黄辉,姜庆坤,等. 中度和重度牙周炎患者龈下细菌多样性和群落结构分析[J]. 口腔医学研究, 2018, 34(8): 846-851. DOI: 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.08.012.
- [5] Gou H, Chen X, Zhu X, et al. Sequestered SQSTM1/p62 crosstalk with Keap1/NRF2 axis in hPDLCs promotes oxidative stress injury induced by periodontitis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 190: 62-74. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.08.001.
- [6] Dutzan N, Kajikawa T, Abusleme L, et al. A dysbiotic microbiome triggers TH17 cells to mediate oral mucosal immunopathology in mice and humans [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(463): eaat0797. DOI: 10.1126/scitranslmed.aat0797.
- [7] Lee JS, Lee JB, Cha JK, et al. Chemokine in inflamed periodontal tissues activates healthy periodontal-ligament stem cell migration [J]. *J Clin Periodontol*, 2017, 44(5): 530-539. DOI: 10.1111/jcpe.12710.
- [8] Meyle J, Dommisch H, Groeger S, et al. The innate host response in caries and periodontitis [J]. *J Clin Periodontol*, 2017, 44(12): 1215-1225. DOI: 10.1111/jcpe.12781.
- [9] Wu HH, Guo Y, Pu YF, et al. Adiponectin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation and promotes osteogenesis in hPDLCs [J]. *Biosci Rep*, 2021, 41(3): BSR20192668. DOI: 10.1042/BSR20192668.
- [10] 武海春,许尧生,李彬,等. LPS 刺激对体外培养人牙周膜细胞产生 IL-8 和 MCP-1 的影响 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2013, 23(8): 485-488. DOI: 10.15956/j.cnki.chin.j.conserv.dent.2013.08.003.
- [11] Guan X, He Y, Wei Z, et al. Crosstalk between Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and NF- $\kappa$ B signaling contributes to apical periodontitis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 98: 107843. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107843.
- [12] Luscinskas FW. Neutrophil CD44 rafts and rolls [J]. *Blood*, 2010, 116(3): 314-315. DOI: 10.1182/blood-2010-04-276410.
- [13] Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(1): 33-45. DOI: 10.1038/nrm1004.
- [14] Okamoto I, Kawano Y, Tsuiki H, et al. CD44 cleavage induced by a membrane-associated metalloprotease plays a critical role in tumor cell migration [J]. *Oncogene*, 1999, 18(7): 1435-1446. DOI: 10.1038/sj.onc.1202447.
- [15] Janiszewska M, de Vito C, le Bitoux MA, et al. Transportin regulates nuclear import of CD44 [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(40): 30548-30557. DOI: 10.1074/jbc.M109.075838.
- [16] Shao Y, Li L, Liu L, et al. CD44/ERM/F-actin complex mediates targeted nuclear degranulation and excessive neutrophil extracellular trap formation during sepsis [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(7): 2089-2103. DOI: 10.1111/jcmm.17231.
- [17] Snyman C, Niesler CU. MMP-14 in skeletal muscle repair [J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 2015, 36(3): 215-225. DOI: 10.1007/s10974-015-9414-4.
- [18] Wu CT, Huang YC, Chen WC, et al. Effect of tumor burden on tumor aggressiveness and immune modulation in prostate cancer: Association with IL-6 signaling [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(7): 992. DOI: 10.3390/cancers11070992.
- [19] Diaz PI, Valm AM. Microbial interactions in oral communities mediate emergent biofilm properties [J]. *J Dent Res*, 2020, 99(1): 18-25. DOI: 10.1177/0022034519880157.
- [20] Wobma HM, Tamargo MA, Goeta S, et al. The influence of hypoxia and IFN- $\gamma$  on the proteome and metabolome of therapeutic mesenchymal stem cells [J]. *Biomaterials*, 2018, 167: 226-234. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.03.027.
- [21] Liu D, Xu J, Liu O, et al. Mesenchymal stem cells derived from inflamed periodontal ligaments exhibit impaired immunomodulation [J]. *J Clin Periodontol*, 2012, 39(12): 1174-1182. DOI: 10.1111/jcpe.12009.
- [22] Weng X, Maxwell-Warburton S, Hasib A, et al. The membrane receptor CD44: Novel insights into metabolism [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2022, 33(5): 318-332. DOI: 10.1016/j.tem.2022.02.002.
- [23] Chen C, Zhao S, Karnad A, et al. The biology and role of CD44 in cancer progression: Therapeutic implications [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 64. DOI: 10.1186/s13045-018-0605-5.

(收稿日期: 2023-05-23)

(本文编辑: 王嫚)