

· 论 著 ·

牙龈卟啉单胞菌脂多糖对树突状细胞成熟及功能影响的体外研究

苏 寒¹, 毛 钊¹, 陈 伟¹, 郭 婷¹, 闫 翔²

[摘要] 目的 研究牙龈卟啉单胞菌脂多糖(*P. gingivalis*-LPS)的刺激对大鼠树突状细胞(DCs)成熟及功能的影响,为探索 DCs 在牙周炎的发生发展中的作用机制提供实验依据。方法 采用流式细胞学方法检测 *P. gingivalis*-LPS 和大肠杆菌脂多糖(*E. coli*-LPS)刺激下,CD11c⁺MHC II⁺、CD11c⁺CD80⁺、CD11c⁺CD86⁺和 CD11c⁺CD40⁺ DCs 的比率;采用 ELISA 法检测 DCs 分泌白介素-12(IL-12)、干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-10(IL-10)和白介素-13(IL-13)的量。采用 CCK8 法检测与上述 DCs 共培养的 CD4⁺T 细胞的增殖;采用 ELISA 法检测 T 细胞分泌 IL-2、IFN- γ 、IL-10 和 IL-13 的量。在上述的培养系统中加入 Toll 样受体 4(TLR4)抑制剂(polymyxin B, PmB)或 TLR2/TLR4 抑制剂(oxidation of 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine, OxPAPC),观察 TLR 抑制剂对上述 DCs 成熟及功能的影响。结果 *P. gingivalis*-LPS 与 *E. coli*-LPS 均能刺激 DCs 成熟。TLR4 抑制剂明显抑制 *E. coli*-LPS 组 DCs 成熟和抗原提呈功能,对 *P. gingivalis*-LPS 组 DCs 成熟和抗原提呈功能没有显著抑制。TLR2/TLR4 抑制剂对 *P. gingivalis*-LPS 组 DCs 成熟和抗原提呈功能显著抑制。*P. gingivalis*-LPS 组 DCs 分泌 IL-12 和 IFN- γ 的量低于 *E. coli*-LPS 组($P < 0.05$);*P. gingivalis*-LPS 组 DCs 分泌 IL-10 和 IL-13 的量高于 *E. coli*-LPS 组($P < 0.05$)。与 *P. gingivalis*-LPS 和 *E. coli*-LPS 共培养的 DCs 均能促进 CD4⁺T 细胞增殖。与 *P. gingivalis*-LPS 组 DCs 共培养的 T 细胞分泌 IL-2 和 IFN- γ 的量低于 *E. coli*-LPS 组($P < 0.05$);其分泌 IL-10 的量高于 *E. coli*-LPS 组($P < 0.05$)。结论 *P. gingivalis*-LPS 能促进 DCs 的成熟和抗原提呈功能。*P. gingivalis*-LPS 刺激下的 DCs 促进 Th2 型免疫应答;*E. coli*-LPS 刺激下的 DCs 促进 Th1 型免疫应答。*P. gingivalis*-LPS 通过 TLR2 通路刺激 DCs 成熟;*E. coli*-LPS 通过 TLR4 通路刺激 DCs 成熟。

[关键词] 树突状细胞;牙龈卟啉单胞菌脂多糖;大肠杆菌脂多糖;细胞表型;抗原提呈

[中图分类号] R780.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2017)05-0465-08

[DOI] 10.3969/j.issn.1672-271X.2017.05.005

Effects of Porphyromonas gingivalis-lipopoly saccharide on the maturation and functions of dendritic cells

SU Han¹, MAO Zhao¹, CHEN Wei¹, GUO Ting¹, YAN Xiang²

(1. Department of Stomatology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China; 2. Department of Orthodontics, Nanjing Stomatological Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective** To study the roles of *P. gingivalis*-LPS on the maturation and functions of DCs to provide experimental evidences to explore the possible mechanism of DCs in periodontitis. **Methods** Flow cytometry was used to detect CD11c, MHC II, CD80, CD86 and CD40 expression on DCs which were stimulated by *P. gingivalis*-LPS or *E. coli*-LPS and ELISA was used to detect IL-12, IFN- γ , IL-10 and IL-13 secreted by DCs. CCK8 was used to assay CD4⁺T cells proliferation after co-cultured with DCs stimulated by *P. gingivalis*-LPS or *E. coli*-LPS and ELISA was used to detect IL-2, IFN- γ , IL-10 and IL-13 secreted by T cells. TLR4 inhibitor (polymyxin B) or TLR2 and TLR4 inhibitor (OxPAPC) was added to *P. gingivalis*-LPS group and *E. coli*-LPS group to observe the effects of these two TLR inhibitors on the maturation and antigen-

presenting functions of DCs. **Results** The capacity of *P. gingivalis*-LPS to stimulate DCs maturation was similar to that of *E. coli*-LPS. When TLR4 inhibitor was added to *E. coli*-LPS group, maturation and antigen-presenting functions of DCs were significantly inhibited. When TLR4 inhibitor was added to *P. gingivalis*-LPS group, maturation and antigen-presenting functions of DCs were not significantly inhibited. When TLR2 and TLR4 inhibitor was added to *P. gingivalis*-LPS group, maturation and antigen-presenting functions of DCs were significantly

基金项目: 南京市医学科技发展重点项目(zkx15035);南京市第七批科技发展计划项目(201507043)

作者单位: 1. 210002 南京,南京军区南京总医院口腔科;
2. 210008 南京,南京大学医学院附属口腔医院正畸科

通信作者: 闫 翔, E-mail: nj12345@126.com

引用格式: 苏 寒,毛 钊,陈 伟,等.牙龈卟啉单胞菌脂多糖对树突状细胞成熟及功能影响的体外研究[J].东南国防医药,2017,19(5):465-472.

effects of these two TLR inhibitors on the maturation and antigen-presenting functions of DCs. **Results** The capacity of *P. gingivalis*-LPS to stimulate DCs maturation was similar to that of *E. coli*-LPS. When TLR4 inhibitor was added to *E. coli*-LPS group, maturation and antigen-presenting functions of DCs were significantly inhibited. When TLR4 inhibitor was added to *P. gingivalis*-LPS group, maturation and antigen-presenting functions of DCs were not significantly inhibited. When TLR2 and TLR4 inhibitor was added to *P. gingivalis*-LPS group, maturation and antigen-presenting functions of DCs were significantly

inhibited. The level of IL-12 and IFN- γ secreted by DCs in *P. gingivalis*-LPS group was significantly lower than that of *E. coli*-LPS group ($P < 0.05$), meanwhile, IL-10 and IL-13 secreted by DCs in *P. gingivalis*-LPS group was significantly higher than that of *E. coli*-LPS group ($P < 0.05$). DCs stimulated by both *P. gingivalis*-LPS and *E. coli*-LPS could promote the proliferation of CD4⁺T cells. The amount of IL-2 and IFN- γ secreted by T cells stimulated by DCs in *P. gingivalis*-LPS group was significantly lower than that of *E. coli*-LPS group ($P < 0.05$), meanwhile, IL-10 secreted by T cells stimulated by DCs in *P. gingivalis*-LPS group was significantly higher than that of *E. coli*-LPS group ($P < 0.05$). **Conclusion** *P. gingivalis*-LPS could promote DCs maturation and antigen-presenting functions. DCs stimulated by *P. gingivalis*-LPS are prone to induce a stronger Th2 cell responses while DCs stimulated by *E. coli*-LPS are prone to induce a stronger Th1 cell responses. *P. gingivalis*-LPS triggers DCs through TLR2 pathway while *E. coli*-LPS triggers DCs through TLR4 pathway.

[**Key words**] Dendritic cells; *P. gingivalis*-LPS; *E. coli*-LPS; Phenotype; Antigen-presenting

牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*) 是慢性牙周炎发生发展的病原微生物, 其致病成分包括脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、荚膜多糖、菌毛蛋白和牙龈素。 *P. gingivalis*-LPS 是牙周炎的主要致病因素之一, 在牙周炎的病程中可引起不同类型的免疫和炎症反应^[1]。树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 广泛分布于组织和器官, 是体内的专效抗原提呈细胞。未成熟 DCs 摄取抗原, 成熟 DCs 向 naïve T 淋巴细胞提呈抗原并刺激 naïve T 细胞分化为效应性 T 细胞。因此, DCs 是先天性免疫应答和获得性免疫应答之间的重要桥梁^[2]。微生物成分对 DCs 的刺激可上调 DCs 表面共刺激分子的表达并促进 DCs 分泌炎症细胞因子, 促使辅助性 T 细胞 (Th 细胞) 分化为 Th1 或 Th2 细胞^[3-4]。上述过程始于 DCs 通过其表面的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 识别不同的抗原物质 (包括病原微生物成分), 因此 PRRs 及它们的配体在 DCs 成熟和发挥抗原提呈功能的过程中具有重要作用。目前已知牙周炎的发病机制为宿主对牙周病原体感染的免疫反应, 宿主免疫系统在此过程中发挥重要作用。有研究发现牙周炎患者的牙龈上皮组织中存在着 DCs, 然而, 这些 DCs 在牙周炎的发展过程中的确切作用机制还不清楚^[5]。本研究拟对 *P. gingivalis*-LPS 对 SD 大鼠骨髓源性 DCs 成熟及功能的影响进行研究, 为探索 DCs 在牙周炎病程中的可能作用机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 24 只 6~8 周龄雄性 SD 大鼠 (实验动物合格证号: SCXK2012-0014), 体重 200~220 g, 养育在南京总医院医学实验动物中心无特定病原体 (specific pathogen-free, SPF) 环境中。动物实验的所有步骤均得到了南京大学动物使用和保护委员会的批准。

1.1.2 实验试剂 RPMI 1640 培养基、热灭活胎牛

血清 (FBS)、青链霉素 (均购自 HyClone 公司); 重组大鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (rrGM-CSF)、重组大鼠 IL-4 (rrIL-4), IFN- γ 、IL-12、IL-2、IL-10、IL-13 大鼠 ELISA 试剂盒 (均购自 R&D 公司); 牙龈卟啉单胞菌脂多糖 (*P. gingivalis*-LPS, standard LPS from *P. gingivalis*)、TLR4 信号抑制剂—Polymyxin B (PmB)、TLR2/TLR4 信号抑制剂—OxPAPC (均购自 Invivogen 公司); 大肠杆菌脂多糖 (*E. coli*-LPS, standard LPS from *E. coli* 0111: B4) (购自 Sigma-Aldrich 公司); anti-CD11c-PE, anti-MHC II-APC, anti-CD86-FITC, anti-CD80-APC, anti-CD40-FITC 抗大鼠单克隆流式抗体 (均购自 eBioscience 公司); CD4 抗大鼠单克隆抗体磁珠 (购自 Miltenyi 公司); CCK8 试剂盒 (购自 Dojindo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 从 SD 大鼠的胫骨、股骨和肱骨新鲜收集全骨髓细胞, 将细胞培养于加入了 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基, 并在其中加入 10 ng/mL rrGM-CSF 和 1 ng/mL rrIL-4 以促进 DCs 的生成。细胞培养于 37 $^{\circ}$ C 饱和湿度、5% CO₂ 的细胞孵育箱内, 每隔 1 d 进行半量换液并保持所有的试剂浓度不变, 收集悬浮的细胞。培养 6 d 后, 将收获的细胞以 2×10^6 /孔的密度培养于 6 孔细胞培养板中。将这些细胞随机分为 7 组: 对照组、*E. coli*-LPS 组、*P. gingivalis*-LPS 组、*E. coli*-LPS+PmB 组、*E. coli*-LPS+OxPAPC 组、*P. gingivalis*-LPS+PmB 组和 *P. gingivalis*-LPS+OxPAPC 组。依据分组将试剂按以下浓度加入培养基: *E. coli*-LPS 100 ng/mL; *P. gingivalis*-LPS 100 ng/mL; PmB 30 μ g/mL; OxPAPC 30 μ g/mL。其中, PmB 和 OxPAPC 作为 TLR 抑制剂, 均于 *E. coli*-LPS 和 *P. gingivalis*-LPS 加入培养基 30 min 前被添加到培养基中。培养 48 h 后, 收集细胞悬浮液和粘附松散的细胞, 采用流式细胞术检测细胞表面 CD11c 的表达, 结果显示 CD11c⁺ 细胞比例高于 90%, 这些细胞可被认为是 DCs。

1.2.2 细胞表型分析 细胞培养的第 8 天, 收集、

计数并用 PBS 冲洗各组细胞,将其再悬浮后以 5×10^5 /mL 转至流式管。根据制造商的说明书分别将 anti-CD11c-PE, anti-MHC II-APC, anti-CD86-FITC, anti-CD80-APC, anti-CD40-FITC 抗大鼠单克隆抗体加入流式管,阴性对照管加入同型对照抗体,在 4 °C 黑暗环境中孵育细胞 30 min,用 PBS 冲洗 2 次使细胞充分悬浮。采用流式细胞仪检测 DCs 表面分子的表达,采用 flowjo7. 6. 1 软件处理实验中获得的原始数据,分析各组双标 CD11c⁺ MHC II⁺、CD11c⁺ CD80⁺、CD11c⁺ CD86⁺、CD11c⁺ CD40⁺ 细胞的百分比。所有检测均一式 3 份进行独立实验。

1.2.3 细胞因子检测 DCs 分泌的细胞因子可影响 DCs 的后续功能,采用 ELISA 法检测各组细胞培养上清液中干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-12(IL-12)、IL-10 和 IL-13 的含量,以研究 E. coli-LPS 和 P. gingivalis-LPS 刺激 DCs 分泌细胞因子的能力。细胞培养的第 8 天,收集各组细胞培养上清液以检测 DCs 分泌的细胞因子。采用大鼠 IFN- γ 、IL-12、IL-10 和 IL-13 ELISA 试剂盒,按照制造商的说明,在酶标仪上采用 450 nm 波长测量各孔上清液的吸光值(A450),判定结果。所有检测均一式 3 份进行独立实验。

1.2.4 混合淋巴细胞反应 取 SD 大鼠脾细胞,按照制造商的说明书,采用 CD4⁺T 细胞磁珠分选系统获取纯化的 CD4⁺T 细胞。采用 PE-CD4 抗体经流式细胞学检测,获得的 CD4⁺T 细胞纯度为 90%~95%。将前述实验所获得的各组 DCs 与密度为 2×10^6 /mL 的 CD4⁺T 细胞按照 1:10 的比例在 96 孔培养板中共培养。每孔加入含有 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液

200 μ L,轻吹吸、混匀细胞悬液以保证 DCs 和 T 细胞充分有效的接触。将培养板放置于 37 °C 饱和湿度、5% CO₂ 的细胞孵育箱内培育 72 h。细胞培育结束前 4 h,按照制造商的说明书,在培养板的每孔内加入 10 μ L CCK-8。孵育 4 h 后,采用酶标仪测定 A450 nm 值,以确定 T 细胞的增殖。测定重复 3 次,取其平均值为最终结果。

如前所述,每一组的 DCs 均与 CD4⁺T 细胞按照 1:10 的比例共培养 72 h。采用 ELISA 试剂盒按照制造商的说明测定上清液中细胞因子 IFN- γ 、IL-2、IL-10 和 IL-13 A450 nm 值,判定结果。所有检测均一式 3 份进行独立实验。

1.3 统计学分析 所有数据及统计学分析采用 SPSS11.0 软件处理,计量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用单因素方差检验分析各组之间的差异,用独立组 t 检验进行 2 组之间的均数比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 E. coli-LPS 和 P. gingivalis-LPS 促进 DCs 表面 MHC II、CD80、CD86 和 CD40 分子的表达 各组 CD11c⁺ MHC II⁺、CD11c⁺ CD80⁺、CD11c⁺ CD86⁺ 和 CD11c⁺ CD40⁺ DCs 比率如图 1~4 所示。将结果以直方图的形式表示如图 5 所示,与对照组相比,相同浓度的 P. gingivalis-LPS 和 E. coli-LPS(100 ng/mL) 均能显著上调 DCs MHC II、CD80、CD86、CD40 的表达水平($P < 0.05$)。P. gingivalis-LPS 和 E. coli-LPS 组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。上述结果表明,P. gingivalis-LPS 和 E. coli-LPS 均能刺激 DCs 成熟。

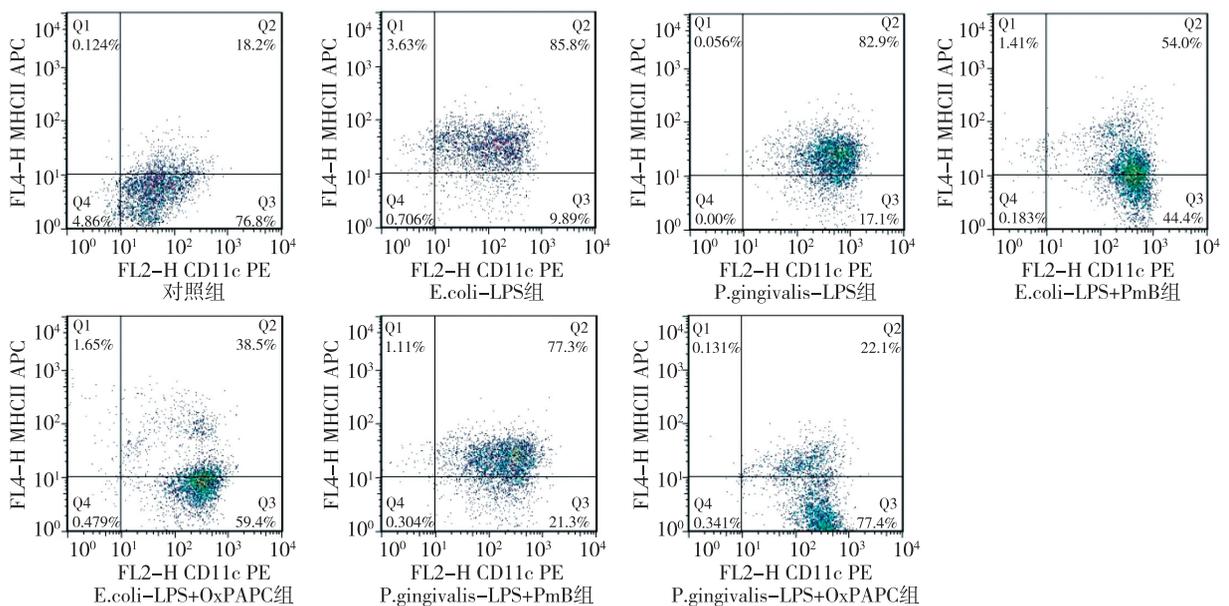


图 1 各组 CD11c⁺ MHC II⁺ DCs 流式细胞学结果

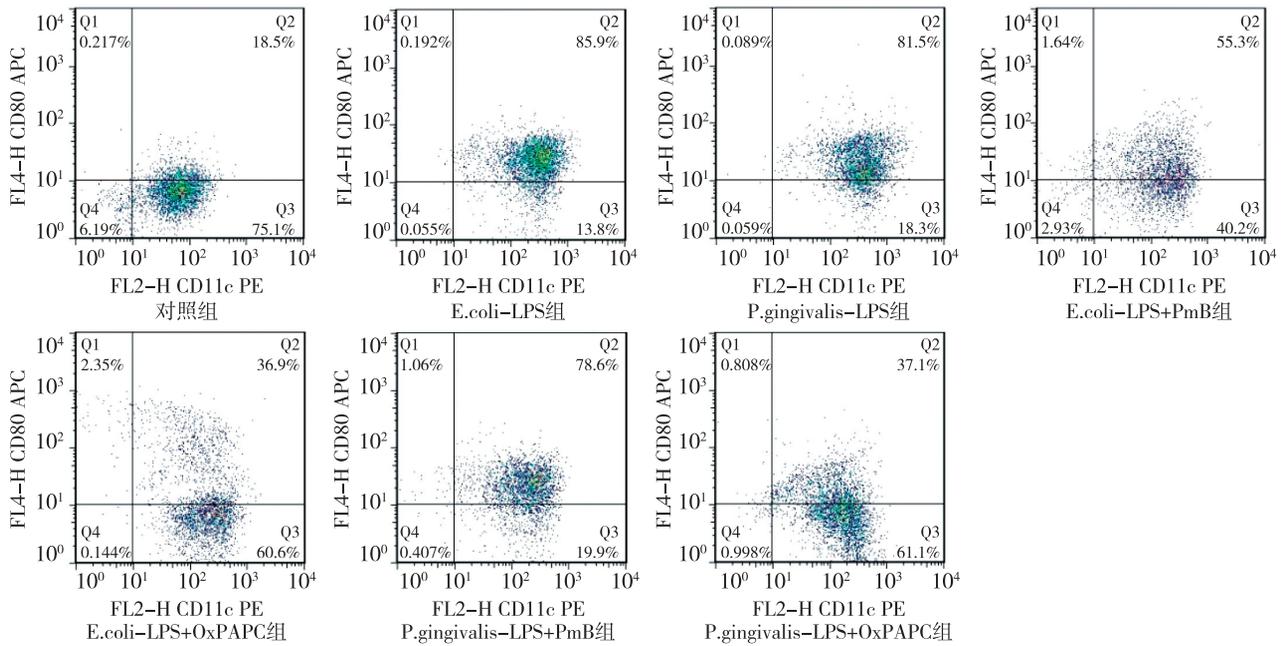


图 2 各组 CD11c⁺ CD80⁺ DCs 流式细胞学结果

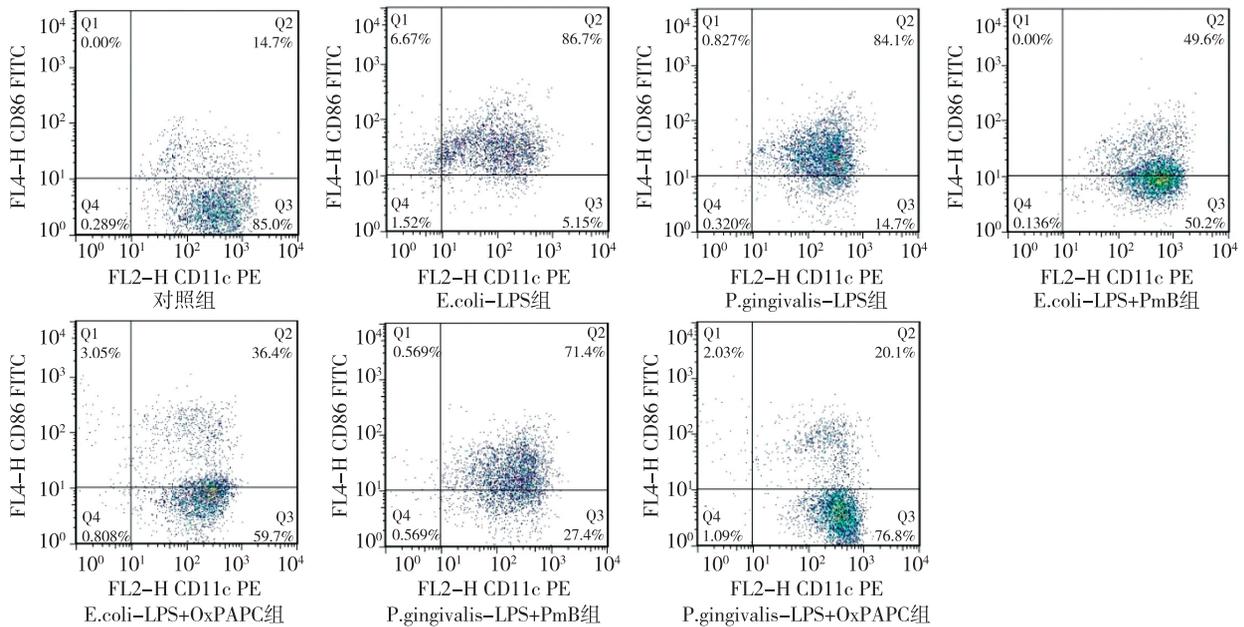


图 3 各组 CD11c⁺ CD86⁺ DCs 流式细胞学结果

2.2 E. coli-LPS 和 P. gingivalis-LPS 通过不同的 TLRs 通路刺激 DCs 成熟 E. coli-LPS + PmB 组和 E. coli-LPS + OxPAPC 组 DCs MHC II、CD80、CD86 和 CD40 表达均明显低于 E. coli-LPS 组 ($P < 0.05$)；E. coli-LPS + PmB 组和 E. coli-LPS + OxPAPC 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。这些结果表明,在 E. coli-LPS 培养系统中加入 TLR4 抑制剂后,DCs 表达 MHC II、CD80、CD86 和 CD40 能力下降,即 TLR4 抑制剂可以抑制 E. coli-LPS 诱导的 DCs 成熟。P. gingivalis-LPS + PmB 组与 P. gingivalis-LPS 组

相比,DCs MHC II、CD80、CD86 和 CD40 表达未见明显下降 ($P > 0.05$)。P. gingivalis-LPS + OxPAPC 组 DCs MHC II、CD80、CD86 和 CD40 表达明显低于 P. gingivalis-LPS 组与 P. gingivalis-LPS + PmB 组 ($P < 0.05$)。这些结果表明,TLR4 信号抑制剂不能抑制 P. gingivalis-LPS 刺激 DCs 成熟,而 TLR2/TLR4 信号通路抑制剂可明显抑制 P. gingivalis-LPS 刺激 DCs 成熟。以上结果表明,E. coli-LPS 对 DCs 的刺激依赖 TLR4 信号通路而 P. gingivalis-LPS 对 DCs 的刺激依赖 TLR2 信号通路。见图 5。

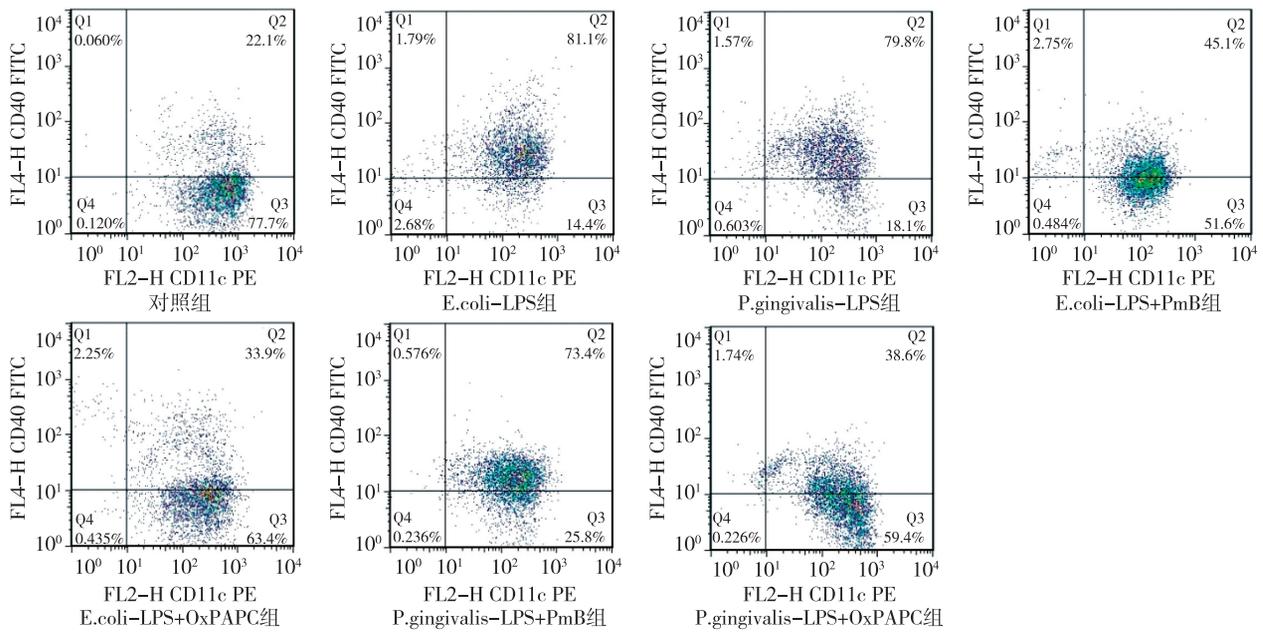
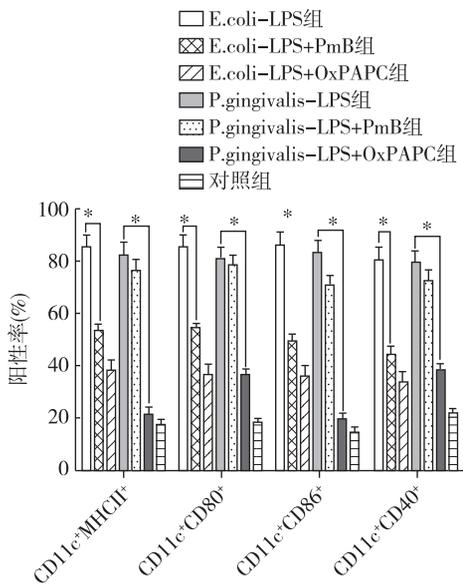


图 4 各组 CD11c⁺CD40⁺ DCs 流式细胞学结果



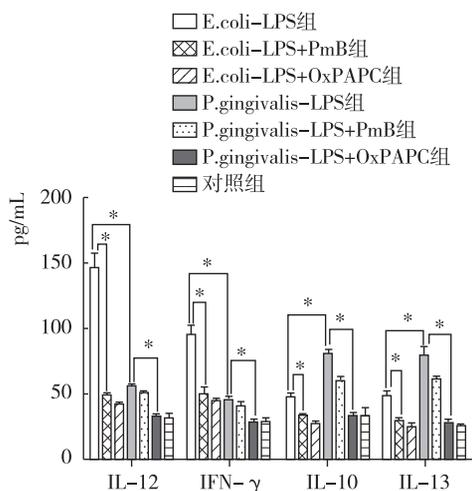
E. coli-LPS 和 P. gingivalis-LPS 均能促进 DCs 的成熟; PmB 抑制 E. coli-LPS 的作用; OxPAPC 抑制 P. gingivalis-LPS 的作用; * $P < 0.05$

图 5 各组 CD11c⁺MHC II⁺、CD11c⁺CD80⁺、CD11c⁺CD86⁺ 和 CD11c⁺CD40⁺ DCs 流式细胞学结果直方图比较

2.3 E. coli-LPS 和 P. gingivalis-LPS 刺激 DCs 分泌不同类型的细胞因子 P. gingivalis-LPS 组 DCs 分泌 IL-12 和 IFN- γ 的能力低于 E. coli-LPS 组 ($P < 0.05$), 同时, P. gingivalis-LPS 组 DCs 分泌 IL-10 和 IL-13 的能力高于 E. coli-LPS 组 ($P < 0.05$)。这些结果表明, E. coli-LPS 刺激下的 DCs 诱导 Th1 型免疫反应, P. gingivalis-LPS 刺激下的 DCs 诱导 Th2 型

免疫反应。TLR4 抑制剂 (PmB) 和 TLR2/TLR4 抑制剂 (OxPAPC) 的加入都可使 E. coli-LPS 组 DCs IL-12、IFN- γ 、IL-10 和 IL-13 的分泌明显降低 ($P < 0.05$); E. coli-LPS+PmB 组和 E. coli-LPS+OxPAPC 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。P. gingivalis-LPS 组加入 PmB 后, DCs 分泌 IL-12、IFN- γ 、IL-10 和 IL-13 的量未见明显下降 ($P > 0.05$); P. gingivalis-LPS 组加入 OxPAPC 后, DCs 分泌 IL-12、IFN- γ 、IL-10 和 IL-13 的量均显著下降 ($P < 0.05$); P. gingivalis-LPS+OxPAPC 组这些细胞因子的量也明显低于 P. gingivalis-LPS+PmB 组。这些结果与前述流式细胞学结果相一致, 即 E. coli-LPS 通过 TLR4 信号通路刺激 DCs 而 P. gingivalis-LPS 通过 TLR2 信号通路刺激 DCs。见图 6。

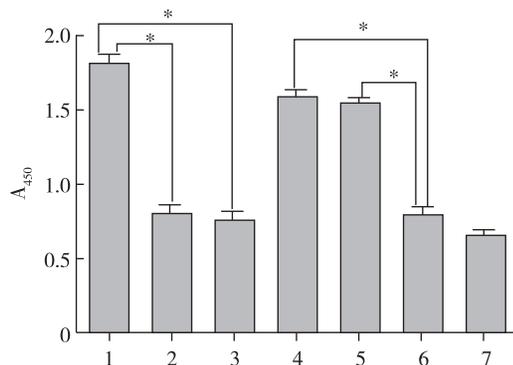
2.4 E. coli-LPS 和 P. gingivalis-LPS 刺激后的 DCs 触发不同类型的 T 细胞反应 各组 DCs 与 CD4⁺T 细胞共培养后的 CCK8 法细胞计数实验结果见图 7。在促进 CD4⁺T 细胞增殖方面, E. coli-LPS 组 DCs 和 P. gingivalis-LPS 组 DCs 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。E. coli-LPS+PmB 组 DCs 和 E. coli-LPS+OxPAPC 组 DCs 较 E. coli-LPS 组 T 细胞增殖均有明显下降 ($P < 0.05$), E. coli-LPS+PmB 组和 E. coli-LPS+OxPAPC 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。P. gingivalis-LPS+PmB 组 DCs 刺激 T 细胞增殖与 P. gingivalis-LPS 组相较未见明显下降 ($P > 0.05$)。P. gingivalis-LPS+OxPAPC 组 DCs 刺激 T 细胞增殖较 P. gingivalis-LPS 组和 P. gingivalis-LPS+PmB 组可见明显下降 ($P < 0.05$)。



E. coli-LPS 促进 DCs 分泌 IL-12 和 IFN- γ , P. gingivalis-LPS 促进 DCs 分泌 IL-10 和 IL-13; PmB 抑制 E. coli-LPS 的作用; OxPAPC 抑制 P. gingivalis-LPS 的作用; * $P < 0.05$

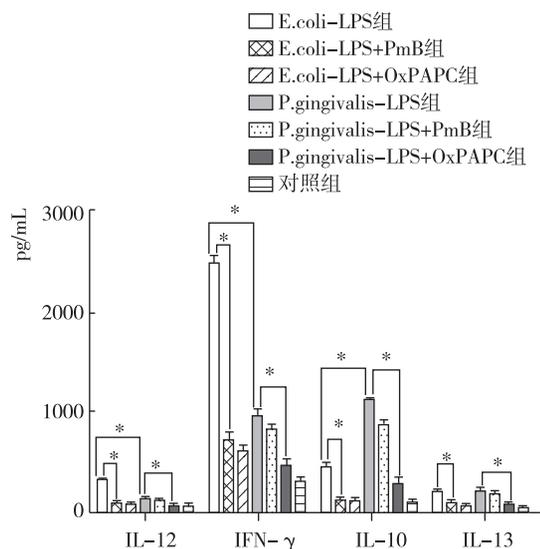
图 6 各组 DCs 分泌的细胞因子结果比较

与各组 DCs 共培养的 CD4⁺T 细胞分泌细胞因子的定量分析结果见图 8。P. gingivalis-LPS 组 T 细胞分泌 IL-2 和 IFN- γ 的量低于 E. coli-LPS 组 ($P < 0.05$), P. gingivalis-LPS 组 T 细胞分泌 IL-10 的量高于 E. coli-LPS 组 ($P < 0.05$), 2 组 T 细胞分泌 IL-13 的量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。这些结果与 E. coli-LPS 或 P. gingivalis-LPS 刺激 DCs 分泌不同类型细胞因子的结果相一致, 说明受 E. coli-LPS 刺激的 DCs 具有激发 Th0 细胞向 Th1 细胞转化的趋势; 受 P. gingivalis-LPS 刺激的 DCs 具有激发 Th0 细胞向 Th2 细胞转化的能力。与 E. coli-LPS+PmB 组 DCs 和 E. coli-LPS+OxPAPC 组 DCs 共培养的 T 细胞分泌的 IL-2、IFN- γ 、IL-10 和 IL-13 与 E. coli-LPS 组相比均明显下降, E. coli-LPS+PmB 组和 E. coli-LPS+OxPAPC 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 P. gingivalis-LPS+PmB 组 DCs 共培养的 T 细胞分泌的 IL-2、IFN- γ 、IL-10 和 IL-13 与 P. gingivalis-LPS 组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。P. gingivalis-LPS+OxPAPC 组 T 细胞分泌的 IL-2、IFN- γ 、IL-10 和 IL-13 明显低于 P. gingivalis-LPS 组和 P. gingivalis-LPS+PmB 组 ($P < 0.05$)。这些结果与前述结果相一致, 表明 E. coli-LPS 通过 TLR4 信号通路刺激 DCs 而 P. gingivalis-LPS 通过 TLR2 信号通路刺激 DCs。



1; E. coli-LPS 组; 2; E. coli-LPS+PmB 组; 3; E. coli-LPS+OxPAPC 组; 4; P. gingivalis-LPS 组; 5; P. gingivalis-LPS+PmB 组; 6; P. gingivalis-LPS+OxPAPC; 7; 对照组
E. coli-LPS 和 P. gingivalis-LPS 均可促进 CD4⁺T 细胞增殖; PmB 抑制 E. coli-LPS 的作用; OxPAPC 抑制 P. gingivalis-LPS 的作用; * $P < 0.05$

图 7 CCK-8 法检测各组 DCs 与 CD4⁺T 细胞共培养的 T 细胞增殖结果



E. coli-LPS 促进与 DCs 共培养的 T 细胞分泌 IL-2 和 IFN- γ , P. gingivalis-LPS 促进与 DCs 共培养的 T 细胞分泌 IL-10; PmB 抑制 E. coli-LPS 的作用; OxPAPC 抑制 P. gingivalis-LPS 的作用; * $P < 0.05$

图 8 与各组 DCs 共培养的 CD4⁺T 细胞分泌的细胞因子结果比较

3 讨论

P. gingivalis-LPS 是牙周炎的主要致病因素之一, 其对于牙周组织细胞的作用一直是研究的热点^[6]。E. coli-LPS 和 P. gingivalis-LPS 虽然同为 LPS, 其两者对于不同细胞系的作用途径和作用

结果不尽相同。Kirikae 等^[7]研究表明, *P. gingivalis*-LPS 能够刺激 TLR4 缺失的 C3H/HeJ 小鼠巨噬细胞发挥抗炎作用。Jones 等^[8]研究指出, *E. coli*-LPS 刺激大鼠牙龈成纤维细胞分泌更多的 IL-6、iNOS 和 MCP-1 而 *P. gingivalis*-LPS 刺激大鼠巨噬细胞分泌更多的 IL-6、IL-1 和 MCP-1。Barksby 等^[9]研究表明, *E. coli*-LPS 通过 TLR4 通路激活单核细胞而 *P. gingivalis*-LPS 通过 TLR2 通路激活单核细胞。Jotwani 等^[10]研究指出, *P. gingivalis*-LPS 刺激单核细胞来源 DCs 成熟需要 TLR2 和 TLR4 双通路。Diya 等^[11]研究表明, *E. coli*-LPS 和 *P. gingivalis*-LPS 通过不同的信号通路刺激 THP-1 细胞, TLR2-JNK 通路在 *P. gingivalis*-LPS 引起的慢性牙周炎病程中起重要作用。Sun 等^[12]研究指出, *P. gingivalis*-LPS 通过 TLR2 通路刺激 THP-1 细胞产生内毒素耐受而 *E. coli*-LPS 通过 TLR4 通路刺激 THP-1 细胞产生内毒素耐受。这些差异产生的原因可能在于 *P. gingivalis*-LPS 和 *E. coli*-LPS 脂质 A 的亲水性二磷酸盐构架不同导致 *P. gingivalis*-LPS 和 *E. coli*-LPS 的化学结构有所不同, 致使 *P. gingivalis*-LPS 和 *E. coli*-LPS 对 TLR 的亲合力产生差异^[13]。

有研究证实, 健康牙龈、牙龈炎牙龈和牙周炎牙龈的上皮和结缔组织中都存在着朗格汉斯细胞 (Langerhans cells, LCs) 和 DCs^[14]。DCs 作为先天性免疫和获得性免疫之间的桥梁在抗微生物感染方面发挥着至关重要的作用, 在牙周病的病程中, DCs 的分布和表型的变化调节着牙周免疫应答^[15]。*P. gingivalis*-LPS 是公认的牙周主要致病成分, 为了研究在牙周病的发生、发展过程中, *P. gingivalis*-LPS 和 DCs 的相互作用, 我们进行了本研究。

近期已发表的研究中, 学者们普遍采用浓度为 10~200 ng/mL 的 LPS 以研究其对于不同细胞系的作用^[16-17]。本研究中, 我们采用 100 ng/mL 的 *P. gingivalis*-LPS 及 100 ng/mL 的 *E. coli*-LPS 在体外与 DCs 共培养, 以评价 *P. gingivalis*-LPS 和 *E. coli*-LPS 在促进 DCs 成熟和发挥抗原提呈功能方面的作用。

Polymyxin B (PmB) 是由类芽孢杆菌 polymixa 产生的环状阳离子抗生素肽, PmB 已经被证实可阻断 TLR4 通路从而抑制 LPS 的作用^[18]。LPS 是 G⁻细菌细胞壁的主要成分, 脂质 A 是其有效致病成分。阳离子属性的 PmB 与阴离子属性的脂质 A 相结合, 从而抑制 LPS 生物学效应的发挥^[19]。OxPAPC 由 1-棕榈酰-2-花生四烯-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (phosphorylcholine, PAPC) 氧化而来, 是含有 sn-2

全长的氧化磷脂及其残留碎片的混合物。OxPAPC 可同时抑制细菌脂肽和 LPS 的信号通路, 已经被证实为 TLR2 和 TLR4 的抑制剂^[20]。细胞上的 CD14、LPS 结合蛋白 (LPS-binding protein, LBP) 和髓样分化蛋白 2 (myeloid differential protein 2, MD2) 可与细菌脂质相结合, 这些蛋白与 TLR 共同构成 LPS 受体复合物, 被称为 TLR 辅助蛋白。OxPAPC 通过与这些 TLR 辅助蛋白相结合, 导致 LPS 无法与 LPS 受体复合物相结合, 从而抑制 TLR2 和 TLR4 信号转导^[21]。

本研究结果显示, 在 *E. coli*-LPS 培养系中加入 PmB 后, DCs 成熟、分泌细胞因子及其与 CD4⁺T 共培养后 T 细胞增殖、分泌炎症因子均被明显抑制, 这些结果表明, 对于 DCs, *E. coli*-LPS 是其 TLR4 配体。在 *P. gingivalis*-LPS 培养系中加入 PmB 后, DCs 成熟、分泌细胞因子及其与 CD4⁺T 共培养后 T 细胞增殖、分泌炎症因子均未见明显下降; 而在 *P. gingivalis*-LPS 培养系中加入 OxPAPC 后, DCs 成熟、分泌细胞因子及其与 CD4⁺T 共培养后 T 细胞增殖、分泌炎症因子均被明显抑制, 这些结果表明, 对于 DCs, *P. gingivalis*-LPS 是其 TLR2 配体。

在 DCs 抗原提呈功能方面, 本研究结果显示, *P. gingivalis*-LPS 组 DCs 分泌的 IFN- γ 和 IL-12 较 *E. coli*-LPS 组少, *P. gingivalis*-LPS 组 DCs 分泌的 IL-10 和 IL-13 较 *E. coli*-LPS 组多。其后的混合淋巴细胞反应结果显示, 与 *P. gingivalis*-LPS 组 DCs 共培养的 T 细胞分泌 IFN- γ 和 IL-2 的量少于与 *E. coli*-LPS 组 DCs 共培养的 T 细胞, 与 *P. gingivalis*-LPS 组 DCs 共培养的 T 细胞分泌 IL-10 的量多于与 *E. coli*-LPS 组 DCs 共培养的 T 细胞。这些结果表明, 较之 *E. coli*-LPS, *P. gingivalis*-LPS 刺激下的 DCs 具有更强的促进 Th2 型免疫反应的能力。

本研究通过体外实验揭示了 *P. gingivalis*-LPS 和 *E. coli*-LPS 在促进 DCs 成熟和抗原提呈功能方面的不同作用途径。同时, 本研究阐释了 *P. gingivalis*-LPS 刺激下 DCs 的免疫反应, 其结果提示 *P. gingivalis*-LPS 刺激导致的 DCs 成熟和抗原提呈并促进 Th2 型免疫反应可能是牙周炎病程中细胞免疫和体液免疫共同发生的重要发病机制。这些实验结果有助于进一步阐明 DCs 在牙周炎的发生、发展过程中的可能作用机制。

【参考文献】

- [1] Marchesan JT, Morelli T, Lundy SK, et al. Divergence of the systemic immune response following oral infection with distinct

- strains of *Porphyromonas gingivalis* [J]. *Mol Oral Microbiol*, 2012, 27(6): 483-495.
- [2] Vroman H, van den Blink B, Kool M. Mode of dendritic cell activation; the decisive hand in Th2/Th17 cell differentiation. Implications in asthma severity? [J] *Immunobiology*, 2015, 220(2): 254-261.
- [3] 陈哲, 胡明道, 田大广, 等. 重组腺病毒介导人类白细胞抗原-G 基因转染恒河猴树突状细胞对 T 细胞的增殖作用 [J]. *医学研究生学报*, 2017, 30(1): 5-9.
- [4] 周建光, 杨梅, 曹海涛, 等. 淋巴细胞亚群的检测在临床的应用 [J]. *东南国防医药*, 2015, 17(3): 298-300, 321.
- [5] Hajishengallis G, Tapping RI, Harokopakis E, *et al.* Differential interactions of fimbriae and lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* with the Toll-like receptor 2-centred pattern recognition apparatus [J]. *Cellular Microbiol*, 2006, 8(10): 1557-1570.
- [6] Kocgozlu L, Elkaim R, Tenenbaum H, *et al.* Variable Cell Responses to P-gingivalis Lipopolysaccharide [J]. *J Dent Res*, 2009, 88(8): 741-745.
- [7] Kirikae T, Nitta T, Kirikae F, *et al.* Lipopolysaccharides (LPS) of oral black-pigmented bacteria induce tumor necrosis factor production by LPS-refractory C3H/HeJ macrophages in a way different from that of *Salmonella* LPS [J]. *Infect Immun*, 1999, 67(4): 1736-1742.
- [8] Jones KJ, Ekhlasi S, Montufar-Solis D, *et al.* Differential cytokine patterns in mouse macrophages and gingival fibroblasts after stimulation with *porphyromonas gingivalis* or *Escherichia coli* lipopolysaccharide [J]. *J Periodontol*, 2010, 81(12): 1850-1857.
- [9] Barksby HE, Nile CJ, Jaedicke KM, *et al.* Differential expression of immunoregulatory genes in monocytes in response to *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide [J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 156(3): 479-487.
- [10] Jotwani R, Moonga BS, Gupta S, *et al.* Nuclear factor-kappa B p50 subunits in chronic periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-pulsed dendritic cells [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1192: 278-285.
- [11] Diya Z, Lili C, Shenglai L, *et al.* Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS [J]. *Innate Immun*, 2008, 14(2): 99-107.
- [12] Sun Y, Li H, Sun MJ, *et al.* Endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*; alternations in Toll-like receptor 2 and 4 signaling pathway [J]. *Inflammation*, 2014, 37(1): 268-276.
- [13] Andrukhov O, Ertlschweiger S, Moritz A, *et al.* Different effects of *P. gingivalis* LPS and *E. coli* LPS on the expression of interleukin-6 in human gingival fibroblasts [J]. *Acta Odontol Scand*, 2014, 72(5): 337-345.
- [14] Cutler CW, Jotwani R. Dendritic cells at the oral mucosal interface [J]. *J Dent Res*, 2006, 85(8): 678-689.
- [15] Cury PR, Furuse C, Rodrigues AE, *et al.* Interstitial and Langerhans' dendritic cells in chronic periodontitis and gingivitis [J]. *Braz Oral Res*, 2008, 22(3): 258-263.
- [16] Kowsar R, Hambruch N, Marey MA, *et al.* Evidence for a novel, local acute-phase response in the bovine oviduct; progesterone and lipopolysaccharide up-regulate alpha 1-acid-glycoprotein expression in epithelial cells in vitro [J]. *Mol Reprod Dev*, 2014, 81(9): 861-870.
- [17] Padiol-Molina M, Volk SL, Rios HF. Periostin increases migration and proliferation of human periodontal ligament fibroblasts challenged by tumor necrosis factor -alpha and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides [J]. *J Periodontal Res*, 2014, 49(3): 405-414.
- [18] Knobloch J, Feldmann M, Wahl C, *et al.* Endothelin receptor antagonists attenuate the inflammatory response of human pulmonary vascular smooth muscle cells to bacterial endotoxin [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 346(2): 290-299.
- [19] Dadaglio G, Fayolle C, Zhang X, *et al.* Antigen Targeting to CD11b(+) Dendritic Cells in Association with TLR4/TRIF Signaling Promotes Strong CD8(+) T Cell Responses [J]. *J Immunol*, 2014, 193(4): 1787-1798.
- [20] von Schlieffen E, Oskolkova OV, Schabbauer G, *et al.* Multi-Hit Inhibition of Circulating and Cell-Associated Components of the Toll-Like Receptor 4 Pathway by Oxidized Phospholipids [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(3): 356-362.
- [21] Erridge C, Kennedy S, Spickett CM, *et al.* Oxidized phospholipid inhibition of Toll-like receptor (TLR) signaling is restricted to TLR2 and TLR4 - Roles for CD14, LPS-binding protein, and MD2 as targets for specificity of inhibition [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(36): 24748-24759.

(收稿日期:2017-03-12; 修回日期:2017-08-08)

(本文编辑:叶华珍; 英文编辑:王建东)