

# IL-1 $\beta$ 对培养的人牙龈成纤维细胞间 sICAM-1 表达的影响<sup>①</sup>

唐倩<sup>1</sup> 梁焕友<sup>1</sup> 刁惠波<sup>1</sup> 宁波<sup>2</sup> 刘国萍<sup>1</sup> 钟梓川<sup>1</sup>

(中山医科大学 1 附属第三医院口腔科 2 免疫教研室; 广州, 510630)

**摘要** 目的: 探讨白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 对人牙龈成纤维细胞(HGF) 培养液中可溶性细胞间粘附分子-1(sICAM-1) 表达的影响。方法: 运用细胞培养技术, 观察不同浓度的 IL-1 $\beta$  诱发 sICAM-1 表达的情况, 并采用 ELISA 法检测培养上清液中 sICAM-1 的含量。结果: 正常 HGF 培养液中有微量 sICAM-1 的表达, 随着 IL-1 $\beta$  浓度的增加, sICAM-1 的表达量亦显著增加。结论: HGF 培养液中, sICAM-1 的表达与 IL-1 $\beta$  浓度呈等级相关, 其含量的改变可能在牙周炎症的病理过程中起着重要作用。

**关键词** 白细胞介素 1/ 类似物和衍生物; 胞间粘附分子; 牙龈; 成纤维细胞

**中图分类号** R 781.4; R 392.11

## Effects of Interleukin-1 $\beta$ on the Expression of Soluble Intercellular Adhesion Molecule in Cultured Human Gingival Fibroblasts

Tang Qian<sup>1</sup> Liang Huanyou<sup>1</sup> Diao Huibo<sup>1</sup> Ning Bo<sup>2</sup> Liu Guoping<sup>1</sup> Zhong Zichuan<sup>1</sup>

(1 Department of Stomatology, Third Affiliated Hospital 2 Department of Immunology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

**Abstract Objective:** To evaluate the effect of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) on the expression of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in cultured human gingival fibroblasts (HGF). **Methods:** Cultured HGF were stimulated on 24-well culture plates with different concentration of IL-1 $\beta$ , expression of sICAM-1 in supernatant were analyzed with ELISA methods. **Result:** sICAM-1 expression was slight in normal HGF, but markedly enhanced by exposure to IL-1 $\beta$  in a dose-dependent manner. **Conclusion:** The findings suggest that the expression of sICAM-1 in HGF be up-regulated by IL-1 $\beta$ , and may be involved in the pathogenesis of periodontitis.

**Subject headings** interleukin-1/ analog & derivatives; intercellular adhesion molecule-1; gingiva; fibroblasts

国外对牙周组织局部膜型细胞间粘附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 的表达与牙周疾病的发生、发展、愈合及复发的关系已进行了研究, 认为牙周炎病损区膜型 ICAM-1 的表达水平变化与牙周炎的病程发展阶段有关<sup>[1]</sup>, 但对可溶性细胞间粘附分子-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1) 与牙周疾病关系的研究尚未见报道。本研究采用体外细胞培养的方法, 观察在不同浓度的炎性因子白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 作用下, 人牙龈成纤维细胞 (human gingival fibroblasts, HGF) 培养液中 sICAM-1 表达的改变, 分析 sICAM-1 表达与 IL-1 $\beta$  的相互关系, 探讨牙周炎发

病的可能机制。

### 1 材料和方法

#### 1.1 主要试剂

培养液 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)、胎牛血清 FCS (Fetal calf serum) 由中山医科大学免疫学教研室提供; 胰酶、ICAM-1 试剂盒、IL-1 $\beta$  购自广州康润生物制品开发有限公司。

#### 1.2 方法

1.2.1 原代培养 无菌条件下, 切取因正畸需要而拔除的健康牙齿周围附着的新鲜牙龈组织, 大小

约为 3 mm×3 mm×2 mm, 用培养液反复冲洗后, 将组织块置于无菌器皿上修整, 将剪切好的小块挟取放置于 25 mL 的培养瓶内, 注入培养液 4 mL, 盖好瓶盖, 将其放入培养箱内培养。培养液为含体积分数为 0.1 的 FCS 的 DMEM, 每 mL 培养液中加 2 mmol/L 谷氨酰胺、100 IU 青霉素以及 100 μg 链霉素。培养条件为 37 °C、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱。

1.2.2 传代培养 原代培养后, 每天在倒置显微镜下观察细胞生长情况, 待从组织块游出的细胞贴壁生长达 1/3 面积时, 即可用 2.5 g/L 胰酶进行消化、传代, 传代比例为 1:1, 以后传代时机为细胞铺满瓶底约 80%~90%, 传代比例为 1:2, 细胞传代至 5~8 代时进行实验。

1.2.3 细胞处理 将传代好的细胞调整浓度为  $1 \times 10^7$  个/L, 接种在 4 个 24 孔的培养板中, 每孔加入细胞混悬液 200 μL, 使得每孔含细胞  $2 \times 10^3$  个, 37 °C、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱培养 24 h, 镜下观察见细胞贴壁生长至单层细胞铺满后, 弃原液, 将培养好的细胞分为 6 组, 每组 8 孔, 在培养液中分别加入不同浓度的 IL-1β (0、0.001、0.01、0.1、1、10 μg/L 的 IL-1β), 培养 24 h。刺激完成后, 取各孔的培养上清液待测。

1.2.4 含量检测 采用 ELISA 法检测培养液中 sICAM-1 的含量。

1.2.5 统计学处理 用 SPSS 统计软件包对数据进行处理, 两样本均数比较采用 *t* 检验, sICAM-1 的表达与 IL-1β 浓度的相关分析采用 Spearman 等级相关分析。

## 2 结果

### 2.1 sICAM-1 的表达与 IL-1β 浓度的等级相关分析

随着 IL-1β 浓度的增加, HGF 生成 sICAM-1 的能力也相应增强, 两者间存在着明显的等级相关关系, 其相关系数为 0.936 ( $P < 0.001$ )。

### 2.2 IL-1β 对 HGF 产生 sICAM-1 的影响

HGF 经 IL-1β 作用后, 培养上清液中 sICAM-1 的含量显著增加, 当 IL-1β 的浓度为 0.001 μg/L 时, HGF 产生 sICAM-1 的量为空白对照组的 5 倍; 当 IL-1β 的浓度增加为 0.01、0.1、1、10 μg/L 时, HGF 产生 sICAM-1 的量分别为空白对照组的 8 倍、16 倍、28 倍和 36 倍。各浓度组与空白对照组间两两

比较, 均存在着统计学差异(表 1)。

表 1 IL-1β 对 HGF 产生 sICAM-1 的浓度效应

Table 1 Dose response of sICAM-1 expression after stimulation by different concentration of IL-1β

$\rho_{IL-1\beta}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho_{sICAM-1}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	<i>t</i>	<i>P</i>
0	0.3±0.4		
0.001	1.5±0.5	7.1	< 0.001
0.01	2.5±0.8	5.0	< 0.001
0.1	5.1±2.2	6.0	< 0.001
1	8.8±1.4	16.8	< 0.001
10	11.4±1.3	23.3	< 0.001

*t*、*P* value: compared with first group; *n*=8 in each group

## 3 讨论

细胞间粘附分子是介导细胞间粘附的重要功能分子。它参与机体的免疫调节, 促进白细胞在炎症或损伤部位的聚集, 影响 T 细胞、B 细胞的活化及其效应<sup>[2]</sup>。它可以膜型表达于多种细胞表面, 还可以脱落或溶解的形式存在<sup>[3]</sup>。1991 年 Seth 和 Rothlein 首先发现以溶解形式存在的 sICAM-1<sup>[4]</sup>, 这种可溶性的 sICAM-1 包含了膜型 ICAM-1 胞外区的绝大部分, 能与膜型 ICAM-1 竞争性地结合白细胞膜表面的 LFA-1。由于 sICAM-1 检测取样方便, 它在肿瘤、自身免疫性疾病、炎症以及移植物排斥反应等多种疾病的发生、发展及转归中的作用已引起了人们的极大关注。牙周炎是牙周菌斑所引发的炎症性病变, 表现为牙周组织异常的炎症反应和免疫反应, 其中 ICAM-1 介导的细胞与细胞间的粘附对于病变区淋巴细胞的浸润有着重要作用<sup>[3]</sup>。而炎症因子 IL-1β 是牙周炎中的一种重要炎性介质, 它能诱导牙龈组织的主要细胞成分 HGF 表达膜型 ICAM-1<sup>[5,6]</sup>。对于它是否能同时增强 sICAM-1 的表达, 以加剧局部炎症反应和免疫损伤, 并导致牙槽骨的吸收目前尚不清楚, 探讨这一问题对于从分子生物学水平揭示牙周炎发病机理具有重要意义, 并为牙周炎的检测开辟新的途径。

本实验发现 IL-1β 能诱导 HGF 产生 sICAM-1, 且其产生 sICAM-1 的能力与 IL-1β 浓度呈等级相关, 即 HGF 培养液中 sICAM-1 的表达随炎症因子 IL-1β 浓度的增高而加强。这说明在牙周病变过程中, IL-1β 可能通过诱导 HGF 生成 sICAM-1, 导致牙周局部出现活性的淋巴细胞、多核巨噬细胞、中性

粒细胞等的过多聚积, 从而产生一系列生物学效应。

研究还发现不同 IL-1 $\beta$  浓度组 sICAM-1 的表达水平存在着统计学差异, 各实验组均显著高于对照组。当 HGF 未经 IL-1 $\beta$  处理时, 仅有微量 sICAM-1 的表达, 而当 IL-1 $\beta$  的作用浓度达 0.001  $\mu\text{g/L}$  时, sICAM-1 的表达显著增加, 为对照组的 5 倍, 这说明 HGF 对炎症因子 IL-1 $\beta$  较为敏感, 小剂量的 IL-1 $\beta$  就能刺激 sICAM-1 的大量生成。

本实验从细胞粘附信息传导的角度, 探讨了牙周炎症过程当中 sICAM-1 的表达水平与炎症因子 IL-1 $\beta$  间的相互关系, 认为 sICAM-1 可作为牙周炎早期免疫反应的一个可靠指标。由于对牙周炎病变过程中细胞粘附的研究尚处于初级阶段, 对于细胞间粘附分子在牙周组织的作用过程及其致病机理尚有待进一步研究。

#### 参 考 文 献

1 Steffensen B, Duong A H, Milam S B, *et al.* Immunohisto-

- logical localization of cell adhesion proteins and integrins in the periodontium. *J Periodontol* 1992, 63(7): 584
- 2 Mackay C R, Imhof B A. Cell adhesion in the immune system. *Immunol Today*, 1993, 14(3): 99
- 3 唐 倩. 细胞间粘附分子在牙周组织的分布及其意义. 国外医学口腔医学分册, 1998, 25(4): 232
- 4 Rothlein R, Mainolfi E A, Czajkowski M. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol* 1991, 147(1): 3788
- 5 Takahashi K, Takigawa M, Takashiba S *et al.* Role of cytokine in the induction of adhesion molecules on cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol*, 1994, 65(3): 230
- 6 Hayashi J, Saito I, Ishikawa I, *et al.* Effects of cytokine and periodontopathic bacteria on the leukocyte function associated antigen 1/ Intercellular adhesion molecule 1 pathway in gingival fibroblasts in adult periodontitis. *Infect Immun*, 1994, 62(12): 5205

(1999-02-26 收稿 1999-06-11 修回)

#### 简 讯

### 博士后余谦的研究显示中药“胃康宁”具有 对抗大鼠实验性胃癌的作用

中山医科大学临床医学博士后余谦的研究工作报告显示中药“胃康宁”具有对抗大鼠实验性胃癌的作用, 并通过对大鼠实验性胃癌组织细胞 PCNA、p53 癌蛋白及 VEGF 表达的抑制效应, 能显著抑制胃癌发生、发展过程中的自主生成、浸润转移等恶性生物学行为。

余谦博士在站期间在中西医结合研究所所长吴伟康教授及孙逸仙纪念医院李庆明教授指导下, 用中医学理论结合现代先进的分子生物学方法, 开展《中药“胃康宁”防治实验性胃癌及对 PCNA、p53 蛋白、VEGF 表达影响的研究》。中医学认为胃癌的发生、发展过程与气郁、痰积、脾虚、瘀毒等病理因素密切相关, 余博士根据此理论以具有健脾化痰、清热解毒、理气活血、消瘀散结功效的中药复方“胃康宁”开展防治大鼠实验性胃癌的研究。在细胞学水平观察中药阻止胃粘膜细胞恶性表型及促进恶变的胃粘膜细胞逆转作用; 在分子生物学水平观察与胃癌发生发展过程密切相关的 p53 癌蛋白及 VEGF、PCNA 等表达及中药干预作用。光镜及电镜观察显示: “胃康宁”对大鼠实验诱导性胃癌的发生有不同程度的对抗作用, 全程服用“胃康宁”组的抗癌效果明显, 提示预防性给予“胃康宁”具有良好的抑制大鼠胃粘膜细胞恶性表型的作用; 后半程服用“胃康宁”组呈现一定的抗癌效应, 提示中药“胃康宁”具有一定的逆转胃粘膜细胞恶性表型作用。通过免疫组化显示: “胃康宁”具有显著抑制大鼠实验性胃癌组织细胞中的 PCNA、p53 癌蛋白及 VEGF 表达的效应, 且全程服用的效应优于后半程服用的效应。研究结果表明中药“胃康宁”具有抗大鼠实验性胃癌的作用。

(冯世容)