

I 型单纯疱疹病毒对牙龈成纤维细胞炎症因子表达的影响

邓 超 薛进朗 郭家奕 王金孟 汪 伟 施六霞 陈传俊

(皖南医学院 口腔医学院 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 通过观察 I 型单纯疱疹病毒(HSV-1) 对牙龈成纤维细胞炎症因子分泌情况的影响, 探究 HSV-1 与牙龈炎症之间的相关性。方法: 体外培养人牙龈成纤维细胞, 分别用 1×10^4 PFU/mL、 1×10^5 PFU/mL、 1×10^6 PFU/mL 3 种浓度的 HSV-1 病毒加以刺激, 48 h、96 h 后分别收集各组上清液进行 ELISA 检测, 观察白细胞介素-6(IL-6) 的表达情况; 96 h 后提取细胞 RNA, real-time PCR 检测细胞 IL-6 基因的表达情况。结果: 3 组实验组的上清液中均有 IL-6 的表达, 且随着刺激浓度的加大、刺激时间的延长, 表达量增加; real-time PCR 结果显示与对照组相比随着浓度的加大 IL-6 mRNA 表达水平增加, 但 1×10^5 PFU/mL、 1×10^6 PFU/mL 浓度组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: I 型单纯疱疹病毒(HSV-1) 能增加炎症因子 IL-6 的表达, 并对人牙龈成纤维细胞产生影响, 可能会增加牙龈炎症的易感性。

【关键词】 I 型单纯疱疹病毒; 人牙龈成纤维细胞; 白细胞介素-6; 牙龈炎

【中图分类号】 R 780.2; R 373.11 **【文献标志码】** A

【DOI】 10.3969/j.issn.1002-0217.2018.05.020

Effect of HSV-1 on the inflammatory cytokines expression in human gingival fibroblasts

DENG Chao, XUE Jinlang, GUO Jiayi, WANG Jinmeng, WANG Wei, SHI Liuxia, CHEN Chuanjun

School of Stomatology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To investigate the effect of herpes simplex virus type 1(HSV-1) on the secretion of inflammatory factors in human gingival fibroblasts and correlation of HSV-1 with gingival inflammation. **Methods:** Human gingival fibroblasts were cultured *in vitro* and challenged with HSV-1 in dose of 1×10^4 PFU / mL, 1×10^5 PFU / mL and 1×10^6 PFU / mL, respectively. The supernatant was harvested from each group after 48 h and 96 h of incubation and subjected to detection of interleukin-6(IL-6) expression using ELISA. Real-time PCR was performed to detect the cell RNA and IL-6 expression in the supernatant obtained at 96 h. **Results:** IL-6 was expressed in the supernatant of the three experimental groups, and up-regulated with added dose and prolonged challenge. Real-time PCR indicated that IL-6 mRNA was also increased with HSV-1 dose as compared with the control group, yet the difference was insignificant between dosage groups of 1×10^5 PFU/ mL and 1×10^6 PFU/mL($P > 0.05$) . **Conclusion:** HSV-1 can increase IL-6 expression and change the biological activity of human gingival fibroblasts, which may lead to increased susceptibility to gingival inflammation .

【Key words】 herpes simplex virus type 1; human gingival fibroblasts; interleukin-6; gingivitis

牙龈炎(gingivitis) 是发生于牙龈组织的炎症, 表现为牙龈色、形、质的改变, 探诊易出血, 随着病程的发展其炎性细胞中相关分子的免疫功能发生变化, 牙周袋形成、牙槽骨丧失, 造成病理性改变从而导致牙周炎(periodontitis) 的发生^[1]。有研究表明, 人巨细胞病毒、单纯疱疹病毒和 EB 病毒在牙周炎发病中起着重要的作用^[2-3], 其通过促炎细胞或非炎细胞释放损害牙周免疫防御的细胞因子和趋化因子, 导致更具毒性的牙周细菌的建立^[4]。还有学者认为牙周炎的发展取决于疱疹病毒、特异性致病菌及破坏性炎症介质之间的协同作用。

本实验拟通过研究 I 型单纯疱疹病毒(HSV-1) 对人牙龈成纤维细胞炎症因子的分泌情况, 探讨 HSV-1 与牙龈炎症之间的相关性, 以及是否通过影响牙龈成纤维细胞的生物性能, 增加了炎症因子的分泌, 从而加剧了牙龈、牙周疾病的发展。

1 材料和方法

1.1 主要试剂、实验器材及取材 PBS(gibco, USA); DMEM 培养基(HyClone, USA); 胎牛血清(四季青, 杭州); 双抗(gibco 公司, USA); Human IL-6 ELISA Kit(ABclonal, 武汉); I 型胶原酶(Solarbio,

基金项目: 国家自然科学基金项目(81550037); 安徽省高校自然科学基金项目(KJ2017A255); 皖南医学院博士科研启动基金项目(WK2014RC03); 皖南医学院大学生科研基金项目(WK2016S10)

收稿日期: 2018-01-02

作者简介: 邓 超(1984-) 男, 讲师, 博士(电话) 0553-3932463(电子信箱) 289991329@qq.com;

陈传俊, 男, 教授(电子信箱) cej6318@sina.com, 通信作者。

USA); 胰蛋白酶(gibco ,USA); 细胞计数仪(Count-star ,上海); 二氧化碳培养箱(Thermo ,USA); 超净培养台(苏州设备净化有限公司 ,苏州); 倒置相差显微镜(OLYMPUS Japan)。

牙龈组织取材于弋矶山医院口腔颌面外科门诊因正畸需要拔牙的患者。取材前征得患者及家属同意。要求患者无全身性疾病,牙龈组织健康。患者年龄 14~20 岁。HSV-1 病毒由安徽医科大学友情提供,病毒滴度为 3×10^5 PFU/mL。

1.2 原代培养 酶消化法培养牙龈成纤维细胞: 将新鲜取出带有牙龈组织的牙齿投放在预冷的含有 $5 \times$ 的双抗的 PBS 液体中(含青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 mg/L) 2 h 内进行实验。在超净工作台用含有 $1 \times$ 双抗的 PBS 溶液中反复冲洗干净后转移到无菌培养皿中用手术刀轻轻地刮取牙颈部的牙龈组织块。1000 r/min 离心 5 min。弃上清后,加入含 3 mg/mL I 型胶原酶 1 mL, 37.5°C 每隔 5 min 振荡, 消化 40 min, 加入少量胎牛血清终止消化。离心后弃上清,加入 3 mL DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清) 将其置于二氧化碳培养箱($5\% \text{CO}_2$, 37°C 恒温) 中孵育 2~3 d 换液。

1.3 传代培养 待细胞长至瓶底 70%~80% 时, PBS 冲洗 1~2 遍, 加入少量 0.25% 含 EDTA 的胰酶置于 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱, 37°C 恒温中消化 5 min, 终止

反应后离心去上清, 进行常规传代培养。

1.4 HSV-1 病毒刺激 筛选生长状态良好的人牙龈成纤维细胞在六孔板中进行铺板, 待细胞长满孔的 80%~90%, 设置 1 个对照组(正常培养液) 3 个实验组(实验组 1、2、3 HSV-1 刺激浓度分别为 1×10^4 PFU/mL、 1×10^5 PFU/mL、 1×10^6 PFU/mL), 放入 CO_2 培养箱中继续培养, 分别于 48、96 h 收集一次上清液, 上清液放置于 -80°C 冷冻保存, 96 h 后提取细胞 RNA 留作后续实验。

1.5 酶联免疫吸附法(ELISA) 测定 IL-6 含量 使用 ABclonal 公司的 ELISA 试剂盒(Human IL-6 ELISA Kit) 测定细胞上清液中 IL-6 的含量。按照所提供的实验步骤稀释标准品, 准备试剂盒中所提供的酶标板, 然后在其中分别加入样本与标准品, 进行稀释、洗涤与抗体孵育等操作, 最后通过酶标仪进行各组 OD 值检测, 并通过 Curve Expert 1.4 软件进行 ELISA 标准曲线的绘制, 并计算出相应的 IL-6 的含量。

1.6 real-time PCR 检测各组 IL-6 mRNA 的含量 培养 96 h 后提取培养细胞总 RNA, β -actin 为内参照。引物设计参照 GenBank 数据库, 由上海生工生物工程股份有限公司设计合成(表 1)。real-time PCR 采用 20 μL 体系, 每管 3 个副孔, 重复 3 次。

表 1 引物序列

Gene	Forward primer	Reverse primer
IL-6	5'AAATTCGGTACATCCTCGACGG3'	5'GGAAGGTTCAAGTTGTTTTCTG3'
β -actin	5'GGGAAATCCTGCCTGACATTAAGG3'	5'CAGGAAGGAAGGCTGGAAGACTG3'

1.7 统计学分析 应用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学分析, 数值变量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据比较采用 F 检验, 多组间两两比较采用 q 检验; 同种病毒浓度不同刺激时间之间比较采用配对 t 检验。

2 结果

2.1 牙龈成纤维细胞的原代及传代 用全消化法培养原代细胞, 2 周左右汇集达到 80%, 倒置显微镜下, 大多数细胞呈梭形, 胞质丰满, 核仁清晰可见, 呈典型的成纤维细胞样形态。细胞长满时排列成束状, 并可见接触抑制现象(图 1)。

2.2 加病毒前后细胞的形态学变化 分别用 1×10^4 PFU/mL、 1×10^5 PFU/mL、 1×10^6 PFU/mL 3 种浓度的 HSV-1 病毒刺激牙龈成纤维细胞, 96 h 后倒置显微镜观察细胞形态, 与正常对照组相比(图 2A): $1 \times$

10^4 PFU/mL 组细胞形态正常, 呈长梭形, 无明显改变(图 2B); 1×10^5 PFU/mL 组细胞出现少量死亡, 细胞间隙增大(图 2C); 1×10^6 PFU/mL 组细胞出现大量死亡, 细胞由长梭形变为圆形, 胞核不清晰(图 2D)。

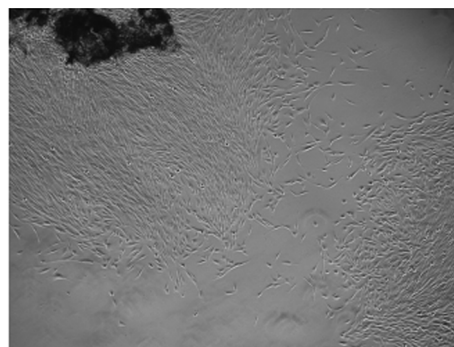
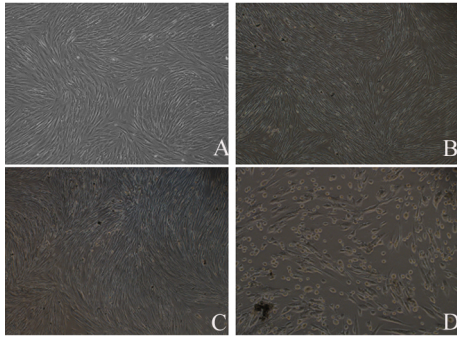


图 1 原代细胞($\times 4$)



A.正常对照组细胞; B.1×10⁴ PFU/mL 浓度下刺激的细胞; C.1×10⁵ PFU/mL 浓度下刺激的细胞; D.1×10⁶ PFU/mL 浓度下刺激的细胞。

图2 不同病毒浓度刺激后的细胞状态(×10)

2.3 酶联免疫吸附法(ELISA)检测IL-6的含量
用Curve Expert 1.4 软件进行ELISA标准曲线的绘制,结果显示 $r=0.996$,可信度高(图3)。

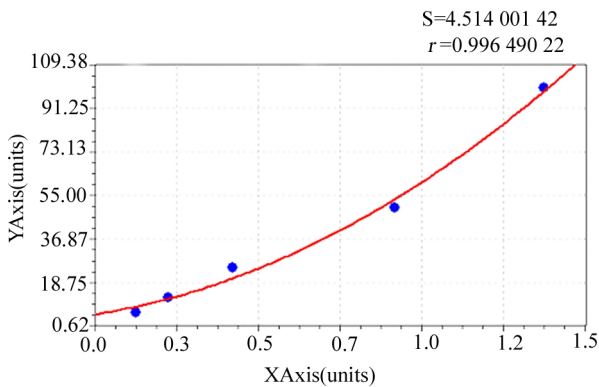


图3 ELISA 标准曲线($r=0.996$)

用 1×10^4 PFU/mL、 1×10^5 PFU/mL、 1×10^6 PFU/mL 3组不同浓度的HSV-1刺激牙龈成纤维细胞,分别于48 h、96 h收集上清液,ELISA检测上清液中IL-6的含量。结果显示:与对照组相比,48 h后3组实验组中IL-6的含量均上升,差异均有统计学意义($P < 0.05$);96 h后3组实验组中IL-6的含量也均上升,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各实验组96 h IL-6分泌量均高于48 h,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 不同浓度刺激下上清液中IL-6的含量 ng/L

组别(n=3)	48 h	96 h	t	P
对照组	127.658±2.602 ^a	165.137±4.635 ^a		
实验组1	213.196±5.977 ^b	268.623±5.531 ^b	215.215	0.000
实验组2	262.150±6.243 ^c	315.773±5.786 ^c	202.988	0.000
实验组3	302.207±5.450 ^d	421.103±8.173 ^d	75.627	0.000
F	609.889	889.445		
P	0.000	0.000		

注:多组间两两比较,符号不同表示 $P < 0.05$ 。

2.4 病毒刺激前后牙龈成纤维细胞IL-6 mRNA的表达
不同浓度HSV-1刺激牙龈成纤维细胞96 h后进行real-time PCR检测,结果表明,与对照组相比,3组实验组IL-6 mRNA的表达量上升,差异有统计学意义($P < 0.05$),但 1×10^5 PFU/mL浓度组和 1×10^6 PFU/mL浓度组IL-6 mRNA的表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表3。

表3 96 h后各组细胞中IL-6 mRNA的表达(RQ)

组别	n	相对表达量
对照组	3	1.000±0.179 ^a
实验组1	3	1.580±0.174 ^b
实验组2	3	2.369±0.360 ^c
实验组3	3	2.191±0.383 ^c
F		14.009
P		0.002

注:多组间两两比较,符号不同表示 $P < 0.05$ 。

3 讨论

牙周炎的致病因素很多,细菌致病学说中提到牙周炎的发病机制主要由牙周致病菌的毒力因子引起,常见的牙周致病菌包括福赛斯类杆菌、牙龈卟啉单胞菌和伴放线放线杆菌,这些细菌在体外表达多种毒力因子如Cag E蛋白、白细胞毒素、脂多糖和细胞致死膨胀毒素等,这些毒力因子加剧了牙周疾病的发生。但细菌致病学说并不能很好地解释牙周病的部位特异性以及间断爆发性等问题,提示除细菌致病学说以外,还存在其他的致病因素,有学者研究表明,在牙周炎患者龈沟液中检测到疱疹病毒,并可以通过牙周基础治疗降低疱疹病毒的感染率^[5];在不同严重程度的牙周炎患者中疱疹病毒的含量随着病变的严重程度而显著增加,疱疹病毒可能在增加疾病的严重程度方面发挥作用^[6]。

白细胞介素-6(IL-6)是牙周炎中最有效的促炎细胞因子之一,与牙周炎的发展息息相关。有学者用IL-1 β 和IL-6共刺激人牙龈成纤维细胞,发现其显著诱导细胞中STAT3,ERK和JNK的磷酸化,并增强了各种炎症相关分子如MMP-1,MCP-1,IL-1ra,bFGF和VEGF的表达^[7]。牙周炎患者的牙龈组织、牙周组织中可检测出大量的IL-6,其IL-6表达水平的增加可能与IL-6启动子甲基化相关^[8-9],大量的炎性介质改变了牙龈细胞和牙周膜细胞的生物学性能,加剧了牙周炎症的发展。

在本研究中,选用单纯疱疹病毒(HSV-1)感染实验组细胞,通过将实验前后记录的图片进行对比,

发现牙龈成纤维细胞随病毒浓度的增高以及感染时间的延长,细胞数目急剧减少,细胞形态由长梭形变为圆形,出现大量的死亡,而对照组细胞则无以上所述变化,正常生长。此外,经 ELISA 检测发现,HSV-1 感染的实验组均出现了炎症因子(IL-6)的表达,并随着病毒浓度的增大,时间的延长,炎症因子分泌量增多,IL-6 mRNA 的表达量在 3 种浓度的实验组中表达均上调,但在 1×10^5 PFU/mL 浓度组和 1×10^6 PFU/mL 浓度组并无明显差异,并未随着单纯疱疹病毒刺激浓度的增加而上升,这可能与高浓度病毒导致细胞死亡有关,过多的炎症因子分泌到上清液中,故 ELISA 检测上清液中 IL-6 含量上升,但存活细胞中 IL-6 的 mRNA 表达量并未增加。

本研究虽然不能证明 HSV-1 与牙周炎的发生直接相关,但可以确定 HSV-1 病毒影响了人牙龈成纤维细胞的功能,并导致细胞炎性分泌的改变。疱疹病毒能够在牙龈组织中繁殖,也可能介导对宿主免疫应答的损害,在牙周病的发病机制中发挥作用。因此,在今后预防和治疗牙周炎的同时可能需要同时考虑控制疱疹病毒的影响,以期获得更好的治疗效果。

【参考文献】

[1] KURGAN S, KANTARCI A. Molecular basis for immunohistochemical and inflammatory changes during progression of gingivitis to periodontitis [J]. *Periodontol* 2000, 2018, 76(1): 51-67.

[2] MUZAMMIL, JAYANTHI D, FAIZUDDIN M *et al.* Association of interferon lambda-1 with herpes simplex viruses-1 and -2, Epstein-Barr virus, and human cytomegalovirus in chronic periodontitis [J]. *J Investig Clin Dent* 2017, 8(2): 189-195.

[3] KAZI MMAG, BHARADWA R. Role of herpesviruses in chronic periodontitis and their association with clinical parameters and in increasing severity of the disease [J]. *Eur J Dent* 2017, 11(3): 299-304.

[4] ANTIPA C, BLEOTU C, GRANCEA C *et al.* Viral serological and molecular data on possible involvement of herpes viruses in periodontal disease [J]. *Singapore Dent J* 2016, 37(12): 15-19.

[5] SHAH R, MEHTA DS. Prevalence of herpesviruses in gingivitis and chronic periodontitis: relationship to clinical parameters and effect of treatment [J]. *J Indian Soc Periodontol* 2016, 20(3): 279-285.

[6] KAZI MM, BHARADWAJ R, BHAT K *et al.* Association of herpes viruses with mild, moderate and severe chronic periodontitis [J]. *J Clin Diagn Res* 2015, 9(7): 5-8.

[7] SAWADA S, CHOSA N, ISHISAKI A *et al.* Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1 β and IL-6 [J]. *Biomed Res* 2013, 34(1): 31-40.

[8] KOBAYASHI T, ISHIDA K, YOSHIE H. Increased expression of interleukin-6 (IL-6) gene transcript in relation to IL-6 promoter hypomethylation in gingival tissue from patients with chronic periodontitis [J]. *Arch Oral Biol* 2016, 69(9): 89-94.

[9] STEFANI FA, VIANA MB, DUPIM AC *et al.* Expression, polymorphism and methylation pattern of interleukin-6 in periodontal tissues [J]. *Immunobiology* 2013, 218(7): 1012-1017.

(上接第 469 页)

[4] 崔新亮, 赵继英, 等. SLIPA 喉罩与气管插管在全麻中的应用比较 [J]. *中华全科医学*, 2010, 8(8): 971-972.

[5] 井郁陌, 孙国明, 刘亚妹, 等. SLIPA 喉罩与气管插管在老年全麻手术中的应用比较 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2010, 26(7): 587-589.

[6] 柴小青, 朱运莲, 魏昕, 等. Supreme 喉罩在老年病人麻醉中的应用 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2011, 27(1): 60-62.

[7] 王少超, 杨振东, 赵献亮, 等. 喉罩全麻控制呼吸在患儿纤维支气管镜手术中的应用 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2014, 30(1): 64-67.

[8] 程大斌, 刘璐, 费建. 欧普乐喉罩在患儿胃镜检查中的应用 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(10): 1013-1014.

[9] NOPAWAN V, DARSHNI V, NAUSHEEN J *et al.* Airway management and endoscopic treatment of subglottic and tracheal stenosis: the laryngeal mask airway technique [J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2014, 123(4): 293-298.

[10] 朱杰, 何海艳, 马航, 等. 喉罩通气全麻下经支气管镜介入治疗恶性中心气道狭窄 15 例临床分析 [J]. *临床肺科杂志*, 2015, 20(7): 1205-1208.

[11] 赵弘卿, 王冬青, 冯金萍, 等. 纤维支气管镜替代硬镜激光治疗气管肿瘤可行性探讨 [J]. *中国内镜杂志*, 2010, 16(9): 904-906.

[12] 李慧, 陈德尚, 张明洁, 等. 电子喉镜下声带息肉和声带小结手术诊治体会 [J]. *中国内镜杂志*, 2012, 18(9): 989-990.

[13] 黄章模, 葛平江, 陈少华, 等. 支撑喉镜下声带手术口咽部并发症的临床分析 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2013, 19(5): 412-415.

[14] 张旭, 戴勇传. 全麻支撑喉镜下显微声带手术的严重并发症及其处理 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2015, 21(5): 416-417.

[15] 钱林荣, 骆云珍. 支撑喉镜下喉显微手术并发症及不良反应分析 [J]. *临床医学*, 2008, 28(4): 26-27.

[16] 朱洪源, 陈敏芬, 吴国民, 等. 声带息肉的两种手术方法治疗疗效对比分析 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2007, 13(2): 129-131.

[17] 张瑾, 史冬梅, 乐都斯·克尤木. 支撑喉镜和电子喉镜下治疗声带息肉的对比分析 [J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2009, 16(12): 687-690.

[18] 唐守英, 王建波. 电子喉镜与支撑喉镜治疗声带良性肿瘤对嗓音的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2015(3): 241-243.

[19] 王耀洪, 汤素琴, 钟玉红. 电子喉镜与支撑喉镜治疗声带良性肿瘤的疗效比较 [J]. *实用医学杂志*, 2007, 23(18): 2875-2876.

[20] 黄益灯, 陈莺, 郑宏良, 等. 两种不同方式的声带息肉手术比较 [J]. *中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*, 2004, 12(6): 319-321.