

内毒素耐受对 THP-1 细胞分泌 TNF- α 和 IL-10 的影响

李 慧^{1,2}, 孙梦君^{1,3}, 徐 艳¹, 孙 颖^{1*}, 陈 武¹

(¹南京医科大学口腔医学研究所, 南京医科大学附属口腔医院牙周科, 江苏 南京 210029; ²淮南市第一人民医院口腔科, 安徽 淮南 232007; ³杭州市拱墅区第二人民医院口腔科, 浙江 杭州 310004)

[摘要] 目的: 观察细菌脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)反复刺激人单核细胞株 THP-1 细胞, 诱导产生的内毒素耐受对该细胞分泌炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和抗炎因子白细胞介素(interleukin, IL)-10 的影响。方法: 采用 1 μ g/ml 牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P.gingivalis*)LPS 或 1 μ g/ml 大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)LPS 刺激 THP-1 细胞 24 h, 洗脱后, 分别采用相同 LPS 再刺激 24 h, 构建内毒素耐受模型。采用 ELISA 技术检测细胞条件培养液中 TNF- α 和 IL-10 分泌水平的变化。结果: *P.gingivalis* LPS 或 *E.coli* LPS 刺激 THP-1 细胞 24 h 后, TNF- α 和 IL-10 分泌水平均较刺激前明显增高($P < 0.05$)。2 种 LPS 重复刺激后, TNF- α 分泌水平较第 1 次刺激后明显降低($P < 0.05$), IL-10 分泌水平则较第 1 次刺激后明显增高($P < 0.05$)。结论: 内毒素耐受能抑制 THP-1 细胞分泌 TNF- α , 促进该细胞分泌 IL-10, 进而可能影响牙周组织的炎症和免疫反应。

[关键词] 内毒素耐受; THP-1 细胞; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-10

[中图分类号] R392.12

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)07-943-04

doi:10.7655/NYDXBNS20130718

Effects of endotoxin tolerance on the production of TNF- α and IL-10 in THP-1 Cells

Li Hui^{1,2}, Sun Mengjun^{1,3}, Xu Yan¹, Sun Ying^{1*}, Chen Wu¹

(¹Institute of Stomatology, Department of Periodontology, Stomatological Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Stomatology, Huainan First People's Hospital, Huainan 232007; ³Department of Stomatology, Second People's Hospital, Hangzhou Gongshu District 310004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of endotoxin tolerance on the production of inflammatory cytokine TNF- α and anti-inflammatory cytokine IL-10 in THP-1 cells. **Methods:** THP-1 cells were pretreated with 1 μ g/ml *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) lipopolysaccharides (LPS) or 1 μ g/ml *Escherichia coli* (*E.coli*) LPS for 24 h. Then, the cells were washed and stimulated with the same LPS for additional 24 h. The levels of TNF- α and IL-10 in supernatants were detected by ELISA. **Results:** The amounts of TNF- α and IL-10 secreted by THP-1 cells stimulated with *P.gingivalis* LPS or *E.coli* LPS were increased significantly after 24 h ($P < 0.05$). After restimulations for another 24 h, TNF- α production was decreased significantly compared with that secreted by the cells stimulated with the same LPS only once ($P < 0.05$), while the level of IL-10 was increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Repeated LPS stimulations triggered endotoxin tolerance and led to a decrease in TNF- α production and an increase in IL-10 production, which might have effects on periodontal inflammation.

[Key words] endotoxin tolerance; THP-1 cells; TNF- α ; IL-10

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(7):943-946]

牙周炎是一种慢性感染性疾病。牙周组织破坏是病原微生物与局部刺激因素引起的直接损伤和宿

主对持续存在的菌斑微生物的免疫应答所引起的间接损伤共同作用的结果^[1]。单核/巨噬细胞是牙周炎免疫调节网络中的一个重要环节, 主要通过分泌细胞因子来调节机体免疫应答, 其分泌的各种细胞因子构成了一个复杂的细胞因子网络, 共同维持局部的内稳态环境。其中, 有促进炎症反应和牙周骨破坏的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α ,

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81000444); 江苏省高校优秀学科建设工程资助

*通信作者(Corresponding author), E-mail: ebolasun@njmu.edu.cn

也有抑制炎症反应的白细胞介素(interleukin, IL)-10^[2-3]。

脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)是牙周致病菌的重要毒力因子之一。在牙周炎的漫长病程中,长期反复的LPS刺激可能诱导机体对后续刺激的反应性降低,即产生内毒素耐受^[4-5]。牙周致病菌牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P.gingivalis*) LPS诱导的耐受对人单核细胞株 THP-1 细胞分泌 TNF- α 和 IL-10 的功能有何影响,对牙周炎症和免疫反应的发生发展又有何影响,目前尚不得而知。

1 材料和方法

1.1 材料

THP-1 细胞(中科院上海生科院细胞所),*P.gingivalis* ATCC 33277 LPS (美国 Invivogen 公司),大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*) O127:B8 LPS (美国 Sigma 公司), RPMI1640 培养液(美国 Gibco 公司),胎牛血清(澳大利亚 Hyclone 公司), TNF- α 、IL-10 ELISA 试剂盒(荷兰 Biosource 公司), BP 800 分光光度计(芬兰 Bio-Hit 公司)。

1.2 方法

1.2.1 内毒素耐受模型的构建

将常规传代后 2~3 d 的 THP-1 细胞以 5×10^5 个/ml 密度接种于 6 孔板中,分成如下 5 组,每组 5 个复孔。A、B、D 3 组加入不含 LPS 的 RPMI1640 培养液, C 组加入预先配制的含 $1 \mu\text{g/ml}$ *P.gingivalis* LPS 的 RPMI1640 培养液, E 组加入含 $1 \mu\text{g/ml}$ 大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*) LPS 的 RPMI1640 培养液。刺激 24 h 后,弃培养液上清, PBS 洗涤 2 次。A 组仍加入不含 LPS 的 RPMI1640 培养液, B、C 组加入含 $1 \mu\text{g/ml}$ *P.gingivalis* LPS 的 RPMI1640 培养液, D、E 组加入含 $1 \mu\text{g/ml}$ *E.coli* LPS 的 RPMI1640 培养液,再次刺激 24 h 后,收集细胞条件培养液,分装于 EP 管中, -40°C 储存备用^[6]。

1.2.2 TNF- α 和 IL-10 表达水平的检测

将收集的细胞条件培养液常温下溶解,按照 ELISA 试剂盒的说明书,取 $100 \mu\text{l}$ 细胞条件培养液,分别加入包被了人 TNF- α 和 IL-10 单抗的 ELISA 96 孔板中,采用双抗体夹心法检测两种细胞因子的表达水平。终止反应后,用 Bio-Hit 分光光度计检测 450 nm 处的吸光度值。根据 ELISA 试剂盒中的 TNF- α 和 IL-10 标准品的吸光度值曲线,换算成所测定的细胞条件培养液中 TNF- α 和 IL-10 的含量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析。各组数据间的比较采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

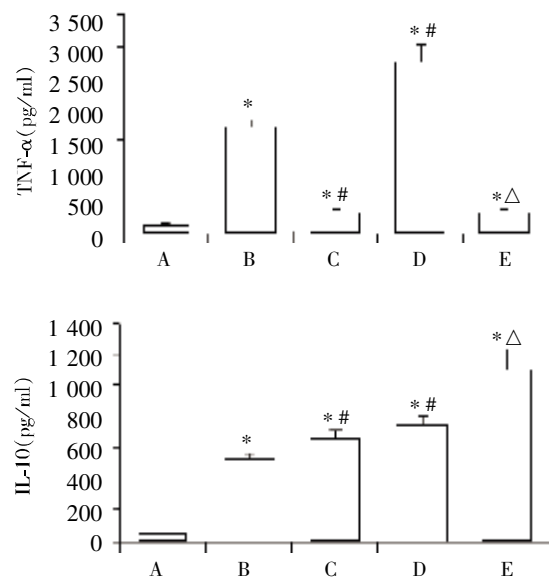
2.1 LPS 刺激对 THP-1 细胞分泌 TNF- α 和 IL-10 的影响

$1 \mu\text{g/ml}$ *P.gingivalis* LPS (B 组) 或 $1 \mu\text{g/ml}$ *E.coli* LPS (D 组) 刺激 THP-1 细胞 24 h 后, TNF- α 和 IL-10 的分泌水平平均较刺激前 (A 组) 明显增高 ($P < 0.05$)。其中, *P.gingivalis* LPS 刺激组 (B 组) 上述 2 种细胞因子的分泌水平平均明显低于 *E.coli* LPS 刺激组 (D 组) ($P < 0.05$, 图 1)。

2.2 内毒素耐受对 THP-1 细胞分泌 TNF- α 和 IL-10 的影响

$1 \mu\text{g/ml}$ *P.gingivalis* LPS 重复刺激后 (C 组), TNF- α 分泌水平较单次刺激后 (B 组) 明显降低 ($P < 0.05$); $1 \mu\text{g/ml}$ *E.coli* LPS 重复刺激后 (E 组), TNF- α 分泌水平也较单次刺激后 (D 组) 明显降低 ($P < 0.05$)。两种 LPS 重复刺激后 (C 组和 E 组) 的 TNF- α 水平均明显高于第 1 次刺激前 (A 组) ($P < 0.05$, 图 1)。

$1 \mu\text{g/ml}$ *P.gingivalis* LPS 重复刺激后 (C 组), IL-10 分泌水平较单次刺激后 (B 组) 明显增高 ($P < 0.05$); $1 \mu\text{g/ml}$ *E.coli* LPS 重复刺激后 (E 组), IL-10 分泌水平也较单次刺激后 (D 组) 明显增高 ($P <$



与 A 组相比, * $P < 0.05$; 与 B 组相比, # $P < 0.05$; 与 D 组相比, $\Delta P < 0.05$; $n=5$ 。

图 1 内毒素耐受对 THP-1 细胞分泌 TNF- α 和 IL-10 的影响
Figure 1 Effects of endotoxin tolerance on the production of TNF- α and IL-10 in THP-1 cells

0.05)。两种 LPS 重复刺激后(C 组和 E 组)的 IL-10 水平亦明显高于第 1 次刺激前(A 组)($P < 0.05$, 图1)。

3 讨 论

牙周组织长期暴露于种类繁多,数量巨大的细菌环境中,因此可能会产生内毒素耐受^[7]。先天免疫系统作为宿主的第一道防线,在获得性免疫系统被激活前发挥着重要的抗感染作用。单核/巨噬细胞是先天免疫系统的重要成员之一,研究单核/巨噬细胞在牙周致病菌内毒素诱导的耐受反应中扮演的角色,对于揭示牙周炎发生发展的免疫学机制具有重要的意义。

P.gingivalis 是最主要的牙周致病菌之一,其检出率的增高与牙周炎病情持续加重和治疗后复发有关^[8]。LPS 是 *P.gingivalis* 的重要毒力因子之一,不仅能直接作用于牙周组织细胞,引起牙周组织的破坏,同时也是一种潜在的细胞激活因子。*P.gingivalis* LPS 的蛋白部分缺乏庚糖和 2-keto-3-deoxyoctonate, 脂类 A 部分则有磷酸化和酰化结构,其酰基链数量和磷酸化程度与最经典 G-菌, *E.coli* LPS 存在较大区别^[9], 后者的结构和生物学功能与具核梭杆菌、伴放线放线杆菌等其他牙周致病菌的 LPS 具有更大的相似性^[10]。*P.gingivalis* LPS 的内毒素活性较 *E.coli* LPS 弱,诱导炎症反应能力也弱于后者,不能像 *E.coli* LPS 那样作为单核细胞的强激活物^[11]。因此,本研究选择 *P.gingivalis* LPS 作为构建细胞耐受模型的刺激因子的同时,也选择了 *E.coli* LPS 作为阳性对照。

本研究发现,尽管两种 LPS 单次刺激后, TNF- α 和 IL-10 表达水平均明显增高,但 *E.coli* LPS 诱导产生的 TNF- α 和 IL-10 水平远远高于 *P.gingivalis* LPS,也再次证明了两种 LPS 生物学功能的差别,这与 Morsczech 等的研究是一致的^[12]。

细胞因子 TNF- α 和 IL-10 与牙周组织的炎症和免疫反应有密切关系。研究表明, TNF- α 具有双重的生物学作用,一方面是机体免疫防御反应的重要介质,能促进中性粒细胞、单核细胞黏附和游走,诱导 B 细胞分化和抗体产生,另一方面可以参与机体的免疫病理损伤,诱发溶酶体酶的释放,促进破骨细胞前体向破骨细胞分化,并诱导胶原酶合成,在牙周炎的病变过程中发挥了重要的作用^[13-14]。IL-10 是一种重要的抗炎因子,可抑制其他免疫细胞产生 IL-6、IL-8、TNF- α 等细胞因子,在复杂的细胞因子网络中发挥平衡免疫应答的作用,其抑制作用主要针对 T 细胞、B 细胞、单核/巨噬细胞和肥大细胞,对于维持

牙周组织的内稳态非常重要^[14]。

构建内毒素耐受的体外模型,模拟体内长期反复的细菌或毒力因子刺激是本研究的关键。Adib-Conquy、Tanabe 等^[15-16]学者采用 LPS 重复两次刺激细胞,构建了人外周血单核细胞和巨噬细胞耐受模型,研究了内毒素耐受后多种细胞因子表达水平的变化。其中,炎症因子 TNF- α 表达水平的降低更被认为是内毒素耐受模型构建成功的“金标准”^[17]。本研究发现, *P.gingivalis* LPS 或 *E.coli* LPS 重复刺激 THP-1 细胞后, TNF- α 分泌水平均较单次刺激后明显降低。提示,细胞对 LPS 的重复刺激产生了耐受,局部炎症和免疫反应受到了一定程度的抑制,本研究构建的内毒素耐受模型是成功的。

但是,与 THP-1 细胞耐受后 TNF- α 分泌水平的下降不同,抗炎因子 IL-10 的分泌水平反而明显增高。目前,国外学者对内毒素耐受后各种细胞因子表达水平的变化一直存在争议,关于 *P.gingivalis* LPS 诱导的耐受对细胞因子表达水平的影响更是知之甚少。de Vos 等^[18]的研究发现, *E.coli* LPS 诱导的耐受全血细胞 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等细胞因子分泌水平均明显下降。Savidge 等^[19]的研究则认为, *E.coli* LPS 和沙门氏菌 LPS 长期刺激人肠上皮细胞后, IL-8 分泌水平下降,而炎症因子 IL-6 分泌水平不受影响。本研究支持,内毒素耐受的效应并非表现为细胞因子分泌水平的全面下调,而是多种基因或蛋白表达水平的“程序重排”。不同细胞因子分泌水平的差异性变化增加了内毒素耐受的复杂性。同时也提示, *P.gingivalis* LPS 和 *E.coli* LPS 诱导的耐受效应均具有不同程度的抑制炎症反应的能力,可能有助于减轻宿主过度炎症反应引起的牙周组织破坏。但是,炎症反应的下调也可能降低宿主杀灭致病菌的能力,从而增加感染的风险。因此,内毒素耐受可能是一柄“双刃剑”。在牙周炎发生发展的过程中,它的作用究竟是利大于弊,还是弊大于利,还有待进一步研究。

总之,内毒素耐受能抑制 THP-1 细胞分泌炎症因子 TNF- α ,同时促进抗炎因子 IL-10 的分泌,进而可能抑制牙周组织局部的炎症和免疫反应。这种耐受的分子机制究竟是什么,它将如何影响牙周炎的治疗和转归,还有待进一步的基础和临床研究。

[参考文献]

- [1] Liébana J, Castillo A. Physiopathology of primary periodontitis associated with plaque. Microbial and host factors. A review. Part 2[J]. Aust Dent J, 1994, 39(5):310-

- 315
- [2] Bostanci N, Akgül B, Tsakanika V, et al. Effects of low-dose doxycycline on cytokine secretion in human monocytes stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [J]. *Cytokine*, 2011, 56(3): 656-661
- [3] Berker E, Kantarci A, Hasturk H, et al. Blocking pro-inflammatory cytokine release modulates peripheral blood mononuclear cell response to porphyromonas gingivalis [J]. *J Periodontol*, 2012 [Epub ahead of print]
- [4] Castegren M, Lipcsey M, Söderberg E, et al. Differences in organ dysfunction in endotoxin-tolerant pigs under intensive care exposed to a second hit of endotoxin [J]. *Shock*, 2012, 37(5): 501-510
- [5] Park SH, Park-Min KH, Chen J, et al. Tumor necrosis factor induces GSK3 kinase-mediated cross-tolerance to endotoxin in macrophages [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(7): 607-615
- [6] Sun Y, Li H, Yang MF, et al. Effects of aging on endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39224
- [7] Zaric S, Shelburne C, Darveau R, et al. Impaired immune tolerance to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide promotes neutrophil migration and decreased apoptosis [J]. *Infect Immun*, 2010, 78(10): 4151-4156
- [8] Ardila CM, López MA, Guzmán IC. Positive correlations between presence of gram negative enteric rods and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque [J]. *Acta Odontol Latinoam*, 2011, 24(1): 15-19
- [9] Bainbridge BW, Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide; an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defense system [J]. *Acta Odontol Scand*, 2001, 59(3): 131-138
- [10] Yoshimura A, Hara Y, Kaneko T, et al. Secretion of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria [J]. *J Periodontol Res*, 1997, 32(3): 279-286
- [11] 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
- [12] Morszeck CO, Dress J, Gosau M. Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* but not from *Porphyromonas gingivalis* induce pro-inflammatory cytokines and alkaline phosphatase in dental follicle cells [J]. *Arch Oral Biol*, 2012, 57(12): 1595-1601
- [13] Hernández M, Dutzan N, García-Sesnich J, et al. Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis [J]. *J Dent Res*, 2011, 90(10): 1164-1170
- [14] Passoja A, Puijola I, Knuutila M, et al. Serum levels of interleukin-10 and tumour necrosis factor- α in chronic periodontitis [J]. *J Clin Periodontol*, 2010, 37(10): 881-887
- [15] Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Gamma interferon and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor prevent endotoxin tolerance in human monocytes by promoting interleukin-1 receptor-associated kinase expression and its association to MyD88 and not by modulating TLR4 expression [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(31): 27927-27934
- [16] Tanabe SI, Grenier D. Macrophage tolerance response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces differential regulation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and matrix metalloproteinase 9 secretion [J]. *J Periodontol Res*, 2008, 43(3): 372-377
- [17] Mathison JC, Virca GD, Wolfson E, et al. Adaptation to bacterial lipopolysaccharide controls lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in rabbit macrophages [J]. *J Clin Invest*, 1990, 85(4): 1108-1118
- [18] de Vos AF, Pater JM, van den Pangaart PS, et al. *In vivo* lipopolysaccharide exposure of human blood leukocytes induces cross-tolerance to multiple TLR ligands [J]. *J Immunol*, 2009, 183(1): 533-542
- [19] Savidge TC, Newman PG, Pan WH, et al. Lipopolysaccharide-induced human enterocyte tolerance to cytokine-mediated interleukin-8 production may occur independently of TLR-4/MD-2 signaling [J]. *Pediatr Res*, 2006, 59(1): 89-95

[收稿日期] 2013-02-07