

论著·基础研究

3,3'-二吡啶基甲烷对脂多糖诱导下牙周膜细胞分泌炎症因子的影响

周菊妹¹, 苑克勇², 林文珍², 胡戌琛², 晋巧巧², 牛晨光²

1. 江苏省昆山市第三人民医院口腔科, 昆山 215316; 2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院牙体牙髓科, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 国家口腔疾病临床研究中心, 上海 200011

[摘要] **目的**· 探讨 3,3'-二吡啶基甲烷 (3,3'-diindolylmethane, DIM) 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的人牙周膜细胞 (human periodontal ligament cells, hPDLs) 分泌炎症因子的影响, 并初步探讨其相关作用机制。**方法**· 分离培养 hPDLs, CCK-8 法测定 DIM 对 hPDLs 增殖的影响, 检测 DIM 毒性浓度范围。将 hPDLs 分为 4 组: 空白组加入不含 LPS 和 DIM 的无血清 DMEM; LPS 组仅加入含 LPS (终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$) 的无血清 DMEM; 低浓度组含 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS+6.25 $\mu\text{mol/L}$ DIM; 高浓度组含 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS+12.50 $\mu\text{mol/L}$ DIM。培养 12 h, 酶联免疫吸附试验检测各组上清液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 浓度, Western blotting 检测 hPDLs 内丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和核因子 κB (nuclear factor κB , NF- κB) 信号通路中蛋白的变化。**结果**· DIM 在 50 $\mu\text{mol/L}$ 范围内时细胞活力不受影响 ($P>0.05$)。低浓度和高浓度 DIM 均抑制 LPS 刺激下 hPDLs 分泌炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 ($P<0.05$), 抑制效果随 DIM 的浓度升高而增强。DIM 可显著抑制 LPS 激活 NF- κB 信号通路。**结论**· DIM 可能通过抑制 NF- κB 信号通路的激活, 抑制 LPS 诱导的 hPDLs 分泌促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6。

[关键词] 人牙周膜细胞; 3,3'-二吡啶基甲烷; 炎症因子; 核因子 κB **[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.02.004 **[中图分类号]** R781.4 **[文献标志码]** A

Influence of 3,3'-diindolylmethane on expression of inflammatory cytokines in periodontal ligament cells induced by lipopolysaccharide

ZHOU Ju-mei¹, YUAN Ke-yong², LIN Wen-zhen², HU Xu-chen², JIN Qiao-qiao², NIU Chen-guang²

1. Department of Stomatology, Kunshan Third People's Hospital, Kunshan 215316, China; 2. Department of Endodontics, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai Research Institute of Stomatology, National Clinical Research Center of Stomatology, Shanghai 200011, China

[Abstract] **Objective**· To investigate the effect of 3,3'-diindolylmethane (DIM) on the expression of inflammatory cytokines in human periodontal ligament cells (hPDLs) induced by lipopolysaccharide (LPS) and to study the related mechanism. **Methods**· hPDLs were isolated and cultured, and CCK-8 method was used to detect the effect of DIM on the proliferation of hPDLs. hPDLs were randomly divided into 4 groups: blank group (without LPS and DIM), LPS group (10 $\mu\text{g/mL}$ LPS), 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS+6.25 $\mu\text{g/mL}$ DIM, 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS+12.50 $\mu\text{g/mL}$ DIM. The cells of all groups were cultured for 12 h. The protein levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in supernatant were detected by enzyme linked immunosorbent assay. The change of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor κB (NF- κB) signaling pathways were detected by Western blotting. **Results**· The cell viability was not affected when the DIM concentration was less than 50 $\mu\text{mol/L}$ ($P>0.05$). DIM at 6.25 and 12.50 $\mu\text{g/mL}$ reduced the LPS-induced expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 at protein levels ($P<0.05$). DIM inhibited the activation of the NF- κB signaling pathway. **Conclusion**· DIM can reduce the LPS-induced inflammatory cytokine expression in hPDLs via restraining the activation of the NF- κB signaling pathway.

[Key words] human periodontal ligament cells; 3,3'-diindolylmethane; inflammatory cytokine; nuclear factor κB

根尖周病是宿主对定植在牙齿根管系统内以革兰阴性菌为主的致病菌及其产物出现持续性炎症免疫应答反应, 可破坏根尖牙周膜、牙骨质等组织^[1]。当牙髓及根尖周组织发生感染时, 细菌产物尤其是脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激局部组织和免疫细胞产生炎症因子, 如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 及 IL-6。这

些炎症因子引发免疫和炎症级联反应, 引起根尖周组织损伤。同时, 体外研究表明 LPS 能直接刺激非典型炎症细胞人牙周膜细胞 (human periodontal ligament cells, hPDLs) 高表达 TNF- α 、IL-6, 并一定程度上通过 TNF- α 进一步介导其他炎症因子的产生^[2-3]。根管治疗可清除感染, 促使根尖周病变的自我愈合。同时, 宿主自身因素是影响根尖周病疗效的重要因素之一。因此, 在行常规根管

[基金项目] 国家自然科学基金 (81570964); 上海市科学技术委员会基金 (1714090350) (National Natural Science Foundation of China, 81570964; Project of Shanghai Municipal Committee of Science and Technology, 1714090350)。

[作者简介] 周菊妹 (1974—), 女, 副主任医师, 学士; 电子邮箱: dentist_zhoujm98@163.com。

[通信作者] 牛晨光, 电子邮箱: niuchg09@alumni.sjtu.edu.cn。



治疗控制感染的同时,将局部使用药物制剂应用在根尖周病损进一步控制感染有一定应用前景。

3,3'-二吡啶基甲烷(3,3'-diindolylmethane, DIM)是一种从芸薹类植物中提取的吡啶类天然化合物。近年来研究^[4-8]表明, DIM具有抗肿瘤、促进组织损伤修复及创伤愈合等多种药理作用。有研究^[5]证实 DIM能抑制经 LPS 刺激的小鼠巨噬细胞产生促炎分子一氧化氮、前列腺素,提示 DIM有一定的抗炎作用。那么 DIM是否抑制 LPS 诱导下 hPDLCS 表达炎症因子,阻止根尖周炎进展而具有更为广泛的抗炎作用,目前国内外尚未见相关报道。本研究旨在探讨 DIM 对 LPS 作用下 hPDLCS 表达炎症因子的影响,并初步分析相应机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DIM、LPS (Sigma, 美国); CCK-8 (Dojindo, 日本); DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素/链霉素 (Gibco, 美国); 普通倒置荧光显微镜 (Olympus, 日本); CO₂ 培养箱 (Thermo, 美国); TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 酶联免疫吸附试验试剂盒 (R&D Systems, 美国), 酶标仪 (Bio Rad, 美国); I κ B α 抗体、p-I κ B α 抗体、ERK 抗体、p-ERK 抗体、JNK 抗体、p-JNK 抗体、p38 抗体、p-p38 抗体、GAPDH 抗体 (Cell Signaling Technology, 美国)。

1.2 hPDLCS 的分离和培养

收取 18 ~ 20 岁患者因正畸需要拔除的健康、完整的第三恒磨牙浸泡于含 2% 青霉素、链霉素双抗的无血清 DMEM 培养液中。超净台中将牙齿用含 1% 青霉素、链霉素双抗的磷酸盐缓冲液反复冲洗,刮取根中 1/3 牙周膜组织,剪碎至 0.5 ~ 1 mm³/块,将组织块均匀接种于 10 cm 培养皿中。盖玻片四角沾取少量无菌凡士林后,将盖玻片压在组织块表面防止其漂浮。向培养皿中加入 10 mL 完全培养基(含 15% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素),置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。待原代 hPDLCS 爬出并铺满培养皿底约 80% 时,消化传代,取 4 ~ 6 代细胞。倒置荧光显微镜下观察细胞生长情况。研究经上海交通大学医学院附属第九人民医院伦理委员会审查批准和患者知情同意。

1.3 CCK-8 法检测 hPDLCS 增殖情况

取对数期生长的 hPDLCS,按 2×10^3 /孔种于 96 孔培

养板中,每孔含 100 μ L 完全培养液,次日贴壁。设 1 个对照组和 5 个实验组,每组设 5 个复孔。实验组从高到低对半稀释法加不同浓度的溶于二甲基亚砜(DMSO)的 DIM (0 ~ 100 μ mol/L),于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱分别培养 48 h 和 96 h 后,每孔加 10 μ L CCK-8 溶液,2 h 后于酶标仪 450 nm 处读数。相对细胞活力 = 实验组 D (450 nm) / 对照组 D (450 nm) \times 100%。

1.4 酶联免疫吸附试验检测 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达

将 hPDLCS 以 4×10^4 /孔的浓度种于 6 孔板中,分为 4 组。空白组加入不含 LPS 和 DIM 的无血清 DMEM; LPS 组仅加入终浓度为 10 μ g/mL LPS 的无血清 DMEM; 低浓度组含 10 μ g/mL LPS+6.25 μ mol/L DIM; 高浓度组含 10 μ g/mL LPS+12.50 μ mol/L DIM。每孔培养液均为 2 mL。连续培养 12 h 后收集各组上清液,按照酶联免疫吸附试验试剂盒说明书要求检测上清液中的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的浓度。

1.5 Western blotting 检测 MPAK 和 NF- κ B 信号通路中蛋白表达

将 hPDLCS 计数后以 4×10^4 /孔的浓度种于 6 孔板中,按 1.4 小节所述分为 4 组,连续培养 12 h 后分别收集各组细胞。RIPA 裂解细胞,溶解蛋白,离心收取上清,BCA 法测蛋白浓度。从各组中取等量总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),通过转膜将蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,加入目标蛋白一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜,1 \times TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入二抗常温作用 1 h, ECL 化学显影。采集图像,并用 ImageJ 软件测定条带灰度值。

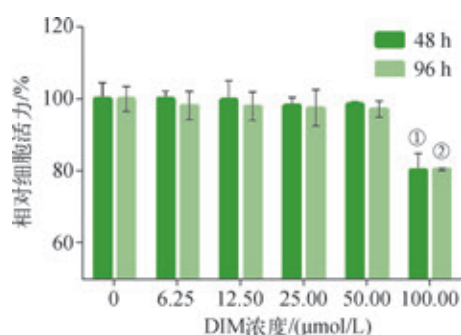
1.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件分析数据,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DIM 对 hPDLCS 增殖的影响

采用 CCK-8 试剂检测 DIM 毒性及其对 hPDLCS 增殖的影响,结果见图 1。与未加 DIM 的对照组相比,当 DIM 浓度大于 100 μ mol/L 时, hPDLCS 的增殖得到抑制 ($P < 0.05$), DIM 表现出一定的细胞毒性;而当 DIM 浓度小于 50 μ mol/L 时,细胞活力不受影响 ($P > 0.05$)。



注: ^① $P=0.006$, ^② $P=0.007$, 与未加 DIM 的对照组比较。

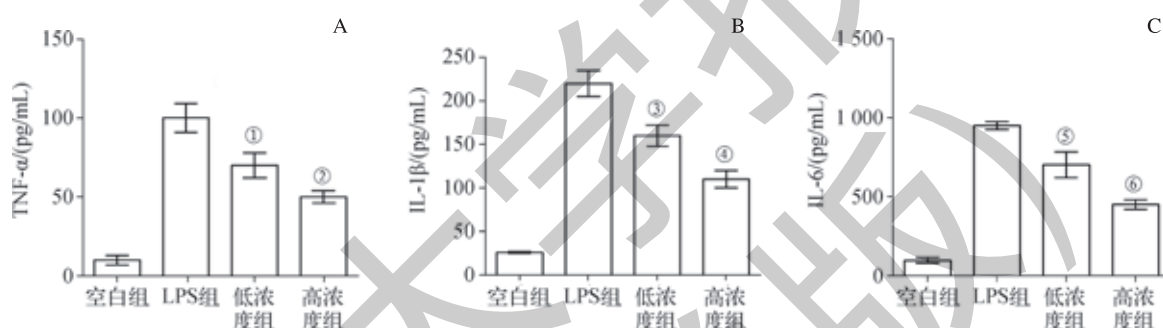
图 1 不同浓度 DIM 对 hPDLCs 增殖的影响

Fig 1 Effect of different concentrations of DIM on proliferation of hPDLCs

2.2 DIM 对 LPS 刺激下 hPDLCs 表达炎症因子的影响

酶联免疫吸附试验在蛋白水平检测 DIM 对受 LPS 刺

激的 hPDLCs 分泌促炎因子的影响。与空白组相比, 仅 LPS 组 hPDLCs 分泌 TNF- α 的量显著升高 ($P=0.000$), 约为 105 pg/mL; 等浓度 LPS 刺激时使用 DIM 进行干预, 低浓度组 hPDLCs 分泌 TNF- α 的量显著下降 ($P=0.016$), 约为 69 pg/mL, 高浓度组 hPDLCs 分泌 TNF- α 的量下降更为明显 ($P=0.005$), 约为 48 pg/mL; DIM 抑制 LPS 刺激下 hPDLCs 分泌炎症因子 TNF- α , 抑制效果与 DIM 的浓度有关 (图 2A)。与 TNF- α 类似, 在 DIM 的干预下, 上清液中炎症因子 IL-1 β 浓度由 255 pg/mL (LPS 组) 下降至 158 pg/mL (低浓度组) 和 107 pg/mL (高浓度组), 见图 2B。同样, 上清液中炎症因子 IL-6 浓度由 960 pg/mL (LPS 组) 下降至 689 pg/mL (低浓度组) 和 450 pg/mL (高浓度组), 见图 2C。



注: ^① $P=0.016$, ^② $P=0.005$, ^③ $P=0.006$, ^④ $P=0.001$, ^⑤ $P=0.023$, ^⑥ $P=0.000$, 与 LPS 组比较。

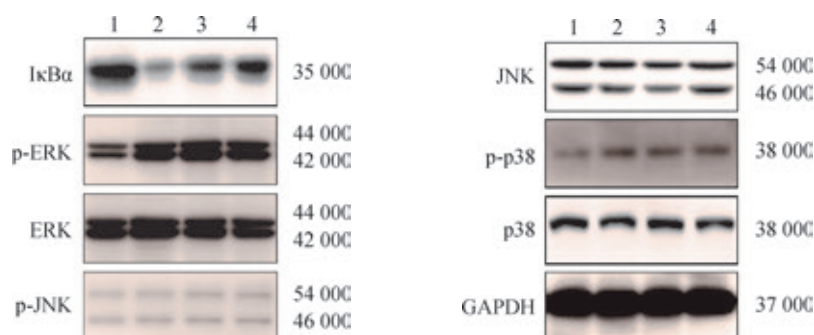
图 2 不同浓度 DIM 对 LPS 诱导下 hPDLCs 表达 TNF- α (A)、IL-1 β (B) 和 IL-6 (C) 的影响

Fig 2 Effect of different concentrations of DIM on expression of TNF- α (A), IL-1 β (B) and IL-6 (C) in hPDLCs induced by LPS

2.3 DIM 对 LPS 刺激下 hPDLCs 中 MAPKs 和 NF- κ B 信号通路的影响

Western blotting 结果显示: 与空白组相比, LPS 组 hPDLCs 中核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路中的 NF- κ B 抑制蛋白 (inhibitor of NF- κ B, I κ B α) 表达量显著降低; 等浓度 LPS 刺激时使用 DIM 进行干预, 低浓度组 hPDLCs 中 I κ B α 蛋白分子表达量有所恢复, 高浓度组 hPDLCs 中 I κ B α 蛋

白分子表达量升高更为明显 (图 3)。与空白组相比, LPS 刺激引起丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路中的 ERK、JNK 及 p38 发生磷酸化, p-ERK、p-JNK 及 p-p38 蛋白含量显著增加 (LPS 组); 而等浓度 LPS 刺激并使用 DIM 进行干预时, 低浓度组和高浓度组 p-ERK、p-JNK 及 p-p38 与空白组无明显差异 (图 3)。



注: 1. 空白组; 2. LPS 组; 3. 低浓度组; 4. 高浓度组。

图 3 不同浓度 DIM 对 LPS 诱导 hPDLCs 内蛋白信号通路的影响

Fig 3 Effect of different concentrations of DIM on the signaling pathway in hPDLCs induced by LPS

3 讨论

根尖周炎发生时, 根尖周细胞及免疫细胞产生大量促炎因子, 进而直接破坏骨组织以及进一步引起宿主的免疫反应和炎症级联反应, 造成组织损伤。Cotti 等^[9]的研究结果显示, 在根管治疗有效去除感染刺激后, 使用药物调节促炎因子过量表达和宿主免疫, 能促进根尖周组织更快愈合。在体外根尖周牙周膜组织中, 细胞在受到 LPS 刺激时可分泌促炎因子 IL-1 β 、IL-6 等^[10-11]。本研究采用 LPS 创造炎症环境, 在排除 DIM 本身毒性的前提下, 发现 DIM 能抑制 hPDLs 分泌 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6, 这种抗炎作用很可能通过抑制 NF- κ B 信号通路来实现。

TNF- α 和 IL-1 β 是致炎作用较强的前炎症因子, 可直接引起根尖周组织损伤及根尖周骨组织吸收^[12-13]。TNF- α 能促进单核巨噬细胞分泌过量 IL-6 等炎症因子, 加重炎症反应, 也可引发破骨细胞分化与生成, 引起骨吸收^[14-15]。IL-1 β 也能通过自分泌或旁分泌引起其他促炎因子的表达上升, 扩大炎症反应, 加速组织破坏, 延缓组织愈合。IL-6 可增强 TNF- α 的促炎效应, 同时抑制成骨细胞分化成熟, 增加破骨细胞数目和活性, 进而引起骨质破坏, 延缓骨组织修复^[16]。有效下调 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达, 可减轻炎症程度及牙周、根尖周组织破坏, 促进组织愈合和修复。在本研究中, DIM 有效降低了经 LPS 刺激

的 hPDLs 分泌 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等促炎因子, 提示 DIM 有良好的抗炎及促进组织愈合的作用。

本研究通过检测 hPDLs 中与炎症反应密切相关的信号通路蛋白的变化, 初步探索了 DIM 抑制 hPDLs 分泌促炎因子的机制。LPS 参与细胞介导的炎症反应所涉及的通路主要有 NF- κ B 和 MAPKs (p38、ERK、JNK) 等信号通路^[17-19]。NF- κ B 是细胞内促炎的一个核转录因子, 一般情况下存在于胞质内, 可因 I κ B α 的磷酸化降解转移至核内, 促使炎症相关的靶基因的转录^[11]。在本研究中, I κ B α 因 LPS 刺激而显著降解, 说明 NF- κ B 信号通路被 LPS 激活, 而同时使用 DIM 处理后 I κ B α 的降解被显著抑制, 抑制程度与 DIM 的浓度有关。该结果说明 DIM 可有效抑制 NF- κ B 入核, 抑制 NF- κ B 信号通路的活化。该结果也说明 DIM 可能通过抑制 NF- κ B 信号通路从而抑制经 LPS 刺激的 hPDLs 分泌 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等促炎因子。有研究^[20]结果显示, 抑制 p38、ERK、JNK 的磷酸化可达到抑制炎症的目的。在本研究中, LPS 可显著促进 p38、ERK、JNK 的磷酸化, 而 DIM 的干预对 LPS 引起的 p38、ERK、JNK 的磷酸化并没有影响。

综上, 本研究发现 DIM 可抑制经 LPS 刺激的 hPDLs 分泌 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等促炎因子, 这种作用很可能是通过抑制 NF- κ B 信号通路激活实现的。但是, DIM 抗炎的具体机制以及临床应用, 还需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Croitoru IC, Craitoiu S, Petcu CM, et al. Clinical, imagistic and histopathological study of chronic apical periodontitis[J]. Rom J Morphol Embryol, 2016, 57(2 Suppl): 719-728.
- [2] Quintero JC, Piesco NP, Langkamp HH, et al. LPS responsiveness in periodontal ligament cells is regulated by tumor necrosis factor- α [J]. J Dent Res, 1995, 74(11): 1802-1811.
- [3] Nebel D, Arvidsson J, Lillqvist J, et al. Differential effects of LPS from *Escherichia coli* and *Porphyromonas gingivalis* on IL-6 production in human periodontal ligament cells[J]. Acta Odontol Scand, 2013, 71(3/4): 892-898.
- [4] Shi H, Xu X, Zhang B, et al. 3, 3'-Diindolylmethane stimulates exosomal Wnt11 autocrine signaling in human umbilical cord mesenchymal stem cells to enhance wound healing[J]. Theranostics, 2017, 7(6): 1674-1688.
- [5] Cho HJ, Seon MR, Lee YM, et al. 3, 3'-Diindolylmethane suppresses the inflammatory response to lipopolysaccharide in murine macrophages[J]. J Nutr, 2008, 138(1): 17-23.
- [6] 李明, 吴凤霞, 刘现栋, 等. DIM 对雌激素非依赖性乳腺癌细胞增殖的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2017(10): 977-980.
- [7] Li F, Chen C, Chen SM, et al. ERK signaling mediates long-term low concentration 3, 3'-diindolylmethane inhibited nasopharyngeal carcinoma growth and metastasis: an *in vitro* and *in vivo* study[J]. Oncol Rep, 2016, 35(2): 955-961.
- [8] Yu T, Pang W, Yang G, 3, 3'-Diindolylmethane increases bone mass by suppressing osteoclastic bone resorption in mice[J]. J Pharmacol Sci, 2015, 127(1): 75-82.
- [9] Cotti E, Schirru E, Acquas E, et al. An overview on biologic medications and their possible role in apical periodontitis[J]. J Endodontics, 2014, 40(12): 1902-1911.
- [10] Sun Y, Shu R, Li CL, et al. Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of Toll-like receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells[J]. J Periodontol, 2010, 81(10): 1488-1496.
- [11] Jian C, Li C, Ren Y, et al. Hypoxia augments lipopolysaccharide-induced cytokine expression in periodontal ligament cells[J]. Inflammation, 2014, 37(5): 1413-1423.
- [12] Wang F, Jiang Y, Huang X, et al. Pro-inflammatory cytokine TNF- α attenuates BMP9-induced osteo/odontoblastic differentiation of the stem cells of dental apical papilla (SCAPs)[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 41(5): 1725-1735.
- [13] Morsani JM, Aminoshariae A, Han YW, et al. Genetic predisposition to persistent apical periodontitis[J]. J Endodontics, 2011, 37(4): 455-459.
- [14] Kwan TS, Padrine M, Theoleyre S, et al. IL-6, RANKL, TNF- α /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15(1): 49-60.
- [15] Kimak A, Strycharz-Dudziak M, Bachanek T, et al. Lipids and lipoproteins and inflammatory markers in patients with chronic apical periodontitis[J]. Lipids Health Dis, 2015, 14: 162.
- [16] Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, et al. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review[J]. Int Endodont J, 2014, 47(7): 615-621.
- [17] Jonsson D, Nebel D, Bratthall G, et al. The human periodontal ligament cell: a fibroblast-like cell acting as an immune cell[J]. J Periodontol Res, 2011, 46(2): 153-157.
- [18] Yamamoto T, Kita M, Oseko F, et al. Cytokine production in human periodontal ligament cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis*[J]. J Periodontol Res, 2006, 41(6): 554-559.
- [19] Patil C, Rossa CJ, Kirkwood KL. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces interleukin-6 expression through multiple mitogen-activated protein kinase pathways in periodontal ligament fibroblasts[J]. Oral Microbiol Immunol, 2006, 21(6): 392-398.
- [20] Fukushima A, Kajiya H, Izumi T, et al. Pro-inflammatory cytokines induce suppressor of cytokine signaling-3 in human periodontal ligament cells[J]. J Endodont, 2010, 36(6): 1004-1008.

[收稿日期] 2017-09-11

[本文编辑] 吴 洋