

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.23.003

## 白细胞介素-17 对人牙周膜成纤维细胞表达 RANKL、OPG 的影响\*

李琳娟,黎敏,彭娟敏,康娜<sup>△</sup>

(广西医科大学附属口腔医院正畸科,南宁 530021)

**[摘要]** **目的** 研究白细胞介素 17(IL-17)水平对人牙周膜成纤维细胞(HPDLF)中细胞核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体(RANKL)、骨保护素(OPG)表达的影响,探讨 IL-17 与正畸牙根吸收的相关性。**方法** 采用组织块培养法,在体外建立人牙周膜成纤维细胞系。以不同水平(0、5、10、20、40 ng/mL)的 IL-17 作用 HPDLF 24 h。采用 RT-PCR 和 ELISA 法,分别检测 RANKL 和 OPG 的 mRNA、蛋白的表达。**结果** (1)在 0 ng/mL 组中,HPDLF 表达 RANKL、OPG。(2)0~20 ng/mL 各组中,HPDLF 中 RANKL 的 mRNA、蛋白表达量与 IL-17 水平呈正相关性。(3)5~20 ng/mL 各组中,OPG 的 mRNA、蛋白表达量与 IL-17 水平呈负相关性。(4)0~20 ng/mL 组中,RANKL/OPG 的 mRNA、蛋白的比值与 IL-17 水平呈正相关性。**结论** 在无 IL-17 刺激时,HPDLF 可表达 RANKL、OPG。IL-17 能够促进 HPDLF 表达 RANKL,同时抑制 HPDLF 表达 OPG,上调 RANKL/OPG 的比值。

**[关键词]** 牙周膜;成纤维细胞;白细胞介素 17;RANK 配体;骨保护素

**[中图分类号]** R783.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)23-3177-03

## Effects of different concentration of IL-17 on the expression of RANKL and OPG in human periodontal ligament fibroblasts\*

Li Linjuan, Li Min, Peng Juanmin, Kang Na<sup>△</sup>

(Department of Orthodontics, Affiliated Stomatological Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effects of different concentration of interleukin(IL)-17 on the expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in human periodontal ligament fibroblasts (HPDLF) and explore the relationship between IL-17 and orthodontic root resorption. **Methods** HPDLF cell line was established through the tissue pieces culture method in vitro. HPDLF were stimulated by IL-17 with five different concentrations(0, 5, 10, 20, 40 ng/mL) for 24 h. The expression level of mRNA and protein of RANKL and OPG in HPDLF were detected by RT-PCR and ELISA, respectively. **Results** HPDLF expressed RANKL and OPG in 0 ng/mL group. The expression amount of mRNA and protein of RANKL in HPDLF was positive correlation with the concentration of IL-17 in 0 to 20 ng/mL group. The expression amount of mRNA and protein of OPG was negative correlation with the concentration of IL-17 in 5 to 20 ng/mL group. The relative RANKL/OPG ratio of mRNA and protein were positive correlation with the concentration of IL-17 in 0 to 20 ng/mL group. **Conclusion** HPDLF expresses RANKL and OPG in the absence of IL-17. IL-17 enhances the expression of RANKL and inhibits the expression of OPG in HPDLF.

**[Key words]** periodontal ligament; fibroblasts; IL-17; RANK ligand; osteoprotegerin

正畸相关炎性牙根吸收的重要原因之一是正畸牙移动所致的炎性反应<sup>[1]</sup>。而白细胞介素 17(interleukin-17, IL-17)主要由辅助性 T 淋巴细胞 17(Th17)分泌,是一种重要的促炎性细胞因子,具有强大的骨吸收作用和促炎症作用<sup>[2]</sup>。研究表明,人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblasts, HPDLF)可以通过表达细胞核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL)和骨保护素(osteoprotegerin, OPG)来影响破骨细胞的活动,从而参与破牙骨质细胞的活动并调节牙根吸收过程<sup>[3-4]</sup>。本实验用逆转录 PCR(RT-PCR)法和酶联免疫吸附实验(ELISA)法分别检测 HPDLF 中 RANKL、OPG 两种因子的 mRNA、蛋白的表达情况,观察不同水平的 IL-17 对 HPDLF 中 RANKL、OPG 表达的影响,探讨 IL-17 与正畸牙根吸收的相关性。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 胎牛血清、DMEM 培养液(南京维森特生物技术有限公司),双抗(青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL,北京索莱宝科技有限公司),鼠抗人细胞角蛋白抗体、鼠抗人波形丝蛋白抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司),RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、引物、Taq DNA PCR 反应试剂盒(Takara 宝生物工程有限公司),IL-17、RANKL、OPG ELISA 检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)等。

## 1.2 方法

**1.2.1 HPDLF 的培养与鉴定** 采用组织块培养法进行 HPDLF 原代培养。培养所需组织均取自本院口腔外科门诊因正畸需要而拔除的前磨牙(牙齿牙周健康、无牙体疾病)。牙齿离体后立即置于预冷的含双抗的 DMEM 培养液中,于 0.5 h 内

送至实验室。取根中 1/3 的牙周膜组织,接种于 75 mL 培养瓶瓶底。竖直培养瓶并加入 1.5 mL 含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内。4~6 h 后组织块贴壁牢固,慢慢放平培养瓶,继续培养,细胞贴壁后每隔 2~3 d 更换 1 次培养液<sup>[5]</sup>。当 HPDLF 爬出后覆盖培养瓶底达 80% 时进行传代。取第 4 代细胞,行波形丝蛋白抗体和角蛋白抗体染色,鉴定细胞来源。

**1.2.2 IL-17 对 HPDLF 增殖活性的影响** 取第 4~5 代细胞,培养 24 h 后,分别给予 0、5、10、20、40、60、80 ng/mL 水平的 IL-17 作用 24 h,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法检测吸光度(A)值,观察 IL-17 对 HPDLF 增殖活性的影响。

**1.2.3 实验干预和检测** 取第 4~6 代细胞,制成  $1 \times 10^5$  个/mL 的细胞悬液,接种于 6 孔培养板中,每孔 2 mL,常规培养 3 d。弃培养液,加入条件培养液进行干预,培养 24 h。其中实验组条件培养液所含 IL-17 的水平分别为 5、10、20、40 ng/mL,对照组为 0 ng/mL,共 5 个组,每组设 3 个重复样品。收集细胞,提取细胞总 RNA,取 1  $\mu$ g 的 RNA 逆转录为 cDNA。用 SYBR Green I 染料法进行 RT-PCR 反应,检测 RANKL、OPG 的 mRNA 相对表达水平,内参为 GAPDH。同时收集细胞上清液,按 ELISA 试剂盒操作步骤检测 RANKL、OPG 的蛋白表达水平。根据所测数据计算 RANKL/OPG 的比值。

表 1 RT-PCR 引物序列

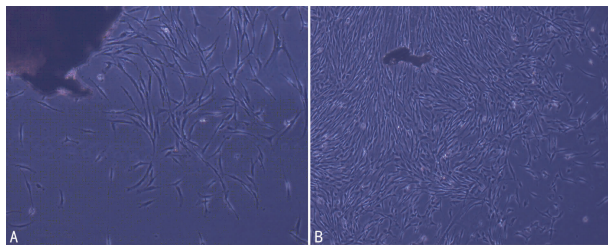
基因	引物序列(5'-3')
RANKL	正向引物:TGGATGCCTTGAATAATAAGCAGGA
	反向引物:AATTTGCGGCACTTGTGGAA
OPG	正向引物:CTGCAGTACGTCAAGCAGGAGTG
	反向引物:TTTGCAAAGTGTATTTTCGCTCTGG
GAPDH	正向引物:GCACCGTCAAGGCTGAGAA
	反向引物:TGGTGAAGACGCCAGTGA

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析进行各组间的比较,检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

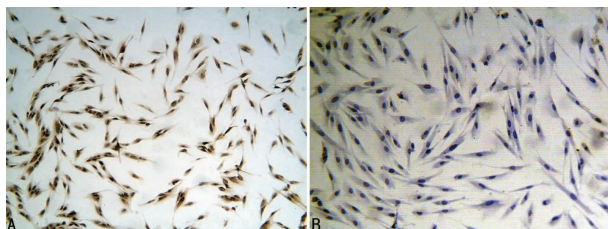
**2.1 HPDLF 的培养与鉴定** 组织块培养 8~10 d 时,镜下见其周边有游出的细胞,呈高折光率的长梭形(图 1A)。10~14 d 后,大量成纤维细胞游出,向四周呈放射状生长(图 1B)。高倍镜下细胞呈长梭形,细胞核呈椭圆形或圆形,细胞体丰满,细胞质均匀,折光性强。细胞经免疫细胞化学染色后,细胞波形丝蛋白染色呈阳性(图 2A),角蛋白染色呈阴性(图 2B),表明所取细胞为中胚层来源,并且没有被外胚层来源的细胞污染。根据细胞长梭形的形态及牙周的取材部位,可判定所用细胞为 HPDLF。

**2.2 IL-17 对 HPDLF 增殖活性的影响** MTT 结果显示,细胞在 0~40 ng/mL 的 IL-17 刺激 24 h 后,OD 值持续升高,HPDLF 增殖能力逐渐增强,在 40 ng/mL 组达到高峰( $P<0.01$ )。60~80 ng/mL 组中 OD 值逐渐下降,HPDLF 增殖变缓并逐渐下降( $P<0.01$ ),其增殖活性被抑制(图 3)。因而选择 0~40 ng/mL 的 IL-17 用于实验。



A: 原代培养 8 d; B: 原代培养 14 d

图 1 细胞形态(普通光学显微镜  $\times 100$ )



A: 波形丝蛋白染色阳性; B: 角蛋白染色阴性

图 2 波形丝蛋白及角蛋白抗体染色( $\times 100$ )

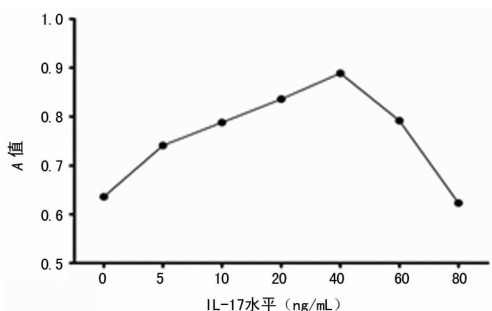


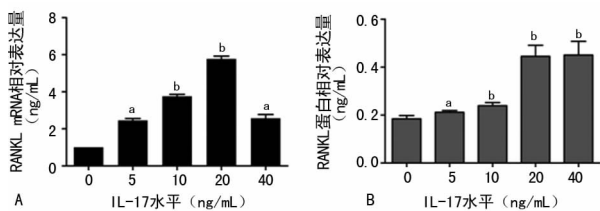
图 3 IL-17 对 HPDLF 增殖的影响

**2.3 HPDLF 的 RANKL 表达** 在对照组(0 ng/mL)中,RANKL 的 mRNA 和蛋白都存在表达。不同水平的 IL-17 作用于 HPDLF 24 h 后,各实验组(5、10、20、40 ng/mL 组)RANKL 的 mRNA 相对表达量均比对照组显著上调,差异有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。0~20 ng/mL 各组,RANKL 的 mRNA 表达量随着 IL-17 水平的增大而增大,在 20 ng/mL 组达最高水平,在 40 ng/mL 组开始下降(图 4A)。各实验组中 RANKL 的蛋白表达量均比对照组显著上调( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。0~40 ng/mL 各组,RANKL 的蛋白表达量随着 IL-17 水平的增大而增大,在 40 ng/mL 组达最高水平(图 4B)。

**2.4 HPDLF 的 OPG 表达** 在对照组(0 ng/mL 组)中,OPG 的 mRNA 和蛋白都存在表达。与对照组(0 ng/mL 组)比较,除 5 ng/mL 组,其余各组 OPG 的 mRNA 表达均下调( $P<0.05$ )。5~20 ng/mL 组中,OPG 的 mRNA 表达量随着 IL-17 水平的增大而下降,20 ng/mL 组表达量最小,40 ng/mL 组开始上升(图 5A)。各实验组中 OPG 的蛋白表达量均比对照组显著下调( $P<0.05$ )。0~20 ng/mL 各组,OPG 蛋白的表达量随着 IL-17 水平的增大而减小,在 20 ng/mL 组达最低,在 40 ng/mL 组开始上升(图 5B)。

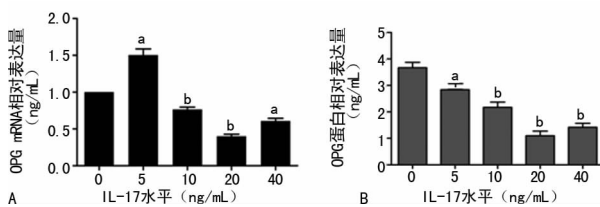
**2.5 RANKL/OPG 的比值** 各实验组 RANKL/OPG 的 mRNA、蛋白的比值均比对照组显著上调,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。0~20 ng/mL 各组,RANKL/OPG 的 mRNA、蛋

白比值随着 IL-17 水平的增大而增大,在 20 ng/mL 组达最高水平,在 40 ng/mL 组开始下降,见图 6。



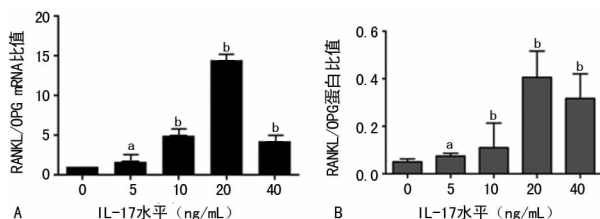
A: RANKL mRNA; B: RANKL 蛋白; a: P<0.05; b: P<0.01

图 4 RANKL mRNA 及蛋白表达



A: OPG mRNA; B: OPG 蛋白; a: P<0.05; b: P<0.01

图 5 OPG mRNA 及蛋白表达



A: RANKL/OPG 的 mRNA 比值; B: RANKL/OPG 的蛋白比值; a: P<0.05; b: P<0.01

图 6 RANKL/OPG mRNA 及蛋白表达

### 3 讨论

RANKL 为 II 型跨膜蛋白,与细胞核因子  $\kappa$ B 受体活化因子(receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B, RANK) 结合后,能直接启动破骨细胞前体和破骨细胞的胞内信号转导,通过一系列酶促级联反应引起破骨细胞前体分化、增殖和成熟,并激活破骨细胞从骨膜中释放、转移、黏附到骨质表面,从而引起骨吸收。而 OPG 是一种分泌性糖蛋白,通过与 RANKL 特异性结合,起到竞争性抑制 RANK 与 RANKL 结合的作用,从而抑制破骨细胞分化成熟,并诱导破骨细胞凋亡<sup>[6]</sup>。其中由破骨细胞介导的骨吸收程度常以 RANKL/OPG 的比值来衡量<sup>[7]</sup>。HPDLF 是牙周膜中最主要的细胞之一,其功能和代谢受多种细胞因子调节和影响,也能通过表达多种细胞因子影响骨代谢活动。研究表明,HPDLF 可以通过表达 RANKL 和 OPG 来影响破牙骨质细胞的活动,并调节牙根吸收过程<sup>[8-9]</sup>。

正畸相关炎性牙根吸收的重要原因之一是正畸牙移动所致的炎性反应。而 IL-17 作为一种重要的促炎性细胞因子,与其他已知的白细胞介素和蛋白的结构不相似,拥有独特的结构,具有强大的促炎症作用和骨吸收作用<sup>[10-11]</sup>。本课题组前期实验显示,静压力能刺激 HPDLF 产生 IL-17 等促炎因子。其中动物实验显示,牙周膜注射外源性 IL-17 能上调 RANKL 的表达,加重正畸牙根吸收的范围和严重程度;而外源性 IL-17 抗体下调 RANKL 的表达,减轻正畸牙根吸收。这提示,IL-17

可能通过调节 HPDLF 中的 RANKL 参与正畸相关炎性牙根吸收。

为证实推断,本研究采用组织块培养法,在体外建立人 HPDLF 系。以不同水平的 IL-17 刺激 HPDLF,作用 24 h 后,检测 RANKL 和 OPG 的表达情况。实验结果显示,在 0 ng/mL 组中 HPDLF 能表达 RANKL 和 OPG,说明在无 IL-17 刺激时,RANKL 和 OPG 均能表达于 HPDLF。与对照组(0 ng/mL 组)比较,IL-17 作用于 HPDLF 后,RANKL 的 mRNA、蛋白表达量均增加;OPG 的 mRNA、蛋白表达量均减小;RANKL/OPG 的 mRNA、蛋白的比值均增大。可以得出,IL-17 可促进 HPDLF 中 RANKL 的表达,抑制 OPG 的表达。Ogasawara 等<sup>[12]</sup>报道的在大鼠实验性正畸牙移动中,成骨细胞和牙周膜细胞均存在 RANKL 和 OPG 的表达;Kanzaki 等<sup>[13]</sup>研究发现 HPDLF 是通过上调 RANKL 和抑制 OPG 的表达,调节破骨细胞进行骨吸收,均与本实验结果相符。

RANKL 的 mRNA、蛋白表达量随着 IL-17 水平的增加而增大,OPG 的 mRNA、蛋白表达量随着 IL-17 水平的增加而下降。说明 IL-17 对 HPDLF 中 RANKL、OPG 细胞因子的调节存在一定的浓度依赖性,与林丹萍等<sup>[14]</sup>的研究发现相符,即 IL-17 可提高人 HPDLF 中 RANKL 的表达水平,并随着 IL-17 水平增高和刺激时间延长而增加。RANKL/OPG 的比值是衡量由破骨细胞介导的骨吸收程度的指标。本实验结果显示,在 0~40 ng/mL 各组中 IL-17 能通过上调 RANKL 和下调 OPG,从而上调 RANKL/OPG 的比值。其中,20 ng/mL 组 RANKL/OPG 的比值最大,受到的影响最为明显。这提示 IL-17 调节 RANKL/OPG 骨代谢系统的体外理想水平是 20 ng/mL。为下一步研究 IL-17 作用时间对 RANKL、OPG 表达的影响,提供了适宜的刺激水平。

综上所述,在 HPDLF 中,IL-17 主要通过促进 RANKL 和抑制 OPG 等骨吸收相关因子的表达,介导破骨细胞的分化与成熟,进而参与正畸相关性牙根吸收。且 IL-17 对 HPDLF 中 RANKL、OPG 因子的调节存在浓度依赖性。牙周膜成纤维细胞 RANKL 和 OPG 之间的平衡可受外界因素干扰,因而外源性因素可干预正畸牙根吸收过程中的牙周组织代谢活动,即通过调节 RANKL、OPG 的表达参与牙槽骨的改建。但破骨细胞的形成是受多因素调节的,IL-17 与 RANKL、OPG 之间的具体作用机制仍然需要未来更多实验去研究及验证。

### 参考文献

- [1] Yamada K, Yamaguchi M, Asano M, et al. Th17-cells in atopic dermatitis stimulate orthodontic root resorption [J]. Oral Dis, 2013, 19(7): 683-693.
- [2] Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage [J]. Nat Med, 2007, 13(2): 139-145.
- [3] Yamaguchi M. RANKL/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement [J]. Orthod Craniofac Res, 2009, 12: 113-119.
- [4] 李盛楠, 霍波, 张丁. 定量观察力值对人牙周膜细胞骨改建相关细胞因子表达的影响 [J]. 中华口腔正畸学杂志, 2015, 22(2): 100-103.

- [2] Gomez Saez JM. Diagnostic and prognostic markers in differentiated thyroid cancer [J]. *Curr Genomics*, 2011, 12(8):597-608.
- [3] Hodak S, Tuttle RM, Maytal G, et al. Changing the cancer diagnosis: the case of follicular variant of papillary thyroid Cancer-Primum Non nocere and NIFTP [J]. *Thyroid*, 2016, 26(7):869-871.
- [4] Rescher U, Gerke V. Annexins—unique membrane binding proteins with diverse functions [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 13):2631-2639.
- [5] 钟雪梅, 陈敏, 邓世山, 等. AnnexinA1 在甲状腺乳头状癌中的表达及临床意义 [J]. *重庆医学*, 2015, 44(25):3488-3490.
- [6] Higuchi DY, Kawakami S, Hashida M. Strategies for in vivo delivery of siRNAs: recent progress [J]. *Biodrugs*, 2010, 24(3):195-205.
- [7] Ren T, Qing Y, Dai N, et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 induced upregulation of fibroblast growth factor 2 and its receptor 3 induces angiogenesis in human osteosarcoma cells [J]. *Cancer Sci*, 2014, 105(2):186-194.
- [8] Ardito G, Revelli L, Polistena A, et al. Complications of neck dissections in papillary thyroid carcinoma: a modified procedure to reduce parathyroid morbidity [J]. *In Vivo*, 2016, 30(3):303-308.
- [9] Liu YF, Zhang PF, Li MY, et al. Identification of annexin A1 as a proinvasive and prognostic factor for lung adenocarcinoma [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2011, 28(5):413-425.
- [10] He ZY, Wen H, Shi CB, et al. Up-regulation of hnRNP A1, Ezrin, tubulin  $\beta$ -2C and Annexin A1 in sentinel lymph nodes of colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(37):4670-4676.
- [11] Monastyrskaya K, Babiychuk EB, Draeger A. The annexins: spatial and temporal coordination of signaling events during cellular stress [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(16):2623-2642.
- [12] D'Acquisto F, Piras G, Rattazzi L. Pro-inflammatory and pathogenic properties of Annexin-A1: the whole is greater than the sum of its parts [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(9):1213-1218.
- [13] Petrella A, Festa M, Ercolino SF, et al. Annexin-1 down-regulation in thyroid cancer correlates to the degree of tumor differentiation [J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(6):643-647.
- [14] Petrella A, Festa M, Ercolino SF, et al. Induction of annexin-1 during TRAIL-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(10):1358-1360.
- [15] Fang Y, Guan XY, Cai TH, et al. Knockdown of ANXA1 suppresses the biological behavior of human NSCLC cells in vitro [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(5):3858-3866.
- [16] Alldridge LC, Bryant CE. Annexin 1 regulates cell proliferation by disruption of cell morphology and inhibition of cyclin D1 expression through sustained activation of the ERK1/2 MAPK signal [J]. *Exp Cell Res*, 2003, 290(1):93-107.

(收稿日期:2017-03-10 修回日期:2017-04-20)

(上接第 3179 页)

- [5] 任媛姝, 付钢, 邱雨, 等. 缺氧对人牙周膜细胞 OPG 和 RANKL 基因表达的影响 [J]. *重庆医学*, 2015, 44(35):4955-4957.
- [6] Liu JZ, Ji ZL, Chen SM. The OPG/RANKL/RANK system and bone resorptive disease [J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2003, 19(6):655-660.
- [7] Hofbauer LC, Kuhne CA, Viereck V. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2004, 4(3):268-275.
- [8] Kanzaki H, Chiba M, Arai K, et al. Local RANKL gene transfer to the periodontal tissue accelerates orthodontic tooth movement [J]. *Gene therapy*, 2006, 13(8):678-685.
- [9] Nishijima Y, Yamaguchi M, Kojima T, et al. Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells in vitro [J]. *Orthod Craniofac Res*, 2006, 9(2):63-70.
- [10] Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy [J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(6):652-657.
- [11] Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27:485-517.
- [12] Ogasawara T, Yoshimine Y, Kiyoshima T, et al. In situ expression of RANKL, RANK, osteoprotegerin and cytokines in osteoclasts of rat periodontal tissue [J]. *J Periodontol Res*, 2004, 39(1):42-49.
- [13] Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, et al. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition [J]. *J Dent Res*, 2001, 80(3):887-891.
- [14] 林丹萍, 王威栋, 李璐, 等. IL-17 对人牙周膜成纤维细胞 RANKL 表达的影响 [J]. *口腔医学*, 2014, 36(6):405-408.

(收稿日期:2017-03-19 修回日期:2017-04-21)