

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2019.06.005

· 基础研究 ·

不同 fimA 基因型牙龈卟啉单胞菌感染对人脐静脉内皮细胞分泌 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响

蔡树玉¹, 林晓悦², 雷劲¹, 葛颂³

1. 暨南大学附属东莞医院, 东莞市第五人民医院口腔科, 广东 东莞(523900); 2. 暨南大学附属东莞医院, 东莞市第五人民医院内分泌科, 广东 东莞(523900); 3. 遵义医科大学附属医院口腔医院, 贵州 遵义(563003)

【摘要】 目的 研究 I、II 和 IV fimA 基因型牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. g*)感染对人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达的影响。方法 根据不同 fimA 基因型感染 HUVEC 细胞分为 I fimA 型刺激组、II fimA 型刺激组和 IV fimA 型刺激组, 同时设立阳性对照组(*E. coli*-LPS 刺激)和阴性对照组(仅加入细胞培养液)。MTT 检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡, ELISA 检测不同 fimA 基因型 *P. g* 刺激 HUVEC 细胞 2 h、6 h 和 24 h 后细胞培养上清液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量。结果 I fimA 型刺激组、II fimA 型刺激组和 LPS 组刺激 24 h 后, 其细胞增殖与阴性对照组相比均受到抑制($P < 0.05$)。而各组细胞凋亡率差异无统计学意义。不同 fimA 基因型 *P. g* 刺激 HUVEC 细胞后, 2 h 后细胞培养上清液中 IL-1 β 含量均高于刺激 6 h 和 24 h; 2 h、6 h 后培养上清液中 IL-6 含量均低于刺激 24 h 后培养上清液 IL-6 含量; 而细胞培养上清液中同一 fimA 型刺激组各时间 TNF- α 含量差异无统计学意义。II fimA 型和 IV fimA 型 *P. g* 对 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的诱导能力高于 I fimA 型 *P. g* ($P < 0.05$)。结论 不同 fimA 基因型 *P. g* 刺激 HUVEC 细胞致其功能紊乱的作用存在差异; II fimA 型和 IV fimA 型 *P. g* 具有较强的上调 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 分泌的能力。

【关键词】 牙龈卟啉单胞菌; 白细胞介素; 肿瘤坏死因子- α ; 动脉粥样硬化; 牙周病

【中图分类号】 R781 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)06-0364-06

【引用著录格式】 蔡树玉, 林晓悦, 雷劲, 等. 不同 fimA 基因型牙龈卟啉单胞菌感染对人脐静脉内皮细胞分泌 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响[J]. 口腔疾病防治, 2019, 27(6): 364-369.

Effects of *Porphyromonas gingivalis* infection with different fimA genotypes on the secretion of IL-1 β , IL-6, and TNF- α by human umbilical vein endothelial cells CAI Shuyun¹, LIN Xiaoyue², LEI Jin¹, GE Song³.

1. Department of Stomatology, Affiliated Dongguan Hospital of Medical College of Jinan University, The Fifth People's Hospital of Dongguan, Dongguan 523900, China; 2. Department of Endocrinology, Affiliated Dongguan Hospital of Medical College of Jinan University, The Fifth People's Hospital of Dongguan, Dongguan 523900, China; 3. Affiliated Stomatological Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China

Corresponding author: GE Song, Email: gesong007b@163.com, Tel: 0086-13984209770

【Abstract】Objective To study the effects of *Porphyromonas gingivalis* (*P. g*) infection with I, II and IV fimA genotypes on the expression of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** HUVECs infected with different fimA genotypes were divided into the fimA type I stimulation group, fimA type II stimulation group, fimA type IV stimulation group. In addition, a positive control group (*E. coli* LPS stimulation) and negative control group (cell culture medium only) were included. Cell proliferation was detected by MTT assay, and cell apoptosis was detected by flow cytometry. IL-1 β , IL-6, TNF- α levels in the supernatant of HUVECs after *P. g* stimulation were assessed by ELISA at 2 h, 6 h and 24 h. **Results** HUVECs were infected by *P. g* with fimA type I, fimA type II and LPS for 24 h. Cell proliferation was inhibited compared with the negative control group ($P < 0.05$), but there was no

【收稿日期】 2018-07-21; **【修回日期】** 2018-10-26

【基金项目】 东莞市社会发展项目(2015108101035); 国家自然科学基金项目(81500007)

【作者简介】 蔡树玉, 副主任医师, 博士, Email: explorer-sy@163.com

【通信作者】 葛颂, 教授, 博士, Email: gesong007b@163.com, Tel: 0086-13984209770

significant difference in the apoptosis rate between *P. g* infection and the negative control group. IL-1 β levels in cell culture supernatants were higher at 2th than 6 and 24 h after stimulation of HUVECs with different fimA genotypes, while the IL-6 levels were higher at 24 h than the other time, while the TNF- α levels were no significant difference at every time. After fimA type II and IV *P. g* infection, IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels were increased compared with fimA type I *P. g* ($P < 0.05$). **Conclusion** Different *P. g* fimA genotypes have different effects on stimulating HUVECs to induce dysfunction. Here, fimA type II and IV *P. g* exhibit a strong ability to upregulate the secretion of IL-1 β , IL-6 and TNF- α .

【Key words】 *Porphyromonas gingivalis*; Interleukin; Tumor necrosis factor- α ; Atherosclerosis; Periodontitis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性炎症性疾病,是由多种原因引起血管内皮细胞损伤和功能紊乱的结果^[1]。血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VEC)衬贴于血管腔面形成单层扁平上皮,是As形成初始过程中的关键细胞,在机体的炎症反应和免疫应答中起重要作用^[1-2]。在细菌等刺激因素作用下,VEC活化后分泌多种致炎细胞因子从而导致炎症反应的发生。目前,越来越多的研究证据支持中、重度牙周炎是As的独立危险因素。而牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. g*)是目前公认的慢性牙周炎主要致病菌^[3],可通过炎症破坏的牙周组织进入血液循环,并在其毒力因子菌毛的介导下,粘附、入侵VEC并在细胞中定居、繁殖,造成细胞的损伤和激惹^[3-4]。越来越多学者认为,*P. g*与As有高度相关性,在动脉粥样硬化的心血管疾病患者冠状动脉和股骨动脉中,可检测出的600多种口腔菌群,其中,*P. g*约占菌群的80%^[5]。fimA基因是*P. g*菌毛蛋白主要亚基菌毛素(fimbriin)的编码基因,共有I~V和Ib fimA 6种不同基因型。不同fimA基因型*P. g*菌株间存在着毒力上的差异且对牙周组织的破坏程度也各异,其中,高毒力的II、IV fimA型*P. g*与中、重度牙周炎相关,而低毒力的I fimA型*P. g*则与健康的牙周状态相关^[6-10]。但迄今,不同fimA型*P. g*对血管内皮功能的影响,尚未见文献系统报道。因此,本实验以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)为研究对象,观察不同fimA型*P. g*对血管内皮产生炎症因子的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

RPMI-1640培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(Gibco公司,美国);ECGS(Amresco公司,美国);青/链霉素(华北制药股份有限公司);牛心脑浸液培养

基(OXIOD公司,英国);氯化血红素、LPS(Sigma公司,美国);鼠抗人VIII因子单抗(武汉博士德生物工程有限公司);羊抗人CD₃₁单抗(Santa Cruz公司,美国);MTT试剂盒、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司);IL-1 β ELISA试剂盒、IL-6 ELISA试剂盒、TNF- α ELISA试剂盒ELISA试剂盒(上海西唐生物工程公司);厌氧培养箱(Bactron 300, Shellab公司,美国);CO₂细胞培养箱(BB15, Thermo公司,美国);倒置相差显微镜(DMIL-PH1, Leica, 德国);酶标仪(ELx 800, BioTek公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 菌株与细胞系 I fimA型*P. g*菌株(ATCC33277), II fimA型*P. g*菌株(WCSP115)和IV fimA型*P. g*菌株(W83)均由四川大学华西口腔医学院口腔疾病防治国家重点实验室提供;人脐静脉内皮细胞株(ATCC CRL-2480)由中南大学湘雅医学院提供。

1.2.2 细胞培养和内皮细胞鉴定 人脐静脉内皮细胞株采用含10%FBS的RPMI-1640完全培养液于37℃, 5% CO₂, 饱和湿度细胞培养箱培养。取对数期细胞10⁵~10⁶个/孔接种于一含盖玻片的6孔板,待细胞完全贴壁后,取出盖玻片,4℃丙酮固定10 min, PBS洗涤数次, 3% H₂O₂室温孵育10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性。封闭液37℃孵育30 min,倾去封闭液,分别采用人第VIII因子(1:100)和人CD31因子(1:100), 37℃孵育60 min, PBS洗涤数次后,二抗37℃孵育20 min, PBS洗涤, DAB显色,苏木素复染,梯度酒精脱水,封片,显微镜下观察、拍片。

1.2.3 *P. g*菌株培养和内皮细胞感染 分别将冷冻干燥管中的I fimA型*P. g*菌株, II fimA型*P. g*菌株和IV fimA型*P. g*菌株复苏后接种于BHI血琼脂培养基(含5%脱纤维兔血、5 μ g/ml氯化血红素、1 μ g/ml维生素K1), 37℃厌氧(80%N₂, 10%H₂, 10%

CO₂)培养48 h。经形态学及生化鉴定后,取对数生长期菌株悬浮于PBS溶液,并采用细菌比浊仪测定菌液浓度,以感染倍数(MOI)为100:1感染HUVEC细胞,在感染后的2、6、24 h分别检测培养上清液中IL-1 β ,IL-6和TNF- α 的含量,同时设立阳性对照组(*E.coli*-LPS刺激)和阴性对照组(仅加入细胞培养液)。

1.2.4 MTT检测细胞增殖 取1 \times 10⁴HUVEC细胞,以感染倍数(MOI)为100:1感染HUVEC细胞2、6、24 h后,采用MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒检测细胞增殖,具体步骤按试剂盒说明书进行。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 取1 \times 10⁴HUVEC细胞,以感染倍数(MOI)为100:1感染HUVEC细胞2、6、24 h后,采用Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒检测,具体步骤按试剂盒说明书进行。

1.2.6 ELISA检测IL-1 β ,IL-6和TNF- α 的表达 取

感染刺激2、6、24 h后的HUVEC细胞培养上清进行ELISA检测,具体检测步骤参见试剂盒操作说明书。

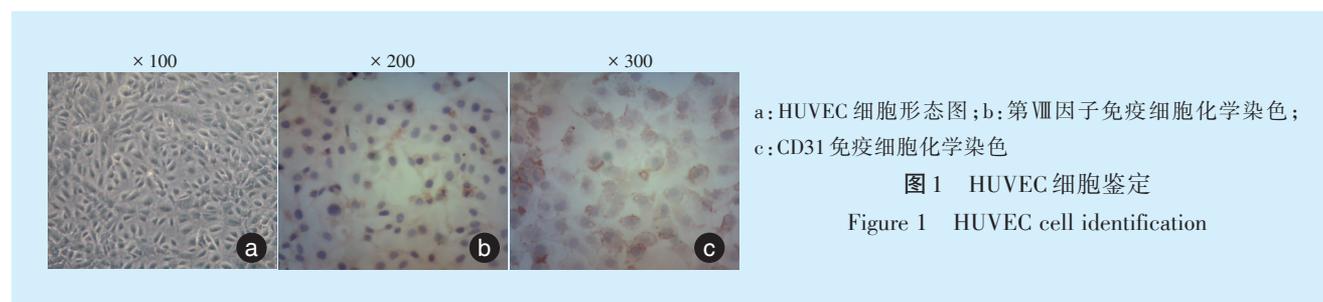
1.3 统计学分析

采用SPSS13.0统计学软件对数据进行分析。数据以均数 \pm 标准差表示,采用方差分析(ANOVA)及SNK法处理所得数据,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 HUVEC细胞鉴定

镜下HUVEC细胞呈贴壁生长,呈菱形或多角形,2~5 d融合成片,呈现典型铺路石状镶嵌排列。第Ⅷ因子和CD₃₁免疫细胞化学染色显示HUVEC细胞胞浆内均呈现棕黄色阳性颗粒,说明培养的HUVEC细胞为内皮细胞,见图1。



2.2 不同fimA基因型*P. g*菌株刺激HUVEC细胞增殖情况

不同fimA基因型*P. g*菌株刺激HUVEC 2、6、24 h时,细胞增殖检测结果如表1。MTT检测结果

显示I fimA型刺激组,II fimA型刺激组和LPS组刺激24 h后,其细胞增殖与阴性对照组相比均受到抑制,而其它组别fimA基因型*P. g*菌株刺激HUVEC细胞增殖情况差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 MTT检测HUVEC细胞增殖情况(OD值)

Table 1 Detection of proliferation of HUVECs by MTT (OD value)

组别	2 h	6 h	24 h	F值	P值
阴性对照组	1.208 \pm 0.207	1.212 \pm 0.212	1.455 \pm 0.111	1.799	0.244
I fimA型刺激组	1.232 \pm 0.202	1.178 \pm 0.206	0.992 \pm 0.201 ¹⁾	1.154	0.377
II fimA型刺激组	1.219 \pm 0.311	1.102 \pm 0.211	0.614 \pm 0.102 ¹⁾²⁾	6.111	0.036
IV fimA型刺激组	1.223 \pm 0.212	1.234 \pm 0.197	1.102 \pm 0.121	0.491	0.635
LPS刺激组	1.267 \pm 0.198	1.106 \pm 0.165	0.798 \pm 0.107 ¹⁾²⁾	6.561	0.031
F值	0.029	0.045	17.100		
P值	0.998	0.876	<0.001		

1):与阴性对照组相比 $P < 0.05$;2):与IV fimA型刺激组相比 $P < 0.05$

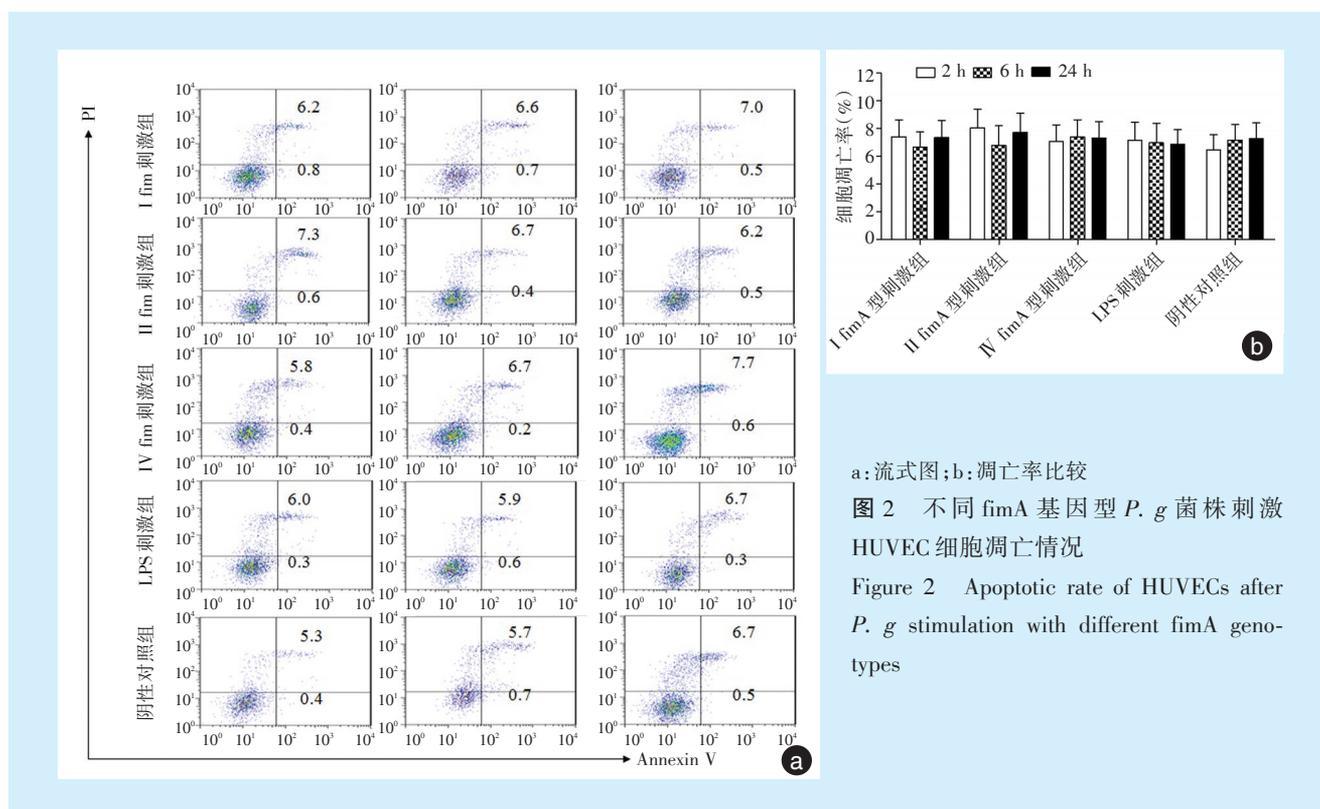
2.3 不同fimA基因型*P. g*菌株刺激HUVEC细胞凋亡情况

不同fimA基因型*P. g*菌株刺激HUVEC 2、6、24 h时,细胞凋亡检测结果显示,各组凋亡率差异

无统计学意义($P > 0.05$,图2)。

2.4 不同fimA基因型*P. g*菌株刺激HUVEC细胞分泌IL-1 β 的比较

不同fimA基因型*P. g*菌株刺激HUVEC 2、6、



a: 流式图; b: 凋亡率比较

图2 不同 fimA 基因型 *P. g* 菌株刺激 HUVEC 细胞凋亡情况

Figure 2 Apoptotic rate of HUVECs after *P. g* stimulation with different fimA genotypes

24 h时, ELISA 检测细胞培养上清液中 IL-1 β 含量结果如表2所示。I、II、IV fimA 型刺激组和 LPS 刺激组 2 h 后培养上清液中 IL-1 β 含量均高于刺激 6 h 和

24 h 后培养上清液 IL-1 β 含量 ($P < 0.05$); 相同时间中, 各组 IL-1 β 含量差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表2 ELISA 检测不同 fimA 基因型 *P. g* 菌株刺激 HUVEC 细胞培养上清液中 IL-1 β 含量

组别	2 h	6 h	24 h	F 值	P 值
阴性对照组	0.436 \pm 0.129	0.171 \pm 0.106	0.259 \pm 0.168	2.99	0.078
I fimA 型刺激组	1.407 \pm 0.211 ¹⁾	0.648 \pm 0.116 ¹⁾⁵⁾	0.348 \pm 0.233 ¹⁾⁵⁾	23.88	0.003
II fimA 型刺激组	4.038 \pm 0.353 ¹⁾²⁾	1.796 \pm 0.393 ¹⁾²⁾⁵⁾	1.707 \pm 0.387 ¹⁾²⁾⁵⁾	36.63	0.002
IV fimA 型刺激组	3.049 \pm 0.191 ¹⁾²⁾³⁾	1.389 \pm 0.241 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾	1.336 \pm 0.157 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾	30.78	0.008
LPS 刺激组	4.144 \pm 0.328 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	1.972 \pm 0.405 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	1.849 \pm 0.081 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	37.01	0.001
F 值	122.10	56.72	89.21		
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001		

1): 与相同时间点阴性对照组相比 $P < 0.05$; 2): 与相同时间点 I fimA 型刺激组相比 $P < 0.05$; 3): 与相同时间点 II fimA 型刺激组相比 $P < 0.05$; 4): 与相同时间点 IV fimA 型刺激组相比 $P < 0.05$; 5): 与相同组别 2 h 相比 $P < 0.05$

2.5 不同 fimA 基因型 *P. g* 菌株刺激 HUVEC 细胞分泌 IL-6 的比较

不同 fimA 基因型 *P. g* 菌株刺激 HUVEC 2、6、24 h 时, ELISA 检测细胞培养上清液中 IL-6 含量结果如表3所示。I、II 和 IV fimA 型刺激组和 LPS 刺激组 2 h、6 h 后培养上清液中 IL-6 含量均低于刺激 24 h 后培养上清液 IL-6 含量 ($P < 0.05$); 相同时间中, 除了 6 h 的 II fimA 型刺激组与 LPS 刺激组、24 h

的 II fimA 型刺激组与 IV fimA 型刺激组差异无统计学意义外 ($P > 0.05$), 其余各组 IL-1 β 含量差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.6 不同 fimA 基因型 *P. g* 菌株刺激 HUVEC 细胞分泌 TNF- α 的比较

不同 fimA 基因型 *P. g* 菌株刺激 HUVEC 2、6、24 h 时, ELISA 检测细胞培养上清液中 TNF- α 含量结果如表4所示。LPS 刺激组 2 h 后培养上清液中

表3 ELISA检测不同fimA基因型*P.g*菌株刺激HUVEC细胞培养上清液中IL-6含量检测

组别	2 h	6 h	24 h	F值	P值
阴性对照组	934.935 ± 188.211	1 036.520 ± 179.650	1 037.894 ± 59.589	0.44	0.731
I fimA型刺激组	1 311.961 ± 377.291 ¹⁾⁵⁾	2 689.837 ± 30.022 ¹⁾⁵⁾	3 555.083 ± 268.570 ¹⁾	53.48	< 0.001
II fimA型刺激组	2 021.525 ± 323.861 ¹⁾²⁾⁵⁾	2 836.319 ± 507.251 ¹⁾²⁾⁵⁾	3 706.353 ± 91.842 ¹⁾²⁾	47.89	< 0.001
IV fimA型刺激组	2 400.680 ± 174.124 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾	3 277.943 ± 88.773 ¹⁾²⁾³⁾⁵⁾	3 700.721 ± 172.883 ¹⁾²⁾	58.16	< 0.001
LPS刺激组	2 129.089 ± 717.938 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	2 836.519 ± 143.034 ¹⁾²⁾⁴⁾⁵⁾	3 494.036 ± 223.025 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	7.16	0.029
F值	60.12	56.23	57.11		
P值	< 0.001	< 0.001	< 0.001		

1):与相同时间点阴性对照组相比 $P < 0.05$; 2):与相同时间点I fimA型刺激组相比 $P < 0.05$; 3):与相同时间点II fimA型刺激组相比 $P < 0.05$; 4):与相同时间点IV fimA型刺激组相比 $P < 0.05$; 5):与相同组别24 h相比 $P < 0.05$

TNF- α 含量均低于刺激24 h后培养上清液TNF- α 含量($P < 0.05$),而I、II、IV fimA型刺激组中各时间TNF- α 含量差异无统计学意义;相同时间中,除了2 h I fimA型刺激组与IV fimA型刺激组、6 h I fimA型刺激组与IV fimA型刺激组、6 h I fimA型刺激组

与LPS刺激组、6 h IV fimA型刺激组与LPS刺激组、24 h I fimA型刺激组与LPS刺激组差异无统计学意义,其余各组TNF- α 含量差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表4 ELISA检测不同fimA基因型*P.g*菌株刺激HUVEC细胞培养上清液中TNF- α 含量检测

组别	2 h	6 h	24 h	F值	P值
阴性对照组	6.621 ± 2.895	9.574 ± 0.321	16.379 ± 3.805	9.815	0.013
I fimA型刺激组	23.184 ± 14.292 ¹⁾	45.109 ± 33.163 ¹⁾	45.109 ± 24.984 ¹⁾	0.748	0.563
II fimA型刺激组	53.425 ± 12.222 ¹⁾²⁾	80.643 ± 27.662 ¹⁾²⁾	87.448 ± 14.477 ¹⁾²⁾	2.595	0.125
IV fimA型刺激组	33.768 ± 10.763 ¹⁾³⁾	33.768 ± 21.384 ¹⁾³⁾	80.643 ± 31.670 ¹⁾²⁾³⁾	4.182	0.063
LPS刺激组	17.639 ± 1.746 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	42.085 ± 32.979 ¹⁾³⁾	70.815 ± 11.416 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾	5.222	0.040
F值	9.837	2.883	6.474		
P值	0.002	0.079	0.008		

1):与相同时间点阴性对照组相比 $P < 0.05$; 2):与相同时间点I fimA型刺激组相比 $P < 0.05$; 3):与相同时间点II fimA型刺激组相比 $P < 0.05$; 4):与相同时间点IV fimA型刺激组相比 $P < 0.05$; 5):与相同组别2 h相比 $P < 0.05$

3 讨论

革兰阴性厌氧菌*P.g*,被认为是慢性牙周炎的主要致病菌。其中,II fimA型和IV fimA型*P.g*与中、重度牙周炎以及慢性牙周炎的发生、发展密切相关,可能是*P.g*高毒力克隆株,而I fimA型*P.g*与健康的牙周状态相关,则可能是低毒力株*P.g*^[6-10]。

致炎细胞因子IL-1 β , IL-6和TNF- α 在参与机体炎症反应及一系列病理生理过程中具有重要作用。在牙周炎的发生、发展过程中,IL-1 β , IL-6和TNF- α 均起重要的免疫调节作用。Jakovljevic等^[11]发现牙周病变组织中IL-1 β , IL-6和TNF- α 水平高于非病变组织且与疾病的严重程度相关。而*P.g*可诱导IL-1 α , IL-1 β , IL-6和TNF- α 等大量细胞因子的产生,导致牙槽骨吸收^[12]。As是一种慢性炎

症性疾病,IL-1 β , IL-6和TNF- α 等细胞因子在As的发病过程中同样发挥重要作用,参与As的发生、发展^[13-16]。

本研究采用不同fimA型*P.g*刺激HUVEC,观察致炎细胞因子IL-1 β , IL-6和TNF- α 分泌情况。结果发现,不同fimA型*P.g*刺激HUVEC后细胞分泌IL-1 β , IL-6和TNF- α 的情况存在差异。I fimA型、II fimA型、IV fimA型*P.g*刺激HUVEC细胞,培养上清液中IL-1 β 分泌量高于对照组,且II fimA型、IV fimA型*P.g*诱导HUVEC细胞分泌IL-1 β 的能力强于I fimA型*P.g*,其中以II fimA型*P.g*诱导细胞分泌IL-1 β 的能力更为突出,接近于LPS的刺激能力,这可能与II fimA型*P.g*毒力较高有关。然而,随着刺激时间的延长,不同fimA型*P.g*、包

括 LPS 刺激 HUVEC 细胞分泌 IL-1 β 的能力渐减弱,这与 Takahashi 等研究结果相似^[14]。在刺激 6 h 和 24 h 时 HUVEC 细胞分泌 IL-1 β 的水平基本稳定。不同 fimA 型 *P. g* 刺激的 2 h~6 h, IV fimA 型 *P. g* 刺激 HUVEC 细胞产生 IL-6 的能力不仅高于 I、II fimA 型 *P. g*, 也高于 LPS, 提示 IV fimA 型 *P. g* 可能更易快速激活细胞产生 IL-6。研究发现 IV fimA 型 *P. g* 在侵袭到冠状动脉内皮 (Human coronary artery endothelial, HCAE) 细胞时, 其粘附能力较 I fimA 型 *P. g* 强, 在 *P. g* 作用的 HCAE 细胞培养液中, IV fimA 型 *P. g* 可存活至 48 h, 而 I fimA 型 *P. g* 则在作用到 24 小时内已被清除, 导致这些不同的粘附能力的差异可能与不同菌株在胞内的运输情况有关^[17]。本实验 IV fimA 型 *P. g* 较其它基因型 *P. g* 更能刺激细胞分泌 IL-6 的能力, 可能跟其对细胞的粘附能力较强及运输途径有关。此外, 不同 fimA 型 *P. g* 刺激也影响 HUVEC 细胞 TNF- α 的产生, I、II、IV fimA 型 *P. g* 均可诱导 HUVEC 细胞分泌 TNF- α 。其中, 尤以 II fimA 型 *P. g* 的刺激作用最为突出, 其可更快地刺激 HUVEC 细胞分泌大量的 TNF- α 。

P. g 促进 As 的发生发展已得到流行病学、临床、免疫学及分子学等多方面研究的证实。学者们发现, *P. g* 可通过不同方式促进 As 的发生发展。本研究发现, II fimA 型、IV fimA 型 *P. g* 较 I fimA 型 *P. g* 更能有效诱导 HUVEC 细胞分泌致炎细胞因子 IL-1 β , IL-6, TNF- α , 表明 II、IV fimA 型 *P. g* 较 I fimA 型 *P. g* 可能更能引起机体慢性炎症或免疫细胞功能紊乱, 从而在 As 发生、发展中起更为重要的作用。

参考文献

- [1] Von Hundelshausen P, Weber C. Chronic inflammation and atherosclerosis[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2013, 138(37): 1839-1844.
- [2] Blum A. HMG-Co A reductase inhibitors (statins), inflammation, and endothelial progenitor cells-new mechanistic insights of atherosclerosis[J]. Biofactors, 2014, 40(3): 295-302.
- [3] Hajishengallis G, Lamont RJ. Breaking bad: manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*[J]. Eur J Immunol, 2014, 44(2): 328-338.
- [4] Kerr JE, Abramian JR, Dao DH, et al. Genetic exchange of fimbrial alleles exemplifies the adaptive virulence strategy of *Porphyromonas gingivalis*[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91696.
- [5] Mougeot JC, Stevens CB, Paster BJ, et al. *Porphyromonas gingivalis* is the most abundant species detected in coronary and femoral arteries. [J]. J Oral Microbiol, 2017, 9(1): 1281562.
- [6] Nagano K, Abiko Y, Yoshida Y, et al. Genetic and antigenic analyses of *Porphyromonas gingivalis* fimA fimbriae[J]. Mol Oral Microbiol, 2013, 28(5): 392-403.
- [7] 蔡树玉, 林玉祥, 肖莉, 等. 不同 fimA 基因型牙龈卟啉单胞菌对人脐静脉内皮细胞产生血管细胞黏附分子 1 和细胞间黏附分子 1 的影响[J]. 中华口腔医学杂志, 2011, 46(6): 332-337.
- [8] Aruni AW, Robles A, Fletcher HM. VimA mediates multiple functions that control virulence in *Porphyromonas gingivalis*[J]. Mol Oral Microbiol, 2013, 28(3): 167-180.
- [9] Moreno S, Contreras A. Functional differences of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in determining periodontal disease pathogenesis: a literature review[J]. Colomb Med, 2013, 44(1): 51-60.
- [10] Moreno S, Jaramillo A, Parra B, et al. *Porphyromonas gingivalis* fim-A genotype distribution among Colombians[J]. Colombia médica (Cali), 2015, 46(3): 122-127.
- [11] Jakovljevic A, Knezevic A, Karalic D, et al. Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: correlation with clinical and histological findings[J]. Aust Endod J, 2015, 41(2): 72-77.
- [12] Enersen M, Nakano K, Amano A. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae[J]. J Oral Microbiol, 2013, 5(2013): 58.
- [13] Ridker PM, Lüscher TF. Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease[J]. Eur Heart J, 2014, 35(27): 1782-1791.
- [14] Takahashi Y, Davey M, Yumoto H, et al. Fimbria-dependent activation of pro-inflammatory molecules in *Porphyromonas gingivalis* infected human aortic endothelial cells[J]. Cell Microbiol, 2006, 8(5): 738-757.
- [15] Hajishengallis G, Sojar H, Gencor J, et al. Intracellular signaling and cytokine induction upon interactions of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae with pattern-recognition receptors[J]. Immunol Invest, 2004, 33(2): 157-172.
- [16] Ogawa T, Peptide UA, ALTTE. With the fimbrial subunit protein from *Porphyromonas gingivalis*, induces production of interleukin 6, gene expression and protein phosphorylation in human peripheral blood mononuclear cells[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 1995, 11(3): 197-205.
- [17] Rodrigues PH, Reyes L, Chadda AS, et al. *Porphyromonas gingivalis* strain specific interactions with human coronary artery endothelial cells: a comparative study[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52606.

(编辑 罗燕鸿, 曾曙光)