

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2019.05.005

· 基础研究 ·

人慢性根尖周炎及根尖囊肿组织巨噬细胞中 IL-33 的表达

代茜^{1*}, 余苑玲^{2*}, 黄世光¹

1. 暨南大学口腔医学院, 广东 广州(510632); 2. 暨南大学附属第一医院, 广东 广州(510632)

【摘要】 目的 观察白细胞介素-33(interleukin-33, IL-33)在慢性根尖周炎及根尖囊肿组织巨噬细胞中的表达情况,为研究IL-33在根尖周病发病机制中的作用提供基础。**方法** 收集正畸减数拔牙的无病变人牙根尖组织20例为正常对照组,慢性根尖周炎组织15例为慢性根尖周炎组,根尖囊肿组织15例为根尖囊肿组,分别进行HE染色,光学显微镜下观察根尖周组织的变化;以CD14作为巨噬细胞的标记,采用免疫荧光双染色法,在荧光显微镜下分别观察各组CD14阳性的巨噬细胞表达IL-33的情况。**结果** 正常对照组、慢性根尖周炎组、根尖囊肿组中IL-33、CD14表达阳性的巨噬细胞密度分别为 (23.81 ± 5.16) 个/ mm^2 、 (62.97 ± 8.54) 个/ mm^2 、 (119.83 ± 14.61) 个/ mm^2 ;3组间差异具有统计学意义($F = 87.17, P < 0.01$);根尖囊肿组IL-33、CD14表达阳性的巨噬细胞密度显著高于慢性根尖周炎组及对照组($P < 0.01$)。**结论** IL-33、CD14表达阳性的巨噬细胞在正常根尖组织、慢性根尖周炎组织、根尖囊肿组织中依次增加。

【关键词】 白细胞介素-33; 慢性根尖周炎; 根尖周囊肿; CD14; 巨噬细胞

【中图分类号】 R781 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)05-0300-04

【引用著录格式】 代茜,余苑玲,黄世光.人慢性根尖周炎及根尖囊肿组织巨噬细胞中IL-33的表达[J].口腔疾病防治,2019,27(5):300-303.

Macrophage IL-33 expression in macrophages of human chronic periapical periodontitis and apical cyst

DAI Qian¹, YU Yuanling^{2*}, HUANG Shiguang¹. 1. School of Stomatology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Jinan University First Affiliated Hospital, Guangzhou 510632, China

Corresponding author: HUANG Shiguang, Email: thshg@126.com, Tel: 0086-13002019868

【Abstract】 Objective To observe the expression of interleukin-33 (IL-33) in macrophages of chronic periapical periodontitis and apical cyst tissue, and to provide a basis for the study of the pathogenesis of IL-33 in periapical diseases. **Methods** The apical tissues of 20 normal control group, 15 chronic periapical periodontitis group and 15 apical cyst group were collected for HE staining and optical microscopy respectively. CD14 was used as the marker of macrophages and double immunofluorescence staining was used to observe the changes of periapical tissues under fluorescence microscopy. The expression of IL-33 in CD14-positive macrophages was observed. **Results** The macrophage density (cell/ mm^2) of IL-33 and CD14 positive expression in normal control group, chronic periapical periodontitis group and root cyst group were $(23.81 \pm 5.16, 62.97 \pm 8.54, 119.83 \pm 14.61)$ respectively, and there were significant differences among the three groups ($F = 87.17, P < 0.01$). The density of IL-33 and CD14 positive macrophages in root cyst group was significantly higher than that in chronic periapical periodontitis group and control group ($P < 0.01$). **Conclusion** IL-33 and CD14 positive macrophages increased in normal apical tissue, chronic periapical periodontitis tissue and apical cyst tissue in turn.

【Key words】 Interleukin-33; Chronic periapical periodontitis; Periapical cysts; CD14; Macrophage

【收稿日期】 2018-08-10; **【修回日期】** 2018-10-12

【基金项目】 广东省科技计划项目(2014A020212212)

【作者简介】 代茜, 医师, 在读硕士研究生, Email: 1196837291@qq.com

【通信作者】 黄世光, 教授, 硕士, Email: thshg@126.com, Tel: 0086-13002019868

*为并列第一作者

白细胞介素-33(interleukin-33, IL-33)是白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)细胞因子家族的新成员,不仅能够调节Th2免疫反应,还能调节Th1免疫细胞,介导CD8⁺T细胞的激活^[1]。另一方面,IL-33对机体炎症反应起到保护作用。因此,IL-33具有双重的免疫调节活性。IL-33主要由屏障组织的上皮细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、外周血淋巴细胞和中枢神经系统产生^[2]。IL-33与感染性疾病、自身免疫性疾病、变态反应性疾病及心肺疾病等有密切的关系^[3]。近年Velickovic等^[4]观察到IL-33及其受体ST2在根尖肉芽肿和根尖囊肿组织成纤维细胞和内皮细胞的表达情况,认为IL-33/ST2信号途径可能参与根尖周病的炎症反应和组织修复。目前尚无关于IL-33在慢性根尖周病变组织中巨噬细胞中表达的研究报道。本研究采用免疫荧光双染色法,以CD14标记巨噬细胞^[5],分析IL-33在人慢性根尖周炎及根尖囊肿组织巨噬细胞中的表达情况,为研究IL-33在根尖周病发病机制中的作用提供基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

收集正畸减数拔牙的无病变牙根尖组织20例,慢性根尖周炎组织15例,根尖囊肿组织15例。其中男性28例,平均年龄(30±15)岁,女性22例,平均年龄(28±13)岁。所有患者均签署知情同意书。

一抗:CD14抗体、IL-33抗体(Santa Cruz Biotechnology,美国)。二抗:山羊抗鼠IgG(H+L)Alex Flour 555[®](Cell Signaling Technology,美国),山羊抗兔IgG(H+L)Alex Flour 488[®](Cell Signaling Technology,美国),二抗稀释浓度为1:200。山羊血清(Cell Signaling Technology,美国),DAPI(MP Bio Medicals,美国),荧光显微镜(Axio Imager Z1, Zeiss,德国)。

1.2 分组

将所获得的实验标本分为3组,①正常对照组20例;②慢性根尖周炎组15例;③根尖囊肿组15例。上述组织均经病理确诊。

1.3 HE染色

将实验标本浸泡于100 g/L中性福尔马林固定液48 h,脱水,包埋,继而制作成5 μm厚连续组织病理切片,进行HE染色,在光学显微镜下观察其组织学的变化。

1.4 免疫荧光双染色

组织切片经常规脱蜡,乙醇复水,柠檬酸盐修复液,微波抗原修复,山羊血清封闭,所有一抗孵育,避光条件下二抗孵育行荧光染色,DAPI避光孵育显核,封片后立即荧光显微镜观察并拍照。IL-33信号为红色荧光,CD14信号为绿色荧光,红色荧光和绿色荧光重叠后为橘黄色荧光,DAPI为蓝色荧光。组织切片由2名病理医师于荧光显微镜下盲法观察,参照Li等^[6]的计数方法,每例组织切片在400倍镜下选取5个连续视野进行计数(0.072 5 mm²/视野面积),获得单位面积免疫荧光双阳性细胞数(个/mm²),取平均值,记录为该标本切片的IL-33、CD14表达阳性巨噬细胞的平均密度^[7-8]。

1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,采用软件SPSS 13.0分析处理。各组标本组织中IL-33、CD14阳性的巨噬细胞平均密度的比较,采用完全随机设计的单因素方差分析(one-way ANOVA)。各组方差齐性时,样本均数两两比较选用S-N-K检验法;各组方差倘若不齐,则选用Tamhane's T2法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

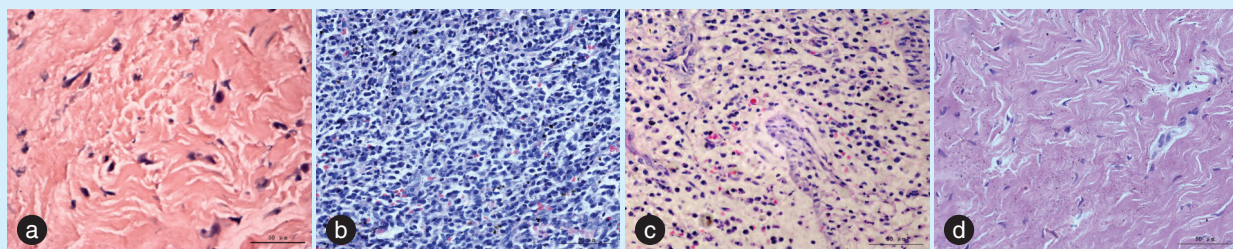
2.1 组织学观察

正常对照组:根尖正常组织未见炎症细胞浸润(图1a)。慢性根尖周炎组:可见大量的炎症肉芽组织,毛细血管和成纤维细胞增生,炎症细胞浸润(图1b)。根尖囊肿组囊腔侧可见淋巴细胞为主的大量炎症细胞浸润,细胞间质水肿明显(图1c);囊肿壁见纤维组织增生融合,成束状排列(图1d)。

2.2 免疫荧光双染色结果

IL-33免疫荧光信号表现为红色荧光,CD14⁺巨噬细胞免疫荧光信号表现为绿色荧光,胞浆及胞膜均有表达。在相同视野下两种荧光重叠后为橘黄色荧光,细胞核显示为蓝色荧光。实验结果显示各组巨噬细胞均有表达IL-33。正常对照组:根尖周组织中可见少量散在分布的双阳性细胞。慢性根尖周炎组:IL-33、CD14阳性巨噬细胞数量较正常对照组明显增加。根尖囊肿组:组织中可见较多IL-33、CD14阳性巨噬细胞(图2)。

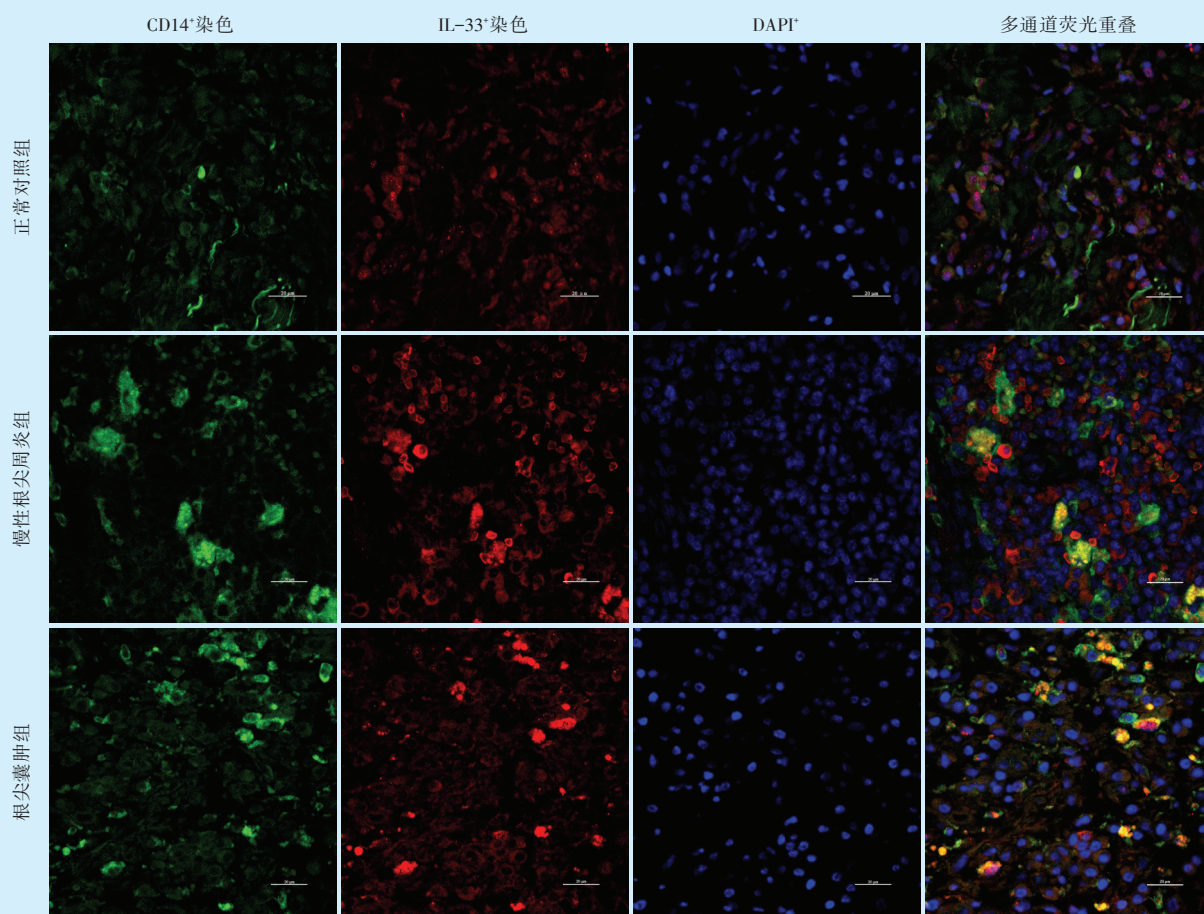
3组标本组织中IL-33、CD14双阳性细胞密度分别为(23.81 ± 5.16)个/mm²、(62.97 ± 8.54)个/mm²、



a: 正常对照组; b: 慢性根尖周炎组; c: 根尖脓肿组的囊腔侧; d: 根尖脓肿组的囊肿壁; bar=50 μm

图1 根尖组织 HE 染色

Figure 1 Apical tissue hematoxylin-eosin staining bar=50 μm



bar=20 μm

图2 激光共聚焦显微镜观察各组 CD14⁺、IL-33⁺巨噬细胞免疫荧光表达

Figure 2 IL-33-CD14 double-positive macrophages infiltration as determined by double immunofluorescence staining in 3 groups using confocal laser scanning microscopy bar=20 μm

(119.83 ± 14.61)个/ mm^2 , 差异具有统计学意义($F=87.17, P < 0.01$), 与正常对照组相比, 慢性根尖周炎组和根尖脓肿组 IL-33、CD14 阳性巨噬细胞密度均明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 根尖脓肿组的 IL-33、CD14 阳性巨噬细胞密度比慢性根尖周

炎组增加更为显著($P < 0.01$)。

3 讨论

慢性根尖周病通常继发于牙髓组织感染, 慢性持续的抗原刺激引起宿主免疫反应, 临床表现

为根尖周牙槽骨的吸收和破坏。在类风湿性关节炎患者的滑膜中检测到IL-33和ST2含量的升高,同时,抑制IL-33可以减轻肿胀^[9]。在牙周炎症组织中,IL-33激发肥大细胞脱颗粒和促炎因子的产生,导致破骨细胞的生成^[10]。IL-33在根尖周的慢性炎症和骨质破坏的作用主要表现在:①促使单核细胞分化成破骨细胞;②导致NF- κ B受体活化因子配体(receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)的增加、骨保护素(osteoclastogenesis inhibitory factor, OPG)的衰减及破骨细胞的活化;③通过IL-33/ST2轴诱导的骨破坏^[11]。IL-33在慢性根尖周炎骨吸收中可能通过以上多个机制发挥作用,然而具体的作用机制不详。

巨噬细胞是根尖周病发病机制中必不可少的免疫细胞成分,其分泌的细胞因子对根尖肉芽肿和根尖囊肿的发展和炎症修复过程发挥重要的作用^[12]。巨噬细胞被认为是参与启动和调节炎症过程的IL-1 α 、IL-1 β 和TNF- α 的主要来源,并能够产生其它几种促炎和抗炎物质^[13]。在促进炎症反应中,巨噬细胞分泌大量的TNF- α ,促进中性粒细胞聚集,配合巨噬细胞产生的趋化因子如单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、CC趋化因子配体2(CC chemokine ligand 2, CCL2),参与Th1免疫反应^[14]。微生物、内毒素和某些化学介质等可以促进巨噬细胞合成IL-1、TNF- α 等细胞因子,从而激活破骨细胞,导致根尖周骨质的吸收。

本实验观察到IL-33在慢性根尖周炎症病变组织中巨噬细胞的表达分布,结果显示慢性根尖周炎组和根尖囊肿组IL-33、CD14阳性巨噬细胞密度明显高于正常对照组,根尖囊肿组IL-33、CD14阳性巨噬细胞密度高于慢性根尖炎组;有研究报道M2型巨噬细胞可能在根尖周组织修复过程起关键作用^[14]。研究表明,IL-33可由巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、周边血淋巴细胞等产生^[10]。巨噬细胞胞膜表面具有ST2受体,IL-33可能激活巨噬细胞,促进其进一步极化分型。其选择性活化M2型巨噬细胞通过多种Th2细胞因子如白细胞介素-4、白细胞介素-10及免疫复合物活化,抑制炎症反应的发生,促进组织修复的进行。M2型能有效抑制M1型反应,大量的白细胞介素-10和转化生长因子- β 的分泌能够有效的介导免疫抑制^[8]。同时,M2型细胞还能促进成纤维细胞的增殖和胶原分泌活性,促进内皮细胞的血管生成过程^[9]。本研究结果显示,IL-33、CD14表达阳性的巨噬细胞在

正常根尖组织、慢性根尖周炎组织、根尖囊肿组织中依次增加;IL-33、CD14阳性巨噬细胞如何参与根尖周病的免疫调控机制尚不清楚,需进一步探究。

参考文献

- [1] Baba S, Kondo K, Kanaya K, et al. Expression of IL-33 and its receptor ST2 in chronic rhinosinusitis with nasal polyps[J]. *Laryngoscope*, 2014, 124(4): e115-e122.
- [2] Molofsky AB, Savage AK, Locksley RM. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury, and inflammation[J]. *Immunity*, 2015, 42(6): 1005-1019.
- [3] Cayrol C, Girard JP. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy[J]. *Curr Opin Immunol*, 2014, 31: 31-37.
- [4] Velickovic M, Pejnovic N, Petrovic R, et al. Expression of interleukin-33 and its receptor ST2 in periapical granulomas and radicular cysts[J]. *J Oral Pathol Med*, 2016, 45(1): 70-76.
- [5] Romano F, Graziano A, Spina A, et al. Increased early inflammatory response and osteoclastic activity in gingival tissues following conventional osseous resective surgery compared with the fibre retention technique: a pilot study[J]. *J Periodontol Res*, 2017, 52(3): 368-376.
- [6] Li J, Wang R, Huang SG. Immunomodulatory activity of interleukin-27 in human chronic periapical diseases[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(3): 1460-1470.
- [7] Shen S, Wang R, Huang SG. Expression of the stem cell factor in fibroblasts, endothelial cells, and macrophages in periapical tissues in human chronic periapical diseases[J]. *Genet Mol Res*, 2017, 16(1). Doi: 10.4238/gmr16019394.
- [8] Liang ZZ, Li J, Huang SG. Transforming growth factor beta-1 expression in macrophages of human chronic periapical diseases[J]. *Genet Mol Res*, 2017, 16(1). Doi: 10.4238/gmr16019329.
- [9] Xu DM, Jiang HR, Kewin P, et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(31): 10913-10918.
- [10] Joshi AD, Oak SR, Hartigan AJ, et al. Interleukin-33 contributes to both M1 and M2 chemokine marker expression in human macrophages[J]. *BMC Immunol*, 2010, 11(10): 52-55.
- [11] Dougall WC. Molecular pathways: osteoclast-dependent and osteoclast-independent roles of the RANKL/RANK/OPG pathway in tumorigenesis and metastasis[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(2): 326-335.
- [12] Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study[J]. *Int Endod J*, 2003, 36(7): 464-471.
- [13] Bracks IV, Armada L, Goncalves LS. Distribution of mast cells and macrophages and expression of interleukin-6 in periapical cysts[J]. *J Endod*, 2014, 40(1): 63-68.
- [14] Schilling E, Weiss R, Grahner A, et al. Molecular mechanism of LPS-induced TNF-alpha biosynthesis in polarized human macrophages[J]. *Mol Immunol*, 2018, 93: 206-215.

(编辑 张琳,曾曙光)