

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

尼古丁誘發人類牙齦造纖維母細胞經由前列腺素 E2 受體訊息傳遞路徑的探討 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2314-B-040-018-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：中山醫學大學口腔醫學研究所

計畫主持人：張育超

計畫參與人員：碩士級-專任助理：張鈞萍

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96 年 10 月 17 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

(計畫名稱)

尼古丁誘發人類牙齦造纖維母細胞經由前列腺素 E2 受體訊息傳遞路徑的探討

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC - 95 - 2314 - B - 040 - 018

執行期間： 95 年 8 月 1 日至 96 年 7 月 31 日

計畫主持人：張育超

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：

中 華 民 國 96 年 9 月 26 日

英文摘要

Keywords : nicotine 、gingival fibroblasts 、PGE2 receptors

It has long been recognized that there is an association between the use of tobacco and periodontal disease. Nicotine, the most abundant tobacco alkaloid, is considered the most important etiologic factor in cigarette smoking. Recently, our study has shown that nicotine can induce COX-2 mRNA and protein expression in human gingival fibroblasts. As far as we know, little is known about whether chemical interaction can modulate nicotine-induced PGE2 receptors expression. In this study, we will culture human gingival fibroblast cell line HGF-1 to investigate the effect of nicotine by EP1~4 pathways. HGF was found to express EP1, EP2, and EP4. Nicotine was found to elevate EP1 and EP4 in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). Taken together, the activation of EP1/4 expression by nicotine suggests a potential role for nicotine in the pathogenesis of smoking-associated periodontal disease.

中文摘要

關鍵詞：尼古丁、牙齦造纖維母細胞、前列腺素 E2 受體

吸煙被視為造成牙周病的一項危險因子，其會造成牙周囊袋加深、牙周附連喪失、齒槽骨破壞及牙齒搖動增加等症狀。nicotine 是煙草中最主要的生物鹼，其對牙周組織的破壞已被廣泛地研究，但鮮少有研究探討 nicotine 對細胞訊息傳遞的影響，最近吾等發現尼古丁會誘發人類牙齦造纖維母細胞 cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA 與 protein 的表達。前列腺素 (prostaglandin) E2 與發炎和免疫反應過程中扮演相當重要的角色，PGE2 位於細胞膜上的受體皆與 G-protein 結合，分別是 EP1、EP2、EP3、EP4 四種 subtypes，迄今鮮少有研究探討尼古丁與 PGE2 受體的訊息傳遞路徑的影響。所以本研究欲以組織培養法，培養人類牙齦造纖維母細胞來探討尼古丁對 PGE2 的影響。人類牙齦造纖維母細胞會表達 EP1, EP2, and EP4。尼古丁會促進 EP1/4 表達。吸煙被造成牙周組織的影響可能是經由 EP1/4 訊息傳遞路徑。

背景及目的

先前研究曾發現煙草粗萃物可誘發人類角質細胞分泌 PGE2 (Johnson *et al.* 1996)，尼古丁會誘發人類 neutrophils (Seow *et al.* 1994)、monocytes (Payne *et al.* 1996) 表達 PGE2，最近吾等發現尼古丁會誘發人類牙齦造纖維母細胞 COX-2 mRNA 與 protein 的表達，由這結果顯示 COX-2 在與抽煙相關的牙周病扮演著重要的角色。最近吾等亦發現的調控與 oxidative stress、extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) signaling 有關 (Ho *et al.* 2006)，但迄今鮮少有研究探討 COX-2 下游 PGE2 之受體 (receptor) 對細胞訊息傳遞的影響。

PGE2 位於細胞膜上的受體皆與 G-protein 結合，分別是 EP1、EP2、EP3、EP4 四種 subtypes；但所調控的訊息傳遞途徑卻大不相同。活化的 EP1 會透過 inositol lipid breakdown 增加細胞內鈣離子濃度 (Watabe *et al.*, 1993)；EP2 及 EP4 可透過 Gs-protein 活化 adenylyl cyclase，使胞內 cAMP 濃度增加 (Nishigaki *et al.*, 1995；Remier *et al.*, 1992)；EP3 主要經由 Gi-protein 抑制 adenylyl cyclase，降低胞內 cAMP 濃度 (Sugimoto *et al.*, 1992)。

吸煙對於牙周組織造成的損傷，其分子致病機轉迄今仍有待厘清，本研究以人類牙齦造纖維母細胞為研究模型，來探討尼古丁誘發人類牙齦造纖維母細胞 HGF 經由 PGE2 受體訊息傳遞路徑的影響，培養 HGF 加入尼古丁作用後，以 RT-PCR 方法探討，期能找到與 PGE2 受體相關的調控機轉。

方法

細胞之培養

HGF 來自於 crown lengthening，以刀片將牙齦組織切成碎片後，置入含有 10% 胎牛血清及 1% PSN (penicillin, streptomycin, neomycin, GIBCO; Grand Island, NY, USA) 之 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO; Grand Island, NY, USA) 培養液中，置入 37°C 自動恆溫培養箱中培養。約在 5-7 天後可見到造細胞從組織塊中長出來，待細胞長滿後再做繼代培養。而實驗所用之細胞代數介於第 3 代到第 8 代間。

測試藥物之製備

將 nicotine 溶入不含血清之培養液中，製備成 0-20 mM 之測試劑量。

細胞萃取製備

取 1×10^5 個細胞懸浮液，植入直徑 60 mm 之塑膠培養皿中，置入 37°C 之恆溫培養箱中培養至 cell confluent，將舊培養液吸去，以 PBS 洗滌兩次後，重新加入培養液培養，於 24 小時後取 100 μ l 培養液儲存於 -70°C 冰箱。

RNA 萃取

利用 TRIzol 萃取細胞內 RNA 置入 1.5 ml 離心管，混合均勻後在冰上靜置，再拿起來混合，重複冰上靜置及混合，再放到冰上靜置 5 分鐘後，離心 (12,000g, 2 分鐘)，取離心管的上層 (RNA 及水層) 到新的離心管，並加入等體積的 chloroform-phenol 混合液混合均勻，再離心 (12,000g, 2 分鐘)，吸取上層液到新的離心管，再加入等體積的 chloroform-phenol 混合液混合均勻，重複此步驟直到水層中看不見白色蛋白質沉澱後，把水層吸到新的離心管並加入等體積的 isopropanol，混合均勻後放到 -20°C 冰箱靜置，直到要使用時再拿去離心 (12,000g, 4°C, 30 分鐘)，此時 RNA 會形成一白色沉澱，將 isopropanol 倒掉後，以 75% ethanol wash 之後，將 75% ethanol 倒掉並吸乾，加入適量的 DEPC-H₂O 溶解 RNA，測量其 260 nm 吸光值並計算 RNA 濃度。

逆反轉聚合鏈反應

取 2 μ g 的 RNA，加入適量的 DEPC-H₂O 後到 33 μ l，以 70 °C 處理 5 分鐘。再加入 RNase inhibitor (40 U/ μ l) 0.25 μ l，再加入 5 倍 RT buffer 10 μ l 及 dNTP (2.5 mM) 4 μ l，和 Oligo dT 1 μ l (50 pmole/ μ l) 及 RTase 1 μ l (200 U/ μ l)，在 42°C 反應 1 小時之後，改以 99°C 作用 5 分鐘後保存在 4°C。PCR (polymerase chain reaction)：取 5 μ l cDNA 加入適量的 DEPC-H₂O 至 26 μ l，加入 primer-5' 和 primer-3' 各 5 μ l，加入 3.2 μ l dNTP (2.5 mM) 及 5 μ l 10 倍 PCR buffer 最後再加入 DNA polymerase 1 μ l (2 U/ μ l)，置於溫度循環機 94°C 1 分鐘之後，annealing 溫度 1 分鐘，72°C 2 分鐘共 30 個循環，最後再以 72°C 反應 20 分鐘，並於 4°C 保存。而各個基因的 PCR primers 序列如下：

Gene

Sequence

GAPDH sense: TCCTCTGACTTCAACAGCGACACC

anti-sense: TCTCTCTTCCTCTTGTGCTCTTGG

EP1 sense: TCTACCTCCCTGCAGCGGCCACTG

anti-sense: GAAGTGGCTGAGGCCGCTGTGCCGGGA

EP2 sense: TTCATCCGGCACGGGCGGACCCG

anti-sense: GTCAGCCTGTTTACTGGCATCTG

EP3 sense: GAGCACTGCAAGACACACACGGAG

anti-sense: GATCTCCCATGGGTATTACTGACAA

EP4 sense: CCTCCTGAGAAAGACAGTGTC

anti-sense: AGGACTCAGAGAGTGTCTT

配置 DNA gel，取 10 μ l 的 PCR 產物加上 2 μ l 的 6 倍 loading dye，加到 DNA gel。於

電壓 100V，進行電泳 45 分鐘之後，以 1 $\mu\text{g/ml}$ Ethidium bromide 染色，再以 ddH₂O 退染，於 UV 燈下分析記錄之。

結果

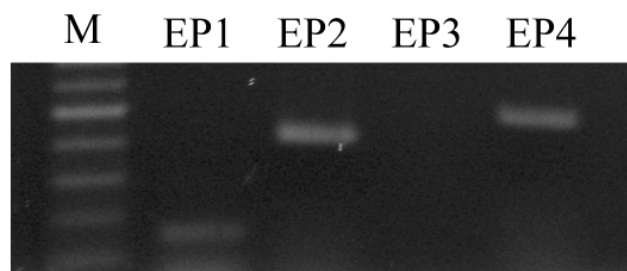


Fig. 1 EP1, EP 2, and EP 4 were found to be expressed in HGFs.

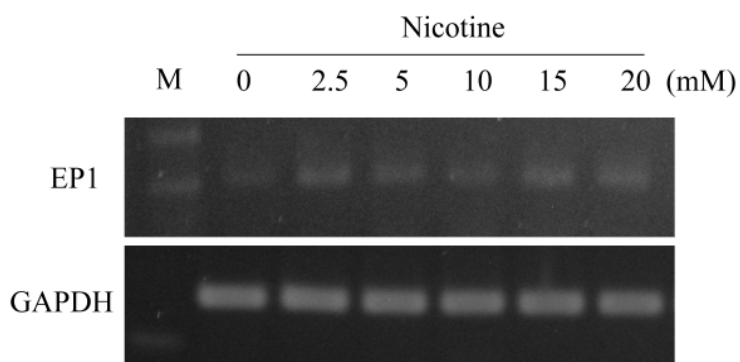


Fig. 2 Nicotine was found to elevate EP1 in HGF cultures ($p < 0.05$).

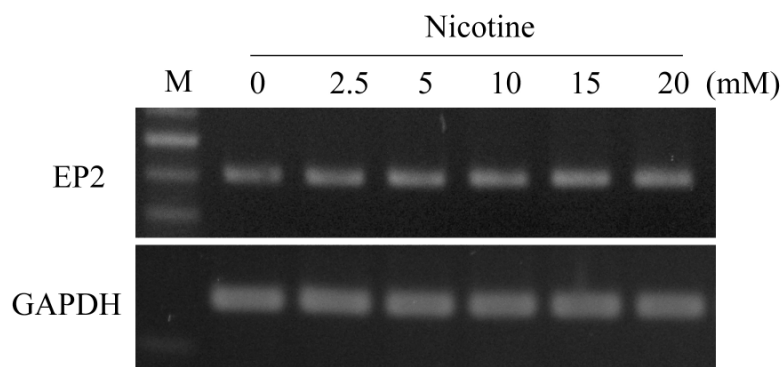


Fig. 3 There was no differences in nicotine-induced EP2 in HGF cultures ($p > 0.05$).

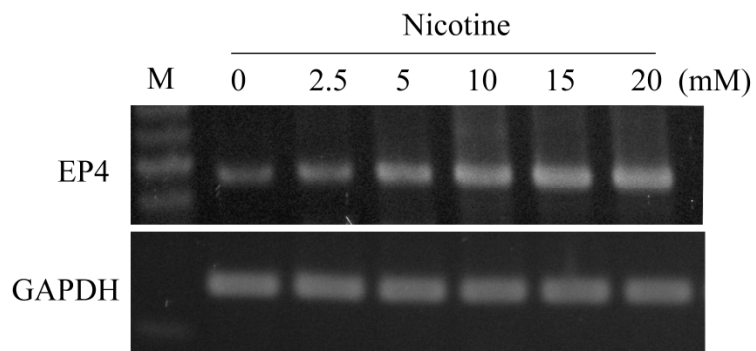


Fig. 4 Nicotine was found to elevate EP4 in HGF cultures ($p < 0.05$).

參考文獻

- Chang YC, Lii CK, Tai KW, Chou MY (2001). Adverse effects of arecoline and nicotine on human periodontal ligament fibroblasts *in vitro*. *J Clin Periodontol* 28: 277-282.
- Chang YC, Huang FM, Tai KW, Yang LC, Chou MY (2002). Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures *in vitro*. *J Periodont Res* 2002; 37: 279-285.
- Chang YC, Hsieh YS, Lii CK, Huang FM, Tai KW, Chou MY (2003a). Induction of *c-fos* expression by nicotine in human periodontal ligament fibroblasts is related to cellular thiol levels. *J Periodont Res* 2003; 38: 44-50.
- Chang YC, Tsai CH, Yang SH, Liu CM, Yang LC, Chou MY (2003b). Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression in human gingival fibroblasts stimulated with nicotine. *J Periodont Res* 38: 496-501.
- Chang YC, Lai CC, Lin LF, Ni WF, Tsai CH (2005). The upregulation of heme oxygenase-1 expression in human gingival fibroblasts stimulated with nicotine. *J Periodont Res* 40: 252-257.
- Ho YC, Chang YC. Regulation of nicotine-induced cyclooxygenase-2 protein expression in human gingival fibroblasts. *Acta Pharmaco Sin* 2006; 27: 409-413.
- Johnson GK, Poore TK, Payne JB, Organ CC. Effect of smokeless tobacco extract on human gingival keratinocyte levels of prostaglandin E₂ and Interleukin-1. *J Periodontol* 1996; 67: 116-124.
- Payne JB, Johnson GK, Reinhardt RA, Dyer JK, Maze CA, Dunning DG. Nicotine effects on PGE₂ and IL-1 β release by LPS-treated human monocytes. *J Periodont Res* 1996; 31: 99-104.
- Seow WK, Thong YH, Nelson RD, MacFarlane GD, Herzberg MC. Nicotine-induced release of elastase and eicosanoids by human neutrophils. *Inflammation* 1994; 18: 119-127.

出席國際學術會議心得報告

| | |
|-------------------|--|
| 計畫編號 | NSC 95-2314-B-040-018 |
| 計畫名稱 | 尼古丁誘發人類牙齦造纖維母細胞經由前列腺素E2受體訊息傳遞路徑的探討 |
| 出國人員姓名 服務機關及職稱 | 張育超 中山醫學大學口腔醫學研究所教授 |
| 會議時間地點 | March 21-24, 2007, New Orleans, LA, USA |
| 會議名稱 | 85th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research |
| 發表論文題目 | Increased cystatin C expression in gingival fibroblasts by cyclosporin A. |

一、參加會議經過

今年的國際牙醫研究學會年會於紐奧良舉行，本屆年會盛況空前，其論文發表形式分為 oral presentation、poster presentation、poster discussion 三種。筆者今年報告的論文題目為“Increased cystatin C expression in gingival fibroblasts by cyclosporin A”屬於牙周病學組。

Objectives: Cystatin C is a 13 kDa non-glycosylated basic protein belonging to cystatin family. It is consistently and dramatically upregulated in a variety of fibrotic diseases. However, there is little known about the correlation between cystatin C and Cyclosporin A (CsA)-induced gingival overgrowth. The aim of this study was to investigate the effects of CsA on the expression of cystatin C in human gingival fibroblasts (HGFs) *in vitro* and further to compare cystatin C expression in normal healthy gingival tissues and CsA-induced gingival overgrowth specimens *in vivo*. **Methods:** Ten CsA-induced gingival overgrowth specimens and five normal gingival tissues were examined by immunohistochemistry. The reverse-transcriptase polymerase chain reaction was used to investigate the effects on HGFs exposed to cyclosporin A. In addition, predominant periodontal pathogens (*Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*) and proinflammatory cytokines (interlukin-1 α and tumor necrosis factor- α) were added to seek the possible regulatory mechanisms of cystatin C expression. **Results:** The cystatin C staining in gingival tissue was stronger in CsA-induced gingival overgrowth group than normal gingival group (p<0.05). Intensive staining for cystatin C expression was observed mainly in the cytoplasm of

fibroblasts, endothelial cells, and inflammatory cells. In addition, CsA was found to increase cystatin C expression in HGFs in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). The additions of periodontal pathogen and proinflammatory cytokines significantly upregulated the expression of cystatin C as compared with additions of CsA alone ($p < 0.05$). **Conclusions:** These results suggest that cystatin C expression is significantly upregulated in CsA-induced gingival overgrowth specimens and CsA may be responsible for the enhanced cystatin C expression *in vivo*. Under inflammatory condition, the expression cystatin C can be significantly enhanced. This study was supported by NSC 95-2314-B-040-018.

二、與會心得

本次盛會收穫良多，吸取了許多寶貴的經驗及目前研究的新方向，對於往後的研究裨益良多，再此亦非常感激國科會予以經費補助參與此次國際牙醫研究學會年會。國際牙醫研究學會已受到政治的藉入，臺灣無法自己成立單獨的 division，目前歸在 South-East Asian Division，而中共加入即自成 China Division，政府應正視此一現象。