牙龈卟啉单胞菌重组牙龈蛋白酶刺激牙龈成纤维细胞内钙离子浓度变化及其机制

张迪亚¹, 卢可心², 李盛来³, 吴燕岷²

1. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院牙科, 浙江 杭州 310016
2. 浙江大学医学院附属第二医院牙周病专科, 浙江 杭州 310009
3. 浙江大学医学院附属口腔医院口腔外科, 浙江 杭州 310006

[摘要] 目的:探讨牙龈卟啉单胞菌重组牙龈蛋白酶(rRgpB)刺激蛋白酶激活受体(PAR)介导的人牙龈成纤维细胞(HGF)内钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)的动态变化及细胞内信号转导通路。方法:流式细胞术检测HGF表达的PAR类型,CCK-8法检测细胞增殖,以牙龈卟啉单胞菌rRgpB作用于HGF,激光共聚焦显微镜观察HGF内 $[Ca^{2+}]_i$ 的动态变化及PAR-1拮抗剂的阻断作用;蛋白质印迹法检测HGF内c-Jun氨基末端激酶(JNK)、胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)、p38丝裂原激活的蛋白激酶(p38 MAPK)、p65蛋白水平的变化。结果:HGF表达PAR-1和PAR-3,且rRgpB可促进HGF生长。细胞受到rRgpB作用后能激发瞬时增强的 $[Ca^{2+}]_i$ 荧光信号,并且这种作用能够被PAR-1拮抗剂完全阻断;与空白对照组比较,rRgpB诱导细胞6、12 h后,JNK、ERK1/2、p65磷酸化蛋白表达均显著上调(均 $P<0.05$),但p38 MAPK磷酸化蛋白水平未见明显变化($P>0.05$);PAR-1拮抗剂成功抑制了rRgpB诱导的JNK、ERK1/2、p65磷酸化蛋白表达的上调。结论:rRgpB通过PAR-1诱导HGF内 $[Ca^{2+}]_i$ 增加,并激活细胞内JNK、ERK1/2、核因子 κ B信号通路。

[关键词] 牙龈蛋白酶;人牙龈成纤维细胞;蛋白酶激活受体;钙离子;信号通路

[中图分类号] R781.4 **[文献标志码]** A

Ca²⁺ mobilization and signaling pathways induced by *Porphyromonas gingivalis* rRgpB in human gingival fibroblast

ZHANG Diya¹, LU Kexin², LI Shenglai³, WU Yanmin² (1. Dental Department, Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310016, China; 2. Department of Periodontology, the Second Affiliated Hospital, Zhejiang University

收稿日期:2021-01-14 接受日期:2021-03-16

基金项目:浙江省自然科学基金(LY17H140002);浙江省新一轮卫生高层次人才培养工程

第一作者:张迪亚,副主任医师,主要从事牙周炎和种植体周围炎发病机制和治疗研究;E-mail:zhangdiya@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0003-4471-9669>。卢可心,硕士研究生,主要从事牙周炎和种植体周围炎发病机制和治疗研究;E-mail:3130102947@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0002-0924-9713>

通信作者:吴燕岷,主任医师,硕士生导师,主要从事牙周炎和种植体周围炎发病机制和治疗研究;E-mail:wuyanmin@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0002-6660-4873>

School of Medicine, Hangzhou 310009, China; 3. Oral Surgery, Stomatology Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310006, China)

ZHANG Diya and LU Kexin contributed equally to this article.

Corresponding author: WU Yanmin, E-mail: wuyanmin@zju.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0002-6660-4873>

[**Abstract**] **Objective:** To assess the *Porphyromonas gingivalis* (Pg) recombinant gingipain R2 (rRgpB)-induced Ca^{2+} mobilization in human gingival fibroblast (HGF) mediated by protease-activated receptor (PAR) and its downstream signal transduction pathways. **Methods:** Flow cytometry was used to detect the expression of PAR in HGF. The proliferation of HGF was measured by CCK-8. The dynamic changes of intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in HGF induced by rRgpB and the blocking effect of PAR-1 antagonist were observed by laser confocal microscopy. Western blot was performed to determine the phosphorylation levels of c-Jun N-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and p65 in HGF. **Results:** PAR-1 and PAR-3 were expressed in HGF, and the rRgpB could promote the proliferation of HGF. rRgpB caused a transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, which could be completely suppressed by vorapaxar, a PAR-1 antagonist. The phosphorylation levels of JNK, ERK1/2 and p65 were significantly up-regulated after the induction of rRgpB for 6 h and 12 h (all $P < 0.05$), which was completely inhibited by vorapaxar. However, the phosphorylation level of p38 MAPK had no significant change after rRgpB stimulation. **Conclusions:** rRgpB causes an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in HGF mediated by PAR-1. JNK, ERK1/2 and nuclear factor- κB may be involved in intracellular signal transduction after PAR-1 activation.

[**Key words**] Gingipains; Human gingival fibroblasts; Protease-activated receptor; Calciumion; Signaling pathways

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2021, 50(2): 171-178.]

[**缩略语**] 蛋白酶激活受体(protease-activated receptor, PAR);人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblast, HGF);细胞内钙离子浓度(intracellular Ca^{2+} concentration, $[\text{Ca}^{2+}]_i$);重组牙龈蛋白酶 R2(recombinant gingivalis gingipain R2, rRgpB);达尔伯克改良伊格尔(dulbecco's modified eagle medium, DMEM);藻红蛋白(phycoerythrin, PE);细胞计数试剂盒(cell counting kit, CCK);磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS);Hanks 缓冲液(Hanks' balanced salt solution, HBSS);N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸[4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-erhanesulfonic acid, HEPES];p38 丝裂原激活的蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK);c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK);胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH);SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE);核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB)

牙龈卟啉单胞菌是一种革兰阴性厌氧菌,存在于龈下菌斑中,是慢性牙周炎的主要致病菌^[1-2]。

牙龈蛋白酶存在于牙龈卟啉单胞菌外膜、膜泡或细胞外,与牙周疾病密切相关,是重要的毒力因子

之一^[3]。在细胞膜上牙龈蛋白酶通过切割 PAR 氨基末端结构域而激活该受体^[4]。PAR 是一组广泛存在于全身各种细胞中、具有七个跨膜单位的 G 蛋白偶联受体。PAR 有四个成员:PAR-1、PAR-2、PAR-3 和 PAR-4^[5]。HGF 是牙龈结缔组织的主要细胞成分,在牙周炎中发挥重要作用。研究发现,HGF 表达 PAR-1 和 PAR-3^[6-9]。PAR-3 本身可能无法介导跨膜信号^[6,10],而 PAR-1 作为 G 蛋白偶联受体家族第一个被发现的成员,不仅在多个系统的多种细胞中存在(包括牙周组织),并且能被多种蛋白酶激活,在疾病的发生发展中发挥重要作用,成为神经退行性疾病、肿瘤和心血管疾病和炎症等多种疾病潜在的治疗靶点^[11-12]。因此,PAR-1 可能在牙龈蛋白酶诱导的牙周炎中发挥重要作用,但具体机制尚未明确。

钙离子广泛存在于细胞内、外液,是重要的第二信使,具有重要的生理功能,在细胞增殖、生长、凋亡和炎症中起作用。目前关于 PAR-1 在牙周炎中的作用尚未明确。研究发现,凝血酶能够激活 HGF 的 PAR-1 和增加 $[Ca^{2+}]_i$,并促进 HGF 增殖^[6],且 PAR-1 可通过 $G_{q/11}$ 介导的信号机制引起钙离子动员^[6,13]。本研究拟探索 rRgpB 对 HGF 的作用及能否激活 PAR-1,以凝血酶为阳性对照,检测了 HGF 的生长及细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化,并采用 PAR-1 特异性阻断剂进行阻断实验,初步探讨细胞内的信号通路。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 培养基、胎牛血清为美国 Gibco 公司产品;PAR-1 PE 抗体、PAR-2 PE 抗体、PAR-3 PE 抗体、PAR-4 PE 抗体为美国 Santa Cruz 公司产品;CCK-8、乙二胺四乙酸为大连美仑生物技术有限公司产品;Fluo-4AM、Pluronic F-127 为美国 Invitrogen 公司产品;PBS、HBSS、HEPES 液为浙江吉诺生物医药技术有限公司产品;rRgpB 为英国 Biorbyt 公司产品;牛血清白蛋白、凝血酶为美国 Sigma 公司产品;p38 MAPK 抗体(1:1000)、磷酸化 p38 MAPK 抗体(1:1000)为美国 CST 公司产品;JNK 抗体(1:2000)、磷酸化 JNK 抗体(1:2000)、ERK1/2 抗体(1:2000)、磷酸化 ERK1/2 抗体(1:2000)为英国 Abcam 公司产品;p65 抗体(1:2000)、磷酸化 p65 抗体(1:1000)、GAPDH 抗体(1:25000)、

山羊抗小鼠免疫球蛋白 G(1:3000)、山羊抗兔免疫球蛋白 G(1:3000)、放射免疫沉淀法裂解液、磷酸酶抑制剂、苯甲基磺酰氟、5×蛋白上样缓冲液、BCA 蛋白定量检测试剂盒、增强化学发光试剂盒为武汉塞维尔生物科技有限公司产品;沃拉帕沙(vorapaxar)为中国 MedChemExpress 公司产品。

1.2 流式细胞术检测 PAR 的表达

HGF 原代培养及鉴定同文献^[9]。以下实验均选取第 4~6 代 HGF。先用含 0.2% 乙二胺四乙酸的 PBS 消化后收集约 2.5×10^5 个生长良好的细胞,接着用 100 μ L 含 0.5% 牛血清白蛋白的 PBS 重悬细胞,室温封闭 10 min,然后直接加入 5 μ L 相应的抗体吹打混匀后在冰上孵育 15 min。结束后每管直接加入 1 mL 的 PBS 洗涤细胞,800×g 离心 5 min,弃上清液,最后用 500 μ L 的 PBS 重悬细胞,采用流式细胞仪检测 PAR 水平。

1.3 CCK-8 法检测细胞增殖

将细胞消化后制备成细胞悬液,调整细胞浓度为 1.5×10^4 个/mL,每孔 1 mL 接种至 12 孔细胞培养板后置于细胞培养箱中过夜至细胞完全贴壁。弃原培养基,用 PBS 洗涤 3 次,每孔加入含药物和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 1 mL,于细胞培养箱中继续培养。rRgpB 组加入终浓度为 5 mg/L 的 rRgpB,凝血酶组加入终浓度为 2 U/mL 的凝血酶,空白对照组加等量的 PBS。分别于加药培养 1、3、5、7 d 后用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖。根据说明书,先用 PBS 洗涤 3 次,然后每孔更换成含 10% CCK-8 的 DMEM 培养基 1 mL,37 °C 恒温箱中孵育 1 h,收集细胞上清液,再按每孔 200 μ L 加入 96 孔细胞培养板,每个样本均设置 3 个复孔,最后用酶联免疫自动检测仪于 450 nm 波长下检测吸光度。

1.4 激光共聚焦显微镜检测 $[Ca^{2+}]_i$

取对数生长期的细胞,消化后制备细胞悬液,调整细胞浓度为 1.0×10^5 个/mL,每孔 2 mL 接种至 35 mm 激光共聚焦培养皿,置于细胞培养箱中过夜至细胞完全贴壁并汇合生长。弃去原培养基,先用 HBSS-H(含 20 mmol/L HEPES-氢氧化钠)溶液洗涤细胞 3 次,然后加入含 4 μ mol/L Fluo-4AM 和 0.02% Pluronic F-127 的 HBSS-H 溶液,于 37 °C 恒温箱中孵育 25 min。接着用 HBSS-H 洗涤 2 次,加入 HBSS-H 继续室温孵育 30 min。rRgpB 组加入

终浓度为5 mg/L的rRgpB;凝血酶组加入终浓度为2 U/mL的凝血酶;rRgpB+沃拉帕沙组先加入终浓度为2 $\mu\text{mol/L}$ 的PAR-1特异性拮抗剂沃拉帕沙,10 min后再加入终浓度为5 mg/L的rRgpB;空白对照组加等量的HBSS-H。通过激光共聚焦显微镜记录加药前后 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 荧光强度的动态变化。

1.5 蛋白质印迹法检测细胞内炎症信号通路

将细胞消化制成细胞悬液,调整细胞浓度为 1.0×10^5 个/mL,每孔2 mL接种至6孔细胞培养板,置于细胞培养箱中过夜至细胞完全贴壁。弃去原培养基,用PBS洗3次,加入含药物和2%胎牛血清的DMEM培养基。加药后置于细胞培养箱中培养6 h和12 h。用含磷酸酶抑制剂和终浓度为1 mmol/L苯甲基磺酰氟的放射免疫沉淀法裂解液处理细胞后收集上清液,使用BCA试剂盒测定蛋白浓度。蛋白溶液按照4:1的比例加入5 $\times$ 蛋白上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 高温变性15 min。12% SDS-PAGE分离蛋白和转膜,5%脱脂牛奶室温下封闭1 h,随后加入相应的一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗膜3次,加入相应辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育30 min,再次洗膜3次。采用增强化学发光试剂盒显影。使用PhotoShop整理去色,Image Lab分析条带灰度。

1.6 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析。计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,组间比较采用两独立样本 t 检验,以双侧 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PAR在HGF表面的表达

流式细胞检测结果显示,HGF表达PAR-1和PAR-3蛋白,但不表达PAR-2和PAR-4蛋白(图1)。

2.2 rRgpB对HGF增殖的影响

rRgpB组、凝血酶组和空白对照组的吸光度值随加药时间延长均呈现增加趋势,并在加药5 d时达到顶峰,随后出现下降趋势。其中rRgpB组在加药5 d和7 d时的吸光度值分别为 2.242 ± 0.157 和 1.997 ± 0.201 ,较空白对照组(1.676 ± 0.103 和 1.511 ± 0.214)均增加(均 $P < 0.01$,图2)。结果提示,rRgpB可以促进HGF增殖。

图1 蛋白酶激活受体(PAR)在人牙龈成纤维细胞表面的表达结果

Figure 1 Expression of protease-activated receptors (PAR) on the surfaces of human gingival fibroblast

与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图2 重组牙龈蛋白酶R2(rRgpB)对人牙龈成纤维细胞增殖的影响

Figure 2 Effects of recombinant gingivalis gingipain R2 (rRgpB) on the proliferation of human gingival fibroblast

2.3 rRgpB激活PAR介导的细胞内钙信号

激光共聚焦显微镜下观察,HGF在rRgpB和凝血酶的刺激下 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 荧光信号水平瞬时升高,而沃拉帕沙基本阻断了rRgpB激发的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 荧光信号(图3、图4)。结果提示,rRgpB激活HGF内钙离子信号通路主要由PAR-1介导。

2.4 rRgpB对PAR介导的细胞内信号通路的激活

蛋白质印迹实验结果显示,rRgpB作用6、12 h后,HGF中磷酸化JNK、磷酸化ERK1/2、

空白对照组细胞内钙离子荧光(绿色荧光)信号较弱,凝血酶组和 rRgpB 组细胞内钙离子荧光信号较强, rRgpB + 沃拉帕沙组钙离子荧光信号强度与空白对照组相近. 标尺=20 μm . rRgpB: 重组牙龈蛋白酶R2.

图 3 各组人牙龈成纤维细胞内钙离子荧光图

Figure 3 Fluorescence images of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in human gingival fibroblasts in each group

rRgpB: 重组牙龈蛋白酶R2.

图 4 各组人牙龈成纤维细胞内钙离子荧光强度变化曲线

Figure 4 Changes in fluorescence intensity of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in human gingival fibroblasts in each group

磷酸化 p65 水平升高,与空白对照组差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),而磷酸化 p38 MAPK 的表达与空白对照组差异无统计学意义($P>0.05$),见图 5。用 rRgpB 刺激 PAR-1 拮抗剂预处理的细胞,可见 PAR-1 拮抗剂可抑制 rRgpB 作用 6 h 的磷酸化 JNK、磷酸化 ERK1/2、磷酸化 p65 的蛋白表达上调(图 6)。上述结果提示, rRgpB 能激活 HGF 内的 JNK、ERK1/2、NF- κ B 信号通路,而不激活 p38 MAPK 信号通路,且 rRgpB 诱导 HGF 内的信号通路主要由 PAR-1 介导。

3 讨论

牙龈卟啉单胞菌是目前公认的慢性牙周炎最重要的致病菌,依靠牙龈蛋白酶、脂多糖、菌毛等毒力因子作用于牙周组织导致牙周膜破坏和牙槽骨吸收。牙龈蛋白酶一方面具有蛋白水解活性,通过精氨酸或赖氨酸残基的羧基末端切割多肽,降解细胞外基质蛋白、细胞因子、免疫球蛋白、补体因子、抗菌肽、T 细胞受体、血红蛋白等;另一方面又可通过干扰宿主细胞信号传导和参与炎症介质的调节,直接或间接地引起牙周组织破坏,提供营养

图5 重组牙龈蛋白酶R2(rRgpB)刺激人牙龈成纤维细胞内信号通路相关蛋白表达的变化

Figure 5 Expression of intracellular signal pathway in human gingival fibroblast induced by recombinant gingipain R2 (rRgpB)

并保护牙龈卟啉单胞菌逃避宿主的防御^[3,14]。牙龈蛋白酶通过PAR启动宿主细胞炎症和免疫反应信号转导通路。PAR是G蛋白偶联受体大家族,目前发现的PAR成员共有4个,其中PAR-1、PAR-3和PAR-4为凝血酶受体,PAR-2为胰酶受体^[5]。我们前期研究表明,HGF表达PAR-1和PAR-3,rRgpB刺激HGF后上调白介素-6水平^[9]。本研究中,流式细胞术进一步证实了PAR-1和PAR-3在HGF上的表达。PAR-1作为该家族第一个被发现的成员,表达于人体多种细胞体系中,在循环系统、神经系统和消化系统中均有分布,并在血栓、炎症、癌症的发生、发展中发挥着重要的作用^[11-12]。而已有研究表明PAR-3本身可能无法

与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与rRgpB+沃拉帕沙组比较,** $P < 0.05$ 。JNK:c-Jun氨基末端激酶;ERK:胞外信号调节激酶;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图6 沃拉帕沙对重组牙龈蛋白酶R2(rRgpB)作用下人牙龈成纤维细胞内信号通路相关蛋白表达的影响

Figure 6 Effects of vorapaxar on the expression of intracellular signal pathway in human gingival fibroblast induced by recombinant gingipain R2 (rRgpB)

介导跨膜信号^[6,10]。因此,我们认为PAR-1可能在rRgpB诱导的HGF细胞内信号通路中发挥重要作用。

钙离子是细胞信号传导中重要的第二信使,在接收到由病原体激活PAR启动信号后可进一步传递信号,介导炎症反应、血小板活化、中性粒细胞脱颗粒和凋亡等活动^[15]。维持 $[Ca^{2+}]_i$ 的稳定对于某些细胞功能包括细胞生长、基因表达和蛋白质合成是非常重要的。在牙周袋中发现激活PAR的主要蛋白酶有中性粒细胞蛋白酶3、凝血酶、肥大细胞类胰蛋白酶和来自牙龈卟啉单胞菌的蛋白酶^[16]。研究发现牙龈蛋白酶通过PAR激活引起血小板聚集^[17-18],并通过激活PAR-1和PAR-2诱导人口腔上皮癌细胞KB细胞分泌IL-6^[19]。血小板上的PAR受牙龈卟啉单胞菌诱导后激活细胞内部磷脂酶C信号传导,随后上调 $[Ca^{2+}]_i$ 以及活化蛋白激酶C^[17]。此外,中性粒细

胞作为先天免疫的前哨细胞,接触牙龈卟啉单胞菌后上调 $[Ca^{2+}]_i$,激活细胞内p38 MAPK和蛋白激酶C信号通路传递PAR-2信号^[20]。也有研究发现,PAR-1激活的钙信号参与牙周炎的修复过程,通过失活NF- κ B,抑制炎症性破骨细胞生成,从而减轻脂多糖诱导的牙周炎症反应^[21]。因此, $[Ca^{2+}]_i$ 上调是PAR激活的标志,并可参与牙周炎中某些炎症信号通路的激活。本研究发现rRgpB能够促进HGF增殖和HGF内 $[Ca^{2+}]_i$ 增加,并且这个过程可被PAR-1拮抗剂完全阻断,说明rRgpB激活HGF内 $[Ca^{2+}]_i$ 信号通路是通过PAR-1介导的。

PAR激活后与G蛋白偶联,激发下游的系列信号通路,启动相关炎症免疫反应调控^[16,20,22]。蛋白质印迹法结果显示,rRgpB作用于HGF后,JNK、ERK1/2、p65磷酸化蛋白水平升高,而p38 MAPK磷酸化蛋白水平无明显变化,并且PAR-1拮抗剂完全抑制了rRgpB的诱导作用。因此,JNK、ERK1/2、NF- κ B参与了rRgpB诱导HGF内信号通路,而p38 MAPK通路似乎不参与这个过程,且该过程由PAR-1介导。有学者发现PAR-1激动剂激活JNK信号通路可诱导HGF合成结缔组织生长因子,在伤口愈合过程中发挥了重要作用^[23]。JNK和NF- κ B信号通路在肥大细胞中受蛋白酶K刺激后参与IL-33的产生,IL-33作用于牙龈上皮细胞可导致上皮屏障的破坏^[24]。有研究发现牙龈卟啉单胞菌会上调牙龈上皮细胞p38 MAPK和JNK磷酸化水平,但对ERK的磷酸化水平似乎不影响。Jayaprakash等^[25]证实PAR激活启动蛋白激酶C、p38 MAPK、ERK和NF- κ B信号通路共同参与牙龈卟啉单胞菌诱导的人髓系白血病单核细胞中白介素-1 β 和趋化因子CXC亚家族配体8的释放。一项最新研究发现,ERK1/2信号通路参与小鼠胶质细胞的PAR-2激活后的信号转导,促进细胞迁移和炎症反应^[26]。不同的微生物病原体感染不同的宿主细胞可能诱导不同的信号通路,从而导致多种宿主反应。

上述研究结果表明,rRgpB能够促进HGF的生长,rRgpB通过PAR-1诱导HGF内 $[Ca^{2+}]_i$ 增加,并激活细胞内JNK、ERK1/2、NF- κ B信号通路。本研究在分子和细胞水平上分析了牙周关键细菌毒力因子与宿主细胞之间的相互作用,阐明了rRgpB通过PAR-1与宿主细胞相互作用的独特机

制。在后续研究中,我们将研究PAR-1介导的钙离子动员及细胞内信号通路是否是引起HGF分泌白介素-6产生的关键信号,从而明确牙龈卟啉单胞菌rRgpB激活的PAR-1介导的信号通路在牙周炎发生发展中的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] HAFFAJEE A D, SOCRANSKY S S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases [J]. *Periodontol* 2000, 1994, 5(1): 78-111.
- [2] ZHANG D, CHEN L, LI S, et al. Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1 β , TNF- α and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS [J]. *Innate Immun*, 2008, 14(2): 99-107.
- [3] O-BRIEN-SIMPSON N M, VEITH P D, DASHPER S G, et al. *Porphyromonas gingivalis* gingipains: the molecular teeth of a microbial vampire [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2003, 4(6): 409-426.
- [4] GIACAMAN R A, ASRANI A C, ROSS K F, et al. Cleavage of protease-activated receptors on an immortalized oral epithelial cell line by *Porphyromonas gingivalis* gingipains [J]. *Microbiology*, 2009, 155 (10): 3238-3246.
- [5] OSSOVSKAYA V S, BUNNETT N W. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(2): 579-621.
- [6] TANAKA N, MORITA T, NEZU A, et al. Thrombin-induced Ca^{2+} mobilization in human gingival fibroblasts is mediated by protease-activated receptor-1 (PAR-1) [J]. *Life Sci*, 2003, 73(3): 301-310.
- [7] CHANG M C, CHAN C P, WU H L, et al. Thrombin-stimulated growth, clustering, and collagen lattice contraction of human gingival fibroblasts is associated with its protease activity [J]. *J Periodontol*, 2001, 72(3): 303-313.
- [8] HOU L, RAVENALL S, MACEY M G, et al. Protease-activated receptors and their role in IL-6 and NF-IL-6 expression in human gingival fibroblasts [J]. *J Periodontol Res*, 1998, 33(4): 205-211.
- [9] 张迪亚, 胡玲静, 李盛来, 等. 牙龈成纤维细胞表达蛋白酶激活受体的类型及作用研究 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2014, 49(1): 21-26.
ZHANG Diya, HU Lingjing, LI Shenglai, et al. Expressions of protease-activated receptors in human gingival fibroblasts and its functions in periodontitis [J]. *Chinese Journal of Stomatology*, 2014, 49(1): 21-26. (in Chinese)
- [10] SAMBRANO G R, WEISS E J, ZHENG Y W, et al.

- Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis[J]. **Nature**, 2001, 413(6851): 74-78.
- [11] HUANG P, HE X Y, XU M. Protease-activated receptor 1 inhibitor improves brain edema in rats with intracerebral hemorrhage[J]. **Bratisl Lek Listy**, 2020, 121(8): 600-604.
- [12] SAEED M A, NG G Z, DÄBRITZ J, et al. Protease-activated receptor 1 plays a proinflammatory role in colitis by promoting Th17-related immunity[J]. **Inflamm Bowel Dis**, 2017, 23(4): 593-602.
- [13] OLIANAS M C, DEDONI S, ONALI P. Proteinase-activated receptors 1 and 2 in rat olfactory system: layer-specific regulation of multiple signaling pathways in the main olfactory bulb and induction of neurite retraction in olfactory sensory neurons[J]. **Neuroscience**, 2007, 146(3): 1289-1301.
- [14] IMAMURA T. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease[J]. **J Periodontol**, 2003, 74(1): 111-118.
- [15] HOESCH R E, YIENGER K, WEINREICH D, et al. Coexistence of functional IP₃ and ryanodine receptors in vagal sensory neurons and their activation by ATP [J]. **J NeuroPhysiol**, 2002, 88(3): 1212-1219.
- [16] ROVAI E S, HOLZHAUSEN M. The role of proteinase-activated receptors 1 and 2 in the regulation of periodontal tissue metabolism and disease[J]. **J Immunol Res**, 2017, 2017: 5193572.
- [17] KLARSTRÖM E K, KHALAF H, KÄLVEGREN H, et al. The role of *Porphyromonas gingivalis* gingipains in platelet activation and innate immune modulation[J]. **Mol Oral Microbiol**, 2015, 30(1): 62-73.
- [18] PETZOLD T, THIENEL M, DANNENBERG L, et al. Rivaroxaban reduces arterial thrombosis by inhibition of FXa-driven platelet activation via protease activated receptor-1[J]. **Circ Res**, 2020, 126(4): 486-500.
- [19] LOURBAKOS A, POTEPA J, TRAVIS J, et al. Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion[J]. **Infect Immun**, 2001, 69(8): 5121-5130.
- [20] JAYAPRAKASH K, DEMIREL I, KHALAF H, et al. The role of phagocytosis, oxidative burst and neutrophil extracellular traps in the interaction between neutrophils and the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*[J]. **Mol oral Microbiol**, 2015, 30(5): 361-375.
- [21] KANNO Y, ISHISAKI A, KAWASHITA E, et al. uPA attenuated LPS-induced inflammatory osteoclastogenesis through the plasmin/PAR-1/Ca²⁺/CaMKK/AMPK Axis[J]. **Int J Biol Sci**, 2016, 12(1): 63-71.
- [22] LOURBAKOS A, YUAN Y P, JENKINS A L, et al. Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity[J]. **Blood**, 2001, 97(12): 3790-3797.
- [23] YANG W H, DENG Y T, HSIEH Y P, et al. Thrombin activates latent TGFβ1 via integrin αvβ1 in gingival fibroblasts[J]. **J Dent Res**, 2016, 95(8): 939-945.
- [24] TADA H, NISHIOKA T, TAKASE A, et al. *Porphyromonas gingivalis* induces the production of interleukin-31 by human mast cells, resulting in dysfunction of the gingival epithelial barrier[J/OL]. **Cell MicroBiol**, 2019, 21(3): e12972.
- [25] JAYAPRAKASH K, DEMIREL I, GUNALTAY S, et al. PKC, ERK/p38 MAP kinases and NF-κB targeted signalling play a role in the expression and release of IL-1β and CXCL8 in *Porphyromonas gingivalis*-infected THP1 cells[J]. **APMIS**, 2017, 125(7): 623-633.
- [26] NONAKA S, NAKANISHI H. Secreted gingipains from *Porphyromonas gingivalis* induce microglia migration through endosomal signaling by protease-activated receptor 2[J]. **NeuroChem Int**, 2020, 140: 104840.

[本文编辑 沈 敏 余 方]

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊2021年开始采用中国科技类学术期刊国际传播平台

本刊从2021年第1期开始采用中国科技类学术期刊国际传播平台(SciEngine)进行投审稿和生产运营。该平台建立了符合国际标准的XML结构化数据生产管理系统和网刊发布系统(<http://engine.scichina.com>),实现了与内部投审稿系统和外部国际知名学术平台如Web of Science、PubMed、Crossref、Google Scholar、Altmetric等的无缝对接,可实时快速、优质地出版和准确、及时地推送,实现学术期刊内容的国际传播。作者可以通过访问本刊网站“浙江大学学报医学版”(<https://www.scicloudcenter.com/JZJUMS/login/index>)投稿。