

## 变形链球菌细胞壁对 EAhy926 细胞 TLR4、IL-6 和 IL-8 表达的影响

李琴, 王一松, 郑群, 赵志鹏, 平国玲, 张力平\*

(首都医科大学基础医学院病原生物学系, 北京 100069)

**摘要:**【目的】观察变形链球菌细胞壁对 EAhy926 细胞的增殖活性、TLR4 的表达和炎性细胞因子 IL-6 和 IL-8 分泌的影响, 初步探讨变形链球菌致血管内皮细胞 TLR4 表达、炎症反应及其两者之间的关系。【方法】变形链球菌细胞壁作用于 EAhy926 细胞, MTT 法检测 EAhy926 细胞的增殖活性; RT-PCR 法检测 EAhy926 细胞 TLR4、IL-6 和 IL-8 mRNA 的表达; 流式细胞术检测 EAhy926 细胞表面 TLR4 的表达; 细胞生物活性方法和 ELISA 分别检测 EAhy926 细胞 IL-6 和 IL-8 的分泌; 抗体阻断实验观察 IL-6 和 IL-8 的表达与 TLR4 的关系。【结果】不同浓度的变形链球菌细胞壁作用 6 h 可促进 EAhy926 细胞的增殖 ( $P < 0.05$ ), 但 12 h 后可明显抑制该细胞的生长 ( $P < 0.05$ ), 呈现显著的时间和剂量依赖性。变形链球菌细胞壁作用于 EAhy926 细胞后, TLR4 mRNA 和蛋白水平的表达量随着作用时间延长而逐渐增高, 在 16 h 达到高峰, 24 h 后又逐渐下降 ( $P < 0.01$ ); IL-6 和 IL-8 的表达也呈现明显的时间依赖性增高 ( $P < 0.05$ )。经 TLR4 抗体阻断后, 变形链球菌细胞壁刺激 EAhy926 细胞 IL-6 和 IL-8 的产生明显减少 ( $P < 0.01$ )。【结论】变形链球菌细胞壁可明显抑制 EAhy926 细胞的生长, 上调该细胞 TLR4 的表达, 促进炎性细胞因子 IL-6 和 IL-8 的分泌; IL-6 和 IL-8 的产生与 TLR4 的表达上调密切相关。

**关键词:** 变形链球菌细胞壁; EAhy926 细胞; TLR4; IL-6; IL-8

**中图分类号:** Q935      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 02-0204-07

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是严重危害人类健康的主要疾病之一。流行病学调查和科学实验研究表明, 感染可能触发炎症反应, 是动脉粥样硬化的一个危险因素<sup>[1-2]</sup>。变形链球菌 (*Streptococcus mutans*, *S. mutans*) 是主要的致龋齿的病原菌<sup>[3]</sup>, 在动脉粥样斑块中有着较高的检出率<sup>[4-5]</sup>。但迄今为止, 变形链球菌与动脉粥样硬化发生和发展的关系还不清楚。有研究显示, TLR4 在动脉粥样斑块中表达显著上调, 提示感染性因子可能通过 Toll 样受体 (Toll like receptor, TLRs) 及其信

号传导途径启动固有免疫应答, 激活内皮细胞, 介导动脉粥样硬化的发生<sup>[6-7]</sup>。

本研究观察变形链球菌细胞壁对人血管内皮细胞 (EAhy926 细胞) TLR4 的表达和炎性细胞因子 IL-6 和 IL-8 产生的影响, 以期初步探讨变形链球菌的感染在动脉粥样硬化形成和发展中的作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

MTT 购自 Sigma 公司, DMSO 和 2-巯基乙醇购

**基金项目:** 北京市教育委员会科技发展计划项目 (KM200810025012); 国家科技重大专项课题项目 (2009ZX10004-305); 北京市属市管高等学校人才强教计划资助项目

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-83911688; E-mail: lpzhang@ccmu.edu.cn

**作者简介:** 李琴 (1979-), 女, 内蒙古人, 硕士研究生, 主要从事细菌与宿主细胞相互作用的研究。E-mail: liqinsnow@163.com

**收稿日期:** 2009-09-23; **修回日期:** 2009-11-30

自 MERCK 公司, Trizol 试剂为 BBI 公司产品, rhIL-6 购自 Pepro Tech 公司, 丙酮酸钠购自 Amresco 公司, DMEM 培养基、PRMI1640 培养基、0.25% 胰酶购自 Hyclone 公司, FBS 为杭州四季青公司产品, MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒购自上海生物工程技术有限公司, GoTaq DNA 多聚酶和 dNTP Mix 为 Promega 公司产品, PE 标记的抗人 TLR4 抗体和 PE 标记的鼠 IgG2a 同型对照购自 eBioscience 公司, 抗人 TLR4 抗体及 IgG 同型对照购自 R&D 公司, 人 IL-8 ELISA 试剂盒为武汉博士德公司产品。

## 1.2 变形链球菌培养和细胞壁的制备

变形链球菌(血清 C 型, 由首都医科大学附属北京口腔医院杨圣辉教授惠赠)用 TSBY 培养基常规培养, 待细菌生长至对数生长期, 参见文献[8]制备细胞壁。用无致热源水重悬细胞壁, 分装于 1.5 mL EP 管中, 冷冻真空干燥并称重, 保存于 -20℃ 备用。经鲎试验检测, 制备的细胞壁中内毒素含量小于 0.05 Eu/mL。

## 1.3 变形链球菌细胞壁作用于 EAhy926 细胞

EAhy926 细胞(融合细胞株, 是人脐静脉内皮细胞和人肺腺癌细胞 A549 杂交而成的细胞株, 具有血管内皮细胞的特性<sup>[9]</sup>)由首都医科大学附属北京安贞医院药理研究室金鸣研究员惠赠, 用含 20% FBS 的 DMEM 培养基, 于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下进行培养。将对数生长期 EAhy926 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵育 12 h。每孔分别加入 100 μg/mL 变形链球菌细胞壁, 各设 3 个复孔, 同时设空白对照, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养不同时间。收集细胞上清用于检测细胞因子, 细胞用于分析 TLR4 的表达及 IL-6 和 IL-8 mRNA 水平的变化。

## 1.4 MTT 法检测 EAhy926 细胞的增殖活性

将对数生长期的 EAhy926 细胞( $5 \times 10^4$ /mL)加于 96 孔细胞培养板, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵育 12 h。每组细胞分别加入不同浓度(10 μg/mL, 100 μg/mL, 200 μg/mL)的变形链球菌细胞壁, 各设 3 个复孔, 同时设空白对照组, 于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵育不同时间(6, 12, 24, 48, 72 h)。每孔加入 20 μL MTT (5 mg/mL), 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续孵育 4 h, 2000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 每孔加 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 使颗粒充分溶解, 用酶标仪于 570 nm 波长下测吸光度(OD 值)。

## 1.5 RT-PCR 分析 EAhy926 细胞 TLR4、IL-6 和 IL-8 mRNA 表达水平

采用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 测定总 RNA 浓度及纯度。用 MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA 后进行 PCR。PCR 引物为 GAPDH (sense 5'-CCACCCAGAAGACTGTGGAT-3', anti-sense 5'-AGGTCCACCACTGACACGTT-3', 218 bp); TLR4 (sense 5'-AGAGCCGCTGCTGTATCTTTGA-3', anti-sense 5'-TTGTTTCCTTGACTGAGTTGGTT-3', 534bp); IL-6 (sense 5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC-3', anti-sense 5'-GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3', 358bp); IL-8 (sense 5'-TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3', anti-sense 5'-ACTTCTCCACAACCTCTGC-3', 229 bp)。PCR 反应条件为 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 45 s, 72℃ 1 min, 循环 35 次; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 用 Bio-Rad 公司图像分析仪成像并进行半定量分析。

## 1.6 流式细胞术检测 EAhy926 细胞 TLR4 的表达

收集  $1 \times 10^6$  个细胞, 4℃, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 用预冷的含 2% BSA 的 PBS 洗两遍(1000 r/min, 5 min, 4℃); 细胞沉淀用 80 μL 含 2% BSA 的 PBS 重悬后, 分别加入 20 μL PE 标记的抗人 TLR4 抗体和鼠 IgG2a 同型对照, 4℃ 避光孵育 45 min; 用预冷的含 2% BSA 的 PBS 洗 3 遍(1000 r/min, 5 min, 4℃); 细胞沉淀用 500 μL PBS 重悬后上机检测。

## 1.7 细胞生物活性法检测 EAhy926 细胞培养上清中 IL-6 的含量

按吴强等<sup>[10]</sup>方法用 7TD1 细胞(IL-6 依赖生长的小鼠杂交瘤细胞, 本室保存)测定待检样品的 IL-6 活性, 并用不同稀释度的 rhIL-6 做标准曲线。

## 1.8 ELISA 检测 EAhy926 细胞培养上清中 IL-8 的含量

按试剂盒说明用 ELISA 方法检测细胞培养上清中的 IL-8 的含量。

## 1.9 抗体阻断实验检测 TLR4 对 EAhy926 细胞 IL-6 和 IL-8 表达的影响

将 EAhy926 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵育 12 h, 每孔分别加入 TLR4 抗体(10 μg/mL)和同型对照孵育 1 h, 各孔分别加入

100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 变形链球菌细胞壁作用 24 h,同时设空白对照。收集细胞用于检测 IL-6 和 IL-8 mRNA 的水平。

### 1.10 统计学处理

实验数据以  $x \pm s$  表示,采用 SPSS 11.5 软件包的 ANOVA 进行分析,以组间  $t$  检验进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 变形链球菌细胞壁对 EAhy926 细胞增殖活性的影响

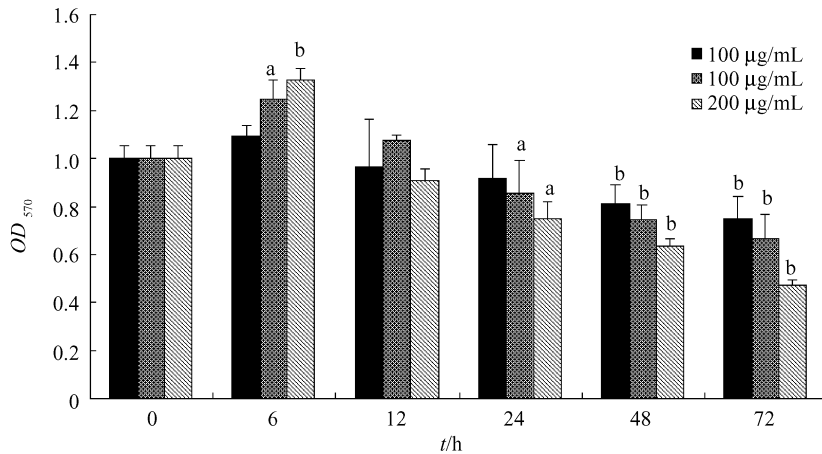


图1 变形链球菌细胞壁对 EAhy926 细胞增殖活性的影响

Fig.1 The effect of the cell wall of *Streptococcus mutans* on the EAhy926 cells proliferation ( $n = 3$ ,  $x \pm s$ , <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  compared with control).

### 2.2 变形链球菌细胞壁对 EAhy926 细胞 TLR4 表达的影响

如图 2-A, B 所示,变形链球菌细胞壁(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )作用于 EAhy926 细胞后,TLR4 mRNA 和蛋白的表达水平随着作用时间的延长而逐渐增加,作用 16 h 后表达水平达到高峰,24 h 后表达逐渐下降,但表达量仍明显高于对照组( $P < 0.01$ )。

### 2.3 变形链球菌细胞壁对 EAhy926 细胞 IL-6 表达的影响

如图 3-A, B 结果所示,变形链球菌细胞壁(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )作用于 EAhy926 细胞,随着作用时间的延长,IL-6 mRNA 的表达水平逐渐增高,在 16 h 达到最高峰,在作用 24 h 和 48 h 后,表达量下降,但仍明显高于对照组( $P < 0.05$ )。细胞培养上清中 IL-6 的含量随着作用时间的延长而逐渐增加。作用 24 h 后,细胞 IL-6 的分泌水平达到最高峰( $P < 0.05$ ),48 h 后表达水平下降。

### 的影响

不同浓度的变形链球菌细胞壁作用 EAhy926 细胞不同时间后,能明显影响细胞增殖活性。结果如图 1 所示,10,100,200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  变形链球菌细胞壁分别作用于 EAhy926 细胞 6 h,随着作用剂量的增加,显著促进细胞增殖,呈剂量依赖性( $P < 0.05$ );作用 24 h,48 h,72 h 后,不同浓度细胞壁对 EAhy926 细胞具有明显的细胞损伤作用(分别为  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  和  $P < 0.01$ ),呈显著的时间和剂量相关性。

### 2.4 变形链球菌细胞壁对 EAhy926 细胞 IL-8 表达的影响

如图 4-A, B 所示,变形链球菌细胞壁(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )作用于 EAhy926 细胞,IL-8 mRNA 的表达水平在 24 h 达到最高峰,呈明显的时间依赖性( $P < 0.05$ ),作用 48 h 后表达水平下降,但仍明显高于对照组( $P < 0.01$ )。细胞 IL-8 的分泌量随着作用时间的延长逐渐增加,48 h 达到高峰,呈现明显的时间依赖关系( $P < 0.05$ )。

### 2.5 变形链球菌细胞壁刺激 EAhy926 细胞 IL-6 和 IL-8 mRNA 与 TLR4 mRNA 表达的关系

变形链球菌细胞壁作用于 EAhy926 细胞,经 TLR4 抗体阻断后,炎症细胞因子 IL-6 mRNA 和 IL-8 mRNA 的表达量均显著低于对照组(分别为  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),抑制率分别为 73% 和 90% (图 5)。结果表明,炎症细胞因子 IL-6 和 IL-8 的表达与细胞表面 TLR4 的介导密切相关,阻断 TLR4 后,变

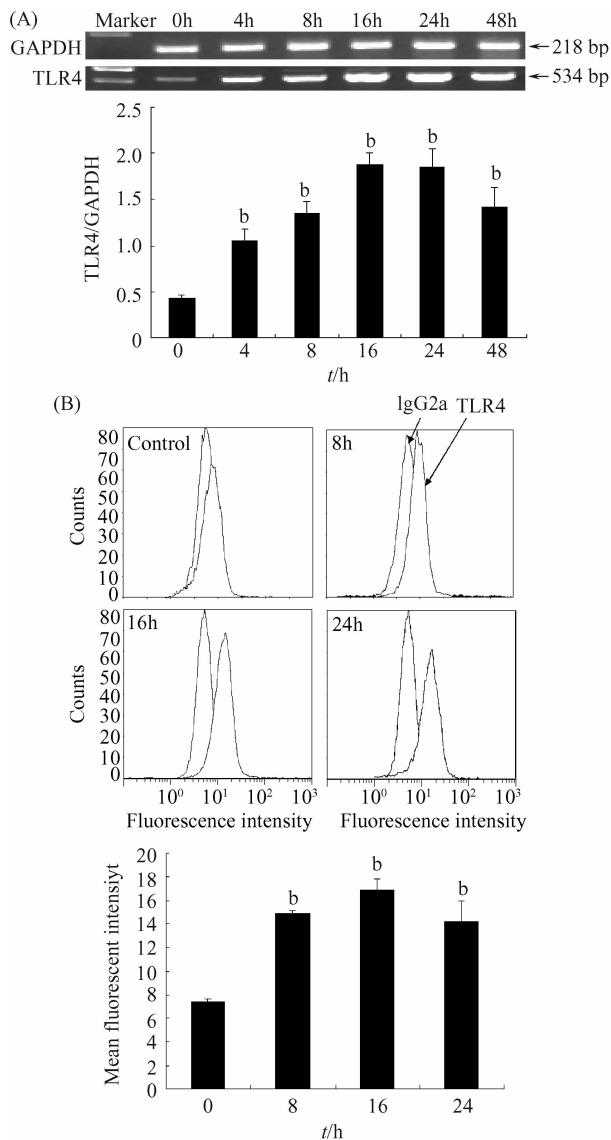


图2 变形链球菌细胞壁 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 对 EAhy926 细胞 TLR4 表达的影响

Fig.2 The effect of the cell wall of *Streptococcus mutans* (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) on the expression of TLR4 in EAhy926 cells ( $n = 3$ ,  $x \pm s$ ,  $^b P < 0.01$  compared with control) A: the expression of TLR4 mRNA of EAhy926 cells. B: the TLR4 protein expression by EAhy926 cells.

形链球菌细胞壁引起的细胞炎性细胞因子基因的表达明显被抑制。

### 3 讨论

冠状动脉粥样斑块内的炎症反应被认为是冠状动脉粥样硬化形成的关键环节。现在普遍认为, 内皮细胞的损伤是动脉粥样硬化的始动因素, 活化的内皮细胞可使粘附分子表达上调, 促进单核细胞与内皮细胞的粘附, 启动后续的炎症和免疫损伤

过程<sup>[11]</sup>。

变形链球菌是革兰阳性球菌, 为致龋齿的主要病原菌, 有证据表明龋齿与心血管疾病之间有着密切的关系<sup>[2]</sup>。上世纪末, Haraszthy VI 等在动脉粥样斑块中检出了与龋齿有关的病原微生物<sup>[4-5]</sup>。Kazuhiko Nakano 等学者发现, 在动脉粥样斑块中变形链球菌的检出率为 74%, 用长距离 PCR 技术分析表明, 心血管组织中的变形链球菌菌体成分可能来源于口腔<sup>[3]</sup>。因此, 有必要探明变形链球菌在动脉粥样硬化发生发展机制中的作用。

细菌细胞壁位于细菌的最外层, 革兰阳性菌细胞壁主要由肽聚糖和磷壁酸构成, 可触发细胞因子的释放和调节促炎症反应<sup>[12]</sup>。链球菌细胞壁成分

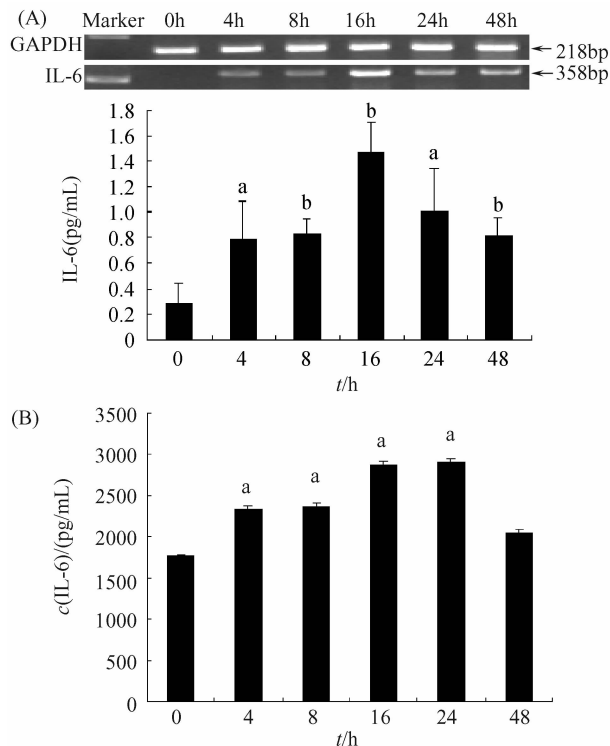


图3 变形链球菌细胞壁 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 对 EAhy926 细胞 IL-6 表达的影响

Fig.3 The effect of the cell wall of *Streptococcus mutans* (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) on the expression of IL-6 in EAhy926 cells ( $n = 3$ ,  $x \pm s$ ,  $^a P < 0.05$ ,  $^b P < 0.01$  compared with control). A: the expression of IL-6 mRNA in EAhy926 cells. B: the IL-6 production by EAhy926 cells.

和可溶性产物可以自发或与宿主细胞作用后自菌体中释放出来, 随血流进行播散, 触发血管内皮细胞的炎症反应, 造成细胞的炎症损伤。本实验中发现变形链球菌细胞壁在体外对血管内皮细胞有一

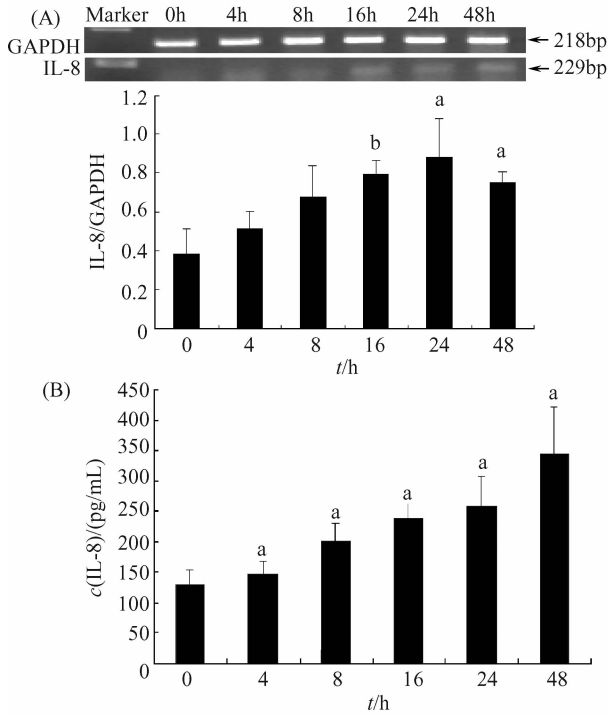


图4 变形链球菌细胞壁(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )对EAhy926细胞IL-8表达的影响

Fig. 4 The effect of the cell wall of *Streptococcus mutans* (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) on the expression of IL-8 in EAhy926 cells ( $n=3$ ,  $x \pm s$ ,  $^a P < 0.05$ ,  $^b P < 0.01$  compared with control). A: the expression of IL-8 mRNA in EAhy926 cells. B: the IL-8 production by EAhy926 cells.

定的损伤作用。D. Heumann<sup>[13]</sup>等发现,革兰阳性菌细胞壁可刺激人单核巨噬细胞、内皮细胞等炎症细胞因子表达。变形链球菌细胞壁的不同组分在单核细胞、骨髓和牙周韧带成纤维细胞中已经证实可诱发IL-6、IL-8和TNF- $\alpha$ 等细胞因子的分泌<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,变形链球菌细胞壁上调EAhy926细胞IL-6和IL-8 mRNA水平的表达,明显促进IL-6和IL-8的分泌,并呈现时间和剂量的依赖性,提示变形链球菌可能通过诱导内皮细胞产生炎症细胞因子参与动脉粥样硬化的形成与发展<sup>[15]</sup>。TLR4在动脉粥样硬化的发生和发展中发挥着重要的作用<sup>[8]</sup>。A. H. Schoneveld等经患有动脉粥样硬化的ApoE<sup>-/-</sup>小鼠研究表明,TLR2和TLR4表达在动脉粥样斑块和循环血液中都有所增加<sup>[7]</sup>,暗示重要的固有免疫分子TLRs可能参与了动脉粥样硬化炎症反应的发生。为探讨TLRs是否介导变形链球菌细胞壁刺激炎症细胞因子的产生,本研究观察了变形链球菌细胞壁对EAhy926细胞TLR4表达的影响,

结果显示,变形链球菌细胞壁能显著上调EAhy926细胞TLR4的基因和蛋白水平的表达。用TLR4抗体阻断后,变形链球菌细胞壁诱导EAhy926细胞炎症细胞因子的产生可被部分抑制,提示TLR4信号转导通路的活化可能参与了诱导细胞产生并释放炎症细胞因子的过程,变形链球菌细胞壁可能通过上调TLR4的表达,激活TLR4介导的信号传导途径,促进炎症细胞因子基因的转录,生成炎症细胞因子,从而参与动脉粥样硬化的形成和发展过程。

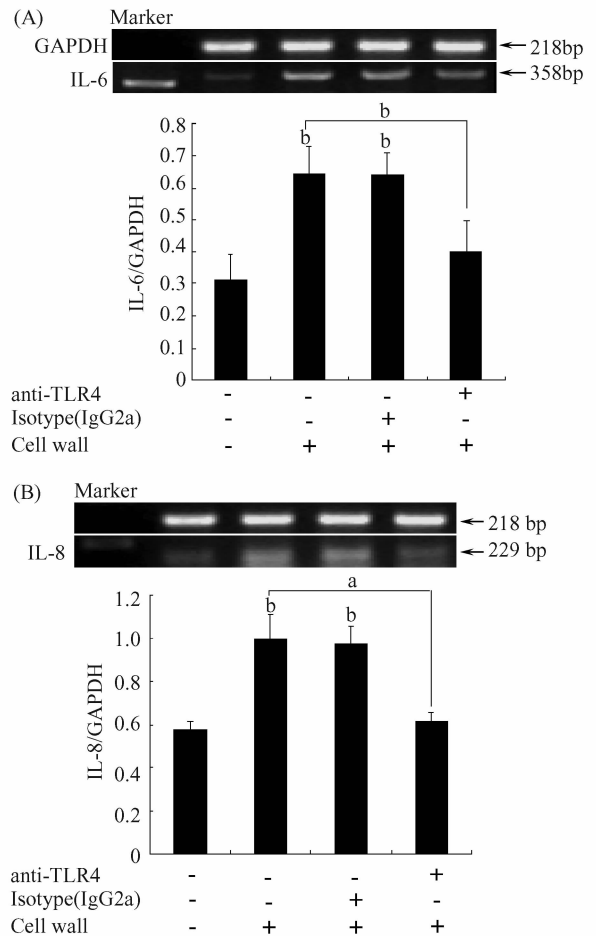


图5 TLR4抗体对变形链球菌细胞壁(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )刺激EAhy926细胞IL-6和IL-8 mRNA表达的影响

Fig. 5 The effect of anti-human TLR4 antibodies on the IL-6 and IL-8 mRNA expression by EAhy926 cells induced with the cell wall of *Streptococcus mutans* (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $n=3$ ,  $x \pm s$ ,  $^a P < 0.05$  compared with control). A: the IL-6 mRNA expression in EAhy926 cells. B: the IL-8 mRNA expression in EAhy926 cells.

本研究证实了变形链球菌细胞壁可导致人血管内皮细胞的损伤,通过上调TLR4的表达,促进血管内皮细胞分泌炎症细胞因子,为研究变形链球菌

致动脉粥样硬化发生的分子机制提供了重要的实验依据。

龋齿和动脉粥样硬化在我国有着较高的发病率,严重危害着人们的健康。明确致龋齿的变形链球菌与动脉粥样硬化发生和发展的关系和机制,可以指导人们通过积极预防龋齿的发生,来预防和降低动脉粥样硬化的发生。

## 参考文献

- [ 1 ] Pucar A, Milasin J, Lekovic V, et al. Correlation between atherosclerosis and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries. *Journal of periodontology*, 2007, 78 (4): 677-682.
- [ 2 ] Kurihara N, Inoue Y, Iwai T, et al. Oral bacteria are a possible risk factor for valvular incompetence in primary varicose veins. *European journal of vascular and endovascular surgery*, 2007, 34(1): 102-106.
- [ 3 ] Kazuhiko N, Ryota N, Takashi O. *Streptococcus mutans* and cardiovascular diseases. *Japanese Dental Science Review*, 2008, 44(1): 29-37.
- [ 4 ] Nakano K, Inaba H, Nomura R, et al. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *Journal of clinical microbiology*, 2006, 44(2): 3313-3317.
- [ 5 ] Kozarov E, Sweier D, Shelburne C, et al. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. *Microbes and infection*, 2006, 8(3): 687-693.
- [ 6 ] Pasterkamp G, Keulen JK, Kleijn DPV, et al. Role of Toll-like receptor 4 in the initiation and progression of atherosclerotic disease. *European journal of clinical investigation*, 2004, 34(5): 328-334.
- [ 7 ] Schoneveld AH, Hoefler I, Sluijter JPG, et al. Atherosclerotic lesion development and Toll like receptor 2 and 4 responsiveness. *Atherosclerosis*, 2008, 197(1): 95-104.
- [ 8 ] Tanabe S, Bodet C, Grenier D. Peptostreptococcus micros cell wall elicits a pro-inflammatory response in human macrophages. *Journal of endotoxin research*, 2007, 13(4): 219-227.
- [ 9 ] Edgell CJS, McDonald CC, Graham JBA. Edgell CJ, et al. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1983, 80: 3734-3737.
- [ 10 ] 吴强, 庞学雯, 钱晓萍, 等. 胸腺细胞对胸腺上皮细胞分泌 IL-6 的促进作用. *中华微生物学和免疫学杂志 (Journal of microbiology and immunology)*, 1996, 16 (6): 418-421.
- [ 11 ] Abbas M, Bignamini V. Effects of chronic microbial infection on atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2006, 187 (2): 439-440.
- [ 12 ] Moreillon P, Majcherczyk PA. Proinflammatory activity of cell wall constituents from Gram-positive bacteria. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 2003, 35 (9): 632-641.
- [ 13 ] Heumann D, Barras C, Severin A, et al. Gram-Positive Cell Walls Stimulate Synthesis of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-6 by Human Monocytes. *Infection and immunity*, 1994, 62(7): 2715-2721.
- [ 14 ] Engels-Deutsch M, Pini A, Yamashita Y, et al. Insertional inactivation of pac and rmLB genes reduces the release of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-8 induced by *Streptococcus mutans*. *Infection and immunity*, 2003, 71(9): 5169-5177.
- [ 15 ] Girna HRS, Orsib NM, Vanniasinkama SH. An overview of cytokine interactions in atherosclerosis and implications for peripheral arterial disease. *Vascular medicine*, 2007, 12(2): 299-309.

# Effects of the cell wall of *Streptococcus mutans* on the expression of TLR4, IL-6 and IL-8 by EAhy926 cells

Qin Li, Yisong Wang, Qun Zheng, Zhipeng Zhao, Guoling Ping, Liping Zhang\*  
(Department of Microbiology, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the effects of the cell wall of *Streptococcus mutans* on the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4), IL-6 and IL-8 in EAhy926 cells (The human endothelial hybridoma of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and the human epithelial cell line A549, characterized by endothelial phenotype and biology). [Methods] EAhy926 cells were treated with different concentrations of the cell wall of *Streptococcus mutans*. The proliferation of EAhy926 cells was determined by MTT assay. The mRNA expression of TLR4, IL-6 and IL-8 in EAhy926 cells was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). TLR4 was analyzed by flow cytometry. The production of IL-6 and IL-8 in the cultured supernatants was measured by biochemical method and ELISA respectively. TLR4 blocking assay was used to investigate the relationship between IL-6, IL-8 and TLR4 mRNA expression. [Results] The proliferation of EAhy926 cells was significantly enhanced by the cell wall of *Streptococcus mutans* at 6 h ( $P < 0.05$ ), and inhibited after 12 h ( $P < 0.05$ ), both time- and dose-dependent. The expression of mRNA and protein for TLR4 in EAhy926 cells was increased after stimulated by the cell wall of *Streptococcus mutans*, peaking at 16 h ( $P < 0.05$ ), and then decreased. The expression of IL-6 and IL-8 mRNA was significantly induced when exposed to the cell wall, reaching the maximal level at 16 h and 24 h, respectively ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, the cell wall of *Streptococcus mutans* induced the production of IL-6 and IL-8 ( $P < 0.05$ ). The expression of IL-6 and IL-8 mRNA in EAhy926 cells was blocked by anti-human TLR4 antibodies significantly. [Conclusion] The cell wall of *Streptococcus mutans* upregulated the expression of TLR4 and induced the production of inflammatory cytokines IL-6 and IL-8, indicating that the expression of TLR4 of EAhy926 cells may elicit a TLR4-mediated innate immune response and contribute to production of inflammatory cytokines IL-6 and IL-8.

**Keywords:** the cell wall of *Streptococcus mutans*; EAhy926 cell; TLR4; IL-6; IL-8

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Scientific and Technological Development Item of Beijing Municipal Education Commission (KM200810025012), the National Important Science & Technology Specific Projects (2009ZX10004-305) and the Funding Project for Academic Human Resources Development in Institutions of Higher Learning Under the Jurisdiction of Beijing Municipality

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-83911688; E-mail: lpzhang@ccmu.edu.cn

Received: 23 September 2009/Revised: 30 November 2009

## 《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上,并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。