

[文章编号] 1000-1182(2004)05-0376-03

四环素对人牙周膜成纤维细胞的生物学作用

葛少华, 杨丕山, 赵 宁, 戚向敏, 孙钦峰, 王 艳
(山东大学口腔医院 牙周科, 山东 济南 250012)

[摘要] 目的 探讨四环素对体外培养的人牙周膜成纤维细胞(HPDLFs)的生物学作用。方法 将不同浓度的四环素(1、5、20、100、500、2 500 $\mu\text{g/ml}$)加入体外培养的 HPDLFs 中, 孵育 2 d 后, 在倒置显微镜下观察其对细胞形态的影响, 并用 MTT 法、考马斯亮蓝法及³H-TdR 掺入法, 分别检测四环素对细胞的增殖活性、蛋白合成及 DNA 合成的影响。结果 在 1~100 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度范围内, 细胞形态呈正常的梭形或纺锤形。在 20~100 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度范围内, 四环素可促进 HPDLFs 的增殖及生物合成($P < 0.01$)。当四环素的浓度增至 2 500 $\mu\text{g/ml}$, 不仅使细胞的镜下形态发生了明显改变, 而且严重抑制了细胞的生物学活性。结论 在合适的浓度范围内, 四环素能促进 HPDLFs 的增殖及生物合成, 而浓度过高则具有细胞毒性。

[关键词] 细胞培养; 人牙周膜成纤维细胞; 四环素

[中图分类号] R 781 **[文献标识码]** A

Biological Effects of Tetracycline on Cultured Human Periodontal Fibroblasts GE Shao-hua, YANG Pi-shan, ZHAO Ning, QI Xiang-min, SUN Qin-feng, WANG Yan. (Dept. of Periodontology, School of Stomatology, Shandong University, Jinan 250012, China)

[Abstract] **Objective** To explore the biological effects of tetracycline on cultured human periodontal ligament fibroblasts (HPDLFs). **Methods** Increasing concentrations of tetracycline (1, 5, 20, 100, 500, 2 500 $\mu\text{g/ml}$) were added to the medium of cultured HPDLFs, respectively. After co-incubated for 2 days, cell morphology was observed under reverse microscope, meanwhile, cell proliferation activity was assayed using MTT, the total amount of protein was detected with Coomassie Bright Blue method and DNA synthesis was measured by ³H-TdR. **Results** Over a concentration range of 1 to 100 $\mu\text{g/ml}$, cells demonstrated a normal appearance, spindle or fusiform shaped. Moreover, at a concentration range of 20 to 100 $\mu\text{g/ml}$, tetracycline significantly enhanced the proliferating activity and biosynthesis of HPDLFs ($P < 0.01$). However, higher concentration (2 500 $\mu\text{g/ml}$) not only changed cell morphology, but also significantly inhibited cellular activity. **Conclusion** The results suggested that proper doses of tetracycline could promote proliferation and biosynthesis of HPDLFs while higher concentrations of tetracycline had cytotoxic effect.

[Key words] cell culture; human periodontal fibroblasts; tetracycline

四环素可作为牙周局部用药来治疗牙周炎, 不仅对多种牙周可疑致病菌有较强的抑制作用^[1], 还能通过抑制胶原酶的活性干预组织破坏和阻止骨吸收^[2]。牙周膜成纤维细胞作为牙周组织的主要功能细胞, 在创伤修复和组织再生中发挥着重要作用。四环素在牙周袋中抑菌消炎的同时必然也作用于牙周组织。本研究在体外培养人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblasts, HPDLFs)的基础上, 探讨不同浓度四环素对牙周膜成纤维细胞生物学活性的影响。

1 材料和方法

1.1 HPDLFs 培养

收集临床因正畸拔除的健康前磨牙, 刮下根中

1/3部位的牙周膜组织, 剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的碎块, 按组织块贴壁法, 用含 15% 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所)的 DMEM(Gibco, 美国)培养液在 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养。待细胞长满瓶底的 70%~80%, 按 1:2 传代。长出的细胞用 ABC 法染色, 细胞表现为抗波形丝蛋白阳性, 抗角蛋白阴性, 证明所培养的细胞是来源于中胚层的成纤维细胞。取生长良好的第 5 代 HPDLFs 用于实验。

1.2 四环素对 HPDLFs 细胞增殖的影响

将化学纯四环素粉(Sigama, 美国)用含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养液稀释成 2 500 $\mu\text{g/ml}$ 、500 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、20 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 6 个浓度。将 HPDLFs 以 2×10^4 个/ml 接种于 96 孔板, 在含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养 24 h 后, 弃去孔内液体及不贴壁细胞, 将各浓度组的四环素液加入 96 孔板中, 每种浓度的四环素为一实验组, 每种浓度加 5 孔; 对照组加含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养

[收稿日期] 2004-04-04; [修回日期] 2004-07-20

[作者简介] 葛少华(1973-), 女, 山东人, 讲师, 硕士

[通讯作者] 杨丕山, Tel: 0531-8382368

液。将 96 孔板置于 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养 2 d 后,MTT 法检测不同浓度四环素对细胞增殖的影响。

1.3 四环素对 HPDLFs 蛋白含量的影响

将细胞用与 1.2 中相同的方法培养 2 d 后,弃去孔内液体,用 pH7.4 的 PBS 冲洗 3 次,吸干,每孔加入 100 μl 0.2% TritonX-100,振荡 30 min,取 20 μl 上述液体加入考马斯亮蓝染液 200 μl,振荡 10 min,在波长 595 nm 处测光吸收值。

1.4 四环素对 HPDLFs DNA 合成的影响

将 HPDLFs 以 1×10^5 个/ml 接种于 96 孔板,在含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养 24 h 后,弃去孔内液体及不贴壁细胞,将各浓度组的四环素液加入 96 孔板,每种浓度的四环素为一实验组,每种浓度加 5 孔;对照组加含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养液。将 96 孔板置于 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养 2 d,每孔加入 1 μCi 的 ³H-TdR。继续孵育 16 h,弃去孔内培养液。用 pH7.4 的 PBS 液冲洗 3 遍,每孔加入 100 μl 甲酸,70 ℃ 水浴 30 min。降至室温后,在孔内反复吹打。确保将孔内贴壁细胞完全吹打到液体中,将液体分别转移至盛有 5 ml 闪烁液的闪烁瓶内混匀,在液闪记数仪上测量每分钟闪烁计数(cpm)。

1.5 数据的分析

运用 SAS 6.12 软件包,所有数据均经过正态分布检验、方差齐性检验、方差分析及多个实验组与一个对照组均数的两两比较分析。

2 结果

2.1 细胞形态观察

培养 10 ~ 16 d 有细胞从组织块中长出(图 1),达汇合点的细胞呈典型的成纤维细胞特征:长梭形或纺锤形(图 2)。在 1 ~ 100 μg/ml 的浓度范围内,四环素对 HPDLFs 的形态无影响:细胞伸展良好,呈梭形的细长外观;当浓度升高达 2 500 μg/ml 时,呈现明显的细胞毒性效应,细胞形态改变:细胞皱缩,变圆,伸展差,不贴壁,呈悬浮状态。

2.2 四环素对 HPDLFs 细胞增殖、蛋白合成及 DNA 合成的影响

由表 1 可见,四环素在 1 ~ 100 μg/ml 的浓度范围内,以剂量依赖方式促进 HPDLFs 的增殖。20 μg/ml 时与对照组相比,可促进细胞增殖 ($P < 0.05$),100 μg/ml 为最大促增殖浓度 ($P < 0.01$)。但至 500 μg/ml 时,促增殖效应开始下降,在 2 500 μg/ml 时则出现明显的细胞毒性,抑制细胞增殖 ($P < 0.01$)。



图 1 HPDLFs 从组织块中长出 × 40

Fig 1 Extension of HPDLFs from the explant × 40

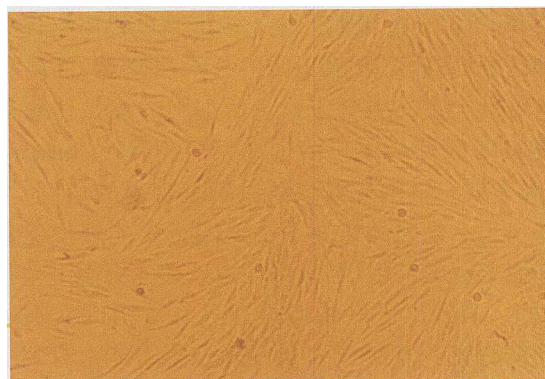


图 2 第 5 代 HPDLFs × 40

Fig 2 The fifth passage of HPDLFs × 40

表 1 四环素对 HPDLFs 细胞增殖、蛋白合成及 DNA 合成的影响 ($\bar{x} \pm s$) ($n = 5$)

Tab 1 Effects of tetracycline on the proliferation, protein synthesis and DNA synthesis of HPDLFs ($\bar{x} \pm s$) ($n = 5$)

药物浓度 (μg/ml)	增殖 (OD 值)	蛋白合成 (OD 值)	DNA 合成 (cpm)
空白对照	0.388 ± 0.013	0.719 ± 0.072	572 ± 87
1	0.394 ± 0.013	0.730 ± 0.115	763 ± 239
5	0.408 ± 0.311	1.182 ± 0.105**	803 ± 158
20	0.434 ± 0.042*	1.219 ± 0.097**	1 222 ± 334**
100	0.460 ± 0.016**	1.188 ± 0.136**	2 153 ± 523**
500	0.412 ± 0.026	0.648 ± 0.074	634 ± 117
2 500	0.228 ± 0.048**	0.329 ± 0.107**	122 ± 53*

注:与空白对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

四环素对 HPDLFs 蛋白总含量的影响见表 1。1 μg/ml 时对 HPDLFs 的蛋白总含量无明显影响,5 ~ 100 μg/ml 时蛋白总含量明显高于空白组 ($P < 0.01$),最大效应浓度为 20 μg/ml,500 μg/ml 时蛋白总含量减少,至 2 500 μg/ml 时明显下降 ($P < 0.01$)。

四环素对 HPDLFs DNA 合成的影响见表 1。20 μg/ml 和 100 μg/ml 时促进细胞 DNA 的合成 ($P < 0.01$),2 500 μg/ml 时抑制合成 ($P < 0.05$)。

3 讨论

牙周病的常规治疗措施是洁治、刮治和根面平整,但深牙周袋及根分歧处,刮治器难以伸入,不能彻底去除菌斑细菌,难以达到理想的治疗效果^[3]。因此局部应用抗菌素作为辅助治疗可取得良好效果,其中以四环素应用最为广泛。经四环素族药物处理的根面,能明显促进成纤维细胞的附着、迁移、生长、伸展及生物合成^[4-6],还能促进牙龈上皮细胞的附着和迁移^[7]。Tilakaratne 等^[8]的研究还表明米诺环素能参与激素介导的合成代谢反应,参与基质的合成。

HPDLFs 的增殖是牙周创伤修复和组织再生的重要过程。HPDLFs 以比牙龈上皮细胞更快速率优先占据创区根面,就可形成正常的牙周新附着,而防止形成结合上皮的愈合方式。活细胞的线粒体脱氢酶能将 MTT 转变成不可溶性的紫色甲臆(formazan)颗粒,后者被二甲基亚砷溶解后所呈现出的色度,可以反映出活细胞的代谢水平。四环素能直接促进丝状胞浆突起的产生,经米诺环素处理的根面上生长的 HPDLFs,表现出更好的伸展性且有高密度交织成网状的细胞突^[4],而良好的伸展性及附着能力有利于细胞增殖。四环素在低浓度时对 HPDLFs 无明显促增殖作用,20 $\mu\text{g/ml}$ 时逐渐出现促增殖作用,100 $\mu\text{g/ml}$ 时对 HPDLFs 有最大促增殖作用,在 2 500 $\mu\text{g/ml}$ 时则出现明显的细胞毒性,抑制细胞增殖。

HPDLFs 是牙周再生的主要细胞,能通过合成结构性和功能性蛋白质完成细胞分裂、趋化、分化以及细胞外基质合成等一系列细胞活动,使牙周组织修复或再生。HPDLFs 总蛋白含量的变化可反映细胞功能的活跃程度。四环素在 1 $\mu\text{g/ml}$ 时对 HPDLFs 蛋白总含量无明显影响;5 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ 时蛋白总含量明显高于空白组,且最大效应浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$;500 $\mu\text{g/ml}$ 蛋白总含量减少,至 2 500 $\mu\text{g/ml}$ 时由于药物的毒性作用,其蛋白总含量也相应降低。细胞增殖与蛋白合成有正相关关系,活细胞数量增加,其总蛋白含量也应相应增多。在本实验中,四环素促细胞增殖与促蛋白合成的效应浓度基本吻合,只是最大效应浓度有所不同。此外,总蛋白含量的增加也可能与四环素有抑胶原酶活性、抑制胶原蛋白的降解有关。

细胞增殖前必须首先复制 DNA,而胸腺嘧啶是 DNA 合成的特异性碱基,用³H 标记的胸腺嘧啶脱氧核苷(TdR)掺入新合成的 DNA 中后,会均匀地分布于子细胞中,此时只需测定³H 的放射性脉冲数便可比较不同细胞的增殖活性。本研究应用³H-TdR 掺入法测定三种四环素药物对 HPDLFs DNA 合成的影响,发现四环素在 20 $\mu\text{g/ml}$ 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 时促进细胞 DNA

的合成,2 500 $\mu\text{g/ml}$ 时则抑制细胞 DNA 的合成。

临床应用四环素族药物的目的一是达到最大治疗效应,包括抑菌效应对牙周组织的作用效应;二是达到最低细胞毒性效应。有研究表明四环素族药物能抑制 90% 细菌生长的浓度(MIC₉₀)为 0.031 ~ 4 $\mu\text{g/ml}$ ^[9],局部用药 MIC₉₀ 的浓度很易达到,关键在于探讨一个合适的药物浓度。本实验结果表明四环素提高 HPDLFs 活性,又不具有细胞毒性的效应浓度为 20 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ 。在这一范围内,该药物能提高 HPDLFs 细胞增殖、蛋白合成及 DNA 合成,有助于牙周新附着的形成,促进牙周创伤的愈合和组织再生。

研究理想药物浓度的最好方法是将体内实验和体外实验相结合,笔者需要进一步的体内实验以验证本实验结果。本实验研究了四环素对 HPDLFs 的细胞活性及细胞毒性的影响及效应浓度,对临床牙周局部用药可提供有益的指导。

[参考文献]

- [1] Greenstein G, Polson A. The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases: A comprehensive review[J]. J Periodontol, 1998, 69(5): 507-520.
- [2] Golub LM, Wolff M, Roberts S, et al. Treating periodontal diseases by blocking tissue-destructive enzymes[J]. J Am Dent Assoc, 1994, 125(2): 163-169.
- [3] Haffajee AD, Cugini MA, Dibart, et al. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases[J]. J Clin Periodontol, 1997, 24(5): 324-334.
- [4] Rompen EH, Goffinet GH, Nussgens B. Human periodontal ligament fibroblast behavior on chemically conditioned dentine: An *in vitro* study[J]. J Periodontol, 1999, 70(7): 1144-1152.
- [5] Rompen EH, Kohi J, Nussgens B, et al. Kinetic aspects of gingival and periodontal ligament fibroblast attachment to surface-conditioned dentin[J]. J Dent Res, 1993, 72(3): 607-612.
- [6] Terranova VP, Franzetti LC, Hic S, et al. A biological approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth[J]. J Periodont Res, 1986, 21(4): 330-337.
- [7] Vanheusden A, Nussgens B, Goffinet G, et al. *In vitro* modulation of human gingival epithelial cell attachment and migration by minocycline-HCL[J]. J Periodont Res, 1998, 33(6): 377-385.
- [8] Tilakaratne A, Soory M. The modulation of androgen metabolism by estradiol, minocycline, and indomethacin in a cell culture model[J]. J Periodontol, 2002, 73(6): 585-590.
- [9] Omori N, Kobayashi H, Tsutsui T. Quantitative comparison of cytotoxic effects of tetracyclines and fluoroquinolones on human periodontal ligament fibroblasts[J]. J Periodont Res, 1999, 34(6): 290-295.

(本文编辑 王 晴)