

[文章编号] 1000-1182(2008)03-0237-04

# 人牙周膜成纤维细胞对米诺环素的跨膜转运

刘宇<sup>1,2</sup>, 刘洪臣<sup>1</sup>, 吴霞<sup>1</sup>, 鄂玲玲<sup>1</sup>, 冷斌<sup>1</sup>

(1.解放军总医院 口腔医学研究所, 北京 100853; 2.海军总医院 口腔科, 北京 100037)

**[摘要]** 目的 研究人牙周膜成纤维细胞(HPDLF)对米诺环素的跨膜转运, 为通过根管局部及全身给药的假说提供实验依据。方法 用米诺环素溶液孵育HPDLF和MC3T3-E1细胞, 超声破碎细胞后, 高效液相色谱法(HPLC)测定不同时间点的胞内药物含量, 考马斯亮蓝法测定细胞蛋白总量。结果 HPLC可以精确测量细胞内米诺环素的含量。细胞种类和孵育时间对细胞内米诺环素含量有显著性影响( $P<0.01$ ), 胞内米诺环素含量随着时间延长而增加, 两种细胞的胞内药物含量不同; 胞外米诺环素浓度增加时, 细胞内药物含量增加。结论 米诺环素存在HPDLF的跨膜转运, 这种转运与细胞外药物浓度及孵育时间有关, 并存在着细胞差异。

**[关键词]** 人牙周膜成纤维细胞; 米诺环素; 高效液相色谱法; 生物转运

**[中图分类号]** R781.4 **[文献标识码]** A

Biological transport of minocycline by human periodontal ligament fibroblasts LIU Yu<sup>1,2</sup>, LIU Hong-chen<sup>1</sup>, WU Xia<sup>1</sup>, E Ling-ling<sup>1</sup>, LENG Bin<sup>1</sup>. (1. Dental Institute, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 2. Dept. of Stomatology, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100037, China)

**[Abstract]** Objective To investigate biological transport of minocycline by human periodontal ligament fibroblasts(HPDLF). To verify the hypothesis of delivering medicine to periodontium and the whole body through the root canal. Methods HPDLF and MC3T3-E1 cells were incubated in minocycline solutions. The intracellular antibiotics contents were measured by high performance liquid chromatography(HPLC) and the cell total protein was measured by Bradford protein assay. Results HPLC was an accurate, sensitive method for measurement of the intracellular minocycline. The incubation time and cell property had significant effect on the intracellular minocycline contents( $P<0.01$ ). The intracellular contents increased with extracellular concentration. Conclusion Minocycline can be transported by HPDLF. The transport is concentration-dependent, time-dependent and cell specific.

**[Key words]** human periodontal ligament fibroblasts; minocycline; high performance liquid chromatography; biological transport

由于四环素类药物的长期大量应用, 细菌对其天然获得品种已呈高度耐药性<sup>[1]</sup>。同时四环素类药物具有在骨组织、牙齿沉积的特点, 目前较少用于细菌性感染的治疗。但是米诺环素等半合成品种抗菌活性强, 细菌耐药性相对少见, 可用于治疗牙周炎等敏感菌所致的轻中度感染<sup>[2]</sup>。在龈沟内等病变处局部使用, 不但可减少副作用的发生, 而且可以抑制牙龈及龈沟液中胶原酶的活性, 抑制破骨细胞功能, 减少骨吸收, 促进成纤维细胞的增殖、分化及结缔组织附着, 有利于牙周组织获得再附着<sup>[3]</sup>。

刘洪臣<sup>[4-5]</sup>提出了两种给药途径, 即人工种植体给药系统和根管全身给药。通过种植体与骨的接触

以及根管与牙周组织的通道, 使药物进入牙周局部以及全身, 所以需要了解口腔各组织, 特别是牙周膜和牙槽骨组织细胞对各种药物的转运能力。研究表明多种组织细胞能够转运包括抗生素在内的多种物质<sup>[6]</sup>。研究SCC-25口腔鳞状细胞癌上皮细胞系、牙龈成纤维细胞对米诺环素的转运, 都取得了阳性结果<sup>[7-8]</sup>。人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblasts, HPDLF)可以转运替硝唑, 不能转运甲硝唑<sup>[9]</sup>。本研究利用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC), 以HPDLF作为研究对象, 观察HPDLF对米诺环素的转运, 为通过根管局部及全身给药的假说提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

高糖DMEM培养基 胎牛血清(Gibco公司, 美

[收稿日期] 2007-08-17; [修回日期] 2008-04-09

[作者简介] 刘宇(1976-), 男, 湖南人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 刘洪臣, Tel: 010-66936254

国), 新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司), 胰蛋白酶(Amresco公司, 美国), 米诺环素(Sigma公司, 美国), DU640紫外分光光度计(Beckman公司, 美国), JY-92 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

## 1.2 细胞的培养

选择正畸拔除的前磨牙, 利用组织块法原代培养HPDLF, 传代后大量扩增。常规培养MC3T3-E1细胞<sup>[9]</sup>。

## 1.3 样品的制备

将1.0 mL第6~10代的两种细胞按密度为每毫升 $5 \times 10^4$ 个分别接种在12孔板内, 培养至细胞融合后进行实验。以PBS液作为空白对照, 不加药的细胞组样品作为阴性对照, 米诺环素标准品作为阳性对照, 每组样本量为3。室温条件下0.01 mol/L的PBS快速洗涤细胞后, 将10、20、40  $\mu\text{g/mL}$ 的米诺环素溶液分别加入细胞培养皿, 室温下孵育1、5、10 min, 0.01 mol/L的室温PBS快速洗涤4次, 收集细胞。使用JY-92 超声波细胞粉碎机, 细胞悬液在冰浴中超声(功率为400 W, 作用3 s, 间隔4 s, 30次循环)破碎细胞。细胞裂解液高速离心, 吸取上清, 0.22  $\mu\text{m}$ 孔径滤膜过滤, 用于HPLC测量。上述实验条件及各种溶液均为室温(约25  $^{\circ}\text{C}$ )<sup>[9]</sup>。

## 1.4 色谱分析

所有实验在室内温度为(25  $\pm$  2)  $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为(60  $\pm$  20)%下完成。流动相经0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜真空负压过滤, 超声排气。色谱分析用Agilent 1100LC系统、紫外检测器、Agilent Eclipse XDB-C8分析柱(150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流速为1.0 mL/min, 进样10  $\mu\text{L}$ 。米诺环素流动相是0.2 mol/L醋酸铵—N, N-二甲基甲酰胺—四氢呋喃(600 398 2, 含0.01 mol/L乙二胺四醋酸二钠), 波长280 nm<sup>[10]</sup>。根据《中华人民共和国药典》的要求, 计算米诺环素的平均回收率、平均相对标准偏差、日内相对标准偏差、日间相对标准偏差<sup>[10]</sup>。

## 1.5 蛋白测量

将新鲜配制的考马斯亮蓝染液与细胞裂解液混匀静置10 min, DU640紫外分光光度计在595 nm测定吸光度, 根据标准品浓度得到标准曲线, 计算样品蛋白质浓度<sup>[9]</sup>。每个样品重复测3次得到平均蛋白浓度。

## 1.6 统计学方法

采用绝对校正曲线法, 通过峰面积定量计算样品的药物浓度。根据样品的药物浓度、细胞蛋白质浓度以及体积, 计算细胞内药物含量/蛋白( $\text{ng}/\mu\text{g}$ )。统计处理采用方差分析和/或t检验( $\alpha=0.05$ )

## 2 结果

### 2.1 米诺环素色谱学指标

米诺环素药品的标准品及实验所得样品的主成分峰的保留时间均为10.692 min, 进样峰未对主成分峰产生影响, 分离度良好(图1)。阴性对照、空白对照在米诺环素的保留时间附近均未出峰(图2)。

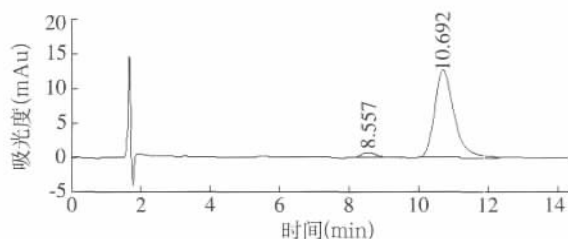


图1 米诺环素标准品和样品色谱图

Fig 1 The standard and specimen chromatography of minocycline

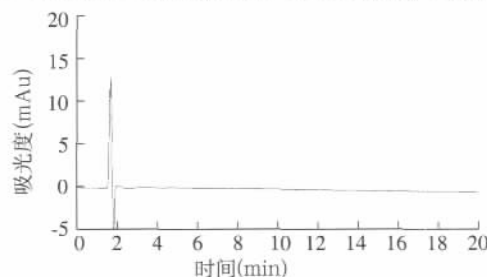


图2 米诺环素阴性对照色谱图

Fig 2 The negative control chromatography of minocycline

以药物浓度( $\text{ng/mL}$ )为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 回归方程为 $Y=0.011\ 170\ 31X+0.536\ 037\ 7$ (图3)。最低检测限1 ng(信噪比 3)。浓度在100~2 000  $\text{ng/mL}$ 时, 线性关系良好, 相关系数( $r$ )为0.999 06。

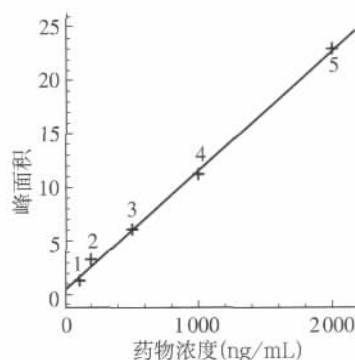


图3 米诺环素线性关系

Fig 3 The linearity of minocycline between concentration and peak area

准备3种不同浓度(分别为0.2、1.0、2.0  $\mu\text{g/mL}$ , 每种浓度各制备3份)标准品进行测定, 平均回收率为98.5%, 平均相对标准偏差为2.65%(表1)。取一份样品连续进样5次测试重复性, 平均相对标准偏差是2.12%。在同一天内以一定时间间隔多次测定标准品溶液, 日内相对标准偏差是1.91%( $n=4$ ), 日

间相对标准偏差2.74%(n=3)。

表 1 米诺环素回收率

Tab 1 The recovery rate of minocycline

投入量(μg/mL)	实测量(μg/mL)	回收率(%)	相对标准偏差(%)
0.2	0.197 ± 0.007	98.5	3.55
1.0	0.995 ± 0.024	99.5	2.41
2.0	1.948 ± 0.039	97.4	2.00

## 2.2 孵育时间和细胞外药物浓度对细胞内药物含量的影响

20 μg/mL米诺环素孵育时, HPDLF细胞内药物含量随时间增加而增多(表2)。两因素析因方差分析表明, 总变异的来源是时间因素( $P < 0.01$ )和细胞种类( $P < 0.01$ )。40 μg/mL米诺环素孵育5 min, HPDLF细胞内米诺环素含量是( $2.155 \pm 0.728$ ) ng/μg, 高于20 μg/mL组, 但两组间差异无统计学意义。10、20、40 μg/mL米诺环素孵育5 min, MC3T3-E1细胞内米诺环素含量分别是( $0.751 \pm 0.265$ ) ng/μg、( $3.331 \pm 0.538$ ) ng/μg、( $3.188 \pm 0.636$ ) ng/μg, 3组间有统计学差异( $P < 0.01$ , 单因素方差分析)。10 μg/mL显著低于其他两组数据, 但后两组间差异无统计学意义。

表 2 HPDLF和MC3T3-E1细胞内米诺环素含量 ng/μg

Tab 2 The intracellular contents of minocycline by HPDLF and MC3T3-E1 cell\$ ng/μg

细胞种类	细胞内米诺环素含量		
	1 min	5 min	10 min
HPDLF	1.661 ± 0.520	1.949 ± 0.415	2.154 ± 0.728
MC3T3-E1	1.532 ± 0.396	3.331 ± 0.538	2.811 ± 0.798

## 3 讨论

Christersson等<sup>[11]</sup>利用免疫荧光、透射电镜等技术, 观察牙周炎患者的牙龈结缔组织, 发现其胶原纤维间存在大量放线共生放线杆菌等主要牙周致病菌, 在细胞内也同样存在病菌。牙周组织细胞内微生物的存在使牙周炎的治疗复杂化。所以治疗细胞内的感染还需要筛选具有合适的细胞内药代动力学和细胞内药效学性质的抗生素。因此, 本研究观察HPDLF对牙周常用抗生素之一的米诺环素的转运。

对每天口服200 mg米诺环素的牙周病患者连续监测8 d, 血药浓度范围为1.02~3.26 μg/mL, 龈沟液药物浓度范围为5.26~15.50 μg/mL<sup>[12]</sup>。所以本研究在确定细胞外液药物工作浓度时, 确定了20 μg/mL为主要工作浓度。同时观察了其他浓度条件下细胞对米诺环素的转运。该浓度远低于引起细胞生物学活性发生改变的浓度<sup>[13]</sup>, 而且本实验观察时间短暂。

本研究中使用辛烷基硅烷(C8)键合硅胶为填充

剂, 除十八烷基硅烷(C18)以外, C8是应用最广泛的填充剂。单层的、中等疏水性的C8键合到球型的多孔硅胶上, 由于分子尺寸较小, 碳链短, 与硅胶表面的游离羟基键合时可以有比C18等长链烷基更高的覆盖和较少的残余羟基, 键合相的非极性作用的面积也相应减少, 降低了对溶质分离的选择性。对于复杂的多种成分的混合物, C8的分离效果比C18差。但是如果遇到性质差别比较大的样品或者单一/简单组分的样品, 或者对中性或其他具有很强保留能力的化合物进行分离时, C8比C18的效率、保留时间短<sup>[10]</sup>。在本研究中, 样品的成分相对单一, 而且米诺环素的极性小, 另外Agilent Eclipse XDB-C8分析柱在较宽的pH值范围内稳定性好, 分离度好, 重现性佳, 所以采用C8柱检测米诺环素。

Yang等<sup>[8]</sup>研究牙龈成纤维细胞对米诺环素的转运, 结果表明转运是饱和的、温度依赖的, 其转运动力学特征符合米氏方程。本实验由于检测时间点的限制, 数据量较少, 未采用Lineweaver-Burk法(双倒数作图法)将数据作转换。本实验结果表明, HPDLF细胞内检测出的药物含量随时间增加而增加, 作用10 min时药物含量略高于作用5 min时的药物含量, 但是二者间差异无统计学意义。而Yang等<sup>[8]</sup>的结果是二者间差异有统计学意义。他们使用的是荧光检测法, 反映药物含量的指标是细胞内的药物浓度和细胞内药物质量与细胞蛋白的比值。本实验使用的是HPLC, 药物测量的指标只有细胞内药物质量与细胞蛋白的比值, 上述研究手段<sup>[14]</sup>和观测参数<sup>[15]</sup>都是国际通用的方法。上述研究结果的差异究竟是由于实验误差、操作的因素、方法学差异还是细胞生物学性质的差异所致, 需进一步研究。

另外, 本实验还证实HPDLF和MC3T3-E1对米诺环素的转运与细胞外液的药物浓度有一定的关系。细胞外液药物浓度高的时候, 向细胞内转运的量比较大。Brayton等<sup>[7]</sup>研究了SCC-25口腔鳞状细胞癌上皮细胞系对米诺环素的转运, 获得了类似的实验结果。当细胞外液的药物浓度增加至10倍的时候, 细胞内米诺环素的药物浓度增加至12.5倍。

Brayton等<sup>[7]</sup>和Yang等<sup>[8]</sup>的研究结果还提示, 转运达到稳定状态时, SCC-25口腔鳞状细胞癌上皮细胞系和人牙龈成纤维细胞的细胞内外米诺环素的浓度比值则分别是50倍和61倍, 这表明不同种属、不同性质的细胞对于某种药物的转运存在差异。对甲硝唑和替硝唑的研究也证明了这种规律<sup>[9]</sup>。在本实验中, HPDLF与MC3T3-E1对米诺环素跨细胞膜的转运也存在一定的差异性。

与HPDLF对盐酸四环素的转运相比较, 同等作



用时间(5 min)、同等细胞外液的药物浓度(20、40  $\mu\text{g/mL}$ )的两种条件下,细胞内米诺环素的含量都要高于盐酸四环素的含量<sup>[7-8]</sup>。其机理是否与药物的结构有关,还是存在其他原因,目前尚不明确。

米诺环素的转运机理较为复杂,可能存在着多种机制。研究发现,佛波醇-肉豆蔻酸-醋酸盐(phorbol-myristate-aceta, PMA)可以显著增加牙龈成纤维细胞对米诺环素的转运<sup>[16]</sup>。PMA属于佛波醇酯,通过非受体依赖的方式激活蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)。这表明PKC在促进转运中起重要作用。PKC广泛参与细胞信号传递、调节细胞增殖分化、蛋白质磷酸化和细胞对生长因子的应答等多种生理、生化及病理过程。但是激活PKC后的下游反应还不明确。Gabler<sup>[17]</sup>发现二价阳离子和蛋白质单独或者联合存在都可以抑制中性粒细胞对多西环素等四环素族药物的跨细胞膜转运。缺乏钠离子会抑制米诺环素在口腔鳞状细胞癌上皮细胞系和人牙龈成纤维细胞的转运,安定、腺嘌呤、罂粟碱、组胺、苯肾上腺素等有机阳离子,以及同族药物四环素/多西环素存在竞争性抑制作用,其原因可能是米诺环素的结构中存在带阳离子的伯胺和叔胺基团,其转运载体可能属于具有广泛底物特异性的有机阳离子转运载体家族<sup>[7-8]</sup>。Babu等<sup>[18]</sup>研究发现米诺环素能显著抑制人有机阴离子转运多肽(human organic anion transporters, hOATs)的hOAT1和hOAT2对有机阴离子的转运,推测hOATs在米诺环素的转运和向细胞外释放的过程中也有重要作用。另外,米诺环素是脂溶性的,其转运也可通过自由扩散。以上研究结果说明不同细胞以及在细胞的不同状态下,米诺环素的转运存在多种途径。对于米诺环素的转运机理,还需要进一步研究。

### [参考文献]

- [1] Rodrigues RM, Goncalves C, Souto R, et al. Antibiotic resistance profile of the subgingival microbiota following systemic or local tetracycline therapy[J]. J Clin Periodontol, 2004, 31(6):420-427.
- [2] Vandekerckhove BN, Quirynen M, van-Steenberghe D. The use of locally delivered minocycline in the treatment of chronic periodontitis. A review of the literature[J]. J Clin Periodontol, 1998, 25(11Pt2):964-968.
- [3] Oringer RJ, Al-Shammari KF, Aldredge WA, et al. Effect of locally delivered minocycline microspheres on markers of bone resorption[J]. J Periodontol, 2002, 73(8):835-842.
- [4] 刘洪臣. 人工种植牙全身给药系统的设计[J]. 口腔颌面修复学杂志, 2006, 7(4):291-292.  
LIU Hong-chen. Design of a new system to give medicine through the dental implant[J]. Chin J Prosthodont, 2006, 7(4):291-292.
- [5] 刘洪臣. 牙根管全身给药假说[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2007, 5(1):2-3.  
LIU Hong-chen. Hypothesis on delivering medicine to the whole body through the root canal[J]. Chin J Geriatric Dent, 2007, 5(1):2-3.
- [6] 刘宇, 刘洪臣. 牙周组织细胞对牙周病常用药物的跨膜转运[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2007, 5(2):123-126.  
LIU Yu, LIU Hong-chen. The biological transport of medicine for periodontal disease by cells of periodontium[J]. Chin J Geriatric Dent, 2007, 5(2):123-126.
- [7] Brayton JJ, Yang Q, Nakkula RJ, et al. An in vitro model of ciprofloxacin and minocycline transport by oral epithelial cells[J]. J Periodontol, 2002, 73(11):1267-1272.
- [8] Yang Q, Nakkula RJ, Walters JD. Accumulation of ciprofloxacin and minocycline by cultured human gingival fibroblasts[J]. J Dent Res, 2002, 81(12):836-840.
- [9] 刘宇, 刘洪臣, 吴霞, 等. 人牙周膜成纤维细胞对甲硝唑和替硝唑的转运[J]. 口腔颌面修复学杂志, 2007, 8(2):90-93.  
LIU Yu, LIU Hong-chen, WU Xia, et al. The transport of metronidazole and tinidazole in human periodontal ligament fibroblasts[J]. Chin J Prosthodont, 2007, 8(2):90-93.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005:507-508.  
Chinese national pharmacopoeia board. Chinese pharmacopoeia [M]. Beijing: Chemical Industrial Publishing Company, 2005:507-508.
- [11] Christersson LA, Albin B, Zambon JJ, et al. Tissue localization of Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontitis. I. Light, immunofluorescence and electron microscopic studies[J]. J Periodontol, 1987, 58(8):529-539.
- [12] Ciancio SG, Mather ML, McMullen JA. An evaluation of minocycline in patients with periodontal disease[J]. J Periodontol, 1980, 51(9):530-534.
- [13] 葛少华, 杨丕山, 赵宁, 等. 四环素对人牙周膜成纤维细胞的生物学作用[J]. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(5):376-378.  
GE Shao-hua, YANG Pi-shan, ZHAO Ning, et al. Biological effects of tetracycline on cultured human periodontal fibroblasts[J]. West China J Stomatol, 2004, 22(5):376-378.
- [14] Koga H. High-performance liquid chromatography measurement of antimicrobial concentrations in polymorphonuclear leukocytes[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1987, 31(12):1904-1908.
- [15] Monkkonen H, Tormalaht S, Asunmaa K, et al. Cellular uptake and metabolism of clodronate and its derivatives in Caco-2 cells: A possible correlation with bisphosphonate-induced gastrointestinal side-effects[J]. Eur J Pharm Sci, 2003, 19(1):23-29.
- [16] Walters JD, Nakkula RJ, Maney P. Modulation of gingival fibroblast minocycline accumulation by biological mediators[J]. J Dent Res, 2005, 84(4):320-323.
- [17] Gabler WL. Fluxes and accumulation of tetracyclines by human blood cells[J]. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1991, 72(1):39-51.
- [18] Babu E, Takeda M, Narikawa S, et al. Human organic anion transporters mediate the transport of tetracycline[J]. Jpn J Pharmacol, 2002, 88(1):69-76.

(本文编辑 王 晴)