

[文章编号] 1000-1182(2008)02-0215-04

# 苯妥英钠对人牙周膜成纤维细胞生物学活性影响的实验研究

于美娇, 杨丕山, 葛少华

(山东大学口腔医院 牙周病科, 山东 济南 250012)

**[摘要]** 目的 研究苯妥英钠(PHT)对体外培养的人牙周膜成纤维细胞(hPDLF)生物学功能的影响,并探讨其用于促进牙周组织再生的可能性。方法 将不同质量浓度的PHT(1、5、20、100、500、2 500 mg/L)加入体外培养的第4代hPDLF,检测其对细胞增殖活性、蛋白合成、碱性磷酸酶(ALP)活性的影响;Von Kossa染色法检测PHT(20、100、500 mg/L)对第4代hPDLF矿化结节形成能力的影响;应用ELISA法测定PHT(20、100 mg/L)对第3代hPDLF中骨形态发生蛋白-2(BMP-2)表达的影响。结果 在20、100 mg/L的质量浓度时,PHT可显著促进hPDLF的增殖及分化( $P<0.01$ );在质量浓度100 mg/L时,PHT可增强hPDLF的蛋白合成( $P<0.05$ );同时,PHT在质量浓度100 mg/L可显著促进hPDLF的矿化能力及BMP-2的表达( $P<0.01$ )。但高质量浓度(2 500 mg/L)的PHT则严重抑制细胞的生物学活性。结论 适当质量浓度的PHT对hPDLF的增殖和分化有促进作用,但过高质量浓度的PHT具有细胞毒性,不利于牙周组织的修复和再生。

**[关键词]** 苯妥英钠; 牙周膜成纤维细胞; 细胞培养; 矿化

**[中图分类号]** R781.4 **[文献标识码]** A

Biological effects of phenytoin on cultured human periodontal ligament fibroblasts in vitro YU Mei-jiao, YANG Pi-shan, GE Shao-hua. (Dept. of Periodontology, School of Stomatology, Shandong University, Jinan 250012, China)

**[Abstract]** Objective To study the biological effects of phenytoin(PHT) on cultured human periodontal ligament fibroblasts(hPDLF), and explore the possibility of its accelerating periodontal regeneration. Methods Increasing concentrations of PHT (1, 5, 20, 100, 500, 2 500 mg/L) were added into the medium of the fourth passage of cultured hPDLF, respectively. After co-incubated for 3 days, cell proliferation activity, the total amount of protein and alkaline phosphatase(ALP) activity were detected. Mineralized sodium and PHT(20, 100, 500 mg/L) were added into the medium of the fourth passage hPDLF. After co-incubated, the mineralized nodules formation were detected by Von Kossa staining. The third passage hPDLF were stimulated by PHT(20, 100 mg/L), bone morphogenetic protein-2(BMP-2) concentration was analyzed by enzyme linked immunosorbent sandwich assay(ELISA). Results At the concentration of 20 or 100 mg/L, PHT significantly enhanced the proliferating activity and ALP activity of hPDLF ( $P<0.01$ ). PHT at 100 mg/L could increase protein synthesis of hPDLF( $P<0.05$ ). The capability of mineralization and BMP-2 expression of hPDLF were increased significantly( $P<0.01$ ) in 100 mg/L group when compared with that in the control group. However, higher concentration(2 500 mg/L) not only changed cell morphology, but also significantly inhibited cell activity. Conclusion The results suggested that proper doses of PHT could promote proliferation and biosynthesis and also enhance osteogenesis by increasing the differentiation, mineralization and BMP-2 expression of hPDLF while higher concentrations of PHT had cytotoxic effect.

**[Key words]** phenytoin; periodontal ligament fibroblasts; cell culture; mineralization

苯妥英钠(phenytoin, PHT)自1938年首次作为

抗癫痫药物被应用于临床以来,已广泛应用于心血管、神经系统疾病的治疗。不仅如此,PHT局部用药在创伤愈合中的积极作用也被许多临床病例所验证,例如糖尿病足溃疡、创伤、褥疮性溃疡、静脉淤积性溃疡等<sup>[1]</sup>。研究表明,PHT对动物成骨细胞、巨噬细胞及人正常牙龈成纤维细胞等的增殖和分化

[收稿日期] 2007-10-24; [修回日期] 2007-12-05

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30371537);山东省自然科学基金资助项目(21350000413011)

[作者简介] 于美娇(1980-),女,山东人,硕士

[通讯作者] 杨丕山, Tel: 0531-88382368

有促进作用,但关于其对牙周膜成纤维细胞作用的研究很少。本研究拟在体外培养人正常的牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblasts, hPDLF)的基础上,研究PHT对其增殖活性、蛋白合成、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性、矿化结节的形成能力及骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)表达的影响,探讨其用于促进牙周组织再生的可能性。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要实验试剂和仪器

苯妥英钠(PHT)、-甘油磷酸钠、抗坏血酸、地塞米松以及对硝基苯基磷酸二钠(Sigma公司,美国);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所);DMEM培养基(Gibco公司,美国);人骨形成蛋白-2(BMP-2)ELISA试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);TritonX-100(上海生工生物工程有限公司);考马斯亮兰G-250(中国医药集团上海化学试剂公司)。

### 1.2 人牙周膜成纤维细胞的培养

收集临床因正畸拔除的健康年轻的前磨牙,刮下根中1/3部位的牙周膜组织,将其剪成1 mm×1 mm×1 mm的碎块,按组织块贴壁法,用含体积分数为15%胎牛血清的DMEM培养液,在37℃、体积分数为5%CO<sub>2</sub>条件下培养。待细胞长满瓶底的70%~80%时消化传代。细胞用免疫细胞化学ABC法染色,细胞表现为抗波丝蛋白阳性,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3、4代hPDLF用于实验。

### 1.3 苯妥英钠对人牙周膜成纤维细胞增殖的影响

将分析纯苯妥英钠粉用含体积分数为15%胎牛血清的DMEM培养液稀释成2 500、500、100、20、5、1 mg/L六个质量浓度。将第4代hPDLF以每升2×10<sup>7</sup>个接种于96孔板中,细胞在含体积分数为15%胎牛血清的DMEM培养液中培养24 h后,将各质量浓度组PHT加入96孔板中,每种质量浓度加5孔;对照组加含体积分数为15%胎牛血清的DMEM培养液,未加PHT,即PHT质量浓度为0 mg/L。继续培养3 d后,在倒置显微镜下观察细胞形态变化,MTT法测定不同质量浓度的PHT对细胞增殖的影响。

### 1.4 苯妥英钠对人牙周膜成纤维细胞ALP活性及总蛋白量的影响

将细胞用与1.3中相同的方法培养3 d后,弃去孔内液体,用pH值7.4的PBS液冲洗3次,吸干,每孔中加入100 μL体积分数为0.2%TritonX-100,振荡30 min,随后在倒置显微镜下观察,见细胞已破碎、

无完整的细胞结构后,进行以下处理以测定ALP活性和总蛋白量。

ALP活性测定:取50 μL上述液体加入含浓度为4 mmol/L对硝基苯基磷酸二钠的底物液50 μL,37℃孵育30 min后,加入浓度为1 mol/L的NaOH以终止反应,405 nm波长下测光密度值;hPDLF蛋白合成总量的测定:取20 μL上述液体加入考马斯亮兰染色液200 μL,振荡10 min,在波长595 nm处测光密度值。

### 1.5 苯妥英钠对人牙周膜成纤维细胞形成矿化结节的影响

取第4代hPDLF,以每毫升5×10<sup>4</sup>个接种于4个24孔板中,每孔液量为1 mL。24 h细胞贴壁后,弃去原培养液,无血清DMEM冲洗3遍后,对照组24孔板中每孔加入矿化液(用含体积分数为15%胎牛血清、浓度为10 mmol/L-甘油磷酸钠、浓度1×10<sup>-4</sup> mmol/L地塞米松、质量浓度为50 mg/L抗坏血酸的DMEM培养液)1 mL,实验组3块24孔板,分别加入矿化液、不同质量浓度PHT(20、100、500 mg/L)。每3 d换液1次,28 d终止培养后进行Von Kossa染色,并在倒置显微镜下观察矿化结节,记录矿化结节孔数和计算矿化率。

### 1.6 苯妥英钠对人牙周膜成纤维细胞中BMP-2表达的影响

采用双抗体夹心ELISA法进行实验。取第3代的hPDLF,以每毫升1×10<sup>6</sup>个接种于24孔板中,每孔液量1 mL。24 h细胞贴壁后,弃去原培养液,无血清DMEM冲洗3遍后,将上述实验的有效质量浓度(20、100 mg/L)的PHT分别加入24孔板中,每种质量浓度加6孔;对照组(6孔)加含体积分数为15%胎牛血清的DMEM培养液。继续培养24 h后,去除24孔板中的培养基,PBS液冲洗孔板,加入细胞裂解液,取裂解后样品离心,取上清液按照ELISA试剂盒的步骤进行测定。以波长450 nm在酶联免疫检测仪上测光密度值。以BMP-2标准品质量浓度为横坐标,光密度值为纵坐标(减去空白光密度值)绘制标准曲线。以样品光密度值减空白对照光密度值,将所得值在曲线上查对应的量,以pg/mL表示。

### 1.7 数据分析

运用SAS 6.12软件包,对hPDLF细胞增殖、ALP活性、总蛋白量及BMP-2表达量的数据,用单因素方差分析(ANOVA)对各组间的样本均数进行两两比较;各组之间矿化率数据用χ<sup>2</sup>检验进行比较。

## 2 结果

### 2.1 人牙周膜成纤维细胞形态变化

对照组细胞呈典型的成纤维细胞特征:长梭形

或纺锤形。在1、5、20、100 mg/L的质量浓度时，PHT对牙周膜成纤维细胞的形态无影响：细胞伸展良好，呈梭形的细长外观；当质量浓度升高到2500 mg/L时，呈现明显的细胞毒性效应，细胞形态发生改变：细胞皱缩，变圆，伸展差，不贴壁，部分呈悬浮状态。

## 2.2 苯妥英钠对人牙周膜成纤维细胞增殖的影响

MTT加入4 h后，各孔内有紫黑色针状结晶物形成，多少不等。PHT对hPDLF增殖活性影响的结果见表1。在20、100 mg/L的质量浓度时，PHT对hPDLF的增殖表现出显著的促进作用( $P<0.01$ )。但质量浓度为500 mg/L时，促增殖效应开始下降，在2500 mg/L时出现明显的细胞毒性，抑制细胞增殖( $P<0.01$ )。

表 1 不同质量浓度的PHT对hPDLF增殖活性、蛋白合成及ALP活性的影响  $n=5, \bar{x} \pm s$

Tab 1 Effects of different concentration PHT on the proliferation, the activity of ALP and protein synthesis of hPDLF  $n=5, \bar{x} \pm s$

PHT质量浓度(mg/L)	光密度值		
	增殖活性	ALP活性	蛋白合成总量
0(对照组)	0.208 0 $\pm$ 0.032 7	0.036 6 $\pm$ 0.002 7	3.404 0 $\pm$ 0.061 9
1	0.210 2 $\pm$ 0.023 3	0.035 2 $\pm$ 0.003 4	3.456 2 $\pm$ 0.027 8
5	0.211 8 $\pm$ 0.034 0	0.036 6 $\pm$ 0.008 7	3.596 2 $\pm$ 0.165 8
20	0.263 8 $\pm$ 0.017 5**	0.063 6 $\pm$ 0.007 0**	3.679 4 $\pm$ 0.218 5
100	0.278 8 $\pm$ 0.007 6**	0.069 0 $\pm$ 0.010 1**	3.881 2 $\pm$ 0.144 2*
500	0.195 4 $\pm$ 0.022 1	0.037 0 $\pm$ 0.011 9	3.688 2 $\pm$ 0.132 8
2 500	0.102 2 $\pm$ 0.044 5**	0.025 8 $\pm$ 0.004 2**	2.944 0 $\pm$ 0.5395**

注：与对照组比较，\* $P<0.05$ ；\*\* $P<0.01$

## 2.3 苯妥英钠对人牙周膜成纤维细胞蛋白合成的影响

PHT对hPDLF蛋白合成影响的测量结果见表1。质量浓度为100 mg/L的PHT可显著增加hPDLF的蛋白合成( $P<0.05$ )。质量浓度为2500 mg/L时蛋白合成受到显著抑制( $P<0.01$ )。

## 2.4 苯妥英钠对人牙周膜成纤维细胞ALP活性的影响

孵育30 min后，各孔内液体变为淡黄色，深浅不一，PHT对hPDLF的ALP活性的影响测量结果见表1。在20、100 mg/L的质量浓度时，PHT对hPDLF的ALP活性有显著促进作用( $P<0.01$ )；2500 mg/L时对ALP活性有显著抑制作用( $P<0.01$ )。

## 2.5 苯妥英钠对人牙周膜成纤维细胞形成矿化结节的影响

经Von Kossa染色hPDLF呈现黑褐色矿化结节，

测量结果见表2。4组之间矿化率的比较有显著性差异( $\chi^2=8.090\ 9, P=0.030\ 5$ )，而质量浓度100 mg/L时，与对照组相比，药物具有最大的促矿化作用( $P<0.01$ )。

表 2 不同质量浓度的PHT对hPDLF矿化结节形成能力的影响

Tab 2 Effects of different concentration PHT on the mineralized nodules formation of hPDLF

PHT质量浓度(mg/L)	接种细胞孔数	形成矿化结节孔数	矿化率(%)
0(对照组)	24	13	54.2
20	24	18	75.0
100	24	21	87.5**
500	24	13	54.2

注：与对照组比较，\*\* $P<0.01$

## 2.6 苯妥英钠对人牙周膜成纤维细胞BMP-2表达的影响

PHT对hPDLF中BMP-2表达影响的测量结果见表3。与对照组相比，在质量浓度20 mg/L时，PHT表现为促进hPDLF中BMP-2表达的作用( $P<0.05$ )。而质量浓度为100 mg/L时具有显著促进作用( $P<0.01$ )。

表 3 不同质量浓度的PHT对hPDLF中BMP-2表达的影响  $n=6, \bar{x} \pm s$

Tab 3 Effects of different concentration PHT on the expression of BMP-2 of hPDLF  $n=6, \bar{x} \pm s$

PHT质量浓度(mg/L)	BMP-2的质量浓度(pg/mL)
0(对照组)	3 516.546 7 $\pm$ 315.475 1
20	4 222.658 3 $\pm$ 451.004 5*
100	4 716.486 7 $\pm$ 421.958 8**

注：与对照组比较，\* $P<0.05$ ；\*\* $P<0.01$

## 3 讨论

1939年，Kimball首次发现服用PHT的患者出现牙龈增生，这一现象提示PHT用于创伤愈合的可能性。之后，Shapiro于1958年临床试验发现，口服PHT的牙周病患者接受牙周手术后，手术创口很少有炎症和疼痛感，并且与对照组相比，愈合速度也加快，说明PHT有明显的促愈合作用。这一结果引起了世界各国学者的注意，并就其促进创伤愈合的作用及机制作了深入的研究，证实PHT能用于各种创伤的治疗，同时它还兼有防辐射的作用<sup>[2]</sup>。体外实验中，亦有学者<sup>[3]</sup>发现PHT能促进人下颌骨来源的成骨细胞的增殖活性、ALP活性、胶原合成及血清游离钙的分泌。上述一定程度上可推理出PHT用于牙周组织再生的可能性，而本实验也证明了这一点。PHT在一定的质量浓度时能显著提高hPDLF的生物



学活性,但质量浓度过高则有细胞毒性作用。

hPDLF是牙周再生的主要细胞,其增殖是牙周创伤修复和组织再生的重要过程<sup>[4]</sup>。本研究用MTT法检测了苯妥英钠对细胞增殖的影响,表明在20、100 mg/L质量浓度时,PHT对hPDLF增殖有明显促进作用。不仅如此,在测定PHT对hPDLF总蛋白表达的影响上,本研究也得到了近乎一致的结果,质量浓度100 mg/L的PHT可显著增加hPDLF蛋白合成。

本研究中,PHT在质量浓度20、100 mg/L时对hPDLF的ALP水平有显著促进作用。hPDLF向成骨细胞、成牙骨质细胞的分化是牙周再生过程中的关键环节,而ALP作为成骨细胞的一种特异表型是成骨细胞早期分化的一个重要指标。ALP活性的高低能比较客观地反映成纤维细胞向成骨细胞或成牙骨质细胞转化的趋势。同时,矿化结节的形成是成骨细胞分化成熟的标志,本实验得出,4组之间矿化率的比较统计学上有显著性差异。而质量浓度20 mg/L时,矿化率高于对照组,但统计学上没有显著性差异,可能是样本例数过少,存在统计处理误差;质量浓度100 mg/L时,与对照组相比,药物具有最大的促矿化作用。上述提示了PHT可促进hPDLF向成骨细胞方向分化。

BMP-2是转化生长因子-(transforming growth factor-, TGF-)超家族成员之一,对靶细胞的生长、分化以及凋亡具有调控作用。BMP-2具有很强的促进成骨的功能,能诱导间充质细胞分化为成骨细胞和骨细胞,促进钙化作用,产生钙化的骨基质<sup>[5]</sup>。很多实验研究表明,BMP在骨形成过程中发挥重要作用。BMP-2用于培养的牙周膜细胞后,能引起细胞增殖和碱性磷酸酶活性增强<sup>[6]</sup>;牙根面上牙周膜细胞附着和增殖数量少、细胞生长状态较差的牙周病患者经BMP作用后,牙周膜细胞数量明显增多<sup>[7]</sup>,提示BMP在牙周组织的修复和重建中起一定的作用。而本研究表明,在质量浓度20、100 mg/L时PHT具有促进hPDLF中BMP-2表达的作用。

目前,用于促进牙周再生的药物很少。外源性生长因子对hPDLF有剂量依赖性增强效应,对牙周组织有选择性趋化作用,能调节和促进牙周组织的修复<sup>[8]</sup>。但外源性的生长因子半衰期短,局部使用很快被稀释和代谢,故需反复大剂量使用,而且价格非常昂贵。目前生长因子的缓释虽然取得了一定的进步,但离临床需要还有很大的距离。近几年,国内外学者对釉基质蛋白(enamel matrix proteins, EMP)进行了大量的研究并取得了较大的进展。Emdogain为釉基质衍生物(enamel matrix derivative,

EMD)与其相应载体的结合物,是商品化的EMD。大量的研究表明其局部应用对牙周组织再生起促进作用,并且临床验证具有极低的免疫原性,安全性较高<sup>[9]</sup>。但其抗菌作用未得到更多的临床实验研究的支持,并且价格昂贵。大量的研究表明,PHT局部用药几乎无系统性的吸收<sup>[10]</sup>,已用于各种创伤的治疗,特别是一些难愈性创伤,而且其价廉、安全、使用方便,除其钠盐有可忍耐的烧灼感外<sup>[11]</sup>,未见其他不适。再加上本研究结果,可以推测PHT能促进牙周新附着的形成,有利于牙周创伤的愈合和组织再生,其在牙周病治疗中的应用值得进一步研究。

### [参考文献]

- [1] Bhatia A, Prakash S. Topical phenytoin for wound healing[J]. Dermatol Online J, 2004, 10(1): 5.
- [2] Vijayasingham SM, Dykes PJ, Marks R. Phenytoin has little effect on in vitro models of wound healing[J]. Br J Dermatol, 1991, 125(2): 136-139.
- [3] Nakade O, Baylink DJ, Lau KH. Phenytoin at micromolar concentrations is an osteogenic agent for human-mandible-derived bone cells in vitro[J]. J Dent Res, 1995, 74(1): 331-337.
- [4] Kapila YL, Lancero H, Johnson PW. The response of periodontal ligament cells to fibronectin[J]. J Periodontol, 1998, 69(9): 1008-1019.
- [5] Sangkaew C. Distraction osteogenesis for the treatment of post-traumatic complications using a conventional external fixator. A novel technique[J]. Injury, 2005, 36(1): 185-193.
- [6] Zaman KU, Sugaya T, Kato H. Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and bone morphogenetic protein-2 application to demineralized dentin on early periodontal ligament cell response[J]. J Periodontol Res, 1999, 34(5): 244-250.
- [7] Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y, et al. Periodontal regeneration by FGF-2(bFGF) in primate models[J]. J Dent Res, 2001, 80(12): 2075-2079.
- [8] Zetterström O, Andersson C, Eriksson L, et al. Clinical safety of enamel matrix derivative(EMDOGAIN) in the treatment of periodontal defects[J]. J Clin Periodontol, 1997, 24(9 Pt 2): 697-704.
- [9] Pitaru S, Pritzki A, Bar-Kana I, et al. Bone morphogenetic protein 2 induces the expression of cementum attachment protein in human periodontal ligament clones[J]. Connect Tissue Res, 2002, 43(2/3): 257-264.
- [10] Anstead GM, Hart LM, Sunahara JF, et al. Phenytoin in wound healing[J]. Ann Pharmacother, 1996, 30(7/8): 768-775.
- [11] 岑瑛,俞宝梁,任林森,等.苯妥英外用治疗难愈性创面疗效观察[J].中国修复重建外科杂志,1992,6(1):16-17.  
CEN Ying, YU Bao-liang, REN Lin-sen, et al. The treatment effects of topical phenytoin on refractory wounds[J]. Chin J Reparat Reconstruct Surg, 1992, 6(1): 16-17.

(本文编辑 汤亚玲)