论著

文章编号:1000-5404(2008)16-1538-03

蜂胶对牙龈卟啉单胞菌及牙龈成纤维细胞的影响

蒋 琳,林居红,张红梅,朱立芬 (重庆医科大学附属口腔医院预防科,重庆 400015)

摘 要:目的 了解蜂胶对牙龈卟啉单胞菌(porphyromonas gingival,Pg)生长的抑制作用及对人牙龈成纤维细胞的毒性作用。**方法** 采用液体稀释法测定蜂胶对Pg的最小杀菌浓度(MBC),用MTT法测定不同浓度蜂胶作用24 h后牙龈成纤维细胞的细胞相对增殖率(RGR),了解蜂胶作用24 h后细胞连续7 d的增殖回复情况。**结果** 蜂胶对Pg的MBC为1.56 g/L,相当于0.125~0.25 mg/L的奥硝唑。蜂胶浓度为MBC时RGR达到70%以上;4 g/L蜂胶组的RGR为52.1%,作用细胞24 h后,连续7 d细胞数持续增加,吸光度逐渐接近阴性对照组。**结论** 蜂胶对Pg的生长有显著抑制作用,且细胞毒性较小,毒性作用可逆。

关键词:蜂胶;牙龈卟啉单胞菌;生长;人牙龈成纤维细胞;细胞毒性
中图法分类号:R780.1;R780.2;R781.4 **文献标识码**:A

Effect of propolis on porphyromonas gingival and human gingival fibroblast

JIANG Lin, LIN Ju-hong, ZHANG Hong-mei, ZHU Li-fen (Department of Preventive Dentistry, The Affiliated Stomatological Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400015, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of propolis on the growth of porphyromonas gingival (Pg) and its toxical influence on human gingival fibroblast (HGF). Methods Minimal bactericidal concentration (MBC) of propolis on Pg was determined by the fluid dilution method. The relative growth rates (RGR) and the proliferation status were determined by MTT assay after HGF was incubated in culture solution containing propolis for 24 h. Results MBC of propolis to Pg was 1.56 g/L, which was equal to 0.125 to 0.25 mg/L ornidazole. The RGR of HGF was more than 70% when propolis was 1.56 g/L. The number of HGF kept increasing for 7 d and approached negative control group after being treated by 4 g/L propolis, and RGR of HGF was 52.1 % after 24 h. Conclusion Propolis can significantly inhibit the growth of Pg, and its cytotoxical effect was weak and reversible. Its clinical application for periodontal diseases is highly valued.

Key words: propolis; porphyromonas gingival; growth; human gingival fibroblast; cytotoxicity

牙周病是口腔常见病和多发病。一种理想的牙周病治疗药物,不仅要有良好的抑制牙周致病菌的作用,还要有较小的细胞毒性作用[1,2]。蜂胶作为一种天然抗生素,具有悠久的应用和研究历史。近年来蜂胶对口腔病的防治作用受到人们的关注。本研究通过药敏实验和细胞毒性实验,了解蜂胶对牙龈卟啉单胞菌(porphyromonas gingival,Pg)的体外生长抑制作用及对人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblast,HGF)的毒性作用,旨在为蜂胶在牙周病治疗方面的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物 水溶性固体蜂胶(河南长葛市晟源蜂业有限公司,纯度达98%,黄酮类化合物总含量≥140 g/kg,含铅量<1 mg/kg),奥硝唑原药(西安博华制药有限公司提供,纯度达99%)。

1.1.2 细菌及培养基 Pg ATCC33277由四川大学华西口腔医学院生物医学工程教育部重点实验室提供。液体培养基:

基金项目:重庆市卫生局科研项目(07-2-50)
Supported by the Project of Chongqing Bureau of Public Health (07-2-50)
作者简介:蒋 琳,女,重庆市人,硕士研究生,主要从事牙周病治疗方面的研究。电话:15922650133,E-mail: jiangliner2008@163.com
通信作者:林居红,电话:(023)89035821-8401,E-mail:juhonglin@sina.com
收稿日期:2007-07-24;修回日期:2007-11-18

采用牛心脑浸液(BHI)培养基,使用时添加 Vitk1-Hemin 液(1%)。固体培养基:BHI 血琼脂培养基。

1.1.3　细胞及培养基　　第3 代 HGF 由四川大学华西口腔医学院细胞教研室提供,免疫组化染色鉴定细胞的组织来源。DMEM 细胞培养基、胎牛血清和胰蛋白酶(含有 EDTA)均由海克隆生物化学制品(北京)有限公司提供。

1.2　体外抑菌实验

菌液的制备:菌冻干株经复苏、增菌、形态学检查及生化鉴定为纯培养后。采用麦氏比浊法用 BHI 培养基配成细菌混悬液[(10^6 ~ 10^7) CFU/ml]备用。液体稀释法测定蜂胶与奥硝唑对 Pg 的最小杀菌浓度(minimal bactericidal concentration, MBC):用 BHI + Hemin 液体培养基按试管 2 倍稀释法将蜂胶稀释成:100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78 g/L。以同样的方法将奥硝唑稀释成:256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 3 mg/L。每个试管加入 0.5 ml 标化的菌液。将每个试管的培养液划线接种于 BHI 血琼脂平板上,每种浓度重复 3 次。经厌氧培养 48 h 无细菌生长的最低药物浓度为 MBC。设立阴性对照组和阳性对照组。

1.3　细胞毒性实验

1.3.1　药物浓度配制　　参考蜂胶 MBC 测定结果,先用三蒸水将水溶性固体蜂胶配成 100 g/L 的蜂胶溶液,0.2 μm 的无菌滤器过滤,再用含 100 ml/L 胎牛血清的 DMEM 培养液将其稀释成 0.5、1、2、4 g/L 4 个浓度以备用。

1.3.2　细胞相对增殖率(relative growth rates,RGR)的测定

第 3 代细胞用 2.5 g/L 的胰酶消化,按 1∶2 传代。取第 5 代细胞,离心后用含 100 ml/L 胎牛血清的 DMEM 培养液吹打成单细胞悬液,调整细胞数至 2×10^7/L,接种于 96 孔板,每孔 100 μl,一共 15 孔,设 A1 孔为空白对照孔,加 100 μl 不含细胞的培养液。培养 24 h,镜下观察大多数 HGF 贴壁并伸展,弃去孔内液体及不贴壁的细胞。将各稀释药液加入 96 孔板中,每种加 3 孔,每孔 100 μl;阴性对照组 3 孔加含 100 ml/L 胎牛血清的 DMEM 培养液,每孔 100 μl。96 孔板置 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 24 h 后,于每孔中加入 5 g/L 的 MTT 20 μl,继续培养 4 h,吸去孔内培养液,每孔加入 150 μl DMSO,振荡 10 min,于 490 nm 波长下测吸光度值[D(490)]。计算 RGR。RGR(%) = 实验组 D(490)值/阴性对照组 D(490)值 × 100% 。按 5 级毒性分级法[3]给细胞毒性分级,RGR ≥ 100% 为 0 级,RGR 75% ~ 99% 为 1 级,RGR 50% ~74% 为 2 级,RGR 25% ~49% 为 3 级,RGR 1% ~24% 为 4 级,RGR = 0 为 5 级。

1.3.3　蜂胶作用 24 h 后细胞生长曲线的测定　　取第 6 代细胞,以 2×10^7/L 细胞数接种于 96 孔板,每孔 100 μl,每 6 孔为 1 组,一共 8 组。培养 24 h,镜下观察大多数 HGF 贴壁并伸展,弃去孔内液体及不贴壁的细胞。根据蜂胶 RGR 测定结果,选择 RGR 约为50% 的浓度组加入96 孔板中,加3 孔,每孔 100 μl;阴性对照组 3 孔加含 100 ml/L 胎牛血清的 DMEM 培养液,每孔 100 μl。培养 24 h 后,选择第 1 组用 MTT 法(同 1.3.2)测定 D(490)值。其余 7 组弃去含药培养液,换上新鲜含 100 ml/L 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养,连续7 d,每天选择 1 组进行 D(490)值测定。

1.4　统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　体外抑菌实验结果

当蜂胶浓度≥1.56 g/L 时,就无细菌生长(表 1)。奥硝唑对 Pg 的 MBC 为 0.125 ~ 0.25 mg/L。

表 1　蜂胶对 Pg 的 MBC 值

细菌	蜂胶浓度(g/L)							
	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78
Pg	–	–	–	–	–	–	–	+

"–":无细菌生长;"+":有细菌生长

2.2　RGR 结果及毒性分级

根据表 1,在蜂胶 MBC 1.56 g/L 上下波动选择 4 个浓度进行实验。由表 2 可知随着药物浓度降低,RGR 趋于 100%,毒性级别趋于 0 级。0.5 g/L 蜂胶的 RGR 为(93.9 ± 0.9)%,毒性级别为 1;4 g/L 蜂胶的 RGR 为(52.1 ± 1.4)%。蜂胶各组之间比较均有统计学差异(F = 203.21, P < 0.05)。

表 2　蜂胶各浓度组和对照组 OD 值及 RGR 和毒性分级(n = 3, $\bar{x} \pm s$)

组别		D(490)值	RGR(%)	毒性级别
蜂胶(g/L)	0.5	0.200 ± 0.002[a]	93.9 ± 0.9[a]	1
	1	0.163 ± 0.004[a]	76.5 ± 1.9[a]	1
	2	0.151 ± 0.007[a]	70.9 ± 3.3[a]	2
	4	0.111 ± 0.003[a]	52.1 ± 1.4[a]	2
阴性对照组		0.213 ± 0.012	100	0

a: P < 0.05,与阴性对照组比较

根据 RGR 结果(表 2),选择 4 g/L 的蜂胶进行细胞回复情况的测定。连续 7 d D(490)值测定结果见表3。蜂胶各时间点比较,有统计学差异(F = 176.78, P < 0.05);对照组各时间点比较也有统计学差异(F = 319.18, P < 0.05)。

表 3　4 g/L 蜂胶作用细胞 24 h 后连续 7 d 吸光度值 [D(490), n = 3, $\bar{x} \pm s$]

组别	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
4 g/L 蜂胶	0.095 ± 0.013[a]	0.161 ± 0.017[a]	0.276 ± 0.022[a]	0.300 ± 0.011[a]	0.354 ± 0.015[a]	0.406 ± 0.017[a]	0.471 ± 0.015[a]	0.561 ± 0.015[a]
阴性对照组	0.201 ± 0.014	0.259 ± 0.023	0.331 ± 0.014	0.355 ± 0.014	0.533 ± 0.007	0.543 ± 0.007	0.584 ± 0.009	0.606 ± 0.008

a: P < 0.05,与阴性对照组比较

3 讨论

随着药物学及牙周病学的发展,牙周病治疗药物越来越多。而牙周病作为一种发生于牙周支持组织的感染性疾病,各种牙周抗菌药物的研究也得到人们的重视[1,2]。近年来蜂胶作为一种天然抗生素,在牙周病的防治领域日益得到关注。Santos 等[4]报道,蜂胶对9种口腔厌氧菌(具核梭形杆菌、坏死梭形杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌和迟缓真杆菌等)均有不同程度的抑菌作用。Boyanova 等[5]研究发现,蜂胶能够抑制数十种厌氧菌的生长。鉴于来源的地域差异性,蜂胶在其成分及抗菌活性上均有所区别[6]。本实验将国产天然蜂胶纳入研究对象,研究其对 Pg 和 HFG 的影响作用,为其在牙周病治疗领域的深入研究提供一定的理论依据。

牙周病是一种多细菌感染性疾病,但近年来因 Pg 在成人慢性牙周炎等多种牙周疾病标本中的检出率较高而受到国内外学者的重视。目前已公认 Pg 是牙周炎的主要病原菌。本实验结果显示,1.56 g/L 的蜂胶就能够完全抑制 Pg 的生长,其体外抑菌作用与 0.125 ~0.25 mg/L 的奥硝唑相同。关于蜂胶抗菌作用的机制,一些学者进行了研究,认为蜂胶抗菌作用的有效成分主要是其所含的黄酮类化合物及多酚类[7];高良姜素、松针素和乔松素是确认的对细菌作用最强的黄酮类,黄酮类化合物能抑制自由基的形成[8]。也有研究说明从蜂胶中提出的单一成分(如黄酮类化合物)的抗菌作用不如总提取物,认为蜂胶的抗菌作用可能是其所含多种成分共同作用的结果[9]。Takaisi 等[10]报道蜂胶可通过阻止细胞分化抑制细菌的生长;还能破坏细胞膜和细胞质的有序状态,引起部分溶菌和抑制细菌蛋白质的合成。

成纤维细胞是牙周组织中最多、功能上最重要的细胞,任何原因所造成的成纤维细胞功能上的破坏,都能导致牙支持组织的丧失。蜂胶对 HFG 细胞毒性实验的结果显示,0.5、1、2、4 g/L 蜂胶组的 RGR 分别为(93.9 ± 0.9)%、(76.5 ± 1.9)%、(70.9 ± 3.3)%、(52.1 ± 1.4)%。当蜂胶浓度为 1.56 g/L,即 MBC 时的 RGR 达到 70% 以上。4 g/L 蜂胶对细胞作用 24 h 后,换上新鲜培养液,随着时间的推移,光密度值逐渐趋向于阴性对照组,表明 ≤4 g/L 的蜂胶作用后的细胞回复情况较好,细胞毒性作用可逆。国外学者 Al-Shaher 等[11]报道,4 g/L 蜂胶对牙周膜成纤维细胞的 RGR 在 75% 以上。Martin 等[12]报道,蜂胶毒性小,使用安全,对牙周膜有很好的保护作用,是良好的离体牙保存液,本研究也证实了蜂胶具有较小的细胞毒性,并且本实验对细胞毒性的评定是在体外进行的,药物直接与细胞接触,其环境与口腔环境不同,所以直接在体外测得的药物毒性往往比体内测试的结果要高。

牙周局部用药是治疗牙周病的重要辅助手段,而一种理想的牙周病局部治疗药物,既要达到良好的抑菌效果,阻断牙周病始动因子的作用,又要保护牙周组织,具有较小的细胞毒性作用。蜂胶对牙周病主要致病菌 Pg 具有良好的生长抑制作用,同时表现出较小的牙龈成纤维细胞毒性作用。目前牙周病问题仍然突出,蜂胶作为一种天然的牙周病局部用药,具有广阔的应用前景。

参考文献:

[1] 段延华, 刘鲁川, 蒋 艳, 等. 奥硝唑联用培氟沙星对牙周病原菌体外抗菌活性研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(7): 638 - 640.

[2] 杜蕴红. 药物辅助治疗牙周炎的临床疗效分析[J]. 中华中西医学杂志, 2008, 6(3): 65 - 66.

[3] Willershausen B, Marroquin B B, Schafer D, *et al*. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines[J]. J Endod, 2000, 26(12): 703 - 707.

[4] Santos F A, Bastos E M, Uzeda M, *et al*. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria[J]. J Ethnopharmacol, 2002, 80(1): 1 - 7.

[5] Boyanova L, Kolarov R, Gergova G, *et al*. *In vitro* activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria[J]. Anaerobe, 2006, 12(4): 173 - 177.

[6] Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, *et al*. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition [J]. Phytomedicine, 2005, 12(3): 221 - 228.

[7] Kosalec I, Pepeljnjak S, Bakmaz M, *et al*. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products[J]. Acta Pharm, 2005, 55(4): 423 - 430.

[8] Burdock G A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis[J]. Food Chem Toxicol. 1998, 36: 347 - 363.

[9] 王 晶, 李玉晶, 张春梅, 等. 蜂胶抑制变形链球菌生长和粘附的体外研究[J]. 北京口腔医学, 2002, 10(2): 79 - 81.

[10] Takaisi-Kikuni N B. Electron microscopic and microcalomitric investigions of the possible mechanism of the anti-bacterial action of a defined propolis provenance[J]. PLanta Med, 1994, 60(3): 222 - 227.

[11] Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, *et al*. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament[J]. J Endod, 2004, 30(5): 359 - 361.

[12] Martin M P, Pileggi R. A quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion[J]. Dent Traumatol, 2004, 20(2): 85 - 89.

(编辑 郭建秀)