短篇论著

文章编号:1000-5404(2012)08-0792-03

蜂胶对人牙周膜成纤维细胞毒性及细胞回复能力的影响

蒋 琳,王金华,林居红,张红梅 (400015 重庆,重庆医科大学附属口腔医院口腔预防科)

[摘要] **目的** 体外研究蜂胶对人牙周膜成纤维细胞的细胞毒性及毒性的可逆性。**方法** 体外培养人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblasts,HPDLFs),选用蜂胶为实验组,碘酚溶液和奥硝唑溶液为药物对照组,培养基作为空白对照组,分别与HPDLFs接触进行细胞培养24 h,用MTT法测定细胞相对增殖率(RGR),更换新鲜培养基继续培养细胞24 h,测定细胞回复度。**结果** 3种药物随着药物浓度的增加,细胞相对增殖率均成下降趋势,同种药物不同浓度间比较,差别具有统计学意义($P<0.05$)。所选浓度的蜂胶和奥硝唑细胞毒性为1~2级,而对照药物碘酚细胞毒性为4级。更换新鲜培养基继续培养细胞24 h后,蜂胶组和奥硝唑组细胞回复度均大于80%,表现出较小的细胞毒性;而碘酚组回复度小于30%,表现出一定的细胞毒性。**结论** 蜂胶对HPDLFs具有较小的细胞毒性,且毒性可逆。

[关键词] 蜂胶;人牙周膜成纤维细胞;细胞毒性;细胞回复能力
[中图法分类号] R781.4;R965 [文献标志码] A

随着药物学和牙周病学的发展,牙周病治疗药物越来越多。近年来,蜂胶因其具有广泛的生物学活性和药理作用得到人们的关注,并逐渐被引进口腔疾病的研究领域。以往研究发现蜂胶对人牙龈成纤维细胞的毒性较小,细胞回复情况较好[1-2]。在此基础上,本实验通过体外细胞培养法,观察蜂胶对人牙周膜成纤维细胞的细胞毒性及细胞回复度,并以碘酚及奥硝唑为对照药物,进一步探讨蜂胶作为牙周病局部用药的安全性,为蜂胶在临床上的开发应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

水溶性固体蜂胶:由河南长葛市晟源蜂业有限公司提供,纯度达98%,黄酮含量≥14,含铅<1 ppm。奥硝唑原药:由西安博华制药有限公司提供,纯度达99%。碘酚配制[3]:碘50 g,苯酚50 g。取碘及苯酚置干燥有塞烧瓶中,在水浴上加热(不超过70 ℃),振摇至碘全部溶解即得,避光密闭保存。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM细胞培养基、胎牛血清和0.25%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;四甲基偶氮唑盐(MTT,美国Sigma公司),二甲基亚砜(DMSO,分析纯,北京化工厂产品);标准型细胞培养板(美国Corning公司);二氧化碳细胞培养箱(上海仕博生物技术有限公司北京分公司,型号:BBGP系列);倒置相差显微镜(日本Olympus CK型)高速低温离心机(德国Sigma公司,型号:1-15K);超净工作台(苏州工业园区三兴净化科技有限公司,型号:YJ900);酶标仪(Bio-Rad,型号:550)。

1.3 人牙周膜成纤维细胞的培养及传代

标本取自2011年1-3月重庆医科大学附属口腔医院颌面外科门诊部,因正畸需要拔除的前磨牙,将新鲜拔除的牙齿立即放入含有双抗的DMEM培养液中,在超净工作台内,刮取根中部1/3牙周膜组织,用培养液反复清洗3次后,用牙科探针将其均匀分布在25 ml培养瓶底。倒置培养瓶,加入3 ml含体积分数为10%胎牛血清、100 mg/L青霉素及100 mg/L链霉素的DMEM培养液,置二氧化碳培养箱,于37 ℃,体积分数5% CO_2条件下培养4 h,待组织块贴壁后,缓慢翻转培养瓶,继续培养。每3天换液1次,待细胞达到汇合点时,用0.25%的胰酶消化,按1:2传代。原代培养的HPDLFs传至第3代,免疫组化染色鉴定细胞的组织来源。细胞继续用0.25%的胰酶消化,按1:2传代,传至第5代。

1.4 3种药物浓度的配制

蜂胶溶液:用三蒸水将水溶性固体蜂胶配成10%的蜂胶溶液,再用含有10%胎牛血清的DMEM培养液稀释到0.05%、0.1%、0.2% 3个浓度。奥硝唑溶液:300 mg奥硝唑原药溶于50 ml三蒸水配成0.6%的溶液,再用含有10%胎牛血清的DMEM培养液稀释到0.02%、0.04%、0.08% 3个浓度。配制碘酚用10%胎牛血清的DMEM培养液稀释到0.05%、0.1%、0.2% 3个浓度。所有浓度药液的配制均在超净工作台内完成,并用0.2 μm的无菌滤器过滤消毒,然后用消毒后的玻璃瓶装好,封上封口胶以备用。

1.5 细胞毒性测定

消化第5代细胞,离心后用含有10%胎牛血清的DMEM培养液吹打成单细胞悬液,用细胞计数板调整细胞浓度至2×10^4,接种于2块96孔板,每板30孔,每孔100 μl。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HPDLFs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,每孔100 μl,每种药物浓度设3个复孔;阴性对照组3孔加含10%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,取第1块96孔板进行细胞毒性测定,于每孔中加入5 g/L的MTT 20 μl,继续培养4 h后,吸去孔内培养液,每孔加入150 μl DMSO,振荡10 min,于490 nm波长下测光密度值。

评价方法[4]:计算细胞相对增殖率(RGR),RGR=实验组光密度值/阴性对照组光密度值×100%。按RGR范围分为5级:RGR≥100%为0级,75%≤RGR≤99%为1级,50%≤RGR≤74%为2级,25%≤RGR≤49%为3级,1%≤RGR≤24%为

[通信作者] 蒋 琳,E-mail:jiangliner2008@163.com

4 级,RGR =0 为 5 级。0 级和 1 级被认为没有细胞毒性,2 级为轻度细胞毒性,3 级和 4 级为中度细胞毒性,5 级为明显的细胞毒性。

1.6 细胞回复度测定

第 2 块 96 孔板在含有药物的培养液培养 24 h 后弃去含药培养液,PBS 液洗 3 次,换上不含药物的新鲜培养基继续培养,24 h 后用 MTT 法测定光密度值。计算方法:细胞回复率 = [(换新鲜培养基继续培养 24 h 后光密度值 - 加药物培养 24 h 后光密度值)/加药物培养 24 h 后光密度值] ×100%。细胞回复度 = 药物组细胞回复率/阴性对照组细胞回复率 ×100%。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 细胞相对增殖率结果及毒性测定结果

由表 1 可见,随着药物浓度的增加,细胞相对增殖率下降,各组别比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。0.05% 及 0.1% 蜂胶和 0.02% 及 0.04% 奥硝唑的细胞相对增殖率均在 75% 以上,毒性级别为 1,表现出较弱的细胞毒性。而碘酚各浓度组细胞相对增殖率较低,明显低于对应浓度的蜂胶组,且毒性级别为 4,表现出较强的细胞毒性。

表 1 各药物对 HPDLFs 细胞毒性及回复情况的比较($n = 3$)

组别	浓度	细胞增殖率(%)	细胞毒性	回复率(%)	回复度(%)
蜂胶组	0.05%	86.09 ±5.63	1	11.06	92.07
	0.10%	75.93 ±2.63	1	11.04	91.87
	0.20%	62.03 ±2.63	2	10.73	89.29
奥硝唑组	0.02%	89.47 ±6.40	1	10.92	90.92
	0.04%	78.20 ±4.89	1	10.72	89.22
	0.08%	64.29 ±2.26	2	10.55	87.78
碘酚组	0.05%	14.66 ±4.51	4	1.68	13.99
	0.10%	6.39 ±1.13	4	1.89	15.70
	0.20%	2.63 ±1.13	4	-4.54	-37.83
阴性对照组		100.00	0	12.02	100.00

2.2 细胞回复情况

药物作用细胞 24 h 后,蜂胶、奥硝唑各浓度组细胞形态正常,而碘酚组细胞出现不同程度的胞体回缩,甚至崩溃融解。换成新鲜培养液继续培养细胞 24 h,蜂胶和奥硝唑各浓度组;细胞回复情况良好,细胞回复度均大于 80%;而碘酚各组细胞回复度均小于 30%,显著低于对照组的回复度 100%,表明碘酚对 HPDLFs 的有重度毒性作用,且毒性不可逆(表 1)。

3 讨论

一种理想的牙周病治疗药物,既要有良好的抑菌效果,又要保护牙周组织,具有较小的毒性作用。大量研究证实蜂胶对口内多种细菌具有较强的生长抑制作用[5-6],并且具有广泛的生物学活性[7]。考虑到牙周膜成纤维细胞是牙周结缔组织中的主要间质细胞,不仅具有合成胶原、基质、弹力纤维和糖蛋白的功能,还有吸收胶原吞噬异物的能力,在牙周组织的生理和病理中起重要作用[8]。所以本研究采用 MTT 法评价蜂胶对人牙周膜成纤维细胞的毒性作用及细胞回复能力,以探讨蜂胶牙周用药的安全性。

前期研究发现蜂胶对牙周病优势菌-牙龈卟啉单胞菌的最小杀菌浓度为 0.156%,相当于 0.125 ~ 0.25 mg/L的奥硝唑[1],故本研究所选浓度在 0.156% 上下波动,采用了 0.05%、0.1% 和 0.2% 蜂胶浓度作为研究浓度。研究发现,0.05%、0.1% 和 0.2% 蜂胶组与对照药物奥硝唑相比,均表现出较小的细胞毒性;而对照药物碘酚却表现出较强的细胞毒性。这与国外学者研究结果相似,Al-Shaher 等[9]报道 0.4% 蜂胶对牙周膜成纤维细胞的细胞相对增殖率在 75% 以上。Martin 等[10]也报道蜂胶毒性小,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。

牙周局部用药后,会受到龈沟液、唾液等的影响,而药物浓度逐渐降低,表现出短暂的作用,所以评价牙周药物毒性作用的同时,还应该评价药物对组织的毒性作用是否可逆。本研究在探讨蜂胶毒性作用的同时,探讨细胞的回复能力。结果发现所选浓度的蜂胶作用后存活的人牙周膜成纤维细胞形态正常。在消除药物作用后,表现出较强的自身回复能力,增殖生长,细胞回复度均大于 80%。与对照药物奥硝唑相近,而明显优于碘酚。这可能与蜂胶作为一种天然药物,含有维生素、脂肪酸、多糖等营养,对组织毒性小有关。

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。有关蜂胶的毒性作用,国内学者也进行了大量的动物实验。马丁等[11]通过大耳白兔口腔黏膜的刺激实验发现 300 g/L 蜂胶对口腔黏膜不具不良刺激反应。张成河[12]也发现蜂胶复方消毒酊对小鼠口服 LD_{50} > 5 000 mg/kg,对家兔皮肤刺激反应积分为 0。可见,从细胞层面和动物层面,蜂胶均表现出较小的细胞毒性。

本研究结果显示蜂胶作为一种天然的抗生素,毒性小,且毒性可逆,有望成为一种牙周病治疗药物,然而在临床上被开发利用的安全性还有待大量研究去证实。以什么样的剂型和剂量被利用,也是今后研究的方向。

参考文献:

[1] 蒋琳, 林居红, 张红梅, 等. 蜂胶对牙龈卟啉单胞菌及牙龈成纤维细胞的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(16): 1538 - 1540.

[2] 张红梅, 林居红, 蒋琳. 蜂胶与氢氧化钙单独用药的细胞毒性研究[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(11): 1193 - 1195.

[3] 重庆市食品药品监督管理局. 重庆市医疗机构制剂规范[S]. 重庆: 重庆市食品药品监督管理局, 2008: 154.

[4] 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 - 711.
[5] 张红梅, 林居红, 蒋琳. 国产水溶性蜂胶对感染根管消毒功效的临床疗效观察[J]. 重庆医学, 2009, 38(23): 2939 - 2940, 2942.
[6] 熊萍, 张明珠, 雷雅燕, 等. 云南蜂胶对3种牙周致病菌的抑制作用[J]. 昆明医学院学报, 2009, 30(9): 23 - 26.
[7] 李园, 丁仲鹃. 蜂胶生物效应的细胞学机制[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(7): 1264 - 1268.
[8] Hoang A M, Chen D, Oates T W, *et al*. Development and characterization of a transformed human periodontal ligament cell line[J]. J Periodontol, 1997, 68(11): 1054 - 1062.
[9] 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.
[10] 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.
[11] 马丁, 和红兵, 吴恩格. 蜂胶提取液生物安全性的初步评价[J]. 实用口腔医学杂志, 2007, 23(1): 71 - 74.
[12] 张成河. 蜂胶复方消毒剂杀菌效果与毒性的试验观察[J]. 现代预防医学, 2006, 33(10): 1808 - 1809.

(**收稿**:2011-10-12;**修回**:2011-11-16)
(编辑 张 维)

短篇论著

文章编号:1000-5404(2012)08-0794-02

50例顺产后阴道松弛症的手术治疗及功能锻炼的临床疗效观察

杜本军[1], 刘晓军[1], 苏 冰[2], 唐祝君[1] (510515 广州, 南方医科大学南方医院: 整形外科[1], 检验科[2])

[**摘要**] **目的** 探讨手术结合功能锻炼对顺产后阴道松弛症的治疗效果。**方法** 选取2006年9月至2010年12月在本科就诊的50例患者进行回顾性分析, 采用手术恢复损伤肛提肌的解剖结构, 并进行功能康复锻炼。**结果** 50例受术者均愈合良好, 没有出现阴道直肠瘘或感染并发症。术后随访6个月至2年, 多数受术者自诉对术后效果满意, 感觉阴道收缩有力, 无下垂感, 排尿、排便控制自如, 夫妻性生活和谐。**结论** 顺产后阴道松弛症是由于肌肉损伤引起, 根据肛提肌损伤的情况, 手术收紧肛提肌, 保留阴道黏膜的完整性, 并配合功能康复锻炼促进肌肉及阴道的弹性恢复, 可以矫正阴道松弛, 提高患者性生活质量, 效果确切。

[**关键词**] 顺产; 阴道松弛; 功能康复锻炼; 手术治疗
[**中图法分类号**] R622; R713.3 [**文献标志码**] A

顺产后阴道松弛症是因为阴道分娩过程中胎儿对产道损伤的结果, 致使阴道收缩力下降, 性快感减弱[1]。随着经济的发展和文化素质的提高, 要求手术改善性生活质量者逐渐增多。以往都是单纯进行手术治疗[2-3], 2006年9月至2010年12月我们对50例在我院分娩女性顺产后阴道松弛症采用手术治疗及术后功能锻炼指导, 效果较好, 现报告如下。

1 资料与方法

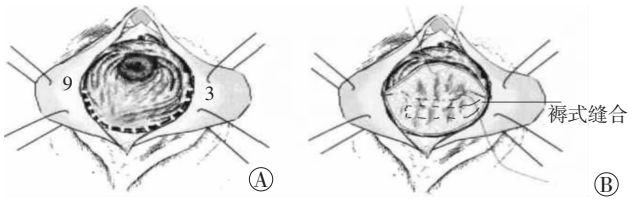
1.1 临床资料

本组病例50例, 年龄为22 ~ 39岁, 均为分娩的育龄妇女, 生育1胎者41例, 生育2胎或以上者9例。均主诉因阴道松弛, 影响性生活质量。检查阴道指诊可容纳3 ~ 4指, 阴道肌肉收缩无力。其中会阴有Ⅰ度撕裂伤5例, Ⅱ度撕裂伤2例。术前静滴抗生素用于预防感染, 手术当日早晨, 进行阴道冲洗。

1.2 手术方法

受术者取截石卧位, 常规消毒外阴、阴道后, 用1%利多卡因加1∶10万肾上腺素, 行局部浸润麻醉。在阴道黏膜和肌层之间可以注射20 ~ 30 ml肿胀液, 可减少术中出血及便于术中分离肌肉。

在会阴后联合与阴道黏膜交界处3点至9点位切开(图1A), 切口长度以与拟缩紧的阴道周径合适为度。切开后沿阴道黏膜下间隙向上向两侧进行钝性和锐性相结合的组织分离, 对称性分离, 直至切口上方5 ~ 8 cm, 左右分别至阴道侧壁。因创面弥漫性渗血, 明显出血点电凝止血后, 湿盐水纱布填塞压迫5 min。根据肛提肌损伤的程度和位置, 在阴道后壁距离中心2 cm处黏膜下从右向左用7号丝线水平褥式对称缝合两侧肛提肌3针(图1B), 使松弛肛提肌向中间靠拢, 恢复盆底组织张力。由于产后阴道后壁中心腱处组织较薄弱, 所以缝合时在阴道侧壁进针较深穿透肛提肌全层, 到中心腱处浅出, 再由中心腱处浅层进针, 于对侧阴道侧壁穿透肛提肌全层后出针, 可以避免损伤直肠。另外, 术区操作空间较小, 所以必须在缝合结束后统一打结, 避免打结后操作空间更小不方便操作引起误伤直肠。如果检查肛提肌仍然觉得略松弛, 可以再次缝合以收紧肛提肌。最后, 用可吸收5-0缝线将阴道口切口纵行缝合, 切除超出阴道外口的少量多余的阴道黏膜部分, 缝合阴道黏膜及会阴部皮肤。术后阴道内能容纳二指略紧为度, 术毕阴道内放置一碘伏纱布卷填充压迫24 ~ 48 h后取出, 便后碘伏冲洗, 抗生素5 ~ 7 d, 术后7 d拆线。术后2 ~ 3个月避免性交, 同时避免便秘等增加腹压因素和体力劳动。



A: 手术切口; B: 褥式缝合
图1 治疗顺产后阴道松弛症的手术示意图

[**通信作者**] 刘晓军, E-mail: liuxiaojun@yahoo.cn