维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2007)02-0154-03

补肾中药醇提活性成分对人牙周膜细胞生物学性状的影响

李丛华[1],杨 霞[2],向学熔[1]

(1.重庆医科大学附属口腔医院综合急诊科,重庆 400015;2.重庆医科大学附属第一医院口腔内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察补肾中药醇提活性成分对体外培养人牙周膜细胞增殖和功能的影响。方法:应用组织块法和酶消化法体外培养人牙周膜细胞,以 MTT 法检测补肾中药活性成分对人牙周膜细胞的增殖率和中药活性成分对 ALP 活性的影响。结果:补肾中药醇提活性成分对人牙周膜细胞增殖能力和 ALP 活性有增强作用。结论:补肾中药醇提活性成分对体外培养人牙周膜细胞的增殖和功能有促进作用。

【关键词】人牙周膜细胞;补肾中药醇提活性成分;增殖与功能

【中国图书分类法分类号】R780.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-09-08

The effect of active components of Chinese medicine for tonifying kidney extracted by alcohol on the biological characteristics of cultured human periodontal ligment cells

LI Conghua, et al

(*Department of Emergency, the Affiliated Stomatology Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of active components Chinese medicine for tonifying kidney extracted by alcohol on the proliferation and function of cultured human periodontal ligament cells. *Methods*: The human periodontal ligament cells were cultured in vitro and the effect of active components of Chinese medicine for tonifying kidney extracted by alcohol on the proliferation ability and alkaline phosphatase (ALP) activity of hPDLCs were detected. *Results*: The active components extracted by alcohol strengthened the proliferation ability and ALP activity of cultured human periodontal ligament cells. *Conclusions*: The active components of Chinese medicine for tonifying kidney extracted by alcohol had great promotion on the proliferation ability and function of cultured human periodontal ligament cells.

【Key words】Human periodontal ligament cells (hPDLCs); Active components of Chinese medicine for tonifying kidney extracted by alcohol; Proliferation and function.

牙周炎是口腔常见病和多发病,危害甚大,其治疗的目的是修复破坏的牙周组织,以建立牙周新附着,而牙周组织再生的基础是牙周膜细胞的成骨作用[1](Periodontal ligament cells, PDLCs)。而由肾主骨理论指导下的补肾法在牙槽骨吸收的治疗中占有重要地位。本研究旨在通过体外细胞培养人牙周膜细胞,观察补肾中药醇提活性成分对人牙周膜细胞增殖和功能的影响,初步探讨补肾中药中的醇提活性成分用于牙周病治疗的机理。

1 材料和方法

1.1 实验药物

补肾中药由菟丝子、何首乌等提取的活性成分组成,由成都中医药大学提供。经乙醇萃取,50℃溶解离心,取上清液得到含有活性部位的浸膏。

1.2 试剂和仪器

DMEM 培养基 (Gibco, U.S.A)、胰蛋白酶 (Sigma, U.S.A)、I 型胶原酶 (Sigma, U.S.A)、胎牛血清 (Sigma U.S.A)、抗细胞角蛋白多克隆抗体、抗波形丝蛋白多克隆抗体、MTT 溶液 (Sigma, U.S.A)、96 孔板培养板 (U.S.A)、多孔板高效分析仪(美国 PE 公司)、CO_2 恒温培养箱、倒置相差显微镜。

1.3 方法

1.3.1 人牙周膜细胞分离培养 取因正畸需要拔除的新鲜第一前磨牙根中 1/3 的牙周膜,加入含 0.2%I 型胶原酶 3ml,37℃振荡消化 10min,1000r/min 离心 10min,弃上清液,加入含 10%FBS(胎牛血清)的 DMEM 培养基,接种于 25ml 细胞培养瓶中,组织块置 37℃、5%CO_2 和饱和湿度的孵箱中,1 周后开始观察细胞生长情况,10~14 天可见细胞基本长满瓶

作者介绍:李丛华(1974-),男,硕士,主治医师,主要研究方向:牙周病病因及防治。

维普资讯 http://www.cqvip.com

底时(>80%),原代培养结束。

1.3.2 传代培养 0.25%胰蛋白酶消化原代细胞,制成单细胞悬液,含血清的培养基中止消化,离心去上清,加入含10% FBS 的 DMEM 培养基,1:2 完成传代。

1.4 观察与鉴定

1.4.1 活体细胞观察 倒置相差显微镜逐日观察培养细胞的生长变化和形态特征。

1.4.2 牙周膜细胞的免疫组织化学染色鉴定(ABC 法) 0.25%胰蛋白酶消化细胞后按 1×10^5cell/ml 接种于载玻片上,制备细胞爬片两张,待细胞成单层后,PBS 振洗 3 次,每次 5min;4% 多聚甲醛固定 20min;PBS 振洗吹干;3% H_2O_2 处理 10min;正常血清工作液封闭 10min,分别加入一抗 Vimitin 和 CK_{18} 于两张爬片上(37℃,2h);PBS 振洗后依次加入二抗、三抗处理(37℃,0.5h);DBA 显色 2~6min;苏木素复染 2~6min,树胶封片,显微镜照相。

1.4.3 MTT 法检测细胞增殖 补肾中药醇提活性成分用含 10% FBS 的 DMEM 细胞培养液配制所需浓度,过滤除菌。按照药物不同浓度将细胞随机分为 100mg/L、10mg/L、1.0mg/L、0.1mg/L、0.01mg/L 共 5 个实验组和一个对照组,每组设 3 个复孔。按照药物作用时间不同分为药物作用后 1、3、5、7、9 天组。细胞稀释成 1×10^5/ml 浓度的细胞悬液,接种于 96 孔板,200μl/孔,细胞孵育 24h,弃去培养液,分别加入各浓度含药培养基中,1 天、3 天、5 天、7 天、9 天后,每孔加入 20μl MTT,测定其光密度值,并取均值。应用 SPSS12.0 统计软件包进行随机区组设计资料的方差分析,比较得出在不同时间点、不同浓度组的细胞吸光度的差别。

1.4.4 碱性磷酸酶(ALP)检测 细胞稀释成 1×10^6/ml 浓度的细胞悬液,接种于 6 孔细胞培养板,细胞孵育 24h,弃去培养液,分别加入各浓度含药培养基中。5 天后收集细胞,测定 hPDLC 的 ALP 活性;并用考马氏亮蓝微板法,定量测定样本中蛋白量。求取 ALP 比活性。

2 结 果

2.1 细胞培养情况

原代细胞的组织块培养周围 6 天有细胞爬出。最初爬出的细胞呈长梭形或星形,长梭形细胞逐渐增多,星形细胞生长相对缓慢;12 天后可见细胞长满瓶底约 80%,以长梭形细胞占绝对优势,细胞胞体丰满,胞突细长,胞浆均匀,核圆形或卵圆形(图 1)。细胞传至 2~3 代后,细胞形态不发生改变,生长速度加快,细胞长满瓶底后呈漩涡状排列。(图 2)

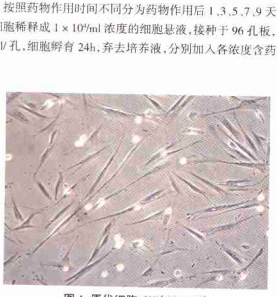


图 1 原代细胞 HE(10×40)

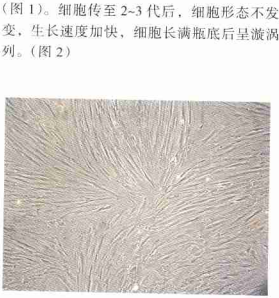


图 2 传代细胞 HE(10×10)

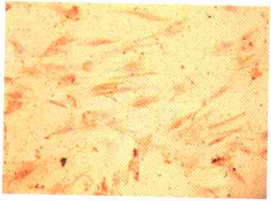


图 3 抗波形丝蛋白染色阳性(10×40)



图 4 抗细胞角蛋白染色阴性(10×40)

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 细胞免疫组织学化学染色鉴定

抗波丝蛋白多克隆抗体(VIM)在细胞中呈阳性表达，胞浆呈棕黄色(图 3)；抗细胞角蛋白(CK)染色阴性，证实细胞的间叶源性，而非上皮源性(图 4)

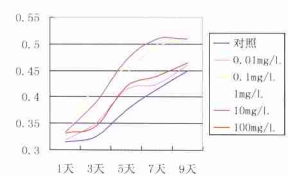


图 5 补肾中药醇提活性成分对 PDLC 增殖影响(OD 值 490)

2.3 MTT 法检测细胞增殖

补肾中药醇提活性成分对 hPDLC 增殖的时间效应见图 5。表明：10mg/L、1mg/L、0.1mg/L 三种浓度的补肾中药对 hPDLC 均具有增殖作用。

2.4 对 ALP 活性的影响

采用 IFCC 推荐法测定补肾中药醇提活性成分对 hPDLC 碱性磷酸酶的影响见表，该表表明：从浓度 100mg/l 到浓度为 0.1mg/l 的补肾中药均可促进 hPDLC 的碱性磷酸酶活性，以 1.0mg/l 浓度组的促进作用最强。(见表 1)

3 讨 论

因牙周病而丧失的牙周组织，其修复和重建难

表 1 不同药物浓度作用后 hPDLC ALP 活性(U/mg)

	对照组	0.01	0.1	1.0	10	100
ALP 活性	0.01070	0.01300	0.02206	0.04035	0.02455	0.02036
标准误	0.00082	0.00022	0.00100*	0.00066**	0.00123*	0.00985*

注：* 表示有统计学意义，$P<0.05$；** 表示具有显著性差异，$P<0.01$

度很大，近年来 GTR 技术与植骨材料、生长因子、细胞移植等联合应用的组织工程方法，备受人们关注。牙周组织工程所要解决的关键问题之一，是种子细胞的来源问题。牙周组织再生成功的关键，取决于牙周膜中参与组织再生的细胞——PDLC 的功能状态。因为牙周膜细胞是牙周组织工程的首选细胞，是一种具有多向分化功能的群体细胞，有人称之为牙周干细胞和前体细胞，它具有趋化、粘附、增生、生物合成和分化为成骨细胞、成牙骨质细胞和形成矿化组织等多项生物学功能，然而在牙周病损部位牙周膜细胞的来源有限，很难达到有效的再生和重建。因此，如何增加病变部位牙周膜细胞的数量和活性是牙周组织再生的关键问题[2,3]。

中医中药作为我国的传统国粹，对牙周炎的研究表明：牙周炎的发生除与局部因素有关外，还与全身因素密切相关，这与西医的观点一致。认为牙周病病因的内因是由于七情所伤，脏腑功能失调，特别与肾气有关[4,5]。肾虚除先天素质外，久病累肾，劳倦过度或生育过多都可造成肾气虚损。肾虚是牙周炎发病的主要因素，肾主骨生髓，齿为骨之余，肾衰则齿豁，精固则齿坚。此观点是近代中医用补肾法治疗牙周病的理论基础，补肾中药治疗牙周炎弥补了西药治疗牙周炎出现的诸多副作用。补肾固齿涉及到免疫系统、内分泌系统、植物神经系统、肾上腺等系统。所谓补肾，就是通过药物作用于这些系统，使调节功能得到改善，从而消除或减轻疾病。而这一过程是一漫长的过程，

大量的研究提示，补肾中药有明显的促成骨作用，然而补肾中药种类多，药物复杂，为探讨其作用机理，故找出明确的补肾中药中活性成分显得很有必要，本实验是采用的以菟丝子和何首乌为主的活性成分，该活性成分具有强骨补肾的功效，何首乌为蓼科植物的干燥块根，祖国医学认为何首乌有补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨等作用，崔阳等研究显示何首乌能同时升高骨矿物质和骨胶原含量[6]。菟丝子为常用补益中药，现代研究表明菟丝子浸提物具有调节内分泌、抗衰老、抗氧化等活性[7]。但这些活性成分在牙周病的治疗方面没有相关报道且其具体作用机制目前尚不完全清楚。

本实验体外培养的牙周膜细胞属于贴壁生长细胞，具有多种细胞成分，体外培养时能生长和传代的细胞形态类似成纤维细胞，但具备成骨细胞的某些功能，故细胞鉴定主要根据细胞形态观察、细胞的特异性分泌蛋白、因子、受体等，及体外矿化功能特征等进行检测[8]。本实验结果提示，应用以菟丝

(下转第 191 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

主,由于手术在上腹部进行操作,引起膈肌的牵拉,肺不张等,手术时间较长,气管插管有利于保持气道通畅,便于呼吸道管理。同时可以避免术中术后低氧血症发生[1]。

阿曲库铵在体内消除,不依赖肝肾功能,而是通过非特异性酯酶水解和 Hofman 消除自行降解,对循环无抑制作用。异氟烷主要以原形从肺排除,不受肝功能的影响,儿童尤其是小婴儿对吸人麻醉药的摄取和排出明显均快于成年人。异氟烷对门静脉前血管床和肝动脉均有扩张作用,使门脉血流减少,而肝动脉及血流增加,结果是肝血流保持相对稳定[2],因而适合胆道闭锁患儿手术的麻醉。芬太尼主要在肝内进行生物转化,其代谢产物随尿液和胆汁排除,反复多次注射,可产生蓄积作用。肝功能损害重的病人代谢时间延长,更易发生蓄积,增加了术后呼吸抑制的危险性,胆道闭锁麻醉时宜尽量少用。

该手术方式内脏牵拉明显,机体应激反应强烈。强烈的应激反应可致血浆 β-内啡肽、儿茶酚胺和去甲肾上腺素浓度升高,单纯全身麻醉不能完全消除机体的应激反应[3],有资料显示硬膜外麻醉加气管内全麻能显著降低血浆儿茶酚胺总量[4,5]。上腹部手术使用单纯硬膜外麻醉的阻滞平面过宽可引起有效血容量下降,易导致血流动力学的波动,当麻醉平面高于 T4 时则易发生呼吸功能的抑制;单纯气管内插管全麻具有诱导快、血流动力学干扰小、呼吸控制和管理易于进行,由于上腹部手术的肌松要求使肌松剂用量过大而影响到术后病人的清醒及拔管。而全麻复合硬膜外能很好地抑制手术牵拉导致的应激反应,又能很好地克服单纯全麻不能有效地阻滞局部伤害性刺激向交感神经中枢的传导[6],同时减少了全麻药物用量,病人苏醒迅速,自主呼吸恢复快,拔管早,减少了喉水肿发生机会,硬膜外麻醉还便于术后镇痛。

根据以上结果,静吸复合全麻和静吸复合全麻联合硬膜外麻醉均可用于婴儿胆道闭锁手术。但静吸复合全麻联合硬膜外麻醉更适合婴儿胆道闭锁。

参 考 文 献

[1] 窦云凌,李喜荣,黄文起,等.先天性胆道闭锁行 Kassi 术的麻醉处理探讨[J].实用医学杂志,1999;15(11):919-920.

[2] 庄心良,曾因明,陈伯銮,等主编.现代麻醉学[M].第 3 版.北京:人民卫生出版社,2003.123-127.

[3] 陈美娟,张 靖,宋 杰,等.全麻联合硬膜外阻滞及术后镇痛术对上腹部手术围术期生长激素、胰岛素和血糖的影响[J].临床麻醉学杂志,2000;16(7):340-342.

[4] 季 炬,陈昆洲,杨晏芳,等.硬膜外阻滞加气管全麻与单纯气管内全麻用于全胃切除的对比研究[J].中华麻醉学杂志,1995;15(2):74-76.

[5] 杨承祥,邓硕曾.硬膜外阻滞加全麻对体外循环应激反应的影响[J].中华麻醉学杂志,1996;16(10):492-494.

[6] 王春显,赵过庆,王丽春.不同麻醉方法对上腹部手术围术期儿茶酚胺的影响[J].临床麻醉学杂志,1996;12(5):250-252.

(上接第 156 页)

子、何首乌等为主的补肾中药经乙醇提取的活性成分,直接作用于体外经组织块和酶消化法培养的人牙周膜细胞,显示对牙周膜细胞的增殖和功能有明显促进作用,表现在:(1)牙周膜细胞增殖率提高;(2)牙周膜细胞 ALP 活性增加。所以可以认为,补肾中药可以提高牙周膜细胞的增殖率、增加牙周膜细胞 ALP 活性,因而能促进牙周膜细胞的形成,在合适的条件下能达到成骨的功能。本结果也为进一步研制开发补肾中药在治疗牙周病方面的应用提供了理论和实验基础。但由于该补肾中药中药物之间相互作用,药物成分复杂,所以还需结合药效动力学实验,进一步纯化提取加工其活性成分。

参 考 文 献

[1] Cochan DL,Wozney JM.Biological mediators for periodontalre generation[J].Periodontal,2000,1999;19(2):40-58.

[2] Hassell TM,Tissue and cell of the periodontium[J].Periodontal 2000,1993;3:9-38.

[3] Hobbs HC,Rowe DJ,Johnson PW.Periodontal ligament cells from Insulin-dependent diabetics exhibit altered alkaline phosphatase activity in response to growth factors[J].J Periodontol,1999;70(7):736-742.

[4] 史俊南主编.现代口腔内科学[M].北京:高等教育出版社,2000.419-420.

[5] 徐治鸿主编.实用中医口腔病学[M].天津:天津科技翻译出版公司,1991.91-93.

[6] 崔 阳,吴 铁,刘钰瑜.环磷酰胺致小鼠骨质疏松及何首乌的防治作用[J].中国骨质疏松杂志,2004;10(2):165-168.

[7] 陈 奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1993.802-803.

[8] 司徒镇强,吴军正,主编.细胞培养[M].西安:世界图书出版西安公司,2004.167-168.