

[文章编号] 1000-4718(2007)02-0316-05

血管紧张素 II 对 THP-1 源性泡沫细胞 ATP 结合盒转运子 A1 的影响

陈志坚, 王彦富, 廖玉华, 梅春丽, 彭红玉, 郭和平
(华中科技大学同济医学院附属协和医院心内科, 湖北 武汉 430022)

[摘要] 目的: 以 THP-1 源性泡沫细胞为研究对象, 探讨血管紧张素 II (Ang II) 对 THP-1 源性泡沫细胞 ATP 结合盒转运子 A1 (ABCA1) 表达、细胞内胆固醇含量及胆固醇流出的影响。方法: 运用逆转录-多聚酶链反应 (RT-PCR) 和 Western blotting 分别检测 Ang II 对 ABCA1 mRNA 与 ABCA1 蛋白表达的影响, 采用酶法, 通过荧光分光光度计检测细胞内胆固醇含量, 应用液体闪烁计数器检测胆固醇流出的变化。结果: Ang II 能引起 THP-1 源性泡沫细胞胆固醇含量显著升高 ($P < 0.05$)、ABCA1 表达显著减少 ($P < 0.05$), Ang II 受体拮抗剂厄贝沙坦 (Irb) 能显著减少细胞内胆固醇含量 ($P < 0.05$)、促进细胞内胆固醇流出及减轻 Ang II 对 ABCA1 的抑制作用 ($P < 0.05$)。结论: Ang II 有通过其受体抑制 ABCA1 表达, 促进泡沫细胞形成, 加速动脉粥样硬化的作用。

[关键词] 血管紧张素 II; ATP 结合匣式转运子; 动脉硬化; 泡沫细胞

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Effects of angiotensin II on ATP binding cassette transporter A1 in THP-1 derived foam cells

CHEN Zhi-jian, WANG Yan-fu, LIAO Yu-hua, MEI Chun-li, PENG Hong-yu, GUO He-ping

(Cardiovascular Department, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430022, China. E-mail: drchenok@sohu.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the influence of angiotensin II (Ang II) on ATP-binding cassette transporter A1 in THP-1 derived foam cells. The variance of the expression of ABCA1, the content and the effluent rate of cholesterol were also investigated. **METHODS:** The regulatory effect of Ang II on the expression of ABCA1 mRNA and protein in THP-1 derived form cells were measured by RT-PCR and Western blotting. The effect of variance of cholesterol content was measured by zymochemistry via-fluorospectrophotometer, cholesterol effluent was measured by liquid scintillator. **RESULTS:** A positive facilitative effect of Ang II on form cells was observed. Total cholesterol content were increased significantly by Ang II treatment ($P < 0.05$). The mRNA and protein of ABCA1 were down-regulated significantly by Ang II stimulation ($P < 0.05$). Irbesartan reduced the total cholesterol content significantly ($P < 0.05$). Meanwhile, the increase in the effluent rate of cholesterol and the expression of ABCA1 were observed ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** The effects of Ang II on the formation of foam cells and atherosclerosis may be correlated to the activation of AT1 receptor and down-regulation of ABCA1.

[KEY WORDS] Angiotensin II; ATP-binding cassette transporters; Arteriosclerosis; Foam cells

ATP 结合盒转运子 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 是近年发现的一种膜蛋白。在动脉壁, 它是单核巨噬细胞内胆固醇流出的重要途径, 有助于清除过多脂质, 防止泡沫细胞形成^[1]。Tangier 病 (TD) 病人正是因为 ABCA1 基因突变^[2], 引起细胞内胆固醇流出障碍, 最终导致 AS 形成。有关 ABCA1 的调控是近年来动脉粥样硬化 (athero-

sclerosis, AS) 领域的又一研究热点。

AS 组织中血管紧张素转化酶 (angiotensin-converting enzyme, ACE) 活性、血管紧张素 II (Ang II) 及血管紧张素 II 1 型受体 (angiotensin II type 1 receptor, AT1R) 水平明显升高, 且 AT1R 表达量与动脉粥样硬化 (AS) 的严重程度和动脉内膜的厚度关系密

[收稿日期] 2005-07-05 [修回日期] 2005-09-29

Tel: 027-85726375; E-mail: drchenok@sohu.com

切^[3]。Keidar 认为, Ang II 通过增加巨噬细胞清道夫受体 CD36, 促进巨噬细胞摄取 ox-LDL^[4], 加速泡沫细胞形成, 有关 Ang II 对巨噬细胞 ABCA1 表达及胆固醇流出的影响尚未见报道。本研究拟以 THP-1 源性泡沫细胞为对象, 观察 Ang II 对 THP-1 源性泡沫细胞 ABCA1 表达及细胞内胆固醇含量变化及流出的影响, 探讨 Ang II 促进 AS 的新机制。

材 料 和 方 法

1 主要材料及仪器

总 RNA 提取试剂盒 (Trizol) 为深圳华氏生物公司产品; 逆转录-聚合酶链反应试剂盒 (TaKaRa 公司); ABCA1 引物、GAPDH 引物 (内参) 由上海生物工程公司提供; apoA-I、Ang II 为 Sigma 公司产品; 羊抗人 ABCA1 抗体 (Santa Cruz 公司)、^[3H] 标胆固醇 (Perkin-Elmer 公司), 厄贝沙坦 (江苏恒瑞制药厂惠赠), 其它试剂均为进口或国产分析纯。L8-M 型低温超速离心机 (Beckman), 3K30 型低温高速离心机 (Sigma), Hitachi 650-60 型荧光分光光度计, 国产 FJ-2107P 型液体闪烁计数仪。

2 方法

2.1 低密度脂蛋白的分离及氧化修饰 参照文献^[5]操作。将新鲜血浆 (购于武汉市血液中心) 置超速离心机中梯度离心, 获得 LDL, 4 °C 充分透析 24 h。以 Bradford 法测蛋白浓度, 用 PBS 调整蛋白浓度至 1.6 g/L, 加入终浓度为 10 μmol/L 的氯化铜, 置 37 °C 充分氧化 24 h, 之后以含有终浓度为 0.5 mmol/L EDTA-Na₂ 的 PBS 终止氧化 24 h, 再次测蛋白浓度, 0.45 μm 孔径滤膜过滤除菌, 4 °C 保存备用。

2.2 实验分组及 THP-1 源性泡沫细胞模型的制备

THP-1 细胞用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中静置培养, 在每次实验前用 160 nmol/L PMA 孵育 THP-1 细胞 72 h, 使其诱导分化成巨噬细胞。分组并计数, 实验共分 3 组, 即泡沫化对照组、Ang II 组和厄贝沙坦组。对照组, 加入 50 mg/L 的氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL); Ang II 组, 同时加入 50 mg/L 的 ox-LDL 和终浓度为 10⁻⁵ mol/L 的 Ang II, 厄贝沙坦 (Irb) 组, 将终浓度为 10⁻⁵ mol/L 的厄贝沙坦加入巨噬细胞中, 预孵 2 h, 之后同时加入 50 mg/L 的 ox-LDL 和终浓度为 10⁻⁵ mol/L 的 Ang II, 在含有 0.3% BSA 的 RPMI-1640 培养液中静置培养 48 h, 随后各组均加入 10 mg/L 的 apoA-I, CO₂ 培养箱中孵育 12 h。

2.3 ABCA1 mRNA 检测 采用逆转录聚合酶链反

应 (RT-PCR)。随机抽取上述各组细胞, 按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。取各组细胞总 RNA 2 μg 逆转录合成 cDNA, 再取逆转录产物 1 μL 进行 PCR 循环。ABCA1 引物序列: 上游 5' - ACAACCAAACCTCACACTACTG - 3', 下游 5' - ATAGATCCATTACAGACAGCG - 3', 扩增片段为 439 bp。内参 GAPDH 引物序列: 上游 5' - TCACCATCTTCCAGGAGCGAG - 3', 下游 5' - TGTCCGCTGTTGAAGT-CAGAG - 3', 扩增片段为 648 bp。PCR 反应条件: ABCA1 (预变性 94 °C 5 min, 94 °C 变性 1 min, 61 °C 退火 30 min, 72 °C 延伸 1 min, 最后 72 °C 终止 5 min, 共 38 个循环), GAPDH (预变性 94 °C 5 min, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 30 min, 72 °C 延伸 1 min, 最后 72 °C 终止 5 min, 共 30 个循环)。反应结束后, 取反应产物 5 μL 进行 2.0% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色, UVP 凝胶图像分析系统扫描摄影, 并分析各组目的基因及 GAPDH 基因灰度值, 以两者的比值代表 ABCA1 转录水平。

2.4 Western blotting 检测 ABCA1 蛋白表达 随机抽取上述各组细胞, 离心收集, 在收获好的细胞中加入 3 去污剂裂解缓冲液进行细胞裂解, 于 4 °C 离心 10 min, 弃除沉淀, Bradford 法进行蛋白质定量, 上样量 60 μg, 用 5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 转 NC 膜, 丽春红染色观察转移效果, 并确定蛋白质分子质量标准位置。封闭液封闭 2 h, 按 1:200 加入羊抗人 ABCA1 I 抗, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 按 1:5 000 的稀释倍数加入辣根过氧化物酶标记兔抗羊 II 抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 用 ECL 显色并曝光于 X 胶片。结果用 Gelwork 凝胶图像分析系统对胶片扫描, 以对照组的面积灰度值为 100% 与实验组进行比较和半定量分析。

2.5 细胞内总胆固醇含量测定 采用酶法, 通过荧光分光光度计检测细胞内胆固醇含量的变化, 参照文献^[6]操作。收集上述各组剩余细胞 (1 × 10⁵ 个细胞/瓶) 以无菌 PBS 洗涤 3 次, 应用 JY96-II 型超声波细胞粉碎仪破碎细胞, 取 100 μL (剩余液体采用 Bradford 法测得各组细胞蛋白浓度), 加入试剂后, 37 °C 水浴反应 60 min, 采用 Hitachi 650-60 型荧光分光光度计, 以 325 nm 为激发光波长, 415 nm 为荧光发射波长, 以 1-10 mg/L 标准胆固醇绘制标准曲线, 测得总胆固醇的量, 以 mg/g 蛋白为单位。

2.6 泡沫细胞胆固醇流出测定 胆固醇流出检测按文献^[7]描述的方法操作, THP-1 巨噬细胞用 0.37 × 10⁹ Bq/L [^{3H}] 胆固醇和 50 mg/L ox-LDL 及含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液共同孵育 48 h

之后,用无菌 PBS 液洗涤细胞,将细胞计数并随机分为 3 组,分别加入无菌 PBS(对照)、 10^{-5} mmol/L 的 Ang II、 10^{-5} mmol/L 的 Irb,在含有 0.3% BSA 的 RPMI - 1640 培养基中静置培养 48 h,换液 1 次并同时加入终浓度为 10 mg/L apoA - I,继续培养 12 h,用闪烁计数法检测培养液和细胞的 $[^3\text{H}]$ 胆固醇。胆固醇流出率 = {培养液 counts/min 值 ÷ (培养基 counts/min 值 + 细胞 counts/min 值)} × 100%。

3 统计学处理

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 12.0 软件进行处理。数据采用单因素方差分析及 *t* 检验。

结 果

1 泡沫化细胞模型的鉴定

通过电镜观察,可见不同干预组,细胞内脂质含量明显不同,结果见图 1。

2 THP - 1 泡沫细胞 ABCA1 表达检测

图 2 可见:Ang II 显著抑制 ABCA1 的表达,mRNA 和蛋白以灰度值记,较对照组分别下降达 50% 和 28% ($P < 0.05$);Irb 则能显著减轻 Ang II 对 ABCA1 mRNA 和蛋白表达的抑制作用,灰度值较 Ang II 组分别高 36% 和 18% ($P < 0.05$),但 ABCA1 mRNA 及蛋白表达仍显著低于对照组。

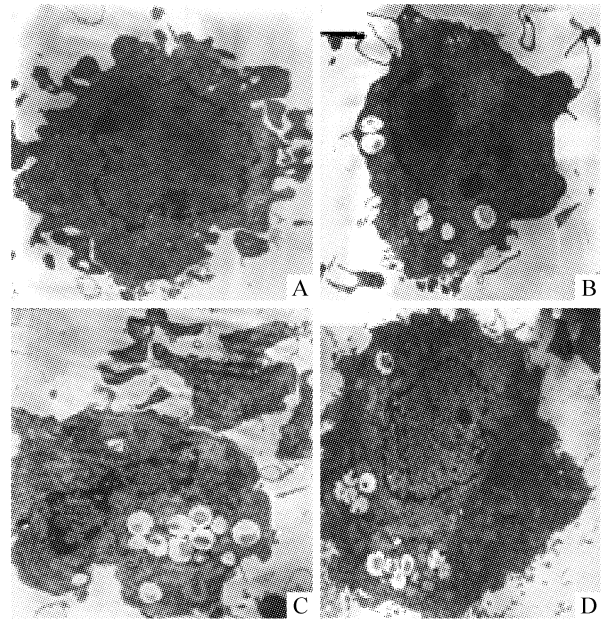


Fig 1 Modeling of foam cells. A: macrophage of THP - 1; B: foam cell group; C: ang II group; D: Irb group.

图 1 泡沫细胞模型建立

3 THP - 1 泡沫细胞内胆固醇含量的变化

Ang II 干预组细胞内胆固醇含量明显高于 ox - LDL 组,增高 157.3% ($P < 0.05$),Irb 组细胞内胆固醇含量明显少于 Ang II 组($P < 0.05$),但仍多于对照组,结果见图 3。

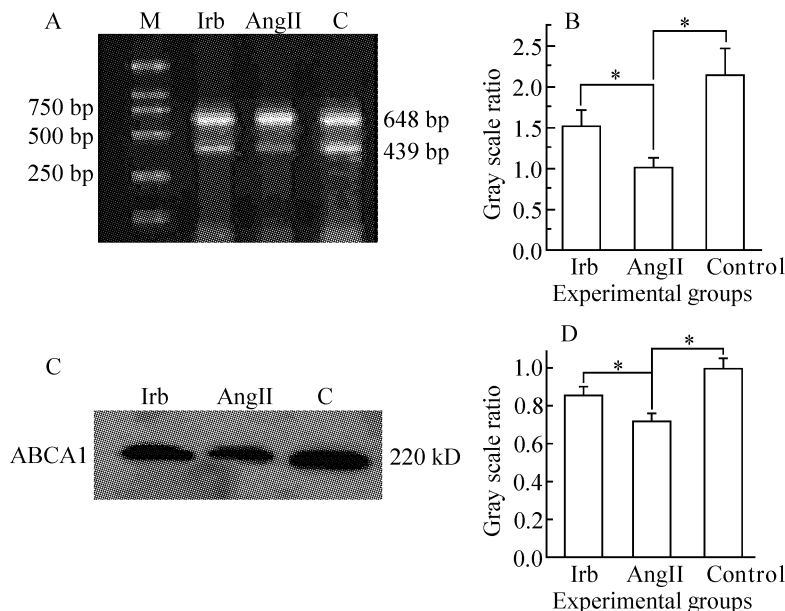


Fig 2 Expression of ABCA1 in different foam cell groups of THP - 1. $\bar{x} \pm s$. $n = 3$. A: RT - PCR assay of mRNA expression of ABCA1 and cf. GAPDH, M is marker, Irb is irbesartan group, Ang II is angiotension II group, C is control group, GAPDH is internal control (MW 648 bp), ABCA1 mRNA (MW 439 bp); B: gray scale ratio of ABCA1 mRNA expression product in different groups, * $P < 0.05$ vs Ang II group; C: Western blotting electrophoregram of ABCA1, MW is 220 kD; D: laying gray scale value of the expression of ABCA1 protein in control group is 100%, 28% decreased in Ang II group refer to control group, in Irb group, 18% decreased vs Ang II group, all * $P < 0.05$ vs Ang II group.

图 2 各组 THP - 1 源性泡沫细胞 ABCA1 的表达

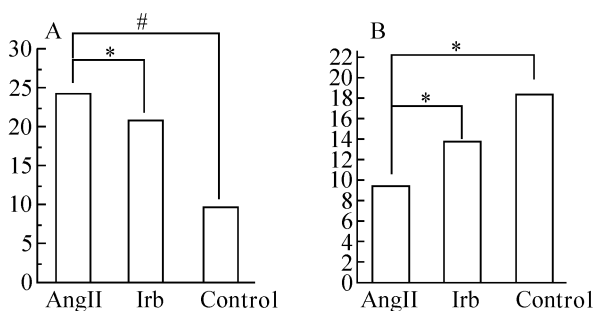


Fig 3 Cholesterol content and effluent rate in different groups. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. A: cholesterol content in different groups, Ang II group vs control group, $^{\#}P < 0.05$; Irb group vs Ang II group, $^*P < 0.05$; B: cholesterol effluent rate in different groups, all $^*P < 0.05$ vs Ang II group.

图3 各组胆固醇含量及胆固醇外排率

4 胆固醇流出的测定结果

如图3所示: Ang II组泡沫细胞胆固醇流出率(9.38 ± 1.50)%较对照组低48.7%,而Irb组较Ang II组显著高47.3% ($P < 0.05$)。

讨 论

泡沫细胞的出现是动脉粥样硬化病变的早期特征,泡沫细胞内胆固醇的有效流出即胆固醇逆转运,可以减轻泡沫细胞的泡沫化,延缓粥样硬化病变的形成,而ABCA1是泡沫细胞内胆固醇流出的最重要途径^[8]。研究发现TD纯合子冠心病的发病率是正常人的6倍,ABCA1基因敲除鼠(ABCA1^{-/-}鼠)具有与人TD类似的表型,转基因研究证实,ABCA1的过度表达促进胆固醇从巨噬细胞流出,并抑制AS斑块的形成^[9,10],因此,ABCA1的表达调控可能在AS的形成中起重要作用,如何调控ABCA1成为人们关注的焦点,近来Santamarina-Fojo等^[11]研究证实,ABCA1的表达受到诸多因素的调控,许多代谢物,如胆固醇、cAMP、过氧化物酶体增殖子活化受体(peroxisome proliferator activated receptor, PPAR)激动剂、干扰素等对ABCA1基因的转录都有调节作用^[11]。然而对AS的形成与发展起重要促进作用的Ang II是否对ABCA1表达有调控作用尚不清楚。

最新公布的心脏后果预防评价(heart outcomes prevention evaluation, HOPE)试验中的一项前瞻性双盲3×2析因研究分试验(SECURE)结果显示,以经B超测定颈动脉内膜厚度的增加为判断AS进展的指标,对照组为0.0217 mm/年,雷米普利2.5 mg/d或10 mg/d组分别为0.0180 mm/年和0.0137 mm/年($P < 0.05$),说明长期应用雷米普利能延缓AS的进程^[12],该结果表明,抑制Ang II产生或发挥作用的ACE抑制剂雷米普利具有明显抑制AS形成和发展

的作用。Keidar等^[4]认为其可能作用包括:抑制巨噬细胞对脂蛋白的摄取;减少胞内脂质的合成;减轻炎症反应等。

实验显示,Ang II对THP-1源性泡沫细胞的形成起着明显的促进作用,细胞内胆固醇含量较对照组明显增加,胆固醇外排率较对照组明显减少,另一方面,AT1R拮抗剂Irb则在一定程度上减轻Ang II的致泡沫化作用,使细胞内胆固醇含量较Ang II组减少15.7%,胆固醇外排率较Ang II组增幅达47.3%,但是却不能完全阻断泡沫细胞的形成。该结果表明,Ang II除通过AT1R引起巨噬细胞泡沫化外,还存在其它机制导致细胞泡沫化。在同一实验中,作者观察到Ang II显著抑制细胞表面膜蛋白ABCA1 mRNA的表达,并且其蛋白表达水平与mRNA表达一致,较对照组下降达28% ($P < 0.05$),而Irb组的ABCA1 mRNA和蛋白表达较Ang II组分别增加36%和18%。因此,Ang II可以抑制THP-1泡沫细胞ABCA1的表达,抑制胆固醇流出。

本研究结果提示,Ang II对泡沫细胞ABCA1表达有负性调控作用。因此,Ang II促进AS形成的一个重要机制,就是通过其受体抑制ABCA1的表达,抑制巨噬细胞胆固醇的外流,加速泡沫细胞的形成。

(致谢:感谢华中科技大学同济医学院附属协和医院国家重点实验室-心血管生化室全体老师给予本实验的热心帮助和指导)

[参 考 文 献]

- [1] Oram JF, Lawn RM. ABCA1: The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol[J]. J Lipid Res, 2001, 42(8): 1173-1179.
- [2] Bodzioch M, Orso E, Klucken J, et al. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease[J]. Nat Genet, 1999, 22(4): 347-351.
- [3] Gross CM, Gerbauer S, Quensel C, et al. Angiotensin II type 1 receptor expression in human coronary arteries with variable degrees of atherosclerosis[J]. Basic Res Cardiol, 2002, 97(4): 327-333.
- [4] Keidar S, Attias J. Angiotensin II injection into mice increases the uptake of oxidized LDL by their macrophages via a proteoglycan-mediated pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 239(1): 63-67.
- [5] 王淳本, 宗义强, 吴万生, 等. 两步超速离心法快速分离血浆大量极低密度脂蛋白[J]. 同济医科大学学报, 1995, 24(3): 169-171.
- [6] Gamble W, Vaughan M, Kruth HS, et al. Procedure for determination of free and total cholesterol in micro- or nanogram amounts suitable for studies with cultured cells[J]. J Lipid Res, 1978, 19(8): 1068-1070.

- [7] Lin GR, Bornfeldt KE. Cyclic AMP – specific phosphodiesterase 4 inhibitors promote ABCA1 expression and cholesterol efflux[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290(2): 663 – 669.
- [8] Oram JF. HDL apolipoproteins and ABCA 1 partners in the removal of excess cellular cholesterol[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(5): 720 – 727.
- [9] Singaraja RR, Bocher V, James ER, et al. Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and apoA1 dependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response element in intron 1 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(36): 33969 – 33979.
- [10] Vaisman BL, Lambert G, Amar M, et al. ABCA1 overexpression leads to hyperalpha lipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice[J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(2): 303 – 309.
- [11] Santamarina – Fojo S, Remaley AT, Neufeld EB, et al. Regulation and intracellular trafficking of the ABCA 1 transporter[J]. *J Lipid Res*, 2001, 42(9): 1339 – 1345.
- [12] Lonn E, Yusuf S, Dzavik V, et al. Effects of ramipril and vitamin E on atherosclerosis; the study to evaluate carotid ultrasound changes in patients treated with ramipril and vitamin E (SECURE) [J]. *Circulation*, 2001, 103(7): 919 – 925.

(上接第 315 页)

去除龈上菌斑后,用棉纱卷隔湿,微风吹干牙面,将无菌滤纸条(2 mm × 8 mm)轻轻插入至龈沟底,停留 30 s 后取出纸条,放入微离心管中,用磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.4)按 1:100 稀释 GCF,振荡 1 h,离心 10 min,取上清液保存于液氮中待检。

5 SOD 活性测定

放射免疫测定法,试剂盒由上海第二军医大学同位素室提供。

6 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对所得数据进行方差分析。

结 果

1 实验组和对照组治疗前后牙周各临床指标及 SOD 含量的变化

结果见表 1,治疗后,实验组牙龈指数(GI)、牙周探诊深度(PD)均明显低于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$);而治疗前两组比较,上述指标未见显著差别($P > 0.05$)。治疗前,实验组龈沟液 SOD 活性与对照组比较无显著差别($P > 0.05$),而治疗后,实验组龈沟液 SOD 活性显著高于对照组($P < 0.05$)。

表 1 治疗前后两组牙周临床指标及 SOD 含量的变化

Tab 1 Comparison of periodontical index and SOD level in two groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s$. $n = 30$)

	Experimental group		Control group	
	Before treatment	After treatment	Before treatment	After treatment
GI	3.31 ± 0.33	1.18 ± 0.78 *	3.51 ± 0.31	2.28 ± 0.66
PD(mm)	4.52 ± 0.66	1.45 ± 0.77 [△]	4.98 ± 0.76	3.08 ± 0.39
AL(mm)	3.44 ± 0.51	3.55 ± 0.49	3.59 ± 0.61	4.06 ± 0.54
SOD(10 ³ U/L)	0.12 ± 0.21	2.02 ± 0.20 *	0.18 ± 0.20	0.55 ± 0.18

* $P < 0.05$, [△] $P < 0.01$ vs control group.

讨 论

SOD 是氧自由基的专一清除酶,周立社等^[3]的研究结果表明,龈沟液中(GCF – SOD)活性随牙周组织炎性破坏的加重而明显降低,与牙周临床指标 GI、AL、PD 呈显著负相关。

说明 GCF – SOD 水平可作为牙周炎症病变的临床参考指标。米诺环素是广谱的抑菌剂,能抑制大部分牙周炎原菌^[4];体外实验证明米诺环素的抑菌效果优于其它抗菌药物,近年来,牙周炎治疗中局部用药有替代全身用药的趋势,Greenstein 等^[5]于 1998 年提出局部释放系统的 4 项标准是牙周炎局部药物治疗的依据。

贾惠梅等^[6]做了米诺环素对牙周膜细胞在根面上附着和增殖影响的研究发现,米诺环素处理根面后,能显著提高细胞的附着和增殖。但对米诺环素的作用机制未作进一步研究。本研究表明局部应用盐酸米诺环素糊剂作为牙周炎治疗的辅助方法可显著改善牙周炎的临床指标,提高牙周炎的治疗效果,同时提高了龈沟液中 SOD 活性。其作用机制可能与盐酸米诺环素在杀灭牙周袋局部病原菌的同时减少了氧自由基的产生,提高了龈沟液中 SOD 活性有关。

参 考 文 献

- [1] 李秀兰,李本容,赵 恂. 龈沟液中超氧化物歧化酶水平与牙周炎关系的研究[J]. *中华口腔医学杂志*, 1997, 32(6): 349.
- [2] Hagiwara S, Takamatsu N, Tominaga Y, et al. Subgingival distribution of periodontopathic bacterial in adult periodontitis and their susceptibility to minocycline2 HCL[J]. *J Periodontol*, 1998, 69(1): 92 – 99.
- [3] 周立社,李 利,罗桂兰. 龈沟液超氧化物歧化酶活性与牙周炎的关系[J]. *包头医学院学报*, 1999, 15(2): 20 – 22.
- [4] Baker PJ, Evans RT, Slots J, et al. Susceptibility of human oral anaerobic bacterial to antibiotics suitable for topical use[J]. *J Clin Periodontol*, 1985, 12(3): 201 – 208.
- [5] Greenstein G, Polson A. The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases: a comprehensive review[J]. *J Periodontol*, 1998, 69(5): 507 – 513.
- [6] 贾惠梅,欧阳翔英,曹采方. 米诺环素对牙周膜细胞在根面上附着和增殖的影响[J]. *现代口腔医学杂志*, 2005, 19(6): 612 – 614.