

西帕依固龈液对 LPS 抑制人牙龈成纤维细胞 DNA 合成 和细胞周期改变的影响

艾比拜·玉素甫¹, 哈木拉提·吾甫尔^{2,*}, 钟良军³

(新疆医科大学 1. 第一附属医院内分泌科; 2. 维吾尔医学系; 3. 第一附属医院口腔科, 乌鲁木齐 830054)

[摘要] 目的: 研究西帕依固龈液对内毒素(lipopolysaccharide, LPS)引起人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblast, HGF) DNA 合成和细胞周期改变的影响。方法: 采用健康人牙龈组织原代培养的 HGF, 以 25 mg/L LPS 作为刺激因子, 用流式细胞仪技术观察西帕依固龈液对 LPS 引起 HGF 细胞周期改变的影响。结果: LPS 刺激后, DNA 合成前期细胞比例(G₁期)明显上升, 而 DNA 合成期(S期)细胞比例及细胞增殖指数(proliferation index, PrI)下降, 西帕依固龈液可以使 G₁期细胞所占百分比下降, 并可使 S 期细胞比例及 PrI 上升。结论: 西帕依固龈液能够明显改善 LPS 抑制 HGF 增殖的影响, 对牙龈纤维层也有保护作用, 有助于牙周病的防治。

[关键词] 西帕依固龈液; 内毒素; 流式细胞仪; 细胞周期

[中图分类号] R329.28 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2006)04-0483-04

Effects of xipayi mouth rinse on the DNA synthesis and change of cell cycles of human gingival fibroblast induced by lipopolysaccharide

AIBIBAI · Yusufu¹, HAMULATI · Wufuer^{2,*}, ZHONG Liang-jun³

(1. Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University; 2. Department of Uygur Medicine, Xinjiang Medical University; 3. Department of Stomatology, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of xipayi mouth rinse on the DNA synthesis and change of cell cycles of human gingival fibroblast (HGF) induced by lipopolysaccharide (LPS).

Methods HGF was stimulated with LPS at 25 mg/L. Flow cytometry was used to examine the effect of xipayi mouth rinse at 25 mg/L on the DNA synthesis and change of HGF cell cycles.

Results The percentage of HGF in G₁ phase increased after the cells were induced by LPS, while the percentage of HGF in S phase decreased. Xipayi mouth rinse could ameliorate this phenomenon.

Conclusion Xipayi mouth rinse can significantly ameliorate the inhibitory effect of LPS on the proliferation of HGF, suggesting the anti-inflammatory effect of xipayi mouth rinse in the treatment and prevention of periodontal diseases.

Key words: xipayi mouth rinse; lipopolysaccharide; flow cytometry; cell cycle

[J Cent South Univ (Med Sci), 2006,31(4):0483-04]

牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblast, HGF)是牙龈结缔组织的主要组成细胞,对维护牙周组织的健康具有重要作用。在牙周炎症的发展过程中,革兰氏阴性厌氧菌表面最重要的致病因

子内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)对 HGF 具有毒性作用,并能够抑制细胞增殖,从而造成牙周组织的直接损伤^[1,2]。

以没食子(春虫秋果)为原料研制的西帕依固

龈液是维药,收录于国家部颁标准维吾尔药分册^[3],具有健齿固龈、消炎和防腐之功效,用于治疗牙周炎、牙龈炎、咽喉炎及口臭等。在临床已应用十余年,证明抗炎效果显著。已有药理学研究证明其具有明显的抗菌、消炎、镇痛及清除自由基等作用^[4,5]。本实验采用流式细胞仪观察西帕依固龈液对 LPS 抑制 HGF 增殖的影响,旨在从细胞和分子水平上探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 西帕依固龈液(新疆奇康哈博维药有限公司生产); E coli. O55:B5 LPS (Sigma 公司); DMEM 培养液(美国 Gibco 公司); 胎牛血清(陕西华美生物工程公司); 地塞米松注射液; DNA 荧光染料(碘化丙啶 PI, 陕西华美生物工程公司); 离心机、流式细胞仪及专用多参数细胞周期分析软件(electronically programmable individual cell sorter, EPICS, 美国 Coulter 公司)。

1.2 HGF 的分离培养 取正畸拔牙区的健康牙龈组织,在超净台内剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的组织块,均匀铺在 25 mL 培养瓶内,翻转瓶底向上,加入 4 mL 含 10% 胎牛血清和青链霉素各 100 U/mL 的 DMEM 培养液,置 5% CO₂, 37 °C 饱和湿度孵箱中培养 2 ~ 4 h,待组织块贴牢瓶底后轻轻翻转培养瓶,继续培养。倒置显微镜下观察细胞生长情况,待细胞长满瓶底后用 0.25% 胰酶消化传代,第 6 ~ 16 代细胞用于实验,等量传代于 25 mL 培养瓶中,培养 24 h,待细胞贴壁后,开始加药。

1.3 实验分组 取对数生长期 HGF,作活细胞计数,用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液配成 1×10^5 细胞悬液,每个培养瓶加入 5 mL 细胞悬液,以等细胞量接种。孵育 24 h 贴壁后,弃原培养液,清洗 2 次加药。第 1 组为空白对照组;第 2 组为阳性对照组, LPS 培养 36 h 后洗去,加培养液再培养 24 h;第 3 组为 LPS 培养 36 h 后洗去,加西帕依固龈液再培养 24 h;第 4 组为 LPS 培养 36 h 后洗去,加地塞米松再培养 24 h;第 5 组为加固龈液培养 24 h 后洗去,加 LPS 再培养 36 h,停止培养,2.5 g/L 胰酶消化细胞,用吸管将细胞沿瓶壁轻轻吹落下来,分别收于离心管中。每组设立 3 个平行样本,西帕依固龈液终末浓度为 50 mg/L, LPS 终末浓度为 25 mg/L,地塞米松终末浓度为 2 mg/L。

1.4 细胞周期测定 将消化下来的细胞用 2

mL 平衡盐溶液(PBS)洗涤 2 次(离心 800 r/min, 5 min),离心弃去 PBS,用剩余的 PBS 充分混匀细胞,加入冰冷的 70% 乙醇,震荡混匀,用封口膜封口,置 4 °C 冷藏室固定过夜。检测前,离心(800 r/min, 5 min),弃乙醇,用 PBS 洗涤 2 次,用剩余的 500 μL PBS 将细胞吹散。各管加入 RNAaseA(终浓度为 100 U/mL)及 Triton(终浓度为 10 U/mL) 37 °C 消化 1 h,再加入碘化丙啶(propidium iodide, PI)染液,终浓度为 30 mg/L,4 °C 避光染色 0.5 h,上机。流式细胞仪测试条件:氩离子激光光源工率为 250 Mw,激发波长 488 nm,接受波长 575 nm,每批样本需调节仪器,经流式细胞仪测定及联机专用软件分析处理,计算各细胞周期时相细胞比例。

2 结果

与空白对照组相比, LPS 培养 36 h 后换用培养液再培养 24 h, DNA 合成前期(G₁期)细胞所占百分比由 60.1% 增加至 88.6%,相反, DNA 合成期(S期)的百分比由 20.8% 下降至 4.2%,反映细胞增殖活力的增殖指数(proliferation index, PrI)也明显下降。两组之间差异有统计学意义。 LPS 培养 36 h,换用西帕依固龈液或地塞米松培养 24 h, DNA 合成前期(G₁期)细胞所占百分比与阳性对照组相比分别下降 76% 和 74.3%,而在 DNA 合成期(S期)增加至 11.5% 和 14.3%, PrI 也明显上升。先加西帕依固龈液培养 24 h 后,再加 LPS 培养 36 h,同样可以使 DNA 合成前期(G₁期)细胞所占百分比分别下降, DNA 合成期(S期)细胞百分比上升,在 3 个实验组中,本组 DNA 合成期(S期)细胞百分比最高(表 1,图 1)。

表 1 西帕依固龈液对 LPS 抑制 HGF DNA 合成和对细胞周期改变的影响

试验分组	细胞周期中各期细胞所占的百分比			PrI (%)
	G ₁ (%)	S (%)	G ₂ M (%)	
第 1 组	60.1*	20.8*	19.1*	39.9*
第 2 组	88.6	4.2	7.2	11.4
第 3 组	76*	11.5*	12.6*	24.1*
第 4 组	73.4*	14.3*	12.3*	26.6*
第 5 组	73*	15.7*	11.4*	27.1*

第 1 组:空白对照组;第 2 组:阳性对照组, LPS 培养 36 h 后洗去,加培养液再培养 24 h;第 3 组: LPS 培养 36 h 后洗去,加西帕依固龈液再培养 24 h;第 4 组: LPS 培养 36 h 后洗去,加地塞米松再培养 24 h;第 5 组:加固龈液培养 24 h 后洗去,加 LPS 再培养 36 h;与第 2 组相比, * P < 0.05

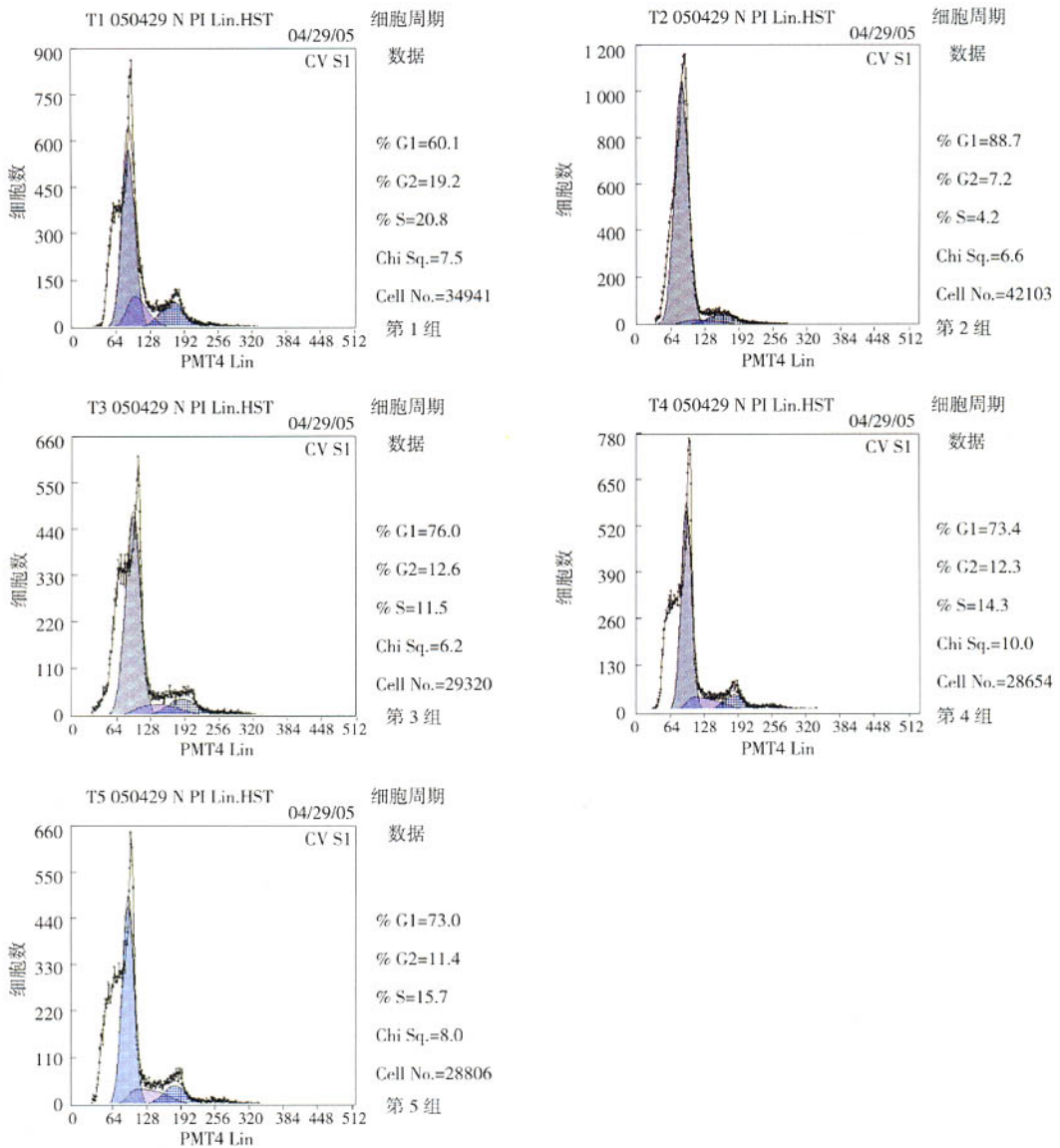


图 1 5 个实验组培养细胞各时相 DNA 含量 第 1 组:空白对照组;第 2 组:阳性对照组,LPS 培养 36 h 后洗去,加培养液再培养 24 h;第 3 组:LPS 培养 36 h 后洗去,加西帕依固龈液再培养 24 h;第 4 组:LPS 培养 36 h 后洗去,加地塞米松再培养 24 h;第 5 组:加固龈液培养 24 h 后洗去,加 LPS 再培养 36 h

Fig. 1 DNA contents of each phase of cell cycle in 5 experimental groups Group 1: Blank control group; Group 2: Positive control group, which cultured in DMEM for 24 h after in LPS for 36 h; Group 3: Cultured in xipayi mouth rinse for 24 hours after in LPS for 36 h; Group 4: Cultured in dexamethasone for 24 h after in LPS for 36 h; Group 5: Cultured in LPS for 36 h after in xipayi mouth rinse for 24 h

3 讨 论

DNA 是细胞内遗传物质,细胞周期各时相 DNA 含量呈规律性变化,DNA 含量的变化代表细胞的生长代谢、分裂和遗传情况,是衡量细胞生命活动的重要指标^[6],检测 DNA 含量对研究细胞周期具有重要意义。细胞周期包括间期和分裂期

(M)两部分,间期又分为 G₁期,S期和 G₂期。G₁期为 DNA 合成前期,发生各种生化变化,为 S 期 DNA 合成作准备。S 期即 DNA 合成期,进行 DNA 的合成复制,为遗传物质较易受损时期,一般增殖旺盛的细胞在此期的比例较高。G₂期为细胞分裂前期,为细胞分裂做准备,若此期内细胞分裂受阻,将影响细胞进行分裂,M 期为有丝分裂期,细

胞分裂相的多少可作为细胞生活状态和增殖旺盛情况判断的重要参考指标^[7]。PrI(S + G₂M)为增殖指数,代表群体中增殖期细胞的数量,反应整个细胞群体的增殖状态。

LPS为牙周致病菌的重要致病因子,通过和血液中内毒素结合蛋白及内毒素受体CD14分子结合形成复合物,作用于牙周组织的各种细胞,引起炎症反应。由于LPS可以抑制细胞的DNA合成,同时对HGF有毒性作用,使其变形坏死,从而使细胞增殖能力明显下降,导致牙周组织受损,自身修复能力下降,造成牙周袋的形成。因此,有效保护HGF免受LPS的损伤,增强细胞增殖能力,就可起到预防和治疗牙周病的作用^[1]。本研究主要观察了西帕依固龈液对LPS作用后抑制HGF增殖活性的影响。结果表明,LPS能够明显改变HGF细胞周期各期细胞所占百分比,使大多数细胞更多的停滞在G₁期,DNA的合成被明显抑制,PrI增殖指数下降,提示细胞增殖受到抑制。本结果与Layman等^[8]的结果一致。李虹等^[9]报道,LPS对HGF的抑制效果前24h最明显,以后增殖能力开始缓慢恢复,但即使7d后也难以恢复到正常水平。用LPS刺激后,换用西帕依固龈液或地塞米松均可明显改善LPS对HGF的抑制作用。地塞米松为公认的抗炎药物,在炎症发生过程中,可清除LPS,保护细胞膜,抑制内源性细胞因子的产生。本实验结果表明地塞米松起到了改善LPS抑制HGF增殖的作用,且西帕依固龈液改善LPS对HGF抑制效果与地塞米松接近。已知糖皮质激素具有抑制成纤维细胞的增殖作用,在本实验中表现与此不一致,但与岳晓红等^[1]的文献报道一致。先用西帕依固龈液培养后再加入LPS培养,同样可改善LPS对HGF增殖的抑制效果,改善效果比先加入LPS,后加西帕依固龈液组的效果更明显,能够更有效地改善S期的DNA合成。即先加西帕依固龈液对HGF起到预防性保护作用,比细

胞已经受到LPS炎症刺激后再用西帕依固龈液治疗,会取得更好的效果,提示西帕依固龈液能拮抗LPS,阻止其对细胞的破坏作用外,对细胞还具有保护作用,其预防效果好于治疗效果。

参考文献:

- [1] 岳晓红,唐荣银,席清平.五倍子水提取物对LPS抑制人牙龈成纤维细胞DNA合成和对细胞周期改变的影响[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2003,13(12):696-699.
- [2] Batruff JB, Yukna RA, Layman DL, et al. Outer membrane vesicles from *Porphyromonas gingivalis* affect the growth and function of cultured human gingival fibroblasts and umbilical vein endothelial cells [J]. *Periodontol*, 2005, 76(6): 972-979.
- [3] WS₃-BW-0123-98, Xipayi GuYin Ye[S]. 中华人民共和国卫生部药品标准,维吾尔分册,1998,123.
- [4] 斯拉甫,努尔·买买提,阿布都热依木素甫,等.维药西帕依固龈液的药理作用研究[J].中国民族医药杂志,1999,5(3):35-36.
- [5] 哈木拉提·吾甫尔,艾比拜·玉素甫,钟良军.西帕依固龈液对内毒素诱导人牙龈成纤维细胞分泌IL-6的抑制作用[J].中南大学学报(医学版),2006,31(3):326-328.
- [6] 张亚庆,肖明振,赵守亮,等.防线共生防线杆菌表面相关物质对人牙龈成纤维细胞超微结构的影响[J].实用口腔医学杂志,1999,15(1):21-23.
- [7] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版公司,2004.9-12.
- [8] Layman DL, Diedrich DL. Growth inhibitory effects of endotoxins from *bacteroides gingivalis* and *intermedius* on human gingival fibroblasts in vitro [J]. *Periodontol*, 1987, 58(6): 387-392.
- [9] 李虹,王顺靖,萧卓然,等.牙周病优势菌群内毒素脂多糖对人牙龈成纤维细胞生长繁殖的影响[J].华西口腔医学杂志,1993,11(2):145-146.

(本文编辑 傅希文)