

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.35.012

尼古丁对牙周炎大鼠牙周膜成纤维细胞的毒性作用

苏鑫 毕良佳[△] 孟培松[△] 胡波 刘继乐

(哈尔滨医科大学附属第四医院口腔科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:观察尼古丁对牙周炎大鼠牙周膜成纤维细胞(PDLFs)增殖的抑制作用及对细胞周期分布的影响,探讨尼古丁的细胞毒性作用,为口腔疾病的预防及治疗提供基础。**方法:**选取30只SD大鼠,采用丝线结扎联合口内接种细菌的方法建立牙周炎大鼠模型。将不同浓度的尼古丁分别作用于大鼠的牙周膜成纤维细胞(PDLFs)中,观察大鼠牙周组织的变化情况,MTT法测定细胞增殖活性,分析不同浓度尼古丁对PDLFs增殖的抑制作用。**结果:**实验组大鼠牙周组织胶原纤维束排列紊乱,有炎症细胞浸润;对照组大鼠牙龈未见红肿或出血。尼古丁可抑制PDLFs增殖,并且呈浓度依赖性,随着浓度的增加,对PDLFs增殖的抑制作用增强,差异具统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比,不同浓度尼古丁作用下牙周炎大鼠牙周膜成纤维细胞周期的分布率明显不同($P<0.05$)。**结论:**尼古丁对牙周膜成纤维细胞增殖具有明显的抑制作用,尼古丁的浓度影响牙周组织的修复重构能力。

关键词:尼古丁;牙周炎;牙周膜成纤维细胞;毒性作用

中图分类号:Q95-3;R781.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)35-6848-03

Toxic Effects of Nicotine on the Periodontal Ligament Fibroblasts of Rats with Periodontitis

SU Xin, BI Liang-jia[△], MENG Pei-song[△], HU Bo, LIU Ji-le

(Department of Stomatology, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of nicotine in various concentrations on the proliferation and cells cycle of periodontal ligament fibroblasts (PDLFs) and to explore the toxicity of nicotine so as to make a reference to prevent and treat the stomatological disease. **Methods:** Thirty SD rats were selected to establish the rats model. The different concentrations of nicotine effect on rats respectively in the periodontal ligament fibroblasts (PDLFs). Then the changes of periodontal tissue in rats were observed, the cells' proliferation activity were determined by MTT and the inhibition of nicotine with different concentrations on the PDLFs' proliferation were analyzed. **Results:** The periodontal tissue collagen fiber bundle of rats in the experimental group was disorder with inflammation cells, while that of rats in the control group was normal without swelling or bleeding. On different concentrations, the proliferation of PDLFs was all inhibited under the effect of nicotine and the inhibition was concentration-dependent($P<0.05$). FCM results showed that after the effect of nicotine of different concentrations, compared with control group, the percentage of G0-G1 cell cycle of PDLFs increased gradually and that of S and G2-M cell cycle decreased gradually. The differences were statistically significant and concentration-dependent ($P<0.05$). And with the increase of concentrations, the inhibition of PDLFs proliferation got enhanced($P<0.05$). **Conclusion:** It is indicated that the nicotine can in the inhibit the proliferation of periodontal ligament fibroblasts and the concentrations of nicotine would influence the reconstructive capability of oral tissues.

Key words: Nicotine; Periodontitis; Periodontal ligament fibroblasts; Toxicity

Chinese Library Classification: Q95-3; R781.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)35-6848-03

前言

牙周炎是常见的慢性破坏性口腔疾病,其发生发展与牙周致病菌和宿主易感性有关^[1]。牙周膜成纤维细胞(Periodontal ligament fibroblasts, PDLFs)是具有再生和修复功能的牙周组织中最重要细胞群之一,具有多种生物学功能和分化潜能,能

够附着在结合上皮、牙龈上皮等组织,分化形成具有牙周结构的组织,对牙周组织的修复再生起着重要的促进作用^[2-4]。近年来,相关研究认为吸烟可能是牙周疾病发生发展的高危因素^[5-6]。由于烟草中的尼古丁属于毒性生物碱,其生物学毒性对牙周组织细胞的增殖及修复再生功能具有抑制作用,因而对牙周病的发生发展及治疗产生重要影响,但其作用机制尚未完全明确^[7]。本实验通过建立牙周炎大鼠模型,检测不同浓度尼古丁作用下牙周膜成纤维细胞增殖的抑制效果,探讨吸烟对牙周组织的破坏作用,为临床治疗提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂及仪器

30只健康雄性成年SD大鼠(体重180-220g,哈尔滨医科

作者简介:苏鑫(1982-),男,主治医师,硕士,研究方向:牙周病及咬合创伤,电话:13845139401

[△]通讯作者:毕良佳,教授,主任医师,主要从事牙周病及种植牙方面的研究;

孟培松,教授,主任医师,主要研究方向:口腔疾病的基础与临床研究

(收稿日期:2014-06-30 接受日期:2014-07-25)

大学动物实验中心提供)、DMEM 培养基(中国科学院生命科学研究院)、尼古丁(Sigma 公司,美国)、MTT 试剂盒、免疫组化试剂盒(Sigma, USA)、小牛血清(FBS, 哈尔滨医科大学附属第四医院)、总 RNA 提取试剂盒(TaKaRa, 日本)、PCR 扩增仪(Eppendorf 公司)、二氧化碳恒温培养箱(Heraeus, Germany)、倒置相差显微镜(Olympus, Japan)。

1.2 实验方法

1.2.1 模型制备 实验大鼠给予充足饲料 3 d。采用丝线结扎联合口内接种细菌的方法建立牙周炎大鼠模型。

1.2.2 PDLF 分离培养 大鼠脱颈处死, 75%酒精浸泡 10 min, 无菌条件下分离全部软组织, 仅保留牙齿及颌骨, 分离上下颌骨, 完整拔除上下颌牙齿, 以无菌刀片刮除牙周膜组织, 将 200 mL/L 含 FBS 的牙周膜成纤维细胞培养基置于 37℃ 5% CO₂ 的恒温培养箱中进行培养; 细胞长满培养瓶底 80%-90% 时, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代; 24 h 后待细胞贴壁生长, 分组更换培养基。

1.2.3 实验分组 取第 6 代牙周炎大鼠牙周膜成纤维细胞, 随机分为 6 组。A 组加入含 100 ng/mL 尼古丁 1%FBS 的 DMEM 培养液 200 μ L; B 组加入含 300 ng/mL 尼古丁 1%FBS 的 DMEM 培养液 200 μ L; C 组加入含 500 ng/mL 尼古丁 1%FBS 的 DMEM 培养液 200 μ L; D 组加入含 2 μ g/mL 尼古丁 1%FBS 的 DMEM 培养液 200 μ L; E 组加入含 5 μ g/mL 尼古丁 1%FBS 的 DMEM 培养液 200 μ L。对照组: 加入含 1%FBS 的 DMEM 培养液 200 μ L。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 细胞的形态学观察 细胞以 5×10^6 mL 接种于置有 2×2 cm² 的六孔培养板内, 在含 100 mL/L FBS 的 DMEM, 常温下培养 24 h, 尼古丁组(各加入含 100 ng/mL, 300 ng/mL, 500 ng/mL, 2 μ g/mL, 5 μ g/mL 尼古丁 1% FBS DMEM 培养液 200 μ L), 对照组(加入含 1%FBS 的 DMEM 培养液 200 μ L)继续培养 5 d, 取出玻片, HE 染色, 光镜下观察、照相。

1.3.2 细胞超微结构观察 细胞以 5×10^6 mL 接种于 25 mL 培养瓶中, 尼古丁组(各加入含 100 ng/mL, 300 ng/mL, 500 ng/mL, 2 μ g/mL, 5 μ g/mL 尼古丁 1% FBS DMEM 培养液 200 μ L), 对照组(加入含 1%FBS 的 DMEM 培养液 200 μ L)培养 5 d, 用 1.0 g/L 胰蛋白酶消化, 离心(1000 $\times$ g, 5 min), 细胞团块立即置戊二醛内固定 1 h, 再经锇酸固定和丙酮系列脱水, 环氧树脂包埋, 切取 60 nm 超薄切片, 经醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重电子染色后, 放入透射电镜观察、照相。

1.3.3 MTT 法检测细胞活性 细胞以 1×10^6 mL 接种于孔板内, 每孔 100 μ L, 培养 48 h。尼古丁组(各加入含 100 ng/mL, 300 ng/mL, 500 ng/mL, 2 μ g/mL, 5 μ g/mL 尼古丁 1%FBS DMEM 培养液 200 μ L), 对照组(加入含 1%FBS 的 DMEM 培养液 200 μ L)。培养 48 h 后, 加入 20 μ L 的 MTT 溶液和 200 μ L 培养液, 孵育 4 h, 每孔加入二甲基亚砷(MMSO)150 μ L, 酶标仪 490 nm 波长下测定每孔光密度值(OD), 计算公式: 细胞增殖抑制率(%)=(1-尼古丁组/正常对照组) $\times$ 100%。

1.3.4 流式细胞仪检测细胞周期 细胞以 1×10^6 mL 接种于孔板内, 每孔 100 μ L, 培养 48 h。尼古丁组(各加入含 100 ng/mL, 300 ng/mL, 500 ng/mL, 2 μ g/mL, 5 μ g/mL 尼古丁 1%FBS DMEM 培养液 200 μ L), 对照组(加入含 1%FBS 的 DMEM 培养液 200 μ L), 孵育 24 h, 冰乙醇固定, PI 染色, 流式细胞仪检测, 应用专

用的 DNA 拟合软件分析结果, 计算公式: 增殖指数(PI)=(S+G2M)/(G0G1+S+G2M) $\times$ 100%。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间均数比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠牙周细胞形态学变化

倒置显微镜下观察实验组大鼠牙间上皮溃疡、坏死, 牙周组织胶原纤维束排列紊乱、水肿变性, 可见炎症细胞浸润, 不同程度的菌斑、垢、牙龈增生、牙周袋, 表面可见吸收凹陷, 牙槽嵴顶轻度下降。

2.2 大鼠牙周细胞超微结构变化

尼古丁作用下细胞核的体积不同程度缩小, 周围出现大量溶酶体小泡, 粗面内质网、高尔基体及含胶原蛋白的分泌小泡减少, 微丝、微管分解甚至消失; 对照组胞质丰满, 可见排列呈束的微丝, 有大量细胞器, 细胞核内染色质分布均匀, 分裂旺盛。

2.3 尼古丁对牙周炎大鼠 PDLFs 细胞增殖的影响

与对照组相比, 不同浓度尼古丁对 PDLFs 增殖的抑制率明显不同。100 ng/mL 尼古丁抑制率为 (22.18 $\pm$ 2.25)%; 300 ng/mL 尼古丁抑制率为 (31.27 $\pm$ 3.17)%; 500 ng/mL 尼古丁抑制率为 (44.79 $\pm$ 4.33)%; 2 μ g/mL 尼古丁抑制率为 (47.91 $\pm$ 5.05)%; 5 μ g/mL 尼古丁抑制率 (51.67 $\pm$ 5.14)%。随着浓度的增高, 尼古丁对牙周炎大鼠 PDLFs 增殖的抑制作用增强, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 尼古丁对牙周炎大鼠 PDLFs 细胞周期分布的影响

如表 1 所示, 与对照组相比, 不同浓度尼古丁作用下牙周炎大鼠牙周膜成纤维细胞周期的分布率明显不同, 且具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 不同浓度尼古丁对牙周炎大鼠 PDLFs 细胞周期分布的影响

Table 1 Effects of nicotine with different concentrations on the cycle of PDLFs in rats with periodontitis

尼古丁(浓度) Nicotine (concentrations)	细胞周期分布(%) Cycles of PDLFs(%)		
	G0-G1	S	G2-M
100 ng/ml	87.17 $\pm$ 0.85	3.45 $\pm$ 0.97	10.18 $\pm$ 0.64
300 ng/ml	90.33 $\pm$ 0.52	3.47 $\pm$ 0.69	8.81 $\pm$ 0.88
500 ng/ml	92.39 $\pm$ 0.47	2.81 $\pm$ 0.73	7.26 $\pm$ 1.11
2 μ g/ml	94.57 $\pm$ 0.95	1.80 $\pm$ 0.71	6.33 $\pm$ 0.66
5 μ g/ml	97.13 $\pm$ 0.59	0.88 $\pm$ 0.14	5.30 $\pm$ 0.57

3 讨论

牙周病治疗的最终目的是促进牙周组织的再生和修复, 而修复和再生的基础是确保病变部位有足够的牙周膜细胞^[9-11]。牙周膜细胞具有成纤维细胞和成骨样细胞的双重特性, 能够合成胶原, 对牙周组织损伤的修复和重构具有重要作用^[12]。

研究表明, 吸烟是牙周病尤其是重度牙周炎发生的高危因素^[13]。烟草中含有一氧化碳、氧化根、亚硝基胺及尼古丁等

4000多种毒素中,尼古丁是毒性最突出的主要生物碱,可从多方面影响牙周病的发生发展及预后^[14]。体内研究认为,吸烟可使牙周病患者体内的中性粒细胞活力低下,影响牙周炎的龈下菌丛的组成结构^[15]。体外研究表明,尼古丁具有多重生物学毒性,可影响牙龈成纤维细胞和PDLFs的生长增殖,并影响细胞对牙根面的贴附等正常生物学行为^[16]。临床资料表明,吸烟可加重牙周病的临床症状,导致术后牙周创口愈合慢,这可能与尼古丁影响PDLFs的增殖有关^[17,18]。结合本研究,倒置显微镜下观察实验组大鼠牙间上皮溃疡、坏死、上皮钉突增生,牙周组织胶原纤维束排列紊乱、水肿变性,可见炎症细胞浸润,不同程度的菌斑、牙龈增生、牙周袋,表面可见吸收凹陷。这提示我们,烟草中的挥发成分丙烯醛和乙醛可改变牙周成纤维细胞的细胞支架,改变细胞形态,破坏细胞的贴附能力。

细胞周期分为分裂间期和有丝分裂期, G₀/G₁ 期细胞分布可反映处于分裂间期的细胞比例, S 期和 G₂ 期细胞分布可反映处于分裂增殖期的细胞比例^[19,20]。本研究结果显示,随着尼古丁浓度的增加, PDLFs 细胞分布率在 G₀-G₁ 期逐渐增高,而在 S 期和 G₂-M 期则明显降低,表明 PDLFs 细胞周期的分布对尼古丁呈浓度依赖性。说明尼古丁的浓度对 PDLFs 细胞周期的分布有明显影响。同时提示,在不同浓度的尼古丁作用下,大多数细胞阻滞在 G₀/G₁ 期,从而抑制 PDLFs 的增殖,这将为深入研究尼古丁抑制 PDLFs 增殖的作用机制提供新的方向。

综上所述,本研究分析了尼古丁对 PDLFs 增殖的影响,在不同浓度的尼古丁作用下, PDLFs 的增殖均受到抑制,且呈浓度依赖性。随着尼古丁浓度的增高,其抑制作用逐渐增强,对 PDLFs 增殖的抑制作用也逐渐增强,从而导致细胞的修复功能下降。

参考文献(References)

- [1] Heidari Z, Mahmoudzadeh-Sagheb H, Rigi-Ladiz MA, et al. Association of TGF- β 1-509 C/T, 29 C/T and 788 C/T gene polymorphisms with chronic periodontitis: a case-control study [J]. Gene, 2013,518(2):330-334
- [2] Gamal AY, Kumper RM, Al Gendy, et al. Doxycycline-Loaded β -Tricalcium Phosphate Release Following EDTA Root Surface Etching Improved the Clinical Outcomes in Chronic Periodontitis: An In Vivo Study[J]. J Periodontol, 2013,84(7):924-933
- [3] Park HJ, Baek KH, Lee HL, et al. Hypoxia inducible factor-1 α directly induces the expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand in periodontal ligament fibroblasts [J]. Mol Cells, 2011,31(6):573-578
- [4] Kalra N, Pradeep AR, Priyanka N, et al. Association of stem cell factor and high-sensitivity C reactive protein concentrations in crevicular fluid and serum in patients with chronic periodontitis with and without type 2 diabetes[J]. J Oral Sci, 2013,55(1):57-62
- [5] 胡波,刘玉三,苏鑫,等. 实验性牙周炎合并咬合创伤模型的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2014,14(12):2376-2378
Hu Bo, Liu Yu-san, Su Xin, et al. Research on Experimental Animal Model of Periodontitis Combined Occlusal Trauma [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014,14(12):2376-2378
- [6] Dantas AM, Mohn CE, Burdet B, et al. Ethanol consumption enhances periodontal inflammatory markers in rats[J]. Arch Oral Biol, 2012, 57:1211-1217
- [7] 薛敏,于江波,张月,等. TGF- β ₁ 在应力介导的牙周膜成纤维细胞增殖中的作用及其机制 [J]. 现代生物医学进展, 2013,13(7):1240-1243+1344
Xue Min, Yu Jiang-bo, Zhang Yue, et al. The Effect of TGF- β 1 on Proliferation by Cultured Periodontal Ligament Fibroblasts under Stress [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013,13(7):1240-1243+1344
- [8] Li Q, Lei H, Liu A, et al. The antishock effect of anisodamine requires the upregulation of α 7 nicotine acetylcholine receptors by IL-10 [J]. Life sciences, 2011,89:395-401
- [9] Hajishengallis G, Krauss JL, Liang S, et al. Pathogenic microbes and community service through manipulation of innate immunity[J]. Adv Exp Med Biol, 2012,946:69-85
- [10] Dias IH, Chapple IL, Milward M, et al. Sulforaphane restores cellular glutathione levels and reduces chronic periodontitis neutrophil hyperactivity in vitro[J]. PLoS One, 2013,8(6):66407
- [11] Wang XJ, Liu YF, Wang QY, et al. Functional expression of α 7 nicotinic acetylcholine receptors in human periodontal ligament fibroblasts and rat periodontal tissues [J]. Cell Tissue Res, 2010,340(2):347-355
- [12] Sadaoka S, Yagami K, Maki S. Nicotine in cigarettes promotes chromogranin A production by human periodontal ligament fibroblasts[J]. Arch Oral Biol, 2013,58(8):1029-1033
- [13] 刘颖凤,王小竞,吴礼安. 大鼠尼古丁实验性牙周炎动物模型的建立[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2008,03:148-152
Liu Ying-feng, Wang Xiao-jing, Wu Li-an, et al. The establishment of the experimental animal model of periodontitis nicotine in Rats [J]. Chinese Journal of Conservative Dentistry, 2008,03:148-152
- [14] Kim YS, Shin SI, Kang KL, et al. Nicotine and lipopolysaccharide stimulate the production of MMPs and prostaglandin E2 by hypoxia-inducible factor-1 α up-regulation in human periodontal ligament cells[J]. J Periodontal Res, 2012,47(6):719-728
- [15] Pereira Vasconcelos DF, Dias da Silva MA. Effects of simultaneous nicotine and alcohol use in periodontitis progression in rats: A histomorphometric study[J]. J Clin Exp Dent, 2013,1,5(2):95-99
- [16] Matthews JB, Chen FM, Milward MR, et al. Effect of nicotine, cotinine and cigarette smoke extract on the neutrophil respiratory burst[J]. J Clin Periodontol, 2011,38(3):208-218
- [17] 高丽,刘琪,葛颂,等. 尼古丁诱导人牙周膜成纤维细胞凋亡的实验研究[J]. 口腔医学研究, 2010,03:356-358
Gao Li, Liu Qi, Ge Song, et al. Research on the Nicotine induce periodontal ligament fibroblast apoptosis [J]. Journal of Oral Science Research, 2010,03:356-358
- [18] Cogo K, Calvi BM, Mariano FS, et al. The effects of nicotine and cotinine on Porphyromonas gingivalis colonisation of epithelial cells [J]. Arch Oral Biol, 2009,54(11):1061-1067
- [19] Lee SI, Kang KL, Shin SI, et al. Endoplasmic reticulum stress modulates nicotine-induced extracellular matrix degradation in human periodontal ligament cells [J]. J Periodontal Res, 2012,47(3):299-308
- [20] 陈慧中,卜欠欠,孔卫东,等. 尼古丁对人牙周膜成纤维细胞超微结构及分泌细胞因子的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2013,02:324-329
Chen Hui-zhong, Bu Qian-qian, Kong Wei-dong, et al. Nicotine on the periodontal ligament fibroblasts ultrastructure and secretion of cytokines[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2013,02:324-329