

复方奥硝唑 - 甲磺酸培氟沙星缓释制剂对人牙周膜细胞凋亡及超微结构的影 响 *

刘 宁¹ 刘鲁川^{1△} 郝立辉² 董正谋¹ 刘 娜¹ 安建平¹

(¹ 第三军医大学大坪医院野战外科研究所口腔科 重庆 400042 ;² 邢台医学高等专科学校口腔系 河北 邢台 054001)

摘要 目的 观察不同浓度复方奥硝唑 - 甲磺酸培氟沙星缓释制剂对人牙周膜细胞 (HPDLC) 凋亡与超微结构的影响。方法 用含有不同浓度复方奥硝唑 - 甲磺酸培氟沙星缓释制剂 (0、1.25、2.5、5、10、20g/L) 的培养液对人牙周膜细胞进行培养,流式细胞术检测细胞凋亡指数 透射电镜下观察 HPDLC 超微结构的改变。结果 在 1.25、2.5 g/L 的浓度下对 HPDLC 的凋亡率和超微结构均与对照组无显著性差异 而 5、10 g/L 的浓度组的细胞凋亡率较对照组小且超微结构显示细胞胞质内粗面内质网和线粒体增多,细胞突起增多 而在高浓度药物 20 g/L 的作用下,凋亡率有所增加,细胞发生退变,溶酶体增多。结论 5、10 g/L 的复方奥硝唑甲磺酸培氟沙星缓释制剂对体外培养的 HPDLC 的生长有一定促进作用,高浓度药物 20g/L 则对 HPDLC 生长有一定的抑制作用。

关键词 牙周炎;牙周膜细胞;凋亡;超微结构

中图分类号 R781.4 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273 (2011) 20-3816-04

Effect of Compound Ornidazole-pefloxacin Mesylate Sustained Release Preparation of Human Periodontal Ligament Cell Apoptosis and Ultrastructure Expression*

LIU Ning¹, LIU Lu-chuan^{1△}, HAO Li-hui², DONG Zheng-mou¹, LIU Na¹, AN Jian-ping¹

(¹ Department of Stomatology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China;

² Department of Stomatology, Xingtai Medical College, 054001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of different concentrations of compound ornidazole-pefloxacin mesylate sustained release preparation on human periodontal ligament cells (HPDLC) apoptosis and ultrastructure expression. **Methods:** Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of the HPDLC in different concentrations of compound ornidazole-pefloxacin mesylate sustained release preparation. The cell ultrastructure was detected by transmission electron microscope (TEM). **Results:** In 1.25, 2.5g/L group, HPDLC apoptosis and ultrastructure had no significant difference with that in the control group; In 5,10g/L concentration of the apoptosis rate group was smaller than that in the control group and the ultrastructure showed rough endoplasmic reticulum and mitochondria increased significantly in cytoplasm; The action of HPDLC under the high concentrations of drug in the 20g/L, the apoptosis rate increased compared with that in the control group, and cell degeneration, lysosomes increased. **Conclusion:** 5,10g/L of compound ornidazole pefloxacin mesylate sustained release preparation can promote the in vitro growth of HPDLC, 20g/L drug concentration can inhibit the growth of HPDLC.

Key words: Periodontitis; Periodontal ligament cells; Apoptosis; Ultrastructure

Chinese Library Classification: R781.4 **Document Code:** A

Article ID:1673-6273(2011)20-3806-04

前言

牙周病是人类常见多发的口腔疾病之一,是导致失牙最主要的原因。导致牙周病的始动因子是牙菌斑,故对局部感染的控制是治疗牙周病的关键。本课题组根据牙周炎的特殊病理特征研制了复方奥硝唑甲磺酸培氟沙星缓释制剂^[1],本制剂为局部缓释药物,可以直接作用于牙周袋杀灭致病菌,有药物浓度高,全身反应小等优点。前期已针对本药物的疗效以及毒性等均做了检测,且取得较理想结果。本实验拟通过体外细胞培养

的方法检测本制剂对人牙周膜细胞 (HPDLC) 凋亡以及超微结构的影响,判断本制剂对细胞的毒性^[2],为临床应用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

高糖 DMEM、胰蛋白酶 (Gibco, 美国), 标准型胎牛血清 (FBS, HyClone, 美国), 复方奥硝唑 - 甲磺酸培氟沙星缓释制剂 (奥硝唑 湖南九典制药有限公司, 批号 200905A05 ;甲磺酸培

* 基金项目 重庆市科技攻关项目 (CSTC2009AC5019)

作者简介 :刘宁(1986 -),女,硕士研究生,主要研究方向 牙周病的治疗。电话: (023)68757575, E- mail : liuningrain@126.com

△通讯作者 :刘鲁川, 电话: (023) 68757576, E-mail : Liuluchuan1957@126.com

(收稿日期 2010-12-20 接受日期 2011-01-18)

氟沙星 宜昌天仁药业有限责任公司,批号 090905)。

1.2 设备器材

单人双侧超净台 (2GH280222B 型,苏州净化设备厂),二氧化碳培养箱 (MCO211AI 型,日本三洋公司),倒置显微镜 (Olympus,日本) 流式细胞仪 (型号 BD FACScan, Becton-Dickinson 公司),透射电镜及照相系统 (飞利浦公司,荷兰)。

1.3 细胞体外培养及分组

取年龄 10~14 岁,因正畸需要拔除的健康牙,拔除后立即置含培养液的青霉素瓶中,在超净台内用 DMEM 培养液冲洗牙齿数遍,用眼科剪刮取牙根中部 1/3 的牙周膜组织^[3],在 DMEM 培养液浸润下,将组织剪切成 1 mm³ 大小的碎块,组织块法获得人牙周膜成纤维细胞并传代^[4],取第 5 代细胞用于实验。将细胞接种于六个培养瓶内,分别加入含 1.25、2.5、5、10、20 g/L 药物制剂的培养液培养,单纯加培养液做空白对照。观察细胞生长状态。

1.4 细胞凋亡检测

将 HPDLC 先用 0.25% 的胰酶 (含 0.02% 的 EDTA) 消化, 1000 r/min × 5 min 离心收集细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次,将细胞重悬于 195 μL 的 1 × Binding Buffer 中,轻轻吹打混匀再转移至 5 mL 的流式管中,加入 5 μL Annexin V - F ITC 染色液和

5 μL 的质量浓度为 20 μg/mL 的碘化丙啶 (PI),混匀,室温下避光孵育 15 min,每个样品以流式细胞仪采集约 10000 个细胞,半小时内上机检测凋亡细胞百分比^[5]。

1.5 对人牙周膜细胞超微结构的影响

取第 5 代生长良好的细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化后离心,按同种密度 $6.0 \times 10^5/\text{ml}$ 接种细胞于 100 ml 培养瓶,5% 普通 CO₂ 孵箱中培养 24 h,弃去培养液及未贴壁的细胞,分别加入含 1.25、2.5、5、10、20 g/L 药物制剂的培养液培养,单纯加培养液做空白对照,观察细胞生长在其对数生长期用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,分别收集于离心管中,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 2.5% 戊二醛固定细胞呈团块 2 h,丙酮梯度脱水,真空干燥,以环氧树脂 618 包埋,超薄切片,醋酸铀及枸橼酸铅双重染色,透射电镜下观察细胞超微结构^[6]。

2 结果

2.1 细胞培养及分组

成功分离培养人牙周膜细胞,牙周膜细胞成功分离培养^[7],光镜下见细胞呈长梭形或星形,胞突细长,胞体丰满,细胞质均匀,中央有圆形或椭圆型的胞核,细胞呈放射状、漩涡状排列 (图 1、2)。观察细胞生长状态在 3 天时达到对数生长期。

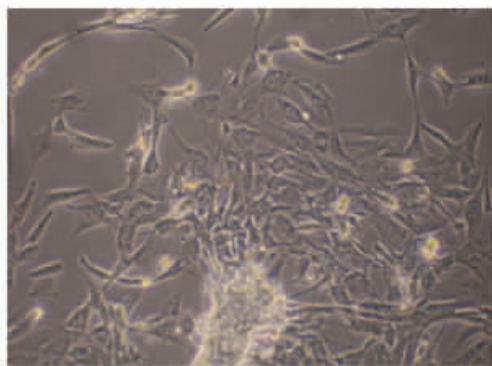


图 1 原代 HPDLC 游出 (× 200)

Fig.1 Original generation HPDLC (× 200)

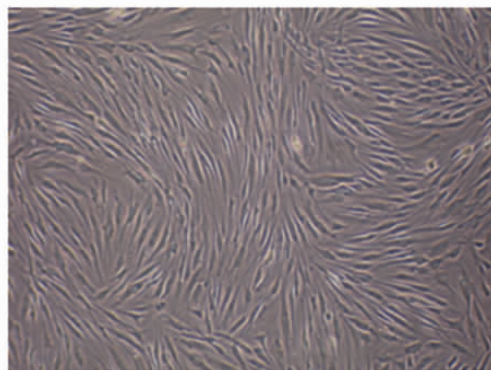


图 2 原代 HPDLC 排列紧密 (× 100)

Fig.2 Original generation HPDLC (× 100)

2.2 细胞凋亡检测结果

低浓度 1.25、2.5 g/L 的药物培养液对细胞生长没有明显影响,与对照组没有明显差别;中浓度 5、10 g/L 的药物浓度培养的细胞则有一定的增殖,在对数生长期的活细胞要多于对照组;而高浓度组 20 g/L 的药物浓度培养液则对细胞有一定的损伤,其细胞凋亡比率有所增加 (图 3)。

2.3 对 HPDLC 超微结构的影响

1.25、2.5 g/L 对细胞超微结构没有明显影响,其结果与对照组相似。如图 4 可以看到,表面细小突起较多。细胞核较小,位于一侧,核膜较清晰,核仁清晰,染色质结构较清晰。细胞质内细胞器丰富,大量内质网及泡状结构,线粒体较为发达,略显固缩。而 5、10 g/L 与对照组比较,表面突起较为粗大,内质网更为发达。而高浓度组 20 g/L 则对细胞的超微结构的改变有一定的作用,其与对照组比较细胞核形态结构及轮廓不清晰,染色质异常聚集。细胞突起较少,胞质内大量内质网囊腔因水肿而略显扩张,大量线粒体固缩^[8]。

3 讨论

牙周炎的特殊病理特点^[9],导致牙周炎在治疗时的复杂性。目前国内外治疗牙周炎的主要方法是通过洁治、刮治等基础治疗后辅助药物治疗。对治疗效果不佳或病损严重者可采取手术治疗,患者痛苦较大,部分患者不能耐受手术治疗。组织工程学的发展为治疗牙周炎带来了理想的新途径,但目前尚在研究探索阶段,临床应用较少,故药物辅助治疗牙周炎是现今牙周炎治疗的主要方法。复方奥硝唑甲磺酸培氟沙星缓释制剂是一种局部缓释用药,置于牙周袋内,直接作用于牙周组织。牙周炎的最终治疗目的是停止病损的继续,使牙周组织达到再生从而恢复牙周组织的功能^[10]。目前已证实复方奥硝唑甲磺酸培氟沙星缓释制剂可以有效的杀灭牙周致病菌,且对牙周组织达到一定的恢复作用^[11]。

通过流式细胞术对 HPDLC 凋亡的分析^[12],本研究发现现在细胞在 1.25、2.5 g/L 药物浓度时与空白对照组没有明显差别,在 5、10 g/L 的药物浓度时细胞的凋亡比率下降,本要无灾此浓度对 HPDLC 的生长呈现一种促进状态,而高浓度组 20 g/L 的药物浓度组则对细胞有一定的损伤,其细胞凋亡比率有所增加,

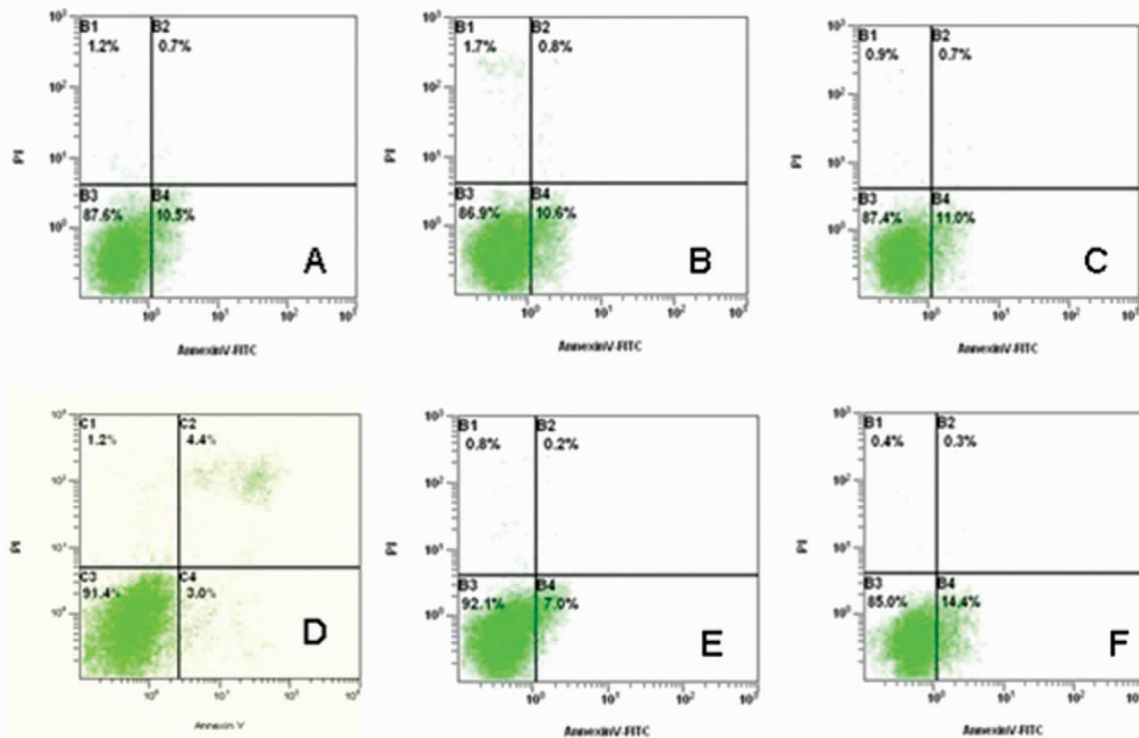


图 3: 流式细胞技术检测实验组和对照组细胞凋亡:A: 0 g/L 组 B: 1.25 g/L 组 C: 2.5 g/L 组 D: 5 g/L 组 E: 10 g/L 组 F: 20g/L 组
Fig.3 Test the experimental group and control group cells apoptosis by flow cytometry:A: 0 g/L group B: 1.25 g/L group C: 2.5 g/L group D: 5 g/L group E: 10 g/L group F: 20g/L group

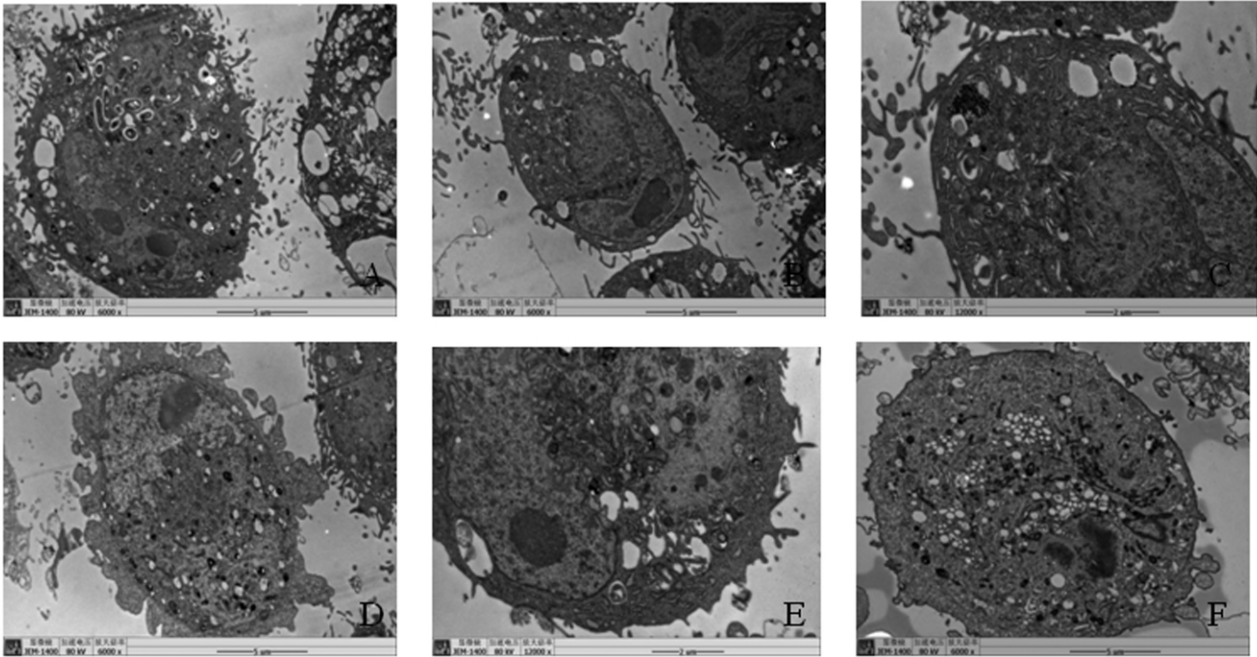


图 4 透射电镜观察实验组和对照组细胞超微结构:A: 0 g/L 组 B: 1.25 g/L 组 C: 2.5 g/L 组 D: 5 g/L 组 E: 10 g/L 组 F: 20g/L 组
Fig. 4 Observation of the experimental group and control cells ultrastructure by TEM:A: 0 g/L group B: 1.25 g/L group C: 2.5 g/L group D: 5 g/L group E: 10 g/L group F: 20g/L group

呈现了一定的毒性作用。细胞凋亡是一个连续动态的过程,电镜下观察细胞超微结构的变化是这一过程的重要证据。细胞的形态结构是研究细胞生物学效应的最基本指标,其改形态改变表明细胞的生长状态受到了影响。

本研究通过电镜观察发现经 1.25、2.5 g/L 药物浓度组诱导的

细胞其超微结构未有明显改变,与空白对照组无明显区别表现为细胞核较小,位于一侧,核膜较清晰,核仁清晰,染色质结构较清晰。细胞质内细胞器丰富,大量内质网及泡状结构,线粒体较为发达,略显固缩,表明本药物在此浓度对细胞的生长没有明显影响。5、10 g/L 的药物浓度诱导的细胞生长旺盛,其表面

凸起粗大,粗面内质网与线粒体明显增多,说明本药物在此浓度时对细胞的生长有一定的促进作用,使细胞生长代谢旺盛。高浓度组 20g/L 则对细胞的超微结构的改变有一定的作用,其与对照组比较细胞核形态结构及轮廓不清晰,染色质异常聚集。细胞突起较少,胞质内大量内质网囊腔因水肿而略显扩张,线粒体嵴稀疏、紊乱且固缩,表明细胞代谢受阻,生长受到抑制^[13],此浓度药物对 HPDLC 有一定的损伤。

流式细胞法检测细胞的凋亡与电镜观察结果相同都是在 5、10 g/L 对细胞的增殖有一定的促进作用,而 20g/L 对细胞生长有一定的抑制作用,此结果对临床用药时有一定指导作用。可经进一步体内动物实验验证结果。

参考文献(References)

- [1] 蒋艳,刘鲁川,李楠,等.奥硝唑牙栓的制备及质量控制[J].第三军医大学学报,2006,28(9):990-991
Jiang Yan; Liu Lu-chuan; Li Nan, et al. Preparation and quality control of ornidazole suppository [J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2006, 28 (9): 990-991
- [2] Chang YC, Huang FM, Tai KW, et al. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro [J]. J Periodontal Res, 2002, 37 (4) :279 -285
- [3] Kemoun P, Laurencin DS, Rue J, et al. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP22/ 27 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro [J].Cell Tissue Res ,2007 , 329 (2) :283-294
- [4] Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament [J]. Lancet, 2004 ,364 (9429) :149-155
- [5] Zhou HJ, Hei ZY, Shi J, et al. Overexpression and Effect on Apoptosis of the 150-ku Oxygen-regulated Protein (ORP150) in Human Hepatocellular Carcinoma [J].Prog biochem biophys,2009,36 (10): 1275-1282
- [6] 贾庆华,蒋军军,哈小琴.醋酸铅对人股动脉内皮细胞超微结构及凋亡相关蛋白 Caspase-3 表达的影响 [J]. 中国预防医学杂志, 2010,11(08):801-804

- Jia Qing-hua, Jiang Jun-jun, Ha Xiao-qin. Effects of lead on ultrastructure and expression of Caspase-3 in human femoral artery endothelial cells(HFAEC) [J]. Chin Prev Med, 2010,11(08): 801-804
- [7] Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED : stem cells from human exfoliated deciduous teeth [J]. Proc Natl Acad Sci USA , 2003 ,100 (10) :5807-5812
- [8] 蒋俊强,蔡炜,王忠朝,等.骨碎补柚皮苷对人牙周膜细胞总蛋白合成及超微结构影响的实验研究 [J]. 华西口腔医学杂志,2010,(03) 330-333
Jiang Jun-qiang, Cai Wei, Wang Zhong-chao, et al. Effect of Drynaria fortunei naringin on the total protein content and ultra-structure of human periodontal ligament cells [J].West China J Stomatol, 2010, (03):330-333
- [9] Tomasi C, Leyland AH, Wennström JL. Factors influencing the outcome of non - surgical periodontal treatment : a multilevel approach [J] . J Clin Periodontol, 2007, 34 (8): 682-90
- [10] Gronthos S, Shi S, Wang S, et al. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine [J].Stem Cells,2008,26 (4) :1065-1073
- [11] Bruno BB, Karina GS, Márcio ZC et al. Physiological features of periodontal regeneration and approaches for periodontal tissue engineering utilizing periodontal ligament stem cell [J]. J biosci bioeng, 2007 103(1): 1-6
- [12] Tian H, Liu XX, Zhang B, et al. Adenovirus-mediated Expression of Both Antisense Ornithine Decarboxylase (ODC) and S-adenosylmethionine Decarboxylase(AdoMetDC) Inhibits Lung Cancer Cell Growth And Invasion In vitro and In vivo [J]. Prog biochem biophys, 2007, 34 (7): 709-717
- [13] 张海元,刘鲁川,刘福玉,等.缺氧对人牙周膜成纤维细胞增殖和超微结构影响的实验研究 [J], 实用口腔医学杂志,2009 25 (4) : 509-512
Zhang Hai-yuan, Liu Lu-chuan, Liu Fu-yu, et al. Experimental studies of hypoxia on the proliferation ability and ultrastructure of cultured human periodontal ligament fibroblasts [J].J Pract Stomatol ,2009 25 (4) :509-512