

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.02.006

不同浓度尼古丁对牙周膜成纤维细胞增殖及纤维结合蛋白合成的作用*

谢 潇^{1,2} 欧 龙^{1△} 罗 芸³ 王 珺⁴ 郭晓东⁵

(1 解放军总医院牙周粘膜科 北京 100853; 2 空军司令部门诊部口腔科 北京 100843;

3 解放军总医院老研所细胞室 北京 100853; 4 海军机关医院口腔科 北京 100841; 5 解放军第 302 医院 北京 100039)

摘要 目的:探讨不同浓度尼古丁对人牙周膜成纤维细胞(PDLFs)增殖及纤维结合蛋白(Fn)合成的作用。**方法:**不同浓度的尼古丁(50 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1 μg/ml, 2 μg/ml, 3 μg/ml)作用于 PDLFs, MTT 比色法检测细胞增殖活性, 流式细胞仪检测细胞周期, 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测 Fn 合成含量。**结果:**不同浓度尼古丁作用下:人 PDLFs 的增殖均被抑制, 且呈浓度依赖性。浓度为 250 ng/ml~3 μg/ml 的尼古丁有明显抑制人 PDLFs 增殖的作用($P<0.05$), 3 μg/ml 尼古丁显示出最强的抑制增殖作用($P<0.01$);人 PDLFs 的 G0-G1 期、S 期、G2-M 期与对照组相比, G0-G1 期细胞周期分布比例逐渐增高, S 期和 G2-M 期逐渐降低, 差异均有统计学意义, 呈浓度依赖性;人 PDLFs 合成 Fn 逐渐减少, 呈浓度依赖性。浓度为 50 ng/ml~3 μg/ml 的尼古丁均有明显抑制人 PDLFs 合成 Fn 的作用($P<0.05$), 其中 3 μg/ml 抑制作用最强。**结论:**尼古丁抑制牙周膜细胞的增殖及 Fn 的合成, 呈浓度依赖性, 并影响其细胞周期的进程, 进而影响牙周新附着的形成, 加重牙周病的病情。

关键词:牙周膜成纤维细胞;尼古丁;增殖;细胞周期;纤维结合蛋白

中图分类号:R781.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)02-225-03

Study on the Effect of Nicotine of Various Concentrations on Periodontal Ligament Fibroblasts Proliferation and Fibronectin Synthesis*

XIE Xiao^{1,2}, OU Long^{1△}, LUO Yun³, WANG Jun⁴, GUO Xiao-dong⁵

(1 Periodontics & Oral Medicine of General Hospital of PLA, Beijing, 100853, China; 2 Department of Stomatology of Air Force

Command Clinics, Beijing, 100843, China; 3 Institute of Geriatrics of General Hospital of PLA, Beijing, 100853, China;

4 Department of Stomatology of Navy Authority Hospital, Beijing, 100841, China; 5 302 Hospital of PLA, Beijing, 100039, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of nicotine of various concentrations on periodontal ligament fibroblasts (PDLFs) proliferation and fibronectin (Fn) synthesis. **Methods:** Nicotine of different concentrations (50 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1 μg/ml, 2 μg/ml, 3 μg/ml) were functioned on PDLFs. MTT colorimetry was used to detect the activity of cell proliferation, flow cytometry was used to detect cell cycle and ELISA was applied to examine the content of Fn synthesis. **Results:** On different concentrations, the proliferation of human PDLFs was all inhibited under the effect of nicotine of different concentrations, and the inhibition was concentration-dependent. Nicotine of 250 ng/ml~3 μg/ml showed obvious inhibition of human PDLFs proliferation ($P<0.05$) with 3 μg/ml reached maximum ($P<0.01$); FCM results showed that after the effect of nicotine of different concentrations, compared with control group, the percentage of G0-G1 cell cycle of human PDLFs increased gradually and that of S and G2-M cell cycle decreased gradually. The differences were statistically significant and concentration-dependent; Fn synthesis of human PDLFs gradually reduced and concentration-dependent. Nicotine of 50 ng/ml~3 μg/ml all showed clear inhibition of Fn synthesis ($P<0.05$) with 3 μg/ml reached the maximum. **Conclusion:** It is suggested that the nicotine could inhibit the periodontal ligament cells proliferation and the synthesis of Fn, which affect the formation of tooth week attached, worsen the condition of periodontal disease.

Key words: Periodontal ligament fibroblasts; Nicotine; Cell cycle; Fibronectin

Chinese Library Classification (CLC): R781.4 **Document code:** A

Article ID:1673-6273 (2015)02-225-03

前言

牙周炎是一种侵犯牙周支持组织的慢性破坏性口腔疾病, 牙周致病菌和宿主的易感性均是其发生的必要条件, 而吸烟是高危因素, 且起明显促进牙周炎发生和发展的作用^[1,2]。近年来

尼古丁对牙周组织凋亡、增殖及修复的作用机制研究已引起广泛的关注。牙周膜成纤维细胞(Periodontal ligament fibroblasts, PDLFs)是牙周组织再生修复的过程中功能最重要的细胞群之一, 具有多种生物学功能和分化潜能^[3]。纤维结合蛋白(Fibronectin, Fn)是一种较好的附着蛋白, 与细胞的生长、迁移、分

* 基金项目: 十一五军队保健课题(10BJZ03)

作者简介: 谢潇(1980-), 女, 主治医师, 主要研究方向: 口腔牙周粘膜相关疾病研究等

△ 通讯作者: 欧龙, 副主任医师, E-mail: laohushanshang@163.com

(收稿日期: 2014-07-18 接受日期: 2014-08-10)

化过程有关,在组织修复及牙周基质的附着、增殖中具有重要作用^[45]。本研究观察不同浓度尼古丁对体外培养的人 PDLFs 的增殖及 Fn 合成的影响,探讨吸烟影响牙周病发生、发展和预后的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

人牙周膜成纤维细胞株(上海拜力生物科技有限公司)、尼古丁(Sigma 公司,美国)、DMEM 培养基(Gibco 公司,美国)、胎牛血清(江苏碧云天生物技术研究)、流式细胞仪(Becton Dickinson, BD, USA)、MTT (Biomol, USA)、纤维结合蛋白 ELISA 检测试剂(Santa, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 人 PDLFs 的体外培养及鉴定 在口腔外科门诊收集 12~20 岁患者因正畸拔除的健康前磨牙, 无菌条件下用龈下刮治器刮取牙根中 1/3 的牙周膜组织, 剪成约 1 mm 的小块, 放入 DMEM 培养液中, 在 CO₂ 恒温培养箱中培养。当细胞长满培养瓶底 80%~90% 时, 即可用 0.25% 的胰酶消化进行传代。应用免疫组织化学 SP 法进行抗波形丝蛋白、角蛋白染色, 作细胞来源鉴定。取第六代细胞用于实验。

1.2.2 尼古丁对人 PDLFs 增殖的影响 细胞以 1×10^6 mL 接种于孔板内, 每孔 100 μ L, 培养 24 h。实验组(各加入含浓度 50 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1 μ g/ml, 2 μ g/ml, 3 μ g/ml 尼古丁的 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)。尼古丁组每种浓度 6 孔。培养 48 h 后, 加入 20 μ L MTT, 孵育 4 h, 每孔加二甲基亚砜(MMSO)150 μ L, 酶标仪 490 nm 波长下测定每孔光密度值(OD), 计算细胞增殖抑制率进行细胞活性评价, 细胞生长增殖抑制率(%)=(1-尼古丁组/正常对照组)×100%。

1.2.3 尼古丁对人 PDLFs 细胞周期的影响 细胞以 1×10^6 mL 接种于孔板内, 每孔 100 μ L, 培养 24 h, 尼古丁组(各加入含浓度 50 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1 μ g/ml, 2 μ g/ml, 3 μ g/ml 尼古丁的 1% FBS 的 DMEM 培养液 200 μ L) 和对照组(加入含 1% FBS 的 DMEM 培养液 200 μ L)。尼古丁组每种浓度 6 孔。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, 并根据公式: 增殖指数(PI)=(S+G2M)/(G0G1+S+G2M)×100% 测定细胞增殖指数。

1.2.4 尼古丁对人 PDLFs 合成 Fn 的影响 细胞以 1×10^6 mL 接种于孔板内, 每孔 100 μ L, 培养 24 h, 尼古丁组(各加入含浓度 50 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1 μ g/ml, 2 μ g/ml, 3 μ g/ml 尼古丁的 1% FBS 的 DMEM 培养液 200 μ L) 和对照组(加入含 1% FBS 的 DMEM 培养液 200 μ L)。尼古丁组每种浓度 6 孔。孵育 24 h, ELISA 法检测 Fn 合成, 酶标仪于 490 nm 波长下测定各孔 OD 值。

1.3 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±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 不同浓度尼古丁对人 PDLFs 细胞增殖的影响

实验组中, 不同浓度的尼古丁对人 PDLFs 增殖的抑制率明显不同: ① 250 ng/ml 尼古丁: 抑制率(28.54±2.83)%; ② 500 ng/ml 尼古丁: 抑制率(33.47±3.52)%; ③ 1 μ g/ml 尼古丁: 抑制率(45.87±4.65)%; ④ 2 μ g/ml 尼古丁: 抑制率(47.29±5.18)%; ⑤ 3 μ g/ml 尼古丁: 抑制率(47.81±5.44)%。由此可见, 随着浓度的增高, 尼古丁对人 PDLFs 增殖的抑制作用随之增强, 浓度为 3 μ g/ml 的尼古丁对人 PDLFs 增殖的抑制作用最强, 差异显著且具有统计学意义(P<0.01)。此外, 浓度为 50 ng/ml 的尼古丁对人 PDLFs 增殖的抑制作用与对照组相当, 两组差异无统计学意义(P>0.05)。

2.2 不同浓度尼古丁对人 PDLFs 细胞周期分布的影响

结果显示, 与对照组相比, 实验组细胞周期分布率在不同浓度尼古丁作用下呈明显变化: ① 50 ng/ml: G0-G1 期(89.17±0.53)%, S 期(3.84±0.92)%, G2-M 期(10.37±0.87)%; ② 250 ng/ml: G0-G1 期(91.25±0.65)%, S 期(3.37±0.85)%, G2-M 期(8.47±0.93)%; ③ 500 ng/ml: G0-G1 期(93.07±0.72)%, S 期(2.75±0.64)%, G2-M 期(7.15±1.06)%; ④ 1 μ g/ml: G0-G1 期(95.09±0.75)%, S 期(1.76±0.89)%, G2-M 期(6.04±0.83)%; ⑤ 2 μ g/ml: G0-G1 期(95.67±0.82)%, S 期(1.04±0.75)%, G2-M 期(5.41±0.58)%; ⑥ 3 μ g/ml: G0-G1 期(96.43±0.76)%, S 期(0.79±0.28)%, G2-M 期(5.28±0.67)%。比较各组数据差异显著, 且均具有统计学意义(P<0.05)。

2.3 不同浓度尼古丁对人 PDLFs 合成纤维结合蛋白的影响

在不同浓度尼古丁作用下, 人 PDLFs 合成纤维结合蛋白呈明显变化: ① 50 ng/ml: 0.78±0.05; ② 250 ng/ml: 0.65±0.04; ③ 500 ng/ml: 0.58±0.05; ④ 1 μ g/ml: 0.52±0.06; ⑤ 2 μ g/ml: 0.47±0.03; ⑥ 3 μ g/ml: 0.44±0.05。浓度为 50 ng/ml-3 μ g/ml 的尼古丁对人 PDLFs 合成 Fn 均呈现明显的抑制作用, 其中浓度为 3 μ g/ml 尼古丁的抑制作用最强, 差异具有统计学意义(P<0.05)。

3 讨论

尼古丁是烟草中主要的毒性生物碱, 流行病学资料表明, 尼古丁的生物学毒性对牙周病的发生、病情发展及治疗效果均有重要影响, 但其致牙周病的病理机制研究仍有许多尚未明确^[6-10]。PDLFs 被人们认为是牙周膜中最为重要的细胞, 其数量和其生物学活性的变化是牙周组织修复再生的基础, 对牙周膜结构修复、改建以及平衡牙周膜功能状态起极其重要的作用^[11,12]。因此, 研究 PDLFs 在牙周组织的生理和病理机制中所起的作用越来越受到人们的重视。

本研究分析了尼古丁对体外培养的人 PDLFs 增殖的影响, 结果显示, 在不同浓度的尼古丁作用下, 人 PDLFs 的增殖均受到抑制, 且呈浓度依赖性; 当浓度增高至 3 μ g/ml 时, 尼古丁对细胞增殖的抑制作用最强。随着尼古丁浓度的增高, 其抑制作用逐渐增强, 对人 PDLFs 增殖的抑制作用也逐渐增强, 从而导致牙周组织的新生胶原蛋白数量逐渐减少, 细胞的修复功能随之下降, 最终造成患者的病情进一步加重。我们的研究进一步证实了国内外相关研究的结果^[13-15], 即烟草中含有高浓度

的尼古丁,而尼古丁对人 PDLFs 细胞增殖的抑制作用致使吸烟人群患牙周疾病的比率逐年增高^[8]。而本组中 50 ng/ml 的尼古丁作用下人 PDLFs 增殖与对照组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$),说明低浓度(50 ng/ml)尼古丁对人 PDLFs 增殖的抑制作用不明显。

细胞周期分为:分裂间期和有丝分裂期,GO/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^[10]。本研究结果显示,随着尼古丁浓度的增加,人 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,表明人 PDLFs 细胞周期的分布呈浓度依赖性,说明尼古丁的浓度对人 PDLFs 细胞周期的分布有明显影响。提示在不同浓度的尼古丁作用下,大多数细胞阻滞在 GO/G1 期,从而抑制人 PDLFs 的增殖,这也将为深入研究尼古丁抑制 PDLFs 增殖的作用机制提供新的研究方向。

Fn 是一种由成纤维细胞、血管内皮细胞、巨噬细胞等合成和分泌的、与细胞间粘连有关的糖蛋白,研究资料发现 Fn 具有促进细胞增殖、迁移和分化的功能,能通过调控微丝的形成和细胞的附着而促进 PDLCs 的活力及其增殖,利于牙周新附着的形成^[17-20]。本研究结果显示,随着尼古丁浓度增高,人 PDLFs 合成纤维结合蛋白逐渐减少,呈浓度依赖性。结果说明,随着尼古丁浓度增加,人 PDLCs 合成 Fn 的作用逐渐减弱。这提示我们,尼古丁致牙周病的病理机制可能与尼古丁抑制合成 Fn 作用有关,但其具体机制仍有待我们深入研究和探讨。

参考文献(References)

- [1] Yanagita M, Mori K, Kobayashi R, et al. Immunomodulation of dendritic cells differentiated in the presence of nicotine with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*[J]. *Eur J Oral Sci*, 2012, 120(5): 408-414
- [2] Back O, Zhu W, Kim C, et al. Effects of nicotine on the growth and protein expression of *Porphyromonas gingivalis*[J]. *J Microbiol*, 2012, 50(1): 143-148
- [3] Wang Y, Ge X, Xu XF, et al. Acetylcholinesterase inhibitor is a potentially useful therapeutic agent for nicotine-induced periodontal disease[J]. *Med Hypotheses*, 2009, 73(4): 604-605
- [4] Malhotra R, Kapoor A, Grover V, et al. Nicotine and periodontal tissues[J]. *J Indian Soc Periodontol*, 2010, 14(1): 72-79
- [5] Salimi M, Esfahani M, Habibzadeh N, et al. Change in nicotine-induced VEGF, PGE2 AND COX-2 expression following COX inhibition in human oral squamous cancer [J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2012, 31(4): 349-356
- [6] Sumanth S, Bhat KM, Bhat GS. Periodontal health status in pan chewers with or without the use of tobacco[J]. *Oral Health Prev Dent*, 2008, 6(3): 223-229
- [7] Dahiya P, Kamal R. Rotary instruments in the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial[J]. *J Indian Soc Periodontol*, 2013, 17(6): 748-752
- [8] Yousefimanesh H, Maryam R, Mahmoud J, et al. Evaluation of salivary tumor necrosis factor-alpha in patients with the chronic periodontitis: A case-control study[J]. *J Indian Soc Periodontol*, 2013, 17(6): 737-740
- [9] Komiya-Ito A, Tomita S, Kinumatsu T, et al. Longitudinal supportive periodontal therapy for severe chronic periodontitis with furcation involvement: a 12-year follow-up report [J]. *Bull Tokyo Dent Coll*, 2013, 54(4): 243-250
- [10] Ge X, Rodriguez R, Trinh M, et al. Oral microbiome of deep and shallow dental pockets in chronic periodontitis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): 65520
- [11] Davanian H, Stranneheim H, Båge T, et al. Gene expression profiles in paired gingival biopsies from periodontitis-affected and healthy tissues revealed by massively parallel sequencing[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): 46440
- [12] Shin J, Kho SA, Choi YS, et al. Antibody and T cell responses to *Fusobacterium nucleatum* and *Treponema denticola* in health and chronic periodontitis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): 53703
- [13] 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
- [14] Salehi MR, Shah Aboei M, Naghsh N, et al. A Comparison in Prevalence of *Helicobacter pylori* in the Gingival Crevicular Fluid from Subjects with Periodontitis and Healthy Individuals using Polymerase Chain Reaction [J]. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*, 2013, 7(4): 238-243
- [15] Nanaiah KP, Nagarathna DV, Manjunath N. Prevalence of periodontitis among the adolescents aged 15-18 years in Mangalore City: An epidemiological and microbiological study [J]. *J Indian Soc Periodontol*, 2013, 17(6): 784-789
- [16] 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
- [17] 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
- [18] Firth JD, Ekuni D, Irie K, et al. Lipopolysaccharide induces a stromal-epithelial signaling axis in a rat model of chronic periodontitis[J]. *J Clin Periodontol*, 2013, 40(1): 8-17
- [19] 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
- [20] Pradeep AR, Rao NS, Bajaj P, et al. 8-Isoprostane: a lipid peroxidation product in gingival crevicular fluid in healthy, gingivitis and chronic periodontitis subjects [J]. *Arch Oral Biol*, 2013, 58(5): 500-504