

• 论 著 •

康复新治疗牙周炎的机制研究^{*}汤雁利¹, 龚斌¹, 沈涛², 李启艳^{1△}

(云南省第一人民医院/昆明理工大学附属医院; 1. 口腔医学中心; 2. 临床医学研究中心, 云南 昆明 650032)

[摘要] **目的** 通过研究康复新对牙周组织相关细胞增殖的影响及康复新在细胞炎症反应模型中的抗炎作用, 从促进牙周组织再生和抗炎 2 个方面探讨康复新治疗牙周炎的相关机制。**方法** (1) 采用淋巴细胞增殖检测法(MTS 法)检测不同浓度康复新对人牙周膜成纤维细胞(hPDLFs)、人牙龈上皮细胞(hGECs)、人单核巨噬细胞(THP-1)和小鼠胚胎成骨细胞(MC3T3-E1)活性的影响;(2)通过细菌脂多糖(LPS)刺激小鼠巨噬细胞 RAW264.7 建立细胞炎症模型, 采用实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测康复新对细胞白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-10、一氧化氮合酶(NOS)和基质金属蛋白酶-13(MMP-13)mRNA 表达水平的影响。**结果** (1) 与对照组比较: 0.100 0、0.050 0、0.025 0、0.012 5 mg/mL 的康复新组在 24 h 和 48 h 时间点均可刺激 hPDLFs、THP-1 和 MC3T3-E1 增殖($P < 0.01$), 且促增殖作用具有浓度依赖性;(2)在炎症细胞模型中, 与对照组比较, 0.050 0 mg/mL 和 0.012 5 mg/mL 的康复新组 IL-1 β 和 IL-10 mRNA 表达水平比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$), NOS 和 MMP-13 mRNA 表达水平降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 康复新在一定浓度范围内能促进 hPDLFs、hGECs、THP-1 和 MC3T3-E1 增殖; 康复新可抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应, 其抗炎机制可能是降低 NOS 和 MMP-13 mRNA 表达水平。康复新可能是通过促进牙周组织再生和抗感染治疗牙周炎。

[关键词] 康复新; 细胞增殖; 抗炎; 细胞炎症模型; 人牙周膜成纤维细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2024.07.004

中图法分类号: R781.4+2

文章编号: 1009-5519(2024)07-1098-07

文献标识码: A

Mechanism of Kangfuxin in treating periodontitis^{*}TANG Yanli¹, GONG Bin¹, SHEN Tao², LI Qiyang^{1△}

(1. Stomatology Center; 2. Clinical Medical Research Center, The First People's Hospital of Yunnan Province/The Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of Kangfuxin on the proliferation of periodontal tissue-related cells and the anti-inflammatory effect of Kangfuxin in the cell inflammatory response model, and to explore the related mechanism of Kangfuxin in treating periodontitis from the aspects of promoting periodontal tissue regeneration and anti-inflammatory. **Methods** (1) MTS method was used to detect the effects of different concentrations of Kangfuxin on the activities of Human Periodontal Ligament Fibroblasts(hPDLFs), human Gingival Epithelial Cells(hGECs), THP-1 and MC3T3-E1 proliferation. (2) The cell inflammation model was established by stimulating mouse macrophage RAW264.7 with bacterial lipopolysaccharide(LPS). The quantitative Real-time polymerase chain reaction(qRT-PCR) was used to detect the effects of Kangfuxin on the mRNA expression of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-10, nitric oxide synthase(NOS) and matrix metalloproteinase-13(MMP-13). **Results** (1) Compared with the control group, the 0.100 0, 0.050 0, 0.025 0, 0.012 5 mg/mL rehabilitation groups could stimulate the proliferation of hPDLFs, THP-1 and MC3T3-E1 at 24 h and 48 h time points($P < 0.01$), and the proliferation promotion effect was concentration-dependent. (2) In the inflammatory cell model, compared with the control group, there was no significant differences in IL-1 β and IL-10 mRNA expression levels in the 0.05 mg/mL group and the 0.012 5 mg/mL group($P > 0.05$). The mRNA levels of NOS and MMP-13 were decreased, and the difference was statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** Kangfuxin promote the proliferation of hPDLFs, hGECs, THP-1 and MC3T3-E1 in a certain concentration range. Kangfuxin inhibit LPS-induced inflammatory response of RAW264.7, and its anti-inflammatory mechanism may be

* 基金项目: 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项项目[2018FE001(-298)]; 2019 年度云南省医学学科后备人才(H-2019017)。

作者简介: 汤雁利(1983—), 硕士研究生, 副主任医师, 主要从事牙周病的治疗工作。△ 通信作者, E-mail: ynlqiyang@aliyun.com。

the decrease of mRNA expression of NOS and MMP-13. Kangfuxin may treat periodontitis by promoting periodontal tissue regeneration and anti-inflammation.

[Key words] Kangfuxin; Cell proliferation; Anti-inflammatory; Cell inflammation model; Human periodontal ligament fibroblasts

康复新是由美洲大蠊提取物制备的生物制剂,该药主要成分为多元醇类及肽类活性物质,能够理气散结、补气养阴、解毒生肌^[1]。康复新具有抗炎、促进组织增生、加速机体损伤修复、消除水肿和增强机体免疫力等功效^[2]。目前,临床上康复新常用来治疗口腔溃疡^[3]、牙周炎^[4]、溃疡性结肠炎^[5]等疾病,效果良好。牙周炎是慢性感染性疾病,其发生涉及一系列免疫炎症反应,主要表现为牙周软硬组织的破坏改建。炎症介质的产生是宿主反应的一部分,与组织破坏有关的介质包括蛋白酶、细胞因子和前列腺素,与牙周组织破坏有关的介质有基质金属蛋白酶(MMPs)类、白细胞介素(IL)-1、肿瘤坏死因子(TNF)、前列腺素E₂(PGE₂)等^[6]。前期研究中检测了炎症模型中IL-6、TNF- α 、前列腺素内过氧化物合酶(PTGS)的表达水平,发现康复新可能是通过抑制前列腺素(PG)而产生抗炎效应^[7]。本研究再次建立细胞炎症反应模型,用实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测细胞IL-1 β 、IL-10、一氧化氮合酶2(NOS2)和基质金属蛋白酶-13(MMP-13)mRNA表达水平;并建立人牙周膜成纤维细胞(hPDLFs)、人牙龈上皮细胞(hGECs)、人单核巨噬细胞(THP-1)和小鼠胚胎成骨细胞(MC3T3-E1)体外培养体系,采用较低浓度的康复新,研究其对hPDLFs、hGECs、THP-1和MC3T3-E1增殖的影响,进一步探讨康复新治疗牙周炎的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 hPDLFs(培养基低糖为DMEM):原代培养;hGECs(培养基为高糖DMEM):购于北京北纳创联生物技术有限公司;MC3T3-E1(培养基为 α -MEM):购于中国科学院昆明细胞库;THP-1(培养基为RPMI-1640):由云南省第一人民医院临床基础研究所赠送;RAW264.7(培养基为DMEM):购于中国科学院昆明细胞库。

1.1.2 主要试剂 康复新(大理大学昆虫生物医药研究院提供,批号:160802);MTS粉剂:美国Pro-mega;吩嗪硫酸甲酯(PMS)粉剂(大连美仑生物技术有限公司);抗波形丝蛋白单克隆抗体(福州迈新公司);抗细胞角蛋白(PCK)单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司)。LPS、核因子- κ B抑制剂BAY11-7082均购于美国Sigma公司;Trizol Reagent购于美国Invitrogen公司;反转录试剂盒和聚合酶链反应(PCR)引物均购于大连Takara公司;荧光定量PCR(qRT-PCR)试剂盒购于北京康为世纪生物科技有限公司;二甲亚砜(DMSO)购于安徽合肥Biosharp公司。

1.1.3 主要仪器和设备 倒置显微镜及显微摄像系统(德国蔡司公司);生物显微镜CX-21(菲律宾奥林巴斯公司);CO₂恒温孵育箱(美国Thermo公司);倒置显微镜AE2000(中国Motic公司);超净工作台SW-CJ-ID型(苏州净化设备有限公司);酶标仪ELX800(美国BioTek公司);DNA Engine Dyad Thermal Cycler Line Drawings(美国Bio-Rad公司);荧光定量PCR仪C1000 Thermal Cycler(美国Bio-Rad公司)。

1.1.4 主要试剂的配制 MTS/PMS的配制:将MTS粉剂和PMS粉剂溶于杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS)中按20:1混合后避光保存于-20℃备用;康复新液:先将康复新浸膏用DMSO溶解后再用PBS稀释为10 mg/mL的康复新液,分装保存于-20℃备用。

1.2 方法

1.2.1 hPDLFs的原代培养 选取11~15岁青少年因正畸需要拔除的前磨牙,所取牙齿无龋坏和其他牙体及牙周组织疾病。牙拔出后,立即放入含有5%青链霉素的PBS缓冲液中。无菌条件下使用手术刀片刮取牙根中1/3牙周膜组织放入6孔板中,向孔板内加入0.2 mL含20%胎牛血清及1%青链霉素的低糖DMEM(以色列Bioind公司)培养液后放入CO₂培养箱内(37℃,5% CO₂,100%湿度)培养,组织块贴于板底后再向孔板内加入含20%胎牛血清(FBS)及1%青链霉素的低糖DMEM培养液2 mL后放入CO₂培养箱内继续培养,5 d换培养液1次,并于倒置显微镜下观察细胞生长状况。当细胞生长融合达80%以上时进行首次传代,加含乙二胺四乙酸(EDTA)的0.25%胰蛋白酶,按1:3比例传代培养,传至4~6代细胞用于实验。

1.2.2 hPDLFs的免疫组织化学鉴定 将生长良好的第4代牙周膜成纤维细胞接种于含有小盖玻片的35 mm×15 mm培养皿中,放入CO₂培养箱内(37℃,5% CO₂,100%湿度)培养,待细胞爬满盖玻片60%后,4%多聚甲醛室温固定10 min,0.5%的Triton X-100处理20 min,加PBS液振荡机上荡洗5 min,3%过氧化氢液滴在爬片表面,37℃温箱20 min,羊血清37℃温箱封闭30 min;滴加一抗(波形丝蛋白抗体或角蛋白抗体)后放入湿盒中,37℃孵育1 h后加多聚物酶标二抗,DAB显色5~10 min,显微镜下观察控制显色时间;苏木精衬染及蓝化,脱水及封固,镜下采集图片。

1.2.3 淋巴细胞增殖检测(MTS)法绘制hPDLFs、

hGECs、THP-1 和 MC3T3-E1 生长曲线 取对数生长期的 4 代 hPDLFs、hGECs、THP-1 和 MC3T3-E1 细胞,分别配制成浓度为 $2 \times 10^3/100 \mu\text{L}$ 、 $1 \times 10^3/100 \mu\text{L}$ 、 $2 \times 10^3/100 \mu\text{L}$ 和 $2 \times 10^3/100 \mu\text{L}$ 的细胞悬液,将细胞悬液依次加入 96 孔板,设置 1、2、3、4、5、6 d 6 个时间点,每个时间点都设置空白孔(无细胞)和对照孔(有细胞)。每组 6 个复孔,每孔 $100 \mu\text{L}$;接种后放入 CO_2 培养箱内($37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$, 100% 湿度)培养,分别培养 1、2、3、4、5、6 d 后,每孔加入 MTS/PMS 混合液 $20 \mu\text{L}$,孵育 3 h,酶联免疫仪检测 490 nm 下的吸光度(A)值。以培养时间作为横坐标,对照孔与空白孔 A 均值之差作为纵坐标,用 Graph-Pad prism5 绘制细胞的生长曲线。

1.2.4 MTS 法检测康复新对 hPDLFs、hGECs、THP-1 和 MC3T3-E1 增殖的影响 取生长良好的第 4 代 hPDLFs、hGECs 和 MC3T3-E1 细胞,以每孔 2.0×10^3 个细胞的浓度接种于 96 孔培养板,每孔总体积为 $100 \mu\text{L}$,hPDLFs、hGECs 和 MC3T3-E1 的培养液分别为加 $10\% \text{ FBS}$ 和 $1\% \text{ 双抗}$ (100 U/mL 青霉素, $100 \mu\text{g/mL}$ 链霉素)的低糖 DMEM、高糖 DMEM,以及 $\alpha\text{-MEM}$ 培养基,放入 $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下培养 24 h 后,弃去旧培养液,更换为加 $1\% \text{ FBS}$ 和 $1\% \text{ 双抗}$ (100 U/mL 青霉素, $100 \mu\text{g/mL}$ 链霉素)的培养液。 $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下继续培养 24 h,再次更换培养液加 $10\% \text{ FBS}$ 和 $1\% \text{ 双抗}$ (100 U/mL 青霉素, $100 \mu\text{g/mL}$ 链霉素)的培养液。因 THP-1 是悬浮细胞,实验过程未更换培养液,具体操作:取生长良好的第 6 代 THP-1 细胞,以每孔 2.0×10^3 个细胞的浓度接种于无菌 96 孔培养板,每孔总体积为 $90 \mu\text{L}$,培养液为加 $10\% \text{ FBS}$ 和 $1\% \text{ 双抗}$ (100 U/mL 青霉素, $100 \mu\text{g/mL}$ 链霉素)的 RPMI-1640 培养液, $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下培养 48 h。实验分为 7 组,对照组 1 组,实验组 6 组,每组随机选 6 个孔。对照组加完全培养液,实验组分别加终浓度为 $0.200 \text{ } 0$ 、 $0.100 \text{ } 0$ 、 $0.050 \text{ } 0$ 、 $0.025 \text{ } 0$ 、 $0.012 \text{ } 5$ 、 $0.006 \text{ } 2 \text{ mg/mL}$ 的康复新液;每组每孔液量 $100 \mu\text{L}$,继续培养 24 h 和 48 h 后,每孔加入 MTS/PMS 混合液 $20 \mu\text{L}$, $5\% \text{ CO}_2$ 、 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 环境下孵育 3 h,

酶联免疫仪检测 490 nm 下的 A 值。
1.2.5 康复新对细胞炎症模型 IL- 1β 、IL-10、NOS 和 MMP-13 mRNA 表达水平的影响
1.2.5.1 细胞培养和分组 取生长良好的 RAW264.7,以每孔 3×10^5 个细胞的浓度接种于 12 孔细胞培养板,用 $10\% \text{ FBS}$ 及 $1\% \text{ 双抗}$ (100 U/mL 青霉素 + 100 mg/L 链霉素)的 DMEM 培养液在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中培养 12 h 后,弃去旧培养液,更换为含 $1\% \text{ FBS}$ 及 $1\% \text{ 双抗}$ 的 DMEM 培养液继续培养 12 h,经 $10\% \text{ FBS}$ 及 $1\% \text{ 双抗}$ 的 DMEM 培养液继续培养。将上述细胞随机分为 6 组:空白对照组、炎症模型组阳性药物对照组及 3 个不同浓度康复新实验组,每组设 3 个复孔。空白对照组和炎症模型组加 DMSO,阳性药物组加 BAY11-7082,3 个实验组加康复新液,康复新液终浓度分别为 $0.200 \text{ } 0$ 、 $0.050 \text{ } 0$ 、 $0.012 \text{ } 5 \text{ mg/mL}$ 。药物干预后培养 1 h,空白对照组加 DMEM 培养液,其余 5 组加入 LPS ($100 \mu\text{g/L}$) $5 \mu\text{L}$ 诱导细胞炎症反应模型,造模后 4、8 h 收集细胞,拟提取 RNA。康复新 $0.200 \text{ } 0 \text{ mg/mL}$ 组在收集细胞时观察到细胞死亡,故未做进一步检测。
1.2.5.2 qRT-PCR 检测各组细胞 IL- 1β 、IL-10、NOS 和 MMP-13 mRNA 表达水平 用 Trizol 试剂采用一步法提取细胞总 RNA,紫外分光光度计检测总 RNA 浓度及质量,取 500 ng RNA 按说明书配制 $10 \mu\text{L}$ 反转录体系(混合物 $5 \mu\text{L}$ 、上下游引物各 $0.2 \mu\text{L}$ 、cDNA 模板 $3 \mu\text{L}$ 及 RNase-Free 水补足 $10 \mu\text{L}$),反转录 cDNA;根据表 1 基因序列合成实验相关引物,配制 $10 \mu\text{L}$ 反应体系,上机检测。反应程序为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 10 min , $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 15 s , $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火、延伸 1 min ,扩增 $35 \sim 40$ 个循环,检测各基因的表达,重复 3 次。然后对反应产物进行相对定量分析。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为参照基因,根据公式 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算目的基因的相对表达水平。
1.3 统计学处理 应用 SPSS23.0 统计软件进行数据分析,对计量资料进行正态性检验和方差齐性检验,若满足以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法(q 检验), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列表

基因	正向引物(5'~3')	反向引物(5'~3')
GAPDH	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG
IL- 1β	TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	GAACGTCACACCAGCAGGTTA
IL-10	GCCAGAGCCACATGCTCCTA	GATAAGGCTTGGCAACCCAAGTAA
NOS	CAAGCTGAACTTGAGCGAGGA	TTTACTCAGTGCCAGAAGCTGGA
MMP-13	TCCCTGGAATTGGCAACAAAG	GCATGACTCTACAATGCGATTAC

2 结 果

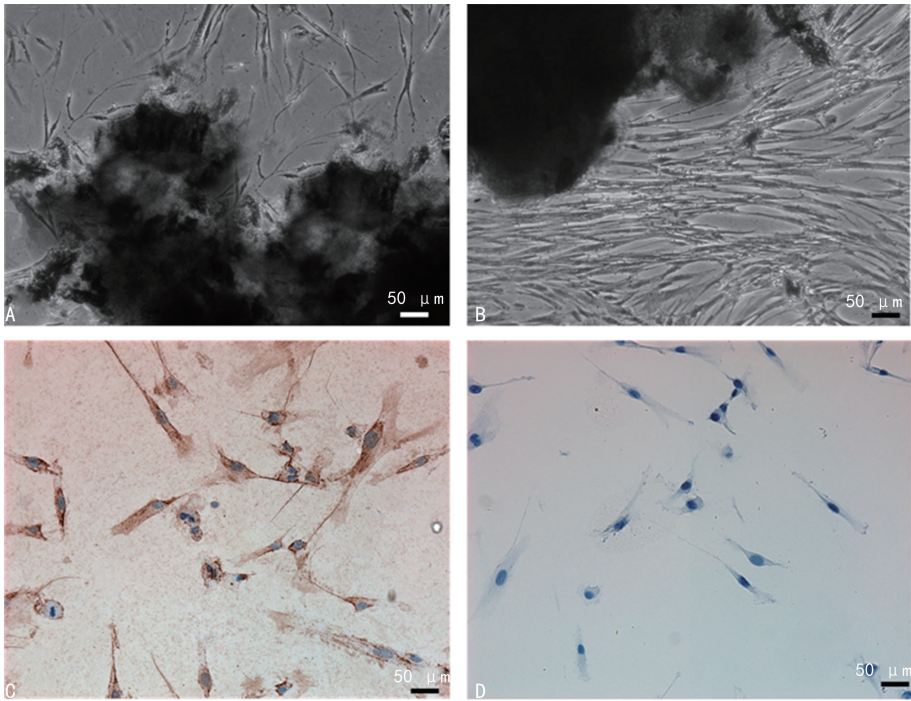
2.1 原代培养的 hPDLFs 细胞形态观察 原代培养的贴壁组织块有 40% 在接种后 $10 \sim 14 \text{ d}$,观察到有细

胞从组织块爬出,呈放射状生长或伪足生长(图 1A)。第 $14 \sim 20 \text{ 天}$,镜下可见大量成纤维细胞游出,成纤维细胞以组织块为中心,向四周呈放射状生长,呈束状、

小聚落放射生长,长满后可复层生长(图 1B)。传代后的细胞在高倍镜下观察,细胞呈长梭形或多角形,胞体丰满,细胞质均匀,细胞透明度大、折光性强,细胞核为椭圆形或圆形,核仁清晰,贴壁生长。传代 3~5 d 后细胞布满瓶底达融合状,呈放射状或漩涡状生长。原代培养的 hPDLFs 细胞免疫组织化学方法来源鉴定:光镜下对第 4 代 hPDLFs 进行免疫组织化学染色观察,显示细胞抗波丝蛋白阳性,阳性颗粒在胞质内分布均匀,胞核清晰无染色(图 1C);抗角蛋白染色阴性(图 1D),表明所培养的细胞为来源于中胚层的

的成纤维细胞,且无外胚层来源的细胞污染,结合细胞的形态及取材时来源的部位可判定细胞为人牙周膜成纤维细胞。

2.2 hPDLFs、hGECs、THP-1 和 MC3T3-E1 生长曲线 细胞接种后,细胞形态变化与传代时相似,无明显异常。细胞生长曲线呈“S”形,接种后第 1 天,细胞增殖较慢;而第 2 天,细胞增殖加速并进入对数生长期,一直持续到第 5、6 天细胞增殖速度变缓进入平台期。hPDLFs、hGECs、THP-1 和 MC3T3-E1 生长曲线见图 2。



注:A.原代培养第 10~14 天组织块周围有细胞伪足生长;B.原代培养第 14~20 天组织块周围爬满细胞呈束状生长;C.波形丝蛋白染色阳性;D.角蛋白染色阴性。

图 1 原代培养的 hPDLFs 细胞形态图(40×)

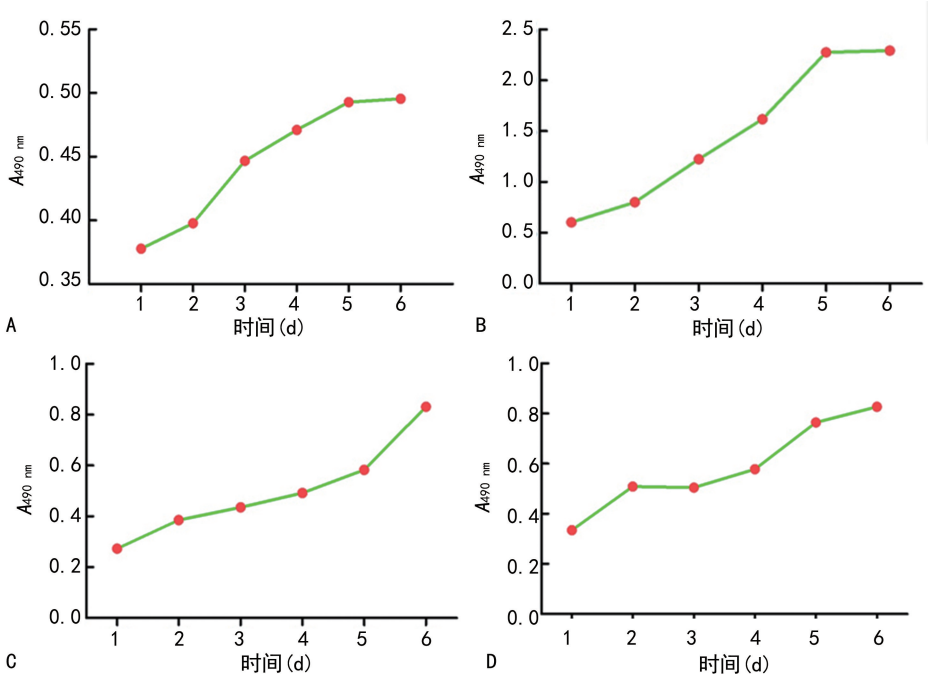
2.3 康复新对 hPDLFs、hGECs、THP-1 和 MC3T3-E1 增殖的影响 康复新 0.200 0 mg/mL 组观察到 hPDLFs、hGECs、MC3T3-E1 细胞死亡,未做进一步检测。而 THP-1 所有浓度组细胞状态良好。与对照组比较:(1)浓度为 0.1 00 0、0.050 0、0.025 0、0.012 5 mg/mL 的康复新组在 24 h 和 48 h 时间点均可刺激 hPDLFs 增殖($P<0.05$),浓度为 0.025 0 mg/mL 的康复新组 A 值最高。(2)浓度为 0.100 0、0.050 0、0.025 0、0.012 5 mg/mL 的康复新组在 24 h 时间点均可刺激 hGECs 增殖($P<0.05$),浓度为 0.012 5 mg/mL 的康复新组 A 值最高;浓度为 0.025 0、0.012 5、0.006 2 mg/mL 的康复新组在 48 h 时间点均可刺激 hGECs 增殖($P<0.05$),浓度为 0.006 2 mg/mL 的康复新组 A 值最高。(3)浓度 0.050 0、0.025 0、0.012 5、0.006 2 mg/mL 的康复新组在 24 h 时间点可刺激 MC3T3-E1 增殖($P<0.05$),浓度 0.006 2 mg/mL 的康复新组 A 值最高。(4)浓度为 0.100 0、0.050 0、

0.025 0、0.012 5 mg/mL 的康复新组在 24 h 时间点均可刺激 THP-1 增殖($P<0.05$),浓度 0.050 0 mg/mL 的康复新组 A 值最高;浓度为 0.100 0、0.050 0、0.025 0、0.012 5、0.006 2 mg/mL 的康复新组在 48 h 时间点均可刺激 THP-1 增殖($P<0.05$),浓度为 0.050 0 mg/mL 的康复新组 A 值最高。见表 2。

2.4 康复新对 LPS 诱导的 RAW264.7 中 IL-1 β 、IL-10、NOS 和 MMP-13 mRNA 表达的影响 实验组康复新 0.200 0 mg/mL+脂多糖(LPS)组收集细胞时观察到细胞死亡,故未进行后续实验检测。与空白对照 DMSO+DMEM 组比较,炎症模型 DMSO+LPS 组中,IL-1 β 、IL-10、MMP-13 和 NOS mRNA 4 h 和 8 h 时间点表达水平平均升高($P<0.05$);与 DMSO+LPS 组比较,阳性对照 BAY11-7082 组 IL-1 β 、IL-10、MMP-13 和 NOS 的 mRNA 表达水平平均降低($P<0.05$);与 DMSO+LPS 组比较,康复新(0.050 0 mg/mL 及 0.012 5 mg/mL)+LPS 组 4 h 时间点 IL-1 β 表达水平

降低($P<0.05$),8 h 时间点 IL-1 β 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),MMP-13 和 NOS mRNA 表达水平降低,且差异有统计学意义($P<0.05$)。此外。在相同时间点,不同浓度康复新(0.050 0 mg/mL 及 0.012 5 mg/mL)+LPS 组之间比较,NOS 和 MMP-

13 mRNA 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$);不同浓度康复新对 LPS 诱导的 RAW264.7 中 IL-1 β 、IL-10、MMP-13 和 NOS mRNA 表达水平的影响见表 3。



注:A 为 hPDLFs 生长曲线;B 为 hGECs 生长曲线;C 为 THP-1 生长曲线;D 为 MC3T3-E1 生长曲线。

图 2 hPDLFs、hGECs、THP-1 和 MC3T3-E1 生长曲线

表 2 不同浓度康复新对 hPDLFs、hGECs、MC3T3-E1 和 THP-1 增殖的影响($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	浓度(mg/mL)	hPDLFs		hGECs	
		24 h	48 h	24 h	48 h
对照组	0.000 0	0.392±0.053	0.468±0.028	0.747±0.040	1.842±0.072
实验组	0.006 2	0.419±0.045	0.483±0.033	0.829±0.048 ^a	2.073±0.078 ^a
	0.012 5	0.502±0.550 ^a	0.532±0.037 ^a	0.967±0.060 ^a	1.967±0.080 ^a
	0.025 0	0.542±0.043 ^a	0.585±0.023 ^a	0.954±0.096 ^a	1.947±0.061 ^a
	0.050 0	0.522±0.026 ^a	0.536±0.032 ^a	0.949±0.038 ^a	1.904±0.063
	0.100 0	0.496±0.067 ^a	0.517±0.034 ^a	0.939±0.110 ^a	1.856±0.115
	0.200 0	—	—	—	—
	<i>F</i>	—	6.426	8.999	9.457
<i>P</i>	—	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010

组别	浓度(mg/mL)	MC3T3-E1		THP-1	
		24 h	48 h	24 h	48 h
对照组	0	0.362±0.017	0.586±0.200	0.401±0.030	0.620±0.094
实验组	0.006 2	0.600±0.019 ^a	0.817±0.183 ^a	0.417±0.017	0.706±0.075 ^a
	0.012 5	0.591±0.014 ^a	0.816±0.124 ^a	0.444±0.025 ^a	0.754±0.052 ^a
	0.025 0	0.545±0.027 ^a	0.776±0.107 ^a	0.452±0.027 ^a	0.777±0.034 ^a
	0.050 0	0.483±0.046 ^a	0.765±0.124 ^a	0.509±0.027 ^a	0.807±0.058 ^a
	0.100 0	0.388±0.037	0.669±0.147	0.500±0.008 ^a	0.756±0.063 ^a
	0.200 0	—	—	0.407±0.024	0.459±0.019
	<i>F</i>	—	74.249	2.220	20.407
<i>P</i>	—	<0.010	0.078	<0.010	<0.010

注:—表示无此项;与对照组比较,^a $P<0.05$ 。

表 3 康复新对 LPS 诱导的 RAW264. 7 中细胞因子 mRNA 表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	IL-1 β		IL-10	
	4 h	8 h	4 h	8 h
DMSO+DMEM 组	1. 01 $\pm$ 0. 17	1. 02 $\pm$ 0. 24	1. 12 $\pm$ 0. 56	1. 08 $\pm$ 0. 49
DMSO+LPS 组	129. 22 $\pm$ 32. 53 ^a	177. 34 $\pm$ 43. 77 ^a	22. 47 $\pm$ 6. 85 ^a	137. 04 $\pm$ 55. 83 ^a
BAY11-7082+LPS 组	8. 06 $\pm$ 0. 28 ^b	25. 59 $\pm$ 16. 28 ^b	2. 13 $\pm$ 0. 34 ^b	25. 45 $\pm$ 4. 47 ^b
康复新 0. 050 0 mg/mL+LPS 组	56. 96 $\pm$ 15. 46 ^b	149. 33 $\pm$ 45. 96	11. 98 $\pm$ 3. 13	119. 87 $\pm$ 36. 31
康复新 0. 012 5 mg/mL+LPS 组	68. 43 $\pm$ 9. 66 ^b	106. 17 $\pm$ 21. 45 ^b	14. 65 $\pm$ 2. 26	89. 77 $\pm$ 7. 28
F	29. 083	18. 638	4. 080	11. 644
P	<0. 010	<0. 010	<0. 010	0. 001

组别	NOS		MMP-13	
	4 h	8 h	4 h	8 h
DMSO+DMEM 组	1. 01 $\pm$ 0. 12	1. 03 $\pm$ 0. 25	1. 07 $\pm$ 0. 49	1. 25 $\pm$ 1. 01
DMSO+LPS 组	10. 72 $\pm$ 0. 69 ^a	8. 74 $\pm$ 1. 07 ^a	186. 76 $\pm$ 116. 28 ^a	241. 72 $\pm$ 63. 42 ^a
BAY11-7082+LPS 组	1. 64 $\pm$ 0. 42 ^b	3. 22 $\pm$ 0. 67 ^b	7. 71 $\pm$ 0. 83 ^b	44. 41 $\pm$ 2. 51 ^b
康复新 0. 050 0 mg/mL+LPS 组	0. 39 $\pm$ 0. 17 ^b	0. 67 $\pm$ 0. 57 ^b	22. 28 $\pm$ 14. 42 ^b	93. 85 $\pm$ 7. 64 ^b
康复新 0. 012 5 mg/mL+LPS 组	0. 14 $\pm$ 0. 02 ^b	0. 56 $\pm$ 0. 24 ^b	23. 15 $\pm$ 4. 79 ^b	34. 18 $\pm$ 15. 49 ^b
F	375. 021	87. 687	6. 336	31. 073
P	<0. 010	<0. 010	<0. 010	<0. 010

注:与 DMSO+DMEM 组比较,^a $P < 0. 05$;与 DMSO+LPS 组比较,^b $P < 0. 05$ 。

3 讨 论

康复新是美洲大蠊干燥虫体的乙醇提取物,美洲大蠊有促血管新生、组织修复、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、增强免疫、抗炎、消肿和镇痛的作用^[8-9]。临床上利用康复新和其他药物联合治疗牙周炎,取得了良好疗效^[10-11]。

牙周炎是由微生物引起的一种慢性炎症性疾病,牙周组织破坏的程度主要取决于微生物与宿主的相互作用^[12],牙周炎的大多数组织损害是由于宿主对感染的应答引起的,而不是感染的微生物直接引起的。在牙周炎的发生过程中,对组织会产生破坏的介质主要包括 MMP、细胞因子(IL 和 TNF)和前列腺素 PGE2^[6]。研究发现,MMP-13 在慢性牙周炎患者龈沟液中的表达水平升高,可以独立作为牙周炎的诊断分子,且与牙周炎患者非活动性位点及健康人比较,牙周炎患者活性位点的 MMP-13 活性更高。促炎细胞因子和基质金属蛋白酶的表达,促进牙周炎患者牙周组织的破坏^[13-14]。NO 是细胞毒效应分子,也是炎症产物,其细胞毒性作用具有双重性。有研究报道,增加唾液 NO 水平则牙周炎的严重程度增加,即唾液中 NO 的含量与牙周炎的发展呈正相关^[15],NOS 是 NO 合成过程中的关键酶,许多关于 NO 的研究都集中在 NOS 的研究上。本研究结果显示,康复新能降低细胞 MMP-13 和 NOS mRNA 的表达水平,推测康复新的抗炎作用可能与抑制基质金属蛋白酶和 NOS 表达水平相关。

IL-1 β 是 IL 家族中与牙周炎发生密切相关的一类因子,可上调炎症细胞因子、趋化因子、转录因子、基质金属蛋白酶及黏附分子的水平^[16]。刘荣坤等^[17]研究结果显示,快速进展性牙周炎炎症反应与 IL-1 β

表达呈正相关。IL-10 又称为细胞因子合成抑制因子,主要由 Th2 细胞、巨噬细胞等分泌,具有较强的抗炎作用^[18]。有研究表明,局部药物诱导牙龈组织中 IL-10+B 细胞表达及移植外源性 IL-10+B 细胞能够抑制牙周炎症和骨丢失^[19]。本研究中,康复新组的 IL-1 β 和 IL-10 mRNA 表达与炎症模型组比较,差异无统计学意义($P > 0. 05$),提示康复新药液的抗炎机制与 IL-1 β 和 IL-10 相关性不大,结果与实验预期不相符,康复新抗炎与 IL-1 β 和 IL-10 的相关性需进行进一步的探讨。

巨噬细胞在动员宿主的防御机制抗细菌感染中发挥关键作用,作为固有免疫系统的重要组成部分,在牙周炎的发生、发展过程中起重要作用。一方面,分泌细胞因子刺激其他细胞的抗菌反应,杀灭病原菌;另一方面,通过释放促炎因子刺激破骨细胞,促进骨破坏,加重牙周炎^[20]。本研究中,康复新能促进人单核巨噬细胞 THP-1 增殖,表明康复新可能有增强免疫的作用。

牙周病的治疗主要是通过机械方法如洁治、刮治和根面平整以清除病因,但单纯的机械治疗有些患者效果欠佳,药物治疗可作为牙周机械治疗的辅助手段,加强疗效,防止疾病复发^[6]。有研究结果显示,应用盐酸米诺环素联合诊疗与单纯进行牙周基础治疗相比,患者的各项临床指标改善更为显著,预后效果更为良好^[21]。

牙周炎治疗的终极目标是通过牙周组织再生的手段重建已丧失的牙周支持组织结构,使因牙周炎而丧失的牙周支持组织再生,理想的牙周炎愈合过程是所有牙槽骨、牙骨质及牙周韧带等牙周组织都能够再生^[2]。本研究探讨康复新对与牙周组织相关的

hPDLFs、hGECs、THP-1 和 MC3T3-E1 增殖的影响,结果显示,康复新在一定浓度范围内能促进 hPDLFs、THP-1 和 MC3T3-E1 增殖。在有效浓度范围内,促增殖效应与康复新浓度呈相关性,低于最优浓度时,增殖效应随浓度的增加而增强,达到最优浓度后,增殖效应随浓度的增加反而减弱。康复新对人牙龈上皮细胞为 24 h 时间点促进增殖,随着时间的推移,48 h 则抑制细胞增殖。

总之,康复新在一定浓度范围内能促进 hPDLFs、hGECs、THP-1 和 MC3T3-E1 增殖,在有效浓度范围内,促增殖效应与康复新浓度呈相关性,表明康复新可能是通过促进牙周组织再生而治疗牙周炎;康复新能降低细胞 MMP-13 和 NOS mRNA 的表达水平推测康复新还有可能是通过降低 MMP-13 和 NO 的表达水平发挥抗炎效应。康复新治疗牙周炎的机制一方面可能是促进与牙周组织再生相关细胞的增殖,从而促进牙周组织再生;另一方面,也可能是通过降低 MMP-13 和 NO 表达水平产生抗炎的作用。

参考文献

[1] 陈新谦,金有豫. 新编药理学[M]. 14 版. 北京:人民卫生出版社,1983:88.

[2] 张汉超,耿福能,沈咏梅,等. 康复新液药理作用及临床应用的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2017,26(3):57-60.

[3] 陈伟,吴均锐,黄舜敏. 醋酸地塞米松粘贴片联合康复新液治疗老年复发性口腔溃疡的效果及对血清 MDA、SOD 的影响[J]. 中外医学研究, 2021,19(1):72-74.

[4] 庄瑞,闵皓博. 康复新液联合替硝唑治疗慢性牙周炎的疗效及对患者龈沟液 S100A12 和乳铁蛋白水平的影响[J]. 广西医科大学学报,2019,36(3):404-408.

[5] 冯玉龙,夏俊博. 康复新液治疗老年溃疡性结肠炎的疗效及对超敏 C 反应蛋白、丙二醛与超氧化物歧化酶的影响[J]. 天津药学,2020,32(3):25-27.

[6] 孟焕新. 临床牙周病学[M]. 2 版. 北京:北京大学医学出版社,2014:168.

[7] 汤雁利,张玉皓,李罡,等. 康复新在巨噬细胞炎症反应中的抗炎作用及其机制[J]. 山东医药, 2016,56(9):13-15.

[8] 胡艳芬,吕小满,王玉梅,等. 美洲大蠊药用价值研究进展[J]. 医学综述,2008,14(18):2822-2824.

[9] 何正春,彭芳,宋丽艳,等. 美洲大蠊化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2007,32(21):2326-2331.

[10] 赵建安,王涛,房洪波,等. 康复新液与盐酸米诺环素软膏联合治疗慢性牙周炎的临床研究[J].

中医药临床杂志,2020,32(7):1352-1354.

[11] 田赫. 康复新液联合替硝唑治疗慢性牙周炎的临床观察[J]. 世界最新医学信息文摘,2019,19(26):149-151.

[12] KUMAR S. Evidence-Based update on diagnosis and management of gingivitis and periodontitis[J]. Dent Clin North Am, 2019, 63(1):69-81.

[13] HERNÁNDEZ RÍOS M, SORSA T, OBRE GÓN F, et al. Proteolytic roles of matrix metalloproteinase(MMP)-13 during progression of chronic periodontitis:initial evidence for MMP-13/MMP-9 activation cascade[J]. J Clin Periodontol, 2009, 36(12):1011-1017.

[14] ÖZCAN E, İŞİL SAYGUN N, SERDAR M A, et al. Non-surgical periodontal therapy reduces saliva adipokine and matrix metalloproteinase levels in periodontitis[J]. J Periodontol, 2016, 87(8):934-943.

[15] REHER V G, ZENÓBIO E G, COSTA F O, et al. nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis[J]. J Oral Sci, 2007,49(4):271-276.

[16] VARDAR-SENGUL S, ARORA S, BAYLAS H, et al. Expression profile of human gingival fibroblasts induced by interleukin-1beta reveals central role of nuclear factor-kappa B in stabilizing human gingival fibroblasts during inflammation[J]. J Periodontol, 2009, 80(5):833-849.

[17] 刘荣坤,曹采方,孟焕新,等. TNF- α 及 IL-1 β 与多形核白细胞在牙周炎症组织中浸润的关系[J]. 中华口腔医学杂志,2000,35(5):327-329.

[18] 唐燕,张蕴惠. 白细胞介素-10 与牙周炎[J]. 国外医学(口腔医学分册),2003,30(6):422-424.

[19] YU P, HU Y, LIU Z Q, et al. Local induction of B cell interleukin-10 competency alleviates inflammation and bone loss in ligature-induced experimental periodontitis in mice[J]. Infect Immun, 2017,85(1):e00645.

[20] MURRAY P J, WYNN T A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets[J]. Nat Rev Immunol, 2011,11(11):723-737.

[21] LU H K, CHEI C J. Efficacy of subgingivally applied minocycline in the treatment of chronic periodontitis[J]. J Periodontal Res, 2005, 40(1):20-27.