

骨碎补柚皮苷对人牙周韧带细胞增殖 和成骨分化潜能的影响

胡其勇^{1,2}, 陈莉丽¹, 王仁飞²

(1. 浙江大学医学院附属第二医院, 浙江 杭州 310009;

2. 杭州口腔医院, 浙江 杭州 310006)

[摘要] 目的:探讨骨碎补柚皮苷对人牙周韧带细胞的增殖能力以及成骨分化潜能的影响。方法:MTT法检测在含有不同浓度骨碎补柚皮苷的细胞培养液中人牙周韧带细胞的增殖特性;检测不同浓度骨碎补柚皮苷作用后人牙周韧带细胞中碱性磷酸酶(ALP)活性的改变。结果:骨碎补柚皮苷 $\geq 0.01 \mu\text{mol/L}$ 时能增进入牙周韧带细胞增殖($P < 0.05$),并能增加其ALP活性($P < 0.05$)。结论:骨碎补柚皮苷可提高人牙周韧带细胞的增殖能力及成骨分化的潜能。

[关键词] 骨碎补△/投药和剂量;橙皮苷/药理学;牙周膜/细胞学;细胞分化;细胞增殖;成骨细胞/药物作用

[中图分类号] R 285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2010)01-0079-05

Traditional Chinese medicine *Drynaria fortunei* J. Smith naringin promotes proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells

HU Qi-yong¹, CHEN Li-li¹, WANG Ren-fei² (1. Department of Stomatology, The Second Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China; 2. Hangzhou Stomatology Hospital, Hangzhou 310006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of *Drynaria fortunei* J. Smith naringin (DFSN) on proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells (hPDL). **Methods:** Cultured human periodontal ligament cells were treated with DFSN at different concentrations. Cell proliferation was determined by MTT method; cell differentiation was evaluated through the examination of alkaline phosphate (ALP) activities. **Results:** DFSN in a concentration ranged from $0.01 \mu\text{mol/L}$ to $10 \mu\text{mol/L}$ showed a promoting effect on proliferation of hPDL ($P < 0.05$), and it also promoted ALP activities of hPDL ($P < 0.05$). **Conclusion:** *Drynaria fortunei* J. Smith naringin can promotes the proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells.

[Key words] DRYNARIA FORTUNEI/admin; Hesperidin/pharmacol; Periodontal ligament/cytol;

收稿日期:2008-11-17 修回日期:2009-10-19

基金项目:浙江省科技厅资助项目(991103115)。

作者简介:胡其勇(1976-),男,本科,主治医师,从事口腔临床医疗工作。

通讯作者:陈莉丽(1957-),硕士,主任医师,口腔内科工作;E-mail:yanchen_5657@163.com

Cell differentiation; Cell proliferation; Osteoblasts/drug eff

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2010,39(1):79-83.]

牙周炎的主要病理改变是牙周袋形成和牙槽骨吸收,是导致我国中老年人牙缺失的主要原因^[1]。人牙周韧带细胞是牙周膜中的主要细胞成分,具有多向分化的潜能,在牙周组织的创伤修复和组织再生中发挥着重要作用。中药骨碎补为水龙骨科植物槲蕨或中华槲蕨的干燥根茎^[2],是中医骨伤科方剂中常用主药,具有促进骨折愈合,强骨补肾的功效^[3],在牙周病治疗上也多有应用。现代中药药物化学研究证实,骨碎补中的有效成分主要为一种黄酮类化合物-柚皮苷^[4]。研究表明含骨碎补成分的复方药物对牙周炎有较好临床治疗效果^[5],但其相关的机制还不清楚。作者研究了骨碎补柚皮苷对人牙周韧带细胞的增殖能力和成骨分化潜能的影响,为更好地开发和利用骨碎补在牙周炎治疗中的作用提供了新的实验数据。

1 材料与方法

1.1 人牙周韧带细胞的培养 经患者(18~25岁)知情同意后,取其因正畸需要拔除的新鲜双尖牙,反复冲洗后刮取根中1/3牙周膜组织,剪成1 mm×1 mm×1 mm组织块,均匀铺于细胞培养瓶瓶底。以含100 g/L胎牛血清(FBS, Gibco, USA)的DMEM (Gibco, USA)培养液,在100%饱和湿度、50 ml/L CO₂、950 ml/L空气、37℃下培养。待细胞生长至70%~80%融合后,用2.5 g/L胰蛋白酶消化,进行传代培养,取5~8代细胞用于实验。

1.2 实验药品 骨碎补柚皮苷标准品(中国药品生物制品检定所)5.805 g溶于1 ml DMSO (Sigma, USA)后,配制成10 mmol/L溶液。5 g/L MTT (Sigma, USA)液。M-PER蛋白提取试剂盒(Pierce, USA)。BCA试剂盒(上海生工)。ALP试剂盒(南京建成)。

1.3 实验分组和处理 含20%胎牛血清的DMEM培养液中加入骨碎补柚皮苷标准品溶液,调整其终浓度分别为10、1、0.1、0.01、0.001 μmol/L。在不同培养容器中接种牙周韧带细

胞,在5% CO₂中37℃预培养24 h。实验分组:10 μmol/L、1 μmol/L、0.1 μmol/L、0.01 μmol/L、0.001 μmol/L 5个实验组和1个对照组。各实验组分别用上述不同终浓度含柚皮苷细胞培养液100 μl,对照组用未含柚皮苷细胞培养液100 μl(每个浓度3孔),间隔24 h每个处理组和对照组均检测1次,共检测3次。

1.4 检测指标

1.4.1 细胞增殖效应检测 MTT法检测细胞增殖效应^[6]。在96孔板(Corning, USA)中每孔接种 2×10^4 /ml人牙周韧带细胞。终止药物作用后,分别加入10 μl MTT,孵育4 h;弃去上清,每孔加入100 μl DMSO,振荡10 min;酶标仪(DG3022A型,国产)570 nm测定每孔OD值。

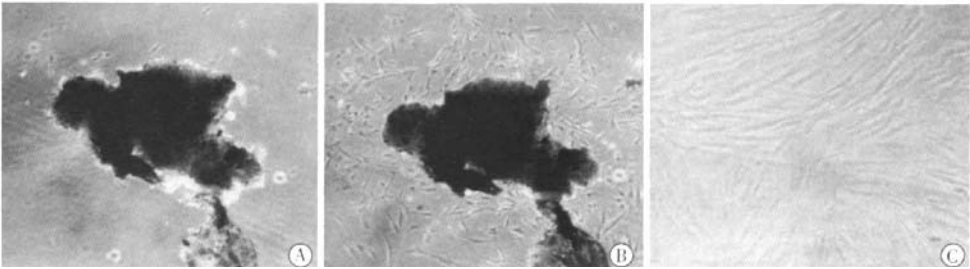
1.4.2 碱性磷酸酶(ALP)活性测定^[7] 6孔板(Corning, USA)中每孔接种 2×10^5 /ml人牙周韧带细胞。终止药物作用后,用M-PER蛋白提取试剂盒分别提取每孔的总蛋白;用BCA试剂盒测定总蛋白浓度;ALP测定。

1.5 统计学处理 应用SPSS 13.0统计软件对各组数据进行单因素方差分析,检验水准 $\alpha < 0.05$ 为差异具有统计学显著性。

2 结果

2.1 细胞培养结果 原代培养第7~9天组织块周围可见细胞游出,以组织块为中心,放射状排列。细胞为长梭形,胞体丰满,两端有细长突起,核圆形或卵圆形。传代后细胞生长旺盛,呈一定方向排列,形态规则,胞体丰满,胞浆均匀,核仁清晰(图1A~C)。

2.2 MTT法检测结果 含1 μmol/L柚皮苷培养液在24 h后,含0.1 μmol/L柚皮苷培养液在48 h后,0.01 μmol/L含柚皮苷培养液在72 h后均能促进人牙周韧带细胞数日增加($P < 0.05$),其余浓度药物在不同时间点均无促细胞增殖作用($P > 0.05$)。除0.001 μmol/L浓度组外,各浓度组的PDLCL随着培养时间的延长,细胞数量均有显著性增加(表1)。



A:原代培养 5 d 有细胞从组织块周围游离出来;B:原代培养 10 d 后,细胞逐渐增多;C:原代培养 20 d 左右细胞长满瓶底,成梭形或星形,胞突细长,放射状排列(×20).

图 1 细胞原代培养结果

Fig.1 Cell in primary culture results

表 1 不同浓度含柚皮苷细胞培养液作用的人牙周韧带细胞 MTT 法吸光度

Table 1 MTT absorbance of hPDLc promoted by DFSN at different dosages

(n=7, $\bar{x} \pm s$, A570)

柚皮苷培养液/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
10	0.463 $\pm$ 0.037 *	0.593 $\pm$ 0.024 *	0.634 $\pm$ 0.026 *
1	0.459 $\pm$ 0.022 *	0.611 $\pm$ 0.031 *	0.651 $\pm$ 0.019 *
0.1	0.435 $\pm$ 0.031	0.585 $\pm$ 0.032 *	0.633 $\pm$ 0.025 *
0.01	0.422 $\pm$ 0.034	0.569 $\pm$ 0.027	0.617 $\pm$ 0.030 *
0.001	0.395 $\pm$ 0.047	0.516 $\pm$ 0.031	0.567 $\pm$ 0.029
对照组	0.381 $\pm$ 0.033	0.498 $\pm$ 0.024	0.555 $\pm$ 0.039

与对照组比较,*P<0.05.

2.3 碱性磷酸酶(ALP)检测结果 与相应对照组比较,同 2.2 各组别同一作用时间均能使细胞 ALP 活性升高(P<0.05)。其中含 10 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮苷培养液在 24 h 后,含 1 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮苷培养液在 48 h 后,含 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 柚皮苷培养液在 72 h 后,均能使细胞 ALP 活性显著

性升高(P<0.01)。其余浓度药物在不同时间点均无使细胞 ALP 活性升高作用(P>0.05)。除 0.001 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组外,各浓度组的 PDLc 随着培养时间的延长,细胞 ALP 活性有显著性增加(表 2)。

表 2 不同浓度含柚皮苷细胞培养液作用的人牙周韧带细胞 ALP 活性

Table 2 ALP activities of hPDLc promoted by DFSN at different concentrations

(n=3, $\bar{x} \pm s$, U $\cdot \text{g}^{-1}$)

柚皮苷培养液/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
10	6.730 $\pm$ 1.332 **	10.850 $\pm$ 1.132 **	12.817 $\pm$ 1.609 **
1	5.165 $\pm$ 1.672 *	6.875 $\pm$ 1.065 **	10.736 $\pm$ 1.494 **
0.1	4.435 $\pm$ 1.229	6.402 $\pm$ 0.779 *	9.344 $\pm$ 0.955 **
0.01	4.295 $\pm$ 0.776	4.434 $\pm$ 0.614	5.645 $\pm$ 0.625 *
0.001	2.2852 $\pm$ 1.018	3.104 $\pm$ 0.174	4.649 $\pm$ 0.488
对照组	2.763 $\pm$ 0.767	2.824 $\pm$ 0.522	4.118 $\pm$ 0.942

与对照组比较,*P<0.05,**P<0.01.

3 讨 论

牙周韧带细胞具有成骨分化潜能,是牙周组织再生修复的主要细胞来源,可合成和分泌大量的胶原和非胶原蛋白,表达较高的 ALP 活性等^[9]。Sun^[10]的研究表明骨碎补提取物能促进成骨细胞增殖,提高其 ALP 的表达活性。柚皮苷为骨碎补中主要的活血化瘀成分,为探讨骨碎补在牙周炎治疗中的作用,本实验将骨碎补中的主要药理成分——柚皮苷作用于体外培养的人牙周韧带细胞,发现具有促进细胞增殖和提高其中 ALP 的表达活性的作用。

细胞增殖实验表明:培养基中柚皮苷浓度除了在 0.001 $\mu\text{mol/L}$ 时,72 h 内促进牙周韧带细胞增殖的效应不明显外,其余在 10 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.01 $\mu\text{mol/L}$ 等不同浓度时,在 72 h 内的不同作用时间后均能促进牙周韧带细胞增殖,且浓度越高,诱导牙周韧带细胞增殖效应发挥得越早。这表明柚皮苷促进细胞增殖的效应具有浓度依赖性。并且,除 0.001 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组外,各浓度组随着培养时间的延长,细胞数量均有显著性增加。这表明柚皮苷促进细胞增殖的效应具有一定的时间关联性。

ALP 是一类主要分布于细胞膜的钙结合转运蛋白,具有促进细胞成熟分化的作用,是成骨细胞早期分化的标志物^[12]。牙周韧带细胞有成骨细胞的潜能。本实验 ALP 活性的检测结果发现:柚皮苷作用于牙周韧带细胞后,柚皮苷浓度在 10 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.01 $\mu\text{mol/L}$ 时,在不同作用时间后均能促进牙周韧带细胞的分化,且与其促进牙周韧带细胞增殖的效应一致,浓度越低,所需要发挥促分化效应或 ALP 活性显著性升高的时间越长;同一浓度随着时间的延长促分化或 ALP 活性显著性提高。这表明柚皮苷在促进人牙周韧带细胞的分化上具有浓度依赖性和时间关联性。有研究发现^[13-14],骨碎补提取物能促进 MC3T3-E1 增殖,提高其 ALP 活性,本实验结果与这些报道一致。本实验中,72 h 内柚皮苷促进 PDL 增殖,提高其 ALP 活性的最低效应浓度是 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组作用最强,但在一定

的观察时间内,骨碎补柚皮苷作用于人牙周韧带细胞的最佳效应浓度尚待进一步研究。

牙周组织损伤后的愈合趋势主要取决于牙周组织中各种细胞成分在牙根表面的竞争性定居,如果牙龈成纤维细胞首先占据根面则导致牙根吸收或纤维性愈合^[15-16],成骨细胞首先占据根面则形成骨黏连^[17],只有牙周韧带细胞首先占据根面才能形成新的牙槽骨牙周膜牙骨质^[18-23]。许彦枝等^[24]发现骨碎补能促进体外培养的人牙龈成纤维细胞 ALP 活性增强,提示其可能参与牙周结缔组织新附着的过程。本实验研究发现,骨碎补柚皮苷具有促人牙周韧带细胞增殖和分化的功能,因此可将其用于牙周炎或牙周创伤的治疗,促进牙周组织的新生。柚皮苷作用于牙周组织,促使牙周韧带细胞增殖和分化,具体的调控机制尚待进一步研究。

References:

- [1] MOMBELLI A, GMURN R, LANG N P, et al. Actinobacillus actinomycetemcomitans in Chinese adults serotype distribution and analysis of the leukotoxin gene promoter Locus [J]. *Chin Periodontol*, 1999, 26(8):505-507.
- [2] XIE Zhi-ming, CAO Lin-lin (谢志民, 曹林林). *Materia Medica Textual Research on Chinese medicine Kaosi* [J]. *Shanxi Journal of Traditional Chinese Medicine* (陕西中医), 1994, 15(7):324. (in Chinese)
- [3] LI Shun-xiang, LONG Mian, ZHANG Zhi-guang (李顺祥, 龙勉, 张志光). Research progress of *Drynaria fortunei smith* [J]. *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine* (中国中医药信息杂志), 2002, 9(11):75-78. (in Chinese)
- [4] LIU Zhen-li, LU Ai-ping, ZHANG Qiu-hai (刘振丽, 吕爱平, 张秋海). Study on the petroleum ether extract of *Rhizoma Drynariae* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medical* (中国中药杂志), 1999, 24(4):222-224. (in Chinese)
- [5] ZHANG Ju-zhi (张举之). A study of therapeutic mechanism of tooth-firming pills (Guchiwan) [J]. *West China Journal of Stomatology* (华西口腔医学杂志), 1990, 8(3):198-200. (in Chinese)
- [6] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular

- growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay [J]. *Immunol Methods*, 1983, 65(1-2):55-58.
- [7] TIETZ N W, RINKER A D, SHAW L M. IFCC method for alkaline phosphatase [J]. *Clin Chem Clin Biochem*, 1983, 21:731-748.
- [8] PITARU S, MCCULLOCH C, NARAYANAN A S. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing[J]. *Periodont Res*, 1994, 29:81-94.
- [9] POYKO U, MELCHER A H, BRUNETTE D M. Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro[J]. *Periodont Res*, 1981, 16(1):73-88.
- [10] SUN J S, LIN C Y, DONG G C, et al. The effect of Gu-Sui-Bu(*drynaria fortunei* J Sm) on bone cell activities [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(16):3377-3378.
- [11] SI-TU Zhen-qiang, WU Jun-zheng(司徒镇强, 吴军正). *Cell Culture* (细胞培养) [M]. Xi An: World Publishing Corporation, 1996: 63-71. (in Chinese)
- [12] LUBEN R A, WONG G L, COHN D V. Biochemical characterization with parathormone and calcitonin of isolated bone cells: provisional identification of osteoclasts and osteoblasts [J]. *Endocrinology*, 1976, 99(2):526-534.
- [13] JEONG Ji-chen, LEE Jae-wook, YOON Cheol-ho, et al. Stimulative effects of *Drynariae* Rhizoma extracts on the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 Cells [J]. *Ethnopharmacology*, 2005, 96:489-495.
- [14] TANG Qi, CHEN Li-li, YAN Jie(唐琪, 陈莉丽, 严杰). Effects of traditional chinese medicine *Drynaria fortunei* smith on promoting the proliferation, differentiation and calcification of mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica* (中国中药杂志), 2004, 29(2):164-168. (in Chinese)
- [15] NYMAN S, KARRING T, IANDHE J, et al. Healing following the plantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue [J]. *Clin Periodontol*, 1980, 7(5):394-401.
- [16] GOTTLOW J, NYMAN S, KARRING T. Healing following citric acid conditioning of roots implanted into bone and gingival connective tissue [J]. *Periodont Res*, 1984, 19(2):214-220.
- [17] MELCHER A H. Repair of wounds in the periodontium of the rat. Influence of periodontal ligament on osteogenesis [J]. *Arch Oral Biol*, 1970, 15(12):1183-1204.
- [18] MELCHER A H. On the repair potential of periodontal tissues [J]. *Periodontol*, 1976, 47(5):256-260.
- [19] NYMAN S, GOTTLOW J, KARRING T, et al. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experiment study in the monkey [J]. *Clin Periodontol*, 1982, 9(3):257-265.
- [20] GOTTLOW J, NYMAN S, KARRING T, et al. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration [J]. *Clin Periodontol*, 1984, 11(8):494-503.
- [21] MAGNUSSON I, NYMAN S, KARRING T, et al. Connective tissue attachment formation following exclusion of gingival connective tissue and epithelium during healing [J]. *Periodont Res*, 1985, 20(2):201-208.
- [22] KARRING I F, NYMAN S, LINDHE J. The significance of coronal growth of periodontal ligament tissue for new attachment formation[J]. *Clin Periodontol*, 1986, 13(2):145-150.
- [23] KURU L, PARKER M H, GRIFFITHS G S, et al. Flow cytometry analysis of gingival and periodontal ligament cells [J]. *Dent Res*, 1998, 77(4):555-564.
- [24] XU Yan-zhi, ZHU Meng-meng, WANG Kun(许彦枝, 朱蒙蒙, 王琨). Effects of traditional Chinese medicine *Drynaria fortunei* smith on Alkaline phosphatase activity and ultra-structure of human gingival fibroblast cells [J]. *Chinese Journal of Practical Stomatology* (中国实用口腔医学杂志), 2008, 1(3):157-160. (in Chinese)

[责任编辑 张荣连]