

西帕依固龈液对 IL-1 β 刺激人牙龈成纤维细胞产生 PGE₂ 的影响

艾比拜·玉素甫¹, 热娜古丽·艾则孜², 哈木拉提·吾甫尔²

1. 新疆医科大学第一附属医院内分泌科, 乌鲁木齐 830054
2. 新疆医科大学维吾尔医药系, 乌鲁木齐 830054

摘要 研究不同浓度西帕依固龈液对白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 刺激人牙龈成纤维细胞 (Human Gingival Fibroblast, HGF) 产生前列腺素 E₂ (Prostaglandin E₂, PGE₂) 水平的影响。采用健康人牙龈组织原代培养的 HGF 细胞, 以 1ng/mL 的 IL-1 β 作为刺激因子, 将 HGF 细胞按 5 \times 10⁴/mL 的细胞密度接种到 24 孔培养板中, 每孔 200 μ L 的细胞悬液。孵育 24h 贴壁后, 弃原培养液, 清洗 2 次后加药, 分组为空白对照组 (用含 20mL/L 的胎牛血清的 DMEM 培养液), IL-1 β 组 (浓度为 1ng/mL), IL-1 β +西帕依固龈液组 (西帕依固龈液终末浓度分别为 12.5、25、50、100、200 μ g/mL), IL-1 β +消炎痛 (消炎痛浓度为 100ng/mL)。用酶联免疫法测定 PGE₂ 含量, 观察不同浓度的西帕依固龈液 (分别为 12.5、25、50、100、200 μ g/mL) 对 HGF 培养上清中 PGE₂ 水平的影响。结果显示, 5 种不同浓度的西帕依固龈液均能显著抑制 1ng/mL 的 IL-1 β 刺激后 HGF 产生 PGE₂, 随着浓度的增加, 抑制效果也增加, 但 5 种浓度的西帕依固龈液抑制效果均低于 100ng/mL 的消炎痛。由此得出, HGF 具有合成和分泌 PGE₂ 的功能, IL-1 β 能有效刺激 HGF 产生 PGE₂; 西帕依固龈液对 IL-1 β 刺激 HGF 合成和分泌 PGE₂ 具有显著抑制作用, 其抑制作用在一定范围内呈浓度依赖性。

关键词 HGF; 西帕依固龈液; IL-1 β ; PGE₂

中图分类号 R29

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2012.15.009

Effects of Xipayi Mouth Rinse on the PGE₂ Production of Human Gingival Fibroblast (HGF) Induced by IL-1 β

YUSUF Abibai¹, AIZEZI Renaguli², UPUR Halmurat²

1. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China
2. Department of Uygur Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Abstract To observe the effects of Xipayi mouth rinse on the prostaglandin E₂ (PGE₂) production of Human Gingival Fibroblast (HGF) by stimulation of interleukin-1 β (IL-1 β), the HGF cells cultured by healthy human gingival tissue are used. With 1ng/mL IL-1 β as a stimulating factor, HGF cells with 5 \times 10⁴/mL cell density were inoculated into a culture plate with 24 holes, each containing 200 μ L cell suspension. 24h after incubation and adhering to the wall, the original culture liquid was abandoned and the mouth was washed 2 times after adding the drugs, which were grouped into control group (with 20m/L fetal bovine serum medium DMEM), IL-1 β group (beta concentration is 1ng/mL), IL-1 β +Xipayi mouth rinse group (end concentrations of were 50, 100, 200g/mL, respectively), IL-1 β +indomethacin (100ng/mL of endcentration) group. The enzyme immunoassay method is used to check the PGE₂ and observe the effects of different concentrations of Xipayi mouth rinse on PGE₂ levels in the HGF supernatant. Results show that Xipayi mouth rinse at different concentrations suppresses the PGE₂ production of HGF stimulated with 1ng/mL IL-1 β significantly in a dose dependent manner. It is concluded that the human gingival fibroblast has the ability of synthesizing and secreting PGE₂, and IL-1 β is a potent stimulation for HGF cell to generate PGE₂; and Xipayi mouth rinse can significantly inhibit the PGE₂ production of HGF by stimulation of IL-1 β .

Keywords HGF; Xipayi mouth rinse; IL-1 β ; PGE₂

收稿日期: 2012-02-27; 修回日期: 2012-04-26

基金项目: 国家技术创新计划项目 (CJ-15-04-13)

作者简介: 艾比拜·玉素甫, 博士, 研究方向为内分泌代谢病; 电子信箱: habiba@126.com; 哈木拉提·吾甫尔 (通信作者), 教授, 研究方向为新疆重大疾病的维吾尔医干预, 电子信箱: Halmurat@263.net

0 引言

维药西帕依固龈液在临床上常用于牙周炎、牙龈炎等的治疗,具有健齿固龈之功效,已有药理学研究证明其具有明显的抗菌、消炎、解热、镇痛及清除自由基等作用。前列腺素 PGE₂ (Prostaglandins), 特别是 PGE₂ 作为一种炎症介质和骨吸收的刺激因子,对牙周病的发生发展具有重要的作用。PGE₂ 可引起牙龈红肿,牙槽骨吸收和牙周袋形成^[1]。人牙龈成纤维细胞 (Human Gingival Fibroblast, HGF) 是牙周结缔组织最基本的细胞形式,其分泌物成分及其含量变化将决定牙龈的生物学特性。研究发现, HGF 可分泌 PGE₂, 并与牙周炎的严重程度密切相关^[2]。本研究采用酶联免疫法和放射免疫法,观察固龈液对白细胞介素-1 β (IL-1 β) 诱导 HGF 分泌 PGE₂ 水平的影响,进一步探究固龈液在牙周炎治疗中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM 培养液 (Gibco 公司, 美国); FCS 胎牛血清 (陕西华美生物工程公司); 西帕依固龈液 (新疆奇康哈博维药有限公司生产, 规格: 100mL/瓶, 含没食子 20mg/mL, 批号: 041218); IL-1 β , (Peprotech 公司, 美国); PGE₂ 酶联免疫检测试剂盒 (DR 公司, 美国)

1.2 HGF 的体外培养

取正畸拔牙区的健康牙龈组织, 在超净台内剪成 1mm³ 大小的组织块, 均匀铺在 25mL 培养瓶内, 翻转瓶底向上, 加入 4mL 含 10%FCS, 青链霉素各 100U/mL 的 DMEM 培养液, 在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 条件下培养 2—4h, 待组织块贴牢瓶底后轻轻翻转培养瓶, 继续培养。倒置显微镜下观察细胞生长情况, 待细胞长满瓶底后用 0.25%胰酶消化传代, 第 6—8 代细胞用于试验。参考刘斌等^[3]的原代细胞培养方法。

细胞来源鉴定: 用波形丝蛋白染色及角蛋白染色等免疫组化检测方法证明所培养的细胞来自外胚间叶, 非上皮源性细胞。

1.3 不同浓度西帕依固龈液的制备

采用液体二倍梯度稀释法, 用无血清的 DMEM 培养液将西帕依固龈液稀释成 5 种不同浓度, 分别为 12.5、25、50、100、200 μ g/mL。

1.4 不同浓度西帕依固龈液对 HGF 在 IL-1 β 刺激下分泌 PGE₂ 的影响

将 HGF 细胞按 5 \times 10⁴/mL 的细胞密度接种到 24 孔培养板中, 每孔 200 μ L 的细胞悬液。孵育 24h 贴壁后, 弃原培养液, 清洗 2 次后加药, 分组为空白对照组 (用含 20mL/L 的胎牛血清的 DMEM 培养液), IL-1 β 组 (浓度为 1ng/mL), IL-1 β +西帕依固龈液组 (西帕依固龈液终末浓度分别为 12.5、25、50、100、200 μ g/mL), IL-1 β +消炎痛 (消炎痛浓度为 100ng/mL)。每孔总量为 200 μ L, 每组 3 个复孔, IL-1 β 终末浓度为 1ng/mL, 于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养细胞 48h, 收集培养液于 EP 管内, 培养液离心, 取上清 200 μ L, 采用酶联免疫测定法, 在 490nm 波长

下测定 PGE₂ 的含量。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件处理数据, 所得结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 经方差齐性检验, 各组方差齐 ($P>0.05$), 进行两两比较, 组间比较用 SNK- q 检验 (Student-Newman-Keuls 法), 检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果与分析

2.1 HGF 的原代培养

细胞形态特征: HGF 呈梭形或星形, 胞浆突 2—4 个, 胞体丰满, 胞浆均匀, 细胞核为 1 个, 呈椭圆或圆形, 细胞密度较低时细胞交织成网状, 密度较高时细胞排列成束状或漩涡状 (图 1)。

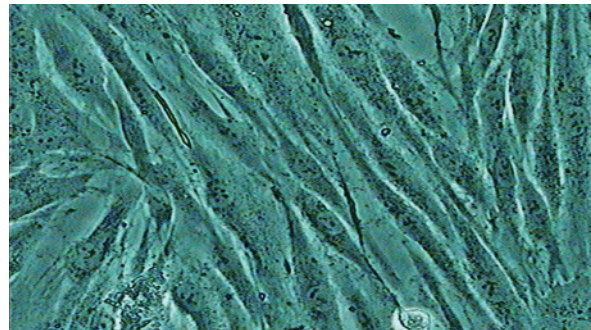


图 1 对数生长期的 HGF (200 \times)

Fig. 1 Growing period of HGF logarithm (200 \times)

细胞贴壁特性: HGF 在传代后 15—30min, 大约有半数细胞贴壁, 少数细胞开始展开, 呈熬鸡蛋样; 1h 后, 细胞贴壁 80% 以上, 部分细胞呈短梭形; 4h 后, 细胞基本上贴壁并完全铺展; 24h 后, 细胞交织成网状。

细胞生长特点: 细胞在传代后第 1 天生长较缓慢, 从第 2 天开始细胞分裂增殖活跃, 呈对数生长, 当细胞达到饱和密度时, 细胞生长处于停滞状态, 细胞平均传代时间为 4—8d。

细胞来源鉴定: 免疫组化检测结果显示, 波形丝蛋白染色阳性, 角蛋白染色阴性, 证明所培养的细胞来自外胚间叶, 非上皮源性细胞。

2.2 西帕依固龈液对 IL-1 β 介导的 HGF 分泌 PGE₂ 水平的影响

HGF 在没有 IL-1 β 刺激之前, 已有少量的 PGE₂ 分泌产生 (94.264 \pm 4.352pg/mL), 在 25 μ g/mL 的 IL-1 β 刺激下, HGF 分泌 PGE₂ 明显增多 (350.256 \pm 4.732ng/mL) ($P<0.01$), 5 种不同浓度的西帕依固龈液均可抑制 IL-1 β 诱导 HGF 分泌 PGE₂ 的作用, 当西帕依固龈液浓度为 12.5 μ g/mL 时, 即可明显抑制 IL-1 β 诱导 HGF 分泌 PGE₂ 的活性 ($P<0.01$), 抑制率为 26.63%, 西帕依固龈液浓度为 200 μ g/mL 时, 抑制率为 45.74%, 其抑制作用与药物对照组消炎痛接近。随着西帕依固龈液浓度的增加, 细胞培养上清液中 PGE₂ 水平逐渐下降,

各浓度组与 IL-1 β 组相比均相差显著 ($P < 0.01$)。但 5 种浓度的西帕依固龈液抑制效果均低于 100ng/mL 的消炎痛, 剂量效

应曲线显示, 西帕依固龈液对 PGE₂ 的影响在一定范围内呈浓度依赖性(表 1, 图 2)。

表 1 西帕依固龈液对 IL-1 β 介导的 HGF 分泌 PGE₂ 水平的影响
Table 1 Impact of Xipayi mouth rinse on IL-1 β mediated HGF secretion of PGE₂ levels

药物分组	PGE ₂ 含量/(pg·mL ⁻¹)	抑制作用/%
对照组(无 IL-1 β)	94.264±4.352	—
IL-1 β 组	350.256±4.732	0
IL-1 β +12.5 μ g/mL 西帕依固龈液	256.972± 4.157*	26.63*
IL-1 β +25 μ g/mL 西帕依固龈液	238.618±9.964*	31.87*
IL-1 β +50 μ g/mL 西帕依固龈液	230.736±5.126*	34.12*
IL-1 β +100 μ g/mL 西帕依固龈液	211.950±3.388*	39.49*
IL-1 β +200 μ g/mL 西帕依固龈液	189.050±7.808*	45.74*
IL-1 β +100ng/mL 消炎痛	171.354±7.696*	51.08*

注: * 与 IL-1 β 组相比, $P < 0.01$ 。

Note: *, compared to the IL-1 β group, $P < 0.01$.

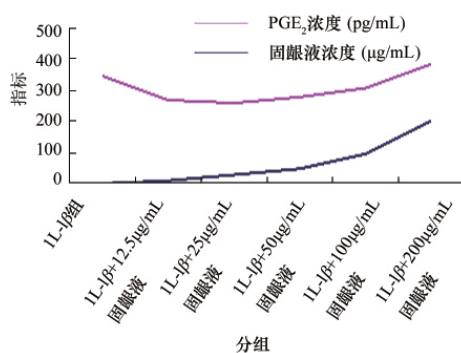


图 2 西帕依固龈液对 IL-1 β 介导的 HGF 分泌 PGE₂ 水平的抑制作用剂量效应曲线

Fig. 2 Dose-effect curve of inhibitory role of Xipayi mouth rinse on PGE₂ secretion from HGF induced by IL-1 β

3 讨论

牙龈炎为最常见的口腔疾病之一, 牙龈炎的发病机理主要是厌氧菌等致病菌侵犯机体引起免疫反应, 使局部炎细胞增多, 分泌前列腺素(PGEs)等细胞因子破坏牙龈组织或引起血管扩张, 血管的通透性增强, 浆液和炎细胞渗出增多, 使牙龈红肿, 形成牙龈炎。PGE₂ 是牙周病病理过程中的一种重要的炎症介质, 可由牙龈组织中的巨噬细胞、浆细胞、淋巴细胞和成纤维细胞等在激活时分泌^[4]。在炎症的牙龈组织和龈沟液中 PGE₂ 含量显著增加^[5], PGE₂ 可引起牙龈红肿, 牙槽骨吸收和牙周袋形成。它具有类似甲状旁腺激素的脱钙作用, 在低浓度时是一个有效的骨吸收诱导剂, 故与牙周附着丧失密切相关^[6]。PGEs 为花生四烯酸环氧代谢产物, 炎症时代谢中所需的酶激活, 代谢加快, PGEs 合成增多, 使牙龈炎加重。牙龈炎明显时, 龈组织中 PGEs 含量升高, 说明 PGEs 在龈炎发生中起重要作用^[7]。Shaik 等^[8]认为 PGEs 在牙周病中的作用与

免疫作用有关, 其免疫作用特点为: (1) 使局部血管扩张, 增强组织胺和缓激肽的作用诱发血浆渗出, 牙龈水肿; (2) 使人外周血和组织中细胞的环磷酸腺苷增多, 中性粒细胞趋化性增强; (3) 调节体液免疫反应活性; (4) 激活补体引起骨吸收, 补体增多时, PGE₂ 合成增多, 骨吸收增强, 细胞膜上的补体激活时, 膜磷脂释放脂肪酸刺激骨吸收或生成 PGEs 刺激骨吸收; (5) PGE₂ 与白细胞介素等相互诱导, 使各自的活性增强, 引起组织破坏。IL-1 β 是牙周病病理过程中另外一种重要的炎症介质, 它能够刺激基质金属蛋白酶的释放, 加速细胞外基质的降解; 能直接或协同其他细胞因子间接促进骨吸收, 抑制骨形成; 抑制牙周组织中碱性磷酸酶基因的表达, 不利于硬组织的形成^[9]。本实验结果显示, 1ng/mL 的 IL-1 β 组与对照组比较即出现显著差异, 由此可见: IL-1 β 能有效刺激 HGF 产生 PGE₂。Kraye 等^[10]报道牙龈组织中 PGEs 含量与炎细胞数量相对应, 表明抑制 PGEs 合成和释放的药物可抑制牙龈组织中的炎细胞数量, 从而减轻牙龈炎症。据 Schonfeld^[11]报道, 消炎痛为非类固醇抗炎药物, 可抑制花生四烯酸环氧合酶, 使 PGEs 合成减少或被完全抑制, 并可抑制巨噬细胞等炎细胞对 PGEs 的分泌, 还能抑制多形核白细胞向炎症部位的移动, 使牙龈组织中的炎细胞和 PGEs 减少, 因此对牙龈炎起治疗作用。还可减少牙龈组织中巨噬细胞和浆细胞数量, 减轻牙龈炎症。

以维吾尔药没食子(春虫秋果)为原料研制的西帕依固龈液, 具有健齿固龈, 清血止血, 消炎和防腐之功效, 被用于牙周炎, 牙龈炎, 咽喉炎及口臭等^[12-15]。已有药理学研究证明其具有明显的抗菌、消炎、解热、镇痛及清除自由基等作用, 减轻诸如毛细血管通透性增高、渗出和水肿等早期炎症反应及减少对慢性炎症增殖期的肉芽组织生成, 这与临床用其治疗急、慢性炎症性疾病是一致的^[16-18]。本实验中 12.5—200 μ g/mL 的西帕依固龈液均能显著降低 IL-1 β 刺激后 HGF 产生 PGE₂, 当西帕依固龈液浓度为 12.5 μ g/mL 时, 即可明显抑制 IL-1 β 诱导 HGF 分泌 PGE₂ 的活性 ($P < 0.01$), 抑制率为

26.63%, 说明西帕依固龈液可以通过阻断 $IL-1\beta$ 的作用抑制 HGF 产生 PGE_2 。随着西帕依固龈液浓度的增加, 抑制效果随之增加, 其抑制作用在一定范围内呈浓度依赖性。西帕依固龈液浓度为 $200\mu\text{g/mL}$ 时, 抑制率为 45.74%, 其抑制作用与药物对照组消炎痛接近。但 5 种浓度的西帕依固龈液抑制效果均低于 100ng/mL 的消炎痛, 进一步说明西帕依固龈液对牙龈炎的治疗作用。西帕依固龈液治疗牙龈炎的分子机制之一, 可能是通过抑制环氧化酶, 从而减少前列腺素的合成, 前列腺素是一种炎症介质, 它的合成减少后, 炎症反应随之减轻。但关于其具体作用方式、及对其他炎症介质的影响方面的研究有待进一步深入。

4 结论

西帕依固龈液对 $L-1\beta$ 刺激 HGF 合成和分泌 PGE_2 具有显著抑制作用, 其抑制作用在一定范围内呈浓度依赖性。

参考文献 (References)

- [1] Bage T, Kats A, Lopez B S, et al. Expression of prostaglandin E synthesis in periodontitis immunolocalization and cellular regulation [J]. *American Journal of Phatology*, 2011, 178(4): 7-14.
- [2] 陈铁楼. 前列腺素与牙周病的关系 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 1993, 4(3): 110-111.
Chen Tielou. *Chinese Journal of Conservative Dentistry*, 1993, 4(3): 110-111.
- [3] 刘斌, 吴军正, 司徒镇强, 等. 人牙龈成纤维细胞系的建立及其生物学特性[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 1999, 9(1): 34-39.
Liu Bin, Wu Junzheng, Situ Zhenqiang, et al. *Chinese Journal of Conservative Dentistry*, 1999, 9(1): 34-39.
- [4] Deo V, Bhongade M L. Pathogenesis and periodontitis: The role of cytokinase[J]. *Dent Today*, 2010, 29(9): 64-66.
- [5] Williams T J. Role of prostaglandin mediated vasodilation in inflammation[J]. *Nature*, 1977, 270: 530-539.
- [6] Brown L J, Loe H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease[J]. *Periodontol*, 2000, 1993, 2(1): 57-71.
- [7] 周以钧, 陈铁楼, 袁乃梅. 牙周病患者牙龈组织前列腺素 E_2 , 血栓素 B_2 , 6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 水平的研究 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 1995, 5(4): 205-207.
Zhou YiJun, Chen Tielou, Yuan Naimei. *Journal of Conservative*

Dentistry, 1995, 5(4): 205-207.

- [8] Shaik Y B, Kantarci A, Gibson F C. Immunoresponse of macrophages from young and aged micetooth oralpathogenic bacterium porphyromonas gingivalis[J]. *Immunity and Ageing*, 2010, 15(7): 7-14.
- [9] Ranney R R. Immunologic mechanisms of pathogenesis in periodontal disease: An assessment[J]. *J Periodont Res*, 1991, 26(3): 243-254.
- [10] Kraye J W, Leite R S, Krikwood K L, et al. Non-surgical chemotherapeutic treatments[J]. *Dent Clin North Am*, 2010, 54(1): 13-33.
- [11] Schonfeld S E. Strategies for managing periodontal inflammation [J]. *Calif Dent Assoc*, 2010, 38(4): 272-283.
- [12] 姚伟伟, 高金星. 西帕依固龈液治疗单纯性牙龈炎疗效观察[J]. 浙江中西医结合杂志, 2009(10): 44-48
Gao Weiwei, Gao Jinxing. *Zhejiang Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2009(10): 44-48.
- [13] 王凤琼, 陈晓涛, 唐柳云, 等. 西帕依固龈液治疗牙周病的临床疗效 [J]. 华西医药杂志, 2006, 21(1): 109-110.
Wang Fengqiong, Chen Xiaotao, Tang Liyun, et al. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006, 21(1): 109-110.
- [14] 封艳, 钟良军, 哈木拉提·吾甫尔. 西帕依固龈液治疗牙龈炎和控制菌斑的临床疗效观察[J]. 新疆医科大学学报, 2006, 29(1): 53-55.
Feng Yan, Zhong Liangjun, Halmurat Upur. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2006, 29(1): 53-55.
- [15] 李秀青, 林勇. 西帕依固龈液治疗复发性口腔溃疡的疗效观察[J]. 实用口腔医学杂志, 2005, 21(4): 559-560.
Li Xiuqing, Lin Yong. *Journal of Practical Stomatology*, 2005, 21(4): 559-560.
- [16] 哈木拉提·吾甫尔, 艾比拜·玉素甫. 西帕依固龈液对 LPS 诱导人牙龈成纤维细胞分泌 $IL-6$ 的抑制作用 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2006, 31(3): 326-328.
Halmurat Upur, Aibibai Yusufu. *Journal of Zhongnan Medical University: Medical Edition*, 2006, 31(3): 326-328.
- [17] 艾比拜·玉素甫, 库热西·玉努斯, 哈木拉提·吾甫尔. 西帕依固龈液对大鼠实验性牙龈炎模型中 $NF-\kappa B p65$ 、 $COX-2$ 表达的影响 [J]. 新疆医科大学学报, 2008, 31(5): 504-509.
Aibibai Yusuf, Kurexi Yunusi, Halmurat Upuer. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2008, 31(5): 504-509.
- [18] 斯拉甫, 努尔买买提·艾买提, 阿布都热依木·玉素甫, 等. 维药西帕依固龈液的药理作用研究[J]. 中国民族医药杂志, 1999, 5(3): 35-36.
Silafu, Nuer Maimaiti Aimaity, Abudureyimu Yusufu, et al. *Journal of Medicine and Pharmacy of Chinese Minorities*, 1999, 3(5): 35-36.

(责任编辑 吴晓丽)



《科技导报》“科技工作大家谈”栏目征稿

“科技工作大家谈”栏目专门刊登科技工作者近期提出的与科学技术相关的工作意见、建议和看法。该栏目内容着眼于科技研究、发展、应用、政策等领域的实际问题, 要求有明确、具体的内容, 方法上尽量具有可操作性。文字应简洁明了, 全文不超过 2200 字。欢迎国内外科技工作者及各级科协、学会投稿。栏目责任编辑: 王芷, 电子邮箱: wangzhi@cast.org.cn; 在线投稿: www.kjdb.org。