

细菌内毒素对钛板上人牙龈成纤维细胞生物学形态及 OPG 表达的影响

陈嘉彤,王稚英,王雪松

(辽宁医学院附属第二医院口腔种植中心,辽宁 锦州 121000)

[摘要] 目的:通过研究不同浓度的细菌内毒素对钛板上人牙龈成纤维细胞及其产物骨保护蛋白(osteoprotegerin,OPG)的影响,了解内毒素对种植体软组织以及骨组织愈合的作用。方法:人牙龈组织块培养并用免疫荧光染色方法进行组织来源鉴定,用 0、10、100 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的细菌内毒素分别刺激钛板上的牙龈成纤维细胞,扫描电镜观察牙龈成纤维细胞的形态,并用 ELISA 法检测 OPG 的含量并进行统计学分析。结果:10 $\mu\text{g/ml}$ 细菌内毒素刺激的牙龈成纤维细胞较正常组细胞伪足增多,细胞基质分泌增加,而 100 $\mu\text{g/ml}$ 组的细胞数量及基质分泌明显减少。ELISA 法表明低浓度条件下,OPG 的含量随着细菌内毒素浓度增多而增加,但 100 $\mu\text{g/ml}$ 组 OPG 含量显著降低。结论:低浓度细菌内毒素可以促进牙龈成纤维细胞生长及分泌细胞基质 OPG,而高浓度细菌内毒素则抑制牙龈成纤维细胞增殖且 OPG 表达降低。

[关键词] 细菌内毒素;人牙龈成纤维细胞;骨保护蛋白

[中图分类号] Q256

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)03-310-04

doi:10.7655/NYDXBNS20140307

Effects of bacterial endotoxin on bio-morphology and OPG level of human gingival fibroblasts on titanium plate

Chen Jiatong, Wang Zhiying, Wang Xuesong

(Center of Oral Implantology, The Second Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of bacterial endotoxin with different concentrations on human gingival fibroblast (HGF) on titanium plate and its product osteoprotegerin (OPG), and to understand the healing function of endotoxin on soft tissue and bone tissue of dental implants. **Methods:** Tissue block culture method was applied to culture human gingiva and gingival fibroblasts were identified by immunofluorescence staining method. Endotoxin with different concentrations of 0, 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$ were used to stimulate HGF on the titanium plate and HGF morphology was observed by scanning electron microscope (SEM). ELISA was applied to detect the OPG level. **Results:** Compare with the normal group, the HGF stimulated by endotoxin of 10 $\mu\text{g/ml}$ had more cellular pseudopods and cellular matrix secretion was increased. However, in the 100 $\mu\text{g/ml}$ endotoxin stimulated group, number of cells and cellular matrix secretion were decreased significantly. ELISA method demonstrated that under the condition of low concentration, OPG increased with the increase of endotoxin concentration. But the OPG level of 100 $\mu\text{g/ml}$ group decreased significantly. **Conclusion:** Low concentration of bacterial endotoxin can promote growth of HGF and secretion of cellular matrix OPG; whereas high concentration of bacterial endotoxin can inhibit growth of gingival fibroblasts and decrease OPG level.

[Key words] bacterial endotoxin; human gingival fibroblasts; osteoprotegerin

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(03):310-313]

人牙龈组织由上皮组织和结缔组织构成,在正常的牙龈结缔组织中,细胞成分约占总体积的 8%,而成纤维细胞约占细胞总体积的 65%。该细胞能够合成胶原纤维、弹力纤维等从而保证牙龈的强度及张力^[1]。

细菌内毒素是革兰氏阴性细菌细胞壁中的一

种成分,其化学本质为一种脂多糖^[2],可引起内毒素休克、微循环障碍、发热以及播散性血管内凝血等。影响口腔种植体软组织愈合的主要刺激因素是细菌,口腔中的主要致病菌如伴放线放线杆菌、牙龈卟啉单胞菌、福赛坦氏菌和中间普氏菌等都是革兰氏阴性细菌^[1],均可以产生内毒素从而激活牙周

组织中的多种靶细胞合成、分泌各种细胞因子及炎症介质,参与牙周组织的破坏。由于细菌内毒素为革兰氏阴性细菌细胞壁的组成成分,因此本研究采用同样为革兰氏阴性细菌的大肠杆菌作为细菌内毒素的来源,具有制取培养方便的优点,从而利用其细胞壁中的内毒素成分进行研究。骨保护蛋白(osteoprotegerin, OPG)的功能是对骨吸收的抑制作用,主要抑制破骨细胞(osteoclast, OC)的分化、活化和成熟以及减少 OC 的数量^[3]。上皮细胞黏附在种植体表面形成的生物学封闭称作为袖口。这一生物屏障主要由牙龈结合上皮、牙龈胶原纤维黏附于种植体表面而形成^[4]。口腔种植体的龈界面是宿主抵抗外界细菌入侵的大门,此处也是一个较为薄弱的部位。本研究将人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblasts, HGF)传代培养于光滑钛板上,研究不同浓度细菌内毒素对钛板上 HGF 的生物学形态及 OPG 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM 低糖培养基、胰蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司),无噬菌体低内毒素胎牛血清(杭州四季青公司),Vimentin (D21H3)XP Rabbit mAb(Cell Signaling 公司,美国),Goat anti-rabbit IgG (H+L)/FITC (Sigma 公司,美国),免疫荧光染色试剂盒(上海汉恒生物科技有限公司),细菌内毒素工作标准品(*Escherichia coli* BL21 (DE3)plysS 型)、OPG ELISA 试剂盒(上海瑞齐生物科技有限公司),光滑钛板、酶标仪(BioTek 公司,美国)、扫描电镜(JSM-T300 公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 HGF 的培养与组织来源鉴定

临床取材因正畸、阻生需要拔牙或者因种植手术需切除牙龈且牙龈健康无炎症的患者,年龄 12~26 岁,在征得其同意后切除其牙龈组织。将其作为 HGF 原代培养的来源。采用组织块贴壁培养法,每 2~3 d 更换 1 次培养液,并在倒置相差显微镜下观察组织块情况及细胞的爬出形态。用胰蛋白酶消化法传代消化提纯 HGF^[5]。取生长旺盛的第 3 代细胞进行免疫荧光染色,抗波形丝蛋白和抗角蛋白染色鉴定细胞来源。

1.2.2 不同浓度细菌内毒素刺激钛板上 HGF 的生物学形态变化

将光滑钛板按照 6 孔板直径大小剪成圆形置于

一次性 6 孔板内,将第 3 代 HGF 传代到光滑钛板上。置于全自动 CO₂ 恒温孵育箱培养 3~4 d。将 0、10、100 μg/ml 的细菌内毒素加入到 6 孔板的不同孔内并记录好组别。培养 24 h 后,吸除旧培养基, PBS 冲洗 3 次,2.5%戊二醛固定,按照扫描电镜样本制备的方法步骤进行样本处理。扫描电镜观察细胞形态并照相记录。

1.2.3 ELISA 检测不同浓度细菌内毒素刺激 OPG 的表达

将 HGF 传代于 12 孔板内的光滑钛板上,取出培养 2 d 后的 12 孔板,吸除旧培养基, PBS 缓冲液冲洗,将含有不同浓度内毒素(0、1、5、10、100 μg/ml)的无酚红无胎牛血清 DMEM 培养基各 2 ml 加入每孔。将 12 孔板置于 37℃ 的全自动 CO₂ 恒温孵育箱内, 24 h 后取出。吸取上清液置于标记好的离心管内待用。严格按照 OPG ELISA 试剂盒使用说明书操作,稀释标准品,并做好标记。最后用酶标仪测得各样品孔的吸光度值,并计算出相应样品中的 OPG 浓度。

1.3 统计学方法

数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析。两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

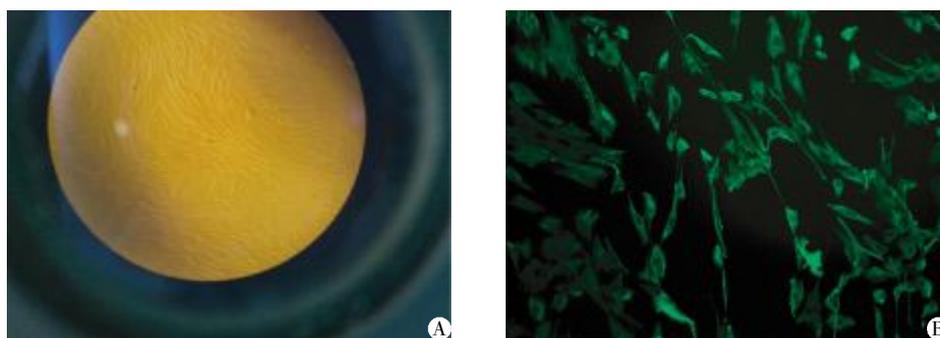
2 结果

2.1 HGF 的培养及鉴定

倒置相差显微镜下观察, HGF 呈梭形或星形,细胞密度较低时交织成网状,密度较高时细胞排列成束状或旋涡状(图 1A)。用免疫荧光染色的方法鉴定 HGF 的组织来源,抗波形丝蛋白抗体染色呈阳性,细胞为长梭形,有细长的伪足,细胞胞浆染成绿色,细胞核为圆形或椭圆形,位于细胞中央(图 1B),抗角蛋白抗体染色结果呈阴性。观察细胞形态并照相,从而鉴定培养的细胞为来源于中胚层的纤维母细胞,具有典型 HGF 的形态特点。

2.2 不同浓度细菌内毒素刺激钛板上 HGF 的生物学形态变化

扫描电镜下观察钛板上不同浓度细菌内毒素刺激 HGF 的生物学形态变化有所差异(图 2)。5 000 倍下扫描电镜观察,与 0 μg/ml 组相比,10 μg/ml 细菌内毒素可以刺激 HGF 增长,细胞基质分泌增多,细胞伪足增多且较粗壮。而无细菌内毒素刺激的 HGF 分泌基质较少,伪足较细(图 2A、B)。相同放大倍数下,与 10 μg/ml 组相比,100 μg/ml



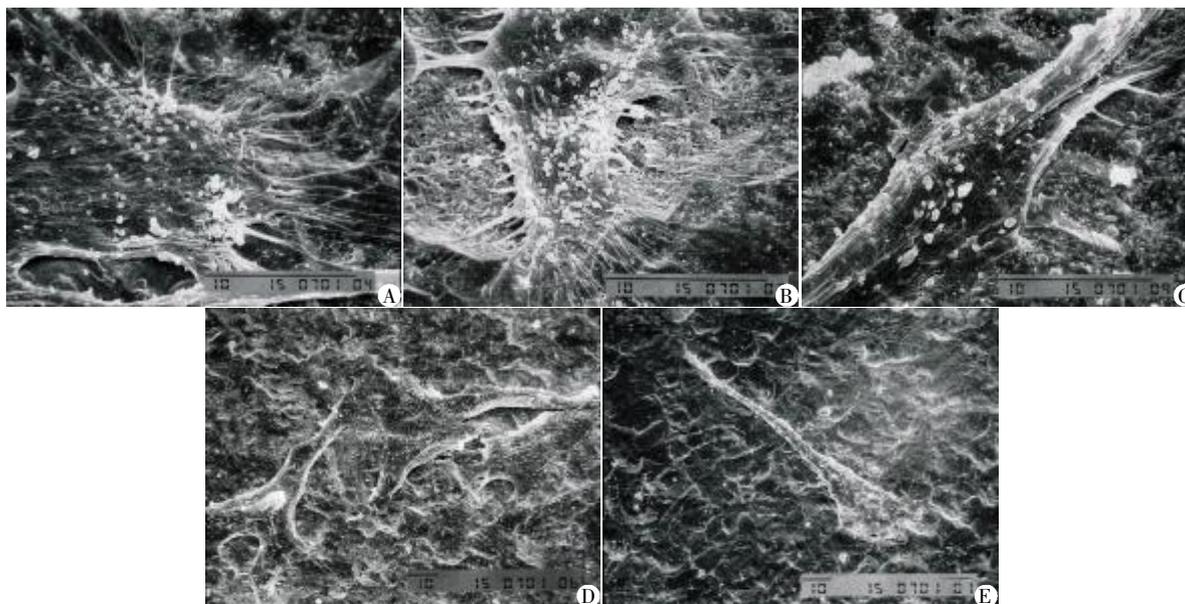
A: 光镜观察培养的 HGF($\times 40$); B: 免疫荧光染色观察($\times 400$)。

图1 牙龈成纤维细胞生物学形态

Figure 1 Bio-morphology of HGF cells

组的细胞数量明显减少,可能是由于高浓度的细菌内毒素抑制 HGF 生长,细胞基质分泌减少,伪足分支较少(图 2B、C)。在放大 1 000 倍下观察,10 $\mu\text{g}/$

ml 组的 HGF 数量较多,细胞呈叠加多层生长(图 2D),而 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组则细胞数量显著减少(图 2E)。



A: 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组 ($\times 5\ 000$); B: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组 ($\times 5\ 000$); C: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组 ($\times 5\ 000$); D: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组 ($\times 1\ 000$); E: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组 ($\times 1\ 000$)。

图2 不同浓度细菌内毒素所致细胞形态学变化

Figure 2 Cells morphological changes caused by different concentration of bacterial endotoxin

2.3 细菌内毒素对 HGF OPG 表达的影响

HGF 在低浓度细菌内毒素刺激下,OPG 含量随着内毒素浓度的增高而增加。高浓度细菌内毒素刺激时,由于抑制了 HGF 的生长,导致 OPG 含量下降。表 1 结果显示经不同浓度细菌内毒素刺激后,各组之间的 OPG 含量有所差异且具有统计学意义 ($F = 275.788, P < 0.001$),两两比较每两组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

HGF 是牙周组织中的主体细胞,在牙周组织的

表1 人牙龈成纤维细胞培养基上清液中 OPG 的浓度

Table 1 The condition of OPG in the culture supernatant of human gingival fibroblasts ($\mu\text{g}/\text{ml}, \bar{x} \pm s$)

组别	n	OPG 浓度
0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组	7	2 615.69 \pm 463.15 ^{#$\Delta\Delta$}
1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组	7	4 292.42 \pm 344.58 ^{*$\Delta\Delta$}
5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组	7	5 315.22 \pm 211.20 ^{**Δ}
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组	7	6 421.86 \pm 416.15 ^{**Δ}
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组	7	804.83 \pm 274.66 ^{**$\Delta\Delta$}

与 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组比较, * $P < 0.05$; 与 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组比较, ^{Δ} $P < 0.05$; 与 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组比较, ^{$\Delta\Delta$} $P < 0.05$ 。

保护及修复中占有重要地位^[6]。牙龈软组织袖口结

合区是种植体在口腔内能够获得成功的关键因素之一。有学者曾经研究过在 2~3 年内失败的种植体,炎症所致的袖口结构丧失与口腔种植体的失败密切相关^[7]。故本研究致力于研究细菌内毒素对种植体周围软组织结构的影响。

本研究采用组织块培养法,体外培养 HGF,原代培养的细胞以组织块为中心呈放射状增长,传代后的细胞呈旋涡状或放射状走行,排列十分紧密且有极性^[8],并将 HGF 成功传代到光滑钛板上。应用不同浓度的细菌内毒素刺激 HGF,观察其生物学形态变化及 OPG 的表达。低浓度细菌内毒素可以促进 HGF 的增殖分化,细胞伪足增加,分泌的细胞基质增多,细胞顺延伪足生长促使其能在光滑钛板上牢固附着。当细菌内毒素浓度增大到 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,细菌内毒素抑制了 HGF 的增殖,这可能与内毒素抑制了细胞 DNA 合成有关^[9],也可能与内毒素影响细胞内外 Ca^{2+} 的跨膜转运有关^[10-11],或者是内毒素直接激活细胞内其他信号分子抑制细胞分裂增殖^[12-13],从而影响了钛板上 HGF 的增长及附着。OPG 的功能是对骨吸收的抑制作用,主要是抑制 OC 的分化、活化和成熟,以及减少细胞数量^[13]。这使得真正具有溶骨作用的 OC 数量大大减少,OPG 通过上述途径起到了保护骨骼的作用。因此本研究结果显示,低浓度的细菌内毒素在刺激 HGF 的同时 OPG 含量有所增加,在一定程度上有利于种植体的骨组织愈合,而高浓度细菌内毒素则抑制了 OPG 合成,使 OPG 对 OC 的作用降低,对种植体的骨组织愈合产生不利影响。正常口腔内有上百种细菌,因此细菌内毒素在一定范围内并不会对口腔内的牙龈组织及骨组织产生破坏作用。但当细菌内毒素浓度超过一定范围后,随着浓度增高,将对口腔内的软组织及骨组织产生不利影响。已有研究证实杨梅酮可以抑制细菌内毒素刺激 HGF 产生的基质金属蛋白酶,并且可以抑制其对 OPG 的不利刺激作用^[14]。在临床上,随着种植技术的提高,牙周病患者并不是口腔种植的绝对禁忌证,但它的存在仍然会对口腔种植技术产生不利影响。本研究重在研究细菌内毒素对种植体周围软组织及骨组织产生影响的致病机制,并未对如何治疗种植体周围炎进行系统研究。但本研究提示临床医生先通过系统的牙周治疗,控制口腔内的菌斑细菌^[15],再选择口腔种植修复的方式来修复牙列缺损和牙列缺失。

[参考文献]

- [1] 孟焕新,吴亚菲,吴织芬,等. 牙周病学[M]. 3 版.北京:人民卫生出版社,2008:53-57
- [2] 郭 萌,李冠民,黄清泉. 细菌内毒素研究进展[J]. 中国实验动物学报,2009,17(5):397-400
- [3] 马世波,孙立婷,韩 璐,等. 骨保护素[J]. 中国兽药,2007,43(2):71-72
- [4] Akagawa Y,Hasimoto M,Kodo N,et al. Tissue reaction to implanted in materials[J]. J Prosthet Dent,1985,53(5):681-686
- [5] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 2 版. 西安:世界图书出版西安公司,2007:64-66
- [6] Bartold PM,Walsh LJ,Narayanan AS,et al. Molecular and cell biology of the gingival[J]. Periodontology,2000,24(1):28-55
- [7] Vogel RE,Wheeler SL,Casellini RC. Restoration of congenitally missing lateral incisors a case report[J]. Implant Dent,1999,8(4):390-395
- [8] 崔 娟,孙克勤,李 霞,等. 人牙龈成纤维细胞的原代培养及鉴定[J]. 中国医药导报,2010,7(3):26-27
- [9] Zheng GC,Jun BX,Cheng ZL. A potential role of EMM-PRIN by regulating ECM degradation in periodontitis[J]. Medical Hypotheses,2007,69(5):1102-1104
- [10] Waga I,Nakamura M,Honda Z. Two distinct signal transduction pathway for activation of guinea-pig macrophage and neutrophils by endotoxin [J]. Biochem Biophys Res Commun,1993,197(2):465-472
- [11] Entrona M. Treatment of murine peritoneal macrophages with bacterial lipopolysaccharide alter expression of c-Fos and c-Myc oncogenes[J]. J Immunology,1986,137(3):2711-2713
- [12] Nakane A,Yoshide T,Nakata K,et al. Effects of lipopolysaccharide on human dental pulp cells[J]. Endodon,1995,21(3):128-135
- [13] Harada Y. Effect of lipopolysaccharide on thymidine salvage as related to macrophage activation[J]. Immunology,1995,84(2):247-253
- [14] Ko SY. Myricetin suppresses LPS-induced MMP expression in human gingival fibroblasts and inhibits osteoclastogenesis by downregulating NFATC1 in RANKL-induced RA264.7 cells[J]. Arch Oral Biol,2012,57(12):1623-1632
- [15] Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases[J]. J Periodontol,2008,79(3):1592-1600

[收稿日期] 2013-07-10