

## 五倍子牙周缓释凝胶对 LPS 介导 HPDLFs 分泌 MMP - 3 的影响

祝 磊<sup>1</sup>, 唐荣银<sup>1</sup>, 张海欧<sup>1</sup>, 张安生<sup>1</sup>, 杨素芳<sup>2</sup>

(1. 第四军医大学口腔医学院, 陕西 西安 710032; 解放军总政治部门诊部口腔科, 北京 100011)

**[摘要]** 目的: 探讨五倍子牙周缓释凝胶对内毒素 (LPS) 介导人牙周膜成纤维细胞 (HPDLFs) 分泌基质金属蛋白酶 - 3 (MMP - 3) 的影响。方法: 体外培养 HPDLFs, 运用 ELISA 分别检测在 LPS 作用下以及在 LPS 加不同时间五倍子凝胶释放液作用下 HPDLFs 分泌 MMP - 3 的量。结果: 与空白对照组相比, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LPS 即能明显促进 HPDLFs 分泌 MMP - 3 ( $P < 0.05$ ), 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LPS 促进作用更显著; 加入五倍子凝胶释放液后, 各时间点凝胶释放液组 MMP - 3 的量均明显低于 LPS 组 ( $P < 0.05$ ), 而且, 各时间点凝胶释放液组之间亦有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 其中, 2 h 释放液组 MMP - 3 最低, 相对于 LPS 组, 对 MMP - 3 的抑制率为 75.77%, 随着释放时间的延长, 抑制作用逐渐减弱, 但第 7 天释放液仍有 32.26% 的抑制率。结论: 五倍子牙周缓释凝胶可有效抑制 LPS 介导 HPDLFs 分泌 MMP - 3, 抑制作用可持续 7 d。

**[关键词]** 五倍子牙周缓释凝胶; 人牙周膜成纤维细胞; 基质金属蛋白酶 - 3; 内毒素

**[中图分类号]** R781.4

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1005 - 2593(2009)05 - 0271 - 04

[牙体牙髓牙周病学杂志, 2009, 19(5): 271]

## Effects of periodontal sustained - released gel of Chinese nutgall on the expression of MMP - 3 in human periodontal ligament fibroblasts induced by lipopolysaccharide

ZHU Lei<sup>\*</sup>, TANG Rong - yin, ZHANG Hai - ou, *et al*

(\* School of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**[Abstract]** **AM:** To detect the influence of a periodontal sustained - released gel of Chinese nutgall on the secretion of MMP - 3 in human periodontal ligament fibroblasts (HPDLFs) induced by lipopolysaccharide (LPS). **METHODS:** HPDLFs were cultured *in vitro* and treated with LPS or with LPS + Chinese nutgall solutions released from the gel at different time points. The amounts of MMP - 3 secreted by HPDLFs were detected by ELISA. **RESULTS:** When the groups treated by LPS were compared with the blank group, significant increases ( $P < 0.05$ ) in MMP - 3 level were observed in the groups treated by LPS of the concentration from 50 to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . After treated with Chinese nutgall solutions released from the gel, the amount of MMP - 3 of all the groups were significantly lower than that of the LPS group ( $P < 0.05$ ). Significant differences were found among all the groups, the amount of MMP - 3 secretion of HPDLFs treated with the solution released from the gel in the first 2 hours was the lowest. Compared with the LPS group, the inhibition ratio of MMP - 3 of this solution was 75.77%. But with the extending of releasing time, the inhibitory action was weakening gradually, however, the inhibition ratio still remained as high as 32.26% on the 7th day. **CONCLUSION:** The periodontal sustained - released gel of Chinese nutgall can significantly inhibit the secretion of MMP - 3 in human periodontal ligament fibroblasts induced by LPS, and the inhibitory action can last 7 days.

**[Key words]** periodontal sustained - released gel of Chinese nutgall; human periodontal ligament fibroblasts; MMP - 3; LPS

[Chinese Journal of Conservative Dentistry, 2009, 19(5): 271]

收稿日期: 2009 - 03 - 11

作者简介: 祝磊 (1976 - ), 女, 汉族, 江西南昌人。硕士生 (导师: 唐荣银)

通信作者: 唐荣银, Tel: 029 - 84776461

牙周病是由牙周致病菌引起的慢性感染性疾病,其主要致病菌 G<sup>-</sup> 厌氧菌及其表面内毒素脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS),除直接对靶细胞的毒性作用外,还能刺激细胞分泌多种炎症因子,其中的基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs)是导致牙周组织破坏的最主要侵袭者。研究表明牙周炎病人龈沟液和牙龈组织中的 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-8及 MMP-13等的水平与牙周病密切相关。炎症程度越重,其活性酶及衍生的产物就越多<sup>[1-4]</sup>。尤其 MMP-3不仅可单独降解构成细胞外基质的大部分成分,同时可激活 MMP-1、MMP-8、MMP-9,共同参与细胞外基质的降解。因此,抑制 MMP-3的分泌对预防和治疗牙周病具有重要的意义。

研究证实多酚类化合物可抑制 MMPs的表达及其活性,被认为是治疗多种疾病的一种新的治疗分子<sup>[5-7]</sup>。五倍子具有收敛、止血、抗炎、止痛等功效<sup>[8]</sup>。其主要成分鞣质是多酚类复杂化合物,不仅可抑制牙周可疑致病细菌的生长<sup>[9]</sup>,还可拮抗 LPS诱导细胞产生炎症因子<sup>[10]</sup>。在前期研究中,我们将五倍子与高分子可降解材料聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA)相结合,研制了五倍子牙周缓释凝胶,本研究旨在观察其对 LPS介导人牙周膜成纤维细胞 (HPDLFs)分泌 MMP-3的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

低糖 DMEM 培养基 (Gibco, 美国),胎牛血清 (FCS, 杭州四季青生物工程材料研究所), E. coli LPS (O<sub>55</sub>B<sub>5</sub>, Sigma), 胰蛋白酶 (Gibco, 美国), 青霉素、链霉素 (华北制药股份有限公司), 人金属基质蛋白酶-3定量酶联检测试剂盒 (MMP-3, 上海森雄科技实业有限公司), 五倍子冻干粉 (自制), 聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA, 济南健宝开元生物材料有限公司), 1-甲基-2-吡咯烷酮 (IMP, 国药集团化学试剂有限公司), 三乙酸甘油酯 (GTA, 国药集团化学试剂有限公司), 酶联免疫检测仪 (Bio-TEK Power wave 340型, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 人牙周膜成纤维细胞 (HPDLFs)的体外培养

取正畸减数拔除的新鲜前磨牙,立即置 4℃ 保存的 DMEM 培养液中。在超净工作台内,无菌条件下刮取根中 1/3 的牙周膜组织,剪成 1 mm × 1 mm × 0.5 mm 左右大小,平铺于培养瓶底,加入

含 150 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液, 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养,每 3 d 换液 1 次。细胞铺满瓶底后,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化,按 1:3 传代培养。取第 6 代细胞用于实验。

#### 1.2.2 五倍子缓释凝胶的制备

将 1-甲基-2-吡咯烷酮 (IMP)和三乙酸甘油酯 (GTA)按 7:3 配成混合溶剂,加入 35% 浓度的聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA),静置,待完全溶解后加入五倍子冻干粉,彻底搅拌均匀,漩涡震荡,制成五倍子浓度为 40 g/kg 的凝胶,避光 4℃ 保存,24 h 后备用。

#### 1.2.3 LPS 对 HPDLFs 分泌 MMP-3 的影响

取生长良好的第 6 代 HPDLFs,胰蛋白酶消化后以  $2.5 \times 10^4$  /mL 浓度接种于 24 孔板。培养 24 h 后,弃原液及未贴壁细胞, PBS 洗涤 3 次后加含 100 mL/L FCS 的培养液,实验组 (4 组)加 LPS,其终末浓度分别为 1、25、50、100 μg/mL,空白对照组加同体积的含 100 mL/L FCS 的培养液。每孔总量 1 mL,每组复 4 孔。于 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养 48 h 后,收集上清,严格按照人基质金属蛋白酶-3 定量酶联检测试剂盒说明书操作,在酶联免疫检测仪上测细胞培养上清 A<sub>490</sub> 值。

#### 1.2.4 五倍子缓释凝胶对 LPS 介导 HPDLFs 分泌 MMP-3 的影响

取 0.2 g 凝胶注入含有 10 mL 培养液的棕色瓶中,加盖,置 37℃ 恒温水浴振荡箱中,分别于注入后 2 h、1、3、5、7 d 收集全部释放溶液,同时补加等量培养液用于实验。取生长良好的第 6 代 HPDLFs,胰蛋白酶消化后以  $2.5 \times 10^4$  /mL 浓度接种于 24 孔板。培养 24 h 后,弃原液及未贴壁细胞, PBS 洗涤 3 次后加含 100 mL/L FCS 的培养液,5 个实验组分别加不同时间点凝胶释放液 (2 h、1、3、5、7 d),同时加 LPS 使终末浓度为 100 μg/mL。空白对照组加培养液,阳性对照组只加含 100 μg/mL LPS 的培养液,每孔总量 1 mL,每组复 4 孔。于 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养 48 h,收集培养上清。严格按照人基质金属蛋白酶-3 定量酶联检测试剂盒说明书操作,在酶联免疫检测仪上测细胞培养上清 A<sub>490</sub> 值。

### 1.3 统计分析

所有数据用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,多组均数间比较采用单因素方差分析,进行 LSD-t 检验,结果用均数 ± 标准差表示,检验标准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 LPS对 HPDLFs分泌 MMP - 3的影响

空白对照组结果显示在正常情况下 HPDLFs的 MMP - 3呈弱阳性表达。当培养液中存在 50  $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS时, HPDLFs分泌 MMP - 3的水平明显增加,与对照组和 1  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$  LPS组相比均有显著性差异 ( $P < 0.05$ );当 LPS达到 100  $\mu\text{g/mL}$ 时,促 MMP - 3分泌作用更加明显,与 50  $\mu\text{g/mL}$  LPS相比亦有显著差异 ( $P < 0.05$ )。表明 LPS能促进 HPDLFs分泌 MMP - 3,并且在 1 ~ 100  $\mu\text{g/mL}$  LPS范围内呈浓度依赖性(表 1)。

表 1 不同浓度 LPS对 HPDLFs的 MMP - 3表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	MMP - 3浓度 (ng/mL)
空白对照组	27.454 $\pm$ 0.586 <sup>A</sup>
1 $\mu\text{g/mL}$ LPS	27.568 $\pm$ 0.776 <sup>A</sup>
25 $\mu\text{g/mL}$ LPS	27.909 $\pm$ 0.587 <sup>A</sup>
50 $\mu\text{g/mL}$ LPS	32.795 $\pm$ 0.682 <sup>B</sup>
100 $\mu\text{g/mL}$ LPS	46.205 $\pm$ 0.776 <sup>C</sup>

注:相同字母组间无显著差异 ( $P > 0.05$ ),不同字母组间相差显著 ( $P < 0.05$ )

### 2.2 五倍子缓释凝胶对 LPS介导 HPDLFs分泌 MMP - 3的影响 (表 2)

表 2 不同时间点释放液对 LPS介导 HPDLFs分泌 MMP - 3的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	MMP - 3浓度 (ng/mL)	抑制率 (%)
空白对照组 (无 LPS)	27.454 $\pm$ 0.586 <sup>A</sup>	-
阳性对照组 (LPS)	46.230 $\pm$ 0.743 <sup>B</sup>	0
LPS + 2h释放液	11.205 $\pm$ 0.572 <sup>C</sup>	75.77
LPS + 1d释放液	14.386 $\pm$ 0.937 <sup>D</sup>	68.89
LPS + 3d释放液	18.136 $\pm$ 0.742 <sup>E</sup>	60.78
LPS + 5d释放液	24.159 $\pm$ 0.777 <sup>F</sup>	47.75
LPS + 7d释放液	31.318 $\pm$ 0.982 <sup>G</sup>	32.26

注:不同字母组间均相差显著 ( $P < 0.05$ )

各时间点凝胶释放液组 MMP - 3的量均明显低于 LPS组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。而且,各时间点凝胶释放液组之间亦有显著差异 ( $P < 0.05$ )。其中 2h释放液组的 MMP - 3最低,相对于 LPS组,对 MMP - 3的抑制率为 75.77%,随着释放时间的延长,抑制作用逐渐减弱,但第 7天释放液组对 MMP - 3的抑制率仍可达 32.26%,另外,各时间点释放液组 (除第 7天) MMP - 3分泌量还明显低于空白对照组。提示五倍子牙周缓释凝胶不仅可有效抑制 LPS介导 HPDLFs分泌 MMP - 3,可能还具有抑制 MMP - 3活性的作用 (表 2)。

## 3 讨论

内毒素 (LPS)是 G<sup>-</sup>菌所独有的一种毒力因子,可造成牙周组织的破坏,其致病作用的强弱在一定意义上体现于其刺激机体产生炎症因子的能力<sup>[11]</sup>。另外,LPS还可刺激牙周组织中的成纤维细胞及单核细胞合成分泌大量的 MMP - 3<sup>[12]</sup>。

MMPs是一族锌离子依赖性内肽酶,主要由牙周炎组织中的中性粒细胞,成纤维细胞,上皮细胞及被激活的巨噬细胞合成分泌,是降解细胞外基质的重要酶类,直接参与牙周组织的破坏降解,在牙周炎的发生发展中起重要作用。牙周炎组织中 MMPs(MMP - 1、MMP - 3、MMP - 8、MMP - 9)的高表达及强活性是导致牙周组织破坏的原因。大量研究证实,在牙周炎病人的牙龈组织及龈沟液中 MMPs的水平明显偏高,且活性增强<sup>[1-2]</sup>。MMP - 3属 MMPs家族中基质溶解素类的一种,又称基质溶解素 - 1 (stromelysin - 1),主要利用各种细胞外基质蛋白作为底物,同时可激活 MMP - 1、MMP - 8及 MMP - 9,阻断纤溶酶原激活物抑制剂的活性,参与牙周组织的破坏<sup>[13-15]</sup>。MMP - 3的高水平表达是导致牙周附着丧失的先兆性因素,与破骨细胞性骨吸收密切相关,在通过牙周治疗后其表达迅速下降<sup>[16-18]</sup>,充分表明 MMP - 3与牙周组织的炎症反应和牙槽骨吸收关系密切。因此抑制 MMP - 3的表达有助降低牙周组织破坏的程度,对阻断牙周病变的发生、发展具有十分重要的意义。本研究结果显示 HPDLFs在正常情况下 MMP - 3呈弱阳性表达,与 Bodet所得结果一致<sup>[12]</sup>。当培养液中加入 50  $\mu\text{g/mL}$  LPS时,能明显促进 HPDLFs分泌 MMP - 3,加入 100  $\mu\text{g/mL}$  LPS后,促进作用更明显。表明 LPS对 HPDLFs合成分泌 MMP - 3表现出很强的介导能力,并在一定范围内呈浓度依赖性。

牙周疾病造成的牙周支持组织破坏始终是临床治疗中必须面临的难题。对牙周炎的治疗通常需在机械刮治的基础上辅以药物治疗以提高和巩固疗效。而牙周局部缓释剂由于其各方面的优越性已成为主要用药方式。但目前临床使用的牙周缓释剂还存在诸多不足,如药物浓度持续时间短、释药不完全、材料的非降解性等,对牙周组织无保护作用,无法获得牙周新附着。

近年来的研究发现:五倍子对常见牙周可疑致

细菌有明显的抑制作用<sup>[9]</sup>,能阻断胶原酶对结缔组织的破坏<sup>[19]</sup>,抑制 LPS对多种细胞的介导作用<sup>[10]</sup>。其主要成分鞣质可与生物体内的蛋白质,多糖,核酸等作用,并抑制多种酶的活性。因此我们试将五倍子与可降解生物材料相结合,制成了理化性质基本符合临床要求的缓释凝胶制剂,并在凝胶的体外释放度实验中,发现其有效药物释放可持续 7d,而最后 1 d 的药物释放量亦超过五倍子抑制内毒素的最小浓度 6.25 mg/L<sup>[10]</sup>。从表 2 的结果可以看出,各时间点释放液组均可显著抑制 LPS 诱导 HPDLFs 分泌 MMP-3,其中 2 h 释放液组抑制作用最强,虽然随释放时间延长抑制作用逐渐减弱,但第 7 天释放液对 MMP-3 的抑制率仍可达到 32.26%,另外,还发现各时间点释放液组(除第 7 天外)MMP-3 分泌量均明显低于空白对照组,提示该凝胶除能抑制 LPS 介导 HPDLFs 分泌 MMP-3 外,可能还有直接抑制 MMP-3 活性的作用,有望作为 MMP-3 抑制剂应用于牙周治疗。分析其机制,可能是五倍子的主要成分鞣质能与蛋白质、酶结合,使之凝固,沉淀而失去活性,另外,可与金属离子发生螯合作用,MMPs 是一族锌离子依赖性内肽酶,五倍子与锌离子螯合,而使 MMPs 失去活性。但其具体机制尚需进一步研究。

五倍子牙周缓释凝胶质地均匀,细腻,稳定性好,可生物降解,且可通过注射给药,使用方便。至于其它相关指标还在进一步研究中。

## 参考文献:

- [1] Soell M, Elkaim R, Tenenbaum H, et al. Matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingival and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients [J]. *J Dent Res*, 2002, 81(3): 174-178.
- [2] Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid [J]. *Periodontol*, 2000, 2003, 31(1): 77-104.
- [3] Aiba T, Akeno N, Kawane T, et al. Matrix metalloproteinases - 1 and - 8 and TIMP - 1 mRNA levels in normal and diseased human gingivae [J]. *Eur J Oral Sci*, 1996, 104(5/6): 562-569.
- [4] Tervahartiala T, Pirila E, Ceponis A, et al. The *in vivo* expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP - 2, - 8, - 13, and - 14) and matrilysin (MMP - 7) in adult and localized juvenile periodontitis [J]. *J Dent Res*, 2000, 79(12): 1969-1977.
- [5] Bachmeier BE, Iancu M, Jochum M, et al. Matrix metalloproteinases in cancer: comparison of known and novel aspects of their inhibition as a therapeutic approach [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2005, 5(1): 149-163.
- [6] Ahmed S, Wang N, Lakonde M, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin - 3 - gallate (EGCG) differentially inhibits interleukin - 1 - induced expression of matrix metalloproteinase - 1 and - 13 in human chondrocytes [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 308(2): 767-773.
- [7] Bellosa S, Dell'Agli M, Canavesi M, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase - 9 activity and gene expression by polyphenolic compounds isolated from the bark of *Tristanopsis caboxuxus* (Myrtaceae) [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60(7): 1440-1448.
- [8] 卓大宏,董岳琳,潘静江,等. 中药临床应用 [M]. 广州:广东人民出版社,1975.
- [9] 朱秀丽,陈强,唐荣银,等. 五倍子对常见牙周细菌抑制作用的体外研究 [J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2001, 12(5): 255-257.
- [10] 王志良,唐荣银,王静,等. 五倍子提取物对牙龈卟啉菌内毒素介导白介素 - 1 活性的影响 [J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2003, 13(4): 193-195.
- [11] 荫俊,王忠泽,侯晓军,等. 牙髓紫卟啉菌内毒素对炎症性细胞因子的介导作用 [J]. *微生物学报*, 1999, 26(1): 37-39.
- [12] Bodet C, Chandad F, Grenier D. Inhibition of host extracellular matrix destructive enzyme production and activity by a high-molecular-weight cranberry fraction [J]. *J Periodont Res*, 2007, 42(2): 159-168.
- [13] Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, et al. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase - 3 (stromelysin) [J]. *Biochemistry*, 1990, 29(4): 10261-10270.
- [14] Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase - 9 [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(6): 3581-3584.
- [15] Roger Lijnen H, Arza B, Van Hoef B, et al. Inactivation of plasminogen activator inhibitor - 1 by specific proteolysis with stromelysin - 1 (MMP - 3) [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(48): 37645-37650.
- [16] Alpagot T, Bell C, Lundergan W, et al. Longitudinal evaluation of GCF MMP - 3 and TIMP - 1 levels as prognostic factors for progression of periodontitis [J]. *J Clin Periodontol*, 2001, 28(4): 353-359.
- [17] 赵筱琴,孟姝,吴亚菲,等. 基质金属蛋白酶 - 2 和基质金属蛋白酶 - 3 在大鼠牙周炎模型中的表达 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2006, 24(3): 202-204.
- [18] Tuter G, Kurtis B, Serdar M, et al. Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase - 3 and tissue inhibitor of metalloproteinase - 3 and tissue inhibitor of metalloproteinase - 1 [J]. *J Periodontol*, 2005, 32(9): 1011-1015.
- [19] 王静,唐荣银,王志良,等. 五倍子水提取物对胶原酶活性的影响 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2006, 22(8): 451-453.