

辛伐他汀对伴 T2DM 牙周病患者牙周膜成纤维细胞增殖分化的影响

福建医科大学附属协和医院口腔科（福州 350001） 王清妹 关为群 蒋剑晖¹

【摘要】 目的 探讨辛伐他汀对伴 2 型糖尿病（T2DM）牙周病患者牙周膜成纤维细胞（PDLF）增殖分化的影响。**方法** 采用体外酶消化联合组织块法分离培养伴 T2DM 牙周病患者 PDLF。在培养液中加入不同浓度的辛伐他汀，分为对照组（0 mol/L）和 4 个实验组（药物浓度分别为 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L、 10^{-5} mol/L），检测各组 PDLF 增殖能力和 ALP 活性。**结果** 10^{-7} mol/L 的辛伐他汀能促进 PDLF 增殖和 ALP 活性，与对照组比较，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。**结论** 10^{-7} mol/L 辛伐他汀能够促进伴 T2DM 牙周病患者 PDLF 的增殖分化，激发 PDLF 被高糖抑制的生物学活性，促进牙周组织的愈合修复。

【关键词】 辛伐他汀；牙周膜成纤维细胞；2 型糖尿病；碱性磷酸酶

【中图分类号】 R781.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2020)05-0123-03

Effect of simvastatin on proliferation and differentiation of periodontal ligament fibroblasts in patients with periodontal disease complicated with T2DM

WANG Qingmei, GUAN Weiqun, JIANG Jianhui. Department of Stomatology, the Affiliated Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350001, China

【Abstract】 Objective To study the effect of simvastatin on the proliferation and differentiation of periodontal ligament fibroblasts (PDLF) in patients with periodontal disease complicated with T2DM. **Methods** In vitro enzymatic digestion and tissue mass were used to isolate and culture PDLF from the patients with periodontal disease complicated with T2DM. Different concentrations of simvastatin were added to the culture medium and divided into the control group (0 mol/L) and four experimental groups (10^{-8} mol/L, 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L and 10^{-5} mol/L) to detect the proliferation ability and alkaline phosphatase (ALP) activity of each group. **Results** 10^{-7} mol/L concentration of simvastatin could promote the proliferation and ALP activity of PDLF in patients with periodontal disease complicated with T2DM, and the difference was statistically significant compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** 10^{-7} mol/L simvastatin can promote the proliferation and differentiation of PDLF in patients with periodontal disease complicated with T2DM, stimulate the biological activity of PDLF inhibited by high glucose, and promote the healing and repair of periodontal tissues.

【Key words】 simvastatin; periodontal ligament fibroblasts; type 2 diabetes; alkaline phosphatase

糖尿病对牙周疾病的影响机制目前虽然还不清楚，但高糖可抑制牙周膜成纤维细胞（periodontal ligament fibroblast, PDLF）生物学活性^[1]，使得伴发糖尿病的牙周炎患者的牙周病常表现为病程复杂、治疗难度高且以伴发 2 型糖尿病（T2DM）的牙周病患者居多^[2]。研究表明，辛伐他汀能促进健康牙周组织成纤维细胞增殖，成骨分化和相关基因

的表达^[3]，是否对炎性组织的牙周膜细胞也起作用，这方面的研究还不多见。本实验通过体外分离培养伴 T2DM 牙周病患者的 PDLF，观察不同浓度辛伐他汀对伴 T2DM 牙周炎患者 PDLF 增殖分化的影响，探讨辛伐他汀在炎症牙周组织中的可能作用机制，旨在为辛伐他汀局部应用及临床难治性牙周病治疗提供实验室依据。

¹ 通信作者：福建医科大学附属口腔医院种植一科

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器：辛伐他汀 (Sigma, USA), DMEM (GIBCO, USA), PBS 缓冲液, DMSO (Sigma, USA), 胎牛血清 FBS (Gibco, 美国), 胰蛋白酶 (Gibco, 美国), BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒 (碧云天, 中国), CCK-8 试剂盒 (同仁, 日本)。二氧化碳恒温培养箱 (Heal force, USA), 低速离心机 (湘仪, 中国), 电热恒温水槽 (森信, 中国), -80°C 冰箱 (Revco, 美国), 高速离心机 (Sigma, 德国), 倒置相差显微镜 (Nikon, 日本), 酶联检测仪 (Biotek, 美国)。

1.2 方法：

1.2.1 hPDLF 培养：征得患者同意, 收集就诊于我院口腔门诊, 因慢性牙周炎无法保留需拔除的患牙。纳入标准: 1) 患者年龄 45~55 岁, 男女不限, 伴 T2DM 牙周病患者且无其他系统性疾病; 2) 3 个月内未接受过任何牙周病治疗, 未曾服用辛伐他汀等其他药物。患牙拔除后立即用含双抗的 PBS 液反复冲洗, 去除血污, 刮取患牙根尖 1/3 组织进行酶消化, 联合组织块法培养原代细胞, 鉴定组织来源, 取对数生长良好的第 4 代细胞作实验观察。

1.2.2 实验方法：

1.2.2.1 辛伐他汀对炎性 PDLF 增殖的影响：细胞以 1×10^4 密度接种于 96 孔板, 每孔加 $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液, 以 DMEM 矿化诱导培养基, 在 37°C CO_2 孵育箱中孵育 24 h 后, PBS 洗涤 3 次。实验分组: 对照组和 4 种不同浓度辛伐他汀 (10^{-8} mol/L 、 10^{-7} mol/L 、 10^{-6} mol/L 、 10^{-5} mol/L) 实验组, 每组设 5 个复孔, 每孔加液量为 $100 \mu\text{L}$ 。在细胞培养的第 1、2、3 d, 每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8, 孵育 3 h 后在酶联检测仪 450 nm 波长处检测 A 值。A 值越大表明细胞增殖能力越强 (采用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖情况, 通过测定反应生成的甲臞物数量间接获得活细胞数量, 活细胞的数量与甲臞物数量成正比)。

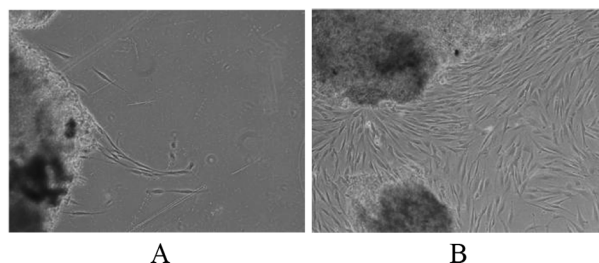
1.2.2.2 辛伐他汀对炎性 PDLF ALP 活性的影响：细胞以 5×10^4 密度接种于 12 孔板, 实验分组同前, 每组设 3 个复孔, 并置于 37°C , 5% CO_2 培养箱培养 7 d 后定量检测细胞 ALP 活性, 按比例配制 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色剂, 在酶联检测仪 450 nm 波长处检测 A 值。细胞 ALP 活性与 A 值大小呈正比。

1.3 统计学分析：采用 SPSS 20.0 软件进行统计

分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异的显著性检验采用单因素方差分析, 两组间比较采用成组 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 hPDLF 体外培养：在倒置相差显微镜下, hPDLF 早期以组织块为中心散在游出, 随着时间的推移细胞呈旋涡放射状生长 (详见图 1)。细胞为长梭形, 单核, 多位于细胞中央, 有数个长短不一的细突起。



注: A: 原代培养第 3 天, hPDLF 从组织块周围散在游出; B: 原代培养第 10 天, hPDLF 呈旋涡状生长。

图 1 人 PDLF 体外培养情况 ($\times 200$)

2.2 辛伐他汀对 PDLF 增殖的影响：与空白组对比, 可见 10^{-8} mol/L , 10^{-5} mol/L 浓度的辛伐他汀组在第 1 天抑制 PDLF 增殖 ($P < 0.05$); 10^{-7} mol/L , 10^{-6} mol/L 的辛伐他汀在第 2 天和第 3 天促进 PDLF 增殖, 其中 10^{-7} mol/L 浓度的辛伐他汀组与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见图 2。

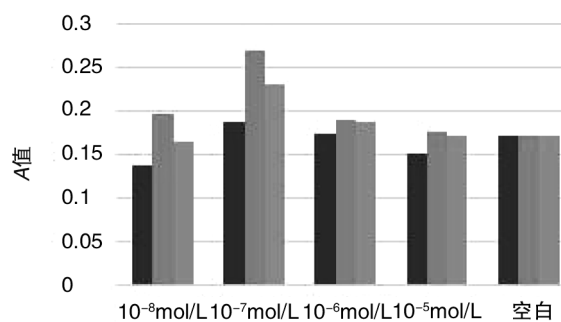


图 2 辛伐他汀对 PDLF 增殖的影响

2.3 辛伐他汀对成纤维细胞 ALP 活性的影响：与空白组对比, 10^{-7} mol/L , 10^{-6} mol/L 浓度辛伐他汀均促进 PDLF ALP 活性, 其中 10^{-7} mol/L 浓度辛伐他汀促进 PDLF ALP 活性能力更强 ($P < 0.05$); 10^{-5} mol/L 浓度的辛伐他汀抑制成纤维细胞 ALP 活性 ($P < 0.05$)。详见图 3。

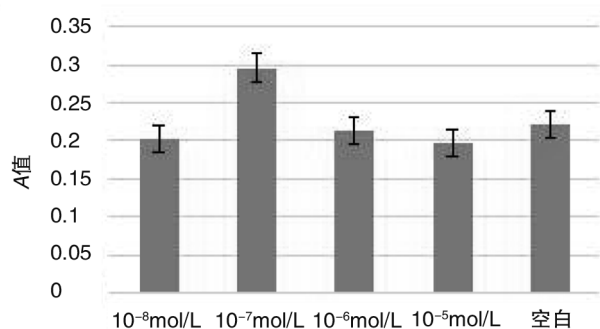


图3 辛伐他汀对成纤维细胞 ALP 活性的影响

3 讨论

牙周膜中含少量具有多向分化潜能的牙周膜干细胞 (PDLSC), 它可促进骨样和成牙本质样结构形成, 在牙周组织愈合修复中发挥重要作用^[4]。研究表明, 他汀类药物具有抗炎抗氧化、诱导血管神经细胞形成、促进成骨细胞分化和形成新骨等功效^[5], 以及通过促进血管内皮生长因子 (VEGF) 和骨形成蛋白 (BMPs) 表达促成新骨形成^[6]。牙周炎是导致成年人牙缺失的重要原因, 研究表明, 牙周炎与高血压、糖尿病、冠心病等系统性疾病的发生发展密切相关^[7], 其中以 T2DM 的影响更为严重^[8]。T2DM 作为一种以高血糖为主要特征的系统性疾病, 对机体其他的组织和器官增殖分化具有很大的抑制作用。高糖对 hPDLF 影响也主要表现为抑制, 通过抑制细胞活性与成骨分化的同时诱导 hPDLF 凋亡, 加剧牙周破坏和延长牙周组织损伤修复周期^[9]。辛伐他汀是临床上一类常用的调脂药物, 其抗炎和促成骨性能在牙周疾病治疗中也有一定功效。研究证实, 他汀类药物的使用可以在一定程度上降低牙周病患者的失牙率^[10], 特定浓度的辛伐他汀可以促进体外培养的牙周膜细胞增殖分化^[3]。

辛伐他汀对于炎症牙周组织是否具有类似调节功效是本研究的主要目的。通过不同浓度辛伐他汀对 2 型糖尿病患者 PDLF 体外增殖及 ALP 活性影响的观察, 我们发现, 10^{-7} mol/L 浓度的辛伐他汀能够促进和提高伴 T2DM 牙周病患者 PDLF 的增殖和碱性磷酸酶的活性, 而较高浓度 (10^{-5} mol/L)

浓度的辛伐他汀对细胞增殖与 ALP 活性有抑制作用。提示, 低浓度辛伐他汀在减少药物对细胞造成可能毒性作用的同时可激发牙周膜细胞被高糖抑制的生物学活性, 通过促进细胞增殖和提高 ALP 生物活性促成骨分化和减轻牙周组织的破坏。该结果与文献报道的, 辛伐他汀通过促进牙周膜细胞增殖和提高 ALP 活性促成骨分化以抵御高糖对牙周膜细胞增殖的抑制^[9], 进而促进牙周组织愈合修复的说法是一致的。这为辛伐他汀局部应用及临床难治性牙周病辅助治疗提供了实验室资料。

参考文献

- [1] 刘加, 强一, 刘洪臣, 等. 高糖对人牙周膜细胞的生物学作用 [J]. 口腔医学, 2011, 20 (3): 225-229.
- [2] Sandberg G E, Sundberg H E, Fjellstrom C A, et al. Type 2 diabetes and oral health: a comparison between diabetic and non-diabetic subjects [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2000, 50 (1): 27-34.
- [3] 赵丙姣, 刘月华. 辛伐他汀对牙周膜细胞增殖分化和成骨分化的影响 [J]. 临床口腔医学杂志, 2012, 28 (10): 595-598.
- [4] Liu Y, Zheng Y, Ding G, et al. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine [J]. Stem Cells, 2008, 26 (4): 1065-1073.
- [5] Jung-Chang L, Mi-kyung Y, Rin L, et al. Terrein reduces pulpal inflammation in human dental pulp cells [J]. J Endod, 2008, 34 (4): 433-437.
- [6] Jae-Cheol K, Young-Hee L, Mi-kyung Y. Anti-inflammatory mechanism of PPAR γ on LPS-induced pulp cells: Role of the ROS removal activity [J]. Archives of Oral Biology, 2012, 57 (4): 392-400.
- [7] Arowojolu M O, Oladapo O, Opeodu O I, et al. An evaluation of the possible relationship between chronic periodontitis and hypertension [J]. J West Afr Coll Surg, 2016, 6 (2): 20-38.
- [8] Sharma P, Dietrich T, Ferro C J, et al. Association between periodontitis and mortality in stages 3-5 chronic kidney disease: NHANES III and linked mortality study [J]. J Clin Periodontol, 2016, 43 (2): 104-113.
- [9] Meisel P, Kroemer H K, Nauck M, et al. Tooth loss, periodontitis, and statins in a population-based follow-up study [J]. J Periodontol, 2014, 85 (6): 160-168.
- [10] 夏佳佳, 王岚, 章燕珍. 高浓度葡萄糖对人牙周膜成纤维细胞成骨分化能力的影响 [J]. 国际口腔医学杂志, 2015, 42 (4): 415-419.