

· 论 著 ·

盐酸小檗碱抑制人颊黏膜成纤维细胞炎症反应的初步实验研究*

王 春¹, 向学熔^{1△}, 杨 鑫¹, 于 超²

(重庆医科大学附属: 1. 口腔医院牙周黏膜科 400015; 2. 生命科学院 400016)

摘要:目的 观察盐酸小檗碱对脂多糖刺激人颊黏膜成纤维细胞炎症反应的抑制作用。方法 原代培养人颊黏膜成纤维细胞作为对照组; 脂多糖刺激组作为炎症组, 同时加入小檗碱和脂多糖组作为实验组。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测细胞培养上清液中前列腺素 E₂ 的含量作为细胞炎症反应指标。结果 炎症组较对照组上清液中前列腺素 E₂ 浓度明显升高 [(8.682±1.984) μg/L vs (22.509±1.245) μg/L, P<0.05], 药物组较炎症组上清液中前列腺素 E₂ 浓度明显降低 [(11.381±1.652) μg/L vs (22.509±1.245) μg/L, P<0.05]。结论 盐酸小檗碱可以明显抑制由脂多糖刺激人颊黏膜成纤维细胞分泌的前列腺素 E₂。盐酸小檗碱在抗人颊黏膜成纤维细胞的炎症反应中具有重要的作用。

关键词: 盐酸小檗碱; 颊黏膜; 成纤维细胞; 炎症反应

中图分类号: R365.781

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)10-1222-02

Initial empirical study of human buccal mucosa fibroblasts inflammatory reaction after berberine excitation

WANG Chun¹, XIANG Xue-rong^{1△}, YANG Xing¹, et al.

(1. Department of Periodontics and Oral Medicine, Affiliated Stomatological Hospital;

2. Academy for Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the depressant effect of inflammatory reaction in human buccal mucosa fibroblasts (HBMFs) by berberine hydrochloride (Ber). **Methods** To primarily culture HBMFs. HBMFs cultured in normal way was as the control group; HBMFs excited by lipopolysaccharide (LPS) as the inflammatory group; HBMFs excited by lipopolysaccharide (LPS) and Ber as the experimental group. To detect the density of prostaglandin E₂ (PGE₂) in clear supernatant liquid of HBMFs with the method of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The density of PGE₂ in the clear supernatant liquid of HBMFs in the inflammatory group advanced obviously than that in the control group, with statistical significance [(8.682±1.984) μg/L vs (22.509±1.245) μg/L, P<0.05]. The density of PGE₂ in the clear supernatant liquid of HBMFs in the experimental group advanced obviously than that in the inflammatory group, with statistical significance [(8.682±1.984) μg/L vs (22.509±1.245) μg/L, P<0.05]. **Conclusion** Ber can obviously depress the density of PGE₂ in HBMFs excited by LPS. Ber has the important effect in the anti-inflammatory reaction in HBMFs.

Key words: berberine; buccal mucosa; fibroblast; inflammatory reaction

口腔扁平苔藓作为一种口腔黏膜的疾病,好发于口腔颊部黏膜。目前临床上治疗该病的中药主要有雷公藤总苷和昆明山海棠,而这两类药物的胃肠道反应明显,并对心肌、肾、肝有损害,还可以引起白细胞、血小板下降,男性精子数目下降、活力降低,女性闭经、月经紊乱等不良反应。盐酸小檗碱(berberine hydrochloride, Ber)最初作为清热解毒药和抗菌药应用于临床,能抑制各类急、慢性炎症,对心血管系统、血糖、肿瘤及肝脏等多方面具有药理作用,且毒副作用较小^[1]。为了探讨该药对于口腔扁平苔藓的炎症反应是否具有抑制作用,本课题组以原代培养的人颊黏膜成纤维细胞(human buccal mucosa fibroblasts, HBMFs)和 Ber 作为研究对象,利用脂多糖(LPS)刺激 HBMFs 产生炎症反应,作为炎症组。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法测定 HBMFs 细胞培养上清液中的炎症因子 PGE₂,根据其表达的升高或降低作为炎症反应扩大或抑制的指标,以期 Ber 作为临床治疗口腔扁平苔藓提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 HBMFs 采用重庆医科大学附属口腔医院门诊口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)取 3 个月内未使

用任何抗生素扁平苔藓患者送活检的颊黏膜组织中的正常组织(征得患者同意)。

1.1.2 主要试剂 Ber 98% (成都思科华生物技术有限公司); RPMI-1640 培养液、胰蛋白酶(Gibco, USA); 胎牛血清优等品(Fetal bovine serum FBS, 美国 Gibco 公司); MTT(上海卓康生物科技有限公司); 脂多糖 LPS (Sigma, USA); 特异性人 PGE₂ ELISA 检测试剂盒(UCL, USA); 二氧化碳细胞恒温培养箱(Forma Scientific, USA); CKC-TR-2W 型倒置显微镜(Olympus, Japan); 酶联免疫检测仪(Labsystems dragon MK3, Finland); YJ-875 型超净化工作台(苏州净化设备厂); 96 孔培养板(北京中杉金桥生物技术有限公司); 波形丝蛋白、角蛋白一抗及即用型一抗+生物素化二抗+abc 复合物(SABC)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 HBMFs 的原代培养、分离纯化及鉴定 用组织块法行 HBMFs 的原代培养,混合酶消化以及差速贴壁法^[2]进行 HBMFs 的分离和纯化,取第 7 代对数生长期 HBMFs,用一抗+生物素化二抗+abc 复合物(SABC)法进行波形丝蛋白、角蛋白免疫组织化学染色,鉴定细胞来源。

* 基金项目:重庆市卫生局科研基金资助项目(2008-2-62)。 △ 通讯作者, E-mail: cqzxfp@sina.com。

1.2.2 MTT 法检测 Ber 对 HBMFs 生长的影响 将 Ber 加入(含 20% 胎牛血清)RPMI-1640 培养基,根据已有的文献报道^[3]调节 Ber 浓度为 20、10、5、2.5、1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以不含 Ber 的 RPMI-1640 培养基原液作为对照。将细胞以 $2.5 \times 10^4/\text{mL}$ 每个孔接种接种于 96 孔培养板,每孔体积 100 μL 。将培养板放入 CO_2 孵箱,在 37°C 、5% CO_2 及饱和湿度条件下,培养 24、48、72 h 后,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μL , 37°C 继续孵育 4~6 h,终止培养,吸弃孔内培养上清液,每孔加二甲亚砜(DMSO)200 μL ,用平板摇床摇匀后,选择 450 nm 波长,使用酶标仪测定光密度值(OD)。每组设 3 个复孔,重复试验 3 次。

1.2.3 Ber 对 LPS 刺激 HBMFs 产生炎症反应的抑制作用的研究 将细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液接种于 96 孔培养板,每孔体积 1.5 mL。在 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养 24 h。以含 20% 胎牛血清 RPMI-1640 培养基培养细胞作为对照组。炎症细胞组培养条件为含 20% 胎牛血清、LPS 浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,药物干预组培养条件为含 20% 胎牛血清、LPS 浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Ber 浓度 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。每个浓度设 5 个复孔,48 h 后,倒置显微镜下观察细胞形态。吸取上清液于 EP 管中,2 000 r/min 离心 5 min,用 ELISA 法检测上清液中 PGE_2 的浓度。

1.3 统计学方法 用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数的比较采用单因素方差分析,两两之间比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 利用差速贴壁细胞培养法成功获得纯化的人类黏膜成纤维细胞,并经 SABC 法染色鉴定,见图 1、2。

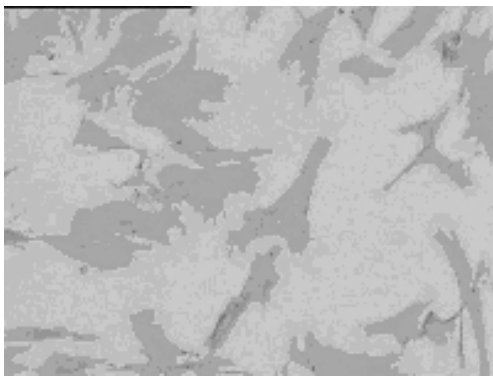


图 1 人类黏膜成纤维细胞波形丝蛋白染色阳性(SABC $\times 400$)

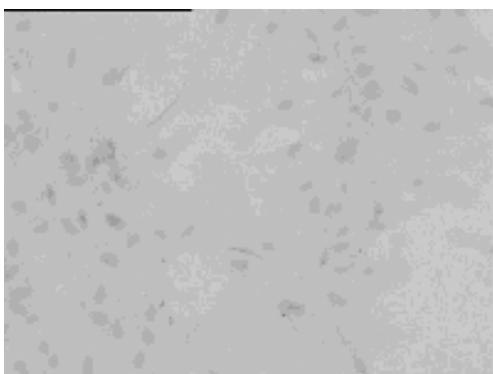


图 2 人类黏膜成纤维细胞角蛋白染色阴性(SABC $\times 400$)

2.2 MTT 实验结果 24 h 时间段内与对照组比较,各浓度组未见明显差异;48 h 时间段中与对照组比较,仅 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$

和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组差异有统计学意义($P < 0.05$);72 h 时间段中与对照组比较,20、10、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 MTT 实验结果

小檗碱浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OD 值		
	24 h	48 h	72 h
20	0.319 \pm 0.044	0.337 \pm 0.073*	0.131 \pm 0.004*
10	0.348 \pm 0.084	0.563 \pm 0.228*	0.234 \pm 0.047*
5	0.378 \pm 0.035	0.55 \pm 0.106	0.285 \pm 0.026*
2.5	0.402 \pm 0.039	0.946 \pm 0.377	0.307 \pm 0.050
1.25	0.432 \pm 0.131	0.963 \pm 0.025	0.319 \pm 0.031
0(对照组)	0.489 \pm 0.109	1.056 \pm 0.161	0.404 \pm 0.075

*:与对照组相比较, $P < 0.05$ 。

2.3 Ber 对 LPS 刺激 HBMFs 炎症反应的抑制作用结果 通过研究发现,HBMFs 在含 20% 胎牛血清的培养基中,培养 48 h 后,上清液中 PGE_2 有一定的表达量,均值水平为(8.682 \pm 1.984) $\mu\text{g}/\text{L}$;加入 LPS 48 h 后上清液中 PGE_2 表达明显升高,均值水平为(22.509 \pm 1.245) $\mu\text{g}/\text{L}$,差异具有统计学意义($P < 0.05$);药物干预组,在加入 LPS 的同时加入 Ber 培养 48 h 后与炎症组比较 PGE_2 表达明显下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组 HBMFs 分泌表达 PGE_2 量表

组别	上清液 PGE_2 浓度($\mu\text{g}/\text{L}$)
对照组	8.682 \pm 1.984
炎症细胞组	22.509 \pm 1.245*
药物干预组	11.381 \pm 1.652*#

*:与对照组比较, $P < 0.05$;#:与炎症组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨 论

颊黏膜成纤维细胞是成纤维细胞家族中的一种。国内外对成纤维细胞的研究主要集中在皮肤、肌肉的成纤维细胞^[4-5],在口腔疾病的细胞学研究中对于髓成纤维细胞的研究较多^[6-8]。本实验以原代培养的 HBMFs 作为研究对象,以脂多糖作为 HBMFs 的炎症刺激因素,观察盐酸小檗碱对 LPS 刺激下 HBMFs 炎症反应的抑制作用。本实验取口腔扁平苔藓患者颊黏膜正常组织进行原代培养,采用混合酶消化和差速贴壁的方法分离纯化 HBMFs,通过形态观察以及波形丝蛋白染色观察,证实得到的细胞形态及功能正常。选择盐酸小檗碱的浓度为 20、10、5、2.5、1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 分别作用于细胞,与对照组比较,在 48 h 时 20、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组对细胞有抑制作用;72 h 时,20、10、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组对细胞有抑制作用,因此,本实验选择 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度作用于 LPS 处理后的细胞。脂多糖一种外源性的可以诱导细胞产生炎症反应的成分,可刺激对大多数真核细胞发生形态、代谢、基因、蛋白表达等方面的改变,导致细胞内细胞因子发生变化,介导各种炎症相关疾病的发生、发展,其作用机制被认为与细胞膜上的特异受体 CD14 及 toll 样受体 4 结合后通过多条信号通路诱导炎症因子的合成。已有研究证实^[9-10],成纤维细胞作为一类重要的炎症和免疫调控细胞,不仅具有维持组织结构和参与损伤修复的作用,同时也与淋巴细胞相似,能够分泌 IL-8、 PGE_2 、MCP-1、MIP-1 等炎症因子^[11-13]。
(下转第 1226 页)

直接用不同浓度的新洁尔灭消毒液调合印模材料,进行印模自身消毒,其结果是印模的尺寸变化与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),同时印模的形变率($\Delta\%$)小于 0.5(最大为 0.482)。虽然浸泡消毒其结果与对照组在 35 min 内比较差异无统计学意义($P>0.05$),但是其印模的形变率最大值已达到 0.772,明显大于自消毒法的最大形变率,且浸泡消毒法中浸泡 45 min、16 h 与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),印模的形变率最大值已达到分别为 2.613 和 4.105,远远超过了临床所能接受的形变率 2.2%。因此藻酸盐不适合长时间浸泡消毒,而与其他消毒方法比较,调合消毒法制取印模后可直接灌模,省略了消毒过程将消毒程序引起最终翻制模型误差的可能性降低,具有对印模精度影响小、省时、消毒效果好的优点,利于临床上的操作及推广。

参考文献:

- [1] Ahmad S, Tredwin CJ. Effect of immersion disinfected with Perform-ID on alginate, an alginate alternative, an addition-cured silicone and resyltant type III gypsum casts[J]. Br Dental J, 2007, 202: E1.
- [2] Samaranyake LP, Hunjian M, Jennings KJ. Carriage of oral flora on irreversible hydrocolloid and elastomeric impression materials[J]. Prosthodont, 1991, 65: 244.
- [3] 黄庆丰, 张建中. 口腔印模的消毒[J]. 口腔材料器械杂志, 2002, 11(2): 82.
- [4] Johnson GH, Chellis KD, Gordon GE, et al. Dimensional stability and detail reproduction of irreversible hydrocolloid and elastomeric impression disinfected by immersion[J]. J Prothet Dent, 1998, 79(4): 446.
- [5] 彭明勇, 胡常红. 新洁尔灭调拌藻酸盐印模材料抑菌效果的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(4): 496.
- [6] Lepe X, Johnson GH. Wettabilit, imbibition, and mass change of disinfected low-viscosity impression material[J]. J Prothet Dent, 2002, 88(3): 268.
- [7] Infection control recommendations for the dental office and the dental laboratory. ADA Council on Scientific Affairs and ADA Council on Dental Practice[J]. J Am Dent Assoc, 1996, 127: 672.
- [8] Council on Dental Material, Instruments, and Equipment. Council on Dental Practice. Council on Dental Therapeutics. Infection control recommendations for the dental office and the dental laboratory[J]. J Am Dent Assoc, 1998, 116(2): 241.
- [9] 郭华, 徐忠建. 调合消毒法对藻酸盐印模材消毒效果的研究[J]. 口腔医学研究, 2006, 22(2): 169.
- [10] 胡丽君, 肖德群. 1:5 000 新洁尔灭浸泡治疗儿童烧伤后不良反应的观察及对策[J]. 重庆医学, 2001, 30(5): 473.

(收稿日期: 2009-12-08)

(上接第 1223 页)

通过研究发现,在正常培养的 HBMFs 细胞上清液中也有 PGE₂ 的表达,在加入 LPS 刺激之后,其上清液中 PGE₂ 含量明显增加,说明 LPS 能够刺激 HBMFs 细胞产生炎症反应。而同时加入 Ber 和 LPS 后培养的细胞,其上清液中 PGE₂ 的分泌表达较 LPS 组明显降低。而 PGE₂ 是一种为人们所熟知的炎症因子,因此在本实验中以认为, PGE₂ 的表达的增加或降低预示着炎症反应的扩大或抑制。因此可以得出结论, Ber 可以抑制 LPS 刺激 HBMFs 产生的炎症反应,进而推论盐酸小檗碱在对抗口腔扁平苔藓的炎症反应中可能具有重要的作用,但其具体机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Jiang JY, Geng DS, Tursonjan T, et al. Anti-inflammatory effects and mechanism of berberine[J]. Chin Pharmacol Bull, 1998, 14(5): 434.
- [2] Hyde A, Blondel B, Matter A, et al. Homo- and heterocellular junctions in cell cultures: an electrophysiological and morphological study[J]. Prog Brain Res, 1969, 31: 283.
- [3] 郝钰, 王萍, 吴珺, 等. 人参总苷和小檗碱对肺癌 PG 细胞分泌免疫抑制性细胞因子的影响[J]. 中西医结合学报, 2008, 6(3): 278.
- [4] 王晓蕾, 薛辛东. 肌成纤维细胞与高氧肺损伤[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(3): 260.
- [5] 王砚宁, 毕新岭, 顾军, 等. 黄芩苷影响人成纤维细胞诱导一氧化氮合酶蛋白表达研究[J]. 中国中西医结合皮肤性病杂志, 2003, 2(3): 152.
- [6] 宋智, 林正梅. 牙髓成纤维细胞的免疫相关作用研究进展[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2008, 18(7): 417.
- [7] Lu HX, Xiao MZ, Niu ZY, et al. Effect of IL-1ra on human dental pulp cells and pulpal cells and pulpal inflammation[J]. Int Endod J, 2002, 35(10): 807.
- [8] Matsushima K, Ohbayashi E, Takeuchi H, et al. Stimulation of interleukin-6 production in human dental pulp cells by peptidoglycans from lactobacillus casei[J]. J Endod, 1998, 24(4): 252.
- [9] 杨鑫, 范小平, 向学熔, 等. 人颊黏膜成纤维细胞原代培养及白屈菜红碱对其生长抑制的影响[J]. 重庆医学, 2009, 38(23): 2924.
- [10] Smpowski GD, Beres PR, Moretti AJ, et al. CD40 mediated activation of gingival and periodontal ligament fibroblast[J]. J Periodontol, 1997, 69: 284.
- [11] Robert D, Suttles SJ. The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses[J]. Immunol Today, 1996, 17: 447.
- [12] Kunkel SL, Lukacs N, Kasama T, et al. The role of Ber-mokines in inflammatory joint disease[J]. J Leukocyte Biol, 1996, 59: 6.
- [13] Sakuta T, Tokuda M, Tamura M, et al. Dual regulatory effects of interferon-alpha, -beta, and -gamma on interleukin-8 gene expression by human gingival fibroblasts in culture upon stimulation with lipopolysaccharide from Prevotella intermedia, interleukin-1 alpha, or tumor necrosis factor-alpha[J]. J Dent Res, 1998, 77: 1597.

(收稿日期: 2009-12-25)