

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2017.04.004

· 基础研究 ·

槟榔碱对人牙周膜成纤维细胞凋亡的影响

王焕玲¹, 张建平²

1. 天津市河东区鲁山道社区卫生服务中心, 天津(300171); 2. 天津中医药大学第二附属医院, 天津(300171)

【摘要】 目的 研究槟榔碱(Arecoline)对体外培养的人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblast, hPDLFs)中凋亡及相关蛋白 p-JNK、p-p53、Bcl-2 表达的影响。方法 采用组织块培养法培养原代 hPDLFs, 并传代纯化后用于实验。采用浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 的槟榔碱处理牙周膜成纤维细胞 12 h, 通过 MTT 法检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞凋亡, 蛋白免疫印记法检测槟榔碱对 hPDLFs 中 p-JNK、p-p53、Bcl-2 表达的情况。结果 槟榔碱作用于 hPDLFs 后, 细胞增殖受到抑制, 细胞凋亡率随着药物浓度增加而增加, p-JNK、p-p53 蛋白表达逐渐增强, Bcl-2 蛋白表达逐渐降低, 呈现浓度依赖性。结论 提示槟榔碱可通过激活 JNK 和 p53 的磷酸化水平导致 hPDLFs 的凋亡, 对牙周组织的再生有抑制作用。

【关键词】 槟榔碱; 人牙周膜成纤维细胞; 凋亡; 抑制; 蛋白表达

【中图分类号】 R781.4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2017)04-0223-04

【引用著录格式】 王焕玲, 张建平. 槟榔碱对人牙周膜成纤维细胞凋亡的影响[J]. 口腔疾病防治, 2017, 25(4): 223-226.

Effects of arecoline on apoptosis of human periodontal ligament fibroblasts WANG Huan-ling¹, ZHANG Jian-ping². 1. Lushan Mountain Road Community Health Service Center of Tianjin, Tianjin 300171, China; 2. Second Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300171, China

Corresponding author: ZHANG Jian-ping, Email: zhangjianpingtem@163.com, Tel: 0086-22-60335344

【Abstract】 Objective To observe the effects of arecoline on the related protein expressions in the apoptosis of cultured human periodontal ligament fibroblasts (hPDLFs), such as p-JNK, p-p53, and Bcl-2. **Methods** hPDLFs were isolated from human periodontal ligament tissues and expanded in vitro. hPDLFs were treated with different concentrations of arecoline (0, 20, 40 and 80 $\mu\text{g/mL}$) for 12 h. The proliferative activities were evaluated by MTT. The expressions of p-JNK, p-p53, and Bcl-2 were determined by Western blot. **Results** Arecoline inhibited cell proliferation and induced apoptosis protein. The protein level of Bcl-2 was decreased, while p-JNK and p-p53 were increased ($P < 0.05$). The protein expressions were in a concentration-dependent manner with arecoline. **Conclusion** It demonstrates arecoline might contribute to the apoptosis of hPDLFs, and could destroy periodontal tissues.

【Key words】 Arecoline; Human periodontal ligament fibroblasts; Apoptosis; Inhibition; Protein expression

槟榔为我国四大南药之一, 具有杀虫、破积、降气行滞、行水化湿的功效。我国台湾、海南和湖南等地的人们具有咀嚼槟榔习惯, 咀嚼槟榔会产生心理兴奋感, 因此具有成瘾性。咀嚼槟榔不仅

是口腔黏膜下纤维性变主要致病因素, 还会引起口腔白斑、牙周病等口腔疾病。槟榔中含量较高的是槟榔碱, 反复咀嚼过程中, 槟榔纤维摩擦可引起口腔黏膜出现微创伤或溃疡, 使槟榔碱易于扩散进入微循环中, 长期咀嚼可导致损伤不愈、局部形成炎症微环境, 对口腔健康十分不利。已有报道显示, 槟榔碱诱导血管内皮细胞、口腔上皮细胞凋亡^[1-5], 但其是否诱导人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblast, hPDLFs)凋亡, 未

【收稿日期】 2016-08-26; **【修回日期】** 2016-11-08

【作者简介】 王焕玲, 主治医师, 大专, Email: 3166425349@qq.com

【通讯作者】 张建平, 主任医师, 硕士, Email: zhangjianpingtem@163.com

见文献报道。本研究以原代培养hPDLFs为研究对象,探讨槟榔碱对hPDLFs凋亡及JNK/p53通路的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

槟榔碱(纯度>98%,中国药品生物制品检定所),倒置显微镜(Olympus,日本);酶标仪(Biotek,美国),离心机(Thermo,美国),细胞培养箱(Heraeus,德国),高糖DMEM培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(Gibco,美国),p-JNK、p-p53、Bcl-2、波形丝蛋白鼠抗人抗体单克隆抗体、角蛋白兔抗人多克隆抗体(Cell Signaling Technology,美国),FITC标记兔抗鼠IgG、PE-Cy3标记驴抗兔IgG和辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠IgG(北京中杉金桥生物公司)。

1.2 hPDLFs的培养

取12~18岁因正畸拔除的双尖牙,无菌条件下,取根中1/3的牙周膜组织,剪碎成约1 mm边长的小块均匀平铺于25 mL培养瓶中,加入5 mL DMEM培养液,置37℃,5%的CO₂培养箱孵育4~6 h后,轻轻翻转培养瓶,使培养液完全浸润组织块,静置培养。每3 d更换培养液,去除漂浮的组织块。7 d后观察细胞游出情况。待细胞长至培养瓶底面积的80%~90%,进行传代培养^[6-7]。成纤维细胞比上皮细胞容易消化,利用差异消化原理可以将两种细胞分离,进而得到纯化的成纤维细胞。经分离纯化后取第4代细胞进行鉴定。

1.3 MTT法检测细胞增殖

将hPDLFs以 1×10^4 个/孔接种于96孔板,每孔100 μL,培养12 h后,别以0、20、40、80 μg/mL 槟榔

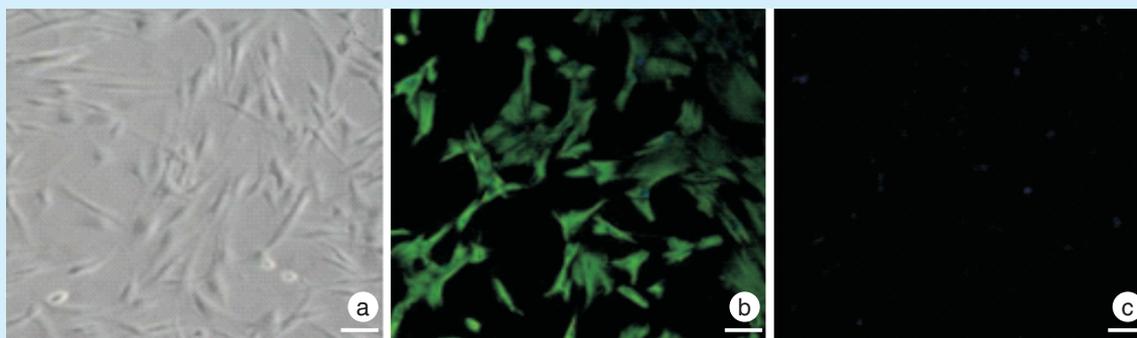
碱作用12 h,每个浓度设置3个复孔。干预后,每孔加入5 g/L的MTT 20 μL,37℃孵育4 h,吸掉培养液,每孔加入150 μL DMSO,避光震荡10 min,在酶联检测570 nm处测定各孔的吸光度(A)^[8]。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

每个浓度设置3个复孔,不同浓度槟榔碱处理hPDLFs 12 h,弃掉培养基,收集细胞,参照凋亡试剂盒说明说操作。3 mL PBS洗涤1次。再用 $1 \times$ Binding Buffer缓冲液制成体积为1 mL数量为 10^5 细胞的悬液。加入荧光标记Annexin V核酸染料轻轻混匀,室温(20℃~25℃)避光处放置15 min。 $1 \times$ Binding Buffer缓冲液洗细胞一次,去上清。加入 $1 \times$ Binding Buffer缓冲液100 μL,加入5 μL PI,室温(20℃~25℃)避光处放置5 min。1 h内上流式细胞仪测定结果。

1.5 Western Blot检测p-JNK、p-p53、Bcl-2的表达

不同浓度槟榔碱处理hPDLFs 12 h,弃掉培养基,PBS洗2次,用蛋白裂解液冰上裂解30 min,4℃ $12\ 000 \times g$ 离心20 min,采用Bradford法测定上清蛋白浓度,配平各组蛋白浓度,100℃蛋白变性。每孔样品30 μg蛋白,SDS-PAGE电泳后转膜至PVDF膜上,5%牛血清白蛋白封闭2 h,Bcl-2(1:500),p-JNK(1:500),p-p53(1:500),4℃冰箱过夜,弃掉一抗,洗膜3次,每次5 min;将膜转入杂交袋,室温孵育二抗(1:10 000)2 h,弃掉二抗,洗膜3次,每次5 min;ECL系统显影,调整曝光时间,直至显影出电泳带。采用β-actin作为内参,实验重复3次。Western Blot蛋白半定量分析采用Gel-Doc凝胶成像分析系统测定,目标平均灰度值与内参平均灰度值的比值来表示。



a: 原代人牙周膜成纤维细胞; b: 波形丝蛋白抗体染色呈阳性; c: 角蛋白抗体染色呈阴性。Bar=50 μm。

图1 细胞原代培养和免疫荧光鉴定

Figure 1 hPDLFs and immunofluorescence identification

1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析比较总体上组间的差异,组间若有差异则进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hPDLFs 的鉴定

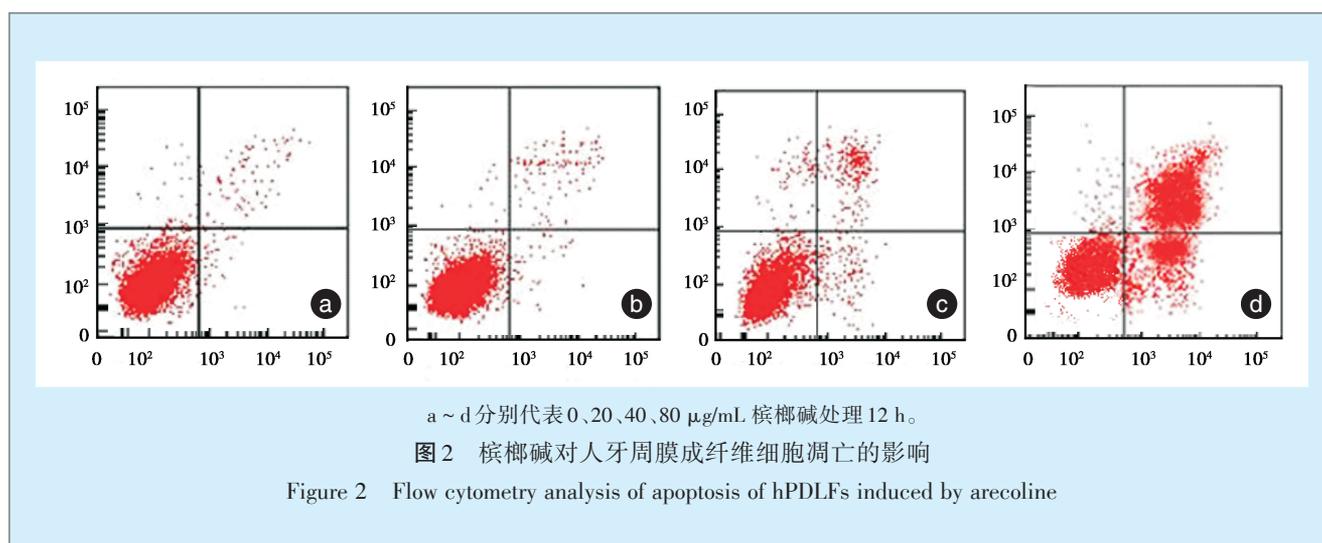
光镜下表现为漩涡形或放射形生长,形态为长梭形(图 1a);波形丝蛋白抗体染色呈阳性,胞浆呈绿色(图 1b);角蛋白抗体染色呈阴性,胞浆未着色(图 1c)。结果表明所培养细胞来源于中胚层,且无上皮源性细胞混杂,明确所培养的细胞为 hPDLFs。

2.2 槟榔碱对 hPDLFs 增殖的影响

不同浓度的槟榔碱对 hPDLFs 增殖作用的影响不同,与正常对照组相比,槟榔碱干预后对 hPDLFs 增殖产生抑制作用,呈现剂量依赖性,其中 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的槟榔碱抑制作用与对照组相比具有显著性差异 ($P < 0.05$),结果见表 1。

2.3 槟榔碱对 hPDLFs 凋亡的影响

对照组凋亡率 (8.7 ± 1.2)%。不同浓度槟榔碱处理后,细胞凋亡率逐渐上升,作用效果与浓度有关。其中,20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 凋亡率为 (10.2 ± 5.1)%,40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 凋亡率为 (17.6 ± 2.4)%,与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$);而 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 凋亡率为 (36.9 ± 4.5)%,与对照组比较,具有显著性差异 ($P < 0.05$),该结果显示槟榔碱可以诱导 hPDLFs 凋亡,结果见图 2。



2.4 槟榔碱对 hPDLFs 中 p-JNK、p53、p-Bcl-2 蛋白表达影响

与对照组相比,40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 槟榔碱干预 12 h

后均可显著提高 hPDLFs 中 p-JNK、p-p53 蛋白的表达 ($P < 0.05$),并显著减少 Bcl-2 蛋白的表达 ($P < 0.01$),见表 1 与图 3。

表 1 槟榔碱对人牙周膜成纤维细胞增殖活性和 p-JNK、p-p53 和 Bcl-2 蛋白影响影响

Table 2 Proliferation activity of hPDLFs and expressions of p-JNK, p-p53 and Bcl-2 protein

(n = 3)

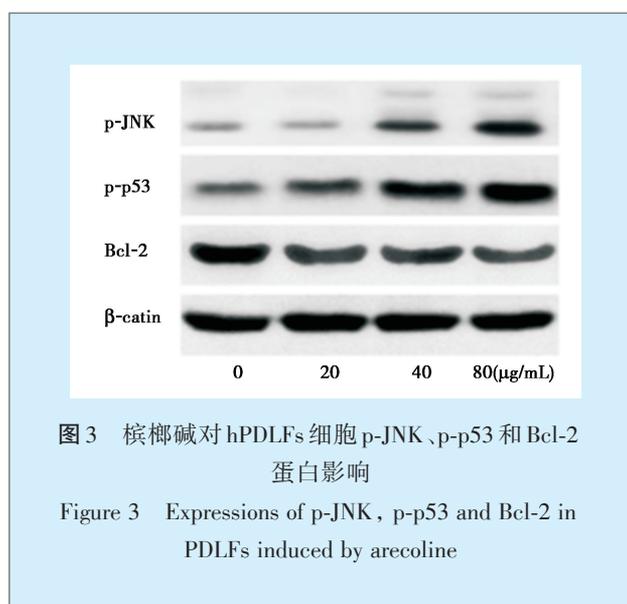
组别($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OD 值(A)	P 值	p-JNK	P 值	p-p53	P 值	Bcl-2	P 值
0(对照组)	0.88 ± 0.08		1.00 ± 0.00		1.00 ± 0.00		1.00 ± 0.00	
20	0.76 ± 0.06	0.290	0.92 ± 0.14	0.175	1.45 ± 0.08	0.093	0.88 ± 0.06	0.059
40	0.68 ± 0.12	0.039	1.48 ± 0.01	0.025	1.72 ± 0.04	0.033	0.42 ± 0.05	0.028
80	0.47 ± 0.11	0.021	1.97 ± 0.12	0.022	2.28 ± 0.13	0.004	0.18 ± 0.03	0.017

3 讨论

hPDLFs 是牙周膜中的主要细胞成分,具有趋化粘附、增殖、生物合成和分化为成牙骨质细胞、成骨细胞,维持牙齿组织再生和损伤修复的功

能。hPDLFs 细胞的数量和生物学活性是牙周组织修复的必要保证^[9]。

槟榔碱可通过诱导 DNA 损伤断裂、阻滞细胞周期、调控凋亡基因等作用而诱导细胞凋亡^[10],对



口腔黏膜的损伤是引发口腔黏膜下纤维病变的重要因素^[11]。如果槟榔碱对牙周膜成纤维细胞也有相应的刺激和损伤,那么长期咀嚼槟榔可能会影响牙周组织的再生修复。本实验采用浓度为20 μg/mL、40 μg/mL、80 μg/mL槟榔碱作用hPDLFs,与对照组相比,不同浓度对细胞的增殖都具有抑制作用,呈现剂量依赖性,40 μg/mL的槟榔碱具有显著差异。Bcl-2通过调控内质网核内外物质转运及膜通透性来阻止细胞色素C的释放,达到阻止细胞凋亡的级联反应过程。本研究发现,高浓度槟榔碱处理hPDLFs,Bcl-2表达明显下降。JNK是MAPK家族重要成员,通过转绿因子磷酸化而改变基因表达,参与众多细胞生长、分化、凋亡等过程,在调控凋亡中具有举足轻重的作用。它可以调整Bcl-2家族蛋白,活化该家族的促凋亡蛋白,抑制抗凋亡蛋白活性。肿瘤抑制因子p53在诱导细胞凋亡中起到重要作用,在不同刺激下调节细胞周期和细胞凋亡。p53可以直接激活线粒体通路,与Bcl-2结合,诱导细胞凋亡。同时,JNK的活化可磷酸化p53使之依赖p53通路的凋亡活性增强^[12]。

本研究结果显示,槟榔碱促进了JNK和p53的磷酸化,在hPDLFs中,槟榔碱引起JNK和p53蛋白

磷酸化,Bcl-2蛋白表达降低,抑制hPDLFs增殖,引起凋亡率显著升高。这说明在hPDLFs中,槟榔碱发挥促凋亡作用JNK和p53蛋白磷酸化密切相关。这可能是长期咀嚼槟榔患者牙周炎程度更重,牙周组织退化原因之一。

参考文献

- [1] 李辉莉,方厂云,苏征,等. 槟榔碱对口腔黏膜成纤维细胞微丝骨架及胶原吞噬的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2013, 29(6): 816-819.
- [2] 刘健,凌天牖,傅润英,等. 槟榔碱对HaCaT细胞增殖活性及S100A7 mRNA表达的影响[J]. 口腔医学研究, 2010, 26(5): 664-666, 670.
- [3] 张睿,李明,彭解英,等. 槟榔碱诱导上皮细胞凋亡相关蛋白caspase-3, 8, 9、Bcl-2和Bax的表达[J]. 临床口腔医学杂志, 2014, 30(2): 75-78.
- [4] 尹晓敏,彭解英,高义军,等. 丹参对槟榔碱诱导血管内皮细胞凋亡和Caspase-3活性的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(9): 1368-1370.
- [5] 李明,彭解英,吴颖芳,等. 槟榔碱诱导上皮细胞凋亡[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2011, 31(4): 282-285.
- [6] 张倩,闫卉. 富血小板血浆和米诺环素对牙周膜成纤维细胞附着增殖的影响[J]. 广东牙病防治, 2015, 23(7): 350-353.
- [7] Kumada Y, Zhang S. Significant Type I and Type III collagen production from human periodontal ligament fibroblasts in 3d peptide scaffolds without extra growth factors[J/OL]. PLoS One, 2010, 5(4): e10305[2016-08-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421985>.
- [8] Ping L, Mavridou DAI, Emberly E, et al. Vital dye reaction and granule localization in periplasm of *Escherichia coli*[J]. Plos One, 2012, 7(6): 341-350.
- [9] 张苗苗,王玲. 人牙周膜成纤维细胞牵张激活的钙离子通道的研究进展[J]. 口腔医学研究, 2008, 24(5): 586-587.
- [10] Lee PH1, Chang MC, Chang WH, et al. Prolonged exposure to arecoline arrested human KB epithelial cell growth: regulatory mechanisms of cell cycle and apoptosis[J]. Toxicology, 2006, 220(2/3): 81-89.
- [11] Canniff JP, Harvey W, Harris M. Oral submucous fibrosis: its pathogenesis and management[J]. Br Dent, 1986, 160(12): 429-434.
- [12] Fan S, Qi M, Yu Y, et al. P53 activation plays a crucial role in silibinin induced ROS generation via PUMA and JNK[J]. Free Radic Res, 2012, 46(3): 310-319.

(编辑 全春天, 曾曙光)