

牙骨质基质提取物促进牙周细胞在牙根表面附着的研究

隋文 洪咏龙 肖明振

摘要 目的:明确附着在牙根表面的牙骨质基质提取物具有促进牙周膜细胞附着的功能。方法:采集健康的牙龈组织和牙周膜,体外培养牙龈成纤维细胞和牙周膜成纤维细胞。从因正畸需拔除的健康牙体表面获得牙骨质基质提取物,分别观察不同作用时间、不同浓度的牙骨质基质提取物对牙龈成纤维细胞和牙周膜成纤维细胞在牙体表面附着的影响。结果:牙龈成纤维细胞、牙周膜成纤维细胞均对牙骨质基质提取物有浓度和时间依赖性,最佳作用时间为2小时,最合适浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。且牙骨质基质提取物促牙周膜成纤维细胞附着的作用高于对牙龈成纤维细胞的作用。结论:牙骨质基质提取物能够促进牙周膜细胞在牙根表面上的附着。

关键词 牙骨质基质提取物 牙周膜成纤维细胞 牙龈成纤维细胞

牙骨质基质内含有多种可促进牙周膜细胞附着和移行的活性蛋白(统称牙骨质基质提取物),已证实牙骨质基质提取物可以附着到牙根表面上¹,那么就有必要明确那些附着在牙根表面的牙骨质基质提取物是否具有促进牙周膜细胞附着的功能,以便于牙骨质基质提取物用于牙周病的治疗。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM 培养液(GBCD 公司,美国),胰酶(GBCD 公司,美国),胎牛血清(金华清湖犊牛生物制品厂,浙江),牛血清白蛋白(华美生物工程公司),3164型CO₂ 孵箱(Foma 公司,美国),YMT-Z型倒置显微镜(Olympus,日本),24孔培养板(Coring 公司,美国),YJ-875型超净工作台(苏州净化设备厂)。

1.2 细胞培养

1.2.1 牙龈成纤维细胞的培养 采集健康的牙龈组织块,放入含庆大霉素的DMEM 细胞培养基中,然后将牙龈组织块放置在玻片上,用眼科剪剪成细碎小块,并将剪碎的组织块粘附于培养瓶瓶壁上,加含抗菌素的DMEM 培养液,37 的CO₂ 孵箱内培养。当瓶壁细胞铺满时,用胰酶消化后传代,每3天换1次液,5至14代均可用于实验。

1.2.2 牙周膜成纤维细胞的培养 取因正畸而拔除的健康恒牙,置入含培养液的培养瓶中,在超净工作台中用培养液冲洗数遍,刮取牙根中部1/3牙周膜,在玻片上剪成小于 1mm^3 大小的碎块,均匀铺于25ml培养瓶底再加入

DMEM 培养液,37 下CO₂ 孵箱培养,隔日换液,瓶壁细胞铺满时胰酶消化传代,4代以后用于实验。

1.3 牙片的制备

从口腔颌面外科临床采集牙周未感染的正畸牙,切除牙冠,在牙根表面贴上大小约 $0.3\text{cm} \times 0.3\text{cm}$ 的双面胶,顺双面胶的边缘切取牙片,将牙本质面磨平,用丙酮除去牙片牙骨质面上的胶,再将牙片放入含 $3\text{mg}/\text{ml}$ 胶原酶和 0.25% 胰酶的溶液中,置37 约72小时,PBS 缓冲液冲洗3遍,将牙片放入含 $1\text{mg}/\text{ml}$ 青霉素和 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 庆大霉素溶液中24小时,再将牙片放入含 $1\text{mg}/\text{ml}$ 青霉素和 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 庆大霉素的DMEM 中24小时后,即可使用。

1.4 牙骨质基质提取物的提取

将健康成人牙齿表面的牙骨质刮下,通过含蛋白酶抑制剂的醋酸和胍两步抽提浓缩、冻干后备用。

1.5 细胞附着实验

1.5.1 牙骨质基质提取物不同作用时间对两种细胞附着的影响 牙片放入24孔板后,每孔分别加入BSA、牙骨质基质提取物,CO₂ 孵箱内孵化1小时,分别接种牙龈成纤维细胞、牙周膜成纤维细胞,再孵化1、2、4小时。胰酶消化后计附着细胞的数量,换算成单位面积附着细胞的数量,每个实验点各测3次,取平均值。

1.5.2 牙骨质基质提取物不同浓度对两种细胞附着的影响 细胞附着的检测同Somerman 等的方法²。

作者单位:710032 第四军医大学口腔医学院牙体科(隋文,肖明振),口腔颌面外科(洪咏龙)

2 结 果

牙骨质基质提取物能够促进牙周膜细胞在牙根表面附着, 牙龈成纤维细胞和牙周膜成纤维细胞均对牙骨质基质提取物有浓度和时间依赖性, 最佳作用时间为2小时(图1~4)。与未加牙骨质基质提取物组对照, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的牙骨质基质提取物即能明显提高牙周膜成纤维细胞在牙根表面的附着, 而对于牙龈成纤维细胞, 则需 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 牙骨质基质提取物方可显著增强细胞在牙根表面的附着, 从统计图上分析牙骨质基质提取物浓度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 对牙龈成纤维细胞和牙周膜成纤维细胞较为合适, 而且牙骨质基质提取物促进牙周膜成纤维细胞附着的作用高于对牙龈成纤维细胞的作用。

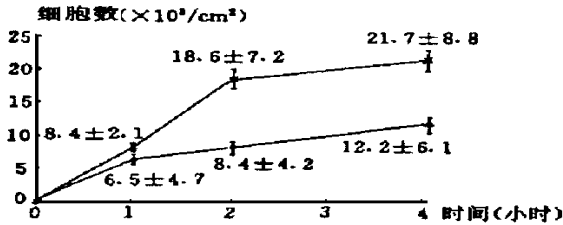


图1 牙骨质基质提取物不同时间对牙龈成纤维细胞附着的影响

* 牙片牙骨质基质提取物处理组(下同)
 牙骨质基质提取物空白组(下同)

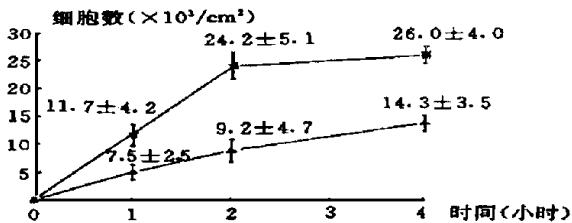


图2 牙骨质基质提取物不同时间对牙周膜成纤维细胞附着的影响

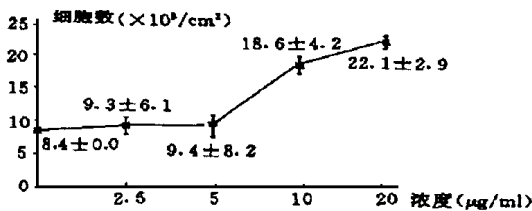


图3 不同浓度牙骨质基质提取物作用2小时牙龈成纤维细胞附着数

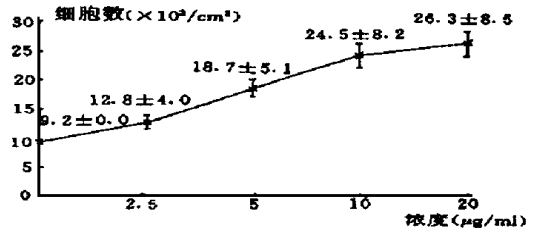


图4 不同浓度牙骨质基质提取物作用2小时牙周膜成纤维细胞附着数

3 讨 论

细胞附着在底物上是其发挥正常功能的先决条件, 如细胞增殖、移行、分化、蛋白合成和组织修复。病变牙周组织修复需要牙周结缔组织重新附着在牙根表面上形成新附着。牙周新附着形成首先是牙周膜细胞在根面上的附着、生长、移行、分化。因此, 许多研究集中于如何提高牙周膜细胞再附着。患牙周病后牙周膜细胞再附着的主要障碍是牙龈上皮的根向生长³。为了解决这一问题, Isidor 等³ 提出在做过刮治术的牙根表面上覆盖微孔膜以防止上皮细胞的根向移行, 而使健康的牙周膜细胞移行并附着在牙根表面。其它一些实验也支持这种治疗方案^{4,5}, 用枸橼酸或四环素处理牙根表面⁶, 牙根表面脱矿后胶原纤维暴露或者是在牙根表面涂布纤维粘连蛋白(FN)⁷⁻⁹。胶原和FN均为结缔组织细胞的趋化和附着因子。

牙骨质的一个重要作用就是固定牙周韧带在牙根表面上。此外, 牙骨质对牙周病的治愈也有一定的作用, 实际上一些研究显示没有健康牙骨质出现, 牙周膜就不能完全恢复健康¹⁰。临床上牙周膜的修复包括新的骨组织和新的牙骨质的形成, 以及牙周结缔组织的附着, 在组织愈合期, 细胞的附着和生长是至关重要的⁸, 所以, 牙骨质基质内提取的附着蛋白在临床上具有很重要的价值。一些研究表明牙骨质基质内存在特异性强且活性很高的附着蛋白, 这类蛋白似乎对牙骨质的发育、保持和再造有着重要的作用⁹。在牙本质的形成过程中, 细胞外基质内的附着蛋白, 如FN、层粘连蛋白、胶原和肌腱蛋白对成牙本质细胞的分化均有一定的作用¹⁰。此外, 这类附着蛋白与牙根周围组织细胞间的作用对维持健康的牙周组织也是十分必要的, 而且牙骨质基质内确实含有只有其组织特有的附着

蛋白。Western blot 显示此蛋白并不是 FN、层粘连蛋白、骨桥蛋白中的一种¹¹，所以它的性质还有待研究，统称为牙骨质基质提取物⁹。牙骨质的再生是牙周修复的关键¹¹，Pitaru 等¹¹认为鉴于牙骨质基质提取物对牙周膜细胞有一定的作用，并为牙骨质所特有，提示牙骨质基质提取物与成牙骨质细胞的分化有关，进而表明牙骨质基质提取物影响着牙周组织的修复。虽然牙骨质被认为主要起着结构上的功能，但近期的研究表明牙骨质还具有重要的生理功能，牙骨质基质提取物可刺激牙周膜细胞的附着、移行、生长和蛋白与胶原的合成¹¹。由于细菌内毒素与牙骨质基质提取物有相互竞争的作用³，因此，成纤维细胞不能良好地附着在患有牙周病的牙根表面。所以，不难得出牙骨质基质提取物能调节牙周结缔组织的形成。由本实验结果可以推测牙骨质基质提取物作为牙根表面的生物涂层材料，可有效地促进牙周组织的再生和修复，为牙周病的治疗提供一种新的可靠的途径。

4 参考文献

- 1 隋文, 肖明振, 洪咏龙. 牙骨质基质提取物附着于牙根表面的实验研究. 实用口腔医学杂志, 1998, 14(3): 166~ 168
- 2 Someman MJ, Archer SY, Shteyer A, et al. Protein production by human gingival fibroblasts is enhanced by guanidine EDTA extracts of cementum in vitro. J Periodont Res, 1987, 22(2): 75~ 79
- 3 Isidor F, Karring T, Nyman S, et al. The significance of coronal growth of periodontal ligament tissue for new

- attachment formation. J Clin Periodontol, 1989, 13(4): 145~ 150
- 4 Aukhil I, Greco G, Suggs C, et al. Root resorption potentials of granulation tissue from bone and flap connective tissue. J Periodont Res, 1989, 21(8): 449~ 452
- 5 Boyko GA, Melcher AH, Brunette D. Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. J Periodont Res, 1981, 16(4): 73~ 79
- 6 Register AA, Burdick F. Accelerated attachment and cement genesis to dentin, demineralized in situ (II) defect repair. J Periodontol, 1988, 47(4): 497~ 503
- 7 Cogen RB, Joburi A, Gantt DG, et al. Effect of various root surface treatments on the attachment and growth of human gingival fibroblasts: histologic and scanning electron microscopic evaluation. J Cell Periodontol, 1995, 11(4): 531~ 543
- 8 Smith B, Caffesse R, Nasjleti C, et al. Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum. J Clin Periodontol, 1987, 14(8): 396~ 404
- 9 Mackenzie IC, Tonetti MS. Formation of normal gingival epithelial phenotypes around osseointegrated oral implants in humans. J Periodontol, 1995, 66(2): 933~ 943
- 10 Fernyhough W, Page RC. Attachment growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin-treated normal and diseased tooth roots. J Periodontol, 1993, 54(2): 133~ 138
- 11 Pitaru S, Gray A, Aubin JE, et al. Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. J Periodont Res, 1994, 19(8): 408~ 414

(1998-04-02 收稿, 1998-11-23 修回)

Extract of Cemental Matrix Enhance Periodontal Cells Bind to the Root Surface

Sui Wen, Hong Yonglong, Xiao Minzhen

College of Stomatology, the Fourth Military Medical University

Abstract

Objective: To investigate whether the extract of cemental matrix can enhance periodontal cells binding to the root surfaces. **Methods:** Healthy human gingiva and periodontal ligament were acquired from patients, then gingival fibroblasts and periodontal cells were cultured in vitro. On the other hand, extract of cemental matrix was separated and clarified from healthy teeth which were extracted because of orthodontic treatment. Finally, the effects of cementum matrix with different concentration and different time on the attachment of gingival fibroblast and periodontal cells to root surface were observed. **Results:** The extract of cemental matrix could enhance the initial attachment of human gingival fibroblasts (HGF) and human periodontal cells (HPC) to the surface of root, and such effects were strengthened with increasing density and time. The optimal concentration of extract of cell attachment 10μg/ml, and the attachment was also proportional to the incubation time, reaching near maximal levels at 2 hours, furthermore, the extract of cemental matrix was more effective in promoting the attachment of human periodontal cells than that of gingival fibroblasts. **Conclusion:** The extract of cemental matrix can enhance the initial attachment of HGF and HPC on the root surface.

Key words: extract of cemental matrix human gingival fibroblast human periodontal cell