

# 尼古丁抑制成牙本质细胞增殖及作用机制的研究

吴礼安, 文玲英, 杨富生, 王小竞

(第四军医大学口腔医院 儿童口腔科, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的 观察尼古丁对成牙本质细胞增殖的抑制作用, 并检测其对成牙本质细胞中Ca<sup>2+</sup>浓度的影响, 以探讨尼古丁抑制成牙本质细胞的分子机制。方法 体外培养成牙本质细胞系MDPC-23细胞, 按每毫升2×10<sup>4</sup>个接种, 随机分为实验组和对照组, 对照组不添加任何刺激, 实验组施加质量浓度为100 μg/mL尼古丁, 并于8 h后加入浓度为10 μmol/L BrdU进行细胞周期标记, 刺激24 h后固定细胞, 行免疫荧光抗BrdU染色, 碘化丙锭(PI)复染胞核, 荧光显微镜下计数细胞总数与BrdU阳性细胞数, 计算S期阳性细胞率并进行统计学分析。培养成牙本质细胞于特制培养皿中, 施加质量浓度为100 μg/mL尼古丁刺激, 激光共聚焦显微镜下检测成牙本质细胞中Ca<sup>2+</sup>浓度的动态变化。结果 实验组、对照组S期阳性细胞率分别为36.3%、48.2%, 实验组显著低于对照组。尼古丁刺激后, 成牙本质细胞中Ca<sup>2+</sup>浓度迅速升高, 在较高水平维持一段时间后缓慢下降。结论 尼古丁可抑制成牙本质细胞增殖, 这种作用同尼古丁升高成牙本质细胞中Ca<sup>2+</sup>浓度有关。

[关键词] 尼古丁; 成牙本质细胞; 增殖

[中图分类号] R780.2 [文献标识码] A

Effects and molecular mechanism of nicotine on odontoblasts WU Li-an, WEN Ling-ying, YANG Fu-sheng, WANG Xiao-jing. (Dept. of Pediatric Dentistry, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi an 710032, China)

[Abstract] Objective To observe the effects of nicotine on the proliferation of odontoblasts and explore the possible mechanism. Methods Odontoblasts MDPC-23 were cultured, inoculated and divided into two groups randomly. With no stimuli added for the control group, the experimental group was stimulated by 100 μg/mL nicotine. After 8 hours, 10 μmol/L BrdU was added to label cells at S stage in cell cycle. 24 hours later, odontoblasts were fixed and immunofluorescence staining was performed with specific mouse BrdU antibody. After counterstaining with propidium iodide, BrdU positive cells were arbitrarily scored microscopically by an independent estimation conducted three times, and the corresponding total cell number in the same vision were counted in both groups. BrdU positive cell rates were calculated and compared statistically. At the same time, odontoblasts MDPC-23 were cultured and stimulated by 100 μg/mL nicotine, the dynamic Ca<sup>2+</sup> concentration inside the cytoplasm were detected immediately by a confocal laser scanning microscope. Results The ratio of S stage cells in the experimental group was 36.3% significantly lower than that(48.2%) in the control group. After the addition of 100 μg/mL nicotine, the Ca<sup>2+</sup> concentration inside the cytoplasm rose rapidly, sustained at a high level for a short time and then relapsed gradually. Conclusion Nicotine had inhibitory effects on the proliferation of odontoblasts MDPC-23, which might be related to the increased Ca<sup>2+</sup> concentration in the cytoplasm.

[Key words] nicotine; odontoblast; proliferation

尼古丁是烟草中的毒性物质, 是损害牙胚并造成牙齿发育异常的重要原因之一<sup>[1]</sup>。为了探讨尼古丁损害牙齿发育的可能作用机制, 本研究以成牙本质细胞系MDPC-23细胞为研究对象, 观察尼古丁对

成牙本质细胞增殖的抑制作用, 并检测尼古丁对成牙本质细胞中Ca<sup>2+</sup>浓度的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 尼古丁抑制成牙本质细胞增殖的检测

1.1.1 细胞的培养与刺激 使用含体积分数为10%新生牛血清的 MEM液培养成牙本质细胞系MDPC-23细胞, 胰酶消化, 计数, 按每毫升2×10<sup>4</sup>个接种于

[收稿日期] 2007-07-11; [修回日期] 2007-10-25

[基金项目] 第四军医大学学术新人基金资助项目(2006)

[作者简介] 吴礼安(1975-), 男, 安徽人, 讲师, 博士

[通讯作者] 文玲英, Tel: 029-84776087

6孔板中, 37 °C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养过夜。次日将接种细胞随机分为对照组和实验组, 每组3孔, 对照组不加刺激, 实验组施加质量浓度为100 μg/mL尼古丁进行刺激, 8 h后两组均加入浓度为10 μmol/L BrdU进行细胞周期标记, 24 h后分别弃去培养液, PBS冲洗, 体积分数为70%乙醇固定30 min, 弃去后晾干备用, 实验重复3次。

1.1.2 免疫荧光抗BrdU染色 每孔加入2 mol/L HCl, 室温孵育30 min, PBS冲洗后加入250 μL抗BrdU单克隆抗体(鼠抗, 稀释度1 1 000), 室温孵育2 h, PBS冲洗, 加入250 μL偶联FITC的羊抗鼠二抗(稀释度1 200), 室温避光孵育2 h, PBS冲洗, 质量浓度为0.04 μg/mL碘化丙啶(propidium iodide, PI)复染1 min, PBS冲洗, 荧光显微镜观察, 计数视野中BrdU阳性细胞数与总细胞数, 计算S期阳性细胞率并比较分析。每组9个独立样本, 每个样本随机选取4个视野, 每个视野计数3次, 取平均值。PBS代替二抗作为阴性对照。

## 1.2 尼古丁对成牙本质细胞中Ca<sup>2+</sup>浓度的检测

1.2.1 细胞准备 牙本质细胞系MDPC-23细胞按每毫升1 × 10<sup>5</sup>个接种于特制的60 mm培养皿中(底部中央开直径1 cm的孔, 其下方黏一盖玻片), 37 °C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养24 h备用。

1.2.2 负荷 弃去培养液, D-Hank s液漂洗细胞, 吸干后加入Fluo-3/AM钙负载液, 37 °C避光孵育45 min后弃去, D-Hank s液漂洗细胞, 再加入40 μL D-Hank s液, 激光共聚焦显微镜下观察。

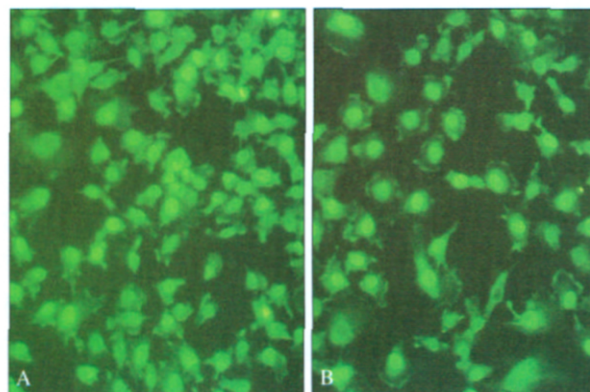
1.2.3 激光共聚焦显微镜观察 显微镜下选定3个已负载的细胞, 扫描细胞内荧光强度, 以荧光强度的相对值指示细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度的变化, 观察时首先确定基线, 检测、记录静息状态下细胞的荧光值, 然后向样品中加入40 μL质量浓度为200 μg/mL的尼古丁(由于受检测细胞本身含有40 μL D-Hank s液, 所以尼古丁质量浓度最终达到100 μg/mL)观察并记录所选定的细胞荧光强度的变化, 根据不同时间点获得的数据绘制细胞内Ca<sup>2+</sup>动态变化曲线图, 同时拍摄施加尼古丁前后不同时间段细胞内荧光强度变化的图片和三维钙离子强度分布图。

## 2 结果

### 2.1 尼古丁对成牙本质细胞增殖的影响

在加入尼古丁24 h后, 实验组与对照组细胞均尚处于对数生长期。免疫荧光染色显示, 两组均有S期阳性细胞, 实验组的S期阳性细胞率为36.3%, 对照组的S期阳性细胞率为48.2%。经统计学分析, 实验组的S期阳性细胞率显著低于对照组(P<0.05),

表明质量浓度为100 μg/mL尼古丁可显著抑制成牙本质细胞系MDPC-23细胞的增殖(图1)。



A: 对照组; B: 实验组

图1 尼古丁对成牙本质细胞增殖的影响 BrdU染色 × 20  
Fig 1 Effects of nicotine on cell proliferation of odontoblasts BrdU staining × 20

### 2.2 尼古丁对成牙本质细胞中Ca<sup>2+</sup>浓度的影响

经Fluo-3/AM负载后, 细胞内游离Ca<sup>2+</sup>浓度的动态变化可通过荧光曲线图、细胞荧光图像和三维钙离子强度分布图等形式来反映。本实验中向细胞外液加入尼古丁后, 观察到成牙本质细胞中Ca<sup>2+</sup>浓度迅速升高(图2中绿色曲线, 红线为基线), 并在较高水平维持一段时间, 随后缓慢下降(图2, 3)。

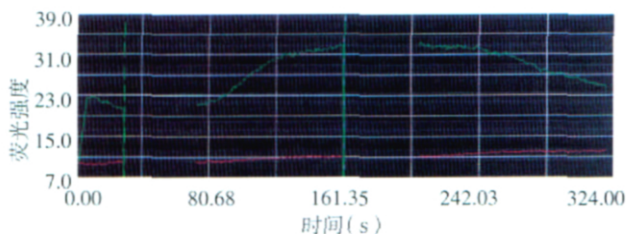


图2 成牙本质细胞中Ca<sup>2+</sup>浓度变化荧光曲线图  
Fig 2 Fluorescence curve of Ca<sup>2+</sup> concentration in the cytoplasm of odontoblast

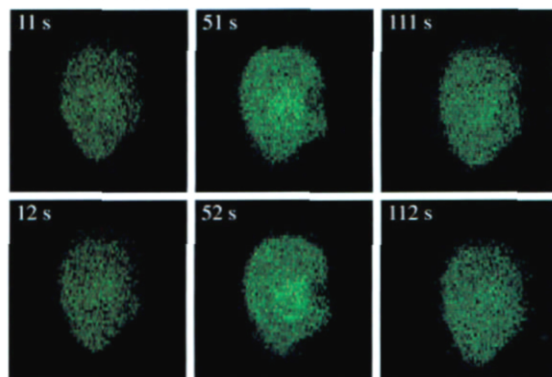


图3 Ca<sup>2+</sup>浓度变化的细胞荧光图像

Fig 3 Cell fluorescence image of dynamic Ca<sup>2+</sup> concentration

## 3 讨论

尼古丁是烟草中毒性物质的主要成分。孕妇主

动或被动吸烟时，烟雾中的尼古丁可被吸收入血液，并迅速通过胎盘屏障进入胎儿体内，对其生长发育产生不利影响。关于尼古丁损害牙齿发育，很早就有学者通过流行病学调查报道了这一现象，后来动物实验研究进一步证实尼古丁确实可损害鼠牙齿发育<sup>[2]</sup>，但其损害机制并不清楚。

成牙本质细胞具有分泌牙本质有机基质并促使其矿化的功能，其增殖、分化和矿化是牙齿发育的重要组成部分，该过程受到多种信号分子的协同作用调节而有序进行<sup>[3]</sup>。一旦出现异常可导致牙本质形成缺陷或矿化不良，牙齿发育异常，本实验结果显示，质量浓度为100 μg/mL尼古丁能够显著抑制成牙本质细胞的增殖，提示这可能是尼古丁导致牙齿发育异常的一个重要原因。

王小竞<sup>[4]</sup>通过实验观察到牙胚中有烟碱乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR) 7表达，并通过细胞实验证实尼古丁损害牙齿发育受nAChR的介导。那么，尼古丁同nAChR结合后，如何将胞外信号传递到细胞浆及细胞核，并最终对成牙本质细胞增殖产生抑制作用？由于nAChR是一种跨膜的五聚体离子通道，调控着细胞内外多种离子的交换，本实验检测了尼古丁刺激后成牙本质细胞中Ca<sup>2+</sup>浓度的变化情况，结果表明，尼古丁可显著提升细胞中Ca<sup>2+</sup>浓度。

细胞中Ca<sup>2+</sup>浓度的改变是细胞生理功能的重要物质基础，也是多种受体激动后信息传递过程的中心环节，它可由Ca<sup>2+</sup>跨膜转运或细胞内钙池释放、摄取Ca<sup>2+</sup>造成。胞浆内Ca<sup>2+</sup>浓度升高可以激活蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)和钙调节蛋白(calmodulin, CaM)等酶，使多种转录因子磷酸化。在前期研究中发现，转录因子上游刺激因子1(upstream stimulating factor 1, USF1)参与牙齿的发生过程，可调控多种与牙齿发育密切相关蛋白的表达，定位于成牙本质细胞细胞浆，并且在尼古丁刺激作用下可发生核转位<sup>[5]</sup>。目前研究已确定USF1为一种磷蛋白，可被PKC等激酶磷酸化<sup>[6]</sup>。Chen等<sup>[7]</sup>研究发现USF1为Ca<sup>2+</sup>反应性转录因子，可以介导Ca<sup>2+</sup>信号对BDNF等启动子的激活，且其转录激活能力受Ca<sup>2+</sup>信号通路的调节。因而，尼古丁作用于成牙本质细胞后使细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度明显增高，很可能激活PKC等激酶，使胞浆转录因子USF1被磷酸化而发生核转位，从而实现信息从胞外经胞浆向胞核传递。

由于USF1是转录因子，必须在胞核内才可能发

生转录调节作用，并且转录因子USF1在牙齿发育过程中特异地表达于成牙本质细胞，具有调控细胞周期进展、抑制细胞增殖<sup>[8]</sup>等重要功能。因而尼古丁能使成牙本质细胞胞浆内Ca<sup>2+</sup>浓度升高并使转录因子USF1发生核转位<sup>[5]</sup>这两个结果提示，尼古丁可能通过影响转录因子USF1的功能而抑制成牙本质细胞的增殖。

本实验表明，尼古丁能够抑制成牙本质细胞的增殖，这种作用的分子信号传导机制可能为尼古丁与nAChR结合后使成牙本质细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度明显增高，激活PKC等激酶的活性，使胞浆转录因子USF1被磷酸化而发生核转位，从而调控下游与细胞生长相关的基因表达，实现抑制细胞增殖。至于确切的分子级链关系，以及USF1以外是否存在其他的转录因子与信号通路，尚需进一步研究。

### [参考文献]

- [1] Saad AY. Postnatal effects of nicotine on incisor development of albino mouse[J]. J Oral Pathol Med, 1990, 19(9): 426-429.
- [2] Chowdhury IG, Bromage TG. Effects of fetal exposure to nicotine on dental development of the laboratory rat[J]. Anat Rec, 2000, 258(4): 397-405.
- [3] Narayanan K, Srinivas R, Ramachandran A, et al. Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(8): 4516-4521.
- [4] 王小竞. 尼古丁对鼠牙齿发育影响的研究[D]. 西安: 第四军医大学口腔医学院, 2002: 48-80.  
WANG Xiao-jing. Effects of nicotine on mouse tooth development[D]. Xi an: College of Stomatology of The Fourth Military Medical University, 2002: 48-80.
- [5] 吴礼安. 转录因子USF1在小鼠牙齿发育中的作用研究[D]. 西安: 第四军医大学口腔医学院, 2003: 73-77.  
WU Li-an. Role of transcription factor USF1 during mouse tooth development[D]. Xi an: College of Stomatology of The Fourth Military Medical University, 2003: 73-77.
- [6] Xiao Q, Kenessey A, Qjamaa K. Role of USF1 phosphorylation on cardiac alpha-myosin heavy chain promoter activity[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283(1): 213-219.
- [7] Chen WG, West AE, Tao X, et al. Upstream stimulatory factors are mediators of Ca<sup>2+</sup>-responsive transcription in neurons[J]. J Neurosci, 2003, 23(7): 2572-2581.
- [8] Qyang Y, Luo X, Lu T, et al. Cell-type-dependent activity of the ubiquitous transcription factor USF in cellular proliferation and transcriptional activation[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(2): 1508-1517.

(本文编辑 王 晴)