

牙龈卟啉单胞菌对兔血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响

赵瑜敏, 张明珠, 税艳青, 彭 艺, 马建薇, 雷雅燕
(昆明医科大学附属口腔医院口腔内科, 云南 昆明 650031)

[摘要] **目的** 研究牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*) 上清液对兔血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响. **方法** 组织块法进行兔腹主动脉 VSMCs 的原代培养, 复苏培养 *P. gingivalis* 标准菌株, 不同浓度细菌上清液刺激细胞 48 h, MTT 法检测细菌上清液对细胞增殖的影响; 爬片法检测 7 d 内 4.3×10^6 CFU/mL 的 *P. gingivalis* 上清对细胞迁移的影响. **结果** 浓度高于 4.3×10^6 CFU/mL 的 *P. gingivalis* 上清液能抑制 VSMCs 的增殖; 4.3×10^6 CFU/mL *P. gingivalis* 上清液作用于 VSMCs 前 4 d 能促进 VSMCs 的迁移, 明显高于对照组 ($P < 0.05$). **结论** 高于 4.3×10^6 CFU/mL 的 *P. gingivalis* 上清液能抑制 VSMCs 的增殖, 4.3×10^6 CFU/mL *P. gingivalis* 上清液可促进血管平滑肌早期的迁移, 从而在动脉粥样硬化的发生发展过程中可能发挥一定的作用.

[关键词] 牙龈卟啉单胞菌; 兔血管平滑肌细胞; 细胞迁移; 细胞增殖

[中图分类号] R781.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2013) 03 - 0022 - 04

Effects of Proliferation and Migration on the Vascular Smooth Muscle Cells of Rabbit Stimulated by *Porphyromonas gingivalis*

ZHAO Yu - min, ZHANG Ming - zhu, SHUI Yan - qing, PENG Yi, MA Jian - wei, LEI Ya - yan
(Dept .of Conservative dentistry, The Stomatology Affiliated Hospital of Kunming Medical University,
Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects of proliferation and migration on the rabbit vascular smooth muscle cells stimulated by the supernatant of *Porphyromonas gingivalis*. **Methods** Tissue block method was used to primary culture the VSMCs derived from rabbit abdominal aorta. The standard *P. gingivalis* lines was resuscitated and cultured. The MTT was employed to assay the proliferation of VSMCs stimulated for 48h by the supernatant. Measured the distances of VSMCs by climbing film law in 7 days after the treatment of the 4.3×10^6 CFU/mL *P. gingivalis* supernatant. **Results** The concentrations higher than 4.3×10^6 CFU/ml *P. gingivalis* supernatant could obviously inhibited the proliferation of VSMCs. And after the treatment of 4.3×10^6 CFU/mL *P. gingivalis* supernatant in 4 days, the migration distance of VSMCs was significant higher than the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** The concentrations higher than 4.3×10^6 CFU/mL *P. gingivalis* supernatant could inhibit the proliferation of VSMCs. 4.3×10^6 CFU/mL *P. gingivalis* supernatant could improve its early migration. So the *P. gingivalis* may play the role in the progress of the generation and development of the AS.

[Key words] *Porphyromonas gingivalis*; Rabbit vascular smooth muscle cells; Cell migration; Cell proliferation

牙周病 (Periodontal diseases) 是发生于牙周组织的以微生物为始动因子的感染性疾病, 造成牙周支持组织破坏, 牙周附着丧失, 最终导致牙齿

脱落. 牙周病是口腔的常见病和多发病, 其与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的相关性研究已经成为热点. 牙龈卟啉单胞菌 (*porphyromonas gin-*

[基金项目] 云南省科技厅省校联合专项基金资助项目 (2008CD057; 2010CD214)

[作者简介] 赵瑜敏 (1984~), 男, 云南宜良县人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事口腔内科临床工作.

[通讯作者] 雷雅燕. E-mail: yayanlei@yahoo.com.cn

givalis, *P. gingivalis*) 是牙周病的主要致病菌之一, 能表达多种毒力因子. 目前很多临床实验及动物实验研究发现在动脉粥样斑块中存在 *P. gingivalis* 的 DNA^[1-3]. 血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 是构成动脉中膜的主要细胞, 在 AS 发生发展过程中, 中膜 VSMCs 迁移至动脉内膜, 表型发生转化, 由收缩表型退化为合成表型^[4], 合成分泌大量细胞外基质及细胞因子, 促进了 AS 病变的发展和心血管事件的发生. 本研究利用 Pg 标准菌株的上清液刺激体外培养的兔血管平滑肌细胞, 观察其对细胞增殖及迁移的情况, 为探讨牙周炎和动脉粥样硬化的可能的相关机制提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

牙龈卟啉单胞菌 ATCC 33277 株 (四川大学华西口腔医院国家重点实验室); 脑心浸液液体培养基 (无琼脂) BHI (美国 BD 公司); 厌氧菌血琼脂培养基 (CDC) (杭州天和微生物生物试剂有限公司); 液体硫乙醇酸盐培养基 (FT) (杭州天和微生物生物试剂有限公司); 维生素 K1 (天津药业集团新郑股份有限公司); 羊血 (昆明医科大学动物科); 隔水式电恒温培养箱 (上海市跃进医疗器械一厂); BIOFUGE PRIMO R 离心机 (美国 Thermo Scientific 公司); 超净台 (苏州净化设备厂); DMEM/F12 培养基 (美国 HyClone 公司); 胰蛋白酶-EDTA 消化液、胎牛血清、双抗 (美国 Solarbio 公司); 倒置显微镜及显微镜摄像系统 (日本 Nikon 公司); 鼠抗人肌动蛋白 Actin 免疫组化单克隆抗体 (福建迈新); 噻唑蓝 (MTT) (美国 sigma 公司); 酶联仪 (美国 Thermo 公司).

1.2 *P. gingivalis* 的培养及上清的提取

P. gingivalis 标准菌株复苏接种于加有羊血及 VitK1 的 CDC 培养板上, 厌氧培养培养 37 °C (5% CO₂) 72 h, 形态学检查后, 挑取菌落在 BHI 液体培养基中增菌 24 h, 取 100 μL 菌液在 FT 中以 1/10 的比例倍比稀释至原始浓度的 10⁻⁷, 取 10⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ 3 个浓度的稀释液各 100 μL 分别在 CDC 培养板上涂板, 培养 48 h 后计数菌落数, 推算出原始菌液的浓度. 其余增菌菌液 8 000 r/min, 4 °C 离心 15 min, 离心后 *P. gingivalis* 上清过滤后分装入 1.5 mL EP 管, -80 °C 保存备用.

1.3 VSMCs 的原代培养及鉴定

体重 2~3 kg 的雄性日本大耳白兔, 麻醉后耳

缘静脉注射空气栓塞处死后, 从腹部切开, 切取 5 cm 的腹主动脉, 装入含双抗的 PBS 中. PBS 洗净后剥去血管外膜, 0.25% 胰酶溶液中剪成约 1 mm × 1 mm 的组织块, 加入约 3 mL 20% FBS 的 DMEM-F12 培养液, 1.5 h 后加入 2.0 mL DMEM-F12 培养基 (含 20% FBS, 1% 双抗), 在 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养, 5 d 换液, 直至细胞游出形成单层, 2.5 g/L 胰酶-EDTA 消化后传代. 取第 3 代细胞进行抗 α-Actin 蛋白免疫组化染色及透射电镜观察鉴定细胞来源. 第 3 代~第 8 代细胞用于实验.

1.4 *P. gingivalis* 对 VSMCs 增殖的影响

将 VSMCs 种植于 96 孔板, 细胞密度为 9 × 10⁵/mL, 每孔加细胞悬液 0.2 mL, 在 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养过夜, 用含 5% FBS 的 DMEM-F12 培养基将提取的 *P. gingivalis* 上清液按 1/2 的比例进行倍比稀释, 从 6.8 × 10⁷ CFU/mL 一直稀释至 1.1 × 10⁶ CFU/mL, 共稀释 6 次. 实验组分为 7 个浓度组, 每个浓度组 6 个孔. 对照组加入含 5% FBS 的 DMEM-F12 培养基 0.2 mL, 培养 48 h 后, 进行 MTT 检测.

1.5 *P. gingivalis* 对 VSMCs 迁移的影响

在玻璃载玻片上用笔划一条线, 载玻片放入玻璃培养皿后高压灭菌, 将 VSMCs 接种于其上, 待细胞长满单层后, 弃培养基, 无菌条件下用棉球沿划线处将一侧的细胞擦去, 实验组加入用含 5% FBS 的 DMEM-F12 培养基稀释至 4.3 × 10⁶ CFU/mL 的细菌上清液, 对照组加入等量的培养基, 实验组和对照组各 6 个爬片, 继续培养 7 d. 从擦去细胞后的第 1 天开始, 每天用倒置显微镜上的测量尺观察细胞迁移情况, 以从划线处到迁移最远的细胞之间的距离作为细胞的迁移距离, 连续观察 7 d.

1.6 统计学分析

应用 SPSS 进行数据分析, 结果均用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组之间的均数比较采用方差分析, 实验组和对照组之间的比较采用独立样本 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 VSMCs 形态观察及细胞鉴定

原代培养 VSMCs, 取材 5~7 d 后组织块周围有细胞游出, 为长梭形或多角形, 继续培养可见细胞复层分布. 约 20 d 后, 细胞长满, 可见细胞呈“峰谷样”生长 (图 1), 传代后细胞生长状态良好 (图 2), 对第 3 代细胞进行抗肌动蛋白 α-Actin 免疫组化染色阳性 (图 3), 透射电镜观察胞浆内见

密斑及肌胞丝，并可见平滑肌细胞的特征性结构 - 密斑 (图 4) .

2.2 P. gingivalis 对 VSMCs 增殖的影响

与对照组相比，P. gingivalis 上清浓度大于 4.3×10^6 CFU/mL 时对 VSMCs 的增殖有抑制作用 ($P < 0.05$)，且抑制作用于浓度成正比， 4.3×10^6 CFU/mL 为对 VSMCs 增殖无抑制作用的最大的 P. gingivalis 上清浓度 ($P > 0.05$)，见图 5.

2.3 P. gingivalis 上清对 VSMCs 迁移的影响

浓度为 4.3×10^6 CFU/mL 的 P. gingivalis 上清刺激细胞 7 d，前 4 d 实验组的细胞迁移距离显著高于对照组 ($P < 0.05$)，从第 5 天开始，二者之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见图 6.



图 1 原代细胞 (×40)

Fig. 1 The primary cells (×40)

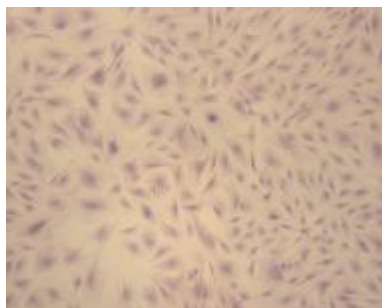


图 2 第 4 代细胞 HE 染色 (×40)

Fig. 2 The fourth generation cells HE staining



图 3 α -Actin 染色阳性 (×100)

Fig. 3 α -Actin positive immunostaining (×100)

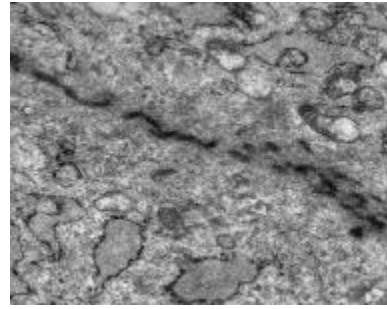


图 4 透射电镜检测结果，胞浆内见密斑及肌胞丝 (×30 000)

Fig. 4 The TEM image,there are dense patches and myofilament in cytoplasm (×30 000)

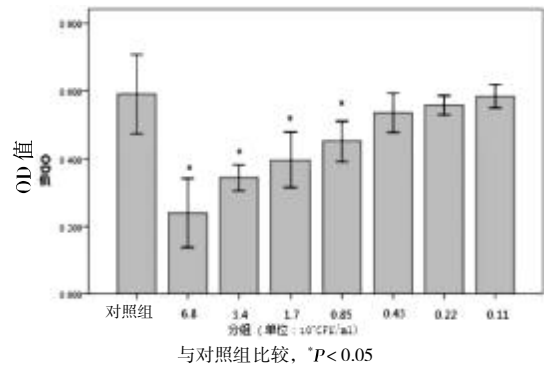


图 5 P. gingivalis 上清液对 VSMCs 增殖的影响

Fig. 5 The effect of P. gingivalis supernatant on VSMCs proliferation.

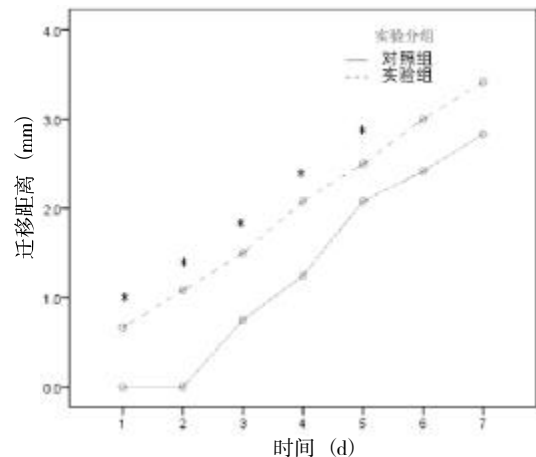


图 6 P. gingivalis 上清对 VSMCs 迁移的影响

Fig. 6 The effect of P. gingivalis supernatant on VSMCs migration.

3 讨论

AS 是严重威胁人类健康的常见病，发展过程虽是一个无症状过程，但斑块的突然破裂却可以触发急性冠脉综合症急性冠状动脉综合征 / 急性冠

状综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 发生, 表现为不稳定心绞痛、急性心肌梗塞和猝死。由于在 ACS 患者血浆中发现存在炎症介质或标记物, 由此认识到 AS 不仅有血脂参与, 而且有炎症参与^[6]。牙周炎是由牙周致病菌导致的一种炎症性疾病, 临床流行病学研究显示牙周炎与动脉粥样硬化之间存在着明显的相关性, 临床实验及动物实验均发现在动脉粥样斑块中存在牙周致病菌的感染, 因此, 牙周炎已被认为是心血管疾病独立的危险因素之一^[6]。牙龈卟啉单胞菌是目前 *P. gingivalis* 是目前公认的引起牙周炎的常见致病菌, 这种细菌表达多种潜在的毒力因子, 包括菌毛 (Fimbriae), 蛋白水解酶 (Proteases), 血凝素 (Hemagglutinins), 脂多糖 (Lipopolysaccharide), 荚膜多糖 (Capsule polysaccharides) 和外膜蛋白 (outer membrane proteins) 等^[7]。鲁维希等^[8]用核磁共振代谢图谱方法研究了 *P. gingivalis* 等牙周致病菌的细菌的 BHI 增菌液 4℃, 15 000 r/min 离心 10min 后的细菌上清液的核磁共振图谱, 发现细菌代谢图谱谱峰分布与强度有显著的差异, 各自有其特异性的代谢峰或峰群出现。据此可以认为 *P. gingivalis* 菌液高速离心后的上清液内保留了 *P. gingivalis* 的主要致病成份, 它可以很好的代表 *P. gingivalis* 的毒性成份。血管平滑肌细胞是构成大、中动脉血管中膜的重要细胞, 其增殖, 迁移和分泌细胞外基质等功能在 AS 发生发展过程中发挥着重要的作用。因此, 研究 *P. gingivalis* 对 VSMCs 的影响对阐明牙周炎与动脉粥样硬化的关系有着重要的意义。

VSMCs 的增殖是 AS 发展的一个关键因素, 而增殖的平滑肌细胞由血管中层向内膜的迁移是内膜增厚的一个重要机制^[9]。VSMCs 迁移的结果可导致内膜中 VSMCs 的大量积聚和结缔组织的形成, 进而促进新生内膜形成和动脉粥样硬化^[10]。本研究采用 MTT 法观察 *P. gingivalis* 上清液对血管平滑肌的增殖的影响, 结果发现 $> 4.3 \times 10^6$ CFU/mL 的 *P. gingivalis* 上清液均可抑制细胞增殖, 我们推测原因是细菌上清液浓度过高时损害细胞, 从而抑制细胞增殖, 所以选择 4.3×10^6 CFU/mL 为作用浓度, 该浓度不抑制细胞增殖, 应用爬片法^[11]观察了 *P. gingivalis* 上清液对 VSMCs 迁移的影响, 发现 *P. gingivalis* 上清作用前 4 d 能促进 VSMCs 的迁移, 提示 *P. gingivalis* 致病物质可能作为一个刺激因素参与了血管中膜内的 VSMCs 向内膜迁移的早期过

程。因此, 可以认为 *P. gingivalis* 的致病物质可以通过直接刺激血管平滑肌细胞, 促进其迁移, 从而在血管平滑肌细胞由血管中膜向血管内膜迁移方面发挥一定的作用, 这提示牙周致病菌可能通过血液循环直接到达动脉粥样斑块处, 对构成血管的细胞产生直接的毒性作用, 可能是牙周炎与动脉粥样硬化的可能相关机制之一。这也提示临床上对牙周疾病早期诊断和及时治疗对防治动脉粥样硬化等心血管疾病有重要的意义。

[参考文献]

- [1] HAYNES W G, STANFORD C. Periodontal disease and atherosclerosis: from dental to arterial plaque [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(8):1 309 - 1 311.
- [2] LALLA E, LAMSTER I B, HOFMANN M A, et al. Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(8):1 405 - 1 411.
- [3] 张明珠, 梁景平, 李超伦, 等. 牙龈卟啉单胞菌感染兔动脉粥样硬化模型的建立 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2007, 27(6):642 - 645.
- [4] HULTGARDH-NILSSON A, LOVDAHL C, BLOMGREN K, et al. Expression of phenotype and proliferation-related genes in rat aortic smooth muscle cells in primary culture [J]. *Cardiovasc Res*, 1997, 34(2):418 - 430.
- [5] 孟丽, 陈纪林. 炎症、血管平滑肌细胞与动脉粥样硬化斑块 [J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2003, 3(2):107 - 111.
- [6] COTRUTZ C E, MEDRIHAN M, BALATESCU M, et al. Periodontitis, a risk factor for cardiovascular diseases [J]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 1999, 103(3-4):78 - 82.
- [7] STANLEY C, HOLT, LAKSHMYYA KESAVALU, et al. Virulence factors of porphyromonas gingivalis [J]. *Periodontology*, 2000, 1999, 20:168 - 238.
- [8] 鲁维希, 吴亚菲, 肖丽英, 等. 牙周可疑致病菌代谢组学鉴定的初步研究 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2009, 27(3):310 - 312, 316.
- [9] 韩英, 谢良地. 血管平滑肌细胞迁移的调控机制 [J]. *高血压杂志*, 2003, 11(2):98 - 101.
- [10] GRAF K, XI XP, YANG D, et al. Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells [J]. *Hypertension*, 1997, 29(1 Pt2):334 - 339.
- [11] 温进坤, 韩梅. 血管平滑肌细胞 [M]. 北京: 科学出版社, 2005:381 - 384.

(2013-01-01 收稿)