

中图分类号: R965; R285 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)18-0042-05  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.18.010



# 没食子水提物对人牙周膜成纤维细胞生物学活性的影响\*

梁猛猛<sup>1,2</sup>, 李 恺<sup>3</sup>, 赵玉绒<sup>4</sup>, 张若冰<sup>4</sup>, 艾 林<sup>3Δ</sup>

(1. 西北大学生命科学与医学部西部资源生物与生物技术教育部重点实验室, 陕西 西安 710069; 2. 西安未央德雅正尚口腔门诊部, 陕西 西安 710018; 3. 中国人民解放军空军军医大学第九八六医院, 陕西 西安 710054; 4. 陕西省药品监督管理局, 陕西 西安 710065)

**摘要:**目的 探讨没食子水提物在防治口腔炎症性疾病中的作用。方法 分离培养人牙周膜成纤维细胞(HPDLF), 设立阴性对照组(PBS)、脂多糖组(1 μg/mL)、没食子组(10 mg/mL)、氯己定组(0.2%, m/m)。对没食子水提物粉末进行大体检查, 采用扫描电子显微镜观察没食子水提物粉末的微观特征。采用 MTT 法检测细胞活力, XTT 法检测细胞增殖水平, 以划痕伤口愈合迁移试验考察细胞迁移情况, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测白细胞介素 1β(IL-1β)、白细胞介素 6(IL-6)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)表达水平。结果 没食子水提物粉末大体检查及显微特征明显。没食子组细胞活力显著高于其他组( $P < 0.05$ )。给药后第 3, 5, 7 天, 没食子组 HPDLF 增殖水平显著高于其他组( $P < 0.05$ )。与阴性对照组比较, 没食子组 IL-1β、IL-6、TNF-α 的表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。没食子组细胞 24 h 划痕伤口几乎完全闭合。结论 没食子水提物可减轻 HPDLF 相关炎症反应。

**关键词:** 没食子; 牙周炎; 人牙周膜成纤维细胞; 生物学活性; 炎症反应

## Effect of Water Extract of Galla Turcica on the Biological Activity of Human Periodontal Ligament Fibroblasts

LIANG Mengmeng<sup>1,2</sup>, LI Kai<sup>3</sup>, ZHAO Yurong<sup>4</sup>, ZHANG Ruobing<sup>4</sup>, AI Lin<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Western Resource Biology and Biotechnology, Department of Life Sciences and Medicine, Northwest University, Ministry of Education, Xi'an, Shaanxi, China 710069; 2. Xi'an Weiyang Deya Zhengshang Dental Clinic, Xi'an, Shaanxi, China 710018; 3. The No. 986 Air Force Hospital of Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, China 710054; 4. Shaanxi Medical Products Administration, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

\* 基金项目: 陕西省科技计划项目[2023-YBSF-175]; 陕西省中医药管理局秦创原中医药创新研发转化项目[2022-QCYZH-011]; 中国人民解放军空军军医大学军事医学提升计划项目[2021JSTS26]。

第一作者: 梁猛猛, 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为口腔诊疗技术及材料应用, (电子信箱)253923331@qq.com。

Δ通信作者: 艾林, 男, 博士, 副主任医师, 研究方向为口腔内科学及口腔生物力学, (电子信箱)173861355@qq.com。

- [4] 罗 铮, 邓 雯, 张前亮, 等. 基于中药 QbD 理念的当归破壁粉质量评价研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(5): 1105-1113.
- [5] 陶文平, 赵淑梅. 三种西洋参破壁饮片质量对比研究[J]. 黑龙江科学, 2018, 20(9): 46-47.
- [6] 雷夏凌, 杨 威, 柳 璐, 等. 中药破壁饮片非临床安全性评价的关注点[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(11): 2724-2725.
- [7] 张 宁, 徐 剑, 缪艳燕, 等. 薏苡仁破壁饮片质量标准研究[J]. 中国药业, 2022, 31(10): 74-78.
- [8] 李友露, 徐 剑, 缪艳燕, 等. 基于高效液相色谱指纹图谱和多成分含量的淫羊藿传统饮片、破壁粉与破壁饮片比较[J]. 中国药业, 2022, 31(9): 44-49.
- [9] 李广雷, 张志超, 魏雅蕾, 等. HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> 法测定大鼠口服西洋参枸杞子胶囊后入血成分[J]. 中医药学报, 2016, 44(1): 15-17.
- [10] 张楠淇, 李平亚, 王翠竹, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 分析西洋参总皂苷的入血成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 117-124.
- [11] 范利荣, 史海明, 李晓波. 人参皂苷的体外模拟代谢及转化研究进展[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(15): 2021-2026.
- [12] 吕 莉, 孙慧君, 韩国柱. 中药药代动力学的研究进展[J]. 药学报, 2013, 48(3): 824-826.
- [13] ZHI HJ, LI ZW, DENG YP, et al. Comparative *in vivo* constituents and pharmacokinetic study in rats after oral administration of ultrafine granular powder and traditional decoction slices of Chinese *Salvia* [J]. Biomed Chromatogram, 2019, 33(2): 325-328.
- [14] XIE L, LIU X, ZHU X, et al. Development of an UHPLC-MS/MS method for comparative pharmacokinetics of nine anthraquinones in rats and application to dosage conversion between different Semen Cassiae forms [J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 174: 696-706.
- [15] 成金乐, 彭丽华, 邓 雯, 等. 中智中药破壁饮片量效关系初探[J]. 世界中医药, 2016, 11(3): 529-532.
- [16] 李德成, 刘庆燕. 超微粉碎技术在中药制剂中广泛应用的优越性[J]. 世界中医药, 2011, 6(5): 454-455.
- [17] 徐浩淇, 陈 莎, 章 军, 等. 西洋参破壁饮片、粗粉与传统饮片中人参皂苷的体外溶出度比较[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2576-2581.

(收稿日期: 2023-08-24; 修回日期: 2024-05-07)

**Abstract: Objective** To investigate the role of water extract of *Galla Turcica* in the prevention and treatment of oral inflammatory diseases. **Methods** The human periodontal ligament fibroblasts (HPDLFs) were isolated and cultured, and divided into the negative control group (PBS), the lipopoly saccharide group (1  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), the *Galla Turcica* group (10  $\text{mg} / \text{mL}$ ), and chlorhexidine group (0.2%, *m / m*). The gross examination was performed on the water extract powder of *Galla Turcica*, the scanning electron microscope (SEM) was used to observe the microscopic characteristics of the the above water extract powder. The MTT assay was used to measure cell viability, the XTT assay was used to detect cell proliferation level, the wound healing assay was used to investigate cell migration, and the enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expression levels of interleukin - 1 $\beta$  (IL - 1 $\beta$ ), interleukin - 6 (IL - 6), and tumor necrosis factor -  $\alpha$  (TNF -  $\alpha$ ). **Results** The gross examination and characteristics microscopic characteristics of water extract powder of *Galla Turcica* were obvious. The cell viability in the *Galla Turcica* group was significantly higher than that in the other groups ( $P < 0.05$ ). On the 3rd, 5th, and 7th days after administration, the proliferation level of HPDLFs in the *Galla Turcica* group was significantly higher than that in the other groups ( $P < 0.05$ ). Compared with those in the negative control group, the expression levels of IL - 1 $\beta$ , IL - 6 and TNF -  $\alpha$  in the *Galla Turcica* group significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The wound healing assay after 24 h showed that the scratch wound in the *Galla Turcica* group almost completely healed. **Conclusion** The water extract of *Galla Turcica* can relieve the inflammatory reactions of HPDLFs.

**Key words:** *Galla Turcica*; periodontitis; human periodontal ligament fibroblast; biological activity; inflammatory reaction

牙周病是由牙周致病菌、机体免疫反应和口腔环境影响导致的牙周组织(牙周膜、牙槽骨、牙骨质)破坏,病理过程主要是通过免疫因子介导免疫细胞在牙周组织中浸润、转移和集聚,其破坏程度取决于细菌的种类及数量、宿主对细菌感染的免疫反应和环境因素之间的动态平衡<sup>[1-2]</sup>。人牙周膜成纤维细胞(HPDLF)是牙周组织的重要组成部分,不仅能合成胶原、基质、弹力纤维和糖蛋白,吸收胶原吞噬异物,还参与牙周组织的病变、修复及再生过程,并可调节牙周组织的免疫反应<sup>[3-4]</sup>。牙菌斑为牙周病的始动因素,故控制牙菌斑对于牙周炎的防治有重要作用。目前主要采取机械方式去除或控制牙菌斑,有时也使用化学制剂预防,但化学制剂可能造成牙齿染色、口腔黏膜溃疡等不良反应。近年来天然草药因具有的活性成分性质温和、效果持久且不产生耐药性的优势,应用范围不断扩大。且其纳米化后将导致药物的物理和生物特性发生重要变化,可提高机体的吸收率和生物利用度,增强疗效,减少毒副作用。没食子为口腔疾病治疗常用药材<sup>[5]</sup>,有效成分主要为鞣质、酚酸及其酯类、黄酮类、甾体类及微量元素等。具有固涩、收敛、燥湿、止血、消炎作用,已被证实有抗炎、抗肿瘤、抗氧化和抗菌的药理作用<sup>[6-7]</sup>。本课题组前期研究结果提示,没食子对牙周炎性组织有显著修复作用<sup>[8-10]</sup>,但目前对其在口腔牙周组织疾病诊疗过程中的机理和作用研究较少。在此,拟评估没食子提取物对HPDLF作用,并检测其对口腔黏附分子、炎性因子表达水平的影响,为开发新型口腔没食子药物提供理论依据。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

仪器: NanoDrop One OneC 型酶标仪(美国 Bio -

Rad 公司); IXplore Standard 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司); Heracell VIOS 160i 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司); TY - 7002 型小型粉碎机(江苏天源试验设备有限公司)。

试剂: 20% 葡萄糖酸氯己定(上海麦克林生化科技有限公司,批号为 C832370); 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号为 11585878001)、胎牛血清(批号为 12103C)、汉克斯平衡盐溶液(HBSS,批号为 H6648)、细胞增殖试剂盒 II (XTT,批号为 11465015001)、噻唑盐(MTT)试剂盒(批号为 M5655)、胰蛋白酶(批号为 T2600000)、DMEM 培养基(批号为 D0819)、白细胞介素 1 $\beta$  (IL - 1 $\beta$ ,批号为 RAB0273)、白细胞介素 6 (IL - 6,批号为 RAB0283)和肿瘤坏死因子 -  $\alpha$  (TNF -  $\alpha$ ,批号为 RAB0476)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒,均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。没食子(新疆奇康哈博维药有限责任公司,批号为 20161112)。

### 1.2 细胞培养

本研究经空军军医大学第九八六医院医学伦理委员会批准(批准号: 202003017),患者均签署知情同意书。收集 9 例患者,男 5 例,女 4 例;年龄 15 ~ 27 岁,平均(17.6  $\pm$  3.5)岁。拔除正畸前磨牙,搔刮牙根获得的正常牙周纤维组织。使用无血清 DMEM 的培养液冲洗组织 3 次,将牙龈组织剪碎成为 1 ~ 3  $\text{mm}^3$  的碎块,置 CO<sub>2</sub> 培养箱(5%CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}\text{C}$ 、饱和湿度)中厌氧培养。细胞贴壁后隔日少量换液,细胞组织出现融合后使用胰蛋白酶消化法处理细胞,每周传代 1 次,使用第 2 - 3 代细胞, - 80  $^{\circ}\text{C}$  低温冰冻保存。实验前复苏细胞,置 CO<sub>2</sub> 培养箱(5%CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 95%)中培养(含 DMEM 培养基、0.25% 胰蛋白酶、100 U / mL 青霉素、100  $\text{mg} / \text{mL}$  链霉素、2  $\text{mmol} / \text{L}$  L - 谷氨酰胺和 0.25  $\text{mg} / \text{mL}$  酮康唑)。

### 1.3 样品制备与分组

取没食子药材适量,以高速粉碎机粉碎,过80目筛,与水按料液比1:10(g/mL)于80℃浸提3次,每次1h。冷却、滤过,旋转蒸发器浓缩,80℃烘干,得没食子水提物粉末<sup>[5-7]</sup>,与HBSS溶液混合得样品溶液。设立阴性对照组(PBS)、脂多糖组(1 μg/mL)、没食子组(10 mg/mL);氯己定组(0.2%,m/m)。

### 1.4 观察指标

肉眼观察及微观特征:对没食子水提物粉末进行大体检查并拍照鉴定,并采用扫描电子显微镜观察其微观特征。

细胞活力:采用MTT法。将细胞以 $0.1 \times 10^6$ 个/mL的密度接种于24孔板,分别加入各组溶液1 mL,CO<sub>2</sub>培养箱(5%CO<sub>2</sub>、37℃、相对湿度95%)培养24 h,检测570 nm波长处光密度(OD<sub>570</sub>)。重复3次,计算平均值。

细胞增殖:采用XTT法。将细胞以 $5 \times 10^3$ 个/mL的密度接种于96孔板,并加入100 μL DMEM和10%FBS,CO<sub>2</sub>培养箱(5%CO<sub>2</sub>、37℃、饱和湿度)培养24 h。分别于第1,3,5,7天吸去溶液,加入XTT试剂,CO<sub>2</sub>培养箱(5%CO<sub>2</sub>、37℃、相对湿度95%)培养4 h后测定450 nm波长处光密度(OD<sub>450</sub>),重复3次,计算平均值。

炎症因子表达:采用ELISA法。加入相应溶液(100 μL/孔),加入酶标抗体工作液(50 μL/孔),并设空白对照。用封板胶纸封住反应孔,室温孵育180 min,充分混匀、振荡(1 000 r/min)。加入显色剂100 μL/孔,避光,室温孵育20~25 min。加入终止液100 μL/孔,混匀,以酶标仪检测IL-1β、IL-6、TNF-α OD<sub>450</sub>值。

细胞迁移:采用划痕伤口愈合迁移试验。将HPDLF以 $10^6$ 个/mL的密度接种于24孔板,室内环境下37℃培养48 h。迁移细胞至DMEM培养基,室温培养4 h,使用10 μL移液管尖(直径为700~900 μm)划过培养基,PBS洗去细胞碎片。分别加入没食子水提物和氯己定溶液培养24 h、48 h,使用显微镜观测伤口宽度,计算伤口闭合度(伤口加样前后的宽度差)。

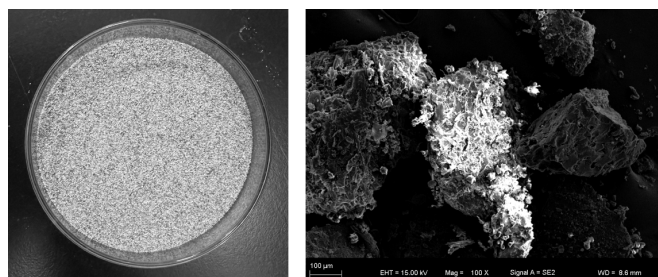
### 1.5 统计学处理

采用SPSS 21.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大体观察及微观特征

没食子水提物粉末呈黄褐色,微香,味微甜。SEM结果显示,粉末直径均小于300 μm。粉末图片见图1。



A. 肉眼观察 B. 扫描电子显微镜观察

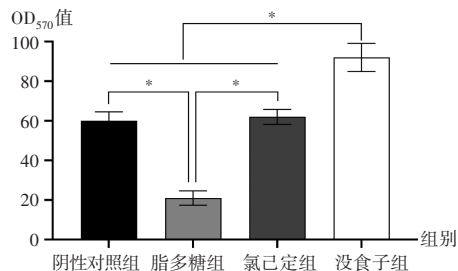
图1 没食子水提物粉末图片

A. Visual image B. SEM image

Fig. 1 Images of water extract powder of Galla Turcica

### 2.2 细胞活力

没食子组细胞活力显著高于其他组( $P < 0.05$ ),脂多糖组细胞活力显著低于阴性对照组与氯己定组( $P < 0.05$ )。详见图2。



注: \* $P < 0.05$ 。

图2 细胞活力检测结果

Note: \* $P < 0.05$ 。

Fig. 2 Results of cell viability detection

### 2.3 细胞增殖

细胞培养第3,5,7天时,没食子组细胞增殖程度显著高于其他组( $P < 0.05$ ),而脂多糖组显著低于阴性对照组与氯己定组( $P < 0.05$ )。详见图3。

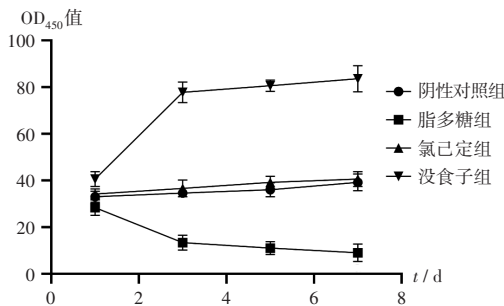


图3 细胞增殖检测结果

Fig. 3 Results of cell proliferation detection

### 2.4 炎症因子表达

与阴性对照组比较,脂多糖组IL-1β、IL-6和TNF-α的表达水平显著升高( $P < 0.05$ ),没食子组和氯己定组3指标表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。详见表1。

### 2.5 细胞迁移

没食子组24 h后划痕伤口几乎完全闭合,氯己定组和阴性对照组划痕无显著变化。详见图4。

表1 各组细胞炎性因子表达水平比较( $\bar{X} \pm s$ )

Tab.1 Comparison of expression levels of inflammatory factors in different groups ( $\bar{X} \pm s$ )

组别	IL - 1 $\beta$	IL - 6	TNF - $\alpha$
阴性对照组	1.53 $\pm$ 0.12	25.55 $\pm$ 4.36	166.57 $\pm$ 12.82
脂多糖组	5.24 $\pm$ 0.46 <sup>#</sup>	81.27 $\pm$ 6.73 <sup>#</sup>	456.11 $\pm$ 29.29 <sup>#</sup>
没食子组	0.86 $\pm$ 0.21 <sup>#</sup>	14.33 $\pm$ 2.79 <sup>#</sup>	108.61 $\pm$ 21.45 <sup>#</sup>
氯己定组	0.67 $\pm$ 0.13 <sup>#</sup>	11.88 $\pm$ 1.92 <sup>#</sup>	99.53 $\pm$ 13.21 <sup>#</sup>

注:与阴性对照组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

Note:Compared with those in the negative control group,<sup>#</sup> $P < 0.05$ .

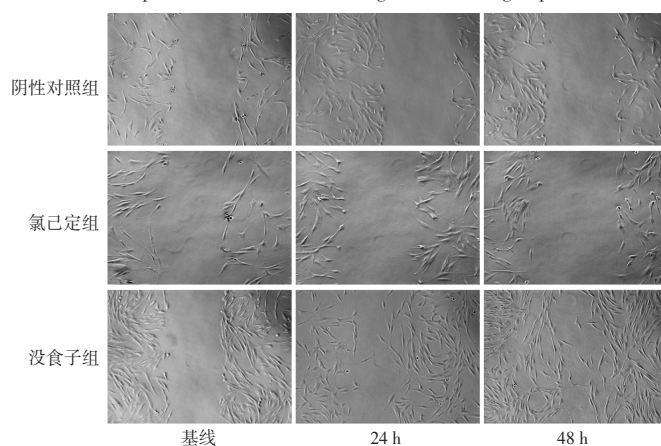


图4 细胞迁移情况

Fig.4 Cell migration

### 3 讨论

没食子为雌性没食子蜂在没食子树中繁殖产卵,幼虫成熟穿孔飞离后残留的虫瘿<sup>[11]</sup>,主治湿热疾病,如牙龈肿痛等<sup>[12]</sup>。主要含有鞣质、酚酸等成分,可抗炎、收敛、镇痛<sup>[13-14]</sup>。本研究中,样品溶液以HBSS和没食子水提物混合制备,HBSS具有生理pH和渗透压,含糖及钠、钙、钾和磷酸盐等细胞代谢物<sup>[15]</sup>。以HBSS作溶剂,可将其细胞培养液的特性与没食子水提物的抗炎、抗菌和促进组织修复的特点相结合,提高疗效。

有研究报道,HPDLF活力检测可通过台盼蓝染色法测定原代细胞得到,由于单个拔除牙齿所能提供的原代细胞数量过少,该方法无法评估细胞的生理健康或增殖能力<sup>[16]</sup>。本研究中使用传代培养的HPDLF,避免了拔牙技术和患者机体差异带来的影响。预试验中考察了0,5,10,20,40,60,80,100 mg/mL质量浓度下样品溶液,5%CO<sub>2</sub>、温度37℃、相对湿度95%条件下培养细胞24h,结果显示,没食子水提物质量浓度为10 mg/mL时细胞活力最强。细胞活力研究结果显示,没食子组细胞活力显著高于其他组。本研究中使用灵敏度更高的XTT法评估细胞增殖能力,对线粒体脱氢酶活性的测量可定量显示细胞的生理状况信息。结果显示,没食子水提物可提高HPDLF的增殖水平。体外划痕伤口愈合试验结果,没食子组与氯己定组有显著差异,提示没食子

水提物可刺激组织中细胞的活性与迁移。

LPS是革兰氏阴性菌外膜的重要组成部分,通过toll样受体、白细胞介素、二十烷酸和一氧化氮(NO)的分泌促进细胞信号转导<sup>[17]</sup>,选取的炎性细胞因子中,TNF- $\alpha$ 可通过上调其他促炎性细胞因子(如IL-6、IL-1)诱导血管生成和活化,从而导致炎性因子水平升高<sup>[18]</sup>;IL-1 $\beta$ 、IL-6起到了促炎性细胞因子的启动和增强作用<sup>[19]</sup>。同时发现,LPS是满足实验要求的促炎性细胞因子,没食子水提物则可显著降低炎性细胞因子的表达水平。

综上所述,本研究中证实了没食子水提物可提高HPDLF活力、增殖能力,并下调炎性细胞因子水平,从而显著减轻牙周炎组织病变程度,促进牙周组织修复。

### 参考文献

- [1] FINKELMAN RD. Defining periodontitis[J]. J Am Dent Assoc, 2019,150(4):241-242.
- [2] 孟红军,王守儒. 养阴清火方治疗慢性牙周炎疗效及对患者TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6影响的研究[J]. 陕西中医, 2018,39(12):1731-1734.
- [3] DE ANGELIS F, MANDATORI D, SCHIAVONE V, et al. Cytotoxic and Genotoxic Effects of Composite Resins on Cultured Human Gingival Fibroblasts[J]. Materials (Basel), 2021,14(18):5225.
- [4] SZKARADKIEWICZ - KARPINSKA AK, SZKARADKIEWICZ A. Effect of exopolysaccharides from cariogenic bacteria on human gingival fibroblasts[J]. Int J Med Sci, 2021,18(12):2666-2672.
- [5] 艾林,高鹏,李恺,等. 没食子水提物对实验性牙周炎的改善作用[J]. 中国药业,2021,30(20):39-43.
- [6] 高鹏,李恺,张若冰,等. 没食子水提物对钛表面念珠菌生物膜的抑制作用[J]. 中国药业,2021,30(16):62-64.
- [7] 徐娜,李恺,高鹏,等. 没食子水提取物对人牙龈上皮角质形成细胞的体外影响[J]. 中国药业,2022,31(9):60-64.
- [8] 张小莉. 没食子中没食子酸提取及抑菌效力比较[J]. 海峡药学,2021,33(2):76-78.
- [9] MA X, HAO M, ZHANG MH, et al. Integrated strategy of network analysis prediction and experimental validation to elucidate the possible mechanism of compound Turkish gall ointment in treating eczema[J]. Chin Med, 2022,17(1):89.
- [10] ZHOU XY, XIE F, JIANG M, et al. Physicochemical properties and lead ion adsorption of biochar prepared from Turkish gall residue at different pyrolysis temperatures[J]. Microsc Res Tech, 2021,84(5):1003-1011.
- [11] 鲁梦琪. 没食子超微粉体理化特性及生物活性研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2019.
- [12] 郭兰忠. 现代实用中药学[M]. 北京:人民卫生出版社,1999:59.
- [13] 陈静梅,郝二伟,杜正彩,等. 基于化学成分、药理作用和网