

压力环境对人牙周膜成纤维细胞碱性磷酸酶活性的影响

碱性磷酸酶(ALP)被认为与体内骨组织的形成有关,是研究成骨细胞功能和分化的一个重要参考指标。众多研究表明,牙周膜成纤维细胞(PLF)不同于一般成纤维细胞,具有许多与成骨细胞相似的特征,如高ALP活性等。颌力是否会对PLF的ALP活性产生影响,从而影响牙周组织的改建,目前这一方面的研究尚少。本研究旨在观察压力对体外培养的人牙周膜成纤维细胞(HPLF)ALP活性的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

主要试剂有DMEM培养液(Gibco, USA)、胎牛血清(Hyclone, USA),对硝基苯基磷酸二钠(p-NPP)(Amresco, USA)、胰蛋白酶(Sigma, USA)。酶联免疫检测仪(为美国Lambda公司产品)。

1.2 细胞加载装置的设计原理

本实验所采用的可控液压细胞加载装置由本课题组自行研置。由储气室、加载室(样品室)、压力自动控制系统、温控装置及加压气流量调控器和减压气流量调控器组成。其工作原理为:储气室内的高压洁净气体由加压气流量调控器调控,以稳定的流量进入加载室。当加载室内的气压达到预定值时,压力自动控制系统会自动关闭进气口,加载室内形成稳定的密闭环境,气压作用于细胞培养液,从而对细胞产生稳定的液压。实验完毕,气体经由减压气流量调控器排出。所用气体为洁净的含2%CO₂的压缩空气。保证加压后培养液pH值稳定在7.2~7.4。实验过程中温控装置使加载室温度恒定在37℃。流程图见图1。

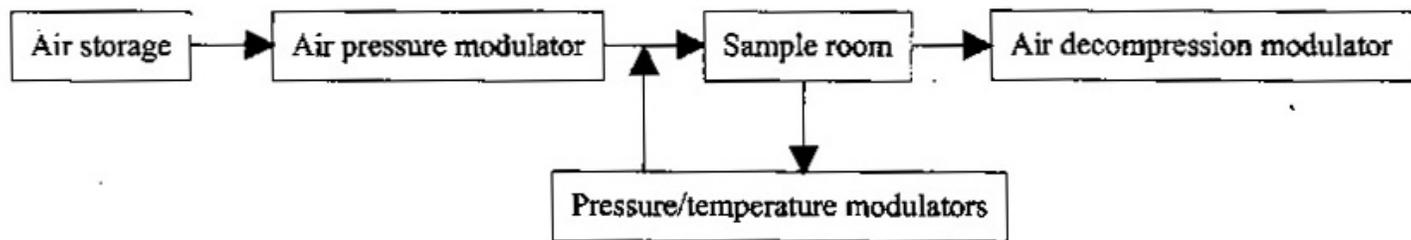


图1 细胞加载装置工作流程图

Fig.1 Schematic chart of the pressure-loading apparatus

1.3 细胞培养

选取因正畸拔除的青少年前磨牙,无菌条件下刮取根中1/3的牙周膜组织。采用组织块法[1]原代培养HPLF。细胞培养液为含10%FBS的DMEM。将第4代细胞用于实验。本组细胞鉴定结果为:角蛋白染色阴性(小鼠抗角蛋白单抗,ABC法免疫组化染色);波形丝染色阳性(小鼠抗波形丝单抗,ABC法免疫组化染色)。

1.4 细胞加压及ALP活性测定

取生长状态良好的细胞以 2×10^4 /孔接种于24孔培养板上,待细胞完全贴壁后,将培养液换为含2%FBS的DMEM。然后分为4组,每组4孔。第1~3组在100 kPa压强下分别加载20 min、1 h、12 h。第4组为对照组(未加压)。加载完毕后,弃除原培养液,用pH 7.4的PBS洗2遍,吸干,每孔加入2 g/L p-NPP的AMP液200 μ l,37℃孵箱内置30 min。每孔加入0.2 mol/L NaOH 50 μ l 终止反应。410 nm波长测各孔D(λ)值。

将加载压强分别换为200、300、400、500 kPa,重复以上步骤。

1.5 统计学处理

采用单因素方差分析进行统计学处理。

各对照组均能稳定表达碱性磷酸酶活性。在100及200 kPa加载负荷时,各实验组ALP活性均无明显变化。负荷为300 kPa时,20 min及1 h组无明显变化,而12 h组ALP活性有轻度下降($P<0.05$)。当负荷加大到400及500 kPa时,各加压时段ALP活性与对照组相比均有显著降低($P<0.05$),而各时段间无显著差异(表1)。

表 1 不同压力在不同作用时间下对人牙周膜成纤维细胞碱性磷酸酶活性的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Effects of varied pressure for different duration on alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament fibroblasts (*Mean \pm SD*)

Loading time	Pressure (kPa)				
	100	200	300	400	500
Control (without loading)	0.174 \pm 0.012	0.184 \pm 0.003	0.190 \pm 0.005	0.183 \pm 0.020	0.192 \pm 0.019
20 min	0.166 \pm 0.005	0.172 \pm 0.006	0.180 \pm 0.006	0.132 \pm 0.016*	0.126 \pm 0.006*
1 h	0.162 \pm 0.010	0.181 \pm 0.008	0.191 \pm 0.002	0.129 \pm 0.005*	0.116 \pm 0.008*
12 h	0.163 \pm 0.005	0.174 \pm 0.002	0.169 \pm 0.003*	0.138 \pm 0.003*	0.119 \pm 0.016*

* $P<0.05$ vs control

3 讨论

ALP是参与骨钙化组织代谢和再生的一种功能性标志酶,ALP活性较高则该组织具有较强的钙化及成骨能力。Kawase[2]研究表明,HPLF的ALP活性普遍高于其他软组织细胞,甚至达到10倍于牙龈成纤维细胞。Somerman[3]也证实HPLF具有较高的ALP活性,同时在钙化活跃的牙周组织中,HPLF的ALP活性显著高于正常水平。Piche[4]则报告牙周膜细胞具有一定的成骨细胞性质,其ALP与成骨细胞的ALP具有相同性质。这些研究表明,HPLF的ALP活性在牙周组织的钙化过程中起重要作用。

牙周膜是位于牙槽骨和牙骨质两种硬组织之间的结缔组织膜。在咀嚼过程中,牙周膜对咀嚼压力能起缓冲作用,同时将所受力的一部分传递到牙槽骨上,因此PLF在口腔环境中经常受到压力作用。压力是否对HPLF的ALP活性产生影响进而调控牙周组织的钙化,以及这种影响的程度有多大,国内外尚无系统研究。体外研究机械压力对培养细胞生命活动影响的前提是建立较好的细胞加载装置,目前相关试验大多是采用Banes等[5]推出的Flexercell Strain Unit细胞加载系统。Yamaguchi等[6]用该系统观察到机械牵张力作用使PLF前列腺素E合成增加。但该系统的细胞受力情况受弹性硅橡胶膜的理化性能影响较大,同时该系统所提供的机械牵张力不能很好地模拟体内环境。HPLF在体内的外环境为组织液,组织液可传递和缓冲细胞所受应力,组织液通过液压变化将牙齿所受的力传递至HPLF。因此,液压对HPLF的ALP活性的影响能更好地反应口内实际情况。Yousefian等[7]报道液压对PLF的代谢活动有明显影响。本试验所采用的加载装置为自行设计,通过精密的自动控制系统对细胞产生可调控的稳定液压,建立了较好的细胞力学实验模型。

本实验结果显示,HPLF本身具有较高的ALP活性,这与国外学者的结论一致。本实验结果还说明HPLF具有一定的压力耐受性,但当压力增加到一定程度时,随着作用时间延长会造成ALP活性降低,压力继续增大则在短时间内就会造成ALP活性显著降低。我们在临床实践中观察到正常颌力有助于牙周组织健康,负载过度(咬合高、义齿或矫治器的作用力过大等)均可导致牙周组织破坏,致使牙齿松动。本实验结果可从分子水平解释这一现象:过大颌力将导致PLF的ALP活性降低,影响牙周组织钙化,并导致牙齿松动。因此在临床口腔修复治疗中,必须注意合理恢复颌力,如修复体颌力恢复过大,则有可能使基牙牙周组织钙化受到影响,致使基牙松动,从而导致修复失败。

参考文献:

[1] 吴军正,司徒镇强,陈建元. 体外培养人牙龈牙髓牙周膜成纤维细胞生长及形态特点[J]. 实用口腔医学杂志, 1993,9(4):227.

[2] Kawase T, Sato S, Miake K, et al. Alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells[J]. Adv Dent Res, 1988,2(2):234-9.

[3] Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, et al. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro[J]. J Dent Res, 1988, 67(1):66-70.

[4] Piche JE, Carnes DL Jr, Graves DT. Initial characterization of cells derived from human periodontia[J]. J Den Res, 1989,68(5):761-7.

[5] Banes AJ, Link GW, Gibert JW, et al. Culturing cells in a mechanically active environment: The Flexercell Strain Unit can apply cyclic or static tension or compression to cells in culture[J]. Am Biotech Lab, 1990,8(7):12-22.

[6] Yamaguchi M, Shimizu N, Groseki T, et al. Effect of different magnitudes of tension force on prostaglandin E production by human periodontal ligament cells[J]. Arch Oral Biol, 1994,39(10):877-84.

[7] Yousefian J, Firouzian F, Shanfeld J, et al. A new experimental model for studying the response of periodontal ligament cells to hydrostatic pressure[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1995,108(4):402-9.

参考文献:

[1] 吴军正, 司徒镇强, 陈建元. 体外培养人牙龈牙髓牙周膜成纤维细胞生长及形态特点[J]. 实用口腔医学杂志, 1993,9(4):227.

[2] Kawase T, Sato S, Miake K, et al. Alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells[J]. Adv Dent Res, 1988,2(2):234-9.

[3] Sormerman MJ, Archer SY, Imm GR, et al. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro[J]. J Dent Res, 1988, 67(1):66-70.

[4] Piche JE, Carnes DL Jr, Graves DT. Initial characterization of cells derived from human periodontia[J]. J Den Res, 1989,68(5):761-7.

[5] Banes AJ, Link GW, Gibert JW, et al. Culturing cells in a mechanically active environment: The Flexercell Strain Unit can apply cyclic or static tension or compression to cells in culture[J]. Am Biotech Lab, 1990,8(7):12-22.

[6] Yamaguchi M, Shimizu N, Groseki T, et al. Effect of different magnitudes of tension force on prostaglandin E production by human periodontal ligament cells[J]. Arch Oral Biol, 1994,39(10):877-84.

[7] Yousefian J, Firouzian F, Shanfeld J, et al. A new experimental model for studying the response of periodontal ligament cells to hydrostatic pressure[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1995,108(4):402-9.