

压力环境对人牙周膜成纤维细胞碱性磷酸酶活性的影响

张宇,施生根,张慧(第四军医大学口腔医学院口腔修复科,陕西西安710032)

摘要:目的 探讨不同压力环境对人牙周膜成纤维细胞碱性磷酸酶活性的影响。方法 采用酶动力学方法,比较不同压强的压力在不同的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。结果 压力增加导致牙周膜成纤维细胞碱性磷酸酶活性降低。结论 颌力过大将造成牙周膜成纤维细胞碱性磷酸酶活性降低,可能影响牙周组织健康。

关键词:牙周组织;成纤维细胞;碱性磷酸酶;压力

中图分类号:R329.24 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2001)10-0767-03

Effects of hydraulic pressure on alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament fibroblasts in vitro

ZHANG Yu, SHI Sheng-gen, ZHANG Hui

(Department of Prosthodontics, Stomatological College, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract Objective To study the effects of different levels of hydraulic pressure on alkaline phosphatase (ALP) activity in human periodontal ligament fibroblast (HPLF) in vitro. Methods The cultured cells were treated by different magnitudes of hydraulic pressure. The ALP activity of human HPLF was determined by a modified enzyme dynamical method. Results There was significant decrease in the ALP activity of HPLF exposed to hydraulic pressure, and the decrease was dependent on the magnitude of the hydraulic pressure. Conclusion High occlusal forces could decrease the ALP activity of HPLF that may cause periodontal ligament damage.

Key words periodontium; fibroblasts; alkaline phosphatase; pressure

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制。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。

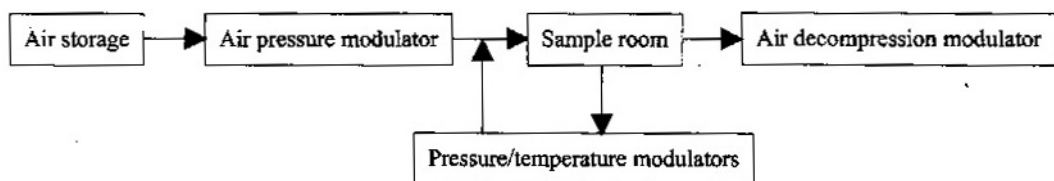


图 1 细胞加载装置工作流程图

Fig.1 Schematic chart of the pressure-loading apparatus

收稿日期:2001-03-15

作者简介:张宇(1976-),男,陕西西安人,第四军医大学口腔医学院在读硕士研究生,E-mail:jvzy@263.net

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 100kPa 压强下分别加载 20min、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 pH7.4 的 PBS 洗 2 遍,吸干,每孔加入 2g/Lp-NPP 的 AMP 液 200 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵箱内置 30min。每孔加入 0.2mol/LNaOH50 μ l 终止反应。410 nm 波长测各

孔 D()值。

将加载压强分别换为 200、300、400、500kPa,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。

2 结果

各对照组均能稳定表达碱性磷酸酶活性。在 100 及 200kPa 加载负荷时,各实验组 ALP 活性均无明显变化。负荷为 300kPa 时,20min 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 500kPa 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] 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 Dent 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.

性乱人群中单纯疱疹 2 型病毒感染情况及丽珠威的疗效观察

孙乐栋,周再高,曾抗,贺凤姣,江丽芬,黄良,王宗发(第一军医大学南方医院皮肤科,广东 广州 510515)

摘要:应用 PCR 技术对广州 120 例性乱者进行单纯疱疹 2 型 (HSV2-DNA) 检测,阳性者用丽珠威治疗。38 例 (31.6%) 检出 HSV2-DNA,治疗后 34 例 HSV2-DNA 转阴。

关键词:疱疹病毒 2 型,人;阿昔洛韦;性传播疾病

中图分类号:R752.11 文献标识码:B 文章编号:1000-2588(2001)10-0769-01

为了解性乱人群中不典型生殖器疱疹症状者单纯疱疹 2 型病毒 (HSV2) 感染的情况,我们利用 PCR 技术对广州地区 120 例性乱人群进行了检测,现报告如下。

1 病人与方法

1.1 一般资料

患者均来自我院性病专科门诊,共 120 例,其中男 49 例、女 71 例,年龄 16~42 岁,平均 27.1 岁。所有患者均有多次非婚性交史,均无典型的生殖器疱疹症状。

1.2 方法

用消毒棉拭子取病损处分泌物,无病损患者男性取尿道和冠状沟处分泌物,女性取阴道、宫颈分泌物置于灭菌生理盐水中,离心弃上清。沉淀物用生理盐水洗 2 次,加 50ml 裂解液 55℃、2 h,100℃煮沸 10min,1500r/min 离心 10min,取上清待用。HSV2 的 PCR 检测参照 Piiparinen^[1]公布的位于 HSV2-DNA 聚合酶内的一段基因序列合成引物,长为 241 bp。HSV2-DNA 阳性者予丽珠威片(批准文号:96 卫药准字 X-235-1)0.3g,2 次/d,口服,连服 7~10d,2~3 周复诊。

2 结果

120 例无典型生殖器疱疹症状的患者 HSV2 阳性者 38 例,占 31.6%。治疗后 38 例中有 34 例转为阴性。

3 讨论

生殖器疱疹的临床表现变化多样,常不典型或无症状,且

可造成潜伏感染,易被人们忽视,同时也是该病水平和垂直传播的重要因素^[2]。目前国内诊断生殖器疱疹主要依据典型临床表现,对非典型病损者极易造成误诊和漏诊。HSV2 与生殖器恶性肿瘤密切相关,并增加了 AIDS 的感染机会^[3,4]。生殖器疱疹感染仍以 2 型 HSV 为主,占 91.7%^[5]。本次调查中阳性率达 31.6%,提示本地区性乱人群中 HSV2 的感染率较高。因性传播 HSV 感染无症状排毒很常见^[6],所以本组 38 例阳性者虽无典型临床症状,但仍存在隐性排毒的可能性,具有传染性。

丽珠威是阿昔洛韦的 L-缬氨酸酯,为阿昔洛韦的前体药,在血液中能迅速转变成阿昔洛韦,口服生物利用度比阿昔洛韦高 3~5 倍^[7]。应用丽珠威治疗 HSV2 感染,38 例中有 34 例转阴,转阴率 89.4%,疗效确切,且用药量小、服药次数少、疗效短,患者的耐受性好,未发现明显的副作用。

参考文献:

- [1] Piiparinen H, Vaheri A. Genotyping of herpes simplex viruses by polymerase chain reaction [J]. Arch Virol, 1991, 119(3-4):275-83.
- [2] 方有兵,肖尚喜,杨森,等.性乱人群中 2 型单纯疱疹病毒感染分析 [J]. 中国皮肤性病杂志, 2000, 14(2):106-8.
- [3] McGeoch DJ. The genome of HSV: structure, replication and evaluation [J]. J Cell Sci, 1987, 7(s):69-89.
- [4] 王镜,白维仁.临床艾滋病学 [M]. 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1992:59-62.
- [5] 白桦,佟菊贞,叶兴东,等.生殖器疱疹的诊断及感染特征探讨 [J]. 中华皮肤科杂志, 1996, 29(3):169-71.
- [6] Wald A, Zeh J, Selke S, et al. Virologic characteristics of subclinical and symptomatic genital herpes infections [J]. N Engl J Med, 1995, 333(12):770-5.
- [7] 孙乐栋,周再高.丽珠威治疗生殖器疱疹疗效观察 [J]. 岭南皮肤性病科杂志, 1998, 5(4):24.

收稿日期:2001-05-26

作者简介:孙乐栋(1976-),男,安徽萧县人,2000年毕业于第一军医大学,硕士,医师,助教,电话:020-85141888-87138