

# 层粘连蛋白加速人龈上皮细胞 在纯钛表面早期附着的实验研究

汪济广 王大章 刘宝林

**摘要** 在建立上皮细胞体外培养模型的基础上,采用层粘连蛋白涂层技术,在落射荧光显微镜下观察人龈上皮细胞在涂层粘连蛋白光滑纯钛表面和未涂层粘连蛋白光滑纯钛表面的附着并计数,计数结果进行统计学分析。结果证实,层粘连蛋白有加速人龈上皮细胞在纯钛表面早期附着的作用。

**关键词** 层粘连蛋白 人龈上皮细胞 附着 钛

纯钛种植体暴露在口腔有菌环境中存在细菌附着、感染的危险。1995年的一项研究表明,种植体2~3年内失败的病例集中在种植后初始菌斑指数高的患者,感染与种植体早期失败明显相关<sup>1</sup>,且菌斑对种植体周围组织的破坏作用强于对牙周组织的破坏作用<sup>2</sup>。故防治菌斑引起的种植体周围炎对种植的成功具有重要意义。1987年,Gristina<sup>3</sup>提出“表面赛跑”(race for the surface)的理论,即组织细胞和口腔致病菌竞争性地在种植体表面附着。如果组织细胞首先在种植体表面形成附着,这个与组织细胞结合的表面则会因组织细胞的活力、完整的细胞膜、多糖及宿主的功能性防御机制抵抗细菌的粘附;如果细菌首先在种植体表面附着,则引起感染,而且一旦细菌粘附发生后,组织细胞将很难取代细菌的位置与种植体表面结合。据此,作者试图通过蛋白质涂层技术加速人龈上皮细胞在纯钛表面早期附着以防止菌斑引起的种植体周围炎。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

层粘连蛋白(Laminin, LN)、无血清上皮细胞培养液(Keratinocyte-SFM)、分离酶(dispace),以上均为GBCO公司产品,鼠抗人鳞状上皮角蛋白单抗和羊抗鼠FITC标记荧光抗体为Sigma公司产品。

### 1.2 纯钛片制备、清洁消毒以及LN涂布

选用宝鸡产钛材(纯度>99%),由西安市钟表研究所加工成厚1mm、直径5mm的钛片,钛片两面的光滑度与临床用种植体基桩表面相同(同一工厂同一标准加工),经40%硝酸纯化,100%三氯乙烯和无水酒精超声清洁,钛片使用前经高压蒸汽消毒后放入24孔培养板备用。细胞接种

前1d,将LN用无菌生理盐水配成 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ,每个钛片上滴1滴,均匀覆盖在钛表面,无菌条件下吹干备用。

### 1.3 龈上皮细胞接种培养

取临床下颌第三磨牙冠周龈瓣切除术切下的龈组织一块,放入盛有无血清DMEM培养液的青霉素小瓶内,按文献<sup>4</sup>的方法分离龈上皮细胞,再加入无血清上皮细胞培养液,计数,调整细胞浓度为 $1\times 10^4/\text{ml}$ 。将此细胞悬液充分混匀后,向涂LN和未涂LN的钛片表面各加 $50\mu\text{l}$ ,置于 $37^\circ\text{C}$ ,湿度100%,含5% $\text{CO}_2$ 和95%空气的培养箱内静置4h,然后每孔加入无血清上皮细胞培养液1ml,继续培养,每2d换液一次。

### 1.4 免疫荧光观察计数贴附细胞数

分别于细胞接种后4h、1d、3d和6d时取出钛片,按文献<sup>5</sup>方法用鼠抗人鳞状上皮角蛋白单抗及羊抗鼠FITC标记荧光抗体进行免疫荧光染色。标本制备好后,立即在OLYMPUS落射荧光显微镜下计数,并用ASA800彩卷照相记录。此实验重复3次,取平均值用析因分析法进行统计处理。另用PBS及Vimentin作空白对照及阴性对照。

## 2 结果

2.1 落射荧光显微镜下,清晰可见人龈上皮细胞在钛表面呈亮绿色,圆形或多角形,可见细胞核和细胞体轮廓,大部分细胞为散在分布,偶尔可见2~5个细胞成团分布(图1,2)。

2.2 计数各段时期LN涂层组和对照组的细胞数,每组各时间段计数3个钛片。3次实验计数的

本课题为国家博士后基金及军队“九五”重点课题基金资助  
作者单位:610041 华西医科大学口腔医学院口腔颌面外科(汪济广,王大章),710032 第四军医大学口腔医学院口腔颌面外科(刘宝林)

结果如下表。

附表 LN 涂层组与对照组 4 个时期  
纯钛表面的附着细胞数 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 培养时间 | 对照组        | LN 涂层组       |
|------|------------|--------------|
| 4 h  | 213 ± 26.1 | 411 ± 24.6** |
| 1 d  | 246 ± 29.2 | 405 ± 32.9** |
| 3 d  | 252 ± 23.7 | 423 ± 21.5** |
| 6 d  | 351 ± 21.5 | 414 ± 19.8** |

\*\*  $P < 0.01$  LN 涂层组与对照组两组间比较

析因分析结果: 时间和处理两因素间有交叉作用, 4 个时期 2 组间的细胞数均有显著性差异。处理组各时间点细胞数无显著性差异 ( $P > 0.05$ ); 对照组中, 培养 4 h 的细胞数与其它 3 组间均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 培养 6 d 组的细胞数与其它 3 组均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 但培养 1 d 和 3 d 两组间的细胞数无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨 论

正常生理情况下, 上皮对其下方结缔组织的附着是通过一层基底膜来实现的, 上皮和结缔组织分泌的层粘连蛋白和 IV 型胶原等成分共同形成基底膜。作者以前的研究发现<sup>5</sup>, 人工基底膜 M atrigel 有助于人龈上皮细胞在纯钛表面的粘附和铺展, 但 M atrigel 成分复杂, 临床应用前景不佳。最近的研究表明<sup>6,7</sup>, 上皮对基质附着的分子机制是, 上皮细胞通过其细胞膜表面的整合素 (Integrin)  $\alpha_6\beta_4$  与其配体, 位于基质表面的层粘连蛋白结合而形成附着。牙龈上皮基底细胞基底面含有  $\alpha_6\beta_4$ , 牙骨质表面有 LN 成分, 两者结合从而引起半桥粒的装配是正常牙周龈上皮附着的分子机制。本研究发现, 在纯钛片表面涂以层粘连蛋白后, 龈上皮细胞在其表面的早期附着明显高于对照组。这可能是由于人为地为龈上皮细胞膜上的  $\alpha_6\beta_4$  提供了足够的配体, 使大部分龈上皮细胞能附着到种植体表面。这一结果与作者以前的发现是不矛盾的, 因为 M atrigel 的主要成分就是 LN (约占 70%)。本研究还发现, 随着培养时间的延长, 处理组的附着细胞数没有明显变化, 而对照组的附着细胞数随着培养时间的延长而增多。对照组中, 4 h 的附着细胞数比其它 3 组少的原因可能是因为没有加入足够的培养液, 上皮细胞本身分泌的层粘连蛋白成分太少的缘故, 而 6 d 组的附着细胞数显著高于其它 3 组则只可能是由于

细胞分裂增殖所致。因为培养条件下早期不贴壁的上皮细胞不会存活太久。上述现象是否说明, 龈上皮细胞在层粘连蛋白表面比较稳定, 这是否意味着在涂层粘连蛋白种植体表面, 龈上皮根向移行形成盲袋的可能性较低? 有类似的研究表明<sup>8</sup>, 在结合上皮根向移行过程中, 层粘连蛋白含量明显下降, 伤口愈合过程中龈牙界面的层粘连蛋白可作为上皮稳定附着的一个标志。由此可以推测, 层粘连蛋白不仅可以促进人龈上皮细胞在纯钛种植体表面的早期附着, 而且有可能保持这种附着的稳定性, 这种作用的机理尚待进一步研究。

本实验还不能回答层粘连蛋白促进人龈上皮细胞在纯钛种植体表面的早期附着能否防治菌斑引起的种植体周围炎, 此外, 层粘连蛋白在钛表面的转归如何? 层粘连蛋白在钛表面降解后上皮能否依靠自身分泌的层粘连蛋白维持这种附着? 这些都是需要进一步研究并作出回答的问题。目前这些研究正在进行当中。

(本文图见中心插页 4)

### 4 参考文献

- Higuchi KW, Folmer T, Christina. Implant Survival rates in partially edentulous patients: a 3-year prospective multicenter study. *J Oral Maxillofac Surg*, 1995, 53: 264
- Wang K, Reddy MS, Jeffcoat MK. Risk factors for early implant failure: effect of hydroxyapatite coating. *J Dent Res (ADR Abstracts)*, 1996, 75: 349
- Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science*, 1987, 237: 1588
- 汪济广, 刘宝林, 吕春堂. 口腔粘膜基上层皮细胞体外培养模型的建立. *中国口腔种植学杂志*, 1997, 2(1): 1
- 汪济广, 刘宝林, 吕春堂. 基底膜提取物对人牙龈上皮细胞在钛表面附着的影响——扫描电镜观察. *华西口腔医学杂志*, 1997, 15(1): 11
- Honma M, Virtanen I, Quaranta V. Immunolocalization of integrin alpha 6 beta 4 in mouse junctional epithelium suggests an anchoring function to both the internal and the external basal lamina. *J Dent Res*, 1992, 71: 1503
- Dowling J, Yu QC, Fuchs E. Beta 4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *J Cell Biol*, 1996, 134: 559
- Dean JW, Schmidle R. Laminin content decrease markedly during apical migration of junctional epithelium. *J Dent Res (ADR Abstracts)*, 1996, 75: 102

(1997- 11- 11 收稿)

(下转第 22 页)

#### 4 参考文献

- 1 Medema RH, Bos JL. The role of P21 ras in receptor tyrosine kinase signaling Crit Rev Oncogenesis, 1993, 4 (6): 615
- 2 Field JK. Oncogenes and tumour-suppressor genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. Oral Oncol Eur J Cancer, 1992, 28B: 67
- 3 Cerutti P, Hussain P, Pourzand C, et al Mutagenesis of the H-ras protooncogene and the P53 tumor suppressor gene. Cancer Res, 1994, 54(Suppl): S1934
- 4 Daya-Grosjean L, Robert T, Drougard C, et al High mutation frequency in ras genes of skin tumors isolated from DNA repair deficient xeroderma pigmentosum patients. Cancer Res, 1993, 53: 1625
- 5 Meltzer SJ, Zhou D, Weinstein WM. Tissue-specific expression of c-Ha-ras in premalignant gastrointestinal mucosa. Exp Mol Pathol, 1989, 51: 264
- 6 Quintanilla M, Brown K, Ramsden M, et al. Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. Nature, 1986, 322: 78
- 7 Mitra AB, Murty VVS, Mahendra P, et al. erbB2 oncogene is frequently amplified in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Cancer Res, 1994, 54: 637
- 8 Oka K, Nakano T, Arai T. c-erbB-2 oncoprotein expression is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the cervix. Cancer, 1994, 73: 668
- 9 Motojima K, Furui J, Kohara N, et al. erbB-2 expression in well-differentiated adenocarcinoma of the stomach predicts shorter survival after curative resection. Surgery, 1994, 115: 349
- 10 Riviere A, Wilckens C, Loning T, et al. Expression of c-erbB-2 and c-myc in squamous epithelia and squamous cell carcinoma of the head and neck and the lower female genital tract. J Oral Pathol Med, 1990, 19: 408

(1997- 06- 12 收稿, 1997- 06- 24 修回)

### Expression of P21 and P185 in Benign and Malignant Epithelia of Cheek Mucosa

Yang Lianjun

*Department of Pathology, the Fourth Military Medical University*

Jin Yan, Si Xiaohui

*Department of Oral Pathology, Stomatological College, the Fourth Military Medical University*

#### Abstract

To analyze the expression of P21 and P185 in normal epithelia, chronic non-specific inflammatory epithelia, squamous cell carcinoma and epithelia immediately adjacent to carcinoma of cheek mucosa, immunohistochemistry technique and image analysis technique were used. The results showed: there was excellently higher expression of P21 and P185 in squamous cell carcinoma and epithelia immediately adjacent to carcinoma than in normal and inflammatory epithelia of cheek mucosa, which were compactly correlative.

**Key words:** cheek mucosa P21 P185 squamous cell carcinoma immunohistochemistry image analysis

(上接第 9 页)

### An Experimental Study of Expediting the Early Attachment of Human Gingival Epithelial Cells to Titanium with Lam in in

Wang Jiguang, Wang Dazhang

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, West China University of Medical Sciences*

Liu Baolin

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Fourth Military Medical University*

#### Abstract

Using in vitro culture model, the attachment of human gingival epithelial cells to lam in in-coated pure titanium was studied. The average numbers of attached cells on different surface of titanium with or without lam in in were calculated under catoptric fluorescent microscope and were statistically analyzed with factorial design. The results showed that Lam in in could expedite the early attachment of human gingival epithelial cells to titanium.

**Key words:** lam in in human gingival epithelial cell attachment titanium