

新型根管充填材料的回顾研究

孙 智 刘 泓

根管充填是保持根管治疗效果的重要一步。因此无论是从材料还是技术方法上都要求能够达到良好的封闭性和生物相容性。随着材料学的不断发展和进步,根管充填材料有了较快的发展,出现了大量的新型材料,如树脂类封闭剂和多聚甲基硅烷类封闭剂等。目前,国内外对此研究较多,期望能够为根管治疗找到更多更合适的根充材料。

一、理想的根管充填材料应具备的条件

Leyhausen 等^[1]认为理想的根管充填材料应该是不刺激根尖周组织;在凝固前应有良好的流动性,凝固过程中体积不收缩,凝固后与根管壁无间隙;具有 X 射线阻射性,便于检查是否充填完满;应该无菌或能够快速灭菌;能够封闭根尖孔和根管侧壁;操作简便,能以简单方法将根管充填完满,必要时能从根管中取出;能长期保存在根管中而不被吸收;不使牙体变色;具有抑菌作用或至少不促进细菌生长。

二、根管充填材料的种类

根管充填材料种类繁多,有固体的牙胶尖,有液体的酚醛树脂,有传统的糊剂如氧化锌丁香酚类、碘仿类等,有添加了抗生素或中药成分的自制糊剂等。与之相比较,新型的根充材料的各种性能和效果更好,下面介绍一些新型的根充材料的组成和特性,列举了其中的部分代表性材料。

1. 氢氧化钙糊剂类:氢氧化钙具有强碱性,能中和炎症区的酸性物质,起到杀菌、消炎的作用,能激活碱性磷酸酶,从而促进根尖周硬组织形成屏障,促进根尖牙槽骨增生使根尖周骨破坏减小、甚至消失,促进类牙骨质、类牙本质的增生,封闭根尖孔。但是,氢氧化钙容易被吸收,对于根尖周炎症未被控制的根管,炎症可沿着吸收后的缝隙进入根管,从而影响了正常的修复效果。目前临床应用较多的氢氧化钙糊剂类多添加了碘仿,增加其抗菌和 X 线阻射效果,如 calvital 糊剂、vitapex 糊剂、apexit、sealapex、sealer 26

等。尤其是 vitapex 糊剂可促使组织钙化和骨化,材料本身能够逐渐被巨噬细胞所吞噬,其成分均匀稳定,流动性好,注射式充填的方法简化了操作程序,对于主根管和侧支根管均能达到较好的充填效果。

而且 Asgary 等^[2]认为含钙丰富的混合接合剂 (calcium enriched mixture, CEM) 呈碱性,能够持续的释放氢氧化钙,控制炎症发展,促进新骨形成,加速根尖周组织愈合,并且发表了有关研究的病例报道,因此他们认为对于根管治疗不当或是根尖孔未闭合的年轻恒牙而言,使用 CEM 可能是适用和有效的。

2. 树脂根充糊剂类:随着黏结技术的发展,带有黏性的根管充填材料已经得到发展,应用于牙髓病和根尖周病的治疗。包括了以环氧树脂单体为主要成分的 AH26、AH plus 等和以甲基丙烯酸甲酯 (MMA) 为基础的 endoREZ、realseal、epiphany、realSesl SE、epiphany SE 等。(1) 环氧树脂类:AH Plus 是 AH26 的改良黏结剂,由环氧树脂、钨酸钙、氧化锆、二氧化硅、氧化铁和金刚烷胺所组成。AH Plus 的特点是具有良好的组织相容性和 X 线阻射、较低的毒性与溶解性、凝固时间短、空间稳定性长、对于牙齿基本无染色,热膨胀系数与牙体组织接近等。AH Plus 的流动性好,能够较好的渗透侧支根管,甚至是牙本质小管中,增强根管的封闭性,从而提高抑菌作用。又因为 AH Plus 含有双酚环氧树脂,其黏结力强、体积收缩性小、热膨胀系数与牙体组织接近,与牙胶一起充填根管后发生微渗漏少。Ulusoy 等^[3]对 AH-plus、endoREZ、resilon 等不同的根充糊剂充填的牙齿的抗断裂性能进行比较,证实了 resilon 的抗折性最高,而 AH-plus 的细胞毒性也比后两者小^[4]。(2) 甲基丙烯酸甲酯类:resilon/epiphany (R/E) 包括固体充填材料 resilon、密封糊剂 epiphany 和引物。理论上它与根管壁之间会形成化学性黏结,形成一体化充填,从而降低微渗漏,而且具有良好的 X 线阻射性,有利于通过 X 线片观察其根管充填效果。但是有体外实验证明,epiphany 在充填完成后短期内细胞毒性较同类封闭剂高,会对根尖周组织造成炎症^[5]。De Campos -

作者单位:150001 哈尔滨医科大学第一附属口腔医院牙体牙髓病科

通讯作者:刘泓,电子信箱:sunzhizxc@126.com

Pinto 等^[6]用成年鼠进行研究后发现,R/E 引物的使用可以有效地减少 epiphany 的细胞毒性。

3. 多聚甲基硅烷类(RSA): guttaFlow 作为 RSA 的一种,主要由牙胶颗粒、氧化锌、硫酸钡及根管封闭剂(聚二甲基硅氧烷、硅油、石蜡油、纳米银、六氢氯铂酸、二氧化锆和着色剂)等成分组成,其中牙胶颗粒和聚二甲基硅氧烷为主要成分。随着纳米技术在医学领域中日益广泛的应用,出现了纳米银材料,由于它具有量子效应、小尺寸效应和极大的表面积,使其具有长效、广谱的抗菌性,比传统抗菌剂具有更优良的抗菌效果^[7,8]。因此含有纳米银离子牙胶粉末的 guttaFlow,具有良好的生物相容性、流动性、体积稳定性、高阻射性和抑菌性。guttaFlow^[9]在常温下使用,其固化不受温度和湿度的影响,固化后有 0.2% 的轻度体积聚合膨胀,吸水性为 0.4%,溶解度为 0.13%,这是在美国牙科学会(American Dental Association,ADA)规定的范围(<3%)之内的,能起到良好的根尖封闭作用,此材料本身也不溶解,这样就有利于提高根管封闭效果。目前,此类材料的临床试验进行的较多,效果较理想^[9,10]。

三、根充材料的特性比较

根管充填材料的性质决定了其在临床的应用与否。在临床操作中根充材料可能被挤出根尖孔,与根尖周组织直接接触,刺激根尖周组织产生炎性物质,同时,根尖周组织所释放出的炎性物质可能从根尖孔反流入根管,造成根管再感染等,因此,能够有效封闭根尖孔,具有良好的生物相容性,较强的理化性质是根充材料应用的重要基础,是根管治疗能否成功的关键之一。

1. 根管封闭性:根管充填的目的就是能够封闭无菌的根管,维持根管治疗的效果,达到根管治疗成功的目的。Vasiliadis 等^[11]利用液体滤过传输法对 AH Plus 和 guttaflow 进行了短期和长期的根管微渗漏的体内研究。结果显示,AH Plus 的微渗漏值在 1 周为 $0.2 \pm 0.31\text{mm}$,3 个月为 $0.28 \pm 0.38\text{mm}$;guttaflow 的微渗漏值在一周为 $0.36 \pm 0.33\text{mm}$,3 个月为 $0.41 \pm 0.36\text{mm}$ 。统计学分析表明两者的微渗漏值在 1 周和 3 个月的结果没有统计学意义($P > 0.05$)。

另外,Oliveira 等^[12]利用粪肠球菌对几种根充材料即 AH Plus (AHP), sealer 26 (S26), epiphany SE (ESE), sealapex (SEL), active GP (AGP), endofill (EDF)与纤维桩的黏结能力进行了比较。结果显示在 120 天后,各实验组均可测得细菌渗漏,而 AGP, CPM 和 MTAS 的细菌渗漏明显($P < 0.05$),AH Plus

和 sealapex 的黏结最紧密,封闭能力最好($P < 0.05$)。而 Nawal 等^[13]人对 guttaflow、resilon、epiphany、AH-plus 4 种材料在体外进行微生物泄漏和流动实验。此实验中的细菌是粪肠球菌,结果观察显示,所有材料均有较好的流动性,epiphany 的流动性最大,其次是 AH-Plus 和 guttaflow。

Barcelos 等^[14]对一个电子文献数据库(1950 ~ 2010 年)进行了检索,其中符合要求的 43 篇文献中报道了,其根管封闭的成功率为 60.0% (sealapex)、从 85.0% 到 100.0% (ZOE)和 89.0%,100.0% (vitapex)不同。同时 vitapex、sealapex 有根管内吸收的报道。

2. 细胞毒性:细胞毒性作为评价材料生物相容性的重要因素之一,主要是进行体外细胞的培养。Silva-Herzog 等^[15]利用 3 种根充材料对 28 只雄性大白鼠进行了皮下移植的炎症反应研究。结果显示,在 14 天时,sealapex 分泌的炎性渗出物明显多于 AH Plus 和 roekoSeal ($P < 0.05$),而后两者之间无统计学差异($P > 0.05$)。Sealapex 是刺激性最大的封闭材料,与多核巨细胞结合能够产生严重的炎症反应。

Ashraf 等^[16]运用 MTT 试验进行了细胞毒性研究。试验选用鼠纤维细胞 L-929 进行培养。结果显示,guttaflow (GF)的细胞毒性的最大值和最小值出现在 24h 和 72h。Gencoglu 等对 60 只大白鼠进行动物实验,研究两种根充材料(guttaflow 和 endoREZ)的生物相容性和细胞毒性。实验结果比较了大白鼠的肺、肝、肾和皮肤中的丙二醇(malondialdehyde,MDA)、谷胱甘肽(glutathione,GSH)以及血清参数中的血清天冬氨酸转氨酶(aminotransferase,AST)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase,ALT)、肌酐和尿素氮(creatinine and blood urea nitrogen,BUN),各实验组的结果中 MDA 的含量、GSH 的水平和血清参数在 7 天和 30 天均无明显的统计学差异($P > 0.05$)。这两种材料对于组织毒性表现出较高的可兼容性和耐受性。

而 Ghanaati 等为了得到更接近体内环境的结果,进行了体外和体内培养,利用荧光显微镜着色试验,比较 AH Plus 和 guttaflow 对牙周纤维细胞的生长和形态学的影响。结果显示了,在 96h 孵育期后因为 AH Plus 仅有一小部分纤维细胞存活下来,所以 AH Plus 的细胞毒性明显($P < 0.002$)超过 guttaflow 的细胞毒性;在体内培养后,guttaflow 被纤维膜包围,没有发生退化,而 AH Plus 被巨噬细胞吞噬形成了新鲜的肉芽组织。与此同时,实验还证明了封闭材料被挤出根尖孔后,其细胞毒性反应能够提高抗菌药物的药效

并且引导材料自身的退化。

3. 物理力学性质:根充材料在充填过程中和术后要求尽量保持自身的形态不变,甚至是少膨胀,不发生转化,这些对于维持根管治疗效果是重要的。Mo-keem - Saleh 等对 4 种根充材料 (realSeal、endoRez、guttaflow 及 tubliseal) 的有孔性、转化度 (DC)、硬度进行了实验比较。结果显示,有孔性中 tubliseal 最大 (3.52%), realseal 最小 (0.41%)。realseal 的转化度百分比明显高于 endorez ($P=0.01$)。然而,硬度值 endoRez 最高 (28.54 VHN), tubliseal 最小 (13.57 VHN)。除了 realseal 和 endorez 之间以外,其他各组的有孔性和硬度值都有显著的统计学意义 ($P=0.01$)。此实验反应了树脂类根充材料具有低孔性、高强度、高转换率的特点。而 Rahimi 等对 3 种树脂的微剪切黏结强度进行了实验。结果显示,环氧树脂对于罩牙本质的微剪切黏结强度明显高于聚氨酯二甲基丙烯酸酯 ($P<0.001$)。而且,封闭剂的厚度也对黏结强度有影响,实验证实了封闭剂的厚度越厚其黏结强度越好 ($P<0.001$) 薄层封闭剂可反映出不同的黏结模式。

Monteiro 等对应用 resilon 和 AH - plus 的牙齿的抗断性能进行了比较。将 80 颗下颌单根前磨牙浸于 10% 的甲醛中,所有操作由一人完成,每个试样安装在丙烯酸聚环和万能试验机抗骨折测试。应用一个垂直加载力,直到根分裂。结果显示,Resilon 密闭的牙齿比 AH - plus 密闭的牙齿更耐断裂 ($P=0.00001$)。Resilon 增加了单根牙在体外的阻力骨折。此外,Ulusoy 等^[3]对 AH - plus、endorez、resilon 等不同的根充糊剂充填的牙齿的抗断裂性能进行比较,也证实了 resilon 的抗折性最高。

4. 抗菌性:为了长期维持根管充填后的效果,根管充填材料还应该具有长期的抗菌抑菌效果。Ferk 等对 ketac endo、AH - Plus、diaket 和 gutta - percha 进行了琼脂扩散试验 (the agar diffusion test, ADT)。在研究中,采用变形链球菌、乳酸杆菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌和多种微生物悬浊液,每种材料分别进行试验。其结果显示,diaket、AH - Plus、ketac endo 具有抗菌效果,gutta - percha 无抗菌效果。diaket 的抗菌作用与 AH Plus、ketac endo 和 gutta - percha 相比较,具有显著的统计学意义 (变形链球菌 $P<0.05$; 乳酸杆菌 $P<0.05$; 金黄色葡萄球菌 $P<0.05$; 粪肠球菌 $P<0.05$; 多种微生物悬浊液 $P<0.05$)。

Nawal 等^[13]对 guttaflow、resilon、epiphany、AH - plus 4 种材料在体外密闭系统中进行微生物泄漏的琼脂扩散试验 (ADT) 和直接接触测试 (direct contact test, DCT)。此实验中的细菌是粪肠球菌,结果观察显示,epiphany 的抗菌活性最好,其次是 AH - Plus 和 guttaflow,并且 guttaflow 在一段较长的时间内抗微生物泄漏。扫描电子显微镜 (scanning electron microscopy, SEM) 显示结果可证实微生物泄漏试验的相关结果。

四、小 结

各种根充材料都有其自身的特点。氢氧化钙糊剂类的理化性质优于其他两类根充材料,但是封闭性和生物相容性较后两者差。树脂根充糊剂类的理化性质好,生物相容性较好,但与比较细胞毒性更大。而 guttaflow 的生物相容性好,细胞毒性较小,封闭性好于环氧树脂类,但是较 MMA 还有一定差距。总而言之,新型根充材料的封闭性、生物相容性及理化性质都更优越,尤其是树脂类和 RSA。对于根充材料的各种性能的实验研究还在继续,由于临床应用的长期效果观察文献报道有限,所以可以推测,未来对于根充材料的研究重点就在此。

参考文献

- 1 Leyhausen G, Heil J, Reifferscheid G, *et al.* Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy resin - based root canal sealer AH plus [J]. J Endod, 1999, 25 (2) : 109
- 2 Asgary S, Nosrat A, Seifi A. Management of inflammatory external root resorption by using calcium - enriched mixture cement: a case report [J]. Endod, 2011, 37(3) : 411 - 413
- 3 Ulusoy OI, Nay Y, Darendeliler - Yaman S. Effect of different root canal sealers on fracture strength of simulated immature roots [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2011, 112(4) : 544 - 547
- 4 Ames JM, Loushine RJ, Babb BR, *et al.* Contemporary methacrylate resin - based root canal sealers exhibit different degrees of ex vivo cytotoxicity when cured in their self - cured mode [J]. J Endod, 2009, 35(2) : 225 - 228
- 5 Donadio M, Jiang J, Safavi KE, *et al.* Cytotoxicity evaluation of activ GP and resilon cones in vitro [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2008, 106(1) : 76 - 79
- 6 de Campos - Pinto MM, de Oliveira DA, Versiani MA, *et al.* Assessment of the biocompatibility of epiphany root canal sealer in rat subcutaneous tissues [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2008, 105(5) : 77 - 81
- 7 Wijnhoven SWP, Peijnenburg WJGM, Herberts CA, *et al.* Nano - silver a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment [J]. Nanotoxicology, 2009, 3:109

(转第 16 页)

以促进成骨。诸多等研究表明 rhBMP-2 对骨延长有明显的促进新生骨形成作用^[10,11]。研究发现, rh-BMP-2 最佳局部浓度与动物种属级别正相关;犬类下颌骨最佳浓度约为人类下颌骨 1/2。由此可以推断,兔下颌骨的用量应该更少。根据本研究者测得,人体下颌骨体部的冠状截面积约为 $2.7\text{cm} \times 1.2\text{cm}$;兔本实验的截骨部位处截面积约为 $1.0\text{cm} \times 0.6\text{cm}$,为前者的 1/5.4。以此可以推断,兔局部下颌骨截骨处的 rhBMP-2 用量应该少于人的 1/10。本研究中间骨延长的截骨间隙仅约 2mm,而且兔下颌骨体部短小,仅能容纳约 2.0mg 的 rhBMP-2 复合材料。该剂量约为厂商人体推荐用量的 1/10,而且也有研究证实 1.5mg 的 rhBMP-2 完全能促进新骨形成^[11]。因此,术中同期置入量是合理的。

Wurzler 等^[3]研究还发现在促进大鼠放射后颅骨缺损的修复时, rhBMP-2 剂量高效果较剂量低者好。在本部分研究中,两组的新生骨没有明显的差别。是 2.0mg rhBMP-2 不足以促进成骨? 或者是 rhBMP-2 本身对放射后骨延长新生骨的形成没有促进作用? 这尚需要进一步的研究。

参考文献

- 1 Simon Y, Zarana SP, James DK, *et al.* Dose effect of dual delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 on bone regeneration in a rat critical-size defect model[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(9):2347-2362
- 2 Hamilton DK, Smith JS, Reames DL, *et al.* Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as an adjunct for instrumented

- posterior arthrodesis in the occipital cervical region: an analysis of safety, efficacy, and dosing [J]. *J Craniovertebr Junction Spine*, 2010, 1(2):107-112
- 3 Wurzler KK, DeWeese TL, Sebald W, *et al.* Radiation-induced impairment of bone healing can be overcome by recombinant human bone morphogenetic protein-2 [J]. *J Craniofac Surg*, 1998, 9(2):131-137
 - 4 Li HW, Dai KR, Tang TT, *et al.* Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2 [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2007, 356(4):836-842
 - 5 郭勇, 张西正, 武继民, 等. 人骨形成蛋白 2 基因成骨诱导作用研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2006, 21(7):579-581
 - 6 孙健, 余优成, 顾章愉, 等. BMP-2 对大鼠骨髓间充质干细胞成骨作用的影响 [J]. *上海口腔医学*, 2011, 20(4):26-31
 - 7 Gerard KJ, Harvinder SS, James F. Bone morphogenetic proteins: applications in spinal surgery [J]. *HSS J*, 2005, 1(1):110-117
 - 8 Ghodadra N, Singh K. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the treatment of bone fractures [J]. *Biologics*, 2008, 2(3):345-354
 - 9 Lssa JP, do Nascimento C, Iyomasa MM, *et al.* Bone healing process in critical-sized defects by rhBMP-2 using poloxamer gel and collagen sponge as carriers [J]. *Micron*, 2008, 39(1):17-24
 - 10 Norine A, René St-A, Dominique L, *et al.* Are endogenous BMPs necessary for bone healing during distraction osteogenesis? [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2009, 467(12):3190-3198
 - 11 田璐鸣, 王稚英. 重组人骨形态发生蛋白 2 在下颌骨牵引成骨过程中的作用 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(15):2670-2674

(收稿:2011-09-22)

(修回:2011-10-27)

晚期糖基化终产物引起内皮细胞 connexin43 表达上调

章顺荣 高 越 封 菲 洪鸣鸣

摘 要 **目的** 研究晚期糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGEs) 对体外培养的人脐静脉内皮细胞缝隙连接蛋白 (gap junction protein) connexin43 基因表达的影响。**方法** D-葡萄糖孵育牛血清白蛋白制备糖基化牛血清白蛋白作为晚期糖基化终产物。体外常规培养的人脐静脉内皮细胞分为 4 组, 分别为对照组, 100、200 和 400mg/L AGEs 干预组, 干预 24h 后通过 RT-PCR 方法检测各组 connexin43 基因 mRNA 的表达有无差别; 通过免疫荧光方法检测对照组和 200mg/L AGEs 干预组之间 connexin43 蛋白的表达水平有无差别。**结果** 不同浓度 (100、200、400mg/L) 的 AGEs 干预 24h 均能引起人脐静脉内皮细胞 connexin43 基因 mRNA 的表达上调 ($P < 0.01$); 200mg/L 的 AGEs 干预 24h 引起人脐静脉内皮细胞 connexin43 基因的蛋白表达上调 ($P < 0.01$)。**结论** AGEs 体外短期干预可引起人脐静脉内皮细胞 connexin43 基因的 mRNA 和蛋白表达水平上调。

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2008B145)

作者单位: 310006 杭州市第一人民医院老年医学科

通讯作者: 高越, 电子信箱: gy9821@sina.com.cn

关键词 Connexin43 晚期糖基化终产物 人脐静脉内皮细胞 基因表达

Effect of Advanced Glycation End Products on The Expression of Connexin43 Gene in Cultured Human Umbilical Vein Endothelium Cells.

Zhang Shunrong, Gao Yue, Feng Fei, Hong Mingming. Department of Gerontology, Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective To investigate the effect of advanced glycation end products (AGEs) on the expression of gap junction protein Connexin43 gene in cultured human umbilical vein endothelium cells (HUVECs) *in vitro*. **Methods** Bovine serum albumin (BSA) was incubated with D-glucose to produce AGE-BSA. Human umbilical vein endothelial cells cultured in normal condition *in vitro* were divided into blank control group, 100, 200 and 400mg/L AGEs intervention groups respectively. 24 hours after AGEs was given, the mRNA expression of connexin43 gene of cultured HUVECs was detected with RT-PCR method. While the protein expression level of connexin43 gene was detected and compared with immunofluorescence method between the control and 200mg/L AGEs intervention groups. **Results** Different concentrations (100, 200, 400mg/L) of AGEs all can up-regulate the mRNA expression level of connexin43 gene in cultured HUVECs after 24 hours intervention ($P < 0.01$). Similarly, the protein expression level of connexin43 gene of HUVECs in the group intervened with 200mg/L AGEs for 24 hours was up-regulated as compared with the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** AGEs may up-regulate the mRNA and protein expression level of connexin43 gene in cultured human vein endothelium cells within short time *in vitro*, indicating that connexin43 may play an important role in the pro-atherosclerotic effect of AGEs.

Key words Connexin43; Advanced glycation end products; Human umbilical vein endothelium cells; Gene expression

糖尿病常引起大小血管病变,大血管病变中最常见的是动脉粥样硬化,糖尿病是冠心病的等危症,然而糖尿病易患动脉粥样硬化的机制仍未完全明了。糖尿病血管并发症的发病机制中晚期糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGEs) 起着重要作用,AGEs 可以通过多种机制促进动脉粥样硬化的发生发展^[1]。AGEs 能引起内皮细胞结构和功能异常,而后者在动脉粥样硬化的发病机制中起着关键作用。组成缝隙连接的蛋白亚单位称为 connexins, 现已发现 20 种以上的 connexins 亚型,内皮细胞表面有 connexin37、40 和 43 的表达^[2]。connexins 在维持内皮整体功能协调中起着重要作用,研究表明 connexin43 的改变与内皮功能异常及动脉粥样硬化的发生发展相关^[3]。AGEs 是否可以通过影响内皮细胞 connexin43 表达而促进动脉粥样硬化的发生发展尚不明确。本研究对 AGEs 是否可影响体外培养的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelium cells, HUVECs) connexin43 的表达做一探索。

材料与方法

1. 材料:牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA), D-葡萄糖, 1640 细胞培养液, 胰酶, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 和胎牛血清购自上海泽衡生物科技有限公司, 内皮细胞株购自南京凯基生物科技有限公司, Trizol 和 RT-PCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司, connexin43 和 GAPDH 引物对由上海泽衡生物科技有限公司合成, 兔抗人 connexin43 多克隆抗体购于 Abcam 公司 (Catalog Number ab62689), 荧光标记的羊抗兔 IgG 抗体, 山羊血清, C 液购自北京中杉金桥生物科技有限公司, Triton X-100 购自上海生工生物工程有限公司, DAB 显色液购自福州迈新生物

技术开发有限公司。

2. AGEs 的制备: 0.5mol/L 的 D-葡萄糖和 50mg/ml 牛血清白蛋白溶解在 0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液中, 用 0.2 μ m 的滤器过滤除菌后置入 37℃ 恒温箱内避光孵育。90 天后取出, AGE-BSA 呈深黄色, 装入低分子量透析袋, 以 PBS 液充分透析 72h, 中途更换透析液 1~2 次以除去未结合的低分子物质。透析后用 0.2 μ m 的滤器过滤除菌后 -80℃ 保存。用荧光分光光度计检测 AGE-BSA 最大发射波长为 460nm, 最大激发波长为 360nm, 检测 AGE-BSA 的蛋白浓度为 50mg/ml。

3. 内皮细胞培养及 AGEs 的干预: 人脐静脉内皮细胞株接种于 6 孔板培养基, 常规传代, 待内皮细胞生长至约 80% 满后换液, 对照组继续以含 10% 胎牛血清的 1640 培养液培养, 而另外 3 组则在 10% 胎牛血清的 1640 培养液中分别加入不同浓度的 AGEs, 使 AGEs 的终浓度分别为 100mg/L, 200mg/L, 400mg/L。继续培养 24h 后, 去除培养液, PBS 液冲洗后, 加入 Trizol 2ml, 提取各组的总 RNA, -20℃ 条件下保存。另两组内皮细胞按 2×10^4 /ml 浓度接种于含有载玻片的 6 孔板培养基, 分为对照组和 200mg/L AGEs 干预组, 待内皮细胞生长至铺满 80% 玻片后换液, 对照组继续以含 10% 胎牛血清的 1640 培养液培养, 干预组则在培养液中加入终浓度为 200mg/L 的 AGEs, 继续培养 24h 后去除培养液, PBS 液冲洗后进行免疫荧光染色。

4. connexin43 基因 mRNA 表达水平的检测: 提取的各组 RNA 通过紫外分光光度计测定 260 和 280nm 处吸光度值, 计算 RNA 纯度和浓度。按反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录成 cDNA, 再进行 PCR 扩增。Premier5.0 软件设计 PCR 引物对, connexin43 基因的 PCR 引物序列为 5'-GAGCGGATACAGAGGAG GA-3' (上游), 5'-CTCCACCCATCTACCCCATAC-3' (下游)。内参 GAPDH 的引物序列为: 5'-CGT-GAAAGATGTCGTGGAA-3' (上游), 5'-TGGAAGATGCTGA

TG GGAT - 3' (下游)。connexin43 基因 PCR 扩增条件为: 95℃ 5min 1 循环, 之后 95℃ 变性 30s, 54℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 40s, 共 35 个循环, 最后 72℃ 10min 1 循环, 产物长度为 383 次/分; 内参 GAPDH 基因 PCR 扩增条件为: 95℃ 5min 1 循环, 之后 95℃ 变性 30s, 56℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 共 32 个循环, 最后 72℃ 10min 1 循环, 产物长度为 223bp。PCR 反应体系为 20μl 体系。PCR 反应产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳判断结果, Bio RAD 成像系统拍摄照片用于分析。

5. connexin43 蛋白表达水平的检测: 主要步骤如下: ① PBS 清洗标本 3 次 各 1min; ② 4% 的多聚甲醛固定 20min; ③ 空气干燥 5min; ④ PBS 清洗标本 3 次 各 2min; ⑤ 0.5% Triton X - 100 孵育 1 次 20min; ⑥ PBS 清洗标本 3 次 各 2min; ⑦ 3% H₂O₂ 孵育 15min, DPBS 清洗标本 3 次 各 2min; ⑧ 标本予以兔抗人 connexin43 多克隆抗体 (效价 1: 200) 4℃ 孵育过夜; ⑨ PBS 液冲洗 4 次, 各 5min, 加入荧光标记的二抗, 室温孵育 30min; ⑩ PBS 液冲洗 4 次后 90% 甘油封片。最后在荧光显微镜下观察结果, 拍摄照片用于分析。

6. 统计学方法: 运用 ImageJ 1.43 图像分析软件对 mRNA 电泳图片和免疫细胞荧光染色图片进行灰度扫描半定量分析。运用 SPSS 13.0 统计软件包进行数据统计分析。mRNA 电泳图片采用各组 connexin43 条带与其 GAPDH 条带的灰度比值作为统计变量, 采用 *t* 检验分析; 免疫细胞荧光染色图片以细胞灰度值作为统计变量, 采用 *t* 检验分析。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

结 果

1. AGEs 对内皮细胞 connexin43 基因 mRNA 表达的影响: 不同浓度 (100、200、400mg/L) 的 AGEs 干预 24h 后引起内皮细胞 connexin43 mRNA 的表达水平上调 (表 1 和图 1)。

表 1 不同浓度 AGEs 对 HUVECs connexin43 mRNA 表达的影响 (*n* = 6, $\bar{x} \pm s$)

组别	灰度比值
对照组	0.38 ± 0.024
100mg/L AGEs 干预组	0.94 ± 0.037 *
200mg/L AGEs 干预组	1.01 ± 0.034 *
400mg/L AGEs 干预组	0.92 ± 0.065 *

* 与对照组相比, *P* < 0.01

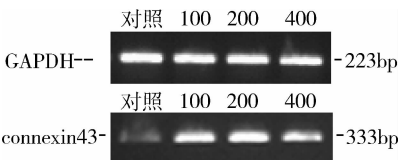


图 1 不同浓度 (100、200、400mg/L) 的 AGEs 刺激后内皮细胞 connexin43 mRNA 表达水平

2. AGEs 对内皮细胞 connexin43 基因蛋白表达的

影响: 见图 2。对照组及 200mg/L 的 AGEs 干预组 24h 后 connexin43 灰度值分别为 64.28 ± 4.34、97.41 ± 6.80。免疫荧光方法检测发现内皮细胞 connexin43 的蛋白表达水平上调 (*P* < 0.01)。

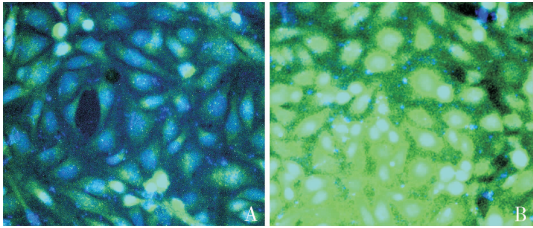


图 2 免疫荧光染色结果

A. 对照组, 内皮细胞表面和细胞质显示的绿色荧光较淡, 细胞核染色呈蓝色; B. 干预组, 200mg/L 的 AGEs 干预 24h, 内皮细胞外形与对照组相比未发现明显变化, 而内皮细胞表面和细胞质显示较强的绿色荧光染色, 提示 connexin43 蛋白表达增强

讨 论

糖尿病常引起全身大血管和小血管病变, 研究表明合并糖尿病的冠心病患者冠状动脉粥样硬化病变更严重、更弥漫, AGEs 在糖尿病血管病变的发生发展中起着关键的作用^[4]。AGEs 的形成先由还原葡萄糖的醛基或酮基与生物分子如蛋白质或脂质的游离氨基反应形成早期可逆产物碱, 再经分子内重排形成更稳定的产物进一步脱水和凝聚形成不可逆的终末产物, 呈棕黄色, 可发荧光, 糖尿病及慢性肾功能不全患者, 体内 AGEs 的积聚明显增加^[5]。AGEs 能通过多种途径促进动脉粥样硬化的发生发展。AGEs 刺激血管内皮细胞能增加诱导型一氧化氮合酶 mRNA 表达, 诱导内皮细胞表达内皮素 - 1、血管细胞黏附分子 - 1、细胞间黏附分子 - 1、E - 选择素、组织因子、血栓素、白细胞介素 IL - 1、IL - 6、肿瘤坏死因子, 以及 AGEs 受体 (RAGE) 等, 促使内皮细胞凋亡, 引起单核 - 吞噬细胞迁移, 吞噬脂质, 启动动脉粥样硬化的病理过程, 促进早期动脉粥样硬化斑块的形成^[6]。研究表明, 抑制糖尿病患者体内 AGEs 的形成能有效延缓动脉粥样硬化的进展^[7]。

近年来 connexin43 在动脉粥样硬化发病机制中的作用日益引起人们的重视^[8]。人类冠状动脉粥样硬化的早期, 其增厚的内膜中缝隙连接蛋白 connexin43 表达明显增强^[9]。Kwak 等^[10]研究表明通过 connexin43 基因半敲除的 LDL 受体基因缺陷的小鼠 (LDLR - / - Cx43 + / -) 与 LDL 受体基因缺陷的带有正常 connexin43 基因的小鼠 (LDLR - / - Cx43 + / +) 相比, 其 connexin43 蛋白表达减少, 喂养高胆固醇

饲料 14 周后其胸腹主动脉和主动根部动脉粥样病变比 LDLR^{-/-}-Cx43^{+/+} 减少 50% ($P < 0.01$), 且 LDLR^{-/-}-Cx43^{+/+} 小鼠粥样硬化斑块中含更少的炎症细胞, 有更厚的纤维帽, 含更多的胶原和平滑肌细胞。他汀类调脂药能减少血管内皮细胞 connexin43 的表达, 而他汀类药物的抗动脉粥样硬化作用可能也与此有关^[11]。Dai 等^[12]模拟斑块易感和抵抗区域的动脉波型, 应用于培养的内皮细胞, 对其表型进行了观察, 结果发现斑块易感波形引起 connexin43 表达上调。Chadjichristos 等研究发现 connexin43 基因半敲除的 LDL 受体基因缺陷的小鼠 (LDLR^{-/-}-Cx43^{+/+}) 球囊损伤颈动脉内膜后其新生内膜的厚度比 LDLR^{-/-}-Cx43^{+/+} 的小鼠减小, 巨噬细胞浸润也更少。总之, 目前的研究提示内皮 connexin43 可能具有促动脉粥样硬化作用, 减少 connexin43 的表达能相应的减轻动脉粥样硬化病变的程度。而作为糖尿病血管病变关键因素的 AGEs 能否影响内皮细胞 connexin43 的表达尚不清楚, 这是一个值得研究的靶点。

本研究用 AGEs 干预体外培养的人脐静脉内皮细胞, 以观察 AGEs 能否影响人脐静脉内皮细胞 connexin43 的表达。结果发现不同浓度 (100、200、400mg/L) 的 AGEs 均能引起人脐静脉内皮细胞 connexin43 基因 mRNA 的表达增加; 200mg/L 的 AGEs 干预人脐静脉内皮细胞 24h 后可引起 connexin43 蛋白的表达水平增加。这些结果提示 AGEs 干预内皮细胞后在转录水平引起缝隙连接蛋白 connexin43 基因的表达上调。由于内皮 connexin43 可能有促动脉粥样硬化作用, AGEs 可通过上调血管内皮细胞 connexin43 的表达而促进动脉粥样硬化的发生发展。

AGEs 引起内皮细胞 connexin43 基因表达上调的机制尚有待于进一步研究明确。目前研究表明人类 connexin43 基因的转录调控, 涉及转录因子 Sp1、Sp3、AP1、Nkx2.5、Tbx2 等, 此外, 几条信号通路也参与了 connexin43 的转录调控。AGEs 与其受体 RAGE 结合可激活内皮细胞多种信号转导通路, 引起多种核转录因子的激活和转位, 启动多种靶基因的转录, 其中也可能包括 connexin43 基因, 进而引起内皮细胞 connexin43 的表达上调, 当然尚有待于进一步研究证实。

总之, 本实验研究初步提示, AGEs 短期干预能引起体外培养的人脐静脉内皮细胞缝隙连接蛋白 connexin43 基因 mRNA 和蛋白的表达水平增加, 提示内皮 connexin43 在 AGEs 促动脉粥样硬化的发病机制中起着重要的作用。本研究对糖尿病患者动脉粥样硬化发病机制的进一步探索具有一定的意义, 对动脉粥样硬化的防治也有一定启示作用。

参考文献

- Méndez JD, Xie J, Aguilar - Hernández M, *et al.* Trends in advanced glycation end products research in diabetes mellitus and its complications[J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 341(1-2):33-41
- Tymk K. Role of connexins in microvascular dysfunction during inflammation[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2011, 89(1):1-12
- 章顺荣, 洪鸣鸣. 缝隙连接蛋白与动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(8):662-664
- Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes[J]. *Exp Gerontol*, 2011, 46(4):217-224
- Zong H, Ward M, Stitt AW. AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy[J]. *Curr Diab Rep*, 2011, 11(4):244-252
- Jandeleit - Dahm K, Watson A, Soro - Paavonen A. The AGE/RAGE axis in diabetes - accelerated atherosclerosis[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008, 35(3):329-334
- Josephine F, Louis TL, Vicki T, *et al.* Advanced glycation end product interventions reduce diabetes - accelerated atherosclerosis[J]. *Diabetes*, 2004, 53(7):1813-1823
- Morel S, Burnier L, Kwak BR. Connexins participate in the initiation and progression of atherosclerosis[J]. *Semin Immunopathol*, 2009, 31(1):49-61
- Chadjichristos CE, Morel S, Derouette JP, *et al.* Targeting connexin 43 prevents platelet - derived growth factor - BB - induced phenotypic change in porcine coronary artery smooth muscle cells[J]. *Circ Res*, 2008, 102(6):653-660
- Kwak BR, Veillard N, Pelli G, *et al.* Reduced Connexin43 expression inhibits atherosclerotic lesion formation in low - density lipoprotein receptor - deficient mice[J]. *Circulation*, 2003, 107(7):1033-1039
- Wang LH, Chen JZ, Sun YL, *et al.* Statins reduce connexin40 and Connexin43 expression in atherosclerotic aorta of rabbits[J]. *Int J Cardiol*, 2005, 100(3):467-475
- Dai G, Kaazempur - Mofrad MR, Natarajan S, *et al.* Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis - susceptible and - resistant regions of human vasculature[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(41):14871-14876

(收稿:2011-09-15)

(修回:2011-11-08)