文章编号:1000-5404(2007)22-2199-02

经验交流

氟化物作用下成釉细胞凋亡及c-myc表达变化

杨 威,柴松宏,陈黎明,汪育娟 (贵阳市口腔医院口腔颌面外科,贵阳 550000)

机体通过细胞凋亡维持了细胞增殖与死亡之间的平衡,过度的细胞凋亡或凋亡不足均可引起疾病的发生[1]。本实验中通过建立小鼠氟牙症模型,探讨氟对成釉细胞凋亡及凋亡相关基因c-myc表达的影响,为进一步探讨氟牙症形成的分子机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型的制备

选用健康昆明小鼠60只,雌性,体质量20~25 g,4周龄(由贵阳医学院动物中心提供)。分为对照组(20只)和实验组(低氟组、高氟组各20只)。对照组饲以去离子水;低氟组饲以50 mg/L氟化钠溶液;高氟组饲以100 mg/L的氟化钠溶液。喂养6周,建立小鼠氟牙症模型[2]。

1.2 病理标本的制备

建模6周后,分离下颌骨,40 g/L多聚甲醛固定24 h,100 g/L EDTA 4 ℃脱钙4周,常规脱水,石蜡包埋,连续切片(厚5 μm),常规透明脱水。

1.3 TUNEL染色

原位细胞凋亡检测试剂盒购自Boehringer Mannhiem公司,按试剂盒说明书进行。

1.4 免疫组化

主要试剂:兔抗鼠c-myc多克隆抗体、SABC试剂盒、DAB显色液均购自北京中山公司。采用SABC法染色。切片常规脱蜡,3%双氧水封闭10 min;0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液10 min,正常山羊血清37 ℃封闭20 min,滴加适当稀释的一抗,4 ℃湿盒过夜;37 ℃ 1 h,生物素化二抗37 ℃ 20 min;SABC复合物37 ℃ 20 min。DAB室温下显色5~30 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.5 图像分析及统计学分析

应用Image Pro Plus 5.1图像分析系统。光镜下(×400)每张切片选取不重叠的6个视野进行自动测量,检测染色阳性细胞平均光密度值,对细胞的阳性表达产物进行半定量分析。采用SPSS 11.5统计软件对结果进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 TUNEL法染色结果及分析

对照组牙釉质增殖期阳性细胞较少见,分泌期及成熟期成釉细胞可见到阳性反应,细胞核呈深棕褐色,此期的星网状层及中间层中亦可见阳性细胞。高氟组牙釉质增殖期即可见阳性细胞,分泌期及成熟期可见较多阳性凋亡细胞。TUNEL检测每张切片增殖期、分泌期及成熟期,按下列公式计算细胞凋亡指数(apoptosis index, AI):AI=凋亡细胞/计数细胞×100%。结果显示高氟组在增殖期、分泌期和成熟期的AI值均显著高于对照组($P<0.01$)。

2.2 c-myc在成釉细胞中的表达

对照组牙齿发育的各期成釉细胞中c-myc蛋白呈阳性表达,早期表达明显[增殖期(0.653±0.036)],分泌期表达较弱[(0.472±0.031)];实验组成釉细胞增殖期有较少表达[低氟组(0.353±0.037)、高氟组(0.295±0.043)],至分泌期表达增强[低氟组(0.598±0.026)、高氟组(0.617±0.027),$P<0.01$]。

3 讨论

氟牙症主要是由于长期摄入过量氟而引起。研究表明,氟的过量摄入不仅可以导致成釉细胞呈现炎症及增殖的病理改变,同时可以诱导成釉细胞的凋亡。到目前为止,氟诱导的成釉细胞凋亡在氟牙症发病中的作用尚不清楚[3]。研究氟化物作用下成釉细胞凋亡及其基因表达变化,对于阐明氟牙症形成的机制具有重要意义。

本实验中利用TUNEL检测技术显示小鼠切牙的成釉细胞在釉质形成过程中的细胞凋亡现象,观察到TUNEL阳性标记出现于分泌期及成熟期早期,实验组中的细胞凋亡数量较对照组明显增多。我们用免疫组化方法检测了成釉细胞中c-myc的表达,观察到对照组牙齿发育的各期成釉细胞中均有c-myc蛋白阳性表达,早期表达明显,分泌期表达较弱,而实验组中c-myc蛋白增殖期有较弱表达,至分泌期表达增强。由此我们推测对照组早期成釉细胞以增殖分化为主,当细胞受增殖信号刺激时,c-myc基因主要维持细胞增殖,至分泌期细胞增殖分化基本完成,细胞增殖信号减弱,导致其表达减少;而实验组由于在氟作用下细胞增殖信号等因子的表达受抑制,导致c-myc表达失调,从而表现出促进细胞凋亡的作用。同时细胞增殖受抑制,而凋亡的成釉细胞数量增多导致能够行使正常功能的细胞数减少,从而产生釉基质蛋白分泌障碍或不能被充分降解,使矿化障碍,出现低矿化釉质。我们通过氟牙症动物模型的研究,观察到氟的摄入过量与成釉细胞凋亡有密切的关系,而

基金项目:贵州省优秀科技教育人才省长专项基金[(2005)第380号];贵阳市科技三项费[(2006)第25号]
Supported by the Nomarch Funds for Excellent Sci & Tech Teachers of Guizhou Province (2005-380) and the Sci & Tech Foundation of Guiyang (2006-25)

作者简介:杨 威(1964-),男,辽宁省铁岭市人,副主任医师,主要从事口腔疾病方面的研究,发表论文18篇。电话:13985180388
通讯作者:陈黎明,电话:13385108880

收稿日期:2007-08-30;修回日期:2007-10-24

c-myc 基因的表达改变可能参与了氟牙症的发生。

关键词：氟牙症；成釉细胞；凋亡

中图法分类号：R780.2　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] Jacobson M D, Weil M, Raff M C. Programmed cell death in animal development[J]. Cell, 1997, 88(3): 347-354.

[2] 章魁华，于世凤. 实验口腔病理学[M]. 北京：人民卫生出版社，2002：31-32.

[3] Yan Q, Zhang Y, Li W, *et al*. Micromolar fluoride alters ameloblast lineage cells *in vitro*[J]. J Dent Res, 2007, 86(4): 336-340.

（编辑　王　红）

经验交流

文章编号：1000-5404(2007)22-2200-02

依托咪酯和丙泊酚复合麻醉在脑血管疾病介入术中的效果比较

文清泉　（河北省邢台市人民医院麻醉科，邢台 054001）

脑动脉狭窄则是引起脑卒中的一个重要原因，大约10%的缺血性卒中及8%的短暂性脑缺血发作是由此引起的[1]。近年来血管内支架成形术和微弹簧圈栓塞术作为一种微创、安全、有效的方法已广泛应用于治疗颅内血管疾病，但其要求麻醉平稳、循环稳定，避免发生呛咳、缺氧、脑血管痉挛及应尽早拔除气管导管等。我们采用依托咪酯乳剂和丙泊酚复合瑞芬太尼全凭静脉麻醉，效果良好，并对两种组合进行了对比观察，现报告如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料

2006年5月至2007年1月，在我院行脑血管介入手术的患者40例，男性23例，女性17例，年龄26～59岁，体质量50～75 kg，其中颅内动脉瘤21例，颅内动脉狭窄19例。分为依托咪酯组（Ⅰ组）和丙泊酚组（Ⅱ组），每组20例，所有患者术前均无心血管、呼吸系统、内分泌、肝肾等疾病。

1.2　麻醉方法

术前30 min肌注苯巴比妥钠0.1 g，东莨菪碱0.3 mg，入室后开放静脉及桡动脉穿刺，以HP监护仪连续监测心电图（ECG）、收缩压（SBP）、舒张压（DBP）、脉搏氧饱和度（SpO_2）、呼气末二氧化碳分压（$P_{ET}CO_2$）。

麻醉诱导：Ⅰ组静脉注射瑞芬太尼1.5 μg/kg（时间>60 s）、依托咪酯0.3 mg/kg（30～60 s）、维库溴铵0.1 mg/kg；Ⅱ组静脉注射瑞芬太尼1.5 μg/kg（时间>60 s）、丙泊酚2 mg/kg（30～60 s）、维库溴铵0.1 mg/kg。两组均行气管插管，接麻醉机控制呼吸，维持$P_{ET}CO_2$在30～40 mmHg。

麻醉维持：Ⅰ组静脉持续泵入依托咪酯10～15 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$。瑞芬太尼12 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$，间断推注维库溴铵0.05～0.1 mg/kg，维持肌松；Ⅱ组持续泵入丙泊酚6～10 $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$，瑞芬太尼、维库溴铵用法同Ⅰ组。

1.3　观察项目

分别记录患者血压、心率的基础值，插管前、插管即刻、插管后5 min、动脉穿刺时、介入栓塞或支架植入时、拔管后5 min的血压、心率、脉搏氧饱和度、呼气末二氧化碳分压以及术毕患者自主呼吸恢复时间、按指令睁眼及张口时间、拔管时间，术后24 h随访术中知晓、恶心、呕吐情况。

1.4　统计学处理

计量资料以$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件，组内和组间比较用t检验。

2　结果

Ⅰ组患者于麻醉诱导后血压、心率有所下降，但麻醉过程中基本平稳（$P>0.05$），Ⅱ组患者诱导后血压、心率明显下降，尤其是SBP在插管前、插管后5 min、动脉穿刺时、介入栓塞（或支架植入）时4个时相点均显著低于基础值（$P<0.05$）。两组患者术中$P_{ET}CO_2$均维持在30～40 mmHg，见表1。Ⅱ组发生低血压、心动过缓者显著高于Ⅰ组（$P<0.05$），但术后苏醒时间短于Ⅰ组（$P<0.05$）；术后24 h随访两组患者均无术中知晓和恶心、呕吐情况发生。

表1　两组患者围术期血压、心率和呼气末二氧化碳分压变化（$n=20$，$\bar{x} \pm s$）

时相点		SBP(mmHg)	DBP(mmHg)	HR(次/min)	$P_{ET}CO_2$(mmHg)
基础值	Ⅰ组	128.32±11.31	80.43±12.06	75.68±8.31	
	Ⅱ组	130.44±6.23	84.35±10.30	78.07±8.69	
插管前	Ⅰ组	124.43±6.18	76.23±8.02	73.16±10.23	
	Ⅱ组	114.56±6.33[ab]	70.44±7.01[a]	70.42±12.21[a]	
插管即刻	Ⅰ组	126.67±9.36	78.19±9.24	75.37±10.41	35.23±4.12
	Ⅱ组	124.77±7.31	76.16±9.21	83.16±8.03	34.17±5.00
插管后5 min	Ⅰ组	125.43±10.73	76.22±7.34	74.13±9.19	34.14±4.04
	Ⅱ组	120.30±6.43[a]	70.25±8.32[a]	76.34±7.47	34.06±4.23
动脉穿刺时	Ⅰ组	125.32±14.76	76.36±11.04	75.02±11.32	33.36±5.04
	Ⅱ组	118.21±6.33[a]	76.34±12.11	78.23±10.04	35.26±5.12
介入栓塞或支架植入时	Ⅰ组	126.41±12.07	77.69±6.34	75.65±12.34	36.33±6.24
	Ⅱ组	119.65±12.38[a]	76.20±8.67	75.13±8.79	35.56±5.29
拔管后5 min	Ⅰ组	122.67±6.34	76.25±8.11	74.14±6.32	
	Ⅱ组	125.41±10.34	80.35±15.01	75.21±11.03	

a：$P<0.05$，与基础值比较；b：$P<0.05$，Ⅰ组比较

作者简介：文清泉（1959－），男，河北省邢台市人，副主任医师，主要从事心脑血管疾病麻醉、全凭静脉麻醉等方面的研究，发表论文28篇。电话：(0319)3286171

收稿日期：2007-04-03；**修回日期**：2007-09-06