论著

文章编号:1000-5404(2008)14-1360-04

# 过表达 Bcl-2 肾小管上皮细胞株的建立及 Bcl-2 逆转录病毒对抗肾小管上皮细胞凋亡的研究

葛成国,靳风烁,李黔生,李彦锋,王洛夫,梁培禾 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

**摘 要:目的** 建立稳定过表达 Bcl-2 蛋白的肾小管上皮细胞,探讨 Bcl-2 过表达对抗大鼠肾小管上皮细胞凋亡的作用。**方法** Bcl-2 逆转录病毒感染培养肾小管上皮细胞株 HK-2,经 G418 抗性筛选,PCR 鉴定并命名为 HK-$2^{Bcl-2}$;原位杂交检测细胞 Bcl-2 mRNA 表达水平;甘油诱导大鼠急性肾功能衰竭模型,采用含重组 Bcl-2 浓缩逆转录病毒液,感染大鼠肾小管上皮细胞,采用免疫组织化学法检测 Bcl-2 蛋白表达,原位末端标记(TUNEL)法检测细胞凋亡变化。**结果** PCR 和原位杂交显示 G418 抗性细胞克隆过表达 Bcl-2;甘油注射后大鼠出现急性肾功能衰竭,Bcl-2 逆转录病毒感染肾小管上皮细胞后,Bcl-2 蛋白表达上调,并能显著对抗肾小管上皮细胞凋亡。**结论** 成功建立过表达 Bcl-2 蛋白的肾小管上皮细胞株 HK-$2^{Bcl-2}$; Bcl-2 逆转录病毒显著抑制大鼠肾小管上皮细胞凋亡。

**关键词**:肾小管上皮;细胞株;B 细胞淋巴瘤/白血病基因

**中图法分类号**:R322.61;R329.28;R394.2 **文献标识码**:A

# Bcl-2-overexpressed renal epithelial cell strain *in vivo* suppresses rat renal tubular epithelial cell apoptosis

GE Cheng-guo, JIN Feng-shuo, LI Qian-sheng, LI Yan-feng, WANG Luo-fu, LIANG Pei-he (Department of Urology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract**: Objective To establish a novel stain of renal cell (HK-2) overexpressing Bcl-2 protein and investigate whether the overexpression of Bcl-2 protein has the anti-apoptosis effect on renal tubule epithelial cells (RTEC) in rats with acute renal failure (ARF). Methods Bcl-2 retrovirus, in the supernatants of packaging cell PA317 was used to infect the human kidney epithelial cell line HK-2. The G418 resistant colonies were selected, and PCR-verified positive colony was named as HK-$2^{Bcl-2}$. Hybridization *in situ* was employed to determine the Bcl-2 mRNA levels in this cell strain. ARF rats were induced by intramuscular injection of glycerol at a large dose of 1.5 ml per 100 g body weight, or a small dose of 0.75 ml. Then $1.8 \times 10^5$ CFU Bcl-2 retrovirus in the supernatant of packaging cell PA317 was infused to the rats of virus intervention group *via* bilateral renal arteries. Thus, there were 5 groups, group A (simple glycerol injection), group B (large dose of glycerol and virus intervention), group C (small dose of glycerol and virus intervention), group D (simple virus intervention), and group E (normal saline injection). Their kidney samples were taken 24 and 96 h, 7, 10, 14, and 21 d after intervention. Immunohistochemical assay was used to detect the expressions of Bcl-2 and PCNA proteins, and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) was employed for apoptotic cells. Results Hybridization *in situ* showed that the cells in G418 resistant HK-2 colonies overexpressed Bcl-2, indicating the establishment of a new stain of HK-2 overexpressing Bcl-2 protein. In ARF rats, Bcl-2 retrovirus infected renal tubular epithelium, up-regulated the expression of Bcl-2 protein, and had anti-apoptosis effect on renal tubular epithelial cells. Conclusion A stable renal epithelial cell line HK-$2^{Bcl-2}$ that overexpresses Bcl-2 mRNA is established successfully. The reconstructed Bcl-2 retrovirus can *in vivo* obviously inhibit the apoptosis of renal tubular epithelial cells.

**Key words**: renal epithelial cell; cell line; acute renal failure; apoptosis; Bcl-2

**作者简介**:葛成国,男,山东省莒南县人,博士,主治医师,主要从事急性肾功衰竭方面的研究,发表论文 10 余篇。电话(023)68757945,E-mail: kinghongyi@163.com

**收稿日期**:2007-07-10;**修回日期**:2007-12-12

近年来发现肾小管上皮细胞凋亡在急性肾衰竭(ARF)发病机制中发挥重要作用[1]。Bcl-2 基因是重要的抗凋亡调控基因之一。研究证实,过量表达 Bcl-2 可以抑制多种组织来源的细胞如肝癌细胞、脑组织细胞的凋亡[2-6]。目前有关 Bcl-2 基因在肾小管上皮细胞抗凋亡中作用的研究较少。本研究采用基因转染方法将含有人 Bcl-2 cDNA 逆转录病毒导入人肾小管上皮细胞,建立稳定过表达 Bcl-2 细胞系。采用甘油注射诱导大鼠急性肾功能衰竭(ARF)模型基础上,通过肾动脉反复灌注含重组 Bcl-2 浓缩逆转录病毒液,感染大鼠肾小管上皮细胞,观察处理后细胞凋亡变化,为研究早期 ARF 后细胞凋亡及 Bcl-2 抗凋亡作用做初步研究。

## 1　材料与方法

### 1.1　主要材料

人肾小管细胞株 HK-2 (美国 ATCC),蛋白酶抑制剂 PICT (瑞士 Roche 公司),Bcl-2 逆转录病毒液(逆转录病毒载体 pLXSN 及含人 Bcl-2 cDNA 的质粒经 *Eco*R Ⅰ酶切,$T_4$ 连接酶连接,*Bam*H Ⅰ酶切鉴定,构建成 pLBcl-2SN,收集其转染阳性 PA317 细胞培养上清液,经过滤,NIH3T3 滴度测定,病毒滴度为 $10^5$ CFU/ml 于本实验室超低温保存[7]。

### 1.2　方法

1.2.1　HK-2 细胞的培养　细胞于 DMEM-10% FBS,37 ℃,5% $CO_2$ 培养箱培养。

1.2.2　逆转录病毒感染 HK-2 细胞及抗性克隆的获得　感染前 2 d,将 $5\times10^5$ HK-2 细胞接种于 6 孔培养板,至细胞 50% ~80% 汇片,移去培养液,加入 1 ml 含 0.1 ml 病毒原液($PA317^{pLBcl\text{-}2SN}$、$PA317^{pLXSN}$ 产生)的培养液,同时加入聚凝胺至终浓度 8 μg/ml,5% $CO_2$ 培养箱内孵育细胞 1 ~ 3 h。用培养液稀释聚凝胺至 2 μg/ml,培养 2 d,细胞 1 ×3 传代,培养液含 500 μg/ml G418,继续选择培养 12 ~ 15 d,直至可见抗性克隆。挑取抗性克隆于 24 孔板,至细胞 70% ~90% 汇片,传代于 25 $cm^2$ 培养瓶,G418 选择压力下,细胞继续传 20 代并冻存。将 $PA317^{Bcl\text{-}2}$ 上清感染所得的抗性 HK-2 细胞命名为 $HK\text{-}2^{Bcl\text{-}2}$,将 $PA317^{pLXSN}$ 上清感染所得的抗性 HK-2 细胞命名为 $HK\text{-}2^{Neo}$。

1.2.3　PCR 检测插入片段新霉素抗性基因 $Neo^r$ 在基因组 DNA 中的存在　提取 HK-2、$HK\text{-}2^{Neo}$、$HK\text{-}2^{Bcl\text{-}2}$ 细胞的基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板,按照试剂盒(瑞士 Roche 公司)操作方法,采用引物新霉素抗性基因 G418($Neo^r$)引物进行扩增,引物序列:正向引物:5′-ATGAAGTTATGGGATGTGTGGCT-3′,反向引物:5′-GCCAAGCTCTTCAGCAATATCACG-3′,扩增片段长度为 480 bp,PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;然后 94 ℃ 1 min,60 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,72 ℃ 10 min,共 35 个循环。

### 1.3　Bcl-2 原位杂交染色

细胞在盖玻片上培养,采用针对 Bcl-2 寡核苷酸探针,经地高辛标记。采用多相寡核苷酸探针和高敏感标记原位杂交检测方法,按照试剂盒(武汉博士德公司)操作步骤分步进行。针对靶基因的 mRNA 序列为:5′-CGACCAGTTCTGAGCAGATCAT-GAAGACAG-3′; 5′-AGGATGCGTCCACCAAGAAGCTGAGCGAG-T-3′;5′-AGCATTCTGGTACTCAAGGCTCTGTGCAC-3′。

结果分析:细胞培养 5 d 后进行原位杂交染色,Bcl-2 mRNA 的细胞质着色呈棕黄色,将原位杂交染色后的盖片各 3 张进行图象分析,每张切片随机取 5 个视野,应用 TIGER 920 图像分析系统测出每个视野的光密度值和面积,得出其单位面积的平均光密度(AOD),取平均值代表该标本细胞质染色的强度。每张盖玻片随机计数 20 个染色阳性的细胞,分析其平均光密度值,结果行 *t* 检验。

### 1.4　ARF 动物模型建立

采用 Leung 等[8]方法。健康 Wistar 大鼠,体质量(200 ± 20) g,甘油(Glycerol)注射方法:G 大:大剂量甘油组: 50% 甘油按剂量 1.5 ml/100 g;G 小:小剂量组:0.75 ml/100 g,分两侧后肢肌注。分为以下各组:A (G, Glycerol) 单纯甘油注射组;B (G 大 + V, Glycerol + Virus) 大剂量甘油注射 + 逆转录病毒液(为含有重组 Bcl-2 基因的逆转录病毒浓缩液 pLBcl-2SN,本科实验室冻存)灌注组;C (G 小 + V, Glycerol + Virus) 小剂量甘油注射 + 逆转录病毒灌注组;D (V, Virus)单纯逆转录病毒灌注(只灌注逆转录病毒)组; E 正常对照组 (以 1.5 ml/100 g 生理盐水代替甘油)。逆转录病毒液肾动脉灌注方法:麻醉后,阻断肾动脉平面下之腹主动脉,穿刺平面上之腹主动脉,抽吸病毒液 0.6 ml,穿刺腹主动脉,灌注两侧肾动脉,夹闭肾蒂 8 min,放松 2 min,重复 3 次;连续重复注射病毒液 3 次共 1.8 ml。96 h 后再次麻醉,A 组不注射甘油,进行假手术(开腹后关腹);B、C 两组只灌注病毒液,剂量、次数同前;D、E 两组重复 96 h 前的药物注射。方法剂量同前。术毕动物置于代谢笼内,自由摄食进水。从最初实验开始计算,经过 21 d 后,麻醉各组动物,各实验组分别重复 21 d 前相同的药物注射(包括病毒液灌注),方法剂量同前。各组动物分别于手术后 24 h、96 h、7 d、10 d、14 d 后麻醉,留取标本,进行免疫组化及细胞凋亡的检测。

### 1.5　免疫组织化学染色

常规方法,按文献[9]进行。兔抗鼠 Bcl-2、PCNA 购于武汉博士德。

### 1.6　细胞凋亡测定

细胞凋亡原位检测试剂盒(国宝灵曼 Boehriner Mannheim)按试剂盒步骤操作。

### 1.7　图像分析

1.7.1　Bcl-2 阳性细胞为细胞质着棕黄染色　每张切片随机取 5 个视野,计算 Bcl-2 阳性细胞面积比(面密度)。应用 TIGER 920 图像分析系统设定灰度值,测出单位面积的平均光密度(AOD),取平均值代表该标本免疫细胞化学染色的强度。

1.7.2　TUNEL 及 PCNA 检测　采用双盲计数,细胞核着色棕黄,形态呈碎点状、不规则者为阳性。切片随机取 5 个高倍(×400) 视野,各计数 100 个细胞,计算阳性表达细胞占目标细胞数(肾小管)的百分比。

### 1.8　统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件进行 *t* 检验。

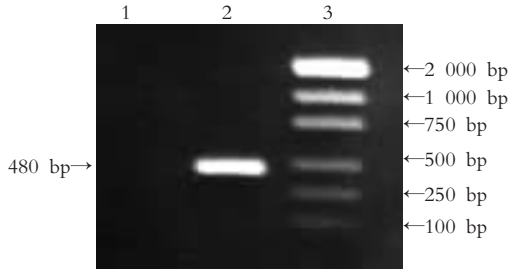
## 2 结果

### 2.1 重组逆转录病毒感染 HK-2 细胞的获得

加入 G418 第 3 天,对照组细胞开始死亡;第 9 天,镜下可见个别区域细胞呈小团状增生。20 d,感染的 HK-2 细胞已形成多个明显的肉眼可见克隆,直径 2 ~ 3 mm。各挑取 6 个 PA317$^{pLBcl\text{-}2SN}$、PA317$^{pLXSN}$上清感染的 HK-2 细胞克隆于 24 孔板,继续 G418(500 μg/ml)选择培养,待长满孔底后,转至 25 $cm^2$培养瓶,含 G418 的液中连续培养 20 代后,细胞液氮冻存。

### 2.2 Neor 目的片段在重组细胞基因组 DNA 的检测

提取 HK-2、HK-2$^{Bcl\text{-}2}$基因组 DNA,采用新霉素抗性基因 Neo$^r$引物进行 PCR,验证 Bcl-2 目的片段是否整合到了细胞基因组。取 10 μl PCR 产物,1.5% 琼脂糖凝胶电泳,结果见图 1,HK-2$^{Bcl\text{-}2}$泳道有大小符合 480 bp 的条带,而 HK-2 未见扩增条带。




1: HK-2; 2: HK-2$^{Bcl\text{-}2}$; 3: DNA 标准(DL 2000)

**图 1 PCR 检测 Neo$^r$目的片段在 HK-2 基因组 DNA 中的存在**

### 2.3 原位杂交 Bcl-2 mRNA 水平的表达变化

可见染色的细胞质有蓝色染色颗粒,细胞核中未见染色。图像分析采用平均光密度法(AOD),发现病毒感染组 HK-2$^{Bcl\text{-}2}$细胞内 Bcl-2 mRNA 表达[AOD 为(0.83 ± 0.08)] 较其他两组增高[HK-2、HK-2$^{Neo}$ AOD 分别为(0.48 ± 0.03)、(0.52 ± 0.07)],差异显著($P < 0.05$)。HK-2、HK-2$^{Neo}$之间表达无显著差异($P > 0.05$)。

### 2.4 大鼠肾脏 Bcl-2 表达

Bcl-2 在正常对照组肾小管呈弥散性、弱阳性表达。大、小剂量甘油注射后出现表达增强,各时相点较对照组升高,差异显著($P < 0.05$)。G 大 + V、G 小 + V 组 Bcl-2 呈片状强阳性表达,各时相点较 G 组明显升高,差异显著($P < 0.05$);G 小 + V 组同 G 大 + V 组之间各时相点无显著性差异($P > 0.05$)。见表 1。

**表 1 肾小管上皮细胞 Bcl-2 免疫组织化学染色结果**
**平均光密度(AOD)($\bar{x} \pm s$)**

| 组别 | 24 h | 96 h | 7 d | 10 d |
|---|---|---|---|---|
| G 大 | 0.57 ± 0.15$^a$ | 0.74 ± 0.18$^a$ | 0.67 ± 0.14$^a$ | 0.52 ± 0.14$^a$ |
| G 大 + V | 0.83 ± 0.08$^{bc}$ | 0.87 ± 0.13$^{bc}$ | 0.85 ± 0.08$^{bc}$ | 0.85 ± 0.15$^{bc}$ |
| G 小 | 0.52 ± 0.13$^a$ | 0.68 ± 0.14$^a$ | 0.56 ± 0.08$^a$ | 0.53 ± 0.16$^a$ |
| G 小 + V | 0.84 ± 0.19$^{bd}$ | 0.88 ± 0.17$^{bd}$ | 0.81 ± 0.08$^{bd}$ | 0.85 ± 0.17$^{bd}$ |
| V | 0.42 ± 0.15 | 0.43 ± 0.16 | 0.42 ± 0.09 | 0.41 ± 0.14 |
| 对照组 | 0.43 ± 0.11 | 0.39 ± 0.12 | 0.37 ± 0.10 | 0.40 ± 0.08 |

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$,与对照组比较; c: $P < 0.05$,与 G 大组比较,d: $P < 0.05$,与 G 小组比较

### 2.5 肾小管上皮细胞凋亡测定

甘油注射后各实验组 TUNEL 阳性细胞数量显著上升,首先出现在外髓区远端小管,明显较皮质及近端小管多,随时间推移比例逐渐上升。各时相点与对照组比较,差异显著($P < 0.05$),均在 24 h 达到峰值,随后逐渐下降。

甘油注射 + 病毒灌注后各时相点,G 小 + V 组同 G 小组比较,TUNEL 阳性细胞数显著下降($P < 0.05$);G 大 + V 组同 G 大组比较,TUNEL 阳性细胞数各时相点无统计学差异($P > 0.05$)。见表 2。

**表 2 ARF 大鼠肾脏 TUNEL 阳性细胞数(/500, $\bar{x} \pm s$)**

| 组别 | 24 h | 96 h | 7 d | 10 d |
|---|---|---|---|---|
| G 小 | 86.54 ± 11.82$^{bd}$ | 50.37 ± 12.63$^{bd}$ | 36.67 ± 8.72$^{bd}$ | 45.86 ± 17.97$^a$ |
| G 小 + V | 64.29 ± 12.16$^{bdc}$ | 38.20 ± 9.28$^{bdc}$ | 29.72 ± 5.89$^{bdc}$ | 33.82 ± 11.41$^{ac}$ |
| G 大 | 208.48 ± 38.27$^b$ | 102.63 ± 35.47$^b$ | 68.62 ± 1.41$^b$ | 46.31 ± 12.48$^a$ |
| G 大 + V | 167.37 ± 32.49$^b$ | 98.31 ± 23.04$^b$ | 56.52 ± 9.07$^b$ | 40.94 ± 10.86$^a$ |
| V | 10.37 ± 3.73 | 11.38 ± 2.20 | 12.28 ± 2.49 | 10.38 ± 3.01 |
| 对照组 | 12.37 ± 2.63 | 13.54.37 ± 2.27 | 10.52 ± 2.77 | 14.50 ± 3.57 |

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$,与对照组比较; c: $P < 0.05$,与 G 小组比较; d: $P < 0.01$,与时相对应大剂量组比较

## 3 讨论

### 3.1 重组 HK-2 细胞的分子生物学鉴定

用重组逆转录病毒感染 HK-2 细胞,获得的 G418 抗性细胞即为重组 HK-2$^{Bcl\text{-}2}$细胞。逆转录病毒能使所转导基因整合入细胞基因组,造成长期基因导入和表达。我们采用 PCR 法鉴定其是否整合到了细胞基因组。HK-2 细胞没能扩增出 Neo$^r$基因片段;HK-2$^{Bcl\text{-}2}$、HK-2$^{Neo}$细胞基因组扩增出 Neo$^r$基因片段,与理论片段长度吻合,表明 HK-2$^{Bcl\text{-}2}$基因组整合了 Bcl-2 的目的 DNA 片段。

### 3.2 过表达 Bcl-2 肾小管上皮细胞株建立的意义

本实验采用的 HK-2 细胞株来源于人肾小管,是通过转染了人乳头瘤病毒 E6/E7 基因而建立的肾小管上皮细胞的株系,保留了原来肾小管上皮细胞的表型特性及其功能,现已被广泛用来从事肾脏生理病理研究。利用逆转录病毒的整合特性,而且逆转录病毒带有内部启动子,其中 5′-LTR 启动子和增强子驱动插入 DNA 的转录。本实验通过逆转录病毒载体将外源 Bcl-2 cDNA 整合到靶细胞基因组中,获得了稳定表达 Bcl-2 的转染细胞。原位杂交显示,转染靶基因组细胞 HK-2$^{Bcl\text{-}2}$内 Bcl-2 mRNA 表达水平较其他两组显著增高。转染细胞中 Bcl-2 mRNA 的表达水平上升说明插入片段 Bcl-2 在蛋白水平出现过表达。表明通过病毒基因转染,成功建立了过表达 Bcl-2 蛋白的肾小管细胞株 HK-2$^{Bcl\text{-}2}$。为进一步关于 Bcl-2 肾小管上皮细胞凋亡调控中的作用研究打下基础。

### 3.3　关于大鼠甘油致 ARF 模型

大鼠甘油肌肉注射造成横纹肌细胞溶解,肌红蛋白管型梗阻,出现肌/血红蛋白尿。血红素蛋白对肾小管上皮细胞具有直接毒性作用,同时合并肾脏缺血性损伤,其作用机制较好的模拟创伤尤其是挤压伤后急性肾功能衰竭的临床特点。本研究进一步证实,轻、中等程度损伤(小剂量甘油注射)后所导致的急性肾功能衰竭,凋亡成为肾小管上皮细胞丢失的主要原因[10]。

Bcl-2 基因蛋白表达产物定位于细胞核膜、细胞质内质网膜、线粒体外膜或内膜。具有稳定细胞器膜的作用。Bcl-2 的过表达通过维持线粒体的完整性,增强线粒体的缓冲钙离子的能力,其过度表达可干扰正在发生凋亡的细胞中的穿越膜的 $Ca^{2+}$ 外流[11]。Bcl-2 可通过改变胞内细胞器的 $Ca^{2+}$ 内流而抑制凋亡,从而能够挽救因缺氧损伤导致的肾小管细胞坏死,Bcl-2 在不同的细胞类型中表达也存在差异,在缺血性肾功能衰竭过程中,抗凋亡原癌基因和肾小管再生过程密切相关。本研究通过 Bcl-2 重组逆转录病毒感染肾小管上皮细胞,促使其 Bcl-2 蛋白过表达,结果提示显著降低肾小管上皮细胞的凋亡比率,从而挽救 ARF 发生后濒临凋亡的部分肾小管上皮细胞,增加其幸存的绝对数量,是否有利于肾功能的早期恢复,成为我们下一步的研究目标。本研究可能为临床 ARF 的救治提供新的思路。

**参考文献:**


[1] Hauser P, Oberbauer R. Tubular apoptosis in the pathophysiology of renal disease[J]. Wien Klin Wochenschr, 2002, 114(15-16): 671-677.

[2] Takahashi M, Saito H, Okuyama T, *et al*. Overexpression of Bcl-2 protects human hepatoma cells from Fas-antibody-mediated apoptosis [J]. J Hepatol, 1999, 31(2): 315-322.

[3] Wei L, Cui L, Snider B J, *et al*. Transplantation of embryonic stem cells overexpressing Bcl-2 promotes functional recovery after transient cerebral ischemia[J]. Neurobiol Dis, 2005, 19(1-2): 183-193.

[4] 何志义, 赵　晶, 邹巧治, 等. 脑室注射 PLXSN-bcl-2 对局灶性脑缺血大鼠脑梗死体积、Bcl-2/Bax 蛋白表达及神经元凋亡的影响[J]. 中华神经科杂志, 2005, 38(4): 269-270.

[5] 付　霞, 何志义, 张晓天, 等. 骨髓基质细胞与 bcl-2 基因对脑缺血大鼠疗效以及 IGF-1 表达影响的研究[J]. 中国医科大学学报, 2007, 36: (4): 369-373.

[6] Jacysyn J F, Conde-Moscatelli M, Barrichello C R, *et al*. Thymic epithelial cells mediate a Bcl-2-independent protection of single-positive thymocytes from dexamethasone-induced apoptosis[J]. Exp Cell Res, 2002, 272(2): 119-126.

[7] 葛成国, 靳风烁, 李黔生, 等. 过表达 Bcl-2 雪旺细胞抗凋亡能力的实验研究[J]. 中国康复医学杂志, 2004, 19(2): 95-97.

[8] Leung V, Croatt A J, Haggard J J, *et al*. Acute cholestatic liver disease protects against glycerol-induced acute renal failure in the rat[J]. Kidney Int, 2001, 60(3): 1047-1057.

[9] 蔡文琴, 王伯沄. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994: 514.

[10] Kunduzova O R, Escourrou G, Seguelas M H, *et al*. Prevention of apoptotic and necrotic cell death, caspase-3 activation, and renal dysfunction by melatonin after ischemia/reperfusion [J]. FASEB J, 2003, 17(8): 872-874.

[11] Zhang M, Zhang H Q, Xue S B. Effect of Bcl-2 and caspase-3 on calcium distribution in apoptosis of HL-60 cells[J]. Cell Res, 2000, 10(3): 213-220.


(编辑　栾　嘉)

(上接 1359 页)

症状,但是由于残髓所在部位不同,临床表现不明显。后牙干髓术后大部分牙髓已被去除,发炎的牙髓多位于根部,症状多不剧烈,常表现为慢性根尖周炎的症状。本组中,后牙干髓术后残髓炎多表现为冷热刺激痛和咬合痛。当遇到不明原因的后牙冷热刺激痛和咬合痛,且曾经有牙髓治疗史的患者,去除充填物进行根管探察可尽快明确诊断以得到及时治疗。

后牙干髓术后残髓炎对温度刺激反应不强烈,多表现为迟缓反应,这是由于残髓多位于根部,温度传导不易到达根部,因此临床检测牙髓活力需要加大刺激强度、增加刺激时间或者改变刺激方式(多个牙面进行测试),刺激过后等待片刻,以得到残髓的真正反应。通常温度强刺激能引起反应的患牙,可以怀疑为残髓炎。

后牙干髓术后残髓炎多位于根管上半部,原因为干髓剂在根髓未完全干尸前已失效或干髓剂过少,根髓干尸不完全造成的。因此,在诊断过程中,可以在治疗后牙干髓术后残髓炎时,去除原充填物后,重新拔髓,若此时出现探痛可以作为诊断后牙干髓术后残髓炎的直接依据[2]。

后牙干髓术后 3~5 年易出现根管或根尖孔闭锁,若出现残髓炎后,可以根据根管的通畅情况重新进行牙髓治疗。后牙干髓术后残髓炎治疗首先要去除原来的充填物,明确诊断后探明根管的通畅程度,通常采用根管治疗、牙髓塑化治疗、根管治疗术加干髓术治疗(牙髓塑化治疗)或者重新进行干髓术治疗。

本组中,101 颗后牙干髓术后残髓炎重新进行牙髓治疗后,临床观察 2 年,89 颗无自觉症状,X 线片显示根尖阴影消失或缩小;12 颗因劈裂拔除。说明后牙干髓术后残髓炎重新进行牙髓治疗近期治疗效果可靠。

后牙干髓术后残髓炎治疗稳定后,应及时进行冠修复,减少牙劈裂的发生;同时恢复后牙的咀嚼功能。

**关键词**: 残髓炎;根管治疗术;干髓术

**中图法分类号**: R781.31　　**文献标识码**: B

**参考文献:**


[1] 张翠贤,袁渝萍,惠爱荣. 干髓术失败原因分析和提高其疗效的措施[J]. 牙体牙髓牙周病杂志, 1999, 9(2): 159

[2] 陈莉娅. 残髓炎病因及治疗分析[J]. 现代口腔医学杂志, 2004, 18(2):168.


(编辑　王　红)