文章编号:1000-5404(2010)10-1059-05

论著

放线共生放线杆菌培养上清对成骨细胞分化及间隙连接通讯的影响

陈允嘉,王豫蓉,邹林洪,李闻颖,郑雷蕾,吴 艳,李 艳 (400015 重庆,重庆医科大学附属口腔医院正畸科)

[摘要] **目的** 探讨放线共生放线杆菌(*actinobacillus actinomycetemcomitans*,*A. a*)培养上清对成骨细胞分化以及细胞间隙连接通讯的影响。**方法** 在 *A. a* 培养上清中体外培养成骨细胞,中性红检测成骨细胞活性,RT-PCR 检测成骨细胞分化标记,免疫组化观察Ⅰ型胶原蛋白表达,利用划痕标记荧光染料示踪(SLDT)法与 Western blot 检测 Connexin43 的表达,研究成骨细胞间隙连接通讯的变化。**结果** 20% 以下浓度的 *A. a* 培养上清对成骨细胞无明显致死性。RT-PCR 结果显示 *A. a* 培养上清中成骨细胞分化标记的表达降低。免疫组化结果显示 *A. a* 培养上清中成骨细胞Ⅰ型胶原蛋白表达降低。SLDT 法结果显示 *A. a* 培养上清中成骨细胞荧光染料扩散低于对照组。Western blot 检测结果显示 *A. a* 培养上清中成骨细胞 Connexin43 表达降低。**结论** *A. a* 培养上清对成骨细胞分化及细胞间隙连接通讯有抑制作用。

[关键词] 放线共生放线杆菌;成骨细胞;分化;细胞间隙连接通讯
[中图法分类号] R322.71; R329.27; R379.1 **[文献标志码]** A

Actinobacillus actinomycetemcomitans induces differentiation and gap junctional intercellular communication in cultured osteoblasts

Chen Yunjia, Wang Yurong, Zou Linhong, Li Wenying, Zheng Leilei, Wu Yan, Li Yan (Department of Orthodontics, Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing, 400015, China)

[Abstract] Objective To investigate the effect of the supernatant of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. a*) on the differentiation and gap junctional intercellular communication in osteoblasts *in vitro*. Methods Osteoblastic cells were maintained in BHI growth medium mixed with *A. a* culture supernatants. Neutral red was used to test cellular activity. Quantitative real-time PCR assay was used to detect the differentiation markers, including alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN) and bone sialoprotein (BSP), and the immunohistochemistry for Ⅰ collagen. The change of gap junctional intercellular communication in osteoblastic cells was studied by scrape-loading and dye transfer technique (SLDT), and the connexin43 expression was detected by Western blotting. Results Until concentration to 20% there was no changing on the viability of osteoblastic cells compared to BHI sample as control. SLDT showed the diffusion distance of fluorescent dye in cells cultured with *A. a* culture supernatants was shorter than those of control. Real-time PCR showed the mRNA expressions of ALP, BSP and OCN were decreased compared with those in control. Immunohistochemistry showed that Ⅰ collagen expression in the osteoblasts was decreased in *A. a* culture supernatants. The protein expression of Cx43 in sample treated with *A. a* culture supernatants was remarkable reduced than in sample treated with BHI. Conclusion *A. a* inhibits the differentiation and gap junctional intercellular communication in osteoblasts.

[Key words] *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; osteoblasts; differentiation; gap junctional intercellular communication

Corresponding author: Wang Yurong, E-mail: rywmin66@yahoo.com.cn

放线共生放线杆菌(*actinobacillus actinomycetemcomitans*,*A. a*)是已知的牙周病病原菌之一,其产生的多种毒力因子可造成牙槽骨破坏[1]。研究证明由于固定矫治器的使用而使口腔自洁功能降低,矫治初期 2 个月放线共生放线杆菌的检出率明显升高[2]。错畸畸形矫治中的正畸牙移动是牙槽骨的组织学改建的结果,需要成骨细胞、破骨细胞和骨细胞的协同作用,而细胞间的协同作用需要依赖于细胞间的传递。本实验通过在 *A. a* 培养上清中体外培养成骨细胞,探讨 *A. a* 对成骨细胞分化以及细胞间隙连接通讯的影响。

[通信作者] 王豫蓉,E-mail:rywmin66@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 *A. a* 培养上清的制备

采用 *A. a* 国际标准菌株 5 株：ATCC43717，ATCC43718，ATCC43719，ATCC29523，ATCC24523（上海坤肯生物化工），BHI 液体培养基（Becton Dickinson，US），37 ℃，10% CO_2、10% H_2、80% N_2培养 48 h。革兰染色检查有无污染，超速离心机离心细菌（10 000 × *g*，离心 20 min），0.22 μm 过滤器过滤，弃沉淀，上清液 -20 ℃保存备用。上清液 pH 值为（7.2 ± 0.2）。

1.2 成骨细胞培养

小鼠颅骨来源正常成骨细胞株 MC3T3-E1（北京亚平宁），含 10% 牛胎血清的 alpha-MEM 液体培养基（上海博生，L0476），100 μg/ml 链霉素，100 μg/ml 青霉素 G，37 ℃，5% CO_2培养。

1.3 *A. a* 培养上清的成骨细胞毒性检测

35 mm 直径培养皿培养 MC3T3-E1，至汇合成均匀单层细胞，更换含不同浓度 *A. a* 培养上清的培养液，37 ℃，5% CO_2培养 72 h。弃培养液，PBS（自制）洗涤 3 次，加入中性红（10 mg/ml，北京索莱宝）培养液 2 ml，再次 37 ℃，5% CO_2培养 1 h，弃培养液，PBS 洗涤 4 次，加入 1 ml 缓冲溶液（1% 醋酸，50% 乙醇）。室温下微型振荡器振荡 5 min，微量分光光度计测定溶液光密度，选择 540 nm 作为检测波长，620 nm 作为参考波长。

1.4 总 RNA 抽提

不同浓度（1%、3%、5%、10%）的 *A. a* 培养上清培养液，直径 35 mm 培养皿培养 MC3T3-E1，至汇合成均匀单层细胞。37 ℃，5% CO_2培养 72 h。弃培养液，PBS 洗涤 3 次。残余物转至 10 ml 试管中，按 Trizol@（Gibco BRL，Grand Island，NY）法抽提总 RNA。*D*（260）/*D*（280）光密度检测 RNA 纯度，1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 降解情况，供后续实验使用。

1.5 成骨细胞分化标志 mRNA 的表达

检测成骨细胞分化标志：碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP），骨钙素（osteocalcin，OCN）和骨唾液酸蛋白（bone Sialoprotein，BSP）。用 PRISM7700 荧光定量 PCR 仪（Applied Biosystems，Foster City，CA），RT-PCR 定量检测成骨细胞分化标志 mRNA。RT-PCR 所用的上游引物，下游引物及 *Taq*Man 探针由 PrimerExpress® 软件设计（Applied Biosystems），见表 1。25 μl 反应缓冲液（Applied Biosystems）中加入 100 ng 总 mRNA，1 μmol/L 引物，0.25 μmol/L *Taq*Man 探针。以下述条件进行 RT-PCR：50 ℃，2 min；60 ℃，30 min；95 ℃，5 min；94 ℃，15 s 循环 40 次后 60 ℃，1 min。

表 1 RT-PCR 所用的引物及 *Taq*Man 探针

分化标志		序列（5′→3′）
ALP	上游引物	TGTCTGGAACCGCACTGAACT
	下游引物	CAGTCAGGTTGTTCCGATTCAA
	*Taq*Man 探针	TGGACTACCTCTTAGGTCTCTTTGAGCCCG
OCN	上游引物	CCTGCTTGTGACGAGCTATCAG
	下游引物	GCACAGGTCCTAAATAGTGATACCGT
	*Taq*Man 探针	CCAGTATGGCTTGAAGACCGCCTACAAAC
BSP	上游引物	TAGCTACGGAGCAGAGACCACA
	下游引物	TCTGCATCTCCAGCCTTCTTG
	*Taq*Man 探针	CACAGACTTTTGAGTTAGCGGCACTCCAAC

1.6 免疫组织化学观察成骨细胞Ⅰ型胶原蛋白

35 mm 直径培养皿培养 MC3T3-E1，培养至第 3 天，弃去培养基，PBS 冲洗 2 次，加入体积分数为 70% 的乙醇，固定 30 min，根据免疫组化试剂盒（SABC 增强型 DAB 显色试剂盒，北京天泽基因）要求染色。

1.7 划痕标记荧光染料示踪（SLDT）检测成骨细胞间 GJIC 变化

35 mm 直径培养皿培养 MC3T3-E1，至汇合成均匀单层细胞。更换含不同浓度 *A. a* 培养上清的培养液，37 ℃，5% CO_2培养 72 h。PBS 洗涤 3 次，加入荧光染色剂，用锐利手术刀在培养皿中央作划痕，静置 5 min，PBS 洗涤 4 次，2% 多聚甲醛固定。用荧光倒置显微镜拍摄 LY 扩散情况，LY 扩散距离使用计算机图像进行测量（来源 U. S. National Institute of Health and available on the Internet. http://rsb. info. nih. gov/nih-image/）。

1.8 成骨细胞间 GJIC 变化影响因素的监测

1.8.1 不同浓度的 *A. a* 培养上清培养液对成骨细胞间 GJIC 变化影响 不同浓度 *A. a* 培养上清培养液中，24 h 培养成骨细胞 MC3T3-E1，SLDT 法检测成骨细胞间 GJIC 变化。

1.8.2 不同培养时间对成骨细胞间 GJIC 变化影响 5% *A. a* 培养上清培养液中，24、48、72 h 培养成骨细胞 MC3T3-E1，SLDT 法检测成骨细胞间 GJIC 变化。48 h 与 72 h 培养组每 24 小时半量更换不含 *A. a* 培养上清的培养液。

1.9 Western blot 检测 Connexin43（Cx43）蛋白的表达

5% *A. a* 培养上清培养液，24 h 培养成骨细胞 MC3T3-E1。加入 250 μl 含有 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂（phenylmethylsulfonyl fluoride，PMSF）和 1 μmol/LEDTA 的 20% 硫酸钠（sodium dodecyl sulfate，SDS），超声波分裂细胞 30 s，4 ℃，13 000 × *g*，离心 15 min。Bio-Rad 蛋白分析试剂盒（Bio-Rad，Hercules，CA）测定蛋白质样本浓度。10 μg 蛋白质加入 12.5% SDS-PAGE，沸水浴加热 3 ~ 5 min，冷却到室温，蛋白样品上样，200 V 电泳 1 h。20 V，电泳 16 h 转膜至 PVDF 膜（Bio-Rad，Hercules，CA）。加入兔抗 Connexin43 多克隆抗体（Zymed Inc.，San Francisco，CA），HRP 标记的 GAPDH 单抗（稀释比例 1∶10 000，康成生物）检测 Connexin43。ECL® 化学发光试剂盒（Amersham）和柯达 X-OMAT BT 胶片（Rochester，NY）检测蛋白。

1.10 统计学方法

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计分析软件进行单因素方差分析。

2 结果

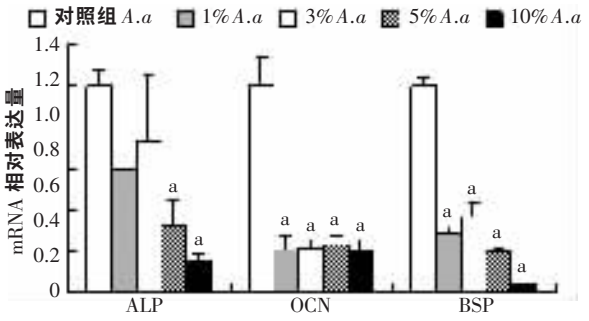
2.1 *A. a* 培养上清的成骨细胞毒性

此次实验的 *A. a* 培养上清浓度分别为 5%、10%、15% 和 20%，中性红只被活细胞吸收，没有发现 *A. a* 培养上清对成骨细胞 MC3T3-E1 有致死性作用。后续实验选用 10% 以下浓度 *A. a* 培养上清进行实验。

2.2 *A. a* 培养上清对成骨细胞分化的影响

2.2.1 *A. a* 培养上清对成骨细胞分化标记表达的影响 图 1 示不同浓度 *A. a* 培养上清均抑制成骨细胞 MC3T3-E1 分化标记的表达。培养上清所有浓度对 OCN 和 BSP 表达的影响高于

对 ALP 表达的影响($P<0.01$)。



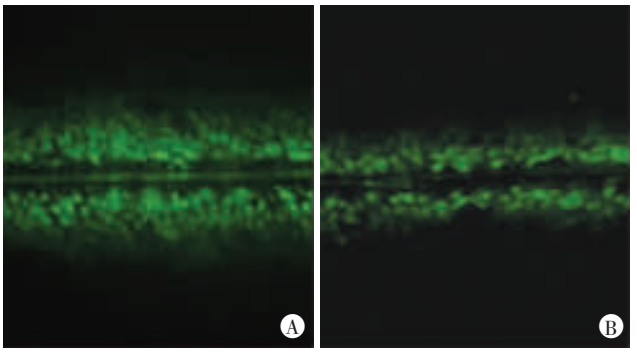
a: $P<0.01$,与对照组比较

图 1　不同浓度 *A. a* 培养上清对成骨细胞分化的影响

2.2.2　*A. a* 培养上清对成骨细胞Ⅰ型胶原蛋白的影响　　结果见图 2。随 *A. a* 培养上清浓度的增加Ⅰ型胶原蛋白表达降低。

2.3　*A. a* 培养上清对 GJIC 的影响

2.3.1　不同血清型 *A. a* 培养上清对 GJIC 的影响　　SLDT 法检测成骨细胞 MC3T3-E1 间 GJIC 变化的荧光显微镜图像结果见图 3。alpha-MEM 培养基培养的成骨细胞作为对照组,观察 LY 扩散层数为 7 ~ 8 层细胞;而培养基中加入 5% *A. a* 培养上清的成骨细胞只观察到 LY 有 3 ~ 4 层细胞扩散。



A:alpha-MEM,24 h;B:5% *A. a* 培养上清,24 h

图 3　SLDT 法检测成骨细胞 GJIC 变化 LY 荧光扩散距离　(×100)

图 4 显示 5 株不同菌株 *A. a* 培养上清对成骨细胞 MC3T3-E1 的 GJIC 抑制结果。所有菌株培养上清与对照组相比对成骨细胞 GJIC 有 50% ~ 70% 的抑制作用,所有菌株培养液对成骨细胞 GJIC 抑制作用没有统计学差异($P>0.05$)。因此决定使用 *A. a* 标准株 ATCC43717 进行实验。

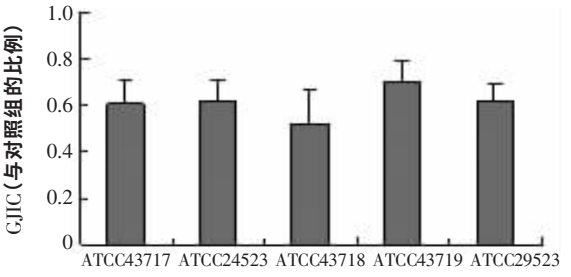
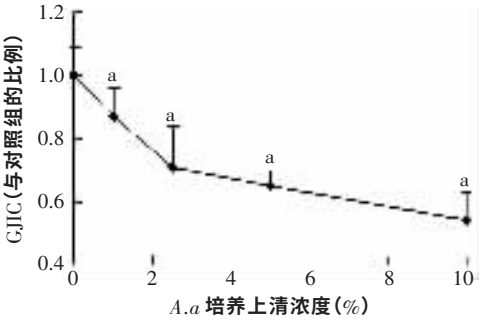


图 4　不同 *A. a* 菌株培养上清对成骨细胞 MC3T3-E1GJIC 的影响

2.3.2　不同浓度 *A. a* 培养上清对 GJIC 的影响　　*A. a* 培养上清浓度越大,对 GJIC 的抑制作用越明显(图 5)。5% 浓度的 *A. a* 培养上清与对照组相比对成骨细胞 GJIC 有 60% 以上的抑制作用。



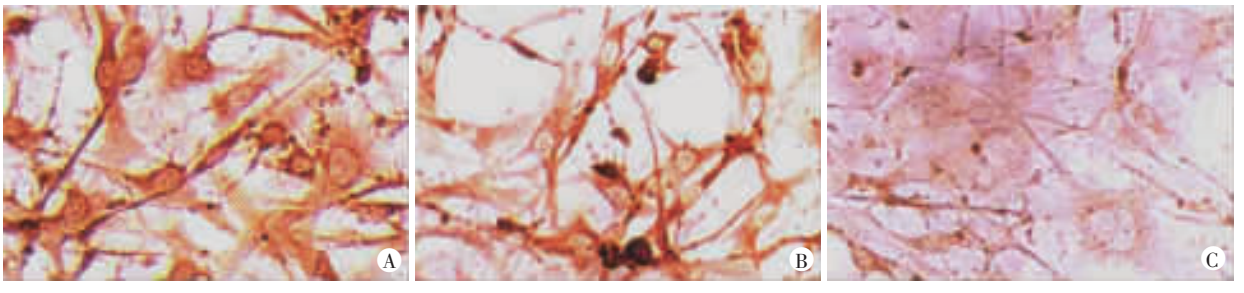
a: $P<0.01$,与 *A. a* 培养上清浓度 0% 比较

图 5　*A. a* 培养上清浓度对 GJIC 的影响

2.3.3　随时间推移 *A. a* 培养上清对 GJIC 的影响　　随时间推移 *A. a* 培养上清对 GJIC 的作用结果见图 6。加入 *A. a* 培养上清 30 min 后开始出现 GJIC 的抑制作用,培养 24 h 检测 *A. a* 培养上清对 GJIC 的抑制作用最明显。24、48 h 更换不含 *A. a* 培养上清的培养基继续培养成骨细胞,GJIC 在 72 h 后恢复到原有水平。

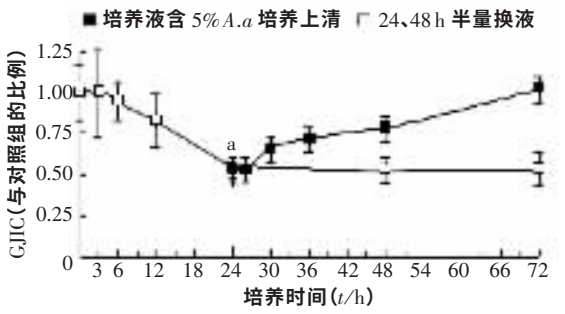
2.4　*A. a* 培养上清对 Connexin43 表达的影响

图 7 显示 5% *A. a* 培养上清培养成骨细胞 24、72 h,Cx43 蛋白条带的 3 种亚型,相对分子质量大小为 43×10^3、40×10^3 和 39×10^3,分别代表磷酸化 P2 带,磷酸化 P1 带和非磷酸化 NP 带。随 *A. a* 培养上清培养时间推移,各条带变淡。



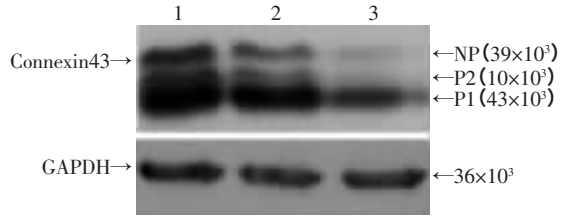
A:对照组;B:5% *A. a* 培养上清;C:10% *A. a* 培养上清

图 2　成骨细胞Ⅰ型胶原蛋白免疫组织化学观察　(SABC ×100)



a: $P<0.01$,与培养 24 h 比较

图 6 随成骨细胞 MC3T3-E1 培养时间推移 *A. a* 培养上清对 GJIC 的影响



1:对照组;2:培养 24 h;3:培养 72 h

图 7 5% *A. a* 培养上清随时间对成骨细胞 MC3T3-E1 Connexin43 表达的影响

3 讨论

正畸牙移动的生物学基础是牙槽骨的改建,即成骨与破骨的平衡,需要成骨细胞、破骨细胞和骨细胞的协同作用。细胞间的协同作用需要依赖于细胞间的传递,细胞间的间隙连接(gap junction, GJ)是细胞间传递的重要途径之一。相邻细胞间通过 GJ 所介导的细胞间隙连接通讯(gap junction intercellular communication, GJIC)进行着信息、能量和物质的交换,参与细胞间物质交换的代谢偶联和电信号传递的电偶联,对细胞的新陈代谢、内环境稳定、增殖和分化等生理过程起着重要的调控作用[3,4]。Cx43 是间隙连接通道的形成以及对 GJIC 的调控发挥重要作用的蛋白质[5]。研究发现,骨的重建与细胞间隙连接的蛋白基因表达和 GJIC 功能调整密切相关。已有研究证明,GJIC 在小鼠骨髓基质干细胞诱导软骨分化过程中起重要作用。采用 Cx43 基因缺失的大鼠研究,发现成骨细胞与破骨细胞欧联动态平衡破坏,提示 GJ 对体内成骨细胞分化起重要的作用[6]。Chiba 等在体外实验证明在人成骨细胞分化中,Cx43 的表达与 ALP 和 OCN 的分泌相平行;Cx43 缺乏的小鼠其颅骨成骨细胞的 GJIC 消失[7]。研究显示 ALP、OPN、Cx43 功能表达与 GJIC 的功能相关,增加 Cx43 的表达可引起成骨细胞的增殖和分化[8]。本实验 SLDT 法检测结果显示 *A. a* 培养上清对 GJIC 的抑制作用随浓度增加而增强,其浓度与抑制作用成正相关;5% *A. a* 培养上清对成骨细胞抑制作用随时间增加,但抑制作用可逆。Western blot 检测 Cx43 的结果显示随培养时间推移,Cx43 各条带变淡、变窄,提示 Cx43 表达受到抑制,且抑制作用随时间增加而增强,与 SLDT 法观察结果一致。在 *A. a* 培养上清对成骨细胞分化影响的实验中,RT-PCR 检测结果显示 *A. a* 培养上清的浓度与其对成骨细胞 MC3T3-E1 分化标记表达的抑制作用呈正相关,浓度越大,成骨细胞分化标记表达越低。免疫组化结果也证实 *A. a* 培养上清的浓度增大,I 型胶原蛋白表达受到抑制。ALP 是成骨细胞早期分化的标志,而 OCN 与 BSP 是骨矿化的标志,表示成骨细胞成熟[9,10]。成骨细胞合成和分泌 I 型胶原蛋白和多种非胶原蛋白,在全身和局部细胞因子调节下,能分泌类骨质和 ALP 等促矿化物质,从而促进新骨形成,I 型胶原蛋白合成不足提示成骨细胞活性下降[11]。实验结果提示 *A. a* 可能抑制骨细胞的成熟。实验结果同 Cx43 基因表达及 GJIC 与骨细胞相关研究结果相符,推论 *A. a* 可通过抑制 GJIC,从而抑制成骨细胞的功能表达及分化成熟。但 *A. a* 的何种毒力因子对成骨细胞 GJIC 具有抑制作用及其具体机制有待进一步探讨。

本实验结果提示,*A. a* 能通过抑制成骨细胞间间隙连接通讯,从而阻碍成骨细胞向骨细胞的分化,打破成骨与破骨的平衡状态。正畸固定矫治器及其附件的使用,破坏原有口腔生理环境平衡,可导致某些口腔细菌增多[12,13],增加发生正畸术中牙周炎的风险,使正畸牙移动中非压力侧的成骨减缓,增加了正畸牙移动的难度。若在固定正畸矫治过程中,指导患者正确刷牙,使用牙线和间隙刷,定期洁治等方法[14,15],并使用特异性控制 *A. a* 的方法,如:在 25 ℃室温条件下,使用浓度 15 mg/L,15 ~ 18 ℃的臭氧水含漱或冲洗,对 *A. a* 有快速、有效的杀灭使用[16,17]。可有效控制口腔中 *A. a* 菌群,可以使正畸牙移动中非压力侧成骨不受 *A. a* 影响,可能提高其移动速度,提高矫治效率,同时成骨与破骨的平衡状态有益于正畸牙移动到位牙槽骨的重建,保持良好的正畸术后效果。

参考文献:

[1] 张迪亚, 李盛来, 陈莉丽. 伴放线杆菌与牙周病相关细胞凋亡关系的研究[J]. 国际口腔医学杂志, 2007, 34(2): 94 - 96, 109.

[2] 肖水清, 张勇, 宋新宇, 等. 正畸治疗中牙龈指数及龈沟液细菌的变化研究[J]. 口腔正畸学, 2004, 11(4): 166 - 168.

[3] Panchin Y V. Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative[J]. J Exp Biol, 2005, 208(Pt 8): 1415 - 1419.

[4] Saez J C, Retamal M A, Basilio D, *et al*. Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1711(2): 215 - 224.

[5] Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication[J]. Arch Bio-

chem Biophy, 2008, 473(2): 201 - 209.
[6] 蔚芃, 袁国华, 杨明辉, 等. 雌性去势大鼠骨细胞内间隙连接蛋白 43 阳性表达率的动态变化及意义[J]. 川北医学院学报, 2006, 21(4): 304 - 307.
[7] Guillotin B, Bareille R, Bourget C, *et al*. Interaction between human umbilical vein endothelial cells and human osteoprogenitors triggers pleiotropic effect that may support osteoblastic function[J]. Bone, 2008, 42(6): 1080 - 1091.
[8] Jekir M G, Donahue H J. Gap junctions and osteoblast-like cell gene expression in response to fluid flow[J]. J Biomech Eng, 2009, 131(1): 011005.
[9] 常新, 侯志明, 柴田恭明, 等. 碱性磷酸酶和骨钙素在成骨过程中表达的定量研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2005, 23(5): 424 - 426.
[10] 张纲, 亓连军, 谭颖徽, 等. bFGF-PLA-NS 对体外培养成骨细胞增殖、分化及矿化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(21): 2073 - 2075.
[11] Lavine L S, Grodzinsky A J. Electrical stimulation of repair of bone [J]. J Bone Joint Surg Am, 1987, 69(4): 626 - 630.
[12] Lee S P, Lee S J, Lim B S, *et al*. Surface characteristics of orthodontic materials and their effects on adhesion of mutans streptococci[J]. Angle Orthod, 2009, 79(2): 353 - 360.
[13] Paschos E, Limbach M, Teichmann M, *et al*. Orthodontic attachments and chlorhexidine-containing varnish effects on gingival health [J]. Angle Orthod, 2008, 78(5): 908 - 916.
[14] 熊剑. 牙周洁治和健康教育对正畸治疗中患者牙周健康的意义[J]. 咸宁学院学报: 医学版, 2008, 22(6): 521 - 522.
[15] 雷畅, 崔德泉, 苏雪艳. 口腔正畸治疗对牙周组织的影响[J]. 山东医药, 2008, 48(33): 50.
[16] 余芳, 王小平, 易敏, 等. 臭氧水对伴放浅放浅杆菌的灭活效果观察[J]. 中华口腔医学杂志, 2009, 3(2): 5 - 8.
[17] 许亚军, 刘衡川, 谷素英, 等. 高浓度臭氧水稳定性及杀菌效果的实验观察[J]. 中国消毒学杂志, 2007, 24(1): 29 - 32.

(**收稿**:2010-01-05;**修回**:2010-04-06)
(编辑　汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2010)10-1063-01

个案与短篇

脂肪再平衡术矫治 58 例面部老化的疗效分析

谢艾玲, 刘晓静, 王　辉, 刘　莹, 朱玮儒, 张　妤　(063000 河北 唐山, 唐山市工人医院美容整形科)

[关键词] 面部老化; 脂肪再平衡; 脂肪注射; 脂肪抽吸
[中图法分类号] R622　**[文献标志码]** B

面部老化出现的形态学变化之一是面部脂肪的改变, 所以使老化面部焕发青春的有效途径之一是重构脂肪, 使其恢复面部年轻时柔和的曲线[1-3]。2003 年 4 月至 2009 年 4 月, 我们应用脂肪再平衡术矫治面部老化患者 58 例, 取得了满意疗效, 报告如下。

1　资料与方法

1.1　临床资料

选取 2003 年 4 月至 2009 年 4 月本科收治的矫治面部老化患者 58 例, 其中男性 11 例, 女性 47 例, 年龄 30 ~ 47 岁, 平均 38.6 岁。其中单纯面部脂肪颗粒注射填充术 32 例, 面部脂肪颗粒注射填充术与脂肪微量抽吸术相结合 26 例。治疗周期 0.5 ~ 1.5 年。

病例选择标准: 所有欲使面部年轻化的患者。病例排除标准: 严重的光老化患者、严重皮肤松弛, 需行面部上提术患者; 合并全身主要脏器或血液系统病变或面颈部皮肤有感染性病灶患者; 心理状态明显异常患者。

1.2　治疗方法

1.2.1　术前评估　术前常规检查、照相、告知。

1.2.2　面部脂肪注射填充术　选择下臀部或大腿前外侧深层皮下脂肪为供区, 局部肿胀麻醉(肿胀麻醉液配制方法: 生理盐水 1 000 ml + 2% 利多利卡因注射液 400 mg + 肾上腺素注射液 1 mg)。采用 20 ml 注射器连接 2.0 mm 内径吸脂针, 回抽针芯, 形成负压, 进行缓慢、均匀地抽取。将脂肪以离心半径 10 cm, < 1 000 r/min 离心 2 min, 分层后取中层脂肪颗粒移至 1 ml 注射器中作注射移植。标记面部注射范围, 1 ml 注射器连接 18 号钝性套管针行局麻下多点多层次注射, 从深及浅, 边退针边注射, 无阻力注射。并利用多个进针点, 以三维交叉的方式注射脂肪。

额颞部与眉间区: 经发际小切口行脂肪注射。一般情况下, 额部需要 4 ~ 15 ml 脂肪, 每侧颞部需要 2 ~ 10 ml。眉间区需要 1 ~ 3 ml 脂肪。颊部: 经鼻唇沟底部切口, 将脂肪广泛注射于颊中部, 向上达眼窝水平, 向外呈扇形展开。一般情况下, 每侧颊部可注射脂肪 6 ~ 15 ml。鼻唇沟: 经鼻唇沟切口, 平行于鼻唇沟注射脂肪。一般情况下, 每侧注射 1 ~ 3 ml。下颌线与颏部: 脂肪注射层次相当于颈阔肌水平。一般情况下, 下颌下区注射 5 ~ 10 ml 脂肪, 颏部注射 3 ~ 4 ml。

1.2.3　面部脂肪微量抽吸术　肿胀麻醉下, 20 ml 注射器连接 0.5 mm 内径吸脂针, 回抽针芯, 形成负压, 进行缓慢、均匀、反复抽取。

术后定期随访。3 ~ 6 个月后, 可行第 2 次注射。

2　结果

58 例患者治疗 2 ~ 4 次, 平均 2.3 次。每次注射 20 ~ 70 ml, 平均 33 ml。随访 3 个月至 3 年, 未发现感染、硬结等术

(下转 1067 页)

[通信作者] 谢艾玲, 电话: (0315)3728651, E-mail: tsxal@ sina. com