

破骨细胞及其骨吸收调控研究进展

于世凤

一、概述

破骨细胞是一个高度分化的多核巨细胞,直接参与骨吸收,是骨组织吸收的主要功能细胞。

破骨细胞的来源:由于长期以来对于破骨细胞(Osteoclast, OC)的来源问题一直不清楚,给研究工作带来许多困难,因而对临床各种骨疾患的诊断及其防治水平,也不可能进一步深入和提高。对于破骨细胞来源的认识,在本世纪40~70年代,普遍应用的经典理论为多潜能的骨源细胞学说,认为破骨细胞是由骨源细胞融合而成。直至70年代中期还认为OC与成骨细胞(OB)为共同的祖代来源。这种观点多年来一直是疑问,不能被证实,现已被否定。自80年代初开始,提出了OC来源于骨外生血系统,自此又出现了3种不同观点:

(1)OC源于单核吞噬细胞系统,即由单核细胞融合而成,这一观点现已被否定。

(2)OC与单核吞噬细胞共同来源于骨髓生血系统的同一前身细胞,之后各自向不同方向分化。这一假说也被实验研究所推翻。研究表明,由骨髓而来的单核细胞经培养之后,可以分化为破骨细胞,但是末梢血中的单核细胞与腹腔中的单核巨噬细胞,经培养后并不能形成破骨细胞,而且前者与破骨细胞的细胞膜上有不同的表面抗原,这提示了破骨细胞与单核巨噬细胞两者不是来自共同的祖代。

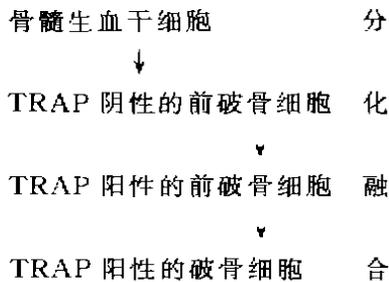
(3)OC来源于单核吞噬细胞系统之外的

骨髓生血细胞系统,为独立于骨髓干细胞系统的一个细胞系。Walker曾采用患有硬化病的小鼠及正常小鼠进行了血循联体实验,结果患硬化病的小鼠恢复了正常。研究表明,破骨细胞浆中碳酸酐酶Ⅱ(CAⅡ)基因突变可以引起骨硬化病的发生。

由此表明,破骨细胞是来源于正常鼠的骨髓生血系统。此外,在临床上通过对患石骨症的患者移植整个胸腺、骨髓等,也取得了良好的疗效。由此说明,破骨细胞的形成取决于血循中的细胞。OC在胚胎早期就已到达骨膜,再逐渐分化、融合为破骨细胞,也就是说OC的前驱细胞是前破骨细胞(Proosteoclast),它在胚胎期间已存在于骨的微环境中,到达骨膜后,由前破骨细胞分化、融合为破骨细胞。OC在各个分化阶段,具有特有的膜抗原和受体。到目前为止,虽然OC的祖代正身还难以确定,但OC的前驱细胞是来自与单核吞噬细胞系统不同的骨髓干细胞系,这一点已被公认。该观点在80年代初已被首先进行分离、培养破骨细胞的Chamber(1984年)所证实,即OC来源于骨髓生血干细胞(Stem Cells)。

破骨细胞的标志:破骨细胞含有丰富的酸性磷酸酶及抗酒石酸磷酸酶(Tartrate Resistant Acid Phosphatase, TRAP)。OC对TRAP呈阳性反应,为棕褐色;OC表面有许多降钙素(Calcitonin, CT)受体,对CT呈阳性反应,为深紫色。目前已把TRAP及CT做为鉴定破骨细胞的重要标志。在破骨细胞的形成过程中,其对

TRAP 的反应如下:



综上所述,破骨细胞是机体内的大型多核巨细胞,来自 CD34⁺ 的骨髓干细胞,经研究证实 CD34⁺ 细胞在粒细胞克隆刺激因子(G-CSF)作用下可分化形成造血细胞,在 1, 25(OH)₂D₃ 以及白细胞介素(IL-1, 3)等刺激因子的作用下,可分化为成熟的破骨细胞,具有体外骨吸收的功能,可在灭活的骨片上形成吸收陷窝。降钙素受体(CTR)、抗酒石酸磷酸酶(TRAP)、Ⅱ型碳酸酐酶(CAⅡ)、组织蛋白酶K(CK)以及 Vitronectin 受体(VR)是破骨细胞的主要标志。破骨细胞通过其质膜上的空泡型质子泵分泌酸分解骨组织中的无机矿物质;并同时通过分泌多种溶酶体酶(主要为组织蛋白酶K、L、B和N)降解有机骨基质。破骨细胞在进行骨吸收过程中是通过多种细胞因子的调控,以及各种细胞间的相互作用和制约,通过复杂的分子机制完成的。

二、破骨细胞的形态、结构、功能

OC 是一个没有突起的多核大细胞,直径为 30~100 μm,有数十个甚至多达上百个细胞核,其胞核多呈圆形,核膜平整,染色质颗粒细小且分布均匀,着色较浅,内有 1~2 个核仁。幼稚的 OC 其胞浆嗜碱性,成熟后的 OC 其胞浆嗜酸性,并随着细胞的老化胞浆嗜酸性愈强。通常胞浆内有丰富的线粒体以及大量的溶酶体与游离的核糖体。破骨细胞的胞膜上有质子泵,其功能是分泌酸,主要是空泡型质子泵。此外,OC 含有极为丰富的酸性磷酸酶(其同功酶为 TRAP)、溶酶体酶、β-甘油磷酸酶、β-葡萄糖醛酸酶、芳香基硫酸酯酶及组织蛋白酶等,存在于

粗面内质网、高尔基复合体中。OC 在骨吸收与骨的重建中起启动作用,一旦 OC 附着于骨面形成了骨吸收的微小环境,OC 通过分泌释放酸及酶,导致骨的吸收;前者致使骨矿溶解,后者导致骨的胶原降解,从而引起骨的破坏。静止状态下的 OC 无极性,只有在进行骨吸收功能状态下才具有明显的极性。超微结构观察可以看到骨吸收时的 OC 呈现细胞的极化,可分为以下 4 个部分:

1、波状缘(Ruffled Border)又称皱褶缘,在光镜下亦称纹状缘,为 OC 附着骨面后,对着骨面进行骨吸收的特殊分化的细胞膜,由许多不规则的绒毛状突起组成,可大大增加破骨细胞进行骨吸收的表面积,OC 通过这些绒毛突起分泌酸与酶等多种生物活性物质,并摄取游离出来的骨盐。据研究报道,一个 OC 可以溶解由 100 个成骨细胞形成的骨质。OC 是可以移动的细胞,当在一个部位进行骨吸收之后,可以从该部位移动到另一个部位,再进行骨吸收活动。当 OC 离开骨的表面之后,则其波状缘消失,骨的吸收活动也就停止。

2、空泡区(Vesicular Region),位于许多绒毛突起之间以及其下方的部位,由密集的空泡相互连接组成,空泡内存在各种酶,其功能主要是分泌、摄取以及消化细胞外被溶解的物质,是骨吸收时的重要组成部分。其中的碳酸酐酶(Carbonic Anhydrase, CA)在骨的吸收破坏中起了极为重要的作用,OC 在局部分泌酸与蛋白酶进行骨吸收,其分泌的酸主要是通过Ⅱ型碳酸酐酶(CAⅡ)将 CO₂ 溶于水形成 H₂CO₃ 而产生的,对骨组织的脱矿及有机基质分解起了至关重要的作用。

3、封锁带(Sealing Zone)又称透明带(Clear Zone),其部位是在波状缘的周围,为一环形的胞浆区,此处无细胞器,内含有大量微丝(如 Vimentin 等)、微管及肌动蛋白(F-Actin),主要由均质的核糖体组成。其主要功能是把被吸收的骨质包围、封闭,与外界隔绝,保证骨吸收时微小环境的 pH 值(约为 pH3~5)呈酸性

环境,足以使骨组织脱矿、溶解。此外,封锁带还具有信息传递功能,其中的微丝、微管、肌动蛋白都参与了细胞间的离子交换及信息的传递作用。OC进行骨吸收时封锁带明显增大,确保其封锁功能的行使。一般情况下每次封闭2~10分钟之后,随着OC的移动及附着骨面,封锁带再继续进行封闭骨吸收时所必要的微环境。OC通过封锁带紧贴骨面,是通过OC中的微丝进行收缩来行使其封锁功能。

4、细胞基底部(Basal Part of The Cell)为不接近骨面的游离端。细胞核位于细胞的基底部位,其内含有丰富的尔基氏体、线粒体等细胞器,围绕每一个细胞核排列。OC中的许多酶存在于粗面内质网、高尔基氏体中,在OC进行骨吸收活动过程中,这些酶不断向波状缘方向移动,参与骨的吸收、破坏。

破骨细胞的功能:骨吸收是与破骨细胞相伴随,骨吸收活动是OC在骨微环境内进行的复杂分子生物学反应的过程。骨吸收时首先是OC分泌酸,致使骨组织脱矿,继而通过分泌的多种酶将残留的有机物分解。OC与胃壁细胞及肾尿管细胞有相类似的结构与膜抗原,都可以通过细胞膜向细胞外分泌酸,其质子泵相当于一个酸泵,不断的分泌酸。是OC保证骨吸收的重要结构,通过分泌酸可直接溶解骨矿中的羟磷灰石,导致骨组织脱矿。

破骨细胞产酸主要是通过I型碳酸酐酶(Carbonic Anhydrase I, CA I),将 CO_2 和 H_2O 结合成 H_2CO_3 ,并分解为 H^+ + HCO_3^- ,通过其胞膜上的质子泵分泌到局部微环境中。如果采用CA I的阻断剂乙酰唑胺(Acetazolamide)阻断了CA I的产酸作用,则发现分离、培养的破骨细胞性骨吸收窝的形成明显减少或被抑制,从而证明了CA I在破骨细胞性骨吸收中具有重要的作用。

质子泵是一种推动 H^+ 跨膜运动的能量系统。大量研究表明破骨细胞皱褶缘上质子泵是属于空泡型质子泵(即空泡型氢离子三磷酸腺苷转运酶 Vacuolar H^+ -translocating, AT-

Pase,简称V-ATPase),广泛分散于胞浆内空泡样细胞器的膜上,当进行骨吸收时,则不断的分泌酸。空泡型质子泵是位于破骨细胞皱褶缘上的泌酸装置,只有在功能状态下的破骨细胞才具有这一特殊结构特点,也是引起骨吸收破坏的必要形态结构。

脱矿后的残余骨基质,又被OC分泌的各种加水分解酶消化、降解、破坏。研究表明,OC在骨吸收过程中1小时可形成直径20 μm 、深5 μm 的吸收陷窝。OC除了具有骨吸收作用以外,还具有吞噬功能,被吸收、破坏的骨组织及其骨基质的分解产物,被OC吞噬后,可被输送到OC的空泡内进行消化、溶解。通过超微结构观察,可以看到被OC吞噬后的游离晶体,沿OC内的微管进入空泡的过程。由此可见OC具有脱矿、降解有机基质分泌、吞噬、运输、消化等功能。因而,近年来把破骨细胞性骨吸收又看作是矿化有机质迁移的过程。

综上所述,破骨细胞是一个高度分化的多核大细胞,其主要功能为吸收骨,骨的吸收过程为:粘附骨面 \rightarrow 极化(吸收态) \rightarrow 破骨 \rightarrow 脱离骨面 \rightarrow 移位至新的骨面。OC与机体内的各种细胞彼此相互依赖和相互制约,并在多种因子的作用下,通过复杂的分子机制,OC与OB共同完成骨的代谢活动。

三、破骨细胞的体外培养

自从明确了破骨细胞来源于骨髓干细胞之后,Chamber和Magnus首先建立了体外分离、培养破骨细胞的技术方法(1982年)。我国于1988年引进并改良了这一技术,为骨病的研究与防治,提供了新的手段及途径。

1 实验材料

(1)动物的选择:主要多采用兔、鼠、鸡、猴、鸟等动物的长管骨或颅盖骨进行破骨细胞的分离、培养。此外,也有学者用人的胚胎骨分离、培养破骨细胞,但少见。

(2)实验用具:二氧化碳孵育箱、倒置相差显微镜、洁净工作台、真空泵及滤器、分析天平、

超声波清洗器、培养器皿(24孔培养板与玻璃培养皿及刻度吸管)以及各种手术剥离器皿、盖玻片与骨片等。

(3)培养液:Hank's液、199培养基、小牛血清、HEPES液、抗菌素(青霉素、链霉素及二性霉素B)、胶原酶及分散酶(溶于199培养液中)以及PBS等。

(4)鉴定破骨细胞的试剂:抗酒石酸磷酸酶(TRAP)与降钙素(Calcitonin)以及抗肌动蛋白抗体(Actin)等。

2 实验方法及破骨细胞的形态功能规则

(1)分离破骨细胞(以兔为例)

采用出生24h之内的中国家兔(或新西兰白兔等)6~7只,用肥皂洗涤3次,再以清水冲洗干净。放置洁净台上用断头术将其处死,浸泡于70%酒精中1分钟,去皮后分离出股骨、肱骨和胫骨,放入含有Hank's液的60mm的玻璃培养皿中,刮除软组织及软骨垢,将骨干与干骺端在Hank's液中洗两次,再将其放入199培养液中(玻璃培养皿内共12ml 199培养液,其中含有25mmol/L HEPES缓冲液、15%小牛血清以及100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素、300ng/ml二性霉素B)pH值为6.8~7.0。将骨干纵行剖开,以手术刀轻刮骨的内表面,再用尖吸管吸取上述的199培养液,反复冲洗骨髓腔和骨的内表面,直至变白为止。再用吸管吹洗、振荡细胞悬液2min,使骨片上的破骨细胞冲到培养液中,静置1min,取上面的细胞悬液备用。

(2)骨片的制备

将鲜的牛股骨放入低温冰箱(-70℃)储存。同时取出以钢齿锯和金刚砂片分切,制成约6mm×6mm大小,厚约200μm的小片(在水冲洗下进行),再以粗细不同的金刚砂石及磨玻璃将小骨片磨成厚约为10μm的薄片备用。使用前将所有放在蒸馏水中的骨薄片,在超声波清洗器内超声处理3次,每次5分钟。再将洗净的骨片浸泡在含有抗菌素的199培养液中,再换3次培养液,以达到消毒灭菌的目的。

(3)盖玻片的处理

将盖玻片用玻璃刀分切成1cm×1cm大小,以洗涤净水浸泡洗涤,再浸入硫酸-重铬酸钾清洗液中过夜后,再以水充分清洗、擦干,高压消毒灭菌、备用。

(4)破骨细胞培养

采用24孔培养板,每孔加上述制备的199培养液1ml,之后每孔再加入一个经过处理、消毒的骨磨片及盖玻片。放置二氧化碳孵育箱中(5%CO₂,37℃)培养1小时,然后加入备用的破骨细胞悬液,每孔0.5ml,继续培养15~20h左右,再以199培养液冲洗掉未附着的破骨细胞及红血球。再继续培养。

(5)破骨细胞的鉴定及观察

鉴定:酸性磷酸酶(或抗酒石酸磷酸酶)染色呈深黄褐色或棕褐色;降钙素免疫组织化学染色(ABC法)呈紫色或棕紫色,则可判断为破骨细胞。

光学显微镜观察:玻片观察可采用HE染色或Giemsa染色,可见多核的破骨细胞呈浅粉红色,胞浆染色质颗粒细小,分布均匀,胞核内含1~2个核仁,胞核呈浅蓝色。胞浆内还可见大小不等的空泡。周围的胞膜可见多数伪足样突起。

相差显微镜观察:盖玻片上可见多核破骨细胞伪足样进行伸展移动,细胞外形不断的变化,其周围还可见单核吞噬细胞、成纤维样细胞以红血球等散在破骨细胞之间,其中OC的体积最大,且见多核结构。

骨片上骨吸收窝形成情况:培养20h左右的骨片上可见骨吸收陷窝形成,多为圆形或椭圆形,随培养时间的延长,骨吸收窝的数量不断增多,骨吸收窝的面积不断扩大,还可见吸收窝呈贝壳形弯曲或不规则形状。

扫描电镜观察:其破骨细胞的骨吸收窝形态与相差显微镜观察的外形一致,骨陷窝内的原纤维结构清晰明显,并可对比观察吸收窝与非吸收部分的显著差异及其微细结构的变化。

3 应用研究

根据破骨细胞是高度分化的终末细胞这一特点,以及 OC 具有迅速贴附于基质上的附着特性,因而在进行破骨细胞的应用研究中,由于 OC 不能进行细胞分裂活动,所以分离、培养的破骨细胞一般情况下只能生存 10 日以内,且不能传代;由于 OC 的贴壁特性,所以培养后应该采用胰蛋白酶等分散酶进行消化,将 OC 周围的成纤维样细胞除去,只留下贴壁的 OC,只有在 OC 得以充分伸展及移动的情况下,才有可能进行体外的各种检测与调控观察。

(1)分离、培养破骨细胞在体外具有形成骨吸收陷窝的功能,可采用约 10 μm 厚的骨片,与 OC 共同培养,可于培养后 1~10 日内的不同时间,采用相差显微镜,观察 OC 吸收骨时的吸收期、游走期以及休止期其形态、结构与机能的变化,从而探讨 OC 的细胞骨骼, pH 的变化,酶的活性、细胞内各种离子的浓度,细胞膜电位差及质子泵等的细胞生物及分子生物学的改变。

(2)采用各种细胞因子、激素以及药物等直接作用于破骨细胞,观察 OC 形态、结构及机能的变化情况,以及检测骨吸收陷窝的数量,面积大小及其形状的改变。可通过光学显微镜、相差显微镜、荧光显微镜以及电子显微镜等仪器进一步观察其超微变化。

(3)采用分离、培养破骨细胞,与其它各种细胞进行共同培养,观察各种细胞因子或中药、西药等对其的作用,从而探讨这些因子及药物对分离、培养 OC 的直接影响,是通过某种细胞介导而发生的。这种最好的观测方法,仍然是通过骨片的加入,观测共同培养时骨吸收陷窝形成情况,加以判定、分析研究。

(4)破骨细胞在进行骨吸收活动时,具有明显的极性,由于通过分泌酸,致使 Ca^{2+} 离子迅速从骨组织中游离,因而可通过检测 Ca^{2+} 的浓度,探讨破骨细胞吸收骨的情况及其各种活性。

(5)通过分离、培养破骨细胞与骨片共同培养,观测 OC 对骨的有机基质的影响,以及有机基质的组成及各种酸对骨胶原消化、吸收的情

况。

(6)破骨细胞的质膜上存在有质子泵,通过分泌酸直接溶解骨盐中的羟磷灰石,对 OC 质子泵分离、提纯及重组,对深入探讨骨的吸收机理,以及为阻断其分泌酸,将对骨病的防治具有重要的理论意义及临床价值。

OC 的质子泵一般分为 3 种: a. 细胞膜质子泵, b. 线粒体膜质子泵, c. 囊泡膜质子泵。OC 进行骨吸收时是通过碳酸酐酶 (Carbonic Anhydrase, CA), 将 CO_2 溶于水形成 H_2CO_3 而产生的酸。现已证实这种酸主要是通过二型碳酸酐酶 CA II 产酸,其在溶解骨盐中起了至关重要的作用,上述 OC 上的三种质子泵,主要为囊泡型 (V_0V_1) 为主,为 63KDa 蛋白质及 31KD 亚基蛋白质,通常分散在 OC 胞浆的细胞器内,当进行骨吸收时,则靠近皱褶缘的空泡区,因而又称空泡型质子泵。

四、骨吸收及其调节因子

骨吸收活动是由破骨细胞介导,通过复杂的分子生物学机制定完成的。骨吸收时 OC、OB、巨噬细胞、淋巴细胞等相互作用、相互制约,分泌并释放多种细胞因子,激活或抑制各种细胞的活性,调控骨的吸收与形成。调节 OC 的局部因子,主要源于成骨细胞、基质细胞以及骨髓中的各种免疫细胞等等,这些细胞都参与了骨吸收的调控。与骨吸收密切相关的主要细胞因子如下:

降钙素 (CT): 由甲状腺滤泡分泌,又称甲状腺降钙素,其主要功能是抑制骨吸收和降低血钙的作用。OC 细胞膜上具有丰富的降钙素受体,CT 对 OC 具有直接的抑制作用;首先 OC 上的 CT 受体与 CT 相结合后,可抑制 Na^+ 、 K^+ 、ATPase,使波状缘的伸展活动受限,导致 OC 不能附着骨面;此外还可抑制碳酸酐酶,减少酸的分泌;CT 又可以促进骨组织中 cAMP 水平升高,从而增强 CT 对 OC 抑制骨吸收的作用。CT 对 OC 的作用是一过性的,之后 OC 还可恢复运动,因此,CT 在临床治疗骨

质疏松症等疾病时,其短期疗效明显,长期使用则疗效欠佳,就是这个道理。

甲状旁腺激素(PTH):由甲状旁腺分泌,主要功能是调节 Ca^{2+} 、 P^{3-} 代谢,促进骨吸收。OC的细胞膜上并无PTH受体,其促进骨吸收作用主要是通过以下几个途径:PTH可促进OC内的空泡的增加,从而增强OC的活性;PTH可促进OC酸的分泌以及水解酶的合成,从而增强骨吸收作用;PTH还可通过首先作用于OB,间接促进骨吸收;PTH通过促进cAMP的生成,进一步促进骨吸收。由于成骨细胞上有PTH的受体,因此OC与OB共同培养,再加入PTH,可以刺激破骨细胞性骨吸收。PTH对单独分离、培养的OC无任何作用,这进一步说明PTH对OC的作用是通过其它细胞介导而间接发生的。

前列腺素(PGs):最早由前列腺中提取而命名。此后发现全身多种组织中都含有PGs,其主要功能为抑制破骨细胞的活性而抑制骨吸收。此外还可通过刺激成骨细胞cAMP水平的提高,间接刺激破骨细胞性骨细胞。PGs在体内是由花生四烯酸(Arachidonic acid)经酶催化后的产物。

活性维生素 D_3 [$1,25(OH)_2VD_3$]:在PTH及 Ca^{2+} 与 P^{3-} 的作用下在肾脏内产生;也可由淋巴细胞及单核细胞产生。其功能为具有明显促进骨吸收的作用,是OC成熟的主要激活因子;还可增加OC的数量;并可与PTH有协同作用,共同促进骨吸收。OC细胞膜上并无活性 VD_3 的受体,其特异性受体只存在与成骨细胞及前成骨细胞的细胞膜上,因此对体外分离、培养破骨细胞无作用,只有在成骨细胞存在时,才能刺激破骨细胞性骨吸收的形成。

细胞因子(Cytokines):过去又称淋巴因子,因为最初是在激活的淋巴细胞培养液中发现的,包括多肽,构成免疫系统的细胞之间沟通的分子基础。近年发现其中许多细胞因子对骨吸收起了重要的作用。现在又称白细胞介素(Interleukin, IL),其中IL- $1_{\alpha, \beta}$ 是骨吸收的有效

的强力刺激因子,它可以刺激成骨细胞产生 PGE_2 ,介导骨吸收,还可刺激成纤维细胞与吞噬细胞产生胶原酶,活化OC而促进骨吸收;IL-2可以通过刺激OC分泌促进骨吸收;IL-6为多功能的细胞因子,是介导破骨细胞性骨吸收的中心因子,具有显著促进骨吸收的作用。此外,IL-6的抗体可阻断骨吸收。

转移生长因子(TGF- β):共发现TGF- β 有5型,其中TGF- β_{1-3} 在人及哺乳类动物中均可发现,而TGF- $\beta_{4,5}$ 仅在鸡和蟾蜍中见到。其功能主要是对破骨细胞的分化、成熟起促进作用,可促进破骨细胞性骨吸收。研究表明,在骨吸收及骨形成的局部微环境中,皆可检测出活化的TGF- β ,它对OC及OB的成熟、活化,起了调节和促进作用。

肿瘤坏死因子(TNF- α, β):可由肿瘤细胞产生。其功能为可增加OC的数量、通过成骨细胞的介导,具有明显的促进骨吸收的作用;并可抑制骨胶原合成,减少矿化骨基质的量,从而导致骨形成减少,骨吸收亢进。

干扰素(IF):由免疫细胞产生。可抑制前OC的增生、分化,从而抑制破骨细胞性骨吸收,是一种多功能的细胞因子,又是骨吸收抑制因子。

白细胞介素-18(IL-18):是由成骨细胞产生,可以抑制破骨细胞的形成,从而抑制了体外的破骨细胞性骨吸收。

白细胞介素-17(IL-17):其作用正与IL-18相反,可以诱导破骨细胞的成熟,从而促进了体外的破骨细胞性骨吸收。此外IL-17还可以作用于成骨细胞合成 PGE_2 ,促进破骨的前体细胞分化形成成熟的破骨细胞,进一步促进骨吸收。

参 考 文 献

- 1 Mantoka T, Amano A, Inoshita E et al. Changes in oxygen consumption in dog gingiva during induction of experimental periodontitis. J Dent Res 1991;71:466-469.
- 2 Ranney R P. Immunologic mechanisms of pathogenesis in periodontal diseases. J Periodontol Res 1991;26(3):213-217.

(下转第13页)