

[文章编号] 1000-1182(2011)05-0519-03

·专栏论著·

慢性牙周炎患者和健康者非刺激性全唾液中的差异蛋白比较

武影¹ 束蓉² 刘宏伟¹

(1.同济大学附属口腔医院 牙周科, 上海 200072;

2.上海交通大学医学院附属第九人民医院 牙周科, 上海 200011)

[摘要] 目的 比较慢性牙周炎患者和健康对照者非刺激性全唾液(WUS)中的差异表达蛋白。方法 采集5名慢性牙周炎患者和5名健康者的WUS, 利用双向凝胶电泳(2-DE)分离蛋白, 将二者之间的差异蛋白质点进行基质辅助激光解析电离串联飞行时间质谱鉴定。结果 通过软件对2组样品的双向胶上的点进行对比分析, 发现17个差异点, 经质谱鉴定明确了13个点的蛋白类型, 其中737、725、692、986为同一种蛋白, 716、535为相同蛋白, 分别是血清白蛋白、 β -纤维蛋白、重组N-叶apo型人血清转铁蛋白2型晶体B链、免疫球蛋白 α -1链C区、人血清白蛋白GA复合物、Rca-Rhogdi复合物的B链、PRO2044、理论蛋白以及未命名蛋白, 而且它们在慢性牙周炎患者全唾液中的表达均上调。结论 比较慢性牙周炎患者和健康者WUS中的蛋白图谱时, 发现至少9种与疾病相关的差异蛋白。这种蛋白组学技术也许能更好地理解慢性牙周炎的发病机制。

[关键词] 慢性牙周炎; 非刺激性全唾液; 差异蛋白; 双向电泳; 质谱

[中图分类号] Q 26 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.05.018

Comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and healthy controls Wu Ying¹, Shu Rong², Liu Hongwei¹. (1. Dept. of Periodontology, The Affiliated Stomatology Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China; 2. Dept. of Periodontology, The Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China)

[Abstract] **Objective** To compare the proteomic profiles of whole unstimulated saliva(WUS) of subjects with chronic periodontitis(CP) with that of healthy volunteers, and to identify proteins. **Methods** WUS was obtained from five subjects with CP and five healthy subjects, and proteins were separated using two-dimensional gel electrophoresis(2-DE). Proteins, the level of which was significantly different among the two groups, were identified by computer image analyses and subsequent matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry(MALDI-TOF-TOF MS). **Results** Seventeen differentially expressed points in the 2-DE gel between the two samples were found by professional software. And protein types of thirteen points were then identified. Among them, the point 737, 725, 692, 986 was the same protein, as well as the point 716, 535. They were respectively serum albumin; β -fibrin; chain B, human serum transferrin, recombinant N-terminal lobe, Apo form, crystal form 2; Ig alpha-1 chain C region; the GA module complexed with human serum albumin(HAB-GA); chain B, crystal structure of a Rca-Rhogdi complexes; PRO2044; hypothetical protein; unnamed protein. Compared with whole saliva of healthy control subjects, the levels of them were increased in whole unstimulated saliva of CP subjects. **Conclusion** Comparison of the proteomic profiles of WUS of CP subjects with that of healthy control subjects reveals at least 9 differential proteins. The approach might be helpful to better understand to the etiology of CP.

[Key words] chronic periodontitis; whole unstimulated saliva; differentiated protein; two-dimensional gel electrophoresis; mass spectrometry

唾液是人体的一面镜子, 许多疾病都可以在唾

液中找到相关的蛋白分子标记物, 如舍格伦综合征、类风湿病、高血压、糖尿病等。尽管利用唾液检测诊断全身性疾病有较大发展但应用于口腔疾病的研究还很少, 而且主要用于口腔癌的早期诊断和预后判断^[1]。目前已有涉及牙周病的唾液蛋白组学研究^[2-3]。

[收稿日期] 2010-07-06; [修回日期] 2011-08-04

[作者简介] 武影(1973—), 女, 江苏人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 束蓉, Tel: 021-23271699-5510

众所周知,慢性牙周炎是与全身性疾病密切相关的多因素疾病,其发病机制尚不清楚。利用慢性牙周炎患者和健康对照者的非刺激性全唾液(whole unstimulated saliva, WUS),通过蛋白组学方法,即双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)结合基质辅助激光解析电离串联飞行时间质谱检测二者唾液中的差异,并对差异蛋白质点进行鉴定,为今后揭示慢性牙周炎的机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验对象

根据1999年美国牙周病分类国际研讨会提出的慢性牙周炎(chronic periodontitis, CP)的诊断标准^[4],从上海交通大学医学院附属第九人民医院牙周科就诊的患者中随机选取5例CP患者。同时选取5例健康对照者,牙龈探诊出血的位点<10%,探诊深度<3 mm,附着丧失>2 mm的位点不超过1%,X线片显示无牙槽骨吸收。各组均有3名男性,2名女性;CP组和对照组平均年龄分别为46、42岁。2组共同纳入标准:全身无系统性疾病;妇女未处于怀孕期及哺乳期;半年内未做过牙周基础治疗;最近3个月未服用过抗生素;全口无龋者;无抽烟者。

1.2 WUS的采集和处理

按照Rhodus改良的方法采集WUS^[5]。每人平均采集1.2 mL唾液,采集后立即加入蛋白酶抑制剂(Sigma公司,美国,每毫升唾液加入100 μ L)。将所得样本在4 $^{\circ}$ C条件下离心,先1 300 g, 5 min,去除食物残屑等;然后20 000 g, 30 min,彻底去除残余细胞。最后各取其上清500 μ L, -80 $^{\circ}$ C保存待用。待收集完所有的样本后,合并组内各样品,分别放入超滤管离心以进行样品超浓缩。依照Bradford法,通过测定光密度值大小并对照标准蛋白的光密度值计算蛋白浓度,从而进行蛋白定量^[6]。

1.3 2-DE

取上样量100 μ g,等电聚焦为pH3~10非线性胶条(30 V 12 h, 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 8 000 V 8 h; Amersham公司,美国),十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)为12.5%的胶。经银染显色的凝胶通过GS-710光密度扫描仪获取图像,使用Imagemaster分析软件(GE healthcare公司,美国)进行分析,统计3次重复实验的2-DE图谱(CP组和对照组各3次),得到合乎统计学标准的蛋白质差异点。蛋白质斑点的量被定义为构成这个点所有像素点强度值的总和,当一种蛋白质在2组样品之间量变倍数大于1.5倍时认为这个蛋白在二者之间有显著性差异。

1.4 基质辅助激光解析电离串联飞行时间质谱仪进行肽质量指纹分析

切取胶上的蛋白差异点并用胰酶酶解20 h,抽提酶解肽段,经Zip Tip脱盐后样品溶于0.1%三氟乙酸,然后基质与样品1:1体积混合,取1 μ L加到不锈钢样品靶上,在空气中放置10 min,待溶剂挥发干后将样品靶送入仪器。利用Flex Analysis分析软件将肽质量指纹分析(peptide mass fingerprinting, PMF)数据和MS-MS数据结合,将结合数据集提交到MASCOT(免费蛋白数据库检索程序)进行蛋白鉴定。搜索NCBI数据库,搜索的参数:肽片段相对分子质量最大容许误差控制在 $\pm 10^{-4}$,肽电荷为+1,酶解片段不完全选择为1个。根据蛋白质得分与蛋白质数据库查询蛋白质的匹配和序列覆盖情况,其中Mascot得分示意图:X轴为Mascot得分,Y轴为匹配的个数,得分超出阴影区表示得到阳性鉴定($P < 0.05$)。

2 结果

通过ImageMaster软件对2组样品2-DE胶上的点进行对比分析,发现2组之间存在着差异点(组间差异倍数 ≥ 1.5),得到17个差异点(图1)。

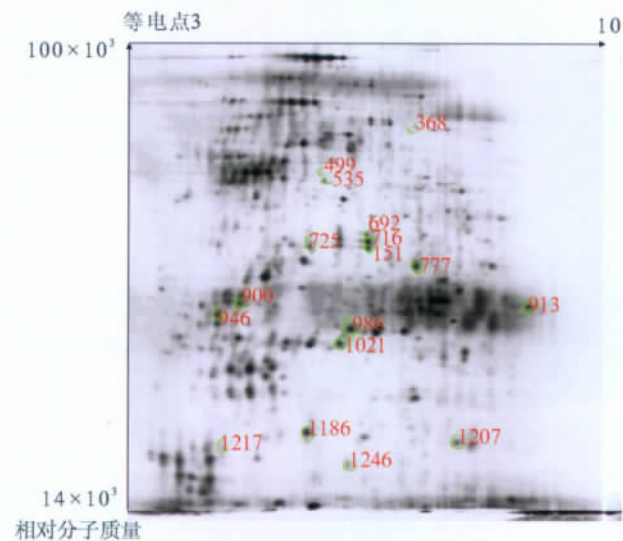


图1 CP组与对照组样本在2-DE胶上的差异点(红色数字标记)

Fig 1 Differential points in the 2-DE between CP group and control group (red number mark)

而这些点经过以上串联质谱仪结合数据库搜索进行鉴定,可明确其中的13个点的蛋白质类型,包括一些未命名蛋白和假设蛋白(表1),其中737、725、692、986为同一种蛋白,716、535为相同蛋白。剩下的蛋白未能从数据库中得到结果,提示可能为未知蛋白。这些差异蛋白在CP组的唾液中表达均增加,其中包括血清白蛋白(serum albumin)、 β -纤维蛋白(β -fibrin)、重组N-叶apo型人血清转铁蛋白2型晶体B链(chain B, human serum transferrin, recombinant

N-terminal lobe , Apo form , crystal form 2)、免疫球蛋白α-1链C区(Ig alpha-1 chain C region)、人血清白蛋白GA复合物(the GA module complexed with human serum albumin , HBA-GA)、Rca-Rhogdi复合物的B链(chain B , crystal structure of a Rca-Rhogdi complexes)、PRO2044、未命名蛋白、理论蛋白。

表 1 CP组和对照组间的唾液差异表达蛋白

Tab 1 Differentially expressed proteins in saliva between control group and CP group					
差异点	编号	蛋白名称	相对分子质量(实/理)	等电点(实/理)	变化比
1246	gi/9955206	Rca-Rhogdi复合物的B链	18/21	6.5/6.2	+16.0
777	gi/113584	免疫球蛋白α-1链C区	33/38	7.0/5.9	+11.8
737	gi/28590	未命名蛋白	34/71	6.5/5.9	+11.2
725			35/71	6.0/5.9	+7.5
692			38/71	6.5/5.9	+2.7
986			31/71	6.5/5.9	+2.5
716	gi/6650826	PRO2044	40/30	6.5/7.0	+11.1
1021	gi/55669910	HBA-GA	27/67	6.5/5.6	+5.9
535	gi/6650826	PRO2044	41/30	6.5/7.0	+4.9
499	gi/223002	β-纤维蛋白	45/51	6.5/8.0	+3.3
900	gi/28592	血清白蛋白	30/71	5.5/6.0	+2.4
946	gi/21687060	理论蛋白	33/20	5.5/5.7	+2.3
1207	gi/4389243	重组N-叶apo型人血清转铁蛋白2型晶体B链	23/38	7.5/6.3	+2.2

注：“+”表示相应蛋白在慢性牙周炎中丰度相对增高。

3 讨论

本实验结果发现血清白蛋白在CP患者WUS中的表达是上调的，这与以往的研究报道患者全唾液中白蛋白含量显著升高的结论一致^[7-8]。因为全唾液中含有10%来源的龈沟液成分，在牙周组织炎症状态下龈沟液流量增大，进入唾液的成分也可能增高，其中包括血液中高丰度的白蛋白，同时这些蛋白也可经炎性牙龈组织直接渗出。血清白蛋白在唾液中的升高反映了牙周炎的严重程度和活动性，可作为CP患者唾液中的分子标记物。实验还发现免疫球蛋白与对照组相比，CP患者全唾液中的IgA1上调，原因同上述解释一样，IgA1主要来自血液渗出，而且有研究表明糖尿病患者的IgA是升高的^[9-10]。在CP组和对照组的差异蛋白比较中发现HBA-GA复合物，GA是厌氧性消化链球菌属来源的白蛋白结合蛋白分子结构上的一个模块，可以和宿主的血清白蛋白结合，形成HBA-GA复合物，有利于细菌的生长，也可增强细菌的毒力^[11-12]。虽然GA的生物学功能还不十分清楚，但从其结构上可以解释细菌适应性这个问题。这也提示牙周致病菌是否也有类似的结构和白蛋白结合，继而引起一系列变化导致组织的破坏。既然HBA-GA复合物关系着致病微生物和宿主血清白蛋白之间的相互作用，研究二者可能会有助于揭示牙周致病菌的分子机制，以及为开发药物以抑制细菌

的生长繁殖开辟一个新的领域。与此同时，上调的转铁蛋白和纤维蛋白都与炎性渗出增加有关。而Rca-Rhogdi复合物通过Rhogdi调节Rho蛋白，但在炎症中究竟有什么作用还不甚清楚。

本实验未发现在牙周炎患者唾液中表达升高的防御素以及一些基质金属蛋白酶等，这可能由于采用的实验方法不同以及2-DE技术自身的缺点所致。对于蛋白质表达谱，希望比较2个不同样品在2-DE胶上存在着特征点强度的不同。但很难得到精确的重复性。同时特定蛋白质的位置通常有微小变化。所以只能选择重复性好的点进行鉴定，这样就会损失一些可能有意义的蛋白。而且，由于样品中高丰度蛋白的干扰和低丰度蛋白的低溶解度，造成低丰度蛋白很难被检测到，恰恰这些蛋白是执行重要生物功能的蛋白质。这需在以后研究中进一步探索。

[参考文献]

[1] Hu S, Arellano M, Boontheung P, et al. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(19) : 6246-6252.

[2] Wu Y, Shu R, Luo LJ, et al. Initial comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and healthy control subjects[J]. J Periodontal Res, 2009, 44(5) : 636-644.

[3] Haigh BJ, Stewart KW, Whelan JR, et al. Alterations in the sali-

则提示下颌有一定的后下旋转,这可能是由于在排斥力作用下,开口位时其上颌分力方向为前上,而下颌分力方向为后下。因此,在该矫治器的临床应用中应注意其副作用,尽量避免应用于开骀倾向的高角类患者,或者对该矫治器进行改良,选择应用吸引力作为矫治力源。SNB角的减小可能是由于下颌骨的生长发育受到一定程度的抑制,但目前研究多认为抑制下颌骨的生长发育比较困难^[5-6],主要原因可能还是由于下颌骨的后下旋转。U1-SN增大及L1-MP的减小同时也证明MOA- 的矫治力方向是上颌向前下颌向后。2个实验组比较,90 d组较45 d组变化明显。提示MOA- 的矫治机制以刺激上颌发育为主,抑制下颌生长为辅,对于下颌作用主要是改变其生长方向;同时上颌牙弓发生前移,上前牙唇倾,下切牙发生一定程度的舌倾。从而使上下颌位发生明显改变,这与以往学者研究结果一致^[2,7-8]。

在外力作用下,颅面骨骼结构中的骨缝作为生长区进行改建,这与在自然生长力作用下发生的改变一致。骨缝纤维拉伸,刺激附着骨的骨沉积;反之,骨缝纤维的压缩导致骨的吸收^[9]。Kambara^[10]通过动物实验发现:上颌前牵引装置可以引起上颌骨周围骨缝内的组织学变化,这证明骨缝内张力或压力区的变化取决于加力的方向。Vardimon等^[3]对 类磁力作用下青春期恒河猴翼上颌裂及髌突软骨的组织学变化进行了研究,发现翼上颌裂下界骨缝有广泛的增生活动。徐芸等^[4]开发了双阻板磁力矫治器- ,并在临床上取得良好的效果。以往的研究多数是针对少数骨缝在矫形力作用下的变化,本研究选取上颌骨周围可能发生改建的主要骨缝进行了观察,结果表明在 类重力作用下,位置不同的各条骨缝在形态、

细胞数目、骨缝的宽度上都出现了不同的改变。

[参考文献]

- [1] Dermaut LR, Aelbers CM. Orthopedics in orthodontics : Fiction or reality. A review of the literature—Part [J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1996, 110(6) :667-671.
- [2] Vardimon AD, Graber TM, Voss LR, et al. Functional orthopedic magnetic appliance(FOMA) —modus operandi[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1990, 97(2) :135-148.
- [3] Vardimon AD, Graber TM, Stutzmann J, et al. Reaction of the pterygomaxillary fissure and the condylar cartilage to intermaxillary Class magnetic mechanics[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1994, 105(4) :401-413.
- [4] 徐芸, 胡江天, 李璞, 等. 双阻板磁力矫治器矫治Angle 类错骀[J]. 中华口腔医学杂志, 1999, 34(3) :148-150.
Xu Yun, Hu Jiangtian, Li Pu, et al. The effects of twin-block magnetic appliance on the early skeletal Class malocclusion[J]. Chin J Stomatol, 1999, 34(3) :148-150.
- [5] Graber LW. Chin cup therapy for mandibular prognathism[J]. Am J Orthod, 1977, 72(1) :23-41.
- [6] Sugawara J, Asano T, Endo N, et al. Long-term effects of chin cap therapy on skeletal profile in mandibular prognathism[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1990, 98(2) :127-133.
- [7] Kim JH, Viana MA, Graber TM, et al. The effectiveness of protraction face mask therapy : A meta-analysis[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1999, 115(6) :675-685.
- [8] Sung SJ, Baik HS. Assessment of skeletal and dental changes by maxillary protraction[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1998, 114(5) :492-502.
- [9] Wagemans PA, van de Velde JP, Kuijpers-Jagtman AM. Sutures and forces : A review[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1988, 94(2) :129-141.
- [10] Kambara T. Dentofacial changes produced by extraoral forward force in the Macaca irus[J]. Am J Orthod, 1977, 71(3) :249-277.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第521页)

- vary proteome associated with periodontitis[J]. J Clin Periodontol, 2010, 37(3) :241-247.
- [4] The American Academy of Periodontology. The new classification for periodontal diseases and conditions[J]. Ann Periodontol, 1999, 4 :1-108.
 - [5] Rhodus NL, Cheng B, Myers S, et al. A comparison of the pro-inflammatory, NF-kappaB-dependent cytokines : TNF-alpha, IL-1-alpha, IL-6, and IL-8 in different oral fluids from oral lichen planus patients[J]. Clin Immunol, 2005, 114(3) :278-283.
 - [6] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72 :248-254.
 - [7] Henskens YM, van der Velden U, Veerman EC, et al. Protein, albumin and cystatin concentrations in saliva of healthy subjects and of patients with gingivitis or periodontitis[J]. J Periodontal Res, 1993, 28(1) :43-48.
 - [8] Henskens YM, van den Keijbus PA, Veerman EC, et al. Protein

- composition of whole and parotid saliva in healthy and periodontitis subjects. Determination of cystatins, albumin, amylase and IgA [J]. J Periodontal Res, 1996, 31(1) :57-65.
- [9] Sessa A, Meroni M, Battini G, et al. IgA nephropathy complicating diabetic glomerulosclerosis[J]. Nephron, 1998, 80(4) :488-489.
 - [10] Iughetti L, Marino R, Bertolani MF, et al. Oral health in children and adolescents with IDDM : A review[J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 1999, 12(5 Suppl 2) :603-610.
 - [11] Lejon S, Frick IM, Björck L, et al. Crystal structure and biological implications of a bacterial albumin binding module in complex with human serum albumin[J]. J Biol Chem, 2004, 279(41) :42924-42928.
 - [12] de Château M, Holst E, Björck L. Protein PAB, an albumin-binding bacterial surface protein promoting growth and virulence[J]. J Biol Chem, 1996, 271(43) :26609-26615.

(本文编辑 胡兴戎)