

[文章编号] 1000-1182(2010)05-0547-04

## 3种铸造合金全冠戴用后Ki67和P53 蛋白在牙龈组织中的表达

乔广艳<sup>1,2</sup> 苏俭生<sup>1</sup>

(1.同济大学口腔医院 修复科, 上海 200072; 2.上海市口腔病防治院 修复科, 上海 200001)

**[摘要]** 目的 研究3种常用铸造合金全冠戴用后Ki67、P53蛋白在牙龈组织中的表达, 探讨3种常用牙科铸造合金的生物学性能。方法 对犬分别行58%金合金、不含铍的镍铬合金、含铍的镍铬合金铸造全冠修复, 建立实验动物模型。应用免疫组化Envision二步法检测戴冠前、戴冠后2周, 1、2及3个月时Ki67、P53蛋白在牙龈组织中的表达。结果 含铍的镍铬合金与不含铍的镍铬合金铸造全冠戴用后, Ki67、P53蛋白在牙龈组织的表达逐渐升高, 戴冠1个月达到最高, 随后逐渐降低; 而58%金合金全冠戴用后, Ki67、P53蛋白的阳性表达率与空白对照组无统计学差异, 随时间延长也无明显改变。结论 镍铬合金全冠戴用后, 牙龈组织中Ki67、P53蛋白表达明显, 而58%金合金全冠戴用后表达不明显。3种铸造合金材料均未造成长时期的牙龈上皮异常增殖。

**[关键词]** 牙科铸造合金; 牙龈组织; Ki67蛋白; P53蛋白

**[中图分类号]** R 783 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.05.024

**Expression of Ki67 and P53 proteins in gingival tissue after wearing casting alloy crowns** QIAO Guang-yan<sup>1,2</sup>, SU Jian-sheng<sup>1</sup>. (1. Dept. of Prosthodontics, School of Stomatology, Tongji University, Shanghai 200072, China; 2. Dept. of Prosthodontics, Shanghai Stomatology of Dental Clinic, Shanghai 200001, China)

**[Abstract]** **Objective** The aim of the study was to detect the expression of Ki67 and P53 proteins in the gingival tissue before and after wearing three kinds of dental casting alloy crowns. **Methods** The three kinds of dental casting alloys(58% golden alloy, NiCr alloy, NiCr alloy excluding Be) were used to make full crowns for 3 dogs in each group. Another 3 dogs were taken as control. The immunohistochemistry Envision method was used to measure the expression of Ki67 and P53 proteins in the gingival tissue before wearing the crowns, 2 weeks, 1 month, 2 months, 3 months after wearing the crowns. **Results** The expression of Ki67 and P53 proteins in gingival tissue increased 1 month after wearing NiCr alloy and NiCr alloy excluding Be, then decreased gradually. And the expression of Ki67 and P53 proteins in 58% golden alloy group was similar to that in control. No pathological change was observed in all samples. **Conclusion** Two kinds of NiCr alloy crowns both can increase the expression of Ki67 and P53 proteins in gingival tissue, but 58% golden alloy crowns can not. So compared with NiCr alloy crowns, 58% golden alloy crowns have better biological properties. And none of three kinds of dental alloy crowns may induce long-term abnormal proliferation in gingival tissue.

**[Key words]** dental casting alloys; gingival tissue; Ki67 protein; P53 protein

牙科铸造合金因具有良好的硬度、耐磨性和韧性等综合力学性能, 广泛应用于固定义齿的冠、桥, 活动义齿的卡环、基托、支架, 以及种植体等修复。而任何牙科铸造合金从戴入口内开始, 便有金属离子不断释出, 当释出量逐渐聚积超过生理耐受量时, 就可能导导致机体局部或全身的损害。

临床上, 一些患者使用了牙科铸造合金制作的修复体后会出现牙龈红肿、充血, 牙龈灰线, 黏膜疼痛、苔藓样变等不良反应。因此, 对牙科铸造合金生物相容性的研究, 一直是国内外学者关注的热点课题之一。本实验给犬进行3种常用铸造合金全冠修复, 建立实验动物模型, 采用免疫组化Envision二步法检测Ki67、P53蛋白在牙龈组织中的表达, 考察3种牙科铸造合金材料(58%金合、不含铍的镍铬合金和含铍的镍铬合金)的生物学效应, 以期为临床应用提供实验数据。

[收稿日期] 2009-11-25; [修回日期] 2010-03-02

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30970726)

[作者简介] 乔广艳(1978—), 女, 江苏人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 苏俭生, Tel: 021-66311629

# 1 材料和方法

## 1.1 主要材料与试剂

58%金合金(Ellephant公司,美国),不含铍的镍铬合金(Matech'inc公司,美国),以及含铍的镍铬合金(Aalba-Dent'inc公司,美国),主要成分见表1。鼠抗人Ki67和P53单抗(野生型,所用抗体稀释滴度分别为:Ki67,1:50;P53,1:50),抗鼠Envision反应液,链酶亲和素-过氧化物酶复合物(strept avidin-biotin complex, SABC), DAB显色剂,均由丹麦Dako公司出品。

表 1 3种牙科铸造合金材料组成成分的质量分数

Tab 1 Components of three categories of dental casting alloys

金合金		不含铍的镍铬合金		含铍的镍铬合金	
元素	质量分数/%	元素	质量分数/%	元素	质量分数/%
Au	58.0	Ni	78.65	Ni	77.36
Pt	3.0	Cr	12.45	Cr	12.27
Pd	7.0	Mo	1.03	Mo	4.84
Ag	27.3	Al	1.36	Al	2.76
Zn	2.3	Si	0.49	Be	1.67
Ta	1.3	Ti	4.59	其他	1.10
其他	1.1	其他	1.43		

## 1.2 研究对象

健康1岁龄雄性杂种犬,共12只,身体健壮,体重10 kg左右。在上海交通大学医学院动物实验中心无特殊病原条件下饲养。

## 1.3 实验方法

1.3.1 铸造合金全冠修复动物模型的建立 将12只健康1岁龄雄性杂种犬随机分为A、B、C、D共4组,每组3只。A组作为对照组,不进行牙体预备和铸造合金全冠修复;B、C、D组作为实验组,按常规进行铸造合金全冠修复,将冠的龈边缘设计与牙龈龈缘平齐的位置。其中B组采用58%金合金全冠修复,C组采用不含铍的镍铬合金全冠修复,D组采用含铍的镍铬合金全冠修复。

1.3.2 牙龈组织的取材、固定与制片 将 $\frac{789}{789}$ 的颊侧龈缘从近中至远中5等分标记,根据5个时间点(戴冠前、戴冠后2周,1、2、3个月)分别在每个牙位的相应等分部位向根向切取深至骨膜的宽约1 mm的牙龈组织,各时间点每只犬分别采集6个标本(每组3只犬,共18个标本)。对每个标本分组编号,以 $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 中性甲醛固定,然后脱水,再用石蜡包埋,最后用RM2135型石蜡切片机以 $4\text{ }\mu\text{m}$ 的厚度连续切

片8张。

1.3.3 牙龈组织切片的苏木精-伊红染色 对每个标本,从上述8张切片中随机选取1张进行苏木精-伊红染色。

1.3.4 牙龈组织切片的免疫组化染色及结果判定标准 采用免疫组织化学Envision二步法,对每个标本的其余7张切片进行染色,具体操作步骤按说明书进行。用PBS液代替一抗作阴性对照,用丹麦Dako公司提供的阳性片作阳性对照,分别测定戴冠前、戴冠2周,1、2及3个月时牙龈组织中Ki67和P53蛋白的表达,其中鼠抗人Ki67(野生型)和鼠抗人P53单抗(野生型)所用的抗体稀释滴度均为1:50。

Ki67阳性染色仅见于细胞质为阴性的细胞,其细胞核呈棕黄色,染色均匀或呈颗粒状;P53阳性染色为细胞核和或质染色同时呈橘红色。利用Mias医用图像分析系统软件,从每张切片中随机选取10个高倍视野,在每个高倍视野中随机选取50个上皮细胞进行观察,计数阳性染色的细胞数,相加得阳性染色的细胞总数,然后按如下公式分别计算Ki67、P53蛋白的阳性表达率:阳性表达率=(阳性染色的细胞总数/500)×100%。

1.3.5 统计学分析 采用SAS 9.0软件对实验结果进行统计学分析,其中计量资料的组间两两比较采用t检验,所有组间的比较采用方差分析。

## 2 结果

### 2.1 铸造合金全冠戴用后Ki67蛋白在牙龈组织中的表达

58%金合金组在戴冠前、戴冠后2周,1、2及3个月时Ki67蛋白在牙龈组织中的表达率无统计学差异( $F=2.86, P>0.05$ )。与戴冠前相比,不含铍的镍铬合金组在戴冠后2周及戴冠后1个月时,Ki67蛋白的表达率呈逐渐上升趋势;到戴冠后2个月与3个月时,Ki67蛋白的表达率虽有下降,但仍然高于戴冠前水平( $F=59.60, P<0.01$ )。含铍的镍铬合金组各时间点Ki67表达率的变化与不含铍的镍铬合金组基本一致,也出现了在戴冠后2周及戴冠后1个月时上升,而在戴冠后2个月与3个月时下降的趋势( $F=115.24, P<0.01$ ,图1)。

同时可以看出,戴冠前各组之间Ki67蛋白在牙龈组织中的表达率无明显统计学差异( $F=2.89, P>0.05$ )。在戴冠后2周、1、2及3个月时含铍的镍铬合金组Ki67蛋白表达率均显著高于不含铍的镍铬合金组及58%金合金组( $P$ 均 $<0.01$ ),并且在戴冠后2周,1、2及3个月时不含铍的镍铬合金组Ki67蛋白表达率也明显高于58%金合金组( $P$ 均 $<0.01$ ,图1)。

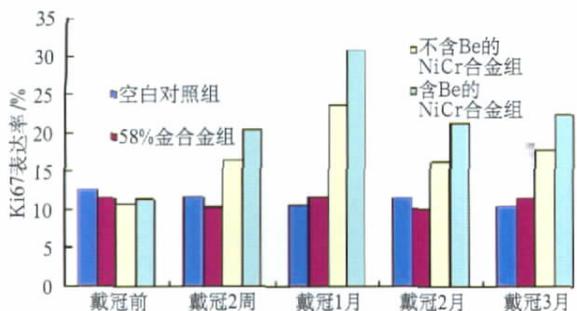


图1 铸造合金全冠戴用后Ki67蛋白在牙龈组织中表达率的比较  
Fig 1 Expression rate of Ki67 protein in gingival tissue after wearing different categories of casting alloy crowns

## 2.2 铸造合金全冠戴用后P53蛋白在牙龈组织中的表达

58%金合金组在戴冠前、戴冠后2周, 1、2及3个月各时间段P53蛋白在牙龈组织中的表达率无统计学差异( $F=0.28, P>0.05$ )。与戴冠前相比, 不含铍的镍铬合金组在戴冠后2周及戴冠后1个月时, P53蛋白的表达率呈逐渐上升趋势; 到戴冠后2个月与3个月时, P53蛋白的表达率虽有下降, 但仍然高于戴冠前水平( $F=153.22, P<0.01$ )。含铍的镍铬合金组各时间点P53蛋白表达率变化与不含铍的镍铬合金组基本一致, 也呈现了在戴冠后2周及戴冠后1个月时上升, 而在戴冠后2个月与3个月时下降的趋势( $F=140.27, P<0.01$ , 图2)。

同时可以看出, 戴冠前各组之间P53蛋白在牙龈组织中的表达率无统计学差异( $F=0.46, P>0.05$ )。在戴冠后2周, 1、2及3个月时含铍的镍铬合金组P53蛋白表达率均显著高于不含铍的镍铬合金组及58%金合金组( $P$ 均 $<0.01$ ), 并且在戴冠后2周, 1、2

及3个月时不含铍的镍铬合金组P53蛋白表达率也明显高于58%金合金组( $P$ 均 $<0.01$ , 图2)。

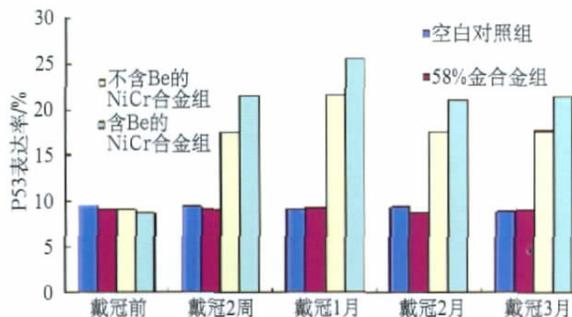
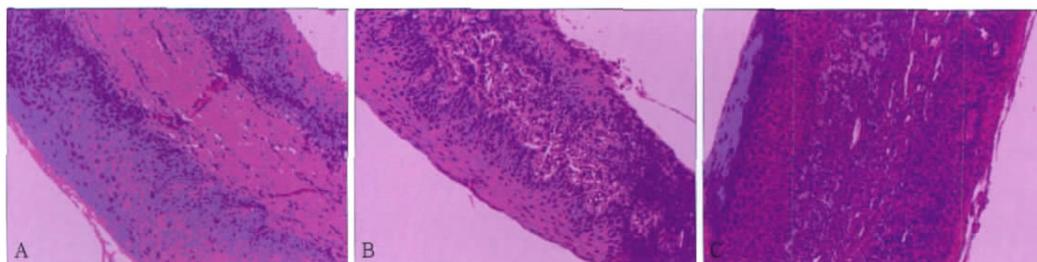


图2 铸造合金全冠戴用后P53蛋白在牙龈组织中表达率的比较  
Fig 2 Expression rate of P53 protein in gingival tissue after wearing different categories of casting alloy crowns

## 2.3 铸造合金全冠戴用后牙龈组织结构的变化

58%金合金全冠戴用后各时间点的牙龈组织结构与戴冠前(空白对照组)无明显差异, 均可见细胞界限清楚, 基底细胞排列正常, 未见炎症细胞浸润, 其中58%金合金全冠戴用后1个月的苏木精-伊红染色结果见图3A; 不含铍的镍铬合金组与含铍的镍铬合金组全冠戴用后2周、1个月时牙龈上皮的炎症反应均逐渐活跃, 均可见细胞结构紊乱, 细胞界限不清, 基底细胞水肿, 出现大量中性粒细胞浸润, 其中含铍的镍铬合金全冠戴用后1个月的苏木精-伊红染色结果见图3B; 不含铍的镍铬合金组与含铍的镍铬合金组全冠戴用后2、3个月时炎症反应均转入慢性炎症期并趋于稳定, 均可见皮下有散在的淋巴细胞和浆细胞浸润, 其中含铍的镍铬合金全冠戴用后2个月的苏木精-伊红染色结果见图3C。



A: 58%金合金组戴冠后1个月; B: 不含铍的镍铬合金组戴冠后1个月; C: 含Be的镍铬合金组戴冠后2个月。

图3 铸造合金全冠戴用后牙龈上皮的形态 HE ×100

Fig 3 The pictures of gingival epithelium after wearing different categories of casting alloy crowns HE ×100

## 3 讨论

近年来研究<sup>[1]</sup>发现, Ki67是一种与细胞增殖密切相关的核抗原, Ki67表达的高低反映了细胞增殖状态, 因此是目前应用最广泛的增殖细胞标记之一。Ki67抗原对蛋白酶非常敏感, 半衰期仅为1h或更短, 故在细胞有丝分裂G<sub>0</sub>期以外各期中均可检测到Ki67抗原, 能反映全部增殖细胞的数量, 因此,

Ki67作为一种可检测细胞增殖状态的指标, 具有准确、可靠的优点<sup>[2]</sup>。p53基因是一种重要的肿瘤抑制基因, 参与细胞生长的正常调控, 将DNA受损的细胞阻滞在G<sub>1</sub>期, 使细胞在进入S期前修复受损的DNA, 阻止突变的形成。而p53基因的异常(如突变)可使P53蛋白发生异常, 在细胞内的稳定性增强, 失去抑制细胞增殖的作用, 而有利于细胞增殖, 细胞增殖失控则最终导致肿瘤的发生。目前认

为p53基因突变可能是细胞生物学行为改变的标志之一<sup>[3]</sup>。

牙科铸造合金在口腔内可能导致的不良生物学反应几乎都是因合金金属离子的析出而引起的<sup>[4]</sup>。牙科铸造合金暴露于口腔环境中，将与牙龈组织、体液(唾液、血液)及口腔菌群直接接触，发生电化学腐蚀，出现孔蚀现象，引起金属离子析出<sup>[5]</sup>。金属离子的析出对牙龈组织产生直接或间接的刺激作用，造成牙龈细胞营养障碍，细胞凋亡或死亡，再加上巨噬细胞吞噬析出离子等颗粒状物质，从而介导组织细胞的免疫反应，引起牙龈炎症反应，从而细胞出现反应性增殖<sup>[6]</sup>。

本实验显示，不含铍的镍铬合金组与含铍的镍铬合金组全冠戴用2周、1个月时，牙龈组织炎症反应逐渐活跃，细胞结构混乱、细胞界限不清，基底细胞水肿，大量中性粒细胞浸润。戴冠2、3个月时，炎症反应趋于稳定，转入慢性炎症期，皮下有散在淋巴细胞、浆细胞浸润。同时炎症反应明显时Ki67及P53蛋白呈较高表达，炎症反应稳定时呈较低表达，可见牙龈上皮细胞增殖与牙龈炎症反应紧密相关。

本实验Ki67及P53蛋白表达结果显示，不同铸造合金全冠材料和戴冠时间均会影响相应区域牙龈上皮细胞的增殖和牙龈炎症反应。从材料角度分析，含铍的镍铬合金全冠和不含铍的镍铬合金全冠在对应区域牙龈组织中Ki67及P53蛋白表达较高，引起较明显的牙龈上皮细胞增殖和牙龈炎症反应；而58%金合金全冠未引起明显的牙龈上皮细胞增殖和牙龈炎症反应。这与以往的不同合金金属离子析出实验结果一致：金合金具有良好的耐腐蚀性能，不易析出金属离子；镍铬合金中加入铍容易导致合金表面的保护性氧化层开裂<sup>[7]</sup>，降低镍铬合金的耐腐蚀性能，析出更多的金属离子，从而引起明显的牙龈上皮细胞增殖和牙龈炎症反应。从戴冠时间角度分析，含铍的镍铬合金全冠和不含铍的镍铬合金全冠戴用后，Ki67、P53蛋白的阳性表达率逐渐升高，戴冠1个月达到最高，随后逐渐降低，戴冠2、3个月时牙龈组织中Ki67及P53蛋白表达率降低。这与以往合金戴用后金属离子释出速度的研究结果相一致：合金戴用2个月后因合金表面逐渐钝化，而生成的钝化膜对材料表面起保护作用，合金的腐蚀速度减慢<sup>[8]</sup>，使得牙龈上皮细胞增殖和牙龈炎症反应趋于稳定。这与苏俭生等<sup>[9]</sup>报道对犬进行不同材料牙科铸造合金全冠修复，应用免疫组化方法检测增殖细胞核抗原、B细胞白血病/淋巴瘤基因2蛋白

在牙龈组织中表达的结果一致。

细胞增殖与凋亡是组织正常生长、行使功能的2个基本要素，二者互相制约，处于动态平衡中，细胞组织凋亡或受损至细胞死亡则由增殖来补充，以保持正常细胞数目及体积；平衡失调则导致异常增殖。本研究表明，含铍的镍铬合金与不含铍的镍铬合金全冠戴用后引起了明显的牙龈上皮细胞增殖和炎症反应，生物相容性较差；而58%金合金全冠戴用后并未引起明显的牙龈上皮增殖和炎症反应，生物相容性较好。

### [参考文献]

- [1] Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, et al. The cell proliferation associated antigen of antibody Ki67 : A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle maintaining proteins[J]. J Cell Biol, 1993, 123(3) :513-522.
- [2] Arens N, Bleyl U, Hildenbrand R. HER2/neu, p53, Ki67, and hormone receptors do not change during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer[J]. Virchows Arch, 2005, 446(5) :489-496.
- [3] 苏剑生, 俞懿强, 张志升, 等. 不同材料暂时冠戴用后牙龈组织中Ki67、P53蛋白的表达[J]. 实用口腔医学杂志, 2006, 22(5) :647-650.
- [4] SU Jian-sheng, YU Yi-qiang, ZHANG Zhi-sheng, et al. Expression of Ki67 and P53 proteins in gingival tissue after wearing four kinds of temporary crowns[J]. J Pract Stomatol, 2006, 22(5) :647-650.
- [5] Wataha JC. Biocompatibility of dental casting alloys : A review[J]. J Prosthet Dent, 2000, 83(2) :223-234.
- [6] Elshahawy W, Watanabe I, Koike M. Elemental ion release from four different fixed prosthodontic materials[J]. Dent Mater, 2009, 25(8) :976-981.
- [7] Elshahawy WM, Watanabe I, Kramer P. *In vitro* cytotoxicity evaluation of elemental ions released from different prosthodontic materials[J]. Dent Mater, 2009, 25(12) :1551-1555.
- [8] 于思荣. 金属系牙科材料的应用现状及部分元素的毒副作用[J]. 金属功能材料, 2000, 7(1) :1-6.
- [9] YU Si-rong. The present status of application of dental metallic materials and the cytotoxicity of some elements[J]. Metallic Functional Materials, 2000, 7(1) :1-6.
- [10] Wataha JC, Lockwood PE, Nelson SK. Initial versus subsequent release of elements from dental casting alloys[J]. J Oral Rehabil, 1999, 26(3) :798-803.
- [11] 苏俭生, 贾爽, 乔乔艳, 等. PCNA和Bel-2蛋白在牙龈组织中的表达[J]. 同济大学学报:自然科学版, 2006, 34(6) :795-799.
- [12] SU Jian-sheng, JIA Shuang, QIAO Guang-yan, et al. Expression of PCNA and Bel-2 in gingival tissue after wearing casting alloy crowns[J]. J Tongji University : Natural Science, 2006, 34(6) :795-799.

(本文编辑 汤亚玲)