

[文章编号] 1000-1182(2007)05-0497-03

正畸力作用下牙周炎大鼠牙周膜骨保护素及配体的mRNA表达

肖立伟^{1,2}, 陈扬熙³, 白 丁³

(1.中南大学湘雅二医院 口腔医疗中心, 湖南 长沙 410011;

2.口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学; 3.四川大学华西口腔医院 正畸科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 探讨骨保护素(OPG)及其配体(OPGL)在炎性牙周条件下参与牙移动及牙周改建的机制。方法 采用原位杂交法检测牙周炎大鼠磨牙移动过程中OPG及OPGL在牙周组织内表达情况。结果 牙周受压后, 牙周炎大鼠加力组OPG及OPGL mRNA的阳性信号强度与牙周炎大鼠对照组比较, 差异有统计学意义, 其平均光密度值在2 d组中两者均达到峰值。结论 OPG及OPGL在炎症及正畸力联合效应下的牙周改建中起着重要作用。

[关键词] 骨保护素; 骨保护素配体; 牙周炎; 正畸力

[中图分类号] R783.5 [文献标识码] A

Influence of orthodontic force on osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand mRNA expression in the inflammatory periodontal tissues XIAO Li-wei^{1,2}, CHEN Yang-xi³, BAI Ding³. (1. Center of Stomatology of The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China; 2. Key. Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Dept. of Orthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective To explore certain principle of how osteoprotegerin(OPG) and osteoprotegerin ligand(OPGL) take part in the periodontal tissues remodeling under the combined influence of inflammation and orthodontic force. Methods The positive signals of OPG and OPGL mRNA were measured with in situ hybridization after orthodontic tooth movement in the experimental periodontitis groups and control ones. Results The OPG and OPGL mRNA expression intensity in the experimental group showed difference from control. All their optical density index reached a peak in day 2, respectively. Conclusion OPG and OPGL play important roles in the periodontal reconstruction induced by inflammation irritation and orthodontic force, and complex interaction could exist between the two factors.

[Key words] osteoprotegerin; osteoprotegerin ligand; periodontitis; orthodontic force

随着正畸成人患者的增多, 围绕牙周炎性刺激的问题在口腔领域引起了关注。学者们已从正畸牙移动和牙周炎防治领域分别探讨了骨保护素(osteoprotegerin, OPG)和骨保护素配体(osteoprotegerin ligand, OPGL)在牙周组织中表达分布的意义, 而炎性刺激和力学信号联合效应下两个因子如何变化、相互之间如何联系等尚不清楚。本实验在牙周炎大鼠牙移动模型上, 探讨OPG及OPGL在炎性牙周条件下调控牙周改建的分子机制, 以期有助于指导口腔正畸、修复及种植方面的临床工作。

1 材料和方法

选取48只SD成年牙周炎大鼠^[1], 去除刺激后纳入实验, 分成0、2、12 h和 2、7、14 d六组, 随机选择一侧磨牙施加0.49 N近中向力, 另一侧磨牙及8只健康大鼠磨牙牙周设为对照组。选取特异性编码大鼠的骨保护素及骨保护素配体基因的三相寡核苷酸探针(武汉博士德生物公司制备), 每条探针含30个碱基。大鼠肠上皮组织的间充质细胞均表达OPG及OPGL mRNA阳性信号, 证实了寡核苷酸探针的有效性。对含牙及牙周组织切片采用原位杂交检测近中腭侧根近中(压力)区牙周膜内OPG及OPGL mRNA的动态表达, 并对棕黄色阳性信号的吸光度值进行半定量分析。采用SPSS 10.0统计软件对数据进行单一ANOVA、t检验分析。

[收稿日期] 2006-12-01; [修回日期] 2007-02-20

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20020610063)

[作者简介] 肖立伟(1969-), 男, 湖南人, 副教授, 博士

[通讯作者] 陈扬熙, Tel: 028-85503081

2 结果

2.1 健康牙周大鼠与牙周炎大鼠OPG mRNA、OPGL mRNA表达的比较

健康大鼠牙周中, OPG mRNA仅在牙周膜内成骨细胞、成纤维细胞中少量弱表达; 牙周炎大鼠中 OPG mRNA表达更趋减弱, 但在牙槽嵴处阳性信号较强。两组大鼠上颌第一磨牙近中腭根压力侧表达的吸光度值分别为 23.45 ± 4.68 和 20.49 ± 4.13 , 两者差异有统计学意义($P < 0.01$)。

健康大鼠牙周中, OPGL mRNA仅表达在少量破骨细胞、成骨细胞及成纤维细胞胞浆中; 牙周炎大鼠牙周中OPGL mRNA表达明显增强, 阳性染色范围广泛, 破骨细胞、成骨细胞及成纤维细胞有阳性信号出现, 牙槽骨髓腔内及牙周上皮中也有阳性细胞检出。两组大鼠近中腭根压力侧表达的吸光度值分别为 24.07 ± 3.54 和 44.19 ± 5.39 , 两者差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 牙周炎大鼠正畸力作用下牙周组织中OPGL mRNA的变化规律

牙周炎大鼠正畸力作用下牙周组织中OPGL mRNA的变化规律见表1、图1。由表1可见, 牙周炎加力组: 加力后各时段OPGL mRNA阳性表达均增强, 与0 h组比较差异有统计学意义($P < 0.01$); 2 d组吸光度值达峰值, 压力侧近牙槽嵴顶破骨细胞信号最强, 附近骨髓腔的巨噬细胞、淋巴细胞以及骨边缘的成骨细胞、成纤维细胞中均出现胞浆阳性; 7 d组及14 d组表达强度趋于下降。牙周炎对照组: OPGL mRNA表达强度逐渐减弱, 同炎症缓解程度呈相同变化趋势。

表 1 牙周炎大鼠牙周膜OPGL mRNA的吸光度值 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The OPGL mRNA optical density in the periodontium of the rats suffering periodontitis ($\bar{x} \pm s$)

分组	吸光度值	
	牙周炎对照组	牙周炎加力组
0 h	44.17 ± 5.48	44.20 ± 5.39
2 h	41.34 ± 6.00	$47.89 \pm 6.77^*$
12 h	35.92 ± 7.62	$58.32 \pm 7.11^*$
2 d	32.68 ± 8.25	$77.79 \pm 7.09^*$
7 d	21.25 ± 5.98	$60.24 \pm 10.67^*$
14 d	20.33 ± 4.81	$47.41 \pm 11.54^*$

注: * $P < 0.01$

2.3 牙周炎大鼠正畸力作用下牙周组织中OPG mRNA的变化规律

牙周炎大鼠牙周膜OPG mRNA表达见表2、图2。

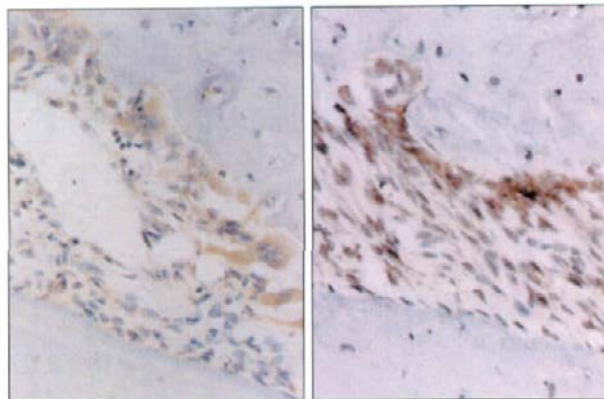


图 1 牙周炎对照组(左)、牙周炎加力组(右)大鼠牙周膜OPGL mRNA表达 原位杂交 $\times 80$

Fig 1 OPGL mRNA expression in the control periodontium (left) and the force-loaded periodontium (right) of the rats suffering periodontitis in situ hybridization $\times 80$

表 2 牙周炎大鼠牙周膜OPG mRNA的吸光度值 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The OPG mRNA optical density in the periodontium of the rats suffering periodontitis ($\bar{x} \pm s$)

分组	吸光度值	
	牙周炎对照组	牙周炎加力组
0 h	20.48 ± 4.20	20.50 ± 4.11
2 h	21.91 ± 3.58	$22.30 \pm 5.34^*$
12 h	23.92 ± 2.68	$25.74 \pm 5.63^{**}$
2 d	25.43 ± 5.39	$33.02 \pm 4.03^{**}$
7 d	28.43 ± 3.55	$29.25 \pm 3.67^*$
14 d	26.46 ± 4.74	$24.47 \pm 4.58^{**}$

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

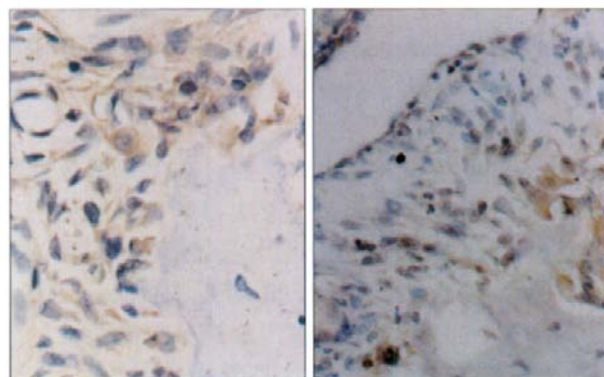


图 2 牙周炎对照组(左)、牙周炎加力组(右)大鼠牙周膜OPG mRNA表达 原位杂交 $\times 80$

Fig 2 OPG mRNA expression in the control periodontium (left) and the force-loaded periodontium (right) of the rats suffering periodontitis in situ hybridization $\times 80$

由表2可见, 牙周炎加力组: 正畸力对大鼠近中腭根压力侧炎症组织OPG mRNA表达的影响有限, 吸光度值出现轻度增高, 在2 d组达到相对峰值, 加力后所有时间段组与0 h对照组OPG mRNA表达比较, 差异均有统计学意义。压力侧牙周膜内,

靠近牙槽嵴顶的成骨细胞及成纤维细胞的胞浆中有较强的阳性表达。实验发现破骨细胞中OPG mRNA阳性信号表达较弱。牙周炎对照组：在7 d组OPG mRNA表达达到相对峰值，但在14 d组，OPG的mRNA平均表达强度略高于牙周炎加力组。随着刺激的去除和炎症的减轻，OPG mRNA表达增强，牙周膜内环境处于恢复及重建状态。

3 讨论

局部微环境中OPG和OPGL的平衡是维持正常骨代谢的基础及决定骨吸收的重要因素，OPGL/OPG浓度之比是破骨细胞分化诱导的关键^[2]。现已证实，OPGL结合于破骨细胞前体上的受体RANK，诱导其分化为破骨细胞；而OPG作为OPGL的假诱导性受体，主要通过OPGL结合，竞争性抑制OPGL与RANK结合，从而消除OPGL对破骨发生各阶段的作用，抑制骨吸收，增加骨量^[3-4]。而牙周膜细胞则可能通过刺激OPGL的活性及抑制OPG来调节破骨细胞形成，从而影响牙周炎形成及牙移动的进程^[5]。

实验组中各加力时段OPG mRNA及OPGL mRNA表达强度与0 h对照组比较均有统计学差异，且均在2 d组达到相对峰值。结合其形态学改变，提示力学信号可能启动了破骨细胞募集、分化、成熟及发挥骨吸收功能的新的循环。Oshiro等^[6]研究发现，对牙齿施力2~5 d后，在OPG基因剔除小鼠或正常小鼠中，牙周组织OPGL表达均增强，但两者差异无统计学意义；而在OPG基因剔除小鼠中，牙槽骨破坏严重。在大鼠牙受力移动的骨吸收区，多种细胞均有OPGL蛋白检出，提示OPGL至少部分参与了牙移动过程中破骨细胞的分化及激活^[7]。当磨牙受近中向牵引力1~2 d时，其牙根远中张力区20%~40%的破骨细胞出现凋亡形态，转化生长因子-1 mRNA和OPG mRNA的水平显著上升，骨衬里细胞的张力刺激和多种相关因子共同影响了破骨细胞的转归^[8]。

OPG和OPGL不仅参与了牙周组织生理改建，其mRNA表达变化也反映牙周炎症的病变进程。本研究发现，实验性牙周炎大鼠的牙周中OPGL mRNA表达强度显著高于正常对照大鼠；而在牙周炎大鼠对照组，其磨牙牙周因炎症刺激的去除，OPGL mRNA表达强度随观察时间延长递减，提示OPGL具有促进破骨活性。而OPG mRNA在牙周炎大鼠中的表达低于正常大鼠，可能是炎症状态抑制了OPG基因转录；在牙槽嵴处OPG mRNA表达较强的原因可能是其具有防止过度破骨吸收的保护功能，与其生物学活性相符。在活跃期牙周炎中OPGL mRNA表达很高，主要在淋巴细胞、巨噬细胞以及牙周上皮

中检出，OPGL mRNA的上调与牙周炎骨破坏密切相关^[9]；活化的CD8⁺T细胞抑制B细胞促破骨细胞的形成作用，其表达大量的OPG和OPGL，加入抗OPG抗体也不能逆转该细胞的抑制效应，提示OPG不是牙周组织单一的骨保护因子^[10]。可以认为OPGL和OPG相互竞争和拮抗，其表达强弱决定炎症环境下牙槽骨破坏的程度及牙周组织的预后，OPG过表达对治疗牙周炎及拮抗牙移动中过度炎症反应有利。

本实验在力学及炎症刺激的联合效应下，从基因转录水平定位、定性、定量分析OPG及其配体OPGL在牙周组织中的表达规律。处于牙周炎慢性期的大鼠磨牙在受到近中向的正畸牵引力后，OPGL mRNA表达水平进一步提升，2 d组达到峰值，并在更长的观察时段内维持较高水平；而同一大鼠的对照侧磨牙因致炎因素的去除以及大鼠具有的良好口腔自洁功能，原有炎症消退较快，OPGL mRNA表达量逐渐下降，破骨活性降低。这与形态学观察结果一致，推测OPGL mRNA的上调直接或间接促进破骨细胞数增加及牙槽骨吸收的增强。炎症牙周状态下加力后OPG mRNA表达水平出现轻度上升，在2 d组达相对最高点，在7 d及14 d组又轻微下调。笔者认为可能原因是OPGL mRNA的上调反馈性的引起成骨细胞增加OPG合成，使牙周组织中OPG mRNA表达相应增多，起到部分抑制OPGL的促破骨作用。

多种刺激骨吸收的因子可作用于成骨细胞，诱导其膜上表达OPGL，OPGL与RANK结合后将信号传入前体细胞，引起级联瀑布反应，使破骨细胞分化成熟和激活其骨吸收功能，OPGL和OPG成为破骨细胞终末分化期及发挥功能的调节因子^[11]。但是，肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1、干扰素- γ 、原癌基因c-myc、激活的T细胞等^[1,12-13]也能单独介导破骨形成，显示破骨吸收是多信号系统、多因子共同发挥调控作用的结果。本实验从力学信号和炎症刺激联合途径介入破骨吸收的研究，揭示OPG及OPGL参与牙周改建的规律，为后继研究提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 肖立伟, 陈扬熙, 白 丁, 等. 正畸力影响炎症性牙周组织中肿瘤坏死因子 蛋白表达的实验研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2005, 23(3): 208-210.
XIAO Li-wei, CHEN Yang-xi, BAI Ding, et al. The effects of orthodontic force on TNF- α protein expression in the inflammatory periodontal tissues[J]. West China J Stomatol, 2005, 23(3): 208-210.
- [2] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: A

以上大部分Homeobox基因具有一个共同的特点,即均在多数或全部的舌癌标本中下调,仅有NANOG出现明显的上调。Homeobox基因的产物均为携带与DNA结合的同源异形域的转录因子蛋白,Homeobox基因在肿瘤中的普遍下调,暗示该转录因子功能可能直接或间接参与了与抑制/促进细胞分化、凋亡相关的其他因子的正向/反向调节。据初步统计在文献中报道与肿瘤相关的差异表达基因有40余条,而在本实验中得到频数大于等于4的共同差异基因仅12条,且多数无法在文献中得到验证。

本研究使用Cluster分析软件进行聚类分析,将结果导入图像聚类分析软件Tree View并以图形显示,归为一个簇的基因在功能上可能相似或关联。结果发现,下调基因在第7、8号芯片中有集体下调趋势,上调基因在第6、7、8号芯片中有集体上调趋势。对照临床资料,发现6、7、8号芯片的标本均来自于颈淋巴结转移阳性的患者,而其余3张芯片则来自于转移阴性患者。这提示在第6、7、8号芯片中出现的共同上调基因和在第7、8号芯片中出现共同下调的基因里,可能存在与鳞癌转移相关的因子,这一结果需要采用全基因组芯片对更大规模的样本进行分析研究。

[参考文献]

- [1] Sobin LH, Wittekind CH. TNM classification of malignant tumours[M]. 6th ed. New York: Wiley Liss, 2002:184-187.

(上接第499页)

- novel secreted protein involved in the regulation of bone density[J]. Cell, 1997, 89(2):309-319.
- [3] Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, et al. The ligand for osteoprotegerin(OPGL) directly activates mature osteoclasts[J]. J Cell Biol, 1999, 145(3):527-538.
- [4] Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption[J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(1):2-12.
- [5] Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, et al. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition[J]. J Dent Res, 2001, 80(3):887-891.
- [6] Oshiro T, Shiotani A, Shibasaki Y, et al. Osteoclast induction in periodontal tissue during experimental movement of incisors in osteoprotegerin-deficient mice[J]. Anat Rec, 2002, 266(4):218-225.
- [7] Shiotani A, Shibasaki Y, Sasaki T. Localization of receptor activator of NFkappaB ligand, RANKL, in periodontal tissues during experimental movement of rat molars[J]. J Electron Microsc, 2001, 50(4):365-369.
- [8] Kobayashi Y, Hashimoto F, Miyamoto H, et al. Force-induced

- [2] Mitsui K, Itoh H. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells[J]. Cell, 2003, 113(5):631-642.
- [3] Chambers I, Robertson M. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cell[J]. Cell, 2003, 113(5):643-655.
- [4] Høi-Hansen CE, Almstrup K, Nielsen JE, et al. Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumours[J]. Histopathology, 2005, 47(1):48-56.
- [5] Manuel A, Beaupain D, Romeo PH, et al. Molecular characterization of a novel gene family(PHTF) conserved from Drosophila to mammals[J]. Genomics, 2000, 64(2):216-220.
- [6] Lord RV, Brabender J, Wickramasinghe K, et al. Increased CDX2 and decreased PITX1 homeobox gene expression in Barrett's esophagus and Barrett's-associated adenocarcinoma[J]. Surgery, 2005, 138(5):924-931.
- [7] Gregory-Evans K, Kelsell RE, Gregory-Evans CY, et al. Autosomal dominant cone-rod retinal dystrophy(CORD6) from heterozygous mutation of GUCY2D, which encodes retinal guanylate cyclase[J]. Ophthalmology, 2000, 107(1):55-61.
- [8] Maclean JA, Chen MA, Wayne CM, et al. Rhox: A novel homeobox gene cluster[J]. Cell, 2005, 120(3):369-382.
- [9] Geserick C, Weiss B, Haendler B, et al. OTEX, an androgen-regulated human member of the paired-like class of homeobox genes[J]. Biochem J, 2002, 366(1):367-375.
- [10] Enomoto Y, Enomoto K, Kitamura T, et al. Keratinocyte-specific POU transcription factor hSkn-1a represses the growth of cervical cancer cell lines[J]. Oncogene, 2004, 23(29):5014-5022.

(本文编辑 汤亚玲)

- osteoclast apoptosis in vivo is accompanied by elevation in transforming growth factor beta and osteoprotegerin expression[J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(10):1924-1934.
- [9] Liu D, Xu JK, Figliomeni L. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: Possible involvement in bone destruction[J]. Int J Mol Med, 2003, 11(1):17-21.
- [10] Choi Y, Woo KM, Ko SH, et al. Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8(+) T cells[J]. Eur J Immunol, 2001, 31(7):2179-2188.
- [11] Shiotani A, Takami M, Itoh K, et al. Regulation of osteoclast differentiation and function by receptor activator of NFkB ligand and osteoprotegerin[J]. Anat Rec, 2002, 268(2):137-146.
- [12] Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction[J]. J Exp Med, 2000, 191(2):275-286.
- [13] Sabokbar A, Kudo O, Athanasou NA. Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periosteal osteolysis[J]. J Orthop Res, 2003, 21(1):73.

(本文编辑 汤亚玲)