

## 咬合力改变对牙周膜成纤维细胞凋亡及其增殖细胞核抗原表达的影响

王国栋, 姜晓钟\*, 何玉林

(第二军医大学长征医院口腔科, 上海 200003)

**[摘要]** **目的:** 观察咬合力改变对大鼠牙周膜成纤维细胞凋亡及其增殖细胞核抗原(PCNA)表达的影响, 探讨牙周膜改建的可能机制。**方法:** 拔除健康雄性SD大鼠右上颌第一、二、三磨牙, 建立左下颌磨牙咬合力改变动物模型, 分别于拔牙后6、12 h及1、2、3、5、7、14、28 d处死大鼠( $n=6$ ), 取牙槽骨组织, 进行H-E染色观察; TUNEL法观测牙周膜成纤维细胞的凋亡情况, 免疫组织化学染色检测其PCNA表达。另设正常咬合力大鼠作为对照组( $n=6$ )。TUNEL法及免疫组织化学染色结果采用二级计分法, 根据染色强度及阳性细胞的数目进行计分取平均值。**结果:** 成功建立咬合力改变雄性SD大鼠模型。H-E染色结果显示与拔牙大鼠相比, 正常对照组大鼠牙周膜结构较致密, 纤维排列有序, 牙槽骨骨壁较平。TUNEL法观察显示拔牙后12 h牙周膜成纤维细胞凋亡达峰值( $252.67 \pm 6.62$ ), 明显高于正常对照组( $7.17 \pm 2.32$ ,  $P < 0.01$ ), 其后开始下降, 至28 d基本恢复正常( $8.50 \pm 1.87$ )。免疫组化染色表明PCNA的表达也呈类似趋势, 拔牙后3 d表达最高( $246.00 \pm 7.21$ ), 此后开始下降至正常( $5.67 \pm 2.16$ ,  $P < 0.01$ )。**结论:** 咬合力改变可能通过加速牙周膜成纤维细胞的凋亡, 促进细胞增殖, 从而共同完成牙周膜的改建。

**[关键词]** 咬合力; 牙周膜; 成纤维细胞; 细胞凋亡; 增殖细胞核抗原

**[中图分类号]** R 780.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)05-0484-05

## Influence of occlusal force change on apoptosis of periodontal ligament fibroblast and expression of proliferating nuclear antigen

WANG Guo-dong, JIANG Xiao-zhong\*, HE Yu-lin (Department of Stomatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the influence of occlusal force change on apoptosis of periodontal ligament fibroblast (PDLF) and expression of proliferating nuclear antigen (PCNA) in the fibroblasts, so as to explore the possible mechanism for remodeling of periodontal ligament. **Methods:** Animal model of occlusal force change was established by extracting the right first, second and third maxillary molars in male SD rats. The rats were sacrificed at 6, 12 hours and day 1, 2, 3, 5, 7, 14, and 28 d after extracting the teeth ( $n=6$ ), and their alveolar bone tissues were harvested. H-E staining was used to observe the morphologic changes of the alveolar bone tissues. TUNEL method and immunohistochemistry were used to detect apoptosis and PCNA expression in PDLF. The rats with normal occlusal forces were used as control ( $n=6$ ). The results were assigned a mean score based on the percentage and the intensity of cells positively stained for TUNEL and PCNA. **Results:** Animal model of occlusal force change was successfully established. H-E staining showed that the control group had more pycnotic periodontal ligament, orderly fibres, and flatter alveolar bone than the model group. TUNEL result showed that the cell apoptosis reached its peak at 12 h after extracting the teeth ( $252.67 \pm 6.62$ ), significantly higher than that of control group ( $7.17 \pm 2.32$ ,  $P < 0.01$ ), then gradually decreased to normal level on day 28 after extraction ( $8.50 \pm 1.87$ ). Immunohistochemical staining showed that the expression of PCNA had a similar tendency of apoptosis; PCNA expression peaked on day 3 after extraction ( $246.00 \pm 7.21$ ) and then gradually decreased to normal level ( $5.67 \pm 2.16$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Changes of occlusal force can facilitate the PDLF apoptosis and promote PDLF proliferation, contributing to the remodeling of periodontal ligament.

**[KEY WORDS]** bite force; periodontal ligament; fibroblasts; apoptosis; proliferating cell nuclear antigen

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(5): 484-488]

细胞凋亡(apoptosis)是基因调控下细胞主动而有序的死亡过程, 又称程序性细胞死亡, 它在个体发育和维持机体内环境稳定方面具有重要的生物学意义<sup>[1]</sup>。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是一种高效的细胞蛋白质, 可与细胞增殖过程相整合来调节DNA的复制和修复<sup>[2]</sup>。已有研究<sup>[1]</sup>发现, 细胞凋亡和细胞增殖与人体许多部位的组织改建有密切关系。

牙周膜组织在体内外环境理化因素的作用下, 需要不断进行改建, 以适应环境和功能的变化<sup>[3,4]</sup>。目前关于牙周膜组织的研究侧重于通过细胞牵张装置对培养的细胞施加周期性牵张力来观察力对细胞生长的影响, 但关于咬合力改变下牙周膜成纤维细

**[作者简介]** 王国栋, 硕士. E-mail: wgd\_ren@163.com

\* Corresponding author. E-mail: Jeanjiang@263.net

胞(periodontal ligament fibroblast, PDLF)凋亡和增殖情况的研究较少。本实验通过建立咬合力改变大鼠模型,探讨PDLF凋亡及增殖在牙周膜改建中的作用。

## 1 材料和方法

1.1 咬合力改变动物模型的建立及动物分组 60只成年雄性SD大鼠(购自海军医学研究所实验动物中心),体质量( $210 \pm 20$ )g,定时、定量摄食,自由饮水,喂养1周后开始实验。大鼠随机分为正常对照组(正常咬合力组,  $n=6$ )和模型组(咬合力改变模型组,  $n=54$ )。模型组大鼠组用3%戊巴比妥钠0.38 ml腹腔麻醉,充分麻醉后拔除右上颌第一、二、三磨牙,建立左下颌磨牙咬合力改变的SD大鼠模型。于拔牙后6、12 h及1、2、3、5、7、14、28 d共9个时相点处死动物( $n=6$ )。

1.2 取材 动物处死前12 h禁食,严格无菌条件下,用3%戊巴比妥钠0.5 ml经腹腔麻醉后放血处死,迅速取出左侧下颌骨,仅保留磨牙区相应骨段,0.9%生理盐水冲洗后,置于4%多聚甲醛缓冲液固定24 h,后将标本移至10%EDTA中脱钙3~4周,梯度乙醇脱水,二甲苯置换至石蜡包埋。常规石蜡切片,厚5  $\mu\text{m}$ 。行常规H-E染色观察;TUNEL (terminal dUTP-X nick end labeling)法观测PDLF细胞凋亡情况,免疫组织化学检测细胞PCNA表达程度。

1.3 TUNEL法测定细胞凋亡程度 按照美国Roche公司细胞凋亡试剂盒的步骤操作:5  $\mu\text{m}$ 切片脱蜡至水,3% $\text{H}_2\text{O}_2$ 室温20 min;滴加蛋白酶K(20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 37 $^\circ\text{C}$  20 min), PBS洗3 min $\times$ 3次;加TUNEL混合液(30  $\mu\text{l}$ /每片, 37 $^\circ\text{C}$  1 h), PBS洗3 min $\times$ 3次;滴加1:200 Streptavidin-HRP(北京中山生物技术有限公司;37 $^\circ\text{C}$  30 min), PBS洗3 min $\times$ 3次;0.04% DAB(Sigma)+0.03% $\text{H}_2\text{O}_2$ 显色10 min,水洗;苏木精衬染1 min,水洗蓝化;吹干后常规树脂封片。阳性乳腺癌标本作为阳性对照;PBS代替TUNEL混合液作为阴性对照。

1.4 免疫组织化学染色观察PCNA表达 按照丹麦DAKO公司SP免疫组化试剂盒的步骤操作:切片经二甲苯脱蜡后梯度乙醇水化,3% $\text{H}_2\text{O}_2$ 室温20 min, PBS洗3 min $\times$ 3次;微波法抗原修复(0.01 mol/L pH 6.0 柠檬酸盐缓冲液,微波炉加热至98 $^\circ\text{C}$ 并持续15 min),自然冷却后PBS洗3次;体积分数10%的正常山羊血清封闭(37 $^\circ\text{C}$  20 min),滴加1:100的PCNA(DAKO, clonePC10, M0879);4 $^\circ\text{C}$

过夜后复温1 h, PBS洗3 min $\times$ 3次;然后滴加1:200的生物素化猪抗兔IgG(北京中山生物技术有限公司;37 $^\circ\text{C}$  30 min), PBS洗3 min $\times$ 3次;然后滴加1:200 Streptavidin-HRP(37 $^\circ\text{C}$  30 min), PBS洗3 min $\times$ 3次;0.05% DAB(Sigma)+0.03% $\text{H}_2\text{O}_2$ 显色,8~12 min后终止反应;苏木精复染,脱水,透明,树脂封片。阴性对照:用PBS代替一抗工作液。

1.5 结果判断 TUNEL法和PCNA阳性染色为淡黄色、棕黄色或棕褐色,均定位于细胞核。所有结果由两位不知情的病理专家进行判断,采用二级计分法统计结果,并取平均值。判断标准:根据染色强度,将结果分为3级,分别表示为+, ++, +++;根据阳性细胞数,计算每100个细胞中阳性细胞数,然后二者相乘,即为最后评分。理论上结果的范围为0~300分<sup>[5]</sup>。

1.6 统计学处理 采用SPSS 11.0软件包,将所有实验结果进行方差齐性检验,对TUNEL法采用单因素方差分析,组间比较行LSD检验;对PCNA免疫组化采用完全随机秩和检验,并对原始数据进行排序,用转化后的秩号进行单因素方差分析,组间比较行LSD检验,以 $P < 0.05$ 为差异显著。

## 2 结果

2.1 动物模型的建立 54只大鼠均成功拔除右上颌磨牙,无牙根残留。术中、术后无明显出血,术后正常进食、进水,拔牙创面愈合良好,无明显感染。成功建立左下颌磨牙咬合力改变的SD大鼠模型。

2.2 H-E染色结果 正常对照组大鼠牙周膜结构致密,纤维排列有序,成纤维细胞核的方向与之一致;牙槽骨骨壁较平,表面衬以连续排列的扁平成骨细胞(图1A)。拔牙3 d后,模型组牙周膜腔增宽,结构疏松,纤维、细胞排列杂乱无序,尤以近牙槽骨侧为重;牙槽骨骨壁凹凸不平,有活跃的骨吸收陷窝(图1B);14 d时,模型组牙周膜宽度明显增加,近牙根侧结构致密,但牙槽骨侧结构疏松,纤维及细胞排列较前规则;牙槽骨骨壁凹凸不平,其内可见破骨细胞(图1C);28 d时,模型组大鼠牙周膜宽度有所减小但仍高于对照组,结构较前致密,细胞、纤维的排列有序;牙槽骨骨壁仍凹凸不平,破骨细胞数量减少(图1D)。

2.3 TUNEL法凋亡检测及PCNA的表达结果 正常对照组大鼠牙周膜组织中凋亡细胞及增殖细胞核抗原染色均呈淡黄色,散在分布,数量较少;模型组呈片状和(或)弥漫分布,且染色强度均高于对照组(图2)。

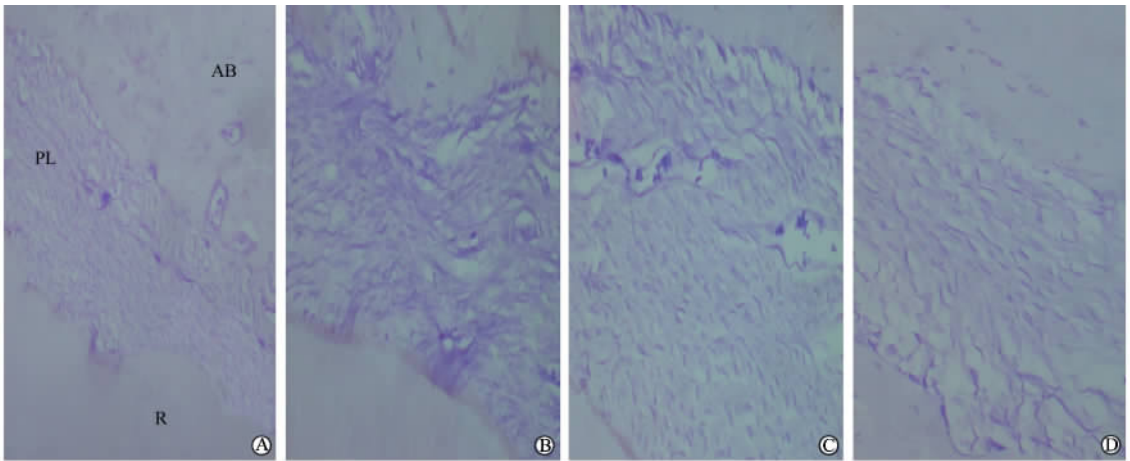


图 1 各组大鼠牙周膜 H-E 染色结果

Fig 1 H-E staining of rat periodontal ligament in each group( $\times 200$ )

A: Control; B-D: 3,14,28 d after extracting the teeth; R: Root; PL: Periodontal ligament; AB: Alveolar bone

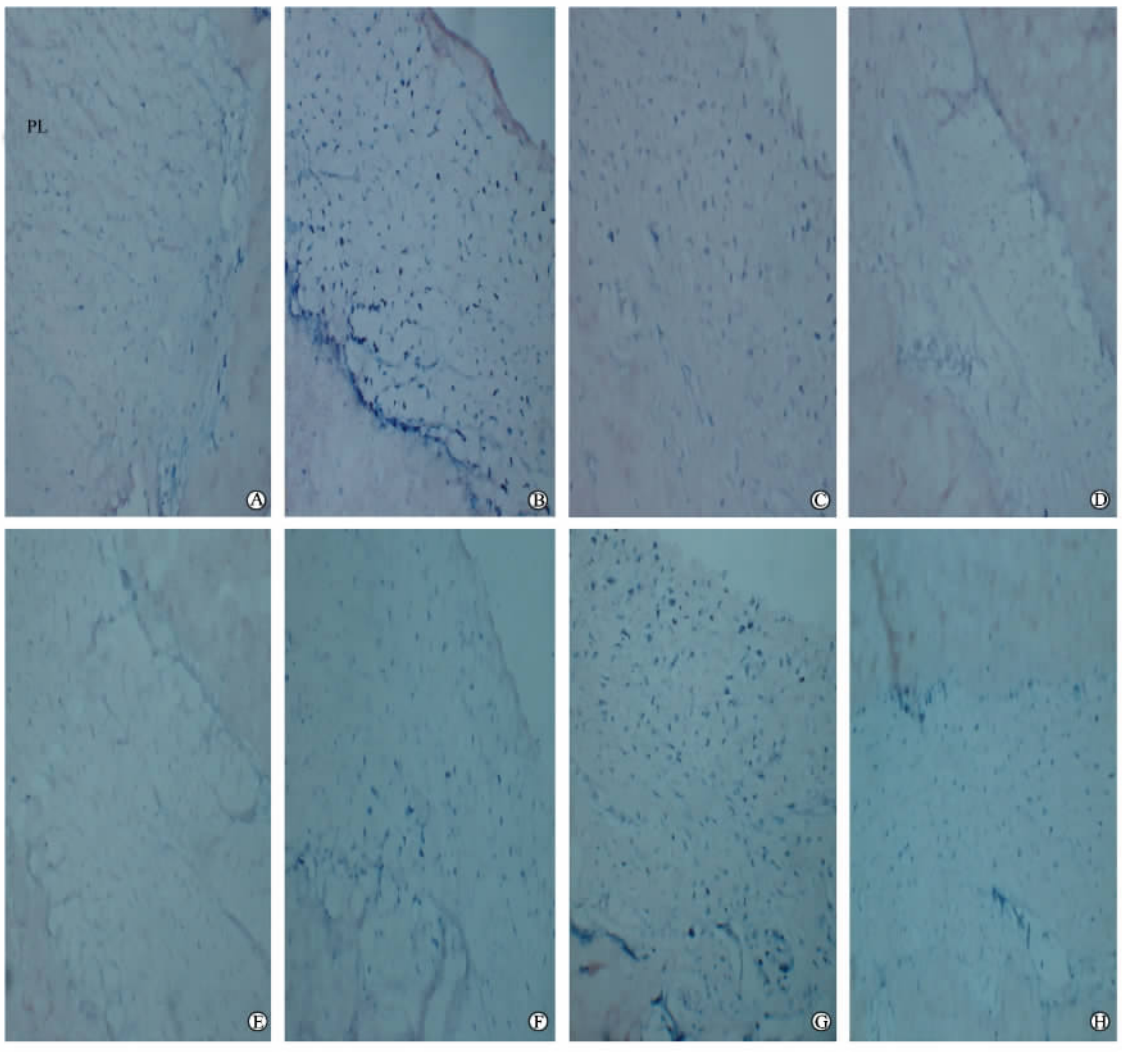


图 2 拔牙后不同时间点大鼠牙周膜成纤维细胞 TUNEL 法及免疫组化染色结果

Fig 2 Immunohistochemical staining and TUNEL results in rat PDLF after extracting teeth( $\times 400$ )

PL: Periodontal ligament. A-D: PDLF cell apoptosis measured by TUNEL method; E-H: PCNA expression measured by immunohistochemistry; A,E: control; B,F: 12 h after extracting; C,G: 3 d after extracting; D,H: 28 d after extracting

统计结果表明,拔牙后各时相点凋亡情况(除 28 d 外)及 PCNA 的表达均高于对照组( $P < 0.01$ )。拔牙后 6 h 细胞凋亡逐渐增多,12 h 达峰值,3 d 后开始下降,5 d 时与 6 h 细胞凋亡情况类似,28 d 后逐渐恢复,与正常对照组无显著差异。PCNA 的表达也呈现类似表现,拔牙后 3 d 表达最高,此后开始逐渐下降至正常,其中 2 d 时 PCNA 的表达与 5 d 时无明显差异。具体数据详见表 1。

表 1 拔牙后不同时间点大鼠牙周膜成纤维细胞凋亡情况和 PCNA 表达的比较

Tab 1 Comparison of apoptosis and PCNA expression in rat PDLF at different time points after extracting teeth  
( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

Group	Mean Score	
	Cell apoptosis	PCNA expression
Control Model	7.17 ± 2.32	5.67 ± 2.16
6 h	128.50 ± 3.08**	46.83 ± 4.02**▲▲
12 h	252.67 ± 6.62**△△	57.00 ± 5.86**▲▲
1 d	234.67 ± 7.00**△△	204.33 ± 8.52**▲▲
2 d	150.17 ± 5.95**△△	222.50 ± 6.83**
3 d	141.83 ± 5.30**△△	246.00 ± 7.21**▲▲
5 d	125.17 ± 4.22**	215.00 ± 9.78**
7 d	109.67 ± 6.38**△△	89.67 ± 4.63**▲▲
14 d	44.83 ± 4.54**△△	28.00 ± 3.16**▲▲
28 d	8.50 ± 1.87△△	13.17 ± 2.86**▲▲

\*\*  $P < 0.01$  vs control group; △△  $P < 0.01$  vs 6 h; ▲▲  $P < 0.01$  vs 2 d

### 3 讨论

牙周膜是一层富含细胞、纤维的致密结缔组织,位于牙根和牙槽骨之间,起着支持牙齿,承担和分散咬合力的作用。PDLF 作为牙周膜中的主体细胞,能将机械负荷转化为分子信号,调节细胞的功能,从而发生组织的改建<sup>[6]</sup>。牙齿位于牙槽窝中始终承担着咬合力的作用,关于咬合力对牙周组织影响的研究,国外学者一般采用以下几种方法来模拟不同的咬合力状态:(1)加高咬合<sup>[7]</sup>,通过自凝树脂在咬合面形成高嵌体而使咬合力增大;(2)调磨<sup>[8]</sup>,通过磨除一定的牙体组织,使其脱离咬合平面从而导致咬合力改变;(3)拔牙<sup>[9]</sup>,通过拔除一个区的部分牙而达到咬合力改变的目的。本实验也采用拔牙法建立动物模型,不同在于拔除了一个区的所有磨牙,使咬合力能均匀地分散于各个牙齿,且组织学研究发现,拔牙后牙周膜组织表现为间隙的增宽及纤维、细胞排列紊乱所致的结构疏松,同时破骨细胞的增多使得牙槽骨骨壁凹凸不平,并出现了活跃的骨吸收陷窝,说明牙周膜改建的同时牙槽骨也在进行适应性

变化;而随着实验周期的延长,疏松、排列无序的纤维、细胞逐渐变得紧密、规则有序,提示牙周膜成纤维细胞吞噬降解能力增强;同时破骨细胞的减少也使牙槽骨的改建趋于完成。因此本实验所建立的动物模型能较好地反映牙周膜组织在咬合力改变下发生的组织和结构的变化。

细胞凋亡是细胞的正常死亡过程,和细胞的生长、分化、增殖一样,在保持细胞再生和细胞死亡之间的平衡,维持机体内环境稳定等方面发挥着重要作用<sup>[10,11]</sup>。既往研究发现,细胞凋亡与组织的重建有密切关系,尤其与力的参与密切相关,因此认为力学因素的影响可促进组织的改建<sup>[12]</sup>。Hatai 等<sup>[13]</sup>利用 TUNEL 法在大鼠牙齿移动的实验中发现,牙周膜中凋亡细胞于施力后 12 h 明显增多,并于 24 h 达高峰后开始下降,48 h 后凋亡细胞已基本消失。而本实验发现在咬合力改变后,牙周膜中细胞凋亡的表达于拔牙后 12 h 达峰值并明显高于正常组织中的表达( $P < 0.01$ ),说明细胞凋亡在牙周膜改建的早期发挥主要作用;而 3 d 后开始下降,至 28 d 时仍能检测到凋亡细胞,这可能与力的作用强度和(或)力的作用方式不同有关。这些结果提示由于咬合力的改变加速了细胞凋亡,从而促进了牙周膜的重建。

PCNA 是细胞增殖的特异性标志之一,它在肿瘤细胞研究中的生物学意义已被广大学者所认可。而在牙周膜细胞的研究领域,尽管国外学者对其进行了部分研究,但由于所采用的模型、力的施加方式等均存在差异,使实验结果不尽相同。Mabuchi 等<sup>[14]</sup>将橡皮块置入大鼠上颌磨牙之间而产生类似于正畸力的作用,观察发现该力能明显促进 PDLF 的增殖,且 PCNA 的作用呈现时间依赖性,尤以作用后 3 d 最为明显。而 Kawarizadeh 等<sup>[7]</sup>对大鼠的牙齿施加 0.1 N 的力持续作用 8 h 后,发现在实验周期内 PCNA 的表达并没有明显变化。本研究发现,PDLF 的增殖出现于咬合力改变后 12 h,且在 3 d 达最大值,此后逐渐降低至正常,这与 Mabuchi 等<sup>[14]</sup>的研究结果一致,表明咬合力的改变对 PDLF 的增殖活性起到了正性调节的作用,从而促进了牙周膜的改建。

如同组织的发生是一个多因素参与的过程一样,组织的改建也是多因素相互作用的结果。正常的组织在行使功能时始终伴随着细胞的新老更替,也就必然存在着凋亡和增殖的平衡<sup>[15]</sup>。本研究结果表明,在咬合力改变初期,牙周膜的改建呈现以凋亡为主的变化,而后随着 PDLF 增殖活性的增强,又

表现为以增殖为主的变化,进而达到凋亡与增殖相对平衡的状态,直至牙周膜改建的完成。因此,可以认为在牙周膜的改建中细胞凋亡与细胞增殖可能共同发挥作用,但具体的调节改建机制还有待进一步探讨。

[参考文献]

[1] Noble BS, Stevens H, Loveridge N, et al. Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone[J]. *Bone*, 1997, 20: 273-282.

[2] Haracska L, Torres-Ramos CA, Johnson RE, et al. Opposing effects of ubiquitin conjugation and SUMO modification of PCNA on replicational bypass of DNA lesions in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 4267-4274.

[3] Harrel SK, Nunn ME. The effect of occlusal discrepancies on periodontitis. II. Relationship of occlusal treatment to the progression of periodontal disease[J]. *J Periodontol*, 2001, 72: 495-505.

[4] Miyata T, Kobayashi Y, Araki H, et al. The influence of controlled occlusal overload on peri-implant tissue. Part 3: A histologic study in monkeys[J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2000, 15: 425-431.

[5] Lombardi DP, Geradts J, Foley JF, et al. Loss of KAI1 expression in the progression of colorectal cancer[J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 5724-5731.

[6] Pavlin D, Gluhak-Heinrich J. Effect of mechanical loading on periodontal cells[J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2001, 12: 414-

424.

[7] Kavarizadeh A, Bourauel C, Götz W, et al. Early responses of periodontal ligament cells to mechanical stimulus *in vivo* [J]. *J Dent Res*, 2005, 84: 902-906.

[8] Steigman S, Michaeli Y, Yitzhaki M, et al. A three-dimensional evaluation of the effects of functional occlusal forces on the morphology of dental and periodontal tissues of the rat incisor [J]. *J Dent Res*, 1989, 68: 1269-1274.

[9] Kaneko S, Ohashi K, Soma K, et al. Occlusal hypofunction causes changes of proteoglycan content in the rat periodontal ligament[J]. *J Periodontal Res*, 2001, 36: 9-17.

[10] Toescu EC. Apoptosis and cell death in neuronal cells: where does Ca<sup>2+</sup> fit in[J]? *Cell Calcium*, 1998, 24: 387-403.

[11] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points [J]. *Cell*, 2004, 116: 205-219.

[12] Li G, White G, Connolly C, et al. Cell proliferation and apoptosis during fracture healing[J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17: 791-799.

[13] Hatai T, Yokozeki M, Funato N, et al. Apoptosis of periodontal ligament cells induced by mechanical stress during tooth movement[J]. *Oral Dis*, 2001, 7: 287-290.

[14] Mabuchi R, Matsuzaka K, Shimono M. Cell proliferation and cell death in periodontal ligaments during orthodontic tooth movement[J]. *J Periodont Res*, 2002, 37: 118-124.

[15] Raff M. Cell suicide for beginners[J]. *Nature*, 1998, 396: 119-122.

[收稿日期] 2005-12-16 [修回日期] 2006-02-20  
[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群

**A meta-analysis of case-control studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma in China**

Shi J, Zhu L, Liu S, Xie WF (Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] We investigated whether concurrent infection by hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) in China, a hyperepidemic area for these infections, was associated with a higher risk of causing hepatocellular carcinoma (HCC) than each infection alone in a meta-analysis in China, 32 case-control studies involving 3 201 cases and 4 005 controls, identified from a computer-based literature search from 1966 to 2004. The pooled odds ratio and 95% confidence interval (CI) for HBsAg positivity was 14.1 (95% CI: 10.6-18.8); for anti-HCV/HCV RNA positivity was 4.6 (95% CI: 3.6-5.9); for HBsAg positivity and anti-HCV/HCV RNA negativity were 15.6 (95% CI: 11.5-21.3); for HBsAg negativity and anti-HCV/HCV RNA positivity were 8.1 (95% CI: 5.0-13.0); and positivity for both HBsAg and anti-HCV/HCV RNA was 35.7 (95% CI: 26.2-48.5). We conclude that HBV and HCV infections are important independent risk factors for HCC in China, and that dual infection by HBV and HCV is associated with a higher risk of causing HCC than each infection alone, suggesting a synergism between HBV and HCV.

[Br J Cancer, 2005, 92: 607-612]