

# 牙周炎大鼠 MMP-2、BGP 及炎症细胞因子的表达特点及低氧对于相关因子的影响

张丹丹 许晓虎

**摘要** **目的** 探讨牙周炎大鼠牙周组织中基质金属蛋白酶(MMP-2)、骨钙素(BGP)、炎症细胞因子的表达及低氧对牙周炎及相关因子表达的影响。**方法** 选取健康雄性 SD 大鼠 48 只,采用数字表法随机分为正常组(正常大鼠,常规氧压下喂养)、牙周炎组(建立牙周炎动物模型)、低氧组(低氧压条件下喂养)、联合组(建立牙周炎动物模型+低氧压)各 12 只,各组大鼠均在相应条件下喂养 8 周,对比两组的牙龈指数(GI)、牙周附着丧失(AL)、采用 Western blot 法检测牙周组织中 MMP-2、BGP 蛋白表达,采用免疫组化染色法检测白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-18(IL-18)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )蛋白表达。**结果** 牙周炎组、低氧组及联合组的牙周组织 GI、AL、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平显著的高于正常组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );联合组的 GI、AL、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平显著的高于牙周炎组、低氧组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );牙周炎组、低氧组及联合组的牙周组织 MMP-2 蛋白水平显著的高于正常组( $P < 0.05$ ),牙周炎组、低氧组及联合组的牙周组织 BGP 蛋白表达水平低于正常组( $P < 0.05$ );联合组的 MMP-2 蛋白显著的高于牙周炎组、低氧组( $P < 0.05$ ),联合组的牙周组织中 BGP 蛋白水平显著的低于牙周炎组、低氧组( $P < 0.05$ )。**结论** 牙周炎大鼠牙周组织中 MMP-2、炎症因子表达增加,BGP 表达显著的降低,低氧条件将促进 MMP-2、炎症因子表达增加,BGP 表达显著的降低从而加重牙周炎病情。

**关键词** 低氧 牙周炎 基质金属蛋白酶 骨钙素 炎症细胞因子

**中图分类号** R781.4+2

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.06.041

**Effect of Hypoxia on Periodontitis and the Effect of MMP-2, BGP and Inflammatory Cytokines.** Zhang Dandan, Xu Xiaohu. Department of Dental, Shenzhen Longhua District Central Hospital, Guangdong 518000, China

**Abstract Objective** To investigate the effects of hypoxia and periodontitis on matrix metalloproteinases (MMP-2), osteocalcin (BGP) and inflammatory cytokines in periodontal tissues of rats. **Methods** We selected 48 healthy male SD rats. They were randomly divided into normal group (normal rats, normal oxygen periodontitis group (FED), to establish the animal model of periodontitis), hypoxia group (low pressure conditions, the combined group (FED) to establish the animal model of periodontitis + oxygen pressure) with 12 rats in each group. The rats were fed for 8 weeks in the corresponding conditions gingival index (GI), periodontal attachment loss (AL), the expression of MMP-2 and BGP protein in periodontal tissue in the two groups was detected by Western blot assay. Immunohistochemical staining was used to detect interleukin-6 (IL-6), interleukin-18 (IL-18), tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), interleukin-1 beta (IL-1 beta) protein expression. **Results** The levels of GI, AL, IL-6, IL-18, TNF-alpha and IL-1 $\beta$  in periodontal tissues were significantly higher than those in normal group ( $P < 0.05$ ). The levels of GI, AL, IL-6, IL-18, TNF-alpha and IL-1 $\beta$  in the combined group were significantly higher than those in the periodontitis group and hypoxia group ( $P < 0.05$ ). The levels of MMP-2 protein in periodontal tissues of periodontitis group, hypoxia group and combined group were significantly higher than those in normal group ( $P < 0.05$ ). The expression of BGP protein in periodontal tissue of periodontitis group, hypoxia group and combined group ( $P < 0.05$ ). The levels of MMP-2 in the combined group were significantly higher than those in the periodontitis group and hypoxia group ( $P < 0.05$ ), and the level of BGP protein in the periodontal tissue of the combined group was significantly lower than that of the normal group Periodontitis group and hypoxia group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of MMP-2 and inflammatory factor was increased in periodontal tissues of rats with periodontitis, and the expression of BGP was significantly decreased. The hypoxic condition could promote the aggravation of periodontitis.

**Key words** Hypoxia; Periodontitis; Matrix metalloproteinases; Osteocalcin; Inflammatory cytokines

牙周炎是一种感染性疾病,主要感染源是龈沟内龈下结合分泌物黏稠,不易被唾液稀释,而与外界细菌和食物残渣相融合后形成的龈下牙菌斑<sup>[1]</sup>。位于龈下的牙菌斑不易被刷牙和漱口等操作去除而在龈下进行堆积,作用于牙周组织,引起口腔中的免疫应答反应。牙周炎首先引起病变的部位是牙龈<sup>[2]</sup>。牙龈炎仅存在于牙龈上皮和附着龈结缔组织中,随牙菌斑进一步进入而扩散到牙周组织中,引起牙周膜纤维胶原组织发生变性溶解断裂,并进一步波及牙槽骨,造成附着丧失、真性牙周袋形成<sup>[3]</sup>。

当牙周组织健康时,致病菌较少,仅存在少量的需氧菌或革兰阳性菌。而在发生牙周炎时,微需氧菌和革兰阴性厌氧菌比例增高至78%,并使血清中炎症因子含量增多。说明在低氧条件能增加牙周炎病变的发生率<sup>[4]</sup>。本研究探讨低氧、牙周炎对大鼠牙周组织中基质金属蛋白酶(MMP-2)、骨钙素(BGP)、炎症细胞因子的影响。现报道如下。

### 对象与方法

1. 实验动物:选取5周龄SD大鼠,体质量180~220g,平均 $200.0 \pm 10.0$ g。购买自北京大学医学部动物实验研究中心,喂养在23~25℃、相对湿度45%~60%、光照12h的环境中。

2. 主要实验药品、实验仪器:Trizol试剂、免疫荧光制剂、无酶的RNA、龙胆紫溶液、聚丙烯酰胺、15%的过硫酸铵钠和TEMED、牙周探针。

3. 实验分组及造模:选取健康雄性SD大鼠48只,采用数字表法随机分为正常组(正常大鼠,常规氧压下喂养)、牙周炎组(建立牙周炎动物模型)、低氧组(低氧压条件下喂养)、联合组(建立牙周炎动物模型+低氧压)各12只,各组大鼠均在相应条件下喂养8周。

4. 免疫组化染色:将4组小鼠分别处死后,进行病理钳取组织标本进行实验,采用组织免疫荧光法检测标本中白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-18(IL-18)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )蛋白表达情况。将钳取的活组织放入Trizol试剂进行细胞分离,5000r/min离心35min进行离心后,应用免疫荧光制剂对分离后的细胞沉浸40min后,应用无酶的RNA冲洗液冲洗10min,放入龙胆紫溶液进行染色观察细胞显性程度。

5. Western blot法检测:将4组小鼠分别处死后,进行病理钳取组织标本进行Western blot法实验,将组织5000r/min离心35min进行离心后得到分散的

组织细胞,将配制好的聚丙烯酰胺分离胶液体并脱气,然后放入15%的过硫酸铵钠和TEMED,轻轻搅拌均匀。按所需分离的蛋白质分子大小选择合适的丙烯酰胺百分比浓度,将以上两种材料进行充分混合后将分离好的组织细胞与混合液一起水浴40min后进行充分清洗,观察MMP-2、BGP蛋白表达情况。

6. 牙周GI、AL检测方法:牙周指数(GI)测定方法:用探针按照顺时针的方向,由远→颊→近→近→颊→远,每个牙检查4个面,分别记分,即颊(唇)侧乳头、颊(唇)远中乳头、颊(唇)侧龈缘、整个舌面龈缘。附着丧失(AL)测定方法:应用牙周探针探测龈沟,当探针超过组织学深度达到结合上皮后,正常数值为2~3mm,当患有牙周炎时,探针深度超过3mm时,用测量数据减去2~3mm即为附着丧失水平。

7. 统计学方法:采用SPSS 16.0统计学软件进行统计分析,采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )进行统计描述,3组间比较采用单因素方差分析法,组间两两比较采用LSD-t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 各组大鼠的GI、AL水平比较:牙周炎组、低氧组及联合组的牙周组织GI、AL水平显著的高于正常组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );联合组的GI、AL水平显著的高于牙周炎组、低氧组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,表1)。

表1 各组大鼠的GI、AL水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	GI	AL(mm)
正常组	12	0.13 ± 0.05	0.51 ± 0.16
牙周炎组	12	0.35 ± 0.11*#	0.82 ± 0.18*#
低氧组	12	0.22 ± 0.09*#	0.68 ± 0.15*#
联合组	12	0.44 ± 0.14*	1.08 ± 0.19*

与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与联合组比较,# $P < 0.05$

2. 各组大鼠的MMP-2、BGP表达水平比较:牙周炎组、低氧组及联合组的牙周组织MMP-2蛋白水平显著的高于正常组( $P < 0.05$ ),牙周炎组、低氧组及联合组的牙周组织BGP蛋白表达水平低于正常组( $P < 0.05$ );联合组的MMP-2蛋白显著的高于牙周炎组、低氧组( $P < 0.05$ ),联合组的牙周组织中BGP蛋白水平显著的低于牙周炎组、低氧组( $P < 0.05$ ,表2)。

3. 各组大鼠牙周组织中炎症因子表达水平比较:牙周炎组、低氧组及联合组的牙周组织IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平显著的高于正常组( $P <$

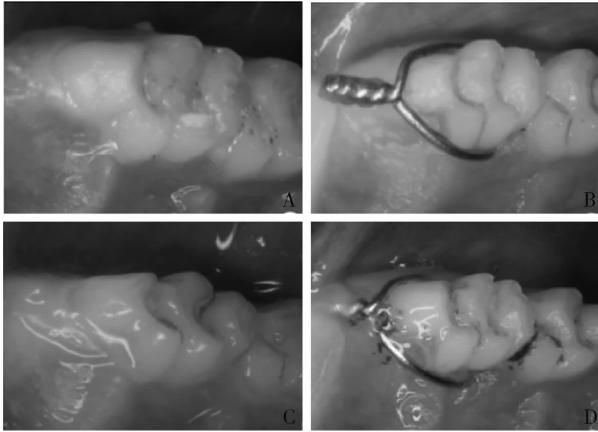


图1 各组大鼠牙周组织变化观察

A. 正常组; B. 牙周炎组; C. 低氧组; D. 联合组; 可见联合组大鼠的牙龈指数、牙周附着丧失程度较其他组显著增加

表2 各组大鼠的 MMP-2、BGP 表达水平比较

( $\bar{x} \pm s$ , 相对表达水平)

组别	n	MMP2	BGP
正常组	12	0.532 ± 0.156	0.416 ± 0.094
牙周炎组	12	0.815 ± 0.224*#	0.211 ± 0.075*#
低氧组	12	0.761 ± 0.180*#	0.304 ± 0.061*#
联合组	12	1.448 ± 0.262*	0.133 ± 0.052*

与正常组比较, \*P < 0.05; 与联合组比较, #P < 0.05

0.05); 联合组的牙周组织 IL-6、IL-18、TNF-α、IL-1β 水平显著的高于牙周炎组、低氧组 (P < 0.05, 表3)。

讨 论

由健康的牙周组织经致病菌侵袭后发展至牙周炎是一个缓慢的过程, 共分为4个阶段, 分别是初期

表3 各组大鼠牙周组织中炎症因子表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s, A$ )

组别	n	IL-6	IL-18	TNF-α	IL-1β
正常组	12	0.173 ± 0.026	0.211 ± 0.051	0.152 ± 0.048	0.093 ± 0.062
牙周炎组	12	0.293 ± 0.037*#	0.317 ± 0.075*#	0.311 ± 0.057*#	0.227 ± 0.093*#
低氧组	12	0.238 ± 0.042*#	0.260 ± 0.084*#	0.204 ± 0.051*#	0.154 ± 0.084*#
联合组	12	0.362 ± 0.081*	0.428 ± 0.095*	0.528 ± 0.090*	0.362 ± 0.101*

与正常组比较, \*P < 0.05; 与联合组比较, #P < 0.05

病理损伤期, 早期疾病缺损期, 疾病确立期病损和晚期病损期<sup>[5,6]</sup>。造成牙周病的始动因子是革兰阴性厌氧菌, 主要有牙龈卟啉单胞菌、伴放线放线杆菌和福赛坦菌等或某些微需氧性细菌<sup>[7]</sup>。在低氧条件下, 可加速发生牙周疾病损害, 在细菌沉积为牙菌斑时仅发生牙龈炎症时, 此时若机体抵抗力较足可不继续发展且牙周病, 此时为初期病理损伤期, 在低氧状态下, 可诱使更多的厌氧菌和微需氧菌聚集, 继而可有大量的淋巴细胞和中性粒细胞浸润牙周组织, 而发生牙周炎的早期疾病缺损, 而在低氧状态持续的情况下可进入疾病确立期, 此时牙龈呈现暗红色, 出现附着丧失等病理改变, 而在不改变低氧的条件下, 可使附着丧失数值增加, 而表现为晚期病损期, 此时牙周组织呈现不可逆的炎性反应, 牙周组织遭到破坏, 纤维溶解变性, 形成牙周炎。

发生牙周炎时牙周组织色形质均发生变化, 此时需要采用牙龈指数 (gingival index, GI) 对病变的牙周组织进行检测, 以明确牙周炎进展程度, 此指数在随牙周炎的进展而逐渐增大<sup>[8,9]</sup>。本研究制造低氧环境下牙周炎大鼠病变进展情况, 在低氧环境下可加速牙周炎的发生, 本研究中表1显示低氧合并牙周炎组大鼠其 GI 指数较其他实验组为高, 说明低氧状态下

存在较多的厌氧菌或微需氧菌有利于牙周炎的快速进展, 进而使牙周正常组织遭到破坏, 使牙周更早的出现颜色暗红、水肿、出血等症状。牙周炎较正常组织另一个重要改变是附着丧失的形成, 附着丧失指牙周正常结合上皮本应附着于釉质牙骨质界处, 而在牙周发生炎症时, 即使是处于初期病理损伤期的牙周组织, 其结合上皮也会向牙根方向增生, 而牙冠与牙面分离, 使附着水平降低, 造成附着丧失 (attachment loss, AL) 形成牙周袋, 牙周袋的形成是诊断牙周炎的直观诊断依据<sup>[10-13]</sup>。因此, 附着丧失的检测数值越大, 牙周炎的程度越严重<sup>[14-16]</sup>。本研究中表1显示, 低氧合并牙周炎模型组大鼠进行 AL 检查时发现其附着丧失的程度较其他实验组较深, 说明在低氧条件下有利于牙周致病菌的繁殖, 而加速牙周炎的进展, 进一步加提高着丧失程度, 使牙周袋增宽。

牙周炎时, 在炎性浸润的牙龈和牙周组织的结合上皮牙根方向的胶原组织中, 含有较多的炎性刺激因子和渗出基质, 单核-吞噬细胞、中性粒细胞和成纤维细胞可在炎性介质的作用下释放较多的溶酶体水解酶, 而且厌氧菌或微需氧菌还可产生胶原蛋白酶以及透明质酸钠等, 可使已经造成附着丧失的牙周袋底周围的进胶原结缔组织中的胶原纤维和正常的牙基

质进行细胞间桥粒松解,这些被松解的组织和其他基质因子为小型肽链的酶被称为基质金属蛋白酶(MMP-2),可作为牙周炎发生时检测牙周组织破坏程度的分子标志物,广泛存在于发生严重牙周炎后的组织中<sup>[17-19]</sup>。由表2可知,低氧合并牙周炎模型组大鼠MMP-2表达率较高,说明低氧环境加速小鼠MMP-2的表达,而加速牙周炎进展中对牙周正常组织的破坏。骨钙素(BGP)是一种可促进正常牙周支持组织特别是牙槽骨的再生与维护的物质,在牙周炎时可发生牙槽骨的破坏,而使骨钙素含量下降,影响正常牙槽骨健康并能加速牙槽骨的吸收破坏<sup>[20,21]</sup>。由表2显示,联合组大鼠骨钙素含量下降,表明低氧环境能加速牙周炎的进展,加速对牙槽骨的侵蚀破坏性吸收。

IL-6、IL-18、IL-1 $\beta$ 均属于白细胞介素,因其主要分布在血清中和龈沟液中,因此当发生牙周炎时,通过检测其含量的多少以检测炎症发生的程度。TNF- $\alpha$ 在正常龈沟液中存在,但其表达效率并不高,在牙周炎时出现表达增多,诱导糖环氧化酶2、磷脂酶A<sub>2</sub>、NO合酶、干扰素 $\gamma$ 、黏附蛋白等效应蛋白的表达,是一种血管抑制因子,促进牙周炎的进展。本研究中表3显示联合组大鼠IL-6、IL-18、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 较之于其他3组含量最高,说明低氧条件下能加速血清炎性因子含量增加,进而促进牙周炎的发展。

本研究的创新点在于应用低氧环境合并已有牙周炎大鼠模型对牙周炎进展进行研究后,能明确低氧环境利于厌氧菌生长而加速牙周炎各项临床症状的发生,加速牙周病变进程。综上所述,牙周炎大鼠牙周组织中MMP-2、炎性因子表达增加,BGP表达显著的降低,低氧条件将促进MMP-2、炎性因子表达增加,BGP表达显著的降低从而加重牙周炎病情。

参考文献

- 1 徐倩,杨佳佳,刘志华,等.低氧和牙周炎对牙周组织中HIF-1 $\alpha$ 和MMP2表达的影响[J].第三军医大学学报,2017,39(7):616-621
- 2 王月昊,王小琴,苗伟,等.间歇性低氧对牙周炎大鼠牙周组织中NF- $\kappa$ B、IL-6及PGE<sub>2</sub>含量的影响[J].实用口腔医学杂志,2016,32(1):28-31
- 3 王斌,王小琴.慢性间歇低氧对大鼠牙周炎模型血清及牙龈组织中白细胞介素-18和低氧诱导因子-1 $\alpha$ 的影响[J].华西口腔医学杂志,2015,33(4):383-387
- 4 王璐,顾思成,郭剑芬,等.高压氧疗法对大鼠心理应激相关牙周炎治疗作用及低氧诱导因子1 $\alpha$ 表达的研究[J].中国病理生理杂志,2016,32(2):339-346
- 5 Still K, Robson CP, Robinson M, et al. Localization and quantifica-

- tion of mRNA for matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2) in human benign and malignant prostatic tissue[J]. Prostate, 2015, 42(1):18-25
- 6 Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology[J]. Exp Lung Res, 2015, 31(6):599-621
- 7 Dedachi K, Khan M TH, Sylte I, et al. Expression patterns of stromal MMP-2 and tumoural MMP-2 and -9 are significant prognostic factors in invasive ductal carcinoma of the breast[J]. Apmis, 2015, 122(12):1196-1206
- 8 Zhang J, Zhu X, Li H, et al. Piperine inhibits proliferation of human osteosarcoma cells via G2/M phase arrest and metastasis by suppressing MMP-2/-9 expression[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 24(1):50-8
- 9 Kennedy TL, Swiderski K, Murphy KT, et al. BGP-15 improves aspects of the dystrophic pathology in mdx, and dko, mice with differing efficacies in heart and skeletal muscle[J]. Am J Pathol, 2016, 186(12):3246
- 10 Fusaro M, Aghi A, Iervasi G, et al. MP670 Cigarette smoking is associated with decreased bgp levels in hemodialysis patients[J]. Nephrol Dialys Transplant, 2017, 32(suppl 3):678-678
- 11 Schlamp J, Holz R, Jacquemart Q, et al. HEAP: reliable assessment of BGP hijacking attacks[J]. IEEE J Select Areas Commun, 2016, 34(6):1849-1861
- 12 Leal RF, Planell N, Kajekar R, et al. Identification of inflammatory mediators in patients with Crohn's disease unresponsive to anti-TNF $\beta$  therapy[J]. Gut, 2015, 64(2):233-242
- 13 Barrow AD, Palarasah Y, Bugatti M, et al. OSCAR is a receptor for Surfactant Protein D that activates TNF- $\beta$  release from human CCR2<sup>+</sup> inflammatory monocytes[J]. J Immunol, 2015, 194(7):3317
- 14 Slaats J, Ten Oever J, van de Veerdonk FL, et al. IL-1 $\beta$ /IL-6/CRP and IL-18/ferritin: distinct inflammatory programs in infections[J]. Plos Pathogens, 2016, 12(12):e1005973
- 15 Fan N, Luo Y, Xu K, et al. Relationship of serum levels of TNF- $\beta$ , IL-6 and IL-18 and schizophrenia-like symptoms in chronic ketamine abusers[J]. Schizophren Res, 2015, 169(1-3):10-15
- 16 张增方,吕芳丽,陈莹,等.心理应激对大鼠实验性牙周炎及牙周组织中低氧诱导因子1 $\alpha$ 表达的影响[J].中国病理生理杂志,2011,27(2):315-319
- 17 李松,宋忠臣,束蓉.低氧及低氧诱导因子-1与牙周炎[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2013,23(11):729-733
- 18 陈冬茹,吴莉萍.低氧诱导因子-1 $\alpha$ 和反义低氧诱导因子-1 $\alpha$ 的研究进展[J].国际口腔医学杂志,2016,43(5):589-593
- 19 闫瑞欣,陈丹,闫奇,等.缺氧环境对牙周膜成纤维细胞增殖及凋亡的影响[J].北京口腔医学杂志,2016,24(3):146-149
- 20 庞静雯,吴亚霖,徐婷,等.低氧激活HIF-1 $\alpha$ 对人牙周膜成纤维细胞增殖与凋亡的影响[J].中华老年口腔医学杂志,2017,15(3):170-174
- 21 葛超,杨冬茹,武明轩,等.槲皮素对实验性牙周炎大鼠牙周组织的保护作用[J].实用口腔医学杂志,2015,15(5):619-622

(收稿日期:2017-08-14)

(修回日期:2017-09-24)