

骨膜蛋白在人正畸牙移动中对牙周膜改建的作用机制

咎琳, 李 硕, 汪 颀, 李 卓[△]

(中国人民解放军第四五二医院口腔科, 成都 610021)

摘要:目的 研究分析人正畸牙移动中骨膜蛋白(PN)对牙周膜改建的作用机制。方法 选取 2013 年 1 月至 2015 年 12 月在该院进行正畸治疗的患者 32 例, 均在前磨牙拔除前行正畸治疗, 其中对照组(19 例)不给予正畸加力治疗, 试验组(13 例)给予 Ni-Ti 丝行 3~4 个月正畸治疗, 采用实时定量反转录-聚合酶链反应测定两组患者牙周膜中转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、黏着斑激酶(FAK)与 PN 表达水平。结果 试验组患者牙周膜中 TGF- $\beta 1$ 、FAK 及 PN mRNA 表达水平较对照组明显增高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 在牙周膜改建过程中, PN 通过 TGF- $\beta 1$ -PN-FAK 信号通路参与改建, 并发挥重要调控作用。

关键词: 正畸牙移动; 牙周膜改建; 骨膜蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.24.021 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)24-3624-03

The mechanism of periostin in periodontal ligament remodeling in orthodontic tooth movement

ZAN Lin, LI Shuo, WANG Qi, LI Zhuo[△]

(Department of Stomatology, No. 452 Hospital of Chinese People's Liberation Army, Chengdu 610021, China)

Abstract: Objective To analysis the mechanism of Periostin(PN) in periodontal ligament remodeling in Orthodontic tooth movement. **Methods** 32 patients, whose premolars were extracted 2 weeks after beginning the orthodontic treatment in the hospital from January 2013 to December 2015 were selected. 13 of them as the experimental group, were treatment with Ni-Ti wires for 3-4 months, while the others as the control group were not loaded. RT-PCR was used to analysis the expression of TGF- $\beta 1$, FAK and PN in periodontal ligament in both groups. **Results** The expression levels of TGF- $\beta 1$, FAK and PN mRNA in experimental group were significantly higher than those in the control group($P < 0.05$). **Conclusion** PN played an important role in periodontal ligament remodeling through TGF- $\beta 1$ -PN-FAK signaling pathway.

Key words: orthodontic tooth movement; periodontal ligament remodeling; periosteal protein

正畸牙移动以牙与牙周组织改建为主要特征, 改建主要包括牙周膜、牙髓及牙龈等。经过长达一个世纪的发展, 现代口腔正畸学无论是在技术上还是治疗理念上都取得了较大成就, 并使高效能矫治体系越来越完善, 但也使人们开始关注机体对正畸力的生物学反应。大量临床报道指出, 正畸治疗中, 只有力的作用, 而不行牙周组织改建, 很难使牙齿维持在必要位置上或者使其移向预期设定位置^[1]。这提示正畸牙移动与牙周组织相应反应有直接关联, 而试验正畸牙移动就必须将牙槽骨或者牙周膜改建作为主要前提。骨膜蛋白(PN)是一种多功能细胞外基质蛋白, 在牙周韧带和骨膜中定位表达, 在含有大量胶原的组织中, PN 往往呈高表达, 对牙齿发育、牙周组织完整性等有重要作用, 其在正畸牙移动中, 可能是牙周膜改建的关键因素^[2]。越来越多的研究将 PN 视为牙周膜细胞特性的重要因子, 并认为其为牙周膜细胞标记基因之一, 但关于 PN 在牙周膜改建中的作用机制研究却甚少。鉴于此, 本研究拟通过收集正畸治疗患者作为研究对象, 探讨前磨牙牙周膜拔除前, PN 在牙周组织改建中的分子信号通路, 从而了解其在牙周组织改建中的作用, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究纳入本院 2013 年 1 月至 2015 年 12 月口腔科接诊的正畸治疗患者 32 例, 男 15 例, 女 17 例, 平均年龄(20.54 ± 2.51)岁, 所有患者均于治疗前确诊为需行减速拔牙治疗, 且明确了拔前磨牙的位置。参与本研究的患者均签署知情同意书。根据患者就诊先后顺序对 32 例患者进行分

组, 其中 19 例患者为对照组, 该组患者在行拔牙前均不给予正畸加力治疗; 另 13 例患者为试验组, 该组患者在行拔牙之前已采用 Ni-Ti 丝行 3~4 个月的正畸治疗, 更换不锈钢方丝之前将前磨牙拔出。

1.2 纳入标准 年龄 12~25 岁; 牙列完整, 均为恒牙列; 无过度磨耗、牙周组织疾病等; 口腔卫生情况健康; 参与本研究前 3 个月未服用任何免疫制剂和抗炎药物; 无全身系统疾病。

1.3 标本采集 在患者家长知情同意下, 因正畸而拔除牙周健康的前磨牙, 生理盐水洗去牙冠和根面的血污, 大圆刀刮取牙根部的牙周膜组织块, 用牙科探针将组织块移入 1.5 mL 的 EP 管中, 放入 -80 °C 低温冰箱中保存待用。

1.4 实时定量反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定 PN 信号通路调控因子 采用 RT-PCR 对两组患者牙周膜改建中 PN 相关信号通路调控因子进行测定。

1.4.1 RNA 提取与反转录 取试验细胞, 按照 Trizol 试剂法对细胞总 RNA 进行提取, 并将获取的总 RNA 做好标记, 放置于 -80 °C 环境下保存; 通过 1% 琼脂糖胶电泳对总 RNA 完整性进行检测, 并采用分光光度计对 RNA 纯度、水平进行测定, 做好标记。采用 MMLV 反转录酶行反转录, 将获取的总 RNA 均反转录为 cDNA^[3]。

1.4.2 制备标准曲线样品 对样品管家基因、目的基因行 PCR 扩增, 并采用梯度稀释法对产物进行标准曲线制作。引物序列为: (1) H-PN, upper: 5'-GAG ACA AAG TGG CTT CCG-3', lower: 5'-CTG TCA CCG TCA CAT CCT-3', 产物长

度为 128 bp; (2) H-TGF- β 1, upper: 5'-GCA ACA ATT CCT GGC GAT AC-3', lower: 5'-AAG GCG AAA GCC CTC AAT-3', 产物长度为 122 bp; (3) H-FAK, upper: 5'-CCA TCC CTA ACC ATT GCG-3', lower: 5'-CAA AGC CCG TTC ACC TTC-3', 产物长度为 116 bp。95 ℃ 下行 10 min 预变性, 10 s 变性, 60 ℃ 下行 20 s 退火, 72 ℃ 下行 34 s 延伸, 35 个循环。

1.4.3 计算 取待测样品与标准曲线样品分别行 RT-PCR, 并行扩增和检测。结合绘制的梯度稀释 DNA 标准曲线, 各管家基因与样品目的基因均由系统自动生成。

1.5 统计学处理 采用实时定量 PCR 试验分析基因表达相对变化的一种简便方法 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法获得基因表达; 以 3 复孔求平均值法获得各样本 CT 值平均值, 并在减去内参平均 CT 值后即可获得 ΔCT 。通过 2 个样本 ΔCT 值相减即可获得 $\Delta\Delta CT$ 。求取 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 即可获取相应基因表达差异倍数^[4]。采用 SPSS18.0 软件对本研究数据进行分析处理, 组间均数比较采用 t 检验; 多组间比较则采用单因素方差分析, 行方差分析之前行方差齐性检验。检验标准为 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组患者牙周膜中 TGF- β 1、FAK 与 PN mRNA 水平表达扩增和溶解曲线 见图 1、2。采用 RT-PCR 检测结果显示, 扩增曲线呈平滑的 S 型曲线, 表明 RT-PCR 程序运行正常, 使目的基因得到有效扩增。熔点曲线测试结果显示有 1 个峰值, 且无其他杂峰, 表明 TGF- β 1、FAK 与 PN mRNA 的扩增产物较为单一, 更利于结果的总结。

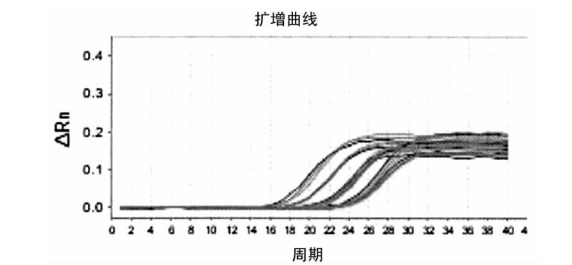


图 1 两组患者牙周膜中 TGF- β 1、FAK 与 PN mRNA 水平表达扩增曲线

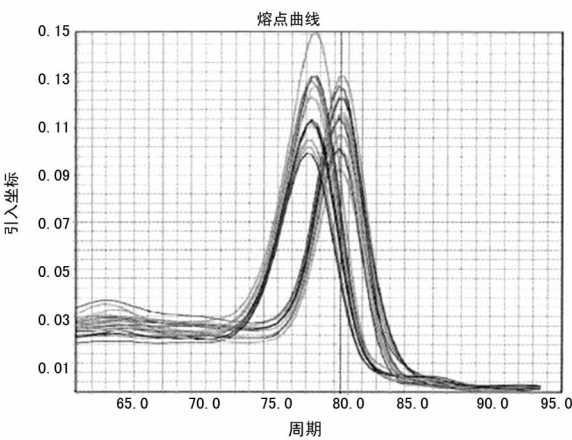


图 2 两组患者牙周膜中 TGF- β 1、FAK 与 PN mRNA 水平表达溶解曲线

2.2 两组患者牙周膜中 TGF- β 1、FAK 及 PN mRNA 表达水平比较 见表 1。由表 1 可见, 试验组患者牙周膜中 TGF- β 1、FAK 及 PN mRNA 表达水平与对照组比较均明显增高, 差异

有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 两组患者牙周膜中 PN、FAK 及 TGF- β 1 mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	PN mRNA	FAK mRNA	TGF- β 1 mRNA
对照组	19	1.10 $\pm$ 0.10	1.10 $\pm$ 0.10	1.10 $\pm$ 0.10
试验组	13	6.57 $\pm$ 0.61	10.44 $\pm$ 0.96	4.60 $\pm$ 0.84
t		15.461	16.937	7.332
P		<0.01	<0.01	<0.05

3 讨 论

正畸牙移动主要是借助机械外力来促使牙周组织实现改建, 在这个动态过程中, 机械外力会对牙槽骨和牙周膜产生刺激作用, 促使其出现一系列生物学反应, 从而实现牙周组织的改建。在正畸治疗中, 牙周膜是一种变异骨膜, 是非常重要的生理介质, 具有非常明显的骨吸收和骨沉积能力。在对牙齿移动时, 成纤维细胞会发生分解、合成胶原作用, 从而实现对新陈代谢的控制, 在牙周膜改建中发挥非常重要的作用, 并可刺激牙槽骨快速更新, 从而实现牙齿移动^[5]。在正畸牙周膜改建过程中, 机械外力作为一种细胞外信号, 其能够实现信号传导, 促使其出现一系列骨细胞生物活性变化, 从而实现牙周组织改建的调节。牙周组织改建作为近几年来正畸学研究的重点, 尤其是对关于机械刺激是通过何种方式实现信号转变来实现牙周组织改建机制的研究^[6]。

PN 是近几年来发现的多功能细胞外基质蛋白, 其在骨膜和牙周韧带中均有相应表达。PN 在含有大量胶原的组织中均呈高表达, 并且支持调节纤维形成、细胞黏附及胶原蛋白的交联, 在促使牙齿发育、牙周组织完整性等方面具有非常重要的作用, 被视为对牙周膜稳态调节有至关重要做功更多的蛋白, 并且在牙周组织改建中也发挥非常重要的作用^[7]。已有临床报道证实, 细胞存活、分化等信号调节中均有 PN 参与^[8]。细胞外基质是牙周膜内细胞外基质分子的目标, 其具有生物力和机械力, 是保障牙周组织完整性非常重要的蛋白, 更是牙齿移动中非常关键的因子。本研究为了解 PN 在人正畸牙移动中牙周膜改建的机制, 通过试验对 PN 相关信号通路进行检测, 了解加力正畸与不加力正畸治疗通路调控因子表达的变化, 结果显示, 试验组患者牙周膜中 PN mRNA 水平明显增高。

有研究者通过试验发现, 乳腺癌转移中, 浸润性肿瘤干细胞主要通过肺组织基底膜 PN 表达进行诱导, 并由聚集 Wnt 配体来刺激通路, 促使其出现肺转移^[9]。另有研究者通过对牙周成纤维细胞进行研究, 了解 FAK、TGF- β 1 对 PN 的调节作用, 结果发现, TGF- β 1 处理后 PN mRNA 水平明显增加, 而 FAK 则可促使其衰减^[10]。在人牙周膜中, PN 呈高表达, 与 FAK 所依赖的通路调节有关。本研究通过对 3 种通路信号进行检测, 结果发现, 加力试验组牙周膜中 TGF- β 1、FAK mRNA 水平与 PN mRNA 相同, 较未加力的对照组明显增高。该结果表明, PN、FAK 与 TGF- β 1 mRNA 表达呈一致性, 证实人在正畸牙移动过程中牙周膜的改建中有 TGF- β 1-PN-FAK 信号通路参与其中, 并发挥着重要的调控作用。

综上所述, 正畸牙移动是一个较复杂的生物学过程, 其通过机械外力的作用来引导牙周组织发生相应(下转第 3628 页)

应”,将导致患者全身多器官免疫受损,进而出现全身炎症反应综合征(SIRS),严重者可能发生多器官功能障碍综合征。本研究发现,观察组与对照组患者的 IL-6 及 TNF- α 水平在镇痛后均明显降低,且观察组降低程度明显高于对照组,观察组患者 IL-10 水平明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。由此提示,观察组患者所使用的麻醉方案对炎症因子的影响更大,更容易促进患者体内炎症消除。其原因可能是硬膜外腔注射局部麻醉药物能阻碍胸、腹部交感神经及躯体痛觉神经的传导,减小交感神经系统的张力,降低应激反应,抑制儿茶酚胺释放。表明硬膜外自控镇痛相对于静脉自控镇痛能有效缓解血液中的炎症因子,消除炎症免疫反应,避免由于炎性反应激导致的 SIRS^[9-10]。此外,在陈美等^[11]和徐辉等^[12]的报道中也得出类似结论。所谓多模式镇痛即应用两种或两种以上不同作用机制的镇痛药物或方法,作用于疼痛感受器或传导的不同层面,减少单药用量,可避免单药过量所致的不良反应。多模式镇痛通过干预多层面的痛觉感知或传导,实现不同作用机制药物或镇痛方法的累加或协同,包括能够经脑脊液或硬膜外静脉丛吸收入血并作用于脊髓及以上相应受体,弥散到脊髓背角罗氏胶质区、直接阻滞脊神经根镇痛;阿片类药物及 α_2 受体拮抗剂可直接作用于患者中枢神经系统而镇痛。需要指出的是,本研究也存在不足之处,例如研究样本量相对较小,缺乏多中心大样本量的广泛性研究。在今后的研究分析中可以充分借鉴,从而规避此类问题,最终获得更加精准的研究结论。

综上所述,硬膜外自控镇痛对老年髋关节置换术患者术后镇痛效果较好,能够有效缩短吞咽恢复时间、手术后清醒时间、拔管时间、出麻醉恢复室时间,调节 IL-6、IL-10 及 TNF- α 水平,值得临床推荐使用。

参考文献

[1] 刘喆,周勇,张军,等.硬膜外自控镇痛对胸部手术患者术后感染及炎症指标的影响研究[J].中华医院感染学杂志,2016,26(15):3458-3460.
[2] 朱本藩,赵家贵,王立奎,等.硬膜外自控镇痛治疗早期带

状疱疹后神经痛的疗效分析[J].中国疼痛医学杂志,2016,22(10):759-762.

[3] 袁野,杨春飞,李军,等.硬膜外自控镇痛治疗对前列腺电切术后凝血功能及血栓事件发生的影响[J].血栓与止血学,2016,22(3):300-302.
[4] 曹忠,范玲.硬膜外自控镇痛对妊娠期糖尿病剖宫产患者术后胃肠动力状态的影响[J].陕西医学杂志,2016,45(6):672-674.
[5] 王燕,刘晓华,李海英,等.全麻联合硬膜外麻醉及硬膜外自控镇痛降低老年患者术后认知功能障碍的发生率[J].中南大学学报(医学版),2016,41(8):846-851.
[6] 高福寅.舒芬太尼复合罗哌卡因用于下腹部手术后硬膜外自控镇痛[J].国际麻醉学与复苏杂志,2016,37(2):142-144.
[7] 吴耀华,胡亮,郝泉水,等.地佐辛与舒芬太尼用于术后病人硬膜外自控镇痛效果及安全性的比较:meta 分析[J].中华麻醉学杂志,2015,35(6):714-717.
[8] 王双梅.硬膜外阻滞分娩镇痛术的临床研究[J].医学理论与实践,2012,25(7):808-809.
[9] 王玥,刘洁,侯丽娜,等.患者静脉自控镇痛与患者硬膜外自控镇痛的比较[J].现代生物医学进展,2015,15(10):1979-1983.
[10] 鲁义,屠伟峰,卿朝晖,等.静脉与硬膜外自控镇痛对老年髋关节置换术患者术后镇静、舒适度及并发症影响的比较[J].临床麻醉学杂志,2015,31(2):109-112.
[11] 陈美,任红艳,吴丹,等.经皮穴位电子灸对硬膜外自控镇痛产妇产程及免疫功能指标的调节[J].河北医药,2015,37(15):2335-2336.
[12] 徐辉,史潇,李梅娜,等.术中静脉应用不同剂量右美托咪定对老年患者术后硬膜外吗啡镇痛的影响[J].中国老年学杂志,2014,34(3):678-680.

(收稿日期:2017-06-24 修回日期:2017-08-28)

(上接第 3625 页)

改建,从而促使正畸矫治效果。本研究经试验证实,在牙周膜改建过程中,PN 通过 TGF- β 1-PN-FAK 信号通路参与改建,并发挥重要的调控作用。

参考文献

[1] 赖玲芝,吴补领,徐会勇,等.周期性张应力对人牙周膜细胞 Periostin 表达的影响[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2015,24(2):79-83.
[2] 钱雅婧,钟良军,米丛波,等.正畸力作用下大鼠炎症牙周组织改建及白细胞介素 6 的表达[J/CD].中华口腔医学研究杂志(电子版),2010,3(5):447-455.
[3] Watanabe T, Yasue A, Fujihara S, et al. PERIOSTIN regulates MMP-2 expression via the α v β 3 integrin/ERK pathway in human periodontal ligament cells[J]. Arch Oral Biol, 2012, 57(1):52-59.
[4] 陈雅竹,管晓燕,肖茜文,等.中草药在正畸牙移动牙周组织改建中的作用[J].中国组织工程研究,2014,17(46):7477-7481.

[5] 吕琳琳,李纾.骨膜蛋白与牙周组织再生[J].国际口腔医学杂志,2014,40(2):224-227.
[6] 宋芳,邹慧儒.牙源干细胞在再生医学中的应用[J].国际口腔医学杂志,2013,39(2):224-228.
[7] 陈曦,林珠,张晓东.减阻牵张矫治法正畸牙快速移动牙周组织改建的研究[J].第四军医大学学报,2005,25(8):685-687.
[8] Padial-Molina MC. Tumor necrosis factor- α and porphyromonas gingivalis lipopolysaccharides decrease periostin in human periodontal ligament fibroblasts[J]. J Periodontol, 2013, 84(5):694-703.
[9] Padial-Molina M, Volk SL, Taut AD, et al. Periostin is down-regulated during periodontal inflammation [J]. J Dent Res, 2012, 91(11):1078-1084.
[10] Liu C, Xue H, Lu Y, et al. Stem cell gene Girdin: a potential early liver metastasis predictor of colorectal cancer [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(9):8717-8722.

(收稿日期:2017-06-20 修回日期:2017-08-22)