论著

文章编号:1000-5404(2012)04-0320-04

RANKL/OPG在高原低氧条件下兔牙周炎发病机制中的作用

祝金香[1],张 纲[1],武 曦[1],罗 丽[1],高钰琪[2],谭颖徽[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院口腔科[1];400038 重庆,第三军医大学高原军事医学系[2])

[摘要] **目的** 研究模拟高原低氧条件下兔牙周炎的病理改变以及与破骨细胞相关的核因子κB受体活化子配体(receptor activator of nuclear factor-κB ligand, RANKL)、骨保护素(osteoprotegerin,OPG)的相关性。**方法** 40只家兔完全随机分成4组:平原实验组、平原对照组、高原实验组、高原对照组,每组各10只。通过钢丝结扎切牙方法建立家兔牙周炎模型,动物于分组饲养8周后处死,制作牙周组织石蜡切片,HE染色观察牙周组织病理变化、破骨细胞的表达,荧光免疫组化检测牙周组织中RANKL、OPG的表达。免疫荧光组化采用激光扫描共聚焦显微镜对实验组与对照组RANKL、OPG进行半定量分析,并比较其差异。**结果** 高原实验组与平原实验组、高原对照组和平原对照组RANKL灰度值分别为(1.799±0.036)、(1.519±0.061)、(1.242±0.078)、(0.963±0.098),差异有统计学意义($P<0.05$),与高原对照组比较,高原实验组OPG表达降低无统计学意义。高原实验组RANKL与牙周指数呈正相关($P<0.01$)。**结论** 高原低氧条件下可能通过改变破骨细胞的RANKL/OPG调节途径促进牙周炎的发生、发展。

[关键词] 缺氧;牙周炎;骨保护素;核因子κB受体活化因子;兔
[中图法分类号] R781.42;R339.54;R363.21 [文献标志码] A

Role of RANKL/OPG in periodontitis rabbits exposed to hypoxia in high altitude

Zhu Jinxiang[1], Zhang Gang[1], Wu Xi[1], Luo Li[1], Gao Yuqi[2], Tan Yinghui[1] ([1]Department of Stomatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To observe the pathological changes of rabbit periodontitis model exposed to hypoxia in high altitude and investigate the roles of receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in the process. Methods Forty rabbits were randomly divided into following groups, plain experimental group, plain control group, plateau experimental group, and plateau control group ($n=10$). The periodontitis models were established by ligating the two central incisors of mandible and being raised by high-glucose diets. The animals of control and experimental groups were exposed to normoxia or hypoxia conditions respectively. All rabbits were sacrificed after 8 weeks. Pathological changes of periodontitis and morphology of osteoclasts were observed by HE staining, and the expression of RANKL and OPG in periodontitis tissue were tested by fluorescent light immunofluorescence assay. RANKL, OPG were semi-quantitatively analyzed by laser scanning and confocal microscopy. Results The RANKL gray values were 1.799±0.036, 1.519±0.061 respectively in the plateau group and plain group, significantly higher than in the plateau control group and plain control group (1.242±0.078 and 0.963±0.098, $P<0.05$). Compared to the plateau control group, OPG was lower in the plateau experimental group, but no significant difference was found between them ($P>0.05$). RANKL expression was positively correlated with periodontal indexes, including plaque index (PLI), bleeding index (BI), and attachment loss (AL) in the plateau experimental group ($P<0.01$). Conclusion Hypoxia environment improves the incidence and progress of periodontitis by changing the RANKL/OPG system in osteoclasts.

[**Key words**] anoxia; periodontitis; receptor activator of nuclear factor-kappa B; rabbits

Supported by the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Development of PLA (06MA184). Corresponding author: Tan Yinghui, Tel: 86-23-68755632; Gao Yuqi, Tel: 86-23-68752331

牙周炎是导致人牙槽骨丧失的常见疾病之一,正常情况下,破骨细胞和成骨细胞共同作用维持骨的改建平衡,在细胞因子的作用下,破骨细胞侵犯骨组织形

[基金项目] 全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MA184)
[通信作者] 谭颖徽,电话:(023)68755632
高钰琪,电话:(023)68752331

成骨吸收陷窝,随后成骨细胞分泌骨基质并矿化形成新骨,使骨吸收与骨形成平衡[1]。这一平衡是维持正常骨代谢的关键,它受全身因素和局部因素的调控,在病理条件下,破骨细胞和成骨细胞的作用失衡,骨吸收大于骨形成导致牙槽骨丧失,从而导致牙周疾病的发生。流行病学调查[2]表明,高原地区牙周炎发病率要远远高于平原地区,可能与高原低氧、低气压有关,但有关高原牙周炎的发病机理研究极少,因而我们建立高原低氧条件下家兔牙周炎模型,观察高原与平原条件下牙周组织中核因子κB受体活化子配体(receptor activator of nuclear factor-κB ligand, RANKL)、骨保护素(osteoprotegerin, OPG)的差异,探讨他们在高原低氧条件下家兔牙周组织破坏中的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

兔抗大鼠RANKL单克隆抗体、兔抗大鼠OPG单克隆抗体、FITC-羊抗兔IgG(博奥森公司,北京)。

1.2 实验动物及分组

40只健康、雌雄不限、体质量为2.1~2.5 kg家兔(新桥医院实验动物中心提供)完全随机分成4组:平原对照组、平原实验组、高原对照组、高原实验组,每组各10只。

1.3 动物模型的建立

将家兔速眠新(0.1~0.2 ml/kg)肌肉注射麻醉,待进入麻醉状态后,取其后仰卧位,四肢和头部固定于手术台上,探及家兔前牙龈沟为2.8~3.0 mm,直径0.25 mm的正畸结扎丝结扎双下颌前牙,使结扎丝尽量进入龈沟内且不损伤牙龈为宜,平原和高原实验组高糖饮食喂养,平原和高原对照组普通饮食喂养。平原实验组和平原对照组于新桥动物中心饲养。平原实验组、高原对照组(第三军医大学高原军事医学系低压氧舱模拟海拔5 000 m高原、23 h/d)分别于常氧、低氧条件下建立家兔牙周炎模型。

1.4 实验方法

1.4.1 标本的采集和处理 分组饲养后第8周用20 ml注射器抽取20 ml空气,采用空气栓塞法处死家兔。大剪刀解剖游离下颌骨,截取保留病变牙所在的前颌骨区段,置于4 ℃生理盐水中漂洗,除去血液,转至10%福尔马林液中4 ℃固定24 h。

1.4.2 牙周组织光镜观察 10%福尔马林液中4 ℃固定24 h,用口腔科快速手机沿牙齿方向制备5 mm厚组织块,乙二胺四乙酸(EDTA)液(pH=7.4)脱钙2周,常规石蜡包埋,制成4 μm切片,HE染色,光镜下观察,采集图像。

1.4.3 荧光免疫组织化学染色 常规制作标本石蜡包埋切片,兔抗大鼠RANKL单克隆抗体和兔抗大鼠OPG单克隆抗体按1∶100稀释,标本置湿盒里,37 ℃恒温孵育箱内孵育1 h,FITC-羊抗兔IgG按1∶50稀释,在37 ℃恒温孵育箱内孵育30 min,甘油封片。激光扫描共聚焦显微镜采集图像,其中RANKL、OPG采集10个图像进行灰度分析。

1.5 统计学分析

实验数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件行双因素方差分析。

2 结果

2.1 实验动物一般情况

建模8周后,平原对照组牙周组织肉眼观察无明显变化,多数仅在龈缘区有少量菌斑,用探针可刮出,平原实验组牙周组织有中度炎症,牙龈红肿光亮,可探及牙周袋,探诊出血比率(BOP)(+),多数在龈缘或牙面可见中等菌斑,高原对照组牙周组织有轻度炎症,牙龈轻度红肿,探诊不出血,多数龈缘或牙面有少数菌斑,高原实验组牙周组织有严重炎症,牙龈明显红肿退缩,可探及较深牙周袋,BOP(+),有自发出血倾向,在龈缘和牙面可见大量食糜。

2.2 牙周检查

实验组家兔牙龈形状、质地、牙周探诊、牙龈充血都比对照组严重。高原实验组与平原实验组的附着丧失程度(attachment lost, AL)比较,差异有统计学差异($P<0.05$),探诊出血指数(bleeding index, BI)、菌斑指数(plaque index, PLI)临床指标均明显高于其余各组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 各组家兔牙周检查情况 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	菌斑指数(PLI)	龈沟出血指数(BI)	附着丧失程度(AL)
高原实验组	2.500±0.535[a]	3.500±0.756[a]	4.433±0.170[a]
高原对照组	1.100±0.738[b]	1.200±0.919[b]	3.761±0.488[b]
平原实验组	2.200±0.632	2.500±0.972	4.070±0.126
平原对照组	1.000±0.667	1.000±0.667	3.370±0.104

a: $P<0.05$,与平原实验组比较;b: $P<0.05$,与平原对照组比较

2.3 HE染色观察

可见牙周膜纤维排列紊乱,破骨细胞形成,高原实验组明显(图1A、B)。高原、平原对照组牙周膜纤维排列整齐,未见破骨细胞(图1C、D)。

2.4 荧光免疫组化染色观察

荧光免疫组化染色结果见图2、3。高原实验组RANKL表达高于平原实验组,且高原对照组RANKL高于平原对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);高原各组与平原各组相比,OPG表达降低,但差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。

表2 各组家兔RANKL、OPG的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	RANKL	OPG
平原对照组	10	0.963±0.098	1.093±0.058
平原实验组	10	1.519±0.061	1.113±0.065
高原对照组	10	1.242±0.078[b]	1.007±0.102
高原实验组	10	1.799±0.036[a]	0.927±0.109

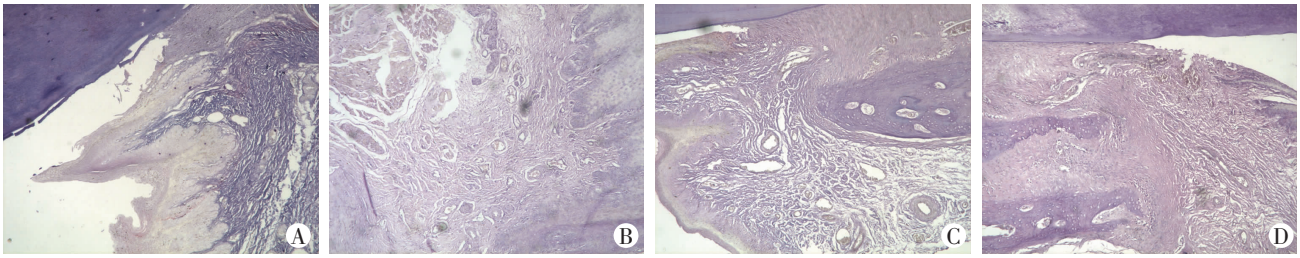
a: $P<0.05$,与平原实验组比较;b: $P<0.05$,与平原对照组比较

2.5 高原实验组中RANKL、OPG与牙周指数(PLI、BI、AL)的相关性

RANKL与PLI、BI、AL有一定的相关性,呈正相关($P<0.01$);而OPG与PLI、AL呈负相关($P<0.01$),与BI无关($P>0.05$)。见表3。

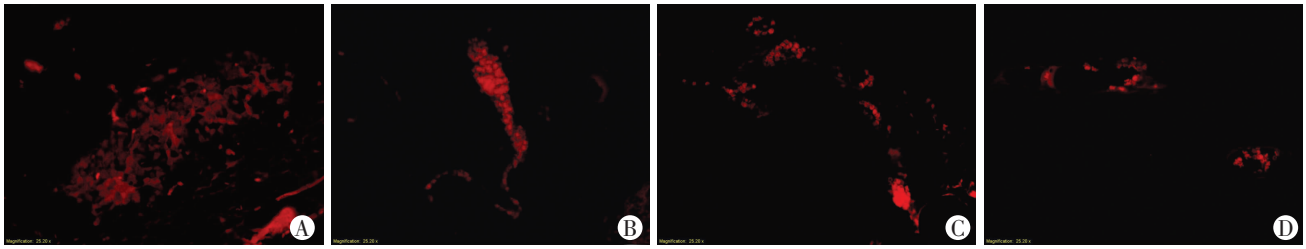
表3 高原实验组中RANKL、OPG与PD、BI、AL相关系数

指标	RANKL	OPG
PLI	0.439	−0.404
BI	0.528	0.122
AL	0.597	−0.439



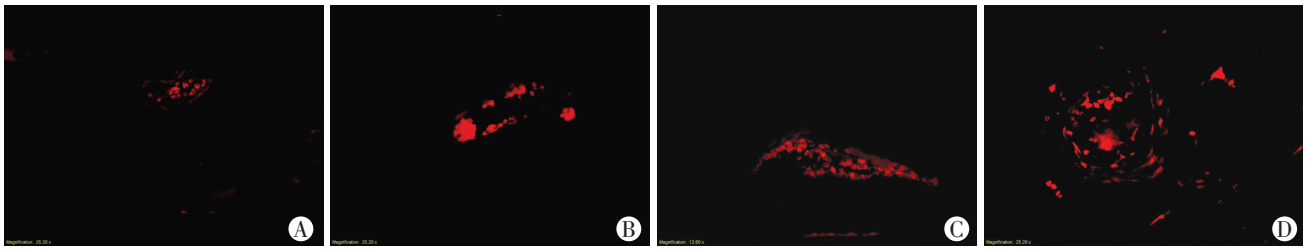
A:高原实验组;B:平原实验组;C:高原对照组;D:平原对照组

图1 各组家兔牙周组织HE染色观察 (HE ×200)



A:高原实验组;B:平原实验组;C:高原对照组;D:平原对照组

图2 各组家兔RANKL免疫荧光染色观察 (×600)



A:高原实验组;B:平原实验组;C:高原对照组;D:平原对照组

图3 各组家兔OPG免疫荧光染色观察 (×600)

3 讨论

牙周病是人类易患的常见病、多发病,波及面广,其主要临床表现是牙龈炎症、牙周组织破坏、牙槽骨吸收和最后牙齿的脱落,是人群中导致失牙的主要疾病,可波及各年龄人群,与全身的健康密切相关。高原地区的人群口腔卫生状况和保健意识以及仪器设备和医疗技术相对处于落后状态,因而牙周炎发病率相对较高[3]。研究表明高原特殊环境可能促使高原地区人群较易发生牙周炎。牙周病的发生和发展,由细菌、宿主、环境三方面条件决定,近年来宿主产生的免疫炎症反应在牙周病进程中的作用已得到充分肯定。因此,本研究在课题组前期研究[2-3]基础上,模拟高原条件下建立家兔牙周炎动物模型,研究高原低氧条件下牙周组织的病理改变以及与破骨细胞、RANKL、OPG作用的相关性。

研究表明RANKL和OPG是近年来发现对破骨细胞分化成熟和增殖活性有重要作用的一对调节因子,其与骨改建关系密切。OPG、RANKL、RANK是破骨细胞活化的分子基础,OPG与RANKL的变化影响破骨细胞的分化,许多因素都是通过调节这二者而影响骨吸收和骨形成[4-5]。

本研究结果表明,高原实验组比平原实验组、高原对照组比平原对照组RANKL表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$),与牙周指数PLI、BI、AL呈正相关,OPG表达降低不明显,差异无统计学意义($P>0.05$),与牙周指数PLI、BI、AL呈负相关。由此可推测海拔升高对RANKL、OPG有一定的影响,且表明局部RANKL和OPG之间出现平衡失调,破骨细胞形成增多,破骨作用增强吸收,牙周病的主要临床表现为牙槽骨吸收,体外及动物实验结果[6]显示RANKL、OPG是慢性牙周炎牙槽骨吸收的重要调节因子。Kanzaki等[7]通过建立大鼠上颌第一磨牙腭侧移动的动物模型,发现RANKL在牙周组织局部基因转染后破骨细胞分化增强,OPG基因转染后,RANKL介导的破骨细胞发生受到抑制。刘棋等[8]研究发现慢性牙周炎牙槽骨吸收处肉芽组织中有RANKL较高的蛋白表达,OPG蛋白表达相对较低,非肉芽组织中显示较强的OPG表达和较弱的RANKL蛋白表达。

破骨细胞的形成和功能受到多种因素调节,包括

细胞因子和激素的调节。有研究[9-10]表明缺氧可促进破骨细胞的增殖,且增殖的高峰在2%～5%之间,OPG基因表达水平在缺氧时较对照组明显降低,在缺氧3 d时最为显著。可见缺氧促进破骨细胞形成可能是通过RANK/RANKL/OPG系统来实现[11]。新近的研究[12]表明,短期缺氧可促进成骨细胞的生长,但长期缺氧可抑制成骨细胞的生长、分化和骨形成能力,因此,随着缺氧时间的延长,RANKL、OPG的表达相对增强,破骨细胞的增殖能力也开始上升。目前的调查和研究均表明高原牙周病的发生可能与缺氧密切相关,低氧环境一方面直接促进破骨细胞增殖活跃,另一方面促进炎症介质表达改变使OPG表达降低,RANKL表达升高,促进牙槽骨的吸收从而导致高原牙周病的加重。高原特殊环境下,细胞因子和缺氧环境的共同作用介导了牙周骨组织的吸收,OPG和RANKL是骨代谢的关键因子,但是缺氧通过何种机制影响OPG和RANKL这二者的相互作用,有待今后进一步研究。

参考文献:

[1] 何海涛, 谭颖徽, 王建华, 等. SP在失神经下颌骨骨痂中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(15): 1558-1560.
[2] 肖娴, 张纲, 李焰,等. 驻高原和平原官兵口腔健康状况调查[J]. 解放军预防医学杂志, 2010, 28(1): 40-41.
[3] 孔燕, 谭颖徽, 张纲, 等. 模拟高原条件下大鼠牙周炎模型牙周组织中TNF-α、PGE_2的表达[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2009, 19(5): 261-264.
[4] Liu D, Xu J K, Figliomeni L, *et al*. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction [J]. Int J Mol Med, 2003, 11(1): 17-21.
[5] Yasuda H, Shma N, Nakagawa N, *et al*. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(7): 3597-3602.
[6] Aarthi J J, Darendeliler M A, Pushparai P N. Dissecting the role of the S1P/S1PR axis in health and disease [J]. J Dent Res, 2011, 90(7): 841-854.
[7] Kanzaki H, Chiba M, Arai K, *et al*. Local RANKL gene transfer to the periodontal tissue accelerates orthodontic tooth movement [J]. Gene Ther, 2006, 13(8): 678-685.
[8] 刘棋, David Haynes, Mark Bartold, 等. 慢性牙周炎中核因子κB受体活化子、护骨素和肿瘤坏死因-α的蛋白表达[J]. 口腔医学, 2004, 24(6): 347-349.
[9] Arnett T R, Gibbons D C, Utting J C, *et al*. Hypoxia is a major stimulator of osteoclast formation and bone resorption[J]. J Cell Physiol, 2003, 196(1): 2-8.
[10] Fukuoka H, Aoyama M, Miyazawa K, *et al*. Hypoxic stress enhances osteoclast differentiation *via* increasing IGF2 production by non-osteoclastic cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 328(4): 885-894.
[11] 郎红梅, 金小岚. 低氧对小鼠成骨细胞OPG及RANKL基因表达的影响[J]. 西南国防医药, 2007, 17(1): 28-30.
[12] Warren S M, Steinbrech D S, Mehrara B J, *et al*. Hypoxia regulates osteoblast gene expression [J]. J Surg Res, 2001, 99(1): 147-155.

(**收稿**:2011-09-09;**修回**:2011-10-08)
(编辑 张 维)

我刊再次被评为百种中国杰出期刊、中国精品科技期刊

2011年12月2日,科技部中国科学技术信息研究所在北京举行了中国科技论文统计结果发布会。会议公布了中国科技期刊评价结果。《第三军医大学学报》的各项计量指标均有较大提升:2010年度被引频次为3153次(2009年为2859次),名列51种医科大学学报第一位;影响因子(核心版)为0.668(2009年为0.505),名列第3;综合评分68.5,位列第1。会议同时公布了"百种中国杰出学术期刊"、"中国精品科技期刊"评选结果。《第三军医大学学报》第4次蝉联"百种中国杰出学术期刊"称号,并再次被评选为"中国精品科技期刊"。

"百种中国杰出学术期刊"是由中国科技信息所根据中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)收录的1998种统计源期刊的各项科学计量指标进行综合评定,遴选出的100种优秀期刊,包括各学科、各类型期刊。每年评选1次,实行淘汰制。进入2011年"百种中国杰出学术期刊"的大学学报共有10种,医科大学学报(含综合性大学学报医学版)仅2种:《第二军医大学学报》和《第三军医大学学报》。

国家科技部自2000年来,为提升中国科技期刊的整体水平,提出了打造精品科技期刊的概念。按照精品科技期刊战略的目标,根据目前我国学术期刊的发展状况以及精品科技期刊战略的总体目标,将精品科技期刊分为"国际化精品科技期刊"和"中国精品科技期刊"。"国际化精品科技期刊"是指有潜力冲击世界水平的、在国际上某一学科具有相对竞争优势和影响力的期刊;"中国精品科技期刊"是指在某一学科内质量和水平较高、在国内具有较高影响且具有一定发展潜力的科技期刊。2008年公布了首批中国精品科技期刊,3年评选1次,今年是第2届。我校主(承)办科技期刊中,仅《第三军医大学学报》连续两届被评为"中国精品科技期刊"。

《第三军医大学学报》于2007年首次进入"百种中国杰出学术期刊"、"中国精品科技期刊"行列,4年来,在校部首长、全校科技人员的支持下,在编委会、编辑部的不懈努力下,期刊学术水平稳步提升,编校质量稳定,才得以在激烈的竞争中独占鳌头,连续4年荣获"百种中国杰出学术期刊"荣誉称号,连续两届被评选为"中国精品科技期刊"。