

# 咬合力丧失影响大鼠 牙周组织中白细胞介素-6 mRNA 表达的研究

袁 林 赵云凤 周伟东

**摘要** 目的:初探 IL-6 mRNA 在牙周组织改建中的分子机理。方法:选用 Wistar 大鼠建立正常咬合力、咬合力丧失的动物模型,采用原位杂交方法,观察牙周细胞中 IL-6 mRNA 表达的动态变化。结果:咬合力丧失引起牙周细胞中 IL-6 mRNA 表达较正常咬合力时明显增强。结论:咬合力丧失,促使 IL-6 mRNA 明显增多,诱发了破骨过程,影响着牙周组织的改建。

**关键词** 咬合力 白细胞介素-6 mRNA 牙周组织改建 原位杂交

## Effects of Bite Force Loss on the Expression of IL-6 mRNA in Rat Periodontium

Yuan Lin, Zhao Yunfeng, Zhou Weidong

The College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

### Abstract

**Objective:** The aim of this study is to evaluate the expression of IL-6 mRNA in rat periodontal cells under normal bite force and without bite force, and to explain periodontal remodeling from the molecular level. **Methods:** Animal models with normal bite force and without bite force were established by using Wistar rats. In situ hybridization technique was applied to detect changes of IL-6 mRNA expression in rat periodontal tissue. **Results:** Without bite force, the expression level of IL-6 mRNA increased significantly in periodontal cells. **Conclusion:** This study initially investigates the molecular mechanism of periodontal remodeling, and suggests that the histological morphology may be closely related to the mechanical stimulation.

**Key words:** bite force IL-6 mRNA periodontium remodeling in situ hybridization

口腔修复临床观察到,咬合力减弱时,牙周组织发生退行性变,牙槽骨骨小梁吸收,骨应力线不明显。说明作用于牙的咬合力可传递至牙周组织引起其改建。大量研究表明,改建过程中,局部代谢因子对牙周组织本身的维持及代谢均起着重要的作用。近年来随着对 IL-6 研究的不断深入,学者们推测 IL-6 可能是牙周组织改建过程中关键的细胞因子之一。本实验采用核酸原位杂交技术研究咬合力丧失对牙周细胞 IL-6 mRNA 表达的影响,从基因水平探讨 IL-6 对牙周膜及牙槽骨改建的分子机理。

### 1 材料和方法

#### 1.1 动物模型

选用 80 只 250g ±20 g 成年雄性 Wistar 大鼠,随机等量地分为对照组(正常咬合力)和实验组。实验组拔除左侧上颌所有磨牙。这样,实验组的左侧下颌磨牙因丧失对颌牙而构成咬合力丧失的动物模型。两组动物分别在实验后 6h、1d、2d、3d、1 周、2 周、3 周和 4 周各处死 5 只,共 16 组。

#### 1.2 组织标本制备

实验动物采用 4% 多聚甲醛心内灌注的方式行内固定。取出下颌相应骨段,保留磨牙区,置于 4% 多聚甲醛中巩固固定 6 h。将标本移至 EDTA 中脱钙 2 周。梯度乙醇脱水,石蜡包埋。标本厚 5 mm,裱于经硅化处理的玻片上。

#### 1.3 实验方法

1.3.1 探针的制备 用 DNA 自动合成仪合成 48 个碱基的寡核苷酸探针,其序列为: 5'-GGT CTG TTG TGG GTG GTA

作者单位:610041 四川大学华西口腔医学院(袁 林,赵云凤),第一军医大学珠江医院(周伟东)

TCC TCT GTG AAG TCT CCT CTC CGG ACT TGF-3'。参照地高辛标记检测试剂盒(Boehringer Mannheim公司,德国)说明对探针进行标记与检测。

1.3.2 原位杂交 切片经梯度乙醇脱水后用 DEPC 水及蛋白酶 K(50mg/L)处理,用 2%的甘氨酸终止反应,4%多聚甲醛固定,经中性 PBS 洗后梯度乙醇脱水、室温干燥,探针处理后杂交(42℃,16h)。切片分别用 2×SSC、0.2×SSC、buffer 1、buffer 3 洗,以标记碱性磷酸酶的地高辛检测系统检测。实验设计 RNase 处理的阴性对照、去除探针的空白对照和已知 IL-6 mRNA 表达的应激大鼠脾组织作阳性对照。

1.4 图像分析与统计学处理

采用 MIAS-2000 型图像分析仪,每个标本选择大鼠第一磨牙牙根为观察对象。结果用 t 检验进行统计学分析。

2 结 果

原位杂交具有特异性,用地高辛标记的 IL-6 寡核苷酸探针进行杂交的大鼠脾组织和牙周膜成纤维细胞(periodontal ligament fibroblast, PDLF)和成骨细胞中均出现阳性信号。而阴性对照组和空白对照组结果均为阴性。

对照组大鼠 PDLF 中有 IL-6 mRNA 表达,表达无时间规律,变化不大。牙槽骨成骨细胞中未见 IL-6 mRNA 明显表达。

实验组(咬合力丧失)PDLF 中 IL-6 mRNA 表达阳性强度较对照组明显增强。

实验 1 d 后开始出现变化,强度逐渐增加,2 周达最高值,随后逐渐减小,4 周时明显减弱(表 1)。实验组与对照组比较,除 6 h 时 P > 0.05 无显著性差异外,其余各时间点均 P < 0.01,有显著性差异。

表 1 实验组和对照组不同时间牙周细胞 IL-6 mRNA 原位杂交染色灰度差值

实验时间	对照组	实验组
6 h	8.2316	9.9310
1 d	8.7894	18.5979 *
2 d	8.0116	26.0843 *
3 d	8.9857	35.3816 *
1 周	8.4392	42.5246 *
2 周	11.8337	57.2623 *
3 周	9.8782	41.4192 *
4 周	8.2507	18.7373 *

\*两组比较 P < 0.01

牙槽骨成骨细胞实验组 2 周时观察到成骨细

胞表达 IL-6 mRNA 明显增强。

3 讨 论

本实验通过原位杂交的方法观察到大鼠牙周膜成纤维细胞和成骨细胞能稳定表达 IL-6 mRNA,这与以往学者<sup>1</sup>的研究和笔者<sup>2</sup>采用 HE 染色和免疫组化的方法对牙周组织形态学变化以及 IL-6 多肽在牙周组织中表达的研究结果一致。牙周膜成纤维细胞和成骨细胞中存在 IL-6 mRNA,所以它们可以通过 IL-6 mRNA 进行翻译,自身合成 IL-6 多肽,并通过自分泌或旁分泌途径,作用于牙周膜和牙槽骨,影响其生长改建。

本实验结果表明,咬合力丧失能影响 PDLF 和成骨细胞中 IL-6 mRNA 的表达,其阳性强度明显高于对照组。从变化趋势看,IL-6 mRNA 与 IL-6 多肽在牙周膜成纤维细胞和成骨细胞中的变化规律基本一致。这从基因水平证实了笔者在免疫组化研究中发现的 IL-6 免疫阳性强度增加的现象,支持 IL-6 通过自分泌和旁分泌方式参与牙周组织改建的结论。

本实验发现在正常咬合力情况下(对照组),牙槽骨成骨细胞未见 IL-6 mRNA 的明显表达。但实验组 D 区 2 周时观察到成骨细胞表达 IL-6 mRNA 明显增强,提示咬合力丧失,除诱导牙周膜成纤维细胞产生 IL-6 增多外,还诱导成骨细胞产生破骨因子 IL-6 增多,促进了破骨功能,其改建是以破骨过程为主。这与笔者用 HE 染色观察到的咬合力丧失导致牙周膜结构紊乱、牙槽骨吸收的现象相符。

骨改建是一个复杂的过程,是通过骨不断吸收和不断形成两者间达到一种平衡来实现的。自 1972 年 Horton 提出 IL-1 为破骨细胞活化因子后,近年来,随着细胞因子的研究日益广泛和深入,许多研究表明,破骨细胞活化因子并非单一的物质,而是一组多源性、异质性生物活性因子。IL-1、IL-6 以及 TNF- $\alpha$  等均有不同程度的破骨细胞活化因子活性,参与骨的改建。

成骨细胞被认为是骨改建中重要的细胞,它能影响破骨细胞前体的募集、增殖及分化。在这一作用过程中,由成骨细胞分泌的 IL-6 起着重要作用。成骨细胞在受到 IL-1、TNF- $\alpha$  等作用后,其分泌 IL-6 明显增多。IL-6 对破骨细胞的调控起着重要作

用。IL-6能显著促进破骨细胞的形成,影响破骨细胞前体的募集和诱导成熟破骨细胞的增殖与分化。同时,活化的破骨细胞本身又能产生IL-6<sup>3,4</sup>。

关于IL-6促进骨吸收的机理,学者们<sup>5,6</sup>认为是通过与破骨细胞膜上表达的特异性受体结合来调控的。指出破骨细胞表面存在特异性IL-6受体(IL-6R),此受体具有酪氨酸蛋白激酶的活性。当IL-6与IL-6R结合后,激活受体本身的酪氨酸蛋白激酶,并依赖此激酶的活性完成信号的跨膜传递,使细胞内靶蛋白酪氨酸残基磷酸化,从而引起破骨细胞反应。

综上所述,咬合力丧失诱导了牙周膜成纤维细胞和牙槽骨成骨细胞表达IL-6 mRNA明显增加。它一方面参与了牙周膜的降解,调节牙周膜的改建。另一方面IL-6明显促进了破骨细胞的形成和活化,而活化的破骨细胞又能分泌IL-6、IL-1和TNF,促进更多的破骨细胞形成。IL-6通过自分泌和旁分泌的方式参与牙槽骨的吸收,诱发牙槽骨的改建。

(上接第143页)

实验组(戴功能矫治器)大鼠功能矫形前伸下颌后,引起翼外肌活动增强。翼外肌内胰岛素阳性染色计数除具有对照组的一般分布规律外,且在各个实验时段均高于对照组。提示实验组大鼠翼外肌内胰岛素的增加,除与青春期生长发育有关外,矫形治疗这一施加因素也发挥了重要作用。翼外肌内胰岛素的增加,可能通过促进葡萄糖跨膜转运进入肌细胞<sup>6</sup>,促进葡萄糖的氧化利用产生高能ATP,增加糖元合成,为翼外肌功能活动增强、耗能增加提供有力保证。胰岛素还可加强蛋白质合成,促进肌纤维肥大,为翼外肌功能矫形后的适应性改建奠定物质基础。功能矫形前伸下颌后,大鼠翼外肌内胰岛素分布的增加,与翼外肌的功能和结构改建有密切关系。

此外,实验组和对照组大鼠翼外肌内胰岛素阳性染色均定位肌细胞膜上。由于组织中胰岛素只能和胰岛素受体产生特异性结合,说明翼外肌细胞膜上存在胰岛素受体。至于胰岛素与何种类型胰岛素受体结合,如何进一步引起细胞内的一系列反

参考文献

- 1 Shimizu N, Ogura N, Yamaguchi M, et al. Stimulation by interleukin-1 of interleukin-6 production by human periodontal ligament cells. Arch Oral Biol, 1992,37(9):743~748
- 2 袁林,赵云凤.咬合力与大鼠牙周组织改建关系研究中动物模型的建立.实用口腔医学杂志,2000,16(3):199~201
- 3 Littlewood AJ, Russell J, Harvey GR, et al. The modulation of the expression of IL-6 and its receptor in human osteoblasts in vitro. Endocrinology, 1991,129(3):1513~1520
- 4 Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. J Immunol, 1990,145(10):3297~3303
- 5 O'Keefe RJ, Teot LA, Singh D, et al. Osteoblasts constitutively express regulators of bone resorption: an immunohistochemical and in situ hybridization study. Lab Invest, 1997,76(4):457~465
- 6 Hoyland JA, Freemont AT, Sharpe PT. Interleukin-6, IL-6 receptor and IL-6 nuclear factor gene expression in Paget's disease. J Bone Miner Res, 1994,9(1):75~80

(1999-10-15 收稿)

(本文编辑 王 晴)

应,最终发挥胰岛素对翼外肌的作用,尚需进一步研究。

参考文献

- 1 McNamara JA. Functional adaptations in the temporomandibular joint. Dent Clin North Am, 1975,19(3):457~461
- 2 Sessle BJ. Effect of functional appliances on jaw muscle activity. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1990,98(2):222~234
- 3 王昕,罗颂椒,周秀坤,等.功能矫形前伸下颌后幼年大鼠下颌前伸肌的组织化学研究.华西口腔医学杂志,1992,10(3):220~223
- 4 赖文莉,赵美英,罗颂椒.功能矫形大鼠下颌前伸后髁突胰岛素分布规律的研究.中华口腔医学杂志,1996,31(2):91~94
- 5 黄宁.功能矫形前伸下颌后大鼠翼外肌胰岛素含量和分布变化的实验研究.华西医科大学研究生学位论文,1997:17~25
- 6 Branard RJ, Youngren JF. Regulation of glucose transport in skeletal muscle. FASEB J, 1992,6(14):3238~3248

(1999-12-16 收稿,2000-12-17 修回)

(本文编辑 王 晴)