

[文章编号] 1000-1182(2006)02-0106-04

大鼠牙周炎牙正畸移动后 整合素 β_3 mRNA变化的实验研究

张京剧, 陈扬熙, 肖立伟, 段培佳, 赵青
(四川大学华西口腔医院 正畸科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 研究大鼠牙周炎牙及其正常牙在正畸移动中整合素 β_3 mRNA的表达变化。方法 选用10周龄雄性成年SD大鼠96只, 随机分为正常牙组、牙周炎牙组, 每组48只。分别在加力后0 d、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d每一时间点处死8只动物, 制备标本。采用原位杂交检测牙周炎牙与正常牙正畸移动后 β_3 mRNA转录水平的变化。结果 正常牙组和牙周炎牙组加力后12 h和3 d时的牙周膜内破骨细胞整合素 β_3 mRNA阳性强度均较加力前有明显增加($P < 0.001$); 其余时间点未见整合素 β_3 mRNA阳性表达。在加力各时间点, 两组整合素 β_3 mRNA的表达强度无显著性差异($P > 0.05$)。结论 在正常牙及牙周炎牙移动早期, 牙周膜和牙槽骨骨髓腔内有整合素 β_3 mRNA表达, 提示整合素 β_3 可能参与破骨细胞前体向破骨细胞转化及破骨细胞迁移和粘附。

[关键词] 整合素; 整合素 β_3 ; 破骨细胞

[中图分类号] R783.5 **[文献标识码]** A

Integrin β_3 mRNA Changes after Orthodontic Teeth Movement in Periodontitis Rats ZHANG Jing-ju, CHEN Yang-xi, XIAO Li-wei, DUAN Pei-jia, ZHAO Qing. (Dept. of Orthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To study the integrin β_3 mRNA changes after orthodontic treatment on normal teeth and periodontitis teeth in rats. **Methods** 96 adult SD rats of 10 weeks old were randomly divided into normal tooth movement group and periodontitis tooth movement group. The rats in the two groups were sacrificed after 0 d, 12 h, 1 d, 3 d, 5 d and 7 d of tooth movement. The alveolar specimens were prepared. The integrin β_3 mRNA were detected using *in situ* hybridization in the specimens. The OD index of positively stained osteoclasts for integrin β_3 mRNA after orthodontic tooth movement in the two groups were measured and compared. **Results** There were weak positive signals on the cytoplasm of osteoclasts in periodontium in both groups after 12 hours and 3 days force activation. No positive signals were detected in the rest samples. There was no difference in the OD of positive stained osteoclasts between normal and periodontitis groups. Strong expressions were present on cells with one or two nuclei in the alveolar marrow. **Conclusion** It is suggested that integrin β_3 mRNA is related with osteoclasts maturation and migration in orthodontic tooth movement.

[Key words] integrin; integrin β_3 ; osteoclast

破骨细胞表达的 β_3 组整合素 $\alpha_v\beta_3$ 是破骨细胞表达水平最强的整合素, 是其主要粘附分子。破骨细胞整合素 $\alpha_v\beta_3$ 配体为VN, 其介导的细胞粘附与破骨细胞迁移分化及其与骨基质的粘附有密切关系^[1]。在牙周炎和正畸牙移动中破骨细胞是骨吸收的核心细胞。破骨细胞整合素 β_3 的表达是否参与了牙槽骨的改建和吸收? 本实验用原位杂交方法探测整合素 β_3

mRNA转录水平的变化, 对牙周炎牙与正常牙正畸移动中牙周组织与整合素表达的关系进行探讨。

1 材料和方法

1.1 实验设计

选用10周龄雄性成年SD大鼠96只, 体重约350 g (四川大学华西实验动物中心), 随机分为正常牙加力组、牙周炎牙加力组, 每组48只。牙周炎牙齿模型在缝线缝扎和高糖饮食1个月后获得^[2]。牙齿加力方法为: 用结扎丝将NiTi螺旋弹簧的一端结扎于磨牙颈部, 弹簧的另一端结扎于两个切牙上并用粘结剂固定, 使弹簧拉伸, 力量为0.49 N, 使磨牙受到

[收稿日期] 2005-03-29; **[修回日期]** 2005-10-21

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20020610063)

[作者简介] 张京剧(1974-), 女, 山西人, 主治医师, 博士, 现在上海太平洋口腔医院正畸中心工作

[通讯作者] 陈扬熙, Tel: 028-85503477

近中方向的拉力，形成大鼠磨牙近中移动动物模型。分别在加力后0 d、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d每一时间点处死8只动物。进行标本制备和组织切片。

1.2 原位杂交 (*in situ* hybridization) 检测

1.2.1 主要试剂及设备 兔整合素 β_3 和 β_3 基因mRNA链原位杂交实验试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)，试剂盒中含有：胃蛋白酶、预杂交液、整合素 β_1 和 β_3 寡核苷酸探针杂交液、封闭液、生物素化鼠抗地高辛、生物素化抗兔IgG、SABC-POD、生物素化过氧化物酶。

原位杂交所用探针采用整合素的三相寡核苷酸探针，经地高辛高效标记。

整合素 β_3 寡核苷酸探针序列：①5'-GACAC CTGTG AGAAG TGCCC CACCT GCCCA-3'；②5'-GGATG ACTGT GTCGT CAGAT TCCAG TACTA-3'；③5'-GCTAA ATTTG AGGAA AGGCG CGCCA GGAGC-3'。

1.2.2 原位杂交实验方法 ①石蜡切片脱蜡至水，阻断内源性过氧化物酶活性，22 min。②体积分数0.5%DEPC水洗，每次5 min，2次。③暴露mRNA核酸片段：切片上滴加3%柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶，37℃，30 min。④量浓度0.5 mol/L磷酸盐缓冲液PBS洗涤，每次5 min，3次，DEPC水洗1次；90%、95%、100%DEPC-乙醇脱水干燥。⑤预杂交：滴加预杂交液于组织上，在42℃湿盒中孵育4 h。⑥杂交：将2块医用纱布用2×SSC浸湿，放入杂交盒底部。切片空气干燥后，每张切片滴20 μ L含地高辛标记探针的原位杂交液。恒温干燥箱40℃杂交过夜。12 h后取出湿盒中纱布，并将湿盒开条缝隙，在干燥环境中继续杂交2—3 h。

1.2.3 杂交信号的检测 ①用2×SSC、0.5×SSC洗涤，10 min，2次。②0.2×SSC洗涤，10 min，2次；0.5 mol/L PBS洗涤，5 min，1次。③滴加封闭液，室温20 min，滴加兔抗地高辛，37℃，60 min。④0.5 mol/L PBS洗2 min，3次，滴加生物素化抗兔IgG，37℃，30 min。⑤0.5 mol/L PBS洗，滴加SABC复合体，37℃，30 min。⑥0.5 mol/L洗5 min，4次DAB显色，苏木素复染。⑦酸乙醇处理，流水冲洗，脱水，二甲苯透明，加拿大胶封片。

1.2.4 阳性标准 细胞胞浆棕黄色染色，着色明显高于背景水平。

1.3 图像分析

采用尼康E600研究显微镜、SPOT COD CCD摄像头进行图像采集，image-pro plus 4.01图像分析系统软件进行统计分析。每只大鼠选用一张切片，在高倍镜下($\times 400$)进行分析，每张切片在牙周膜区

随机选择一个区域，以交互方式测量出破骨细胞整合素 β_3 mRNA表达的平均光密度值(optical density, OD)。以3次测量值的均值作为该动物在该时间点的实测值。

1.4 统计学处理

加力后0 d组与加力后各时间点切片的破骨细胞浆着色OD测量值进行t检验比较，对正常牙和牙周炎牙不同时间段的OD测量值进行单因素方差分析。

2 结果

在正常牙组和牙周炎牙组大多数时段并未观察到牙周膜内破骨细胞整合素 β_3 mRNA的表达阳性；只在加力后12 h和第3天观察到牙周膜内破骨细胞整合素 β_3 mRNA有弱阳性表达(图1, 2)。加力后正常牙组和牙周炎牙组牙周膜内破骨细胞整合素 β_3 mRNA光密度值见表1。从表1可见，两组加力后12 h, 3 d时破骨细胞整合素 β_3 mRNA光密度值与加力0 d比较，皆有显著性差异($P < 0.001$)，可见在正常牙组与牙周炎牙组，加力12 h, 3 d后的整合素 β_3 mRNA阳性强度均较加力前有明显增高。进一步对正常牙组与牙周炎牙组牙周膜内破骨细胞整合素 β_3 mRNA光密度值进行方差分析表明，正常牙组与牙周炎牙组牙周膜内破骨细胞整合素 β_3 mRNA的表达强度在各时间点均无显著性差异($P > 0.05$)。

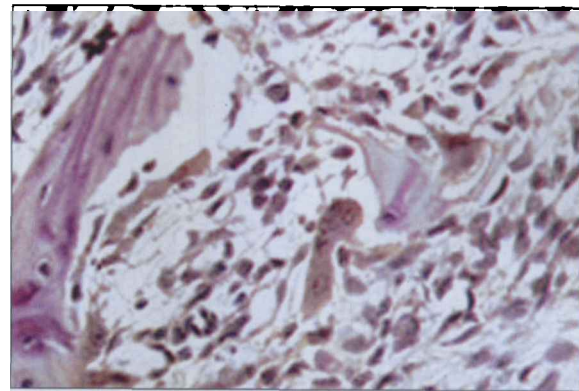


图1 牙周炎牙组受力后3 d牙周膜内破骨细胞整合素 β_3 mRNA阳性表达 原位杂交 $\times 400$

Fig 1 Distribution of integrin β_3 mRNA detected in the periodontitis teeth group after movement 3 days *in situ* hybridization $\times 400$

表1 正常牙组与牙周炎牙组牙周膜内破骨细胞整合素 β_3 mRNA光密度值($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The integrin β_3 mRNA OD of normal group and periodontitis teeth group ($\bar{x} \pm s$)

分组	加力时间		
	0 d	12 h	3 d
正常牙组	2.87 \pm 0.35	9.25 \pm 2.31	10.12 \pm 1.35
牙周炎牙组	3.08 \pm 1.09	10.87 \pm 2.03	11.62 \pm 1.84

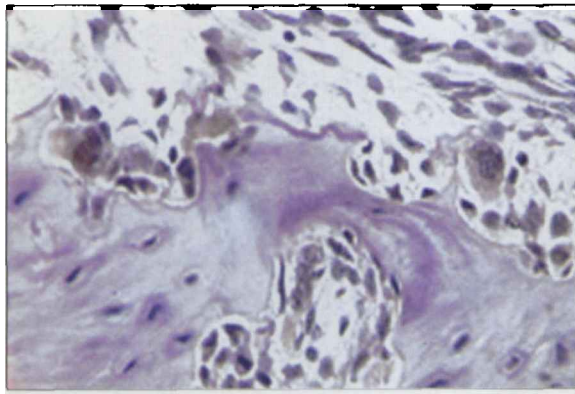


图2 正常牙组加力后3 d牙周膜内破骨细胞整合素 β_3 mRNA阳性表达 原位杂交 $\times 400$

Fig 2 Integrin β_3 mRNA positive signals on osteoclasts were located in the periodontal ligament of normal teeth after movement 3 days *in situ* hybridization $\times 400$

在加力后3 d的标本牙槽骨的骨髓腔内见到大量单核或双核细胞胞浆有强烈阳性信号表达(图3)。据研究在各种促破骨细胞形成因素刺激下,破骨细胞前体单核细胞在融合形成破骨细胞时整合素 β_3 的转录与表达水平升高,提示此时骨髓腔内可能有破骨细胞的形成和融合。

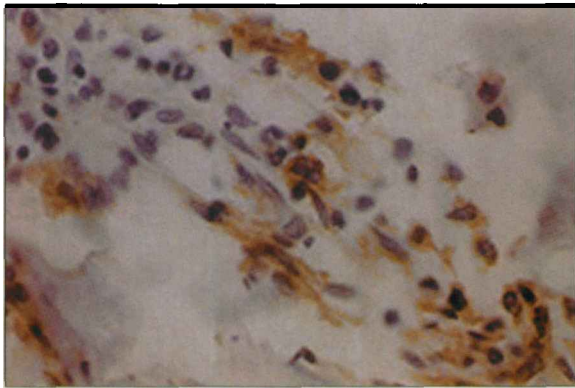


图3 正常牙组加力后3 d骨髓腔内整合素 β_3 mRNA阳性表达 原位杂交 $\times 400$

Fig 3 Integrin β_3 mRNA positive signals were located in marrow cavity in the periodontal ligament of normal teeth after movement 3 days *in situ* hybridization $\times 400$

3 讨论

在破骨细胞膜上鉴定出来的整合素主要有 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 等,其中 $\alpha_v\beta_3$ 在破骨细胞表达水平最强,是破骨细胞的主要粘附分子^[1]。鼠类的破骨细胞通过整合素 $\alpha_v\beta_3$ 与细胞外基质和裂解的I型胶原连接。破骨细胞整合素 $\alpha_v\beta_3$ 与配体VN粘附,是骨吸收功能的关键步骤。其中整合素 α_v 亚单位和 β_3 亚单位缺一不可,而且必须组合在一起发挥作用。对整合素 β_3 亚单位基因敲除的大鼠进行研究后发现,该型大鼠的破骨细胞无法形成正常的刷状缘和肌动

蛋白环,阻碍了骨吸收的进行^[9]。抗 $\alpha_v\beta_3$ 单抗可抑制破骨细胞与细胞外基质的粘附^[10],研究表明,整合素 β_3 对破骨细胞功能调节发挥重要作用。某些细胞因子通过调整合素 β_3 的表达而调节破骨细胞功能。例如O'Brien等^[11]发现骨保护素配体可刺激破骨细胞从鼠颅骨的骨膜释放,从而粘附于骨表面,同时整合素 β_3 蛋白表达增高,而应用骨保护素后,破骨细胞整合素 β_3 蛋白表达下降,从而抑制破骨细胞的骨吸收。

有关破骨细胞成熟和开始行使功能后仍表达 β_3 mRNA的研究较少见。Shinar等^[12]用原位杂交技术在大鼠骨吸收活跃部位的破骨细胞上发现有整合素 α_v 和 β_3 mRNA的阳性表达。Faccio等^[7]认为在破骨细胞中,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 存在不同状态——“静止状态”与“激活状态”,发现活动状态的破骨细胞中,激活状态 $\alpha_v\beta_3$ 分布于刷状缘,静止状态的 $\alpha_v\beta_3$ 位于结合带。肝细胞生长因子与巨噬细胞集落刺激因子可以调节整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的构相,从而激活 $\alpha_v\beta_3$ 活性,使破骨细胞迁移,开始骨吸收。该研究提示破骨细胞可能在早期即已经完成整合素 α_v 和 β_3 mRNA的转录和蛋白的合成,只是在需要行使功能时进行构相的改变,激活蛋白的功能。这可能是加力后破骨细胞很少表达整合素 β_3 mRNA的原因。而在加力后12 h和3 d,正是破骨细胞大量形成和开始骨粘附的时期,这时可能破骨细胞仍在进行整合素 β_3 的合成,以完成破骨细胞迁移和破骨细胞与骨基质的粘附,开始骨吸收。在整合素 β_3 与骨质粘附完成,骨吸收开始后,可能就不再需要整合素 β_3 mRNA的合成,这也许是加力后期实验中未发现整合素 β_3 mRNA阳性表达的原因。

大量研究发现整合素 β_3 mRNA高表达于成熟前的前破骨细胞上。Medhora等^[13]用 $1,25-(OH)_2D_3$ 刺激破骨细胞前体向成熟破骨细胞转化,发现加入 $1,25-(OH)_2D_3$ 后,24 h内细胞的整合素 α_v 的mRNA表达水平增高,随之而来的是破骨细胞整合素 $\alpha_v\beta_3$ 蛋白的增高,说明破骨细胞的转化成熟过程中,有整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的参与。Mimura等^[14]报道在 $1,25-(OH)_2D_3$ 来源于单核/巨噬细胞家族的破骨细胞前体向破骨细胞转化中,整合素 β_3 mRNA水平也在1 d内表达增高,与蛋白表达水平相对应。鼠骨髓巨噬细胞(mouse marrow macrophages, BMM)可以分化为破骨细胞。Li等^[15]发现在加入雌激素后,增加 $1,25-(OH)_2D_3$ 诱导的破骨细胞前体细胞向破骨细胞转化,其中整合素 β_3 mRNA的高表达持续时间增加,认为是增加了 β_3 mRNA的稳定性,从而导致蛋白水平的相应增加。以上研究都说明,在破骨细胞前体向破骨细胞转化

过程中,是整合素 β_3 mRNA合成与高表达的时期。Rody等^[1]研究认为加力后牙周组织内破骨细胞来源于牙槽骨骨髓的破骨细胞前体。本实验发现在牙槽骨的骨髓腔内,大量的单核或双核细胞表达整合素 β_3 mRNA。提示此部位可能是破骨细胞前体向成熟破骨细胞转化的部位,整合素在加力后12 h和第3天, β_3 mRNA阳性表达,这与破骨细胞形成的高峰期相对应,提示整合素 β_3 mRNA阳性表达似乎与破骨细胞的成熟、聚集有关。

[参考文献]

- [1] Duong LT, Lakkakorpi P, Nakamura I, et al. Integrins and signaling in osteoclast function[J]. *Matrix Biol*, 2000, 19(2):97-105.
- [2] 陈铁楼,周以钧,吴织芬.牙周病龈组织中血栓素 B_2 的放射免疫测定及免疫组化定位与定量分析[J].*华西口腔医学杂志*, 1994, 12(4):241-243.
(CHEN Tie-lou, ZHOU Yi-jun, WU Zhi-fen. The locateon and quantive analysis of TXB_2 in gingiva of patients with periodontal diseases by radioimmunoassay and immunohistochemistry[J]. *West China J Stomatology*, 1994, 12(4):241-243.)
- [3] Cheng SL, Lai CF, Fausto A, et al. Regulation of alpha v beta 3 and alpha v beta 5 integrins by dexamethasone in normal human osteoblastic cells[J]. *J Cell Biochem*, 2000, 77(2):265-276.
- [4] Schneider G, Burrige K. Formation of focal adhesions by osteoblasts adhering to different substrata[J]. *Exp Cell Res*, 1994, 214(1):264-269.

(上接第105页)

弱阳性表达,尤其在离血管较近的细胞体积较小的幼稚牙髓细胞中表达明显。因为未分化间充质细胞通常位于小血管和毛细血管附近,体积比正常牙髓细胞小,有不明显的胞浆突,不易与牙髓细胞相鉴别,故推测在血管周围体积较小的阳性细胞中可能有部分为未分化间充质细胞。这些提示了HO-1在牙髓的正常代谢和损伤修复中起一定的作用。Anderson等^[4]研究发现,用10%的双氧水溶液漂白活髓牙后,牙髓组织通过增加合成HO-1来对抗氧化应激引起的损伤。这也说明了HO-1在牙髓损伤时起保护作用。有研究证明HO-1具有强大的细胞保护作用^[5],而CO具有信号传递和抗细胞凋亡作用^[6],故推测HO-1的细胞保护功能和CO的信号传递功能可能与牙髓损伤时的自我保护和修复有关,而CO的抗细胞凋亡作用则可能在牙髓细胞的代谢中得到发挥。

本研究明确了HO-1在牙髓组织中的分布和表达,初步探讨了HO-1及其催化血红素产生的气体信号分子CO在牙髓中的作用,但其作用的具体机制及其与牙髓疾病的关系还需进一步深入研究。

- [5] O'Brien EA, Williams JH, Marshall MJ. Osteoprotegerin ligand regulates osteoclast adherence to the bone surface in mouse calvaria[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 274(2):281-290.
- [6] Shinar DM, Schmidt A, Halperin D, et al. Expression of alpha v and beta 3 integrin subunits in rat osteoclasts *in situ*[J]. *J Bone Miner Res*, 1993, 8(4):403-414.
- [7] Faccio R, Grano M, Colucci S, et al. Localization and possible role of two different alpha v beta 3 integrin conformations in resting and resorbing osteoclasts[J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(Pt 14):2919-2929.
- [8] Medhora MM, Teitelbaum S, Chappel J, et al. 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D_3 up-regulates expression of the osteoclast integrin alpha v beta 3[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(2):1456-1461.
- [9] Mimura H, Cao X, Ross FP, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 transcriptionally activates the beta 3-integrin subunit gene in avian osteoclast precursors[J]. *Endocrinology*, 1994, 134(3):1061-1066.
- [10] Li CF, Ross FP, Cao X, et al. Estrogen enhances alpha v beta 3 integrin expression by avian osteoclast precursors via stabilization of beta 3 integrin mRNA[J]. *Mol Endocrinol*, 1995, 9(7):805-813.
- [11] Rody WJ Jr, King GJ, Gu G. Osteoclast recruitment to sites of compression in orthodontic tooth movement[J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2001, 120(5):477-489.

(本文编辑 汤亚玲)

[参考文献]

- [1] 刘和亮,赵金恒.血红素氧合酶抗损伤作用研究进展[J].*中国工业医学杂志*, 2002, 15(4):228-230.
(LIU He-liang, ZHAO Jin-heng. Advances in studies on the effects of heme oxygenase on injury protection[J]. *Chinese Int Med*, 2002, 15(4):228-230.)
- [2] Craser T, Vedernikov YP, Li DS. Study on the mechanism of carbon monoxide induced endothelium-independent relaxation in porcine coronary artery and vein[J]. *Biomed Biochim Acta*, 1990, 49(4):293-296.
- [3] Soares MP, Vsheva A, Brouard S, et al. Modulation of endothelial cell apoptosis by heme oxygenase-1-derived carbon monoxide[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2002, 4(2):321-329.
- [4] Anderson DG, Chiego DJ Jr, Glickman GN, et al. A clinical assessment of the effects of 10% carbamide peroxide gel on human pulp tissue[J]. *J Endod*, 1999, 25(4):247-250.
- [5] Ouerbein LE, Choi AM. Heme oxigenase: Colors of defense against cellular stress[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279(6):L1029-L1037.
- [6] Ouerbein LE, Bach FH, Alam J, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway[J]. *Nat Med*, 2000, 6(4):422-428.

(本文编辑 汤亚玲)