

· 论著 ·

# 烟草烟雾对大鼠牙槽骨内牙本质基质蛋白1 C末端表达的影响

侯秀敏<sup>1</sup> 马肃<sup>1</sup> 刘培红<sup>1</sup> 秦春林<sup>2</sup> 陈力<sup>2</sup>

(1.哈尔滨医科大学口腔医院牙周科;

2.哈尔滨医科大学附属第一医院黑龙江学者实验室 哈尔滨 150001)

**[摘要]** 目的 观察烟草烟雾对大鼠牙槽骨内牙本质基质蛋白(DMP)1 C末端表达的影响。方法 建立试验大鼠吸入烟草烟雾模型,免疫组织化学法检测 DMP1 C末端在大鼠牙槽骨内的表达。结果 阳性对照组: DMP1 C末端深棕黄色连续线形表达于固有牙槽骨的钙化前缘,形成明显的矿化条带;棕黄色颗粒状密布于骨细胞周围,浅棕黄色颗粒状散布于矿化区域;上述表达由牙槽嵟顶至根尖方向逐渐上调。试验组: DMP1 C末端表达部位同对照组,表达强度下调且随试验时间的延长下调加重。结论 吸入烟草烟雾可下调大鼠牙槽骨内 DMP1 C末端的表达;在试验周期内, DMP1 C末端的表达下调呈时间依赖性。

**[关键词]** 烟草烟雾; 牙槽骨; 矿化; 牙本质基质蛋白

**[中图分类号]** Q 786 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.04.002

**The effect of tobacco smoke on the expression of the dentin matrix protein 1 C-terminal in rat alveolar bone** Hou Xiumin<sup>1</sup>, Ma Su<sup>1</sup>, Liu Peihong<sup>1</sup>, Qin Chunlin<sup>2</sup>, Chen Li<sup>2</sup>. (1. Dept. of Periodontics, Hospital of Stomatology, Harbin Medical University, Harbin 150001, China; 2. Heilongjiang Scholars Laboratory, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effect of tobacco smoke on the expression of the dentin matrix protein (DMP)1 C-terminal in rat alveolar bone. **Methods** The model of the test rats inhaled tobacco smoke was established. The expression of the DMP1 C-terminal in the alveolar bone was detected by immunohistochemistry. **Results** Control group: DMP1 C-terminal continuous linear expressed in the calcification front of the proper alveolar bone and it is dark brown yellow, apparent mineralization strap was formed; DMP1 C-terminal brown granular dense clouded around the bone cells and light brown yellow fine granules scattered in the mineralized zone; the expression of the DMP1 C-terminal gradually increased from the alveolar ridge crest to root tip. Experimental group: DMP1 C-terminal parts of the same expression in the control group, decreased intensity of expression, this change increased with prolonged test time. **Conclusion** Inhalation of tobacco smoke can decrease the expression of the DMP1 C-terminal in rat alveolar bone. The effect presents time dependent in this study period.

**[Key words]** tobacco smoke; alveolar bone; mineralization; dentin matrix protein

吸烟是牙周疾病一项重要的危险因素<sup>[1]</sup>。长期暴露于烟草烟雾中的大鼠牙槽骨矿化组织的比例明显降低<sup>[2]</sup>,但其影响机制尚不清楚。研究显示,硬组织的矿化受控于多种因素:1)碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP);2)碱性成纤维细胞

生长因子;3)力学刺激;4)磷酸化非胶原蛋白等<sup>[3-4]</sup>。牙本质基质蛋白(dentin matrix protein, DMP)1作为磷酸化非胶原蛋白成员之一,参与骨和牙本质的矿化<sup>[4]</sup>。

功能性 DMP1 主要以 N 末端和 C 末端<sup>[5]</sup>的形式存在于骨和牙本质中,其中 DMP1 C末端是磷灰石成核剂,可以促进骨和牙本质矿化<sup>[6-7]</sup>。本研究以大鼠为研究对象,观察烟草烟雾对其牙槽骨内 DMP1 C末端表达的影响,探讨烟草烟雾对牙槽骨矿化的影响机制。

[收稿日期] 2011-10-12; [修回日期] 2012-04-16

[基金项目] 哈尔滨市科技局创新人才研究专项基金资助项目(20-09RFXXS214)

[作者简介] 侯秀敏(1984—),女,山东人,硕士

[通讯作者] 马肃, Tel: 0451-85553988

## 1 材料和方法

### 1.1 药物和仪器

哈德门牌香烟：含焦油 15 mg、烟碱 1.2 mg、一氧化碳 15 mg；小鼠抗大鼠 DMP1 C 末端，即 DMP1 C-clone8G10.3 单克隆抗体(美国得克萨斯 A&M 大学贝勒牙学院生物医学系秦春林教授赠送)；免疫组织化学检测试剂盒和二氨基联苯氨基显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。有机玻璃箱：80 cm×60 cm×40 cm，带 2 个排气孔，自制；Leica DM2500 光学显微镜(德国徕卡公司)；Nikon ECLIPSE 80i 显微镜、Nikon DS-Ri1 采集系统、NIS-Elements BR3.0 图文处理系统(日本尼康公司)。

### 1.2 动物的选择分组和建模

6 周龄雄性威斯塔大鼠 30 只(哈尔滨医科大学附属第一医院实验动物中心提供)，体质量 160~180 g，随机分为试验组(20 只)和对照组(10 只)。根据吸入烟草烟雾时间，将试验组随机等分为吸入烟草烟雾 1 个月和 2 个月组。每日将试验组大鼠置于有机玻璃箱内 2 次，每次将 10 支香烟的烟雾注入箱内，每次 1 h，间隔 4 h，每周 6 d，建立吸入烟草烟雾动物模型；对照组分为阴性对照组和阳性对照组，两组均不做任何处置。所有大鼠正常水食饲养。

### 1.3 组织病理学检测

按试验设计处死各组大鼠：体积分数 10% 的水合氯醛腹腔注射麻醉，解剖并暴露心脏，体积分数 0.9% 的生理盐水和 4% 的多聚甲醛经心脏灌注内固定。取其下颌磨牙区牙周-牙体联合组织块，外固定 24 h，置于体积分数 10% 乙二胺四乙酸脱钙液中 4℃ 下脱钙。以下颌磨牙颊侧面为包埋面制作常规蜡块，5 μm 厚近远中向连续切片。选择下颌磨牙颊舌面中点处组织切片 2 张，分别行苏木精-伊红染色和免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)染色。免疫组织化学染色操作严格按照试剂盒说明书进行。

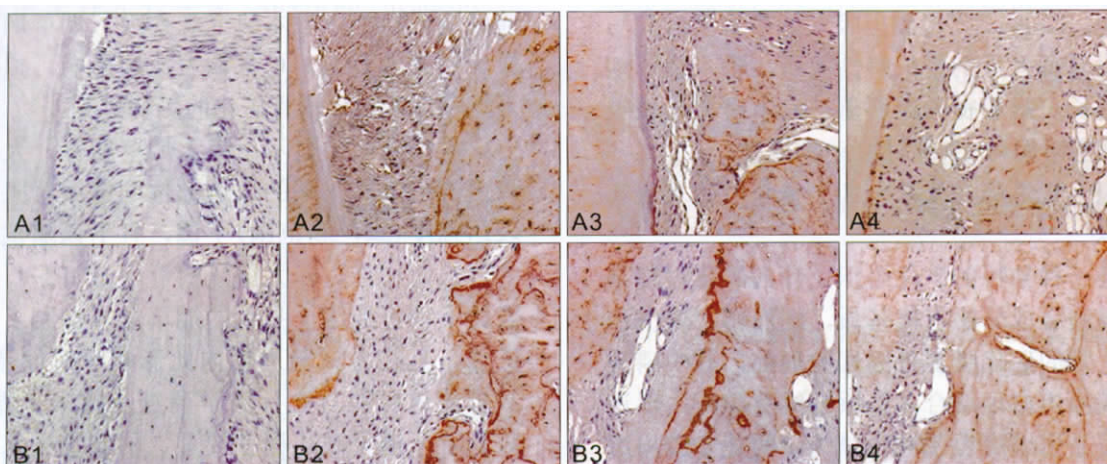
### 1.4 结果判定

DMP1 C 末端呈棕黄色颗粒为染色阳性。

## 2 结果

### 2.1 DMP1 C 末端在对照组大鼠牙槽骨内的表达

图 1A1、B1 示 DMP1 C 末端在阴性对照组大鼠牙槽骨内无表达的情况。图 1A2、B2 阳性对照组示 DMP1 C 末端深棕黄色连续线形表达于固有牙槽骨的钙化前缘，形成明显的矿化条带；棕黄色密集颗粒状密布于骨细胞周围，浅棕黄色细小颗粒状散布于矿化区域；由牙槽峭顶至根尖方向，DMP1 C 末端表达强度逐渐增强，矿化条带逐渐增宽。



A: 牙槽峭部位; B: 牙根尖部位; A1、B1: 阴性对照; A2、B2: 阳性对照; A3、B3: 吸入烟草烟雾 1 个月; A4、B4: 吸入烟草烟雾 2 个月。

图 1 大鼠牙槽骨内 DMP1 C 末端表达 IHC ×200

Fig 1 Express of DMP1 C-terminal in rat alveolar bone IHC ×200

### 2.2 DMP1 C 末端在试验组大鼠牙槽骨内的表达

DMP1 C 末端表达部位同对照组，但其表达强度下降。吸入烟草烟雾 1 个月组：DMP1 C 末端连续线形表达于固有牙槽骨的钙化前缘，形成

矿化条带，颗粒状分布于骨细胞周围和矿化区域；相对于对照组，其表达强度轻度下降；由牙槽峭顶至根尖方向，DMP1 C 末端的表达颜色逐渐加深，矿化条带增宽(图 1A3、B3)。吸入烟草烟雾

2个月组：DMP1 C末端连续线形表达于固有牙槽骨的钙化前缘，矿化条带不明显，颗粒状散布于骨细胞周围和矿化区域；相对于1个月组，其表达颜色明显变浅，矿化条带明显变窄；由牙槽嵫顶至根尖方向，DMP1 C末端的表达颜色逐渐加深，矿化条带增宽(图1A4、B4)。

### 3 讨论

#### 3.1 动物模型的建立

大鼠骨骼的解剖结构和骨代谢与人类有众多相似之处，故常被用于骨代谢的研究<sup>[8]</sup>。César-Neto等<sup>[2]</sup>采用单纯烟熏法，即将5只300~400g的雄性威斯塔大鼠放入45cm×25cm×20cm的带有一个抽气泵和两个流入和流出管的有机玻璃箱内，每周6d，每天2次，每次给予10支香烟的烟雾8min，两个月后成功地建立了吸入烟草烟雾致大鼠牙槽骨矿物质减少的动物模型。本研究为缩短建模时间，并考虑烟草烟雾体积分数对动物全身耐受的影响，将建模条件作了如下适当改变。1)鼠龄小：雄性威斯塔大鼠于出生后40~50d性成熟，80~90d身体成熟<sup>[9]</sup>，身体成熟前骨骼仍处于生长发育阶段，成骨及矿化比较活跃，钙质量增长较快，骨代谢旺盛，可观察其快速和明显的代谢变化数据，故本研究选用6周龄160~180g的雄性威斯塔大鼠为研究对象。2)延长吸入烟草烟雾的时间：Grossi等<sup>[10]</sup>检测出吸入烟草烟雾时间与牙槽骨附着丧失呈剂量依赖性关系，吸入烟草烟雾时间越长，附着丧失越严重，故本研究延长吸入烟草烟雾时间为1h来建立动物模型。

#### 3.2 DMP1 C末端在健康大鼠牙槽骨内的表达及意义

骨是一种独特的矿化组织，骨的矿化过程是指成骨细胞合成分泌有机基质，继而钙、磷沉积的过程。骨的矿化受多种因素的调控，其中磷酸化的非胶原蛋白可结合在胶原纤维孔隙内，促进羟磷灰石晶体成核<sup>[4]</sup>。DMP1作为磷酸化非胶原蛋白成员之一，可以促进骨的矿化<sup>[6]</sup>。在骨细胞外基质中，DMP1主要以N末端和C末端两种形式存在，其中DMP1 C末端是磷灰石成核剂<sup>[5-7]</sup>。体内研究<sup>[7]</sup>显示，低血磷性佝偻病小鼠下颌骨的骨外板较少且矿化降低，出现类骨质样结构，这些类骨质样结构中的DMP1 C末端信号较弱，故认为DMP1 C末端可促进骨的矿化。

本研究结果显示：在对照组大鼠牙槽骨内，

DMP1 C末端深棕黄色连续线形表达于固有牙槽骨钙化前缘，形成明显的矿化条带；棕黄色密集颗粒状密布于骨细胞周围，浅棕黄色细小颗粒状散布于矿化区域。即DMP1 C末端主要表达于健康大鼠牙槽骨的钙化前缘和骨细胞周围，这暗示DMP1 C末端可促进大鼠牙槽骨的矿化。该结果与Zhang等<sup>[7]</sup>的研究结果相一致。

适当的咀嚼压力可直接作用于牙槽骨的成骨细胞和破骨细胞，影响牙槽骨的改建，促进牙槽骨中成纤维细胞的活跃和未分化间充质细胞的分化增殖，参与牙槽骨的代谢与改建<sup>[11]</sup>。根尖区牙槽骨位于牙根尖周围，承受来自各个方向的咀嚼力，此处矿化和改建活跃。定量研究<sup>[12]</sup>显示，机械负载可使骨细胞中DMP1增加2~3.7倍。在本研究中，健康大鼠牙槽骨内DMP1 C末端表达由牙槽嵫顶至根尖方向逐渐增强增宽，暗示此处因生物机械力的作用导致牙槽骨矿化活跃。

#### 3.3 DMP1 C末端在吸入烟草烟雾大鼠牙槽骨内的表达及意义

体外研究<sup>[13]</sup>显示，烟草中的尼古丁可通过降低AKP的活性和Ⅰ型胶原的表达来降低骨的钙化。体内研究仅从组织学水平阐述了吸入烟草烟雾可导致大鼠牙槽骨矿化组织的比例降低<sup>[2]</sup>，但其机制尚不清楚。DMP1 C末端可促进骨矿化<sup>[7]</sup>，但吸入烟草烟雾对其在大鼠牙槽骨内表达的影响目前尚缺乏报道，故本研究观察吸入烟草烟雾对大鼠牙槽骨内DMP1 C末端表达的影响，拟探讨吸入烟草烟雾对牙槽骨矿化的影响机制。

本研究结果显示：吸入烟草烟雾，大鼠牙槽骨内DMP1 C末端的表达部位同健康对照鼠，但表达强度(颜色和范围)下调，且下调随试验时间的延长而加重，即大鼠牙槽骨内DMP1 C末端的表达下调可能缘于吸入的烟草烟雾抑制了牙槽骨矿化，且在本试验周期内此影响呈时间依赖性。故推测这可能与流行病学调查及临床上看到的，吸烟者牙槽骨破坏程度较重、附着丧失水平较高有关；但吸烟对牙槽骨矿化的具体影响机制仍不清楚，尚需进一步的研究。

### 4 参考文献

- [1] Bergström J, Preber H. Tobacco use as a risk factor[J]. J Periodontol, 1994, 65(5 Suppl) 545-550.
- [2] César-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, et al. The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: A histometric study



in rats[J]. J Periodontol Res, 2006, 41(2) :118-123.

[3] 巩沅鑫, 赵先英, 刘毅敏. 成骨细胞生物矿化过程中的调控机制[J]. 重庆医学, 2009, 38(5) :596-599.

[4] Qin C, Baba O, Butler WT. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 2004, 15(3) :126-136.

[5] Qin C, Brunn JC, Cook RG, et al. Evidence for the proteolytic processing of dentin matrix protein 1. Identification and characterization of processed fragments and cleavage sites[J]. J Biol Chem, 2003, 278(36) :34700-34708.

[6] He G, Dahl T, Veis A, et al. Nucleation of apatite crystals *in vitro* by self-assembled dentin matrix protein 1[J]. Nat Mater, 2003, 2(8) :552-558.

[7] Zhang B, Sun Y, Chen L, et al. Expression and distribution of SIBLING proteins in the predentin/dentin and mandible of hyp mice[J]. Oral Dis, 2010, 16(5) :453-464.

[8] Compston JE. Sex steroids and bone[J]. Physiol Rev, 2001, 81(1) :419-447.

[9] 崔淑芳. 实验动物学[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2007 :115, 310.

[10] Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, et al. Assessment of risk for periodontal disease. Risk indicators for attachment loss[J]. J Periodontol, 1994, 65(3) :260-267.

[11] 张烈焚, 刘丽, 何福明, 等. 咬合力增强对老年大鼠磨牙牙周组织成骨和增殖细胞核抗原表达的影响[J]. 口腔医学, 2007, 27(4) :169-171, 180.

[12] Yang W, Lu Y, Kalajic I, et al. Dentin matrix protein 1 gene cis-regulation: Use in osteocytes to characterize local responses to mechanical loading *in vitro* and *in vivo*[J]. J Biol Chem, 2005, 280(21) :20680-20690.

[13] 白冰, 钟丽芳, 朱静涛. 尼古丁对成人成骨细胞生物学性能的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2009, 27(5) :483-486.

(本文编辑 刘世平)

(上接第427页)

标准影像涉及标准口内牙列影像、口内软组织影像和口外影像, ADA 对这些标准影像拍摄的部位和患者状态、涉及的牙位、拍摄时相机与中线的角度以及牙齿的咬合状态都有非常详细的规定。

美国美容牙科学会(American Academy of Cosmetic Dentistry, AACD)2011年颁布了口腔医生入会的标准试用条款, 主要针对美容牙科领域, 需要申请者提交一定数量的五大类前牙美容治疗的病例图片。对于图片的要求也有一个指南, 这个指南更有针对性, 从5个方面判断照片的质量, 分别是: 正确的颜色、正确的曝光、景深、良好的色调梯度和图像的锐度。指南对于摄影器材也有一定的要求, 相机参数设置涉及图像格式、镜头放大率和光圈大小。需要强调的是, 提交的前牙美容病例图片必须包含治疗前和治疗后完整的影像资料, 必须同时提交 RAW 格式和 JPEG 格式的文件, 完整的资料包括 12 张照片(图13)<sup>[3]</sup>。

口腔医学摄影是口腔医务工作者需要掌握的

基本技术, 可以为日常口腔临床医疗带来很多便利, 其涉及到的摄影技巧并不太复杂, 只要装备必需的基本摄影器材和辅助工具, 掌握基本的摄影技能和相应的拍摄要求以及合乎规范的流程, 一般都可以拍摄出规范的口腔数码影像。和其他类型的摄影艺术一样, 口腔数码摄影需要摄影者大量的操作实践和及时的经验总结, 同时需要对助手进行一定的培训, 拍摄出的影像质量才能得到不断提高。

致谢: 感谢李有伟、喻晓、严伟浩医师, 陈文慧、黄晓娟护师为本文照片拍摄做出的贡献。

## 5 参考文献

[1] 美国纽约摄影学院. 美国纽约摄影学院摄影教材[M]. 2版. 北京: 中国摄影出版社, 2010 :1-1234.

[2] McLaren EA, Terry DA. Photography in dentistry[J]. J Calif Dent Assoc, 2001, 29(10) :735-742.

[3] Lowe E. Digital photography: The AACD series-part one [J]. J Cos Dent, 2010, 26(1) :25-30.

(本文编辑 王姝)