

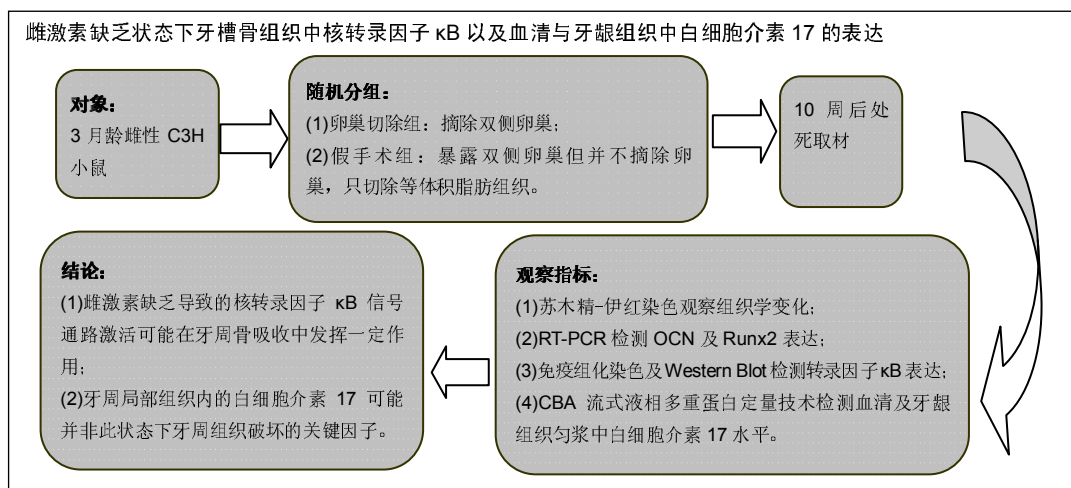
雌激素缺乏状态下牙周组织中核转录因子 κ B及白细胞介素17的表达变化

贾 智, 张丰伟, 祁星颖, 闫 潇, 华 烨, 赵梦明, 刘大勇(天津医科大学口腔医院牙体牙髓科, 天津市 300070)

引用本文: 贾智, 张丰伟, 祁星颖, 闫潇, 华烨, 赵梦明, 刘大勇. 雌激素缺乏状态下牙周组织中核转录因子 κ B及白细胞介素17的表达变化[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(24):3796-3802.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.24.005 ORCID: 0000-0001-6378-3493(贾智)

文章快速阅读:



贾智, 男, 1962 年生, 天津市人, 汉族, 1985 年天津医科大学毕业, 副教授, 主要从事牙体牙髓病学方面的研究。

通讯作者: 刘大勇, 博士, 副主任医师, 天津医科大学口腔医院牙体牙髓科, 天津市 300070

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2017)24-03796-07
稿件接受: 2017-03-17

文题释义:

白细胞介素 17: 是近年来发现的一种 T 细胞来源的细胞因子, 该家族包括 6 个配体(IL-17A-F)和 5 个受体(IL-17RA-D 和 SEF)。白细胞介素 17 与受体结合后, 通过 MAP 激酶途径和核转录因子 κ B 途径发挥其生物学作用, 在介导哮喘、多发性硬化症、类风湿关节炎、银屑病等疾病的发生、发展中具有重要的意义, 也可能在牙周炎病变的牙周组织破坏中发挥作用。

核转录因子 κ B: 是一个哺乳动物转录因子蛋白家族, 包括 5 个亚单位: p65 (RelA)、c-Rel、RelB、NF- κ B1 (p50/p105)和 NF- κ B2 (p52/p100)。核转录因子 κ B 在炎性和免疫反应中发挥重要作用。所有 5 个成员占有 N-末端区域的 300 个氨基酸, 即特定的 Rel 同源区域, 主要负责 DNA 连接, 二聚化及抑制 I κ B 蛋白相互作用。作者认为其与雌激素缺乏状态下的牙周炎发生有关。

摘要

背景: 绝经期后骨质疏松症与牙周组织疾病有着十分密切的关系, 而其作用机制尚不清楚。

目的: 通过切除卵巢建立雌激素缺乏状态下骨质疏松小鼠模型, 观察在此状态下牙槽骨组织中核转录因子 κ B 以及血清与牙龈组织中白细胞介素 17 的表达变化。

方法: 将 3 月龄雌性 C3H 小鼠随机分为卵巢切除组及假手术组。术后 10 周, 苏木精-伊红染色观察下颌骨及股骨组织学改变; RT-PCR 检测下颌骨中成骨相关因子 OCN 及 Runx2 表达变化; 免疫组化染色及 Western Blot 检测下颌骨中核转录因子 κ B 表达; CBA 流式液相多重蛋白定量技术检测血清及牙龈组织匀浆中白细胞介素 17 水平。

结果与结论: ①卵巢切除组小鼠股骨的骨皮质变薄, 骨髓腔扩大, 骨小梁变细、数目减少、密度降低、结构不完整, 骨吸收陷窝样结构增多; ②卵巢切除组牙槽骨组织中 OCN 及 Runx2 相对表达量较假手术组低; ③卵巢切除组小鼠下颌骨中核转录因子 κ B 活化形式 P65 蛋白呈阳性表达; ④卵巢切除组牙槽骨组织中核转录因子 κ B 活化形式 P65 相对表达量高于假手术组; ⑤卵巢切除组小鼠血清中白细胞介素 17 表达水平高于假手术组, 但牙龈组织中白细胞介素 17 表达水平与假手术组相比无明显变化; ⑥实验表明, 雌激素缺乏导致的核转录因子 κ B 信号通路激活可能在牙周骨吸收中发挥一定作用; 而牙周局部组织内的白细胞介素 17 可能并非此状态下牙周组织破坏的关键因子。

关键词:

组织构建; 组织工程; 卵巢切除; 雌激素; 骨代谢; 牙周组织; 核转录因子 κ B; 白细胞介素 17; 天津市自然科学基金

主题词:

骨质疏松; 绝经后; 卵巢切除术; NF- κ B; 白细胞介素 17; 组织工程

基金资助:

天津市自然科学基金一般项目(15JCYBJC50200)和重点项目(16JCZDJC32800)

Jia Zhi, Associate professor, Department of Endodontics, Hospital of Stomatology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Corresponding author: Liu Da-yong, M.D., Associate chief physician, Department of Endodontics, Hospital of Stomatology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Effect of estrogen deficiency on the expression levels of nuclear factor-kappa B and interleukin-17 in periodontal tissues

Jia Zhi, Zhang Feng-wei, Qi Xing-ying, Yan Xiao, Hua Ye, Zhao Meng-ming, Liu Da-yong (Department of Endodontics, Hospital of Stomatology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract

BACKGROUND: There is a very close relationship between osteoporosis and periodontal disease in postmenopausal women, but the mechanism remains unclear.

OBJECTIVE: To investigate the expression of nuclear factor- κ B in the alveolar bone and interleukin-17 in the serum and gingiva in the mouse model of osteoporosis caused by ovariectomy.

METHODS: Female mice aged 3 months were randomly divided into ovariectomy and sham operation groups. At 6 months after surgery, the mouse models were evaluated histologically on the submandibular bone and thigh bone stained with hematoxylin and eosin. In the submandibular bone, the expression levels of OCN and Runx2 were detected by RT-PCR, and the expression level of nuclear factor- κ B was detected by immunohistochemical staining and western blot assay. Besides, the expression level of interleukin-17 in the serum and gingival homogenate was evaluated using Cytometric Beads Array.

RESULTS AND CONCLUSION: The thigh bone in the ovariectomy group revealed the thin cortical bone, enlarged marrow cavity, and increased resorption lacunae, as well as fewer, thinner trabeculae with lower density and irregular structure. Compared with the sham operation group, the expression levels of OCN and Runx2 in the alveolar bone were decreased in the ovariectomy group. The activation of nuclear factor- κ B (P65) appeared with P65 positive expression in the submandibular bone in the ovariectomy group, and the relative expression level was higher than that in the sham operation group. The serum level of interleukin-17 in the ovariectomy group was higher than that in the sham operation group, but the level in the gingival tissue showed no significant difference between the two groups. These results indicate that estrogen deficiency after ovariectomy can activate nuclear factor- κ B signal pathway to play a role in periodontal osteolysis. However interleukin-17 in the local periodontal tissue may not be a key cytokine to damage the periodontal tissue.

Subject headings: Osteoporosis, Postmenopausal; Ovariectomy; NF-kappa B; Interleukin-17; Tissue Engineering

Funding: the Natural Science Foundation of Tianjin, No. 15JCYBJC50200 and 16JCZDJC32800

Cite this article: Jia Z, Zhang FW, Qi XY, Yan X, Hua Y, Zhao MM, Liu DY. Effect of estrogen deficiency on the expression levels of nuclear factor-kappa B and interleukin-17 in periodontal tissues. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(24):3796-3802.

0 引言 Introduction

绝经期后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是一种与雌激素缺乏直接相关,以骨量减少、骨组织微结构破坏为特征,导致骨脆性增加且易于骨折的代谢性骨疾病^[1]。牙周组织疾病与绝经期后骨质疏松症有着十分密切的关系,有研究显示,绝经期后骨质疏松症患者罹患牙龈出血、牙周附着丧失以及牙周骨吸收的比例远高于正常人群^[2-3],因此推测雌激素对维持牙周组织健康具有重要作用^[4]。然而,雌激素通过何种机制发挥这一作用目前尚知之甚少。

核转录因子 κ B(NF- κ B)是一种具有多向性调节作用的蛋白质分子,实验表明核转录因子 κ B信号通路能够诱导破骨分化基因表达,延长破骨细胞的生命,促进骨吸收^[5-7];而核转录因子 κ B对成骨活性的影响尚不很清楚。最近有研究报道小鼠雌激素缺乏伴随成骨细胞核转录因子 κ B活性增强,应用小分子抑制剂抑制核转录因子 κ B活性,骨形成和骨丧失之间的平衡会得到明显恢复,骨量缺失减少^[8-10]。由此推测核转录因子 κ B可能是雌激素缺乏状态下成骨缺陷中的重要调节因素之一。

此外,有研究发现Th17作为惟一促进破骨细胞发生的辅助性T细胞,与骨质疏松症的发生有密切联系^[11]。Th17分泌的代表性细胞因子白细胞介素17一方面直接促进基质

细胞表达RANKL,另一方面可活化局部炎症反应,促进炎症因子如白细胞介素1、白细胞介素6、肿瘤坏死因子的释放^[12],进而提高基质细胞RANKL的表达,从而加速破骨细胞成熟。因此,白细胞介素17也可能是雌激素缺乏状态下发生牙周骨吸收的关键细胞因子之一。

实验基于上述研究结果及推断假设,旨在检测雌激素缺乏状态下牙槽骨组织中核转录因子 κ B的表达变化以及血清与牙龈组织中白细胞介素17的表达变化,从而为探讨绝经后妇女牙周骨吸收这一临床常见病的发病机制提供一定线索。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 对比观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2013年1月至2015年5月在天津医科大学口腔医学院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物及分组 3月龄C3H雌性小鼠20只,由首都医科大学动物实验中心提供,动物批号SCX(J)2010-0003,体质量(25 $\pm$ 5)g。将20只小鼠随机均分为卵巢切除组和假手术组,每组10只。

1.3.2 主要试剂和仪器 EDTA(Sigma公司);RIPA裂解液蛋白酶抑制剂(Aprotinin, Leupeptin, PMSF)、丙烯酰胺、

N,N'-亚甲双丙烯酰胺、SDS(十二烷基磺酸钠, 超纯)、Tris Base(三氢甲基氨基甲烷)、甘氨酸、TEMED(四甲基乙二胺)、PAS(过硫酸铵)、DTT(二硫苏糖醇)、 β -巯基乙醇、考马斯亮蓝R-250、溴酚蓝、Tween-20(美国Sigma公司); BCA 蛋白定量试剂盒(美国Pierce公司); ECL试剂盒(美国Miliplore公司); NF- κ B P65标记兔抗鼠IgG(北京博奥森生物技术有限公司); PVDF膜(美国Miliplore公司); Human and Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine(Becton Dickinson US); 低温离心机(美国Heraeus公司); PCR扩增仪(美国PerkinElmer公司); 全自动酶标仪(美国Beckman公司); 电泳仪(北京六一仪器厂); 流式细胞仪(FACSCalibur, Becton Dickinson US)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物造模及标本制作 小鼠称质量, 麻醉。卵巢切除组小鼠行背部切口摘除双侧卵巢; 假手术组小鼠行背部切口暴露双侧卵巢但并不摘除卵巢, 只切除等体积脂肪组织。

造模手术后10周, 从小鼠眼眶取血, 置于无菌不含抗凝剂的试管中, 室温静置2 h, 放置4 °C过夜, 3 000 r/min离心10 min, 分离收集上层血清, 置于-80 °C冰箱内冷冻保存。

取血后将小鼠麻醉下脱颈处死, 取小鼠下颌颊侧牙龈组织, 在冰冷生理盐水中漂洗, 除去血液, 滤纸拭干, 称质量, 放入5 mL或10 mL的小烧杯内; 用移液管量取0.86%冰冷生理盐水(生理盐水体积总量为组织块质量的9倍)于烧杯中, 用眼科剪尽快剪碎组织块(冰水浴中进行), 用组织捣碎机10 000-15 000 r/min上下研磨制成10%组织匀浆; 3 000 r/min离心10 min; 分离收集上层血清, 于-80 °C冰箱内冷冻保存。

取下颌骨及股骨, 下颌骨自中线处分割为左右两半; 一半放入液氮中保存以备RT-PCR和Western-blot之用, 另一半连同股骨以体积分数为10%甲醛溶液固定3 d后, 15% EDTA脱钙一两个月(每日更换脱钙液), 脱钙完全后, 自动脱水机梯度脱水, 石蜡包埋, 5 μ m厚度连续切片, 以备苏木精-伊红染色和免疫组化之用。

1.4.2 RT-PCR检测

总RNA的提取: 将小鼠下颌牙槽骨组织称重并移至经DEPC处理的研钵中, 用骨钳将骨组织块夹碎, 加入少量液氮, 迅速研磨至粉末状。以骨组织: Trizol=100 mg: 1 mL比例加入TriZol, 彻底混匀后室温放置5 min。将其移至1.5 mL无RNA酶EP管中; 每管加入200 μ L氯仿, 剧烈振荡15 s混匀至乳糜状, 室温放置2.0-3.0 min; 4 °C 12 000 r/min离心15 min; 提取上层RNA, 转移至新EP管中, 加入4 °C异丙醇, 室温孵育10 min; 10 000 r/min 4 °C离心10 min; 弃上清, 加入1 mL体积分数为75%冰乙醇洗涤沉淀, 4 °C 12 000 r/min离心15 min; 弃上清, 加入1 mL体积分数为75%冰乙醇, 剧烈涡旋, 4 °C 7 500 r/min离心

5 min; 弃上清, 室温放置晾干10 min, 使RNA沉淀干燥; 加入50 μ L RNA溶解液溶解沉淀, 60 °C孵育10 min后保存样品于液氮罐中。

反转录合成cDNA: 加入表1所示成分, 轻轻混匀, 85 °C加热失活TransScript RT。

表1 反转录体系

Table 1 Reverse transcription system

反应体系	体积
Total RNA/mRNA	50 ng-5 μ g/5-500 ng
Anchored Oligo(dT) ₁₈ (0.5 g/L)	1 μ L
2 $\times$ TS Reaction Mix	10 μ L
TransScript TM RT/RI Enzyme Mix	1 μ L
RNase-free Water to 20 μ L	20 μ L

引物设计: 根据GeneBank中Runx2、OCN(Balap)、GAPDH的mRNA序列, 应用Oligo引物设计软件设计引物序列如下:

Runx2 (5 865 bp, NM_009820.4)基因片段引物序列: 上游: 5'- CGG GAA TGA GAA CTA CTC C-3', 下游: 5'- GGA TTA AAA GGA CTT GGT GCA-3', 扩增产物长度363 bp。

OCN (Bglap) (494 bp, NM_007541.2)基因片段引物序列: 上游: 5'- ACA CCA TGA GGA CCA TCT TTC T-3', 下游: 5'- ACA CCC TCT TCC CAC ACT GTA-3', 扩增产物长度306 bp。

GAPDH(1 648 bp, XM_003085777.1)基因片段引物序列: 上游: 5'- CCA CAG TCC ATG CCA TCA CT-3', 下游: 5'- CCA CAG TCC ATG CCA TCA CT-3', 扩增产物长度268 bp。

PCR反应及产物分析: 在EP管中配置如下反应体系(总体积50 μ L), 见表2。制胶, 电泳, 成像分析。

表2 PCR 反应体系

Table 2 PCR system

反应体系	体积	终浓度
cDNA	2 μ L	As required
上游引物(10 μ mol/L)	1 μ L	0.2 μ mol/L
下游引物(10 μ mol/L)	1 μ L	0.2 μ mol/L
2 $\times$ TransTaq TM HiFiPCRSuperMix II	25 μ L	1 $\times$
加 dd H ₂ O 到 50 μ L	50 μ L	Not applicable

1.4.3 Western blot检测

小鼠下颌骨总蛋白的提取: 小鼠骨组织称质量, 研磨。每100 g组织加1 mL PMSF裂解液, 摇匀后置于冰上。冰上裂解30 min-1 h, 然后用移液器将组织碎片和裂解液移至1.5 mL离心管中。4 °C 12 000 r/min离心10 min后, 去上清。每管中加入等量的上样缓冲液。煮沸15-20 min, 置于室温或冰上晾干, 测定蛋白浓度。SDS-PAGE电泳, 用DYY-III 40 L型电转仪将电泳后的凝胶上蛋白质转移至PVDF膜上。

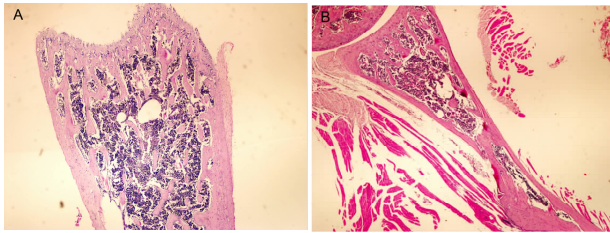


图 1 苏木精-伊红染色示股骨骨小梁及骨髓腔结构($\times 100$)
Figure 1 Morphology of trabeculae and marrow cavity of the thigh bone (hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)
图注: 图中 A 为假手术组骨小梁密集排列, 互相连接成网状结构, 骨小梁厚度大, 其间距小; B 为卵巢切除组骨小梁连接中断, 明显稀少, 明显变细, 间距增宽。

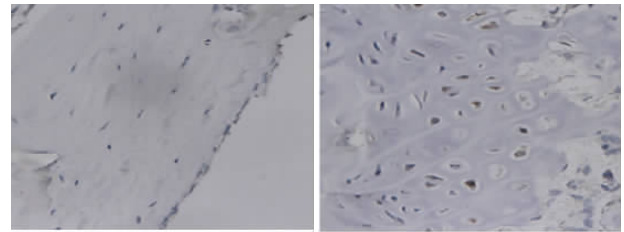


图 4 两组小鼠牙槽骨软骨细胞 NF- κ B P65 表达($\times 100$)
Figure 4 Expression of nuclear factor- κ B (P65) in the mouse alveolar chondrocytes in the two groups ($\times 100$)
图注: 卵巢切除组软骨细胞 NF- κ B P65 呈阳性表达, 而假手术组未见明显 NF- κ B P65 表达。

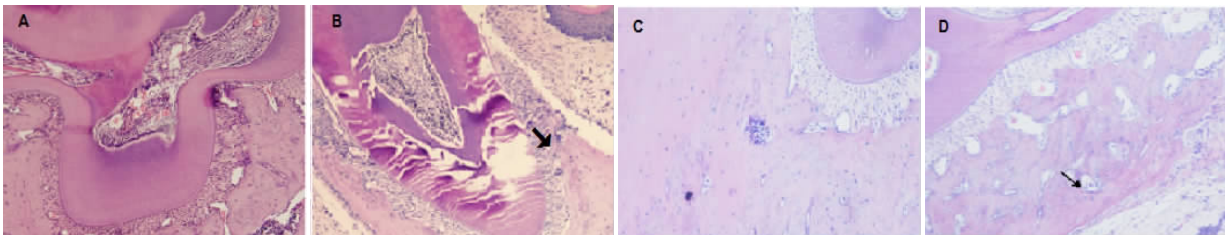


图 2 苏木精-伊红染色示牙槽骨结构($\times 100$)
Figure 2 Alveolar bone structure (hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)
图注: A 和 C 为假手术组, B 和 D 为卵巢切除组。箭头所示为水平型吸收的牙槽骨和骨陷窝。

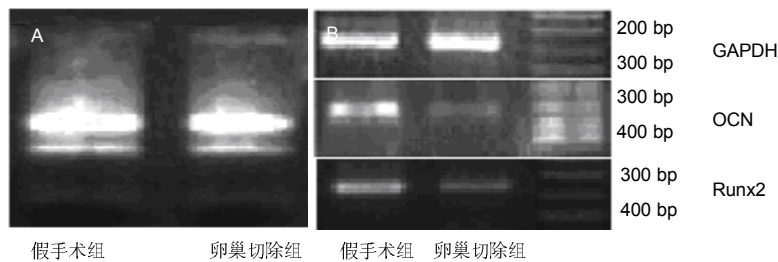


图 3 两组小鼠牙槽骨总 RNA 电泳图(A)和 OCN 和 Runx2 mRNA 扩增情况(B)
Figure 3 RNA electrophoretogram of the mouse alveolar bone (A) and OCN and Runx2 mRNA amplification (B) in the two groups

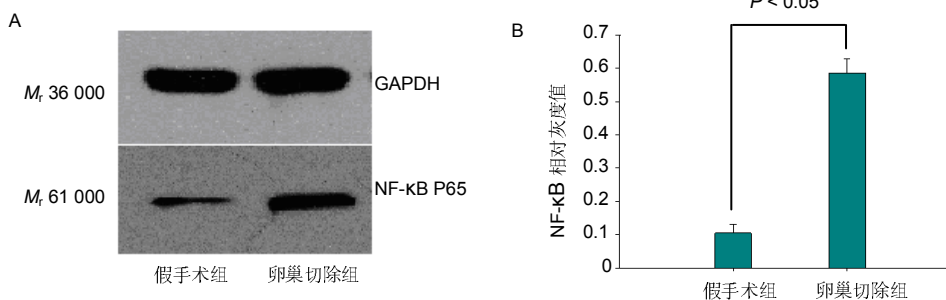


图 6 两组小鼠 NF- κ B 的 Western blot 结果(A)及相对灰度值柱状图(B)
Figure 6 Western blot assay result (A) and relative gray scale histogram (B) of nuclear factor- κ B in the mice of two groups

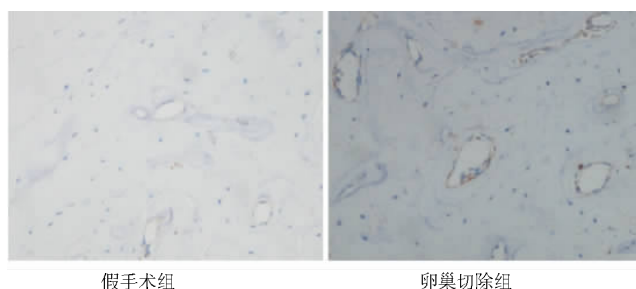


图 5 两组小鼠牙槽骨成骨细胞 NF- κ B P65 表达($\times 100$)
Figure 5 Expression of nuclear factor- κ B (P65) in the mouse alveolar osteoblasts in the two groups ($\times 100$)
图注: 卵巢切除组成骨细胞 NF- κ B P65 呈阳性表达, 而假手术组未见明显 NF- κ B P65 表达。

蛋白质的免疫检测: TBS-T洗膜, 按 $100 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 加入封闭液, 并以适宜比例加入一抗, 4°C 过夜, NF- κ B P65 抗体的稀释比例为 $1:150$, GAPDH抗体的稀释比例为 $1:2000$; TBS-T洗膜, 按 $100 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 加入封闭液, 并以 $1:2000$ 加入HRP标记的羊抗鼠二抗, 在摇床上室温孵育 1h , TBS-T洗膜。ECL显影, 胶片经凝胶成像分析系统扫描, NF- κ B P65的相对含量 $=(\text{NF-}\kappa\text{B条带灰度值}/\text{GAPDH条带灰度值})\times 100\%$ 。

1.4.4 苏木精-伊红染色 烤片至溶蜡后依次入二甲苯、甲苯脱蜡至切片透明; 入体积分数为 100% , 95% 乙醇脱水;

流水冲洗; 苏木精染色 5 min, 清洗; 1% 盐酸水溶液分化 10 s (切片由蓝变红); 清水洗返蓝 30 min; 0.05% 伊红染色 1 min; 体积分数为 95%、100% 乙醇依次脱水; 入二甲苯、甲苯中透明 4 min; 中性树脂封固; 镜下观察。

1.4.5 免疫组化染色 微波炉中 65 °C 烤片 10 min; 迅速放入二甲苯 I、II、III 中各 5 min; 置入无水乙醇、体积分数为 95%、70%、50%、30% 乙醇各 3 min; 在 0.3% PBST 中清洗 3 次, 每次 5 min; pH 6.0 柠檬酸缓冲液中进行抗原修复: 70 °C 加热 2 h, 室温冷却 30 min; 0.3% PBST 清洗 3 次; 3% BSA 室温封闭 30 min; PBS 清洗; 在湿盒中一抗 4 °C 孵育过夜; 0.3% PBST 中清洗 3 次; 滴加二抗, 避光室温孵育 1.0–2.0 h; PBS 清洗 3 次; DAB 显色; 冲洗, 晾干, 封固; 镜下观察。

1.4.6 CBA 流式液相多重蛋白定量分析 CBA 流式操作采用 CBA Human and Mouse Th1/Th2/Th17 试剂盒进行。严格按照试剂盒说明书准备 1:2 至 1:256 序列稀释标准品及捕获微球, 并取 500 μL 1:256 反应稀释液作为 0 ng/L 的阴性对照; 取出血清及牙龈组织匀浆样本, 室温解冻, 在冷冻离心机离心 15 min (1 000 r/min), 取上清, 获得组织待测样品; 向新试管中依次加入 50 μL 混合捕获微球、50 μL 组织待测样品、50 μL Th1/Th2/Th17 PE 检测试剂, 室温避光孵育 3 h, 而后加入 1 mL 洗液, 200 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清, 加入 300 μL 洗液后重悬, 获得流式细胞仪待测样品; 以 FITC 为阳性对照、PE 为阴性对照, 在流式细胞仪下检测标准品及待测样品; 使用 FCAP Array 软件分析数据, 计算待测血液及牙龈组织匀浆样品中白细胞介素 17 水平。

1.5 主要观察指标 ① 雌激素缺乏状态下股骨及下颌骨组织学变化; ② 成骨相关因子 OCN 及 Runx2 基因及蛋白水平; ③ NF- κB 水平; ④ 白细胞介素 17 水平。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计软件, 组间比较采用方差分析, SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 雌激素缺乏状态下股骨及下颌骨组织学变化 苏木精-伊红染色结果显示: 假手术组小鼠股骨骨小梁密集排列, 互相连接成网状结构, 骨小梁厚度大, 其间距小 (图 1A); 卵巢切除小鼠骨小梁连接中断, 明显稀少, 明显变细, 间距增宽 (图 1B), 牙槽骨高度降低, 牙槽骨吸收; 骨小梁的间隙较大, 骨组织界面可以看见较多的骨吸收陷窝及破骨细胞, 提示骨代谢呈骨吸收活跃状态, 箭头所示分别为水平型吸收的牙槽骨和骨陷窝 (图 2)。

2.2 雌激素缺乏状态下成骨相关因子表达变化 对小鼠下颌骨骨组织总 RNA 进行紫外分光光度计检测, $A_{260}/A_{280\text{ nm}}$ 大于 1.8, 提示 RNA 纯度较好; RNA 样品经琼脂糖凝胶电泳, 可清晰看见 28 s 和 18 s 条带, 提示 RNA 未降解 (图 3A)。

电泳所得成骨相关因子 OCN 和 Runx2 的 RT-PCR 凝胶图像见 图 3B。经 Quantity one 进行灰度值分析, 卵巢切除组下颌骨 OCN 相对表达量为 $0.166\ 8 \pm 0.047\ 0$, 假手术组为 $0.539\ 1 \pm 0.129\ 3$, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 卵巢切除组下颌骨 Runx2 相对表达量为 $0.306\ 4 \pm 0.048\ 3$, 假手术组为 $0.581\ 7 \pm 0.113\ 1$, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

2.3 雌激素缺乏状态下 NF- κB 表达变化 免疫组化染色结果显示: 卵巢切除组小鼠下颌骨中软骨细胞和成骨细胞 NF- κB P65 均呈阳性表达, 而假手术组未见明显 NF- κB P65 表达 (图 4, 5)。

Western-blot 结果显示: 卵巢切除组小鼠牙槽骨 NF- κB P65 的条带较假手术组条带颜色清晰且粗大 (图 6A); 成像扫描经 Quantity one 进行灰度值分析, 卵巢切除组下颌骨 NF- κB P65 相对表达量为 $0.585\ 4 \pm 0.043\ 0$, 假手术组为 $0.104\ 5 \pm 0.027\ 0$, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$, 图 6B)。

2.4 雌激素缺乏状态下白细胞介素 17 表达变化 卵巢切除组小鼠血清中白细胞介素 17 相对表达量为 3.313 ± 0.203 , 假手术组为 1.417 ± 0.204 , 差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 而在牙龈组织中, 卵巢切除组小鼠白细胞介素 17 相对表达量为 1.050 ± 0.703 , 假手术组为 1.167 ± 0.662 , 差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论 Discussion

3.1 雌激素缺乏与牙周骨吸收 绝经期后骨质疏松症在中老年妇女中发病率极高。在为数众多的绝经期后骨质疏松症患者中, 除骨质疏松带来的腰酸背痛、形体改变等全身性影响外, 牙周骨吸收及其导致的咀嚼无力、牙齿移位、牙齿脱落等也是影响患者生活质量的重要方面^[13-14]。要实现绝经期后骨质疏松症患者牙周骨组织破坏的精准治疗, 需明确其发生的病理生理基础, 即探讨雌激素缺乏造成牙周骨吸收的机制。

牙周骨形成是一个高度协调的动态平衡过程, 这一过程主要由成骨细胞和破骨细胞参与, 是骨吸收与骨形成两方面综合作用的结果^[15]。雌激素能直接抑制破骨细胞活性, 当雌激素水平降低时, 破骨细胞在活性和数量上均超过成骨细胞, 因此破骨细胞的骨吸收作用增强^[16-17]。而雌激素对成骨细胞的影响可能更为复杂, 一方面, 雌激素可通过激活成骨细胞表面的雌激素受体进而抑制刺激破骨的细胞因子 (肿瘤坏死因子, 白细胞介素 1, 白细胞介素 6, 白细胞介素 17 等) 的释放^[18]; 另一方面, 雌激素可能通过某种机制直接刺激成骨细胞, 促进成骨细胞增殖与分化、骨胶原形成及骨基质合成^[19], 因此雌激素水平下降时, 对其较为敏感的牙周组织将出现骨形成小于骨吸收, 表现为临床可见的牙周骨量丧失。本实验中, 也观察到雌激素缺乏状态下, 下颌牙槽骨出现成骨标记物 (OCN, Runx2) 表达下降, 再次证实雌激素缺乏可导致成骨抑制。

3.2 核转录因子 κB 与牙周骨吸收 核转录因子 κB 是一种具有多向性调节作用的蛋白质分子^[20-22],广泛存在于各类细胞中,参与调控趋化因子、细胞激酶、细胞黏附因子、生长因子及早期反应的蛋白质分子基因的转录。核转录因子 κB 可以诱导促炎症基因和免疫应答基因的表达,促进细胞凋亡;又能诱导生存基因表达,起抗凋亡作用^[23]。在静息的细胞中,核转录因子 κB 和抑制单位 $\text{I}\kappa\text{B}$ (包括 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, $\text{I}\kappa\text{B}\beta$, $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ 和 $\text{I}\kappa\text{B}\gamma$)形成复合体,以无活性形式存在于胞浆中。

受到肿瘤坏死因子 α 或白细胞介素 1β 等外界刺激,活化的 $\text{I}\kappa\text{B}$ 激酶复合体(IKK)将 $\text{I}\kappa\text{B}$ 磷酸化,导致其泛素化和被26S蛋白酶体降解。这个过程使得核转录因子 κB 二聚体转移到细胞核内,与特异性 κB 序列结合,诱导相关基因转录^[24]。越来越多的实验表明核转录因子 κB 信号通路能够诱导破骨分化基因表达,延长破骨细胞的生命,促进骨吸收^[25-27];而核转录因子 κB 对成骨细胞的活性和成骨作用的影响知之甚少。

实验采用免疫组化和Western blot检测下颌牙槽骨中核转录因子 κB 的表达水平。结果显示卵巢切除组小鼠下颌骨组织核转录因子 κB 异常活化,较假手术组表达强烈。Chang等^[28]通过研究证明在骨质疏松症和炎性骨紊乱等疾病中,针对性抑制核转录因子 κB 不仅能够抑制骨吸收,而且促进骨形成,阻止骨质疏松症的骨丧失。卵巢切除组小鼠成骨细胞中核转录因子 κB 异常活化,其可能存在的机制有2种:一是配体依赖模式,生理条件下,雌激素激活成骨细胞表面雌激素受体与核转录因子 κB 发生相互作用,从而直接抑制核转录因子 κB 转录^[29],而在雌激素缺乏状态下,这种负向调节作用减弱,导致成骨细胞核转录因子 κB 基础活性升高;二是雌激素缺乏状态下肿瘤坏死因子、白细胞介素1、白细胞介素6、白细胞介素7等促炎因子通过T细胞和其他细胞高度表达^[30],从而刺激成骨细胞的核转录因子 κB 活性。

3.3 白细胞介素17与牙周骨吸收 白细胞介素17是近年来新发现的Th细胞亚类Th17所分泌的代表性细胞因子^[11],其在破骨过程中的作用可分为直接和间接2个方面:一方面可直接促进基质细胞表达RANKL;另一方面可活化局部炎症反应,促进白细胞介素1、白细胞介素6、肿瘤坏死因子等炎性因子的释放^[12],进而间接促进基质细胞RANKL的表达;RANKL信号通路活跃进而促进破骨细胞成熟^[31]。由于T细胞产生的细胞因子是绝经期后骨质疏松症破骨细胞形成的驱动程序,而分泌白细胞介素17的Th17被认为是惟一促进破骨细胞发生的Th细胞,绝经期后骨质疏松症患者牙周骨吸收的发生可能与白细胞介素17存在相关性^[32-35]。而作者实验结果显示,虽然卵巢切除组小鼠血清中白细胞介素17表达升高,但在牙龈组织中白细胞介素17表达并无明显变化,因此推断雌激素缺乏可能并不是通过白细胞介素17激发破骨过程,即白细胞介素17不是雌激素缺乏状态下

牙周骨吸收的主要因素。雌激素缺乏状态下牙周骨吸收的主要影响因素仍是菌斑细菌及其产物引起的炎性反应。同时由于雌激素缺乏状态下宿主免疫功能受损,导致其抗炎基因低表达,清除感染细菌的能力下降,从而加重牙槽骨的吸收。

致谢: 感谢王婧婷医师为文章的撰写提供指导。

作者贡献: 实验设计为刘大勇,实验实施为贾智、张丰伟、祁星颖、闫潇、华辉,实验评估为赵梦明,资料收集为祁星颖。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经首都医科大学动物实验中心动物实验伦理委员会批准,批准号为SCX(J)2010-0003。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章撰写与编辑修改后遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE 指南)。

文章查重: 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 通讯作者对于研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 肖建德. 实用骨质疏松学[M]. 北京:科学出版社, 2004: 274-276.
- [2] Pascarella A, Ciatti R, Pascarella F, et al. Treatment of articular cartilage lesions of the knee joint using a modified AMIC technique. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2010; 18(4):509-513.
- [3] Passos JS, Vianna MI, Gomes-Filho IS, et al. Osteoporosis/osteopenia as an independent factor associated with periodontitis in postmenopausal women: a case-control study. Osteoporos Int. 2013;24(4):1275-1283.
- [4] 刘大勇. VEGF在卵巢切除大鼠实验性牙周炎牙周组织表达的实验研究[D]. 天津:天津医科大学, 2005.
- [5] Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, et al. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. Science. 2000; 289(5488):2363-2366.
- [6] Jimi E, Fukushima H. NF-kB signaling pathways and the future perspectives of bone disease therapy using selective inhibitors of NF-kB. Clin Calcium. 2016;26(2):298-304.
- [7] Huh JE, Jung IT, Choi J, et al. The natural flavonoid galangin inhibits osteoclastic bone destruction and osteoclastogenesis by suppressing NF-kB in collagen-induced arthritis and bone marrow-derived macrophages. Eur J Pharmacol. 2013;698(1-3): 57-66.

- [8] Clowes JA, Riggs BL, Khosla S. The role of the immune system in the pathophysiology of osteoporosis. *Immunol Rev.* 2005;208:207-227.
- [9] Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3318-3325.
- [10] Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1186-1194.
- [11] Haeckel R, Hänecke P. Application of saliva for drug monitoring. An in vivo model for transmembrane transport. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1996;34(3):171-191.
- [12] Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol.* 2007; 19(6):652-657.
- [13] Palacios S, Borrego RS, Forteza A. The importance of preventive health care in post-menopausal women. *Maturitas.* 2005;52 Suppl 1:S53-60.
- [14] Lai PS, Chua SS, Chan SP. Impact of pharmaceutical care on knowledge, quality of life and satisfaction of postmenopausal women with osteoporosis. *Int J Clin Pharm.* 2013;35(4):629-637.
- [15] Deal C. Potential new drug targets for osteoporosis. Potential new drug targets for osteoporosis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2009;5(1):20-27.
- [16] Ogita M, Rached MT, Dworakowski E, et al. Differentiation and proliferation of periosteal osteoblast progenitors are differentially regulated by estrogens and intermittent parathyroid hormone administration. *Endocrinology.* 2008; 149(11):5713-5723.
- [17] Liang L, Yu JF, Wang Y, et al. Estrogen regulates expression of osteoprotegerin and RANKL in human periodontal ligament cells through estrogen receptor beta. *J Periodontol.* 2008; 79(9):1745-1751.
- [18] Trombelli L, Penolazzi L, Torreggiani E, et al. Effect of hydroxyapatite-based biomaterials on human osteoblast phenotype. *Minerva Stomatol.* 2010;59(3):103-115.
- [19] Yao C, Sakata D, Esaki Y, et al. Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat Med.* 2009; 15(6):633-640.
- [20] Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 2004;18(18):2195-2224.
- [21] Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004;25(6):280-288.
- [22] Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* 2002;109 Suppl:S81-96.
- [23] DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. NF-kB and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev.* 2012;246(1):379-400.
- [24] Jimi E, Ghosh S. Role of nuclear factor-kappaB in the immune system and bone. *Immunol Rev.* 2005;208:80-87.
- [25] Lee ZH, Kim HH. Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305(2):211-214.
- [26] Soysa NS, Alles N. NF-kappaB functions in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378(1):1-5.
- [27] Cheng B, Li J, Du J, et al. Ginsenoside Rb1 inhibits osteoclastogenesis by modulating NF-kB and MAPKs pathways. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(5):1610-1615.
- [28] Chang J, Wang Z, Tang E, et al. Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor-kappaB. *Nat Med.* 2009; 15(6):682-689.
- [29] Harnish DC. Estrogen receptor ligands in the control of pathogenic inflammation. *Curr Opin Investig Drugs.* 2006; 7(11):997-1001.
- [30] Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3318-3325.
- [31] Urushibara M, Takayanagi H, Koga T, et al. The antirheumatic drug leflunomide inhibits osteoclastogenesis by interfering with receptor activator of NF-kappa B ligand-stimulated induction of nuclear factor of activated T cells c1. *Arthritis Rheum.* 2004;50(3):794-804.
- [32] Yago T, Nanke Y, Ichikawa N, et al. IL-17 induces osteoclastogenesis from human monocytes alone in the absence of osteoblasts, which is potently inhibited by anti-TNF-alpha antibody: a novel mechanism of osteoclastogenesis by IL-17. *J Cell Biochem.* 2009;108(4):947-955.
- [33] Kamiya S, Nakamura C, Fukawa T, et al. Effects of IL-23 and IL-27 on osteoblasts and osteoclasts: inhibitory effects on osteoclast differentiation. *J Bone Miner Metab.* 2007;25(5):277-285.
- [34] Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517.
- [35] Schwandner R, Yamaguchi K, Cao Z. Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6 in interleukin 17 signal transduction. *J Exp Med.* 2000;191(7):1233-1240.