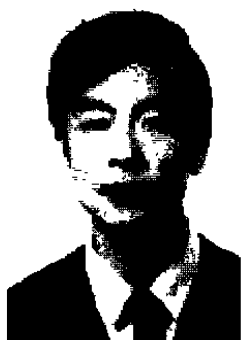


牙周炎患者牙龈组织中 ET 和 NO 改变与局部骨吸收的研究

陈世璋 宋子元 王跃



关键词 牙周炎 一氧化氮 内皮素 骨质疏松

摘要 目的 为了探讨慢性牙周炎患者牙龈组织中 ET 和 NO 的改变与局部颌骨的吸收及骨质疏松的关系。**方法** 本研究对 20 例正常人及 20 例慢性牙周炎患者应用组织化学、免疫组织化学、颌骨 X 线曲面断层片图象等方法对各牙龈组织中免疫活性物质内皮素(ET)和一氧化氮(NO)及相应颌骨 X 线曲面断层片的检测结果进行定量的图象分析。**结果** 显示慢性牙周炎患者牙龈组织中 ET 含量明显升高,颌骨密度减低,牙槽骨水平吸收显著。**结论** 研究结果提示,慢性牙周炎时牙龈组织中 ET 和 NO 的改变与局部颌骨的吸收及骨质疏松有密切的关系。

Changes of endothelin and nitric oxide in gingival tissue of periodontitic patients and their relationship with local bone absorption

Chen Shizhang, Song Ziyuan and Wang Yue

Beijing Stomatological Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, China.

Abstract Objective To study the changes of endothelin(ET) and nitric oxide (NO) in gingival tissue of periodontitic patients and their relationship with local bone absorption. **Methods** NO and ET in 20 patients with chronic periodontitis and 20 healthy subjects as controls were assayed by immunohistochemical and histochemical staining methods, and pantomograms of jaws to observe the relationship with chronic periodontitis. **Results** Quantitative analysis of these results by Qumat 970 showed that NO and ET in periodontitis tissue increased significantly ($P < 0.01$), particularly the content of ET in comparison with healthy subjects. In addition, the bone mineral density(BMD) of jaws was reduced and absorption of alveolar bone was prominent. **Conclusion** The levels of NO and ET increase significantly in periodontitis tissue which is closely associated with local jaw absorption and osteoporosis.

Key words Periodontitis Nitric oxide Endothelin Osteoporosis

慢性牙周炎是以牙周支持组织进行性损伤 为特征的一种口腔疾患,它的主要临床特点是

作者单位:100050 北京首都医科大学附属北京口腔医院(陈世璋、宋子元);北京中日友好医院病理科(王跃)

作者简介:陈世璋,1957年6月出生,现任首都医科大学附属北京口腔医院副主任医师、副教授。1990年起从事慢性牙周炎病因学及局部颌骨损伤机理的系统性研究。在国家一级杂志发表论文十余篇,其中两项研究,《慢性牙周炎患者牙周组织中基膜及弹性系统纤维的病理改变》及《正常人与慢性牙周炎患者牙龈组织中免疫活性物质的观察》分别于1994年及1998年两次获北京市科学技术成果奖。

牙龈组织的充血、水肿、糜烂、牙槽骨进行性的水平吸收从而导致牙体松动直至脱失。由于目前尚无理想的治疗方法故给患者带来了极大的痛苦。牙周炎的最初表现阶段是牙龈组织反复发作的炎性改变,进而发展为结缔组织损伤及骨质破坏。最近研究表明存在与人体中的免疫活性物质在发挥生理功能抗御感染起着重要的作用^[1]。大量研究证实,ET 和 NO 介导许多生理作用并涉及病理改变^[2],我们拟通过本项研究揭示牙周炎患者牙龈组织中 ET 和 NO 的改变与局部骨质损伤的关系。

1 材料和方法

1.1 标本取自20例翻瓣手术的中度慢性牙周炎患者的牙龈组织,临床标准为:牙龈组织充血水肿,彩点消失。牙周袋深度3~5 μm 。牙槽骨吸收达根长1/2左右。牙齿松动Ⅱ左右。另用20例阻生齿拔牙术后切取的牙龈组织做为对照。切除后的组织立即置于4%多聚甲醛内含0.2% 0.1 mol/L 苦叶酸的0.1 mol/L PB(pH7.4)固定剂中固定24小时,继之浸于30%蔗糖液中直至沉底,然后冷冻切片,(片厚50 μm)进行组织化学和免疫组织化学游离切片染色。

1.2 组织化学染色:游离切片 NADPH-d 染色步骤如下:切片于0.1 mol/L Tris-HCl(pH7.6)缓冲液漂洗,然后在下列孵育液中孵育1~2小时(37℃):0.1 mol/L Tris-HCl(pH7.6);NBT 0.25 mg/ml; NADPH 1 mg/ml 内含0.3% TX-100。不时于显微镜下观察,染色适度时切片置于0.1 mol/L PBS中终止反应。如需要时用苏木素复染细胞核。最后切片贴附于覆有铬明矾-明胶膜载玻片上,空气干燥中,经逐级酒精(70%~100%)脱水,二甲苯透明,封片。

1.3 免疫组织化学染色:应用 SABC 方法。切片经0.1 mol/L PBS(3×5分钟),然后在0.3% H_2O_2 孵育30分钟阻断内源性过氧化物酶,继用10%正常羊血清处理1小时。切片直接滴加一抗孵育48~72小时,一抗滴度为 ET(1:200)。切片再进入生物素标记羊抗兔 IgG(1:200)孵育1

小时及卵白素-生物素复合物(ABC 1:100)孵育1~2小时,用0.05% DAB 和0.01% H_2O_2 进行显色。最后切片贴附于覆有铬明矾-明胶膜载玻片上,甲基绿复染细胞核,空气干燥后,经逐级酒精(70%~100%)脱水,二甲苯透明,封片。每步骤均需经常搅动同时各步骤之间用含有0.5% TX-100,0.01 mol/L PBS(pH7.4)漂洗。全部样品随机各取一片用 Quantimet 970 图象分析并做统计学处理。

1.4 采用:意大利产 rotograph-230 曲面断层 X 线摄影机在相同条件下对正常人及受检牙周炎患者进行上、下颌骨曲面断层拍摄自动冲洗。

2 结果

2.1 正常牙龈组织:镜下见小血管及毛细血管内皮细胞 ET 呈阳性反应(图1)NOS 染色与 ET 染色结果相似(图2),间质中可见 NADPH-d 阳性反应神经纤维,大多呈串珠样,有处见串珠样神经终末与毛细血管相连接。血管周围亦可见纤维的 NADPH-d 神经纤维,有着与血管并行或包绕血管。



图1 血管及毛细血管内皮细胞呈 NADPH-d 阳性反应($\times 100$)

2.2 慢性牙周炎牙龈组织:镜下见牙龈表皮增生,间质中毛细血管也明显增生及炎性细胞浸润。血管内皮细胞 ET 及 NADPH-d 均深染。慢性牙周炎时除血管内皮细胞 ET 免疫组织化学染色呈深染外,血管周围的浆细胞也显 ET 阳性反应(图3)。间质内可见大量深染的 NADPH-d 串珠样神经纤维(图4)。经 Quan-



图2 小血管内皮细胞 ET 免疫组织化学染色呈阳性反应($\times 600$)

timet 970 图象分析后和统计学处理结果表明牙周炎患者 NO 及 ET 含量较正常者升高, 尤以 ET 水平升高显著(图5)。



图3 牙周炎时除内皮细胞 ET 阳性反应外, 血管周围的浆细胞也呈阳性反应($\times 660$)



图4 牙周炎时在间质组织中可见许多 NADPH-d 深染的串珠样神经纤维($\times 800$)

2.3 颌骨 X 线曲面断层片显示: 与正常人颌骨片比较慢性牙周炎时, 牙槽骨嵴水平吸收明显, 骨小梁密度减低, 下颌骨体部骨松质出现明显透光区, 哈氏管扩大, 经图象分析后结果证实慢性牙周炎患者颌骨骨质疏松明显(图6)。

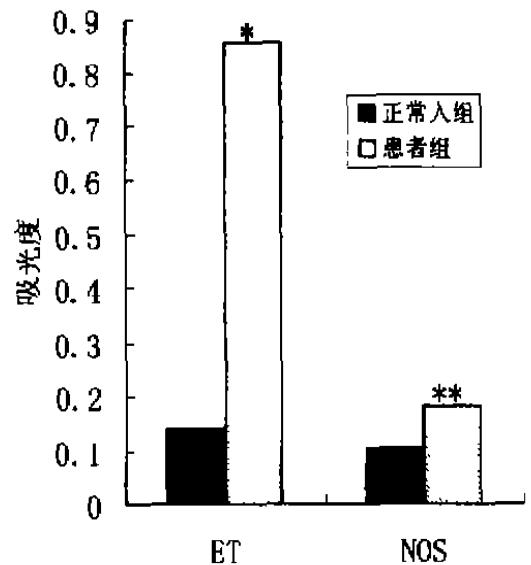


图5 牙周炎患者 NO 及 ET 含量

* 患者组 ET 平均吸光度为 0.856788, 较常人组 0.138981 显著增高 ($P < 0.01$)

** 患者组 NOS 平均吸光度为 0.180854, 较常人组 0.102266 显著增高 ($P < 0.01$)



图6 病变时颌骨 X 线曲面断层片示牙槽骨吸收骨质疏松

3 讨论

随着分子生物学、细胞生物学及放射免疫微量测定技术的发展, 人体中许多免疫活性物质不断被发现并证实这些免疫活性物质不仅具有调控微血管通透性和局部血流的功能, 同时还与抗牙周炎感染也有密切的关系。

一氧化氮(NO)是一个新型具有多功能的重要细胞内信使^[3]。血管内皮细胞和神经元都可以产生 NO, 研究证实 NO 可使血管舒张并维持血管张力。神经系统中的 NO 不仅可作为第一信使作用于自体细胞, 并可作为第二信使

对相邻周围的细胞发挥作用。研究表明牙龈及牙周组织中血管内皮细胞存有 NOS^[4]。我们的研究显示牙龈组织中 NO 不仅来源于血管的内皮细胞,同时牙龈间质中神经纤维也释放 NO。慢性牙周炎时不但有小血管大量增生,间质中的神经纤维也较正常人丰富,显示 NO 水平略高于正常人。

内皮素(ET)也是由内皮细胞分泌的一种 21 氨基酸多肽,通过自分泌,旁分泌机制在组织中起类似神经介质发挥多功能调节肽作用,是目前已知作用最强的血管收缩肽。尤其在调控血管张力方面更为重要,所以是一种强的血管收缩因子^[5]。本研究发现慢性牙周炎牙龈组织中 ET 的表达明显高于正常人,有关 ET 及 NO 的合成生物学效应间相互作用关系的研究提示 NO 对 ET 虽有抑制作用,但这种抑制作用一旦破坏,ET 释放量会远远超出生理水平,所以 NO 和 ET 两者之间的平衡状态是血液动力学变化的重要因素。牙周炎过程中我们发现 NO 含量虽高于正常人,但 ET 含量显著高于 NO。我们观察到牙周炎时组织中 NO 含量相应增高可能与炎症时血管动力学改变及血管损伤有关,是一种机体保护性反应,但由于炎症持续反复,NO 水平远低于 ET 水平,从而破坏了原有正常的 NO 与 ET 间的生理平衡状态,显示为 ET 损害的病理形态学改变。

牙周支持组织主要包括牙龈,牙周膜和牙槽骨。牙龈有保护牙齿,牙周膜和牙槽骨的作用。牙周膜是介于牙体和牙槽骨之间的致密结缔组织。牙槽骨是颌骨的突起部分,是支持牙齿的主要结构,使牙齿能固定于颌骨上承担咀嚼功能。牙槽骨在围绕牙根周围为薄层密度骨板,有许多小孔血管和神经与牙周结缔组织相通。颌骨则由骨松质组成,有骨小梁,骨髓腔组成,牙周组织的血运主要来自牙槽动脉分支到牙槽骨,牙龈和牙周膜^[6]。局部血管功能的正常是保证组织间物质交换的基本条件和组织发挥正常生理功能的前提。已有研究表明,牙周组织中基膜及弹力系统纤维的病理改变造成了局部血管

损伤而使局部牙龈组织的防御屏障破坏结缔组织受损,是导致慢性牙周炎发生的原因之一^[7]。本研究的结果也证实由于牙龈组织中免疫活性物质的改变而导致血管调节功能失控,使局部血流动力学发生改变,我们认为由于长期的血流病理学改变,造成局部牙槽骨组织的相对血流量下降,阻碍了正常的组织间物质交换和营养供给,造成局部骨代谢失调,加之长期来自相邻牙龈组织的炎性刺激使牙槽骨水平吸收,颌骨的骨小梁减少,骨质结构疏松明显。

本研究通过组织化学和免疫组织化学染色观察的结果表明在正常牙龈组织中血管内皮细胞及神经纤维内含有 NO,ET 免疫活性物质。NO 和 ET 的释放均较正常人增加,尤以 ET 释放远远高于正常人,导致局部血管强烈收缩,从而使得血液供给不足,影响了牙周组织活力,促使组织受损而成为一种内源性致病因素,刺激了局部的骨组织而发生骨吸收及骨疏松的病理改变,提示 NO 和 ET 可能不仅与牙周炎密切相关而且在慢性牙周炎时对阻碍正常的骨代谢起着重要作用。

参 考 文 献

- 1 Kerezoudis NP, Olgart L, Edwall L. Evans blue extravasation in ret dental pulp and oral tissues induces by electrical stimulation of the inferior alveolar nerve. Arch Oral Biol, 1993a,38:893-901.
- 2 Salvador Moricada, Annine Higgs. The L-Arginine Nitric oxide pathway. New E J Med, 1993,2002-2012.
- 3 Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain the free radical oxide. Ann Neurol 1,1992,32:297-311.
- 4 Kereaoudis NP, Olgart L, Fried K. Localization of NADPH-d activity in the dental pulp, pulpperiodontum and alveolar bone of the rat. Histochem,1993,100:219-233.
- 5 Kiyoshi Kurokawa, hisao yamada and Junzo Ochi. Endothelin-induced c-fos expression in the rat forebrain. Acta Histochem Cytochem,1997,30:51-56.
- 6 上一医主编,组织学.人民卫生,1983,639-642.
- 7 Shizhang Chen, Ming Xu, Shulin Wang, et al. Pathological changes of oxytalan fiber in the human gingival of chronic periodontitis. Chinese Med J, 1994,107:785.