

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.09.002

❖ 基础研究 ❖

SFRP1 及 Dickkopf 相关蛋白 1 在慢性牙周炎患者牙龈组织中的表达及意义

陈欣, 尼加提·吐尔逊, 热依拉·库尔班

(新疆医科大学第二附属医院口腔科, 新疆 830001)

【摘要】目的: 通过检测分泌型卷曲相关蛋白 (SFRP1) 及 Dickkopf 相关蛋白 1 (DKK1) 在慢性牙周炎 (CP) 患者牙龈组织中的表达改变, 探讨 SFRP1 和 DKK1 联合检测对慢性牙周炎感染的临床意义。**方法:** 选取 CP 患者 30 例 (CP 组), 根据牙周炎病变程度分为轻度 CP 组 ($n = 13$) 和重度 CP 组 ($n = 17$); 另以 15 名健康志愿者为对照组, 采用免疫组织化学技术检测 SFRP1 和 DKK1 在牙龈组织中的表达, 染色强度运用双评分法评价。采用牙龈组织蛋白印迹法检测 SFRP1 和 DKK1 的蛋白表达水平。**结果:** 免疫组织化学实验检测结果显示, 轻度 CP 组的 SFRP1 和 DKK1 阳性积分值高于正常组, 重度 CP 组高于轻度 CP 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western blot 实验检测结果显示, 轻度 CP 组的 SFRP1 和 DKK1 蛋白表达水平高于正常组, 重度 CP 组高于轻度 CP 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** SFRP1 与 DKK1 在 CP 患者牙龈组织中的表达升高, 且两者的表达水平可能与病情严重程度有关。

【关键词】 慢性牙周炎; 分泌型卷曲蛋白 1; Dickkopf 相关蛋白 1

【中图分类号】 R781.4 **【文献标志码】** A

Expression and significance of SFRP1 and DKK1 in gingival tissue of patients with chronic periodontitis

CHEN Xin, NIJIATI ·Tu-er-xun, REYILA ·Ku-er-ban

(Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830001, Xinjiang, China)

【Abstract】Objective: To investigate the clinical significance of secreted crimp related protein (SFRP1) and DKKOPF-related protein 1 (DKK1) combined detection in the gingival tissue of chronic periodontitis (CP) by detecting the expression changes of secreted curl associated protein (SFRP1) and DickKOPF-related protein 1 (DKK1) in patients with CP. **Methods:** 30 CP patients (CP group) were selected and divided into moderate CP group ($n = 13$) and severe CP group ($n = 17$) according to the severity of periodontitis, and 15 healthy controls as the healthy group. Expressions of SFRP1 and DKK1 in gingival tissue were detected by immunohistochemistry, and the staining intensity was evaluated by double score method. Protein expression levels of SFRP1 and DKK1 were detected by western blot in gingival tissue. **Results:** The immunohistochemical experiment results showed that the positive scores of SFRP1 and DKK1 in the mild CP group were higher than those in the normal group, and the positive scores of SFRP1 and DKK1 in the severe CP group were higher than those in the mild CP group, and the differences between groups were statistically significant ($P < 0.05$). The WB results showed that the expression levels of SFRP1 and DKK1 proteins in the mild CP group were higher than those in the normal group, and the expression levels of SFRP1 and DKK1 proteins in the severe CP group were higher than those in the mild CP group, and the differences between groups were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of SFRP1 and DKK1 is elevated in the gingival tissue of CP patients and the expression levels of both may be related to the severity of the disease.

【Key words】 Chronic periodontitis; Secretory coiled protein 1; Dickkopf associated protein 1

近年来,随着人们生活品质的不断提高,对口腔卫生问题重视程度逐渐加强,与之相关的慢性牙周炎 (chronic periodontitis, CP) 也逐渐成为了研究领域中的热点话题。CP 是由菌斑、细菌引起牙周组织的一种慢性炎症性疾病^[1], 常发生在牙周膜、牙龈、

牙槽骨、牙骨质, 其中牙槽骨的吸收是其较严重的病变, 最终可导致牙齿的松动及脱落, 对患者的生活质量造成严重影响^[2]。有研究^[3]表明, Wnt 信号通路在成骨细胞的定向、分化、发育、增殖等生理过程中具有关键作用, 是骨代谢调控的重要途径, 也是一种

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2019D01C226)

作者简介: 陈欣 (1982 -), 女, 主治医师。E-mail: cx13999275275@163.com

通讯作者: 尼加提·吐尔逊。E-mail: 15566722@qq.com

检测骨丧失的生物标志物。Wnt 信号因子在牙周组织中的表达异常与慢性牙周炎的进展程度相关^[4]。分泌型卷曲相关蛋白 (secreted frizzled-related protein 1, SFRP1) 是 Wnt 信号通路的重要拮抗剂,可竞争结合 Wnt 蛋白从而抑制 Wnt 通路激活^[5],能够减少炎症细胞及破骨细胞数量,降低牙周支持骨组织的破坏。另一组分泌型糖蛋白 (Dickkopf1, DKK1) 作为 Wnt 信号通路有力的抑制剂,抑制了牙周膜成纤维细胞中由 Wnt 介导的成骨活动,对分化起到抑制作用,同时促进骨的破坏^[6-7]。本研究通过检测 SFRP1 和 DKK1 在 CP 患者和正常者牙龈组织中的表达水平情况,研究 Wnt 信号通路经典拮抗分子 SFRP1 和 DKK1 与 CP 的相关性,探讨 SFRP1 和 DKK1 两种蛋白在成人慢性牙周炎中发生及发展过程中的作用关系。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取 2020 年 1 月至 2020 年 12 月就诊于新疆医科大学第二附属医院口腔医学中心的患者,其中被诊断为中、重度 CP 患者 30 例(男性 18 例、女性 12 例)为实验组,年龄 35 ~ 60 岁,平均(46.37 ± 5.31)岁;病程 1 ~ 6 年,平均(2.62 ± 0.70)年。牙周健康者 15 名(男性 8 名,女性 7 名)为对照组,年龄 33 ~ 61 岁,平均(46.58 ± 5.22)岁。两组性别占比和年龄比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。纳入标准:全身健康状况良好,无系统性疾病;无吸烟史或长期酗酒史;近 3 个月未服用抗生素、非甾体类抗炎药物及其他免疫抑制剂等药物;无累及牙龈的黏膜疾病;诊断为慢性牙周炎患者,全口余留牙 ≥ 18 颗,且近半年内未接受过牙周系统治疗者;女性未处于妊娠或哺乳期;无正畸治疗史。本研究经本院医学伦理委员会研究批准(批准号:L2021013),患者及家属均签署研究知情同意书。

1.2 主要试剂及仪器

重组 Anti-SFRP1 抗体、重组 Anti-DKK1 抗体 (Abcam 公司,美国),免疫组织化学染色试剂盒、DAB 显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司),山羊抗兔、鼠 IgG H&L (HRP) (Abcam 公司,美国),显微镜 (Nikon 生物显微镜),化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)等。

1.3 实验标本采集

选取实验组患者牙周手术中切取的口腔内牙周炎病灶部位的牙龈组织(排除根尖周组织疾病);对照组取自拔除智齿或正畸过程中切取的健康牙龈组织。组织标本离体后冲洗干净,滤纸吸干。

1.4 实验方法

1.4.1 牙龈组织的苏木精-伊红染色(HE 染色)

将标本用 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,将包埋好的组织蜡片切片,常规进行 HE 染色,用 ChemiScope mini 化学发光仪检测、拍照,观察 CP 组牙龈组织的病理学改变,以及正常组的牙龈形态和组织结构,明确慢性牙周炎诊断。

1.4.2 牙龈组织的免疫组化检测(SP 法) 将包埋好的牙龈组织蜡块连续切片,切片厚度 4 μm,脱蜡复水,浸入乙二胺四乙酸抗原修复,放入湿盒中滴加过氧化氢溶液封闭内源性过氧化物酶,分别加入 SFEP1 及 DKK1 工作液孵育。配置 DAB 显影液避光反应,复染,脱水封片,通过显微镜观察组织阳性染色程度。用苏木素复染胞核,镜下观察。以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照,以明确表达 SFRP1 及 DKK1 的卵巢组织作为阳性对照。

1.4.3 免疫组化结果判定 SFRP1、DKK1 在牙龈组织中的表达使用着色强度积分进行双评分法判定^[8],在光镜下每张切片随机选择 5 个视野(400 ×),观察阳性染色的细胞百分比及着色程度。以有棕黄色颗粒状沉淀为阳性细胞,着色范围以阳性染色百分比 < 1% 为 0 分,2% ~ 20% 为 1 分,21% ~ 50% 为 2 分,≥ 50 为 3 分;着色程度依据深浅记分,阴性着色为 0 分,浅黄色为 1 分,浅褐色为 2 分,深褐色为 3 分。上述两者相加作为着色强度的积分值。

1.4.4 牙龈组织蛋白印迹法(WB)检测 将收集到的实验组和健康组的牙龈组织,置于 EP 管中,放入液氮内速冻,再转移至 -80 °C 冰箱中保存。样本称重研磨之后,加入 10 倍 RIPA 裂解液离心 15 min,收集上清液检测蛋白浓度,剩余加入 5 倍缓冲液加热使蛋白变性,和配制的 BCA 工作液加入孔板中,酶标仪 562 nm 处检测其吸光度,根据标准曲线计算出样品中的蛋白浓度,将蛋白样品浓度与标准蛋白曲线对应计算。蛋白分离置 PVDF 膜,将三种目的蛋白进行切割,分别孵育三种抗体,包括 SFRP1、DKK1 以及内参抗体 β-actin。用 TBST 漂洗一抗孵育后的 PVDF 膜和 HRP 标记的山羊抗兔血清(二抗),运用增强化学发光法显影,用 ChemiScope mini 化学发光仪检测、拍照。采用 Image J 软件检测目的条(SFRP1、DKK1)及内参条(actin)的灰度值,两者比值即为蛋白表达的相对信号强度。比较各组间 SFRP1 及 DKK1 相对信号强度的差异。

1.5 统计学分析

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件。符合正态分布的计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,不符合正态分布的

计量资料用中位数(上下四分位距) [$M(P_{25}, P_{75})$] 描述, CP 组与健康组 SFRP1 及 DKK1 着色强度积分比较采用非参数检验, 有统计学意义时行多个样本两两比较的秩和检验, CP 组与健康组 SFRP1 及 DKK1 表达水平比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牙龈组织 HE 染色

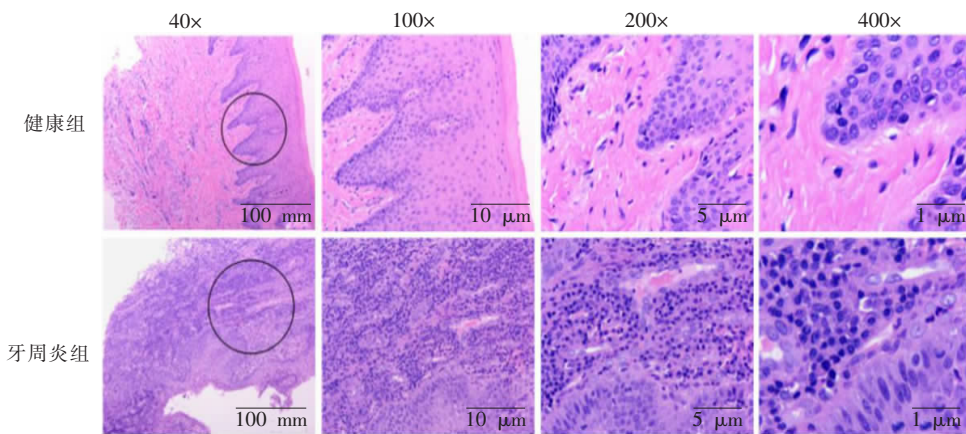


图 1 HE 染色观察牙周炎的组织病理特点

2.2 免疫组织化学试验测定各组 SFRP1 与 DKK1 的定位与阳性表达情况

镜下观察, 健康组牙龈组织鳞状上皮 SFRP1 和 DKK1 蛋白少见浅黄色颗粒状, 表达弱, 阳性表达少; 中度 CP 组和重度 CP 组牙龈组织均见浅黄色颗粒状。分析发现, DKK1 和 SFRP1 着色强度积分中度 CP 组中高于健康组, 重度 CP 组高于轻度 CP 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1、图 2、图 3。

镜下观察, 健康组: 镜下见复层鳞状上皮, 皮下固有层纤维结缔组织内少量慢性炎细胞浸润, 未见明显异常; CP 组: 镜下见复层鳞状上皮, 部分变薄, 表面糜烂、溃疡形成, 部分棘层肥厚, 钉突增生, 部分网状增生, 皮下固有层纤维结缔组织内大量慢性炎细胞(淋巴细胞、浆细胞)浸润伴纤维肉芽组织增生, 局灶可见较多中性粒细胞浸润。见图 1。

表 1 各组牙龈组织中 SFRP1 和 DKK1 着色强度积分比较 $M(P_{25}, P_{75})$

组别	DKK1	SFRP1
健康组 ($n = 15$)	1(1, 2)	1(1, 2)
中度 CP 组 ($n = 13$)	2(2, 3) *	2(1, 3) *
重度 CP 组 ($n = 17$)	3(2, 4) **	3(3, 4) **
H 值	3. 111	3. 749
P 值	0. 002	< 0. 001

* $P < 0.05$, 与健康组比较; # $P < 0.05$, 与中度 CP 组比较。

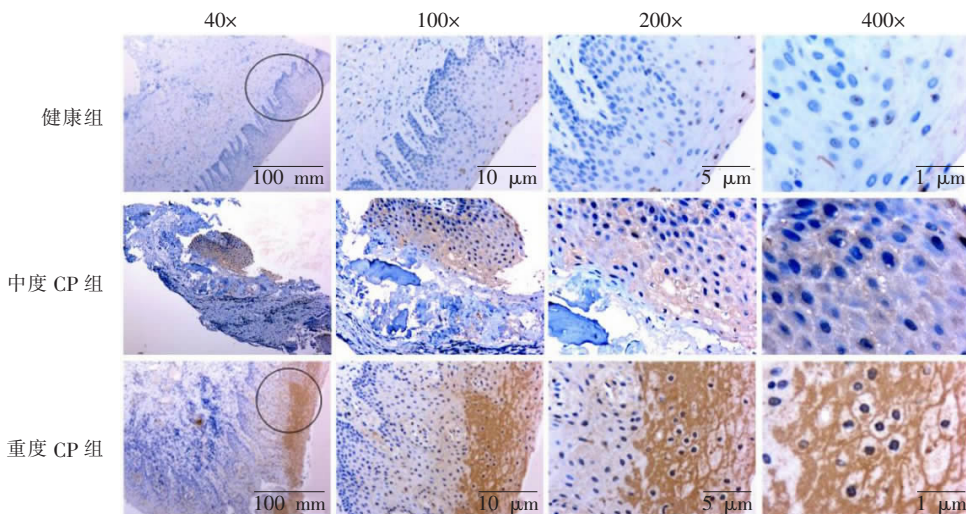


图 2 免疫组织化学实验测定 SFRP1 阳性表达的典型例图

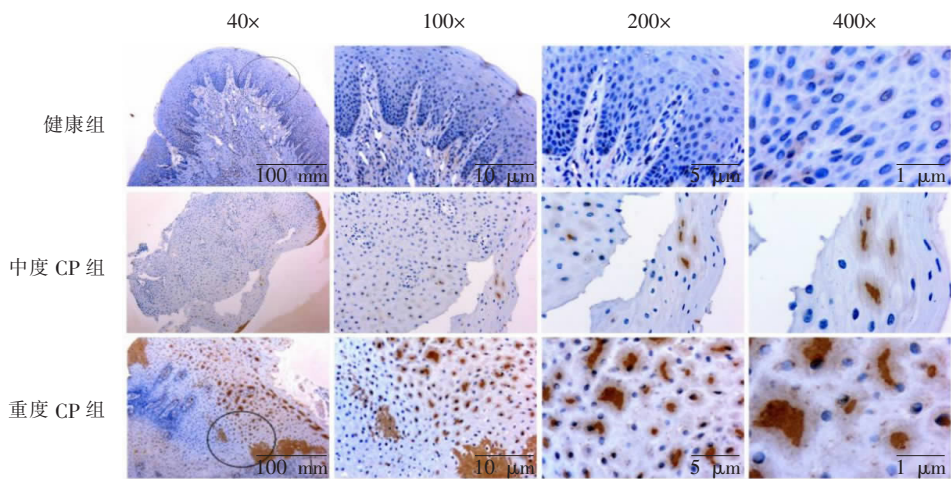


图3 免疫组织化学实验测定 DKK1 阳性表达的典型例图

2.3 牙龈组织 WB 实验

健康组中的 SFRP1 及 DKK1 在牙龈组织中的表达水平平均比 CP 组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。表 2。

表 2 SFRP1 和 DKK1 在牙龈组织中的表达水平分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SFRP1	DKK1
健康组 ($n = 15$)	0.351 ± 0.054	0.438 ± 0.092
中度 CP 组 ($n = 13$)	$0.456 \pm 0.074^*$	$0.556 \pm 0.075^*$
重度 CP 组 ($n = 17$)	$0.672 \pm 0.029^{**}$	$0.738 \pm 0.117^{**}$
F 值	135.405	36.245
P 值	< 0.001	< 0.001

* $P < 0.05$,与健康组比较;# $P < 0.05$,与中度 CP 组比较。

3 讨论

有研究^[9]发现 Wnt 信号通路与骨的发育和代谢密切相关,诱导间质干细胞向成骨分化,促进或抑制成骨细胞和破骨细胞的增殖与分化。同时有研究^[10]在不同的微环境下 Wnt 信号通路调控牙周膜干细胞上的成骨分化,炎症因子的表达增高,加重牙周组织的破坏。

SFRP1、DKK1 通过竞争结合抑制 Wnt 通路,成为 Wnt 经典信号通路重要的抑制剂,可以阻止 Wnt 蛋白的下行转导,阻碍成骨细胞的活动,抑制骨的形成^[11],广泛应用于研究。有研究^[12]指出牙周炎患者血清中 SFRP1 高表达状态时与牙周破坏程度呈正相关,并随着破坏程度的加重而逐渐升高。本研究结果显示,轻度 CP 组的 SFRP1 阳性积分值、蛋白表达水平平均高于正常组,重度 CP 组高于轻度 CP 组。证明此蛋白作为分泌型蛋白可能通过在血液中的扩散等途径影响牙周炎的发展。在 Li 等^[13]研究

中,SFRP1 蛋白在牙周中与成骨细胞和成纤维细胞凋谢有关,此蛋白的高表达可能促使与牙周成骨细胞表达相关基因沉默,从而引起成骨细胞的凋亡,造成牙周炎中牙槽骨的缺损流失。

研究^[14]发现 DKK1 在牙周膜干细胞中的表达降低,可激活 Wnt 信号通路,引发牙周膜上的成骨干细胞分化不全,骨质降低。其他研究^[15]发现 CP 组龈沟液中 DKK1 浓度高于对照组,且随着牙周的发展,DKK1 的分泌亦增加,提示 DKK1 与慢性牙周炎的发生发展相关。本研究结果显示,轻度 CP 组的 DKK1 阳性积分值、蛋白表达水平高于正常组,重度 CP 组高于轻度 CP 组。查阅资料可知 DKK1 可以作为 Wnt 通路的抑制剂,能有效抑制骨形成,促进破骨细胞作用导致骨的破坏。DKK1 蛋白在骨的代谢中扮演非常重要的作用。这也提示此蛋白在牙周炎发展过程中,面临牙槽骨缺损流失的可能作用机制是与它可以抑制 Wnt 通路有关。其他实验^[16]在健康对照组龈沟液中亦检测到少量的 DKK1 蛋白,说明 DKK1 也参与牙龈正常生理状态的维持。

综上所述,本研究通过免疫组织化学试验检测慢性牙周炎患者牙龈组织中 SFRP1 和 DKK1 的表达,结果表明两者蛋白表达均高于健康对照组,且重度 CP 组高于中度 CP 组。SFRP1 和 DKK1 蛋白表达与抑制 Wnt 通路有关,体内 SFRP1 和 DKK1 蛋白高表达可能会引起牙周炎的牙槽骨损害。

参考文献

- [1] Gao YG, Jheon A, Nourkeyhani H, et al. Molecular cloning, structure, expression, and chromosomal localization of the human Osterix (SP7) gene[J]. Gene, 2004, 341: 101 - 110.

(下转第 1119 页)