

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2019.11.003

· 基础研究 ·

大鼠牙周炎正畸牙移动初期 TNF 信号通路的基因本体分析

马遥^{1,2}, 姜兆伟¹, 靳云轶¹, 苗倩¹, 张春香^{1,3}, 张淋坤^{1,3}

1. 南开大学医学院口腔医学系,天津(300071); 2. 南方医科大学顺德医院口腔医学中心,广东佛山(528308); 3. 天津市口腔医院正畸科,天津(300041)

【摘要】 目的 探究肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)信号通路在牙周炎正畸牙移动初期的表达和功能,为牙周炎正畸患者早期炎症反应的调控机制研究提供证据。**方法** SD大鼠16只随机分为4组,A组建立双侧上颌第一磨牙牙周炎正畸模型,加力12 h,初始力为80 g;B组仅建立双侧上颌第一磨牙牙周炎模型,不加力;C组对双侧上颌第一磨牙建立健康牙周正畸模型,加力12 h,初始力为80 g;D组为正常大鼠,不作处理(为对照组)。建模及加力完成后,截取各组双侧上颌第一磨牙及牙周组织作为样本进行基因芯片检测,对TNF信号通路相关差异基因进行信号通路富集分析、基因本体(gene ontology, GO)分析和qRT-PCR验证。**结果** 基因芯片结果显示,A、B、C组中TNF信号通路均显著性上调($P < 0.01$),参与通路的基因在A组有28个上调,5个下调,B组有12个上调,4个下调,C组有12个上调,1个下调($P < 0.05$)。GO分析中显著性最高的GO条目为“对脂多糖的应答”、“炎症反应”、“NF- κ B转录因子活性的正调控”、“NF- κ B进入细胞核的正调控”、“对缺氧的应答”($P < 0.001$)。qRT-PCR检测结果显示,相较于对照组,C组TNF- α 表达量无差异($P > 0.05$),A组、B组显著性上调($P < 0.01$),A组>B组>C组($P < 0.05$);相较于对照组,A、B、C组前列腺素内过氧化物合成酶2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)表达量均上调,差异具有统计学意义($P < 0.05$),但A组PTGS2和IL-6的表达量低于B组($P < 0.05$)。**结论** 大鼠牙周炎正畸牙移动早期激活TNF信号通路,参与多种生物学过程,并在炎症反应和骨吸收过程中起重要作用。

【关键词】 正畸牙移动; 牙周炎; 大鼠; 炎症反应; 肿瘤坏死因子; NF- κ B转录因子; 信号通路; 基因本体分析

【中图分类号】 R783.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)11-0695-08

开放科学(资源服务)标识码(OSID)

【引用著录格式】 马遥,姜兆伟,靳云轶,等.大鼠牙周炎正畸牙移动初期TNF信号通路的基因本体分析[J].口腔疾病防治,2019,27(11):695-702.

Gene ontology analysis of the TNF signaling pathway in early orthodontic tooth movement of rats with periodontitis MA Yao^{1,2}, JIANG Zhaowei¹, JIN Yunyi¹, MIAO Qian¹, ZHANG Chunxiang^{1,3}, ZHANG Linkun^{1,3}. 1. Department of Stomatology, Nankai University School of Medicine, Tianjin 300071, China; 2. Center of Stomatology, Shunde Hospital of Southern Medical University, Foshan 528308, China; 3. Department of Orthodontics, Tianjin Stomatological Hospital, Tianjin 300041, China

Corresponding author: ZHANG Linkun, Email: zlkxjtu@163.com, Tel: 86-22-27121753

【Abstract】 Objective To investigate the expression and function of the TNF signaling pathway in the early stage of orthodontic tooth movement with periodontitis and to provide evidence to study the early inflammatory response in patients with periodontitis orthodontic treatment. **Methods** Sixteen SD rats were randomly divided into four groups: group A--12 h of orthodontic tooth movement of the bilateral maxillary first molars in rats with periodontitis; group B--

【收稿日期】 2019-01-25; **【修回日期】** 2019-04-13

【基金项目】 国家临床重点专科建设项目(国卫医办函[2013]544号);天津市科技计划项目(2018JCYBJC27000);天津市卫生计生委科技基金重点攻关项目(14KG132);天津市卫生行业重点攻关项目(15KG119)

【作者简介】 马遥,医师,硕士,Email: mayao11nku@163.com

【通信作者】 张淋坤,主任医师,博士,Email: zlkxjtu@163.com, Tel: 86-22-27121753

periodontitis model of the bilateral maxillary first molars without orthodontic tooth movement; group C--12 h of orthodontic tooth movement of the same teeth in rats with healthy periodontium; group D--control group without operations. The bilateral maxillary first molars and surrounding periodontal tissue of each group were collected for gene chip detection. Pathway enrichment analysis, qRT-PCR and GO (gene ontology) analysis were performed to identify differential genes involved in the TNF signaling pathway. **Results** Gene chip results showed that the TNF signaling pathway was significantly upregulated in group A, group B and group C ($P < 0.01$). Among the differential genes involved in the pathway, 28 were upregulated and 5 were downregulated in group A, 12 were upregulated and 4 were downregulated in group B, and 12 were upregulated and 1 was downregulated in group C ($P < 0.05$). The most significant GO items included "response to lipopolysaccharide", "inflammatory response", "positive regulation of NF- κ B transcription factor activity", "positive regulation of NF- κ B import into nucleus" and "response to hypoxia" ($P < 0.001$). qRT-PCR results showed no significant difference in TNF- α mRNA expression in group C compared with that in group D, TNF- α was upregulated in both groups A and B ($P < 0.01$), and mRNA expression decreased in the following order: group A > group B > group C ($P < 0.05$). Compared with group D, the expression levels of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) and interleukin-6 (IL-6) in groups A, B and C were significantly upregulated ($P < 0.05$), but the expression levels of PTGS2 and IL-6 in group A were lower than those in group B ($P < 0.05$). **Conclusion** The TNF signaling pathway is activated in the early stage of orthodontic tooth movement in rats with periodontitis. The pathway products participate in many biological processes and play an important role in the inflammatory response and bone absorption.

【Key words】 orthodontic tooth movement; periodontitis; rats; inflammatory response; tumor necrosis factor; NF- κ B transcription factor; signaling pathway; gene ontology analysis

J Prev Treat Stomatol Dis, 2019, 27(11): 695-702.

随着需要正畸治疗的牙周炎患者日趋增多,牙周炎正畸治疗机制成为当今研究热点之一。如何缩短牙周炎患者的正畸疗程,并且避免牙根吸收、牙槽骨破坏等正畸副作用,是亟待解决的问题。牙周一正畸联合治疗是学者们目前推荐的治疗牙周炎伴错殆畸形的模式之一。然而,在牙周炎得到控制情况下,正畸治疗到底会不会加重牙周炎、促进牙槽骨破坏吸收,仍然具有争议。牙周炎和正畸引起的骨吸收在一定程度上有相似的分机制^[1]。在正畸牙移动(orthodontic tooth movement, OTM)初期,正畸力会启动炎症级联反应,促进压力侧骨吸收和张力侧的骨沉积^[2]。而牙周炎是以牙菌斑为始动因子的进行性、感染性炎症,机体的宿主免疫反应同样会引起牙周组织的降解和牙槽骨吸收,然而其与健康牙周正畸过程中的无菌性炎症有何区别和联系尚不完全明了。近年来,许多学者对各种炎性因子在牙周炎正畸过程中的表达变化进行了研究,但对于牙周炎正畸早期炎症反应是如何发展和调控的,还未达成统一认识。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)作为炎症过程中重要的促炎因子,与成骨细胞、破骨细胞及成纤维细胞等的功能活动关系紧密,且在牙周炎和正畸牙移动引起的骨吸收中均起到重要作用^[3]。动物研究发现,正畸力加载后

引起的白介素-1 β (interlukin-1 β , IL-1 β)和TNF- α 的表达上升并加速原本因牙周炎存在的骨吸收^[4],但TNF信号通路在其中的作用机制并未完全阐明。本研究旨在探究TNF信号通路在牙周炎正畸牙移动中的表达情况,并运用基因本体学(gene ontology, GO)分析其功能和调控机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

6周龄雄性SD大鼠(中国医学科学院实验动物研究所),10%水合氯醛(中国医药集团化学试剂有限公司)。

Ni-Ti螺旋弹簧(有研亿金,中国);京津化学固化粘结剂(天津市合成材料工业研究所),正畸不锈钢结扎丝(天天齿科,中国)。

TaKaRa MiniBEST通用RNA提取试剂盒(TaKaRa,日本),TaKaRa RR037A反转录试剂盒(TaKaRa,日本);TB Green Real Time PCR试剂盒(TaKaRa,日本)。

LightCycler480荧光定量PCR仪(Roche,德国),GeneChip2 Hybridization Oven 640芯片杂交炉(Affymetrix,美国),GeneChip2 Fluidics Station 450芯片洗涤站(Affymetrix,美国),GeneChip2 Scanner 3000 7G芯片扫描仪(Affymetrix,美国)。

1.2 实验动物及分组

6周龄雄性SD大鼠16只,体重(200 ± 10)g,随机分为4组:牙周炎正畸组(A组)、牙周炎组(B组)、健康牙周正畸组(C组)和对照组(D组),每组4只。本实验已获得天津市口腔医院伦理委员会批准。

1.3 建立牙周炎模型

采用牙颈部结扎法及高糖饮食的方法,A组和B组大鼠用10%水合氯醛腹腔麻醉、仰卧固定,3-0丝线和0.20 mm不锈钢丝结扎于双侧上颌第一磨牙牙颈部龈沟内,饲喂普通粒状饲料及10%蔗糖水4周。隔天检查大鼠牙周情况1次,装置如有脱落则重新结扎。C组和D组大鼠不作处理,普通食水喂养。

1.4 正畸牙移动模型的建立及取样

A组和C组大鼠建立正畸牙移动模型,以上颌切牙为支抗牙经Ni-Ti拉簧近中移动双侧上颌第一磨牙(图1)。10%水合氯醛腹腔麻醉,仰卧固定,去除牙颈部丝线及结扎丝,0.25 mm不锈钢丝将正畸用Ni-Ti螺旋弹簧(0.012英寸)拴接于双侧上颌第一磨牙及同侧上颌切牙牙颈部,拉伸弹簧加力并用测力计测定,使初始Ni-Ti拉簧力值为80 g,化学固化粘接剂加固,定期检查装置,如有脱落及时重新安装。B组、D组两组大鼠不作加力处理。



图1 牙周炎正畸牙移动大鼠动物模型

Figure 1 Orthodontic tooth movement model of rats with periodontitis

加力12 h后,将4组大鼠断颈处死,取双侧上颌第一磨牙及周围约1 mm牙周组织置于-80℃冻存。每组各随机选取3个样本拍摄X线片,测量牙槽骨高度。

1.5 总RNA提取、反转录及基因芯片检测

将各组样本骨组织冰冻粉碎后,用TaKaRa

MiniBEST试剂盒提取总RNA。用分光光度计检测总RNA的浓度和质量。用琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性。经分光光度计检测和电泳测定,确定样本总RNA的浓度、纯度、完整性均满足实验要求后,按照反转录试剂盒说明书进行反转录得到cDNA。

每组随机选取3个样本cDNA进行基因芯片检测。将cDNA片段化,Cy3分别标记实验组(A、B、C组)及对照组(D组)的cDNA,并用Klenow酶标记,按照试剂盒说明书所述在芯片杂交炉中进行杂交。杂交结束后,将芯片在洗涤站中洗涤1 h,放在扫描仪中进行扫描,Genechip2 Operating Software读取芯片的原始信号。

1.6 生物信息学分析

分析芯片的Cy3荧光强度,计算实验组(A、B、C组)与对照组(D组)的比值。实验组与对照组比值 > 1.3 ($P < 0.05$)为基因表达上调,对照组与实验组比值 < 1.3 ($P < 0.05$)为基因表达下调。根据KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)中的信号通路数据库,对TNF信号通路(图2)进行差异基因富集分析。参考GO数据库中的生物过程(biological process)信息,对参与TNF信号通路的差异基因进行GO分析,探讨其功能。

1.7 qRT-PCR检测

每组随机选取3个样本,对基因芯片结果中参与TNF信号通路的部分差异基因设计引物,本研究选取TNF通路中在正畸牙移动炎症反应和骨改建中均有重要作用的3个基因TNF- α 、前列腺素-内过氧化物合成酶2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6),设计引物(表1)进行qRT-PCR检测。

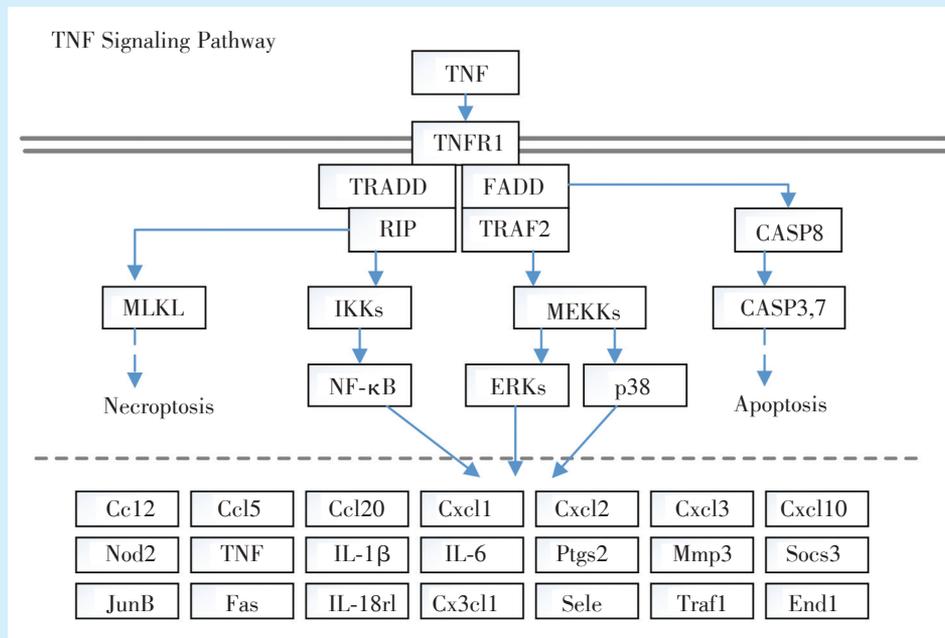
1.8 统计学方法

采用SPSS17.0软件进行数据分析。基因芯片筛选差异表达基因采用两独立样本 t 检验($P < 0.05$),信号通路富集分析和GO分析采用Fisher精确检验($P < 0.05$),PCR检测中相对表达量的差异比较采用两独立样本 t 检验($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 建模情况

牙周炎建模4周后,A组、B组大鼠上颌第一磨牙牙龈红肿,探诊出血,X线片显示上颌第一磨牙牙槽骨水平吸收;C组和D组无明显的牙龈炎症和牙槽骨吸收(图3)。



TNF: 肿瘤坏死因子; TNFR1: TNF 受体 1; TRADD: TNF 受体超家族成员 1A 相关死亡结构域; FADD: Fas 相关死亡域蛋白质; RIP: 受体相互作用蛋白质; TRAF: TNF 受体相关因子; CASP8: 半胱天冬酶 8; MLKL: 混合谱系激酶结构域如假激酶; IKKs: 抑制性 κ B 激酶; MEKKs: 丝裂原激活的蛋白激酶激酶; NF- κ B: 核因子 κ B; Ccl: C-C 基序趋化因子配体; Cxcl: C-X-C 基序趋化因子配体; Cx3cl1: C-X3-C 基序趋化因子配体 1; Nod2: 含有 2 个核苷酸的结合寡聚域; IL: 白细胞介素; Ptgs2: 前列腺素-内过氧化物合酶 2; Mmp3: 基质金属蛋白酶 3; Socs3: 细胞因子信号传导抑制因子 3; JunB: JunB 原癌基因; Fas: Fas 细胞表面死亡受体; IL-18rl: 白细胞介素 18 受体 1; Edn1: 内皮素 1; Sele: 选择素 E

图2 TNF 信号通路示意图

Figure 2 Schematic diagram of the TNF signaling pathway

表1 qRT-PCR 目的基因及引物

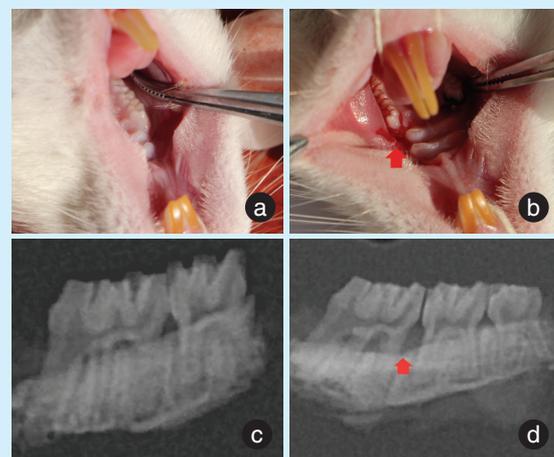
Table 1 Sequences of primers used in qRT-PCR

目的基因	上游引物	下游引物
PPIB	TCCGTGGCCAACGATAAGAAG	CACTCGTCTACAGGTTTCGT
TNF- α	AGAAACACACGAGACGCTGA	ACTCAGGCATCGACATTCCG
PTGS2	ATGCTACCATCTGGCTTCGG	TGGAACAGTCGCTCGTCATC
IL-6	CTGGTCTTCTGGAGTCCGT	TGCTCTGAATGACTCTGGCT

注 TNF- α : 肿瘤坏死因子- α ; PTGS2: 前列腺素-内过氧化物合酶 2; IL-6: 白细胞介素-6

2.2 基因芯片结果

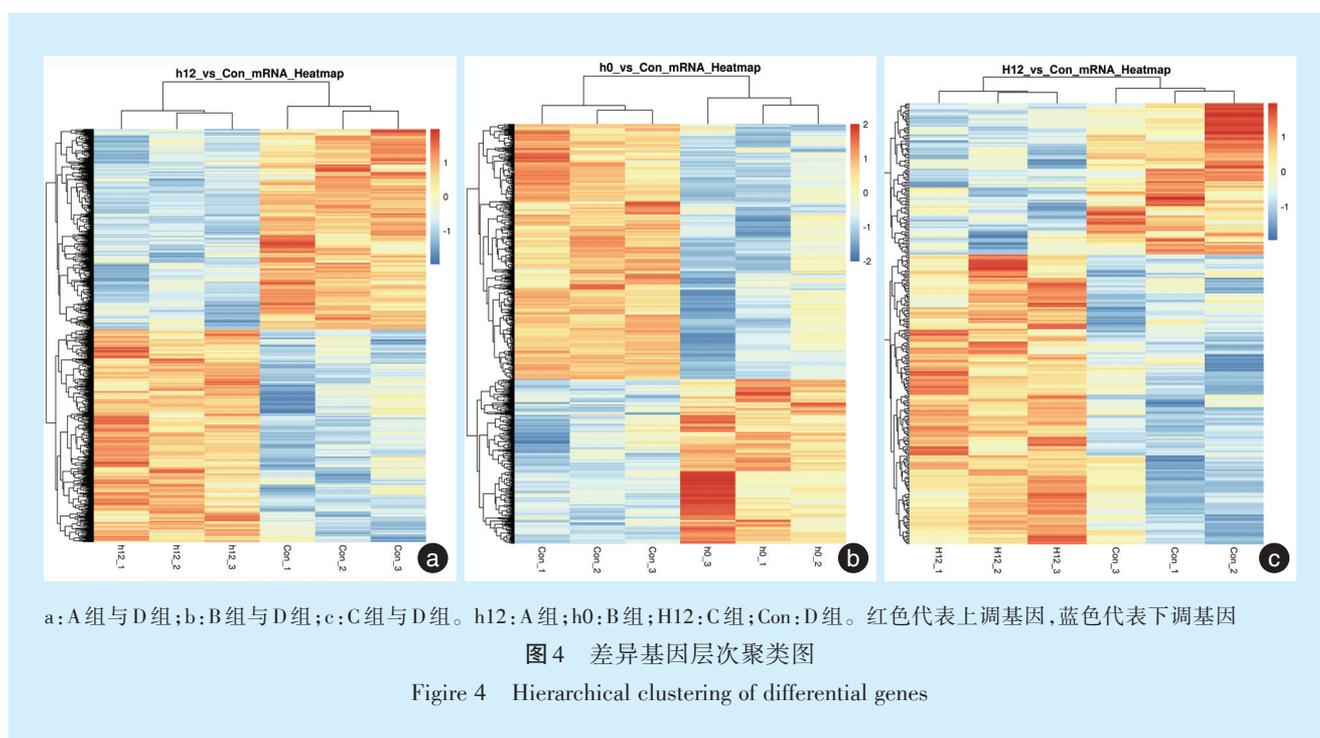
基因芯片结果显示,与对照组相比,A组共筛选到1 156个差异表达基因,B组筛选到2 089个,C组463个。对差异表达基因做无监督层次聚类分析,以热图形式显示(图4)。KEGG pathway 数据库中参与TNF信号通路的基因有110个,以D组作为对照,在A组上调的有28个,下调的有5个($P < 0.05$)(表2);在B组上调的有12个,下调的有4个($P < 0.05$)(表3);在C组上调的有12个,下调的有1个($P < 0.05$)(表4)。采用 Fisher 精确检验进行



a: C组上颌第一磨牙牙龈无明显炎症;b: A组上颌第一磨牙牙龈红肿出血(红色箭头);c: C组上颌第一磨牙槽骨无明显吸收;d: A组上颌第一磨牙槽骨吸收明显(红色箭头)

图3 大鼠牙周炎模型建立情况

Figure 3 Establishment of the periodontitis model in rats



信号通路富集分析,与D组相比较,TNF信号通路在A($P < 0.001$)、B($P = 0.004$)、C($P < 0.001$)组均有显著性上调($P < 0.01$)。

2.3 差异基因GO分析

采用Fisher精确检验对差异基因进行GO富集度分析,表5~表7中分别列出了各组显著性最高的几个GO条目($P < 0.001$)中参与TNF信号通路的差异基因的分布情况。

2.4 qRT-PCR

qRT-PCR结果显示A组、B组的TNF- α 、PTGS2、IL-6 mRNA表达量相对D组均显著性上调($P < 0.05$),C组PTGS2、IL-6 mRNA表达量显著性上调($P < 0.05$)而TNF- α mRNA表达量与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。A组TNF- α mRNA表达量高于B组,PTGS2和IL-6的mRNA表达量低于B组($P < 0.05$)(图5)。

3 讨论

GO数据库对基因和基因产物进行了统一的功能注释,通过富集分析,可以从大量无序的基因芯片数据中发现目标基因所带性状的最重要功能,这是芯片研究常用的分析方法。本研究发现A、B、C组参与TNF通路的差异基因显著性富集($P < 0.01$),可以推断TNF通路在牙周炎控制状态下、健康牙周正畸早期以及牙周炎正畸早期均被激活。

PCR结果显示,A组TNF- α 基因表达相对于B组和C组上调($P < 0.05$),这与以往的研究结果一致^[5-6],可以推测正畸力与牙周炎可能存在协同作用,并进一步促进了TNF- α 的表达。

本研究中TNF信号通路上调基因富集的GO条目主要有“对脂多糖的应答”、“炎症反应”、“NF- κ B转录因子活性的正调控”、“NF- κ B进入细胞核的正调控”、“对缺氧的应答”。牙周致病菌表面的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)能与宿主细胞表面的Toll样受体结合,启动牙周组织的宿主反应,引起炎症细胞募集、促炎因子的产生和破骨细胞的激活^[7]。牙龈成纤维细胞、牙周膜细胞以及成骨细胞等在LPS的刺激下表达TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子,这些因子均可诱导破骨细胞的分化和激活^[3]。正畸牙移动初期,正畸力刺激导致压力侧局部缺氧状态^[8]、神经反应^[9]、组织损伤、细胞机械信号转导等,这些改变会诱导细胞合成、分泌许多关键的促炎因子,如TNF- α 、前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)等各种细胞因子、趋化因子^[1],以介导牙周组织急性炎症的发生。本研究中,在牙周炎和正畸力的共同作用下,A组相比B组和C组在加力12 h有更多炎症相关基因上调,可以推测牙周炎和正畸力之间存在一些交互作用,具体是何种反应有待继续研究。

图2中TNF信号通路的产物大多参与了“炎症

表2 A组TNF信号通路差异基因

Table 2 Differential genes in group A

基因名称	属性	差异倍数	P
Ripk3	上调	1.562	0.018
Ccl2	上调	4.321	0.002
Mkl1	上调	1.612	0.001
Casp7	上调	1.325	0.014
Ccl12	上调	1.769	0.019
Tnf-α	上调	1.741	0.001
Tnfrsf1a	上调	1.732	0.001
Ripk1	上调	1.413	0.011
Nfkb1	上调	1.362	0.031
Rps6ka4	上调	1.342	0.014
Socs3	上调	3.566	0.005
Tnfaip3	上调	2.572	0.013
Traf1	上调	1.594	0.001
Ifi47	上调	1.728	0.007
Junb	上调	1.633	0.031
Cxcl2	上调	12.460	0.001
Cxcl1	上调	2.345	0.042
Cxcl3	上调	3.841	0.001
Cxcl10	上调	2.613	0.004
Fas	上调	1.337	0.033
Il-1b	上调	10.583	< 0.001
Il-6	上调	3.306	0.013
Bcl3	上调	1.551	0.010
Mmp3	上调	7.686	0.001
Edn1	上调	1.816	< 0.001
Nod2	上调	1.959	0.020
Ptgs2	上调	2.728	0.036
Tnfrsf1b	上调	1.699	0.027
Tab3	下调	-1.411	0.013
Fos	下调	-1.714	0.008
Vcam1	下调	-2.429	< 0.001
Birc2	下调	-1.368	0.030
Pik3cg	下调	-1.787	0.005

表3 B组TNF信号通路差异基因

Table 3 Differential genes in group B

基因名称	属性	差异倍数	P
Creb5	上调	1.364	0.049
Ccl5	上调	1.607	0.049
Fas	上调	1.330	0.036
Il-18r1	上调	1.402	0.042
Cxcl3	上调	3.152	0.004
Cx3cl1	上调	1.334	0.046
Traf1	上调	1.406	0.011
Ifi47	上调	1.610	0.016
Edn1	上调	1.357	0.033
Sele	上调	1.860	0.004
Il-1b	上调	3.902	0.009
Bcl3	上调	1.468	0.021
Mapk10	下调	-1.632	0.027
Jun	下调	-1.523	0.003
Fos	下调	-1.648	0.012
Pik3ca	下调	-1.304	0.010

表4 C组TNF信号通路差异基因

Table 4 Differential genes in group C

基因名称	属性	差异倍数	P
Birc3	上调	1.655	0.032
Ccl2	上调	2.946	0.004
Ccl20	上调	1.988	0.033
Cxcl2	上调	4.301	0.001
Cxcl1	上调	2.840	< 0.001
Il-1b	上调	7.269	< 0.001
Il-6	上调	3.581	< 0.001
Socs3	上调	2.047	0.012
Tnfaip3	上调	1.894	< 0.001
Mmp3	上调	4.924	0.009
Sele	上调	1.544	0.018
Ptgs2	上调	2.436	< 0.001
Fos	下调	-1.921	0.017

表5 A组TNF信号通路差异基因的GO分析

Table 5 Gene ontology analysis of the differential genes of group A in the TNF signaling pathway

GO 条目	P	上调基因
对脂多糖的应答	< 0.001	TNFRsf1a, TNF-α, TNFRsf1b, Ccl2, Cxcl3, Cxcl10, Cxcl1, Socs3, Junb, Fas, Ptgs2, Fas, Il-6, Il-1β, Mmp3, Nod2
炎症反应	< 0.001	TNFRsf1b, TNF-α, TNFRsf1a, Ccl2, Ccl12, Cxcl3, Cxcl2, Cxcl10, Nfkb1, Fas, Ptgs2, Il-6, Il-1β
NF-κB转录因子活性的正调控	< 0.001	Ripk3, Ripk1, Traf1, Nod2
对缺氧的应答	< 0.001	TNF-α, TNFRsf1a, Ccl2, Socs3, Fas, Il-1β, Mmp3

注 GO:基因本体

表6 B组TNF信号通路差异基因的GO分析

Table 6 Gene ontology analysis of the differential genes of group B in the TNF signaling pathway

GO 条目	P	上调基因
对脂多糖的应答	< 0.001	Ccl5, Fas, Cxcl3, Edn1, Il-1β, Il-6, Ptgs2
炎症反应	< 0.001	TNF-α, Ccl5, Fas, Cxcl3, Cx3cl1, Sele, Il-1β, Il-6, Ptgs2
NF-κB进入细胞核的正调控	< 0.001	Il-18r1, Il-1β, Ptgs2

注 GO:基因本体

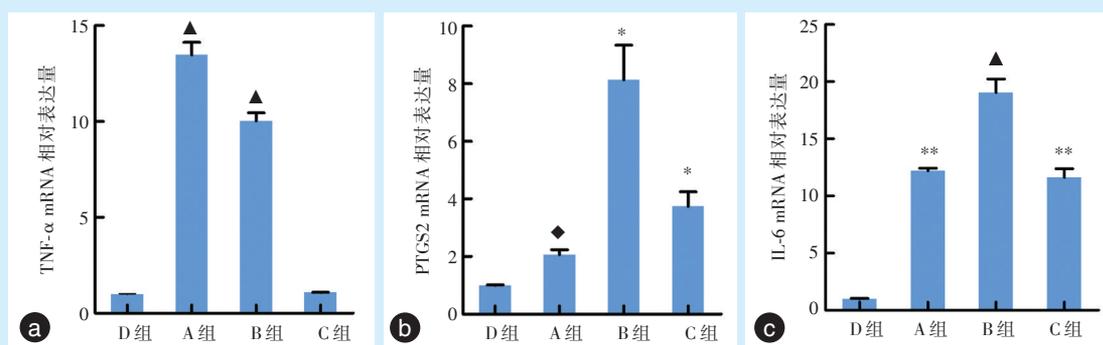
表7 C组TNF信号通路差异基因的GO分析

Table 7 Gene ontology analysis of the differential genes of group C in the TNF signaling pathway

GO条目	P	上调基因
炎症反应	<0.001	Ccl2, Ccl20, Cxcl2, Il1 β , Il6, Sele, Ptgs2
中性粒细胞趋化	<0.001	Ccl2, Ccl20, Cxcl2, Cxcl1
对缺氧的应答	<0.001	Ccl2, Socs3, Mmp3

注 GO:基因本体

反应”这一GO条目,如趋化因子C-C基序趋化因子配体2(C-C motif chemokine ligand 2, Ccl2),细胞因子IL-6、IL-1 β ,以及PTGS2等。IL-1 β 和IL-6属于正畸牙移动过程中最重要的细胞因子。IL-1 β 可以激活MAPK通路,引起炎症介质PGE2的合成和释放;也可以激活NF- κ B,从而调节多种因子的表达,特别是炎症细胞因子如IL-6等的表达增加,形



*表示与D组有统计学差异, $P < 0.05$, **表示与D组有统计学差异, $P < 0.01$; ◆表示与D组、B组相比有统计学差异, $P < 0.05$; ▲表示与其他各组相比均有统计学差异, $P < 0.05$

图5 qRT-PCR 检测结果

Figure 5 qRT-PCR results

成炎症级联放大效应^[10]。IL-6通过作用于牙周膜成纤维细胞调节血管渗透性和胶原生成,诱导急性期炎症反应,从而导致炎症细胞的募集和放大的组织损伤^[11]。这些因子调节炎症反应的发展,直接或间接促进破骨细胞生成,并且抑制由成骨细胞介导的骨形成,协同促进正畸牙移动。Ccl2又称单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1),能募集单核细胞、中性粒细胞和T细胞,迁移到局部发挥炎症效应。有研究表明,Ccl2还对破骨细胞分化形成起到关键作用^[12]。PTGS2又名环氧合酶2(cyclooxygenase 2, COX-2)是前列腺素合成起始步骤的关键酶,它负责催化产生PGE2等炎症介质,从而扩张血管、提高血管通透性,促进炎症反应。PGE2能通过促进核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)的表达、抑制骨保护素(osteoprotegerin, OPG)的表达来促进破骨细胞生成^[13]。基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinase-3, MMP-3)能够分解细胞外基质中的多种蛋白,参与了牙周炎过程中组织基质的破坏,并且具有炎症调节因子的作用^[14]。PCR检测结果中A组

PTGS2和IL-6的表达量相对于B组显著降低,可能是由于正畸力诱导促炎因子表达的同时促进了IL-10等抗炎因子的表达,反馈性抑制了PTGS2和IL-6的表达^[15],对此还需进一步研究进行验证。

此外在A组和B组中TNF信号通路还促进了Fas的表达上调。Fas受体,是细胞表面的死亡受体,与其配体FasL结合导致细胞凋亡。有研究表明Fas/FasL能够促进破骨细胞生成,抑制成骨细胞的分化^[15]。

本研究中C组的差异表达基因在“中性粒细胞趋化”这一GO条目中富集。最近的研究发现中性粒细胞不仅仅是炎症环境下的抗菌效应分子,而且与其他免疫细胞、组织细胞存在信号交通,从而发挥免疫调节作用^[16]。

GO分析结果表明A组和B组部分上调基因与转录因子核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的激活相关。根据研究结果,推测牙周感染刺激通过TNF通路诱导了NF- κ B的激活。NF- κ B信号通路是与炎症最直接相关的关键信号通路,该通路的活性能诱导多种炎症因子如TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的生成,并且正反馈调节NF- κ B的进一步活化^[17]。

有研究表明,NF- κ B信号通路在正畸牙移动骨改建中起到重要作用;NF- κ B的活化是破骨分化中的关键因素;TNF- α 通过活化NF- κ B发挥促炎效应,并抑制人牙周膜干细胞的成骨分化作用;成骨细胞中TNF- α 介导的Runt相关转录因子2(runt-related transcription factor 2, Runx2)表达抑制依赖于NF- κ B^[18]。有体外研究表明成骨细胞谱系的细胞通过激活NF- κ B在牙周炎的骨丧失中发挥重要作用^[19]。TNF- α 能通过NF- κ B和p38 MAPK两个途径促进MMP3的表达^[20]。

本研究结果表明TNF信号通路在牙周炎正畸加力的早期处于激活状态,在炎症反应和骨吸收过程中起到重要作用。初步推测牙周炎大鼠的正畸早期TNF信号通路参与的大致反应过程:牙周致病菌和正畸力共同诱导炎症反应的发生,导致TNF- α 表达上调,活化TNF信号通路;通路中TNF- α 通过上调NF- κ B等因子诱导多种效应分子表达增加,从而实现白细胞募集、炎症级联放大等效应。这些炎症因子促进破骨、抑制成骨,参与构成利于骨吸收和正畸牙移动的环境。

参考文献

- [1] 杨雁琪,李旻劫. 正畸治疗与牙周炎的关系:从临床研究到生物实验的分析[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(5): 281-287.
- [2] Li Y, Jacox L, Little S, et al. Orthodontic tooth movement: the biology and clinical implications[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2018, 34(4): 207-214.
- [3] Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of bone resorption in periodontitis[J]. J Immunol Res, 2015: 615486.
- [4] Kirschneck C, Fanghänel J, Wahlmann U, et al. Interactive effects of periodontitis and orthodontic tooth movement on dental root resorption, tooth movement velocity and alveolar bone loss in a rat model[J]. Ann Anat, 2017, 210: 32-43.
- [5] Kirschneck C, Proff P, Fanghänel J, et al. Reference genes for valid gene expression studies on rat dental, periodontal and alveolar bone tissue by means of RT-qPCR with a focus on orthodontic tooth movement and periodontitis[J]. Ann Anat, 2016, 204: 93-105.
- [6] Nogueira A, Molon RD, Nokhbehaim M, et al. Contribution of biomechanical forces to inflammation-induced bone resorption[J]. J Clin Periodontol, 2017, 44(1): 31-41.
- [7] Li Y, Lu Z, ZHANG Xi, et al. Metabolic syndrome exacerbates inflammation and bone loss in periodontitis[J]. J Dent Res, 2015, 94(2): 362-370.
- [8] Li ML, Yi J, Yang Y, et al. Compression and hypoxia play independent roles while having combinative effects in the osteoclastogenesis induced by periodontal ligament cells[J]. Angle Orthod, 2016, 86(1): 66-73.
- [9] Ma A. Biological aspects of orthodontic tooth movement: a review of literature[J]. Saudi J Biol Sci, 2018, 25(6): 1027-1032.
- [10] Krishnan V, Davidovitch ZE. Biological mechanisms of tooth movement[M]. Hoboken: John Wiley & Sons, 2015: 125-126.
- [11] Rincon M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases[J]. Trends Immunol, 2012, 33(11): 571-577.
- [12] Khan U, Hashimi S, Bakr M, et al. CCL2 and CCR2 are essential for the formation of osteoclasts and foreign body giant cells[J]. J Cell Biochem, 2016, 117(2): 382-389.
- [13] Huang H, Williams RC, Kyrkanides S. Accelerated orthodontic tooth movement: molecular mechanisms[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2014, 146(5): 620-632.
- [14] Franco C, Patricia H, Timo S, et al. Matrix metalloproteinases as regulators of periodontal inflammation[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2): 440.
- [15] Takayanagi HM. Osteoimmunology: interactions of the immune and skeletal systems[M]. New York: Academic Press, 2016: 327-333.
- [16] Hajishengallis G, Moutsopoulos N, Hajishengallis E, et al. Immune and regulatory functions of neutrophils in inflammatory bone loss[J]. Semin Immunol, 2016, 28(2): 146-158.
- [17] Luo Y, Zheng S. Hall of fame among pro-inflammatory cytokines: interleukin-6 gene and its transcriptional regulation mechanisms [J]. Front Immunol, 2016, 7: 604.
- [18] 杜沿林. NF- κ B信号通路对正畸牙周组织改建影响的研究[D]. 西安:第四军医大学, 2016.
- [19] Pacios S, Xiao W, Mattos M, et al. Osteoblast lineage cells play an essential role in periodontal bone loss through activation of nuclear factor-Kappa B[J]. Sci Rep, 2015, 5: 16694.
- [20] Sanchavanakit N, Saengtong W, Manokawinchoke J, et al. TNF- α stimulates MMP-3 production via PGE2 signalling through the NF- κ B and p38 MAPK pathway in a murine cementoblast cell line[J]. Arch Oral Biol, 2015, 60(7): 1066-1074.

(编辑 张琳,刘楚峰)



官网



公众号