

[文章编号 1000-1182(2004)03-0180-03

## 增殖细胞核抗原、bcl-2 在灰线 牙龈组织中的表达

陈 林<sup>1</sup>,朱国威<sup>1</sup>,杨晓红<sup>1</sup>,刘华庆<sup>2</sup>

(1. 遵义医学院附属口腔医院 修复科; 2. 遵义医学院 病理学教研室, 贵州 遵义 563003)

[摘要] 目的 研究增殖细胞核抗原(PCNA)、bcl-2 蛋白在灰线牙龈组织和正常牙龈组织中的表达,探讨瓷熔附金属全冠修复的生物学效果。方法 采用免疫组化 SP 法,以瓷熔附金属全冠修复后建立出的家兔灰线牙龈实验动物模型为研究对象,检测 PCNA、bcl-2 蛋白在戴金属烤瓷全冠 3 个月组、戴金属烤瓷全冠 6 个月组和不戴金属烤瓷全冠组即对照组牙龈组织中的表达。结果 戴金属烤瓷全冠 3 个月组与对照组 PCNA 有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 戴金属烤瓷全冠 6 个月组与对照组 PCNA 没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。戴金属烤瓷全冠 3 个月组、戴金属烤瓷全冠 6 个月组与对照组 bcl-2 差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。结论 PCNA 表达与灰线牙龈组织炎症反应有关;PCNA、bcl-2 的表达,不表明灰线牙龈组织有异常增殖。

[关键词] 增殖细胞核抗原; bcl-2; 免疫组织化学; 瓷熔附金属全冠; 变色

[中图分类号] R 781.5 [文献标识码] A

**Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen, bcl-2 in Gray Gingival Tissue** CHEN Lin<sup>1</sup>, ZHU Guo-wei<sup>1</sup>, YANG Xiao-hong<sup>1</sup>, LIU Hua-qing<sup>2</sup>. (1. Dept. of Prosthodontics, Stomatological Hospital of Zunyi Medical College; 2. Dept. of Pathology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

**Abstract Objective** To study the expression of PCNA, bcl-2 protein in gray and normal gingival tissue, and to investigate the biological effect of porcelain-fused-to-metals (PFM). **Methods** Gray gingival tissue animal model was established by PFM prosthesis and immunohistochemistry S-P method was used to detect the PCNA, bcl-2 protein expression in gingival tissue after 3 months, 6 months in PFM groups and control group. **Results** The expression of PCNA had significant difference between the 3th month group and the control group ( $P < 0.05$ ); no significant difference was found between the 6th month group and the control group ( $P > 0.05$ ). The expression of bcl-2 had no significant difference between the 6th month group and the control group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** There were a correlation between the expression of PCNA and inflammation of the gray gingival tissue; The expression of PCNA and bcl-2 protein does not indicate that gray gingival tissue had dysplasia change.

**Key words** proliferating cell nuclear antigen; bcl-2; immunohistochemistry; porcelain-fused-to-metals crown; discoloration

瓷熔附金属全冠是临床最常用的修复体,但临床上可见戴修复体后数月或数年,牙龈缘变成灰黑色,这种变色的牙龈是否存在异常增殖,是医、患都非常关注的问题。近年来,国内外一些学者对灰线牙龈组织研究,多为模拟口腔修复环境进行细胞培养,或通过光镜、电镜观测灰线牙龈组织的形态学改变,缺乏对细胞增殖相关核抗原、细胞增殖和凋亡相关调控基因等方面的研究报道。本课题通过以瓷熔附金属全冠 (porcelain-fused-to-metals crown, PFM) 修复后建立出的家兔灰线牙龈实验动物模型为研究对象,运用免疫组化方法,检测增殖细胞核抗原 (proliferating cell nu-

clear antigen, PCNA)、bcl-2 蛋白在灰线牙龈和正常牙龈中的表达,考察瓷熔附金属全冠修复的生物学效果,予以临床提示。

### 1 材料和方法

#### 1.1 标本来源

选择 6 个月以上的健康成年家兔 38 只,随机分为 3 组并编号。对照组 8 只;第 1 组 (戴金属烤瓷全冠 3 个月) 15 只;第 2 组 (戴金属烤瓷全冠 6 个月) 15 只。选用临床常用烤瓷合金美白齿 VK 德国烤瓷铸造合金 (Ni 61.0%, Cr 25.8%, Al < 0.4%, Silicium 1.5%, Mangan 0.1%, Mulybdan 11.0%)。常规预备牙体,取印模,灌注模型,做蜡型,包埋,铸造,上瓷,戴冠。第 1 组在戴冠 3 个月后,第 2 组在戴冠 6 个月,按照要求在动物实验区牙龈取材,对照组也在相

[收稿日期 2003-10-09; 修回日期 2004-02-05]

[基金项目] 贵州省自然科学基金资助项目 (2001, 309)

[作者简介] 陈 林 (1968-), 男, 贵州人, 讲师, 硕士

[通讯作者] 陈 林, Tel: 0852-8635723

应区域牙龈处取材,分组编号,10%甲醛固定,石蜡包埋,以4μm厚连续切片5张,1张HE染色,其余作免疫组化染色(石墨炉原子吸收光谱法分析表明,戴冠牙龈组织中镍铬金属离子含量增高;电镜观察发现,戴冠牙龈组织存黑色颗粒)。

### 1.2 试剂与方法

鼠抗兔单克隆抗体 PCNA(即用型),兔抗鼠多克隆抗体 bcl-2(即用型),链酶亲和素-过氧化物酶复合物(StreptAvidin-Biotin Complex SABC),DAB 显色剂,多聚-L-赖氨酸(Poly-L-Lysine)均购自武汉博士德生物工程公司。采用免疫组织化学 SP 法,按说明书进行,用 PBS 液代替一抗作阴性对照,博士德生物工程公司提供的阳性片作阳性对照。

### 1.3 判定标准

PCNA 阳性细胞为细胞核呈棕黄色。

bcl-2 阳性细胞为细胞胞质、胞膜或核膜呈棕黄色。

PCNA、bcl-2 采用兼顾阳性染色强度和阳性细胞所占百分比的判定标准:以随意 5 个 400 倍视野区阳性细胞所占百分比打分,0 分为阴性,1 分为阳性细胞 10%,2 分为阳性细胞占 11%~50%,3 分为阳性细胞 51%。以细胞染色强度打分,0 分为细胞无染色,1 分为浅黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色。

阳性细胞所占百分比与染色强度的乘积 3 分为免疫反应阳性,即 0~2 分为阴性,3~9 分为阳性。

### 1.4 统计学分析

采用四格表确切概率法进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 PCNA 在 3 组家兔牙龈组织中的表达

对照组牙龈组织上皮细胞中 PCNA 不表达或仅在基底细胞有少量阳性表达。戴金属烤瓷全冠 3 个月,出现 8 例免疫反应阳性,阳性率为 53.33%,阳性反应主要集中于基底层和近基底层细胞(图 1)。戴金属烤瓷全冠 6 个月,出现 2 例免疫反应阳性,阳性率为 13.33%。经检验,第 1 组与对照组牙龈组织上皮细胞中 PCNA 的表达存在显著性差异( $P < 0.05$ ),而第 2 组与对照组不存在显著性差异( $P > 0.05$ )(表 1)。

### 2.2 bcl-2 在 3 组家兔牙龈组织中的表达

对照组和戴金属烤瓷全冠 3 个月组牙龈组织上皮细胞未见 bcl-2 的表达。戴金属烤瓷全冠 6 个月,出现 2 例免疫反应阳性,阳性率为 13.33%,阳性细胞出现于基层以上部位,但染色均较弱(图 2)。经检验,第 2 组牙龈组织上皮细胞中 bcl-2 的表达与对照组间差异无显著性( $P > 0.05$ )(表 2)。

表 1 对照组、第 1 组、第 2 组牙龈组织中 PCNA 的表达

Tab 1 The expression of PCNA in the control group, the first group and the second group

分组	例数	阴性	阳性	阳性率 (%)	P 值
对照组	8	8	0	0	
第 1 组	15	7	8	53.33	0.019
第 2 组	15	13	2	13.33	0.526

表 2 对照组、第 1 组、第 2 组牙龈组织中 bcl-2 的表达

Tab 2 The expression of bcl-2 in the control group, the first group and the second group

分组	例数	阴性	阳性	阳性率 (%)	P 值
对照组	8	8	0	0	
第 1 组	15	15	0	0	
第 2 组	15	13	2	13.33	0.526

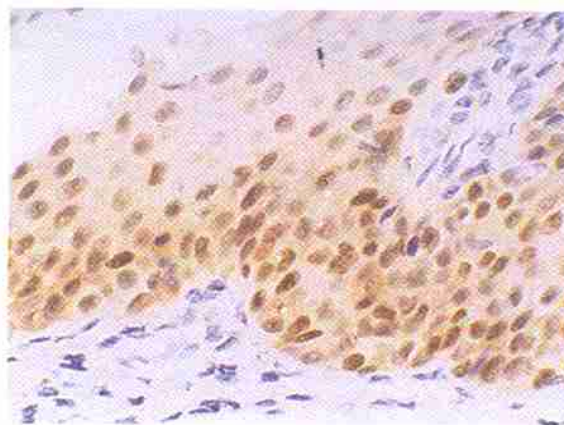


图 1 PCNA 在第 1 组牙龈组织中的表达 SP 法 ×400

Fig 1 The expression of PCNA in the first group SP ×400



图 2 bcl-2 在第 2 组牙龈组织中的表达 SP 法 ×400

Fig 2 The expression of bcl-2 in the second group SP ×400

### 2.3 HE 染色显示

3 个月组牙龈组织细胞结构混乱、细胞界限不清,基底细胞水肿,大量中性白细胞浸润;6 个月组上皮下有散在淋巴细胞,浆细胞浸润。

### 3 讨论

#### 3.1 PCNA 在灰线牙龈组织中的表达和意义

PCNA 是一种分子量为 36 000 的核蛋白,是 DNA 聚合酶辅助蛋白,可加速 DNA 聚合酶作用,与 DNA 复制和细胞增殖密切相关。PCNA 在细胞周期 G<sub>1</sub> 期开始升高,S 期合成达最高峰,M 期降到最低,因此,PCNA 能较好地反映细胞进入增殖周期的状况,代表细胞的增殖潜能,是评价细胞增殖活性的可靠指标<sup>1</sup>。本研究结果显示,3 个月组炎症反应明显,6 个月组炎症反应趋于稳定。说明炎症反应明显时 PCNA 呈较高表达,炎症反应稳定时呈较低表达,这与 Satour<sup>2</sup> 报道相似。临床也发现,随戴冠时间的增长,牙龈着色会加深,但炎症反应却会在一定时间内稳定下来。

用透射电镜观察该灰线牙龈动物模型,发现实验组牙龈组织呈炎症表现,部分细胞凋亡,上皮细胞内见黑色颗粒。吕卉等<sup>3</sup> 用电镜观察镍铬合金烤瓷修复后人局部变色牙龈组织,发现牙龈组织中出现大量核碎裂、核膜溶解、细胞器空泡变性且辨认不清,并有大量吞噬了颗粒状物质的巨噬细胞出现,部分细胞坏死。有的吞噬细胞发生凋亡,与 Schedle<sup>4</sup> 采用人牙龈纤维细胞在烤瓷合金浸提液中进行的模拟试验结果相一致。PFM 修复体暴露于口腔环境中,与牙龈细胞、体液(唾液、血液)及口腔菌群直接接触,发生电化学腐蚀,出现孔蚀现象<sup>5</sup>,金属离子析出,对牙龈组织产生直接或间接的刺激作用,造成牙龈细胞营养障碍,细胞凋亡或死亡,巨噬细胞吞噬颗粒状物质,介导组织细胞的免疫反应,引起牙龈炎症反应,从而细胞出现反应性增殖。

细胞增殖与凋亡是组织正常生长、行使功能的两个基本要素,二者互相制约,处于动态平衡之中,组织细胞凋亡或受损致细胞死亡则由增殖来补充,以保持正常细胞数目及体积;平衡失调,会导致异常增殖。周序琰等<sup>6</sup> 计数观察正常口腔粘膜上皮、异常性和恶性增生病变中增殖 PCNA 的改变发现,随着粘膜上皮的异常增生和癌变,阳性率呈上升趋势,与正常粘膜比较,有显著性差异。本实验 3 个月组 PCNA 阳性高表达,推测与细胞维持代谢平衡有关;6 个月后阳性率降低,表达无统计学意义,表明细胞增殖活性也降低,没有异常增殖。

#### 3.2 bcl-2 在牙龈组织中的表达和意义

bcl-2 即 B 细胞淋巴瘤/白血病基因-2,是从 B 淋

巴细胞瘤中首先分离出来的一种原癌基因,位于 28 号染色体 q21,由 3 个外显子组成,编码 bcl-2 和 bcl-2 蛋白,分布于线粒体内膜、细胞膜、细胞核膜及内质网膜上。bcl-2 是抑凋亡基因,可抑制多种因素诱导的细胞凋亡,并在不影响细胞增殖的情况下增强细胞存活力,参与细胞增殖与凋亡动态平衡的调控,其高表达所介导的细胞凋亡障碍,使遗传物质的突变率增加,从而参与多种肿瘤的发生过程<sup>7</sup>。

Dekker 等<sup>8</sup> 研究了自口腔正常粘膜经异常增生到口腔鳞癌过程中 bcl-2 的表达,发现阳性率呈上升趋势。研究发现,烤瓷合金在龈沟液内腐蚀产生的金属离子及其衍生物会引起机体组织毒性的组织反应,可引起细胞凋亡。而目前认为,在肿瘤的发生发展的机制中,抑凋亡基因具有更重要作用,它对各种刺激诱导的凋亡有阻抑效应,延长细胞寿命而导致异常细胞的积聚,因此属于另一种范畴的癌基因。

本研究结果显示,对照组和戴金属烤瓷全冠 3 个月组牙龈组织上皮细胞 bcl-2 无阳性表达,戴金属烤瓷全冠 6 个月后,出现 2 例免疫反应阳性,阳性率为 13.33%,与对照组间差异无显著性( $P > 0.05$ ),说明灰线牙龈中虽存在金属离子的增高,但未造成 bcl-2 高表达。

#### [参考文献]

- 1] Akui S, Furusata M, Itoh T, et al. Tumor angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study J. J Pathol, 1992, 168(2): 257-262.
- 2] Satour T. Remodeling mechanisms of transeptal fibers during and after tooth movement J. Angle Orthod, 1995, 65(2): 141-150.
- 3] 吕卉, 杨晓东, 陈明. 镍铬合金烤瓷修复体局部牙龈组织的电镜 X 线能谱分析 J. 中国医科大学学报, 2003, 30(5): 385-387.
- 4] Schedle P, Samrapoompichit HX, Nrausch F, et al. Response of L929 fibroblasts, human gingival fibroblast and human tissue mast cells to various metal cations J. J Dent Res, 1995, 74(8): 1513-1520.
- 5] 宋应亮, 徐君伍, 马轩祥, 等. 边缘链球菌 g 型对铸钛、钴铬合金、镍铬合金修复腐蚀失泽的研究 J. 华西口腔医学杂志, 2002, 20(1): 14-17.
- 6] 周序琰, 沈丽佳, 谢立群. 口腔增生性病变 PCNA 和微血管密度的定量研究及其意义 J. 中华口腔医学杂志, 2000, 35(4): 345-346.
- 7] Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked J. Science, 1997, 275(5303): 1129-1132.
- 8] Dekker NP, Lozada-Nur F, Lagenaur LA, et al. Apoptosis-associated markers in oral LPJ. J Oral Pathol Med, 1997, 85(1): 26-29.

(本文编辑 王晴)