



税艳青, 女, 教授, 硕士生导师, 九三学社社员. 1985年毕业于昆明医学院口腔医学系, 获医学学士学位, 2001年获四川大学华西口腔医学院口腔医学硕士学位, 现任昆明医科大学附属口腔医院/云南省口腔医院牙体牙髓牙周黏膜病科副主任; 中华口腔医学会牙周病学专业委员会委员; 中国国家医学考试中心执业医师资格考试口腔类云南省首席考官; 云南省医院协会口腔管理专业委员会委员. 曾赴美国纽约州立大学石溪分校牙学院专修牙周病学 1 a.

从事牙周病专业临床教学科研工作 29 a, 临床方面专注于各类牙龈炎、中重度慢性牙周炎、侵袭性牙周炎、复杂的牙周疾病诊断与治疗. 首先将牙冠延长术、牙周组织引导再生术及牙周电子探针等先进的牙周病学诊疗技术引入云南省, 并致力于在省内推广规范化牙周基础治疗; 在牙周美学手术治疗方面开展牙周组织再生治疗、牙冠延长术及牙龈结缔组织移植术等; 特别是对于牙周炎患者的综合治疗方面, 使中重度牙周炎患者能在最大程度恢复牙周健康、咀嚼功能及美观. 科研方面主要研究方向为牙周病病因学及牙周组织工程方面的研究. 在牙周病病因学方面主要研究方向为牙龈增生的发生的蛋白及基因机制; 在牙周组织工程学方面, 研究云南白药、丹参及蜂胶

复合物生物膜在牙周组织再生治疗中的应用. 曾主持云南省教育厅、省科技厅资助的有关牙周病学研究课题 3 项, 现在研课题 4 项, 发表论文 30 余篇, 培养研究生近 30 名.

牙周病相关研究及组织工程应用的研究进展

税艳青, 张 睿

牙周病 (Periodontal diseases) 是一类发生于牙周组织的以牙菌斑生物膜为始动因子的, 多因素联合作用的感染性疾病, 包括牙龈病及牙周炎等多种疾病. 牙周病造成牙周支持组织破坏, 牙周附着丧失, 最终导致牙齿脱落. 昆明医科大学附属口腔医院牙体牙髓牙周黏膜病科对牙周病的病因及治疗方面展开了较为广泛和深入的研究, 其中税艳青教授所在的研究团队主要致力于侵袭性牙周炎的病因、牙龈增生的发病机制及云南白药在牙周组织工程应用方面的研究, 现对目前研究的进展及取得的成果作简要介绍.

1 侵袭性牙周炎易感因素与基因多态性相关研究

侵袭性牙周炎 (aggressive periodontitis, AgP) 是牙周炎的一种类型, 以牙周支持组织快速降解、破坏为特征, 常发生于全身健康的年轻患者, 有一定的家族聚集性. 侵袭性牙周炎与重度慢性牙周炎的易感位点具有相似性, 在易感因素研究中, 以单

核苷酸基因多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 的相关研究较多. 单核苷酸多态性是指基因组 DNA 序列中由于单个核苷酸 (A、G、C、T) 转换、颠换、插入和缺失等而引起的多态性. 当等位基因的频率大于或等于 1% 时才能称得上是单核苷酸多态性^[1]. 基因多态性的发生可导致相关蛋白表达异常, 氨基酸序列发生改变或者蛋白质折叠错误或拓扑异构, 发生功能改变.

Kornman 等^[2]1997 年首次将白细胞介素 -1 (interleukin 1, IL-1) 基因多态性引入与慢性牙周炎的关联研究中. 近年来成为牙周炎遗传危险因素研究的最主要方面. IL-1 基因的多态性对侵袭性牙周炎的发生可能有着更重要的作用. 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 是一组结构相近、功能复杂的蛋白水解酶, 是细胞外基质和基底膜降解必不可少的酶类. 炎性因子刺激宿主细胞产生大量的 MMPs, 过量的 MMPs 将最终破坏牙周结缔组织, 在牙周炎的病理过程中起到“终结者”的作用. 肿瘤坏死因子 (TNF- α) 是引起炎症反应和组织损伤的重要介质, 其编码基因 TNF-A 位于

第 6 号染色体上. 已发现 TNF-A 存在多个多态性位点, 其中位于启动子区的 308 位点发生了 G 到 A 的碱基置换, 形成了 1、2 两个等位基因^[9]. 国外文献报道 TNF A-308 位点基因多态性、与 AgP 易感性无明显相关性^[4-9].

与慢性牙周炎不同, 侵袭性牙周炎的病因尚未完全明了, 除了特定微生物感染外, 遗传基因背景可能起到更为重要的作用. 目前认为某些基因多态性可能是侵袭性牙周炎病因中的重要易感因素, 正开展对基因多态性的研究, 探讨在侵袭性牙周炎发病及发生发展过程中其作用, 希望对今后的治疗和研究方向提供一定的思路.

2 bcl-2 表达与牙龈增生的相关性研究

牙龈增生 (Gingival hyperplasia) 临床上表现为炎症性牙龈肿胀和牙龈实质性增生的综合体现^[7]. 牙龈瘤 (Epulis) 是牙龈增生的一种特殊表现形式, 临床较为多见. 近年来, 大多数学者认为牙龈增生是牙龈上皮程序性细胞死亡减少和 (或) 细胞增殖增加的结果^[8], 并认为凋亡减少 (decreased apoptosis) 在牙龈增生发生过程中发挥着重要作用. bcl-2 (B-cell leukemia 2) 蛋白是细胞凋亡研究中重要的凋亡蛋白之一.

部分学者已发现 bcl-2 蛋白在药物性牙龈增生中表达增多, 且认为药物性牙龈增生的发病机制包含有抗凋亡作用. Kantarci 等^[9]发现在药物性牙龈增生中苯妥英钠引起的牙龈增生其牙龈组织中成纤维细胞凋亡显著下降, 认为苯妥英钠所导致的牙龈增生, 可能是成纤维细胞凋亡减少的结果. 文海燕等^[10]通过体外培养人牙龈上皮细胞 (human gingival epithelial cells, HGECs), 观察到在不同浓度硝苯地平 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激下, 细胞 bcl-2 mRNA 水平随硝苯地平浓度增高而上升, 认为硝苯地平对 HGECs 具有确定的诱导 bcl-2 基因增强表达的能力, 而且其诱导作用具有时间和浓度依赖性. Handajani J 等^[11]对服用了硝苯地平的老鼠进行观察, 其牙龈中 bcl-2 蛋白阳性的细胞数量显著高于未服用硝苯地平的老鼠, 并且硝苯地平的浓度与作用时间长短呈正比, 由此可认为服用硝苯地平的老鼠, 其牙龈中的 bcl-2 蛋白表达呈浓度、时间依赖性. Nedzielska I^[12]等发现 bcl-2 蛋白在牙龈良性病变中的表达多于恶性病变, 而 bcl-2 基因在牙龈良性增生性病变及牙龈癌中的表达明显高于健康牙龈.

对于非药物性牙龈增生, 笔者已经对不同类型

牙龈瘤组织样本采用免疫组织化学及 TUNEL 凋亡检测方法, 检测其凋亡蛋白 bcl-2 及凋亡细胞表达情况. 发现在非药物性牙龈增生中, 凋亡抑制作用在牙龈瘤发生中起重要的作用, 在牙龈瘤发病过程中该作用部分通过抗凋亡蛋白 bcl-2 来实现^[13]. bcl-2 蛋白在药物性和非药物性牙龈增生中都起着重要作用, 但关于其凋亡作用与牙龈增生的确切机制仍然不清楚, 本研究团队正继续探讨牙龈瘤的发生及作用机制, 为今后深入研究牙龈瘤发病原因及发病机制提供依据.

3 云南白药在牙周组织工程中应用的研究

近年来, 使已丧失的牙周组织再生修复是牙周病学领域研究的重点之一. 如何增加组织修复的细胞、促进牙周组织再生来源的细胞增殖分化、改善局部修复环境是目前牙周修复再生研究的关键.

牙周组织工程是由具有一定分化潜能的牙周种子细胞、刺激细胞增殖分化的细胞生长因子及为支持装置或支架, 构建为具有承载细胞或组织的支架, 不仅有利于牙周组织细胞的黏附和增殖, 同时也有利于细胞间信号传导, 维持细胞的表型及其表达的复杂的组织工程结构. 种子细胞、细胞生长因子和组织支架被称为牙周组织工程学三要素^[14]. 种子细胞为支架材料提供生命源泉, 并能形成具有生理功能的细胞. 根据构建不同组织的需要, 可为自体、异体或异种细胞, 牙周膜成纤维细胞 (human periodontal ligament fibroblasts, HPDLs)、骨髓基质细胞 (bone marrow stromal cells, BMCs) 和牙周膜干细胞 (PDL stem cells) 是目前在牙周组织工程中最为常用的种子细胞.

支架材料的构建是近年来研究焦点之一. 其基本原理和方法是将体外培养扩增的正常组织细胞吸附于一种具有优良细胞相容性, 同时可被机体降解吸收的生物材料上形成复合物, 然后将细胞-生物材料复合物植入人体组织或器官的病损部位, 当作为细胞生长支架的生物材料逐渐在机体内降解吸收时, 细胞不断增殖、分化, 形成新且形态、功能方面与相应组织或器官一致的组织, 从而达到修复创伤和重建功能的目的^[15,16]. 现在研究最多和应用最广泛的细胞外支架材料主要有胶原类 (Collagen)、纤维蛋白 (Fibrin) 及合成聚合物类 (Synthetic polymers).

在过去的 10 a 中, 大量的研究显示细胞因子在牙周组织工程中可有效地刺激细胞增殖和分化. 研究表明, 成骨细胞、成纤维细胞均可表达多种生

长因子的受体. 生长因子可以与这些细胞的相关受体结合, 从而激活及启动成骨的相关细胞及机制. 以下各因子对牙周组织再生重建有一定的作用, 如骨形成蛋白 BMPs、转移生长因子 (transforming growth factor, TGF- β 1)、血小板转化生长因子 (platelet-derived growth factors, PDGFs)、胰岛素样生长因子 (insulinlike growth factor, IGF-1)、成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factors, bFGF) 等. 尽管大量试验均证明多种生长因子联合使用, 更具有刺激骨细胞增殖激活化的作用, 但纯化的细胞因子价格昂贵、制备困难, 且联合使用的用量和比例难以控制, 同时外源性的因子为异种蛋白存在排异反应, 难以达到理想的效果.

云南白药是我省具地方特色的中药, 其促组织愈合的作用早已为国内外普遍承认并广泛应用于临床. 在促进组织修复的作用研究中, 云南白药能激活血小板, 促进血小板聚集和活化血小板, 可明显促进 bFGF 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的生成, 加速血管的生长及结缔组织增生, 促进组织愈合. 研究证实云南白药具有促进局部毛细血管生长, 改善组织血供, 有利于形成良好的修复环境.

在笔者的前期研究中发现, 云南白药对牙周膜成纤维细胞、骨髓基质干细胞、牙髓成纤维细胞有促进细胞增殖及分化的作用^[17]. 笔者的研究已将云南白药应用于牙周组织工程, 培养了具有分化潜能的牙周种子细胞, 选择合适的细胞载体及组织支架, 在体外构建人牙周膜细胞的三维培养, 再将细胞支架复合体植入动物体内, 观察云南白药在组织工程环境中的增殖、分化的影响, 评价云南白药在牙周组织工程学中的作用并探讨其作用机制, 为牙周组织的修复寻找新的思路.

[参考文献]

- [1] KARAHALIL B, BOHR V A, WILSON D M. Impact of DNA polymorphisms in key DNA base excision repair proteins on cancer risk [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2012, 31(10): 981 - 1 005.
- [2] KORNMAN K S. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease [J]. *J Clin Periodontol*, 1997, 24: 72 - 77.
- [3] LOUIS E, FRANCHIMONT D, PIRON A, et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans [J]. *Clin Exp Immunol*, 1998, 113(3): 401 - 406.
- [4] ENDO M, TAI H, TABETA K, et al. Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor- α gene in Japanese patients with early-onset periodontitis [J]. *J Periodontol*, 2001, 72(11): 1 554 - 1 559.
- [5] TREVILATTO P C, TRAMONTINA V A, MACHADO M A, et al. Clinical, genetic and microbiological findings in a Brazilian family with aggressive periodontitis [J]. *J Clin Periodontol*, 2002, 29(3): 233 - 239.
- [6] PEREZ C, GONZALEZ F E, PAVEZ V, et al. The -308 polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene and ex vivo lipopolysaccharide-induced TNF- α expression in patients with aggressive periodontitis and/or type 1 diabetes mellitus [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2004, 15(4): 364 - 370.
- [7] 栾庆先, 曹采方. 牙周基础治疗对药物性牙龈增生疗效的纵向观察 [J]. *现代口腔医学杂志*, 2005, 19(3): 239 - 241.
- [8] 刘培红, 马肃. 环孢素诱导牙龈上皮细胞增生的机制 [J]. *国际口腔医学杂志*, 2009, 36(1): 81 - 83.
- [9] KANTARCI A, AUGUSTIN P, FIRATLI E, et al. Apoptosis in gingival overgrowth tissues [J]. *J Dent Res*, 2007, 86(9): 888 - 892.
- [10] 文海燕, 束蓉, 蒋少云, 等. 硝苯地平对人牙龈上皮细胞 bcl-2 基因表达的影响 [J]. *上海口腔医学*, 2010, 19(1): 81 - 85.
- [11] SHIMIZU Y, KATAOKA M, SETO H, et al. Nifedipine induces gingival epithelial hyperplasia in rats through inhibition of apoptosis [J]. *J Periodontol*, 2002, 73(8): 861 - 867.
- [12] NIEDZIELSKA I, SYPNIEWSKI D, MAZUREK U, et al. Differential diagnosis of gingival hyperplasia based on IFN- γ -stimulated gene expression using RT-PCR [J]. *Folia Biol (Praha)*, 2007, 53(1): 23 - 26.
- [13] 张明珠, 张蕾, 朱红, 等. bcl-2 蛋白在血管性和纤维性牙龈瘤中的表达和意义 [J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2013, 23(8): 503 - 506.
- [14] ROSENBAUM A J, GRANDE D A, DINES J S. The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment [J]. *Organogenesis*, 2008, 4(1): 23 - 27.
- [15] DOUGLASS G L. Periodontics-tissue engineering and the future [J]. *J Calif Dent Assoc*, 2005, 33(3): 203 - 204.
- [16] AHMED T A, DARE E V, HINCKE M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2008, 14(2): 199 - 215.
- [17] 储雯, 雷雅燕, 税艳青. 不同浓度云南白药水溶液对体外培养人牙周膜成纤维细胞增殖和 ALP、OC 表达的影响 [J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2009, 19(10): 582 - 584, 597.

(2014-10-03 收稿)