

# 非贵金属烤瓷冠对家兔牙龈组织的影响\*

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

(1. 遵义医学院附属口腔医院修复科, 贵州 563003; 2. 贵州省遵义市环保监测站 563000)

**摘要:**目的 研究家兔戴实验冠后牙龈组织中镍铬元素的含量及增殖细胞核抗原(PCNA)、bcl-2 蛋白的表达。方法 采用免疫组化和石墨炉原子吸收光谱法。结果 戴冠 3 个月组镍铬元素含量与对照组无差异, 6 个月组比对照组及 3 个月组高, 差异有统计学意义; 3 个月组 PCNA 与对照组表达比较差异有统计学意义, 6 个月组与对照组无差异。3、6 个月组与对照组 Bcl-2 表达无差异。结论 非贵金属烤瓷冠金属离子可游离于牙龈组织; PCNA 表达与炎症反应有关; PCNA、bcl-2 的表达, 不表明牙龈组织有异常增殖。

**关键词:**非贵金属烤瓷冠; 增殖细胞核抗原; bcl-2; 免疫组织化学

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.23.004

中图分类号: R783.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)23-3160-02

## Influence of base metal porcelain crown on hare gingiva tissue\*

CHEN Lin<sup>1</sup>, ZHU Guo-wei<sup>1</sup>, YANG Xiao-hong<sup>1</sup>, et al.

(1. Department of Prosthodontics, Affiliated Hospital of Stomatology, Zunyi Medical College, Guizhou 563003, China; 2. Zunyi Environmental Monitoring Station, Guizhou 563000, China)

**Abstract:** Objective To study the content of Nickel(Ni) and Chromium(Cr) and the expression of PCNA, bcl-2 protein in the Hares gingiva tissue. Methods Immunohistochemistry S-P and atomic absorption spectrometer method. Results The content of Nickel(Ni) and Chromium(Cr) had no significant difference between the 3 month group and the contrast group. It had significant difference between the 6 month group and 3 month group and the contrast group. The expression of PCNA had significant difference between the 3 month group and the contrast group. It had no significant difference between the 6 month group and the contrast group. The expression of bcl-2 had no significant difference between the 6 month group and the contrast group. Conclusion The metalion was released in gingiva tissue. There were a correlation between the expression of PCNA and inflammation of the gingiva tissue. The expression of PCNA and bcl-2 protein can not indicate the gingiva tissue to be dysplasia.

**Key words:** base metal porcelain crown; proliferating cell nuclear antigen; bcl-2; immunohistochemistry

金属烤瓷冠是临床常用的修复体, 但常见戴非贵金属烤瓷冠后数月或数年, 牙龈缘变成灰黑色, 这种变色的原因及牙龈是否存在异常增殖, 是医、患都非常关注的问题。本课题以非贵金属烤瓷冠修复后建立家兔牙龈实验动物模型为研究对象, 检测家兔牙龈组织中镍铬元素含量, 探讨牙龈灰线原因, 同时运用免疫组化方法, 检测增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、bcl-2 蛋白在牙龈中的表达, 考察其生物学影响。

### 1 材料与方 法

**1.1 材料** 美白齿 VK 德国烤瓷铸造合金(Ni 61.0%, Cr 25.8%, A<0.4%, Silicium 1.5%, Mangan<0.1%, Mulybdan 11.0%)。鼠抗家兔单克隆抗体 PCNA 等购至武汉博士德生物工程公司。

**1.2 动物模型的建立** 选择 6 个月家兔 38 只, 分 3 组: 对照组 8 只; 3、6 个月组各 15 只。常规备牙、取模、包埋、铸造、上瓷、戴冠。3、6 个月组, 按要求取材, 分组编号, 10% 甲醛固定。

**1.3 牙龈组织镍铬元素检测** 称取干样 0.50 g, 置高压聚四氟乙烯罐中, 加入 5.0 mL 硝酸, 5.0 mL 硫酸, 微波消解 15 min, 冷却后, 转入 10.0 mL 比色管中, 定容至刻度标准曲线, 用石墨炉原子吸收光谱仪测定。

**1.4 PCNA、bcl-2 蛋白检测** 将龈材固定, 包埋, 4 μm 切片 5

张, 1 张 HE 染色, 其余免疫组化染色。

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS12.0 软件进行统计学分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析及四格表确切概率法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结 果

**2.1 牙龈组织中镍铬元素含量** 见表 1。

表 1 牙龈组织中镍铬元素含量( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/g}$ )

组别	n	镍	铬
对照组	8	5.125 ± 1.458 <sup>*</sup>	26.250 ± 5.203 <sup>*</sup>
3 个月组	15	6.133 ± 1.506 <sup>#</sup>	26.533 ± 3.482 <sup>#</sup>
6 个月组	15	9.000 ± 2.778 <sup>*</sup>	34.933 ± 7.035 <sup>*</sup>

\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.05$ , 与 6 个月组比较; \*:  $P > 0.05$ , 与 3 个月组比较。

**2.2 PCNA 在各组牙龈组织中的表达** 对照组牙龈上皮细胞中 PCNA 不表达或仅在基底细胞有少量阳性表达。见表 2。主要集中于基底层细胞, 呈棕黄色(封 2 图 1)。

**2.3 bcl-2 在各组牙龈组织中的表达** 见表 3。出现于基层以上部位, 但染色均较弱(封 2 图 2)。

**2.4 HE 染色结果** 3 个月组牙龈组织细胞结构混乱、界限不

\* 基金项目: 贵州省科技厅自然科学基金资助项目(黔科字 200309)。

清,基底细胞水肿,大量中性粒细胞浸润;6 个月组上皮下有散在淋巴细胞,浆细胞浸润。

表 2 各组牙龈组织中 PCNA 的表达

组别	n	阴性	阳性	阳性率(%)	P
对照组	8	8	0	0	
3 个月组	15	7	8	53.33	0.019
6 个月组	15	13	2	13.33	0.526

表 3 各组牙龈组织中 Bcl-2 的表达

组别	n	阴性	阳性	阳性率(%)	P
对照组	8	8	0	0	
3 个月组	15	15	0	0	
6 个月组	15	13	2	13.33	0.526

### 3 讨 论

**3.1 家兔牙龈组织中镍铬元素含量** Vaidyanathan 等<sup>[1]</sup>研究了口腔微生物对 5 种烤瓷修复合金的作用,发现合金对口腔微生物敏感,均发生了腐蚀变化。镍铬合金易氧化,金属基底冠的组织面经过多次烧结后存在不完整的氧化膜,与口腔环境中的 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>、Cl<sup>-</sup>、F<sup>-</sup>、CN<sup>-</sup> 等酸根发生电化学腐蚀<sup>[2-3]</sup>,腐蚀物随口内温度的波动缓慢析出,渗透到牙龈组织中引起牙龈变色。本实验结果表明:戴冠后近期内牙龈组织中镍铬元素含量无明显升高,而 6 个月后显著升高,说明戴冠后基底合金金属离子会渗透到牙龈组织中,并随着时间的延长不断增加。付国祥和骆鸣宇<sup>[4]</sup>及 Keohips 等<sup>[5]</sup>进行的临床牙龈变色原因分析指出,基牙游离龈变色是由于金属的电化学腐蚀,渗透到牙龈组织中显示暗色条纹。有的牙龈变色肉眼不能见,但基底合金在唾液中会失去光泽,发生电化学腐蚀<sup>[6]</sup>,出现孔蚀现象<sup>[7]</sup>。本实验结果还显示因金属腐蚀而释放的金属离子与修复时间密切相关,这与 Keohips 等<sup>[5]</sup>研究一致。

**3.2 PCNA 在牙龈组织中的表达和意义** PCNA 与 DNA 复制和细胞增殖密切相关,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>[8]</sup>。本实验结果显示,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>[9]</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。

吕卉等<sup>[10]</sup>用电镜观察镍铬合金烤瓷修复后人局部变色牙龈组织,发现组织中大量核碎裂、核膜溶解、细胞器空泡变性且辨认不清,巨噬细胞出现,部分细胞坏死。有的吞噬细胞发生凋亡,与 Schedle 等<sup>[11]</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一致。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,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,处于动态平衡,如平衡失调,会导致异常增殖。周序珑等<sup>[12]</sup>计数观察正常口腔黏膜上皮、异常性和恶性增生病变中 PCNA 的改变发现,随着黏膜上皮的异常增生和癌变,PCNA 阳性率呈上升趋势,与正常黏膜比较,差异有统计学意义。本

实验 3 个月组 PCNA 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,表明细胞增殖活性也降低,无异常增殖。

**3.3 bcl-2 在牙龈组织中的表达和意义** bcl-2 是抑凋亡基因,可抑制多种因素诱导的细胞凋亡,并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>[13]</sup>。Dekker 等<sup>[14]</sup>研究了口腔正常黏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的毒性反应,可引起细胞凋亡<sup>[15]</sup>。目前认为,在肿瘤的发生、发展机制中,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。

本实验结果显示,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%,与对照组比较差异无统计学意义(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:

- Vaidyanathan TK, Vainyanathan J, Linke HAB, et al. Tarnish of dental alloys by oral microorganisms [J]. J Prosthet Dent, 1991, 66(5):709.
- 徐军,郭娟丽. 烤瓷用镍-铬合金金属氧化膜研究[J]. 中华口腔医学杂志, 1999, 34(5):310.
- 朱松,韩英杰. 烤瓷烧结次数对镍铬合金表面氧化膜形成的影响[J]. 现代口腔医学杂志, 2000, 14(4):227.
- 付国祥,骆鸣宇. 金属烤瓷冠龈缘修复效果的临床观察[J]. 重庆医学, 2008, 37(24):2837.
- Keohips PS, Memikoglu MM, Kansu G, et al. Casereport: ionization tendency of a basemetal alloy in the oral environment[J]. Eur J Prosthodont Restor Dent, 1995, 3(5):231.
- Ito H, Okade T, Ishida T, et al. Treatment and analysis of clinical case of gingival pigmentation around there stored teeth[J]. Dtsch Zahnarz Z, 1990, 34(1):1.
- 宋应亮,徐君五,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.
- 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.
- Satour T. Remodeling mechanisms of transeptal fibers during and after tooth movement[J]. The Angle Orthodontics, 1995, 65(2):141.
- 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.
- Schedle P, Samorapoompichit HX, Nrausch F, et al. Response of L929 fibroblasts, human gingival fibroblast and human tissue mast cells to various (下转第 3164 页)

无明显的促凋亡作用<sup>[12-13]</sup>。本研究发现 100 ng/mL 脂多糖较对照组而言,能显著地抑制白血病细胞株 U937、HL60 的增殖,增加 G<sub>1</sub> 期细胞的比率,阻滞细胞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,S 期细胞比例减少、细胞凋亡率增加。

α-干扰素与脂多糖均能抑制细胞增殖和促进细胞凋亡,本研究中将两者以 1:1 处理白血病细胞株 U937、HL60,发现两者联合后较单用其中一种,其白血病细胞的增殖抑制率、细胞凋亡率及阻滞细胞周期均有显著提高( $P < 0.05$ )。这与 Manfred 等<sup>[4]</sup>报道 α-干扰素联合脂多糖能明显增强白血病细胞的凋亡相一致。其机制可能在脂多糖处理白血病细胞后启动 Toll 样受体发生级连反应,促发机体的免疫反应,增强 α-干扰素的协同抗白血病效应。也可能是两者联合处理细胞后,激活细胞内外多条信号通路,导致 Caspase-8 等活化进一步加强,促进细胞外凋亡途径加强,并释放一些凋亡相关蛋白如 Fas 等促发线粒体介导的细胞凋亡,从而进一步增强细胞凋亡<sup>[14-15]</sup>。

综上所述,α-干扰素与脂多糖联合使用可协同增强抗白血病作用,将为 IFN-α 协同 TLR 激动剂或 TLR 配体佐剂的使用为临床免疫治疗白血病提供坚实的理论依据。

#### 参考文献:

[1] Fraser CK, Lousberg EL, Kumar R, et al. Dasatinib inhibits the secretion of TNF-α following TLR stimulation in vitro and in vivo[J]. *Exp Hematol*, 2009, 37(12): 1435.

[2] 叶燕, 夏大静. Toll 样受体与树突状细胞介导的天然免疫和获得性免疫[J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 15(5): 637.

[3] 熊芳, 王兴兵, 张佳华, 等. Toll 样受体在 U937 细胞的表达及其作用研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2007, 15(3): 449.

[4] Manfred L, Marco B, Daniel S, et al. Caspase-8 dependent apoptosis induction in malignant myeloid cells by TLR stimulation in the presence of IFN-α[J]. *Leukemia Research*, 2008, 31(12): 1729.

[5] Huang B, Zhao J, Unkeless JC, et al. TLR signaling by tumor and immune cells: a double edged sword[J]. *Oncogene*, 2008, 27(2): 218.

[6] Lion E, Smits EL, Berneman ZN, et al. Acute myeloid leu-

kemic cell lines loaded with synthetic dsRNA trigger IFN-γ secretion by human NK cells[J]. *Leuk Res*, 2009, 33(4): 539.

[7] Lee WH, Liu FH, Lee YL, et al. Interferon-α induces the growth inhibition of human T-cell leukaemia line Jurkat through p38 α and p38 β[J]. *J Biochem*, 2010, 147(5): 645.

[8] Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, et al. Apoptosis and interferons: role of interferon stimulated genes as mediators apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2003, 8: 237.

[9] Keating A. Chronic myeloid leukemia: current therapies and the potential role of farnesyltransferase inhibitors[J]. *Semin Hematol*, 2002, 39(3 Suppl 12): S11.

[10] 杨清武, 李敬诚, 曹参祥, 等. 急性脑梗死患者外周血单核细胞 TLR4 表达及其与 TNF-α、IL-6 的相关性[J]. *重庆医学*, 2007, 36(13): 1239.

[11] Schmitt A, Li L, Giannopoulos K, et al. Quantitative expression of Toll-like receptor-2, -4, and -9 in dendritic cells generated from blasts of patients with acute myeloid leukemia[J]. *Transfusion*, 2008, 48(5): 861.

[12] Srivastava MD, Srivastava BI. Expression of mRNA and proteins for toll-like receptors, associated molecules, defensins and LL-37 by SRIK-NKL, a CD8+ NK/T cell line[J]. *Leuk Res*, 2005, 29(7): 813.

[13] 刘建仓, 周荣, 刘良明, 等. 细菌脂多糖诱导人单核细胞株对细菌脂蛋白的耐受性及其与肌动蛋白骨架关系[J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 15(5): 747.

[14] 陈建清, 吴晓安, 骆锦忠, 等. 胸腺肽 α1 对成人急性非淋巴细胞性白血病诱导化疗免疫功能的影响[J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2009, 12(6): 495.

[15] Lion E, Smits EL, Berneman ZN, et al. Acute myeloid leukemic cell lines loaded with synthetic dsRNA trigger IFN-γ secretion by human NK cells[J]. *Leuk Res*, 2009, 33(4): 539.

(收稿日期: 2010-06-31 修回日期: 2010-08-05)

(上接第 3161 页)

metal cations[J]. *J dent Res*, 1995, 74(8): 1513.

[12] 周序珑, 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.

[13] 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.

[14] Dekker NP, Lozada-Nur F, Lagenaur LA, et al. Apoptosis-associated markers in oral LP[J]. *J orol Pathol Med*, 1997, 85(1): 26.

[15] 苏俭生, 郭凌云, 俞懿强, 等. 铸造合金全冠戴用后对外周静脉血淋巴细胞凋亡的影响[J]. *复旦学报: 医学版*, 2006, 33(3): 315.

(收稿日期: 2010-06-03 修回日期: 2010-07-23)