

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.12.007
文章编号: 1005-8982 (2019) 12-0032-04

慢性根尖肉芽肿中 TNF- α 与 IL-34 表达的相关性*

朱永娜¹, 陈直², 宋伟², 张晓东¹

(1. 蚌埠医学院第二附属医院 口腔科, 安徽 蚌埠 233000; 2. 蚌埠医学院, 安徽 蚌埠 233000)

摘要: 目的 探讨慢性根尖肉芽肿中肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素-34 (IL-34) 表达的关系, 并进一步研究 TNF- α 在慢性根尖肉芽肿中的致病机制。**方法** 选取 2018 年 3 月—2018 年 5 月就诊于蚌埠医学院第二附属医院且临床及影像学诊断为慢性根尖肉芽肿的患者。9 例根尖肉芽肿组织作为实验组。拔除智齿时切除的健康牙龈组织 8 例作为对照组。应用免疫组织化学法检测两组 TNF- α 和 IL-34 蛋白的表达, 并应用图像处理软件分析两者的表达量及相关性。**结果** 实验组 TNF- α 、IL-34 相对表达量高于对照组 ($P < 0.05$); 实验组 TNF- α 与 IL-34 呈正相关 ($r = 0.896, P = 0.001$), 对照组 TNF- α 与 IL-34 无相关性 ($r = 0.186, P = 0.659$)。**结论** 在慢性根尖肉芽肿中 TNF- α 与 IL-34 的表达有相关性。在慢性根尖肉芽肿中, TNF- α 可能通过 IL-34 发挥致病作用。

关键词: 肉芽肿; 牙根尖; 慢性病; 肿瘤坏死因子 α

中图分类号: R781.34

文献标识码: A

Correlation between IL-34 and TNF- α in the chronic periapical granulomas*

Yong-na Zhu¹, Zhi Chen², Wei Song², Xiao-dong Zhang¹

(1. Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233000, China; 2. Department of Clinical Medicine, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233000, China)

Abstract: Objective To study the correlation of TNF- α and IL-34 in the chronic apical granulomas and the pathogenic mechanism of TNF-alpha in chronic periapical granulomas. **Methods** Nine cases of chronic periapical granulomas were selected as experimental samples. Eight cases of normal gingival tissues from the impacted third molars recommended for extraction were selected as normal control samples. The expressions of IL-34 protein and TNF- α protein in the experimental samples and control samples were detected by immunohistochemical analysis. The image J was used to analyze the expressions of IL-34 and TNF- α . **Results** The relative expression of TNF-a and IL-34 in the experimental group was higher than that in the control group ($P < 0.05$); there was a positive correlation between TNF-a and IL-34 in the experimental group ($r = 0.896, P = 0.001$), but no correlation between TNF-a and IL-34 in the control group ($r = 0.186, P = 0.659$). **Conclusions** The relationship of TNF-a and IL-34 in the chronic periapical granulomas is demonstrated, and the TNF- α may play a pathogenic role through IL-34.

Keywords: granuloma; tooth root; chronic disease; tumor necrosis factor-alpha

收稿日期: 2018-12-18

* 基金项目: 蚌埠医学院自然科学基金 (No: BYKY17119)

慢性根尖肉芽肿是一种以炎性骨吸收为特征的常见疾病^[1]。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 对该病有重要的调节作用, 可调节破骨细胞分化成熟, 调节骨吸收^[2-4]。白介素-34 (Interleukin-34, IL-34) 是一种新型炎症因子, 该因子的表达受 TNF- α 的调节^[5-6]。TNF- α 和 IL-34 均可以调节慢性根尖肉芽肿中的骨吸收^[7-8], 但慢性根尖肉芽肿中 IL-34 与 TNF- α 的关系还不清楚。因此本研究拟初步探讨慢性根尖肉芽肿中两者表达的相关性, 以进一步研究 TNF- α 的致病机制, 为后期临床治疗提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 3 月—2018 年 5 月就诊于蚌埠医学院第二附属且医院临床及影像学诊断为慢性根尖肉芽肿的患者, 收集患牙拔除时的病损软组织 13 例作为实验组。纳入标准: ①患者近 2 个月内未应用抗生素及非甾体类药物; ②患者无高血压、糖尿病等系统性疾病, 无其他口腔疾病; ③患者的患牙无牙髓活力, 无法保留, 需要拔除; ④X 射线诊断患牙为慢性根尖肉芽肿; ⑤患者无拔牙禁忌证。另选取本院同期就诊拔除阻生牙时切除的健康牙龈组织 8 例作为对照组 (符合纳入标准中的①②⑤)。

1.2 方法

1.2.1 苏木精-伊红 (HE) 染色 将收集的软组织用去离子水冲洗 3 min, 置于 4% 的甲醛中固定 24 h, 石蜡包埋备用。将石蜡切成 4 μ m 厚的连续切片, 然后按 HE 步骤进行染色。封片后, 倒置显微镜下观察染色结果, 判定标本类型。根尖肉芽肿的病理诊断标准为: 可见以大量炎症细胞、毛细血管和成纤维细胞增生为主的炎症肉芽组织。筛选影像学 and 病理诊断一致并且符合要求的标本, 最终获得实验组 9 例。

1.2.2 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接 (streptavidin-peroxidase, SP) 法 将符合要求的石蜡包块切成 4 μ m 厚切片。切片脱蜡、复水及抗原修复。用 3% 过氧化氢液阻断内源性过氧化物酶。滴加一抗 50 μ l 于 4 $^{\circ}$ C 避光过夜孵育 (IL-34 抗体和 TNF- α 分别用抗原稀释液 1:100 和 1:500 稀释)。每张切片滴加兔抗人二抗 50 μ l 孵育 20 min, 加入二氨基联苯胺显色液在显微镜下观察, 至染色效果理想时终止染色。苏木精复染 3 min。切片脱水、透明, 每步之

间均要用磷酸盐缓冲液充分洗涤切片。中性胶封片后在倒置显微镜下拍照观察。阴性对照为肉芽肿组织, 用磷酸盐缓冲液代替一抗孵育切片作为阴性对照组。

阳性判断标准为细胞核、细胞质或细胞膜上出现黄色或棕色颗粒。每张切片随机选 5 个视野拍照, 并用 Image-J 软件进行分析。

1.3 影像学诊断标准

患牙根尖、根侧方或根分叉处有直径 <1 cm 的低密度影像, 并且边界清晰, 周围骨质正常或者稍微变致密^[9]。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验, 相关性分析用 Pearson 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组病理检查结果比较

慢性根尖肉芽肿中见大量炎症细胞浸润, 包括中性粒细胞、淋巴细胞及浆细胞等, 并伴有新生血管形成 (见图 1A)。健康牙龈见大量纤维组织, 炎症细胞较少 (见图 1B)。

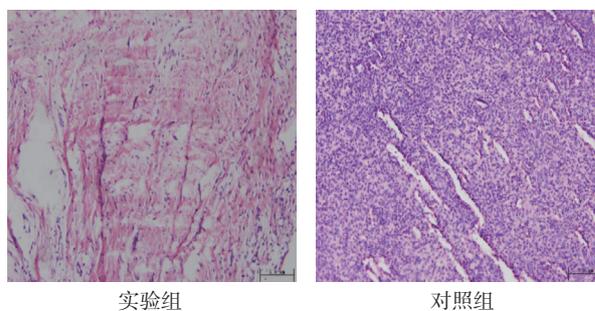
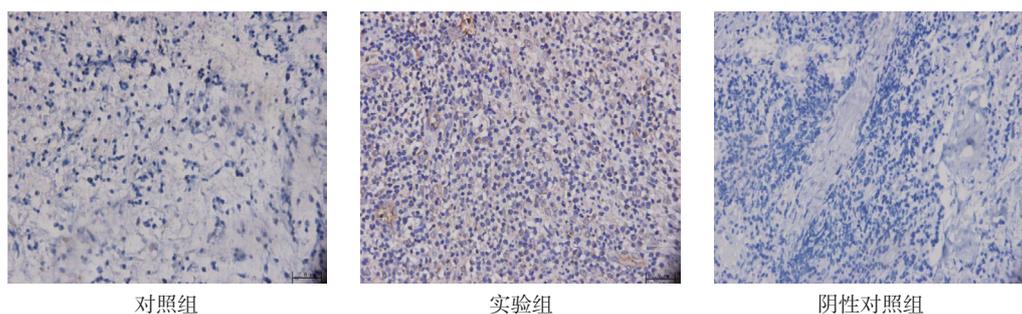
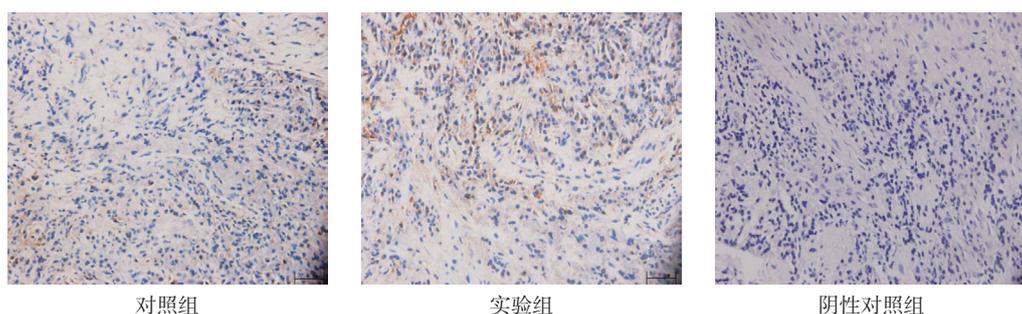


图 1 两组患者病理切片图 (HE $\times 20$)

2.2 各组 TNF- α 、IL-34 相对表达量比较

实验组和对照组可见 TNF- α 表达, 主要表达于细胞浆及细胞核上。实验组和对照组 TNF- α 相对表达量分别为 (0.246 \pm 0.059) 和 (0.158 \pm 0.017), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 4.274$, $P = 0.002$), 实验组高于对照组 (见图 2)。实验组和对照组可见 IL-34 表达。实验组和对照组 IL-34 相对表达量分别为 (0.206 \pm 0.038) 和 (0.131 \pm 0.023), 经独立样本 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 4.867$, $P = 0.000$), 实验组中 IL-34 表达较高 (见图 3)。阴性对照组中两者均无表达。

图 2 各组 TNF- α 的表达 (SP 法 $\times 40$)图 3 各组 IL-34 的表达 (SP 法 $\times 40$)

2.3 IL-34 和 TNF- α 表达的相关性

经 Pearson 相关检验, 实验组 TNF- α 与 IL-34 呈正相关 ($r=0.896$, $P=0.001$), 对照组 TNF- α 与 IL-34 无相关性 ($r=0.186$, $P=0.659$)。

3 讨论

TNF- α 是在病原菌、内毒素或相关物质诱导下, 由单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等分泌的一种促炎因子, 在骨吸收中发挥重要作用^[10]。有报道在小鼠的根尖病损中发现 TNF- α 的表达, 用药物抑制小鼠的根尖病损后, 小鼠病损组织中 TNF- α 的表达也受到抑制^[11-12]。KIMAK 等^[13]在人根尖病损组织中也多次检测到 TNF- α 的表达。本研究在慢性根尖肉芽肿中发现 TNF- α 的表达高于对照组, 与之前结果一致。

本研究发现在慢性根尖肉芽肿中 IL-34 的表达高于对照组。2013 年有学者报道牙周炎患者牙周膜细胞中 IL-34 的表达较高^[14]。CHEMEL 等^[15]证实 RA 患者的滑膜中 IL-34 的表达较健康人高, 本文的慢性根尖肉芽肿中 IL-34 表达较高, 与前两者一致。这可能是因为慢性根尖肉芽肿与牙周炎及类风湿性关节炎有共同特征 (均伴有炎性骨破坏) 有关。破骨细胞在骨改建中负责骨吸收, 核因子 κ B 受体活化因子配体和其配体结合后能够促进破骨细胞的增殖、分化及成熟, 促进骨吸收。集落刺激因子 (colony stimulating factor,

CSF-1) 与其配体结合后能够协同核因子 κ B 受体活化因子配体诱导破骨细胞的分化, 增加其活性。IL-34 和 CSF-1 拥有共同的配体。IL-34 可以代替 CSF-1 协同核因子 κ B 受体活化因子配体调节破骨细胞的分化成熟, 促进骨吸收。在类风湿关节炎患者血清中, IL-34 与核因子 κ B 受体活化因子配体的表达呈正相关, 且两者均与骨密度水平呈负相关。可以看出 IL-34 主要通过核因子 κ B 受体活化因子配体参与骨组织的破坏吸收。IL-34 在慢性根尖肉芽肿中对根尖骨组织的破坏可能与核因子 κ B 受体活化因子配体有关。

CHEMEL^[15] 和 HWANG 等^[16] 分别报道, 在类风湿性关节炎患者的滑膜组织及滑膜成纤维细胞中存在 IL-34 的表达, 且 TNF- α 可以促进 IL-34 的表达。RANKL 在慢性根尖周炎的骨破坏中扮演重要角色, TNF- α 、IL-34 可通过调节核因子 κ B 受体活化因子配体调节骨吸收。TNF- α 在慢性根尖肉芽肿中除可以直接通过核因子 κ B 受体活化因子配体调节骨破坏外, 还可能通过 IL-34 间接调节其活性, 调节炎性骨破坏^[17-18]。有学者发现, TNF- α 拮抗剂在临床上能有效减轻类风湿性关节炎患者的骨组织破坏^[19]。动物实验发现, TNF- α 拮抗剂可以减轻伴糖尿病小鼠的牙周炎症^[20]。本研究进一步揭示 TNF- α 在慢性根尖肉芽肿中的作用机制, 为后期临床应用 TNF- α 拮抗剂治疗慢性根尖肉芽肿提供一定的理论依据。

参 考 文 献:

- [1] KOIVISTO T, BOWLES W R, ROHRER M. Frequency and distribution of radiolucent jaw lesions: a retrospective analysis of 9723 cases[J]. *J Endod*, 2012, 38(6): 729-732.
- [2] KAWASHIMA N, SUZUKI N, YANG G, et al. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2007, 103(5): 707-711.
- [3] JAKOVLJEVIC A, KNEZEVIC A, KARALIC D, et al. Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: correlation with clinical and histological findings[J]. *Aust Endod J*, 2015, 41(2): 72-77.
- [4] YU Y Q, QU L, QIU L H, et al. Mechanism of TNF- α in bone defect of chronic apical periodontitis[J]. *Shanghai Journal of Stomatology*, 2016, 25(4): 414-419.
- [5] LIN H, LEE E, HESTIR K, et al. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome[J]. *Science*, 2008, 320(5877): 807-811.
- [6] KAWABEM, OHYAMA H, KATO-KOGOE N, et al. Expression of interleukin -34 and colony stimulating factor-1 in the stimulated periodontal ligament cells with tumor necrosis factor α [J]. *Medical molecular morphology*, 2015, 48(3): 169-176.
- [7] MA N, QU L, XU L Y, et al. Expression of IL-34 in chronic periapical lesions and its clinical significance[J]. *Shanghai Journal of Stomatology*, 2016, 25(1): 53-57.
- [8] NAKAMICHI Y, MIZOGUCHI T, ARAI A, et al. Spleen serves as a reservoir of osteoclast precursors through vitamin D-induced IL-34 expression in osteopetrotic op/op mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(25): 10006-10011.
- [9] 胡菊花, 李倩, 王艳青, 等. 白细胞介素 -21 和核因子 κ B 受体活化因子配体在人根尖囊肿和肉芽肿中的表达及临床意义 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2015, 3(3): 244-248.
- [10] LU G, LI F F, LI X M, et al. TNF- α and RANKL promote osteoclastogenesis by upregulating RANK via the NF- κ B pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 6605-6611.
- [11] WAN C Y, YUAN G H, YANG J W, et al. MMP9 deficiency increased the size of experimentally induced apical periodontitis[J]. *J Endod*, 2014, 40(5): 658-664.
- [12] HAO L, CHEN W, MCCONNELL M, et al. A small molecule, odanacatib, inhibits inflammation and bone loss caused by endodontic disease[J]. *Infect Immun*, 2015, 83(4): 1235-1245.
- [13] KIMAK A, STRYCHARZ-DUDZIAK M, BACHANEK T, et al. Lipids and lipoproteins and inflammatory markers in patients with chronic apical periodontitis[J]. *Lipids Health Dis*, 2015, 14(1): 162-182.
- [14] BOSTRÖM E A, LUNDBERG P. The newly discovered cytokine il-34 is expressed in gingival fibroblasts, shows enhanced expression by pro-inflammatory cytokines, and stimulates osteoclast differentiation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): DOI: 10.1371/journal.pone.0081665.
- [15] CHEMEL M, LE GOFF B, BRION R, et al. Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients[J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(1): 150-154.
- [16] HWANG S J, CHOI B, KANG S S, et al. Interleukin-34 produced by human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis supports osteoclastogenesis[J]. *Arthritis Res Ther* 2012, 14(1): R14.
- [17] 黄哲敏. 类风湿关节炎患者血清 IL-34 和 RANKL 水平变化及与骨质疏松的关系 [D]. 太原: 山西医科大学, 2015: 9-15.
- [18] ZHANG F, DING R, LI P, et al. Interleukin-34 in rheumatoid arthritis: potential role in clinical therapy[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(5): 7809-7815.
- [19] 吕倩, 刘惠杰, 邵平, 等. 肿瘤坏死因子 - α 拮抗剂对类风湿关节炎伴发骨质疏松患者骨密度及血清骨代谢标志物的影响 [J]. *南京医科大学学报 (自然科版)*, 2018(5): 696-698.
- [20] KIM J H, KIM A R, CHOI Y H, et al. Tumor necrosis factor- α antagonist diminishes osteocytic RANKL and sclerostin expression in diabetes rats with periodontitis[J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): DOI: 10.1371/journal.pone.0189702.

(李科 编辑)