

## 分泌型卷曲相关蛋白1及β-连环蛋白在慢性牙周炎患者牙龈组织中的表达

池毓坦 许春姣 孙晓娟 李冬梅 王宏峰 王苗苗 贺秀芳  
中南大学湘雅医院口腔医学中心, 长沙 410008

**[摘要]** 目的 检测分泌型卷曲相关蛋白1 (SFRP1) 及β-连环蛋白 (β-catenin) 在慢性牙周炎 (CP) 患者牙龈组织中的表达及相关性, 探讨经典Wnt/β-catenin信号通路在牙周炎发生发展中的作用。方法 选取CP患者28例 (CP组), 其中中度CP16例, 重度CP12例, 健康对照者12例 (正常组), 收集牙龈组织并记录探诊深度、出血指数及临床附着丧失水平。采用免疫组织化学技术检测SFRP1及β-catenin的表达, 双评分法评价阳性染色强度, SPSS 19.0软件进行统计分析。结果 正常组SFRP1及β-catenin的着色强度积分值分别为 $2.16 \pm 0.65$ 、 $1.12 \pm 0.51$ , CP组为 $3.57 \pm 0.45$ 、 $2.36 \pm 0.49$ , 其中中度CP组为 $3.61 \pm 0.40$ 、 $2.30 \pm 0.44$ , 重度CP组为 $3.52 \pm 0.52$ 、 $2.45 \pm 0.55$ 。CP组中SFRP1及β-catenin的表达较正常组升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。进一步比较, 正常组与中度、重度CP组间差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 但中度与重度CP组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。SFRP1与β-catenin着色强度的相关系数 $r = 0.657$  ( $P < 0.01$ )。两者的表达均与牙周临床指数相关, 其中SFRP1与探诊深度的相关性最明显 ( $r = 0.723$ ,  $P < 0.01$ ); β-catenin与出血指数的相关性最强 ( $r = 0.697$ ,  $P < 0.01$ )。结论 SFRP1及β-catenin在CP患者牙龈组织中的表达升高且与牙周破坏相关, 两者的异常表达可能促进牙周炎的发生发展。

**[关键词]** 慢性牙周炎; 分泌型卷曲相关蛋白1; β-连环蛋白

**[中图分类号]** R 781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2018.03.005

**Expression and significance of secreted frizzled-related protein 1 and β-catenin in gingival tissue of patients with chronic periodontitis** Chi Yutan, Xu Chunjiao, Sun Xiaojuan, Li Dongmei, Wang Hongfeng, Wang Miaomiao, He Xiufang. (Center of Stomatology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China)

Supported by: The Project-sponsored by Scientific Research Foundation for Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry of China [(2012)940]. Correspondence: Xu Chunjiao, E-mail: chunjiaoxu@126.com.

**[Abstract]** **Objective** This study aimed to investigate the expression and correlation of secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) and β-catenin in gingival tissues of patients with chronic periodontitis (CP). The role of the classical Wnt/β-catenin signaling pathway in the development of periodontitis was also explored. **Methods** Twenty-eight patients with CP (CP group) were enrolled in this study. Among them, 16 cases were moderate CP, and 12 demonstrated severe CP. Twelve healthy cases comprised the controls (normal group). Gingival tissue was collected, and the probing depth, bleeding index, and clinical attachment loss were recorded. The expression levels of SFRP1 and β-catenin were detected by immunohistochemistry, and staining intensity was evaluated by double scoring method. SPSS 19.0 was used for statistical analysis. **Results** The staining strength scores of SFRP1 and β-catenin were  $2.16 \pm 0.65$  and  $1.12 \pm 0.51$  in the normal group,  $3.57 \pm 0.45$  and  $2.36 \pm 0.49$  in the CP group,  $3.61 \pm 0.40$  and  $2.30 \pm 0.44$  in the moderate CP group, and  $3.52 \pm 0.52$  and  $2.45 \pm 0.55$  in the severe CP group, respectively. The expression of SFRP1 and β-catenin in the CP group was higher than that in the normal group ( $P < 0.01$ ). A significant difference was noted between the normal group and the moderate and severe CP groups ( $P < 0.01$ ) but none between the moderate and severe CP groups ( $P > 0.05$ ). A positive correlation was found between the expression of SFRP1 and β-catenin ( $r = 0.657$ ,

$P < 0.01$ ). The expression levels of β-catenin and SFRP1 were related to periodontal indexes. The correlation between the expression of SFRP1 and probing depth was most significant ( $r = 0.723$ ,  $P < 0.01$ ), as well as that between β-catenin and

**[收稿日期]** 2017-12-15; **[修回日期]** 2018-03-01

**[基金项目]** 教育部留学回国人员科研启动基金[教外司留(2012)940号]

**[作者简介]** 池毓坦, 硕士, E-mail: 337686520@qq.com

**[通信作者]** 许春姣, 教授, 博士, E-mail: chunjiaoxu@126.com

bleeding index ( $r=0.697, P<0.01$ ). **Conclusion** Patients with CP exhibit elevated expression of SFRP1 and  $\beta$ -catenin in gingival tissues, and this event is related to the degree of periodontal destruction. Abnormal expression of SFRP1 and  $\beta$ -catenin may promote the development of periodontitis.

**[Key words]** chronic periodontitis; secreted frizzled-related protein 1;  $\beta$ -catenin

近年来,经典Wnt通路与牙周炎的相关性研究越来越受到关注。Wnt蛋白通过与膜上的卷曲蛋白受体结合激活经典Wnt通路,促进细胞质内 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)的蓄积、入核,最终激活下游基因的转录<sup>[1]</sup>。有研究<sup>[2-3]</sup>指出,Wnt蛋白及其抑制因子在牙周组织中的异常表达与牙周炎的发生发展密切相关。

分泌型卷曲相关蛋白1(secreted frizzled-related protein 1, SFRP1)是一种分泌型糖蛋白,通过竞争性地结合Wnt蛋白抑制Wnt通路的激活<sup>[4]</sup>。本课题组前期研究<sup>[5]</sup>发现,SFRP1在慢性牙周炎(chronic periodontitis, CP)患者龈沟液中的表达升高,且与牙周破坏程度相关,提示其可能参与了牙周炎的发病过程。 $\beta$ -catenin是经典Wnt通路下游的核心调控因子,在细胞质内的表达是经典通路激活的重要环节。此外, $\beta$ -catenin还作为细胞间的黏附蛋白发挥作用。本研究拟检测CP患者牙龈组织中SFRP1及 $\beta$ -catenin的表达,研究两者的相关性以及与牙周临床指数的关系,进一步探讨SFRP1及经典Wnt通路在牙周炎发病机制中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

收集2016年9月—2017年2月就诊于中南大学湘雅医院口腔医学中心的CP患者及健康志愿者为研究对象,要求入选者知情同意,并通过医学伦理审核。纳入标准:无全身系统性疾病;无吸烟史或长期酗酒史;近3个月未服用免疫抑制剂、抗生素等;无累及牙龈的黏膜疾病,如口腔白斑、口腔扁平苔藓等;诊断为慢性牙周炎者,全口余留牙 $\geq 16$ 颗,且既往无系统牙周治疗史。排除标准:伴有全身系统性疾病;妊娠或哺乳期妇女;既往有正畸治疗史或有严重的错殆畸形。

选择CP患者28例(CP组),其中中度CP患者16例[临床附着丧失(clinical attachment loss, CAL)为3~4 mm,探诊深度(probing depth, PD) $> 4$  mm],重度CP患者12例(CAL $> 4$  mm, PD $> 6$  mm)。因轻度CP临床表现不严重且组织来源有限,未纳入研究。另外选择牙周健康者12例(正常组),要求临床检查无附着丧失及探诊出血,PD $< 3$  mm。

### 1.2 牙周记录与标本采集

采用龈上洁治术去除牙石,1周后记录全口PD、出血指数(bleeding index, BI)和CAL,取患者口内牙周破坏最严重患牙的牙龈组织(无合并根尖周疾病以及牙龈瘻管、脓肿等)。对照组标本取自拔除下颌第三磨牙或正畸牙过程中获取的牙龈组织。组织离体30 min内用10%甲醛溶液固定,石蜡包埋。

### 1.3 主要试剂及仪器

SFRP1兔抗人多克隆抗体、 $\beta$ -catenin兔抗人单克隆抗体(Abcam公司,美国),免疫组织化学试剂盒、DAB显色试剂盒(武汉谷歌生物技术公司),光学显微镜(LEICA公司,德国)等。

### 1.4 免疫组织化学染色

牙龈组织蜡块连续切片,切片厚度4  $\mu$ m,脱蜡复水,经乙二胺四乙酸抗原修复,3% $H_2O_2$ 封闭内源性过氧化物酶,一抗孵育(37  $^{\circ}C$ , 1 h),SFRP1及 $\beta$ -catenin的工作浓度均为1:200,生物素标记二抗孵育,DAB显色,复染,脱水封片。以PBS缓冲液代替一抗作阴性对照。

### 1.5 结果判定

高倍镜下(400 $\times$ )随机选择5个视野,采用双评分法,观察阳性染色细胞的百分比及着色程度:阳性染色细胞 $< 1\%$ 计0分,2%~20%计1分,21%~50%计2分, $> 50\%$ 计3分;着色程度为无着色计0分,浅着色计1分,深着色计2分。两者相加作为着色强度的积分值。

### 1.6 统计学分析

采用单因素方差分析比较着色强度;组间的两两比较采用Tukey法;SFRP1及 $\beta$ -catenin着色强度的相关性以及与牙周临床指标的关系采用Pearson相关性分析。采用SPSS 19.0软件进行统计分析,检验水准为双侧 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 基本资料及牙周临床指标的比较

CP组与正常组的年龄、PD、BI、CAL的差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),仅性别组成的差异无统计学意义( $P>0.05$ )(表1)。

### 2.2 SFRP1的免疫组织化学染色

正常组SFRP1在牙龈上皮细胞的细胞质中有浅



棕色的低水平表达,在上皮下组织中少有阳性表达。CP组的上皮表达与正常组相近,而在上皮下组织中的表达明显升高,阳性表达主要见于成纤维细胞、浸润的炎症细胞及血管内皮细胞(图1)。

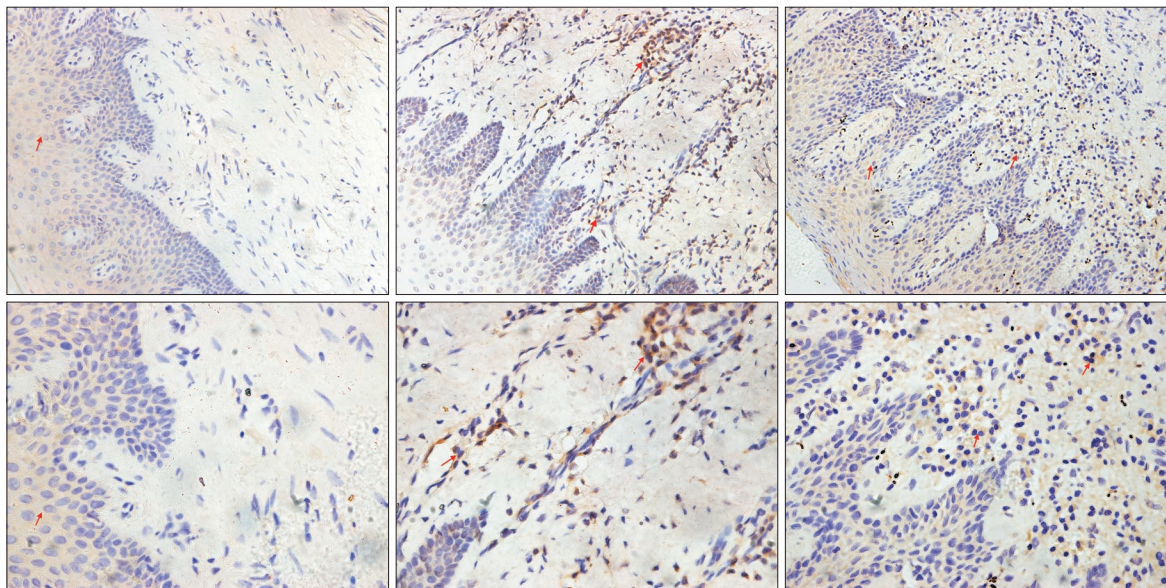
### 2.3 $\beta$ -catenin的免疫组织化学染色

$\beta$ -catenin在上皮细胞膜有明显的阳性表达,与其发挥细胞连接作用有关。在上皮下组织中,正常组无明显表达;CP组在部分成纤维细胞、内皮细胞以及炎症细胞中均有阳性表达,染色位于细胞质中(图2)。

表 1 两组间基本资料及牙周指数比较

Tab 1 Comparison of basic information and clinical periodontal indexes in two groups

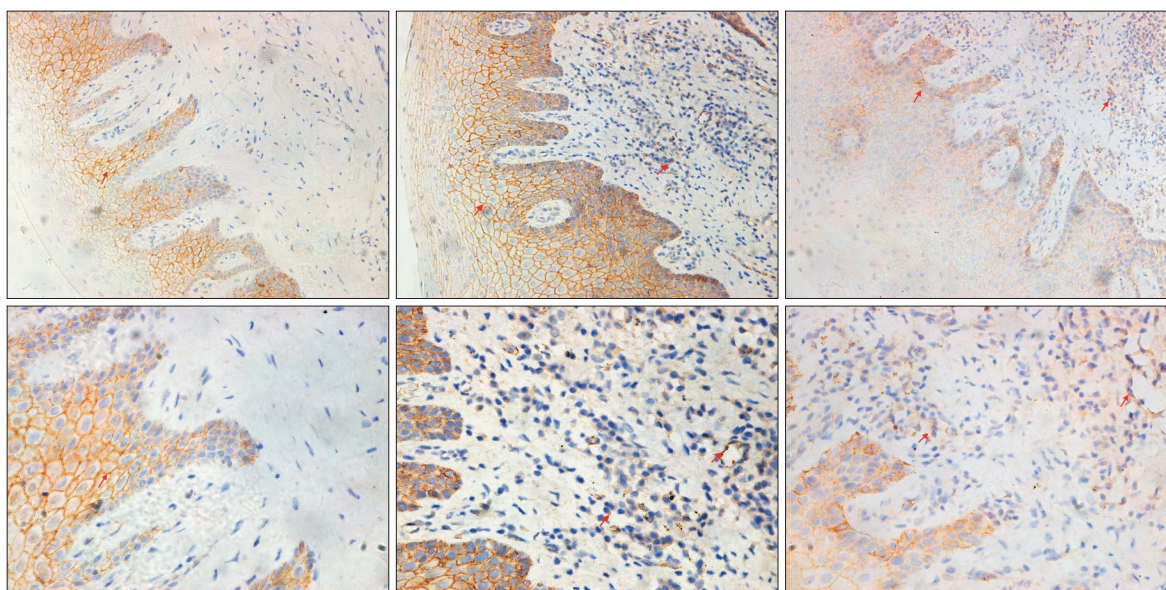
项目	CP组 (n=28)	正常组 (n=12)	P值
年龄/岁	38.11±8.29	32.40±3.98	<0.05
性别(男/女)	15/13	7/5	>0.05
PD/mm	4.09±1.66	1.73±0.22	<0.05
BI	3.30±0.71	0.25±0.20	<0.05
CAL/mm	4.08±1.66	0.12±0.37	<0.05



上:  $\times 200$ ; 下:  $\times 400$ ; 左: 正常组; 中: 中度CP组; 右: 重度CP组。箭头示SFRP1阳性。

图 1 SFRP1免疫组织化学染色 DAB

Fig 1 The immunohistochemistry staining of SFRP1 DAB



上:  $\times 200$ ; 下:  $\times 400$ ; 左: 正常组; 中: 中度CP组; 右: 重度CP组。箭头示 $\beta$ -catenin阳性。

图 2  $\beta$ -catenin免疫组织化学染色 DAB

Fig 2 The immunohistochemistry staining of  $\beta$ -catenin DAB

2.4 着色强度积分

CP组SFRP1及β-catenin的着色强度积分均较正常组升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.01$ ) (表2)。Turkey法两两比较, 结果见表3、4: 正常组与中度、重度CP组间SFRP1及β-catenin表达的差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ ), 中度与重度CP组的差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

表 2 SFRP1和β-catenin在CP组和正常组中的着色强度比较

Tab 2 Staining intensity of SFRP1 and β-catenin in CP group and control group

组别	着色强度	
	β-catenin	SFRP1
正常	1.12±0.51	2.16±0.65
CP	2.36±0.49*	3.57±0.45*

注: \*CP组与正常组相比,  $P<0.01$ 。

表 3 SFRP1着色强度在各组间的多重比较

Tab 3 Multiple comparisons between the staining intensity of SFRP1 in CP groups and control group

组别	积分值	P值 (两两比较)			方差分析	
		正常	中度CP	重度CP	F值	P值
正常	2.16±0.65	-	<0.01*	<0.01**	28.36	<0.01
中度CP	3.61±0.40	<0.01*	-	0.875 <sup>Δ</sup>		
重度CP	3.52±0.52	<0.01**	0.875 <sup>Δ</sup>	-		

注: \*正常组与中度CP组比较,  $P<0.01$ ; \*\*正常组与重度CP组比较,  $P<0.01$ ; <sup>Δ</sup>中度CP组与重度CP组比较,  $P>0.05$ 。

表 4 β-catenin着色强度在各组间的多重比较

Tab 4 Multiple comparisons between the staining intensity of β-catenin in CP groups and control group

组别	积分值	P值 (两两比较)			方差分析	
		正常	中度CP	重度CP	F值	P值
正常	1.12±0.51	-	<0.01*	<0.01**	23.57	<0.01
中度CP	2.30±0.44	<0.01*	-	0.71 <sup>Δ</sup>		
重度CP	2.45±0.55	<0.01**	0.71 <sup>Δ</sup>	-		

注: \*正常组与中度CP组比较,  $P<0.01$ ; \*\*正常组与重度CP组比较,  $P<0.01$ ; <sup>Δ</sup>中度CP组与重度CP组比较,  $P>0.05$ 。

2.5 SFRP1与β-catenin的相关性分析

SFRP1与β-catenin在各组牙龈组织中着色强度的总体均值分别为3.20±0.80和2.04±0.74, 采用Pearson相关分析法进行分析, 两者的相关系数 $r=0.657$  ( $P<0.01$ ), 可以说两者在牙龈组织中的表达呈正相关。

2.6 SFRP1及β-catenin与牙周临床指数的相关性分析

SFRP1及β-catenin的阳性着色强度与牙周临床

指数的相关性分析见表5: SFRP1及β-catenin的着色强度与牙周临床指数均有相关性, 其中SFRP1与PD的相关性最明显 ( $r=0.723, P<0.01$ ), β-catenin与BI的相关性最明显 ( $r=0.697, P<0.01$ )。

表 5 SFRP1及β-catenin着色强度与牙周临床指数的相关性分析

Tab 5 The correlations between the staining intensity of β-catenin and SFRP1 and clinical periodontal indexes

牙周临床指标	r值		P值
	SFRP1	β-catenin	
PD	0.723	0.620	<0.01
CAL	0.631	0.610	<0.01
BI	0.715	0.697	<0.01

3 讨论

CP是以菌斑刺激为始动因素的慢性感染性疾病, 炎症导致的牙槽骨破坏是最主要的病理表现之一。经典Wnt通路参与了机体的骨质代谢、免疫反应等过程的调节, 在牙周稳态的维持中可能发挥重要作用。研究<sup>[6]</sup>指出, 经典Wnt通路的激活能够促进成骨细胞相关基因的表达, 增强碱性磷酸酶的活性及矿化结节的产生。SFRP1通过抑制经典Wnt通路的表达, 影响骨质代谢的过程。在骨质疏松、类风湿性关节炎等骨破坏疾病中, SFRP1的表达升高与骨丧失及活动期的骨破坏有关<sup>[7-8]</sup>。

本研究发现, SFRP1在CP患者牙龈组织中的表达升高, 且与牙周破坏程度相关。作为分泌型的糖蛋白, SFRP1在牙龈组织中的高表达可能通过组织扩散、血液循环等途径影响牙槽骨的成骨与破骨活动。Li等<sup>[9]</sup>发现, SFRP1在牙周组织中的表达与成骨细胞、成纤维细胞及炎症细胞的凋亡有关, 外源性地拮抗SFRP1的表达可减轻牙周组织破坏。SFRP1的组织表达升高可能使牙槽骨中成骨相关基因的表达沉默, 促进成骨细胞的凋亡, 可能是导致牙槽骨破坏的重要因素。

免疫组织化学的组织定位显示, SFRP1以及β-catenin在炎症细胞、成纤维细胞及内皮细胞中有明显的阳性表达, 提示经典Wnt通路参与了牙周炎症及免疫反应的调节。已有的研究<sup>[10]</sup>指出, 在不同组织细胞或免疫反应阶段, 经典Wnt通路可能发挥抗炎和促炎的双重作用。一方面, 内皮细胞经典Wnt通路的激活能够抑制中性粒细胞及巨噬细胞的跨血管迁移, 抑制急性期的炎症反应<sup>[11]</sup>; 另一方面, 经



典Wnt通路参与调节辅助性T细胞的分化成熟,  $\beta$ -catenin的细胞质表达可通过核因子- $\kappa$ B信号通路影响炎症因子的释放<sup>[12]</sup>。目前, 经典Wnt通路在调节牙周炎症中的作用仍少有研究。本研究观察到, SFRP1及 $\beta$ -catenin在炎症相关细胞中的表达呈正相关, 两者的表达可能相互影响。

经典Wnt通路受到多种因素的复杂调控, SFRP1抑制经典通路可导致 $\beta$ -catenin的细胞质内降解和低表达。但本研究发现, 高表达SFRP1的炎症细胞及成纤维细胞中 $\beta$ -catenin的表达也明显升高, 这提示 $\beta$ -catenin在细胞质内的表达不只受到SFRP1的单一调控。有研究<sup>[3]</sup>指出, Dickkopf 1、Sclerostin、Wnt5a等Wnt调节因子在牙龈组织中的表达也明显升高, 且与牙周破坏相关。另有研究指出, 在结肠癌组织中经典通路的激活可以导致Wnt抑制因子DKK1的表达升高, 提示经典Wnt通路中存在负反馈调节的可能<sup>[13]</sup>。

牙周临床指数(PD、BI、CAL)与SFRP1及 $\beta$ -catenin的表达具有明显的相关性。PD、BI值的升高常指示着牙周袋内存在较重的厌氧菌感染及炎症反应, 而未控制的深牙周袋(PD>5 mm)是导致进行性牙槽骨吸收和CAL加重的危险因素。免疫组织化学染色显示, SFRP1及 $\beta$ -catenin的表达与炎症浸润程度有关, 这可能解释了与牙周临床指数的相关性。

本研究探讨了SFRP1及 $\beta$ -catenin在牙龈组织中的表达及相关性, 但对牙周骨代谢的影响还需进一步研究证实, 经典Wnt通路在调节牙周炎症中的作用也有待进一步研究。

#### [参考文献]

[1] Duan P, Bonewald LF. The role of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 77(Pt A): 23-29.  
[2] Maekawa T, Kulwattanaporn P, Hosur K, et al. Differential expression and roles of secreted frizzled-related protein 5 and the wingless homolog Wnt5a in periodontitis[J]. *J Dent Res*, 2017, 96(5): 571-577.  
[3] Napimoga MH, Nametala C, da Silva FL, et al. Involvement of the Wnt- $\beta$ -catenin signalling antagonists, sclerostin and dickkopf-related protein 1, in chronic periodontitis[J]. *J Clin*

*Periodontol*, 2014, 41(6): 550-557.  
[4] Esteve P, Bovolenta P. The advantages and disadvantages of sfrp1 and sfrp2 expression in pathological events[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2010, 221(1): 11-17.  
[5] 袁海波, 金晶, 许春姣, 等. 分泌型卷曲相关蛋白1与慢性牙周炎的相关分析[J]. *华西口腔医学杂志*, 2013, 31(6): 615-618.  
Yuan HB, Jin J, Xu CJ, et al. Exploring the relationship between secreted frizzled-related protein 1 and chronic periodontitis[J]. *West Chin J Stomatol*, 2013, 31(6): 615-618.  
[6] Boudin E, Fijalkowski I, Piters E, et al. The role of extracellular modulators of canonical Wnt signaling in bone metabolism and diseases[J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2013, 43(2): 220-240.  
[7] Wang FS, Lin CL, Chen YJ, et al. Secreted frizzled-related protein 1 modulates glucocorticoid attenuation of osteogenic activities and bone mass[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(5): 2415-2423.  
[8] Matzelle MM, Gallant MA, Condon KW, et al. Resolution of inflammation induces osteoblast function and regulates the Wnt signaling pathway[J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(5): 1540-1550.  
[9] Li CH, Amar S. Inhibition of SFRP1 reduces severity of periodontitis[J]. *J Dent Res*, 2007, 86(9): 873-877.  
[10] Jang J, Ha JH, Chung SI, et al. Beta-catenin regulates NF-kappaB activity and inflammatory cytokine expression in bronchial epithelial cells treated with lipopolysaccharide [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(2): 632-638.  
[11] Tickenbrock L, Schwable J, Strey A, et al. Wnt signaling regulates transendothelial migration of monocytes[J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 79(6): 1306-1313.  
[12] Ma B, Hottiger MO. Crosstalk between Wnt/beta-Catenin and NF-kappaB signaling pathway during inflammation[J]. *Front Immunol*, 2016(7): 378.  
[13] Guo H, Nagy T, Pierce M. Post-translational glycoprotein modifications regulate colon cancer stem cells and colon adenoma progression in Apc(min/+) mice through altered Wnt receptor signaling[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(45): 31534-31549.

( 本文编辑 吴爱华 )