

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 90-2314-B-038-035-

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人：呂炫 教授 臺北醫學大學牙醫學系系主任

共同主持人：郭彥彬教授 臺大醫學院臨床牙醫學研究所

吳銘芳組長 臺大醫學院實驗動物中心研發組

計畫參與人員：黃萬騰醫師 臺北醫學大學口腔復健醫學研究所研究生

一.中文摘要

本研究目的是比較男性荷爾蒙接受體 (Androgen receptor, AR) 在健康 (H) 者 (PD $\leq$ 3mm, 年齡 30~47 歲)、牙周炎患者 (P) (PD $\geq$ 5mm, 年齡 28~55 歲) 的發炎組織內與因尼菲迪平 (Nifedipine) 引發牙齦增生患者 (NIGO), (PD $\geq$ 5mm, 年齡 51~63 歲) 的表現情形。在與患者充分溝通實驗流程後, 分別記錄病人牙齒之臨床牙周參數: 牙周囊袋深度 (probing depth), 探測出血點百分比 (bleeding on probing) 與牙菌斑之百分數。經由牙周手術取出牙齦標本並固定於緩衝弗馬林中。利用 LSAB[®] 免疫染色方法標定出組織內的男性荷爾蒙接受體。經由顯微鏡下觀察並計算 AR 呈現陽性細胞數目, 統計方法使用 Kruskal-Wallis test 和 Mann-Whitney U-test 分析。實驗結果顯示 AR 陽性細胞分布於在 H、P 和 NIGO 三組的表皮層內的基底層、棘皮層、與結締組織內的血管內皮細胞與牙齦纖維母細胞之浸潤發炎細胞中。**NIGO 組的牙齦組織內免疫染色 AR 陽性的表皮細胞, 炎性細胞, 與牙齦纖維母細胞數目各為 (58.6 $\pm$ 2.3; 81.3 $\pm$ 2.2; 32.7 $\pm$ 2.8); 而 P 組則各為 (49.3 $\pm$ 4.6; 69.6 $\pm$ 12.8; 15.2 $\pm$ 2.3) 和 H 組各為 (38.5 $\pm$ 4.6;**

66.1 $\pm$ 11.8; 6.5 $\pm$ 1.1), 其中唯以 NIGO 組之三個數據與其他兩組比較, 具有明顯統計學上的差異 (P<0.01)。基於以上的發現, 我們推測男性荷爾蒙在尼菲迪平引發牙齦增生的疾病進程中可能扮演一個重要的角色。

關鍵詞: 尼菲迪平, 牙齦增生, 男性荷爾蒙接受體, 牙周炎, 免疫染色。

Abstract

The purpose of this study was to compare the androgen receptor positive cell (AR+ cell) in the inflammatory tissues of patients with adult periodontitis with PD $\geq$ 5mm, (n=15, age range 28-55) and nifedipine induced gingival overgrowth (NIGO) with probing depth (PD) $\geq$ 5mm, (n=5, age range 51-63). After full ethical approval of patient, the clinical periodontal parameters - pocket depth (PD), bleeding on probing (BOP), and plaque index (%) were measured. Gingival samples were harvested during periodontal surgery and fixed in buffered formalin. Gingival biopsies were further processed for immunohistochemical stain with primary antibody of rabbit anti-human AR antibody by using LSAB[®] method. The expression of AR positive cells was counted using grid scan by semiquantitative method. The Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U-test were employed for the statistical analysis. The results revealed that AR

was intensively expressed in the nuclei of basal epithelial cells, spinosal cells, surface epithelial cells, inflammatory cells, and gingival fibroblasts. Strong expression of AR +cell was also found in the NIGO group. The number of AR labeled cells was significantly higher in the epithelial cells and gingival fibroblasts of the NIGO group than in the periodontitis group and control ($P < 0.01$). Based on these findings we postulated that androgen might play an important role in the progression of NIGO.

Key word : nifedipine, gingival overgrowth, androgen receptor, periodontitis, immunohistochemistry.

二.緣由與目的

性賀爾蒙在體內扮演一個重要的角色，性賀爾蒙除了會引導第二性徵的分化與個體的成熟，此外性賀爾蒙也有可能影響人體內的恆定與免疫系統的調控¹。男性荷爾蒙接受體 (Androgen) 包括了 testosterone (高脂酮) 和 5α 二水高脂酮 (5α -dihydrotestosterone)。androgen 在標的細胞 (target cell) 作用上主要是靠著在細胞上的 androgen receptor (AR) 直接調控基因的表現²。

關於口腔組織內 AR 的研究，Formicola³ 等學者利用 ^3H 同位素標定出 AR 確定存在於實驗鼠的牙齦組織內，而 Southren⁴、Rappaport⁵、和 Vittek⁶ 更進一步利用 ^3H 同位素發現，在人體的牙齦組織內有 AR 的存在^{4,5}；Southern 等學者更發現在服用 phenytoin 或是懷孕性牙齦炎的牙齦組織內 AR 的含量比起正常的組織高出 9-12 倍之多⁶。但在牙周發炎組織 (periodontal inflammatory tissue) 及因 nifedipine 引發牙齦增生病人組織 AR 的分布至今仍無文獻佐證。因此本研

究的目的是利用免疫染色的方式來探討因尼菲迪平引發牙齦增生 (nifedipine induced gingival overgrowth; NIGO) 與牙周炎組織中 AR+cells 之分佈狀況及 AR 可能扮演的角色，並進一步建立模式與解釋 NIGO 引發牙周腫大之可能機制。

三.結果

病人臨床資料顯示 H、P、NIGO 組在經過口腔衛生教育後，plaque control record 並無顯著差異 ($p > 0.01$)。P 與 NIGO 組的 PPD 與 BOP 百分比兩者並無顯著差異 ($p > 0.01$ ，表 1)。

免疫染色結果顯示，AR+cells 存在於口腔內的牙齦組織的基底層 (stratum basale) 與棘皮層 (stratum spinosum)。在牙齦結締組織內，牙齦纖維母細胞層 (gingival fibroblast)，與浸潤於結締組織內的發炎細胞層 (inflammatory cell) 中皆成現 AR+cell 分布之狀態。臨床資料顯示 P 組與 NIGO 組的 PPD 與 BOP 百分比並無顯著差異，但組織顯微切片統計結果顯示 NIGO 組之 AR+細胞計算數量於上皮組織內的表皮細胞層與結締組織內的牙齦纖維母細胞層的表現上，皆大於 P 組與 H 組的牙齦且達到統計上的差異 ($p < 0.01$) (表 2)。NIGO 組於結締組織內的發炎細胞中 AR+細胞計算數量雖然數量上皆大於 P 組與 H 組的牙齦，但並未達到統計上的差異 ($p > 0.01$)。

圖 1 (A)(B) 各顯示 H 組與 P 組的牙齦組織內 AR+cell 的分布情形，結果顯示 P 組的 AR 表現比起 H 組健康的牙齦組織免疫染色強度為強，呈現 AR+cell 較多。P 組的上皮組

織中的基底層、棘皮層，結締組織內的牙齦纖維母細胞以及發炎細胞 (inflammatory cell) 群中 AR+cell 計算數量均較 H 組的牙齦為高，而且沒有性別上的差異 (表 2)。

圖 2 顯示 NIGO 組無論是結締組織內的牙齦纖維母細胞以及發炎細胞 (inflammatory cell) AR+cell 計算數量均較 P 組與 H 組的牙齦高，並且沒有性別上的差異。

四. 討論 (Discussion)

由本實驗結果顯示，NIGO 中，病人的牙周狀態雖然接受過牙周基本治療，但並未完全能使牙齦腫大的現象消失。可能在 NIGO 中，藥物扮演一個重要的角色。藥物加上牙齦發炎的程度，可能活化組織中增生的機制進而引發牙齦增生。

本實驗中發現 P 組、NIGO 組病人 AR+cell 的數量上，皆高於 H 組且男性與女性病人並無顯著差異。本研究結果顯示與 Sooriyamoorthy⁷、Ojanotko⁸ 的發現相似，或許 AR+cell 數量似乎與 androgen 的代謝量有正相關的效應，當組織內 androgen 的含量增加時，可能會活化細胞的 AR 以進行細胞內的生理調控。由本實驗得知，NIGO 組各項臨床參數與 P 組並無統計上的差異下，而表皮細胞與牙齦纖維母細胞 AR+cell 的數量均較 H 組、P 組為高，由此可推論 AR+cell 數量增高，可進而調控 AR+cell 細胞內 DNA 之轉錄，調控周圍細胞並產生更多蛋白質與聚醣體，因而造成牙齦腫大。而 androgen 與 AR 之間正或負相關的調控機制與性別對於 androgen 與 AR 之間的相互影響則須進一步的研究。Cutolo 等學者在於罹患

Rheumatoid Arthritis (RA) 病人血液中白血球與 androgen 關係機制的表現上，發現 androgen 與 adrenal androgen (DHEA) 對於 monocyte、macrophage、和 T lymphocyte 有免疫抑制 (immunosuppression) 的現象⁹。又如從男性 RA 病人的白血球細胞培養的研究 (cell culture) 上，發現 testosterone 有抑制 macrophage 生成 IL-1 β 分泌的現象¹⁰。由本實驗的結果顯示，NIGO 組之浸潤結締組織內的發炎細胞其 AR+cell 的計算數量較 P 組與 H 組為高，因此在 P 組與 NIGO 組同為發炎的組織中，NIGO 組的 androgen 與 AR 活性較強，或許是 androgen 與 AR 可抑制鄰近之 fibroblast 產生 IL-1，間接抑制或破壞 IL-1 對於 collagen 新成代謝的機轉，因而導致牙齦增生的現象。

本實驗結果顯示牙齦纖維母細胞 AR+cell 數量上在 NIGO 組高於 H 組 5 倍之多，而 androgen 位於牙齦纖維母細胞在組織內之 collagen 的調節可能佔有一個重要的角色。有關 Kasasa 等學者於牙齦纖維母細胞與 androgen 方面的研究上指出，當牙齦纖維母細胞受到一定量的 androgen 刺激後，牙齦纖維母細胞分泌的生長因子 (growth factor) TGF- β 1 與 PDGF 的量增加^{11,12}。James 等學者觀察在因 cyclosporine 引發牙齦增生組織中也發現 TGF- β 1 免疫染色陽性的細胞數量較正常牙齦組織為高¹³。因此我們推測於 NIGO 中，androgen 可能會影響 cytokine 與 growth factor 的分泌，進而調控組織內 collagen 或 GAG 蛋白質之生成機轉，因而導致牙齦增生，但仍然需要更進一步的研究¹⁴。

五.參考文獻

1. Sooriyamoorthy M, Gower DB. Hormonal influences on gingival tissue: relationship to periodontal disease. *J Clin Periodontol*,16: 201-208,1989.
2. Brinkmann AO, Jenster G, Ris-Stalpers C, van der Korput JA, Brüggewirth HT, Boehmer AL, Trapman J. Androgen receptor mutations. *J Steroid Biochem Molec Biol*, 53:443-448,1995.
3. Formicola AJ, Weatherford T 3rd, Grupe H. The uptake of ³H-estradiol by oral tissues of rats. *J of Periodont Res*, 5:269-275, 1970.
4. Southern AL, Rappaport SC, Gordon GG, Vittek J. Specific 5 α -dihydrotestosterone receptors in human gingiva. *J Clin Endocrinol Metab*, 47:1378-1382,1978.
5. Rappaport SC, Vittek J, Altman K, Gordon GG & Southren AL. Sex differences in the metabolism of androgens by human gingiva. *J Dent Res*, 55:1371,1976.
6. Vittek J, Rapport SC, Gordon GG, Munnangi PR, Southren AL. Concentration of circulating hormones and metabolism of androgens by human gingiva. *J Periodontol*, 50:255-264,1979
7. Sooriyamoorthy M, Gower DB. Hormonal influences on gingival tissue: relationship to periodontal disease, *J Clin Periodontol*. 16:201-208,1989.
8. Ojanotko A, Nienstedt W, Harri MP. Metabolism of testosterone by human healthy and inflamed gingiva in vitro. *Archs Oral Biol*, 25:481-484,1980.
9. Cutolo M, Castagnetta L. Immunomodulatory mechanisms mediated by sex hormones in rheumatoid arthritis. *Annals New York Academy of Science*, 732:236-251,1998.
10. Zava DT, McGuire WL. Androgen action through estrogen receptor in a human breast cancer cell line. *Endocrinology*, 103:624-631, 1978.
11. Kasasa SC, Soory M. The effect of PDGF, TGF-beta and IGF in combination of androgen metabolism by fibroblasts. *J Clin Periodontol*, 25:640-646,1998.
12. Kasasa SC, Soory M. The synthesis of 5-alpha dihydrotestosterone from androgens by human gingival tissues and fibroblasts in culture in response to TGF-beta and PDGF. *J Periodont Res*, 31:313-322,1996.
13. James JA, Irwin CR, Linden GJ. Gingival fibroblast response to cyclosporine A and transforming growth factor beta1. *J Periodont Res*, 33:40-48,1998.
14. Modeer T, Mendez C, Dahllof G, Anduren I, Andersson G. Effect of phenytoin medication on the metabolism of epidermal growth factor receptor in culture gingival fibroblasts. *J Periodont Res*, 25:120-127,1990.

表 1. 控制組、牙周病組及因服用尼非迪平引發牙齦增生組病人的基本生理資料

與臨床牙周參數數值

Biographical and periodontal clinical characteristics of the subjects with healthy, treated periodontitis, and nifedipine group.

	Healthy group	Treated periodontitis group	nifedipine group
n	10	15	5
Mean age and range(years)	39.3 (30~47)	42.4 (28~55)	58.2 (51~63)
Male/female	5/5	7/8	3/2
PD(mm)(Mean±SE)†	2.2±0.7	5.3±0.6	6.0±0.7
BOP(%)(Mean±SE)†	4.8±7.7	72.8±11	72.8±15.2
Plaque(%)(Mean±SE)*	15.9±2.5	17.9±5.5	17.2±3.1

PD=probing depth ; BOP=bleeding on probing

*O'Leary plaque control record ;

Kruskal –Wallis test $p>0.01$

†Mann Whitney U-test : $p>0.01$

nifedipine versus periodontitis group

表 2. 男性荷爾蒙接受體在表皮與結締組織數量分布情形

Distribution of androgen receptor positive cells in the epithelium and

connective tissue

zone	Healthy group	Treated periodontitis group	Nifedipine group	P value*
n	10	15	5	
Epithelial cell (%)	38.5±4.6	49.3±4.6	58.6±2.3†	0.0002*
Inflammatory cell (%)	66.1±11.8	69.6±12.8	81.3±22	0.056
Gingival fibroblast (no./0.1mm ²)	6.5±1.1	15.2±2.3	32.7±2.8†	0.0000*

Mean ± S.D

*Kruskal-Wallis test: $p<0.01$

†Mann-Whitney U-test: $p<0.01$

Nifedipine versus treated periodontitis and healthy group

圖 1. H 組 (A) 與 P 組 (B) 免疫染色 AR positive cell 於結締組織內的分布情形 (150 倍; Immunoperoxidase stain)

Localization of AR positive cell in the connective tissue of healthy and periodontitis group (150X; Immunoperoxidase stain)

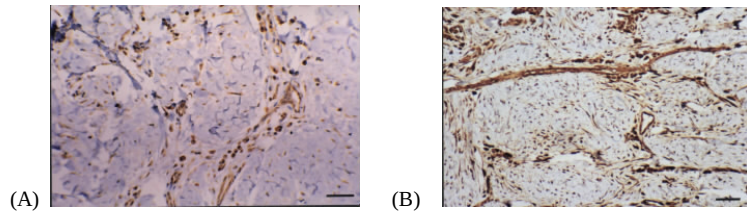
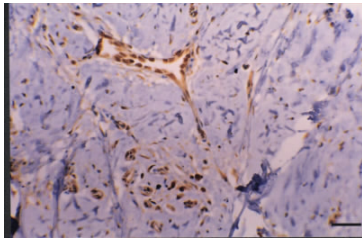


圖 2.因尼菲迪平引發牙齦增生組免疫染色 AR positive cell 於結締組織內的分布情形（150 倍；Immunoperoxidase stain）

Localization of AR positive cell in connective tissue of nifedipine induced gingival overgrowth group (150X ; Immunoperoxidase stain)



附件：封面格式

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

Nifedipine 引發牙齦腫大之炎性牙齦組織中鞣固酮接受器之分佈與表現

Androgen receptors in adult periodontitis and nifedipine induced gingival overgrowth Running title: Immunoassay of AR in periodontitis and NIGO

計畫類別：☒個別型計畫 ☐整合型計畫

計畫編號：NSC90-2314-B-038-035-

執行期間： 90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

計畫主持人：呂炫 教授 臺北醫學大學牙醫學系系主任

共同主持人：郭彥彬教授 臺大醫學院臨床牙醫學研究所

吳銘芳組長 臺大醫學院實驗動物中心研發組

計畫參與人員：黃萬騰醫師 臺北醫學大學口腔復健醫學研究所研究生

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- ☐赴國外出差或研習心得報告一份
- ☐赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- ☐出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- ☐國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：私立臺北醫學大學牙醫學系

中 華 民 國 91 年 08 月 19 日